

active caspase-3 can cause membrane blebbing, disassembly of the cell structure and DNA fragmentation, which eventually lead to cell death. Some initiator caspases, such as caspase 9, can activate procaspase 3, which then can cleave the cellular substrates needed for the orchestration of apoptosis and form a “wheel of death”^[8-10]. Recent data have shown that apoptosis, especially the caspase-mediated cell death, plays an important role in the etiology, pathogenesis, and therapy of a variety of hematological malignancies such as acute leukemia, and cytotoxic effects of most anti-leukemia drugs are based on induction of apoptosis^[11]. All these studies indicate that induction of apoptosis may be a index for new antitumor drug selection and an important method of assesement for the clinical effectiveness of many anti-leukemia drugs^[12].

In summary, the results demonstrate that oridonin can induce apoptosis in NB4 cells via activation of caspase-3. This indicates that oridonin may be an important potential anti-leukemia reagents.

Acknowledgments: We thank the members of our laboratories for their insight and technical support.

References:

- [1] Wang N, Xie G X, Shi X H, *et al.* Study on extracting and separating of oridonin in *Rabdosia rubescens* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(10): 901-902.
- [2] Han Q B, Li M L, Li S H, *et al.* Ent-kaurane diterpenoids from *Isodon rubescens* var. *lushanensis* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51(7): 790-793.
- [3] Kezoc T, Chen S S, Tong X J, *et al.* Oridonin induces growth inhibition and apoptosis of a variety of human cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2003, 23(4): 1187-1189.
- [4] Beauparlant P, Shore G C. Therapeutic activation of caspases in cancer: a question of selectivity [J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2003, 6(2): 179-187.
- [5] Thorburn A. Death receptor-induced cell killing [J]. *Cell Signal*, 2004, 16(2): 139-144.
- [6] Qi S N, Yoshida A, Wang Z R, *et al.* GP7 can induce apoptotic DNA fragmentation of human leukemia cells through caspase-3-dependent and -independent pathways [J]. *Int J Mol Med*, 2004, 13(1): 163-167.
- [7] Liu J J, Pan X L, Wu X Y, *et al.* Inhibitory effect and mechanism of oridonin on Raji cells proliferation [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(7): 287-290.
- [8] Denault J B, Salvesen G S. Caspases: keys in the ignition of cell death [J]. *Chem Rev*, 2002, 102 (12): 4489-4500.
- [9] Boatright K M, Salvesen G S. Caspase activation [J]. *Biochem Soc Symp*, 2003, (70): 233-242.
- [10] Philchenkov A A. Caspases as regulators of apoptosis and other cell functions [J]. *Biochemistry*, 2003, 68(4): 365-376.
- [11] Smolewski P, Darzynkiewicz Z, Robak T. Caspase-mediated cell death in hematological malignancies: theoretical considerations, methods of assessment, and clinical implications [J]. *Leuk Lymphoma*, 2003, 44(7): 1089-1104.
- [12] Beauparlant P, Shore G C. Therapeutic activation of caspases in cancer: a question of selectivity [J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2003, 6(2): 179-187.

雷公藤甲素对胶原诱导的关节炎大鼠关节局部热休克蛋白和主要组织相容性复合体 I 类分子表达的影响

涂胜豪, 胡永红, 曾克勤, 张明敏, 赖先阳, 张玮琛

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 中西医结合科, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 观察雷公藤甲素对胶原诱导的关节炎大鼠关节局部热休克蛋白 (HSPs) 和主要组织相容性复合体 I 类分子 (MHC-I) 表达的影响。方法 建立胶原诱导的关节炎大鼠模型, 雷公藤甲素按 40 $\mu\text{g/kg}$ im 给药, 运用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 和免疫酶组织化学染色的方法, 观察大鼠关节滑膜细胞和软骨细胞 HSP60、HSP70 和 MHC-I 类分子的表达情况。结果 与正常对照组相比, 模型组大鼠关节滑膜细胞及软骨细胞 HSP60、HSP70 和 MHC-I 类分子的表达均显著增高 ($P < 0.05$), 与模型组相比, 雷公藤甲素可以下调关节炎大鼠关节局部 HSP60、HSP70 和 MHC-I 类分子的表达 ($P < 0.05$)。结论 降低关节炎大鼠关节局部软骨细胞和滑膜细胞异常表达的 HSPs 与 MHC-I 类分子的表达, 可能是雷公藤甲素治疗类风湿关节炎 (RA) 的作用机制之一。

收稿日期: 2004-12-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070961)

作者简介: 涂胜豪 (1965—), 男, 湖北武汉人, 硕士, 华中科技大学同济医学院附属同济医院副教授, 硕士生导师, 主要从事中西医结合治疗风湿病研究。 Tel: (027) 83663379 E-mail: shtu@tjh.tjmu.edu.cn

关键词:雷公藤甲素;胶原诱导的关节炎;类风湿关节炎;热休克蛋白;主要组织相容性复合体

中图分类号:R286.11

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)08-1193-04

Effects of triptolide on expression of heat shock proteins and major histocompatibility- I molecule in synoviocytes and chondrocytes of collagen-induced arthritis rats

TU Sheng-hao, HU Yong-hong, ZENG Ke-qin, ZHANG Ming-min, LAI Xian-yang, ZHANG Wei-chen

(Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College,

Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of triptolide on the expression of heat shock proteins (HSPs) and major histocompatibility- I (MHC- I) molecule in synoviocytes and chondrocytes of collagen-induced arthritis rats. **Methods** The experimental Wistar rat model of collagen-induced arthritis was established. The rats in triptolide group were administered with triptolide at 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ by im. The expression of HSP60, HSP70, and MHC- I molecule in synoviocytes and chondrocytes was detected by RT-PCR and immunohistochemical staining. **Results** To compare with normal group, the expression of HSPs and MHC- I molecule increased remarkably in synoviocytes and chondrocytes of model rats ($P < 0.05$). Triptolide could reduce the expression of these molecules in inflammatory joints rats ($P < 0.05$). **Conclusion** Triptolide may play its curative role via down-regulating the expression of HSPs and MHC- I molecule in synoviocytes and chondrocytes of rheumatoid arthritis (RA).

Key words: triptolide; collagen-induced arthritis; rheumatoid arthritis (RA); heat shock proteins (HSPs); major histocompatibility (MHC)

异常的自身免疫过程可能是类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)发病机制之一。热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)是一种应激蛋白,广泛存在于人、动物、微生物和植物细胞内。HSPs 同源保守序列及其特定的结构、功能与风湿性疾病、感染性自身免疫过程相关^[1,2]。许多研究显示,RA 的发生与主要组织相容性复合体(MHC)密切相关^[3]。因此,通过恢复 RA 患者异常表达的 HSPs 和 MHC 至正常水平,可能是药物发挥治疗作用的环节之一。雷公藤药用部位为卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 的根,具有抗炎、免疫抑制、抗肿瘤和抗生育等多种药理作用,是临床治疗 RA 的有效药物之一。雷公藤甲素是雷公藤的有效药理成分之一。以往研究往往局限于雷公藤及其有效成分对 T、B 细胞增殖、细胞因子的表达和凋亡的影响,而忽视了对 T、B 细胞活化增殖的始动环节影响的探讨。本实验通过建立胶原诱导的关节炎大鼠模型,观察雷公藤甲素对大鼠关节局部 HSPs 和主要组织相容性复合体- I (major histocompatibility- I, MHC- I) 类分子表达的影响,以进一步探讨雷公藤治疗 RA 的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物:清洁级健康雄性 Wistar 大鼠,购于华中科技大学同济医学院实验动物中心,体重 130~150 g,正常饮食。

1.2 试剂:雷公藤甲素(福建省医学科学研究所提供,质量分数 98.5% 以上),牛Ⅱ型胶原(Chondrex),完全弗氏佐剂(Sigma),抗 HSP60 抗体(中山公司),抗 HSP70 抗体(中山公司),抗 MHC- I 分子抗体(Harlan),逆转录试剂盒(Fermentas),DNA 聚合酶(Fermentas),免疫组化染色试剂盒(中山公司),浓缩型 DAB 显色试剂盒(中山公司),苏木素染液(中山公司)。

1.3 仪器:图像分析仪,显微镜,电热恒温孵育箱,PCR 仪,垂直板电泳仪,紫外分光光度仪,凝胶电泳成像系统等。

1.4 造模、评估和给药:从 50 只大鼠中随机选 10 只作为正常对照,其余用于造模。参照文献方法^[4]配制Ⅱ型胶原乳剂,沿大鼠背部及尾根部分 5 点皮内注射,每点 0.05 mL,15 d 后分两点皮内激发注射。正常对照组予以生理盐水同法注射。初次免疫 30 d 后参照关节炎指数评分标准^[5]对造模效果进行评估,评分达 4 分以上的大鼠被用于继续实验。将造模成功的大鼠随机分为两组,每组 10 只,分别为模型组和雷公藤甲素组。将雷公藤甲素用 5% 丙二醇配制成注射液,其中含雷公藤甲素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。正常对照组、模型组和雷公藤甲素组大鼠分别以生理盐水、5% 丙二醇液和雷公藤甲素注射液,按 0.04 mL/100 g (雷公藤甲素剂量为 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$,预试验结果表明此剂量为最佳剂量)后腿 im 给药。每 3 天用

药 1 次。

1.5 取材:用药 30 d 后,将大鼠称重,用 2% 戊巴比妥钠 ip 麻醉,仰位固定,打开膝关节腔,取滑膜组织,置 10% 中性甲醛中固定,用于石蜡切片的制备。同法取另外一侧滑膜,用无酶锡箔纸包裹,置冻存管液氮冻存,用于 RT-PCR。取大鼠右侧踝关节,去掉皮肤与肌肉,置 10% 中性甲醛中固定 24 h,然后转入脱钙液甲酸-甲醛-三蒸水 (20:5:75) 中脱钙,每 3 天更换一次脱钙液,脱钙 30 d 后,石蜡包埋,切片。

1.6 滑膜组织 HSP60、HSP70 mRNA 的 RT-PCR:按 TRIZOL 试剂说明书提取总 RNA,按逆转录试剂盒说明书进行逆转录反应,按 Taq 酶说明进行 PCR 反应,各引物 (上海生工合成) 序列为: HSP60 上游引物为 5'-CAAATGAAGAAGC-TGGGGATGGCA-3',下游引物为 5'-GAGCAGG-TACAATGGACTGAACAC-3',扩增片段长度为 467 bp; HSP70 上游引物为 5'-TGCTGACCAAGATGAAG-3',下游引物为 5'-AGAGTC-GATCTCCAGGC-3',扩增片段长度为 491 bp; β -actin 上游引物为 5'-CATTTCCGGTG-CACGATG-GAG-3',下游引物为 5'-GCCATCCT-GCGTCTGGACCTG-3',扩增片段长度为 599 bp。反应条件分别为 HSP60: 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 60 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 90 s; 共 33 个循环; HSP70: 95 $^{\circ}$ C, 60 s; 55 $^{\circ}$ C, 60 s; 72 $^{\circ}$ C, 60 s; 共 30 个循环; β -actin: 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 60 $^{\circ}$ C, 60 s; 68 $^{\circ}$ C, 120 s; 共 30 个循环。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳,凝胶电泳成像系统分析。

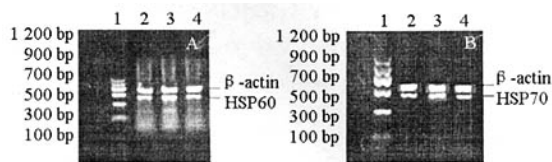
1.7 滑膜细胞 HSP60、HSP70 及 MHC-I 和踝关节软骨 MHC-I 的 S-P 免疫组织化学染色:石蜡切片常规脱蜡,脱水。PBS (pH 7.4) 洗 3 次,每次 3 min,滴加 3% 双氧水-甲醇溶液,37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 15 min。蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5 min,0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液 (pH 6.0) 微波抗原修复 30 min。PBS 洗 3 次,每次 3 min,滴加二抗动物的血清,37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 15 min,倾去血清 (勿洗)。滴加一抗 (HSP60、HSP70 的稀释度分别为 1:200, MHC-I 的稀释度为 1:1 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。阴性对照用 PBS 代替一抗。PBS 洗 3 次,每次 3 min,滴加生物素化的二抗,37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 45 min。PBS 洗 3 次,每次 3 min,滴加链霉素-辣根过氧化物酶标记的三抗,37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 45 min。PBS 洗 3 次,每次 3 min, DAB 显色,苏木素复染,盐酸乙醇分化液分化,脱水、

透明、中性树胶封片。图像分析仪进行图像分析。

1.8 统计学分析:结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用方差分析 F 检验,由 SPSS11.5 统计软件进行统计分析。

2 结果

2.1 RT-PCR 结果:模型组大鼠滑膜细胞 HSP60 和 HSP70 的 mRNA 表达量较正常对照组和雷公藤甲素组均明显升高 ($P < 0.05$),而正常对照组与雷公藤甲素组之间差异无显著性 ($P > 0.05$)。HSP60 电泳条带见图 1-A; HSP70 电泳条带见图 1-B,平均灰度值比较见表 1。



1-DNA Marker 2-正常对照组 3-模型组 4-雷公藤甲素组
1-DNA Marker 2-normal control group
3-model group 4-triptolide group

图 1 大鼠滑膜细胞 HSP60 (A) 和 HSP70 (B) 的 mRNA RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 Results of RT-PCR of HSP60 (A) and HSP70 (B) mRNA in synoviocytes of rats

表 1 大鼠滑膜细胞中 HSP60 和 HSP70 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

Table 1 Expression of HSP60 and HSP70 mRNA in synoviocytes of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

组别	剂量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	HSP60	HSP70
正常对照	—	31.46 $\pm$ 3.38	49.72 $\pm$ 5.49
模型	—	39.53 $\pm$ 2.61*	78.93 $\pm$ 7.90*
雷公藤甲素	40	32.74 $\pm$ 3.27 Δ	53.87 $\pm$ 5.86 Δ

与正常对照组比较: * $P < 0.05$ 与模型组比较: $\Delta P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs normal control group; $\Delta P < 0.05$ vs model group

2.2 滑膜细胞 HSP60 和 HSP70 免疫组织化学染色结果:棕黄色阳性表达部位位于细胞浆。模型组阳性染色强度明显高于正常对照组 ($P < 0.05$) 和雷公藤甲素组 ($P < 0.05$)。切片经图像分析仪分析,统计结果见表 2。

2.3 滑膜细胞和踝关节软骨细胞 MHC-I 的 S-P 法染色结果:阳性表达部位位于细胞膜和细胞浆,以细胞膜为主。模型组阳性染色强度明显高于正常对照组 ($P < 0.05$) 和雷公藤甲素组 ($P < 0.05$)。统计结果见表 2。

3 讨论

类风湿关节炎 (RA) 是一种以滑膜增生、软骨降解和骨质破坏为特征的慢性炎症性关节病,其病

表 2 大鼠滑膜细胞和软骨细胞 HSP60、HSP70 与 MHC- I 类分子的免疫组织化学染色结果 ($\bar{x} \pm s, n=20$)

Table 2 Results of immunohistochemical staining of HSP60, HSP70, and MHC- I molecule in synoviocytes and chondrocytes of rats ($\bar{x} \pm s, n=20$)

组 别	剂量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	滑膜细胞 HSP60	滑膜细胞 HSP70	滑膜细胞 MHC- I	软骨细胞 MHC- I
正常对照	—	0.093 4 $\pm$ 0.021 3	0.238 7 $\pm$ 0.037 1	0.183 9 $\pm$ 0.064 7	0.142 7 $\pm$ 0.068 1
模型	—	0.190 3 $\pm$ 0.019 9*	0.475 2 $\pm$ 0.127 0*	0.281 3 $\pm$ 0.130 1*	0.253 3 $\pm$ 0.127 7*
雷公藤甲素	40	0.115 7 $\pm$ 0.072 1 Δ	0.292 3 $\pm$ 0.046 4 Δ	0.185 7 $\pm$ 0.078 5 Δ	0.179 8 $\pm$ 0.148 7 Δ

与正常对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: $\Delta P<0.05$

* $P<0.05$ vs normal control group; $\Delta P<0.05$ vs model group

因仍不很明了。炎症细胞因子(如 IL-1、TNF- α 等)的过度表达被认为是疾病迁延发展的关键因素,但是,引起这些细胞因子表达失调的原因至今不清。研究表明,RA 发病过程中,活化的巨噬细胞和淋巴细胞等免疫应答细胞表达炎症细胞因子上调。而引起这些免疫细胞活化、增殖的因素多样^[6]。尽管感染因素被认为是病因之一,然而迄今为止还未找出明确的病原体,进一步研究发现,感染过程引起机体应答产生反应蛋白,HSPs 便是其中之一。由于它们与人体某些正常组织蛋白可能拥有结构相似的抗原表位,能通过交叉反应改变宿主自身免疫和自身耐受间平衡,使机体产生异常免疫应答,同时,自身免疫细胞通过识别 HSPs 而活化,从而分泌大量细胞因子,导致 RA 的发生与发展。

在 RA 中引起自身免疫性细胞活化的原因与具体的机制至今尚不清楚。大量研究表明,自身抗原参与了疾病的发生与发展^[7]。体内抗原提呈途径主要有两条,即溶酶体提呈途径(MHC- II 类分子途径)和胞质溶胶提呈途径(MHC- I 类分子途径)。MHC- I 类分子提呈的抗原大多是内源性抗原,热休克蛋白(HSP70、HSP90 等)参与抗原肽的转运。

目前,国内外学者正致力于新的自身抗原的寻找。尽管广泛表达于体内有核细胞的 MHC- I 类分子尚未被认为是一种潜在的自身抗原,但是,这种抗原的过度表达可能是一种危险因素。本实验中观察到模型组大鼠滑膜细胞和软骨细胞的 MHC- I 类分子的表达明显增加,表明炎症关节内过度表达的 MHC- I 类分子可能与关节炎之间存在着某种联系,有关机制尚待进一步的研究。近年来有很多关于 HSP60 和 HSP70 与自身免疫反应及自身免疫疾病如反应性关节炎、RA、II 型糖尿病、动脉粥样硬化等的关系的研究报道^[1]。这些研究认为 HSPs 在调节自身免疫反应及引发自身免疫疾病的发生中起着非常重要的作用。本实验从 mRNA 和蛋白质水平加以研究,结果观察到 HSPs 的表达显著升高。胶原诱导的关节炎大鼠模型是复制 RA 最为理想的动物

模型。因此,实验结果可能提示,一方面 MHC- I 类分子和 HSPs 表达的上调增强了细胞抗原提呈的能力,从而导致了自身反应细胞的异常活化,RA 的发生;另一方面,体内确实存在能够直接识别 MHC- I 类分子和 HSPs 而活化的自身免疫细胞,如 $\gamma\delta$ T 细胞等^[8]。

通过恢复 RA 患者异常表达的 HSPs 和 MHC 于正常水平,可能是药物发挥治疗作用的途径之一。雷公藤是临床治疗 RA 的有效药物。到目前为止,已从雷公藤中分离出 70 多种成分^[9],包括生物碱、二萜类、三萜类、倍半萜、苷类、有机酸和卫矛醇等,但仅对其中部分单体的化学成分进行了研究。雷公藤甲素是被研究得最为系统和全面的单体成分。本实验首次探讨雷公藤甲素对关节局部 HSPs 和 MHC- I 类分子表达的影响。结果发现,雷公藤甲素可以有效地下调模型大鼠关节滑膜和软骨细胞 HSP60、HSP70 和 MHC- I 类分子的表达。因此有可能通过这条途径,雷公藤甲素抑制了体内自身反应性细胞的活化,从而达到治疗 RA 的目的。但其具体机制有待进一步探讨。

References:

[1] Zhao Y H. Heat shock protein and autoimmune disease [J]. Shanghai J Immunol (上海免疫学杂志), 1995, 15(3): 192-194.
[2] Puga Y G L, Le T D, Roord S, et al. Heat shock proteins (HSP) for immunotherapy of rheumatoid arthritis (RA) [J]. Inflamm Res, 2003, 52(11): 443-451.
[3] Newton J L, Harney S M, Wordsworth B P, et al. A review of the MHC genetics of rheumatoid arthritis [J]. Genes Immun, 2004, 5(3): 151-157.
[4] Larson P. Homologous type II collagen induced arthritis in rats [J]. Arthritis Rheum, 1990, 33(5): 693-697.
[5] Hu Y H, Weng G M, Lu F E, et al. Experimental investigation on triptolide induced apoptosis of synoviocytes in collagen induced arthritis rats [J]. Chin J Rheumatol (中华风湿病学杂志), 2004, 8: 131-134.
[6] Han H X, Kong F H, Xi Y Z. The research about the role of MHC in immune recognition [J]. Immunol J (免疫学杂志), 2000, 16(4): S15-S17.
[7] Wang J B, Pan L. The etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. Shandong Med J (山东医药), 2002, 42(18): 69-70.
[8] Haas W, Pereira P, Tonegawa S. Gamma/delta cell [J]. Annu Rev Immunol, 1993, 11: 637-685.
[9] Yin X Q, Zhang D S. Research progress of Tripterginin wilfordii Hook. f. in clinic [J]. Med Recapit (医学综述), 2001, 7(7): 438-439.