

稀莪醇对佐剂性关节炎大鼠血清细胞因子及滑膜细胞凋亡蛋白的影响

毕娟¹, 信红岭¹, 高子芬², 林文翰³, 钱瑞琴^{1*}

(1. 北京大学基础医学院 中西医结合教研室, 北京 100083; 2. 北京大学基础医学院 病理系, 北京 100083; 3. 北京大学药学院, 北京 100083)

摘要:目的 探讨稀莪醇(奇任醇)对佐剂性关节炎(AA)大鼠血清细胞因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)及滑膜细胞 Bcl-2、Fas-L 蛋白表达的影响。方法 采用弗氏完全佐剂建立 SD 大鼠 AA 模型, 分别给予奇任醇、氢化可的松、阿司匹林+环磷酰胺治疗; ILISA 法测定实验大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 水平; 踝关节滑膜细胞进行 Bcl-2、Fas-L 免疫组化染色, 运用计算机图像分析系统对染色结果进行分析。结果 与正常组相比, 模型组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 水平显著升高 ($P < 0.01$), 滑膜细胞 Bcl-2 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$), Fas-L 表达显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 奇任醇组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 水平显著降低 ($P < 0.01, 0.05$); 滑膜细胞 Bcl-2 蛋白表达显著下调 ($P < 0.05$), Fas-L 蛋白水平显著升高 ($P < 0.05$)。结论 奇任醇可降低 AA 大鼠血清细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 水平, 下调滑膜细胞 Bcl-2 蛋白表达、促进 Fas-L 蛋白表达。

关键词: 奇任醇; 佐剂性关节炎(AA); 抗炎; 凋亡

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)08-1207-04

Effect of kirenol on cytokines in serum and apoptosis proteins expression in synoviocytes of adjuvant arthritis rats

BI Juan¹, XIN Hong-ling¹, GAO Zi-fen², LIN Wen-han³, QIAN Rui-qin¹

(1. Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, School of Basic Medical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China; 2. Department of Pathology, School of Basic Medicine Sciences, Peking University, Beijing 100083, China; 3. School of Pharmaceutical Science, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of kirenol on serum concentration of IL-1 β , TNF- α , and IL-6, as well as the expression of Bcl-2 and Fas-L proteins in synoviocytes of adjuvant arthritis (AA) rats. **Methods** AA Model of SD rats was made by means of Freund's complete adjuvant. Kirenol, Hydrocortisone, Aspirin and Cytoxan were administered for treatment, respectively. The levels of IL-1 β , TNF- α , and IL-6 in serum of rats were assayed by means of ILISA. The immunohistochemical stain was used in synoviocytes and computer images analysis system was used to analyze the expression of Bcl-2 and Fas-L proteins. **Results** Compared with the normal group, the levels of IL-1 β , TNF- α , and IL-6 in serum and the excessive expression of Bcl-2 in synoviocytes of AA model rats were increased, remarkably ($P < 0.01, 0.05$), the expression of Fas-L was decreased significantly ($P < 0.05$); While compared with the model group, the levels of IL-1 β , TNF- α , and IL-6 in serum of rats were significantly decreased by kirenol ($P < 0.01, 0.05$), the protein expression of Bcl-2 in synoviocytes was down-regulated ($P < 0.05$), and the protein expression of Fas-L was increased ($P < 0.05$) by kirenol markedly. **Conclusion** Kirenol can decrease the levels of IL-1 β , TNF- α , and IL-6 in serum of AA rats, down-regulate the excessive expression of Bcl-2 in synoviocytes, and promote the expression of Fas-L.

Key words: kirenol; adjuvant arthritis (AA); anti-inflammation; apoptosis

稀莪醇(奇任醇)是从治疗风湿痹症、骨节疼痛的稀莪草 *Siegesbeckia orientalis* L. 中提取的有效成分之一。奇任醇具有良好的抗炎作用,并可抑制佐剂性关节炎(adjuvant arthritis, AA)大鼠原发必

和继发性足肿胀,改善踝关节炎病理状态^[1]。本实验在前期工作基础上通过观察奇任醇对炎性细胞因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)及凋亡相关蛋白 Bcl-2、

收稿日期:2006-12-14

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(7072043)

作者简介:毕娟(1979—),女,山东威海人,在读研究生,专业方向为中药免疫药理研究。

* 通讯作者 钱瑞琴 Tel: (010) 82801198

Fas-L 的影响,初步探讨其抗炎及改善滑膜病变的作用机制。

1 材料

1.1 药品和试剂:奇任醇(质量分数 99%),北京大学医学部药学院提供。氢化可的松注射液,5 mg/mL,天津金耀氨基酸有限公司,批号 0302162。阿司匹林,0.5 g/片,阿斯特拉(无锡)制药有限公司,批号 343401。注射用环磷酰胺,200 mg/瓶,上海华联制药有限公司,批号 031004。弗氏完全佐剂,Sigma 公司生产。IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 ILISA 试剂盒和 Bcl-2、Fas-L 试剂盒均由北京中杉金桥生物技术有限公司提供。

1.2 仪器:紫外分光光度计,Nikon ECLIPS E600 型显微镜,Nikon FDX-35 型显微照相设备。

1.3 动物:健康清洁级雄性 SD 大鼠,140~160 g,许可证号:SYXK(京)2002-0001,北京大学医学部实验动物中心提供。

2 方法

2.1 AA 大鼠模型制备:除正常组外,其余各组大鼠均以完全弗氏佐剂 0.1 mL 注射于右后足趾皮内造模。

2.2 给药方法:各给药组造模第 3 天开始给药,连续给药 21 d。给药剂量及途径分别为:奇任醇组 2 mg/(kg·d),ig;氢化可的松组 2 mg/(kg·3 d),ip;阿司匹林+环磷酰胺组 100 mg/(kg·d),ig,第 11 天停止给予阿司匹林,改为给予环磷酰胺 7 mg/(kg·2 d),ip^[2]。

2.3 ILISA 法测定血清 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 水平:取各组大鼠股动脉血,离心取血清。按照 ILISA 试剂盒说明书操作,紫外分光光度计于 490 nm 处分别测定 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 对应的吸光度(A)值,根据标准曲线换算为血清中质量浓度。

2.4 免疫组化与评价:取各组大鼠右侧踝关节滑膜,中性福尔马林固定,EDTA 液脱钙 3 周后石蜡包埋,切片。按照 Bcl-2、Fas-L 免疫组化染色试剂盒说明书进行操作。染色结果评价:切片滑膜细胞中 Bcl-2 及 Fas-L 阳性细胞分别于胞浆、胞膜(或胞浆呈棕黄色染色。染色切片结果运用北航计算机医学图像分析系统分析。随机选取 3 个 400 倍镜下视野,记录平均吸光度值(测量参数:亮度 194,对比度 188,色度 133,饱和度 189)。以平均积分吸光度值反映阳性指标表达量。

2.5 统计学处理:实验数值采用 SPSS 12.0 统计软件包进行,多组间比较采用 One-Way ANONA

分析,数据间相互关系采用相关分析,统计结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 对 AA 大鼠血清细胞因子的影响:见表 1。模型组与正常组相比,IL-1 β 水平显著升高($P < 0.01$);与模型组相比,奇任醇组、氢化可的松组、阿司匹林+环磷酰胺组的 IL-1 β 水平均有显著降低($P < 0.01$)。各给药组间相比差异无显著性($P > 0.05$)。模型组与正常组相比,TNF- α 水平显著升高($P < 0.01$);与模型组相比,奇任醇组、阿司匹林+环磷酰胺组 TNF- α 水平均显著降低($P < 0.05$),两组间比较差异无显著性($P > 0.05$);氢化可的松组 TNF- α 水平与模型组相比降低,但差异无显著性($P > 0.05$)。模型组与正常组相比,IL-6 水平显著升高($P < 0.01$);与模型组相比,各给药组 IL-6 水平均有显著降低($P < 0.05$),且各组间相比差异无显著性($P > 0.05$)。

表 1 奇任醇对 AA 大鼠血清中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of kirenol on levels of IL-1 β , TNF- α , and IL-6 in serum of AA rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	IL-1 β / (pg·mL ⁻¹)	TNF- α / (pg·mL ⁻¹)	IL-6/ (pg·mL ⁻¹)
正常	—	29.318 $\pm$ 6.740	16.387 $\pm$ 4.578	15.108 $\pm$ 7.240
模型	—	56.276 $\pm$ 10.498**	23.870 $\pm$ 8.774**	28.955 $\pm$ 11.451**
奇任醇	2	38.802 $\pm$ 4.804 $\Delta\Delta$	17.910 $\pm$ 10.301 Δ	18.102 $\pm$ 10.291 Δ
氢化可的松	2	23.318 $\pm$ 9.823 $\Delta\Delta$	20.322 $\pm$ 2.369	16.278 $\pm$ 9.900 Δ
阿司匹林+环磷酰胺	100+7	32.771 $\pm$ 7.776 $\Delta\Delta$	17.474 $\pm$ 9.765 Δ	17.541 $\pm$ 8.810 Δ

与正常组比较: ** $P < 0.01$

与模型组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs normal group

$\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model group

3.2 对 AA 大鼠踝关节滑膜细胞凋亡蛋白的影响:见表 2。模型组与正常组相比,Bcl-2 蛋白平均吸光度值显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,奇任醇组、氢化可的松组、阿司匹林+环磷酰胺组 Bcl-2 蛋白水平均有显著降低($P < 0.05$, 0.05 , 0.01)。各给药组间相比差异无显著性($P > 0.05$)。模型组与正常组相比,Fas-L 蛋白平均吸光度值显著降低($P < 0.05$);与模型组相比,奇任醇组、阿司匹林+环磷酰胺组水平显著升高($P < 0.05$, 0.01),两组间比较差异无显著性($P > 0.05$);氢化可的松组与模型组比较 Fas-L 蛋白水平升高,但差异无显著性($P > 0.05$)。

3.3 细胞因子与凋亡蛋白相关性分析:采用 Spearman 等级相关分析,奇任醇组 TNF- α 与 Fas-L

表 2 奇任醇对 AA 大鼠滑膜细胞 Bcl-2 和 Fas-L 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Effect of kirenol on Bcl-2 and Fas-L protein expression in synoviocyte of AA rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	平均吸光度值	
		Bcl-2	Fas-L
正常	—	6.02 ± 1.06	7.27 ± 1.06
模型	—	8.48 ± 1.35 *	4.57 ± 0.87 *
奇任醇	2	6.13 ± 1.19 [△]	7.76 ± 2.40 [△]
氢化可的松	2	6.17 ± 1.38 [△]	5.92 ± 0.64
阿司匹林+环磷酰胺	100+7	4.81 ± 0.06 ^{△△}	8.64 ± 2.29 ^{△△}

与正常组比较: * $P < 0.05$

与模型组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

* $P < 0.05$ vs normal group

$\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model group

之间呈明显相关 ($r = -0.833$, $P = 0.003$), IL-1 β 与 Fas-L 呈相关趋势, 但差异无显著性 ($P > 0.05$)。

4 讨论

AA 大鼠为典型的免疫性炎症模型, 其关节组织病理学及血中变化与人类类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 相似, 因此该模型为研究 RA 的常用实验模型之一^[3]。RA 患者血清中 IL-1 β 、TNF- α 及 IL-6 水平升高, 且与病情活动程度呈正相关。TNF- α 、IL-1 β 是 RA 细胞因子级联系统中的关键性炎性分子, 作为前炎症细胞因子, 二者可激活核因子 κ B (NF- κ B) 活性, 诱导环氧酶 2 (cyclooxygenase 2, COX-2) 产生, 从而刺激细胞产生大量前列腺素 E (PGE₂), 引发炎症反应^[4]。IL-6 可由 TNF- α 及 IL-1 β 诱导产生, 是体内最为重要的调节天然免疫应答、体液和细胞免疫应答的细胞因子之一, 高水平的 IL-6 与急性炎症反应密切相关。本实验模型组上述 3 种细胞因子水平比正常组均有显著升高 ($P < 0.01$), 各给药组均可显著降低 IL-1 β 、IL-6 水平 ($P < 0.01$, 0.05), 除氢化可的松组外, 奇任醇组、阿司匹林+环磷酰胺组又可显著降低 TNF- α 水平 ($P < 0.05$)。糖皮质激素氢化可的松对各类炎症不同阶段及免疫反应的许多环节都有显著抑制作用, 抗炎机制之一与其通过糖皮质激素受体和 NF- κ B 直接作用从而抑制 NF- κ B 转录、并抑制 COX-2 表达有关, 对控制 RA 的症状有显著疗效。阿司匹林属 NSAIDs 类, 是临床治疗 RA 的常用药物, 可迅速镇痛、消退关节炎症、减轻关节损伤, 其主要通过抑制 COX 活性、进而抑制前列腺素的生成来发挥抗炎作用。现已发现 NSAIDs 也是 NF- κ B 的强效抑制剂。用阿司匹林处理原代滑膜成纤维细胞可阻断 IL-1 β 和 TNF- α 诱导的 NF- κ B 的激活,

并可抑制 IL-6 的表达^[5]。阿司匹林对抑制 AA 大鼠原发性病变有效, 对 AA 大鼠继发性病变影响较小, 而环磷酰胺则可防止或减少 AA 大鼠继发性炎症^[2]。以往实验表明奇任醇对 AA 大鼠原发性及继发性病变均有效^[1], 因此, 本实验设定阿司匹林+环磷酰胺组为对照, 即在给予阿司匹林 10 d 后改为给予环磷酰胺^[2]。本实验表明奇任醇组与阿司匹林+环磷酰胺组在抑制血清炎性因子方面差异无显著性 ($P > 0.05$), 提示奇任醇抗炎机制可能与其降低血清炎性细胞因子、进而抑制 NF- κ B 转录或抑制 COX-2 等活性有关。

RA 滑膜细胞增生与滑膜细胞凋亡异常密切相关^[6]。奇任醇可抑制 AA 大鼠骨膜增生和水肿^[1], 提示奇任醇可能具有促进异常增生的滑膜细胞凋亡的作用。Bcl-2 家族是凋亡调控家族中最大的一族, 在凋亡调节中发挥了重要作用, 其中当 Bcl-2 高表达时, 可与 Bax 形成异源二聚体抑制细胞凋亡。Fas/Fas-L 复合物在免疫系统的平衡状态中起至关重要的作用。Fas-L 属于肿瘤坏死因子家族成员, 与 Fas 结合可以介导细胞凋亡^[6]。本实验模型组与正常组相比 Bcl-2 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$), Fas-L 蛋白显著降低 ($P < 0.05$), 这可能是造成 AA 大鼠滑膜细胞异常增殖且凋亡不足的原因。各给药组均可显著下调 Bcl-2 蛋白表达 ($P < 0.05$, 0.01), 除氢化可的松组外, 奇任醇组及阿司匹林+环磷酰胺组均可促进 Fas-L 蛋白表达 ($P < 0.05$, 0.01)。本实验结果提示奇任醇可以通过两种方式促进 AA 大鼠异常增生的滑膜细胞凋亡, 即一方面提高促凋亡蛋白 Fas-L 表达, 另一方面降低凋亡蛋白 Bcl-2 表达。

研究发现 TNF- α 、IL-1 β 可促进 IL-15 的表达, 而 IL-15 通过增强滑膜细胞 Bcl-2 及 Bcl-xL 表达造成 RA 滑膜细胞异常增殖且凋亡不足^[7]。另有实验表明 IL-1 β 可以通过下调 Fas 表达从而抑制 Fas/Fas-L 介导的滑膜细胞凋亡, 但对 Bcl-2 表达无影响^[8]。本实验模型组 TNF- α 水平升高, Fas-L 表达降低, 而奇任醇既可降低 TNF- α 水平, 又可促进 Fas-L 表达, 且 TNF- α 与 Fas-L 在统计学意义上呈显著性相关 ($P < 0.01$), 初步表明奇任醇可通过降低 AA 大鼠血清炎性细胞因子并下调 Bcl-2 表达、促进 Fas-L 表达来发挥其抗炎及改善 AA 大鼠滑膜病变作用。

综上所述, 降低炎性细胞因子水平并调节滑膜细胞凋亡蛋白表达可能是奇任醇抑制 AA 急性慢性炎症的作用机制之一。

References:

- [1] Xin H L, Bi J, Liu M, *et al.* Experimental study on anti-inflammatory and immuno-regulating effect of kirenol [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(6): 866-870.
- [2] Vogel H G, Vogel W H. *Guidebook of Pharmacological Experiment—Drug Discovery and Evaluation—Pharmacological Assays* (药理学实验指南——新药发现和药理学评价) [M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [3] Liu J W. *Methodology in Pharmacological Experiment—New Technology and Method* (药理实验方法学——新技术与新方法) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003.
- [4] Wang X L. *Applied Molecular Pharmacology* (应用分子药理学) [M]. Beijing: Peking Union Medical College Press, 2005.
- [5] Jiang M X. *Newly Compiled Practical Materia Medica* (新编实用药理学) [M]. Beijing: Science Press, 2005.
- [6] Liu W, Li S X. Research progression on apoptosis of RA fibroblast-like synoviocytes [J]. *Chin J Rheumatol* (中华风湿病学杂志), 2005, 9(10): 620-622.
- [7] Masahiko T, Weronika R, Ewa K, *et al.* Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients express functional IL-15 receptor complex; Endogenous IL-15 in autocrine fashion enhances cell proliferation and expression of Bcl-xL and Bcl-2 [J]. *J Immunol*, 2002, 1760-1767.
- [8] Masahiko T, Katsumi E, Atsushi K, *et al.* FAS Antigen expression on synovial cells was down-regulated by interleukin 1 β [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 218: 280-285.

苦参碱抑制人大肠癌 HT29 细胞增殖及诱导凋亡作用与机制

黄 建¹, 陈康杰², 张 卧¹, 朱永良³

(1. 浙江大学医学院附属第二医院 肿瘤科, 浙江 杭州 310009; 2. 温州医学院附属第二医院 普外科, 浙江 温州 325000; 3. 浙江大学医学院附属第二医院 消化科, 浙江 杭州 310009)

摘要:目的 探讨苦参碱对人大肠癌 HT29 细胞增殖抑制和凋亡诱导作用及其可能机制。方法 分别采用 MTT 法检测细胞增殖活性、流式细胞仪检测细胞周期及凋亡、透射电镜观察细胞结构变化、基因芯片检测细胞基因表达改变。结果 0.062 5~0.5 mg/mL 苦参碱处理 48 h 后, 细胞增殖明显受抑制; 但 1 mg/mL 时增殖抑制率降低而凋亡诱导作用明显增强; 苦参碱对细胞 G₂/M 和 G₁/S 期均有阻滞作用; 电镜下可见凋亡的形态学变化; 基因芯片检测发现苦参碱影响细胞增殖、周期和凋亡相关基因的表达。结论 苦参碱通过影响 HT29 细胞一些与增殖、周期和凋亡相关基因的表达发挥增殖抑制和凋亡诱导作用, 且与苦参碱质量浓度相关。

关键词:苦参碱; 增殖; 凋亡; 基因芯片

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)08-1210-05

Effect of matrine on inhibiting proliferation and inducing apoptosis of human intestinum crassum carcinoma HT29 cells

HUANG Jian¹, CHEN Kang-jie², ZHANG Wo¹, ZHU Yong-liang³

(1. Department of Oncology, Second Affiliated Hospital of Medical School, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China; 2. Department of Surgery, Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical School, Wenzhou 325000, China; 3. Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital of Medical School, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China)

Abstract: Objective To explore the anti-proliferation and apoptosis-induced effects of matrine on HT29 cell and their possible mechanism. **Methods** HT29 Cell proliferative activity was measured by MTT assay; Cell cycle and apoptosis were analyzed by Flow Cytometry; Alteration of cellular skeleton was observed by transmission electron microscopy (TEM); Global gene expression profiles were scanned by gene chip. **Results** After exposure to matrine at concentrations from 0.062 5 to 0.5 mg/mL for 48 h, cellular proliferation was inhibited with increasing the concentration, but this inhibitory effect attenuated at 1 mg/mL and the apoptosis was up-regulated significantly. G₂/M and G₁/S phases of cell cycle were, to some extent, arrested. Under TEM, the morphological changes could be found. Gene chip showed that matrine could alter a large number of genes, which related to the cell proliferation, cell cycle, and apoptosis. **Conclusion** The anti-proliferation and apoptosis-induced effects of matrine on HT29 cells are concentration-dependent through changing of many genes involved in proliferation, cell cycle, and

收稿日期: 2007-01-05

基金项目: 浙江省自然科学基金青年人才专项基金资助项目 (R01055); 浙江省中医药管理局资助课题 (2003C094, 2006Z012)

作者简介: 黄 建 (1964—), 男, 浙江人, 主任医师, 博士, 从事中药抗肿瘤的临床与基础研究。

Tel: (0571) 87784556 E-mail: hjys@zju.edu.cn