

## 苏木酮 A 对大鼠类风湿性关节炎的治疗作用

周小清, 廖理曦, 姜 勇, 屠鹏飞, 曾克武\*

北京大学 天然药物与仿生药物国家重点实验室, 北京 100191

**摘要:** 目的 探究苏木 *Caesalpinia sappan* 的活性成分苏木酮 A 对大鼠类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 的治疗作用。方法 以牛 II 型胶原蛋白诱导建立 RA 大鼠模型, 以苏木酮 A (50 mg/kg) 进行干预, 考察大鼠足容积变化, 对大鼠踝关节组织进行病理分析, 采用免疫组化考察大鼠踝关节组织中白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 表达。以脂多糖诱导 Raw264.7 细胞建立炎症细胞模型, 考察苏木酮 A 对 Raw264.7 细胞上清液中一氧化氮和 IL-6 水平的影响。结果 苏木酮 A 显著降低 RA 大鼠足容积 ( $P < 0.05$ ), 改善 RA 大鼠踝关节滑膜组织损伤, 抑制 RA 大鼠踝关节滑膜组织中 IL-6、TNF- $\alpha$  和 MMP-9 的表达。苏木酮 A 显著抑制脂多糖诱导的 Raw264.7 细胞上清液中一氧化氮和 IL-6 水平 ( $P < 0.01$ )。结论 苏木酮 A 可有效缓解大鼠 RA。

**关键词:** 类风湿性关节炎; 牛 II 型胶原蛋白; 苏木; 苏木酮 A; Raw264.7 细胞; 炎症因子

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)03-0744-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.03.017

## Effect of sappanone A on rheumatoid arthritis in rats

ZHOU Xiao-qing, LIAO Li-xi, JIANG Yong, TU Peng-fei, ZENG Ke-wu

State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of sappanone A, an effective active ingredient from *Caesalpinia sappan* on rheumatoid arthritis in rats. **Methods** Bovine type II collagen was used to induce rheumatoid arthritis rats model and sappanone A (50 mg/kg) was used to intervention. Changes of rat foot volume were detected and pathological analysis of rat ankle joint tissue was carried out. Expressions of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in rat ankle joint tissue were investigated by immunohistochemistry. Lipopolysaccharide was used to induce Raw264.7 cells to establish an inflammation cell model. Levels of nitric oxide and IL-6 in the supernatant of Raw264.7 cells were detected. **Results** Sappanone A significantly reduced the foot volume of RA rats ( $P < 0.05$ ), improved the damage of the ankle synovial tissue of RA rats, and inhibited the expressions of IL-6, TNF- $\alpha$ , and MMP-9 in the ankle synovial tissue of RA rats. Sappanone A significantly inhibited the levels of nitric oxide and IL-6 in the supernatant of Raw264.7 cells induced by lipopolysaccharide ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Sappanone A could effectively alleviate RA in rats.

**Key words:** rheumatoid arthritis; bovine type II collagen; *Caesalpinia sappan* L.; sappanone A; Raw264.7 cells; inflammatory mediators

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是以系统性慢性炎症为主的自身免疫性疾病<sup>[1]</sup>, 其主要病理特点为关节滑膜细胞增生、滑膜衬里层增厚、多种炎性细胞浸润和大量炎症因子分泌等<sup>[2-3]</sup>, 临床表现为关节疼痛、酸胀、晨僵、活动受限<sup>[4]</sup>。RA 患者若不能及时得到有效的治疗, 可能出现关节畸形、残疾等现象。目前 RA 的治疗药物主要为

非甾体抗炎药、糖皮质激素、B 细胞抑制剂、细胞因子受体抑制剂等<sup>[5]</sup>, 价格昂贵且伴有心血管和胃肠道出血、肝肾毒性和生长抑制等不良反<sup>[6-8]</sup>, 因此, 开发抗 RA 的天然药物尤为重要。

苏木 *Caesalpinia sappan* L. 为豆科植物苏木干燥的心材, 具有活血化瘀、消肿止痛的功效。现代药理学研究表明, 苏木具有抗炎、抗菌、抗肿瘤、

收稿日期: 2020-09-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973505); 国家重点研发计划基金资助项目 (2019YFC1708902, 2019YFC1711000)

作者简介: 周小清, 硕士研究生, 研究方向为中药活性成分作用靶点的揭示及药理机制阐明。Tel: 15310530968 E-mail: aszhouxq@163.com

\*通信作者: 曾克武, 副研究员。Tel: (010)82801404 E-mail: ZKW@bjmu.edu.cn

抗氧化、降血糖、免疫抑制等活性<sup>[9]</sup>。苏木酮 A 是苏木的活性成分之一，可抑制脑部小胶质细胞活化，具有抑制神经炎症作用<sup>[10]</sup>。目前尚无苏木酮 A 对其他炎症模型作用的相关报道，本研究旨在探讨苏木酮 A 对牛Ⅱ型胶原诱导的 RA 大鼠的治疗作用，为抗 RA 药物的研发提供思路。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠，6~8 周龄，体质量 200 g，购自北京维通利华有限公司，许可证号 SYXK(京)2016-0041。动物在 (25±2) °C，12 h 光照/12 h 黑暗周期下适应性饲养 1 周。动物实验经北京大学生物医学伦理会批准(批准号 LA2015206)。

### 1.2 细胞

小鼠单核巨噬细胞 Raw264.7 购自中国医学科学院细胞中心。

### 1.3 药品

苏木酮 A 由本实验室合成制备，HPLC 检测其质量分数>95%，经 UV、MS、NMR 等方法确定其结构，ESI-MS  $m/z$ : 283.4 [M-H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 10.58 (1H, brs), 9.57 (1H, brs), 9.21 (1H, brs), 8.24 (1H, s), 7.72 (1H, d,  $J = 8.7$  Hz), 7.52 (1H, s), 6.83 (2H, m), 6.76 (1H, dd,  $J = 8.3, 1.7$  Hz), 6.54 (1H, dd,  $J = 8.7, 2.2$  Hz), 6.31 (1H, d,  $J = 2.2$  Hz), 5.35 (2H, d,  $J = 1.6$  Hz)。

### 1.4 试剂

DMEM 高糖培养基(批号 CM15019)、无酚红 DMEM 高糖培养基(批号 CM15020)、青霉素-链霉素溶液(批号 CC004)均购自北京中科迈晨科技有限公司;胎牛血清(批号 AB-fbs0500S)购自北京百诺威生物科技有限公司;溴化噻唑蓝四氮唑(MTT, 批号 88417)、脂多糖(批号 L8880-10)、完全弗氏佐剂(批号 F5881)、不完全弗氏佐剂(批号 F5506)均购自美国 Sigma 公司;肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 抗体(批号 60291-1-Ig)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 抗体(批号 66146-1-Ig)、基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 抗体(批号 10375-2-AP), 均购自美国 Proteintech 公司;生物素标记化山羊抗兔 IgG 抗体(批号 A0277)购自上海碧云天生物技术有限公司;牛Ⅱ型胶原(批号 G810381)购自上海麦克林生化科技有限公司;戊巴比妥钠(批号 T0894)购自美国 Merck 公司;TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒(批号

G001-2)、一氧化氮测定试剂盒(批号 A013-1-1)购自南京建成生物工程研究所;IL-6 ELISA 试剂盒(批号 EM004-96)购自 ExCellBio 公司;二甲基亚砜(DMSO, 批号 D103272)购自上海阿拉丁试剂有限公司。

## 1.5 仪器

Sunrise-Basic 酶标仪购自瑞士 Tecan 公司;IX73 倒置荧光显微镜购自日本 Olympus 公司;MJ-78A 高压灭菌锅购自上海施都凯仪器设备有限公司;SC-237 冰箱、BC/BD-H100 冰柜购自青岛澳柯玛医疗器械有限公司;DW-86L626 超低温冰箱购自上海海尔特种电器有限公司。

## 2 方法

### 2.1 RA 大鼠模型的建立、分组与给药

根据课题组前期研究<sup>[10]</sup>, 大鼠随机分为对照组、模型组、苏木酮 A (50 mg/kg) 组, 每组 6 只。牛Ⅱ型胶原溶于醋酸配制成质量浓度为 2 mg/mL 的溶液, 与完全弗氏佐剂按 1:1 混合配成乳剂 I, 与不完全弗氏佐剂按 1:1 混合形成乳剂 II。大鼠麻醉后, 尾根部 sc 0.1 mL 乳剂 I, 第 7 天于尾根部 sc 0.1 mL 乳剂 II, 第 14 天大鼠后肢红肿, 踝关节体积明显增大, 造模成功。苏木酮 A 溶于 0.5% 羧甲基纤维素钠配制成质量浓度为 0.5 mg/mL 的溶液。苏木酮 A 组大鼠 ig 药物 (10 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积生理盐水, 1 次/d, 连续 20 d。测量大鼠右后足的足趾容积。

### 2.2 大鼠踝关节组织的病理分析

大鼠脱颈椎处死, 取右后足, 固定、脱水、石蜡包埋后切片。切片以蒸馏水漂洗, 依次用苏木精、伊红染料染色;脱水后用二甲苯透明, 再用中性树脂封片, 于显微镜下观察大鼠踝关节组织病理变化。

切片按照 TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒说明书进行染色后, 置磷酸盐缓冲液(含 0.05% 聚山梨醇 20)中洗涤, 于显微镜下观察大鼠踝关节损伤情况。

### 2.3 大鼠踝关节组织中 IL-6、TNF- $\alpha$ 和 MMP-9 的表达情况

踝关节组织切片用二甲苯脱蜡, 用柠檬酸钠缓冲液进行抗原修复。经 3% 过氧化氢处理并漂洗后, 用 5%~10% 山羊血清封闭, 分别滴加 IL-6、TNF- $\alpha$  和 MMP-9 抗体并孵育, 滴加生物素标记化山羊抗兔 IgG 抗体并孵育, PBS 洗涤后滴加二氨基联苯胺显色液显色。苏木素复染后脱水、透明、封片, 于显微镜下观察并拍照。

### 2.4 细胞培养

Raw264.7 细胞用高糖 DMEM 培养基(含 10%

胎牛血清、100 U/L 青霉素、100  $\mu\text{g/L}$  链霉素) 培养, 每天传代 1 次。

### 2.5 MTT 法检测 Raw264.7 细胞存活率

将 Raw264.7 细胞以  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔板中, 设置对照组、模型组和苏木酮 A (2.5、5.0、10.0  $\mu\text{mol/L}$ ) 组。苏木酮 A 溶于 DMSO 配制成 20 mmol/L 母液, 用高糖 DMEM 培养基分别稀释为 2.5、5.0、10.0  $\mu\text{mol/L}$  的溶液。模型组和给药组加入脂多糖 (1  $\mu\text{g/mL}$ ), 给药组另加入苏木酮 A, 对照组加入不含药物的高糖培养基, 培养 24 h。弃去上清液, 加入 MTT (0.5 mg/mL), 孵育 4 h; 弃去上清液加入 DMSO 溶解后, 用酶标仪于 570 nm 检测吸光度 (A) 并计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

### 2.6 Raw264.7 细胞中一氧化氮水平测定

将 Raw264.7 细胞以  $5 \times 10^4$  个/孔接种于 48 孔板中, 设置对照组、模型组和苏木酮 A (2.5、5.0、10.0  $\mu\text{mol/L}$ ) 组。模型组和给药组加入脂多糖 (1  $\mu\text{g/mL}$ ), 给药组另加入苏木酮 A, 对照组加入不含药物的无酚红培养基, 培养 24 h。吸取上清液 300  $\mu\text{L}$ , 按照试剂盒说明书测定一氧化氮水平。

### 2.7 Raw264.7 细胞中 IL-6 水平测定

将 Raw264.7 细胞以  $5 \times 10^4$  个/孔接种于 48 孔板中, 设置对照组、模型组和苏木酮 A (2.5、5.0、10.0  $\mu\text{mol/L}$ ) 组。模型组和给药组加入脂多糖 (1  $\mu\text{g/mL}$ ), 给药组另加入苏木酮 A, 对照组加入不含药物的高糖培养基, 培养 8 h。吸取上清液 100  $\mu\text{L}$ , 按照 ELISA 试剂盒说明书测定 IL-6 水平。

### 2.8 统计学分析

所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 GraphPad Prism5 软件进行 *t* 检验和单因素方差分析。

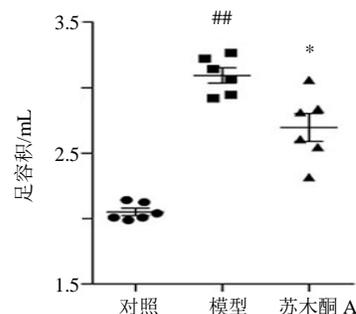
## 3 结果

### 3.1 苏木酮 A 对 RA 大鼠足容积的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠足容积明显增大 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 苏木酮 A 组大鼠足容积显著减少 ( $P < 0.05$ )。

### 3.2 苏木酮 A 对 RA 大鼠踝关节滑膜组织病理变化的影响

如图 2 所示, HE 染色可见模型组大鼠踝关节滑膜细胞增生、炎性细胞浸润, 滑膜层相较于对照组明显增厚; 苏木酮 A 组大鼠踝关节滑膜形态明显恢复, 相较于模型组明显变薄, 炎性细胞浸润减轻。TUNEL 染色可见模型组大鼠踝关节滑膜组织出现



与对照组比较: ## $P < 0.01$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$   
## $P < 0.01$  vs control group; \* $P < 0.05$  vs model group

图 1 苏木酮 A 对 RA 大鼠足容积的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 1 Effect of sappanone A on foot volume in RA rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

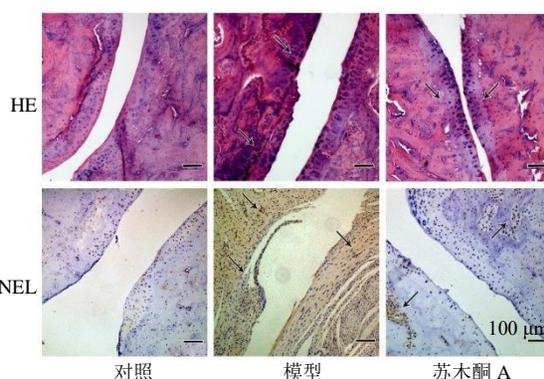


图 2 苏木酮 A 对 RA 大鼠踝关节滑膜组织病理变化的影响 ( $\times 10$ )

Fig. 2 Effect of sappanone A on histopathological changes of ankle synovium in RA rats ( $\times 10$ )

阳性染色, 提示存在细胞凋亡; 苏木酮 A 组 TUNEL 阳性染色区域减少, 提示细胞凋亡受到抑制。表明苏木酮 A 能改善 RA 大鼠踝关节滑膜组织的损伤。

### 3.3 苏木酮 A 对 RA 大鼠踝关节组织中 IL-6、TNF- $\alpha$ 和 MMP-9 表达的影响

如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠踝关节组织中 IL-6、TNF- $\alpha$  和 MMP-9 表达升高, 表明模型组大鼠踝关节组织出现炎性损伤; 与模型组比较, 苏木酮 A 组大鼠踝关节组织中 IL-6、TNF- $\alpha$  和 MMP-9 表达降低, 表明苏木酮 A 可抑制 RA 大鼠炎性因子的表达。

### 3.4 苏木酮 A 对 Raw264.7 细胞存活率的影响

如图 4 所示, 苏木酮 A (2.5、5.0、10.0  $\mu\text{mol/L}$ ) 组 Raw264.7 细胞存活率均大于 80%。

### 3.5 苏木酮 A 对脂多糖诱导的 Raw264.7 细胞一氧化氮和 IL-6 水平的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组一氧化氮

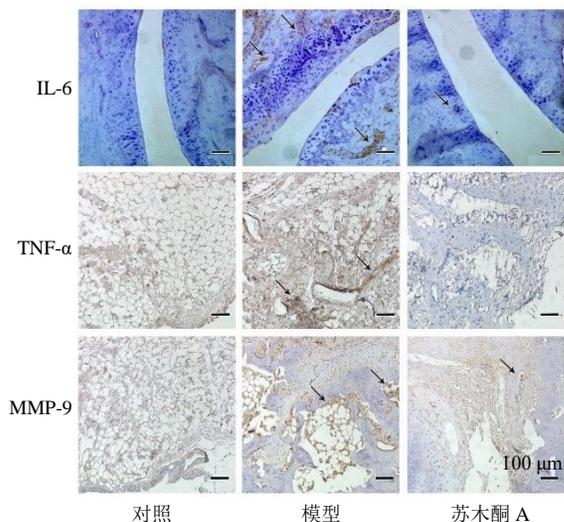


图3 苏木酮A对RA大鼠踝关节组织中IL-6、TNF-α和MMP-9表达的影响

Fig. 3 Effect of sappanone A on expressions of IL-6, TNF-α and MMP-9 in ankle joint tissue of RA rats

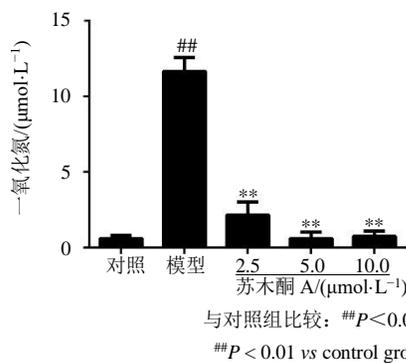


图5 苏木酮A对脂多糖诱导的Raw264.7细胞一氧化氮和IL-6水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 5 Effect of sappanone A on levels of nitric oxide and IL-6 in Raw264.7 cells induced by lipopolysaccharide ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

#### 4 讨论

RA 疾病发展迅速, 如果患者在早期不能得到有效治疗, 则可能恶化成疾。RA 病理特征表现为关节肿胀、滑膜细胞增生、炎症因子大量释放<sup>[2-3]</sup>。成纤维样滑膜细胞是 RA 患者滑膜组织中的主要细胞类型之一, 被认为是治疗 RA 的有效靶点<sup>[11-14]</sup>。因此, 抑制滑膜细胞增生可作为治疗 RA 的指标之一。促炎细胞因子 IL-6 和 TNF-α 作为重要的炎症介质参与机体的炎症反应, 可作为 RA 的评价指标。MMP-9 具有降解和再塑造细胞外基质的功能, 参与机体中多种病理和生理过程<sup>[15]</sup>。MMP-9 的表达与活化可促进 RA 中炎症细胞浸润, 参与患者骨组织的侵蚀和破坏<sup>[16]</sup>。

苏木酮 A 是从苏木中发现的抗炎活性成分, 课题组前期研究发现其具有良好的抑制神经炎症作用。本研究发现苏木酮 A 能有效抑制牛 II 型胶原蛋

和 IL-6 水平显著增加 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 苏木酮 A (2.5、5.0、10.0 μmol/L) 显著抑制一氧化氮和 IL-6 水平 ( $P < 0.01$ ), 呈剂量相关性, 表明苏木酮 A 可抑制脂多糖诱导的炎症。

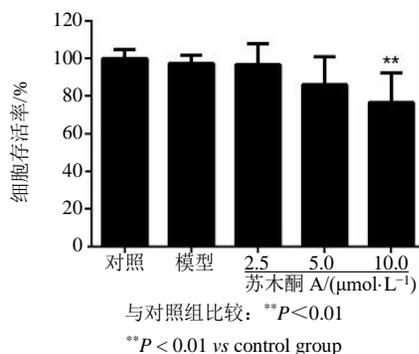
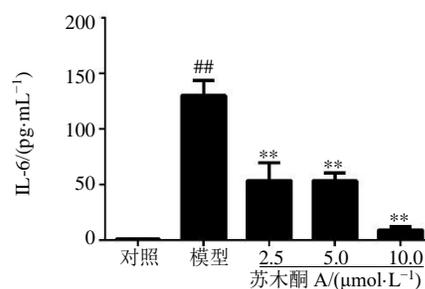


图4 苏木酮A对脂多糖诱导的Raw264.7细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 4 Effect of sappanone A on viability of Raw264.7 cells induced by lipopolysaccharide ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )



白诱导的 RA 大鼠足肿胀、踝关节滑膜组织损伤和炎症反应, 其机制可能为抑制滑膜组织细胞凋亡、成纤维细胞增殖和炎症因子释放; 苏木酮 A 能显著降低脂多糖诱导的 Raw264.7 细胞中炎症介质一氧化氮和 IL-6 的分泌, 表明苏木酮 A 的抗 RA 作用与抑制炎症因子生成有关。本研究从体内外探讨了苏木酮 A 对 RA 的治疗作用, 为抗 RA 药物的开发提供了参考。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Kourilovitch M, Galarza-Maldonado C, Ortiz-Prado E. Diagnosis and classification of rheumatoid arthritis [J]. *J Autoimmun*, 2014, 48/49: 26-30.
- [2] 张晓攀, 李艳贞, 李珊珊, 等. 类风湿性关节炎治疗药物研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2018, 41(10): 1906-1910.

- [3] Bottini N, Firestein G. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: Passive responders and imprinted aggressors [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2013, 9(1): 24-33.
- [4] 胡小丽, 谷颖, 蔡燕, 等. 肌骨超声评价类风湿性指关节炎的病理特征及炎性病变 [J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(20): 3182-3187.
- [5] 王静, 赵庆杰, 卓小斌, 等. 类风湿性关节炎的治疗药物研究进展 [J]. *药实践杂志*, 2019, 37(6): 485-490.
- [6] Nissen S E, Yeomans N D, Solomon D H, *et al.* Cardiovascular safety of celecoxib, naproxen, or ibuprofen for arthritis [J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(26): 2519-2529.
- [7] Chen Y R, Hsieh F I, Chang C C, *et al.* Effect on risk of stroke and acute myocardial infarction of nonselective nonsteroidal anti-inflammatory drugs in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Am J Cardiol*, 2018, 121(10): 1271-1277.
- [8] Urushibara M, Takayanagi H, Koga T, *et al.* The antirheumatic drug leflunomide inhibits osteoclastogenesis by interfering with receptor activator of NF-kappa B ligand-stimulated induction of nuclear factor of activated T cells c1 [J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(3): 794-804.
- [9] 孔令魁, 胡鹏飞, 任旭朝, 等. 苏木的药理活性研究进展 [J]. *安徽化工*, 2019, 45(4): 5-7.
- [10] Liao L X, Song X M, Wang L C, *et al.* Highly selective inhibition of IMPDH2 provides the basis of antineuroinflammation therapy [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2017, 114 (29): 5986-5994.
- [11] Zhang Q, Liu J, Zhang M, *et al.* Apoptosis induction of fibroblast-like synoviocytes is an important molecular-mechanism for herbal medicine along with its active components in treating rheumatoid arthritis [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(12): 795-823.
- [12] Smolen J S, Aletaha D, McInnes I B. Rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2016, 388(10055): 2023-2038.
- [13] Bartox B, Firestein G S. Fibroblast-like synoviocytes: Key effector cells in rheumatoid arthritis [J]. *Immunol Rev*, 2010, 233(1): 233-255.
- [14] 白雪, 付瑞嘉, 乐世俊, 等. 雷公藤治疗类风湿性关节炎研究进展 [J]. *中草药*, 2020, 51(1): 265-275.
- [15] Newby A C. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture [J]. *Physiol Rev*, 2005, 85(1): 1-31.
- [16] 谢建民, 王好问, 陆才生. TNF- $\alpha$  上调单核巨噬细胞 MMP-9 的活性与类风湿性关节炎关节破坏的关系 [J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(6): 1181-1185.

[责任编辑 李亚楠]