

• 药理与临床 •

基于 NF- κ B 通路探讨杜仲皮、叶醇提取物对胶原诱导型关节炎大鼠炎症性骨破坏的影响

张 妍¹, 王健英², 陈晓云³, 张 磊², 袁 颖^{1*}

1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203

2. 上海中医药大学协同创新中心, 上海 201203

3. 上海中医药大学附属龙华医院 类风湿科, 上海 200032

摘 要: 目的 研究杜仲皮、叶醇提取物对胶原诱导型关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 大鼠骨破坏的治疗作用及机制。方法 随机选取 6 只雌性 Wistar 大鼠作为对照组, 其余大鼠于背部多点及尾根部 sc 0.1 mL 牛 II 型胶原乳剂建立 CIA 模型, 第 14 天将 CIA 大鼠随机分为模型组, 杜仲皮醇提取物低、高剂量 (2、4 g/kg) 组, 杜仲叶醇提取物低、高剂量 (2、4 g/kg) 组及甲氨蝶呤 (1 mg/kg) 组, 各给药组 ig 相应药物, 1 次/d, 连续 4 周。观察各组大鼠足肿胀情况; 采用苏木精-伊红 (HE) 染色法观察各组大鼠踝关节病理变化; 采用 ELISA 法检测各组大鼠血清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 水平; 采用 qRT-PCR 法检测各组大鼠脾脏中炎症因子如 TNF- α 、TNF 受体相关因子-6 (TNF receptor-associated factor-6, TRAF-6)、IL-1 β 、IL-17、IL-1 β mRNA 表达, 膝关节组织中破骨细胞标志物如抗酒石酸性磷酸酶 (tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)、活化 T 细胞的核因子 c1 (nuclear factor of activated T cells cytoplasmic 1, NFATc1)、组织蛋白酶 K (cathepsin K, CTSK)、原癌基因 c-Fos、核转录因子- κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL) mRNA 表达, 膝关节组织中血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) mRNA 表达及成骨细胞标志物如金属蛋白酶组织抑制剂 1 (tissue inhibitor 1 of metalloproteinases, TIMP1)、骨钙素 (osteocalcin, OCN)、骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) mRNA 表达; 采用 Western blotting 法检测各组大鼠膝关节组织中磷酸化 NF- κ B 抑制蛋白激酶 α/β (phosphorylated inhibitor of NF- κ B kinase α/β , p-I κ B α/β)、磷酸化 NF- κ B 抑制蛋白 α (phosphorylated inhibitor α of NF- κ B, p-I κ B α)、磷酸化 p65 (p-p65) 蛋白表达情况。结果 与模型组比较, 杜仲皮、叶醇提取物可显著降低 CIA 大鼠足肿胀度 ($P < 0.05$ 、 0.01); 改善踝关节组织病理; 显著降低 CIA 大鼠血清中 TNF- α 、IL-6 水平 ($P < 0.01$); 显著降低 CIA 大鼠脾脏中 TNF- α 、TRAF-6、IL-1 β 、IL-17 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 显著降低 CIA 大鼠膝关节组织中 TRAP、NFATc1、CTSK、c-Fos、RANKL、VEGF、HIF-1 mRNA 表达水平 ($P < 0.01$), 显著升高 CIA 大鼠膝关节组织中 TIMP1、OCN、OPG mRNA 表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 显著降低 CIA 大鼠膝关节组织中 p-I κ B α/β 、p-I κ B α 、p-p65 蛋白表达水平 ($P < 0.01$)。结论 杜仲皮、叶醇提取物可以减轻 CIA 大鼠关节炎症, 抑制促血管生成因子的表达, 延缓关节内软骨与骨的破坏, 其机制与调控 NF- κ B 通路相关的炎症性骨代谢有关。

关键词: 类风湿关节炎; 杜仲皮、叶醇提取物; 胶原诱导型关节炎; 大鼠; 炎症; 骨破坏

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)06-1645-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.06.012

Effects of ethanol extracts of barks and leaves from *Eucommia ulmoides* on inflammatory bone destruction in collagen-induced arthritis rats based on NF- κ B pathway

ZHANG Yan¹, WANG Jian-ying², CHEN Xiao-yun³, ZHANG Lei², YUAN Ying¹

1. School of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. Shanghai Innovation Center of TCM Health Service, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

3. Shanghai Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

收稿日期: 2020-11-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773922); 上海自然科学基金资助项目 (19ZR1452000)

作者简介: 张 妍 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药及复方药效作用机制研究。E-mail: ZY180629@163.com

*通信作者: 袁 颖, 女, 博士, 硕士生导师, 研究方向为中药及复方药效作用机制研究。Tel: 18621174662 E-mail: yyin921@163.com

Abstract: Objective To study the therapeutic effect and mechanism of alcohol extract of barks and leaves from Duzhong (*Eucommia ulmoides*) on bone destruction of collagen-induced arthritis (CIA) rats. **Methods** Six female Wistar rats were randomly selected as control group, the rest of rats were sc 0.1 mL bovine type II collagen emulsion at multiple points on back and tail to establish CIA model. On 14th day, CIA rats were randomly divided into model group, alcohol extract of barks from *E. ulmoides* low- and high-dose (2 and 4 g/kg) groups, alcohol extract of leaves from *E. ulmoides* low- and high-dose (2 and 4 g/kg) groups, and methotrexate (1 mg/kg) group, rats were ig corresponding drugs, once a day for 4 weeks. Foot swelling situation of each group was observed. Hematoxylin-eosin (HE) staining method was used to observe the pathological changes of ankle joint in each group of rats. Levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in serum were detected by ELISA. qRT-PCR was used to detect mRNA levels of inflammatory factors such as TNF- α , TNF receptor related factor-6 (TRAF-6), IL-1 β , IL-17, and IL-1 β in spleen, osteoclast markers such as tartrate resistant acid phosphatase (TRAP), nuclear factor of activated T cells cytoplasmic 1 (NFATc1), cathepsin K (CTSK), proto-oncogene *c-Fos*, and receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) mRNA expressions, vascular endothelial growth factor (VEGF), and hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) mRNA expressions, and osteoblast markers such as tissue inhibitor 1 of metalloproteinases (TIMP1), osteocalcin (OCN) and osteoprotegerin (OPG) mRNA expressions in knee joints; Western blotting was used to detect expressions of phosphorylated inhibitory of NF- κ B kinase α/β (p-I κ B α/β), phosphorylation inhibitor α of NF- κ B (p-I κ B α), phosphorylated p65 (p-p65) in knee joints. **Results** Compared with model group, swelling of feet was significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$), pathology of ankle joint was improved, levels of TNF- α and IL-6 in serum were significantly reduced ($P < 0.01$), TNF- α , TRAF-6, IL-1 β , IL-17 mRNA levels in spleen were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$), TRAP, NFATc1, CTSK, *c-Fos*, RANKL, VEGF, HIF-1 mRNA levels in knee joints were significantly reduced ($P < 0.01$), TIMP1, OCN, OPG mRNA levels in knee joints were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), expressions of p-I κ B α/β , p-I κ B α , and p-p65 in knee joints were significantly reduced ($P < 0.01$) in alcohol extract of barks and leaves from *E. ulmoides* groups. **Conclusion** Barks and leaves from *E. ulmoides* can relieve joint inflammation in CIA rats, inhibit expressions of pro-angiogenic factors, and delay the destruction of cartilage and bone in the joints, of which mechanism is related to the regulation of inflammatory bone metabolism related to NF- κ B pathway.

Key words: rheumatoid arthritis; alcohol extract of barks and leaves from *Eucommia ulmoides* Oliv.; collagen-induced rheumatoid arthritis; rats; inflammation; bone destruction

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以慢性多关节炎和骨质破坏为主的自身免疫疾病, 其主要病理特征为滑膜炎性细胞增生、软骨和骨破坏、关节畸形等。目前治疗 RA 的药物主要针对关节炎症, 研究发现, RA 后期, 即使滑膜炎已经得到控制, 但骨质的破坏仍可造成关节不可逆损伤^[1]。核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 位于细胞质中, 与 NF- κ B 抑制蛋白 (inhibitor of NF- κ B, I κ B) 结合为非活性复合物, 炎性状态下 I κ B 蛋白降解, NF- κ B 被释放并转移到细胞核, 调控炎症细胞因子如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 转录, 激活多个炎症信号。关节内的巨噬细胞可分泌大量炎症细胞因子, 激活 NF- κ B 通路, 导致大量炎症细胞浸润, 加剧软骨损伤^[2]。

中医常选用具有祛风湿、强筋骨、活血化瘀等功效的药物治 RA, 既能抗炎、镇痛, 也能抑制自身免疫应答的发生并调节全身免疫系统。杜仲具有补肝肾、强筋骨的功效, 常用于治疗肝肾亏虚、腰膝酸痛。杜仲的活性成分具有降血压、提高免疫

功能、抗衰老、抗炎、抗肿瘤、利尿等作用^[3-5]。课题组前期研究发现, 杜仲皮醇提物体外可抑制人 RA 滑膜细胞的增殖, 促进其凋亡; 体内可降低胶原诱导型关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 大鼠模型足肿胀及关节炎评分、改善滑膜炎浸润、减轻血管翳形成^[6]。杜仲皮作为杜仲的传统入药部位, 药源日趋紧缺。本研究探究杜仲皮、叶醇提物对 CIA 大鼠骨破坏的治疗作用及机制, 为杜仲皮、叶等药用部位应用于 RA 的治疗提供依据。

1 材料

1.1 动物

雌性 Wistar 大鼠 42 只, 体质量 (120 $\pm$ 10) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号 SCXK (京) 2016-0011。动物实验经上海中医药大学实验动物福利和动物实验伦理委员会批准 (批准号 PZSHUTCM18122823)。

1.2 药材

杜仲皮、叶 (批号分别为 180915、20181116) 购于上海康桥中药饮片公司, 经上海中医药大学吴靳荣教授鉴定为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮及叶。

1.3 药品与试剂

甲氨蝶呤 (2.5 mg/片, 批号 036170604) 购自上海上药信谊药厂有限公司; II 型胶原、完全弗氏佐剂购自美国 Chondrex 公司; TNF- α 、IL-6 ELISA 试剂盒购自杭州联科生物科技股份有限公司; RNA 提取试剂盒、4 $\times$ Reverse Transcription Master Mix、2 $\times$ SYBR Green qPCR Master Mix 购自美国 EZBioscience 公司; 引物购自上海生工生物工程股份有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒、牛血清白蛋白购自大连美仑生物技术有限公司; RIPA 裂解液购自美国 Sigma 公司; 蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂购自瑞士 Roche 公司; SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、蛋白上样缓冲液、三色预染蛋白 Marker、超敏发光液购自上海雅酶生物科技有限公司; PVDF 膜购自美国 Millipore 公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔 IgG 抗体购自武汉 ABclonal 公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、磷酸化 p65 (p-p65)、磷酸化 I κ B α (p-I κ B α)、磷酸化 NF- κ B 抑制蛋白激酶 α/β (phosphorylated inhibitor of NF- κ B kinase α/β , p-I κ B α/β) 抗体购自美国 CST 公司。

1.4 仪器

低速台式离心机 (德国 Eppendorf 公司); 正置显微镜 (日本 Olympus 公司); 多功能酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); YLS-7A 足趾容积测量仪 (济南益延科技发展有限公司); RM2265 全自动轮转式石蜡切片机 (德国 Leica 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); 电泳仪、电泳槽、转印槽 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 杜仲皮、叶醇提物的制备

分别精确称取 200 g 干燥杜仲皮、叶粉末, 加入 70% 乙醇, 加热回流提取, 真空干燥。杜仲皮、叶醇提物临用前分别以蒸馏水配制成质量浓度为 0.5、1.0 g/mL (以生药量计) 的溶液, 分别用作杜仲皮、叶醇提物低、高剂量组^[6-9]。

2.2 CIA 大鼠模型制备、分组与给药

牛 II 型胶原蛋白溶于 0.1 mol/L 醋酸, 与等体积完全弗氏佐剂乳化, 制成稳定的乳剂 (10 mg/mL)。随机选取 6 只大鼠作为对照组, 其余大鼠于背部多点及尾根部 sc 0.1 mL 乳剂, 对照组大鼠于同部位 sc 等体积生理盐水, 记为第 0 天; 第 7 天, 大鼠尾根部 sc 0.1 mL 乳剂, 加强免疫。第 14 天大鼠 CIA 模

型成功建立, 按照文献报道方法^[10], 将 CIA 大鼠随机分为模型组, 杜仲皮醇提物低、高剂量 (2、4 g/kg, EB-2、EB-4) 组, 杜仲叶醇提物低、高剂量 (2、4 g/kg, EL-2、EL-4) 组及甲氨蝶呤 (1 mg/kg) 组, 每组 6 只。各给药组大鼠 ig 相应药物 (10 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积蒸馏水, 1 次/d, 连续 4 周。

2.3 杜仲皮、叶醇提物对 CIA 大鼠足容积和关节炎评分的影响

每 7 天用足趾容积测量仪测量大鼠足容积, 并进行关节炎评分。关节炎评分标准: 0 分为无肿胀、红肿; 1 分为跗骨或踝关节出现红肿; 2 分为从脚踝到跗骨出现肿胀和发红; 3 分为从脚踝到跗骨关节出现红肿; 4 分为脚踝、跗骨和跗骨周围红肿^[11]。

2.4 杜仲皮、叶醇提物对 CIA 大鼠血清炎症因子水平的影响

给药结束后, 乌拉坦麻醉大鼠, 采用腹主动脉取血, 按照试剂盒说明书检测各组大鼠血清中 TNF- α 、IL-6 水平。

2.5 杜仲皮、叶醇提物对 CIA 大鼠踝关节病理变化的影响

大鼠脱颈椎处死, 取各组大鼠踝关节, 于 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 10% 乙二胺四乙酸脱钙、石蜡包埋后切片 (厚 4 mm); 苏木素-伊红 (HE) 染色, 于显微镜下观察各组大鼠踝关节的滑膜炎症、血管翳形成及骨破坏情况并评分。评分标准: 0 分为无炎性细胞浸润、无血管翳形成、无骨破坏; 1 分为炎性细胞浸润或轻微水肿、少量血管翳形成、骨轻度破坏; 2 分为炎性细胞中等浸润、大量血管翳形成、骨中度破坏; 3 分为炎性细胞严重浸润、关节腔狭窄; 4 分为血管翳形成、骨重度破坏^[9]。

2.6 杜仲皮、叶醇提物对 CIA 大鼠脾脏及膝关节中炎症因子和骨代谢因子 mRNA 表达的影响

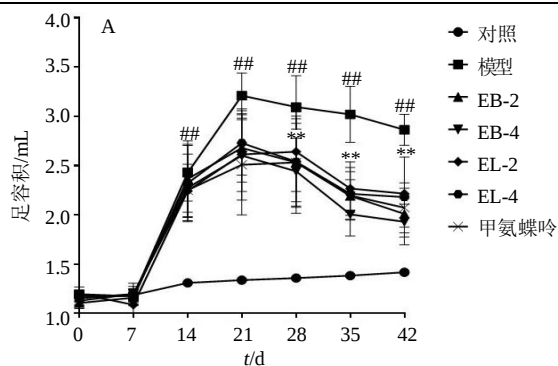
取各组大鼠脾脏及膝关节, 按照试剂盒说明书提取 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析, 检测大鼠脾脏中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-17 及膝关节中抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)、TNF 受体相关因子-6 (TNF receptor-associated factor-6, TRAF-6)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1)、活化 T 细胞的核因子 c1 (nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1, NFATc1)、组织蛋白酶 K (cathepsin K, CTSK)、原癌基因 c-Fos、核转录因

子- κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of NF- κ B ligand, *RANKL*)、金属蛋白酶组织抑制剂 1 (tissue inhibitor 1 of metalloproteinases, *TIMP1*)、骨钙素 (osteocalcin, *OCN*)、骨保护素 (osteoprotegerin, *OPG*) mRNA 表达情况。qRT-PCR 程序: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C、10 s, 60 °C、30 s, 40 个循环, 72 °C 延伸 90 s。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称	序列
<i>GAPDH</i>	5'-CCACCCATGGCAAATTCATGGCA-3' 5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC-3'
<i>TNF-α</i>	5'-GGAAAGCATGATCCGAGATG-3' 5'-CGAGCAGGAATGAGAAGAGG-3'
<i>IL-1β</i>	5'-CTCACAGCATCTCGACAAGAG-3' 5'-CACACTAGCAGGTCGTCATCATCC-3'
<i>IL-6</i>	5'-CACAGAGGATACCACCCACA-3' 5'-CAGAAATGCGATTGCACAAC-3'
<i>IL-17</i>	5'-GCCGAGGCCAATAACTTTCT-3' 5'-AGCCACAAATCTCAGGGTGG-3'
<i>TRAF-6</i>	5'-TCTCGGAGTGCTGCGTGTATAGG-3' 5'-GTCGCTTAGAGACTGGCTGGAC-3'
<i>VEGF</i>	5'-GGCAGCTTGAGTTAAACGAAC-3' 5'-TGGTGACATGGTTAATCGGTC-3'
<i>HIF-1</i>	5'-GGAAATGCTGGCTCC CTAT-3' 5'-CTGTAAGTGGGTCTGCTGGA-3'
<i>TRAP</i>	5'-CCATTGTTAGCCACATACGG-3' 5'-CACTCAGCACATAGCCCA-3'
<i>NFATc1</i>	5'-GGAGAGTCCGAGAATCGAGAT-3' 5'-TTGCAGCTAGGAAGTACGTCT-3'
<i>CTSK</i>	5'-TAGCACCCCTTAGTCTTCCGC-3' 5'-CTTGAACACCCACATCCTGC-3'
<i>c-Fos</i>	5'-TTTCAACGCCGACTACGAGG-3' 5'-GCGCAAAAGTCTGTGTGT-3'
<i>TIMP1</i>	5'-CGAGACCACCTTATACCAGCG-3' 5'-ATGACTGGGGTGTAGGCGTA-3'
<i>OCN</i>	5'-GCGCTCTGTCTCTGACCT-3' 5'-ACCTTATTGCCCTCCTGCTT-3'
<i>OPG</i>	5'-GGCAGGGCATACTTCTGTT-3' 5'-GCCACTTGTTCATTGTGGTCC-3'
<i>RANKL</i>	5'-AGGCTGGGCCAAGATCTCTA-3' 5'-GATAGTCCGCAGGTACGCTC-3'



与对照组比较: * $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below

图 1 杜仲皮、叶醇提物对 CIA 大鼠足容积 (A) 和关节炎评分 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effect of ethanol extract of barks and leaves from *E. ulmoides* on foot volume (A) and arthritis score (B) of CIA rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.7 杜仲皮、叶醇提物对 CIA 大鼠 NF- κ B 通路相关蛋白表达

取 20 mg 各组大鼠膝关节组织, 加入 RIPA 裂解液 (含蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂) 于冰上研磨, 提取蛋白, 用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量, 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% 脱脂牛奶封闭, 分别加入 p-I κ α / β 、p-I κ B α 、p-p65 抗体 (1:1000), 于 4 °C 孵育过夜, 加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (1:5000), 于室温孵育 2 h, 加入超敏发光液, 采用蛋白凝胶电泳成像仪曝光, Image 软件分析蛋白条带的灰度值。

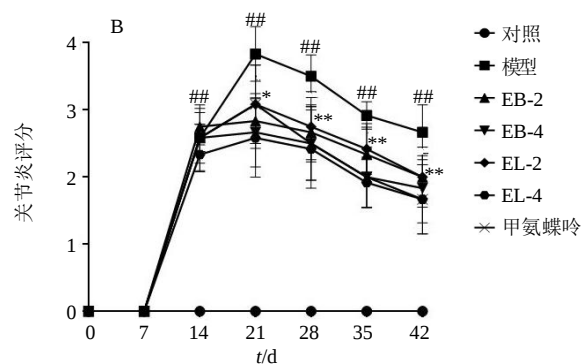
2.8 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件对实验数据进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据符合正态分布且方差齐性较好, 多组样本量比较采用单因素方差分析, 组间的两两比较采用 LSD- t 检验; 不符合正态分布且方差不齐时, 采用非参数检验进行比较。

3 结果

3.1 杜仲皮、叶醇提物对 CIA 大鼠足容积和关节炎评分的影响

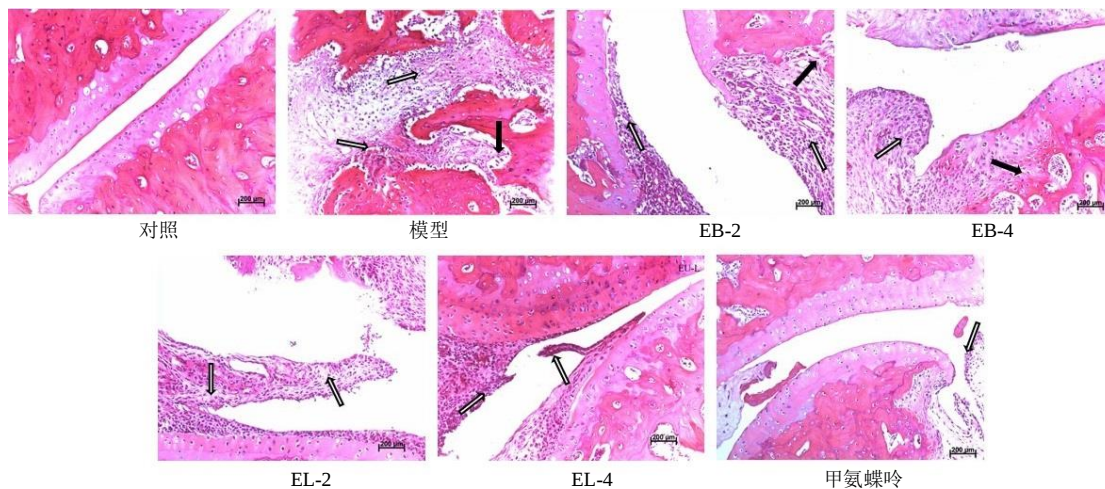
如图 1-A 所示, 与对照组比较, 自第 14 天造模大鼠足容积显著升高 ($P < 0.01$), 踝关节红肿明显、变形严重, 表明 CIA 模型制备成功; 与模型组比较, 自第 28 天, 各给药组大鼠足容积显著降低 ($P < 0.01$), 关节肿胀程度均减轻。如图 1-B 所示, 与对照组比较, 自第 14 天造模大鼠关节炎评分显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 自第 21 天, 各给药组大鼠关节炎评分显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。



3.2 杜仲皮、叶醇提取物对 CIA 大鼠踝关节病理变化的影响

如图 2 所示, 对照组大鼠关节组织未见明显病理改变; 模型组大鼠关节软骨变性坏死, 纤维组织增生, 关节腔内大量炎性细胞浸润, 部分骨及骨小梁坏死; EB-2 组大鼠关节软骨部分变性坏死, 血管翳形成, 纤维组织、滑膜增生, 炎性细胞浸润; EB-4 组大鼠关节组织少量关节滑膜变性坏死, 血

管翳形成, 滑膜增生; EL-2 组大鼠关节滑膜变性坏死, 纤维组织增生, 关节腔内大量炎性细胞浸润, 纤维组织增生, 滑膜增生, 部分骨及骨小梁坏死; EL-4 组大鼠关节软骨部分变性坏死, 血管翳形成, 滑膜增生, 炎性细胞浸润; 甲氨蝶呤组关节腔内少量炎性细胞浸润, 少量滑膜增生。如图 3 所示, 与模型组比较, 各给药组病理评分均显著降低 ($P<0.01$)。



白色箭头表示滑膜增生及血管翳; 黑色箭头表示软骨侵蚀

White arrow shows synovial hyperplasia and pannus; Black arrow shows cartilage erosion

图 2 杜仲皮、叶醇提取物对 CIA 大鼠踝关节病理变化的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of ethanol extract of barks and leaves from *E. ulmoides* on pathological changes in joint of CIA rats (HE, $\times 200$)

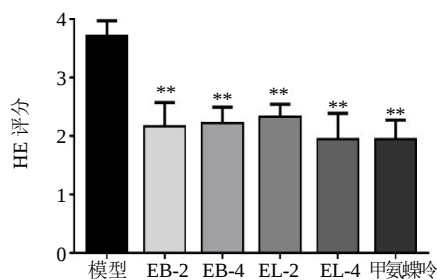


图 3 杜仲皮、叶醇提取物对 CIA 大鼠踝关节病理变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 3 Effect of ethanol extract of barks and leaves from *E. ulmoides* on pathological changes in joint of CIA rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.3 杜仲皮、叶醇提取物对 CIA 大鼠血清炎症因子水平的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 TNF- α 、IL-6 水平显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠血清中 TNF- α 、IL-6 水平均明显降低 ($P<0.01$), 表明杜仲皮、叶醇提取物可以

降低 CIA 大鼠血清中 TNF- α 、IL-6 等炎症因子水平, 对炎症具有一定的抑制作用。

3.4 杜仲皮、叶醇提取物对 CIA 大鼠脾脏中炎症因子 mRNA 表达的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠脾脏中 TNF- α 、IL-1 β 、TRAF-6、IL-17 mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.05, 0.01$); 与模型组比较, 除 EL-2 组大鼠脾脏中仅 TNF- α 、IL-1 β 、TRAF-6 mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.01$), 其余给药组大鼠脾脏中 TNF- α 、IL-1 β 、TRAF-6、IL-17 mRNA 表达水平均显著降低 ($P<0.01$)。

3.5 杜仲皮、叶醇提取物对 CIA 大鼠膝关节中骨代谢因子 mRNA 表达的影响

如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠膝关节组织中血管新生相关因子如 VEGF、HIF-1 及破骨细胞标志物如 NFATc1、TRAP、c-Fos、CTSK、RANKL mRNA 表达水平均显著升高 ($P<0.01$), 成骨标志物如 TIMP1、OCN mRNA 表达水平均显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠膝关节组织中血

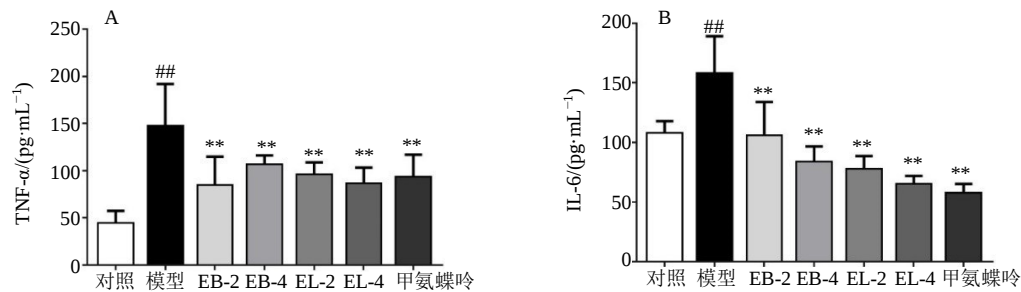


图 4 杜仲皮、叶醇提取物对 CIA 大鼠血清中 TNF- α (A) 和 IL-6 (B) 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 4 Effect of ethanol extract of barks and leaves from *E. ulmoides* on levels of TNF- α (A) and IL-6 (B) in serum of CIA rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

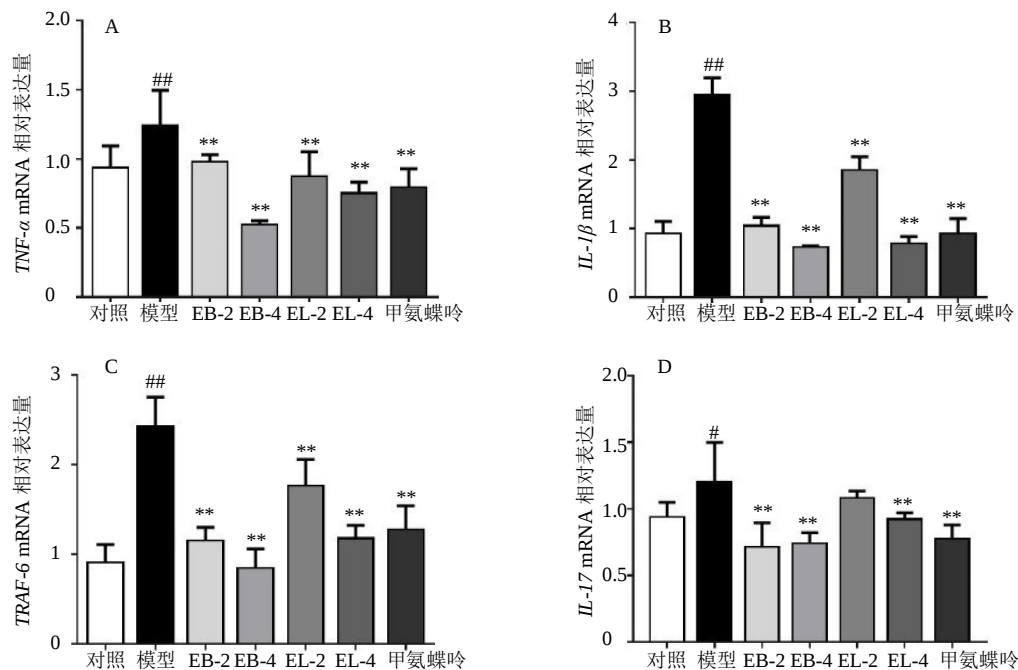


图 5 杜仲皮、叶醇提取物对 CIA 大鼠脾脏中 TNF- α (A)、IL-1 β (B)、TRAF-6 (C) 和 IL-17 (D) mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 5 Effect of ethanol extract of barks and leaves from *E. ulmoides* on mRNA levels of TNF- α (A), IL-1 β (B), TRAF-6 (C), and IL-17 (D) in spleen of CIA rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

管新生相关因子如 VEGF、HIF-1 及破骨细胞标志物如 NFATc1、TRAP、c-Fos、CTSK、RANKL mRNA 表达水平均显著降低 ($P<0.01$), EB-2 组大鼠膝关节组织中 TIMP1、OCN mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.01$), EB-4 组大鼠膝关节组织中 TIMP1、OCN、OPG mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.05, 0.01$), EL-2 组大鼠膝关节组织中 OCN mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.01$), EL-4 组大鼠膝关节组织中 TIMP1、OCN、OPG mRNA 表达水平均显著升高 ($P<0.05, 0.01$)。

3.6 杜仲皮、叶醇提取物对 CIA 大鼠膝关节组织 NF- κ B 通路相关蛋白表达的影响

如图 7、8 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠

膝关节组织 NF- κ B 通路中 p-I κ B α /p-I κ B β 、p-I κ B α 、p-p65 蛋白表达水平均显著升高 ($P<0.05, 0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠膝关节组织中 p-I κ B α 、p-p65 蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.01$), EB-4、EL-4 组大鼠膝关节组织中 p-I κ B α /p-I κ B β 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$)。

4 讨论

RA 是一种以慢性多关节炎症和骨破坏为主的自身免疫疾病, 中医学认为 RA 属于“痹病”范畴, 风寒湿邪导致经络闭阻为标, 肝肾亏虚为本。杜仲具有补肝肾、强筋骨的功效, 在增强免疫、降血压、抗骨质疏松、抗炎和抗衰老等方面有一定的作用^[3]。

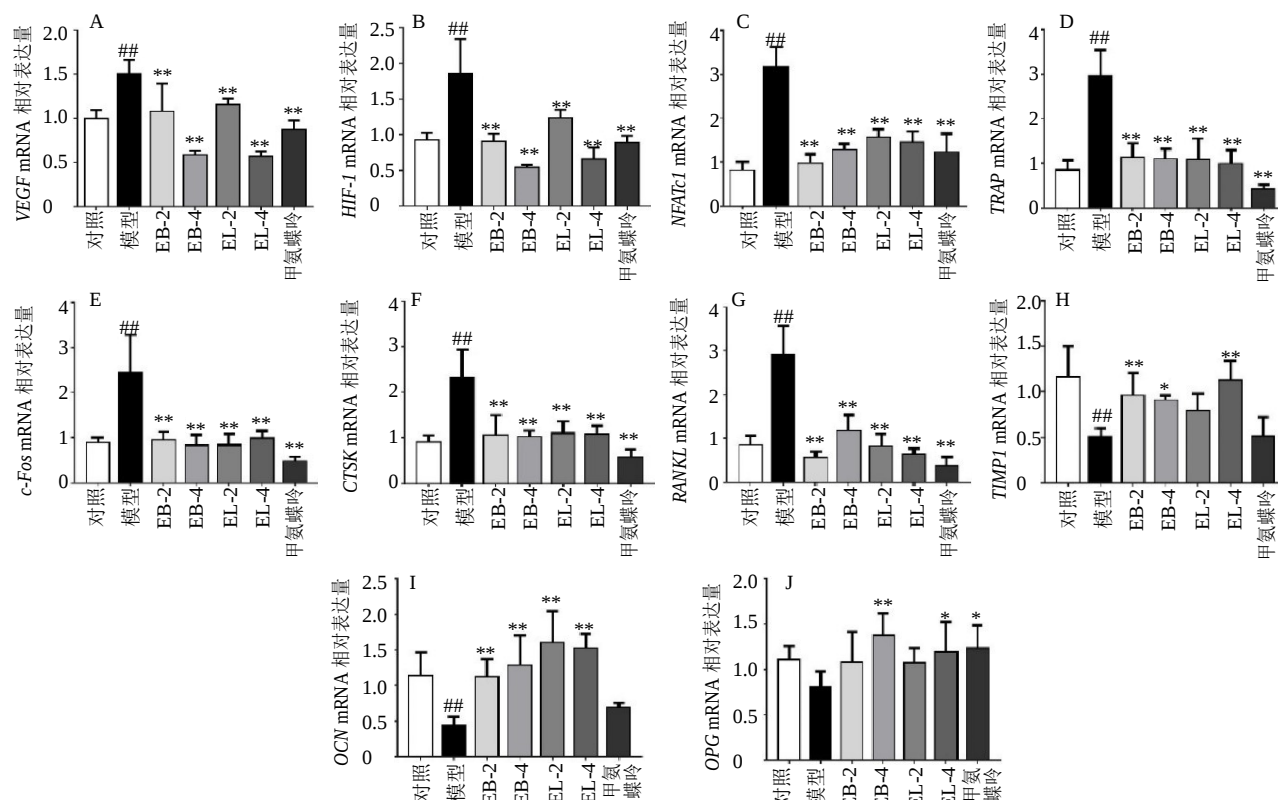


图 6 杜仲皮、叶醇提取物对 CIA 大鼠膝关节中 VEGF (A)、HIF-1 (B)、NFATc1 (C)、TRAP (D)、c-Fos (E)、CTSK (F)、RANKL (G)、TIMP1 (H)、OCN (I) 和 OPG (J) mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Effect of ethanol extract of barks and leaves from *E. ulmoides* on mRNA levels of VEGF (A), HIF-1 (B), NFATc1 (C), TRAP (D), c-Fos (E), CTSK (F), RANKL (G), TIMP1 (H), OCN (I), and OPG (J) in knee joints of CIA rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

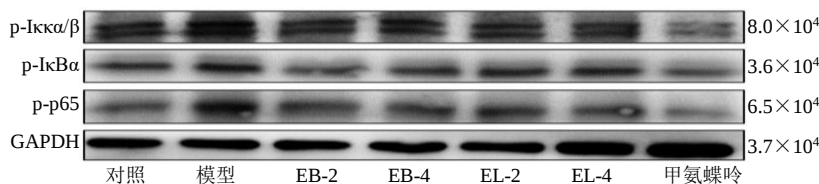


图 7 杜仲皮、叶醇提取物对 CIA 大鼠膝关节中 NF-κB 通路相关蛋白表达的影响

Fig. 7 Effect of ethanol extract of barks and leaves from *E. ulmoides* on expressions of NF-κB related protein in knee joints of CIA rats

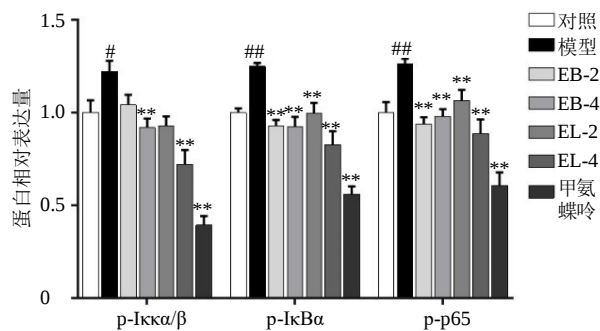


图 8 杜仲皮、叶醇提取物对 CIA 大鼠膝关节中 NF-κB 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 8 Effect of ethanol extract of barks and leaves from *E. ulmoides* on expressions of NF-κB related protein in knee joints of CIA rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

杜仲叶与杜仲皮具有相似的化学成分和临床功效。研究表明,杜仲叶具有抗骨质疏松、抑菌和抗氧化的药理作用^[12];杜仲叶总提取物可以改善骨质疏松(osteoporosis, OP)模型动物骨代谢,增加骨质疏松模型动物的骨密度,加强骨稳定、减少骨破坏,可有效防治骨质疏松症^[13];杜仲叶提取物/磷酸钙骨水泥(calcium phosphate cement, CPC)复合载体具有促进成骨细胞增殖、生长、黏附的作用^[14]。课题组前期研究发现,杜仲皮对 CIA 模型大鼠具有良好的治疗作用,但杜仲叶与杜仲皮药理作用的一致性尚不明确。

本研究结果显示,模型组大鼠关节红肿、踝关

节畸形,与 RA 临床表现相似;杜仲皮、叶明显减轻 CIA 大鼠的关节肿胀程度,减轻关节软骨部分坏死,减少血管翳形成,抑制炎细胞浸润、纤维组织及滑膜增生,表明杜仲皮与杜仲叶可有效抑制 CIA 大鼠模型关节炎炎症反应,改善关节病理特征。

TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 由活化的巨噬细胞产生,在 RA 的发生、发展中起重要作用。TNF- α 、IL-1 β 可激活 NF- κ B,从而激活内皮细胞,促进血管新生因子生成,为炎症细胞提供营养和氧,促进其向炎症组织浸润。IL-6 可刺激中性粒细胞迁移,促进破骨细胞成熟,促进 VEGF 生成,诱导炎症细胞浸润,从而导致血管炎、滑膜炎和关节破坏^[15]。TNF 和 IL-6 受体阻断剂可有效延缓 RA 骨侵蚀^[16]。本研究结果显示,杜仲皮、叶醇提物可显著降低 CIA 大鼠血清中 TNF- α 、IL-6 水平及脾脏中 TNF- α 、TRAF-6、IL-1 β 、IL-17 mRNA 表达水平及膝关节中 VEGF、HIF-1 mRNA 表达水平,表明杜仲的抗炎作用可能与抑制促炎因子的产生及血管新生有关。

炎性状态下,I κ B 蛋白降解,NF- κ B 被释放并转移到细胞核,炎症因子的增加激活 I κ K、I κ B、p65 使之磷酸化,从而调节一系列靶基因的转录活性^[2]。NF- κ B 信号通路与 RA 血管新生有关,在破骨细胞中,NF- κ B 介导 RANKL 诱导的 VEGF 表达^[17]。NF- κ B 的激活增加了 HIF-1 α 启动子的活性,从而增加了 HIF-1 α 表达^[18]。破骨细胞是来源于单核细胞系的巨大多核细胞,是唯一能够在体内吸收骨的细胞,可通过与细胞外基质蛋白的相互作用来吸收骨基质。RA 中,RANKL 激活 NF- κ B 信号,破骨细胞合成的基质酶如 CTSK、TRAP 等可降解骨基质,加剧骨侵蚀^[19]。本研究结果显示,杜仲皮、叶醇提物可显著降低 CIA 大鼠膝关节中 p-I κ α / β 、p-I κ B α 、p-p65 蛋白表达水平,抑制 NF- κ B 信号通路的激活;杜仲皮、叶醇提物可显著降低 CIA 大鼠膝关节中 NFATc1、TRAP、c-Fos、CTSK、RANKL mRNA 表达水平,升高成骨细胞标志物 OCN、OPG mRNA 表达水平,表明杜仲皮、叶醇提物可抑制破骨细胞成熟及骨基质降解,对骨代谢有一定的调节作用,杜仲皮、叶醇提物可能通过抑制 NF- κ B 信号通路来改善 CIA 大鼠模型的炎症性骨破坏。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)参与组织的重塑、修复及血管生成等,受 TIMP 调节,骨关节炎、RA 等疾病发生时,MMPs 蛋白表达升高,与 TIMP 的平衡被打破^[20]。本研究结果显示,

模型组大鼠膝关节中 TIMP1 mRNA 表达水平降低,杜仲皮、叶醇提物可上调 TIMP1 mRNA 表达水平,表明杜仲皮、叶醇提物对关节炎有一定的改善作用,课题组后续将进一步研究杜仲皮、叶醇提物对 MMPs 的影响。

综上所述,杜仲皮、叶醇提物可以减轻 CIA 大鼠关节炎症,抑制促血管生成因子的表达,延缓关节内软骨与骨的破坏,其机制与调控 NF- κ B 通路相关的炎症性骨代谢有关。在改善炎症性骨破坏方面,杜仲皮与杜仲叶有着相似的作用,杜仲叶在一定程度上可替代杜仲皮用于治疗 RA。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Brodsky V, Bíró A, Szekanecz Z, et al. Determinants of biological drug survival in rheumatoid arthritis: Evidence from a Hungarian rheumatology center over 8 years of retrospective data [J]. *Clinicoecon Outcomes Res*, 2017, 9: 139-147.
- [2] Duan W, Li H. Combination of NF- κ B targeted siRNA and methotrexate in a hybrid nanocarrier towards the effective treatment in rheumatoid arthritis [J]. *J Nanobiotechnol*, 2018, 16(1): 58.
- [3] He X R, Wang J H, Li M X, et al. *Eucommia ulmoides* Oliv.: Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(1): 78-92.
- [4] 李莉莉,马宁宁,范姗姗,等.杜仲不同提取物对帕金森病小鼠的治疗作用及谱效关系研究[J].*中草药*, 2019, 50(6): 1400-1406.
- [5] Li Z Y, Gu J, Yan J, et al. Hypertensive cardiac remodeling effects of lignan extracts from *Eucommia ulmoides* Oliv. bark: A famous traditional Chinese medicine [J]. *Am J Chin Med*, 2013, 41(4): 801-815.
- [6] Wang J Y, Yuan Y, Chen X J, et al. Extract from *Eucommia ulmoides* Oliv. ameliorates arthritis via regulation of inflammation, synoviocyte proliferation and osteoclastogenesis *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 194: 609-616.
- [7] 钟淑娟,杨欣,李静,等.杜仲不同部位总黄酮含量及抗氧化活性研究[J].*中国药房*, 2017, 28(13): 1787-1790.
- [8] 曹洪斌,申明金,任铜彦,等.杜仲总黄酮提取方法的研究进展[J].*陕西农业科学*, 2017, 63(8): 62-65.
- [9] Wang J Y, Chen X J, Zhang L, et al. Comparative studies of different extracts from *Eucommia ulmoides* Oliv. against rheumatoid arthritis in CIA rats [J]. *Evid Based*

- Compl Alternat Med*, 2018, 2018: 7379893.
- [10] Zhai W J, Ma Z H, Wang W J, *et al*. Paeoniflorin inhibits Rho kinase activation in joint synovial tissues of rats with collagen-induced rheumatoid arthritis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 255-259.
- [11] Kawamura H, Kawamura T, Kanda Y, *et al*. Extracellular ATP-stimulated macrophages produce macrophage inflammatory protein-2 which is important for neutrophil migration [J]. *Immunology*, 2012, 136(4): 448-458.
- [12] 屠万倩, 李宁, 张留记, 等. 不同加工方式生产的杜仲叶中 8 种化学成分的含量及抗氧化活性研究 [J]. *中国新药杂志*, 2020, 29(16): 1863-1867.
- [13] 饶华, 徐贤柱, 王曼莹. 杜仲叶总提取物治疗去势大鼠骨质疏松症的实验研究 [J]. *江西医药*, 2014, 49(2): 100-102.
- [14] 林军, 李幼琴, 李万红, 等. 杜仲叶提取物/CPC 复合载体对大鼠成骨细胞作用的实验研究 [J]. *浙江大学学报: 医学版*, 2008, 37(1): 78-82.
- [15] Pirmardvand Chegini S, Varshosaz J, Taymouri S. Recent approaches for targeted drug delivery in rheumatoid arthritis diagnosis and treatment [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(2): 502-514.
- [16] Schett G, Stach C, Zwerina J, *et al*. How antirheumatic drugs protect joints from damage in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(10): 2936-2948.
- [17] Fearon U, Canavan M, Biniecka M, *et al*. Hypoxia, mitochondrial dysfunction and synovial invasiveness in rheumatoid arthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2016, 12(7): 385-397.
- [18] Park S Y, Lee S W, Kim H Y, *et al*. HMGB1 induces angiogenesis in rheumatoid arthritis via HIF-1 α activation [J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(4): 1216-1227.
- [19] Schett G, Gravallesse E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: Mechanisms, diagnosis and treatment [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2012, 8(11): 656-664.
- [20] Li X, Wu J F. Recent developments in patent anti-cancer agents targeting the matrix metalloproteinases (MMPs) [J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2010, 5(2): 109-141.

[责任编辑 李亚楠]