

# 青藤碱对胶原诱导性关节炎小鼠 TLR4、MyD88 及 NF- $\kappa$ B mRNA 表达的影响\*

张玉萍, 姚茹冰, 赵智明, 蔡 辉\*\*

(南京军区南京总医院, 江苏 南京 210002)

**[摘要]** 目的: 探讨青藤碱(SIN)对胶原诱导性关节炎(CIA)小鼠滑膜 Toll 样受体(TLR)4、髓样分化因子 88(MyD88)、核因子(NF)- $\kappa$ B mRNA 表达的影响。方法: 30 只 DBA/1 小鼠均分为正常组、CIA 组和 SIN 组; CIA 组与 SIN 组小鼠尾部给予皮内注射胶原乳剂诱导建立 CIA 模型, CIA 造模第 28 天时 SIN 组小鼠给予 SIN 干预治疗, 其余两组予生理盐水作对照, 治疗 20 d; 于造模第 27、34、41 及 48 天对各组小鼠进行关节炎指数(AI)评分, 并于第 48 天时处死 3 组小鼠取小鼠膝关节滑膜, 采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)测定小鼠滑膜 TLR4、MyD88 及 NF- $\kappa$ B mRNA 的表达。结果: 与正常组比较, CIA 组及 SIN 组小鼠 AI 评分明显升高( $P < 0.01$ ); 造模第 41 和 48 天时, SIN 组小鼠 AI 评分较 CIA 组有明显下降( $P < 0.05$ ); CIA 组 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B mRNA 的相对表达较正常组明显上调, 与 CIA 组相比, SIN 组 TLR4、MyD88 及 NF- $\kappa$ B mRNA 的相对表达明显降低( $P < 0.01$ )。结论: SIN 可改善 CIA 小鼠的关节炎症, 这可能与抑制了滑膜 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路有关。

**[关键词]** 青藤碱; 胶原诱导性关节炎; Toll 样受体 4; 髓样分化因子 88; 核因子  $\kappa$ B

**[中图分类号]** R593.22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)07-0783-03

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.07.009

## Effects of Sinomenine on the mRNA Expression of TLR4, MyD88, and NF- $\kappa$ B in Mice with Collagen-induced Arthritis

ZHANG Yuping, YAO Rubing, ZHAO Zhiming, CAI Hui

(Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, Jiangsu, China)

**[Abstract] Objective:** To explore the effect of sinomenine (SIN) on the mRNA expression of synovium TLR4, MyD88, and NF- $\kappa$ B in collagen-induced arthritis (CIA) mice. **Methods:** Thirty mice were randomly divided into normal group (group N), group CIA and group SIN. Mice in groups CIA and SIN were given collagen emulsion to induce CIA. and the mice in group SIN were given sinomenine as drug intervention in 28 d after. After 20 d of treatment, The AI scores were measured on the 27<sup>th</sup>, 34<sup>th</sup>, 41<sup>st</sup>, and 48<sup>th</sup> days of the experiment. All of the mice were sacrificed on the 48<sup>th</sup> day, and synovial tissues were taken and the mRNA expression of TLR4, MyD88, and NF- $\kappa$ B were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR) analysis. **Result:** The AI scores in groups CIA and SIN were obviously higher than that in group N ( $P < 0.01$ ). On the 41<sup>st</sup> and 48<sup>th</sup> days, AI scores in group SIN were significantly lower than those in group CIA ( $P < 0.05$ ). mRNA expression of synovium TLR4, MyD88, and NF- $\kappa$ B in group CIA and were significantly higher than that in group N ( $P < 0.01$ ) and lower than those in group SIN ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** SIN can remit the joint swelling of the CIA mice, which may relate to the suppressing of TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway in synovium.

**[Key words]** sinomenine; collagen-induced arthritis; Toll-like receptor 4; myeloid differentiation factor 88; nuclear factor- $\kappa$ B

\* [基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81303124)

\*\* 通信作者 E-mail: 962516239@qq.com

网络出版时间: 2017-07-13 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170713.2305.017.html>

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是以滑膜炎和滑膜增生为主要病理表现的慢性自身性免疫疾病,滑膜的持续炎症可导致关节损伤和功能障碍<sup>[1]</sup>。虽然 RA 的发病机制尚不明确,但一般认为炎症细胞因子的级联反应在 RA 的发生发展中起着重要作用<sup>[2-3]</sup>。Toll 样受体(Toll like receptor, TLR)4 是先天免疫和适应性免疫的桥梁,是机体重要的防御机制,但某些情况下也参与疾病的发生发展,有研究发现 TLR4 信号通路的异常激活可能与 RA 有关<sup>[4]</sup>。青藤碱(sinomenine, SIN)具有抗炎镇痛、调节免疫等作用,对 RA 有较好的治疗作用,但作用机制尚不清楚<sup>[5]</sup>,本研究于小鼠尾根部皮内注射胶原乳剂建立胶原诱导性关节炎(CIA)模型,同时给予 SIN 治疗,观察小鼠滑膜 Toll 样受体 4(TLR4)、髓样分化因子 88(MyD88)、核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)mRNA 表达,以探索 SIN 对 CIA 的疗效及可能的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物、药品及试剂

DBA/1 小鼠 30 只,6 周龄,雄性,购于常州卡文斯实验动物有限公司,使用许可证 SCXK(苏)2011-0003。SIN(正清风痛宁片,湖南正清制药股份有限公司产品),牛 II 型胶原、完全弗氏佐剂(CFA)及不完全弗氏佐剂(IFA)均为美国 Chondrex 公司产品,TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司),cDNA 第一链合成试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司),Real time PCR Master Mix(日本 TOYOBO 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物分组** 30 只 DBA/1 小鼠以随机数字表法分成正常组( $n = 10$ )、CIA 组( $n = 10$ )、SIN 组( $n = 10$ )。除正常组外,CIA 组和 SIN 组小鼠参与 CIA 造模,在后续的造模及实验给药过程中,正常组死亡 1 只,CIA 组死亡 1 只,SIN 组死亡 2 只。

**1.2.2 造模** 参照文献[1]方法制备 CIA 小鼠模型。配置牛 II 型胶原乳剂,于小鼠尾根部皮内注射 100  $\mu$ L,造模当天记为 0 d,第 21 天时于小鼠尾根部加强免疫 II 型胶原乳剂 100  $\mu$ L。第 28 天时 SIN 组予 SIN 药液 100 mg/(kg · d)灌胃,正常组及 CIA 组给予等量生理盐水处理,连续给药 20 d。

**1.2.3 关节炎指数(AI)评分** 于造模第 27、34、41 及 48 天时对各组小鼠进行 AI 评分<sup>[2]</sup>,无关节

肿胀记 0 分,足趾关节肿胀记 1 分,趾关节和足趾肿胀记 2 分,踝关节以下的足爪肿胀记 3 分,包括踝关节在内整个足爪严重红肿记 4 分;各关节累计积分为各小鼠的 AI 评分,每只最高分为 16 分。

**1.2.4 TLR4、MyD88 及 NF- $\kappa$ B mRNA 表达** 给予 SIN 治疗 20 d 时处死 3 组小鼠,剥离完整的膝关节滑膜并置于预冷的组织匀浆器中研磨,研磨结束后用 TRIzol 法提取总 RNA,紫外分光光度仪测定提取 RNA 的浓度及含量,由南京金斯瑞科技有限公司设计合成引物,提取总 RNA 样品 2  $\mu$ g 进行逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)。PCR 反应条件为 95  $^{\circ}$ C 15 s、60  $^{\circ}$ C 30 s、72  $^{\circ}$ C 30 s 共 40 个循环,取 PCR 产物 4  $\mu$ L 进行琼脂糖凝胶电泳,采用凝胶成像系统和图像分析系统进行成像及灰度分析,以 GAPDH 为参照,分别计算 TLR4/GAPDH、MyD88/GAPDH、NF- $\kappa$ B/GAPDH mRNA 的比值。引物序列和反应条件见表 1。

表 1 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 及 GAPDH PCR 引物序列及产物大小

Tab.1 PCR primers and product sizes of TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B, and GAPDH

基因	引物序列	产物(bp)
TLR4	F:5'-ACA AAC GCC GGA ACT TTT CG-3'	129
	R:5'-GTC GGA CAC ACA CAA CTT AAG C-3'	
MyD88	F:5'-TTG CCA GCG AGC TAA TTG AG-3'	94
	R:5'-ACA GGC TGA GTG CAA ACT TG-3'	
NF- $\kappa$ B	F:5'-TGT CTG CAC CTG TTC CAA AG-3'	139
	R:5'-TCA GCA TCA AAC TGC AGG TG-3'	
GAPDH	F:5'-TCT CCC TCA CAA TTT CCA TCC C-3'	202
	R:5'-TTT TTG TGG GTG CAG CGA AC-3'	

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 22 软件分析实验结果,数据资料用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,数据比较采用单因素方差分析;两组间比较,满足方差齐性检验者用 SNK 法比较,不满足方差齐性检验者用 Dunnett T3 检验; $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

的影响

## 2 结果

### 2.1 AI 评分

如表 2 所示,与正常组比较,CIA 组及 SIN 组小鼠 AI 评分明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );造模第 41 和 48 天时,SIN 组小鼠 AI 评分较 CIA 组有明显下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 2 各组小鼠 AI 评分比较

Tab. 2 Comparison of AI scores of different groups

造模	正常组	CIA 组	SIN 组
第 27 天	0	3.33 ± 2.12 <sup>(1)</sup>	3.25 ± 2.05 <sup>(1)</sup>
第 34 天	0	9.50 ± 2.81 <sup>(1)</sup>	8.83 ± 2.23 <sup>(1)</sup>
第 41 天	0	9.67 ± 2.34 <sup>(1)</sup>	5.50 ± 1.38 <sup>(1)(2)</sup>
第 48 天	0	3.33 ± 1.21 <sup>(1)</sup>	1.67 ± 0.52 <sup>(1)(3)</sup>

<sup>(1)</sup>与正常组比较, $P < 0.01$ ;与 CIA 组比较,<sup>(2)</sup> $P < 0.01$ ,<sup>(3)</sup> $P < 0.05$

### 2.2 TLR4、MyD88 及 NF- $\kappa$ B mRNA 表达

如表 3 所示,CIA 组 TLR4、MyD88 及 NF- $\kappa$ B mRNA 的相对表达较正常组明显上调,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与 CIA 组相比,SIN 组 TLR4、MyD88 及 NF- $\kappa$ B mRNA 的相对表达明显下调,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

表 3 各组小鼠滑膜 TLR4、MyD88 及 NF- $\kappa$ B mRNA 表达

Tab. 3 Comparison of mRNA expression of synovium TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B

组别	TLR4	MyD88	NF- $\kappa$ B
正常组	1.18 ± 0.14	1.07 ± 0.10	1.11 ± 0.13
CIA 组	4.29 ± 0.14 <sup>(1)</sup>	8.32 ± 0.14 <sup>(1)</sup>	6.79 ± 0.17 <sup>(1)</sup>
SIN 组	2.84 ± 0.17 <sup>(2)</sup>	4.18 ± 0.23 <sup>(2)</sup>	3.07 ± 0.19 <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>与正常组比较, $P < 0.01$ ;<sup>(2)</sup>与 CIA 组比较, $P < 0.01$

## 3 讨论

RA 是一种复杂的自身免疫性疾病,主要表现为关节肿痛、晨僵、关节畸形,基本的病理学特点为滑膜炎,其贯穿 RA 整个病程,是 RA 的研究热点之一。TLR 是先天免疫和适应性免疫的桥梁,研究

表明 TLR4 在 RA 发病机制中可能发挥重要作用<sup>[4]</sup>。TLR4 是炎症信号通路中的重要受体,不管是细菌性或是非细菌性的炎症反应中均扮演着重要角色。TLR4 信号传导分为两种途径,即 MyD88 依赖性和非依赖性,MyD88 是 TLR4 信号通路中重要的衔接蛋白,参与 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号的传递。当组织损伤或细胞坏死后可释放相当于佐剂的内源性激活剂,这些激活剂可作为 TLR4 的配体与之结合,进而激活细胞内信号,使其与 MyD88 结合,然后可引发 NF- $\kappa$ B 的活化,促进一系列基因的转录并释放多种致炎细胞因子<sup>[3-4]</sup>。研究发现,TLR4 缺陷小鼠诱导的 CIA 模型在关节炎的严重程度和发病率上较野生型小鼠明显降低,TLR4 表达的上调可诱发关节炎,并诱导软骨细胞变性<sup>[5-6]</sup>。脂多糖是 TLR4 的重要配体,其可诱导外周血单个核细胞分泌炎症细胞因子的产生<sup>[7-8]</sup>。

SIN 是从中药青风藤中提取的有效成分之一,其有抗炎、免疫抑制、镇痛等多种药理作用,在 RA 治疗中有较好的临床疗效。CIA 被认为其在临床表现、实验室检查、免疫学及病理学改变等方面均与人类 RA 十分相似,是目前 RA 实验研究常用的动物模型之一。本研究成功诱导 CIA 小鼠模型,造模第 24 天小鼠关节炎开始发病,随着时间的延长,关节肿胀逐渐加重,急性期表现为关节明显红肿,红肿甚者可见少量渗出及出血,肿胀关节无法承重、活动受限<sup>[4,9]</sup>,本研究发现 CIA 小鼠滑膜 TLR4、MyD88 及 NF- $\kappa$ B mRNA 的表达较正常组显著上调( $P < 0.01$ );经 SIN 药物干预后,SIN 组小鼠滑膜 TLR4、MyD88 及 NF- $\kappa$ B mRNA 的表达较 CIA 组显著下降( $P < 0.01$ ),与以往研究结果相一致,并在此基础上探索 SIN 可能的作用机制,前期课题组在 SIN 治疗 RA 上做了相关研究,结果发现 SIN 对佐剂性关节炎大鼠滑膜 TLR2、MyD88 mRNA 的表达以及 RA 患者外周血单个核细胞表面 TLR4、MyD88 及 NF- $\kappa$ B mRNA 的表达均有显著的抑制作用<sup>[10-11]</sup>,本研究在前期研究的基础上进一步发现 SIN 对 CIA 小鼠滑膜 TLR4 信号通路亦有抑制作用。

综上所述,SIN 可改善 CIA 小鼠的关节炎症,其机制可能与抑制了小鼠滑膜 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路有关,但其确切的机制有待于进一步从蛋白及细胞水平进行论证。

(下转第 789 页)

7.65%, 0.85% ~ 1.09%, 该结果可以作为该下一步研究的基础。

艳山姜作为贵州的特色民族药,其疗效可定,有深入研究和开发的潜力;由文献报道可知对其挥发性成分与药理作用研究较多,但缺乏对其显微特征及质量评价方面的研究报道。本文从显微鉴别和质量评价方面对贵州特色民族药艳山姜进行了系列研究,结果可为该药材的深入研究、应用,质量标准的提升及制定提供可靠的数据参考。

#### 4 参考文献

- [1] 中华本草编委会,中华本草 8[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2004(24):607-608.
- [2] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[M]. 贵州:贵州科技出版社, 2003: 292-293.
- [3] 张亦诚,雷朝云,卢加举. 香料砂仁的生物学特性及栽培技术[J]. 中国野生植物资源, 2013(3):67-68.
- [4] 赵林君. 宜宾川砂仁的价值与种植技术[J]. 宜宾科技, 2014(1):21-24.
- [5] 朱丹粤. 酸旱环境下艳山姜的形态、生长与有效成分研究[J]. 湖南林业科技, 2008(5):38-39.

- [6] 吴万征. GC-MS analysis of chemical constituents of volatile oil from *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burtt et Smith [J]. 中国医院药学杂志, 2005(5):332-333.
- [7] 李莉,黄家宇,盛钰. HPLC 测定艳山姜中的去甲氧基醉椒素[J]. 华西药学杂志, 2013(3): 309-310.
- [8] 李莉,黄家宇,刘青. 艳山姜中槲皮素含量的高效液相色谱法测定[J]. 时珍国医国药, 2013(7):1596-1597.
- [9] 邵君微,李佳川,曾敏. 民族药艳山姜提取物对实验性动脉粥样硬化大鼠血管舒缩因子的影响[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2015(5):571.
- [10] 陶玲,沈祥春,彭佼. 艳山姜挥发油抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 中国医院药学杂志, 2010(9):722-724.
- [11] 张彦燕,文波,陶玲. 艳山姜挥发油对脂多糖诱导损伤的血管内皮细胞保护作用研究[J]. 中药药理与临床, 2014(4):66-68.
- [12] 陈训,黄丽华,龙成昌,等. 艳山姜(土砂仁)与几种“砂仁”的鉴别[J]. 贵州科学, 2004(4):53-55.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:附录 52-53,62-63.

(2017-01-17 收稿,2017-05-16 修回)  
中文编辑:刘平;英文编辑:乐萍

(上接第 785 页)

#### 4 参考文献

- [1] Wang Q, Li XK. Immunosuppressive and anti-inflammatory activities of sinomenine [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011(3):373-376.
- [2] Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis[J]. *Nat Protoc*, 2007(5):1269-1275.
- [3] Jiang Z, Ninomiya-Tsuji J, Qian Y, et al. Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-dependent IL-1-induced signaling complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasma membrane and activate TAK1 in the cytosol [J]. *Mol Cell Biol*, 2002(20):7158-7167.
- [4] Xu W, Chu K, Li H, et al. *Bauhinia championii* extraction treatment of collagen-induced arthritis via downregulation of the expression of TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ B [J]. *Am J Chin Med*, 2013(2):379-390.
- [5] Pierer M, Wagner U, Rossol M, et al. Toll-like receptor 4 is involved in inflammatory and joint destructive pathways in collagen-induced arthritis in DBA1J mice [J]. *PLoS One*, 2011(6):e23539.
- [6] Lorenz W, Buhmann C, Mobasher A, et al. Bacterial lipopolysaccharides form procollagen-endotoxin complexes that trigger cartilage inflammation and degeneration: implications for the development of rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2013(15):111.
- [7] Chovanova L, Vlcek M, Krskova K, et al. Increased production of IL-6 and IL-17 in lipopolysaccharide-stimulated peripheral mononuclears from patients with rheumatoid arthritis [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2013(32):395-404.
- [8] Tang CH, Hsu CJ, Yang WH, et al. Lipoteichoic acid enhances IL-6 production in human synovial fibroblasts via TLR2 receptor, PKCdelta and c-Src dependent pathways [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010(79):1648-1657.
- [9] Kim SH, Bang J, Son CN, et al. Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates murine autoimmune arthritis through regulation of TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Korean J Intern Med*, 2016:653.
- [10] Mu H, Yao RB, Zhao LJ, et al. Sinomenine decreases MyD88 expression and improves Inflammation-induced joint damage progression and symptoms in rat adjuvant-induced arthritis [J]. *Inflammation*, 2013(5):1136-1144.
- [11] 蔡辉,张群燕,姚茹冰. 脂多糖对类风湿关节炎患者外周血单核细胞 TLR2、TLR4 mRNA 及其蛋白表达的影响 [J]. 贵州医科大学学报, 2017(1):1-3.  
(2017-03-25 收稿,2017-06-16 修回)  
中文编辑:吴昌学;英文编辑:苏晓庆