

风湿定胶囊治疗类风湿关节炎模型大鼠的相关机制研究*

王景靓, 徐晓峰, 张家国

(辽宁省大连市第二人民医院骨科, 辽宁 大连 116011)

摘要:目的 探讨风湿定胶囊治疗类风湿关节炎(RA)模型大鼠的作用机制。方法 选取健康大鼠100只,随机选取20只作为空白对照组(等量生理盐水),剩余80只大鼠均注射CⅡ型胶原制备RA大鼠模型,随机分成模型组及(等量生理盐水)风湿定胶囊低剂量组[200 mg/(kg·d)]、中剂量组[400 mg/(kg·d)]、高剂量组[800 mg/(kg·d)],每组20只。分别比较给药后不同时间点各组大鼠的体质量与足部肿胀体积变化情况。此外,给药4周后采用Western Blotting法测定各组大鼠的关节滑膜组织p-JAK3及p-STAT3蛋白表达水平。结果 空白对照组和风湿定胶囊低、中、高剂量组大鼠分别于7,14,21,28 d时的体质量均比模型组高,且随着风湿定胶囊剂量的不断增加,不同时间点的体质量呈逐渐增长趋势,组间差异均有统计学意义($P < 0.05$);空白对照组和风湿定胶囊低、中、高剂量组大鼠7,14,21,28 d时的足部肿胀体积均较模型组低,且随着风湿定胶囊剂量的不断增加,不同时间点的足部肿胀体积呈逐渐降低趋势,组间差异均有统计学意义($P < 0.05$);空白对照组和风湿定胶囊低、中、高剂量组大鼠滑膜组织中p-JAK3及p-STAT3蛋白表达水平均比模型组低($P < 0.05$),且随着风湿定胶囊剂量的不断增加,蛋白表达水平呈逐渐降低趋势,组间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 风湿定胶囊治疗RA模型大鼠效果显著,可改善大鼠体质量,降低足部肿胀体积,其作用机制可能与下调大鼠关节滑膜组织中的p-JAK3和p-STAT3蛋白表达水平有关。

关键词:类风湿关节炎;风湿定胶囊;作用机制;关节滑膜组织;大鼠

中图分类号:R932;R285.5;R593.22

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)17-0008-04

Study on the Relevant Mechanism of Fengshiding Capsules in the Treatment of Rheumatoid Arthritis Model Rats

WANG Jingliang, XU Xiaofeng, ZHANG Jianguo

(Department of Orthopedics, Dalian Second People's Hospital, Dalian, Liaoning, China 116011)

Abstract: Objective To investigate the related mechanism of Fengshiding Capsules in the treatment of rheumatoid arthritis(RA) model rats. **Methods** Totally 100 healthy rats were selected, and 20 rats were randomly selected as the blank control group(the same amount of saline). The remaining 80 rats were injected with type CⅡ collagen to establish RA rat models, and they were randomly divided into the model group, Fengshiding Capsules low dosage group[200 mg/(kg·d)], medium dosage group[400 mg/(kg·d)], high dosage group [800 mg/(kg·d)], 20 rats in each group. The changes in body weight and foot swelling volume were compared at different time points after administration. Besides, the expression levels of p-JAK3 and p-STAT3 protein in synovial tissue of joints of rats in each group were measured by Western Blotting method after 4 weeks of administration. **Results** The body weight of rats in the blank control group, Fengshiding Capsules low, medium and high dosage groups was higher than that of the model group on the 7th, 14th, 21st and 28th days, and with the increasing dosage of Fengshiding Capsules, the body weight of rats at different time points showed a gradual growth trend, and the difference among those groups was significant($P < 0.05$). The foot swelling volume of rats in the blank control group, Fengshiding Capsules low, medium and high dosage groups was lower than that of the model group on the 7th, 14th, 21st and 28th days, and with the increasing dosage of Fengshiding Capsules, the foot swelling volume of rats at different time points showed a decreasing trend, and the difference among those groups was significant($P < 0.05$). The expression levels of p-JAK3 and p-STAT3 protein in synovial tissue of joint of rats in the blank control group, Fengshiding Capsules low, medium and high dosage groups were lower than those in the model group($P < 0.05$), and with the increasing dosage of Fengshiding Capsules, the expression levels of p-JAK3 and p-STAT3 protein showed a decreasing trend, and the difference among those groups was significant($P < 0.05$). **Conclusion** Fengshiding Capsules are effective in the treatment of RA model rats, which can improve the body weight and reduce the foot swelling volume of rats. The mechanism may be related to the down-regulation of p-JAK3 and p-STAT3 protein expression in synovial tissue of joints of rats.

Key words: rheumatoid arthritis; Fengshiding Capsules; mechanism of action; synovial tissue of joint; rats

类风湿关节炎(RA)属常见自身免疫性疾病,主要病理表现为多个关节滑膜的炎症、增生等,如不及时有

效地治疗,随着病情的不断进展,会出现不同程度的关节畸形及活动功能障碍^[1]。近年来,中医药低毒性及多靶

*基金项目:辽宁省自然科学基金指导计划项目[20160133]。

第一作者:王景靓,男,在职硕士研究生,副主任医师,研究方向为关节外科学,(电子信箱)w2548636@163.com。

点治疗的特点越来越受到重视,已成为研发治疗 RA 药物的新靶点^[2]。风湿定胶囊具有补气养血、扶正祛邪、驱寒除湿等功效,能治疗 RA 及坐骨神经痛等病症,其作用机制可能与其能调节 Janus 激酶/信号转导子与转录激活子(JAK/STAT)信号通路有关^[3]。JAK/STAT 信号通路属诸多细胞因子发生信号转导的一个共同途径,能广泛地参与到细胞增殖、分化、凋亡,以及机体的炎症反应过程,并能依靠负调节因子同其他信号通路发生相互作用,还可通过 STATs 的共价修饰途径实施信号调节。此信号通路能促使各类炎症类疾病的形成和发展,对其实施靶向治疗逐渐成了当前研究的重要方向。本研究中探讨了风湿定胶囊治疗 RA 的作用机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物、试药与仪器

动物:SPF 级健康未交配性成熟的雄性 Wistar 大鼠 100 只,体质量为 180~220 g,足趾容积为 1.70~2.30 mL,购自广州中医药大学,动物合格证号为 SYXK(粤)2014-0144,予以标准饲料和水饲养,保证生存室温为 18~22℃,相对湿度为 40%~50%。本试验经医院试验动物伦理委员会审批。

试药:风湿定胶囊(陕西健民制药有限公司,国药准字 Z20044165,规格为每粒 0.3 g);Ⅱ型胶原(规格为每支 10 mg),完全弗氏佐剂,均购自大连宝生物工程有限公司。

仪器:总 RNA 提取试剂盒,逆转录试剂盒,实时荧光定量 PCR 试剂盒购自上海恒远生物科技有限公司;DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物技术有限公司);p-JAK3 及 p-STAT3 单抗购自上海康朗生物科技有限公司;荧光定量 PCR 仪(南京贝登医疗股份有限公司);Western Blotting 相关试剂盒(上海英拜生物科技有限公司)。

1.2 方法

动物分组:根据随机数字表法将大鼠分为 5 组,分别为空白对照组(A 组),模型组(B 组),风湿定胶囊低、中、高剂量组(C₁组,C₂组,C₃组),每组 20 只。

风湿定胶囊灌胃溶液配制:按照不同剂量取风湿定

胶囊加入 0.9% 氯化钠注射液中,制成混悬液,低、中、高剂量分别为 10,20,40 g/L,给药体积为每 100 g 体质量 2 mL。大鼠的风湿定胶囊灌胃浓度根据体表面积法,以临床成人给药剂量计算。

CⅡ乳剂配置:无菌条件下用 0.1 mol/L 冰乙酸充分溶解Ⅱ型胶原,随后置 4℃冰箱过夜。于次日取出,加入等体积完全弗氏佐剂混合,经振荡乳化得 CⅡ乳剂,置 4℃冰箱保存。

RA 模型大鼠制备:采用 10% 水合氯醛麻醉处理,选择大鼠背部及左右足跖多点皮下注射 0.5 mL CⅡ乳剂。A 组与 B 组予等量生理盐水,C₁组,C₂组,C₃组分别予 200,400,800 mg/(kg·d)的风湿定胶囊,连续给药 4 周。

p-JAK3 及 p-STAT3 蛋白表达水平检测:提取各组大鼠的关节滑膜组织,置研钵内,添加 300 μL 的裂解液,研磨 10 min,再充分振荡后放置 10 min,4℃下以 14 000 r/min 离心 10 min,获得上清总蛋白,通过 BCA 法测定蛋白浓度,再提取适量的总蛋白,通过 5 倍的上样缓冲液稀释后,置 95℃条件下 5 min。再将变性蛋白置 120 g/LSDS-PAGE 内实施电泳,并添入一抗 p-JAK3 和 p-STAT3,4℃下与辣根过氧化酶发生结合的山羊抗兔共同孵育过夜,通过 BeyoECL Plus 发光测定,完成后清除免疫印迹,测定甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH),有关操作步骤同上。利用图像分析软件对条带实施灰度分析,将二者的蛋白灰度比记为表达水平。

1.3 观察指标

比较给药后 0,7,14,21,28 d 时各组大鼠的体质量与足部肿胀体积变化情况,对比给药 4 周后各组大鼠的 p-JAK3 和 p-STAT3 蛋白表达水平。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计学软件处理。计数资料以率(%)表示,行 χ^2 检验。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行 t 检验;多组间的计量资料比较实施方差分析,计算 F 值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

结果见表 1 和表 2 及图 1。

表 1 各组大鼠不同时间点体质量和足部肿胀体积比较($\bar{X} \pm s$, $n = 20$)

组别	体质量(g)					足部肿胀体积(mL)				
	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
A 组	182.42 ± 6.32	203.66 ± 7.13 [#]	225.91 ± 8.14 [#]	273.18 ± 9.27 [#]	298.34 ± 9.20 [#]	0.99 ± 0.09	1.07 ± 0.13 [#]	1.13 ± 0.13 [#]	1.20 ± 0.11 [#]	1.30 ± 0.18 [#]
B 组	174.32 ± 7.41	196.32 ± 8.11	213.87 ± 8.29	235.46 ± 9.10	246.83 ± 9.61	1.29 ± 0.11	1.58 ± 0.09	1.75 ± 0.14	1.90 ± 0.14	2.06 ± 0.17
C ₁ 组	192.17 ± 8.20	213.43 ± 8.72 [#]	223.62 ± 7.16 [#]	265.79 ± 8.22 [#]	282.88 ± 6.24 [#]	1.23 ± 0.10	1.49 ± 0.07 [#]	1.55 ± 0.15 [#]	1.70 ± 0.13 [#]	1.80 ± 0.12 [#]
C ₂ 组	192.33 ± 7.68	215.03 ± 8.20 ^{#*}	236.04 ± 7.41 ^{#*}	274.69 ± 7.33 ^{#*}	291.70 ± 8.18 ^{#*}	1.24 ± 0.10	1.38 ± 0.10 ^{#*}	1.44 ± 0.07 ^{#*}	1.55 ± 0.15 ^{#*}	1.61 ± 0.12 ^{#*}
C ₃ 组	192.42 ± 7.31	218.54 ± 8.16 ^{#*▲}	241.67 ± 8.10 ^{#*▲}	290.51 ± 9.92 ^{#*▲}	308.52 ± 9.44 ^{#*▲}	1.24 ± 0.11	1.28 ± 0.06 ^{#*▲}	1.35 ± 0.07 ^{#*▲}	1.42 ± 0.09 ^{#*▲}	1.48 ± 0.13 ^{#*▲}
F 值	3.011	4.653	6.880	4.930	10.257	0.319	11.261	7.303	5.288	5.394
P 值	0.104	0.012	0.000	0.008	0.000	0.108	0.000	0.000	0.001	0.000

注:与 B 组相比,[#] $P < 0.05$;与 C₁组相比,^{*} $P < 0.05$;与 C₂组相比,[▲] $P < 0.05$ 。下表同。

表2 各组大鼠滑膜组织中的 p-JAK3 和 p-STAT3 蛋白表达水平比较 ($\bar{X} \pm s$, $n = 20$)

组别	p-JAK3 蛋白	p-STAT3 蛋白
A 组	$0.59 \pm 0.04^{* \Delta}$	$0.68 \pm 0.13^{* \Delta}$
B 组	1.90 ± 0.15	2.76 ± 0.21
C ₁ 组	$1.31 \pm 0.12^{\#}$	$1.70 \pm 0.18^{\#}$
C ₂ 组	$1.15 \pm 0.11^{**}$	$1.33 \pm 0.12^{**}$
C ₃ 组	$0.87 \pm 0.07^{* \Delta}$	$0.93 \pm 0.10^{* \Delta}$
F 值	7.885	10.691
P 值	0.000	0.000

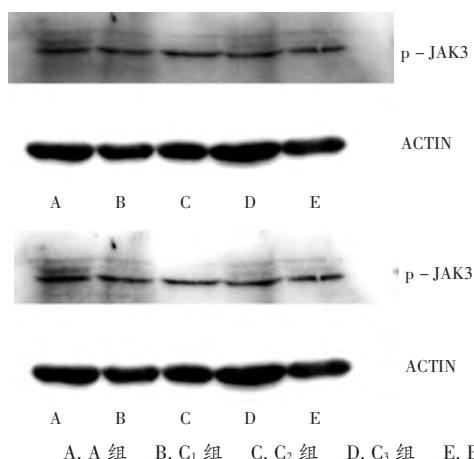


图1 各组大鼠滑膜组织中的 p-JAK3 和 p-STAT3 蛋白表达水平

3 讨论

RA 患者普遍存在不同程度的关节功能障碍,加之免疫系统失调,极易导致感染性疾病及心血管疾病^[4-5]。目前,临床主要采用激素类药物,但长期服用极易引发不良反应,降低患者的依从性及耐受性,不利于预后^[6]。RA 中医治疗主要是从病机根源“痹病”出发,辨证施治,且以扶正驱邪为主要原则。目前,中医针对 RA 的治疗常用有清热解毒、活血化瘀、祛风散寒等功效的复方药,虽然临床疗效明显,但其具体的作用机制尚未完全明确。

本研究结果显示,A 组和风湿定胶囊给药组大鼠于 7, 14, 21, 28 d 时的体质量均比 B 组高,且随着风湿定胶囊剂量的不断增加呈逐渐增长趋势。风湿定胶囊方中,甘草清热解毒、补气益脾、和中缓急,八角枫祛风除湿、散瘀止痛、舒筋活络,徐长卿祛风止痛、止痒消肿,白芷祛风除湿、活血排毒、生肌止痛,诸药联用,共奏镇痛、抗炎、消肿及活血通络功效,可有效改善 RA 的预后。A 组和风湿定胶囊给药组大鼠 7, 14, 21, 28 d 时的足部肿胀体积均比 B 组低,且随着风湿定胶囊剂量的不断增加而逐渐降低,表明风湿定胶囊有利于降低大鼠的足部肿胀体积,主要原因与风湿定胶囊能有效改善关节滑膜组织增生、炎症有关。

A 组和风湿定胶囊给药组大鼠滑膜组织中的 p-JAK3 和 p-STAT3 蛋白表达水平平均比 B 组低,且随

着风湿定胶囊剂量的不断增加而呈逐渐降低趋势,这与文献[7-8]报道相符,提示风湿定胶囊可有效降低 RA 大鼠滑膜组织中的 p-JAK3 和 p-STAT3 蛋白表达水平与其能调节 Janus 激酶/信号转导子与转录激活子(JAK/STAT)信号通路等因素有关。JAK/STAT 信号通路是哺乳动物机体中较常见的一种信号转导途径,通常含有 4 个 JAKs 及 7 个 STATs,其中 JAKs 属非受体类酪氨酸激酶,主要有 JAK1, JAK2, JAK3, Tyk2 等成员,相对 JAK3 存在 7 个保守性结构域,不含跨膜结构域,其 C-末端的 JH1 和 JH2 域存在催化功能,而 N-末端所含 4 个 JH 域不存在酪氨酸激酶的活性,但可能参与到 JAKs 和其他有关的信号蛋白分子互相结合过程^[9-11]。STATs 源自研究干扰素的信号转导机制过程,其主要包括 STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, 5aSTAT, 5bSTAT, STAT6 等成员。STAT3 是常见的家族蛋白成员,其所含有的 C-末端残基构成了转录激活域,并与其他 STATs 成员间具有较大差异,因此可促使其与 RA 有关的其他转录调节信号发生联系^[12-13]。此信号通路是人体内重要的多功能细胞因子转导通路,参与了体内细胞增殖分化、炎症反应、免疫调节等多种病理生理过程,并与 RA 的发生及进展有关。研究发现,RA 大鼠治疗后关节滑膜组织中的 JAK3 及 STAT1 等均存在显著降低^[14]。风湿定胶囊可能正是通过下调组织滑膜中的 p-JAK3 和 p-STAT3 蛋白表达水平调控 JAK/STAT 信号通路,发挥治疗 RA 的作用。

综上所述,风湿定胶囊治疗 RA 模型大鼠的可能机制为下调组织滑膜中 p-JAK3 和 p-STAT3 蛋白表达水平,参与 JAK/STAT 信号通路的调控过程,进一步发挥治疗作用。

参考文献:

- [1] MASUOKA S, KUSUNOKI N, TAKAMATSU R, et al. Epstein-Barr virus infection and variants of Epstein-Barr nuclear antigen-1 in synovial tissues of rheumatoid arthritis[J]. PLoS One, 2018, 13(12):208957-208958.
- [2] 郑棚良, 张郁晨茜, 张 烁, 等. 鲁贤昌教授治疗类风湿性关节炎经验[J]. 浙江中医药大学学报, 2018, 42(5):370-373.
- [3] 俞 颖, 朱琳超, 徐淑贞, 等. 类风湿性关节炎患者外周血白细胞 VCS 参数变化与病情活动相关性的研究[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 33(1):50-52.
- [4] WANG W, ZHENG H, ZHENG M, et al. Protective effect of avicularin on rheumatoid arthritis and its associated mechanisms[J]. Exp Ther Med, 2018, 16(6):5343-5349.
- [5] 单翠平. 独活寄生汤治疗活动期类风湿性关节炎的临床效果及对患者免疫功能影响[J]. 内科, 2018, 13(3):374-376.
- [6] 田 芳, 许 海. 祛风通络饮辨治类风湿性关节炎(风寒痹阻证)的临床效果及对 RF、IL-17、IL-22、PGE2 表达的影响[J].