文章编号:1000-5404(2007)13-1269-04

论著

青藤碱对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜细胞 NF-κB 的抑制作用

黄小鲁[1,2],郝 飞[2],王 勇[1],方勇飞[1] (第三军医大学西南医院:[1]中医科,[2]皮肤科,重庆市皮肤性病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观察青藤碱(sinomenine,SN)对胶原诱导性关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)大鼠滑膜细胞核因子-κB(NF-κB)的DNA结合活性及核转位的影响,以阐明该药抗炎的可能机制。**方法** 以CIA大鼠为模型,收集膝关节滑膜细胞体外培养,设正常对照组、CIA组、CIA+甲氨喋呤10 μmol/L(阳性对照组)、CIA+SN 50 μmol/L组、CIA+SN 500 μmol/L组。应用荧光标记与激光共聚焦扫描显微镜检测滑膜细胞NF-κB p65亚基核转位,电泳迁移率改变分析法(EMSA)检测NF-κB与DNA序列的结合活性。**结果** 与正常对照组相比,CIA大鼠滑膜细胞可见明显的p65亚基核移位,NF-κB的DNA结合活性显著升高($P<0.01$),SN在50 μmol/L及500 μmol/L时可呈浓度依赖性地抑制CIA大鼠滑膜细胞p65亚基核转位及NF-κB的DNA结合活性,甲氨喋呤在10 μmol/L时可下调NF-κB的DNA结合活性但未抑制p65亚基的核转位。**结论** SN抑制滑膜细胞内NF-κB p65核转位和NF-κB的DNA结合活性为其抗炎机制之一。

关键词:青藤碱;胶原诱导性关节炎;滑膜细胞;核转录因子-κB;核转位
中图法分类号:R285.5;R392.11;R593.22 **文献标识码**:A

Inhibition of sinomenine on nuclear factor-κB of synoviocytes in collagen-induced arthritis rats

HUANG Xiao-lu[1,2], HAO Fei[2], WANG Yong[1], FANG Yong-fei[1] ([1]Department of Traditional Chinese Medicine, [2]Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effect of sinomenine (SN) *in vitro* on nuclear factor-κB (NF-κB) DNA binding activity and nuclear translocation of synoviocytes in collagen-induced arthritis (CIA) rats and explore its antiinflammatory mechanisms. **Methods** The experimental model of CIA rats was used and synoviocytes were collected. Cells were divided into five groups: normal control, CIA, CIA + 10 μmol/L methotrexate (MTX), CIA + 50 μmol/L SN, CIA + 500 μmol/L SN. Nuclear translocation of NF-κB p65 subunit and NF-κB DNA binding activity of synoviocytes were investigated by fluorescence labelling laser confocal scanning microscopy and electrophoretic mobility shift assay (EMSA) respectively. **Results** Compared to normal control, significant nuclear translocation of NF-κB p65 subunit was observed and NF-κB DNA binding activity was increased in synoviocytes of CIA rats ($P<0.01$). SN (50, 500 μmol/L) attenuated nuclear translocation of NF-κB p65 subunit and the DNA binding activity of NF-κB in a concentration-dependent manner. MTX (10 μmol/L) inhibited NF-κB DNA binding activity but had no effect on nuclear translocation of NF-κB p65 subunit. **Conclusion** SN inhibits nuclear translocation of NF-κB p65 subunit and NF-κB DNA binding activity of synoviocytes, which might be one of antiinflammatory mechanisms.

Key words: sinomenine; collagen-induced arthritis; synoviocytes; nuclear factors-κB; nuclear translocation

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性全身性自身免疫性疾病,其病理基础为关节滑膜炎。RA病因不明,临床表现复杂多样,严重危害了人类的身体健康。青藤碱(sinomenine, SN)是从中药青风藤(*Sinomenium acutum Rehd. et Wils*)中提取的生物碱单体。它具有抗炎、免疫抑制、镇痛、降压、抗心律失常等药理作用[1]。在治疗RA方面,该药具有较明确的疗效,在临床上得到了广泛的应用。本室前期的研究已

基金项目:国家自然科学基金(30300452);重庆市卫生局中医药科研基金(2005B30)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300452) and the Traditional Chinese Medicine and Drug Project of Chongqing Bureau of Public Health (2005B30)
作者简介:黄小鲁(1971-),男,新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市人,硕士研究生,主治医师,主要从事风湿病的防治机制方面的研究。电话:(023)68765206,E-mail: huangxiaolulu@126.com
通讯作者:王 勇,电话:(023)68765206,E-mail: wangyongjhy@tom.com
收稿日期:2006-08-30;修回日期:2006-11-29

证实 SN 可降低滑膜细胞内 TNF-α mRNA 及 IL-1β mRNA 的表达[2]。本研究在此基础上与甲氨喋呤(methotrexate, MTX)相比较,进一步探讨 SN 对胶原诱导性关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)大鼠滑膜细胞核转录因子-κB(NF-κB)的 DNA 结合活性及核转位的影响,为该药在临床上治疗 RA 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 大鼠 40 只,雄性,6~8 周龄,体质量 160~180 g,由本校大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。

1.2 药品及试剂

SN(湖南正清制药集团,含量 99%,批号:6040567);DMEM 培养基(Gibco-BRL 公司)、完全弗氏佐剂(Sigma 公司);兔抗 NF-κB p65 抗体、异硫氰酸荧光素(FITC)标记兔抗小鼠 IgG(H+L)(Santa Cruz 公司)。Poly(dI-dC)、Tripure™ RNA 分离试剂盒(宝灵曼公司);γ-^{32}P-ATP(北京亚辉公司);T_4 多聚核苷酸激酶(Promega 公司);M-MuLV 反转录、dNTP、*Taq* DNA 聚合酶(上海生工生物工程公司)。

1.3 仪器

激光共聚焦显微镜 TCS-NP 型(德国 Leica 公司);低温离心机(Backman 公司);恒温孵育箱(Heraeus 公司);DYY-Ⅲ 24D 型垂直电泳槽(北京六一仪器厂)。

1.4 Ⅱ型胶原诱导性关节炎(collagen-induced arthritis,CIA)大鼠动物模型的建立[3]

将牛Ⅱ型胶原溶于 0.1% 醋酸中按比例与完全弗氏佐剂 1:1 充分混和乳化,于 SD 大鼠尾根部多点注射 0.5 mg/只,1 周后加强注射 1 次,0.2 mg/只,20~25 d 出现关节炎改变,持续 3~4 周,42 d 后处死大鼠采取滑膜组织作细胞培养及病理切片。实验组 36 只,造模成功 4 只。正常对照组 4 只,于第 1 天及第 7 天在鼠尾根部各注射生理盐水 0.1 ml,42 d 内未出现关节炎的表现。

1.5 滑膜细胞的分离纯化和培养[4]

脱臼处死大鼠,无菌修剪收集膝关节滑膜组织的滑膜层。充分剪碎至 1 mm×1 mm 溶于 DMEM 液(含青、链霉素各 10 万 U/L,胶原酶 0.8 mg/ml),37 ℃,5% CO_2 孵箱中消化 4 h 后,收集全部液体 2 000 r/min 离心 5 min,加入 0.25% 胰酶 5 ml 消化 30 min,10% 胎牛血清的 DMEM 液重悬细胞,转移至新培养瓶中继续培养 24 h 后吸弃仍未贴壁细胞。细胞长满培养瓶壁后进行传代培养,用相差显微镜及电镜进行鉴定,3~5 代后用于实验。

1.6 分组

将细胞按每孔 3×10^6 接种于 6 孔培养板内,一式两孔。设正常对照组(正常滑膜细胞)、CIA 组(关节炎滑膜细胞)、CIA+甲氨喋呤 10 μmol/L(阳性对照组)、CIA+SN 50 μmol/L 组,CIA+SN 500 μmol/L 组,培养 22 h 使滑膜细胞完全贴壁后,按设计的分组,每孔不加或者加甲氨喋呤或 SN,培养 2 h 后用相应的方法提取细胞核蛋白或细胞固定以进行下一步实验。

1.7 激光共聚焦扫描显微镜观察 SN 对滑膜细胞 NF-κB p65 核转位的影响[5]

制作细胞爬片,于 24 h 后 1% 甲醛固定,PBS(pH 7.2)洗 1 次,用 70% 乙醇 -20 ℃浸泡 24 h。将细胞爬片用 PBS-BSA 洗 2 次,加一抗 NF-κB p65 4 ℃放置过夜。细胞爬片用 PBS-BSA 洗 2 次,加二抗 FITC 标记兔抗小鼠 IgG 于湿盒中室温避光放置 1 h。细胞爬片用 PBS-BSA 洗 2 次,加入碘化丙啶染液,染 8 min。PBS 洗 2 遍,经 90%(质量体积分数)的甘油封片,置于激光共聚焦扫描显微镜下观察。阴性对照为正常细胞爬片,不加一抗,其他条件同。另设 NF-κB p65 特异性抑制剂 PDTC 为阳性对照,用 Leica confocal software 2100 Build 0871 分析各组红色荧光的核区中绿色荧光与胞质区中的绿色荧光比值(FN/FC),以 FN/FC 表示 NF-κB 活化程度。

1.8 核蛋白抽提及电泳迁移率改变分析法(EMSA)检测滑膜细胞 NF-κB 的活性

1.8.1 探针序列 由上海生工合成的大鼠 NF-κB 探针通用序列:P1:5′-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3′,P2:5′-GCCT-GGGAAAGTCCCCTCAACT-3′。

1.8.2 电泳迁移率改变分析法(EMSA)[6] 抽提的核蛋白经考马斯亮蓝蛋白定量后取 3 μg,DNA 结合缓冲液 17 μl、标记探针 1 μl(γ-^{32}p-ATP 在 T_4 多聚核苷酸激酶的作用下 5′端标记 NF-κB 探针序列),总反应体积 21 μl,置 37 ℃孵育 30 min,然后加上样缓冲液 4 μl。同时设不加核蛋白的阴性对照组。反应产物经 5% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(0.25×TBE,pH 8.3,电压 110 V)。电泳完毕,凝胶置 -70 ℃放射自显影。电泳滞后带用凝胶图像分析仪进行密度扫描,LabImage 2.6 软件分析,以其灰度值与滞后带面积之积表示 NF-κB 与标记探针结合的活性,结果用相关密度单位(RDU)表示。

1.9 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 8.0 统计软件。组间数据作方差齐性检验,若方差齐性,多组数据显著性差异用单因素方差分析。与关节炎相比,组间比较用 Dunnetts t 检验。CIA 与正常对照相比,采用 t 检验。

2 结果

2.1 成功建立 CIA 模型

大鼠于免疫后第 20~25 天出现后爪关节肿胀,生理盐水对照组在 56 d 内无任何症状及体征改变。与正常大鼠比较,CIA 组大鼠活动能力降低,后爪明显肿胀,关节呈屈曲状态。CIA 大鼠前爪、尾部关节无改变,未出现结节、红斑和关节强直。常规 HE 染色病理切片显示在滑膜组织中有大量炎性细胞浸润,滑膜组织中度增殖,但无血管翳形成,软骨及软骨下骨无骨质破坏。病理学研究证实在本模型中,关节局部存在特异性炎症。

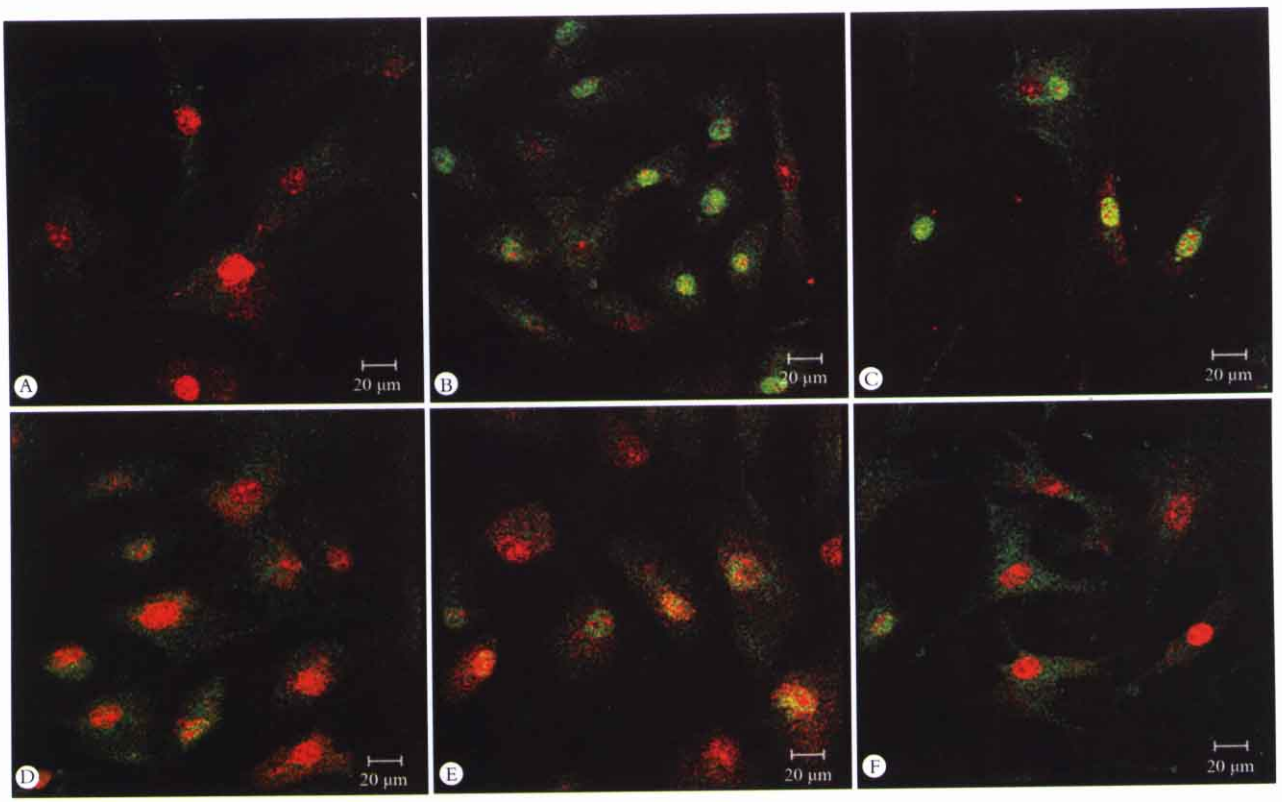
2.2 滑膜细胞的相差显微镜及电镜观察

分离的滑膜细胞,培养 24 h 后贴壁并伸出生长突。含 10% FCS 的 DMEM 培养液中培养的 B 型细胞分裂增殖迅速,呈长梭状极向排列。在培养的第 7 天当细胞汇合程度达 70%~80% 时即可进行传代培养。分离的 B 型细胞纯度均达 98% 以

上(Giemsa 染色)。光镜下见 B 型细胞呈梭形或柱形，细胞核呈卵圆形，位于细胞中央，核仁明显，细胞周围可见分泌物集聚。电镜下见 B 型细胞的主要特征为核染色质较疏松，染色质呈细颗粒状分布在核周围，核仁明显，粗面内织网丰富，细胞质突起长而粗，细胞质中往往缺乏高尔基复合体、小泡和囊泡。

2.3　SN 对滑膜细胞 NF-κB p65 亚基核转位的影响

经异硫氰酸荧光素和碘化丙啶双标观察滑膜细胞的 NF-κB p65 核转位，激光共聚焦显微镜下可见细胞图像合成图。正常对照组(0.76 ±0.11)的细胞几乎无活化。CIA 组细胞的 NF-κB p65(3.61 ±0.75)活化最多，荧光强度最强，出现在细胞核内(核区中绿色荧光强度明显高于正常对照组，$P=0.000$)。有趣的是，NF-κB 特异性抑制剂 PDTC 在 10 μmol/L 时明显抑制 CIA 滑膜细胞的 NF-κB p65 亚基的核转位(0.79 ±0.15)，显示在核区中绿色荧光强度较 CIA 组明显减少($P=0.000$)，而 10 μmol/L的 MTX 对炎性滑膜细胞的核转位无明显影响(2.76 ±0.45，$P=0.095$)。SN 50 μmol/L 剂量组(2.42 ±0.45)和 SN 500 μmol/L 剂量组(1.29 ±0.15)明显抑制炎性滑膜细胞的 NF-κB p65 的核转位。两个剂量 SN 组中核区绿色荧光与胞质区绿色荧光的比值(FN/FC)明显小于 CIA 组细胞，差异有显著性($P=0.000$)。见图 1。



A：正常对照组；B：CIA 组；C：CIA + MTX 10 μmol/L 组；D：CIA + PDTC 10 μmol/L 组；E：CIA + SN 50 μmol/L 组；F：CIA + SN 500 μmol/L 组

图 1　SN 对 CIA 大鼠滑膜细胞 NF-κB p65 核转位的影响　(激光共聚焦显微镜)

2.4　SN 对 CIA 大鼠滑膜细胞内 NF-κB 与 DNA 序列结合活性的影响

检测滑膜细胞内核转录因子 DNA 结合活性常用的方法为电泳迁移率改变分析法(electrophoretic mobility shift assay，EMSA)，其基本原理为：具有 DNA 结合能力的核转录因子与特定序列的 DNA 探针结合而形成 DNA-蛋白质复合物，使其电泳迁移率减慢，于是在放射自显影的 X 线片上出现 1 条较游离探针带滞后的新条带，并可根据滞后的条带的强弱对样品中转录因子的活性进行半定量分析，同时还可用抗体超迁移率试验或特异性竞争试验对反应的特异性进行检验。我们作了非特异性竞争试验及特异性竞争试验。EMSA 图像显示，当用 100 倍同名非标记探针与标记探针进行特异性竞争时，电泳结合带消失。CIA 大鼠滑膜细胞内 NF-κB 活性较正常对照组明显增高($P=0.000$)。MTX 抑制了 NF-κB 的 DNA 结合活性($P=0.018$)，SN 在 50 μmol/L 及 500 μmol/L 时可呈浓度依赖性地抑制 NF-κB 的 DNA 结合活性($P=0.001$，$P=0.000$)。见表 1。

表 1　SN 对 CIA 大鼠滑膜细胞 NF-κB 的 DNA 结合活性的影响

组别	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	NF-κB 活性
正常对照	5.20	4.67	6.44	6.38	5.67 ±0.88[b]
CIA	29.89	65.91	79.95	74.33	62.52 ±22.50
CIA + MTX 10 μmol/L	47.42	31.13	35.68	32.08	36.58 ±7.49[a]
CIA + SN 50 μmol/L	14.30	25.87	29.72	31.54	25.36 ±7.74[b]
CIA + SN 500 μmol/L	10.71	10.33	13.56	16.97	12.89 ±3.08[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 CIA 组比较

3　讨论

Ⅱ型胶原蛋白是一种组织局限性蛋白，主要存在

于关节软骨和眼球组织中。它是关节软骨的主要组成蛋白,关节损伤导致Ⅱ型胶原蛋白的释放并刺激免疫系统产生自身免疫攻击被认为是RA发生的机制之一。用Ⅱ型胶原免疫大鼠可以诱导出针对Ⅱ型胶原免疫应答的侵蚀性多关节炎,称为胶原诱导性关节炎(CIA)。CIA的表现在许多方面与人类的RA相似,如滑膜炎、软骨和软骨下血管翳的形成、炎性细胞浸润,可有软骨侵蚀、骨吸收和重塑等[7,8]。因此,CIA被认为是人类RA的独特动物模型,较广泛地用于RA机制的研究。

NF-κB为NF-κB/Rel家族成员,是可与多种基因启动子或增强子上的κB位点(GGGACTTTCC)发生特异性结合并能促使基因转录的多效转录调节因子,存在于各种细胞中。目前已知5个不同的家族成员:p65(RelA)、NF-κB1(p50/p105)、NF-κB2(p52/p100)、RelB及c-Rel[9]。它们之间可形成p65/p65、p50/p50等同源二聚体和p50/p65等异源二聚体,其中典型结构为p50/p65。静息状态下,NF-κB(p50/p65)与核抑制因子κB(IκB)结合形成无活性的三聚体,存在于胞浆中。许多刺激物(如细菌、病毒产物和特定的细胞因子等)通过一系列胞内传导,可引起IκB降解,致使NF-κB二聚体与IκB解离,从细胞质移位至细胞核,从而与DNA上的κB位点结合,激活相关基因的转录,导致多种细胞因子如TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8等的表达增加,调节免疫和炎症反应[10,11]。

在RA的血清及关节液中,有高水平的炎性细胞因子生成,如TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8、GM-CSF和细胞黏附分子(如ICAM-1)等[12]。另外,在RA滑膜衬里层细胞核内p50/p65亚基呈高表达状态,滑膜组织抽提物中的NF-κB活性明显高于骨关节患者[13]。研究表明,SN能够抑制NO合成,下调IL-lβ的表达,对TNF-α蛋白合成具有抑制作用,但仅在高浓度时才对TNF-α mRNA表达具有轻微的抑制作用[14]。本室前期研究已证实SN可降低佐剂性关节炎大鼠中滑膜细胞内TNF-α mRNA及IL-1β mRNA的表达[2]。因此,SN具有抗炎作用,但具体的作用机制尚不明。

本研究表明,与正常对照组相比,关节炎滑膜细胞可见明显的p65亚基核转位,NF-κB的DNA结合活性显著升高($P<0.01$),SN在50 μmol/L及500 μmol/L时可呈浓度依赖性地抑制p65亚基核转位及NF-κB的DNA结合活性,表明SN可抑制CIA大鼠滑膜细胞中p65亚基核转位及NF-κB的DNA结合活性而发挥抗炎效应。由于MTX是经典的治疗类风湿关节炎的药物,10 μmol/L的MTX体外作用60 min可抑制NF-κB活化,能下调NF-κB与DNA序列的结合活性,抑制NF-κB依赖的报告基因的转录,发挥抗炎及免疫调节效应[15]。故开始我们在实验设计时将它作为阳性对照药,但我们进一步发现,MTX虽然能抑制NF-κB活化,但并不能抑制NF-κB p65核移位。这表明SN与MTX在抗炎机制上有所不同。因此,SN抑制滑膜细胞内NF-κB p65核转位和NF-κB的DNA结合活性为其抗炎机制之一,但SN是否可直接抑制IκB的降解,或抑制IκB激酶及上游相关分子而导致下游转录因子NF-κB的DNA结合活性受抑,尚有待进一步研究。

参考文献:

[1] 罗 烈,杨 健,宋金春,等. 苯甲酰青藤碱的镇痛抗炎作用[J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(3): 196-198.

[2] 方勇飞,王 勇,周 新,等. 青藤碱对佐剂性关节炎大鼠滑膜细胞核因子κB信号转导的影响及其机制[J]. 中国临床康复, 2005, 9(7): 204-205.

[3] 程 宏,张 育,祝 瑾,等. 血管活性肠肽对胶原诱导关节炎大鼠治疗的作用初探[J]. 实用临床医药杂志, 2005, 9(9): 55-58.

[4] 蒋建平,杨铁诚,候凡凡,等. 人类关节滑膜A型和B型细胞的分离和体外培养[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(1): 52-55.

[5] Gomez P F, Pillinger M H, Attur M, *et al*. Resolution of inflammation: prostaglandin E_2 dissociates nuclear trafficking of individual NF-kappaB subunits (p65, p50) in stimulated rheumatoid synovial fibroblasts[J]. J Immunol, 2005, 175(10): 6924-6930.

[6] 王 勇,黄文华. 一种改进的核转录因子的电泳迁移率改变分析法[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(1): 119-120.

[7] 奚正德,王 利,柏 峻,等. Ⅱ型胶原特异性T细胞系与关节炎发病机制的研究[J]. 中华风湿病学杂志, 2003, 7(9): 527-530.

[8] 李景怡,吴玉章,陈永文,等. 盐酸青藤碱抑制小鼠胶原性关节炎的实验研究[J]. 免疫学杂志, 2005, 21(4): 313-316.

[9] May M J, Ghosh S. Signal transduction through NF-kappa B[J]. Immunol Today, 1998, 19(2): 80-88.

[10] Wakamatsu K, Nanki T, Miyasaka N, *et al*. Effect of a small molecule inhibitor of nuclear factor-kappaB nuclear translocation in a murine model of arthritis and cultured human synovial cells[J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7(6): R1348-R1359.

[11] Agarwal S, Deschner J, Long P, *et al*. Role of NF-kappaB transcription factors in antiinflammatory and proinflammatory actions of mechanical signals[J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(11): 3541-3548.

[12] Yamanishi Y, Firestein G S. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of synoviocytes[J]. Rheum Dis Clin North Am, 2001, 27(2): 355-371.

[13] Takada Y, Ichikawa H, Badmaev V, *et al*. Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid potentiates apoptosis, inhibits invasion, and abolishes osteoclastogenesis by suppressing NF-kappa B and NF-kappa B-regulated gene expression[J]. J Immunol, 2006, 176(5): 3127-3140.

[14] 杨德森,刘 芳,曾繁典,等. 青藤碱对大鼠佐剂性关节炎治疗作用及机制的研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(17): 1361-1363.

[15] Majumdar S, Aggarwal B B. Methotrexate suppresses NF-kappaB activation through inhibition of IkappaBalpha phosphorylation and degradation[J]. J Immunol, 2001, 167(5): 2911-2920.

(编辑 王 红)