

# 红花黄色素对佐剂型关节炎大鼠的抗炎作用研究

顾超兰, 周杰(重庆市中医院骨科, 重庆 400021)

**摘要:** 目的 观察红花黄色素对佐剂型关节炎大鼠的抗炎作用并探讨其机制。方法 用弗氏完全佐剂建立佐剂型关节炎大鼠模型, 分为正常组、模型组、红花黄色素 100, 50, 25 mg·kg<sup>-1</sup> 组, 每组 10 只。排水法检测大鼠足趾肿胀度, Elisa 法检测炎症因子 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  的水平, Western blot 法检测滑膜组织中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  蛋白的表达。结果 与模型组相比, 红花黄色素各组能显著降低佐剂型关节炎大鼠的足趾肿胀度( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 降低血清中 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  含量水平( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 还能降低滑膜组织中 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  蛋白的表达( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。结论 红花黄色素能显著缓解佐剂型关节炎大鼠的关节炎, 其机制与下调炎症因子 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  的表达有关。

**关键词:** 红花黄色素; 佐剂型关节炎; IL-1 $\beta$ ; TNF- $\alpha$

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2017)04-0521-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.04.009

## Anti-inflammatory Effect of Safflower Yellower on Adjuvant Arthritis Rats

GU Chaolan, ZHOU Jie(Department of Orthopedics, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing 400021, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the effect of the anti-inflammatory effect of safflower yellower on adjuvant arthritis rats. **METHODS** Rats model of adjuvant arthritis(AA) was induced by Freund's complete adjuvant(FCA). Rats were divided into control group, model group, 100, 50, 25 mg·kg<sup>-1</sup> safflower yellower groups, 10 rats each group. The swelling of the hind paw was measured by toe circumference method. The level and protein expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  was measured by ELisa and Western blot, respectively. **RESULTS** Compared with model group, the swelling of the hind paw, the level and protein expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  was decreased significantly( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ) in safflower yellower groups. **CONCLUSION** Safflower yellower can relieve arthritis in AA rats and the mechanism is related with decreased the expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ .

**KEY WORDS:** safflower yellower; adjuvant arthritis; IL-1 $\beta$ ; TNF- $\alpha$

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种自身免疫性疾病, 其特征为关节滑膜增生, 临床特点为手、足小关节的多关节、对称性、侵袭性关节炎。RA 在临床治疗中非常棘手, 因滑膜炎持续反复地发作使得关节软骨和骨发生破坏, 关节功能障碍, 严重者残废。RA 在各族人群中发病率和致残率较高, 对社会造成极大的负担。RA 的发病机制并不明确, 目前认为 RA 和免疫反应有关。

红花黄色素(safflower yellower, SY)是桔科植物红花活血、化瘀、通脉的主要有效成分, 它是一种天然的水溶性色素。目前, 以红花为主要成分的制剂在临床上已有大量使用, 临床经验表明, 红花制剂具有良好的抗炎、镇痛等药理活性, 但其作用机制仍不明确。

本研究通过建立佐剂型关节炎(adjuvant arthritis, AA)大鼠模型, 观察 SY 对其治疗作用,

并探讨机制, 为红花制剂的临床应用提供实验依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 动物** 50 只 SPF 级健康 SD 大鼠,  $\sigma$ , 体重(250 $\pm$ 50)g, 实验动物许可证号: SYXK(渝)2012-0001, 购自重庆医科大学实验动物中心。

**1.1.2 试剂及仪器** SY(浙江永宁制药, 批号: 20160113, 纯度>98%), 溶解于生理盐水中, 配制成 100 mg·mL<sup>-1</sup> 备用。IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  Elisa 试剂盒(武汉博士德公司, 规格: 96T, 批号: BA1191 及 20160516); 弗氏完全佐剂(规格: 10 mL, 批号: 160123)、IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  抗体(兔抗鼠, 规格: 0.2 mL, 批号: DZE90089 和 093k8949)、SABC 试剂盒(规格: 96T, 批号: SA1125)和 DAB 显色试剂盒(规格: 200  $\mu$ g, 批号: A0692)均购自 Sigma 公司。680 型酶标仪, GelDoc XR 凝胶成像仪(美

作者简介: 顾超兰, 女, 副主任护师 Tel: 15923277648 E-mail: 953306563@qq.com

国伯乐公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验分组及 AA 大鼠模型的建立** 50 只 SD 大鼠随机分为正常组, 模型组, SY 高、中、低剂量组, 每组 10 只。参考文献[1]的方法, 乙醚麻醉各实验组大鼠后, 用 75%酒精消毒右后足跖部, 皮内注射弗氏完全佐剂 0.1 mL, 正常组大鼠注射等剂量的生理盐水。注射弗氏完全佐剂后 3~4 h, 大鼠右后方足趾出现红肿发热等炎症反应, 第 2 天达到高峰, 第 4~5 天炎症渐渐消退, 第 8~10 天, 炎症又再次加重, 表明大鼠 AA 模型造模成功<sup>[2]</sup>。

**1.2.2 给药** 造模后第 10 天起, SY 高、中、低剂量组大鼠分别经尾静脉注射 100, 50, 25 mg·kg<sup>-1</sup> 的 SY, 正常组和模型组分别静脉注射相应剂量的生理盐水, 连续给药 3 d。

**1.2.3 大鼠足趾肿胀度的检测** 造模前和给药后, 参考文献[3]的方法, 用排水容积法测量大鼠右后方足踝关节下 0.5 mm 处的排水容积, 检测出大鼠致炎前后足趾容积的变化, 从而确定足趾的炎症情况。

肿胀度=致炎后足趾排水容积-致炎前足趾排水容积

**1.2.4 血清 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  水平的检测** 给药 3 d 后, 每组大鼠以 0.4 mL·(100 g)<sup>-1</sup> 的剂量, 腹腔注射 10% 的水合氯醛麻醉, 仰位固定好后心脏采血 4 mL, 将血样于 4 °C 下静置 2 h, 上层析出无色透明液为血清, 严格按照 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  Elisa 试剂盒说明书的步骤, 对 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  水平进行检测。

**1.2.5 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  蛋白表达的检测** 在大鼠麻醉的同时, 摘取每组 5 只大鼠的右侧踝关节, 并在研钵中将组织样品研磨成匀浆。向匀浆组织中加入细胞裂解液, 裂解匀浆组织, 再按步骤离心提取蛋白。先按照 BCA 试剂盒说明书的步骤, 测定样品的总蛋白浓度, 再加入 4 $\times$  上样缓冲液, 沸水浴 5 min, 于 -40 °C 保存备用; 取 10  $\mu$ L 的蛋白, 于 80 V 恒压下进行 SDS-PAGE 电泳, 时间为 30 min, 再换至 120 V 恒压, 200 mA 下转膜 1 h, 再于室温下, 封闭液封闭 PVDF 膜过夜。剪下 PVDF 膜, 加入 1:1 000 的 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  一抗, 在 4 °C 下孵育 48 h, TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min; 再加入 1:2 500 的二抗, 室温下孵育 2 h, TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min; 经 ECL 显色, 暗室曝光, 显影定影。Western blot 条带灰度值用 Quantity One

软件进行分析。

**1.2.6 统计分析** 实验数据均采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 *t* 检验进行组间比较, *P*<0.05 为有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 大鼠足趾肿胀度的检测结果

大鼠足趾肿胀度是反映足趾炎症程度的最直接的指标。在致炎前各组足趾容积无显著性差异。致炎并给药后, 各组足趾容积出现差异; 与模型组相比, SY 100, 50, 25 mg·kg<sup>-1</sup> 组能显著降低致炎后大鼠足趾的排水容积, 降低足趾肿胀度 (*P*<0.05 或 *P*<0.01)。结果见表 1。

表 1 各组大鼠致炎前后足趾容积的变化及肿胀度 (*n*=10,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 The changes of paw volume and swelling degree of rats before and after inflammation (*n*=10,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	致炎前足趾排水容积/cm <sup>3</sup>	致炎后足趾排水容积/cm <sup>3</sup>	肿胀度/cm <sup>3</sup>
正常组	0.35 $\pm$ 0.06	0.33 $\pm$ 0.05	-
模型组	0.37 $\pm$ 0.04	0.58 $\pm$ 0.06 <sup>2)</sup>	0.21 $\pm$ 0.03
SY 100 mg·kg <sup>-1</sup> 组	0.34 $\pm$ 0.03	0.42 $\pm$ 0.05 <sup>1)4)</sup>	0.08 $\pm$ 0.02 <sup>4)</sup>
SY 50 mg·kg <sup>-1</sup> 组	0.36 $\pm$ 0.05	0.47 $\pm$ 0.07 <sup>1)3)</sup>	0.11 $\pm$ 0.04 <sup>3)</sup>
SY 25 mg·kg <sup>-1</sup> 组	0.34 $\pm$ 0.06	0.50 $\pm$ 0.04 <sup>1)3)</sup>	0.16 $\pm$ 0.03 <sup>3)</sup>

注: 与正常组比较, <sup>1)</sup>*P*<0.05, <sup>2)</sup>*P*<0.01; 与模型组比较, <sup>3)</sup>*P*<0.05, <sup>4)</sup>*P*<0.01。

Note: Compared with normal group, <sup>1)</sup>*P*<0.05, <sup>2)</sup>*P*<0.01; compared with model group, <sup>3)</sup>*P*<0.05, <sup>4)</sup>*P*<0.01.

### 2.2 大鼠血清中 IL-1 $\beta$ 及 TNF- $\alpha$ 水平的检测结果

与正常组相比, 模型组大鼠血清中 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  水平显著增加 (*P*<0.01); 与模型组相比, SY 100, 50, 25 mg·kg<sup>-1</sup> 组能显著降低大鼠血清中 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  水平 (*P*<0.05 或 *P*<0.01)。见表 2。

表 2 各组大鼠血清中 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  水平 (*n*=10,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 The level of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  of rats in serum (*n*=10,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	IL-1 $\beta$ /pg·mL <sup>-1</sup>	TNF- $\alpha$ /pg·mL <sup>-1</sup>
正常组	11.15 $\pm$ 3.75	31.20 $\pm$ 5.63
模型组	54.37 $\pm$ 7.89 <sup>2)</sup>	66.89 $\pm$ 8.01 <sup>2)</sup>
SY 100 mg·kg <sup>-1</sup> 组	28.46 $\pm$ 7.63 <sup>1)4)</sup>	33.62 $\pm$ 5.50 <sup>4)</sup>
SY 50 mg·kg <sup>-1</sup> 组	31.09 $\pm$ 6.99 <sup>2)3)</sup>	40.01 $\pm$ 5.87 <sup>3)</sup>
SY 25 mg·kg <sup>-1</sup> 组	35.24 $\pm$ 7.08 <sup>2)3)</sup>	42.33 $\pm$ 6.22 <sup>1)3)</sup>

注: 与正常组比较, <sup>1)</sup>*P*<0.05, <sup>2)</sup>*P*<0.01; 与模型组比较, <sup>3)</sup>*P*<0.05, <sup>4)</sup>*P*<0.01。

Note: Compared with normal group, <sup>1)</sup>*P*<0.05, <sup>2)</sup>*P*<0.01; compared with model group, <sup>3)</sup>*P*<0.05, <sup>4)</sup>*P*<0.01.

### 2.3 踝关节组织中 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 蛋白表达的检测结果

与正常组比较, 模型组显著升高踝关节组织中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  蛋白的表达水平( $P<0.01$ ); 与模型组比较, SY 100, 50, 25 mg·kg<sup>-1</sup> 组能显著降低踝关节组织中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  蛋白的表达水平( $P<0.01$  或  $P<0.05$ )。结果见表 3 和图 1。

表 3 各组大鼠踝关节组织中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  蛋白表达的结果( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

Tab. 3 The level of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  protein of rats in ankle joint tissue( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

组别	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$
正常组	0.19 $\pm$ 0.02	0.55 $\pm$ 0.07
模型组	0.44 $\pm$ 0.05 <sup>2)</sup>	1.12 $\pm$ 1.05 <sup>2)</sup>
SY 高剂量组	0.25 $\pm$ 0.04 <sup>1)4)</sup>	0.62 $\pm$ 0.09 <sup>4)</sup>
SY 中剂量组	0.31 $\pm$ 0.03 <sup>2)3)</sup>	0.71 $\pm$ 0.08 <sup>3)</sup>
SY 低剂量组	0.33 $\pm$ 0.04 <sup>2)3)</sup>	0.83 $\pm$ 0.07 <sup>3)</sup>

注: 与正常组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较, <sup>3)</sup> $P<0.05$ , <sup>4)</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with normal group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>3)</sup> $P<0.05$ , <sup>4)</sup> $P<0.01$ 。

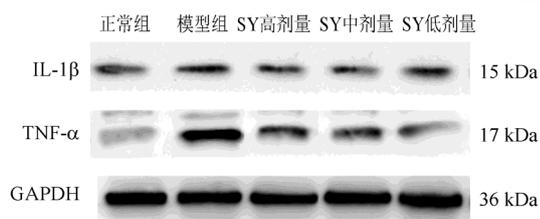


图 1 SY 对大鼠踝关节组织中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  蛋白的表达情况的影响

Fig. 1 The effect of SY on level of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  protein in ankle joint tissue of rats

### 3 讨论

RA 是一种慢性全身性自身免疫疾病, 特征为关节滑膜出现炎症, 特点为滑膜炎、细胞增殖、形成肉芽、软骨和骨组织被破坏等<sup>[4]</sup>。RA 的治疗很困难, 目前还是医学难题, 临床的治疗以控制炎症症状为主。SY 是一种天然的水溶性色素, 是红花活血化瘀的主要有效成分。SY 的安全性很高, 在药品、食品、饮料、化妆品等领域都有广泛应用, 将其用于 RA 药物的开发具有一定的意义。

由于 RA 是以炎症反应为主, 因此炎症因子在 RA 的发生和发展过程中起到了重要的作用。在炎症关节积液中, 可以检测到 IL-1、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  等多种炎症因子。其中 IL-1 的亚型 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  是最重要的 2 种炎症因子, 已有多篇文献报道

IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表达的升高与 RA 有着密切的联系<sup>[5]</sup>。

IL-1 $\beta$  是目前最强的炎症细胞因子之一, 它是由单核细胞、成纤维细胞和内皮细胞等在炎症刺激时产生的细胞因子。在 RA 的发生和发展过程中, IL-1 $\beta$  的表达显著升高, 它能促进关节滑膜的炎性浸润和增殖, 使得细胞合成释放 PGE<sub>2</sub>, 进一步加重 RA 炎症反应并形成血管翳<sup>[6]</sup>。TNF- $\alpha$  同样对 RA 有着严重的影响, 研究显示 TNF- $\alpha$  能调节机体的炎症反应和免疫应答<sup>[7]</sup>, 能促进血管内皮细胞表达黏附分子, 促进巨噬细胞和单核细胞在滑膜炎处聚集, 诱导成纤维细胞和软骨分泌前列腺素 E<sub>2</sub> 等炎性介质, 加重炎症反应, 破坏并降解软骨<sup>[8]</sup>。

本实验发现, AA 大鼠经 SY 干预后, 大鼠足趾肿胀程度明显降低, 血清及踝关节组织中 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  水平显著降低, 表明 SY 能有效缓解 AA 大鼠的关节炎, 减轻 AA 的破坏, 其机制与降低炎症因子 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  的表达有关。

### REFERENCES

- [1] HUANG H G, SUN Y F, HU M, et al. Characteristics of monosodium urate monohydrate crystal-induced acute arthritis in rats that mimicked human gouty arthritis [J]. Bull Acad Mil Med Sci(军事医学科学院院刊), 2005, 29(6): 538-542.
- [2] MICINNES IB, SCHETT G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. N Engl J Med, 2011, 365(23): 2205-2219.
- [3] CHOI H K, MOUNT D B, TEGINATO A M. Pathogenesis of gout [J]. Ann Intern Med, 2005, 143(4): 499-516.
- [4] TAO H Y, HUANG H, HOU G P, et al. Effect of saussurea involucrata injection on counteracting adjuvant-induced arthritis and its immunoregulation function [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2007, 18(4): 269-273.
- [5] LI S B, WU Y C. Effect of electroacupuncture on cartilaginous tissue IL-1 and IL-1 $\beta$  mRNA contents in the SD rats with knee osteoarthritis [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm(中医药导报), 2011, 17(11): 19-21.
- [6] PALOMARES R A, BROCK K V, WALZ P H. Differential expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines during experimental infection with low or high virulence bovine viral diarrhea virus in beef calves [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2014, 157(3/4): 149-154.
- [7] HUANG Y H, LIU T, PENG Q L, et al. Effect of Tongluo decoction on luber intervertebral disc herniation in rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2015, 32(7): 803-808.
- [8] MERRILL J C, YOU J, CONSTABLE C, et al. Whole-body deletion of LPS-induced TNF- $\alpha$  factor(LITAF) markedly improves experimental endotoxemic shock an inflammatory arthritis [J]. PNAS, 2011, 108(52): 21247-21252.

收稿日期: 2016-08-30

(本文责编: 曹粤锋)