

松萝酸对 CIA 大鼠 HMGB1、自噬蛋白 Beclin1 及炎症因子的影响

谢良山¹, 安 阳², 张 军², 黄 颖², 潘晓艺², 徐 晖²

(1. 贵州中医药大学第二临床医学院, 贵州 贵阳 550002;

2. 贵州中医药大学第二附属医院风湿免疫科, 贵州 贵阳 550001)

摘要:目的 探讨松萝酸对关节炎(CIA)大鼠 HMGB1、自噬蛋白 Beclin1 及炎症因子的影响。方法 将 72 只大鼠随机分成 6 组, 每组 12 只, 即空白对照组、模型对照组、阳性对照组、松萝酸低、中、高剂量组, 各组采用 II 型胶原乳剂造模成 CIA 大鼠模型, 空白对照组除外。造模结束后, 用低(2 mg/kg)、中(6 mg/kg)、高(54 mg/kg)剂量组的松萝酸进行药物干预治疗, 阳性对照组给予羟氯喹(36 mg/kg), 空白对照组及模型对照组予等溶剂 5 ml 蒸馏水灌胃。所有大鼠每天给药 1 次, 连续给药 28 d。末次灌胃 2 h 后, 提取标本, 观察大鼠关节指数评分、肿胀程度测定, 透射电镜观察细胞自噬, 采用 ELISA 检测 HMGB1、TNF- α 、IL-1、INF- γ 的血清浓度水平, PCR、WB 检测蛋白 HMGB1、Beclin1、Bcl-2、PI3K 蛋白表达情况。结果 模型对照组血清 HMGB1、TNF- α 、IL-1、INF- γ 含量高于空白对照组, 滑膜组织中 HMGB1、Bcl-2、PI3K 蛋白水平高于空白对照组, Beclin1 蛋白表达量低于空白对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 松萝酸中、高剂量组及阳性对照组 HMGB1、TNF- α 、IL-1、INF- γ 、Bcl-2、PI3K 水平低于模型对照组, Beclin1 蛋白表达量高于模型对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 松萝酸中、高剂量组抑制 HMGB1、Bcl-2、PI3K 表达、激活 Beclin1 的效果与阳性对照组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结论 松萝酸能减轻 CIA 大鼠关节肿胀程度, 降低血清 HMGB1、TNF- α 、IL-1、INF- γ 浓度, 抑制 HMGB1、Bcl-2、PI3K 蛋白的表达, 促进 Beclin1 表达上升, 增强细胞自噬, 减少滑膜炎炎症反应。

关键词: 类风湿关节炎; HMGB1; 自噬蛋白 Beclin1; 炎症因子; 松萝酸

中图分类号: R539.22

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2023.16.014

文章编号: 1006-1959(2023)16-0078-06

Effects of Ursolic Acid on HMGB1, Autophagy Protein Beclin1 and Inflammatory Factors in CIA Rats

XIE Liang-shan¹, AN Yang², ZHANG Jun², HUANG Ying², PAN Xiao-yi², XU Hui²

(1. The Second Clinical Medical College of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, Guizhou, China;

2. Department of Rheumatology and Immunology, Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, Guizhou, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of ursolic acid on HMGB1, autophagy protein Beclin1 and inflammatory factors in CIA rats. **Methods** A total of 72 rats were randomly divided into 6 groups, with 12 rats in each group: blank control group, model control group, positive control group, low dose group, middle dose group and high dose group. CIA rats were induced by type II collagen emulsion in each group, except the blank control group. After the establishment of the model, the rats in the low (2 mg/kg), middle (6 mg/kg) and high (54 mg/kg) dose groups were treated with ursolic acid, the positive control group was given hydroxychloroquine (36 mg/kg), and the blank group and model group were given 5 ml distilled water. All rats were given the drug once a day for 28 days. Two hours after the last intragastric administration, the specimens were extracted, and the joint index score, swelling degree and autophagy were observed under transmission electron microscope. The serum concentrations of HMGB1, TNF- α , IL-1 and INF- γ were detected by ELISA, and the protein expressions of HMGB1, Beclin1, Bcl-2 and PI3K were detected by PCR and WB. **Results** The levels of serum HMGB1, TNF- α , IL-1 and INF- γ in the model control group were higher than those in the blank control group, the levels of HMGB1, Bcl-2 and PI3K protein in synovial tissue were higher than those in the blank control group, and the expression of Beclin1 protein was lower than that in the blank control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of HMGB1, TNF- α , IL-1, INF- γ , Bcl-2 and PI3K in the middle and high dose groups of ursolic acid and the positive control group were lower than those in the model control group, and the expression of Beclin1 protein was higher than that in the model control group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). There was no significant difference in the effect of inhibiting the expression of HMGB1, Bcl-2, PI3K and activating Beclin1 between the middle, high dose groups of ursolic acid and the positive control group ($P>0.05$). **Conclusion** Ursolic acid can reduce the degree of joint swelling in CIA rats, decrease the concentration of serum HMGB1, TNF- α , IL-1 and INF- γ , inhibit the expression of HMGB1, Bcl-2 and PI3K protein, increase the expression of Beclin1, enhance autophagy and reduce synovial inflammation.

Key words: Rheumatoid arthritis; HMGB1; Autophagy protein Beclin1; Inflammatory factor; Ursolic acid

基金项目: 1. 国家自然科学基金资助项目(编号: 81960909); 2. 贵州省科技计划项目(编号: 黔科合平台人才[2020]2202 号)

作者简介: 谢良山(1997.6-), 男, 贵州瓮安人, 硕士研究生, 主要从事中西医结合风湿免疫疾病的防治研究

通讯作者: 安阳(1975.4-), 男, 贵州德江县人, 硕士, 副主任医师, 主要从事中西医结合风湿免疫疾病的防治研究

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种常见的以对称性、侵蚀性关节炎为主的慢性自身免疫性疾病,其发病率高、致残率大、分布广,以血管翳的形成、滑膜炎的产生、关节软骨和骨质的破坏为特征。研究发现^[1],细胞自噬在 RA 的发病中具有重要作用, HMGB1 是重要的细胞自噬调节基因,通过调节自噬蛋白 Beclin1 等的表达从而影响疾病进展,促进炎症因子的活化和增殖,加重炎症持续。并活化核转录因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B) 信号, 激活下游炎症因子 HMGB1、TNF- α 、IL-1、INF- γ 的表达,放大免疫反应,诱发关节炎症。因此,通过调节相关的自噬蛋白及炎症因子,可能是治疗 RA 的潜在靶点。目前,民族医药在治疗 RA 上有一定的优势,侗医药松萝,其主要药理活性成份是松萝酸,具有祛风除湿、通络止痛的功效。近年来研究证实,松萝具有抗菌、抗肿瘤、抗炎、镇痛等一系列生物活性, 对治疗 RA 等炎症性疾病都具有良好的治疗效果,可有效控制炎症,减轻相应的临床症状。本课题组前期研究证实松萝制剂对 RA 的治疗具有良好疗效^[2],但松萝酸是否参与影响 HMGB1、自噬蛋白 Beclin1 及相关炎症因子的表达情况尚未得到验证。因此,本研究通过观察松萝酸对 CIA 大鼠 HMGB1、自噬蛋白 Beclin1 及炎症因子的影响,探讨松萝酸对治疗 RA 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 5 周龄 Wistar 雌性大鼠 72 只(由湖北省实验动物研究中心提供),体质量 160~180 g,免检合格。合格证号:SCXK(鄂)2022-0018;实验室清洁环境喂养,室温适宜,喂养 1 周后开始造模。

1.2 主要药品及试剂 松萝酸(Solarbio, IU0130)、羟氯喹(Solarbio, IH0720)、胶原蛋白(源叶生物, S24940)、弗氏佐剂(SIGMA, F5881-6X)、全自动酶标仪(Thermo scientific, Multiskan MK3)、PCR 仪(东胜创新生物科技有限公司, EDC-810)、实时荧光定量 PCR 仪(ABI, QuantStudio 6)、荧光定量 PCR 管(EXTRAGENE/illumina)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天, P0010)、RIPA 裂解液(碧云天, P0013B)、磷酸酶抑制剂(碧云天, S1873)等。

1.3 方法

1.3.1 分组与造模 将 72 只大鼠编号后随机分为空白对照组、模型对照组、阳性对照组、松萝酸低、中、

高剂量组 6 组, 每组 12 只,按照参考文献建立模型,将胶原蛋白溶解于 0.1 M 的冰醋酸,配制成 1 mg/ml 的溶液,于 4 ℃冰箱内过夜后,加入等体积的完全弗氏佐剂(CFA),置于注射器中,于冰上反复推拉充分混匀,制成 0.5 mg/ml 的混合溶液,锡纸包裹以免曝光,4 ℃冰箱保存,现用现配。将大鼠置于呼吸机麻醉后,于大鼠尾根部、背部及足垫多点皮下注射配制好的胶原蛋白溶液,剂量为 0.3 ml/100 g。初次免疫 1 周后按照相同剂量再加强免疫 1 次,建立稳定的 CIA 大鼠模型^[3]。空白对照组大鼠皮下注射生理盐水。

1.3.2 给药 造模后第 3 天开始给药,空白对照组、模型对照组给予蒸馏水 5 ml/只灌胃;松萝酸低、中、高剂量组分别予 2、6、54 mg/(kg·d)灌胃,阳性对照组 36 mg/(kg·d),连续 4 周。

1.3.3 标本采集 末次给药后,以 0.4 ml/100 g 的乌拉坦溶液进行腹腔注射,麻醉后于股动脉取血 4~6 ml,通过静置 30 min 后,3000 r/min 离心 15 min,制备血清。处死大鼠后,解剖大鼠膝关节组织分离滑膜组织,分别于 2.5%戊二醛溶液固定、-80 ℃冻存以及 4%多聚甲醛固定,用于后续病理切片检测。

1.4 观察指标

1.4.1 模型关节炎评分 造模后观察大鼠关节红肿程度,对每只大鼠关节进行炎症评分,关节炎指数评分标准:无红肿为 0 分;小趾关节轻度红肿为 1 分;小趾关节和足跖肿胀为 2 分;踝关节下指甲肿胀为 3 分;所有指甲、关节肿胀为 4 分。四肢关节得分总和为该大鼠总评分,大于 4 分为造模成功,最高为 16 分^[4]。

1.4.2 血清 HMGB1、TNF- α 、IL-1、INF- γ 水平检测 用 ELISA 法检测,按照 ELISA 试剂盒说明进行操作,加入标准品和待测样品,设置阴性对照,37 ℃反应 30 min 温育,洗板 5 次,加入酶标试剂,37 ℃反应,再洗板 5 次,每孔加入显色剂,酶标板加上覆膜 36 ℃避光孵育 15 min。后加入终止液,立即用酶标仪测量各孔的光密度(OD 值),进行计算,取平均值。

1.4.3 关节滑膜组织中 HMGB1、Bel-2、PI3K、Beclin1 蛋白浓度检测 采用 Western Blotting 法检测,将组织低温匀浆后加入裂解液,裂解 30 min,4 ℃下 12000 rpm 的条件下离心 10 min,取上清。将蛋白样品以 BSA 为标准品进行稀释,每孔加入 20 μ g

蛋白样品, SDS-PAGE 电泳分离 1.5 h 后, 开始转膜, 用封闭液稀释相应的一抗, 洗膜后添加二抗 (1:50 000), 反复洗膜 5 次后, 放入显影液显影、定影液定影, 用 Western blotting 印迹观察, 用图像分析测定各带吸光度(A)值作定量分析。

1.4.4 关节滑膜组织中 HMGB1、Bcl-2、PI3K、Beclin1 mRNA 表达检测 采用 RT-PCR 法检测, 提取总 RNA, 裂解、离心, 逆转录合成 cDNA, 反应条件: 50 ℃ 2 min, 95 ℃ 10 min, 95 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 40 个循环。引物设计见表 1。

表 1 引物设计表

mRNA	方向	序列
HMGB1	Forward	5'-ATATGGACTGCTCAGGAAAC-3'
	Reverse	5'-GGCAAACCGTAATATAGGAA-3'
Bcl-2	Forward	5'-GGTGCCACCTGTGGTCCACCTG-3'
	Reverse	5'-CTTCACTTGTGGCCAGATAGG-3'
PI3K	Forward	5'-GCAACAAGTCCTCTGCCAAA-3'
	Reverse	5'-ACGTAATAGAGGAGCTGGGC-3'
Beclin1	Forward	5'-GGTGTCTCTCGCAGATTCATC-3'
	Reverse	5'-TCAGCTTCGGCTGAGGTTCA-3'
β -actin	Forward	5'-CACGATGGAGGGCCGGACTCATC-3'
	Reverse	5'-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3'

1.4.5 透射电镜观察细胞自噬 将待观察细胞经离心、洗涤、戊二醛固定、锇酸固定、丙酮梯度脱水、浸泡、包埋、修块、定位、切片、染色后, 在透射电镜下观察细胞自噬小体和自噬泡的形成。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 26.0 统计软件分析数据, 所有数据先进行正态性检验, 符合正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 松萝酸对大鼠关节症状的影响 空白对照组的大鼠无关节红肿、变形, 活动量减少等症状, 而其他各组大鼠出现关节红肿、变形, 活动量减少, 甚至畸形的症状, 评分为(4.38 ± 0.74)分, 提示造模成功。经过松萝酸与羟氯喹干预治疗后, 上述症状均得到缓解。松萝酸低剂量组的评分为(3.00 ± 0.75)分, 松萝酸中剂量组的评分为(2.25 ± 0.88)分, 松萝酸高剂量组的评分为(1.75 ± 0.71)分, 阳性对照组的评分为(1.63 ± 0.74)分。

2.2 各组大鼠血清 HMGB1、TNF- α 、IL-1、INF- γ 含量比较 与空白对照组相比, 其他各组大鼠血清 HMGB1、TNF- α 、IL-1、INF- γ 含量上升($P < 0.05$), 提示造模成功; 与模型对照组相比, 松萝酸低、中、高剂量组及阳性对照组血清 HMGB1、TNF- α 、IL-1、INF- γ 含量均下降($P < 0.05$); 松萝酸中、高剂量组治疗效果与阳性对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 2。

2.3 各组大鼠关节滑膜组织中 HMGB1、Bcl-2、PI3K、Beclin1 mRNA 表达比较 与空白对照组相比, 松萝酸低剂量组、中剂量组、高剂量组、阳性对照组及模型对照组 HMGB1、Bcl-2、PI3K、Beclin1 均增加, Beclin1 下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与模型对照组相比, 松萝酸中、高剂量组及阳性对照组均能激活 Beclin1, 下调 HMGB1、Bcl-2、PI3K 蛋白表达, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与阳性对照组相比, 松萝酸中、高剂量组与其效果相当, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 3、图 1。

表 2 各组大鼠血清 HMGB1、TNF- α 、IL-1、INF- γ 含量比较($\bar{x} \pm s$, ng/ml)

组别	n	HMGB1	TNF- α	INF- γ	IL-1
空白对照组	9	588 \pm 62	301.95 \pm 49.20	80 \pm 6.06	25.70 \pm 3.74
模型对照组	9	2001 \pm 193 ¹⁾³⁾	1153.11 \pm 89.26 ¹⁾³⁾	265 \pm 22.67 ¹⁾³⁾	74.30 \pm 7.24 ¹⁾³⁾
松萝酸低剂量组	9	1690 \pm 199 ¹⁾²⁾³⁾	974.16 \pm 80.97 ¹⁾²⁾³⁾	210 \pm 14.75 ¹⁾²⁾³⁾	65.66 \pm 7.90 ¹⁾²⁾³⁾
松萝酸中剂量组	9	1251 \pm 158 ¹⁾²⁾	764.67 \pm 100.17 ¹⁾²⁾	165 \pm 16.08 ¹⁾²⁾	55.08 \pm 5.70 ¹⁾²⁾
松萝酸高剂量组	9	1140 \pm 176 ¹⁾²⁾	724.83 \pm 77.51 ¹⁾²⁾	154 \pm 16.20 ¹⁾²⁾	52.08 \pm 7.26 ¹⁾²⁾
阳性对照组	9	1061 \pm 143 ¹⁾²⁾	683.65 \pm 72.10 ¹⁾²⁾	145 \pm 14.33 ¹⁾²⁾	48.83 \pm 6.24 ¹⁾²⁾

注: 与空白对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$; 与模型对照组相比, ²⁾ $P < 0.05$; 与阳性对照组相比, ³⁾ $P < 0.05$

表 3 各组大鼠关节滑膜组织中 HMGB1、Bcl-2、PI3K、Beclin1 mRNA 表达比较($\bar{x}\pm s$,ng/ml)

组别	n	HMGB1	Bcl-2	PI3K	Beclin1
空白对照组	9	0.73±0.52	1.14±0.15	0.42±0.02	0.99±0.13
模型对照组	9	3.34±0.30 ¹⁾³⁾	3.74±0.40 ¹⁾³⁾	0.76±0.07 ¹⁾³⁾	0.43±0.05 ¹⁾³⁾
松萝酸低剂量组	9	2.98±0.32 ¹⁾³⁾	3.23±0.33 ¹⁾³⁾	0.62±0.05 ¹⁾³⁾	0.51±0.06 ¹⁾³⁾
松萝酸中剂量组	9	2.09±0.43 ¹⁾²⁾	2.50±0.41 ¹⁾²⁾	0.56±0.06 ¹⁾³⁾	0.68±0.07 ¹⁾²⁾
松萝酸高剂量组	9	1.89±0.23 ¹⁾²⁾	2.25±0.35 ¹⁾²⁾	0.51±0.03 ¹⁾³⁾	0.70±0.08 ¹⁾²⁾
阳性对照组	9	1.88±0.37 ¹⁾²⁾	2.16±0.26 ¹⁾²⁾	0.51±0.02 ¹⁾³⁾	0.73±0.05 ¹⁾²⁾

注:与空白对照组相比,¹⁾ $P<0.05$;与模型对照组相比,²⁾ $P<0.05$;与阳性对照组相比,³⁾ $P<0.05$

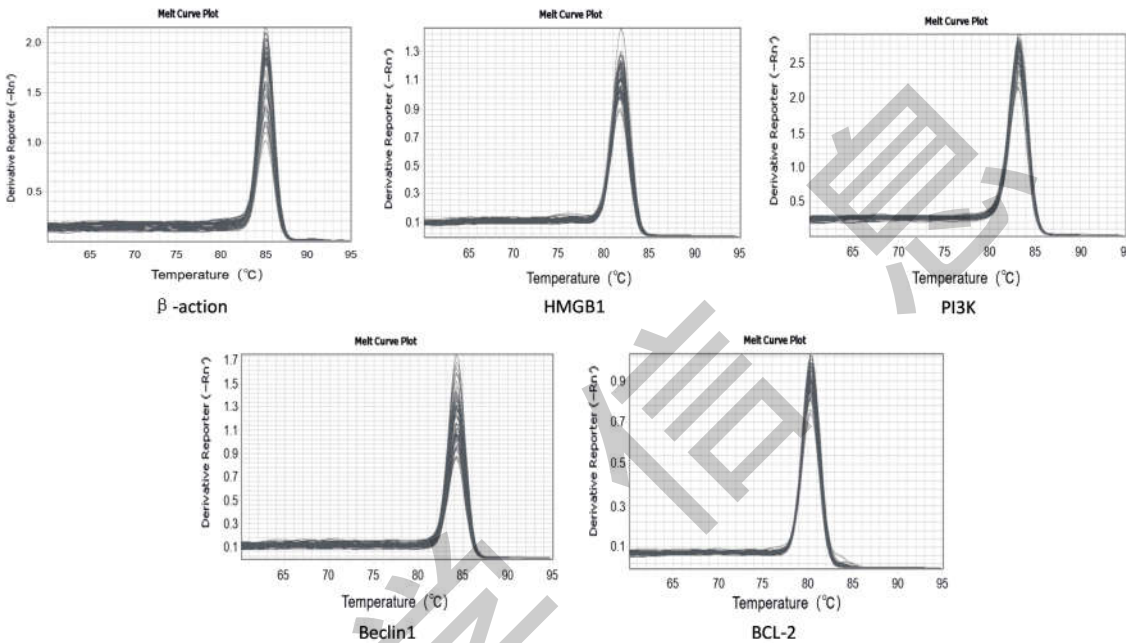


图 1 各组蛋白 mRNA 的溶解曲线图

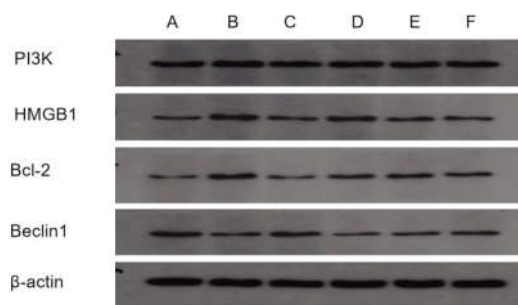
2.4 各组大鼠关节滑膜组织中 HMGB1、Bcl-2、PI3K、Beclin1 表达比较 与空白对照组相比,模型对照组、松萝酸低、中、高剂量组及阳性对照组滑膜组织中 HMGB1、Bcl-2、PI3K 蛋白相对表达量水平增高, Beclin1 相对下降,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型对照组相比,松萝酸中、高剂量组及阳性对照组 HMGB1、Bcl-2、PI3K 蛋白相对表达量下降,Beclin1 增加,差异有统计学意义($P<0.05$);松萝酸中、高剂量组蛋白表达与阳性对照组比较,差异无统计学意

义($P>0.05$),见表 4、图 2。
2.5 关节滑膜组织中细胞自噬病理变化比较 与空白对照组相比,模型对照组、松萝酸低剂量组自噬体数量稍增加,自噬体数量相对较少,维持正常需求,松萝酸中、高剂量组及阳性对照组自噬小体数量明显增加;炎症细胞因子减少,细胞凋亡增加,提示松萝酸及羟氯喹皆能促进细胞自噬,从而达到抑制滑膜细胞产生炎症的机制,见图 3。

表 4 各组大鼠关节滑膜组织中 HMGB1、Bcl-2、PI3K、Beclin1 表达比较($\bar{x}\pm s$,ng/ml)

组别	n	HMGB1	Bcl-2	PI3K	Beclin1
空白对照组	9	0.32±0.08	0.33±0.10	0.82±0.23	0.93±0.10
模型对照组	9	1.12±0.21 ¹⁾	0.79±0.04 ¹⁾	1.17±0.24 ¹⁾	0.43±0.04 ¹⁾
松萝酸低剂量组	9	1.01±0.17 ¹⁾³⁾	0.71±0.06 ¹⁾³⁾	1.09±0.12 ¹⁾³⁾	0.57±0.03 ¹⁾³⁾
松萝酸中剂量组	9	0.80±0.05 ¹⁾²⁾	0.57±0.06 ¹⁾²⁾	1.03±0.14 ¹⁾²⁾	0.64±0.06 ¹⁾²⁾
松萝酸高剂量组	9	0.73±0.03 ¹⁾²⁾	0.53±0.10 ¹⁾²⁾	0.99±0.07 ¹⁾²⁾	0.75±0.07 ¹⁾²⁾
阳性对照组	9	0.65±0.04 ¹⁾²⁾	0.51±0.08 ¹⁾²⁾	0.99±0.15 ¹⁾²⁾	0.77±0.07 ¹⁾²⁾

注:与空白对照组相比,¹⁾ $P<0.05$;与模型对照组相比,²⁾ $P<0.05$;与阳性对照组相比,³⁾ $P<0.05$



注:A:空白对照组;B:模型对照组;C:阳性对照组;D:松萝酸低剂量组;E:松萝酸中剂量组;F:松萝酸高剂量组

图2 大鼠关节滑膜组织中 HMGB1、Bcl-2、PI3K、Beclin1 蛋白表达条带图

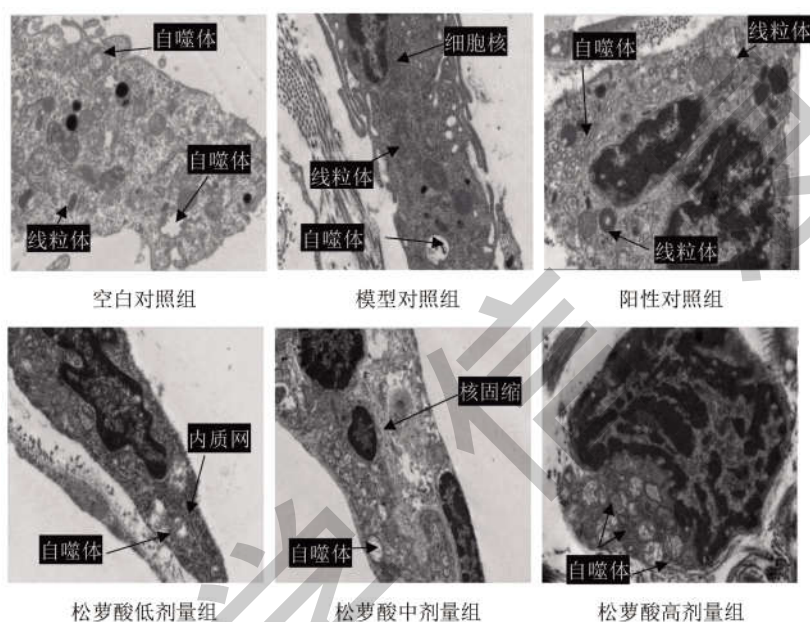


图3 各组大鼠关节滑膜组织中细胞自噬病理变化图

3 讨论

RA 的病因较为复杂,且发病机制研究尚不清楚,临床表现为关节炎症反应及免疫缺陷,血清学检查总表现为相关抗体阳性。RA 发生时,滑膜组织细胞内的炎症因子种类及数量相对增加,机体在免疫机制的作用下出现异常的表达。临床研究发现, TNF- α 、IL-1、INF- γ 在 RA 患者血清表达中普遍增高,对疾病的发生及转归有一定程度的影响,可通过调控细胞信号通路来释放炎症及相关的免疫抗体,达到干预炎症反应的效果^[5,6]。HMGB1 是一种核蛋白,更是重要的血清致炎因子,在 RA 疾病进展中有着重要的促进作用, HMGB1 在滑膜组织、滑液甚至血清中表达水平都有显著升高^[7];同时, HMGB1 在 RA 的疾病进程中对调节免疫反应、炎症以及自噬具有重要作用^[8]。HMGB1 位于细胞核内,当组织发生炎症刺激,或细胞凋亡、坏死以及免疫细胞活化等情况下,核内的 HMGB1 可被释放至细胞核外^[9],与

TNF- α 、IL-1、INF- γ 等炎症因子形成正向炎症反馈通路,刺激血管内皮细胞及单核巨噬细胞释放 HMGB1,促使 TNF- α 、IL-1、INF- γ 分泌,使炎症反应得以维持^[10]。另外,当 HMGB1 与 IL-1、核小体或脂多糖(LPS)等结合后形成聚合物,再与相关受体结合,促进炎症细胞的趋附性及 IL-17、IL-6、IL-23 等的分泌,刺激 NF- κ B 炎症通路活化,诱导 TNF- α 、IL-1 等致炎因子释放,加重炎症反应状态,导致 RA 的发生发展^[11]。自噬蛋白 Beclin1 在机体炎症反应及过程中发挥重要作用^[12]。研究表明^[13],核内 HMGB1 转移至细胞质直接与自噬因子 Beclin1 结合,将 Beclin1 从凋亡抑制因子 Bcl-2 中分离,通过促进 BECN1 和 III 型磷酸肌醇 3 激酶(PtdIns3KC3, PI3K Class III)/Vsp34 结合,激活自噬。还可以激活细胞外调节蛋白激酶(ERK),进一步激活死亡相关蛋白激酶(DAPK),促使 Beclin1 磷酸化,诱导 Beclin1 与 Bcl-2 分离,调节自噬的水平^[14]。由此表明, HMGB1

可与 Beclin1 特异性结合,共同作用于炎症反应的表达。

侗族医学认为,RA 属于“风湿痛”范畴,其病因病机是机体蕴生“邪热”所致,疼痛乃邪热蕴阻关节之外像。本课题组^[15]提出 RA 活动期的治疗以清郁热为主,其热之所生,是由于外邪、情志、内伤等因素,致气机闭郁,经络痹阻,导致内生邪热,气血津液运行不畅,腐坏关节、组织。侗医名家吴定元著《草木春秋》中也提出“赶邪、消水”的治法。侗医药松萝性味甘、平,具有除湿通络、清热解毒之功,可治风湿痹痛、跌打损伤。前期的预试验研究显示松萝提取物可以抑制 CIA 大鼠关节滑膜细胞中 HMGB1、TNF- α 、INF- γ 、IL-1 的表达水平,进一步的实验研究显示松萝制剂可以降低 CIA 大鼠血清 IL-1、IL-1 β 、TNF- α 的分泌水平^[16],有效控制关节滑膜炎。

本研究显示,空白对照组大鼠关节无红肿、变形,活动量正常。CIA 大鼠造模成功后,模型大鼠的关节发生了明显的炎性变化,关节发生红肿、变形,活动量下降,炎症因子 HMGB1、TNF- α 、INF- γ 、IL-1 的表达水平升高。松萝酸中、高剂量组及阳性对照组大鼠经干预治疗后症状减轻,下调了 HMGB1、TNF- α 、INF- γ 、IL-1 的表达水平,减轻了炎症反应,说明炎症时自噬是抑制状态,松萝酸及羟氯喹对促进自噬具有相同的作用,从而在机体内产生抑制炎症反应的效果。本研究结果还发现,造模后 CIA 大鼠滑膜组织中 HMGB1、Bcl-2、PI3K 蛋白表达上升,Beclin1 下降($P<0.05$),同时通过松萝酸、羟氯喹干预治疗后,松萝酸中、高剂量组及阳性对照组大鼠滑膜组织中 HMGB1、Bcl-2、PI3K 蛋白表达下降,Beclin1 上升($P<0.05$),说明松萝酸可有效降低 CIA 大鼠机体内的炎症因子表达,进一步调控自由基的释放,抑制炎症反应。这也说明 HMGB1、Beclin1 及其调节机制可能与 RA 的发生发展具有一定的相关性,证实松萝酸可下调炎症指标,延缓 RA 的进程。

综上所述,松萝酸可通过调控 CIA 大鼠 HMGB1、自噬蛋白 Beclin1 等蛋白及炎症因子的表达,控制 CIA 大鼠炎症反应过程。

参考文献:

[1]Alsousi AA,Igwe OJ.Redox-active trace metal-induced release of high mobility group box 1 (HMGB1) and inflammatory cytokines in fibroblast-like synovial cells is Toll-like receptor 4 (TLR4) dependent [J].Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018,1864(11):3847-3858.
[2]安阳,陆道敏,马武开,等.松筋通络方对胶原性关节炎大鼠血

清 IL-1、IL-1 β 、TNF- α 及滑膜病理的影响[J].风湿病与关节炎,2013(11):32-34.

[3]Postigo J,Iglesias M,Cerezo-Wallis D,et al.Mice deficient in CD38 develop an attenuated form of collagen type II-induced arthritis[J].PLoS One,2012,7(3):e33534.

[4]熊国林,黄海潇,谢玲,等.类风湿性关节炎大鼠模型的制备[J].解放军医学杂志,2007(2):121-123.

[5]郑学彬,龙淑会,李富杰,等.老年慢性牙周炎合并冠心病患者龈沟液及血清中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-18 及 IFN- γ 的表达与临床意义[J].中国老年学杂志,2020,40(11):2360-2363.

[6]丁非凡,王朝燕.AD 患者血清中炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 水平变化情况及意义分析[J].湖南师范大学学报(医学版),2019,16(4):57-60.

[7]Wang LH,Wu MH,Chen PC,et al.Prognostic significance of high-mobility group box protein 1 genetic polymorphisms in rheumatoid arthritis disease outcome [J].Int J Med Sci,2017,14(13):1382-1388.

[8]Chen X,Chen C,Fan S,et al.Omega-3 polyunsaturated fatty acid attenuates the inflammatory response by modulating microglia polarization through SIRT1-mediated deacetylation of the HMGB1/NF- κ B pathway following experimental traumatic brain injury[J].J Neuroinflammation,2018,15(1):116.

[9]Tang Y,Zhao X,Antoine D,et al.Regulation of Posttranslational Modifications of HMGB1 During Immune Responses[J].Antioxid Redox Signal,2016,24(12):620-634.

[10]Zhu B,Zhu Q,Li N,et al.Association of serum asma high mobility group box 1 with autoimmune diseases: A systematic review and meta-analysis[J].Medicine (Baltimore),2018,97(29):e11531.

[11]Li YB,Xu P,Xu K,et al.Methotrexate affects HMGB1 expression in rheumatoid arthritis, and the downregulation of HMGB1 prevents rheumatoid arthritis progression [J].Mol Cell Biochem,2016,420(1-2):161-170.

[12]郭鑫,杨俊.Beclin1 调控自噬、凋亡与炎症反应的分子机制[J].中国老年学杂志,2014,34(18):5289-5291.

[13]Majdoul S,Cosette J,Seye AK,et al.Peptides derived from evolutionarily conserved domains in Beclin-1 and Beclin-2 enhance the entry of lentiviral vectors into human cells [J].J Biol Chem,2017,292(45):18672-18681.

[14]Mou K,Liu W,Han D,et al.HMGB1/RAGE axis promotes autophagy and protects keratinocytes from ultraviolet radiation-induced cell death[J].J Dermatol Sci,2017,85(3):162-169.

[15]安阳,黄颖,曹跃朋,等.侗族药松枝方对类风湿关节炎患者活动期的临床疗效观察[J].贵阳中医学院学报,2018,40(1):87-89.

[16]安阳,马武开,陆道敏,等.松筋通络方对胶原性关节炎大鼠关节炎及滑膜细胞 NF- κ B 信号的影响 [J].医学信息, 2013,26(29):77-78.

收稿日期:2022-09-27;修回日期:2022-10-08

编辑/成森