

· 论 著 ·

## 青蒿琥酯对佐剂性关节炎大鼠血 IL-17、MMP-3 及 MMP-9 的影响\*

莫汉有, 王丽芳, 周润华, 杨敏, 许佳, 李宝贞, 石宇红<sup>△</sup>

(桂林医学院附属医院风湿免疫科, 广西桂林 541000)

**摘要:**目的 拟验证不同剂量青蒿琥酯对大鼠模型血白细胞介素-17(IL-17)、基质金属蛋白酶-3(MMP-3)及基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的影响。方法 取雄性 Wistar 大鼠 80 只建立佐剂性关节炎大鼠模型,第 6 天选出右后足和两前足关节炎指数之和大于或等于 6 的 60 只大鼠,随机分为模型对照组,2.5、5、10、20、40 mg/(kg·d)青蒿琥酯治疗组,每组 10 只;另取 10 只正常 Wistar 大鼠作为健康对照组。应用 ELISA 检测各组动物灌服不同剂量的青蒿琥酯后血 IL-17、MMP-3 及 MMP-9 的浓度。结果 与模型对照组相比,各治疗组大鼠血 IL-17、MMP-3 及 MMP-9 的浓度均下降( $P < 0.01$ ),且下降的幅度与青蒿琥酯的浓度呈正相关(IL-17: $r = 0.56, P = 0.003$ ;MMP-3: $r = 0.54, P = 0.003$ ;MMP-9: $r = 0.58, P = 0.003$ )。而组间对比,在青蒿琥酯浓度达到 20 mg/(kg·d)时抑制作用达到高峰。结论 青蒿琥酯能下调佐剂性关节炎大鼠血 IL-17、MMP-3 及 MMP-9 的浓度,且下降的幅度与青蒿琥酯的浓度呈正相关。

**关键词:**青蒿素;关节炎,实验性;白细胞介素;基质金属蛋白酶

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.07.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)07-0628-03

Influence of artesunate on level of interleukin-17, matrix metalloproteinases-3  
and matrix metalloproteinases-9 in rat of adjuvant arthritis\*

Mo Hanyou, Wang Lifang, Zhou Runhua, Yang Min, Xu Jia, Li Baozhen, Shi Yuhong<sup>△</sup>

(Department of Rheumatism and Immunology, Affiliated Hospital, Guilin Medical College, Guilin, Guangxi 541000, China)

**Abstract: Objective** To explore the effect of different doses of artesunate on the level of interleukin-17 and matrix metalloproteinases-3(MMP-3) and matrix metalloproteinases-9(MMP-9) in rat of adjuvant arthritis. **Methods** 80 clean grade male Wistar rats were selected to establish model adjuvant arthritis. On 6 d after modeling, 60 rats with the sum of arthritis index of right metapodes and two propodium  $\geq 6$  were selected, and randomly divided into 6 groups ( $n = 10$ ). Model control group was infused with normal saline [10 mL/(kg·day)] for 7 d; the other groups, artesunate groups, were infused with different doses of artesunate [2.5, 5, 10, 20, 40 mg/(kg·day)] and normal saline (2-4 mL) for 7 d. 10 normal Wistar rats were selected as controls. On 8 d after treatment, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect serum level of IL-17, MMP-3 and MMP-9. **Results** Compared with model rats, the serum level of IL-17 and MMP-3 and MMP-9 in artesunate groups were significantly decreased in a dose-depended manner ( $P < 0.01$ ). The group [20mg/(kg·day)] was the top in artesunate groups. **Conclusion** Artesunate can down-regulate the serum level of IL-17, MMP-3 and MMP-9 of adjuvant arthritis in a dose-depended manner.

**Key words:** artemisinin; arthritis, experimental; interleukin; matrix metalloproteinases

类风湿关节炎(RA)是一种以关节病变为主的自身免疫性疾病,关节的慢性炎症、滑膜增生和全身性的免疫反应异常是其特点。目前许多研究发现,免疫反应的异常是 RA 的主要发病机制之一。最近研究发现,白细胞介素-17(Interleukin-17, IL-17)、基质金属蛋白酶-3(matrix metalloproteinases-3, MMP-3)和基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinases-9, MMP-9)可能与 RA 炎症反应、血管翳形成、关节软骨、滑膜病变进展之间存在一定的内在联系<sup>[1-3]</sup>。

青蒿琥酯是青蒿素的一种半合成衍生物。近年发现,除了抗疟疾作用外,青蒿素还具有抑制细胞增殖、抗血管增生、诱导细胞凋亡等生物学作用。最近研究提示,青蒿素及其衍生物可能还具有抗炎和免疫调节作用。有研究已经发现青蒿素及其衍生物能通过调节 NF- $\kappa$ B 信号途径抑制脂多糖(LPS)诱导的 RA 滑膜细胞分泌 TNF- $\alpha$ ,从而发挥抑制 RA 滑膜炎症的作

用<sup>[4]</sup>。但其是否可以抑制 IL-17、MMP-3 及 MMP-9 目前仍不清楚。本文采用观察不同剂量青蒿琥酯对佐剂性关节炎大鼠模型血浆 IL-17、MMP-3 及 MMP-9 的影响,研究青蒿琥酯对 IL-17、MMP-3 及 MMP-9 的调节作用,并进一步探讨其机制,为今后应用青蒿琥酯治疗 RA 提供进一步实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 雄性 Wistar 大鼠 80 只,清洁级,鼠龄 6~8 周,体质量 146~153 g,由桂林医学院实验动物中心提供。青蒿琥酯由广西桂林制药厂惠赠。IL-17 试剂盒购于南昌长城生物科技有限公司,批号为 20090312。MMP-3 及 MMP-9 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。酶标仪为瑞典 ClineBio-128C。

## 1.2 方法

**1.2.1 弗氏完全佐剂的制作** 将液体石蜡与无水羊毛脂按 6:4 比例混合制成混合液 1 mL,高压灭菌,加入 80℃、灭活 1

h 的减毒卡介苗。

**1.2.2 模型的制备** 用体积分数为 0.75 的乙醇消毒大鼠尾部后,将配制好的弗氏完全佐剂每只注射 0.1 mL 于鼠尾中、内 1/3 交界处皮内。

**1.2.3 干预分组** 在造模第 6 天,选出右后足和两前足关节炎指数之和大于或等于 6 的 60 只大鼠,用随机数字表法分为模型对照组,及青蒿琥酯 2.5、5、10、20、40 mg/(kg·d) 治疗组(分别为青蒿琥酯 I、II、III、IV、V 组),每组 10 只;另取 10 只正常 Wistar 大鼠作为健康对照组。将各剂量青蒿琥酯分别加入 2~4 mL 生理盐水中灌服;模型对照组和健康对照组则灌服生理盐水 10 mL/(kg·d)。连续 7 d。第 8 天麻醉后处死 Wistar 大鼠前取血 2 mL,分成抗凝、不抗凝两种试管,室温;静置 2 h 后 3 000 r/min 离心 15 min,分离收集血浆/血清,分装后置 -80 °C 保存。

**1.2.4 检测**

**1.2.4.1 ELISA 法检测 MMP-3、MMP-9 的表达** MMP-3 采用血清样品,MMP-9 采用血浆样品,并用肝素锂抗凝,将浓缩洗涤液用双蒸水稀释,加入标准品/标本稀释液(1b)1.0 mL 至标准品(1a)中,待彻底溶解后,静置 15 min 混匀(浓度为 2 μg/L)。然后根据需要进行稀释。以生物素化抗体稀释液(2b)稀释生物素化抗体(2a)。以酶结合物稀释液(3b)稀释浓缩酶结合物(3a)。经稀释后加至预经单抗或明胶包被的反应微孔,置温育 37 °C 反应 2 h,再洗涤 5 次后加入辣根过氧化物-亲和素偶联物,37 °C × 30 min;再洗涤 5 次后,每孔加入 100 μL 的 TMB 底物液室温反应 10~15 min,最后加入 50 μL 1.8 N/L HCL 终止反应。根据标准曲线计算各样值。

**1.2.4.2 双抗体夹心 ELISA 法测定血清 IL-17 的浓度** 严格按照 IL-17 ELISA 试剂盒说明书进行操作。在 96 孔板中每孔加入 100 μL 的抗人 IL-17 IgG 单克隆抗体(2 pg/mL);同时每板均设阴性对照孔,置于 4 °C 中过夜。洗板,加入 100 μL 不同浓度的标准抗原及待测血清。室温孵育 2 h 并洗板后加入 100 μL 多克隆兔抗人 IL-17 抗体,室温孵育 2 h,洗板,每孔加入 100 μL 辣根过氧化物标记的羊抗兔 IgG,室温孵育 30 min,洗板,加入底物室温反应 15 min 后。加终止液,在 492 nm 波长处测定吸光度(A)值。IL-17 浓度与 A 值成正比,通过绘制标准曲线求出标本中 IL-17 浓度。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS11.0 软件完成统计分析。两组均数比较用 *t* 检验;3 组和多组样本均数比较采用单因素方差分析;多变量之间的关系采用多元直线回归;两变量之间的关系采用相关分析,多变量与一种变量之间的关系采用 Logistic 回归。

**2 结 果**

**2.1 实验动物数量分析** 纳入大鼠 80 只,其中 72 只造模成功,共选用 60 只进入本研究。

**2.2 模型建立后大鼠关节肿胀情况** 弗氏完全佐剂注射后第 2 天即有明显肿胀,出现急性免疫反应。

**2.3 予青蒿琥酯前、后关节病理学的改变** 以青蒿琥酯 20 mg/(kg·d) 治疗后病理学改变最为明显,见插图 1、2。

**2.4 青蒿琥酯对佐剂性关节炎大鼠血 IL-17、MMP-3 及 MMP-9 的影响** 青蒿琥酯对佐剂性关节炎大鼠血 IL-17、MMP-3 及 MMP-9 的影响均呈剂量依赖性(表 1)。与模型对照组相比,各治疗组 IL-17、MMP-3 及 MMP-9 的浓度均下降

( $P < 0.01$ ),且下降的幅度与青蒿琥酯的浓度呈正相关(IL-17:  $r = 0.56, P = 0.003$ ;MMP-3:  $r = 0.54, P = 0.003$ ;MMP-9:  $r = 0.53, P = 0.003$ )。而组间对比,在青蒿琥酯浓度达到 20 mg/(kg·d) 时抑制作用达到高峰,其与其他浓度相比差异有统计学意义。

**表 1 各组大鼠血清 IL-17、MMP-3 及 MMP-9 浓度比较 ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g/mL}$ )**

组别	<i>n</i>	IL-17	MMP-3	MMP-9
健康对照组	10	11.3±1.6	35.8±9.1	15.4±4.9
模型对照组	10	89.5±4.9	52.3±11.8	74.9±8.3
青蒿琥酯I组	10	67.8±2.4 <sup>a</sup>	47.6±12.2 <sup>a</sup>	51.1±7.9
青蒿琥酯II组	10	51.2±3.3 <sup>a</sup>	45.8±10.1 <sup>a</sup>	47.7±5.7 <sup>a</sup>
青蒿琥酯III组	10	44.7±4.5 <sup>a</sup>	44.3±8.3 <sup>a</sup>	41.3±6.1 <sup>a</sup>
青蒿琥酯IV组	10	16.2±3.8 <sup>ab</sup>	39.4±8.7 <sup>ab</sup>	35.5±5.5 <sup>ab</sup>
青蒿琥酯V组	10	15.1±2.7 <sup>abc</sup>	37.2±9.3 <sup>abc</sup>	24.6±5.2 <sup>abc</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ ,与模型对照组比较;<sup>b</sup>:  $P < 0.01$ ,与青蒿琥酯 I、II、III 组比较;<sup>c</sup>:  $P > 0.05$ ,与青蒿琥酯 IV 组比较。

**2.5 不良反应** 各治疗组小鼠均未见不良反应。

**3 讨 论**

RA 是一种常见的慢性炎性关节疾病。据初步调查中国的患病率为 0.3%。其是以对称性多关节炎为主要临床表现的慢性、进行性、侵袭性疾病,进行性的关节结构破坏是其病理学的主要特点,其破坏的主要原因是血管翳的形成及对软骨及骨的侵蚀,主要病理变化为关节滑膜的慢性炎症,初期滑膜充血、水肿、增厚,血管翳形成,软骨和软骨下骨破坏,其破坏是类似于肿瘤性的破坏<sup>[5]</sup>。其中新生血管形成与细胞外基质降解是侵蚀破坏过程中两个至关重要的环节<sup>[6]</sup>。

IL-17 是 T 淋巴细胞产生的一种前炎症细胞因子,是 T 淋巴细胞诱导的炎症反应早期启动因素<sup>[7]</sup>。近年发现,IL-17 主要通过其受体特异性结合,发挥促炎症反应、免疫应答等多种功能<sup>[8]</sup>。在 RA 的发病中,IL-17 可与其他细胞因子相互作用,相互调节,促进炎症反应的发生,IL-17 还能上调血管内皮生长因子(VEGF)的水平,增加 VEGF mRNA 的表达,促进血管翳的形成<sup>[9-11]</sup>。IL-17 还通过诱导滑膜细胞和软骨细胞表达基质金属蛋白酶<sup>[10]</sup>,基质金属蛋白酶的主要作用是破坏成熟血管壁的基底膜,从而允许内皮细胞的迁移,促进血管翳形成<sup>[11]</sup>,使蛋白多糖分子断裂,并上调细胞外基质降解酶的表达<sup>[12]</sup>,从而促进血管基底膜的降解,破坏软组织结构,刺激破骨细胞的生长;IL-17 与 TNF-α 协同作用可加强其致炎效应,因此在炎症的发生、发展过程中起促进作用,这可能是 IL-17 参与炎症损伤的机制之一<sup>[13-15]</sup>。

青蒿琥酯具有免疫调节的作用已经被认可,本研究也得出同样的结论,但其具体作用机制尚不明了<sup>[4]</sup>。本研究结果提示青蒿琥酯能明显抑制 IL-17、MMP-3 及 MMP-9 的分泌,且下降的幅度与青蒿琥酯的浓度呈正相关。而组间对比,在青蒿琥酯浓度达到 20 mg/(kg·d) 时抑制作用达到高峰,其与其他浓度相比差异有统计学意义。推测青蒿素除能通过调节 NF-κB 信号途径抑制 LPS 诱导的 RA 滑膜细胞分泌 TNF-α 外,可能还通过抑制 IL-17、MMP-3 及 MMP-9 的分泌及其二者的协同性而抑制 RA 滑膜细胞分泌炎症因子,从而减少血管翳的形成

及对软骨及骨的侵蚀。但青蒿琥酯在抑制炎症时 IL-17、MMP-3 及 MMP-9 和 TNF- $\alpha$  三者之间的关系目前还不清楚,还有待进一步探讨。IL-17 在佐剂性关节炎发病中作用的揭示,针对 IL-17 及与 IL-17 相关的细胞因子进行治疗干预手段,就有可能早期阻止病情进展,为治疗该类疾病提供了新的思路。但 RA 是一种复杂的免疫性疾病,有多种免疫活性细胞参与发病过程,IL-17 在 RA 中的具体作用机制以及与其他免疫细胞的相互作用,尚需进一步的研究和探讨。随着对 IL-17 研究的不断加深,将促进人们对免疫系统效应功能更全面的认识,为自身免疫性疾病等发病机制和防治对策提供新的认识。

#### 参考文献:

- [1] 樊有龙,傅颖媛. 类风湿关节炎患者 AECA、VEGF、IL-17 的检测及临床相关性研究[J]. 中国实验诊断学,2010,14(6):34-36.
- [2] 魏平,付爽,王俊祥,等. 基质金属蛋白酶-3 在类风湿关节炎中的表达及其意义[J]. 临床荟萃,2006,21(19):1389-1390.
- [3] Giannelli G, Erriquez R, Iannone F. MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 levels in patients with rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis[J]. Clin Exp Rheumatol, 2004,22(3):335-338.
- [4] 刘鹏,叶玉津,许韩师,等. 青蒿琥酯对类风湿关节炎滑膜细胞 TNF- $\alpha$  分泌的抑制作用及其机制研究[J]. 中国药物与临床,2007,7(7):520-523.
- [5] Kurosaka D, Yoshida K, Yasuda J, et al. Inhibition of arthritis by systemic administration of endostatin in passive murine collagen induced arthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2003,62(7):677-679.
- [6] 张晶,左晓霞,李通,等. 沙利度胺对大鼠佐剂性关节炎的治疗作用及其对炎性细胞因子的影响[J]. 中华风湿病学杂志,2005,11(9):656-659.
- [7] Chen Z, O'shea JJ. Regulation of IL-17 production in hu-

man lymphocytes[J]. Cytokine,2008,41(2):71-78.

- [8] Annunziato F, Cestai K, Santafilaaci V, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells[J]. J Exp Med,2007,204(9):1849-1851.
- [9] Pickens SR, Volin MV, Mandelin AM, et al. IL-17 contributes to angiogenesis in rheumatoid arthritis[J]. J Immunol,2010,184(6):3233-3241.
- [10] Lubberts E. IL-17/Th17 targeting: On the road to prevent chronic destructive arthritis? [J]. Cytokine,2008,41(2):84-91.
- [11] Shahrara S, Pickens SR, Dorfleutner A, et al. IL-17 induces monocyte migration in rheumatoid arthritis[J]. J Immunol,2009,182(6):3884-3891.
- [12] Kirkham BW, Lassere MN, Edmonds JP, et al. Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study( the damage study cohort)[J]. Arthritis Rheum,2006,54(4):1122-1131.
- [13] 汤天凤,梁清华,罗徐,等. 活动期类风湿关节炎患者血清基质金属蛋白酶-3 及其组织抑制剂-1 水平的检测和意义[J]. 中华风湿病学杂志,2005,9(5):291-294.
- [14] Zhu P, Ding J, Zhou J, et al. Expression of CD147 on monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis: its potential role in monocyte accumulation and matrix metalloproteinase production [J]. Arthritis Res Ther, 2005,7(5):R1023-1033.
- [15] Ma HL, Napierata L, Stedman N, et al. Tumor necrosis factor alpha blockade exacerbates murine psoriasis-like disease by enhancing Th17 function and decreasing expansion of Treg cells[J]. Arthritis Rheum,2010,62(2):430-440.

(收稿日期:2010-05-10 修回日期:2010-09-15)

(上接第 627 页)

- haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 and lung cancer susceptibility[J]. Carcinogenesis, 2005, 26(6):1117-1121.
- [14] Zhang J, Jin X, Fang S, et al. The functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-7 promoter increases susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma, gastric cardiac adenocarcinoma and non-small cell lung carcinoma[J]. Carcinogenesis,2005,26(10):1748-1753.
  - [15] Lamper K, Machein U, Machein MR, et al. Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor in human brain tumors[J]. Am J Pathol,1998,153(2):429-432.

- [16] Sang QXA, Douglas DA. Comprtational sequence-analysis of matrix metalloproteinases[J]. Protein Chem,1996,15(2):137-160.
- [17] Linn R, Dupon BR, Knight CB, et al. Reassignment of the 92Kda type Iv collagenase gene (CLG4B) to human chromosome 20[J]. Cytogenet Cell Genet,1996,72(23):159-161.
- [18] Grieu F, Li WQ, Iacopetta B. Genetic polymorphisms in the MMP-2 and MMP-9 genes and breast cancer phenotype[J]. Breast Cancer Res Treat,200,88(3):197-204.

(收稿日期:2010-08-16 修回日期:2010-11-04)