

· 论 著 ·

昆明山海棠对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜组织中 HIF-1 α 表达的影响*陈森洲, 张惠勤, 骆耐香, 李莎莎, 黄耀峰 Δ

(桂林医学院微生物学与免疫学教研室, 广西桂林 541004)

摘要:目的 探讨昆明山海棠(THH)在胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠模型中对外周血及滑膜组织低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)表达的影响。方法 将 Wistar 大鼠分为对照组($n=10$, 不做任何处理)、CIA 模型组($n=10$)、治疗组[包括地塞米松组($n=10$)、THH 高剂量组($n=10$)、THH 中剂量组($n=10$)及 THH 低剂量组($n=10$)]。实验前 CIA 模型组及治疗组大鼠建模。X 线摄片观察关节的形态改变, 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)以及免疫组化法分别检测 HIF-1 α 在外周血及滑膜组织中的表达情况。结果 对照组大鼠踝关节软组织结构完整, 足趾关节间隙清楚, CIA 模型组大鼠踝关节周围软组织肿胀, 足趾关节间隙模糊、狭窄; 各治疗组分别与 CIA 模型组及与对照组比较, 大鼠在外周血及滑膜组织中 HIF-1 α 表达差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 THH 可能通过调节外周血以及滑膜组织中 HIF-1 α 的表达而对 CIA 大鼠具有治疗作用。

关键词: 关节炎, 实验性; 滑膜; 大鼠; 昆明山海棠; 低氧诱导因子-1 α

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.35.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)35-3540-03

Effects of tripterygium hypoglaucum hutch on expression of HIF-1 α in synovium tissue of rats with collagen-induced arthritis*Chen Senzhou, Zhang Huiqin, Luo Naixiang, Li Shasha, Huang Yaofeng Δ

(Department of Microbiology & Immunology Guilin Medical University, Guilin Guangxi 541004, China)

Abstract: Objective To study effects of tripterygium hypoglaucum hutch (THH) on expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) in peripheral blood and synovium tissue in rat models of collagen-induced arthritis(CIA). **Methods** Wistar Rats were divided into control group($n=10$, without any treatment), CIA model group($n=10$) and treatment group [dexamethasone group($n=10$), THH high-dose group($n=10$), THH medium-dose group($n=10$) and THH low-dose group($n=10$)]. Rats in CIA model group and treatment group were subjected to modeling before experiment. Morphological changes of joint were observed by X-ray, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry were used to detect the expression of HIF-1 α in peripheral blood and synovium tissue, respectively. **Results** X-ray demonstrated integrated structure of the ankle joint, clear toe joint space of rats in control group, while soft tissue swelling around the ankle joint and fuzzy, narrow toe joint space of rats in CIA model group. Differences showed statistically significance when compared HIF-1 α expression in peripheral blood and synovium tissue of rats in each treatment group with those in CIA model group, and with those in control group, respectively($P<0.05$). **Conclusion** THH may exert therapeutic effect on CIA rats via regulating the expression of HIF-1 α in their peripheral blood and synovium tissue.

Key words: arthritis, experimental; synovial membrane; rats; tripterygium hypoglaucum; hypoxia-inducible factor-1 α

类风湿关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)是一种以多发性、侵蚀性外周关节炎为特点的慢性炎症性自身免疫性疾病。是目前造成劳动力丧失和致残的主要疾病之一,并且对患者产生一定的心理方面影响^[1],迫切需要有效的治疗与预防方案。

低氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)是介导细胞对缺氧微环境适应反应的关键性调控因子。近年来研究发现, HIF-1 α 在调节缺氧组织血管新生、细胞增殖存活、能量代谢、铁转运等方面具有重要作用,已发现超过60种基因受其调控^[2-4]。Tang等^[5]证实了在实体瘤中HIF-1 α 能够上调血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达,调控血管发生的功能。HIF-1 α 通过上调VEGF表达,促进血管生成,可能是其参与RA发病最重要的机制之一。

胶原诱导性关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)大鼠模型是目前研究RA的最佳动物模型。本研究前期已成功制备了大鼠CIA模型,证实HIF-1 α 在RA滑膜组织中的表达情况与炎症严重程度呈正相关,提示HIF-1 α 在RA滑膜组织增生和血管生成中起重要作用^[6]。HIF-1 α 是诱导VEGF表达的

首要转录因子^[7]。

昆明山海棠(tripterygium hypoglaucum hutch, THH)是一种传统中草药,其有效成分主要有生物碱类(雷公藤次碱等)、二萜类(环氧二萜内酯化合物)、三萜类(雷公藤内酯甲等)^[8-9]。THH能通过抑制细胞免疫、体液免疫等多个环节对机体的免疫功能产生影响^[10-11]。本文旨在通过研究不同剂量THH对CIA大鼠模型的治疗作用,探讨THH在大鼠滑膜组织中对HIF-1 α 与VEGF表达的影响及其作用机制,为临床治疗RA提供新的治疗思路。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)试验药物:THH片(重庆市中药研究院制药厂批号:22081006 每片0.18g),地塞米松(山东鲁抗辰欣药业有限公司批号:071231201 每片0.75mg)。(2)动物:Wistar大鼠60只,体质量160~200g,雌雄各半,SPF级,桂林医学院动物中心提供(许可证号SCXK桂2007-0001)。(3)试剂:牛II型胶原(CII),不完全弗氏佐剂(Sigma, F5506-10 mL), TRIZOL(美国Invitrogen公司,批号1382739), RT-PCR试剂盒

(大连宝生物工程有限公司, DRR014A), HIF-1 α 一抗 (Abcam, 批号 653496), 二抗 (福州迈新生物工程有限公司, 批号: 100301408A), DAB 显色剂 (福州迈新生物工程有限公司, 批号: 1003150031), 羊血清工作液 (北京中衫金桥生物工程有限公司, 批号: 90519050)。(4) 仪器: 微量台式高速冷冻离心机 (Thermo), 超低温冰箱 (Thermo), 基因扩增仪 (Biometra), 电泳仪 (北京六一仪器厂), 凝胶电泳结果图像分析仪 (培清 JS-780), 生物组织自动脱水机 (TS-12F), 切片机 (LEICARM), 照相显微镜 (OLYMPUS)。

1.2 方法

1.2.1 造模与分组 将 60 只大鼠分成对照组 ($n=10$, 不做任何处理)、CIA 模型组 ($n=10$)、治疗组 [包括地塞米松组 ($n=10$)、THH 高剂量组 ($n=10$)、THH 中剂量组 ($n=10$) 及 THH 低剂量组 ($n=10$)]。CIA 模型组及治疗组的 50 只大鼠预先制备为 CIA 模型, CII 与不完全弗氏佐剂制备成终浓度为 1 mg/mL 免疫混合物, 无菌状态下多点皮内注射 CII 共 500 μ g, 14 d 后加强免疫 1 次, 尾根部皮内注射 CII 500 μ g。造模 28 d 入组, 灌胃给药。地塞米松组给予地塞米松 0.08 mg \cdot kg $^{-1}$ \cdot d $^{-1}$, THH 高、中、低剂量组分别给予 400、300、200 mg \cdot kg $^{-1}$ \cdot d $^{-1}$ THH 灌胃, 每天 1 次, 连续用药 30 d, 对照组及 CIA 模型组给予等体积的蒸馏水。造模及治疗前后观察大鼠体质量、体毛色泽的改变、神志、活动状态、饮食变化及关节红肿情况。免疫后第 21 天经 1% 戊巴比妥麻醉大鼠后, X 线拍摄踝关节, X 线片条件为 40 kV。

1.2.2 半定量逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测外周血中 HIF-1 α 表达 给药结束后, 大鼠麻醉后心脏取血, 提取 HIF-1 α mRNA, 并进行 RT-PCR 检测。TRIZOL 法提取外周血中总 RNA, 加无 RNA 酶的水保存至 -70 $^{\circ}$ C。根据 RT-PCR 两步法试剂盒操作说明, 合成第一链 DNA, 先进行变性, 退火反应: dNTP Mixture 1 μ L, Oligo Dt Prime 1 μ L, Template RNA 3 μ L, 加无 RNA 酶的水至总体积为 10 μ L, 先 65 $^{\circ}$ C, 5 min, 然后 4 $^{\circ}$ C 保存。取上述变性退火后的反应液 10 μ L, 5 * PrimescriptTM buffer 4 μ L, RNase inhibitor 0.5 μ L, Prime scriptTM RTase 0.5 μ L, RNase free dH₂O 5 μ L, 45 $^{\circ}$ C, 30 min; 95 $^{\circ}$ C, 5 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。保存于 -20 $^{\circ}$ C。PCR 反应体系 (10 * PCR Buffer II 5 μ L, dNTP Mixture 2 μ L, 上游引物 0.5 μ L, 下游引物 0.5 μ L, TAKARA EX TAQTM HS 0.5 μ L)。选取 GAPDH 作为内参, GAPDH 引物的序列为: 上游 5'-TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA-3'; 下游 5'-AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT-3'; 片段长度: 303 bp。HIF-1 α 引物的序列为: 上游: 5'-ACA GGA TTC CAG CAG AC-3'; 下游: 5'-TTC CAA GAA AGC GAC AT-3'; 片段长度: 461 bp。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 30 个循环, 4 $^{\circ}$ C 保存。取 5 μ L 产物 2.5% 琼脂糖凝胶电泳, 对照分子量标准检测扩增结果。

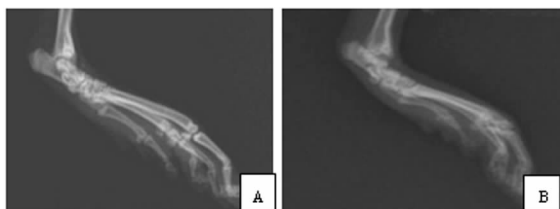
1.2.3 免疫组化法检测滑膜组织中 HIF-1 α 表达 石蜡切片先脱蜡至水; 再作 0.01 M, pH 6.0 的柠檬酸微波修复; 然后 3% H₂O₂ 封闭, 正常山羊血清封闭, 加一抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜; 加二抗; 加链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液; 最后加 DAB 显色液; 洗去; 复染, 封片。

1.2.4 免疫组化结果采用半定量记分法判定 (1) 按阳性着色程度评分。0 分为无着色, 与背景色一致; 1 分为浅黄色, 略高于背景色; 2 分为棕黄色, 明显高于背景色; 3 分为棕褐色。(2) 按阳性细胞所占比例评分。0 分为阴性; 1 分为 10% 以下; 2 分为 11%~50%; 3 分为 51%~75%; 4 分为 75% 以上。(3)

二者乘积判定阳性结果。HIF-1 α 阳性细胞为细胞质或细胞核呈棕黄色或棕褐色, VEGF 阳性细胞为细胞质呈棕黄色或棕褐色。

2 结果

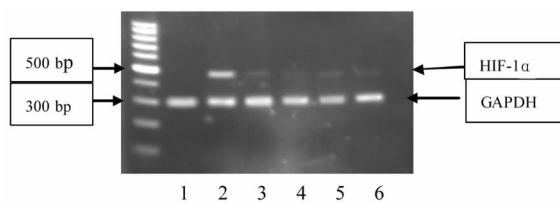
2.1 踝关节影像学观察 对照组大鼠踝关节软组织无肿胀, 骨质无破坏, 结构完整, 足趾关节间隙清楚。CIA 模型组大鼠踝关节周围软组织肿胀, 足趾关节间隙模糊、狭窄及融合等表现, 见图 1。



A: 对照组大鼠; B: CIA 模型组大鼠

图 1 大鼠踝关节 X 线表现

2.2 外周血 HIF-1 α 表达的结果比较 给药 30 d 后, 治疗组与 CIA 模型组相比, 外周血 HIF-1 α 表达有明显差异; 而对照组与各组相比也有明显差异 (图 2)。各组大鼠外周血 HIF-1 α 以 RNA 基因表达的灰度值, 见表 1。



1: 对照组; 2: CIA 模型组; 3: 地塞米松组; 4: THH 高剂量组; 5: THH 中剂量组; 6: THH 低剂量组。

图 2 各组大鼠 HIF-1 α 的 RT-PCR 结果

表 1 HIF-1 α mRNA 基因表达的灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HIF-1 α (目的/内参)
对照组	10	0.028 \pm 0.046 #
CIA 模型组	10	0.750 \pm 0.149 *
地塞米松组	10	0.340 \pm 0.335 * #
THH 高剂量组	10	0.417 \pm 0.192 * #
THH 中剂量组	10	0.405 \pm 0.303 * #
THH 低剂量组	10	0.414 \pm 0.131 * #

* : $P < 0.05$, 与对照组比较; # : $P < 0.05$, 与 CIA 模型组比较。

表 2 HIF-1 α 蛋白表达的免疫组化结果 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	HIF-1 α
对照组	10	0.090 \pm 0.145 #
CIA 模型组	10	0.771 \pm 0.082 *
地塞米松组	10	0.474 \pm 0.131 * #
THH 高剂量组	10	0.635 \pm 0.092 * #
THH 中剂量组	10	0.574 \pm 0.131 * #
THH 低剂量组	10	0.640 \pm 0.112 * #

* : $P < 0.05$, 与对照组比较; # : $P < 0.05$, 与 CIA 模型对照组比较。

2.3 免疫组化染色结果 模型组滑膜衬里层和衬里下层 HIF-1 α 阳性密度明显高; 各用药组的 HIF-1 α 阳性密度与模型

组比较差异有统计学意义(封 3 图 3)。各组大鼠滑膜组织 HIF-1 α 蛋白表达的免疫组化评分,见表 2。

3 讨 论

本实验用半定量的方法对各组目的/内参的灰度值进行了统计分析。结果表明 THH 高、中、低剂量组及地塞米松组与 CIA 模型组和对照组中的 HIF-1 α 表达差异有统计学意义($P < 0.05$)。

从免疫组化结果可见滑膜组织中,对照组基本没有 HIF-1 α 蛋白表达;CIA 模型组 HIF-1 α 表达增强。HIF-1 α 在细胞核及细胞质中均表达。各个治疗组的情况则相对好得多,在滑膜细胞 HIF-1 α 表达只有少量核阳性,且颜色呈浅褐色,免疫组化结果有明显差异。半定量记分法结果显示各个治疗组与 CIA 模型组之间 HIF-1 α 的蛋白表达差异有统计学意义($P < 0.05$)。

本研究显示在 CIA 模型中,THH 通过降低 HIF-1 α 的表达调控其下游基因,特别是降低其滑膜组织中 VEGF 的表达,进而控制其血管翳的生成。在临床用作治疗 RA,其主要成分雷公藤甲素被证实通过抑制 HIF-1 α 的表达及其活性,作为一种潜在的抗肿瘤药物^[12]。说明 THH 对于 CIA 模型组的治疗有明显疗效,已有一定的研究表明 THH 对于 RA 有一定的治疗作用^[13]。也有实验证明 THH 在一定浓度下对于 RA 滑膜巨噬样细胞和滑膜成纤维样细胞有诱导凋亡和明显抑制异常增殖作用^[14]。提示 THH 通过 HIF-1 α 的途径调节其下游基因的表达可能是治疗 RA 患者的作用机制之一。

参考文献:

- [1] 周润华,朱芳晓,王晓桃,等. 76 例类风湿关节炎患者抑郁症状临床分析[J]. 重庆医学,2010,39(4):466-468.
- [2] Westra J, Brouwer E, Bos R, et al. Regulation of cytokine-induced HIF-1 α expression in rheumatoid synovial fibroblasts[J]. Ann N Y Acad Sci, 2007(1108):340-348.
- [3] Hashimoto A, Tarner IH, Bohle RM, et al. Analysis of vascular gene expression in arthritic synovium by laser-mediated microdissection[J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(4):1094-1105.
- [4] Boulton J, Roberts K, Brookes MJ, et al. Overexpression of

cellular iron import proteins is associated with malignant progression of esophageal adenocarcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(2):379-387.

- [5] Tang N, Wang L, Esko J, et al. Loss of HIF-1 α in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis[J]. Cancer Cell, 2004, 6(5):485-495.
- [6] 陈森洲,王险峰,侯巧燕,等. 低氧诱导因子-1 α 在 CIA 模型中的表达及其意义[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2010, 30(2):115-119.
- [7] Kajiwaru H, Luo Z, Belanger AJ, et al. A hypoxic inducible factor-1 α hybrid enhances collateral development and reduces vascular leakage in diabetic rats[J]. J Gene Med, 2009, 11(5):390-400.
- [8] 王钺,隆长锋. 中药昆明山海棠的研究进展[J]. 医学综述, 2006, 12(11):691-692.
- [9] 张彦文,范云双,王晓东,等. 昆明山海棠中具有免疫抑制活性的二萜类化合物[J]. 中草药, 2007, 38(4):493-496.
- [10] 韩玉. 昆明山海棠的药理作用研究进展[J]. 国外医学中医中药分册, 2005, 27(5):272-275.
- [11] Xu Y, Zheng YT, He L, et al. Study of Tripterygium hypoglaucom Hutch on mouse's splenic lymphocyte activation in vitro[J]. Zhong Yao Cai, 2008, 31(4):557-561.
- [12] 周光辉,钟秋生,朱永坤,等. 补肾活血方合火把花根片治疗类风湿关节炎临床研究[J]. 新中医, 2008, 40(9):46-47.
- [13] 曾润铭,杜世新,吴杰,等. 昆明山海棠与类风湿关节炎滑膜细胞体外增殖和凋亡[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(50):9892-9897.
- [14] Zhou ZL, Luo ZG, Yu B, et al. Increased accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α with reduced transcriptional activity mediates the antitumor effect of triptolide[J]. Mol Cancer, 2010(9):268.

(收稿日期:2011-05-09 修回日期:2011-07-12)

(上接第 3539 页)

- [3] 龙翔宇,何大川,戴路明,等. COPD 骨骼肌功能障碍与 PPAR α 基因多态性关系研究[J]. 重庆医学, 2010, 39(18):2406-2408.
- [4] Remels AH, Schrauwen P, Broekhuizen R, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor expression is reduced in skeletal muscle in COPD[J]. Eur Respir J, 2007, 30(2):245-252.
- [5] Luquet S, Lopez-Soriano J, Holst D, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability[J]. FASEB J, 2003, 17(15):2299-2301.
- [6] Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates

the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1 [J]. J Biol Chem, 1999, 274(45):32048-32054.

- [7] Engelen MP, Schols AM, Does JD, et al. Skeletal muscle weakness is associated with wasting of extremity fat-free mass but not with airflow obstruction in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Am J Clin Nutr, 2000, 71(3):733-738.
- [8] Montes de Oca M, Torres SH, De Sanctis J, et al. Skeletal muscle inflammation and nitric oxide in patients with COPD[J]. Eur Respir J, 2005, 26(3):390-397.

(收稿日期:2011-03-09 修回日期:2011-08-12)