

雷公藤红素对破骨细胞及胶原诱导关节炎小鼠中 趋化因子 CXCL2 表达的影响 *

彭柳莹¹, 钱 晨², 谈文峰³, 冯小可², 张前德^{2Δ}

(1. 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏南京 210023; 2. 南京医科大学中西医结合研究所, 江苏南京 210029;
3. 南京医科大学第一附属医院, 江苏南京 210029)

摘要: **目的** 探讨雷公藤红素(Celastrol, Cel)通过抑制趋化因子 CXCL2 的表达减少大鼠骨髓诱导的破骨细胞形成及胶原诱导的关节炎小鼠(CIA 小鼠)模型局部关节炎症及骨侵蚀的发生。**方法** 体内实验制备 CIA 小鼠模型,分为空白对照组、CIA 组及 Cel 组,以病理染色的方法观察小鼠关节炎症,以实时荧光定量 PCR 及 ELISA 的方法检测关节局部及血清的 CXCL2 表达的变化;体外实验诱导大鼠骨髓形成破骨细胞,加入不同浓度的 Cel,通过实时荧光定量 PCR 检测 CXCL2 的变化。**结果** 破骨前体细胞及 CIA 小鼠中 CXCL2 高表达,且 Cel 能够抑制其表达,且成剂量依赖性。**结论** Cel 可能通过抑制趋化因子 CXCL2 的表达,抑制炎性细胞对组织的浸润,从而减少组织破坏。

关键词: 雷公藤红素; 破骨细胞; 类风湿关节炎; 趋化因子

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2014)02-0001-05

类风湿关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)是以全身小关节为主的慢性滑膜炎和骨侵蚀为基本病理过程的自身免疫性疾病。RA 患者关节最严重的临床结局即是关节畸形、关节功能丧失,严重影响患者的生活质量。趋化因子是一种具有趋化和激活作用的小分子多肽物质,广泛参与了炎性细胞的迁移及浸润过程。有研究表明,在 RA 发病过程中,通过趋化中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞,参与滑膜炎和骨组织破坏^[1-6],同时也参与 RA 血管炎的形成^[1-3]。雷公藤红素来源于中药雷公藤的根皮,是具有多种生物活性的天然产物,是雷公藤片、雷公藤多甙片等制剂的主要有效成分之一。近年来已有多项研究围绕雷公藤红素在抑制破骨细胞形成、阻止骨侵蚀发生过程中发挥的重要作用开展,但大多数的研究重点在对炎性因子的抑制和对 RANK/RANKL/OPG 通路的影响,对趋化因子的作用研究甚少。本文以 CIA 大鼠及小鼠骨髓诱导破骨细胞为研究对象,旨在探讨 Cel 对关节炎小鼠及破骨细胞形成中对 CXCL2 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物

24 只 8 周龄 SPF 级 DBA/1J 雄性小鼠,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司;4 周龄 SPF 级 SD 大鼠 20 只,购自南京医科大学动物实验中心。

1.1.2 主要试剂

aMEM 培养液、胎牛血清及胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;细胞核因子 κ B 受体活化因子配基(RANKL)购自美国 Peprotech 公司;M-CSF 及 Cel 购自美国 Sigma 公司;CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所;小鼠 MIP-2 ELISA Kit 购自博士德;逆转录试剂盒购自日本 Takara 公司;引物均由美国 Invitrogen 公司合成。

1.1.3 主要仪器

3111 型 CO₂ 恒温培养箱购自美国 Thermo 公司;E 808 酶联免疫检测仪购自美国 BIO-TEK Instruments 公司;Sterilgard advance 生物安全操作台购自美国 Baker 公司;实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)SYBR Green Mixture 及 384 孔反应板购自美国 ABI 公司;ABI Prism 7900HT 型 PCR 仪购自

* 基金项目: 国家自然科学基金(30701129, 81172845);江苏省自然科学基金(BK2011851)

收稿日期: 2014-03-20

作者简介: 彭柳莹(1987-),女,广西柳州人,在读硕士研究生,主要研究方向:中医内科学风湿临床方向。

Δ通信作者: 张前德, E-mail: zhangqiande@njmu.edu.cn

美国 Applied Biosystems 公司。

1.2 方法

1.2.1 CIA 小鼠模型制备

1.2.1.1 初次免疫

牛 II 型胶原溶于 0.05mol/L 冰醋酸中, 浓度 4mg/mL, 4℃搅拌过夜。次日, 取牛 II 型胶原与等体积完全弗氏佐剂置于冰上乳化。混匀, 使用 1mL 进口螺旋注射器吸取。距小鼠尾根部 1.5~2cm 处的尾巴的皮下注射, 100 μ L/mouse (150 μ g/mouse, 牛 II 型胶原终浓度 1.5 μ g/ μ L)。注意避开静脉。

1.2.1.2 加强免疫

初次免疫后第 21 天: 牛 II 型胶原溶于 0.05mol/L 冰醋酸中, 浓度 3mg/mL, 置于 4℃冰箱搅拌过夜; 牛 II 型胶原与等体积不完全弗氏佐剂冰上乳化, 混匀, 小鼠尾根部 1.5~2cm 处的尾巴的皮下注射, 50 μ L/mouse (75 μ g/mouse, 牛 II 型胶原终浓度 1.5 μ g/ μ L)。

1.2.2 Cel 对 CIA 小鼠的治疗

将 24 只 8 周龄 SPF 级 DBA/1J 雄性小鼠随机分为 3 组, 分别为空白对照组, CIA 组, Cel 组; 给药剂量及途径: 空白对照组不给药, 胶原诱导关节炎组予 PBS, Cel 组予 Cel 0.3mg/kg^[7], 于初次免疫 4 周后开始腹腔注射给药, 连续给药 14d (d29~d42)。于初次免疫后第 43 天 10%水合氯醛麻醉小鼠后眼眶采血, 用于 ELISA 检测。用手术器械尽量刮取双侧膝关节软骨, 置于冻存管中, 液氮冻存, 用于 Real-time-PCR 分析, 另部分置于 Carnoy 液固定 24h 以上, 脱水、包埋、切片后用于 HE 染色。

1.2.3 CIA 小鼠关节 HE 染色

将取下的 CIA 小鼠双侧关节常规脱水、包埋、切片, 按照 HE 染色步骤进行染色。光学显微镜下观察踝关节及足趾关节间隙, 滑膜增生情况, 软骨下骨质破坏程度及炎性细胞浸润情况, 并拍片。

1.2.4 CCK8 法测定 Cel 对骨髓单核细胞活性影响

将 12h 后重悬的骨髓单核细胞接种于 96 孔板中 (0.1mL 培养基), 分别给予不同浓度的 Cel: 5 μ mol/L、2.5 μ mol/L、1 μ mol/L、0.5 μ mol/L、0.25 μ mol/L、0.1 μ mol/L, 每组 5 个复孔, 1d、3d、5d 后再空白对照组和加药组加入 10 μ L CCK8 试剂, 放入培养箱中继续孵育 1h, 用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度。用以测定 Cel 不同浓度对所测细胞活性的影响。

1.2.5 骨髓诱导破骨细胞分化

选用雄性 4 周龄大鼠 4~6 只, 颈椎脱臼处死, 75%乙醇浸泡 2min。在相对无菌条件下剥离双侧股骨和胫骨, 在无菌超净工作台中清除骨周围软组织, 用眼科镊及胶骨剪剪去骨干两端, 以注射器抽取 PBS 冲洗骨髓直至发白, 收集细胞悬液离心后, 用 α -MEM 重悬, 接种至培养皿中, 于 37℃, 5%CO₂ 培养箱中孵育 12h 后收集未贴壁细胞 (单核细胞), 离心, 弃上清, 用 100 μ g/mL M-CSF 的 α -MEM 重悬细胞, 均匀接种 12 孔板中培养 48h 后换用 30 μ g/mL M-CSF+100 μ g/mL RANKL 的 α -MEM 继续培养, 隔天半量换液。按照 CCK8 法的规定结果, 将细胞分为空白对照组及不同浓度的雷公藤红素组进行实验。

1.2.6 ELISA

按照 ELISA 试剂盒说明书检测胶原诱导关节炎小鼠血清中的 CXCL2 表达。

1.2.7 Real-time PCR 检测破骨细胞及 CIA 小鼠中 CXCL2 的相对量表达

将骨髓诱导的破骨细胞分为对照、Cel 0.5 μ mol/L、Cel 0.25 μ mol/L、Cel 0.1 μ mol/L 组, 分别在加入 RANKL 后第 1、3 天, 组分别加入 Trizol 提取 RNA, 另外也将 CIA 小鼠双侧膝关节软骨研磨提取 RNA, TAKARA 公司 RT-reagent 试剂盒反转录为 cDNA。检索美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 数据库数据, 获取 CXCL2 序列, 合成引物, 进行 RT-PCR 检测。

1.2.8 统计分析

所有数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 spss18.0 统计软件进行统计学处理。P<0.05 为差异具有统计学意义, P<0.01 差异具有显著统计学意义。

2 结果

2.1 CCK8 法测定对细胞活性的影响

CCK8 法检测对骨髓单核细胞向破骨细胞分化活性影响, 选用不同浓度的 Cel 进行检测, 结果如图 1: Cel 浓度为 5 μ mol/L、2.5 μ mol/L、1 μ mol/L 时, 细胞出现了不同程度的死亡, 而 Cel 浓度为 0.5 μ mol/L、0.25 μ mol/L 及 0.1 μ mol/L 时, 对细胞活性无影响。所以选用了 0.5 μ mol/L、0.25 μ mol/L、0.1 μ mol/L 组进行实验。

2.2 骨髓诱导破骨细胞 CXCL2 的表达

如图 2 所示: 通过 PCR 检测, 骨髓向破骨细胞分化第 3 天 (加入 RANKL 第 1 天) CXCL2 高水平表达, 第 5、7 天 (加入 RANKL 第 3、5 天) CXCL2 表达升高不明显。

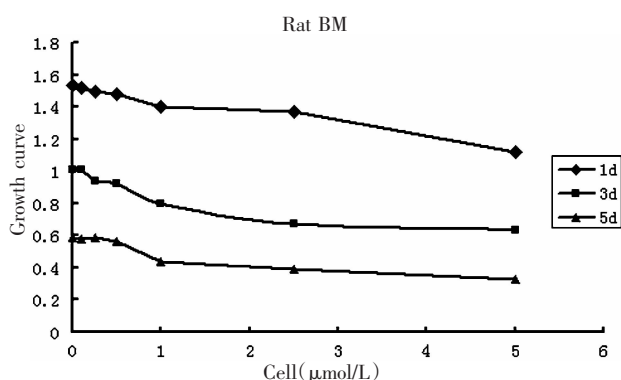


图1 CCK8 法测定对细胞增殖的影响

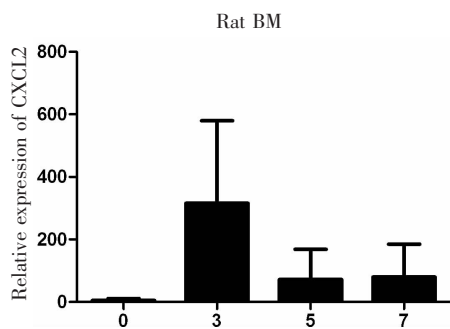


图2 骨髓诱导破骨细胞 CXCL2 的表达

2.3 Cel 对破骨细胞 CXCL2 表达的影响

通过 PCR 检测加入 RANKL 后 24h 及 72h CXCL2 的表达水平,如图 3 结果显示,Cel 能够抑制破骨前体细胞 CXCL2 的表达,且在安全浓度范围内,随着剂量的增加,CXCL2 的表达减少。

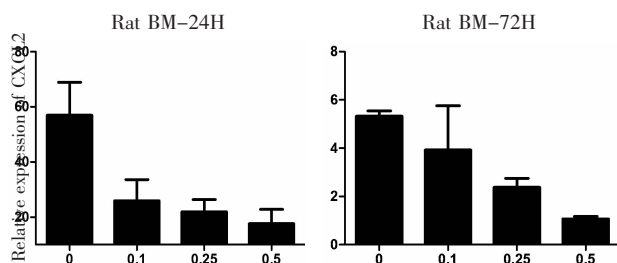


图3 Cel 对破骨细胞 CXCL2 表达的影响

2.4 CIA 小鼠关节 HE 染色

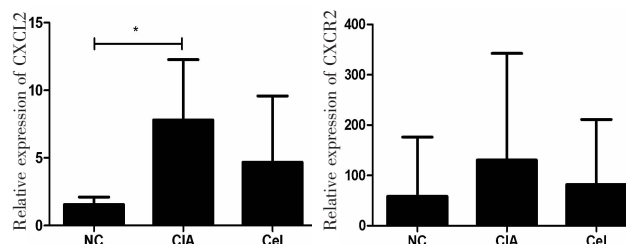
对 CIA 小鼠踝关节进行 HE 染色发现,如图 4 所示:空白对照组小鼠关节及其关节间隙正常,关节软骨无明显破坏,滑膜无明显增生,未见血管翳形成和骨质破坏。CIA 组关节间隙明显变窄,关节明显破坏,滑膜组织增生,关节周围大量炎症细胞浸润。CIA+Cel 组关节间隙稍见狭窄,关节破坏较 CIA 组减少,滑膜增生不明显,关节周围少量炎性细胞浸润。见图 4。



图4 CIA 小鼠关节 HE 染色

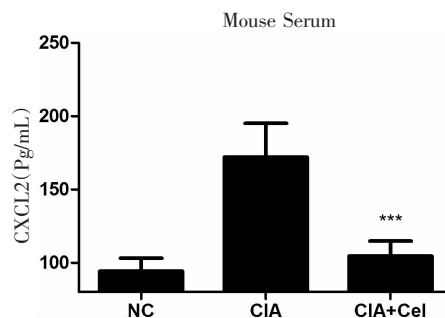
2.5 Cel 对 CIA 小鼠关节 CXCL2 表达的影响

通过 PCR 检测,CIA 小鼠组与空白对照组相比,高表达 CXCL2,差异有统计学意义($P<0.01$),Cel 组 CXCL2 表达较 CIA 组降低。见图 5。

图5 Cel 对 CIA 小鼠关节 CXCL2 及 CXCR2 表达的影响($P<0.01$ CXCL2 表达 NC 与 CIA 组相比较)

2.6 ELISA

通过 ELISA 定量分析 CIA 小鼠的血清中 CXCL2 表达,如图 6 可见:NC 组低表达 CXCL2,CIA 组高表达 CXCL2,而 CIA+Cel 组 CXCL2 表达显著降低($P=0.003$)

图6 ELISA 定量分析 CIA 小鼠的血清中 CXCL2 表达
注:***: $P=0.003$

3 讨论

RA 作为一种会导致关节畸形的自身免疫性疾病,近十年来的临床及实验室研究已反复证实,导致关节畸形的最根本病理过程为受到慢性炎症刺激的滑膜组织,通过促进核因子 κB 受体激活因子配体(RANKL)的表达,加速破骨细胞的激活和分化,从而导致了骨侵蚀的发生。因此,大量实验室及临床研究重点为,通过减轻炎症、抑制 RANKL 表

达,从而减少破骨细胞的形成,阻止骨侵蚀的发生。然而在破骨细胞形成的过程中,众多趋化因子也扮演了重要的角色。

趋化因子根据其 N 端半胱氨酸残基的不同分为 CXC、CC 两个大亚型和 C、CX3C 两小亚型^[8]。新的分类方法将趋化因子视为配体,其家族被分称为 CXCL(CXCL1-CXCL16),CCL(CCL1-CCL28),XCL(XCL1,XCL2)和 CX3CL1^[9],它们由巨噬细胞产生,与受体结合后,在 Th1/Th2 细胞的分化中发挥重要的作用。趋化因子通过与其受体的相互结合发生作用,使靶细胞趋化、迁移,增强靶细胞与内皮细胞的黏附以及靶细胞的形成、分化、凋亡等生理功能^[10]。同时也如炎症反应、病原体感染、创伤的修复、维持组织细胞间的平衡和肿瘤的形成、转移等诸多病理过程中发挥重要作用^[11]。在炎症过程中,趋化因子能趋化促炎细胞在受损部位的浸润及活化来参与炎症反应。在 RA 的慢性滑膜炎炎症过程中,趋化因子参与了细胞活化、细胞粘附、血管生成及组织破坏等免疫机制。已有研究表明,其中 IL-8/CXCL8,ENA-78/CXCL5,gro- α /CXCL1,CTAP-III/CXCL6 和 SDF-1/CXCL12 涉及到 RA 炎症过程^[12-20]。已经被证明一些趋化因子在破骨细胞的形成和分化中起到重要作用(CCL2、CCL3 等)。CXCL2 属于 CXC 趋化因子亚家族成员,Jeongim Ha 等^[21]研究已显示,由 RANKL 诱导的破骨前体细胞表达大量 CXCL2,并能够在破骨细胞的迁移、分化和功能上发挥重要作用。可能通过调节各种细胞间的反应影响破骨细胞形成的早期阶段^[22]。我们的实验也证明了,在诱导破骨细胞形成的过程中加入 RANKL 后的 1 天,CXCL2 的表达最高,而后表达量明显减少。这说明趋化因子的 CXCL2 可能参与破骨形成的早期阶段,而对后期破骨细胞形成影响相对较小。

雷公藤(又叫黄藤、水莽草、断肠草)为卫矛科植物雷公藤的根,味苦、辛,性凉,大毒,归肝、肾经,具有祛风通络、除湿止痛、消肿解毒之功,其主要成分 Cel 具有抗炎、抗肿瘤及免疫抑制等药理作用,临床上常年用于类风湿关节炎、系统性红斑狼疮、肾炎等疾病的治疗。有研究表明 Cel 能减少佐剂性关节炎大鼠关节滑膜 IL-1 及关节 TNF- α 的表达,从而抑制关节肿胀和骨破坏的进展^[23]。在 RA 滑膜成纤维细胞中,也可以通过抑制 NF- κ B 介导的 MMP-9 的表达抑制 IL-17A 诱导的迁移和侵袭^[24]。Cel 能

减轻 CIA 小鼠的骨侵蚀程度,并能够通过抑制炎症和 RANKL 的表达减少破骨细胞的形成 Shivaprasad H 等研究显示,Cel 能下调佐剂诱导关节炎大鼠趋化因子(RANTES、MCP-1、MIP-1 α 和 GRO/KC)及细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 的表达^[25]。但 Cel 对趋化因子的作用研究相对甚少,对于其作用机制尚未明确。我们通过 CIA 小鼠关节 HE 染色观察到,Cel 能够明显减轻关节炎小鼠关节局部的破坏,抑制滑膜增生及炎症细胞的浸润,从而减轻骨侵蚀的严重程度。通过 PCR 及 ELISA 进一步证实了关节炎小鼠中血清及体外培养的破骨前体细胞 CXCL2 均有高表达,也证实小鼠关节中高表达 CXCL2 及 CXCR2,提示 CXCL2 可能通过与其受体 CXCR2 的结合在关节炎的发病过程中发挥重要作用,而 Cel 能够抑制 CIA 小鼠的关节局部、血清及体外诱导破骨细胞形成的过程中 CXCL2 和其受体 CXCR2 的表达,且在相对安全浓度内成剂量依赖性,提示我们 Cel 有可能通过抑制 CXCL2 与其受体的表达影响破骨细胞的形成,减轻关节骨侵蚀的发生。

综上所述,趋化因子 CXCL2 及其受体 CXCR2 在 RA 的发病过程中,尤其是骨侵蚀的发生、发展中具有重要作用,Cel 可以通过抑制 CXCL2 及其受体的表达,直接或间接地抑制炎症细胞对滑膜的浸润、减轻滑膜炎炎症以及破骨细胞的形成,可能成为又一个治疗 RA 骨侵蚀的新方向,并为 Cel 治疗 RA 骨侵蚀提出新的分子机制。

参考文献:

- [1] Szekanecz Z,Kunkel SL,Strieter RM,et al. Chemokines in rheumatoid arthritis [J]. Springer Semin Immunopathol, 1998, 20:115-32.
- [2] Szekanecz Z,Koch AE. Chemokines and angiogenesis [J]. Curr Opin Rheumatol,2001,13:202-208.
- [3] Koch AE,Kunkel SL,Strieter RM. Chemokines in arthritis [J]. Chemokines in disease. Austin:RG Landes Company, 1996:103-116.
- [4] Strieter RM,Polverini PJ,Kunkel SL,et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis[J]. J Biol Chem,1995,270:27348-27357.
- [5] Taub DD. C-C chemokines-an overview [J]. Chemokines in disease. Austin:RG Landes Company,1996:27-54.
- [6] Walz A,Kunkel SL,Strieter RM. C-X-C chemokines-an overview [J]. Chemokines in disease. Austin:RG Landes Company,1996:1-25.

- [7] 冯小可. SOX5、SOX6 在类风湿关节炎中的表达及雷公藤红素对胶原诱导关节炎鼠中 SOX5、SOX6/RANKL 通路的影响[D]. 南京:南京医科大学, 2013:49.
- [8] Bonecchi R, Galliera E, Borroni EM, et al. Chemokines and chemokine receptors: an overview[J]. *Front Biosci*, 2009, 14: 540–551.
- [9] Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity[J]. *Immunity*, 2000, 12: 121–127.
- [10] Bendall L. Chemokines and their receptors in disease[J]. *Histol Histopathol*, 2005, 20: 907–926.
- [11] Le Y, Zhou Y, Iribarren P, et al. Chemokines and Chemokine Receptors: Their Manifold Roles in Homeostasis and Disease[J]. *Cell Mol Immunol*, 2004, 1(2): 95–104.
- [12] Szekanecz Z, Koch AE. Chemokines and angiogenesis. *Curr Opin Rheumatol*, 2001, 13: 202–208.
- [13] Nanki T, Hayashida K, El-Gabalawy HS, et al. Stromal cell-derived factor-1–CXCR4 chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4+ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium [J]. *J Immunol*, 2000, 165: 6590–6598.
- [14] Hogan M, Sherry B, Ritchlin C, et al. Differential expression of the small inducible cytokines $\text{gro}\alpha$ and $\text{gro}\beta$ by synovial fibroblasts in chronic arthritis: possible role in growth regulation[J]. *Cytokine*, 1994, 6: 61–69.
- [15] Koch AE, Kunkel SL, Shah MR, et al. Growth-related gene product α : a chemotactic cytokine for neutrophils in rheumatoid arthritis[J]. *J Immunol*, 1995, 155: 3660–3666.
- [16] Narumi S, Tominaga Y, Tamaru M, et al. Expression of IFN-inducible protein-10 in chronic hepatitis [J]. *J Immunol*, 1997, 158: 5536–5544.
- [17] Wooley PH, Schaefer C, Whalen JD, et al. A peptide sequence from platelet factor 4 (CT-112) is effective in the treatment of type II collagen-induced arthritis in mice[J]. *J Rheumatol*, 1997, 24: 890–898.
- [18] Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, et al. Epithelial neutrophil activating peptide-78: a novel chemotactic cytokine for neutrophils in arthritis [J]. *J Clin Invest*, 1994, 94: 1012–1018.
- [19] Koch AE, Kunkel SL, Burrows JC, et al. Synovial tissue macrophage as a source of the chemotactic cytokine IL-8 [J]. *J Immunol*, 1991, 147: 2187–2195.
- [20] Buckley CD, Amft N, Bradfield PF, et al. Persistent induction of the chemokine receptor CXCR4 by TGF- β 1 on synovial T cells contributes to their accumulation within the rheumatoid synovium[J]. *J Immunol*, 2000, 165: 3423–3429.
- [21] Jeongim Ha, Hyo-Sun Choi, Youngkyun Lee, et al. CXCL2 Chemokine Ligand 2 Induced by Receptor Activator of NF- κ B Ligand Enhances Osteoclastogenesis[J]. *J Immunol*, 2010, 184: 4717–4724.
- [22] Zoltán Szekanecz, Joon Kim, Alisa E. Koch. Chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis [J]. *Seminars in Immunology*, 2003, 15: 15–21.
- [23] Hong Li, Yun-Yi Zhang, Hui-Wen Tan, et al. Therapeutic effect of tripterine on adjuvant arthritis in rats [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2008, 118: 479–484.
- [24] Guo-qing Li, Yu Zhang, Dan Liu, et al. Celestrol inhibits interleukin-17A-stimulated rheumatoid fibroblast-like synoviocyte migration and invasion through suppression of NF- κ B-mediated matrix metalloproteinase-9 expression[J]. *International Immunopharmacology*, 2012, 14(4): 422–431.
- [25] Shivaprasad H. Venkatesha, Brian Astry, Siddaraju M, et al. Suppression of autoimmune arthritis by Celestrol through modulation of pro-inflammatory chemokines [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2012, 20: 5229–5234.

(编辑:岳胜难)

The Effect of Celestrol on Chemokine CXCL2 in Osteoclast and CIA Mice

PENG Liu-ying¹, QIAN Chen², TAN Wen-feng³, FENG Xiao-ke², ZHANG Qian-de²

(1. The First Medical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

2. Graduate Institution of Integrated Medicine of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China;

3. The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the effect of celestrol on reducing osteoclast formation in rat bone marrow culture and occurrence of local inflammation and bone erosion in Collagen-induced arthritis(CIA) mice by inhibiting the expression of chemokine CXCL2. **Methods** CIA models of mice were randomly divided into three groups: control group, arthritis group and celestrol group, observing the inflammation by pathological staining technique, detecting the changes of CXCL2 expression in local joints and blood serum by real-time fluorescence quantitative PCR and ELISA. Osteoclast was induced by bone marrow in rat in which celestrol of different concentration was added in vivo test, detecting the changes of CXCL2 expression by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** High CXCL2 expression in pre-osteoclast and CIA mice was observed. And celestrol can inhibit its expression in dose-dependent manner. **Conclusion** Cel may inhibit the expression of chemotactic factor CXCL2 and inflammatory cells from invading the organization, thus reducing the tissue destruction.

KEY WORDS: Celestrol; osteoclast; rheumatoid arthritis; chemokine