

## · 基础研究 ·

## 薯蓣皂苷元改善类风湿关节炎模型大鼠关节肿胀的效果及作用机制研究

张华燕, 何援军

(浙江衢化医院, 浙江 衢州 324004)

**摘要 目的:**探讨薯蓣皂苷元改善类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)模型大鼠关节肿胀的效果及可能的作用机制。**方法:**从 70 只 6 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠中随机选取 55 只, 建立Ⅱ型胶原诱导的 RA 大鼠模型, 剩余 15 只纳入空白组。将造模成功的 48 只大鼠随机分为模型组、激活剂组和薯蓣皂苷元组, 每组各 16 只。薯蓣皂苷元组以薯蓣皂苷元干预, 激活剂组以尼日利亚菌素钠盐干预, 空白组、模型组仅给予生理盐水。每天干预 1 次, 共干预 2 周。干预结束后, 采用关节炎指数评定各组大鼠的关节肿胀情况, 检测外周血炎症因子[白细胞介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )]和氧化应激因子[丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)]含量, 取大鼠关节滑膜组织 HE 染色后进行病理学观察, 并测定大鼠滑膜组织中 Nod 样受体蛋白 3(Nod-like receptor protein 3, NLRP3)炎性体信号通路相关蛋白[IL-1 $\beta$ 、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1(Caspase-1)及 NLRP3]含量。**结果:**①关节肿胀情况。模型组、激活剂组及薯蓣皂苷元组大鼠的关节炎指数比较, 差异有统计学意义[(3.43 $\pm$ 0.32)分, (2.44 $\pm$ 0.20)分, (0.86 $\pm$ 0.10)分,  $F=14.974$ ,  $P=0.000$ ]。激活剂组和薯蓣皂苷元组的关节炎指数均低于模型组( $P=0.001$ ,  $P=0.000$ ), 薯蓣皂苷元组的关节炎指数低于激活剂组( $P=0.000$ )。②外周血炎症因子含量。空白组、模型组、激活剂组及薯蓣皂苷元组大鼠的血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 含量比较, 组间差异均有统计学意义[IL-1 $\beta$ : (128.82 $\pm$ 13.71) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , (279.44 $\pm$ 28.21) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , (213.12 $\pm$ 20.65) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , (176.76 $\pm$ 19.25) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $F=36.554$ ,  $P=0.000$ ; IL-6: (119.56 $\pm$ 12.42) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , (271.18 $\pm$ 27.11) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , (198.43 $\pm$ 21.36) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , (146.85 $\pm$ 15.72) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $F=28.643$ ,  $P=0.000$ ; TNF- $\alpha$ : (203.63 $\pm$ 22.08) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , (328.91 $\pm$ 36.22) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , (275.88 $\pm$ 27.52) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , (237.89 $\pm$ 23.12) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $F=41.832$ ,  $P=0.000$ ]。模型组、激活剂组及薯蓣皂苷元组的血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 含量均高于空白组(IL-1 $\beta$ :  $P=0.001$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.002$ ; IL-6:  $P=0.001$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.016$ ; TNF- $\alpha$ :  $P=0.000$ ,  $P=0.002$ ,  $P=0.043$ ); 激活剂组和薯蓣皂苷元组的血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 含量均低于模型组(IL-1 $\beta$ :  $P=0.003$ ,  $P=0.000$ ; IL-6:  $P=0.002$ ,  $P=0.000$ ; TNF- $\alpha$ :  $P=0.031$ ,  $P=0.001$ ); 薯蓣皂苷元组的血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 含量均低于激活剂组( $P=0.021$ ,  $P=0.002$ ,  $P=0.046$ )。③外周血氧化应激因子含量。空白组、模型组、激活剂组及薯蓣皂苷元组大鼠的血浆 MDA、SOD、GSH 含量比较, 组间差异均有统计学意义[MDA: (10.24 $\pm$ 1.87) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , (36.51 $\pm$ 3.63) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , (21.33 $\pm$ 2.42) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , (16.37 $\pm$ 1.85) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $F=15.632$ ,  $P=0.000$ ; SOD: (145.52 $\pm$ 14.72)U $\cdot\text{mL}^{-1}$ , (40.41 $\pm$ 6.96)U $\cdot\text{mL}^{-1}$ , (79.42 $\pm$ 8.32)U $\cdot\text{mL}^{-1}$ , (106.12 $\pm$ 10.22)U $\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $F=21.334$ ,  $P=0.000$ ; GSH: (38.54 $\pm$ 3.82)U $\cdot\text{mL}^{-1}$ , (14.77 $\pm$ 2.12)U $\cdot\text{mL}^{-1}$ , (21.63 $\pm$ 2.19)U $\cdot\text{mL}^{-1}$ , (28.63 $\pm$ 2.97)U $\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $F=13.213$ ,  $P=0.000$ ]。模型组、激活剂组及薯蓣皂苷元组的血浆 MDA 含量均高于空白组( $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.001$ ), 血浆 SOD、GSH 含量均低于空白组(SOD:  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.001$ ; GSH:  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.002$ ); 激活剂组及薯蓣皂苷元组的血浆 MDA 含量均低于模型组( $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ), 血浆 SOD、GSH 含量均高于模型组(SOD:  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ; GSH:  $P=0.001$ ,  $P=0.000$ ); 激活剂组的血浆 MDA 含量高于薯蓣皂苷元组( $P=0.007$ ), 血浆 SOD、GSH 含量均低于薯蓣皂苷元组( $P=0.002$ ,  $P=0.003$ )。④滑膜组织病理学观察结果。空白组关节滑膜组织结构、形态正常; 模型组关节滑膜组织有炎性细胞浸润, 滑膜细胞增生, 血管扩张, 形成血栓; 激活剂组关节滑膜组织病理变化较模型组改善, 但有轻微滑膜细胞增生; 薯蓣皂苷元组关节滑膜组织病理变化明显改善。⑤滑膜组织 NLRP3 炎性体信号通路相关蛋白含量。空白组、模型组、激活剂组及薯蓣皂苷元组大鼠关节滑膜组织 IL-1 $\beta$ 、Caspase-1、NLRP3 含量比较, 组间差异均有统计学意义(IL-1 $\beta$ : 0.46 $\pm$ 0.07, 1.02 $\pm$ 0.10, 0.72 $\pm$ 0.08, 0.56 $\pm$ 0.06,  $F=31.025$ ,  $P=0.000$ ; Caspase-1: 0.54 $\pm$ 0.08, 1.16 $\pm$ 0.12, 0.90 $\pm$ 0.10, 0.73 $\pm$ 0.08,  $F=23.658$ ,  $P=0.000$ ; NLRP3: 0.69 $\pm$ 0.08, 1.27 $\pm$ 0.12, 1.01 $\pm$ 0.11, 0.88 $\pm$ 0.09,  $F=28.754$ ,  $P=0.000$ ); 模型组、激活剂组及薯蓣皂苷元组滑膜组织 IL-1 $\beta$ 、Caspase-1、NLRP3 含量均高于空白组(IL-1 $\beta$ :  $P=0.000$ ,  $P=0.001$ ,  $P=0.042$ ; Caspase-1:  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.006$ ;

基金项目: 2018 年度衢州市科技计划指导性项目(第二批)(2018127)

通讯作者: 张华燕 E-mail: Dsbz1122@163.com

NLRP3;  $P=0.000, P=0.001, P=0.013$ ); 激活剂组和薯蓣皂苷元组的 IL-1 $\beta$ 、Caspase-1、NLRP3 含量均低于模型组 (IL-1 $\beta$ :  $P=0.001, P=0.000$ ; Caspase-1:  $P=0.006, P=0.000$ ; NLRP3:  $P=0.007, P=0.000$ ); 薯蓣皂苷元组的 IL-1 $\beta$ 、Caspase-1、NLRP3 含量均低于激活剂组 ( $P=0.007, P=0.018, P=0.046$ )。结论: 薯蓣皂苷元能有效改善 RA 模型大鼠的关节肿胀, 其作用机制可能是通过下调 IL-1 $\beta$ 、Caspase-1、NLRP3 的表达, 抑制 NLRP3 炎性体信号通路介导的炎症反应。

**关键词** 关节炎; 类风湿; 薯蓣皂苷元; Nod 样受体蛋白 3 炎性体; 动物实验; 大鼠, Sprague-Dawley

## Efficacy and mechanism of diosgenin against joint swelling in rat models with rheumatoid arthritis

ZHANG Huayan, HE Yuanjun

Zhejiang Quhua Hospital, Quzhou 324004, Zhejiang, China

**ABSTRACT Objective:** To explore the efficacy of diosgenin against joint swelling in rat models with rheumatoid arthritis (RA) and its possible mechanism. **Methods:** From the 70 6-week-old SPF-grade male Sprague-Dawley (SD) rats, 55 rats were randomly selected and intracutaneously injected with type II collagen for inducing RA, and the remaining 15 rats were classified into blank group. The successfully modeled 48 rats were then randomly assigned to model group, activator group and diosgenin group, 16 rats in each group. The rats in diosgenin group were treated with diosgenin, the ones in activator group with nigericin sodium salt, and the ones in blank group and model group with normal saline (NS), once a day for consecutive two weeks. After the end of intervention, the joint swelling of rats in each group was evaluated based on the arthritis index (AI). The levels of inflammatory cytokines including interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and oxidative stress (OS) inducers including malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) in peripheral blood were detected. The synovial tissues of rat joints were stained with hematoxylin-eosin (HE) for pathological observation, followed by the determination of the expression levels of related proteins including IL-1 $\beta$ , cysteinyl aspartate-specific protease-1 (Caspase-1) and Nod-like receptor protein 3 (NLRP3) in the NLRP3 inflammasome signaling pathway. **Results:** The difference in AI scores among model group, activator group and diosgenin group was statistically significant ( $3.43 \pm 0.32, 2.44 \pm 0.20, 0.86 \pm 0.10$  points,  $F=14.974, P=0.000$ ). The AI scores of activator group and diosgenin group were lower than that of model group ( $P=0.001, P=0.000$ ), and that in diosgenin group was even lower ( $P=0.000$ ). The comparison of serum IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  levels of rats among blank group, model group, activator group and diosgenin group revealed significant differences (IL-1 $\beta$ :  $128.82 \pm 13.71, 279.44 \pm 28.21, 213.12 \pm 20.65, 176.76 \pm 19.25$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $F=36.554, P=0.000$ ; IL-6:  $119.56 \pm 12.42, 271.18 \pm 27.11, 198.43 \pm 21.36, 146.85 \pm 15.72$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $F=28.643, P=0.000$ ; TNF- $\alpha$ :  $203.63 \pm 22.08, 328.91 \pm 36.22, 275.88 \pm 27.52, 237.89 \pm 23.12$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $F=41.832, P=0.000$ ). The serum IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  levels in model group, activator group and diosgenin group were all higher than those in blank group (IL-1 $\beta$ :  $P=0.001, P=0.000, P=0.002$ ; IL-6:  $P=0.001, P=0.000, P=0.016$ ; TNF- $\alpha$ :  $P=0.000, P=0.002, P=0.043$ ). The serum IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  levels in activator group and diosgenin group were reduced as compared with those in model group (IL-1 $\beta$ :  $P=0.003, P=0.000$ ; IL-6:  $P=0.002, P=0.000$ ; TNF- $\alpha$ :  $P=0.031, P=0.001$ ), with the lowest levels detected in diosgenin group ( $P=0.021, P=0.002, P=0.046$ ). There were statistically significant differences in plasma MDA, SOD and GSH levels among the blank group, model group, activator group and diosgenin group (MDA:  $10.24 \pm 1.87, 36.51 \pm 3.63, 21.33 \pm 2.42, 16.37 \pm 1.85$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $F=15.632, P=0.000$ ; SOD:  $145.52 \pm 14.72, 40.41 \pm 6.96, 79.42 \pm 8.32, 106.12 \pm 10.22$  U/mL,  $F=21.334, P=0.000$ ; GSH:  $38.54 \pm 3.82, 14.77 \pm 2.12, 21.63 \pm 2.19, 28.63 \pm 2.97$  U/mL,  $F=13.213, P=0.000$ ). The comparison with blank group showed that the plasma MDA levels of model group, activator group and diosgenin group were elevated ( $P=0.000, P=0.000, P=0.001$ ), while the plasma SOD and GSH levels declined (SOD:  $P=0.000, P=0.000, P=0.001$ ; GSH:  $P=0.000, P=0.000, P=0.002$ ). The plasma MDA levels decreased, whereas the plasma SOD and GSH levels increased in activator group and diosgenin group in contrast to that in model group (MDA:  $P=0.000, P=0.000$ ; SOD:  $P=0.000, P=0.000$ ; GSH:  $P=0.001, P=0.000$ ). The plasma MDA level was higher, while the plasma SOD and GSH levels were lower in activator group than that in diosgenin group ( $P=0.007; P=0.002, P=0.003$ ). The pathological findings demonstrated that the synovial tissues of rat joint in the blank group was normal in structure and morphology. However, the inflammatory cell infiltration, synovial cell proliferation, vasodilatation and thrombosis were presented in synovial tissues of model group. The pathological changes in activator group were milder than those in model group, manifested as slight synovial cell proliferation. The improvements of pathological changes in diosgenin group were more obvious. The blank group, model group, activator group and diosgenin group differed from each other significantly in the levels of IL-1 $\beta$ , Caspase-1 and NLRP3 in synovial tissues of rat joints (IL-1 $\beta$ :  $0.46 \pm 0.07, 1.02 \pm 0.10, 0.72 \pm 0.08, 0.56 \pm 0.06$ ,  $F=31.025, P=0.000$ ; Caspase-

1:  $0.54 \pm 0.08$ ,  $1.16 \pm 0.12$ ,  $0.90 \pm 0.10$ ,  $0.73 \pm 0.08$ ,  $F = 23.658$ ,  $P = 0.000$ ; NLRP3:  $0.69 \pm 0.08$ ,  $1.27 \pm 0.12$ ,  $1.01 \pm 0.11$ ,  $0.88 \pm 0.09$ ,  $F = 28.754$ ,  $P = 0.000$ ). The levels of IL-1 $\beta$ , Caspase-1 and NLRP3 in model group, activator group and diosgenin group were higher than those in blank group (IL-1 $\beta$ :  $P = 0.000$ ,  $P = 0.001$ ,  $P = 0.042$ ; Caspase-1:  $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.006$ ; NLRP3:  $P = 0.000$ ,  $P = 0.001$ ,  $P = 0.013$ ). The levels of IL-1 $\beta$ , Caspase-1 and NLRP3 in activator group and diosgenin group were lower as compared with those in model group (IL-1 $\beta$ :  $P = 0.001$ ,  $P = 0.000$ ; Caspase-1:  $P = 0.006$ ,  $P = 0.000$ ; NLRP3:  $P = 0.007$ ,  $P = 0.000$ ), with the lowest levels detected in diosgenin group ( $P = 0.007$ ,  $P = 0.018$ ,  $P = 0.046$ ). **Conclusion:** Diosgenin can effectively relieve joint swelling in rat models with RA possibly by down-regulating the levels of IL-1 $\beta$ , Caspase-1 and NLRP3 and inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory responses.

**Keywords** arthritis, rheumatoid; diosgenin; Nod-like receptor protein 3 inflammasome; animal experimentation; rats, Sprague-Dawley

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是以炎性细胞浸润为特征, 导致滑膜、关节软骨及骨退变的一种慢性全身性自身免疫性疾病<sup>[1]</sup>, 具有发病率高、病程长、难治愈、致残率高的特点, 10% 的患者会在数年内丧失劳动力<sup>[2-3]</sup>。RA 早期表现为关节游走性疼痛及功能障碍, 晚期则表现为关节僵硬与畸形<sup>[4]</sup>。由于 RA 的病因与发病机制尚不明确, 而抗生素类药物在本病治疗中效果有限, 并存在一定不良反应, 因此寻找更加安全有效的治疗方法具有重要的价值。薯蓣皂苷元为穿山龙的根茎提取物, 是穿山龙总皂苷的主要成分, 具有舒筋活络、祛风止痛的功效<sup>[5]</sup>。现代医学研究显示, 薯蓣皂苷元能够减轻炎症反应<sup>[6-9]</sup>。为探讨薯蓣皂苷元对于 RA 关节肿胀的改善效果及作用机制, 我们进行了动物实验, 现总结报告如下。

## 1 材料与仪器

**1.1 实验动物** 6 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 70 只, 体质量 180 ~ 200 g, 由上海南方模式生物科技股份有限公司提供, 实验动物生产许可号: SCXK(沪)2019-0002。在温度 23 ~ 25 °C、湿度 60% ~ 65% 环境中, 昼夜 12 h 交替适应性饲养。实验方案通过医学动物实验伦理委员会批准。

**1.2 主要试剂** 薯蓣皂苷元 (北京索莱宝科技有限公司, 纯度  $\geq 98\%$ ), 鸡源性 II 型胶原 (Sigma-Aldrich 公司), Nod 样受体蛋白 3 (Nod-like receptor protein 3, NLRP3) 炎性体通路激活剂尼日利亚菌素钠盐 (西安乐森生物科技有限公司), 甲醇、氯仿 (郑州建祥化工产品有限公司), 兔抗鼠白细胞介素 (interleukin, IL)-1 $\beta$ 、NLRP3 单克隆抗体、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1 (Caspase-1) 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 (Abcam 公司), IL-1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 检测试剂盒 (上海恒远生物公

司), 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒 (武汉赛培生物科技有限公司), 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒 (江苏凯基生物技术股份有限公司)。

**1.3 实验仪器** ST-360 酶标仪 (上海科华生物股份有限公司), WMS-1030 生物显微镜 (上海豫光仪器有限公司)。

## 2 方法

**2.1 造模及分组** 从 70 只大鼠中随机选取 55 只, 按照李立萍等<sup>[10]</sup>的方法建立 II 型胶原诱导的 RA 大鼠模型。具体方法如下: 按照  $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  腹腔注射 3% 戊巴比妥钠麻醉大鼠后, 在右后足跖皮内注射  $100 \mu\text{L}$  II 型胶原乳剂 (鸡源性 II 型胶原溶于  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酸中, 使终浓度为  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 与等体积弗氏完全佐剂冰浴混合, 充分乳化制成); 1 周后, 在右后肢注射  $100 \mu\text{L}$  II 型胶原乳剂加强免疫 1 次。剩余 15 只纳入空白组, 先给予等量  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酸, 1 周后仍给予等量  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酸。4 周后, 由 2 名实验人员观察大鼠的关节肿胀程度, 依据文献<sup>[11]</sup>进行关节炎指数评定: 无关节炎为 0 分; 个别足趾及足底肿胀为 1 分; 大部分足趾及足底肿胀为 2 分; 踝关节及以下肿胀为 3 分; 肿胀累及踝关节以上, 不能负重为 4 分。取 2 名实验人员评定的平均值作为最终评定结果, 评分  $\geq 2$  分判定为造模成功。

将造模成功的 48 只大鼠随机分为模型组、薯蓣皂苷元组、激活剂组, 每组 16 只。造模成功后 2 d, 薯蓣皂苷元组按  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  腹腔注射薯蓣皂苷元 (薯蓣皂苷元溶于甲醇, 用生理盐水稀释至甲醇体积分数为 5%), 空白组、模型组及激活剂组注射等量含 5% 甲醇的生理盐水。1 h 后激活剂组按  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  腹腔注射尼日利亚菌素钠盐 [尼日利亚菌素钠盐溶于二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO), 用生理盐水稀

释至 DMSO 体积分数为 5%], 薯蓣皂苷元组、空白组、模型组注射等量含 5% DMSO 的生理盐水。每天干预 1 次, 共干预 2 周。

**2.2 实验指标测定** 干预 2 周后, 先对各组大鼠进行关节炎指数评定, 然后将各组大鼠麻醉后自腹腔静脉取血 5 mL, 干燥管和抗凝管中各保存 2.5 mL, 以  $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min (离心半径 8 cm), 分别从干燥管和抗凝管中提取上清液, 即为血清和血浆, 于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存, 用于炎症因子和氧化应激因子含量检测。

采血后, 在各组大鼠右后肢踝关节正中做纵切口, 分离肌肉, 继续分离可见平滑光亮的滑膜组织, 用手术刀分离关节囊的滑膜层和纤维层, 取出滑膜层组织。一部分 HE 染色后进行滑膜组织病理学观察, 另一部分 ( $-80^{\circ}\text{C}$  保存) 以 Western Blot 法检测滑膜组织 NLRP3 炎性体信号通路相关蛋白含量。

**2.2.1 关节肿胀情况评定** 采用关节炎指数<sup>[11]</sup>评定各组大鼠右后肢的肿胀情况。

**2.2.2 外周血炎症因子含量测定** 取  $-20^{\circ}\text{C}$  保存的血清, 室温下解冻, 用 ELISA 试剂盒测定 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  含量。按照 ELISA 试剂盒说明书加样, 用全自动酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 (A 值), 通过绘制标准曲线得出 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  含量。

**2.2.3 外周血氧化应激因子含量测定** 取保存在  $-20^{\circ}\text{C}$  的血浆, 室温下解冻, 分别测定其中 MDA、SOD、GSH 的含量, 均按照对应试剂盒说明书加样。以硫代巴比妥酸法测定并计算 MDA 含量, 以嘌呤氧化酶法测定并计算 SOD 含量, 以 ELISA 法测定并计算 GSH 含量。

**2.2.4 滑膜组织病理学观察** 用于组织病理学观察的滑膜组织样品, 用 10% 甲醛固定 36 h, 经流水冲洗、9% 硝酸脱钙、闭光过夜、梯度乙醇脱水 (低浓度到高浓度)、二甲苯透明处理后, 置于已溶化的石蜡中包埋、切片, 切片厚度 5  $\mu\text{m}$ 。将切片于热水中烫平, 贴于载玻片上, 在  $45^{\circ}\text{C}$  恒温箱烘干。二甲苯、梯度乙醇脱蜡至水 (高浓度到低浓度), 蒸馏水浸泡片刻, 苏木精水溶液染色 5 min, 酸水及氨水中分色, 各 5 s。流水冲洗 1 h 后入蒸馏水片刻。在 70%、90% 乙醇中各脱水 10 min。酒精伊红染色液染色 3 min, 再经无水乙醇脱水、二甲苯透明、树胶封片后, 在显微镜观察。

**2.2.5 滑膜组织 NLRP3 炎性体信号通路相关蛋白含量测定** 取  $-80^{\circ}\text{C}$  保存的关节滑膜组织, 液氮速冻研磨后加入蛋白提取裂解液, 冰上裂解、离心后取上清液。加入 SDS 上样缓冲液,  $95^{\circ}\text{C}$  水浴使蛋白变性, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 电转至聚偏二氟乙烯膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h; 洗膜后加入 1:1000 稀释的 IL-1 $\beta$ 、Caspase-1 及 NLRP3 一抗,  $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜; 洗膜后加入 1:4000 辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 1 h, 洗膜后加入 ECL 发光液显影。采用 Image J 软件分析图像, 以  $\beta$ -actin 为内参, IL-1 $\beta$ 、Caspase-1 及 NLRP3 相对表达量用蛋白条带灰度值/ $\beta$ -actin 蛋白条带灰度值表示。

**2.3 数据统计方法** 采用 SPSS24.0 软件进行数据统计分析。各组大鼠的关节炎指数、外周血炎症因子含量、外周血氧化应激因子含量、滑膜组织 NLRP3 炎性体信号通路相关蛋白含量的组间总体比较均采用单因素方差分析, 组间两两比较均采用 LSD- $t$  检验。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

### 3 结果

**3.1 关节肿胀情况评定结果** 各组大鼠的关节炎指数比较, 差异有统计学意义。激活剂组和薯蓣皂苷元组的关节炎指数均低于模型组 ( $P=0.001$ ,  $P=0.000$ ), 薯蓣皂苷元组的关节炎指数低于激活剂组 ( $P=0.000$ )。见表 1。

**3.2 外周血炎症因子含量测定结果** 各组大鼠的血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  含量比较, 组间差异均有统计学意义。模型组、激活剂组及薯蓣皂苷元组的血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  含量均高于空白组 (IL-1 $\beta$ :  $P=0.001$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.002$ ; IL-6:  $P=0.001$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.016$ ; TNF- $\alpha$ :  $P=0.000$ ,  $P=0.002$ ,  $P=0.043$ ); 激活剂组和薯蓣皂苷元组的血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  含量均低于模型组 (IL-1 $\beta$ :  $P=0.003$ ,  $P=0.000$ ; IL-6:  $P=0.002$ ,  $P=0.000$ ; TNF- $\alpha$ :  $P=0.031$ ,  $P=0.001$ ); 薯蓣皂苷元组的血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  含量均低于激活剂组 ( $P=0.021$ ,  $P=0.002$ ,  $P=0.046$ )。见表 1。

**3.3 外周血氧化应激因子含量测定结果** 各组大鼠的血浆 MDA、SOD、GSH 含量比较, 组间差异均有统计学意义。模型组、激活剂组及薯蓣皂苷元组的血浆 MDA 含量均高于空白组 ( $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.001$ ), 血浆 SOD、GSH 含量均低于空白组 (SOD:

$P=0.000, P=0.000, P=0.001$ ; GSH:  $P=0.000, P=0.000, P=0.002$ ); 激活剂组及薯蓣皂苷元组的血浆 MDA 含量均低于模型组 ( $P=0.000, P=0.000$ ), 血浆 SOD、GSH 含量均高于模型组 (SOD:  $P=0.000, P=0.000$ ; GSH:  $P=0.001, P=0.000$ ); 激活剂组的血浆 MDA 含量高于薯蓣皂苷元组 ( $P=0.007$ ), 血浆 SOD、GSH 含量均低于薯蓣皂苷元组 ( $P=0.002, P=0.003$ )。见表 1。

**3.4 滑膜组织病理学观察结果** 空白组关节滑膜组织结构、形态正常; 模型组关节滑膜组织有炎性细胞浸润, 滑膜细胞增生, 血管扩张, 形成血栓; 激活剂组关节滑膜组织病理变化较模型组改善, 但有轻微滑膜细胞增生; 薯蓣皂苷元组关节滑膜组织病理变化明显改善。见图 1。

**3.5 滑膜组织 NLRP3 炎性体信号通路相关蛋白含量测定结果** 各组大鼠关节滑膜组织 IL-1 $\beta$ 、

Caspase-1、NLRP3 含量比较, 组间差异均有统计学意义; 模型组、激活剂组及薯蓣皂苷元组滑膜组织 IL-1 $\beta$ 、Caspase-1、NLRP3 含量均高于空白组 (IL-1 $\beta$ :  $P=0.000, P=0.001, P=0.042$ ; Caspase-1:  $P=0.000, P=0.000, P=0.006$ ; NLRP3:  $P=0.000, P=0.001, P=0.013$ ); 激活剂组和薯蓣皂苷元组的 IL-1 $\beta$ 、Caspase-1、NLRP3 含量均低于模型组 (IL-1 $\beta$ :  $P=0.001, P=0.000$ ; Caspase-1:  $P=0.006, P=0.000$ ; NLRP3:  $P=0.007, P=0.000$ ); 薯蓣皂苷元组的 IL-1 $\beta$ 、Caspase-1、NLRP3 含量均低于激活剂组 ( $P=0.007, P=0.018, P=0.046$ )。见表 2、图 2。

## 4 讨论

RA 的病因以及发病机制比较复杂, 至今仍未完全明确, 但一般认为是因某种未知的外来抗原作用于有易感基因的个体, 机体对外来抗原出现免疫反应的同时, 通过分子模拟或诱导自身免疫耐受的破坏而引

表 1 各组大鼠关节炎指数、外周血炎症因子及氧化应激因子含量

组别	样本量/只	关节炎指数/ ( $\bar{x} \pm s$ , 分)	血清 IL-1 $\beta$ <sup>1)</sup> 含量/ ( $\bar{x} \pm s$ , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	血清 IL-6 <sup>2)</sup> 含量/ ( $\bar{x} \pm s$ , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
空白组	15		128.82 $\pm$ 13.71	119.56 $\pm$ 12.42
模型组	16	3.43 $\pm$ 0.32	279.44 $\pm$ 28.21	271.18 $\pm$ 27.11
激活剂组	16	2.44 $\pm$ 0.20	213.12 $\pm$ 20.65	198.43 $\pm$ 21.36
薯蓣皂苷元组	16	0.86 $\pm$ 0.10	176.76 $\pm$ 19.25	146.85 $\pm$ 15.72
<i>F</i> 值		14.974	36.554	28.643
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

组别	血清 TNF- $\alpha$ <sup>3)</sup> 含量/ ( $\bar{x} \pm s$ , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	血浆 MDA <sup>4)</sup> 含量/ ( $\bar{x} \pm s$ , $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	血浆 SOD <sup>5)</sup> 含量/ ( $\bar{x} \pm s$ , $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	血浆 GSH <sup>6)</sup> 含量/ ( $\bar{x} \pm s$ , $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
空白组	203.63 $\pm$ 22.08	10.24 $\pm$ 1.87	145.52 $\pm$ 14.72	38.54 $\pm$ 3.82
模型组	328.91 $\pm$ 36.22	36.51 $\pm$ 3.63	40.41 $\pm$ 6.96	14.77 $\pm$ 2.12
激活剂组	275.88 $\pm$ 27.52	21.33 $\pm$ 2.42	79.42 $\pm$ 8.32	21.63 $\pm$ 2.19
薯蓣皂苷元组	237.89 $\pm$ 23.12	16.37 $\pm$ 1.85	106.12 $\pm$ 10.22	28.63 $\pm$ 2.97
<i>F</i> 值	41.832	15.632	21.334	13.213
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000

1) 白细胞介素-1 $\beta$ ; 2) 白细胞介素-6; 3) 肿瘤坏死因子; 4) 丙二醛; 5) 超氧化物歧化酶; 6) 谷胱甘肽。

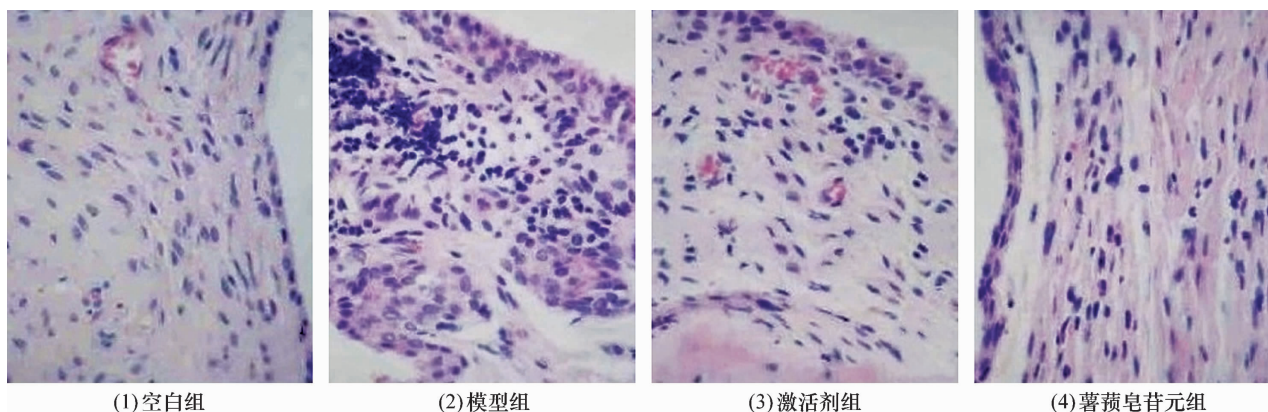


图 1 各组大鼠膝关节滑膜组织 HE 染色图片 ( $\times 200$ )

表 2 各组大鼠关节滑膜组织 IL-1 $\beta$ 、Caspase-1、NLRP3 含量

组别	样本量/只	IL-1 $\beta$ <sup>1)</sup> 含量 ( $\bar{x} \pm s$ )	Caspase-1 <sup>2)</sup> 含量 ( $\bar{x} \pm s$ )	NLRP3 <sup>3)</sup> 含量 ( $\bar{x} \pm s$ )
空白组	15	0.46 $\pm$ 0.07	0.54 $\pm$ 0.08	0.69 $\pm$ 0.08
模型组	16	1.02 $\pm$ 0.10	1.16 $\pm$ 0.12	1.27 $\pm$ 0.12
激活剂组	16	0.72 $\pm$ 0.08	0.90 $\pm$ 0.10	1.01 $\pm$ 0.11
薯蓣皂苷元组	16	0.56 $\pm$ 0.06	0.73 $\pm$ 0.08	0.88 $\pm$ 0.09
F 值		31.025	23.658	28.754
P 值		0.000	0.000	0.000

1) 白细胞介素-1 $\beta$ ; 2) 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1; 3) Nod 样受体蛋白 3。

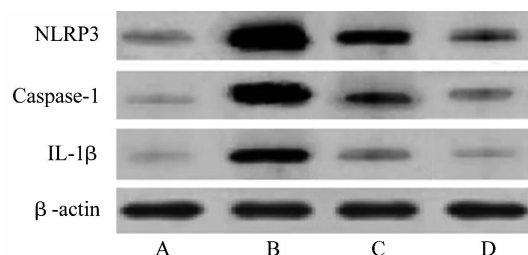


图 2 各组大鼠滑膜组织 IL-1 $\beta$ 、Caspase-1、NLRP3 含量 Western Blot 法检测结果

注: NLRP3 为 Nod 样受体蛋白 3, IL-1 $\beta$  为白细胞介素 1 $\beta$ , Caspase-1 为半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1; A 为空白组, B 为模型组, C 为激活剂组, D 为薯蓣皂苷元组。

起自身免疫反应<sup>[12-13]</sup>。目前治疗 RA 的药物主要有非甾体抗炎药、慢作用抗风湿药和免疫抑制剂, 这类药物虽能较好地控制临床症状, 但不能有效防止骨侵蚀<sup>[14-15]</sup>。近年来, 中医药在治疗 RA 方面已显现出一定的优势, 并受到了国内外学术界的青睐。

现代医学研究证明, 穿山龙的有效成分甾体皂苷能改善免疫功能, 发挥调节免疫、抗炎、镇痛、抗肿瘤、止咳祛痰、降糖降尿酸等药理作用<sup>[7,16]</sup>。Song 等<sup>[17]</sup>的研究表明, 穿山龙可能是通过抑制外周炎症介质的产生而起到镇痛作用。Ou-Yang 等<sup>[18]</sup>认为, 穿山龙能明显抑制肉芽组织增生和炎症早期的毛细血管渗出。魏志萍等<sup>[19]</sup>研究发现, 薯蓣皂苷元可通过抑制环氧合酶 2 的表达, 抑制 TNF- $\alpha$  诱导的关节炎大鼠成纤维样滑膜细胞异常增殖。王文云等<sup>[20]</sup>研究发现, 薯蓣皂苷元可以通过促进 M2 型小胶质细胞极化, 并抑制 M1 型小胶质细胞极化发挥抗炎作用。本研究中, 与模型组相比, 薯蓣皂苷元组大鼠关节炎指数降低, 炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  含量降低, 氧化应激因子 MDA 含量降低, 氧化应激因子 SOD、GSH 含量升高, 而且关节滑膜组织病变明显改善, 提示薯蓣皂苷元能调节 RA 模型大鼠的免疫反应, 缓解关节肿胀。

NLRP3 炎性体是一种存在于细胞质的蛋白复合

物, 能被多种内外因素所激活; 活化其效应蛋白 Caspase-1, 可将无活性的促炎细胞因子 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的前体剪切加工成熟并释放, 参与机体抵抗病原体的免疫应答反应; 一旦体内对 NLRP3 炎性体的调控失衡, 可生成过量的 IL-1 $\beta$  和 IL-18, 从而引发一系列炎症性疾病<sup>[21-22]</sup>。研究发现, 抑制 NLRP3 炎性体通路, 能够抑制炎症因子的表达, 缓解机体内炎症反应<sup>[23-24]</sup>。本研究中, 薯蓣皂苷元组和激活剂组滑膜组织中 IL-1 $\beta$ 、Caspase-1、NLRP3 含量均低于模型组, 但激活剂组滑膜组织中 IL-1 $\beta$ 、Caspase-1、NLRP3 含量高于薯蓣皂苷元组, 提示薯蓣皂苷元可能通过下调 IL-1 $\beta$ 、Caspase-1、NLRP3 的表达, 抑制 NLRP3 炎性体通路发挥治疗作用。

本研究结果提示, 薯蓣皂苷元能有效缓解 RA 大鼠的关节肿胀, 其作用机制可能是通过下调 IL-1 $\beta$ 、Caspase-1、NLRP3 的表达, 抑制 NLRP3 炎性体信号通路介导的炎症反应。

## 参考文献

- [1] 吴海洋. 骨髓间充质干细胞移植对胶原诱导性关节炎大鼠血清细胞因子的影响[J]. 中医正骨, 2019, 31(8): 14-19.
- [2] TARGONSKA-STEPNIAK B. Rheumatoid arthritis in elderly people[J]. Wiad Lek, 2019, 72(9 cz 1): 1676-1682.
- [3] BLUM A, ADAWI M. Rheumatoid arthritis (RA) and cardiovascular disease[J]. Autoimmun Rev, 2019, 18(7): 679-690.
- [4] LIANG C, LI J, LU C, et al. HIF1 $\alpha$  inhibition facilitates Leflunomide-AHR-CRP signaling to attenuate bone erosion in CRP-aberrant rheumatoid arthritis[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 4579.
- [5] 王洋, 赵立春, 庞宇舟, 等. 不同剂量薯蓣皂苷元的大鼠体内药动学研究[J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(3): 269-273.
- [6] ZHANG Y, JIN L, LIU J, et al. Effect and mechanism of dioscorein from dioscorea spongiosa on uric acid excretion in ani-

- mal model of hyperuricemia[J]. J Ethnopharmacol, 2018, 214:29-36.
- [7] DU S, LI C, LU Y, et al. Dioscin alleviates crystalline silica-induced pulmonary inflammation and fibrosis through promoting alveolar macrophage autophagy[J]. Theranostics, 2019, 9(7):1878-1892.
- [8] XU L N, YIN L H, JIN Y, et al. Effect and possible mechanisms of dioscin on ameliorating metabolic glycolipid metabolic disorder in type-2-diabetes[J]. Phytomedicine, 2020, 67:153.
- [9] 金霏, 梁秋实, 陈克研, 等. 薯蓣皂苷抑制 ERK/p38MAPK 信号通路减轻过敏性哮喘小鼠炎症反应[J]. 解剖科学进展, 2020, 26(4):400-403.
- [10] 李立萍, 刘超, 钟志伟, 等. 新型制剂 FNS007 对 II 型胶原诱导的关节炎大鼠炎症反应和骨损伤的影响[J]. 现代免疫学, 2018, 38(1):48-53.
- [11] 闫秀清, 王芳芳, 葛风梅, 等. 甲氨蝶呤时间治疗学在胶原诱导性关节炎大鼠中的实验研究[J]. 中华风湿病学杂志, 2016, 20(5):325-330.
- [12] 任世祥, 赵潇雄, 陈彤, 等. 硒纳米颗粒治疗类风湿关节炎大鼠效果观察及抗炎机制[J]. 山东医药, 2020, 60(4):43-47.
- [13] WASSERMAN A. Rheumatoid arthritis: common questions about diagnosis and management[J]. Am Fam Physician, 2018, 97(7):455-462.
- [14] ATZENI F, TALOTTA R, MASALA I F, et al. Central nervous system involvement in rheumatoid arthritis patients and the potential implications of using biological agents[J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2018, 32(4):500-510.
- [15] 王丽丹, 张广德. 魏子孝辨病分期治疗类风湿关节炎经验[J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(4):118-120.
- [16] LIU W, ZHAO Z, WANG Y, et al. Dioscin inhibits stem-cell-like properties and tumor growth of osteosarcoma through Akt/GSK3/β-catenin signaling pathway[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(3):343.
- [17] SONG S, CHU L, LIANG H, et al. Protective effects of dioscin against doxorubicin-induced hepatotoxicity via regulation of Sirt1/FOXO1/NF-κB signal[J]. Front Pharmacol, 2019, 10:1030.
- [18] OU-YANG S H, JIANG T, ZHU L, et al. Dioscorea nipponica Makino: a systematic review on its ethnobotany, phytochemical and pharmacological profiles[J]. Chem Cent J, 2018, 12(1):57.
- [19] 魏志萍, 刘雅珩, 杨树龙. 薯蓣皂苷对 TNF-α 诱导的 CIA 大鼠成纤维样滑膜细胞 COX 表达的影响[J]. 南昌大学学报(医学版), 2020, 60(4):6-9.
- [20] 王文云, 李杰, 马铁梁, 等. 薯蓣皂苷元对脂多糖诱导的 BV2 小胶质细胞极化状态的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2018, 13(1):39-43.
- [21] SUN L, MA W, GAO W, et al. Propofol directly induces caspase-1-dependent macrophage pyroptosis through the NLRP3-ASC inflammasome[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(8):542.
- [22] WANG J, SAHOO M, LANTIER L, et al. Caspase-11-dependent pyroptosis of lung epithelial cells protects from melioidosis while caspase-1 mediates macrophage pyroptosis and production of IL-18[J]. PLoS Pathog, 2018, 14(5):e105.
- [23] 林艳梅, 彭庆海, 陈杰, 等. 基于 NLRP3 炎性小体通路探讨金樱子乙醇提取物对系膜增生性肾小球肾炎大鼠的保护作用[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(5):560-565.
- [24] 魏傲, 李强, 丁玲新, 等. 黄芪注射液联合曲美他嗪对老年病毒性心肌炎外周血 NLRP3 炎性小体及相关下游通路的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(8):815-818.

(收稿日期:2021-01-11 本文编辑:李晓乐)

(上接第 43 页)

- [19] 章伟, 赵林林, 陈立伟, 等. 恶性肿瘤化疗后骨髓抑制的中医药防治进展[J]. 四川中医, 2014, 32(6):179-182.
- [20] 侯天将, 尚静, 由凤鸣, 等. 化疗所致骨髓抑制的中医病机要素及临床治疗分析[J]. 云南中医中药杂志, 2016, 37(9):31-33.
- [21] 王茜, 窦永起. 化疗后骨髓抑制的中药防治研究进展[J]. 现代医药卫生, 2013, 29(14):2141-2143.
- [22] 陶灵佳, 任建琳, 季青, 等. 健脾补肾复方治疗大肠癌靶点的网络药理学研究[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(4):1772-1774.
- [23] 孙政华, 邵晶, 郭玫. 党参化学成分及药理作用研究进展[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(33):174-176.
- [24] 刘爽. 黄芪药理作用的研究进展[J]. 北方药学, 2015, 12(12):95-96.
- [25] 刘医辉, 杨世英, 马伟林, 等. 当归药理作用的研究进展[J]. 中国当代医药, 2014, 21(22):192-193.
- [26] 祝烨. 人参、黄芪、当归对血发生的影响[J]. 成都中医药大学学报, 2000, 23(3):55-56.
- [27] 芮鑫森, 钱佳诚, 李永峰, 等. 健脾补肾法治疗放化疗后骨髓抑制研究进展[J]. 浙江中西医结合杂志, 2019, 29(7):606-608.

(收稿日期:2020-11-01 本文编辑:郭毅曼)