

姜黄素对佐剂性关节炎大鼠血清骨保护素和核因子 κ B 受体活化因子配体蛋白表达及骨密度的影响

赵凌杰 邱艳 商玮 刘春丽 赵智明 郭郡浩 蔡辉

【摘要】 目的 观察姜黄素对佐剂性关节炎(adjuvant arthritis, AA)大鼠血清骨保护素(osteoprotegerin, OPG)、核因子 κ B 受体活化因子配体(receptor activator for nuclear factor- κ B ligand, RANKL)表达以及骨密度的影响,探讨姜黄素防止类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)骨破坏的作用机制。**方法** 取SD大鼠30只,随机分为模型组、姜黄素组及正常组,第28天腹主动脉取血,采用ELISA法来检测血清中RANKL、OPG蛋白的表达,取血后处死大鼠,剥离大鼠右侧胫骨,行骨密度检查。**结果** (1)与正常组比较,造模组即模型组与姜黄素组大鼠血清RANKL均显著升高($P < 0.01$),血清OPG显著降低($P < 0.01$),RANKL/OPG比值显著升高($P < 0.01$);(2)与模型组比较,治疗组即姜黄素组血清RANKL显著降低($P < 0.01$),血清OPG均显著升高($P < 0.01$),RANKL/OPG比值均显著降低($P < 0.01$);(3)3组大鼠胫骨整体骨密度无显著性差异($P > 0.05$),姜黄素组大鼠兴趣区骨密度值显著高于模型组($P < 0.01$)。**结论** 姜黄素对AA大鼠具有良好的治疗作用,能够通过调节血清RANKL及OPG的表达,来调节OPG/RANKL通路,从而提高AA大鼠骨密度,抑制其骨丢失。

【关键词】 姜黄素; 佐剂性关节炎; 骨密度; 骨保护素; 核因子 κ B 受体活化因子配体

【中图分类号】 R593.22 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.03.013

Effect of curcumin on the expression of blood serum osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand protein and bone mineral density in adjuvant arthritis rats ZHAO Ling-jie, QIU Yan, SHANG Wei, et al. Department of Integrated Traditional and Western Medicine, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region, Nanjing 210002, China

Corresponding author: ZHAO Ling-jie, Email: zhaolingjie68@163.com

【Abstract】 Objective By observing the effects of curcumin on blood serum osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) protein and bone mineral density of adjuvant arthritis (AA) rat models, we try to explore the possible mechanism of curcumin preventing bone destruction in rheumatoid arthritis. **Methods** 30 SD rats were randomly divided into model group, curcumin group and normal group. On day 28 draw blood from abdominal aorta to detect the expression of blood serum RANKL and OPG protein by ELISA method. After drawing blood, rats were sacrificed and stripped the right tibia, to examine bone density. **Results** (1) Compared with the normal group, the serum RANKL of model group and curcumin group rats were significantly increased ($P < 0.01$), the serum OPG expression were significantly decreased ($P < 0.01$), the ratio of RANKL/OPG were significantly increased ($P < 0.01$); (2) Compared with the model group, the serum RANKL of curcumin group was significantly decreased ($P < 0.01$), the serum OPG was significantly increased ($P < 0.01$), the ratio of RANKL/OPG was significantly decreased ($P < 0.01$); (3) There are no significant differences among the 3 groups' tibia bone mineral density ($P > 0.05$). The bone mineral density in region of interest of curcumin group

基金项目:南京军区南京总医院科研基金(2013056)

作者单位:210002 南京军区南京总医院中西医结合科

作者简介:赵凌杰(1966-),女,博士,副主任医师,研究生导师。研究方向:中西医结合治疗风湿免疫。E-mail:zhaolingjie68@163.com

was significantly higher than that of the model group ($P < 0.01$). **Conclusions** Curcumin has a good therapeutic effect on AA rats. Curcumin regulates the expression of blood serum RANKL and OPG, thus regulate the OPG/RANKL pathway, thereby improve bone mineral density in AA rats to inhibit the bone loss.

【Key words】 Curcumin; Adjuvant arthritis; Bone mineral density; Osteoprotegerin; Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand

姜黄素 (curcumin) 是从植物姜黄根茎中分离出来的天然多酚类产物。近年来在体外和体内对姜黄素进行了广泛的研究^[1-2], 发现姜黄素具有抗肿瘤、抗病毒、抗关节炎、抗氧化等作用, 其作用机制涉及到多个靶点, 包括转录因子如核因子 κ B (NF- κ B), 生长因子如血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF), 炎性细胞因子如肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α 、白细胞介素 1 (interleukin 1, IL-1)、IL-6, 蛋白激酶如丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPKs) 和 Akt, 以及其他酶如环氧合酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2)。由于其有效性, 安全性及多目标调控性, 姜黄素成为一个潜在的治疗及预防类风湿关节炎的药物。

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性炎症性疾病, 以多关节滑膜炎为特征伴随软骨及骨破坏, 引起关节畸形, 甚至导致患者残疾。且 RA 的发病率随着环境及空气的污染呈逐年增高的趋势^[3]。RA 骨破坏包括局灶性炎症活动部位的骨侵蚀和关节周围的骨量减少, 其机制并未被完全阐明, 诸多证据表明 RANK/RANKL 通路是 RA 的骨质流失的关键因素。RA 动物模型支持 RANK/RANKL 系统在骨侵蚀中发挥作用, AA 大鼠模型是最常见的 RA 动物模型, 其造模方法简单, 成功率高^[4]。本文通过观察姜黄素对 AA 大鼠血清 OPG、RANKL 蛋白表达及骨密度的影响, 进一步探讨其对 RA 的作用机制, 为姜黄素治疗 RA 提供动物实验参考。

1 材料与试剂

1.1 动物

雄性 SD 大鼠 30 只, 清洁级, 实验起始体质量 140 ~ 160 g, (南京军区南京总医院的实验动物中心供应, 使用许可证: SYXK20030032)。

1.2 试剂

姜黄素溶液: 浓度为 5 mg/mL (将姜黄素 500 mg 溶解于无菌的二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DM-

SO) 10 mL, 加无菌生理盐水直至 100 mL, 用 5 mL 注射器进行分装, 保存需要避光, 冰箱温度调节在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 周内使用完, 禁止反复冻融。

2 实验方法

2.1 分组及造模方法

将大鼠以随机数字表法分为 3 组: 正常组, 模型组, 姜黄素组, 每组 10 只。用标准饲料饲养, 饮水自由, 将室温控制在 $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ~ $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 之间, 湿度调控在 70% 左右, 适应性喂养 1 周。除了正常组不造模, 将其余 2 组大鼠左后跖处进行常规消毒, 皮内注射完全弗氏佐剂 0.1 mL, 制成 AA 模型, 造模当天记做第 0 天。

2.2 给药方法

模型组、姜黄素组, 于第 7 天开始腹腔注射给药。姜黄素组给予姜黄素溶液 50 mg/kg · d, 连续 21 天; 模型组给予 10% DMSO, 5 mg/kg · d, 连续 21 天; 正常组自由饮水。于最后一次姜黄素治疗后 24 小时, 即第 28 天将大鼠仰卧位固定头部、四肢, 行腹主动脉取血, 离心, 取血清, 低温冰箱保存备检, ELISA 法检测血清 RANKL、OPG 蛋白的表达; 取血后处死大鼠, 剥离大鼠右侧胫骨, 双能 X 线骨密度仪 (dual energy x-ray absorptiometry, DXA) 测量大鼠胫骨骨密度记做整体骨密度, 及胫骨远端 1 cm 处的兴趣区域骨密度记为兴趣区骨密度。

2.3 检测指标和方法

2.3.1 整体及兴趣区骨密度 处死大鼠后, 剥离大鼠右侧胫骨, 取其标本, 用 DXA 进行检测, 记录整个胫骨的整体骨密度及兴趣区骨密度。

2.3.2 血清 RANKL、OPG 蛋白表达 参考文献^[5]及试剂盒说明, 离心机离心 → 取血清保存备检 → 激活标本 → 分别取 OPG 的 ELISA 试剂盒与 RANKL 的 ELISA 试剂盒 → 加入 0.5 mL 的蒸馏水混匀, 配制成 10 ng/mL 溶液 → 标准管 8 管 → 第 1 管加入标本稀释液 900 μ L → 第 2 至 8 管加入标本稀释液 500 μ L → 在第 1 管中加入 10 ng/mL 的标准品溶液 100 μ L 混匀后加样器吸出 500 μ L 移至第 2 管 → 如此反复

稀释,从第 7 管中吸出 500 μL 弃去,第 8 管为空白对照组 \rightarrow 洗涤液:用重蒸水 1:20 稀释 \rightarrow 加样:每孔各加入标准品或待测样品 100 μL ,将反应板充分混匀后至 37 $^{\circ}\text{C}$ 120 分钟 \rightarrow 洗板:用洗涤液将反应板充分洗涤 4~6 次,向滤纸上印干 \rightarrow 每孔加入第一抗体工作液 100 μL ,将反应板充分混匀后至 37 $^{\circ}\text{C}$ 60 分钟 \rightarrow 洗板:同前 \rightarrow 每孔加入酶标抗体工作液 100 μL ,将反应板充分混匀后至 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 分钟 \rightarrow 洗板:同前 \rightarrow 每孔加入底物工作液 100 μL ,至 37 $^{\circ}\text{C}$ 暗处 15 分钟 \rightarrow 每孔加入 100 μL 终止液混匀 \rightarrow 30 分钟内用酶标仪在 40 nm 处测吸光值 \rightarrow 结果计算:以标准品 1000、500、250、125、62、31、15.6、0 pg/mL 作为横坐标,光密度(optical density, OD)值为纵坐标,建立标准曲线 \rightarrow 经多元回归计算结果。

2.4 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组均数比较采用单因素方差分析,两两比较用 LSD 法,若方差不齐则用 Tamhane 法。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

3 结果

注射完全弗氏佐剂后 3~4 小时,造模组所有大鼠左后足即可出现红、肿的炎症表现;第 3 天左右达到高峰;第 7 天左右 4 只足爪均有不同程度的肿胀,表明造模成功。本实验的造模成功率为 100%。

3.1 3 组大鼠骨密度的比较

3 组大鼠右侧胫骨整体骨密度之间比较均无显著性差异($P > 0.05$);模型组大鼠兴趣区骨密度值显著低于正常组大鼠兴趣区骨密度($P < 0.01$);姜黄素组大鼠兴趣区骨密度值显著高于模型组($P < 0.01$)。由此可见,大鼠造模后一定时间(28 天)内整体胫骨骨密度未出现显著性降低。而造模组大鼠胫骨远端的骨密度出现显著性降低,姜黄素的治疗能显著抑制 AA 骨密度下降,治疗后骨密度与正常组无显著性差异,详见表 1。

表 1 各组大鼠骨密度的比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	整体骨密度(g/cm^2)	兴趣区骨密度(g/cm^2)
正常组	0.0709 \pm 0.0018	0.0701 \pm 0.0018
模型组	0.0698 \pm 0.0009	0.0608 \pm 0.0012 ^a
姜黄素组	0.0697 \pm 0.0014	0.0670 \pm 0.0008 ^b

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.01$ 。

3.2 3 组大鼠血清 RANKL、OPG 及其比值的比较

由表 2 可见,大鼠血清 RANKL,与正常组比较,模型组、姜黄素组均显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,治疗组即姜黄素组显著降低($P < 0.01$)。大鼠血清 OPG,与正常组比较,模型组、姜黄素组均显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,姜黄素组显著升高($P < 0.01$)。RANKL/OPG 比值,与正常组大鼠比较,模型组、姜黄素组均显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,姜黄素组显著降低($P < 0.01$)。姜黄素能够通过改变血清 RANKL 及 OPG 的表达,来改变其比值。

表 2 各组大鼠血清 RANKL、OPG 及其比值的比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	RANKL	OPG	RANKL/OPG
正常组	34.41 \pm 0.64	10.47 \pm 0.38	3.29 \pm 0.13
模型组	54.21 \pm 0.53 ^a	6.63 \pm 0.24 ^a	8.19 \pm 0.28 ^a
姜黄素组	47.57 \pm 0.46 ^{ab}	7.52 \pm 0.23 ^{ab}	6.33 \pm 0.20 ^{ab}

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.01$ 。

4 讨论

RA 这一病名是由英国人 Garrod 第一个提出的,发病后表现为小关节肿胀疼痛等炎症症状,进而出现受累部位骨丢失,随着病情进展,骨破坏加重,呈不可逆性,如未进行正规治疗,2 年内关节软骨及骨的破坏可达到 50%^[6]。关节软骨及骨破坏是 RA 的重要病理特征,而局部的骨侵蚀又是 RA 患者关节畸形、功能障碍的最主要原因,因此早期预防及控制骨破坏是改变 RA 预后的关键。RA 的骨破坏早期表现为受累关节软骨及骨组织由病理组织取代,进一步发展为软骨及骨侵蚀,最终导致全身性的骨丢失,破坏关节结构。

OPG/RANKL/RANK 信号途径是免疫系统紊乱疾病(包括 RA)与骨破坏之间联系的重要通路,破骨细胞(Osteoclast, OC)是参与骨破坏的主要细胞,而 OPG/RANKL/RANK 系统在 OC 分化成熟及活性保持中起着重要作用^[7]。在正常的骨重建过程中,RANKL 蛋白结合 RANK,促使破骨细胞的生成,保持其活性,促进骨的吸收功能。当骨的吸收大于骨的形成时,成骨细胞系自动分泌更多的 OPG,假性受体竞争结合 RANKL,阻止 RANKL 与受体 RANK 结合,抑制破骨细胞生成、活化,抑制骨吸收功能,使骨吸收与骨形成又处于一个相对稳定的状态^[8]。而骨丢失是 RA 特征性标志,其丢失程度与病情严

重程度有关,本实验采用 DXA 检查大鼠胫骨整体及兴趣区的骨密度,通过骨密度来评价 AA 大鼠骨丢失情况。检查测得大鼠骨密度的情况:造模后 28 天,所有组大鼠的整体骨密度差异无显著性差异。由此可见,大鼠造模后一定时间(28 天)内整体胫骨骨密度并不会出现显著降低。而胫骨远端 1 cm 的骨密度即兴趣区骨密度,模型组兴趣区的骨密度是显著低于正常组的。而与模型组比较,药物干预组即姜黄素组显著升高。姜黄素,化学结构为 $C_{21}H_{20}O_6$, 研究发现其对免疫、细胞因子、转录因子具有调节作用,因此能够产生广泛的生物学效应。但姜黄素难以溶于水,易于溶于 DMSO 等有机溶剂,本实验将姜黄素溶解于 10% DMSO 制成姜黄素溶液后,进行药物干预,目的是为了大鼠能够更加好的吸收姜黄素,并且同时给予模型组大鼠腹腔注射 10% 的 DMSO,以观察姜黄素对 AA 大鼠的治疗作用。本实验中观察到在大鼠造模 28 天内,胫骨远端存在着一定程度的骨丢失,姜黄素能够抑制胫骨远端骨密度的降低。

研究表明^[9-11] 诸多炎症细胞因子(TNF- α 、IL-1、IL-7、IL-17、IL-23、IL-34)能够影响 RA 的炎症及骨破坏,目前没有有力的证据可以证明这些细胞因子能够直接激活破骨细胞,但有证据表明绝大多数细胞因子是通过 RANKL/RANK 通路间接调节破骨细胞分化及活性,从而发挥作用。炎性细胞因子通过诱导成骨细胞表达 RANK,结合滑膜 RANKL,来激活 NF- κ B 或 JNK,增强 T 细胞和 DC 的协同作用,促进破骨细胞的分化和增殖,最终导致软骨及骨质破坏。本实验采用 ELISA 法测得大鼠血清 RANKL、OPG 蛋白的表达,并计算出 RANKL/OPG 的比值。AA 模型大鼠血清 RANKL 表达明显增加,OPG 的表达明显减少,RANKL/OPG 的比值明显增加,骨密度检查,兴趣区的骨密度明显低于其它组的大鼠,进一步表明 AA 炎症发生骨质破坏重要通路为 OPG/RANKL 通路。姜黄素干预治疗 AA 模型大鼠后,能降低血清的 RANKL 的表达,提高 OPG 的表达,最终 RANKL/OPG 的比值显著均低于模型组。因此可见,姜黄素能够影响到外周血清 RANKL、OPG 的含量,最终使得 RANKL/OPG 的比值显著低于模型组。由此推测,在 RA 治疗中,姜黄素通过调控 RANKL/OPG 的比值,来调节 OPG/RANKL 系统,从而参与到抑制 RA 骨丢失,防止 RA 骨破坏。

综上所述,姜黄素对 RA 具有肯定的治疗作用,

通过降低血清 RANKL 表达,提高血清 OPG 的表达,降低 RANKL/OPG 的比值,维护 RA 骨吸收和骨形成的动态平衡,有效预防骨质破坏,防止关节损伤,提高其骨密度,改善 RA 的预后。姜黄素是传统中药的有效提取物,具有安全性较高,价格便宜等优点,进一步研究姜黄素,可能成为治疗 RA 的重要药物。

参 考 文 献

- [1] Gulcubuk A, Haktanir D, Cakiris A, et al. Effects of curcumin on proinflammatory cytokines and tissue injury in the early and late phases of experimental acute pancreatitis [J]. *Pancreatology*, 2013, 13(4):347-354.
- [2] Kloesch B, Becker T, Dietersdorfer E, et al. Anti-inflammatory and apoptotic effects of the polyphenol curcumin on human fibroblast-like synoviocytes[J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 15(2):400-405.
- [3] Gan RW, Deane KD, Zerbe GO, et al. Relationship between air pollution and positivity of RA-related autoantibodies in individuals without established RA: a report on SERA [J]. *Ann Rheum Dis*, 2013, 72(12):2002-2005.
- [4] Seferos N, Pantopoulou A, Kotsiou A, et al. The influence of simvastatin in rats mandible and femur bone mass under Freund's adjuvant arthritis[J]. *Stomatologija*, 2012, 14(2):46-52.
- [5] Salah H, Atfy M, Fathy A, et al. The clinical significance of OPG/sRANKL ratio in thalassemia patients suffering from osteopenia or osteoporosis in Egyptian patients [J]. *Immunol Invest*, 2010, 39(8):820-832.
- [6] 何勇,王旭,顾湘杰,等. 类风湿性关节炎足部病变的影像学研究[J]. *中国矫形外科杂志*, 2009, 17(5):348-351.
- [7] Teitelbaum S L, Ross F P. Genetic regulation of osteoclast development and function[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2003, 4(8):638-649.
- [8] Schett G, Hayer S, Zwerina J, et al. Mechanisms of disease: the link between RANKL and arthritic bone disease [J]. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 2005, 1(1):47-54.
- [9] 施青,王美美. IL-17 和 RANKL 在胶原诱导性关节炎大鼠关节滑膜的表达及 99Tc-TDP 的干预作用[J]. *现代医学*, 2010, (2):116-122.
- [10] Chen Z, Kim SJ, Chamberlain ND, et al. The novel role of IL-7 ligation to IL-7 receptor in myeloid cells of rheumatoid arthritis and collagen-induced arthritis [J]. *J Immunol*, 2013, 190(10):5256-5266.
- [11] Shiozawa S, Tsumiyama K, Yoshida K, et al. Pathogenesis of joint destruction in rheumatoid arthritis [J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2011, 59(2):89-95.

(收稿日期:2014-05-14)

(本文编辑:董历华)