

- 践指南[J]. 胃肠病学, 2010, 15(9): 548-558.
- [2] 王玉芳, 欧阳钦, 胡仁伟, 等. 炎症性肠病流行病学研究进展[J]. 胃肠病学, 2013, 18(1): 48-51.
- [3] 周春和, 高玉华, 高社光, 等. 中医辨证论治慢性溃疡性结肠炎临床研究进展[J]. 环球中医药, 2012, 5(9): 717-720.
- [4] Morris GP, Beck PL, Herridge MS, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon[J]. Gastroenterology, 1989, 96(3): 795-803.
- [5] 叶应妩, 王毓三. 全国临床检验操作规程[M]. 2 版. 南京: 东南大学出版社, 1997: 143.
- [6] Sasaki S, Hirata I, Maemura K, et al. Prostaglandin E2 inhibits lesion formation in dextran sodium sulphate-induced colitis in rats and reduces the levels of mucosal inflammatory cytokines[J]. Scand J Immunol, 2000, 51(1): 23-28.
- [7] 吕飞, 卢光新, 杜勇. 复方甘草酸苷对实验性溃疡性结肠炎大鼠白细胞介素 4、白细胞介素 17 水平的影响[J]. 临床荟萃, 2013, 28(2): 178-180.
- [8] Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines[J]. Clin Exp Immunol, 1998, 114(3): 385-391.
- [9] 叶任高, 陆再英, 谢毅, 等. 内科学[M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 411-512.
- [10] Blonski W, Buchner AM, Lichtenstein GR. Treatment of ulcerative colitis[1]. Curr Opin Gastroenterol 2014, 30: 84-96.
- [11] 李彩虹, 周克元. 黄连活性成分的作用及机制研究进展[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(2): 466-468.
- [12] 舒德忠, 万先惠, 刘华蓉, 等. 黄连总碱对实验性溃疡性结肠炎的作用研究[J]. 儿科科学杂志, 2005, 11(3): 7-9, 12.
- [13] 吴建华, 马耀茹. 姜不同炮制品止血作用实验研究[J]. 陕西中医, 2002, 23(5): 449-450.
- (收稿日期: 2013-12-03)
(本文编辑: 黄凡)

地乌三萜皂苷 W_1 对破骨细胞分化和骨吸收功能的影响

杨悦 孔祥英 万红叶 苏晓慧 林娜

【摘要】 目的 探讨地乌三萜皂苷类成分 W_1 对体外破骨细胞分化及骨吸收功能的影响。**方法** 3 个不同浓度(0.0625, 0.125, 0.25 $\mu\text{g/ml}$)的 W_1 与核因子- κB 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor κB ligand, RANKL)诱导的小鼠单核/巨噬细胞 RAW 264.7 共孵育 7 天, 抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)染色观察 TRAP 阳性多核细胞的形成, 甲苯胺蓝染色及扫描电镜观察骨吸收陷窝的形成, 图像分析计算骨吸收陷窝面积百分比; 同 3 个浓度的 W_1 与 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞共孵育 24 小时后收集细胞上清液, 放射免疫法检测肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的含量; 甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)法检测 W_1 对 RAW264.7 细胞毒性影响。**结果** RANKL 组诱导 RAW 264.7 细胞形成多量 TRAP 阳性多核细胞, 形成明显的骨吸收陷窝, 并诱导 TNF- α 在 RAW264.7 细胞上清中异常高表达; 与 RANKL 组相比, 3 个浓度的 W_1 均能显著减少 TRAP 阳性细胞数($P < 0.01$), 显著减少骨吸收陷窝面积($P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.001$), 明显降低 TNF- α 的表达量($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), 且未观察到对 RAW264.7 的细胞毒性。**结论** W_1 对由 RANKL 诱导的体外破骨细胞分化和骨吸收功能有一定的负调节作用。

【关键词】 地乌三萜皂苷 W_1 ; 小鼠单核/巨噬细胞 RAW264.7; 肿瘤坏死因子 α ; 骨吸收

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2014.03.007

基金项目: 国家科技重大专项(2011ZX09101-006-03); 北京市自然科学基金(7112096); 中国中医科学院基本科研业务费自主选题(ZZ070836)

作者单位: 100700 北京, 中国中医科学院中药研究所中药理论与本草文献研究中心

作者简介: 杨悦(1989-), 女, 2011 级硕士研究生。研究方向: 中药药理研究。E-mail: yangyue8675658@163.com

通讯作者: 林娜(1963-), 女, 博士, 研究员, 博士生导师。研究方向: 中药药性理论与中药药理。E-mail: linna888@163.com

Effect of triterpene saponin W_1 from rhizome of *Anemone Flaccid* on osteoclasts differentiation and bone resorption

YANG Yue, KONG Xiang-ying, WAN Hong-ye, et al. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Corresponding author: LIN Na, E-mail: linna888@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of W_1 from rhizome of *Anemone Flaccid* on osteoclasts formation and bone resorption in vitro. **Methods** RAW264.7 cells induced by RANKL were cultured with three variable concentration (0.0625, 0.125, 0.25 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) of W_1 in vitro for 7 days. The influence of W_1 on osteoclasts differentiation was assessed by osteoclast-like number and tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) activity; resorption lacunae were stained by toluidine blue and were visualized by Philips XL30 scanning electron microscope. The number of TRAP+ cells and the percentage of resorption pits were counted. RAW264.7 cells induced by RANKL were incubated with three variable concentration of W_1 in vitro for 24 hours, the level of TNF- α in cell culture supernatant was examined by Iodine [^{125}I] Tumor Necrosis Factor Radioimmunoassay kit; RAW264.7 cell viability was assayed by MTT. **Results** RANKL could induce RAW264.7 cells to form TRAP positive multinucleated cells and form bone resorption pits on bone. RANKL could induce abnormally high expression of TNF- α in RAW264.7 cells. W_1 (0.0625, 0.125, 0.25 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) could decrease the number of TRAP+ cells ($P < 0.01$) as well as the area of bone resorption pits ($P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.001$), and showed no cytotoxicity to RAW264.7; W_1 (0.0625-0.25 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) could suppress the expression of TNF- α ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$). **Conclusion** RANKL induced osteoclastogenesis in these monocytic cells, and W_1 inhibited RANKL-induced tumor necrosis factor- α production and osteoclast differentiation and bone resorption pit formation.

【Key words】 Triterpene saponin W_1 from rhizome of *Anemone Flaccid*; RAW264.7; Tumor necrosis factor- α ; Bone resorption

地乌总皂苷是民间治疗风湿疼痛的单验方地乌的主要活性成分群^[1],研究表明其具有抗炎免疫作用,且无明显毒副反应^[2-3]。笔者在前期的地乌总皂苷活性成分筛选研究中发现,地乌三萜皂苷 W_1 (以下简称 W_1) 在地乌总皂苷中的含量接近最高,且具有较强的镇痛抗炎活性及较好的骨免疫调节作用。为了有利于地乌治疗类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 机制的阐明及地乌总皂苷的进一步研发,本研究拟通过核因子 κB 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor κB ligand, RANKL) 诱导小鼠单核/巨噬细胞 RAW 264.7 细胞建立体外破骨细胞分化模型,观察 W_1 对破骨细胞分化、骨吸收功能及炎症因子肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 表达的影响,相关结果报道如下。

1 材料

1.1 细胞

小鼠单核/巨噬细胞系 RAW 264.7 (由中国医学科学院基础医学研究所细胞库提供),加入含 10% 的胎牛血清、1% 双抗和谷氨酰胺的高糖 (dulbecco's modified eagle's medium, DMEM) 培养

基,置于 5% CO_2 , 37℃ 培养箱中常规培养。细胞生长至 80% ~ 90% 融合后进行传代,2 ~ 3 天传代 1 次。

1.2 试剂

胎牛血清,高糖 DMEM 培养基 (美国 GIBCO 公司);小鼠重组可溶性核因子 κB 受体活化因子配体 (soluble receptor activator of nuclear factor κB ligand, sRANKL) (英国 Peprotech 公司);3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5 二苯基四氮唑溴盐 (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT)、甲苯胺蓝、多聚赖氨酸、抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate resistant acid phosphatase, TRAP) 染色试剂盒 (美国 Sigma 公司); W_1 (广州康和药业有限公司提供);牛骨片 (北京荣志海达生物科技有限公司);小鼠肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF- α) 放射免疫试剂盒 (北京普尔伟业生物科技有限公司)。

1.3 仪器

CO_2 培养箱 (上海力申科学仪器有限公司, HF151UV);生物安全柜 (上海力申科学仪器有限公司, HFsafe-TE1200);全自动酶标仪 (Thermo 公司,

MK3 型)。

2 方法

2.1 药物制备

地乌三萜皂苷 W_1 由广州康和药业有限公司提供。化学名称为:3-O- α -L-吡喃鼠李糖(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃葡萄糖-齐墩果酸-28-O- α -L-吡喃鼠李糖(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 6)- β -D-吡喃葡萄糖苷。纯度为 99.40%。

2.2 玻片与骨片的预处理

将直径为 8 mm 的 48 孔板专用细胞爬片,充分清洗,高压灭菌,超净台内多聚赖氨酸包被。将由牛股骨皮质部分制成的直径 6 mm 的骨片,保存于 4℃ 下 70% 乙醇中,实验前先将骨片或包被过的细胞爬片置于培养板中,加入培养基冲洗 3 遍,孵育过夜,然后弃去旧液,接种细胞。

2.3 W_1 对破骨细胞生成的影响

将对数生长期 RAW264.7 细胞消化,制备单细胞悬液,以 5×10^3 个/孔的密度接种于预置有细胞爬片的 48 孔板中,每孔 0.5 ml 培养基,除空白对照组外,其它组均加入 50 ng/ml RANKL 诱导,给药组同时加入 W_1 使其浓度分别为 0.0625、0.125、0.25 μ g/ml,每组 3 个复孔。置于 37℃、5% CO_2 培养箱中孵育培养,每 2 天换液 1 次,换液同时更换培养液中的诱导因子及药物。诱导培养 7 天,用 PBS 冲洗细胞爬片 3 次,然后用 4% 多聚甲醛固定 15 分钟,去离子水冲洗 2 遍,加入按照说明书配制的 TRAP 染液,37℃ 水浴孵育 30 分钟,光镜下观察到含 3 个胞核以上且呈 TRAP 染色阳性的多核巨噬细胞为破骨细胞,计算阳性细胞平均值。

2.4 W_1 对骨吸收陷窝形成的影响

将对数生长期 RAW264.7 细胞消化,制备单细胞悬液,以 2×10^3 个/孔的密度接种于置有牛骨片的 96 孔板中,除正常对照组外,其它组均加入 50 ng/ml RANKL 诱导,给药组同时加入 W_1 使其浓度分别为 0.0625、0.125、0.25 μ g/ml,每组 3 复孔。隔天换 1 次液,各组细胞置 37℃、5% CO_2 培养箱中孵育培养 7 天。第 7 天取出骨片,用 0.25 mol/L NH_4OH 溶液超声洗涤 10 分钟 \times 3 次,蒸馏水冲洗,梯度酒精(80%、90%、95%、100% I, 100% II)脱水,每个梯度 3 分钟。室温 1% 甲苯胺蓝染色 8 分钟左右。蒸馏水冲洗,光镜下观察,用 Image Pro Plus

软件分析整张骨片上骨陷窝的数量及面积百分比。将牛骨片超声清洗干净后,烘干、装台(粘胶)、表面真空离子喷金,扫描电子显微镜下观察并摄像。

2.5 放射免疫法检测 W_1 对 TNF- α 表达的影响

将对数生长期 RAW264.7 细胞消化制备单细胞悬液,以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔培养板,待细胞长满 80%,加入含 0.1% 胎牛血清(fetal calf serum, FBS)的培养基,静息 24 小时后,除正常对照组外,其它组均加入 50 ng/ml RANKL 诱导,给药组同时加入 W_1 使其浓度分别为 0.0625、0.125、0.25 μ g/ml,培养 24 小时,收集细胞上清液,按碘 [I^{125}]-肿瘤坏死因子放射免疫试剂盒说明步骤进行 TNF- α 含量测定, γ 放免计数器直接给出检测数值。

2.6 MTT 法检测 W_1 对 RAW264.7 细胞毒性的影响

将对数生长期 RAW264.7 细胞消化,制备单细胞悬液,以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板,每孔 200 μ l,培养过夜。除正常对照组外,其它组均加入 50 ng/ml RANKL 诱导,给药组同时加入 W_1 使其浓度分别为 0.0625、0.125、0.25 μ g/ml。培养 24 小时后,每孔加入 MTT(5 mg/ml) 10 μ l,反应 4 小时后,小心吸去培养液,每孔加入 150 μ l 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),震荡 10 分钟充分溶解,酶标仪在 492 nm 波长检测吸光度值。

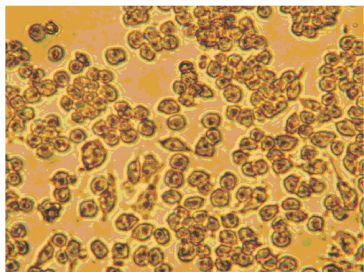
2.7 统计学处理

采用 SPSS 17.0 数据分析软件对实验数据进行统计分析处理,实验数据用($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析做组间数据分析, $P < 0.05$ 为组间具有显著性差异。

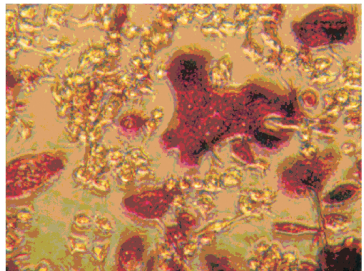
3 结果

3.1 W_1 对破骨细胞生成的影响

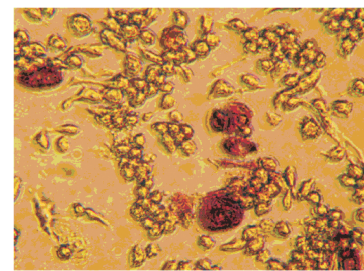
诱导培养 7 天后进行 TRAP 染色,与空白对照组相比,RANKL 组出现多个体积较大、胞浆呈玫红色的多核细胞(核 ≥ 3 个)($P < 0.001$);与 RANKL 组相比,在不同浓度的 W_1 作用下,破骨细胞数量均明显降低($P < 0.01$),说明 W_1 具有明显的抑制 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞形成破骨细胞的能力,见图 1 及表 1。



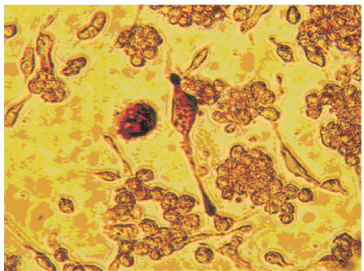
空白对照组



RANKL组



W₁ 0.0625 μg/ml



W₁ 0.25 μg/ml

图1 TRAP染色图片(×400)

表1 W₁对RAW264.7细胞诱导分化的TRAP阳性细胞数目的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	W ₁ 给药量 (μg/ml)	TRAP 阳性 细胞数(个)
空白对照组	0	0.333 ± 0.577
RANKL 组	0	31.667 ± 6.110 ^a
RANKL + W ₁ 0.0625 μg/ml 组	0.0625	12.333 ± 3.215 ^b
RANKL + W ₁ 0.125 μg/ml 组	0.125	7.333 ± 2.082 ^b
RANKL + W ₁ 0.25 μg/ml 组	0.25	4.333 ± 1.155 ^b

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.001$;与 RANKL 组比较,^b $P < 0.01$

3.2 W₁对骨吸收陷窝形成的影响

药物作用 7 天后,骨片经甲苯胺蓝染色,光镜下可见蓝紫色圆形、椭圆形或不规则形,大小不一,边界清晰的吸收陷窝;扫描电镜下观察,骨吸收陷窝的变化趋势与光镜结果一致,同一标本可清楚识别形态相似的骨吸收陷窝。RANKL 组可见较大面积的骨吸收陷窝形成;与 RANKL 组相比,0.0625、0.125、0.25 μg/ml 的 W₁ 均可显著抑制骨吸收陷窝形成,减少骨吸收陷窝面积($P < 0.01, P < 0.001, P < 0.001$),说明 W₁ 具有明显的抑制 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞形成破骨细胞的能力,见图 2、图 3 及表 2。

表2 W₁对骨吸收陷窝形成面积的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	W ₁ 给药量 (μg/ml)	相对骨吸收 陷窝面积(%)
RANKL 组	0	7.903 ± 0.301
RANKL + W ₁ 0.0625 μg/ml 组	0.0625	5.917 ± 0.486 ^a
RANKL + W ₁ 0.125 μg/ml 组	0.125	4.143 ± 0.432 ^b
RANKL + W ₁ 0.25 μg/ml 组	0.25	1.700 ± 0.150 ^b

注:与 RANKL 组比较,^a $P < 0.01, ^bP < 0.001$

3.3 W₁对 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞 TNF-α 表达的影响

RANKL 组 TNF-α 水平较空白对照组显著升高($P < 0.01$),说明 RANKL 诱导可显著提高 TNF-α 在 RAW264.7 细胞中的分泌水平;0.0625、0.125、0.25 μg/ml 的 W₁ 均可显著降低由 RANKL 诱导的 TNF-α 在 RAW264.7 培养上清中的异常高表达($P < 0.05, P < 0.01$ 和 $P < 0.01$),说明 W₁ 可显著抑制 RAW264.7 细胞分泌 TNF-α,见表 3。

表3 W₁对 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞 TNF-α 表达的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	W ₁ 给药量 (μg/ml)	TNF-α (ng/ml)
空白对照组	0	0.763 ± 0.050
RANKL 组	0	0.938 ± 0.087 ^a
RANKL + W ₁ 0.0625 μg/ml	0.0625	0.800 ± 0.069 ^b
RANKL + W ₁ 0.125 μg/ml W ₁	0.125	0.753 ± 0.017 ^c
RANKL + W ₁ 0.25 μg/ml W ₁	0.25	0.708 ± 0.017 ^c

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.01$;与 RANKL 组比较,^b $P < 0.05, ^cP < 0.01$

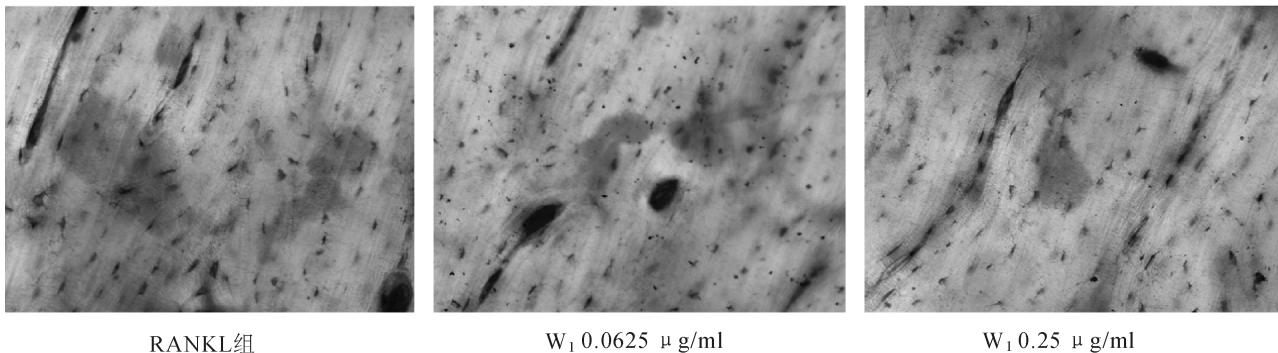


图 2 骨吸收陷窝甲苯胺蓝染色图片(×200)

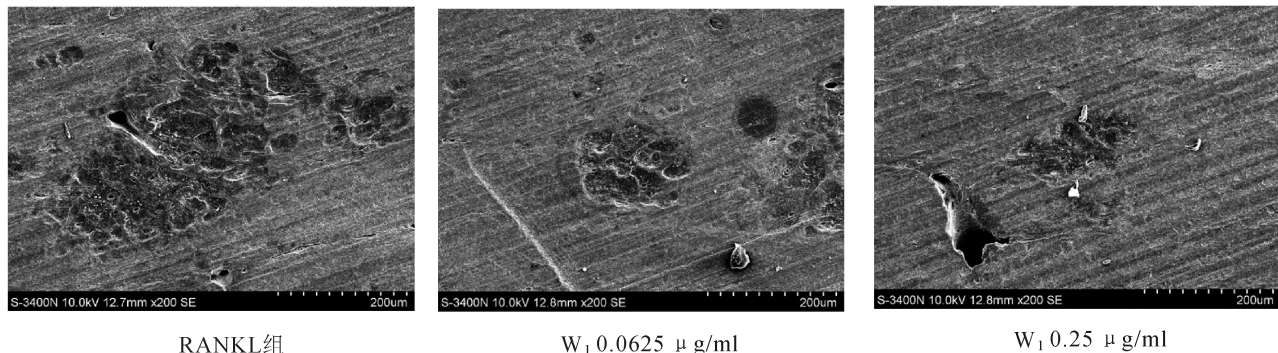


图 3 骨吸收陷窝扫描电镜图片(×200)

表 4 W₁ 对 RANKL 诱导情况下细胞毒性的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	W ₁ 给药量 ($\mu\text{g/ml}$)	吸光度
空白对照组	0	0.814 ± 0.109
RANKL 组	0	0.912 ± 0.098
RANKL + W ₁ 0.03125 $\mu\text{g/ml}$ 组	0.03125	0.918 ± 0.122
RANKL + W ₁ 0.0625 $\mu\text{g/ml}$ 组	0.0625	0.918 ± 0.134
RANKL + W ₁ 0.125 $\mu\text{g/ml}$ 组	0.125	0.842 ± 0.076
RANKL + W ₁ 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 组	0.25	0.903 ± 0.101
RANKL + W ₁ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 组	0.5	0.896 ± 0.100

表 5 W₁ 对无 RANKL 诱导情况下细胞毒性的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	W ₁ 给药量 ($\mu\text{g/ml}$)	吸光度
空白对照组	0	0.734 ± 0.019
W ₁ 0.03125 $\mu\text{g/ml}$ 组	0.03125	0.744 ± 0.011
W ₁ 0.0625 $\mu\text{g/ml}$ 组	0.0625	0.721 ± 0.020
W ₁ 0.125 $\mu\text{g/ml}$ 组	0.125	0.733 ± 0.019
W ₁ 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 组	0.25	0.753 ± 0.015
W ₁ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 组	0.5	0.767 ± 0.037

3.4 W₁ 对 RAW264.7 细胞毒性的影响

MTT 比色法所测各组吸光度值间接反映活细胞数量。结果显示,在有/无 RANKL 诱导的情况下,W₁ 在所观察的浓度范围内,对 RAW264.7 均不具有明显的增殖抑制作用,无细胞毒作用,见表 4、表 5。

4 讨论

破骨细胞在骨破坏中所起的关键作用已被研究所证实^[4]。作为体内唯一具有骨破坏能力的细胞,破骨细胞来源于单核/巨噬细胞系的造血前体细胞,并由这些前体细胞经分化、融合而成终末多核巨细胞^[5]。RAW264.7 细胞是小鼠源性破骨前体细胞,目前,通过 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞获得成熟破骨细胞是公认的体外研究破骨细胞分化的经典体系^[6-7]。该细胞体系不仅表达巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage-colony stimulating factor, M-CSF), 还表达原癌基因 c-fms (the proto-oncogene fms, c-fms) 癌基因受体 (c-fms receptor) 和核因子 κB 受体活化因子 (receptor activator of nuclear factor κB ligand, RANK), 这也解释了 RAW264.7 只需要 RANKL 诱导就能生成破骨细胞的原因^[8-9]。本研究利用 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞向成熟破骨细胞分化方法,观察到在 RANKL 诱导下,RAW264.7 细

胞由类圆形单核细胞逐渐转变为胞体较大、边缘不整齐、周围有刷状缘(褶皱)和伪足的多核细胞,且在诱导的第 7 天左右多核细胞数量达到高峰,经 TRAP 染色可见多量胞浆成玫瑰红色的多核(核 ≥ 3 个)TRAP 阳性细胞,提示了本实验条件下,破骨细胞在体外的诱导分化成功。当给予不同浓度的 W_1 干预后,TRAP 阳性细胞数目均显著减少,提示了 W_1 可抑制破骨细胞的分化。

破骨细胞形态和功能成熟是两个相对独立的阶段,功能成熟的破骨细胞可黏附于骨的表面并迁移造成不规则、波状的哈氏陷窝,形成骨侵蚀^[10],因此通过骨片上的陷窝面积反映破骨细胞的骨吸收活性,是目前定量评定体外培养破骨细胞活性的可靠方法之一^[11]。本实验发现 RANKL 诱导培养 7 天后,牛骨片经甲苯胺蓝染色,光镜下可见圆形、椭圆形、串珠形、腊肠形或不规则形等呈蓝紫色异染的陷窝,散在分布,边界清晰,大小不一;扫描电镜下观察,骨吸收陷窝的变化趋势与光镜结果一致,同一标本可清楚识别形态相似的骨吸收陷窝,边界轮廓清晰,陷窝底部粗糙,纤维纹路清晰可见,表明了本实验条件下所诱导形成的破骨细胞具有骨吸收功能。当给予不同浓度的 W_1 干预后,骨吸收陷窝面积和数量显著减少,提示了 W_1 可抑制破骨细胞的骨吸收功能。

TNF- α 不仅能直接诱导破骨细胞分化并刺激其活性,还能通过影响 OPG/RANKL/RANK 信号系统,以旁分泌形式调节破骨细胞分化,刺激骨吸收^[12]。本实验发现, TNF- α 经 RANKL 诱导在 RAW264.7 细胞中异常高表达,而一定浓度的 W_1 能显著抑制 TNF- α 的表达水平,且呈现一定的量效关系,提示 W_1 能有效降低关键炎症因子的表达。地乌总皂苷对 RA 的抑制作用已被前期的实验研究所证实,目前已知的相关作用机制是通过上调 CIA 小鼠外周血免疫负相调控受体细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4) 以及细胞因子白介素 10 (interleukin 10, IL-10)、白介素 4 (interleukin 4, IL-4)、干扰素- γ (interferon-gamma, IFN- γ) 的表达水平,抑制滑膜细胞增殖,减少血管翳形成,减少关节软骨破坏,改善 RA 病情^[13-15]。本研究通过体外实验证明了地乌总皂苷最重要的活性成分之一 W_1 能显著抑制细胞因

子 TNF- α 在体外培养的 RAW264.7 细胞中的分泌,同时有效负调节 RANKL 诱导的破骨细胞分化和骨吸收,这可能是 W_1 发挥免疫抗炎作用的药效分子机制之一。相关研究结果将为地乌总皂苷治疗 RA 机制的阐明提供初步的科学依据。

参 考 文 献

- [1] 邱飞虹,韩林涛,张国斌,等. 蜈蚣三七的化学成分及免疫抑制活性[J]. 中国药科大学学报,2008,39(6):496-499.
- [2] 邱飞虹,江俊,蒋冠斌. 地乌总甙抗炎免疫作用研究[J]. 湖北中医杂志,1995,17(118):82.
- [3] 邱飞虹,江俊,蒋冠斌. 地乌总甙对动物免疫功能的影响[J]. 实用中医药杂志,1996,12(2):40.
- [4] Lipsky PE. Osteoimmunology: a new area of rheumatology research[J]. Nat Clin Pract Rheumatol,2008,4(3):111-116.
- [5] 董伟,戚孟春,刘强,等. 阿伦膦酸盐在不同分化阶段对破骨细胞生成及骨吸收功能的影响[J]. 口腔医学研究,2011,27(3):195-198.
- [6] Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, et al. Regulation of cancer cell migration and bonemetastasis by RANKL[J]. Nature,2006,440:692-696.
- [7] 徐嘉莹,刘薇,黄宇光. Calpain 及抑制剂对小鼠破骨细胞分化的作用[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2011,4(2):101-107.
- [8] Hsu H, Lacey D, Dunstan C, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1999,96(7):3540-3545.
- [9] Shadduck RK, Waheed A, Mangan KF, et al. Preparation of a monoclonal antibody directed against the receptor for murine colony - stimulating factor - 1[J]. Exp Hematol,1993,21(4):515-520.
- [10] 甘可,冯小可,郭婕,等. 补肾方骨青颗粒对破骨细胞分化及骨吸收功能的影响[J]. 江苏医药,2013,39(12):1377-1380.
- [11] 林静吟. 中医药治疗骨质疏松症[J]. 广东药学,2004,14(3):47-49.
- [12] Liu L, Yang P, He H. Leptin increases in Vogt - Koyanagi - Harada(VKH) disease and promotes cell proliferation and inflammatory cytokine secretion [J]. Br J Ophthalmol, 2008, 92(4):557.
- [13] 张国斌. 蜈蚣三七提取物抗类风湿性关节炎免疫机理的研究[D]. 武汉:湖北中医学院,2006.
- [14] 董梦久,姜爱莉. 银莲花胶囊治疗类风湿性关节炎 40 例[J]. 湖北中医杂志,1996,18(2):8-9.
- [15] 江俊. 地乌总甙对佐剂性关节炎大鼠特异性免疫功能影响的实验研究[J]. 中药材,2002,25(3):194-195.

(收稿日期:2013-12-03)

(本文编辑:董历华)