



DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.07.012

<http://xbyx.xysm.net/xbwk/fileup/PDF/201307715.pdf>

滁菊总黄酮调控类风湿性关节炎模型大鼠 滑膜组织 Wnt 通路 SFRP4 表达

缪成贵^{1,2,3}, 刘健², 张永和², 高敏², 陈庆榆³, 何华奇³

(安徽科技学院 1. 家禽疫病监测安徽省重点实验室; 2. 食品药品学院; 3. 生命科学学院, 安徽 蚌埠 233100)

[摘要] 目的: 研究中药滁菊中主要活性成分总黄酮对类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 模型大鼠滑膜组织 Wnt 通路分泌型卷曲蛋白 4 (secreted frizzled-related protein 4, SFRP4) 基因及 SFRP4 下游基因 β -catenin 和 C-myc 表达的调控作用。方法: 采用大鼠关节炎评分法和足爪肿胀评分法评价滁菊总黄酮 (Chuju total flavonoids, CJTF) 对 RA 模型大鼠的治疗作用; RT-PCR 和 Western 印迹分别检测 CJTF 灌胃治疗对模型大鼠滑膜组织 Wnt 通路中 SFRP4, β -catenin 和 C-myc 基因 mRNA 和蛋白表达的调控作用。结果: 经 CJTF 灌胃治疗后, 模型大鼠关节炎评分、足爪肿胀评分均明显下降。模型大鼠滑膜组织中 SFRP4 基因 mRNA 和蛋白表达明显上调, 而其下游基因 β -catenin 和 C-myc 基因 mRNA 和蛋白表达明显下调。结论: CJTF 对 RA 模型大鼠有明显的治疗作用, 其机制与以 SFRP4 为靶点, 抑制 RA 模型大鼠滑膜组织 Wnt 通路的激活有关。

[关键词] 滁菊总黄酮; 类风湿性关节炎; 滑膜组织; 分泌型卷曲蛋白 4; Wnt; β -catenin

Chuju total flavonoids control the SFRP4 expression in Wnt pathway in rheumatoid arthritis model rats

MIAO Chenggui^{1,2,3}, LIU Jian², ZHANG Yonghe², GAO Min², CHEN Qingyu³, HE Huaqi³

(1. Poultry Disease Monitoring Key Laboratory; 2. Food and Drug College; 3. Life Science College,
Anhui Science and Technology University, Bengbu Anhui 233100, China)

ABSTRACT

Objective: To determine the effect of Chuju total flavonoids (CJTF) on the secreted frizzled-related protein 4 (SFRP4) expression in Wnt pathway in rheumatoid arthritis (RA) model rats.

Methods: The role of CJTF in the treatment of RA model rats was evaluated by rat arthritis score and paw edema score. The expression regulation of the SFRP4, β -catenin and C-myc in Wnt pathway in RA model rats was detected by RT-PCR and Western blot after CJTF gavage treatment.

Results: After CJTF treatment, the rat arthritis score and paw edema score in RA model rats were

收稿日期 (Date of reception): 2012-10-08

作者简介 (Biography): 缪成贵, 博士研究生, 主要从事抗炎免疫药理学研究。

通信作者 (Corresponding author): 缪成贵, Email: fensheng1981@126.com

基金项目 (Foundation items): 安徽科技学院研究项目 (ZRC2013378); 安徽省教育厅项目 (KJ2013B082)。This work was supported by the fund from the Anhui Science and Technology University Research Project (ZRC2013378) and the Department of Education Projects in Anhui Province (KJ2013B082), P.R. China.

significantly decreased when the RA model rats were treated with CJTF, the SFRP4 expression was significantly up-regulated, while the β -catenin and C-myc gene expression were significantly down-regulated in RA model rat synovial tissues.

Conclusion: CJTF has significant therapeutic effect and inhibitory effect on Wnt pathway activation by targeting SFRP4 in RA model rat synovium.

KEY WORDS

Chuju total flavonoids; rheumatoid arthritis; sonyvium; SFRP4; Wnt; β -catenin

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节滑膜炎为特征的慢性全身性自身免疫性疾病。RA发病过程中首先发生病变的是关节滑膜,表现为滑膜的增生和炎症,进而导致骨和软骨的破坏,发病机制目前仍不清楚,但极有可能与关节独特的解剖和生理结构有关^[1-2]。滑膜细胞的激活增生、淋巴细胞的侵入、微血管的生成导致滑膜向软骨表面侵袭增生形成血管翳,破坏骨和软骨的结构和功能^[3-4]。多种信号通路参与调控RA的发生发展,虽然Wnt通路调控RA发生发展的研究起步较晚,但研究^[5]已证明Wnt通路在RA发生过程中起重要调控作用。在RA发生过程中Wnt1, Wnt5a, Wnt7b显著高表达,而下调Wnt1, Wnt5a, Wnt7b能够抑制关节成纤维化滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLS)活化增殖,预示Wnt通路相关分子可能是潜在的RA治疗靶点^[6]。SFRP4是Wnt信号通路上游负调控基因, β -catenin是经典Wnt通路关键基因,C-myc是经典Wnt通路下游重要效应基因,并且与RA滑膜异常增生直接相关。RA发生时,上游SFRP4表达下调, β -catenin和C-myc表达均明显上调,滑膜异常增生^[5-6]。滁菊位列中国四大药用名菊之首,具有清热解毒等功效,亦是具有重要保健作用的食物。本课题以滁菊中主要化学成分滁菊总黄酮(Chuju total flavonoids, CJTF)为研究对象,研究CJTF对RA发生相关基因SFRP4, β -catenin和C-myc表达的调控作用,探讨其对RA模型大鼠滑膜组织异常增生的调控作用。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

1.1.1 仪器设备

梯度PCR仪购自美国ABI公司;CO₂培养箱购自美国Thermo公司;电泳仪和半干转膜仪购自美国Bio-rad公司;倒置显微镜购自奥林巴斯公司;

ChemiScope3400 Mini化学发光成像购自上海勤翔科学仪器有限公司;101AS-3型数显恒温干燥箱购自上海浦东跃欣科学仪器厂;超净工作台购自江苏净化仪器设备有限公司。

1.1.2 药品试剂

CJTF由安徽科技学院药学系天然药物化学室研制。取滁菊花干燥叶,90%乙醇提取后减压浓缩,水溶后调pH值至2.0,乙醚萃取有机相精制浓缩,水相大孔树脂吸附,二者混合得CJTF含量>80%。反转录试剂盒和PCR试剂盒购自美国Fermentas公司;C-myc抗体和SFRP4抗体购自美国Santa公司; β -catenin抗体购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 RA模型大鼠制备

SD雄性大鼠,体质量180~200 g,由安徽医科大学实验动物中心提供(合格证号:皖医动准01号),随机分为5组:正常组、模型组、CJTF(50, 100, 150 mg/kg),每组10只。模型组以完全弗氏佐剂于每只大鼠右后足趾皮内注射0.1 mL致炎,正常对照组注射0.1 mL PBS。造模后进行关节炎评分和足爪肿胀评分。

1.2.2 RA模型大鼠关节炎和足爪肿胀评分

关节炎评分:RA模型大鼠1只耳朵出现结节和红肿记1分,1只鼻子出现结节和红肿记1分,1只尾巴出现结节和红肿记1分,1只足爪出现结节和红肿记1分,每只RA模型大鼠的关节炎最高评分为8分。

足爪肿胀评分:RA模型大鼠每只足爪包括5只指关节或趾关节,1只腕关节或踝关节,每个小关节出现结节和红肿记为1分,每只RA模型大鼠的足爪肿胀最高评分为24。

1.2.3 RT-PCR, Western 印迹检测 RA模型大鼠滑膜组织 SFRP4, β -catenin 和 C-myc 基因表达

TRIzol试剂提取大鼠滑膜组织细胞总RNA,

Fermentas反转录酶反转录得到cDNA。PCR引物(表1)由上海生工合成, PCR扩增反应条件为: 94 °C预变性5 min, 94 °C变性40 s, 54 °C复性40 s(β -catenin, SFRP4, C-myc), 72 °C延伸1 min, 35个循环。PCR产物在琼脂糖凝胶上进行电泳, 凝胶成像用Quantity One v 4.6软件分析。

Western裂解液充分裂解滑膜组织, 4 °C下12000 r/min离心30 min后取上清, 加入上样缓冲液后100 °C加热10 min。每孔上样20 μ L总蛋白进行SDS-PAGE。电泳后半干转蛋白至

PVDF膜上, 5%的脱脂奶粉封闭3 h, 加一抗, 一抗 β -catenin, SFRP4和C-myc均为1:1000稀释。4 °C孵育过夜后加二抗, 室温孵育2h, ECL发光试剂盒显影, 以 β -actin为内对照, 分析蛋白条带光密度值。

1.3 统计学处理

数据分析采用SPSS17.0软件, 所有数据结果均以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间比较采用One-Way ANOVA检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 RT-PCR primer sequence

Primer name	Primer sequence (5' \rightarrow 3')	Size/bp
β -catenin1 5'-F	CTGACCAAAGTCTAAATGACG	208
β -catenin1 5'-R	GATGGTGGGAAAGGTTGTGTAG	208
SFRP4 5'-F	CTTCATCACCTATCCCTCGAAC	241
SFRP4 5'-R	CTGGCTAITTGCTTCTTGTCTT	241
C-myc 5'-F	TCTTGAACGTCAGAGGAGAA	142
C-myc 5'-R	GCTTGAACGGACAGGATGTAG	142
β -actin 5'-F	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC	345
β -actin 5'-R	ACGCAGCTCAGTAACAGTCCG	345

2 结果

2.1 CJTF 对 RA 模型大鼠的治疗作用

RA模型大鼠在造模后第17天出现继发性炎症, 四肢、耳朵、鼻子、尾巴出现红肿或结节, 关节炎评分显著增高; 与模型组相比, CJTF能显著降低RA大鼠关节炎评分($P<0.05$, 图1A)。RA模型大鼠在造模后第17天, 足爪肿胀评分显著增加, 与模型组相比, CJTF能显著降低RA模型大鼠的足爪肿胀评分($P<0.05$, 图1B)。

2.2 CJTF 对 RA 模型大鼠滑膜组织 SFRP4 基因表达的调控作用

与正常对照大鼠相比, RA模型大鼠滑膜组织中Wnt通路上游基因SFRP4 mRNA和蛋白表达均明显降低; RA模型大鼠灌胃CJTF治疗后, 滑膜组织中

SFRP4 mRNA和蛋白表达明显上调($P<0.05$, 图2)。

2.3 CJTF 对 RA 模型大鼠滑膜组织 β -catenin 基因表达的调控作用

与正常对照大鼠相比, RA模型组大鼠滑膜组织中经典Wnt通路关键基因 β -catenin mRNA和蛋白表达明显升高, CJTF灌胃治疗后 β -catenin mRNA和蛋白表达明显下调($P<0.05$, 图3)。

2.4 CJTF 对 RA 模型大鼠滑膜组织 C-myc 基因表达的调控作用

与正常对照大鼠相比, RA模型组大鼠滑膜组织中C-myc mRNA和蛋白表达明显上调, CJTF灌胃治疗后C-myc mRNA和蛋白表达明显下调($P<0.05$; 图4, 5)。

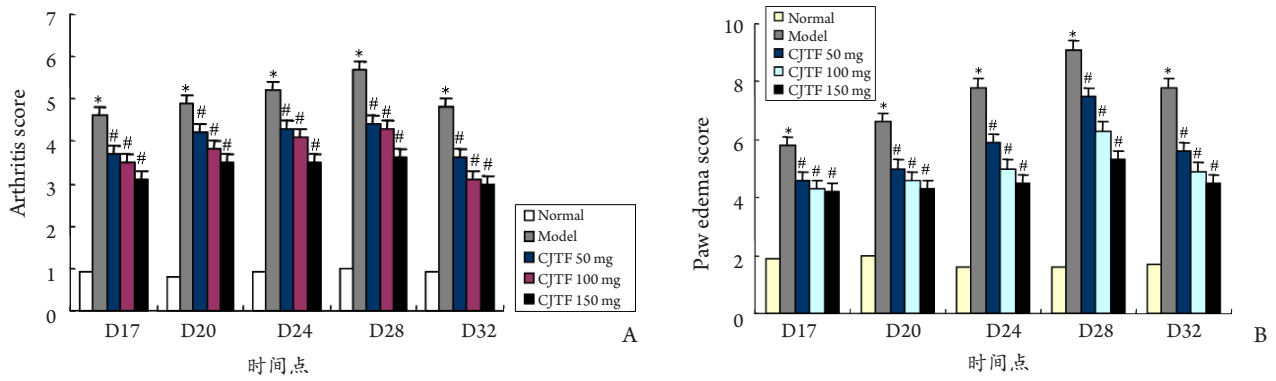


图 1 CJTF 对 RA 大鼠关节炎评分 (A) 和足爪肿胀评分 (B) 的影响 ($n=3, \bar{x}\pm s$)。与 normal 组比较, $^*P<0.05$; 与 model 组比较, $^{\#}P<0.05$ 。

Figure 1 Effects of CJTF on arthritis score (A) and paw edema score (B) of RA rat ($n=3, \bar{x}\pm s$). $^*P<0.05$ vs the normal group; $^{\#}P<0.05$ vs the model group.

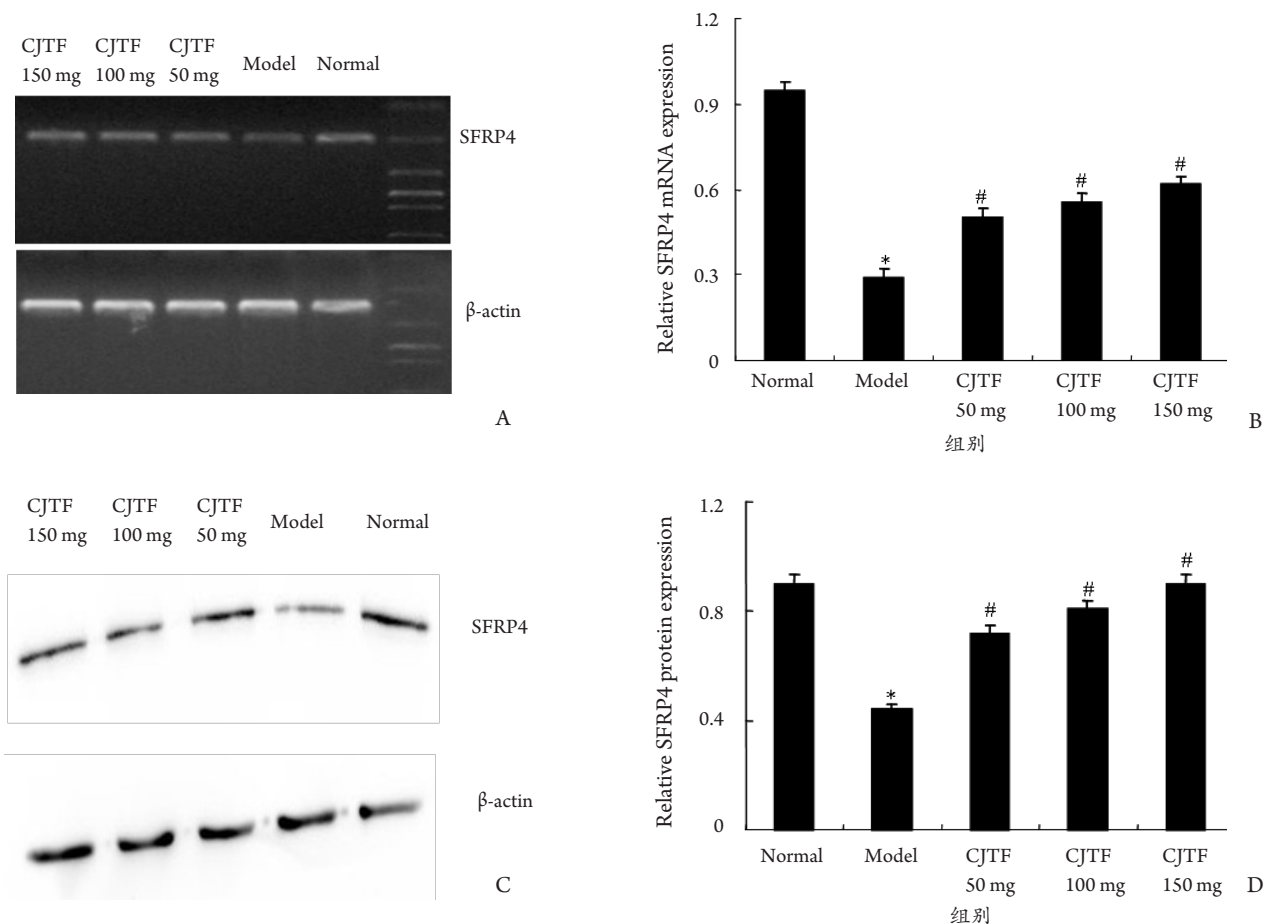


图 2 CJTF 对 RA 大鼠滑膜组织 SFRP4 表达的影响。A: RT-PCR 电泳图; B: SFRP4 mRNA 表达结果分析直方图 ($n=3, \bar{x}\pm s$); C: Western 印迹电泳图; D: SFRP4 蛋白表达结果分析直方图 ($n=3, \bar{x}\pm s$)。与 normal 组比较, $^*P<0.05$; 与 model 组比较, $^{\#}P<0.05$ 。

Figure 2 Effects of CJTF on the expression of SFRP4 in RA rat synovium. A: Electrophoretogram of RT-PCR; B: Analysis of the SFRP4 mRNA expression ($n=3, \bar{x}\pm s$); C: Electrophoretogram of Western blot; D: Analysis of the SFRP4 protein expression ($n=3, \bar{x}\pm s$). $^*P<0.05$ vs the normal group; $^{\#}P<0.05$ vs the model group.

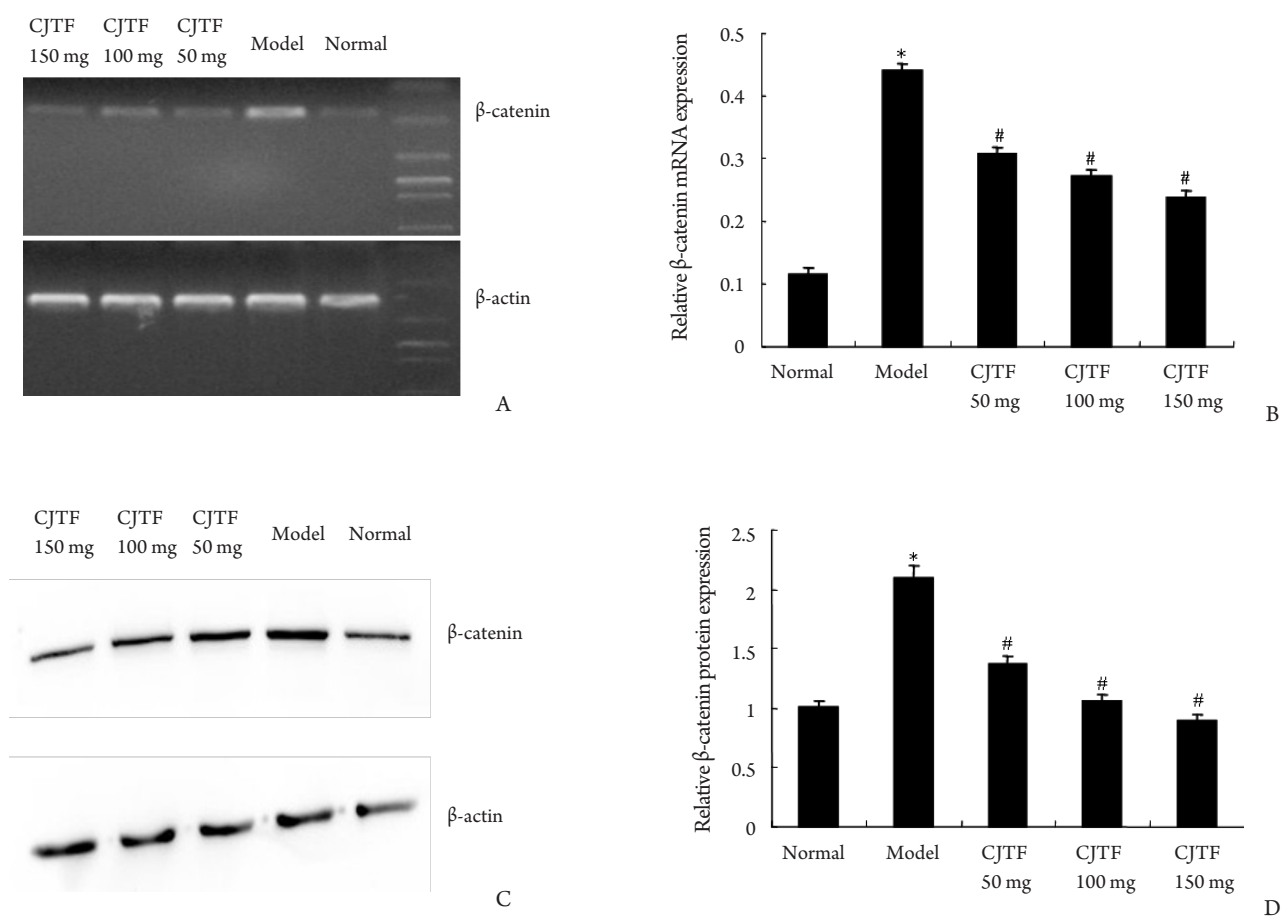


图3 CJTF对RA大鼠滑膜组织 β -catenin表达的影响。A: RT-PCR电泳图; B: β -catenin mRNA表达结果分析直方图($n=3, \bar{x}\pm s$); C: Western印迹电泳图; D: β -catenin蛋白表达结果分析直方图($n=3, \bar{x}\pm s$)。与normal组比较, * $P<0.05$;与model组比较, # $P<0.05$ 。

Figure 3 Effects of CJTF on the expression of β -catenin in RA rat synovium. A: Electrophoretogram of RT-PCR; B: Analysis of the β -catenin mRNA expression ($n=3, \bar{x}\pm s$); C: Electrophoretogram of Western blot; D: Analysis of the β -catenin protein expression ($n=3, \bar{x}\pm s$). * $P<0.05$ vs the normal group; # $P<0.05$ vs the model group.

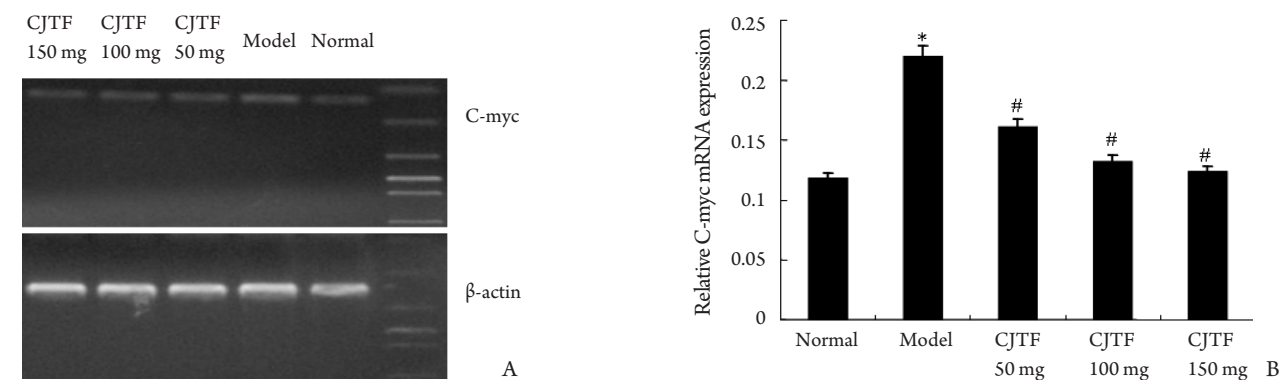


图4 CJTF对RA大鼠滑膜组织C-myc mRNA表达的影响。A: RT-PCR电泳图; B: 直方图($n=3, \bar{x}\pm s$)。与normal组比较, * $P<0.05$;与model组比较, # $P<0.05$ 。

Figure 4 Effects of CJTF on the expression of C-myc mRNA in RA rat synovium. A: Electrophoretogram of RT-PCR; B: Analysis of the C-myc mRNA expression ($n=3, \bar{x}\pm s$). * $P<0.05$ vs the normal group; # $P<0.05$ vs the model group.

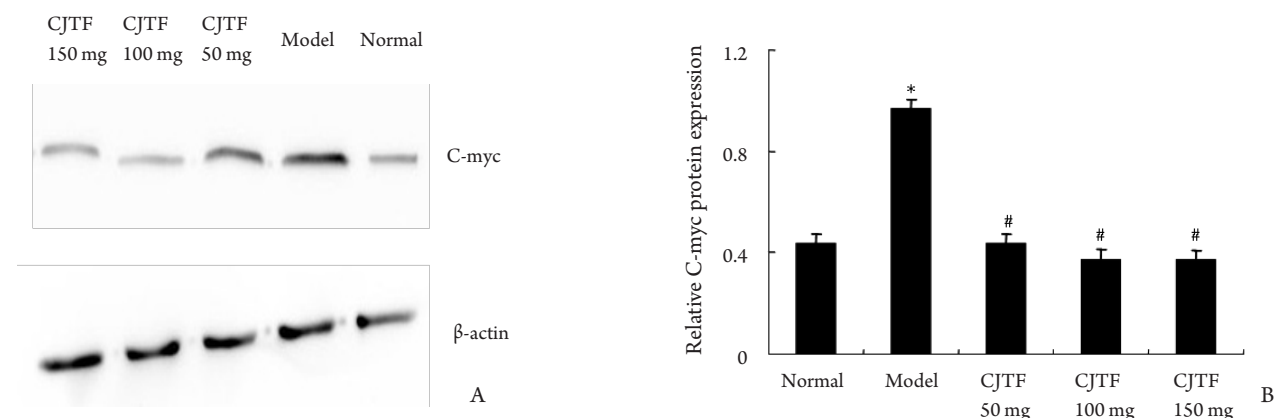


图5 CJTF对RA大鼠滑膜组织C-myc蛋白表达的影响。A: Western印迹电泳图; B: C-myc蛋白表达结果分析直方图($n=3, \bar{x}\pm s$)。与normal组比较, $^*P<0.05$; 与model组比较, $^*P<0.05$ 。

Figure 5 Effects of CJTF on the expression of C-myc protein in RA rat synovium. A: Electrophoretogram of Western blot; B: Analysis of the C-myc protein expression ($n=3, \bar{x}\pm s$). $^*P<0.05$ vs the normal group; $^*P<0.05$ vs the model group.

3 讨论

Wnt和Fz家族基因首先在果蝇中被发现, 之后证实Wnt通路在哺乳动物各组织细胞水平上广泛存在, 在细胞增殖、细胞分化、四肢发育、胚胎发育中起重要调控作用。随进一步深入研究发现Wnt通路广泛参与了肿瘤的发生发展、肿瘤细胞的侵袭生长等^[7-8]。Wnt蛋白家族存在多个成员, 在细胞外结合到细胞表面FZ多肽胞外区后, 通过FZ介导的跨膜多肽启动了一系列的信号激活信号。FZ类似于G蛋白跨膜多肽, 其胞外区同时可以结合Wnt通路负调控蛋白DKK, 阻断Wnt介导的激活信号。Wnt通路另一类重要的负调控蛋白即是SFRP蛋白家族, 目前研究发现共存在5个SFRP蛋白, 分别是SFRP1, 2, 3, 4和5^[9-12]。SFRPs具有与FZ胞外区相似的结构域, 理论上5个SFRP蛋白都能和Wnt蛋白结合, 阻断Wnt蛋白在细胞膜外启动的Wnt信号, 但在不同的组织、细胞水平, SFRPs的作用并不相同。我们研究发现, RA模型大鼠滑膜组织中SFRP4表达明显升高, 而其他的4个SFRP蛋白表达差异并不明显。RA发生前, Wnt通路上游负调控基因SFRP4的表达量较高, 高表达的SFRP4能够抑制Wnt通路信号, 抑制滑膜的异常增殖。RA发生过程中, SFRP4表达明显下调, 经典Wnt通路基因 β -catenin, C-myc表达明显上调, 导致了滑膜的异常增生。CJTF灌胃RA模型大鼠后, 关节滑膜组织中SFRP4表达明显上调, 验证了SFRP4在RA发生发展中起到了重要调控作用, 并且CJTF对RA的治疗作用可能是通过对SFRP4的调控实现的。

目前的研究证实了RA的发生发展与Wnt通路的异常激活有直接的关系。Wnt1蛋白在RA病人滑

膜组织中显著高表达, 并且高于炎症较轻为特征的骨关节炎。在RA病人关节滑膜分离的FLS中同样检测到Wnt 1的差异表达, 下调Wnt 1蛋白表达能够显著抑制RA FLS的增殖。Wnt 5a是另一个被证实的参与RA发病机制的Wnt蛋白, 抑制Wnt 5a蛋白表达能够明显减轻RA模型大鼠关节滑膜增生和炎症^[13-14]。在骨关节炎病人软骨和RA病人滑膜中Wnt 7b表达明显上调, 当向软骨细胞和滑膜细胞转染Wnt 7b后TNF- α , IL-1b和IL-6表达上调, 这些因子在RA的发病机制中起重要作用^[15]。Wnt 1, Wnt 5a, Wnt 7b等蛋白在RA发生过程中通过Wnt通路促进FLS活化、增殖, 促进炎症发展、骨的侵蚀等, 同时有研究表明SFRP 1在RA滑膜组织和正常关节滑膜组织中表达有差异, 并且在RA发生过程中SFRP 1极有可能通过表观遗传学修饰下调导致Wnt通路激活促进FLS的活化、增殖^[16]。药用菊花主要活性成分为黄酮、三萜类等化合物, 具有多种药理活性, 在心血管、抗病毒、抗肿瘤等方面活性研究报道较多。滁菊花为滁州产安徽地道药材, 药食两用, 既有重要的保健作用又有较大的经济价值。鉴于Wnt信号通路在RA滑膜异常增殖中的重要作用, 本课题研究CJTF对RA模型大鼠滑膜组织Wnt通路的调控作用, 并证明CJTF对RA模型大鼠滑膜组织低表达的SFRP4具有上调作用, 上调的SFRP4抑制了 β -catenin, C-myc的表达, 抑制了RA模型大鼠滑膜的异常增殖。与国内外同类研究相比, 首次研究了安徽滁州地区地道药材滁菊中总黄酮对RA的治疗作用, 探讨了这种作用的分子机制, 为安徽滁州地道药材滁菊的综合开发和RA治疗奠定了实验基础。

参考文献

1. Keen HI, Emery P. How should we manage early rheumatoid arthritis? From imaging to intervention[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2005, 17(3): 280-285.
2. Huang YJ, Shiau AL, Chen SY, et al. Multivalent structure of galectin-1-nanogold complex serves as potential therapeutics for rheumatoid arthritis by enhancing receptor clustering[J]. *Eur Cell Mater*, 2012, 13(23): 170-181.
3. Tugnet N, Cooper S, Douglas K. Methotrexate therapy, rheumatoid arthritis, and life-threatening liver complications: should we be monitoring more closely?[J]. *Scand J Rheumatol*, 2012, 41(2): 163-164.
4. Tedesco A, D Agostino D, Soriente I, et al. A new strategy for the early diagnosis of rheumatoid arthritis: a combined approach[J]. *Autoimmun Rev Jan*, 2009, 8(3): 233-237.
5. Rabelo Fde S, da Mota LM, Lima RA, et al. The Wnt signaling pathway and rheumatoid arthritis[J]. *Autoimmun Rev*, 2010, 9(4): 207-210.
6. Sen M, Reifert J, Lauterbach K, et al. Regulation of fibronectin and metalloproteinase expression by Wnt signaling in rheumatoid arthritis synoviocytes[J]. *Arthritis Rheum*, 2002, 46(11): 2867-2877.
7. Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, et al. A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer[J]. *Nat Genet*, 2002, 31(2): 141-149.
8. Urakami S, Shiina H, Enokida H, et al. Combination analysis of hypermethylated Wnt-antagonist family genes as a novel epigenetic biomarker panel for bladder cancer detection[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(7Pt1): 2109-2116.
9. Nojima M, Suzuki H, Toyota M, et al. Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer[J]. *Oncogene*, 2007, 26(4): 4699-4713.
10. Lin YW, Chung MT, Lai HC, et al. Methylation analysis of SFRP genes family in cervical adenocarcinoma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009, 135(12): 1665-1674.
11. Takagi H, Sasaki S, Suzuki H, et al. Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes in hepatocellular carcinoma[J]. *J Gastroenterol*, 2008, 43(5): 378-389.
12. Kawakami K, Yamamura S, Hirata H, et al. Secreted frizzled-related protein-5 is epigenetically downregulated and functions as a tumor suppressor in kidney cancer[J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(3): 541-550.
13. Sen M, et al. Blockade of Wnt-5A/frizzled 5 signaling inhibits rheumatoid synoviocyte activation[J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(4): 772-781.
14. Yuasa T, Iwamoto ME. Mechanism of cartilage matrix remodeling by Wnt[J]. *Clin Calcium*, 2006, 16(6): 1034-1039.
15. Nakamura Y, Nawa ta M, Wakitani S. Expression profiles and functional analyses of Wnt-related genes in human joint disorders[J]. *Am J Pathol*, 2005, 167(1): 1-3.
16. Imai K, Morikawa M, D'Armiento J, et al. Differential expression of WNTs and FRPs in the synovium of rheumatoid arthritis and osteoarthritis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345(4): 1615-1620.

(本文编辑 郭征)

本文引用: 缪成贵, 刘健, 张永和, 高敏, 陈庆榆, 何华奇. 滁菊总黄酮调控类风湿性关节炎模型大鼠滑膜组织 Wnt 通路 SFRP4 表达 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2013, 38(7): 715-721. DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.07.012

Cite this article as: MIAO Chenggui, LIU Jian, ZHANG Yonghe, GAO Min, CHEN Qingyu, HE Huaqi. Chuju total flavonoids control the SFRP4 expression in Wnt pathway in rheumatoid arthritis model rats[J]. *Journal of Central South University. Medical Science*, 2013, 38(7): 715-721. DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.07.012