

白花丹素对类风湿关节炎大鼠 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响*

梅敦成, 黄 恒, 杨庆红**

(湖北省第三人民医院阳逻院区 武汉 430000)

摘 要:目的 探究白花丹素(PLB)对类风湿关节炎(RA)大鼠 Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)信号通路的影响。方法 将60只SD大鼠(每组12只)随机分为对照组、模型组、地塞米松组(模型+30 mg·kg⁻¹地塞米松)、PLB-L组(2 mg·kg⁻¹ PLB)、PLB-M组(4 mg·kg⁻¹ PLB)和PLB-H组(6 mg·kg⁻¹ PLB);除对照组外均构建胶原诱导的关节炎(CIA)大鼠模型,药物组给予相应剂量的药物,对照组与模型组以生理盐水代替;观察大鼠一般情况;记录大鼠热刺激缩足反射潜伏期(PWTL)、机械性痛阈(PWT)及关节炎症积分;HE染色观察大鼠足关节滑膜组织病理学变化;酶联免疫吸附实验(ELISA)检测大鼠关节滑膜组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)水平;免疫印迹法检测各组关节滑膜组织中 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白表达情况。结果 与对照组相比,模型组大鼠皮毛无光泽、关节肿胀、跛行、活动量与进食量减少、精神倦怠;地塞米松组、PLB-L组、PLB-M组和PLB-H组大鼠皮毛光泽度、脱毛情况、饮食、精神及行动得到改善;与对照组相比,模型组大鼠PWT、PWTL显著降低,而关节炎症积分、足关节滑膜组织病理学程度、TNF- α 、IL-6、Wnt3a、 β -catenin、糖原合成酶激酶-3(GSK-3 β)和基质金属蛋白酶13(MMP-13)水平显著增加($P<0.05$);与模型组相比,地塞米松组、PLB-L组、PLB-M组和PLB-H组PWT、PWTL显著增加,而关节炎症积分、足关节滑膜组织病理学程度、TNF- α 、IL-6、Wnt3a、 β -catenin、GSK-3 β 和MMP-13表达水平显著降低,存在PLB剂量依赖性($P<0.05$);与地塞米松组相比,PLB-H组上述指标无显著性差异($P>0.05$)。结论 PLB对CIA大鼠关节滑膜增生及炎症反应的抑制作用,可能与其抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路有关。

关键词: 白花丹素 类风湿关节炎 Wnt/ β -连环蛋白 关节滑膜 炎症

doi: 10.11842/wst.20210511003 中图分类号: R285.5 文献标识码: A

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种受环境和遗传因素共同影响的炎症性关节炎症,其作为自身免疫性系统疾病^[1],关节肿胀、疼痛、功能下降、变性是其主要临床表现,而其主要特征在于慢性炎症,可刺激关节滑膜成纤维细胞增殖,进而引发滑膜炎,而增生组织入侵软骨或骨组织会造成患者软骨、骨骼损伤,甚至残疾,严重影响患者寿命和生活质量^[2-4],由此,抑制滑膜增生对治疗RA具有重要作用^[5]。目前甲氨蝶呤及地塞米松等抗风湿药是治疗RA的常用药

物,虽然可在一定程度上缓解疾病程度,但该治疗方案并非对所有患者有效,有许多患者对该类治疗药物无反应,因此有必要寻找新的治疗药物以提高治疗效果^[3]。

白花丹是一种天然野生草药,对风湿性关节疼痛、血瘀闭经等疾病具有较好的改善作用,白花丹素(plumbagin, PLB)是其主要有效成分,有抗炎抑菌、抗纤维化等作用^[6]。研究表明,PLB能有效促进人RA成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocyte, FLS)凋亡

收稿日期:2021-05-11

修回日期:2022-05-21

* 武汉市卫生和计划生育委员会科研项目(WX18D51):锥形扩张器在椎间孔治疗腰椎间盘突出症中的应用,负责人:杨庆红。

** 通讯作者:杨庆红,主任医师,疼痛科主任,主要研究方向:神经病理性疼痛。

并抑制炎症反应,从而对RA具有改善作用^[7]。Wnt/ β -连环蛋白(Wnt/ β -catenin)信号通路对大量与代谢、生长相关的基因具有调控作用,并且与骨质疏松、股骨头坏死、骨关节炎等骨相关疾病的发生密切相关^[8-10],除此之外,其已被发现在RA中具有重要作用,其激活可导致关节滑膜增生及滑膜液中大量炎性因子的分泌,造成滑膜炎损伤^[5]。在人骨肉瘤细胞中,PLB能够通过抑制Wnt/ β -catenin通路信号转导起到抗骨肉瘤细胞增殖的作用^[11]。

目前关于PLB对RA中Wnt/ β -catenin通路的影响还未见报道,并且PLB在RA中的影响机制是否可能与其调控Wnt/ β -catenin通路有关也未可知。因此,本研究以期通过探究PLB对CIA大鼠Wnt/ β -catenin信号通路的影响,以及其在RA中的可能作用机制,为RA新治疗药物的寻找提供参考。

1 材料

1.1 实验动物

从长春市亿斯实验动物技术有限责任公司购买60只SPF级SD大鼠(242-289 g),许可证:SCXK(吉)2016-0004,于正常12 h明暗交替环境中适应性饲养一周,期间保持环境通风,大鼠自由饮水、采食,实验前禁食12 h。

1.2 主要试剂

白花丹素(货号:T2841c)购自TargetMol公司;地塞米松(批准文号:国药准字H20053754)购自西安国康瑞金制药有限公司;肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)酶联免疫吸附实验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒(货号:ER1393、ER0042)购自武汉菲恩生物科技有限公司;HE染色试剂盒(货号:G1120-100)购自北京索莱宝科技有限公司;蛋白提取试剂盒(货号:CD-13559-ML)购自武汉纯度生物科技有限公司;蛋白检测试剂盒、HRP标记的山羊抗兔IgG二抗抗体(货号:HR0329-ZHV、JN0200-GLH)购自北京百奥莱博科技有限公司;兔抗 β -actin(货号:4970)、 β -catenin(货号:8480)、糖原合成酶激酶-3(GSK-3 β)(货号:9315)、Wnt3a抗体(货号:2721)购自Cell Signaling Technology;基质金属蛋白酶13(matrix metalloproteinase 13, MMP-13)(货号:18165-1-AP)购自Proteintech。

蛋白凝胶成像仪购自美国Bio-Rad公司;Von Frey纤维丝测痛仪购自上海玉研科学仪器有限公司;热痛敏刺激仪购自天津伯尔尼科技有限公司;SpectraMax iD3多功能酶标仪购自美谷分子仪器(上海)有限公司。

2 方法

2.1 分组与模型构建

将60只SD大鼠(每组10只)随机分为对照组、模型组、地塞米松组(模型+30 mg·kg⁻¹地塞米松)^[12]、PLB-L组(2 mg·kg⁻¹ PLB)、PLB-M组(4 mg·kg⁻¹ PLB)、PLB-H组(6 mg·kg⁻¹ PLB)^[13]。关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)模型构建:10 mg牛II型胶原与0.1 mol·L⁻¹冰醋酸(5 mL)混匀后4℃过夜,将上述溶液与完全弗氏佐剂等体积混合、乳化(质量浓度1 g·L⁻¹)于右后足跖足垫皮下注射0.1 mL,7天后以相同溶液于尾根部注射0.1 mL进行加强免疫1周,若大鼠出现四肢甚至尾部出现红肿即全身多发性关节炎,视为造模成功^[12];将造模成功的大鼠进行为期2周的灌胃,地塞米松组、PLB-L组、PLB-M组、PLB-H组大鼠分别每天给予等量的30 mg·kg⁻¹地塞米松及2 mg·kg⁻¹ PLB、4 mg·kg⁻¹ PLB、6 mg·kg⁻¹ PLB,对照组与模型组大鼠给予等量生理盐水。

2.3 关节炎积分评价

灌胃结束后进行关节炎积分评价:0分(正常):无肿胀,2分(轻度):皮肤纹理变浅、骨标志明显、触之柔软、轻度肿胀,4分(中度):皮肤纹理消失、骨标志不明显、触之发硬、明显肿胀,6分(重度):严重肿胀、骨标志消失、皮肤紧绷、触之发硬^[12]。

2.4 大鼠热刺激缩足反射潜伏期(paw withdrawal thermal latency, PWTL)及机械性痛阈(paw withdrawal mechanical threshold, PWT)检测

使用热痛敏刺激仪照射各组大鼠后足底掌心,当大鼠后足移动时系统记录反映时间,即为PWTL;使用von Frey纤维丝测痛仪中的Von Frey纤维丝刺激各组大鼠后足底中部至轻度弯曲5 s,大鼠后足骤抬即为一次阳性反应(每次间隔大于60 s),重复5次,若大于三次出现阳性反应,则此力度即为PWT^[12]。

2.5 HE染色观察大鼠足关节滑膜组织病理学变化

随机取5只大鼠,腹腔注射水合氯醛(10%)进行麻醉后于关节腔中注射生理盐水(1 mL),活动关节,

抽取并收集关节液后取足关节滑膜组织于4%多聚甲醛中固定,24 h后乙醇脱水、石蜡包埋、切片(4 μm)、二甲苯脱蜡及梯度乙醇处理,再进行HE染色、脱水、封片、显微镜观察($n=5$)。

2.6 ELISA法检测大鼠关节液中炎症因子水平

取2.5所得关节液,严格根据TNF- α 、IL-6 ELISA检测试剂盒说明书实验步骤进行操作,于酶标仪450 nm处检测关节液中二者的水平。

2.7 免疫印迹法检测关节滑膜组织中蛋白表达情况

另取5只大鼠关节滑膜组织,在研钵中研磨后通过苯甲基磺酰氟(Phenylmethanesulfonyl fluoride、PMSF)裂解后提取总蛋白,经二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法检测总蛋白含量;取上样缓冲液与蛋白混匀后100 $^{\circ}\text{C}$ 进行5min变性,以每孔40 μg 的量进行SDS-PAGE凝胶电泳,低温转移蛋白至聚偏氟乙烯(Poly vinylidene fluoride),PVDF膜上,5%的脱脂奶粉封闭(1 h)后,1:1000加入兔抗 β -actin、Wnt3a、 β -catenin、GSK-3 β 和MMP-13一抗孵育(4 $^{\circ}\text{C}$)过夜,PBS清洗3次后HRP标记的山羊抗兔IgG二抗(1:3000)孵育2 h,添加免疫印迹化学发光试剂(ECL Reagent)进行显色,蛋白凝胶成像仪观察,定量分析各蛋白含量($n=5$)。

2.8 统计学分析

数据采用SPSS 23.0统计学软件进行分析,计量资料用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)进行描述,多组间行单因素方差分析,采用snk-q检验进行多组间进一步两两比较; $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结论

3.1 各组大鼠一般情况比较

对照组大鼠皮毛光亮、关节无肿胀、可灵活运动;模型组大鼠皮毛无光泽、关节肿胀、跛行、活动量与进食量减少、精神倦怠;地塞米松组、PLB-L组、PLB-M组和PLB-H组大鼠皮毛光泽度、脱毛情况、饮食、精神及行动以PLB剂量依赖性的方式得到改善。

3.2 PLB对大鼠PWT、PWTl、关节炎症积分的影响

与对照组相比,模型组大鼠PWT、PWTl显著降低,而关节炎症积分显著增加($P<0.05$);与模型组相比,地塞米松组、PLB-L组、PLB-M组和PLB-H组PWT、PWTl显著增加,而关节炎症积分显著降低($P<$

0.05);与PLB-L组相比,PLB-M组和PLB-H组PWT、PWTl显著增加,而关节炎症积分显著降低($P<0.05$);与PLB-M组相比,PLB-H组PWT、PWTl显著增加,而关节炎症积分显著降低($P<0.05$)。与地塞米松组相比,PLB-L组、PLB-M组PWT、PWTl显著降低,而关节炎症积分显著增加($P<0.05$),PLB-H组PWT、PWTl、关节炎症积分无显著性差异($P>0.05$)(表1)。

3.3 PLB对大鼠足关节滑膜结构的影响

对照组大鼠关节滑膜结构正常,无病理学现象;模型组出现炎性细胞浸润、滑膜层水肿、增厚明显;地塞米松组、PLB-L组、PLB-M组和PLB-H组炎性细胞浸润、滑膜层水肿增生现象以PLB剂量依赖性的方式逐渐减少(图1)。

3.4 PLB对大鼠关节液中炎症因子水平的影响

与对照组相比,模型组大鼠关节液中TNF- α 、IL-6水平显著增加($P<0.05$);与模型组相比,地塞米松组、PLB-L组、PLB-M组和PLB-H组TNF- α 、IL-6水平显著降低($P<0.05$);与PLB-L组相比,PLB-M组和PLB-H组TNF- α 、IL-6水平显著降低($P<0.05$);与PLB-M组相比,PLB-H组TNF- α 、IL-6水平显著降低($P<0.05$);与地塞米松组相比,PLB-L组、PLB-M组TNF- α 、IL-6水平显著增加($P<0.05$),PLB-H组TNF- α 、IL-6水平无显著性差异($P>0.05$)(表2)。

3.5 PLB对大鼠关节滑膜组织Wnt/ β -catenin通路相关蛋白的影响

与对照组相比,模型组大鼠关节滑膜组织Wnt3a、 β -catenin、GSK-3 β 和MMP-13表达水平显著增加($P<0.05$);与模型组相比,地塞米松组、PLB-M组和PLB-H组Wnt3a、 β -catenin、GSK-3 β 和MMP-13表达水平显著降低($P<0.05$),PLB-L组Wnt3a、 β -catenin、GSK-

表1 PLB对大鼠PWT、PWTl、关节炎症积分的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	PWT(g)	PWTl(s)	关节炎症积分(分)
对照组	37.31 $\pm$ 6.12	22.76 $\pm$ 3.76	0
模型组	10.72 $\pm$ 3.30 ^a	7.08 $\pm$ 1.09 ^a	13.61 $\pm$ 1.77 ^a
地塞米松组	35.60 $\pm$ 5.34 ^b	20.30 $\pm$ 3.37 ^b	3.14 $\pm$ 0.49 ^b
PLB-L组	16.40 $\pm$ 1.37 ^{bce}	10.58 $\pm$ 1.61 ^{bce}	10.01 $\pm$ 0.48 ^{bce}
PLB-M组	23.94 $\pm$ 3.60 ^{bce}	15.23 $\pm$ 2.36 ^{bce}	6.55 $\pm$ 0.75 ^{bce}
PLB-H组	34.07 $\pm$ 4.49 ^{bcd}	19.10 $\pm$ 2.58 ^{bcd}	3.11 $\pm$ 0.36 ^{bcd}

注:与对照组相比,^a $P<0.01$;与模型组相比,^b $P<0.05$,^b $P<0.01$;与PLB-L组相比,^c $P<0.05$,^c $P<0.01$;与PLB-M组相比,^d $P<0.05$,^d $P<0.01$;与地塞米松组相比,^e $P<0.05$,^e $P<0.01$ 。

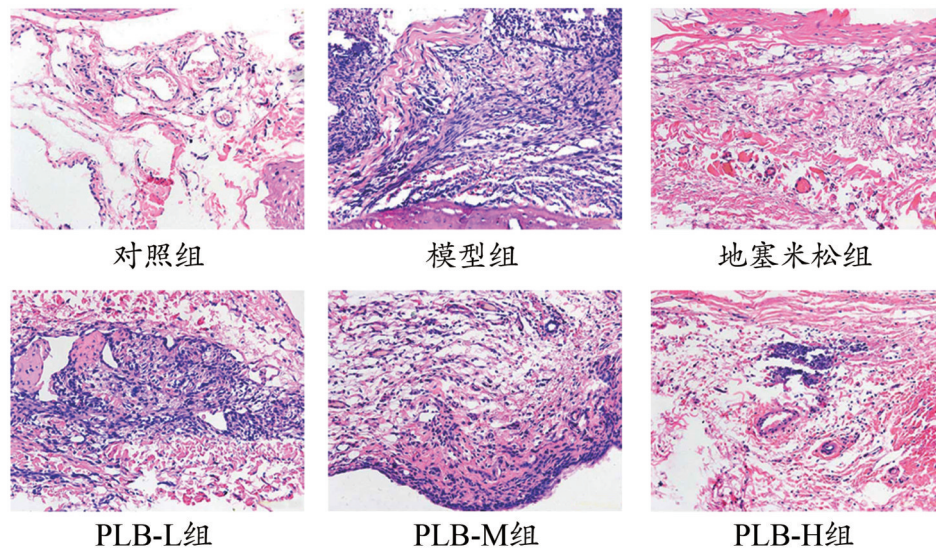


图1 大鼠足关节滑膜结构组织病理学观察(HE,200×)

表2 PLB对大鼠关节滑膜组织炎症因子水平的影响(n=5, $\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α (pg·mL ⁻¹)	IL-6 (pg·mL ⁻¹)
对照组	98.42±11.19	162.13±33.68
模型组	159.75±13.60 ^a	387.49±20.76 ^a
地塞米松组	102.86±13.34 ^b	194.52±18.70 ^b
PLB-L组	140.15±10.21 ^{bc}	300.87±11.58 ^{bc}
PLB-M组	122.33±8.10 ^{bce}	259.70±17.43 ^{bce}
PLB-H组	104.01±6.33 ^{bed}	198.46±17.65 ^{bed}

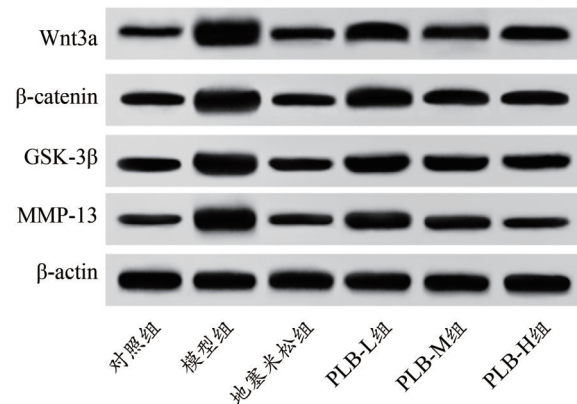
注:与对照组相比,^a $P<0.01$;与模型组相比,^b $P<0.05$,^b $P<0.01$;与PLB-L组相比,^c $P<0.05$,^c $P<0.01$;与PLB-M组相比,^d $P<0.05$,^d $P<0.01$;与地塞米松组相比,^e $P<0.05$,^e $P<0.01$ 。

表3 PLB对大鼠关节滑膜组织炎症因子水平的影响(n=5, $\bar{x} \pm s$)

组别	Wnt3a/ β -actin	β -catenin/ β -actin	GSK-3 β / β -actin	MMP-13/ β -actin
对照组	0.51±0.11	0.63±0.15	0.70±0.11	0.48±0.08
模型组	1.60±0.31 ^a	1.69±0.26 ^a	1.57±0.23 ^a	1.39±0.27 ^a
地塞米松组	0.78±0.14 ^b	0.72±0.13 ^b	0.79±0.13 ^b	0.53±0.10 ^b
PLB-L组	1.33±0.20 ^c	1.47±0.28 ^c	1.27±0.18 ^c	1.16±0.20 ^c
PLB-M组	1.06±0.17 ^{bce}	1.15±0.11 ^{bce}	1.02±0.10 ^{bce}	0.85±0.16 ^{bce}
PLB-H组	0.80±0.13 ^{bed}	0.74±0.15 ^{bed}	0.80±0.17 ^{bed}	0.55±0.10 ^{bed}

注:与对照组相比,^a $P<0.01$;与模型组相比,^b $P<0.05$,^b $P<0.01$;与PLB-L组相比,^c $P<0.05$,^c $P<0.01$;与PLB-M组相比,^d $P<0.05$,^d $P<0.01$;与地塞米松组相比,^e $P<0.05$,^e $P<0.01$ 。

3 β 和MMP-13表达无显著差异($P>0.05$);与PLB-L组相比,PLB-M组和PLB-H组Wnt3a、 β -catenin、GSK-3 β 和MMP-13表达水平显著降低($P<0.05$);与PLB-M组相比,PLB-H组Wnt3a、 β -catenin、GSK-3 β 和MMP-

图2 PLB对大鼠关节滑膜组织 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白的影响

13表达水平显著降低($P<0.05$);与地塞米松组相比,PLB-L组、PLB-M组Wnt3a、 β -catenin、GSK-3 β 和MMP-13表达水平显著增加($P<0.05$),PLB-H组上述蛋白表达无显著性差异($P>0.05$)(表3、图2)。

4 讨论

白花丹具有散瘀、消肿、止痛的功效,可用于治疗跌打损伤、风湿性关节痛等病症,大量研究证实,其在膝关节骨性关节炎、RA等关节疾病中具有明显改善作用,而PLB是一种从白花丹中提取的具有免疫抑制特性的小分子化合物,在治疗骨折、细菌感染、关节肿胀中疗效甚佳,研究发现其在胶原蛋白诱发的关节炎中不仅可有效抑制破骨细胞增殖,还能通过调节调节性T细胞(Treg)/辅助性Th17细胞失衡,抑制炎症反

应^[13-16]。PLB 不仅能预防白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β) 诱导的骨关节炎模型小鼠软骨破坏及软骨下骨增生, 还能有效抑制小鼠滑膜炎的发生, 因此可能是骨关节炎的潜在治疗药物^[17]。随着关节肿胀的发作, 滑膜会呈现出增生及巨噬细胞、自然杀伤(NK) 细胞等炎性细胞浸润现象^[2]。FLS 是 RA 发生时的主要效应细胞, 其增殖过度是关节炎症及关节破坏的主要原因之一, 因此抑制其增殖对 RA 的治疗十分重要, 而 PLB 能通过抑制 Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2) 和信号转导和转录活化因子 3 (Signal Transducer and Activator of Transcription protein, STAT3) 信号通路来有效促进 RA 大鼠 FLS 凋亡、抑制细胞增殖及炎症反应^[6-7]。虽然 PLB 在多种类型关节疾病中具有良好的改善作用, 但其在 RA 中的相关研究甚少。因此, 本研究通过构建 CIA 大鼠模型探究 PLB 对 RA 的改善机制发现, PLB 能有效改善 CIA 大鼠行为学变化及足关节滑膜组织病理学程度, 增加 PWT、PWTL, 降低关节炎症积分、TNF- α 和 IL-6 水平, 与前人研究结果相一致。PLB 可能是通过某种机制来降低 CIA 大鼠炎症因子的分泌, 以此减轻足关节滑膜组织病理损伤, 上述结果表明, PLB 能有效抑制 CIA 大鼠关节滑膜增生及炎症反应, 有作为 RA 潜在治疗药物的可能。

Wnt 家族蛋白质与骨骼形成、组织修复、关节内稳态密切相关, 而 β -catenin 过表达可加剧软骨细胞肥大、软骨变性, 促进基质蛋白酶的表达^[18-20]。Wnt/ β -catenin 是一个经典的 Wnt 信号通路, 其在正常状态下处于静止状态, 可在器官受到损伤时被激活, 研究发现其在骨关节炎关节软骨及滑膜中处于激活状态, 抑制该通路可改善骨关节炎小鼠及 RA 大鼠模型的关节炎症程度^[18,21]。补肾祛寒治尪汤可通过抑制 Wnt/ β -catenin 通路激活, 来缓解胶原所诱导的关节炎大鼠关

节炎症症状及骨破坏^[22]。Wnt/ β -catenin 参与滑膜成纤维细胞中的炎症反应, RA 患者滑膜组织中 β -catenin 表达水平异常增加, 因此抑制其信号转导是治疗 RA 的重要环节^[5,23]。有研究发现, 抑制 Wnt-3 α / β -catenin 信号通路可显著缓解 RA 患者关节疼痛, 改善关节功能^[24]。GSK-3 β 可与 β -catenin 相结合参与细胞增殖、分化^[23]。MMPs 能够降解关节软骨中的胶原、蛋白等大分子, 而且来源于滑膜细胞的 MMPs 还能够导致关节病理性损伤, 抑制其产生对 RA 的治疗至关重要, 研究发现, Wnt/ β -catenin 通路激活可促进 MMP-13 分泌^[25]。本研究发现, CIA 模型大鼠关节滑膜组织中 Wnt3a、 β -catenin、GSK-3 β 和 MMP-13 表达水平显著增加, 与前人研究结果相似, 该结果表明, Wnt/ β -catenin 通路在 CIA 大鼠关节滑膜组织被显著激活, 其参与 RA 的发生, CIA 大鼠炎症反应及关节滑膜组织病理损伤的发生可能与该通路的激活有关。有报道称, PLB 能够通过抑制 Wnt/ β -catenin 途径来抑制乳腺癌细胞增殖和侵袭, 以及血管生成^[26]。而 PLB 是否可能影响 CIA 大鼠 Wnt/ β -catenin 途径的激活还未可知, 因此本研究通过对其探究发现, PLB 能显著降低 CIA 大鼠 Wnt3a、 β -catenin、GSK-3 β 和 MMP-13 表达水平。该结果表明, PLB 能够有效抑制 CIA 大鼠 Wnt/ β -catenin 途径的激活, 而 PLB 对 CIA 大鼠潜在的治疗作用可能与其抑制该通路有关。

综上所述, PLB 对 CIA 大鼠关节滑膜增生及炎症反应的抑制作用, 可能与其抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路有关。本研究不仅为 RA 新药的寻找提供参考, 还对其发病机制的研究具有重要意义, 但由于模型样本受限, 研究未对 Wnt/ β -catenin 信号通路的下游详细机制进行探讨, 因此在未来的研究中还需扩大样本, 对其下游机制进行深入探究。

参考文献

- Choudhary N, Bhatt L K, Prabhavalkar K S. Experimental animal models for rheumatoid arthritis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2018, 40(3):193-200.
- Firestein G S, McInnes I B. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunity*, 2017, 46(2):183-196.
- 蔡强, 金书欣, 陈广洁, 等. 青藤碱联合甲氨蝶呤治疗早期类风湿关节炎的疗效及对患者 MMP-3、RANKL/OPG 表达的影响. *上海中医药大学学报*, 2019, 33(1):36-41.
- 赵艳红, 金晨, 周彩虹, 等. 抗类风湿性关节炎滑膜增生和滑膜血管新生中药的研究进展. *江西中医药大学学报*, 2020, 32(2):113-116.
- 赵军, 董重阳, 师建平, 等. 蒙药蓝刺头调控 FoxO/Wnt/ β -catenin 通路抗氧化应激防治绝经后骨质疏松研究. *中华中医药杂志*, 2021, 36(1):116-121.
- 钟毓娟, 李丽, 李勇文, 等. 白花丹酊对 CIA 大鼠滑膜细胞增殖及 TNF- α 、IL-1 β 和 MMP-3 表达的影响. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(3):343-347.
- 刘玉, 朱德强, 高薇. 白花丹素对人类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡的影响. *中国药理学通报*, 2018, 34(8):1126-1133.

- 8 李涛, 吴山, 范志勇, 等. 基于 Wnt/ β -catenin 通路中医药疗法治疗骨相关疾病研究进展. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(4):117-121.
- 9 陈杰, 张堃, 孔令俊, 等. 三七总皂苷通过调控 Wnt/ β -catenin 通路减轻家兔股骨头坏死. 中药药理与临床, 2019, 35(4):95-99.
- 10 孙莹, 邱新萍, 孙颂歌. Wnt/ β -catenin 信号通路在类风湿关节炎中的表达. 世界中医药, 2019, 14(3):761-765.
- 11 Xue Y L, Meng X Q, Ma L J, *et al.* Plumbagin exhibits an anti-proliferative effect in human osteosarcoma cells by downregulating FHL2 and interfering with Wnt/ β -catenin signalling. *Oncol Lett*, 2016, 12(2):1095-1100.
- 12 黄皆和, 郑文标, 管军辉, 等. 白芍总苷对类风湿性关节炎的治疗作用及 Wnt/ β -catenin 通路的影响. 中国药师, 2020, 23(2):218-223.
- 13 Wang T, Qiao H, Zhai Z, *et al.* Plumbagin ameliorates collagen-induced arthritis by regulating treg/Th17 cell imbalances and suppressing osteoclastogenesis. *Front Immunol*, 2019, 9(1):3102-3110.
- 14 蔡立民, 谭志超, 袁胜超, 等. 白花丹止痛喷雾剂治疗膝关节骨性关节炎临床研究. 新中医, 2018, 50(7):111-113.
- 15 Abimannan T, Peroumal D, Parida J R, *et al.* Oxidative stress modulates the cytokine response of differentiated Th17 and Th1 cells. *Free Radic Biol Med*, 2016, 99(1):352-363.
- 16 黄祖辉, 蔡立民, 谭志超, 等. 白花丹喷雾剂治疗膝关节骨性关节炎的临床疗效. 内蒙古中医药, 2020, 39(10):121-122.
- 17 Zheng W, Tao Z, Chen C, *et al.* Plumbagin prevents IL-1 β -induced inflammatory response in human osteoarthritis chondrocytes and prevents the progression of osteoarthritis in mice. *Inflammation*, 2017, 40(3):849-860.
- 18 Lietman C, Wu B, Lechner S, *et al.* Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling ameliorates osteoarthritis in a murine model of experimental osteoarthritis. *JCI Insight*, 2018, 3(3):e96308-96323.
- 19 Zhou Y, Wang T, Hamilton J L, *et al.* Wnt/ β -catenin signaling in osteoarthritis and in other forms of arthritis. *Curr Rheumatol Rep*, 2017, 19(9):53-60.
- 20 闫沛春, 陈长兴, 陈剑, 等. 透骨消痛胶囊对膝关节炎大鼠软骨下骨 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响. 风湿病与关节炎, 2020, 9(3):6-11.
- 21 徐愿, 阎小萍, 肖诚, 等. 补肾祛寒治尪汤对胶原诱导关节炎大鼠抗炎与抗骨破坏的作用及对 Wnt/ β -catenin 通路的影响. 北京中医药大学学报, 2020, 43(4):289-295.
- 22 徐愿, 阎小萍, 肖诚, 等. 补肾祛寒治尪汤对胶原诱导关节炎大鼠抗炎与抗骨破坏的作用及对 Wnt/ β -catenin 通路的影响. 北京中医药大学学报, 2020, 43(4):289-295.
- 23 兰维娅, 唐芳, 马武开, 等. 毒蛇祛湿胶囊对 CIA 大鼠关节滑膜 Wnt/ DKK1 的表达及调控机制. 中华中医药杂志, 2020, 35(11):5800-5803.
- 24 周艳, 罗凛. 温经通络汤联合针灸治疗风寒湿痹型类风湿关节炎疗效及对血清 Wnt-3 α 、 β -catenin、BMP-2 的影响. 现代中西医结合杂志, 2019, 28(30):3375-3378.
- 25 贾庆运, 王拥军, 梁倩倩, 等. 槲皮素对人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞炎症因子和基质金属蛋白酶的表达的影响. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(6):738-741.
- 26 Sakunrangsit N, Ketchart W. Plumbagin inhibits cancer stem-like cells, angiogenesis and suppresses cell proliferation and invasion by targeting Wnt/ β -catenin pathway in endocrine resistant breast cancer. *Pharmacol Res*, 2019, 150(1):104517-104556.

Effect of Plumbagin on Wnt/ β -catenin Signaling Pathway in Rheumatoid Arthritis Rats

Mei Duncheng, Huang Heng, Yang Qinghong

(Yangluo Hospital of Third People's Hospital of Hubei Province, Wuhan 430000, China)

Abstract: Objective To explore the effect of plumbagin (PLB) on Wnt/ β -catenin signaling pathway in rheumatoid arthritis (RA) rats. Methods Sixty SD rats (12 in each group) were randomly divided into control group, model group, dexamethasone group (model + 30 mg·kg⁻¹ dexamethasone), PLB-L group (2 mg·kg⁻¹ PLB), PLB-M group (4 mg·kg⁻¹ PLB) and PLB-H group (6 mg·kg⁻¹ PLB); except for the control group, a collagen-induced arthritis (CIA) rat model was constructed. The drug group was given corresponding doses of drugs, and the control group and model group were replaced with normal saline; the general condition of the rat was observed; the paw withdrawal thermal latency (PWT), paw withdrawal mechanical threshold (PWT) and joint inflammation scores in rats were recorded; HE staining was used to observe histopathological changes in the synovium of rat foot joints; enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in rat joint synovial tissue. Western blot was used to detect the expression of Wnt/ β -catenin pathway related proteins in the joint synovial tissues of each group. Results Compared with the control group, rats in the model group had dull fur, swollen joints,

limp, decreased activity and food intake, and mental fatigue; rats in the dexamethasone group, PLB-L group, PLB-M group and PLB-H group had improved fur glossiness, hair loss, diet, spirit and action; compared with the control group, the PWT and PWTL of the model group reduced significantly, the joint inflammation score, histopathological degree of foot joint synovium, TNF- α , IL-6, Wnt3a, β -catenin, GSK-3 β and MMP-13 levels increased significantly ($P<0.05$). Compared with the model group, the PWT and PWTL of the dexamethasone group, PLB-L group, PLB-M group and PLB-H group increased significantly, the joint inflammation score, histopathological degree of foot joint synovium, TNF- α , IL-6, Wnt3a, β -catenin, GSK-3 β and MMP-13 levels reduced significantly, in a dose dependent manner ($P<0.05$). Compared with the dexamethasone group, there was no significant difference in the above indicators in the PLB-H group ($P>0.05$). Conclusion The inhibitory effect of PLB on synovial hyperplasia and inflammation in CIA rats may be related to its inhibition of Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Keywords: Plumbagin, Rheumatoid arthritis, Wnt/ β -catenin, Joint synovium, Inflammation

(责任编辑: 周阿剑、刘玥辰, 责任译审: 周阿剑, 审稿人: 王瑀、张志华)