

金线蒲醇提取物对Ⅱ型胶原诱导小鼠关节炎的治疗作用及其机制

徐宝丽, 吴永剑

(华中科技大学同济医学院附属协和医院药剂科, 武汉 430022)

摘要 **目的** 研究金线蒲乙醇提取物对Ⅱ型胶原蛋白联合弗氏佐剂共同诱导小鼠关节炎的治疗作用,并探讨其药理机制。**方法** 采用Ⅱ型胶原蛋白和弗氏佐剂联用,诱导雄性 BALB/c 小鼠关节炎模型,设立正常对照组(给予等剂量0.9%氯化钠溶液)、模型对照组(给予等剂量0.9%氯化钠溶液)、雷公藤组(给予雷公藤片 $15 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、金线蒲醇提取物大剂量组(给予金线蒲乙醇提取物 $60 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、金线蒲醇提取物小剂量组(给予金线蒲乙醇提取物 $15 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$);各组每天给药1次,连续给药21 d。实验中按照时间节点测量小鼠脚踝关节,实验结束后取小鼠全血并制作血清,测定小鼠血清中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、类风湿因子(RF)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α);取出小鼠脾脏以计算脾指数,并摘取关节炎部位,制作病理切片,显微镜下观测病理切片处的炎症情况。**结果** 与模型对照组比较,金线蒲醇提取物大剂量组关节外周长在给药后6 d减小,差异有统计学意义($P < 0.05$);金线蒲醇提取物小剂量组关节外周长在给药后12 d减小,差异有统计学意义($P < 0.05$);雷公藤组关节外周长在给药后9 d减小,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与正常对照组比较,模型对照组脾指数增大,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型对照组比较,雷公藤组、金线蒲醇提取物大剂量组和小剂量组脾指数减小,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与正常对照组比较,模型对照组血清 IL-1 β 、RF 和 TNF- α 的水平上升,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。与模型对照组比较,雷公藤组、金线蒲醇提取物大剂量组和小剂量组血清 IL-1 β 、RF 和 TNF- α 水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 金线蒲乙醇提取物对大鼠诱导性关节炎有显著治疗作用,其作用机制可能是通过调节血清中的炎症因子 IL-1 β 、RF 和 TNF- α 的水平,来发挥作用,保护关节。

关键词 金线蒲;类风湿关节炎;炎症因子

中图分类号 R285.5;R684.3

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2017)06-0626-05

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.06.009

Therapeutic Effect and Mechanism of *Acorus gramineus* Extraction on Mice Arthritis Induced by Type- II Collagen

XU Baoli, WU Yongjian (1. Department of Pharmacy, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

ABSTRACT **Objective** To investigate the medical effect of the ethanol extract of *Acorus gramineus* Sol. on arthritis of mice induced by collagen- II, and explore the potential pharmacological mechanisms. **Methods** Arthritis mouse model was established by injection of admixture containing type II collagen and Freund's complete adjuvant (FCA) in male BALB/c mice. Mice were divided into five groups: the normal control group (0.9% of sodium chloride solution), the model control group (0.9% of sodium chloride solution), tripterygium group ($15 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of tripterygium tablets), the high-dose of extract of *Acorus gramineus* Sol. group ($60 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ extract of *Acorus gramineus* Sol.) and the low-dose of extract of *Acorus gramineus* Sol. group ($15 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ extract of *Acorus gramineus* Sol.). Each group was administered once a day, lasting 21 days. During the experiment, ankles of all mice were measured at predetermined time. At the end of the experiment, blood of the mice was exsanguinated and centrifuged to get serum for measuring the levels of IL-1 β , RF and TNF- α . Spleens of mice were dissected and weighed to calculate the spleen index. All arthritis ankles were dissected to make tissue section, and observed under microscope. **Results**

Compared with the model control group, the perimeter of ankle joints of the high-dose of extract of *Acorus gramineus* Sol. group significantly changed 6 days after administration ($P < 0.05$); That of the low-dose of extract of *Acorus gramineus* Sol. group significantly changed 12 days after administration ($P < 0.05$); That of tripterygium group significantly changed 9 days after administration ($P < 0.05$). As compared with the normal control group, the spleen index of the model control group was significantly different ($P < 0.01$). As compared with the model control group, the spleen index of tripterygium group, high-dose and low-dose of extract of *Acorus gramineus* Sol. groups were significantly different ($P < 0.05$). As compared with the normal control group, levels of IL-1 β , RF and TNF- α of the model control group were significantly different (all $P < 0.01$). As compared with the model control group, levels of IL-1 β , RF and TNF- α of tripterygium group, high-dose and low-dose of extract of *Acorus gramineus* Sol. groups were significantly decreased. **Conclusion** Ethanol extracts of *Acorus gramineus* Sol. have significant therapeutic effect on arthritis mice. The anti-arthritis mechanism is associated with its ability to regulate levels of IL-1 β , RF and TNF- α .

KEY WORDS *Acorus gramineus* Sol.; Arthritis rheumatoid; Inflammatory cytokines

金线蒲(*Acorus gramineus* Sol.)是天南星科菖蒲属植物,主要以根茎入药,茎、叶、花也可入药^[1]。金线蒲属菖蒲属,主要化学成分含有挥发油(萜类、苯丙素类衍生物及脂肪族醛酮类)、苯丙素类(苯丙酸、香豆素、木脂素)、生物碱、醌类、黄酮类、氨基酸、糖类等成分^[2-3]。类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种病因尚未明了的自身免疫性紊乱,最后导致关节功能障碍的慢性疾病^[4]。研究发现在 RA 的病理进程中,滑膜增生和血管翳的形成是导致关节障碍的主要因素,而炎症因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、类风湿因子(rheumatoid factor, RF)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)在体内异常升高,会直接或间接促进关节部位的滑膜增生和血管翳的形成,后者再刺激炎症因子导致其异常升高,由此形成恶性循环^[4-5]。研究表明,菖蒲属植物具有广泛的药理活性^[6-8],但对于金线蒲的研究鲜见报道。在本研究中,笔者通过建立小鼠关节炎模型^[9-10],从抗炎和免疫调节方面研究金线蒲醇提取物对风湿性关节炎的治疗作用,并探讨其发挥作用的药理机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 无特定病原体(SPF)级 BALB/c 小鼠 50 只,雄性,体质量 18~24 g,购自华中科技大学同济医学院实验动物中心,动物合格证编号:1394527,实验动物生产许可证号:SCXK(鄂)2010-0009。实验小鼠于实验前适应性喂养 1 周,摄食标准颗粒饲料,自由饮水。饲养房自然光线,温度为(20 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度约 70%。

1.2 药品与试剂 金线蒲根茎采自湖北省恩施土家族苗族自治州巴东县,由华中科技大学同济医学院药学院皮慧芳副教授鉴定为天南星科菖蒲属植物金线蒲(*Acorus gramineus* Sol.)。金线蒲醇提取物:华中科技大学同济医学院药学院中药教研室制备,取适量提取物,用 0.9% 氯化钠溶液配置成一定浓度混悬液,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用;雷公藤片(华润三九黄石制药厂,批号:Z42021534);II 型小牛胶原蛋白(美国 Sigma 公司,批号:C2371);弗氏完全佐剂(美国 Sigma 公司生产,批号:FB6791;小鼠血清 IL-1 β 、RF、

TNF- α 试剂盒,购自上海酶联生物科技有限公司,批号分别为 YSQ112584,YSQ473001,YSQ21421;其余试剂为分析纯。

1.3 仪器与设备 Labsystems Multiskan MS-352 型酶标仪(芬兰),Mobio vortex-Genie-2 涡旋仪(美国)。

1.4 诱导剂的制备 将适量 II 型胶原蛋白溶解于 0.1 mol \cdot L⁻¹ 醋酸溶液中,配制成 2 mg \cdot mL⁻¹ II 型胶原蛋白溶液,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中过夜。次日于实验前取出,与弗氏完全佐剂按照体积 1:1 混合,置于涡旋仪上混悬至混合物完全乳化,制成 1 mg \cdot mL⁻¹ 的 II 型胶原诱导注射液,临用时再次涡旋以混悬均匀后置于冰面上备用^[10]。

1.5 动物分组、模型制备、给药方法 BALB/c 小鼠 50 只,按照体质量由轻到重顺序编号并划分为 5 个群体。按照数字表法,随机分为 5 组:正常对照组、模型对照组、雷公藤组、金线蒲醇提取物大剂量组、金线蒲醇提取物小剂量组,每组 10 只。实验开始第 1 天,除正常对照组外,其他组小鼠左侧后肢肌内注射诱导剂 0.1 mL,第 14 天,第 2 次腹腔注射诱导剂 0.1 mL^[9-10]。从实验开始第 14 天起,雷公藤组灌胃给予雷公藤片(用 0.9% 氯化钠溶液制成的混悬液)15 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,金线蒲醇提取物大剂量组和小剂量组分别灌胃金线蒲醇提取物 60 和 15 mg $\cdot\text{kg}^{-1}$,正常对照组和模型对照组分别给予等容量 0.9% 氯化钠溶液。每天定时给药 1 次,连续给药 21 d(即第 14 天至第 35 天)。

1.6 关节肿胀率测量与计算 在注射 II 型胶原诱导液的前 1 天,记为实验第 0 天,软尺测量每只小鼠右足踝关节处周长。其后分别于实验第 14、17、20、23、26、29、32 和 35 天,分别测量各组小鼠的右足踝关节处周长,测量所得的平均数分别记为 $L_{\text{正常对照}}$ 、 $L_{\text{模型对照}}$ 、 $L_{\text{雷公藤}}$ 、 $L_{\text{大剂量}}$ 、 $L_{\text{小剂量}}$ 。关节肿胀率(%) = $(L - L_{\text{正常对照}})/L_{\text{正常对照}} \times 100\%$ 。

1.7 脾指数的测量与计算 在实验第 35 天,分别测定小鼠质量(g),采完血后,处死大鼠。解剖小鼠脾脏,去掉附着的结缔组织,立即称定质量。各组的脾质量平均数分别记为 $M_{\text{正常对照}}$ 、 $M_{\text{模型对照}}$ 、 $M_{\text{雷公藤}}$ 、 $M_{\text{大剂量}}$ 、 $M_{\text{小剂量}}$,计算脾指数(S_x), $S_x = \frac{M_x}{M_{\text{体质量}}}$ 。

1.8 关节病理切片的制备 在实验第 35 天,将各小鼠左右后肢关节分别取下,并去掉外层的皮毛、黏膜结缔组织,保留肌肉组织,浸泡于 10% 乙二胺四醋酸(EDTA)脱钙液(取 EDTA 100 g,加入纯化水 900 mL 中加热至 60 $^{\circ}\text{C}$ 溶解,以氢氧化钠调节 pH 值至 7.2~7.3,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱密封保存备用。3 d 更换一次脱钙液,

收稿日期 2016-01-05 修回日期 2016-05-07

作者简介 徐宝丽(1985-),女,湖北武汉人,药师,硕士,研究方向:医院药学。电话:027-85726967, E-mail:2068639367@qq.com。

通信作者 吴永剑(1985-),男,湖北武汉人,药师,硕士,研究方向:临床药学。电话:027-85726163, E-mail:281178420@qq.com。

脱钙 2 周后,关节组织软化即可进行包埋、染色、切片、制片,完成后显微镜下观察。本实验采用苏木精-伊红(HE)染色制片。

1.9 小鼠血清 IL-1 β 、RF、TNF- α 的测定 在实验第 35 天,每只小鼠经眼眶取血 1 mL,室温静置 30 min 后,离心机 3 000 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min,得小鼠血清。小鼠血清 IL-1 β 、RF 和 TNF- α 水平采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法,分别按照试剂盒说明书进行测定。

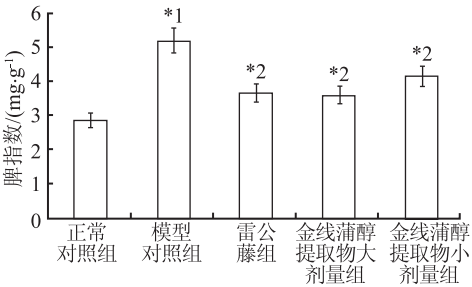
1.10 统计学方法 采用 SPSS 11.0 版统计软件进行统计分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,如数据符合正态分布、方差齐,两两组间均数比较采用 one-way ANOVA 分析法,否则采用 Games-Howell 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义^[11]。

2 结果

2.1 关节外周长 结果见表 1。可知,在实验第 14 天,与正常对照组比较,各组踝关节外周长显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明该实验造模基本成功。与模型对照组比较,金线蒲醇提取物大剂量组在给药后 6 d(第 20 天)减小,差异有统计学意义($P < 0.05$);金线蒲醇提取物小剂量组在给药后 12 d(第 26 天)减小,差异有统计学意义($P < 0.05$);雷公藤组在给药后 9 d(第 23 天)减小,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 脾指数 结果见图 1。与正常对照组比较,模型对照组增大,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型对照组比较,雷公藤组、金线蒲醇提取物大剂量组和小剂量组减小,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 小鼠踝关节病理切片分析 结果见图 2。与正常对照组比较,小鼠关节腔均存在不同程度的狭窄;关节软骨增生严重,部分个体的标本可见软骨坏死现象;滑膜组织增生较多,可见 10 层以上的细胞层;关节周边可见增生较多的血管丛或血管翳。与模型对照组比



与正常对照组比较, *¹ $P < 0.01$;与模型对照组比较, *² $P < 0.05$

图 1 5 组小鼠脾指数比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Compared with normal control group, *¹ $P < 0.01$; Compared with model control group, *² $P < 0.05$

Fig. 1 Comparison of spleen index among five groups of mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

较,雷公藤组和金线蒲醇提取物大剂量组关节情况明显改善,关节腔基本正常,软骨、滑膜、毛细血管组织未见增生或轻微增生;而金线蒲醇提取物小剂量组治疗情况没有大剂量组效果显著,多数小鼠关节腔中度狭窄,3 只个体标本显示狭窄不明显,软骨组织轻微增生,滑膜组织中度增生。

2.4 血清 IL-1 β 、RF 和 TNF- α 的水平 结果见表 2。与正常对照组比较,模型对照组血清 IL-1 β 、RF 和 TNF- α 的水平差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。与模型对照组比较,雷公藤组、金线蒲醇提取物大剂量组和小剂量组血清 IL-1 β 、RF 和 TNF- α 水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。金线蒲醇提取物小剂量组降低程度不及大剂量组。

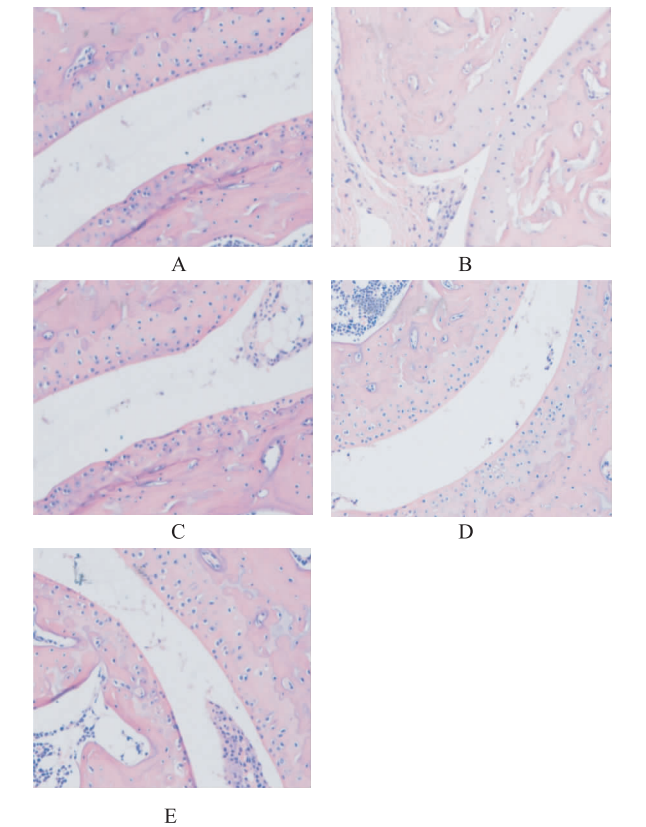
3 讨论

Ⅱ型胶原蛋白来源于软骨,为软骨的主要成分,具有强烈的抗原性,可诱发鼠类的自身免疫反应,主要针对自身软骨和滑膜细胞产生免疫反应,同时诱发体液

表 1 5 组小鼠随时间变化的踝关节外周长
Tab. 1 Changes of the perimeter of ankle joints over time in five groups of mice cm, $\bar{x} \pm s, n = 10$

组别	第 0 天	第 14 天	第 17 天	第 20 天	第 23 天	第 26 天	第 29 天	第 32 天	第 35 天
正常对照组	0.63 \pm 0.012	0.65 \pm 0.006	0.67 \pm 0.007	0.66 \pm 0.002	0.65 \pm 0.004	0.64 \pm 0.010	0.64 \pm 0.007	0.66 \pm 0.006	0.65 \pm 0.005
模型对照组	0.63 \pm 0.015	0.70 \pm 0.013 * ¹	0.72 \pm 0.009 * ²	0.73 \pm 0.003 * ²	0.74 \pm 0.007 * ²	0.74 \pm 0.008 * ²	0.73 \pm 0.004 * ²	0.73 \pm 0.005 * ²	0.74 \pm 0.006 * ²
雷公藤组	0.68 \pm 0.007	0.72 \pm 0.009 * ¹	0.68 \pm 0.009	0.70 \pm 0.011	0.67 \pm 0.016 * ³	0.67 \pm 0.011 * ⁴	0.66 \pm 0.009 * ⁴	0.67 \pm 0.009 * ⁴	0.67 \pm 0.003 * ⁴
金线蒲醇提取物									
大剂量组	0.68 \pm 0.016	0.73 \pm 0.008 * ¹	0.66 \pm 0.009	0.66 \pm 0.017 * ³	0.62 \pm 0.016 * ³	0.64 \pm 0.011 * ³	0.64 \pm 0.008 * ³	0.63 \pm 0.006 * ³	0.64 \pm 0.008 * ³
小剂量组	0.72 \pm 0.009	0.74 \pm 0.011 * ¹	0.70 \pm 0.011	0.66 \pm 0.013	0.67 \pm 0.015	0.68 \pm 0.012 * ³	0.65 \pm 0.012 * ³	0.63 \pm 0.005 * ³	0.65 \pm 0.008 * ³

与正常对照组比较, *¹ $P < 0.05$, *² $P < 0.01$;与模型对照组比较, *³ $P < 0.05$, *⁴ $P < 0.01$
Compared with normal control group, *¹ $P < 0.05$, *² $P < 0.01$; compared with model control group, *³ $P < 0.05$, *⁴ $P < 0.01$



A. 正常对照组;B. 模型对照组;C. 雷公藤组;D. 金线蒲醇提取物大剂量组;E. 金线蒲醇提取物小剂量组

图 2 5 组小鼠关节病理图片 (HE, ×200)

A. normal control group;B. model control group;C. tripterygium group;D. high-dose of ethanol extracts of *Acorus gramineus* sol.;E. low-dose of ethanol extracts of *Acorus gramineus* Sol.

Fig. 2 Pathological images of the joints in five groups of mice (HE, ×200)

表 2 5 组小鼠血清 IL-1β、RF、TNF-α 的水平

Tab. 2 Serum levels of IL-1β, RF, and TNF-α in five groups of mice

组别	RF/	TNF-α		IL-1β
	(μg·mL ⁻¹)	(pg·mL ⁻¹)		
正常对照组	3.73 ± 0.76	4.02 ± 0.73	16.45 ± 2.87	
模型对照组	26.45 ± 5.38 ^{*1}	24.51 ± 1.07 ^{*1}	47.76 ± 9.07 ^{*1}	
雷公藤组	15.36 ± 3.09 ^{*2}	5.46 ± 1.05 ^{*3}	26.54 ± 5.41 ^{*3}	
金线蒲醇提取物				
大剂量组	5.74 ± 1.26 ^{*3}	4.51 ± 0.87 ^{*3}	23.64 ± 4.58 ^{*3}	
小剂量组	17.21 ± 3.37 ^{*2}	5.79 ± 1.14 ^{*3}	36.81 ± 7.02 ^{*2}	

与正常对照组比较, ^{*1}*P* < 0.01; 与模型对照组比较, ^{*2}*P* < 0.05, ^{*3}*P* < 0.01

Compared with normal control group, ^{*1}*P* < 0.01; Compared with model control group, ^{*2}*P* < 0.05, ^{*3}*P* < 0.01

中的炎症因子分泌异常,后者异常反馈性刺激并加剧

软骨和滑膜的病变^[5],由此形成恶性循环,最终导致关节炎症和正常功能的丧失^[4]。其病理过程和类风湿关节炎相似,均有 IL-1β、RF 和 TNF-α 等一系列炎症因子升高。现阶段临床病理学研究对于类风湿关节炎的病因依然没有定论,但已确定的是,分泌紊乱的炎症细胞因子在病理进程中发挥重要作用^[4,12]。

本课题的研究结果表明,金线蒲醇提取物可显著改善关节肿胀的症状,降低脾指数;关节病理切片结果表明,金线蒲醇提取物治疗小鼠关节病理状况有显著改善,可显著降低小鼠血清 IL-1β、RF 和 TNF-α 水平。

本研究中金线蒲醇提取物可有效改善关节炎小鼠关节病理情况,一定程度保护关节不受抗原侵蚀破坏,可能是金线蒲所含各类化学成分综合作用的结果。其作用机制可能是通过一定的途径直接或间接调节体内失调的炎症因子的分泌,降低体内 IL-1β、RF 和 TNF-α 等炎症因子的水平,保护关节结缔组织不受免疫攻击,抑制关节炎症的加剧,达到治疗和保护的作用。具体发挥作用的物质基础还需要进一步研究。

参考文献

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(八册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 468 - 478.

[2] 林晨, 安红梅. 石菖蒲的中枢神经系统药理作用研究[J]. 长春中医药大学学报, 2014, 30(2): 230 - 233.

[3] 廖矛川, 陈凤, 张雨馨, 等. 石菖蒲正丁醇部位化学成分研究[J]. 中南民族大学学报, 2016, 35(1): 64 - 66, 74.

[4] BARKSBY H E, LEA S R, PRESCHAW P M, et al. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders[J]. Clin Exp Immunol, 2007, 149: 217 - 225.

[5] SEN D, GONZALEZ-MAYDA M, BRASINGTON R D. Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis [J]. Rheum Dis Clin North Am, 2014, 40(1): 27 - 49.

[6] 赖先银, 梁鸿, 赵玉英, 等. 菖蒲属植物的化学成分和药理活性研究概况[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(3): 161 - 165, 198.

[7] 郑英, 邹晓华, 陈素红, 等. 石菖蒲与九节菖蒲抗氧化作用的比较研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2013, 37(4): 451 - 454.

[8] 李艳菊, 刘辉, 郭月秋. 石菖蒲对小鼠免疫功能调节作用的研究[J]. 中国中医药科技, 2007, 14(2): 95.

[9] ZHU L, WEI W, ZHENG Y Q, et al. Effects and mechanisms of total glucosides of paeony on joint damage in rat collagen-induced arthritis [J]. Inflamm Res, 2005, 54(5): 211 - 220.

[10] CHEN C X, ZHANG P, PI H F, et al. Extracts of *Ariseama Rhizomatum* C. E. C. Fischer attenuate inflammatory response on collagen-induced arthritis in BALB/c mice [J]. J Ethnopharmacology, 2011, 133:

573–582.

- [11] 魏刚,林双峰,方永奇. 气相色谱-质谱联用法分析石菖蒲水煎液主要化学成分[J]. 广州中医药大学学报, 2005,22(2):147–149.
- [12] LOPATNIKOVA J A, GOLIKOVA E A, SHKARUBA N S,

et al. Analysis of the levels of tumour necrosis factor (TNF), autoantibodies to TNF, and soluble TNF receptors in patients with rheumatoid arthritis [J]. Scand J Rheumatol, 2013, 42(6):429–432.

杂环齐墩果酸衍生物-阿司匹林缀合物抑制血清素合成及促骨形成作用

吉璐宏,赵庭波

(湖北省仙桃市第一人民医院骨外二科,仙桃 433000)

摘要 目的 探讨杂环齐墩果酸衍生物-阿司匹林缀合物对血清素合成的抑制活性以及促骨形成活性。方法 采用高效液相色谱(HPLC)法、酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒和荧光实时定量聚合酶链反应(PCR)测试杂环齐墩果酸衍生物-阿司匹林缀合物对RBL-2H3细胞中血清素合成的关键酶色氨酸羟化酶-1(TPH-1)的抑制率、TPH-1蛋白含量及mRNA的表达。构建去势大鼠骨质疏松症模型(OVX),并将骨质疏松大鼠随机分为给药组、甲状旁腺激素组、模型对照组和假手术组,给药35 d后采用HPLC法测定血清和小肠中血清素水平。采用噻唑蓝(MTT)法测定杂环齐墩果酸衍生物-阿司匹林缀合物对成骨细胞促进活性。结果 在RBL-2H3细胞中,杂环齐墩果酸衍生物-阿司匹林缀合物对TPH-1的抑制呈剂量依赖性,抑制率为20.4%~92.5%,缀合物7在 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度有最高抑制率(92.5%),TPH-1蛋白含量为 $51\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,较对照组($216\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)显著降低,TPH-1mRNA表达也降低。与假手术组比较,模型对照组血清和小肠中血清素水平明显增高($P<0.05$),给予缀合物后大鼠血清和小肠中血清素水平却明显降低,缀合物7给药后血清和小肠血清素分别为 $232,155\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,较模型对照组1 050和 $783\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 明显降低。缀合物能够促进乳小鼠成骨细胞增殖。结论 该研究为开发新型、高效、低毒的具有抗骨质疏松症的齐墩果酸衍生物提供信息和依据。

关键词 杂环齐墩果酸衍生物-阿司匹林缀合物;齐墩果酸;阿司匹林;血清素;骨质疏松

中图分类号 R336;R285

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2017)06-0630-06

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.06.010

Effects of Heterocyclic Oleanolic Acid Derivatives-Aspirin Conjugates on Inhibition of Serotonin Biosynthesis and Increase of Bone Formation

Ji Luhong, ZHAO Tingbo (Department of Orthopaedics, the First People's Hospital of Xiantao City, Hubei Province, Xiantao 433000, China)

ABSTRACT Objective To explore the effects of the heterocyclic oleanolic acid derivatives-aspirin conjugates on inhibition of serotonin biosynthesis and increase of bone formation. **Methods** The inhibition rate, content and mRNA expression of heterocyclic oleanolic acid derivatives-aspirin conjugates on tryptophan hydroxylase 1 (TPH-1), which was the principal enzyme in the biosynthesis of serotonin, were tested by HPLC, ELISA kit and real-time PCR, respectively. Osteoporosis model was established by ovariectomy (OVX). The rats were randomly divided into conjugate groups, parathyroid hormone group, model control group and sham operation group. Serum and gut serotonin levels were tested by HPLC after 35 days of administration, and the antiosteoporosis activity of the heterocyclic oleanolic acid derivatives-aspirin conjugates was evaluated by using osteoblast-like cells isolated from murine calvaria by MTT assay. **Results** The preliminary biological results showed that heterocyclic oleanolic acid derivatives-aspirin conjugates displayed a dose-dependent suppression on TPH-1 in RBL-2H3, and the inhibition rate was 20.4%–92.5%. Specifically, conjugate 7 at $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ concentration showed the greatest inhibition rate on TPH-1 (92.5%). Content of TPH-1 was $51\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, significantly lower than that in the control group ($216\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), as well as the TPH-1 mRNA. Compared with the sham operation group, levels of serum and gut serotonin were increased in OVX group, while they were significantly decreased in conjugate groups, and reduced significantly in conjugate 7 group (232 and $155\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) as compared with OVX group ($1\ 050$ and $783\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$); Moreover, heterocyclic oleanolic acid derivatives-aspirin conjugates could increase the bone formation. **Conclusion** This study provides information and basis for development of novel, efficient and harmfullness oleanolic acid derivatives with anti-osteoporosis.

KEY WORDS Heterocyclic oleanolic acid-aspirin conjugates; Oleanolic acid; Aspirin; Serotonin; Osteoporosis