

白术多糖对类风湿性关节炎大鼠的抗炎作用及 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响

李梅¹ 蒋锦梅¹ 欧大明¹ 黄丽芳¹ 谢立虎¹ 张济²

摘要 目的 探讨白术多糖(PAMK)对类风湿性关节炎(RA)大鼠的抗炎作用及其对Toll样受体4/核因子 κ B(TLR4/NF- κ B)信号通路的影响。方法 采用II型胶原诱导建立RA大鼠模型,造模成功后将大鼠分为模型组、阳性药物组(雷公藤多苷片)、PAMK低、高剂量组,同时设置正常对照组,每组12只。给予雷公藤多苷片或PAMK灌胃给药,1次/d,连续4周。测量大鼠体重、足趾容积和关节炎指数;计算胸腺指数和脾脏指数;HE染色观察踝关节滑膜组织病理学变化;ELISA法检测血清及踝关节滑膜组织中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平;Western blot检测踝关节滑膜组织中总蛋白Toll样受体4(TLR4)、髓样分化因子88(MyD88)、磷酸化核因子 κ B p65 [p-NF- κ B p65(Ser536)]及核蛋白NF- κ B p65表达水平。结果 与正常对照组比较,模型组大鼠可见滑膜增生、层次不清等病理学改变,体重降低($P < 0.05$),足趾容积、关节炎指数以及胸腺、脾脏指数升高($P < 0.05$),血清及踝关节滑膜组织中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平以及踝关节滑膜组织中TLR4、MyD88、p-NF- κ B p65和NF- κ B p65蛋白表达水平升高($P < 0.05$)。与模型组比较,阳性药物组和PAMK高剂量组大鼠踝关节滑膜组织病理学改变明显改善,体重升高($P < 0.05$),足趾容积、关节炎指数以及胸腺、脾脏指数降低($P < 0.05$),血清及踝关节滑膜组织中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平以及踝关节滑膜组织中TLR4、MyD88、p-NF- κ B p65和NF- κ B p65蛋白表达水平降低($P < 0.05$),而PAMK低剂量组大鼠以上各指标与模型组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 PAMK可减轻机体炎症反应,改善RA,其机制可能与抑制TLR4/NF- κ B信号通路的活化有关。

关键词 白术多糖;类风湿性关节炎;炎症;TLR4/NF- κ B信号通路

中图分类号 R 593.22

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)04-0552-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.04.009

2022-03-07 接收

基金项目: 湖南省卫生健康委科研课题(编号: 202103100054)

作者单位: 南华大学附属第一医院¹ 风湿免疫科、² 风湿免疫实验室, 衡阳 421001

作者简介: 李梅,女,主治医师;

蒋锦梅,女,主治医师, 责任作者 E-mail: 1056370281@qq.com

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节滑膜组织炎症为特征的自身免疫性慢性疾病,可导致多关节炎、滑膜增生、关节破坏畸形等。临床表现为关节疼痛、酸胀、晨僵、活动受限,因其较高的致畸和致残率,给患者造成了极大的痛苦^[1]。白术多糖(polysaccharide of atractylodes macrocephala koidz, PAMK)是天然中草药白术的主要有效成分之一,具有抗肿瘤、免疫调节、抗炎等多重药理作用^[2]。有研究^[3]显示,Toll样受体4(toll like receptor 4, TLR4)及其介导的核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)信号通路,通过诱发机体炎症反应、介导炎症因子表达,成为RA发病的关键。而PAMK可通过调控TLR4/NF- κ B信号通路调节机体免疫功能^[4]。推测PAMK可能会通过抑制TLR4/NF- κ B信号通路改善RA,但PAMK在RA过程中具体作用如何,目前尚未见报道。因此,该研究拟建立RA大鼠模型,探讨PAMK对RA的影响及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级SD雄性大鼠60只,8周龄,体重300~350g,购自重庆医科大学实验动物中心,实验动物生产许可证:SCXK(渝)2018-0003。于室温22~24℃,相对湿度50%~70%环境下饲养,实验期间严格按照实验动物伦理学要求,自由饮水和摄食,实验前适应性喂养1周。

1.2 主要试剂及仪器 PAMK购自陕西慈缘生物技术有限公司;雷公藤多苷片购自浙江得恩德医药有限公司;牛II型胶原购自美国Chondrex公司;弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂购自美国Sigma公司;TLR4、髓样分化因子88(myeloid differentiation factor, MyD88)、p-NF- κ B p65(Ser536)、NF- κ B p65、Histone H3及 β -actin抗体购自英国Abcam公司;Nuclear Extract Kit试剂盒购自美国Active Motif公司;HE染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;BCA试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;大鼠白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-1 β (in-

terleukin-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒购自上海江莱生物科技有限公司;全自动酶标仪购自美国 Thermo 公司。

1.3 方法

1.3.1 动物模型制备与分组 参考文献^[5],采用 II 型胶原诱导建立 RA 大鼠模型。具体操作如下:以醋酸为溶剂,将牛 II 型胶原配制成浓度为 2 mg/ml 的溶液,与弗氏完全佐剂按 1:1 混合配成乳剂 I,与弗氏不完全佐剂按 1:1 混合配成乳剂 II。第 1 天于大鼠尾部皮下注射乳剂 I,每只 0.1 ml,第 7 天于大鼠尾部皮下注射乳剂 II,每只 0.1 ml。造模 2 周后,大鼠后肢足趾红肿,踝关节体积明显增大,提示造模成功。将造模成功大鼠随机分为模型组、阳性药物组和 PAMK 低、高剂量组,同时设置正常对照组,每组 12 只。分组后阳性药物组大鼠给予 6.25 mg/kg^[6]雷公藤多苷片灌胃,PAMK 低、高剂量组大鼠分别按 75、300 mg/kg 剂量灌胃给予 PAMK,正常对照组及模型组大鼠灌胃给予等量生理盐水,1 次/d,连续 4 周。

1.3.2 体质量检测 从第 2 次免疫(给药干预第 0 天)开始,每隔 7 d 测量 1 次各组大鼠体质量。

1.3.3 足趾肿胀度检测 采用水容积法,从第 2 次免疫(给药干预第 0 天)开始,每隔 7 d 测量 1 次各组大鼠右后足容积。

1.3.4 关节炎指数检测 参考文献^[6],从第 2 次免疫(给药干预第 0 天)开始,采取 5 级评分法,每隔 7 d 观察计算 1 次各组大鼠关节炎指数。大鼠所有关节炎指数之和即为每只大鼠关节炎指数值,最高计 16 分。

1.3.5 胸腺和脾脏指数检测 取脾脏和胸腺组织,剔除脂肪,滤纸吸干表面液体并精密称量,分别计算其占体质量的比例(mg/g)。

1.3.6 HE 染色 取踝关节滑膜组织,于 4% 多聚

甲醛中固定 24 h,随后经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、液体石蜡浸蜡、石蜡包埋等过程后,作连续 5 μ m 切片,行常规 HE 染色,于光学显微镜下观察。

1.3.7 ELISA 检测 取踝关节滑膜组织匀浆及腹主动脉全血,于 4 $^{\circ}$ C 下 4 000 r/min 离心 10 min,分别提取上清液及血清,按照试剂盒操作说明,检测各组大鼠血清及踝关节滑膜组织中炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平。

1.3.8 Western blot 检测 取踝关节滑膜组织,用 RIPA 裂解液提取总蛋白、Nuclear Extract Kit 试剂盒提取核蛋白,通过 BCA 法进行蛋白质定量,取 20 μ g 总蛋白或核蛋白与上样缓冲液均匀混合,随后 SDS-PAGE 电泳并进行转膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,分别加入 TLR4 抗体(兔抗,1:1 000)、MyD88 抗体(兔抗,1:1 000)、p-NF- κ B p65 抗体(兔抗,1:1 000)、NF- κ B p65 抗体(兔抗,1:1 000)、Histone H3 抗体(兔抗,1:1 000)、 β -actin 抗体(兔抗,1:1 000)一抗,摇床孵育过夜;然后加入二抗(1:10 000),室温孵育 2 h 后 ECL 显色,以 Histone H3、 β -actin 表达水平作为内参,应用 Image J 进行灰度分析,分析总蛋白 TLR4、MyD88、p-NF- κ B p65 及核蛋白 NF- κ B p65 的相对表达量。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间数据比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较采用 LSD- t 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠体质量比较 与正常对照组比较,模型组大鼠体质量降低($P < 0.05$);与模型组比较,治疗 1 周后阳性药物组、PAMK 高剂量组大鼠体质量升高($P < 0.05$),而 PAMK 低剂量组差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 各组大鼠足趾肿胀度比较 与正常对照组比

表 1 各组大鼠体质量比较($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常对照	322.6 \pm 8.06	354.8 \pm 8.06	391.6 \pm 7.79	425.4 \pm 7.87	452.7 \pm 8.63
模型	265.7 \pm 10.24*	279.2 \pm 9.07*	303.5 \pm 10.69*	328.4 \pm 7.23*	352.5 \pm 9.63*
阳性药物	277.2 \pm 7.16	310.6 \pm 9.21#	349.4 \pm 8.56#	377.1 \pm 6.82#	418.2 \pm 8.12#
PAMK 低剂量	268.4 \pm 9.78	282.3 \pm 8.26	306.5 \pm 9.32	332.9 \pm 9.96	357.6 \pm 10.33
PAMK 高剂量	291.1 \pm 6.62	328.5 \pm 9.63#	358.2 \pm 7.42#	386.7 \pm 6.05#	432.5 \pm 6.51#
F 值	21.584	40.082	60.169	84.459	80.493
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

表2 各组大鼠足趾肿胀度比较($\bar{x} \pm s$, ml $n=12$)

组别	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常对照	1.35 ± 0.52	1.42 ± 0.71	1.49 ± 0.81	1.56 ± 0.69	1.63 ± 0.53
模型	4.82 ± 2.06*	4.78 ± 1.35*	4.62 ± 1.43*	4.51 ± 1.48*	4.37 ± 1.56*
阳性药物	4.55 ± 1.38	3.98 ± 1.24#	3.26 ± 1.08#	2.64 ± 1.03#	1.94 ± 0.87#
PAMK 低剂量	4.76 ± 1.26	4.63 ± 1.59	4.55 ± 1.12	4.38 ± 1.52	4.09 ± 1.12
PAMK 高剂量	4.63 ± 0.82	3.77 ± 0.96#	3.01 ± 0.94#	2.25 ± 0.62#	1.68 ± 0.44#
F 值	4.075	3.720	4.051	4.106	5.942
P 值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

表3 各组大鼠关节炎指数比较($\bar{x} \pm s$, 分 $n=12$)

组别	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常对照	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型	15.08 ± 3.93*	13.33 ± 3.22*	12.42 ± 4.53*	9.33 ± 3.98*	8.08 ± 2.54*
阳性药物	13.58 ± 4.24	9.17 ± 2.45#	6.50 ± 2.27#	3.67 ± 1.32#	2.42 ± 1.62#
PAMK 低剂量	14.42 ± 4.19	13.25 ± 3.65	12.33 ± 3.32	9.17 ± 2.74	8.25 ± 2.01
PAMK 高剂量	12.33 ± 3.97	8.75 ± 2.33#	6.42 ± 2.24#	2.50 ± 1.13#	1.17 ± 0.59#
F 值	8.717	12.735	9.616	9.756	17.333
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.001

与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

较 模型组大鼠足趾肿胀度升高 ($P < 0.05$) ; 与模型组比较 治疗 1 周后阳性药物组、PAMK 高剂量组大鼠足趾肿胀度降低 ($P < 0.05$) , 而 PAMK 低剂量组差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 。见表 2。

2.3 各组大鼠关节炎指数比较 与正常对照组比较 模型组大鼠关节炎指数升高 ($P < 0.05$) ; 与模型组比较 治疗 1 周后阳性药物组、PAMK 高剂量组大鼠关节炎指数降低 ($P < 0.05$) , 而 PAMK 低剂量组差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 。见表 3。

2.4 各组大鼠胸腺、脾脏指数比较 与正常对照组比较 模型组大鼠胸腺、脾脏指数升高 ($P < 0.05$) ; 与模型组比较 阳性药物组、PAMK 高剂量组大鼠胸腺、脾脏指数降低 ($P < 0.05$) , 而 PAMK 低剂量组差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 。见表 4。

表4 各组大鼠胸腺、脾脏指数比较($\bar{x} \pm s$, mg/g)

组别	胸腺指数	脾脏指数
正常对照	0.98 ± 0.07	2.25 ± 0.06
模型	1.72 ± 0.15*	3.86 ± 0.37*
阳性药物	1.06 ± 0.05#	2.38 ± 0.24#
PAMK 低剂量	1.68 ± 0.13	3.88 ± 0.41
PAMK 高剂量	1.02 ± 0.06#	3.34 ± 0.08#
F 值	41.583	24.916
P 值	<0.001	<0.001

与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

2.5 各组大鼠踝关节滑膜组织病理学变化 如图 1 所示 正常对照组大鼠滑膜组织结构正常 表面光

滑无增生; 模型组、PAMK 低剂量组大鼠滑膜组织增生 层次不清 伴有大量炎性细胞浸润; 阳性药物组、PAMK 高剂量组滑膜组织增生和炎性细胞浸润明显改善。

2.6 各组大鼠血清及踝关节滑膜组织中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平 与正常对照组比较 模型组大鼠血清及踝关节滑膜组织中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平升高 ($P < 0.05$) ; 与模型组比较 阳性药物组、PAMK 高剂量组大鼠血清及踝关节滑膜组织中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平降低 ($P < 0.05$) , 而 PAMK 低剂量组差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 。见表 5。

2.7 各组大鼠踝关节滑膜组织中 TLR4、MyD88、p-NF- κ B p65 及 NF- κ B p65 蛋白表达水平 与正常对照组比较 模型组大鼠踝关节滑膜组织中 TLR4、MyD88、p-NF- κ B p65 及 NF- κ B p65 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$) ; 与模型组比较 阳性药物组、PAMK 高剂量组大鼠踝关节滑膜组织中 TLR4、MyD88、p-NF- κ B p65 及 NF- κ B p65 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$) , 而 PAMK 低剂量组差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 。见图 2、表 6。

3 讨论

自身免疫激活是 RA 发病的关键 随后的炎症因子大量释放 导致滑膜炎发生。苍术属植物种类繁多 白术是其中之一 在中国药典中白术和苍术有着明确的区分 但在日本部分品种的苍术也被当

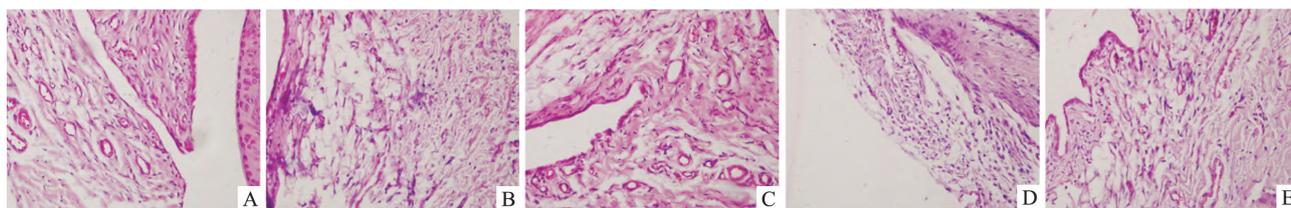


图1 踝关节滑膜组织 HE 染色 ×400

A: 正常对照组; B: 模型组; C: 阳性药物组; D: PAMK 低剂量组; E: PAMK 高剂量组

表5 各组血清及踝关节滑膜组织中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平 ($\bar{x} \pm s$, ng/L, n=12)

组别	血清			踝关节滑膜组织		
	IL-1β	IL-6	TNF-α	IL-1β	IL-6	TNF-α
正常对照	43.52 ± 3.27	29.87 ± 3.16	86.05 ± 6.19	67.55 ± 5.81	43.17 ± 4.02	62.91 ± 4.73
模型	112.17 ± 8.34*	75.02 ± 6.25*	216.72 ± 12.23*	294.32 ± 14.15*	132.63 ± 8.61*	184.53 ± 10.15*
阳性药物	58.34 ± 5.66 [#]	43.51 ± 5.33 [#]	114.21 ± 9.28 [#]	96.20 ± 6.19 [#]	72.54 ± 5.29 [#]	81.44 ± 6.05 [#]
PAMK 低剂量	106.88 ± 9.03	71.34 ± 7.42	205.39 ± 11.73	297.68 ± 12.55	136.28 ± 6.14	177.01 ± 8.49
PAMK 高剂量	52.97 ± 4.61 [#]	30.58 ± 4.57 [#]	103.81 ± 8.46 [#]	84.05 ± 5.37 [#]	57.53 ± 3.26 [#]	88.62 ± 6.44 [#]
F 值	72.602	45.878	117.453	445.334	168.866	184.508
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与正常对照组比较: * P < 0.05; 与模型组比较: [#] P < 0.05

表6 各组踝关节滑膜组织 TLR4、MyD88、p-NF-κB p65 及 NF-κB p65 蛋白相对表达水平 ($\bar{x} \pm s$, n=12)

组别	TLR4	MyD88	p-NF-κB p65	NF-κB p65
正常对照	0.05 ± 0.01	0.11 ± 0.04	0.09 ± 0.02	0.18 ± 0.02
模型	1.16 ± 0.07*	1.01 ± 0.06*	1.19 ± 0.06*	1.12 ± 0.04*
阳性药物	0.14 ± 0.04*	0.04 ± 0.02 [#]	0.13 ± 0.03 [#]	0.75 ± 0.05 [#]
PAMK 低剂量	1.15 ± 0.06*	1.03 ± 0.08	1.12 ± 0.05	1.16 ± 0.06
PAMK 高剂量	0.07 ± 0.03*	0.09 ± 0.02 [#]	0.17 ± 0.04 [#]	0.66 ± 0.02 [#]
F 值	464.230	321.508	527.667	280.200
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与正常对照组比较: * P < 0.05; 与模型组比较: [#] P < 0.05

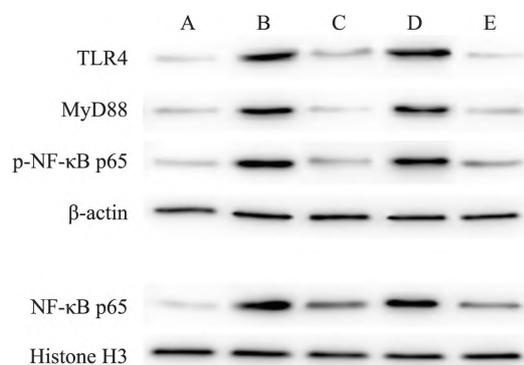


图2 Western blot 检测各组心肌组织中 TLR4、MyD88、p-NF-κB p65 及 NF-κB p65 蛋白表达

A: 正常对照组; B: 模型组; C: 阳性药物组; D: PAMK 低剂量组; E: PAMK 高剂量组

做白术使用。有学者研究了包括白术在内的五种苍

术属植物在 RA 中的作用,发现这些植物均可有效降低 RA 大鼠血清中炎症因子水平,从而改善 RA^[7]。但其研究仅限于白术复合物,并非单体物质,复合物的药理成分复杂,稳定性差,而 PAMK 作为白术中起主要作用的单体物质,成分单一,稳定性更好。因此,本研究进一步探索了 PAMK 对 RA 的抗炎作用及可能机制。

本研究通过 II 型胶原诱导建立 RA 大鼠模型后,模型组大鼠精神倦怠,食欲减退,四肢出现明显红肿及变形,体质量较正常对照组大鼠显著降低,足趾肿胀度和关节炎指数显著升高,且踝关节滑膜组织增生,病理学改变明显,以上提示 RA 大鼠造模成功。经 PAMK 治疗后,大鼠体质量较模型组显著升高,足趾肿胀度和关节炎指数显著降低,且踝关节滑膜组织结构趋于正常,说明 PAMK 可保护 RA 大鼠

踝关节滑膜组织,对 RA 有改善作用。

脾脏和胸腺是机体内重要的免疫器官,胸腺指数和脾脏指数可以在一定程度上反映机体免疫水平的高低及状态。本研究结果显示,模型组大鼠胸腺指数和脾脏指数较正常对照组显著升高,标志着 RA 大鼠免疫系统的激活,局部抗原发生改变,在滑膜组织中炎症因子大量释放,导致滑膜炎的发生^[8]。IL-1 β 是一种破骨细胞激活因子,它常与 TNF- α 同时合成和分泌,共同破坏关节软骨,造成关节损伤^[9]。IL-6 是一种重要的促炎因子,参与多种人体炎症反应和疾病,同时还能促进免疫细胞的增殖和分化^[10]。IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 刺激着软骨细胞、滑膜细胞分泌胶原酶等物质,破坏软骨细胞周围环境,是 RA 过程中起主要作用的炎性介质^[11]。本研究显示,模型组大鼠血清及踝关节滑膜组织中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平较正常对照组显著升高,经 PAMK 治疗后,大鼠 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平显著降低,且胸腺指数和脾脏指数显著降低,说明 PAMK 可通过调节机体免疫水平,从而减轻 RA 大鼠炎症反应。

MyD88 是 TLR4/NF- κ B 信号通路中重要的接头蛋白分子,可以通过传导信号激活下游多种转录因子。TLR 是非特异性免疫反应中的重要蛋白质分子,能够通过识别脂多糖、膜脂蛋白等分子参与机体免疫系统调节^[12]。其中 TLR4 是关键信号传导蛋白之一,可以通过与相应配体结合活化 NF- κ B,启动和调控炎症级联反应,在 RA 过程中发挥重要作用^[13]。NF- κ B 由 p65 和 p50 两个亚基组成,通常情况下与其抑制性蛋白 I κ B 结合而呈非活化状态,受到刺激后,NF- κ B p65 磷酸化使 I κ B 降解,导致 NF- κ B 入核并活化,从而刺激炎症因子的释放,加重炎症损伤^[14]。本研究显示,模型组大鼠踝关节滑膜组织中 TLR4、MyD88、p-NF- κ B p65 及 NF- κ B p65 蛋白表达水平较正常对照组显著升高,标志着 TLR4/NF- κ B 信号通路的激活,经 PAMK 治疗后,大鼠 TLR4、MyD88、p-NF- κ B p65 及 NF- κ B p65 蛋白表达水平显著降低,说明 PAMK 减轻 RA 大鼠机体炎症反应,可能是通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路实现的。

综上所述,PAMK 可以通过减轻机体炎症反应,起到对 RA 大鼠的治疗和保护作用,其机制可能是

通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路的活化实现的,为 RA 的临床治疗提供了新的参考依据。

参考文献

- [1] 许海艳,况南珍,张瑜娟,等. 类风湿性关节炎治疗方法的研究进展[J]. 南昌大学学报(医学版),2020,60(5):97-102.
- [2] 杨锦涛,程希,陈红伟,等. 白术多糖免疫调节作用机制的研究进展[J]. 中国兽药杂志,2018,52(6):80-5.
- [3] 李磊,吴昊,杨安忠,等. 鼠尾草提取物对类风湿性关节炎的治疗作用及其机制研究[J]. 中国中医骨伤科杂志,2020,28(9):6-11.
- [4] 李婉雁,曹楠,田允波,等. 白术多糖通过 Toll 样受体 4/核因子- κ B 信号通路调控雏鸡脾脏淋巴细胞免疫功能[J]. 动物营养学报,2019,31(11):5192-201.
- [5] Liao L X, Song X M, Wang L C, et al. Highly selective inhibition of IMPDH2 provides the basis of antineuroinflammation therapy [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(29): E5986-94.
- [6] 朱健,武璐璐,张全书,等. 枫杨乙醇提取物对胶原诱导性关节炎大鼠的治疗作用及其机制研究[J]. 中国药理学通报,2019,35(1):117-23.
- [7] Liu Y, Zhang B, Cai Q. Study on the pharmacodynamics and metabolomics of five medicinal species in *Atractylodes* DC. on rats with rheumatoid arthritis [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 131: 110554.
- [8] 龚辉,邓奕辉,王衡新,等. TOLL 样受体 2、4 及其介导的 NF- κ B 信号通路参与类风湿关节炎发病的研究进展[J]. 中医正骨,2018,30(7):29-31.
- [9] 范卫闯,吕立桃. 当归四逆汤对类风湿性关节炎模型大鼠炎症因子表达及 TLR/Beclin-1 信号通路的影响[J]. 中药与临床,2020,11(2):27-30.
- [10] 梁宏,蔡惠芳,徐佳妮. 箭羽散对湿热型痛风性关节炎患者血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 表达的影响[J]. 吉林中医药,2019,39(8):1059-62.
- [11] 肖伟,丁敬韬,任翔,等. 类风湿性关节炎患者血清炎症细胞因子水平的临床价值分析[J]. 中国社区医师,2020,36(20):65-7.
- [12] 单佳铃,程虹毓,文乐,等. TLR/MyD88/NF- κ B 信号通路参与不同疾病作用机制研究进展[J]. 中国药理学通报,2019,35(4):451-5.
- [13] Liu W, Wu Y H, Zhang L, et al. MicroRNA-146a suppresses rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes proliferation and inflammatory responses by inhibiting the TLR4/NF- κ B signaling [J]. Oncotarget, 2018, 9(35):23944-59.
- [14] 丁章楠,博庆丽,费君,等. 罗格列酮对细菌脂多糖所致小鼠肺部炎症和氧化应激的保护效应[J]. 安徽医科大学学报,2021,56(2):282-6.

Effect of polysaccharide of *Atractylodes macrocephala* koidz on anti-inflammatory effects and TLR4/NF- κ B signaling pathway in rats with rheumatoid arthritis

Li Mei¹ Jiang Jinmei¹ ,Ou Daming¹ ,Huang Lifang¹ ,Xie Lihu¹ ,Zhang Ji²

(¹Dept of Rheumatology and Immunology ,²Laboratory of Rheumatology and Immunology ,
The First Affiliated Hospital of Nanhua University ,Hengyang 421001)

Abstract Objective To investigate the anti-inflammatory effect of polysaccharide from *Atractylodes atractylodes* (PAMK) on rheumatoid arthritis (RA) rats and its effect on Toll like receptor 4/nuclear factor kappa-B (TLR4/NF- κ B) signaling pathway. **Methods** RA rat model was induced by type II collagen ,after successful modeling , the rats were divided into model group , positive drug group (*Tripterygium wilfordii* polyglycoside tablet) , PAMK low-dose and high-dose groups , normal control group was also set , with 12 rats in each group. *Tripterygium wilfordii* polyglycoside tablets or *Atractylodes macrocephala* polysaccharide were administered intragastric administration , once a day for 4 weeks. The body weight , paw swelling rate and arthritis index of rats were measured; the thymus index and spleen index were calculated; HE staining was used to observe the histopathological changes of synovial membrane of ankle joint; The levels of interleukin-1 β (IL-1 β) , interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum and synovial tissue of ankle were determined by ELISA; The expression levels of total protein TLR4 , MyD88 , phosphorylated NF- κ B p65 (Ser536) and nuclear protein NF- κ B p65 in synovial tissue of ankle were detected by Western blot. **Results** Compared with the normal control group , synovial hyperplasia and unclear layers were observed in the model group , body weight decreased ($P < 0.05$) , paw swelling rate , arthritis index , thymus index and spleen index increased ($P < 0.05$) , the levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in serum and synovial tissue of ankle , and the protein expressions of TLR4 , MyD88 , p-NF- κ B p65 and NF- κ B p65 in synovial tissue of ankle increased ($P < 0.05$) . Compared with model group , the histomathological changes of synovial of ankle joint in positive drug group and PAMK high-dose group were significantly improved , body weight increased ($P < 0.05$) , paw swelling rate , arthritis index , thymus index and spleen index decreased ($P < 0.05$) , the levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in serum and synovial tissue of ankle , and the protein expressions of TLR4 , MyD88 , p-NF- κ B p65 and NF- κ B p65 in synovial tissue of ankle decreased ($P < 0.05$) , however , there were no significant differences in the above indexes between PAMK low-dose group and model group ($P > 0.05$) . **Conclusion** PAMK can reduce the inflammatory response and improve RA , and the mechanism may be related to the inhibition of TLR4/NF- κ B signaling pathway activation.

Key words polysaccharide of *Atractylodes macrocephala* koidz; rheumatoid arthritis; inflammation; TLR4/NF- κ B signaling pathway