中图分类号：R593.22；R392.11 编号：20120101

**承德医学院**

硕士研究生毕业论文

**穿龙薯蓣皂苷对胶原诱导性关节炎小鼠CD4+T细胞亚群平衡的影响及其调控机制研究**

**Effects of dioscin from Dioscorea nipponica on CD4+ T cell subsets in collagen-induced arthritis mice and its regulation mechanism**

研究生：安高

导 师：宋鸿儒 教授学科专业：免疫学

所在系部：基础医学院

研究起止日期：2013年9月～2015年3月论文提交日期：2015年3 月

**穿龙薯蓣皂苷对胶原诱导性关节炎小鼠CD4+T细胞亚群平衡的影响及其调控机制研究**

**Effects of dioscin from Dioscorea nipponica on CD4+ T cell subsets in collagen-induced arthritis mice and its regulation mechanism**

研究生：安高

学号：20120101

年级：2012 级

导师：宋鸿儒教授学科专业：免疫学

所在系部：基础医学院研究方向：中药免疫学

研究起止日期：2013年9月～2015年3月论文提交日期：2015年3 月

**承德医学 院**

**学位论文使用授权及知识产权归属承诺**

本学位论文在导师（或指导小组）的指导下，由本人独立完成。本学位论文研究所获的研究成果，其知识产权归承德医学院所有。承德医学院有权对本学位论文进行交流、公开和使用。凡发表与学位论文主要内容相关的论文，第一署名单位为承德医学院，试验材料、原始数据、申报的专利等知识产权均归承德医学院所有。否则，承担相应的律责任。

研究生签名：导师签章：

日期：年月日

**承德医学 院**

**研究生学位论文独创性声明**

本论文是在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果，除了文中特别加以标注和致谢等内容外，文中不包含其他人已经发表或撰写的研究成果，指导老师对此进行了审定。本论文有本人独立撰写，文责自负。

研究生签名：导师签章：

日期：年月日

目 录

[摘要](#_Toc686634409) 3

[结论](#_Toc686634410)**[:](#_Toc686634410)** 4

**[Abstract](#_Toc686634411)** 4

[前言](#_Toc686634412) 9

[1 材料](#_Toc686634413) 9

[2 实验方法](#_Toc686634414) 15

[1 小鼠的一般情况、足爪肿胀度及AI 值](#_Toc686634415) 22

[2 流式细胞术检测结果（Table.2）](#_Toc686634416) 22

[3 western blot检测结果（Table.3, Fig.10）](#_Toc686634417) 22

[4 PCR检测结果（Table.4）](#_Toc686634418) 23

[结论](#_Toc686634419) 29

[参考文献](#_Toc686634420) 29

[参考文献](#_Toc686634421) 33

**穿龙薯蓣皂苷对胶原诱导性关节炎小鼠CD4+T细胞亚群平衡的影响及其调控机制研究**

摘**要**

类风湿性关节炎是一种常见的自身免疫病，病变特点为慢性侵蚀性关节炎，以及由此造成的关节软骨和骨质破坏，如不治疗，疾病逐渐发展，最后可导致关节畸形。CD4+T细胞是机体免疫系统的重要组成部分，在疾病的发生和发展中具有重要作用。CD4+T细胞按照其功能的不同可以分为Th1、Th2、Th17和Treg细胞。早期研究认为RA发病主要与Th1细胞相关。但近期研究发现，Th1、Th2、Th17和Treg细胞均与RA的发生密切相关。

穿ft龙是薯蓣科薯蓣属植物穿龙薯蓣的根茎，民间多用其浸酒或煎服，治疗筋骨麻木和腰酸腰痛。薯蓣皂苷（dioscin）是从穿龙薯蓣中分离得到的甾体皂苷，是生产多种激素类药物的重要原料，同时也被认为是许多中药复方的主要活性成分，如维奥欣片、地奥心血康胶囊。现代药理学研究证实，薯蓣皂苷具有多种生物活性作用。可以肯定，薯蓣皂苷是一种很有潜力的药物。

**目的：**

研究穿龙薯蓣皂苷对鸡Ⅱ型胶原诱导的关节炎(CIA)小鼠CD4+T细胞亚群平衡的影响及其具体调控机制，初步明确穿龙薯蓣皂苷对CIA小鼠产生治疗作用的机制，为薯蓣皂苷的进一步研究及临床应用提供一定的理论依据。

**方法：**

采用随机数字表法将72只DBA1/J小鼠分为对照组、模型组、薯蓣皂苷组、雷公藤组，用制备的Ⅱ型胶原乳剂免疫模型组、薯蓣皂苷组和雷公藤组小鼠，第21天相同剂量加强1次。对照组按照上述方法注射等量生理盐水。从初次免疫第22天开始，薯蓣皂苷组灌胃给予100mg/kg/d穿龙薯蓣皂苷混悬液，雷公藤组根据说明书按照人/鼠体表面积比值灌胃给予含雷公藤甲素的雷公藤片混悬液（按雷公藤甲素计17µg/kg/d），对照组和模型组给予等体积溶媒。初次免疫第35天处死小鼠，无菌取腹股沟淋巴

1

结，制成单细胞悬液，用流式细胞术检测CD4+T细胞亚群Th1、Th2、Th17、

Treg细胞的百分率；用western blot技术检测信号传导及转录激活因子p-STAT1、p-STAT3、p-STAT4、p-STAT5、p-STAT6 和细胞因子信号转导负调控蛋白SOCS3的含量；用实时荧光定量PCR技术检测转录因子T-bet、

GATA3、RORγt、Foxp3的表达情况。**结果：**

1体重、足爪肿胀度及AI值变化

对照组小鼠体重稳定增长，而模型组小鼠因为关节发病，体重下降明显（*P*<0.05），薯蓣皂苷组小鼠体重对比对照组小鼠体重下降明显（*P*<0.05），但和模型组相比差异无统计学意义（*P*> 0.05）。雷公藤组小鼠和薯蓣皂苷组小鼠体重变化情况相似。

对照组小鼠足垫厚度在实验过程中无显著变化，稳定在1.40 mm左右，而模型组小鼠足垫到35天达到1.99 mm，与关节炎症严重程度一致，与对照组小鼠相比差异有统计学意义（*P*<0.05）。薯蓣皂苷组小鼠足垫厚度上升幅度较模型组为轻，与模型组相比差异有统计学意义（*P*<0.05）。雷公藤组小鼠足爪肿胀情况最轻，第35天足垫厚度只有1.72 mm。与模型组相比差异有统计学意义（*P*<0.05）。雷公藤组小鼠和薯蓣皂苷组小鼠相比差异无统计学意义（*P*> 0.05）。

对照组小鼠足爪无红肿表现，AI值在实验过程中一直为0，而模型组小鼠第35天AI指数达到11.84，与对照组小鼠对比差异有统计学意义

（*P*<0.05）。薯蓣皂苷组小鼠关节炎指数相比模型组有明显改善（*P*<0.05）。雷公藤组小鼠关节炎指数最小，症状最轻，相比模型组改善明显（*P*<0.05）。雷公藤组小鼠和薯蓣皂苷组小鼠相比差异无统计学意义（*P*> 0.05）。

2流式细胞术检测Th1、Th2、Th17、Treg细胞的百分率

与对照组相比，模型组Th1细胞比率明显升高（*P*<0.05），薯蓣皂苷组相比模型组则显著降低（*P*<0.05）。对照组和模型组相比，Th2 细胞比率差异无统计学意义（*P*> 0.05），薯蓣皂苷组则高于模型组（*P*<0.05）。与对照组相比，模型组Th17细胞比率显著升高（*P*<0.05），薯蓣皂苷组则显著降低（*P*<0.05）。对照组和模型组相比，Treg细胞比率差异无统计学意 义（*P*> 0.05），与模型组相比，薯蓣皂苷组Treg细胞比率显著升高（*P*<0.05）。

3 western blot技术检测p-STAT1、p-STAT3、p-STAT4、p-STAT5、

2

p-STAT6和SOCS3的含量

模型组与对照组相比，p-STAT1 显著升高（*P*<0.05）。模型组相比对照组p-STAT3显著升高（*P*<0.05），薯蓣皂苷组与模型组相比则显著下降

（*P*<0.05），而雷公藤组下降较薯蓣皂苷组小。模型组与对照组对比，p-STAT4显著升高（*P*<0.05），薯蓣皂苷组则明显下降（*P*<0.05），雷公藤组较薯蓣皂苷组更为降低。模型组相比对照组p-STAT5显著升高（*P*<0.05），薯蓣皂苷组对比模型组显著升高，雷公藤组升高较小。与对照组相比，薯蓣皂苷组p-STAT6明显升高（*P*<0.05）。与对照组相比，模型组、薯蓣皂苷组和雷公藤组SOCS3显著升高（*P*<0.05），薯蓣皂苷组和模型组相比差异无统计学意义（*P*> 0.05）而雷公藤组和模型组相比则明显升高。

4实时荧光定量PCR技术检测转录因子T-bet、GATA3、RORγt、Foxp3

的表达情况

模型组与对照组相比，T-bet显著升高（*P*<0.05）。模型组与对照组相比GATA-3差异无统计学意义（*P*> 0.05）,薯蓣皂苷组和雷公藤组与模型组相比显著升高（*P*<0.05），薯蓣皂苷组升高更为明显（*P*<0.05）。模型组与对照组相比，RORγt 显著升高（*P*<0.05），薯蓣皂苷组和雷公藤组与模型组相比显著下降（*P*<0.05）。模型组与对照组相比，Foxp3 显著升高

（*P*<0.05）。

结论**:**

薯蓣皂苷通过调节CD4+T细胞亚群分化关键转录因子进而影响Th1、

Th2、Th17、Treg细胞分化和平衡，从而对胶原诱导性关节炎小鼠产生疗效，其有望开发成为一种新的治疗类风湿性关节炎的药物。

**关键词：**薯蓣皂苷；关节炎；鸡Ⅱ型胶原； T 细胞亚群；转录因子； 流式细胞术；实时荧光定量； PCR

3

**Effects of dioscin from Dioscorea nipponica on CD4+ T cell subsets in collagen-induced arthritis mice and its regulation mechanism**

**Abstract**

Rheumatoid arthritis is a chronic autoimmune disease which is characterized by erosive arthritis and the resulting articular cartilage and bone destruction. Without proper treatment, the illness will progressively worse, eventually leading to joint deformity. CD4+T cells are an important component of immune system and play an important role in the occurrence and development of diseases. CD4+ T cells can be divided into Th1, Th2, Th17 and Treg cells in accordance with their different functions. Early studies suggest that the incidence of RA is mainly associated with the Th1 cells, But recent studies have found that, but recent studies have found that, Th1, Th2, Th17 and Treg cells are closely related to the incidence of RA.

Dioscorea nipponica often used as drugs. Folks always dip it into the wine or decocted it, to treat backache and numbness. Dioscin which is isolated from Dioscorea nipponica is steroidal saponins, and it is an important basic raw materials for producing steroid drugs. Dioscin is considered to be the main active ingredient in many traditional Chinese medicine, such as Diaoxinxuekang capsules and weiaoxin tablets. Modern pharmacological studies confirmed that dioscin has a variety of biological activity. To be sure, dioscin is a promising drug.

**Objective:**

To observe the influence and specific regulatory mechanism of dioscin on CD4+ T cell subsets on chicken type Ⅱcollagen-induced arthritis in mice,

Initially clear what mechanism dioscin to produce a therapeutic effect by and provide a theoretical basis for further research and clinical application of dioscin.

**Methods:**

4

A total of 72 DBA1/J mice were divided into four groups(control group, model group, dioscin group and triptolide group) randomly. Prepared the typeⅡcollagen emulsion by mixing the chick type Ⅱcollagen with Freund's

Complete adjuvant. The mice in model group, dioscin group and triptolide group were immunized by this type Ⅱcollagen emulsion under aseptic

Condition. Each mouse is injected intracutaneously with 0.1 mL in tail root and the same procedure repeated on the 21st day after the first immunization. The control group was injected with saline as described above. Starting from the 22nd day of the first immunization, dioscin group was given suspension of dioscin 100mg /kg/d. Triptolide group was given suspension of triptolide

According to the ratio of body surface of human and mouse(By triptolide

Meter 17μg/kg/d）. The mice of model group and control group were given equal volume of solvent. The mice were killed in the thirty-five days after the first immunization, take lymph nodes in the groin under sterile condition. The percentage of Th1, Th2, Th17 and Treg cells were detected by flow cytometry. The contents of p-STAT1, p-STAT3, p-STAT4, p-STAT5, p-STAT6 and SOCS3 were detected by Western Blot Assay. The expression of the transcription factor T-bet, RORγt, Foxp3 and GATA3 were observed by real-time PCR technique.

**Results:**

1 Changes of body weight, paw swelling and AI value

Weight of mice in the control group growed steady, while the model group decreased significantly because arthritis(*P*<0.05). Compared to control group, dioscin group decreased significantly (*P*<0.05 ), but there was no significant difference between model group and dioscin group(*P*> 0.05). triptolide group was similar to the dioscin group.

Footpad thickness of mice in the control group had no significant change during the experiment, stabilizing at around 1.40 mm. While the model group reached 1.99 mm in the 35th day after immunized, consistent with the severity of arthritis. There had significant difference compared with the control group(*P*<0.05). Footpad thickness of mice in the dioscin group increased less

5

Compared with the model group, the difference was statistically significant (*P*<0.05). Footpad thickness of mice in the triptolide group increased least and reached only 1.72 mm in the 35th day after immunized. Compared with the model group, difference was statistically significant (*P*<0.05). There was no significant difference between triptolide group and dioscin group(*P*> 0.05).

Control group showed no swelling and AI value has been to 0 during the experiment. While AI index of model group reached 11.84 in the 35th day after immunized, compared with the control group the difference was statistically significant (*P*<0.05). AI index of dioscin group significantly improved compared to the model group(*P*<0.05). AI index of triptolide group was smallest and the symptom was lightest. There was no significant difference between triptolide group and dioscin group(*P*> 0.05).

2 Percentage of Th1, Th2, Th17 and Treg cells detected by flow cytometry

Compared with the control group, the ratio of Th1 cells in model group was significantly higher (*P*<0.05). The ratio of Th1 cells was significantly lower in dioscin group compared to the model group(*P*<0.05). Control group

Compared with the model group, the ratio of Th2 cells showed no difference (*P*> 0.05). Dioscin group was higher than model group(*P*<0.05). Compared with the control group, the ratio of Th17 cells in model group were significantly higher (*P*<0.05). Dioscin group was significantly lower than model group. The ratio of Treg cells showed no difference between control group and model group(*P*> 0.05). Dioscin group was significantly higher than model group(*P*<0.05).

3 Western blot detection of transcription factor p-STAT1, p-STAT3, p-STAT4, p-STAT5, p-STAT6 and SOCS3 content

Compared with the control group, p-STAT1 in model group was significantly higher(*P*<0.05). P-STAT3 increased significantly in model group compared with the control group(*P* <0.05). In dioscin group p-STAT3 decreased significantly (*P*<0.05) and triptolide group decreased less(*P*<0.05). Compared with the control group, p-STAT4 in model group was significantly

6

Higher (*P*<0.05). In dioscin group p-STAT4 decreased significantly (*P*<0.05) and triptolide group decreased more(*P*<0.05). P-STAT5 in model group increased significantly compared with the control group(*P*<0.05). Dioscin group increased significantly compared with the model group(*P*<0.05), and triptolide group increased less(*P*<0.05). Compared with the control group, p-STAT6 significantly increased in dioscin group(*P*<0.05). SOCS3 increased in all the other group compared with the control group. SOCS3 showed no difference between dioscin group and model group(*P*> 0.05), but triptolide group was significantly higher(*P*<0.05) than model group.

4 Real-time PCR technology to detect expression of transcription factor T-bet, GATA3, RORγt, Foxp3

Compared with the control group, T-bet was significantly higher in model group(*P*<0.05). Compared control group to model group GATA-3 showed no difference (P> 0.05), but dioscin group and triptolide group was significantly higher than model group (*P*<0.05) and dioscin group increased more. Compared with the control group, RORγt increased significantly in model group. Dioscin group and triptolide group decreased compared with model group(*P*<0.05). Foxp3 was significantly higher(*P*<0.05) in model group compared with the control group.

**Conclusion:**

Dioscin can regulate differentiation of CD4+ T cell subset by adjusting key transcription factors and then affects the balance of Th1/Th2 and Th17/Treg cells, which have an effect on collagen-induced arthritis in mice. It is expected to develop a new drug to treat rheumatoid arthritis.

**KEy words:**

Dioscin; arthritis; chick typeⅡcollagen; T cell subsets; transcription factor; flow cytometry; Real-time PCR

7

**英文缩写**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 英文缩写 | 英文全称 | 中文名称 |
| Dio | Dioscin | 薯蓣皂苷 |
| CIA | Collagen-induced arthritis | 胶原诱导性关节炎 |
| AI | Arthritis index | 关节炎指数 |
| RA | Rheumatoid arthritis | 类风湿性关节炎 |
| JAK | Janus Kinase | Janus 激酶 |
| STAT | Signal transducers and activators of  transcription | 信号传导及转录激活因子 |
| NF-κB | Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer  Of activated B cells | 活化B 细胞核因子κ  轻链增强子 |
| T-bet | T-box transcription factor TBX21 | T 盒 转 录 因 子  TBX21 |
| GATA3 | Trans-acting T-cell-specific transcription  Factor GATA-3 | 反式调控 T 细胞特异转录因子 GATA-3 |
| RORγt | RAR-related orphan receptor gamma t | 维甲酸相关核孤儿  受体 γt |
| Foxp3 | Forkhead box P3 | 叉状头转录因子 3 |
| SOCS3 | Suppressor of cytokine signaling 3 | 细胞因子信号转导  负调控蛋白 3 |
| IFN-γ | Interferon-γ | 干扰素-γ |
| TGF-β | Transforming growth factor-β | 转化生长因子-β |
| COX | cyclo-oxygen-ase | 环氧酶 |
| MMP | Matrix metalloproteinase | 基质金属蛋白酶 |
| IL | Interleukin | 白介素 |
| PMA | Phorbol-12-myristate-13-acetate | 丙二醇甲醚醋酸酯 |
| BFA | Brefeldin A | 布雷非德菌素 A |
| DEPC | Diethy pyrocarbonate | 焦碳酸二乙酯 |
| CD | Cluster of differentiation | 分化群 |
| PCR | Polymerase chain reaction | 聚合酶链反应 |

8

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| PE | Phycoerythrin | 藻红素 |
| FITC | Fluorescein isothiocyanate | 异硫氰酸荧光素 |
| OD | Optical density | 光密度值 |
| d | Day | 天 |
| h | Hour | 小时 |
| ig | Intragastric gavage | 灌胃给药 |
| min | Minute | min |
| rpm | Revolutions per minute | 每 min 转速 |
| CFA | Freund's complete adjuvant | 弗氏完全佐剂 |
| PBS | Phosphate buffered saline | 磷酸盐缓冲液 |
| RPMI-l640 | Roosevelt Park Memorial Institute  Medium 1640 | RPMI-l640 培养基 |

9

**穿龙薯蓣皂苷对胶原诱导性关节炎小鼠CD4+T细胞亚群平衡的影响及其调控机制研究**

前**言**

类风湿性关节炎是一种常见的自身免疫病，病变特点为炎性滑膜炎，病理检查可见炎性细胞浸润，滑膜增生，血管翳形成及软骨和骨组织的破坏。患者常有对称性多关节炎症，部分患者可有类风湿结节，血液学分析可见类风湿因子阳性，X线片检查可见侵袭性骨破坏，关节间隙狭窄。如不治疗，疾病逐渐发展，最后可导致关节畸形。目前关于类风湿性关节炎并无特效药物，治疗主要以缓解症状、减轻关节炎症反应、延缓不可逆性关节破坏为目的。常用非甾体抗炎药（NSAIDS）和抗风湿药（DMARDs），近年有许多生物制剂被批准用于类风湿性关节炎的治疗，如英夫利昔单抗

（Infliximab）、阿达木单抗等，但其治疗效果并不令人满意。

类风湿性关节炎的发病原因至今未明，目前的研究认为，其发病与遗传、免疫、感染等有关。因为类风湿性关节炎的男女发病率不等，所以性别因素也可能具有重要作用。近些年来，随着免疫学与分子生物学技术的发展，CD4+T细胞各亚群的作用逐渐被阐明，根据功能和分泌的细胞因子的不同可将CD4+T细胞分为Th1、Th2、Th17、Treg细胞，这些细胞在细胞免疫和体液免疫中互相影响、相互制约，共同维护机体的免疫平衡，防止机体收到疾病的损害。已经证实Th1、Th2、Th17、Treg细胞在RA的发生和发展中发挥着极其重要的作用。

穿龙薯蓣是薯蓣科多年生草本植物，其性平，味苦，治风寒湿痹。穿龙薯蓣皂苷是从穿龙薯蓣的根茎中提取出来的螺旋甾烷型甾体皂苷。现代药理学研究证实，薯蓣皂苷具有抗肿瘤，调节免疫，降血脂、等多种生物活性作用[1-5]，可以调节细胞因子的分泌，影响免疫细胞功能。

**材料与方法**

# 1 材料

## 1.1 实验动物

10

雄性SPF级DBA1/J小鼠72只，7-8周龄，体重18-22克，购于上海斯莱克实验动物有限责任公司，许可证号码：SCXK(沪) 2012-0002。所有动物饲养于SPF级屏障动物室，每笼5只，自由饮食，室内温度24±1℃，室内湿度为55±5%，每日光照12h（7:00–19:00）。实验前适应性饲养一周。

## 1.2 试剂与仪器

### 1.2.1 主要试剂及配制

|  |  |
| --- | --- |
| 鸡Ⅱ型胶原 | 美国 Chondrex 公司 |
| 弗氏完全佐剂 | 美国 Sigma 公司 |
| 水合氯醛 | 中国成都市科龙化工试剂  厂 |
| Na2HPO4▪12H2O | 中国天津市福晨化学试剂  厂 |
| NaOH | 中国天津市福晨化学试剂厂 |
| NaH2PO4▪2H2O | 中国天津市福晨化学试剂厂 |
| 无水乙醇 | 中国北京化工厂 |
| 胎牛血清 | 美国 sigma 公司 |
| RPMI-l640 培养液 | 美国 thermo 公司 |
| PBS | 美国 thermo 公司 |
| Trizol Reagent | 美国 invitrogen 公司 |
| 琼脂糖 | 美国 Uniche Co 公司 |
| 异丙醇 | 中国北京化工厂 |
| 氯仿 | 中国北京化工厂 |
| 丙酮 | 中国天津市德恩化学试剂有限公司 |
| 薯蓣皂苷 | 中国南京春秋生物工程有  限公司 |
| PMA/Ionomycin mixture | 中国联科生物公司 |
| BFA/Monensin mixture | 中国联科生物公司 |
| FIX&PERM CELL PERMEABILIZATION | 中国联科生物公司 |

11

|  |  |
| --- | --- |
| REAGENTS |  |
| SYBR Premix Ex TaqTM II 试剂盒 | 中国大连宝生物工程有限  公司 |
| PrimeScript RT reagent Kit With  gDNA Eraser 试剂盒 | 中国大连宝生物工程有限公司 |
| PageRuler Prestained Protein Ladder | 美国 thermo 公司 |
| SuperSignal West Pico 化学发光底物 | 美国 thermo 公司 |
| Anti-STAT1(phospho Y701) antibody | 英国 Abcam 公司 |
| Anti-STAT5a(phospho Y694) antibody | 英国 Abcam 公司 |
| Anti-STAT4(phospho Y693) antibody | 英国 Abcam 公司 |
| Anti-STAT3(phospho S727) antibody | 英国 Abcam 公司 |
| Anti-STAT6(phospho Y641) antibody | 英国 Abcam 公司 |
| Anti-SOCS3 antibody | 英国 Abcam 公司 |
| β-Actin antibody | 美国SANTA CRUZ 生物公司 |
| BCA 蛋白浓度测定试剂盒 | 美国 thermo 公司 |
| RIPA 裂解液 | 中国碧云天公司 |
| SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5X) | 中国碧云天公司 |
| PMSF(100mM) | 中国碧云天公司 |
| 辣根过氧化物酶标记ft羊抗兔 IgG | 中国碧云天公司 |
| Anti-Mouse CD3e FITC 抗体 | 美国 Ebioscience 公司 |
| Anti-Mouse CD3e PE 抗体 | 美国 Ebioscience 公司 |
| Anti-Mouse CD3e PE-Cyanine5 抗体 | 美国 Ebioscience 公司 |
| Anti-Mouse CD25 PE 抗体 | 美国 Ebioscience 公司 |
| Anti-Mouse CD69 PE 抗体 | 美国 Ebioscience 公司 |
| Anti-Mouse/Rat IL-17A PE 抗体 | 美国 Ebioscience 公司 |
| Anti-Mouse CD4 FITC 抗体 | 美国 Ebioscience 公司 |
| Anti-Mouse IFN gamma PE 抗体 | 美国 Ebioscience 公司 |
| Anti-Mouse IL-4 PE 抗体 | 美国 Ebioscience 公司 |
| Armenian Hamster IgG Isotype Control PE 抗  体 | 美国 Ebioscience 公司 |

12

|  |  |
| --- | --- |
| Mouse Regulatory T Cell Staining Kit #3 | 美国 Ebioscience 公司 |
| Armenian Hamster IgG Isotype Control  PE-Cyanine5 抗体 | 美国 Ebioscience 公司 |
| Rat IgG1 κ Isotype Control PE 抗体 | 美国 Ebioscience 公司 |
| Rat IgG2α κ Isotype Control PE 抗体 | 美国 Ebioscience 公司 |
| Rat IgG2α κ Isotype Control FITC 抗体 | 美国 Ebioscience 公司 |
| Rat IgG2α κ Isotype Control PE-Cyanine5 抗体 | 美国 Ebioscience 公司 |
| 引物 | 中国大连宝生物工程有限  公司 |

1）薯蓣皂苷灌胃混悬液：用电子天平称取1 g羧甲基纤维素钠，加入

50 mL蒸馏水，充分溶解，配成2%的羧甲基纤维素钠溶媒。取10 mL溶媒，称取200 mg薯蓣皂苷加入溶媒中，制成20 mg/mL的薯蓣皂苷混悬液。

2）30%(W/V) Acrylamide:称取290 g Acrylamide和10 g BIS，置于1 L烧杯中，加入约600 mL的去离子水，充分搅拌溶解，加去离子水将溶液定容至1 L，用0.45µm滤器滤去杂质，于棕色瓶中4℃保存。

3）10%（W/V）过硫酸铵：称取1 g过硫酸铵，加入10 mL的去离子水后搅拌溶解，储存于4℃。

4) 5X Tris-Glycine Buffer(SDS-PAGE电泳缓冲液)：分别称量Tris 15.1 g、Glycine 94 g、SDS 5.0g，加入约800 mL去离子水，搅拌溶解，加去离子水将溶液定容至1 L后，室温保存。

5）5X SDS-PAGE Loading Buffer:分别称量1M Tris-Hcl(pH6.8) 1.25 mL、SDS 0.5 g、BPB 25 mg、甘油2.5 mL，加去离子水溶解后定容至5 mL. 小份（500µL/份）分装后，于室温保存。使用前将25µL的2-ME加到每份中。

6）膜转移缓冲液（Western杂交用）：称量Glycine 2.9 g、Tris 5.8 g、SDS 0.37 g置于1 L烧杯中，向烧杯中加入约600 mL的去离子水，充分搅拌溶解，加去离子水将溶液定容至800 mL后，加入200 mL的甲醇。室温保存。

7）TBST Buffer(Western杂交膜清洗液)：称量NaCl 8.8 g、1M Tris-Hcl(pH8.0) 20 mL置于1 L烧杯中，向烧杯中加入约800 mL的去离

13

子水，充分搅拌溶解，加入0.5 mL Tween20后充分混匀，再加入去离子水将溶液定容至1 L后，4℃保存。

8）封闭缓冲液（Western杂交用）：称量5 g脱脂奶粉加入到100 mL

的TBST Buffer中，充分搅拌溶解，4℃保存待用。

9）溴乙锭（10 mg/ml）:称量1 g溴乙锭，加入到100 mL容器中，加去离子水100 mL，充分搅拌数小时完全溶解溴乙锭，将溶液转移至棕色

瓶中，室温避光保存。溴乙锭的工作浓度为0.5µg/mL。

10）10X TBE Buffer(pH8.3):称量Tris 108 g、Na2EDTA▪2H2O 7.44 g、硼酸55 g置于1 L烧杯中，向烧杯中加入约800 mL的去离子水，充分搅拌溶解，加去离子水将溶液定容至1 L后，室温保存。

11）10X Loading Buffer(RNA电泳用)：称量0.5M EDTA(pH8.0) 200

µL, Bromophenol Blue 25 mg、Xylene Cyanol FF 25 mg置于10 mL离心管中，向离心管中加入约4 mL的DEPC处理水后，充分搅拌溶解，加入5 mL的甘油后充分混匀。用DEPC处理水定容至10 mL后，室温保存。

12）1M Tris-Hcl(pH6.8、8.0):称量121.1 g Tris置于1 L烧杯中，加入约800 mL的去离子水，充分搅拌溶解，加入浓盐酸调节所需要的pH值，将溶液定容至1 L，室温保存。

13）1.5M Tris-Hcl(pH8.8): 称量181.7 g Tris置于1 L烧杯中，加入约

800 mL的去离子水，充分搅拌溶解，加入浓盐酸调节pH值至8.8，将溶液定容至1 L，室温保存。

14）10%(W/V) SDS:称量10 g SDS置于烧杯中，加入约80 mL的去离子水，68℃加热溶解，滴加浓盐酸调节pH值至7.2，将溶液定容至100

mL后，室温保存。

15）2N NaOH:量取80 mL去离子水置于100-200 mL塑料烧杯中，称取8 g NaOH小心地逐渐加入到烧杯中，边加边搅拌，待NaOH完全溶解后，用去离子水将溶液定容至100 mL，将溶液转移至塑料容器中后，室温保存。

16）0.5M EDTA（pH8.0）:称取186.1 g Na2EDTA▪2H2O置于1L 烧

杯中，加入约800 mL的去离子水，充分搅拌，用NaOH调节pH值至8.0，加去离子水将溶液定容至1 L，适量分成小分后，高温高压灭菌，室温保存。

14

17）5%水合氯醛溶液：称取1 g水合氯醛置于烧杯中，加入20 mL去离子水充分溶解，室温保存。

18）无RNase的水（DEPC处理水）：把水加入到玻璃瓶中，加入DEPC

至0.01% (v/v)。静置过夜，高压蒸汽灭菌。

### 1.2.2 实验仪器

|  |  |
| --- | --- |
| 手术器械 | 中国上海医疗器械有限公司  手术器械厂 |
| SIM-F124 型制冰机 | 日本 SANYO 公司 |
| 96 孔板 | 美国 thermo 公司 |
| CSR-1-30 型超纯水机 | 中国北京爱思泰克公司 |
| HXGLOO450A 型医用干燥箱 | 中国江苏省墟沟电器厂 |
| SERIES 8000DH 型 CO2 培养箱 | 美国 thermo 公司 |
| 4℃冰箱 | 中国海信集团 |
| -80℃低温冰箱 | 美国 thermo 公司 |
| BP211D 电子天平 | 德国 Sartorius 公司 |
| BH-2 型倒置显微镜 | 日本 OLYMPUS 公司 |
| Autoclare GI54DW 型高压灭菌锅 | 美国 ZEALWAY 公司 |
| MyCycler Thermal cycler | 美国 BIO-RAD 公司 |
| MyiQ2 Two color real-time PCR Detection  System | 美国 BIO-RAD 公司 |
| Molecular Imager Gel Doc XR+ with Image  Lab Software | 美国 BIO-RAD 公司 |
| ScanSpeed 1580R 离心机 | 丹麦 Labogene 公司 |
| ScanSpeed 1524M 离心机 | 丹麦 Labogene 公司 |
| OptiMair 超净工作台 | 新加坡 ESCO 公司 |
| 微量移液器 | 德国 Eppendorf 公司 |
| LD5-IA 低速离心机 | 中国北京雷勃尔离心机有限  公司 |
| Multiskan MK3 酶联仪 | 美国 thermo 公司 |
| FACS Calibur 流式细胞仪 | 美国 BD 公司 |
| DYY-7 型转移电泳仪 | 中国北京市六一仪器厂 |

15

|  |  |
| --- | --- |
| 微波炉 | 中国美的集团 |

# 2 实验方法

## 2.1 实验动物分组

采用随机数字表法将72只DBA1/J小鼠分为对照组、模型组、薯蓣皂苷组、雷公藤组，每组18只。

## 2.2 动物模型建立及判断标准

模型组和药物组小鼠正常饲养7 d后，将鸡Ⅱ型胶原2 mg/mL与弗氏完全佐剂等体积混合，于灭菌试管中反复抽吸充分乳化，制成Ⅱ型胶原乳剂，以乳剂滴入水中不分散为乳化成功标准。5%水合氯醛400 mg/kg腹腔注射麻醉小鼠，剪去尾根部毛发，无菌条件下以每只小鼠0.1 mL的剂量在小鼠尾根部多点皮内注射，第21 d相同剂量加强1次。对照组按照上述方法注射等量生理盐水。用关节炎指数（arthritis index, AI）作为衡量足爪肿胀情况的标准，肢体关节肿胀按0～4级评分：0级为无红肿，评0分；1级为趾关节稍肿，评1分；2级为趾关节及足趾关节肿胀，评

2分；3级为踝关节以下足爪肿胀，评3分；4级为包括踝关节在内的全

部足爪肿胀，评4分。关节炎z指kq数为20四16肢01关18节肿胀评分之和，每只小鼠最

少为0分，最多为16分。AI指数越高，关节症状越严重。加强免疫第七

天的小鼠关节炎指数≥4分判定为造模成功[6]。

## 2.3 药物灌胃

从初次免疫第22天开始，薯蓣皂苷组灌胃给予100mg/kg/d穿龙薯蓣皂苷混悬液，雷公藤组根据说明书按照人/鼠体表面积比值灌胃给予含雷公藤甲素的雷公藤片混悬液（按雷公藤甲素计17µg/kg/d），对照组和模型组给予等体积溶媒。

## 2.4 小鼠一般状况的观察及取材

观察小鼠的一般状况，包括体重、饮食、毛色、神智和活动状态的变化及关节红肿情况。用游标卡尺测量小鼠足爪趾根部厚度，并根据关节肿胀情况计算关节炎指数。于初次免疫第35天断颈处死小鼠，将其完全浸入75%酒精浸泡消毒。取出小鼠置于超净台中，固定好后剪开腹股沟处皮肤，翻转皮肤后可见在皮下有脂肪组织包绕的半透明状淋巴结，小心分离腹股沟淋巴结，去掉多余的脂肪组织，将淋巴结放入200目钢网折成的小皿中，此小皿放入培养皿，加入少量PBS防治淋巴结干燥，用1 mL的注

16

射器活塞头反复碾磨制成淋巴细胞单细胞悬液。

## 2.5 流式细胞术检测CD4+T细胞亚群Th1、Th2、Th17、Treg细胞的百分率

#### 1）细胞滤网过滤杂质，种入6孔板，37℃培养1小时使单核吞噬细胞

贴壁。从培养箱中拿出6孔板，小心吹起淋巴细胞，收集细胞于离心管中，

1700RPM离心8 min，弃去上清。

#### 2）用含10%胎牛血清的RPMI1640培养液定容250µL，振荡混匀器充分混匀，取出10µL注入EP管中，用RPMI1640稀释10倍，玻璃细胞计数板计数细胞，根据细胞浓度重新调整浓度至1×107个/mL。

Th1、Th2、Th17细胞检测步骤：

1）调整细胞浓度至2×106个/mL

2）取300µL加入到96孔板中，每个小鼠单独种板，每只小鼠种2孔，加入250×PMA/Ionomycin mixture离子霉素工作液1.25µL，平板振荡器混匀，37℃培养箱孵育1小时，后加入高尔基体阻断剂250×BFA/Monensin mixture 1.25µL，平板振荡器混匀，放入37℃培养箱孵育5小时（每隔 2

小时混匀一次）。用正常小鼠zkq 20160118

多种4个孔，2个加入250

×PMA/Ionomycin mixture离子霉素工作液1.25µL（为刺激孔），2个不加

PMA/Ionomycin mixture（为未刺激孔），平板振荡器混匀，37℃培养箱孵育6小时（每隔2小时混匀一次），这4孔都不加高尔基体阻断剂250×BFA/Monensin mixture，用于检测CD69活性，CD69比率大于90%说明活化成功。

#### 3）从温箱中拿出培养板，静置10 min以上，使淋巴细胞沉入下层，从上层每孔吸弃80µL，浓缩细胞，震荡混匀后待用。

#### 4）根据小鼠组别分别编号流式上样管，同时设同型0管（全部染同型对照抗体）、同型1管（染anti-mouse CD3e Pe-cyanine5、anti-mouse CD4

FITC同型）、同型2管（染anti-mouse CD3e Pe-cyanine5、anti-mouse CD4

FITC）、检测管（染anti-mouse CD3e Pe-cyanine5、anti-mouse CD4 FITC），吸取100µL /管染表面抗原，表面染色同时进行，同型对照抗体终浓度与检测抗体终浓度一致。anti-mouse CD3e Pe-cyanine5和anti-mouse CD3e Pe-cyanine5同型每管1µL, anti-mouse CD4 FITC和anti-mouse CD4 FITC同型每管1µL，混匀室温避光20 min。

17

5）将前述刺激孔和未刺激孔的淋巴细胞吸入编好号的流式上样管，同时设CD69同型0管（全部染同型对照抗体）、CD69同型1管（染anti-mouse CD3e FITC、anti-mouse CD69 PE同型），检测管（染anti-mouse CD3e FITC、anti-mouse CD69 PE），染表面抗原，表面染色同时进行，同型对照抗体终浓度与检测抗体终浓度一致。anti-mouse CD3e FITC、anti-mouse CD3e FITC同型每管1µL, anti-mouse CD69 PE和anti-mouse CD69 PE同型每管1µL。混匀室温避光20 min。加入2 mL流式上样缓冲液漩涡混匀器震荡清洗，1700RPM离心8 min，弃上清，流式上样缓冲液定容200µL，震荡混匀后上机检测。

6）将其余管取出，加入PBS 2mL震荡清洗，1700RPM离心8 min，弃上清，滤纸吸干多余水分，加入FIX&PERM cell permeabilization reagents Medium A 100µL，室温避光15 min。

7）加入PBS 2 mL震荡清洗，1700RPM离心8 min，弃上清，滤纸吸干多余水分，加入100µL FIX& PERM cell permeabilization reagents Medium B 100µL，染胞内抗原，同型管染同型抗体（染anti-mouse IFN gamma PE同型、anti-mouse IzLk-q4 P E20同16型01、18anti-mouse IL-17A PE同型），

检测管染检测抗体（染anti-mouse IFN gamma PE、anti-mouse IL-4 PE、

anti-mouse IL-17A PE），同型对照抗体终浓度与检测抗体终浓度一致，anti-mouse IFN gamma PE和anti-mouse IFN gamma PE同型每管1.5µL, anti-mouse IL-4 PE和anti-mouse IL-4 PE同型每管1.0µL, anti-mouse IL-17A PE和anti-mouse IL-17A PE同型每管1.0µL，混匀室温避光15 min。

8）加入2 mL流式上样缓冲液漩涡混匀器震荡清洗，1700RPM离心

8 min，弃上清，流式上样缓冲液定容200µL，震荡混匀后上机检测。

Treg细胞检测步骤：

#### 1）调整浓度至1×107个/mL，编号流式上样管，每管加入100 µL

淋巴细胞悬液。

#### 2）设同型0管（全部染同型对照抗体）、同型1管（染anti-mouse CD4

FITC、anti-mouse CD25 PE同型）、同型2管（染anti-mouse CD4 FITC、anti-mouse CD25 PE）、检测管（染anti-mouse CD4 FITC、anti-mouse CD25

PE），染表面抗原，表面染色同时进行，同型对照抗体终浓度与检测抗体终浓度一致。anti-mouse CD4 FITC和anti-mouse CD4 FITC同型每管1µL，

18

anti-mouse CD25 PE和anti-mouse CD25 PE同型每管1µL. 混匀4℃孵育

30min。

#### 3）将1份Fixation/Permeabilization Concentrate加入3份Fixation/Permeabilization Diluent制成Fixation/Permeabilization工作液，每管需要1mL。用超纯水稀释10×Permeabilization Buffer 到1×（1：9）。每管需要8 mL。

4）加入预冷的Flow Cytometry Staining Buffer，每管2 mL，震荡清洗，1700RPM离心8 min，弃上清，每管加入1 mL Fixation/Permeabilization，震荡混匀，4℃避光孵育30 min。

5）加入2 mL 1X Permeabilization Buffer，震荡清洗，1700RPM离心8 min，弃上清，每管加入100µL 1X Permeabilization Buffer，再加入1µL anti-mouse CD16/32(Fc block) purified，4℃避光孵育15 min。

6）不洗，检测管加0.5µg anti -mouse/rat Foxp3 PE-Cy5 (FJK-16s)抗体，同型管加0.5µg anti -mouse/rat Foxp3 PE-Cy5同型抗体，4℃避光孵育30 min。

7）每管加入2 mL 1X Pezrkmqe a b2i0li1z6at0i1o1n8Buffer，震荡清洗，1700RPM

离心8 min，弃上清，加入Flow Cytometry Staining Buffer定容200µL 。

上机检测。

调整好流式细胞仪各项参数，对各样本进行检测分析。前向散射（FSC）和侧向散射（SSC）均以线性信号进行收集，所有的荧光强度都以对数

（0-104）度量收集。首先在FSC-SSC二维散点图上划出淋巴细胞分布区域，设门后以荧光抗体染色阳性细胞的百分率记录结果，每份样本检测

10000个细胞。获得的数据用CellQUEST pro软件（BectonDickinson）进行分析。

## 2.6 Western blot技术检测p-STAT1、p-STAT3、p-STAT4、p-STAT5、p-STAT6和SOCS3的含量。

1）吸出淋巴细胞悬液加入离心管中，1700RPM离心8 min，弃上清。计算要使用的RIPA裂解液的总量，按照1: 100的比率混合PMSF和RIPA裂解液制成工作液。每管加入200µL预冷的工作液，震荡混匀，置于冰上40 min充分裂解。

#### 2）12000RPM 4℃离心20 min，轻轻吸取上清，转移至新预冷的微量

19

离心管内，置于冰上，即为蛋白样本。

#### 3）取一块96孔板，按照下表加入试剂，绘制标准曲线，蛋白标准原

液浓度为2 mg/mL。

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 孔号 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 蛋白标准溶液（µL） | 0 | 1 | 2 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 |
| 去离子水（µL） | 20 | 19 | 18 | 16 | 12 | 8 | 4 | 0 |
| 对应蛋白浓度（µg/mL） | 0 | 100 | 200 | 400 | 800 | 1200 | 1600 | 2000 |

#### 4）根据样品数量，按50体积BCA试剂A加1体积BCA试剂B（50:1）配制适量BCA工作液，充分混匀。

#### 5）各孔加入200µL BCA工作液，把酶标板放在振荡器上振荡30 sec，

37℃温箱放置30 min，然后在562 nm下比色测定。以对应蛋白浓度（µg/mL）为横坐标，吸光值为纵坐标，绘出标准曲线。

#### 6）取2µL待测样品，以1: 10的比例稀释待测样品，使样品稀释液总体积为20µL，种板后加入BCA工作液200µL，把酶标板放在振荡器上振荡30 sec，37℃温箱放置30 min，然后在562 nm下比色测定，记录吸光值。根据所测样品的吸光z值kq，在2标01准60曲11线8上即可查得相应的蛋白浓度。

#### 7）调整蛋白浓度到3.75µg/µL，以4: 1的比例混合样品蛋白和5X 蛋

白上样缓冲液（5X SDS-PAGE Loading Buffer），震荡混匀，于100℃煮沸5 min，充分变性蛋白样品。蛋白样品终浓度为3µg/µL，分装保存于-20℃。

#### 8）组装好电泳架后，先灌制分离胶，水封，待分离胶凝固后超纯水冲洗，去除未凝固的分离胶，用滤纸吸去多余水分，再灌制浓缩胶，插入齿梳，约30 min后胶体凝固。按照下表的配方配制SDS-PAGE浓缩胶（5%）及分离胶（8%）。

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 各组分名称 | H2O | 30% Acrylamide | 1M Tris-Hcl(pH6.8) | 1.5M Tris-Hcl(pH8.8) | 10% SDS | 10%过硫酸铵 | TEMED |
| 5%浓缩胶（4mL） | 2.7 | 0.67 | 0.5 |  | 0.04 | 0.04 | 0.004 |
| 8%分离胶（10mL） | 4.6 | 2.7 |  | 2.5 | 0.1 | 0.1 | 0.006 |

9）用超纯水稀释5X Tris-Glycine Buffer至1X，在电泳槽中加入配制好的电泳液，放入电泳架，拔出齿梳，向内槽加入电泳液，没过浓缩胶上端。取出蛋白质样品，室温溶解后上样，每孔上样量为10µL，即30µg总蛋白，并加入彩色预染Marker。浓缩胶用80V稳压电泳，待溴酚蓝跑至分离胶，电压改为120V，稳压电泳直至溴酚蓝跑至分离胶底端。

20

10）关闭电源停止电泳，准备转膜。按照胶的大小裁剪PVDF膜，放入甲醇中浸泡5 min激活，然后放入预冷的膜转移缓冲液中浸泡10 min。同时裁剪相同大小的滤纸，将裁剪好的滤纸和纤维帕放入膜转移缓冲液中浸泡10 min。按照正极-纤维帕-滤纸-PVDF膜-胶-滤纸-纤维帕-负极的顺序组装好转膜夹，放入转膜槽中，加入膜转移缓冲液，将电泳槽放入冰中防止转膜过程中温度过高。150 mA转移2 h。

11）取出转移好的PVDF膜，放入配制好的封闭缓冲液中，4℃过夜，以防止一抗或/和二抗与膜的非特异性结合产生的高背景。

12）按抗体说明书建议的稀释倍数，用TBST稀释一抗，与封闭好的

PVDF膜室温孵育2 h。

#### 13）TBST摇动洗膜3次，每次5 min，去除残留的一抗。用TBST

按说明书推荐的倍数稀释二抗，室温摇动孵育1 h。

#### 14）TBST摇动洗膜3次，每次5 min，去除残留的二抗。准备好显影液及定影液，以1: 1的比例混合SuperSignal®West Pico化学发光底物A、

B液，用滤纸吸干PVDF膜上的水分，加入混合好的化学发光底物孵育 5

min，吸干多余液体，用保鲜z膜kq包 裹20P1V60D1F18膜，固定在暗盒内，在暗室内采用手工曝光的方法，将X-ray胶片压在膜上，控制好曝光时间，约30 sec-3

min，取出胶片放入显影液中显影2 min，放入定影液定影。

#### 15）显影的胶片采用灰度分析仪进行分析。数据经过β-actic校正后进行统计分析。

## 2.7 实时荧光定量PCR技术检测转录因子T-bet、GATA3、RORγt、Foxp3

的表达情况。

1）吸出淋巴细胞悬液加入EP管中，4℃，1700RPM离心8 min，弃上清。每管加入1 mL TRIzol Reagent，在TRIzol试剂中重复吹打以裂解细胞，15-30°C孵育5 min，以利于样品中蛋白完全分离。每1 mL的TRIzol试剂添加0.2 mL氯仿。小心盖好样品管。用手大力摇管15秒，15-30°C

孵育2-3 min。4℃，12000×g离心15 min。离心后，混合物分离为红色下层（酚-氯仿相）、中间相以及上层的无色水相。RNA存在于水相。水相体积约为60％使用的TRIzol试剂量。

2）吸取上层水相转移到一个新管，每1 mL初始的TRIzol试剂使用

0.5 mL异丙醇。15-30℃孵育样品10 min，4℃，12000×g离心10 min，

21

离心后在管侧面和底部形成一个凝胶样沉淀。

3）弃上清。用75％的乙醇洗涤RNA沉淀一次。每毫升初始TRIzol 试剂使用1 mL75％的乙醇。涡旋混合，4℃，7500×g离心5 min，尽量弃上清。

4）将离心管倒扣在吸水纸上简单干燥RNA沉淀（空气干燥5-10 min）。不要让RNA沉淀完全干燥，因为这将大大降低其溶解度。每管加30 µL的无RNA酶水，在无RNA酶的水中吹打几次溶解RNA，并在55-60℃孵育10 min待用。

5）取少量待测RNA样品，用无RNA酶水稀释100倍，用无RNA酶水做空白，在260 nm、280 nm、230 nm处调节紫外分光光度计的读数至零。加入待测RNA 样品在三个波长处读取OD 值。RNA 纯品的

OD260/OD280的比值为2.0，故根据OD260/OD280的比值可以估计RNA的纯度。若比值较低，说明有残余蛋白质存在；比值太高，则提示RNA有降解。OD260/OD230比值应≥2.0，若比值较低说明盐分过高。估算RNA浓度。RNA在260 nm波长处有最大吸收峰。OD值为1相当于大约40

µg/mL的单链RNA。

6）10X TBE取25 mL稀释成500 mL，称取琼脂糖0.2 g，加0.5X TBE Buffer 20 mL，微波炉加热融化琼脂糖，冷却至55℃，加入10 mg/ml EB 1

µL，充分混匀，将温热的凝胶倒入已置好梳子的电泳板中，在室温下放置45 min左右后进行电泳。

7）拔出梳子，电泳板放入电泳槽中，另外0.5X TBE 480 mL倒入电泳槽中。4.5µL样品加0.5µL Loading Buffer混匀后依次加入孔中。接上电源，电压120V进行电泳。电泳约1 h后，紫外灯检测。出现的电泳条带有两条，是两条最大的核糖体RNA（rRNA）分子，即18S和28S rRNA，较小的RNA也很丰富但看不到，因为太小，跑出了凝胶的边界。多数细胞中的信使RNA（mRNA）经EB染色后不足以形成可见的带。只要18S和28S rRNA带亮，且28S rRNA大约为18S rRNA的两倍，说明提取的

RNA没有发生降解，纯度好。

8）按如下成分于冰上配制反应混合液，42℃反应2 min，然后4℃恒温以去除DNA。为了保证反应液配制的准确性，进行各项反应时，应先按反应数+2的量配制Master Mix，然后再分装到每个反应管中，最后加

22

入RNA样品。

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 使用量 |
| 5×gDNA Eraser Buffer | 4.0 μL |
| GDNA Eraser | 2.0 μL |
| Total RNA | 1 μg |
| RNase Free dH2O | up to 20 μL |

9）按如下成分于冰上配制反应混合液，37℃反应15 min，85℃反应

5 sec，然后4℃恒温。反转录为cDNA。

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 使用量 |
| 上一步的反应液 | 20.0 μL |
| PrimeScript RT Enzyme Mix I | 2.0 μL |
| RT Primer Mix | 2.0 μL |
| 5×PrimeScript Buffer 2 （ for Real Time） | 8.0 μL |
| RNase Free dH2O | 8.0 μL |
| Total | 40 μL |

10）进行反转录反应后，选择SYBR®Premix Ex Taq I(I

Tli RNaseH Plus)

进行Real Time PCR反应。每个样品设3个平行复孔取均值，按下列组份配制PCR反应液。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试剂 | 使用量 | 终浓度 |
| SYBR® Premix Ex TaqII (Tli RNaseH Plus)（2×） | 12.5 μL | 1× |
| PCR Forward Primer(10 μM) | 1.0 μL | 0.4 μM |
| PCR Reverse Primer(10 μM) | 1.0 μL | 0.4 μM |
| RT 反应液（cDNA 溶液） | 2 μL |  |
| dH2O（灭菌蒸馏水） | 8.5 μL |  |
| Total | 25 μL |  |

11）采用两步法PCR 反应程序。Stage 1 ：预变性，Repeat：1, 95℃

30 s；Stage 2: PCR反应，Repeat: 40, 1, 95℃5 s，2，退火(T-bet 57.5℃、GATA-3 57.5℃、RORγt 61℃、Foxp3 61℃) 30 s，3, 60℃30 s，读取荧光读数。

|  |  |
| --- | --- |
| 基因名称 | 序列 |

23

|  |  |
| --- | --- |
| T-bet | 上游引物 5’-AGCAAGGACGGCGAATGTT-3'  下游引物 5’-GGGTGGACATATAAGCGGTTC-3' |
| GATA-3 | 上游引物 5’-CTCGGCCATTCGTACATGGAA-3'  下游引物 5’-GGATACCTCTGCACCGTAGC-3' |
| RORγt | 上游引物 5’-GCTCCATATTTGACTTTTCCCACT -3'  下游引物 5’- GATGTTCCACTCTCCTCTTCTCTTG-3' |
| Foxp3 | 上游引物 5’-AGTGCCTGTGTCCTCAATGGTC-3'  下游引物 5’-AGGGCCAGCATAGGTGCAAG-3' |
| GAPDH | 上游引物 5’-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'  下游引物 5’-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3' |

12）反应结束后确认Real Time PCR的扩增曲线和融解曲线，依据所得目的基因与内参基因Ct值（Ct值为每个反应孔内荧光信号达到设定阈值时所对应的循环数），用内参进行标准化处理，按照2-ΔΔCt法对基因表达进行相对定量分析。ΔΔCt=（待测组目的基因Ct均值－待测组内参照基因

Ct均值）－（对照组目的基因Ct均值－对照组内参照基因Ct均值），2-ΔΔCt代表目的基因在不同组织的相对表达量，进行实验数据分析。

3 统计学分析

采用SPSS22.0软件包进行统计分析，所有数据以x̅±s表示，组间比较用单因素方差分析，两两比较用t检验。P＜0．05表示差异有统计学意义。

**结果**

# 1 小鼠的一般情况、足爪肿胀度及AI 值

## 1.1 一般情况观察

在实验过程中，小鼠全部存活。对照组小鼠在整个实验期状态良好，毛色光滑，饮食粪便均正常，运动功能良好。模型组小鼠活动与进食均减少，小鼠的背部及尾根部形成多处溃疡，溃疡大小不一，毛色暗淡干枯，精神萎靡，反应迟钝。薯蓣皂苷组小鼠灌药后全身症状有所减轻，精神状况一般，食欲和活动较模型组增加，体毛较有光泽。雷公藤组小鼠相对模型组和薯蓣皂苷组症状最轻，精神状况较好，活动量较模型组大，饮食情

24

况好，体毛光泽。

## 1.2 体重、足爪肿胀度及AI值变化（Table.1）

对照组小鼠体重稳定增长，到第35天体重达到23g左右。而模型组小鼠因为关节发病进食减少，体重下降明显（*P*<0.05），薯蓣皂苷组小鼠体重对比对照组小鼠体重下降明显（*P*<0.05），但和模型组相比差异无统计学意义（*P*> 0.05）。雷公藤组小鼠和薯蓣皂苷组小鼠体重变化情况相似，和对照组相比体重下降明显（*P*<0.05），但和模型组相比差异无统计学意义（*P*> 0.05）。雷公藤组小鼠和薯蓣皂苷组小鼠相比差异无统计学意义

（*P*> 0.05）。

对照组小鼠足垫厚度在实验过程中无显著变化，稳定在1.40 mm左右

（Fig.1），而模型组小鼠足垫到35天达到1.99 mm（Fig.2），与关节炎症严重程度一致，与对照组小鼠相比差异有统计学意义（*P*<0.05）。薯蓣皂苷组小鼠足垫厚度上升幅度较模型组为轻（Fig.3），与模型组相比差异有统计学意义（*P*<0.05）。雷公藤组小鼠足爪肿胀情况最轻，第35天足垫厚

度只有1.72 mm（Fig.4）。与模型组相比差异有统计学意义（*P*<0.05）。雷公藤组小鼠和薯蓣皂苷组小鼠相比差异无统计学意义（*P*> 0.05）。

对照组小鼠足爪无红肿表现，AI值在实验过程中一直为0，而模型组小鼠第35天AI指数达到11.84，与对照组小鼠对比差异有统计学意义

（*P*<0.05）。薯蓣皂苷组小鼠关节炎指数相比模型组有明显改善（*P*<0.05）。雷公藤组小鼠关节炎指数最小，症状最轻，相比模型组改善明显（*P*<0.05）。雷公藤组小鼠和薯蓣皂苷组小鼠相比差异无统计学意义（*P*> 0.05）。

# 2 流式细胞术检测结果（Table.2）

激活组CD69+细胞比率达到90%以上，活化成功。（Fig.5）

## 2.1 Th1细胞检测结果（Fig.6）

与对照组相比，模型组Th1细胞比率明显升高（*P*<0.05），薯蓣皂苷组和雷公藤组相比对照组Th1细胞比率则显著降低（*P*<0.05），雷公藤组和薯蓣皂苷组相比差异无统计学意义（*P*> 0.05）。

## 2.2 Th2细胞检测结果（Fig.7）

对照组和模型组相比，Th2 细胞比率差异无统计学意义（*P*> 0.05），薯蓣皂苷组则高于模型组（*P*<0.05）。

## 2.3 Th17细胞检测结果（Fig.8）

25

与对照组相比，模型组Th17细胞比率显著升高（*P*<0.05），薯蓣皂苷组和雷公藤组相比对照组Th17细胞比率则显著降低（*P*<0.05），雷公藤组和薯蓣皂苷组相比差异无统计学意义（*P*> 0.05）。

## 2.4 Treg细胞检测结果（Fig.9）

对照组和模型组相比，Treg细胞比率差异无统计学意义（*P*> 0.05），与模型组相比，薯蓣皂苷组Treg细胞比率显著升高（*P*<0.05）。

# 3 western blot检测结果（Table.3, Fig.10）

## 3.1 STAT1检测结果

模型组与对照组相比，STAT1显著升高（*P*<0.05），薯蓣皂苷组和雷公藤组与模型组相比差异无统计学意义（*P*> 0.05）。

## 3.2 p-STAT3检测结果

模型组与对照组相比，p-STAT3 显著升高（*P*<0.05），薯蓣皂苷组和雷公藤组与模型组相比则显著下降（*P*<0.05），且薯蓣皂苷组对比雷公藤组下降更为明显（*P*<0.05）。

## 3.3 p-STAT4检测结果

模型组与对照组相比，p-STAT4 显著升高（*P*<0.05），薯蓣皂苷组和雷公藤组与模型组相比则显著下降（*P*<0.05），雷公藤组对比薯蓣皂苷组下降更为明显（*P*<0.05）。

## 3.4 p-STAT5检测结果

模型组与对照组相比，p-STAT5 显著升高（*P*<0.05），薯蓣皂苷组对比模型组显著升高（*P*<0.05），雷公藤组升高较小（*P*<0.05）。

## 3.5 p-STAT6检测结果

与对照组相比，薯蓣皂苷组p-STAT6明显升高（*P*<0.05），薯蓣皂苷组和雷公藤组与模型组相比差异无统计学意义（*P*> 0.05）。

## 3.6 SOCS3检测结果

模型组与对照组相比，SOCS3显著升高（*P*<0.05），薯蓣皂苷组和模型组相比差异无统计学意义（*P*> 0.05）,雷公藤组与模型组相比显著升高

（*P*<0.05），雷公藤组和薯蓣皂苷组相比显著升高（*P*<0.05）。

# 4 PCR检测结果（Table.4）

## 4.1 T-bet检测结果（Fig.11）

模型组与对照组相比，T-bet显著升高（*P*<0.05），薯蓣皂苷组和

26

雷公藤组与模型组相比差异无统计学意义（*P*> 0.05）。

## 4.2 GATA-3检测结果（Fig.12）

模型组与对照组相比差异无统计学意义（*P*> 0.05）,薯蓣皂苷组和雷公藤组与模型组相比显著升高（*P*<0.05），薯蓣皂苷组对比雷公藤组升高更为明显（*P*<0.05）。

## 4.3 RORγt检测结果（Fig.13）

模型组与对照组相比，RORγt 显著升高（*P*<0.05），薯蓣皂苷组和雷公藤组与模型组相比显著下降（*P*<0.05），薯蓣皂苷组对比雷公藤组差异无统计学意义（*P*> 0.05）。

## 4.4 Foxp3检测结果（Fig.14）

模型组与对照组相比，Foxp3 显著升高（*P*<0.05）。薯蓣皂苷组相比模型组显著升高（*P*<0.05）。

27

**附图**



Fig. 1 The paw of control group mice on the 35d



Fig. 2 The paw of model group mice on the 35d

28



Fig. 3 The paw of dioscin group mice on the 35d



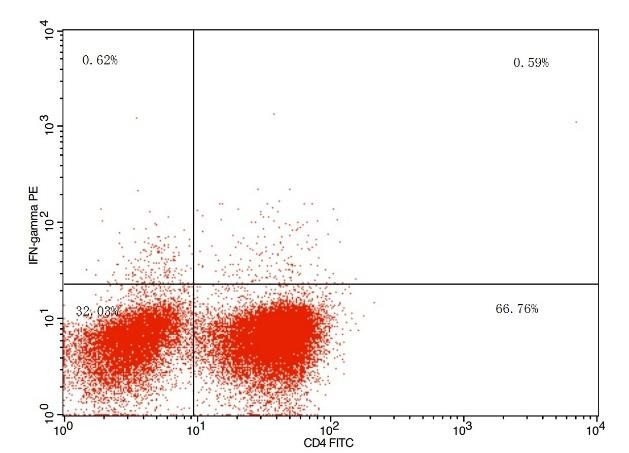
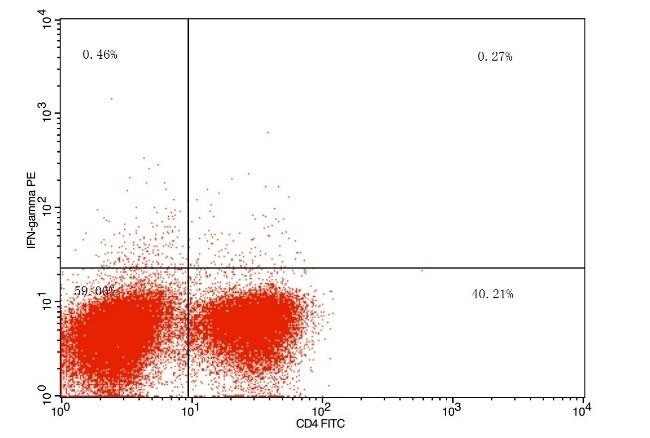
Fig. 4 The paw of triptolide group mice on the 35d

29



Not activated activated

Fig. 5 Flow cytometry picture of CD69



Control group Model group



Dioscin group Triptolide group

Fig. 6 Flow cytometry picture of Th1 cells

30



Control group Model group

Dioscin group Triptolide group

Fig. 7 Flow cytometry picture of Th2 cells



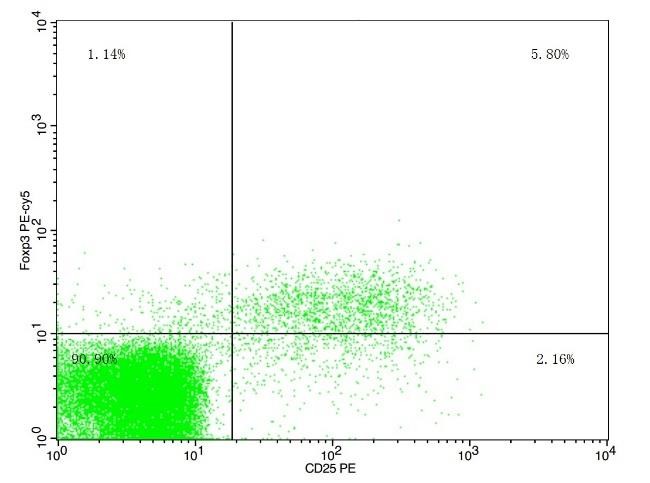
Control group Model group

31



Dioscin group Triptolide group

Fig. 8 Flow cytometry picture of Th17 cells



Control group Model group



Dioscin group Triptolide group

Fig. 9 Flow cytometry picture of Treg cells

32

p-STAT1 p-STAT3

p-STAT4 p-STAT5

p-STAT6

SOCS3

Control Model Dioscin Triptolide



Fig. 10 Western Blot results



Fig. 11 Amplification and melt curve of T-bet

33



Fig. 12 Amplification and melt curve of GATA3



Fig. 13 Amplification and melt curve of RORγt



Fig. 14 Amplification and melt curve of Foxp3

34

**附表**

Table.1 Changes of body weight, feet thickness and AI index at different time points

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 35 天体重 | 35 天足爪肿胀 | 35 天 AI |
| 对照组 | 23.21±1.22 | 1.41±0.14 | 0±0 |
| 模型组 | 19.82±1.44 \* | 1.99±0.13 \* | 11.84±3.48 \* |
| 薯蓣皂苷组 | 21.11±1.52 \* | 1.80±0.10 \*▲ | 5.77±4.52 \*▲ |
| 雷公藤组 | 20.84±0.83 \* | 1.72±0.18 \*▲ | 4.88±3.31 \*▲ |

x̅±s(g, n=6)

\*: *P*＜0.05, compared with control group;▲: *P*＜0.05, compared with model group;★: *P*＜0.05, compared with dioscin group

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Th1 | Th2 | Th17 | Treg |
| 对照组 | 1.00±0.02 | 1.00±0.15 | 1.00±0.13 | 1.00±0.09 |
| 模型组 | 1.50±0.16 \* | 0.92±0.31 | 3.76±1.91 \* | 1.16±0.12 |
| 薯蓣皂苷组 | 1.13±0.32 ▲ | 1.47±0.37 ▲ | 1.27±0.12 ▲ | 1.53±0.44 \*▲ |
| 雷公藤组 | 1.10±0.16 ▲ | 1.17±0.40 | 1.33±0.14 ▲ | 1.32±0.08 |

Table.2 Flow cytometry results x̅±s(n=6)

\*: *P*＜0.05, compared with control group;▲: *P*＜0.05, compared with model group;★: *P*＜0.05, compared with dioscin group

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | p-STAT1 | p-STAT3 | p-STAT4 | p-STAT5 | p-STAT6 | SOCS3 |
| 对照组 | 1.00±0.18 | 1.00±0.12 | 1.00±0.22 | 1.00±0.18 | 1.00±0.17 | 1.00±0.21 |
| 模型组 | 23.85.±17.42 \* | 3.25±0.60 \* | 2.71±0.28 \* | 3.30±0.55\* | 1.43±0.62 | 5.58±0.33 \* |
| 薯蓣皂苷组 | 11.07±8.42 | 1.52±0 .43\*▲ | 2.00±0.20 \*▲ | 6.37±0.88 \*▲ | 2.11±0.45\* | 6.93±1.76 \* |
| 雷公藤组 | 9.29±6.29 | 2.30±0 .10\*▲★ | 1.42±0.12 \*▲★ | 4.38±0.46 \*▲★ | 1.72±0.63 | 12.21±1.94 \*▲★ |

Table.3 Western Blot results x̅±s(n=6)

\*: *P*＜0.05, compared with control group;▲: *P*＜0.05, compared with model group;★: *P*＜0.05, compared with dioscin group

Table.4 real-time PCR results x̅±s n=6)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | T-bet | GATA3 | RORγt | Foxp3 |
| 对照组 | 1.00±0.45 | 1.00±0.17 | 1.00±0.10 | 1.00±0.07 |
| 模型组 | 1.45±0.11 \* | 0.96±0.04 | 1.62±0. 26\* | 1.49±0.55\* |
| 薯蓣皂苷组 | 1.31±0.14 | 2.57±0.37 \*▲ | 0.97±0.13 ▲ | 2.22±0.61 \* |
| 雷公藤组 | 1.32±0.08 | 2.14±0.23 \*▲★ | 0.82±0.34 ▲ | 1.78±0.71 |

\*: *P*＜0.05, compared with control group;▲: *P*＜0.05, compared with model group;★: *P*＜0.05, compared with dioscin group

35

**讨论**

类风湿性关节炎是一种以慢性侵蚀性关节炎为特征的全身性自身免疫病，病变特点为滑膜炎，以及由此造成的关节软骨和骨质破坏，未经适当治疗，病情将逐步加重，最终导致关节畸形甚至残疾。这种病症也有可能影响到其他关节外组织，包括皮肤、血管、心脏、肺部及肌肉。该病呈全球性分布，多发于35-50岁，女性多于男性。

类风湿关节炎的病因至今未明，目前认为环境、遗传和免疫紊乱等多种因素都在RA的发病中起重要作用，尤其是免疫紊乱被认为是RA发病的主要机制，Th1/Th2、Th17/Treg等CD4+T细胞亚群免疫平衡功能异常在RA的发病中起重要作用[7-10]。

在1986年，Mosmann and Coffman首次根据分泌细胞因子的不同鉴定了Th1和Th2细胞[11]。经过20多年的研究，现今已有至少4种细胞亚群被鉴定，分别是Th1、Th2、Th17和Treg细胞。Th1、Th2、Th17、Treg细胞均分化自幼稚T细胞（Tn），初始CD4+T细胞在不同细胞因子环境条件下分化为不同的Th亚群。最新研究证实，JAK/STAT信号转导通路主导着CD4+T细胞亚群的分化，各种细胞因子作用于受体，通过激活不同的JAK/STAT通路而影响CD4+T细胞的分化[12-15]. IL-12和IFN-γ分别通过激活STAT4和STAT1上调转录因子T-bet的表达，诱导Tn向Th1细胞分化。IL-4激活STAT6上调转录因子GATA3的表达，诱导Tn向Th2细胞分化。IL-6激活STAT3，在低浓度TGF-β的协同下上调RORγt的表达，诱导Tn向Th17方向分化。IL-2激活STAT5，在高浓度TGF-β的环境下上调转录因子Foxp3诱导Tn向Treg分化。

早期研究认为：Th1在组织特异性自身免疫病RA的发生中占主导地位。IL-12能促进Tn细胞向Th1细胞分化，经IL-12处理的小鼠其CIA发病率和疾病严重程度显著增高，如果敲除小鼠IL-12基因或使用抗体中和IL-12则发病率显著降低。同样如果使用免疫调节剂抑制Th1细胞反应也可降低CIA关节损伤程度和发病率。临床研究发现RA患者滑膜中总

STAT1水平明显增高，炎症部位可见大量STAT1阳性细胞，内膜的衬里层的纤维母样滑膜细胞中也有大量的STAT1[16-17]。本研究发现在CIA 小

36

鼠免疫后第35天，小鼠足爪肿胀度达到峰值，此时模型组小鼠Th1细胞比率、p-STAT1和p-STAT4均高于对照组小鼠，转录因子T-bet同样高于对照组小鼠，而薯蓣皂苷组虽然其p-STAT1和T-bet与模型组并无差异，但p-STAT4和Th1细胞比率却显著降低，说明薯蓣皂苷可能通过抑制p-STAT4的表达抑制幼稚T细胞向Th1细胞分化，从而对CIA小鼠产生治疗作用。而雷公藤对CIA小鼠Th1细胞及其相关转录因子的影响与薯蓣皂苷类似，能够降低p-STAT4，但其对p-STAT4的影响更加明显，因为从大体上看，雷公藤组的治疗效果最好，因此这一结果与薯蓣皂苷对p-STAT1和p-STAT4的影响是一致的。

Th2细胞主要分泌IL-4、IL-5、IL-9、IL-10、IL-13、IL-25等细胞因子，幼稚T细胞表达一定量的IL-4受体，在IL-4的刺激下，IL-4受体招募并磷酸化下游的STAT6，激活一系列的信号通路，诱导幼稚T细胞向

Th2细胞分化。在RA患者早期关节液中可以检测到IL-4、IL-5、IL-13高表达，但是随着病情进展，这些细胞因子的表达逐渐降低，这说明Th2细胞有可能在RA的早期起作用。通过免疫组化和原位杂交技术，可以检测到RA患者滑膜有STAT6的表达，但是与骨关节炎患者对比发现，STAT6的表达无差异，这提示STAT6有可能在关节中是非特异性的诱导因素，任何对关节的损伤都会诱导STAT6的表达，从而对关节起到保护作用[18]。本研究发现薯蓣皂苷组小鼠p-STAT6和GATA3均显著高于模型组小鼠，诱导幼稚T细胞向Th2细胞方向分化，导致薯蓣皂苷组小鼠Th2细胞比率显著升高，结合小鼠关节炎指数和足爪肿胀情况证明了薯蓣皂苷可以影响Th2细胞分化，对CIA小鼠关节具有保护作用。

Th17细胞由IL-6和低浓度TGF-β共同诱导Tn分化而成，能分泌IL-17、IL-21等多种细胞因子，主要发挥促炎症作用。IL-17可以上调软骨细胞及滑膜成纤维细胞MMP的表达，促进软骨基质的破坏，同时IL-17也是一种血管生长调节因子，促进血管增生，导致血管翳的形成。在正常小鼠关节内注射IL-17可以引起类似RA的病理改变，而IL-17基因缺陷鼠或经IL-17受体拮抗剂处理的小鼠则不易发生CIA。对小鼠注射抗IL-17的抗体或疫苗进行治疗，可有效缓解关节炎症状、减少关节损伤。应用IL-17单克隆抗体对RA患者进行治疗，病情得到明显改善[19]。IL-6作为Th17细胞的诱导因子，能够促进滑膜纤维母细胞增殖和血管翳的形成，介导关

37

节的破坏。在RA 患者关节液中可以检测到IL-6 的高表达[20]。SOCS3

（STAT3负调节因子）的大量表达能有效的抑制关节炎的发生，减轻关节炎的严重程度[21-23]。这些研究结果均说明了Th17细胞在RA中的作用。本研究发现模型组小鼠Th17细胞比率、p-STAT3和RORγt均高于对照组小鼠，而薯蓣皂苷组Th17细胞比率、p-STAT3和RORγt的表达均显著降低，说明薯蓣皂苷可通过抑制p-STAT3表达和RORγt的mRNA的转录，抑制幼稚T细胞向Th17细胞分化，对CIA小鼠产生治疗作用。

Treg细胞作为一种专职的调节性T细胞亚群，是近年来免疫学领域有关免疫负相调控最大的研究热点，其能够阻止自身反应性T细胞的活化并抑制自身免疫性疾病的发生，在维持自身耐受中发挥重要作用。在自身免疫性疾病动物模型中，输入体外扩增的Treg细胞或体内应用提升该细胞功能的药物可以缓解疾病症状。本研究发现经过薯蓣皂苷的治疗，小鼠腹股沟淋巴结信号蛋白p-STAT5显著升高，引起Foxp3升高，最终导致幼稚T细胞向Treg细胞分化，抑制炎症反应强度，对CIA小鼠有治疗作用。而雷公藤组p-STAT5虽然也有升高，但其Foxp3并无明显变化，

Treg细胞比率相比模型组亦无明显差异，说明雷公藤可能在关节发病早期即已对Treg细胞产生作用，而这一作用逐渐减弱，到第35天与模型组相比p-STAT5和Foxp3已无明显差异。

结**论**

薯蓣皂苷通过调节CD4+T细胞亚群分化关键转录因子进而影响Th1、

Th2、Th17、Treg细胞分化和平衡，从而对胶原诱导性关节炎小鼠产生疗效，其有望开发成为一种新的治疗类风湿性关节炎的药物。

38

参考文献

[1]赵潇，任贺，高松等.薯蓣皂苷对胰腺癌MiaPaCa-2细胞凋亡的影响及机制[J].中华肿瘤杂志，2014, 36(1)：5-10.

[2]段一娜，王明娟，孔素红等.薯蓣皂苷片对RSC-364 细胞核转录因子

-κB p65表达的影响[J].世界科学技术-中医药现代化,2014, (7):1625-1628.

[3]张春芳，吴珊，彭金咏等.薯蓣皂苷通过上调Lrp5、β-catenin表达促进成骨细胞 MC3T3-E1 增殖、分化[J]. 中国药理学通报,2013,29(9):1255-1260.

[4]褚春民，张洪泉，卜平等.薯蓣皂苷对胶原性关节炎模型大鼠环氧合酶

2及NF-κB的抑制作用[J].中国药理学与毒理学杂志,2013,27(3):341-345.

[5]李凌霞，李季委，王兴焱等.薯蓣皂苷对大鼠结肠平滑肌细胞内钙浓度的影响[J].中医药学报，2013, 41(4)：62-63.

[6] Welles WL, Batlisto JR．Suppression of adjuvant arthritis by antibodies specific for collagen type II[J]．Immunol Commun, 1981, 10(8):673-685. [7] VanderBorght A, Geusens P, Raus J, et al. The autoimmune pathogenesis of

Rheumatoid arthritis: role of autoreactive T cells and new immunotherapie[s Semin Arthritis Rheum. 2001,31(3):160-175.

J].

[8] Panayi GS, Corrigall VM, Pitzalis C. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. The role of T cells and other beasts[J]. Rheum Dis Clin North Am. 2001,27(2):317-334.

[9] Kinne RW, Palombo-Kinne E, Emmrich F. T-cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis villains or accomplices[J] BiochimBiophysActa.1997, 1360(2):109-141.

[10] Holoshitz J, Klajman A. The role of T-cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. Harefuah. 1984,107(5-6):136-137.

[11] Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins[J]. J Immunol. 1986,136:2348-2357.

39

[12] Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications[J]. Annu Rev Immunol 1998, 16:293-322.

[13] Aaronson DS, Horvath CM. A road map for those who don't know JAK-STAT[J]. Science. 2002,296 (5573): 1653–5.

[14] Hebenstreit D, Horejs-Hoeck J, Duschl A. JAK/STAT-dependent gene regulation by cytokines[J]. Drug News Perspect. 2005,18(4): 243–249.

[15] KisselevaT, Bhattachanga S, Braunstem J, et al. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges

[J]. Gene,2002,285(1-2):1-24.

[16] van der Pouw Kraan TC, van Gaalen FA, Kasperkovitz PV, et al. Rheumatoid arthritis is a heterogeneous disease: evidence for differences in the activation of the STAT-1 pathway between rheumatoid tissues[J]. Arthritis

Rheum. 2003,48(8):2132-2145.

[17] Kasperkovitz PV, Verbeet NL, Smeet TJ, et al. Activation of the STAT1 pathway in rheumatoid arthritis[J]. Ann Rheum Dis. 2004,63(3):233-239.

[18] Muller−Ladner U, Judex M, Ballhorn W, et al. Activation of the IL−4 STAT Pathway in Rheumatoid Synovium[J]. J Immunol 2000, 164(7): 3894–3901. [19]Hueber W, Patel DD, Dryja T, et al. Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis[J]. Sci Transl Med,2010,2(52):52-72.

[20] Swaak A, van Rooyen A, Nieuwenhuis E, et al. Interleukin-6 (IL-6) in synovial fluid and serum of patients with rheumatic diseases[J]. Scand J Rheumatol 1988, 17(6):469–474.

[21] Katoh M. STAT3-induced WNT5A signaling loop in embryonic stem cells, adult normal tissues, chronic persistent inflammation, rheumatoid arthritis and cancer (Review). Int J Mol Med.2007,19(2):273-278.

[22] Sen M, Chamorro M, Reifert J, et al. Blockade of Wnt-5A/frizzled 5 signaling inhibits rheumatoid synoviocyte activation. Arthritis Rheum. 2001,44(4):772-781.

40

[23] Shouda T, Yoshida T, Hanada T, et al. Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. J Clin Invest 2001,108(12):1781–1788.

41

**综述**

**薯蓣皂苷药理作用机制研究进展**

穿ft龙是薯蓣科植物穿龙薯蓣的根茎，为传统中药，民间多用其泡酒治疗筋骨麻木。现代药理学研究证实，穿ft龙中含有多种甾体皂苷类活性成分，其中薯蓣皂苷被认为是其主要活性成分。薯蓣皂苷（dioscin）是典型的螺旋甾烷型甾体皂苷(spirostanol saponin)，近年来，对于薯蓣皂苷的许多研究证实其具有抗肿瘤、调节免疫、改善心血管功能等多种生物学活性。因其结构的特殊性，使得薯蓣皂苷成为合成多种甾体激素类药物的重要原料。薯蓣皂苷是近年来备受关注的天然化合物。现将薯蓣皂苷药理作用机制研究状况综述如下。



**1抗肿瘤作用**

Fig1. structure of dioscin

薯蓣皂苷主要通过抑制肿瘤细胞分裂、增殖，诱导凋亡，增强抑癌基因表达等途径来抑制肿瘤的生长，从而延缓肿瘤的进展速度，改善患者的生活质量，提高生存率。

细胞凋亡在肿瘤的发病过程中起着至关重要的作用。肿瘤细胞是从生物体内正常细胞演变而来，体内正常细胞转变成肿瘤细胞的过程称为癌变。在正常细胞发生癌变前，机体可以通过细胞凋亡从而清除损伤、衰老和突变的细胞。发生癌变后，凋亡机制发生明显障碍，细胞不断增殖，进入失控的生长状态，最终导致肿瘤的发生。实验证实薯蓣皂苷可上调Fas/FasL、

42

TNF-a、TNFR1、TRAF-1、FADD、Bax、Bak、p53等基因及其蛋白质的表达，下调Bcl-2、Bcl-xl的表达，促进细胞色素C从线粒体向胞浆基质中释放，同时能显著增强caspase-3和caspase-8的活化[1]，激活细胞凋亡的的死亡受体途径和线粒体介导途径，从而诱导肿瘤细胞凋亡。但是在Huh-7细胞的研究中发现，薯蓣皂甙诱导细胞凋亡是通过caspase-3和caspase-9的活化，而不是caspase-8[2]。这种差异可能是因为不同肿瘤细胞中caspase蛋白的表达差异而造成的。ROS（reactive oxygen species）可以结合Fas蛋白，激活下游信号途径，也可以促进线粒体释放细胞色素c[3-5]，从而诱导受体介导的或者线粒体介导的细胞凋亡。薯蓣皂苷可以显著提高肿瘤细胞中活性氧（ROS）的浓度，使用抗氧化剂或提高PRDX1 和PRDX6

（peroxiredoxins 1 and 6）的表达阻断ROS的升高可以抑制薯蓣皂苷诱导的细胞凋亡[6]。薯蓣皂苷还可以下调c-FLIPL[Cellular FLICE (FADD-like IL-1β-converting enzyme) -inhibitory protein (c-FLIP)]的表达，加强肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor (TNF) -related apoptosis inducing ligand，TRAIL)诱导的癌细胞凋亡[7]。但是也有实验证实，薯蓣皂苷在诱导肿瘤细胞凋亡的同时，可以通过激活ERK1/2和JNK1/2，降低PI3K、磷酸化的Akt和mTOR的表达，从而诱导细胞自噬，这种薯蓣皂苷诱导的细胞自噬对肿瘤细胞产生了一种保护机制，通过使用细胞自噬抑制剂，可以显著加强薯蓣皂苷对肿瘤细胞的凋亡诱导作用[8]。可见薯蓣皂苷通过多种途径、多个靶点对肿瘤细胞产生抑制作用，虽然其也能对肿瘤细胞产生保护作用，但是通过一定的手段，能够降低这种保护作用的发生，使其成为一种有效的治疗肿瘤的药物。

**2对心血管系统的作用**

薯蓣皂苷能够通过提高心肌细胞的抗氧化能力，减轻心肌细胞钙超载等多种途径改善心肌损伤。可以用于治疗和预防心绞痛和冠心病。

在心肌缺血/再灌注损伤中，自由基的作用是毋庸置疑的。正常时，细胞可以通过自由基清除剂超氧化物歧化酶(SOD)将氧自由基转变为过氧化氢，最后通过触酶和谷胱甘肽过氧化酶的作用将过氧化氢还原为水和氧。当心肌缺血再灌注时，由于细胞内SOD减少，产生的大量氧自由基不能被及时分解清除，导致心肌细胞氧化损伤最终引起细胞死亡。研究发现，薯蓣皂苷能够提高心肌细胞SOD和过氧化氢酶的活性，且这一作用

43

具有剂量依赖性，从而提高机体清除氧自由基的能力，减轻自由基对心肌细胞损伤，改善心肌细胞功能[9-10]。心肌细胞钙超载也是引起心肌细胞损伤的原因之一,钙超载可引起线粒体内氧化磷酸化过程障碍，改变线粒体膜通透性，影响线粒体功能，使线粒体合成ATP 能力下降，能量生成障碍。同时还能激活胞浆内的多种酶类，促进膜磷脂分解，产生游离脂肪酸、前列环素和白三烯等对细胞有毒性的物质，使细胞发生不可逆性损伤。薯蓣皂苷明显阻断L-型钙通道电流，减轻心肌细胞钙超载，保护缺氧心肌[11]。同时能抑制caspase-3活性，降低Bax表达水平的同时提高Bcl-2的表达，抑制凋亡[12]。

从对血管内皮细胞的作用方面看，薯蓣皂苷可以抑制血浆中的CD62p、CD63及PAF的表达，通过抗血小板活化，减少心肌缺血再灌注时血栓的形成，从而保护心肌[13]。而血管内皮细胞的功能障碍在动脉粥样硬化的发病过程中同样重要，薯蓣皂苷能够减少内皮素（endothelin, ET）的合成与分泌，提高eNOS蛋白的表达，使NO的合成与释放增加，从而对Ox-LDL诱导的血管内皮细胞凋亡起到保护作用[14]，这提示薯蓣皂苷也许可以用于动脉粥样硬化的治疗。

**3调节免疫作用**

薯蓣皂苷能通过不同途径调节机体免疫，对体液免疫和细胞免疫均有着明显的调节作用。

类风湿性关节炎（rheumatoid arthritis, RA）是一种以慢性侵蚀性关节炎为特征的全身性自身免疫病，其发病机制十分复杂，但是免疫系统作为机体保护自身，排斥异己的重要系统在其发病过程中必然有重要作用。现 已证实多种免疫细胞和分子参与了类风湿性关节炎的炎症反应和组织破坏。薯蓣皂苷可以调节细胞因子的分泌，降低血清和足爪炎性细胞因子IL-1、TNF-α的水平，显著降低NF-κB p65亚基、前列腺素E2和COX-2的水平，影响免疫细胞功能，对胶原诱导性关节炎（collegen induced arthritis, CIA）大鼠有明显的治疗作用[15-16]。肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)作为重要的促炎性细胞因子，在活动期RA患者滑膜及血液中都明显升高。其参与了RA多种致病机制，能够激活内皮细胞，促进血管翳的形成和生长，诱导细胞因子产生和白细胞的聚集，促进破骨细胞的活化与软骨的破坏，还能刺激产生基质金属蛋白酶直接参与软骨和骨的破坏。

44

大量临床试验证明，抗TNF-α治疗能明显改善RA的症状，减轻疾病活动。英夫利西单抗和阿达木单抗等TNF-α抑制剂均可减轻RA关节炎症。薯蓣皂苷这种类似的作用可能是其对类风湿性关节炎产生治疗作用的重要途径。

血管内皮生长因子(VEGF)是一种内皮细胞特异的血管新生因子，能促进血管翳的形成，在RA关节破坏的发展中具有重要作用。临床研究发现，VEGF在RA患者的血清和滑液中明显升高。薯蓣皂苷能够抑制NF-κB

p65、STAT3及AP-1表达，进而抑制VEGF及其受体Flk-1和Ang-2及其受体Tie-2表达，减少血管翳形成，抑制炎症发展，减轻关节破坏改善关节炎症状[17-21]。

我们前期的研究也发现穿ft龙总皂苷（含薯蓣皂苷）和薯蓣皂苷元（薯蓣皂苷的水解产物）对大鼠具有较强的抗炎作用，对大鼠佐剂性关节炎

（AA）和胶原诱导的关节炎（CIA）疗效肯定，能降低血清和关节滑液中IL-1、IL-6、IL-8和TNF-α的水平；穿ft龙总皂苷含药血清体外可抑制

RA大鼠T淋巴细胞增殖及IL-2的产生；可见，薯蓣皂苷通过多种途径调节炎症因子及免疫细胞的功能，发挥抗炎作用。

**4其他作用**

除过以上作用，薯蓣皂苷还具有多种作用。如能降低结肠平滑肌细胞内钙浓度，松弛平滑肌，改善结肠平滑肌细胞生物学功能[22]。同样薯蓣皂苷还能对酪氨酸酶抑制剂产生显著的协同作用，降低酪氨酸酶抑制剂的用量[23]，这种作用提示我们也许薯蓣皂苷可以用来治疗帕金森症。薯蓣皂苷还能通过影响真菌胞膜结构发挥显著的抗真菌作用[24]。薯蓣皂苷的抗病毒作用近期也有报道[25]，但是具体的机制有待进一步研究。还有一个具有极大潜力的作用是薯蓣皂苷能够逆转肿瘤细胞的多重耐药性，通过抑制MDR1（multidrug resistance gene 1）启动子活性，从而下调MDR1基因表达，抑制P-糖蛋白（P-glycoprotein）的功能，这使得薯蓣皂苷可能成为一种多药耐药逆转剂，用于提高肿瘤疾病的治疗效果[26-27]。

**5思考与展望**

可以肯定，薯蓣皂苷在抗肿瘤、改善心血管功能、调节免疫等方面都有着明显的作用，安全毒性小[28]，但其药理作用机制有很多方面至今仍不清楚，如薯蓣皂苷的肠道吸收到底是如何的？吸收入血后是否通过肝的代

45

谢形成次级产物而发挥作用？又是通过何种方式能够诱导肿瘤细胞的凋亡而却抑制缺氧心肌细胞的凋亡，从而发挥这种双向调节的？薯蓣皂苷调节免疫的作用是不是因为其结构和甾体激素类似，而能在体内发挥类激素样的作用呢？如此种种问题，还需进一步研究。而且，目前的研究大多集中在离体细胞的研究层面，而在动物体内的详细作用过程报道较少，也不够深入，这为薯蓣皂苷的更广泛的应用带来许多障碍。

总之，薯蓣皂苷是一种极有潜力的药物，有着广阔的前景，对其作用机理的进一步研究，是具有极大价值的。

46

参考文献

[[1] Hu M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hu%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22334414), [Xu L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Xu%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22334414), [Yin L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Yin%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22334414), et al. Cytotoxicity of dioscin in human gastric carcinoma cells through death receptor and mitochondrial pathways[J]. J Appl. Toxicol. 2013, 33(8): 712–722.

[[2] Hsieh MJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hsieh%20MJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23193420), [Yang SF](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Yang%20SF%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23193420), [Hsieh YS](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hsieh%20YS%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23193420), et al. Autophagy Inhibition Enhances Apoptosis Induced by Dioscin in Huh7 Cells[J]. Evid Based Complement Alternat Med. 2012, 2012: 134512-134523.

[[3] Waris G](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Waris%20G%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16689993), [Ahsan H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ahsan%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16689993). Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions[J]. J Carcinog, 2006, 11: 5-14.

[4] Gupta SC, Hevia D, Patchva S, et al. Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy [J]. Antioxid. Redox Signal. 2012, 16(11): 1295–1322.

[5] Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy[J]. J Pharm Sci, 2007, 96(9): 2181–2196.

[6] Wang Z, Cheng Y, Wang N, et al. Dioscin induces cancer cell apoptosis through elevated oxidative stress mediated by downregulation of peroxiredoxins[J]. Cancer Biol Ther, 2012, 13(3): 138-147.

[[7] Kim YS](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kim%20YS%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22895655), [Kim EA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kim%20EA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22895655), [Park KG](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Park%20KG%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22895655), et al. Dioscin sensitizes cells to TRAIL-induced apoptosis through downregulation of c-FLIP and Bcl-2[J]. Oncol Rep. 2012, 28(5): 1910-1916.

[[8] Hsieh MJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hsieh%20MJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23552851), [Tsai TL](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Tsai%20TL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23552851), [Hsieh YS](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hsieh%20YS%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23552851), et al. Dioscin-induced autophagy mitigates cell apoptosis through modulation of PI3K/Akt and ERK and JNK signaling pathways in human lung cancer cell lines[J]. Arch Toxicol. 2013, 87(11): 1927-1937.

[9] 倪岚, 许澎, 伍旭升等. 薯蓣皂苷对缺氧/复氧心肌细胞损伤的抗氧化作用研究[J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(11): 76-77.

[10] 郭春宏, 李欣, 康毅等. 薯蓣皂苷含药血清对乳鼠心肌细胞过氧化损伤的保护作用[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(13): 1027-1031.

[11] 张铭慧, 尹永强, 何海燕等. 薯蓣皂苷对大鼠心室肌细胞钙离子通道的影响[J]. 中药药理与临床, 2011, 01: 23-26.47

[12] 吴志恒, 张曦, 汪云等. 薯蓣皂苷含药血清抗氧化损伤致心肌细胞凋亡的研究[J]. 中国药学杂志, 2012, 19: 1547-1551.

[13] 魏星, 沈炳玲, 张真等. 薯蓣皂苷对心肌缺血再灌血小板活化的影响[J]. 天津医科大学学报, 2009, 01: 7-9.

[14] 苏健, 郭卫莉, 李欣等. 薯蓣皂苷对氧化低密度脂蛋白诱导血管内皮细胞凋亡的保护作用[J]. 天津医科大学学报, 2012, 02: 175-178.

[15] 褚春民, 张洪泉, 卜平等. 薯蓣皂苷对大鼠胶原性关节炎治疗作用的实验研究[J]. 中国药理学通报, 2012, (10): 1464-1467.

[16] 褚春民, 陈放, 张洪泉等. 薯蓣皂苷对胶原性关节炎大鼠的免疫调节[J]. 实用临床医药杂志, 2013, 17(1): 5-9.

[17] 董文娟, 梁秀军, 翟泽玲等. 穿ft龙总皂苷对CIA大鼠滑膜血管新生的作用[J]. 承德医学院学报, 2010, 27(4): 360-362.

[18] 谢守军, 宋鸿儒. 穿ft龙总皂苷对佐剂性关节炎大鼠免疫调节作用的实验研究[J]. 辽宁中医杂志, 2007, 34(9): 1323-1325.

[19] 高亚贤, 梁秀军, 董文娟等. 穿ft龙总皂苷对胶原诱导性关节炎大鼠关节滑膜组织NF-κB p65活性及STAT3表达的影响[J]. 中国医科大学学报, 2012, 41(6): 485-489.

[20] 于海荣, 王济兴, 张风英等. 穿ft龙总皂苷对大鼠T淋巴细胞功能影响的血清药理学研究[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(9): 1653-1654.

[21] 谢守军, 宋鸿儒, 彭兴荣等. 穿ft龙总皂甙对佐剂性关节炎大鼠病理改变的影响[J]. 四川中医, 2007, 25(8): 10-13.

[22] 李凌霞, 李季委, 王兴焱等. 薯蓣皂苷对大鼠结肠平滑肌细胞内钙浓度的影响[J]. 中医药学报, 2013, 41(4): 62-63.

[[23] Liang C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Liang%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23107741), [Lim JH](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lim%20JH%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23107741), [Kim SH](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kim%20SH%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23107741), et al. Dioscin: A synergistic tyrosinase inhibitor from the roots of Smilax china[J]. Food Chem, 2012, 134(2): 1146–1148.

[[24] Cho J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Cho%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23262192), [Choi H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Choi%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23262192), [Lee J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lee%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23262192), et al. The antifungal activity and membrane-disruptive action of dioscin extracted from Dioscorea nipponica[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1828(3): 1153–1158.

[[25] Liu C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Liu%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23238077), [Wang Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Wang%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23238077), [Wu C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Wu%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23238077), et al. Dioscin's antiviral effect in vitro[J]. Virus Res, 2013, 172 (1-2): 9–14.

[[26] Sun BT](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sun%20BT%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21195709), [Zheng LH](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zheng%20LH%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21195709), [Bao YL](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bao%20YL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21195709), et al. Reversal effect of Dioscin on multidrug

48

Resistance in human hepatoma HepG2/adriamycin cells[J]. Eur J Pharmacol,2011,654 (2):129–134.

[[27] Wang L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Wang%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23621869), [Meng Q](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Meng%20Q%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23621869), [Wang C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Wang%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23621869), et al. Dioscin restores the activity of the anticancer agent adriamycin in multidrug-resistant human leukemia K562/adriamycin cells by down-regulating MDR1 via a mechanism involving NF-κB signaling inhibition[J]. J Nat Prod, 2013, 76(5): 909-914.

[[28] Xu T](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Xu%20T%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22386816), [Zhang S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zhang%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22386816), [Zheng L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zheng%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22386816), et al. A 90-day subchronic toxicological assessment of dioscin, a natural steroid saponin, in Sprague–Dawley rats[J]. Food Chem Toxicol, 2012, 50(5): 1279-1287.

49

致**谢**

本研究及论文是在我的恩师宋鸿儒教授的关怀和悉心指导下完成的。宋老师治学严谨，待人真诚，知识渊博。从论文的最初选题到最终完成，宋老师都始终给予我耐心的指导和坚定的支持，他独特的人格魅力，精益求精的工作作风和条理分明、逻辑清晰的科学思维都深深的影响着我。正是在宋老师的无私帮助下我的论文才能顺利完成，谨在此向他致以崇高的敬意和衷心的感谢。

诚挚的感谢郭亚春老师、邢恩洪老师、封桂英老师对我的指导和帮助，在实验中每每遇到难题，他们都能为我指点迷津，解惑答疑，让我受益良多。

感谢梁秀军师姐、高亚贤师姐、郭明师兄在实验上的帮助和生活上的关怀。感谢免疫学教研室、病原生物学教研室、中心实验室的各位老师的支持与帮助。感谢我的同学赵学荣、师妹赵晓菲和王弥对我的支持和帮助。感谢承德医学院研究生部各位老师在我研究生学习阶段给予的关怀和帮助。

感谢我的家人，是他们的支持与鼓舞让我有信心向目标不断前进。

50

**个人简历**

**一、个人基本情况**

姓名安高性别男民族汉

出生日期1987年2月18日籍贯陕西省渭南市

**二、个人经历**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 2005.9～2010.7 | 第四军医大学 | 临床医学专业 |
| 2012.9～2015.7 | 承德医学院 | 免疫学专业 |

**三、发表论文情况**

1.胶原诱导型关节炎小鼠Th1细胞及特异转录因子动态变化的研究。中国老年学杂志，已录用。

**四、获奖情况**

无

**五、承担或主研课题情况**

承担国家自然科学基金面上项目：穿龙薯蓣皂苷对CIA鼠CD4+T细胞亚群平衡的影响及其调控机制研究（81273986）的部分研究工作

51