

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2021.12.011

实验研究

小乌桂汤对胶原诱导性关节炎模型小鼠脾脏 Th17/Treg 平衡及血浆炎症因子的影响

单文君¹, 李长征², 齐杰莹¹, 谢丽芬¹, 张巧莹¹, 聂晓莉¹✉

1. 南方医科大学中西医结合医院, 广东省广州市海珠区赤岗石榴岗路 13 号大院, 510315; 2. 南方医科大学中医药学院

摘要 目的 探讨小乌桂汤治疗类风湿关节炎 (RA) 的作用机制。方法 60 只雄性 DBA/1 小鼠随机分为正常组 8 只及造模组 52 只。造模组采用尾根部及背部分 3 点皮内注射鸡 II 型胶原蛋白乳化液建立胶原诱导性关节炎 (CIA) 小鼠模型。造模成功的 40 只小鼠随机分成模型组、甲氨蝶呤组、小乌桂汤低剂量组、小乌桂汤中剂量组、小乌桂汤高剂量组, 每组 8 只。甲氨蝶呤组予 0.1 mg/ml 甲氨蝶呤药液 2 mg/kg 灌胃, 每周 1 次; 小乌桂汤低、中、高剂量组分别予含生药 19.5、39、75 g/(kg·d) 小乌桂汤灌胃, 每日 1 次; 正常组与模型组给予生理盐水 0.2 ml/10 g 灌胃, 每日 1 次。4 周后评定关节炎指数评分, 测量发病足厚度, 观察踝关节组织病理并进行组织病理学评分; 检测脾脏辅助性 T 细胞 17 (Th17)、调节性 T 细胞 (Treg) 及血浆肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 17 (IL-17)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 10 (IL-10) 的水平。结果 与模型组比较, 甲氨蝶呤组及小乌桂汤中、高剂量组关节炎指数评分, 发病足厚度, 脾脏 Th17 细胞水平, 血浆 TNF- α 、IL-6、IL-17、IL-1 β 水平, 关节病理总评分, 血管翳及骨破坏评分均显著降低, Treg 细胞水平均显著升高, 甲氨蝶呤组及小乌桂汤高剂量组 Th17/Treg 值、滑膜炎评分显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与甲氨蝶呤组比较, 小乌桂汤低剂量组脾脏 Th17 细胞水平、Th17/Treg 值、关节病理总评分、血管翳及骨破坏评分显著升高, 小乌桂汤低、中剂量组 Treg 细胞水平显著降低 ($P < 0.01$)。与小乌桂汤低剂量组比较, 小乌桂汤中、高剂量组 Th17 细胞水平, Th17/Treg 值显著降低, Treg 细胞水平显著升高, 小乌桂汤高剂量组病理总评分、血管翳评分显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与小乌桂汤中剂量组比较, 小乌桂汤高剂量组 Treg 细胞水平显著升高 ($P < 0.01$)。结论 小乌桂汤对 CIA 小鼠具有抗炎及免疫调节作用, 以高剂量效果最佳, 其作用机制与调节 Th17/Treg 的平衡, 抑制 TNF- α 、IL-6、IL-17、IL-1 β 炎症因子的表达相关。

关键词 胶原诱导性关节炎; 小乌桂汤; 辅助性 T 细胞 17; 调节性 T 细胞; 炎症因子

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是以慢性对称性关节炎症和关节进行性损伤、骨质侵蚀为主要特征的一类系统性自身免疫性疾病^[1-2]。T 细胞介导的免疫反应异常是 RA 的主要病理机制之一^[3]。研究表明, 辅助性 T 细胞 17 (Th17)/调节性 T 细胞 (Treg) 的失衡在 RA 中起着关键作用^[4]。Th17 细胞分泌肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 17 (IL-17)、白细胞介素 1 β (IL-1 β) 等炎症因子, 促进炎症的发展; 而 Treg 细胞能够分泌白细胞介素 10 (IL-10)

等抑炎因子, 阻止炎症的发展, 两者在 RA 中起着相互拮抗的作用, 调控 Th17/Treg 的平衡可能成为防治 RA 的重要策略^[5-6]。

RA 常累及手、足小关节, 主要临床表现为多关节、对称性、侵蚀性的关节炎症, 患者常因关节软骨和骨组织的破坏而致残。目前的一线用药虽很大程度上可以改善患者病情, 但尚不能完全控制疾病的进展, 而且长期使用会导致一系列的副作用^[7]。小乌桂汤具有疏风散寒祛湿、益气养血通络的功效, 治疗 RA 临床疗效颇佳^[8-9]。本研究采用胶原诱导性关节炎 (CIA) 小鼠模型, 观察小乌桂汤对 CIA 小鼠相关免疫细胞 Th17、Treg 细胞的

基金项目: 国家自然科学基金 (81603599, 81774038)

✉ 通讯作者: nxl117@smu.edu.cn

影响,探讨小乌桂汤治疗 RA 的免疫学机制。本研究已通过南方医科大学实验动物伦理委员会审查(批件号: L2018181)。

1 材料与方法

1.1 动物

60 只 SPF 级雄性 6 周龄健康 DBA/1 小鼠,北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号: SCXK (京) 2012-0001。

1.2 药物

小乌桂汤组成: 麻黄 10 g, 桂枝 10 g, 当归 10 g, 党参 15 g, 生石膏 20 g, 干姜 10 g, 川芎 10 g, 白芍 15 g, 黄芪 20 g, 制川乌 10 g, 知母 10 g, 防风 10 g, 黑顺片 10 g, 牡丹皮 10 g, 黄芩 10 g, 炙甘草 10 g。饮片由南方医科大学南方医院中药房提供,水煎煮两次,混匀过滤,浓缩分别制得含生药 0.975、1.95、3.9 g/ml 的药液,4℃ 保存。甲氨蝶呤片(上海上药信谊药厂有限公司,批号: 036190503) 研磨成粉,用生理盐水混匀配制成 0.1 mg/ml 药液,现配现用。

1.3 主要试剂与仪器

鸡Ⅱ型胶原蛋白(CⅡ,批号: 190133)、弗氏完全佐剂(批号: 190016)、弗氏不完全佐剂(批号: 190269),美国 Chondrex 公司;细胞刺激剂(含布雷菲德菌素 A,批号: B287064)、纯化抗小鼠 CD16/32 抗体(批号: B264872)、异硫氰酸荧光素(FITC)抗小鼠 CD4 抗体(批号: B266671)、藻红蛋白(PE)抗小鼠细胞介素 17A(IL-17A)抗体(批号: B271227)、别藻蓝蛋白(APC)抗小鼠 CD25 抗体(批号: B272759)、PE 抗小鼠叉头状转录因子 p3(Foxp3)抗体(批号: B271498)、LEGENDplex™ 小鼠炎症因子试剂盒(批号: B301387),德国 Biolegend 公司; eBio-science™ FOXP3/转录因子染色缓冲液试剂盒(美国 Invitrogen 公司,批号: 2115575); 苏木精染液(批号: ZH200304)、伊红染液(批号: ZH202305),中国谷歌生物有限公司。

电动匀浆器(德国 IKA 公司,型号: T 10 basic ULTRA-TURRAX®); 电子千分尺(日本三丰公司,型号: 293-240-30); 流式细胞仪(美国 BD 公司,型号: BD LSRFortessa™); 光学显微镜(日本尼康公司,型号: Eclipse E100); 高速离心机(德国 Eppendorf 公司,型号: Centrifuge 5804 R)。

1.4 分组、造模及给药

用 0.1 mol/L 乙酸配制 2 mg/ml 的 CⅡ溶液,冰

浴条件下,使用电动匀浆器将 CⅡ溶液与弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂混匀,条件为 25 000 r/min,进行 2 min,暂停 2 min,反复多次直至形成油包水状奶白色黏稠乳液,乳液终浓度为 1 mg/ml。

60 只小鼠适应性饲养 1 周后按随机数字表法分为正常组 8 只及造模组 52 只。造模组小鼠参照文献[10-11]建立 CIA 小鼠模型,于第 0 天进行初次免疫,第 21 天进行强化免疫,予背部及尾根部分 3 点皮内注射乳化剂。初次免疫时,每只小鼠 3 点共注射 CⅡ弗氏完全佐剂乳化液 0.1 ml。强化免疫时,避开结痂部位,注射方法、部位大致同初次注射,每只小鼠 3 点共注射 CⅡ弗氏不完全佐剂乳化液 0.1 ml。

初次免疫后的第 28 天,观察小鼠关节炎发病情况,并记录关节炎指数评分^[12],≥1 分为造模成功。40 只小鼠造模成功,按随机数字表法分为模型组、甲氨蝶呤组及小乌桂汤低、中、高剂量组,每组 8 只。初次免疫第 28 天开始给药,按照人和动物间体表面积折算的等效剂量比值^[13]计算给药剂量。小乌桂汤低、中、高剂量组分别按 19.5、39、75 g/(kg·d) 剂量灌胃小乌桂汤,每日 1 次。甲氨蝶呤组按 2 mg/kg 灌胃甲氨蝶呤药液,每周 1 次。正常组与模型组给予生理盐水 0.2 ml/10 g 灌胃,每日 1 次。各组小鼠均连续给药 4 周。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 关节炎指数评分、发病足厚度测量 给药 4 周后观察各组小鼠关节红肿情况,并进行关节炎指数评分。关节炎指数评分标准^[14]: 0 分为正常,无关节发炎; 1 分为轻度,踝关节或足趾单个关节红肿; 2 分为中度,踝关节红肿; 3 分为重度,整个足爪严重红肿; 4 分为极重度: 整个足爪严重红肿,甚至关节变形、功能障碍。每只小鼠 4 足爪的关节炎指数总评分最高为 16 分。使用电子千分尺测量小鼠发病足的厚度。

1.5.2 血浆 TNF-α、IL-6、IL-17、IL-1β、IL-10 含量 麻醉小鼠后,采用肝素钠抗凝管采集全血后,尽快进行血浆分离(30 min 内),室温下 3000 r/min 离心 10 min,离心半径为 16 cm,取上层血浆,以 50 μl/管分装至 1.5 ml 离心管中, -80℃ 冰箱保存备用,避免反复冻融。按 LEGENDplex™ 小鼠炎症因子试剂盒说明书检测 TNF-α、IL-6、IL-17、IL-1β、IL-10 水平。

1.5.3 脾脏 Th17、Treg 细胞检测 麻醉处死小鼠

后,分离脾脏,加入冷 PBS 研磨成单个脾细胞,收集单细胞悬液,4℃、1600 r/min 离心 5 min,离心半径为 16 cm,弃上清,加入红细胞裂解液,冰上裂解红细胞后台盼蓝染色计数,调整细胞浓度至 1×10^7 个/ml,混匀备用。

Th17 检测: 取上述脾单细胞悬液接种于 96 孔板,用含有细胞刺激剂(含布雷菲德菌素 A)的细胞培养液进行刺激培养,在 37℃、5% CO₂ 环境下孵育 5 h 后,收集脾细胞,洗涤后进行细胞计数,调整细胞数为 1×10^7 个/ml。取 100 μl 脾细胞悬液加入流式管,并加入 2 μl 的纯化抗小鼠 CD16/CD32 抗体冰上孵育 10 min 后,再加入 0.5 μl FITC 抗小鼠 CD4 抗体冰上避光孵育 25 min,加入 1 ml PBS 洗涤 1 次,离心 5 min(离心条件同上),弃上清,加入 0.5 ml 固定液,4℃固定过夜后,离心 5 min(离心条件同上),弃上清,加入 1 ml 胞内染色破膜洗涤液洗涤 1 次,离心 5 min(离心条件同上),弃上清,加入 1.25 μl PE 抗小鼠 IL-17A 抗体冰上避光孵育 30 min,用 1 ml 胞内染色破膜洗涤液洗涤 1 次,离心 5 min(离心条件同上),弃上清,加入 300 μl PBS 重悬细胞,流式细胞仪检测 Th17 细胞比例,选取 CD4⁺IL-17⁺ 标记的细胞群为 Th17 细胞。

Treg 检测: 取上述脾脏单细胞悬液 100 μl 加入流式管,并加入 2 μl 的纯化抗小鼠 CD16/CD32 抗体冰上孵育 10 min 后,加入 0.5 μl FITC 抗小鼠 CD4 抗体、1.25 μl APC 抗小鼠 CD25 抗体冰上避光孵育 25 min,加入 1 ml PBS 洗涤 1 次,离心 5 min(离心条件同上),弃上清,加入 1 ml 新鲜制备的固定破膜液 1 次,在室温下避光孵育 30 ~ 60 min,加入 2 ml 破膜液 1 次,室温下离心 5 min(离心条件同上),弃上清,加入 2.5 μl PE 抗小鼠 Foxp3 抗体冰上避光孵育 50 min,加入 1 ml 破膜液洗涤细胞 1 次,室温下 1600 r/min 离心 5 min,离心半径 16 cm,破膜,弃上清,加入 300 μl PBS 重悬细胞,流式细胞仪检测 Treg 细胞比例,选取 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 细胞群标记为 Treg 细胞。

1.5.4 踝关节组织病理学评分 麻醉处死小鼠后,暴露小鼠发病的踝关节,于踝关节上缘 1 cm 剪断下肢。分离剥除皮肤及肌肉,迅速放入 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h。置于福尔马林盐酸溶液(40% 甲醛 10 ml,浓盐酸 2 ml,蒸馏水 88 ml)中脱钙 72 h,随后水洗脱酸,接着依次脱水、透明、65℃浸蜡、包埋、切片,厚度 4 ~ 5 μm。随后进行 HE

染色,依次进行脱蜡、HE 染色、脱水、透明、封片。显微镜下观察滑膜增生、血管翳、软骨及骨侵蚀情况。病理评分标准^[4-15]: 1) 滑膜炎(根据滑膜细胞厚度判断): <3 层计 0 分; 3 ~ 5 层计 1 分; 6 ~ 10 层计 2 分; 11 ~ 20 层计 3 分; 21 ~ 30 层计 4 分; >30 层计 5 分。2) 血管翳: 无血管翳生成计 0 分; 存在微小绒毛计 1 分; 出现清楚的血管翳 2 分; 血管翳明显附着计 3 分; 血管翳布满关节腔计 4 分; 血管翳广泛增生计 5 分。3) 骨破坏: 未见骨侵蚀计 0 分; 骨和软骨轻微侵蚀计 1 分; 出现清楚的软骨侵蚀计 2 分; 出现软骨下骨侵蚀计 3 分; 骨和软骨严重侵蚀计 4 分; 骨和软骨严重流失计 5 分。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件分析数据。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐性者两两比较采用 LSD 法,方差不齐者两两比较采用 Dunnett T^3 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠关节炎指数评分、发病足厚度比较

表 1 示,与正常组比较,模型组关节炎指数评分、发病足厚度均显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较,甲氨蝶呤组及小乌桂汤中、高剂量组关节炎指数评分、发病足厚度均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),小乌桂汤低剂量组关节炎指数评分、发病足厚度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。甲氨蝶呤组及小乌桂汤各剂量组关节炎指数评分、发病足厚度组间比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组小鼠关节炎指数评分、发病足厚度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	关节炎指数评分/分	发病足厚度/mm
正常组	8	0	2.20 ± 0.06
模型组	8	9.50 ± 0.76 ^{a)}	3.41 ± 0.23 ^{a)}
甲氨蝶呤组	8	6.25 ± 1.28 ^{a) c)}	2.89 ± 0.31 ^{a) b)}
小乌桂汤低剂量组	8	7.75 ± 4.17 ^{a)}	3.00 ± 0.40 ^{a)}
小乌桂汤中剂量组	8	5.63 ± 0.74 ^{a) c)}	2.77 ± 0.44 ^{b)}
小乌桂汤高剂量组	8	4.63 ± 1.19 ^{a) c)}	2.52 ± 0.21 ^{c)}

注: a) 与正常组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

2.2 各组小鼠脾脏 Th17、Treg 细胞水平及 Th17/Treg 值比较

表 2 示,与正常组比较,模型组小鼠脾脏中 Th17 细胞水平、Th17/Treg 值显著升高, Treg 细胞水平显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较,甲氨

表 2 各组小鼠脾脏 Th17、Treg 细胞水平及 Th17/Treg 值比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Th17/%	Treg/%	Th17/Treg
正常组	8	1.44 ± 0.21	11.33 ± 0.87	0.13 ± 0.02
模型组	8	3.12 ± 0.84 ^{b)}	5.05 ± 0.78 ^{b)}	0.64 ± 0.24 ^{b)}
甲氨蝶呤组	8	1.78 ± 0.5 ^{d)}	9.56 ± 0.69 ^{b) d)}	0.19 ± 0.05 ^{e)}
小乌桂汤低剂量组	8	2.78 ± 0.52 ^{b) e)}	5.76 ± 0.79 ^{b) e)}	0.49 ± 0.1 ^{b) e)}
小乌桂汤中剂量组	8	2.04 ± 0.64 ^{a) d) f)}	7.08 ± 0.83 ^{b) d) g)}	0.29 ± 0.09 ^{a) f)}
小乌桂汤高剂量组	8	1.94 ± 0.53 ^{d) g)}	9.00 ± 0.51 ^{b) d) g) h)}	0.22 ± 0.05 ^{a) e) g)}

注: Th17, 辅助性 T 细胞 17; Treg, 调节性 T 细胞。

a) 与正常组比较, $P < 0.05$; b) 与正常组比较, $P < 0.01$; c) 与模型组比较, $P < 0.05$; d) 与模型组比较, $P < 0.01$; e) 与甲氨蝶呤组比较, $P < 0.01$; f) 与小乌桂汤低剂量组比较, $P < 0.05$; g) 与小乌桂汤低剂量组比较, $P < 0.01$; h) 与小乌桂汤中剂量组比较, $P < 0.01$ 。

蝶呤组及小乌桂汤中、高剂量组脾脏 Th17 细胞水平均显著降低, Treg 细胞水平均显著升高 ($P < 0.01$), 甲氨蝶呤组及小乌桂汤高剂量组 Th17/Treg 值显著降低 ($P < 0.05$)。与甲氨蝶呤组比较, 小乌桂汤低剂量组脾脏 Th17 细胞水平、Th17/Treg 值显著升高, 小乌桂汤低、中剂量组 Treg 细胞水平显著降低 ($P < 0.01$)。与小乌桂汤低剂量组比较, 小乌桂汤中、高剂量组 Th17 细胞水平、Th17/Treg 值显著降低, Treg 细胞水平均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与小乌桂汤中剂量组比较, 小乌桂汤高剂量组 Treg 细胞水平显著升高 ($P < 0.01$)。

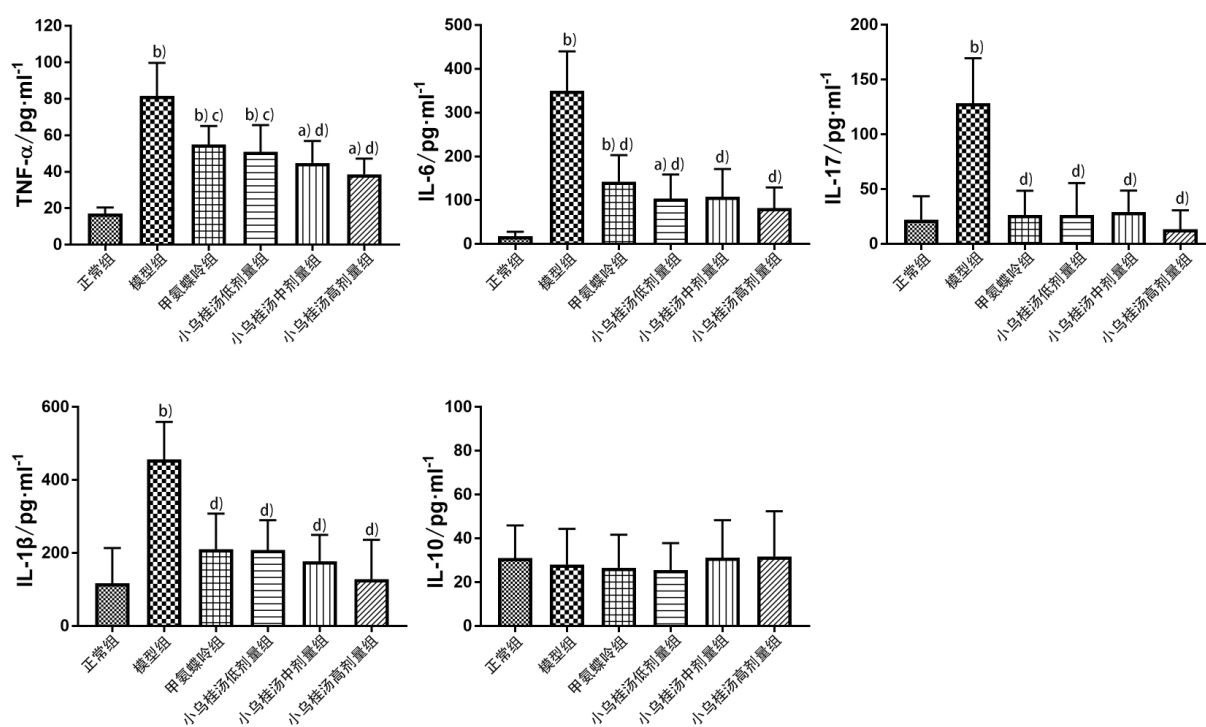
2.3 各组小鼠血浆 TNF- α 、IL-6、IL-17、IL-1 β 、IL-10 水平比较

图 1 示, 与正常组比较, 模型组小鼠血浆

TNF- α 、IL-6、IL-17、IL-1 β 水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 甲氨蝶呤组及小乌桂汤各剂量组血浆 TNF- α 、IL-6、IL-17、IL-1 β 均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 甲氨蝶呤组及小乌桂汤各剂量组间各指标比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组血浆 IL-10 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 各组小鼠踝关节组织病理学评分比较

图 2 示, 正常组小鼠踝关节滑膜细胞排列规则, 未见炎性细胞浸润及骨侵蚀。模型组小鼠关节滑膜细胞大量增殖, 层次增多, 排列紊乱, 大量炎性细胞浸润关节腔, 广泛血管翳附着, 可见软骨和骨的侵蚀破坏, 骨量严重流失。甲氨蝶呤组小鼠踝关节滑膜细胞少量增殖, 层次增多, 排列紊乱, 少



注: TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; IL-6, 白细胞介素 6; IL-17, 白细胞介素 17; IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; IL-10, 白细胞介素 10。

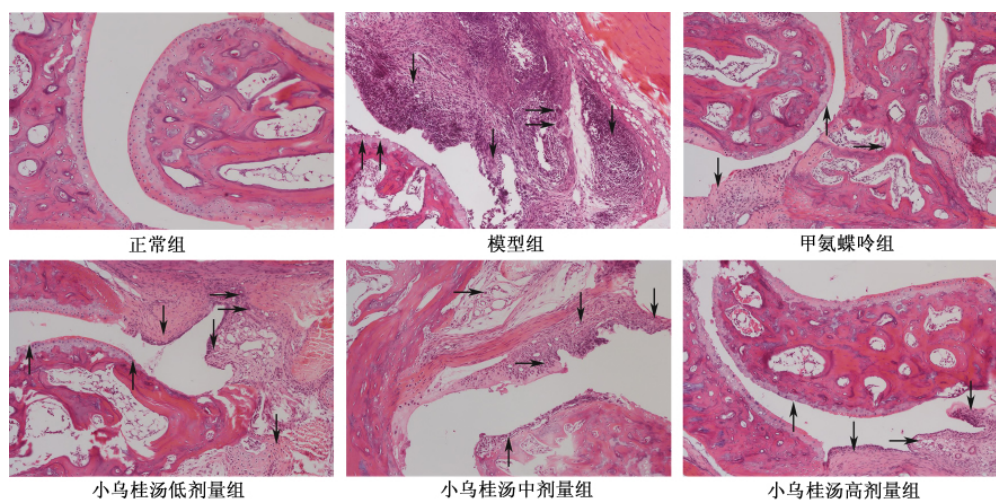
a) 与正常组比较, $P < 0.05$; b) 与正常组比较, $P < 0.01$; c) 与模型组比较, $P < 0.05$; d) 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

图 1 各组小鼠血浆 TNF- α 、IL-6、IL-17、IL-1 β 、IL-10 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

量炎性细胞浸润关节腔及血管翳形成, 少量软骨侵蚀破坏。小乌桂汤低、中、高剂量干预后均可改善 CIA 小鼠的关节病理损伤, 主要表现为减少了滑膜细胞增生、炎性细胞浸润及血管翳形成, 随着小乌桂汤剂量增大, 滑膜细胞增生、炎症细胞浸润、血管翳形成呈梯度减少, 软骨及骨侵蚀破坏程度降低。

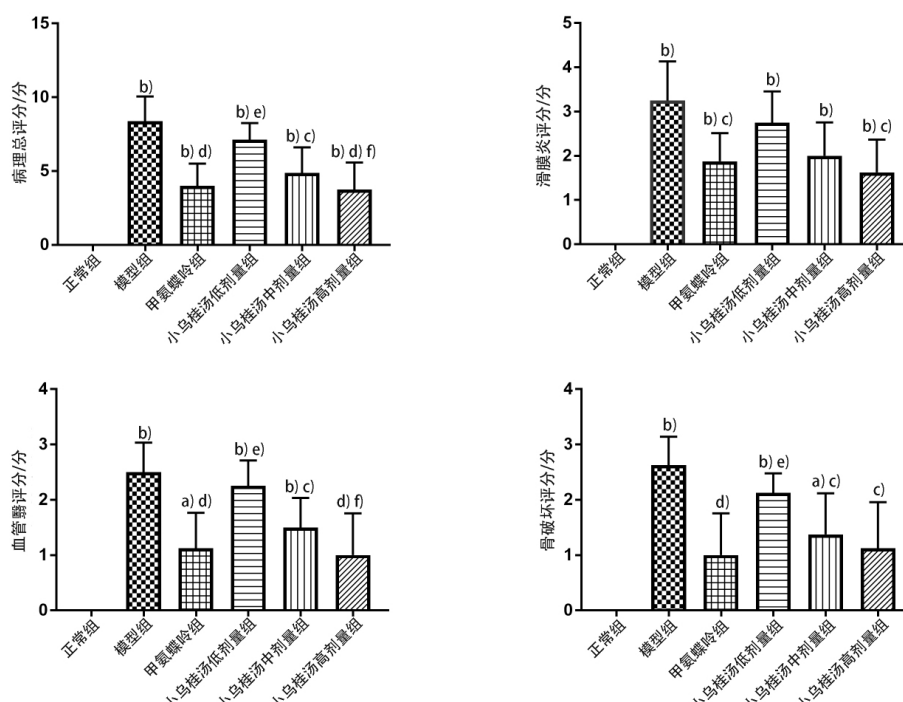
图 3 示, 与正常组比较, 模型组小鼠的关节病理总评分、滑膜炎、血管翳及骨破坏评分均升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 甲氨蝶呤组及小乌桂汤中、高剂量组各指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

评分, 甲氨蝶呤组及小乌桂汤高剂量组滑膜炎评分均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与甲氨蝶呤组比较, 小乌桂汤低剂量组关节病理总评分、血管翳及骨破坏评分显著升高 ($P < 0.05$), 小乌桂汤中、高剂量组各指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与小乌桂汤低剂量组比较, 小乌桂汤中剂量组各指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 小乌桂汤高剂量组病理总评分、血管翳评分显著降低 ($P < 0.05$)。小乌桂汤中、高剂量组各指标比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注: 图中箭头所指为增生滑膜, 血管翳形成, 软骨及骨侵蚀破坏。

图 2 各组小鼠踝关节组织 HE 染色病理图 ($\times 200$)



注: a) 与正常组比较, $P < 0.05$; b) 与正常组比较, $P < 0.01$; c) 与模型组比较, $P < 0.05$; d) 与模型组比较, $P < 0.01$; e) 与甲氨蝶呤组比较, $P < 0.05$; f) 与小乌桂汤低剂量组比较, $P < 0.05$ 。

图 3 各组小鼠踝关节组织病理学评分比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

3 讨论

RA 属中医学“痹证”范畴,多由风、寒、湿等邪气侵袭人体,闭阻经络,留滞关节,气血运行不畅所致,当以祛风散寒除湿、益气活血通络为治法。小乌桂汤方中应用辛温散寒祛风之麻黄、桂枝、川乌、黑顺片、干姜、防风以达疏风散寒除湿之功;应用活血之川芎、当归、牡丹皮以通血瘀;以补气养血之黄芪、党参、白芍、当归补气血亏虚,扶助正气;以寒凉之品知母、生石膏防麻黄、桂枝、干姜等辛散过度耗伤正气,全方共奏疏风通络、散寒除湿、益气养血之功,主治风寒湿痹证。临床研究^[6]发现,小乌桂汤对寒湿痹阻型 RA 患者有明确疗效,能明显改善关节畏冷、肢体沉重等临床症状。实验研究^[7]证实,小乌桂汤具有抗炎、调节免疫的作用。甲氨蝶呤是目前治疗 RA 的一线用药,因此本研究选用甲氨蝶呤片作为阳性对照药物。

本研究结果显示,模型组小鼠关节炎指数评分及踝关节切片 HE 染色病理总评分、滑膜炎评分、血管翳评分、骨破坏评分均显著升高。小乌桂汤中、高剂量组关节炎指数评分、发病足厚度、关节病理总评分、血管翳及骨破坏评分均显著降低,小乌桂汤高剂量组滑膜炎评分亦显著降低,疗效与甲氨蝶呤组相当。小乌桂汤能减轻 CIA 小鼠关节红肿,抑制关节滑膜细胞增生、血管翳形成、骨破坏的进展,提示小乌桂汤具有抗炎作用。

RA 的发展与细胞免疫紊乱、异常活化和细胞亚群失衡密切相关,尤其是 CD4⁺ T 细胞亚群^[18-19]。CD4⁺ T 细胞受到抗原的刺激活化后能进一步分化为各种功能性细胞亚群,通过细胞及分泌的细胞因子的相互作用,在关节局部诱导炎症细胞聚集浸润并释放炎症因子,从而导致关节滑膜损伤^[20]。Th17 细胞是 CD4⁺ T 细胞亚群之一,其分泌 IL-17、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等炎症因子,促进破骨细胞的生成,从而导致骨破坏,是 RA 发病的关键因素之一^[21]。既往研究^[22]发现,在 RA 患者外周血中以及模型鼠的滑膜及外周血中均检测到 Th17 细胞的增加。总之, Th17 细胞的活化增殖是 RA 发病不容忽视的因素之一。Treg 细胞也是 CD4⁺ T 细胞亚群之一,其主要通过释放抗炎细胞因子或者细胞接触的方式抑制炎症细胞因子的产生,具有强大的抗炎功能^[23]。实验研究^[24]证实,与正常小鼠相比, CIA 小鼠 Treg 细胞比例显著降

低,过继转移 Treg 细胞能够有效抑制 CIA 小鼠的关节炎。由此表明, Treg 细胞的减少或者功能受损可能是导致 RA 发生的重要机制之一。本研究证实, CIA 小鼠脾脏中存在 Th17/Treg 免疫失衡,促进 CIA 小鼠关节炎症反应;小乌桂汤灌胃后,脾脏中 Th17 细胞水平显著降低, Treg 细胞水平显著升高,且随着小乌桂汤剂量增大, Th17 细胞水平越低, Treg 细胞水平越高。结果提示小乌桂汤具有免疫调节作用,可能与改善 Th17/Treg 免疫失衡有关,且疗效呈剂量依赖性,其中高剂量与甲氨蝶呤等效。

TNF- α 可促进滑膜成纤维细胞增殖和血管翳生成,促进基质金属蛋白酶 (MMPs) 的分泌,激活核因子 κ B (NF- κ B) 信号通路介导的软骨和骨的破坏,并能抑制 Treg 细胞^[25-27]。IL-6 能够持续促进单核细胞趋化因子 1 (MCP-1) 分泌、血管增殖及 T 细胞抗凋亡功能,促进损伤部位的单核细胞积聚,为持续的慢性炎症提供基础^[28];同时 IL-6 能够通过促进信号转导子与转录激活子 3 (STAT3) 介导的类视色素孤儿受体 γ t 的上调来促进 Th17 细胞分化,同时抑制转化生长因子 β (TGF- β) 诱导 Treg 细胞分化^[29-31]。IL-6 和白细胞介素 1 (IL-1) 协同增强滑膜细胞产生 MMPs,这可能导致软骨和关节破坏^[32]。IL-17 是 Th17 分泌的主要细胞因子,可诱导 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等多种促炎细胞因子的表达^[33-34],同时上调 NF- κ B 受体活化因子配体 (RANKL) 的表达,从而促进骨破坏和骨吸收^[35]。IL-1 β 是由活化的单核细胞/巨噬细胞、滑膜成纤维细胞产生的促炎细胞因子,是促成 RA 关节炎症和骨破坏的重要因素^[36]。IL-10 通过阻断促炎性细胞因子的分泌起抑制炎症的作用^[37]。本研究证实, CIA 小鼠存在 TNF- α 、IL-6、IL-17、IL-1 β 炎症因子异常升高的情况,小乌桂汤灌胃后,小鼠血浆中 TNF- α 、IL-6、IL-17、IL-1 β 的表达水平均显著降低,提示小乌桂汤的抗炎作用可能主要与下调 TNF- α 、IL-6、IL-17、IL-1 β 炎症因子的产生和表达有关。

综上所述,小乌桂汤对 CIA 小鼠具有抗炎及免疫调节作用,其作用机制可能是通过调节脾脏 Th17/Treg 的平衡,抑制血浆 TNF- α 、IL-6、IL-17、IL-1 β 炎症因子的表达,从而减轻 CIA 小鼠关节炎症反应。

参考文献

[1] KANJANA K, CHEVAISRAKUL P, MATANGKASOMBUT

- P, et al. Regulatory T cell suppressive activity predicts disease relapse during disease-modifying anti-rheumatic drug dose reduction in rheumatoid arthritis: a prospective cohort study [J]. Front Med (Lausanne), 2020, 7: 25. doi: 10.3389/fmed.2020.00025.
- [2] 中华医学会风湿病学分会. 2018 中国类风湿关节炎诊疗指南 [J]. 中华内科杂志, 2018, 57(4): 242-251.
- [3] SMOLEN JS, ALETAHA D, MCINNES IB. Rheumatoid arthritis [J]. Lancet, 2016, 388(10055): 2023-2038.
- [4] LEE GR. The balance of Th17 versus treg cells in autoimmunity [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(3): 730. doi: 10.3390/ijms19030730.
- [5] FASCHING P, STRADNER M, GRANINGER W, et al. Therapeutic potential of targeting the Th17/Treg axis in autoimmune disorders [J]. Molecules, 2017, 22(1): 134. doi: 10.3390/molecules22010134.
- [6] FIRESTEIN GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis [J]. Nature, 2003, 423(6937): 356-361.
- [7] CAROLINA N, VIOLETA B, ANDRA B, et al. Management of rheumatoid arthritis: Impact and risks of various therapeutic approaches (Review) [J]. Exp Ther Med, 2016, 11(4): 1177-1183.
- [8] 房显辉, 杨少峰, 聂晓莉, 等. 小乌桂汤联合甲氨蝶呤治疗类风湿关节炎临床研究 [J]. 中医学报, 2016, 31(4): 603-605.
- [9] 陈湘南, 朱俊卿, 冯知涛, 等. 小乌桂颗粒剂联合 DMARDs 治疗类风湿关节炎的临床研究 [J]. 中药材, 2014, 37(4): 710-713.
- [10] BRAND DD, LATHAM KA, ROSLONIEC EF. Collagen-induced arthritis [J]. Nat Protoc, 2007, 2(5): 1269-1275.
- [11] FTHORNTON S, STRAIT RT. Head-to-head comparison of protocol modifications for the generation of collagen-induced arthritis in a specific-pathogen free facility using DBA/1 mice [J]. Bio Techniques, 2016, 60(3): 119-128.
- [12] KIM H, BANG J, CHANG HW, et al. Anti-inflammatory effect of quetiapine on collagen-induced arthritis of mouse [J]. Eur J Pharmacol, 2012, 678(1/2/3): 55-60.
- [13] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [14] LIANG B, SONG Z, WU B, et al. Evaluation of anti-IL-6 monoclonal antibody therapy using murine type II collagen-induced arthritis [J]. J Inflamm (Lond), 2009, 6: 10. doi: 10.1186/1476-9255-6-10.
- [15] 徐娟. 紫杉醇对胶原诱导性关节炎小鼠血管新生抑制作用的研究 [J]. 广州: 南方医科大学, 2017.
- [16] 陈智勇. 小乌桂颗粒剂、锍-亚甲基二膦酸盐、rhTNF:Fc 分别联合甲氨蝶呤治疗达标类风湿关节炎 52 例临床研究 [J]. 广州: 南方医科大学, 2017.
- [17] 吴婧, 朱俊卿, 李娟. 小乌桂颗粒剂含药血清对 CIA 大鼠膝关节成纤维滑膜细胞体外增殖的干预研究 [J]. 热带医学杂志, 2013, 13(7): 797-800.
- [18] VYAS SP, HANSDA AK, GOSWAMI R. Rheumatoid arthritis: 'melting pot' of T helper subsets [J]. Int Rev Immunol, 2019, 38(5): 212-231.
- [19] WANG T, LI S, YANG Y, et al. T helper 17 and T helper 1 cells are increased but regulatory T cells are decreased in subchondral bone marrow microenvironment of patients with rheumatoid arthritis [J]. Am J Transl Res, 2016, 8(7): 2956-2968.
- [20] ODOBASIC D, JIA Y, KAO W, et al. Formyl peptide receptor activation inhibits the expansion of effector T cells and synovial fibroblasts and attenuates joint injury in models of rheumatoid arthritis [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 61: 140-149. doi: 10.1016/j.intimp.2018.05.028.
- [21] FIRESTEIN GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis [J]. Nature, 2003, 423(6937): 356-361.
- [22] TOH M, MIOSEC P. The role of T cells in rheumatoid arthritis: new subsets and new targets [J]. Curr Opin Rheumatol, 2007, 19(3): 284-288.
- [23] SAKAGUCHI S, ONO M, SETOGUCHI R, et al. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease [J]. Immunol Rev, 2006, 212(1): 8-27.
- [24] FOX DA. Citrullination: a specific target for the autoimmune response in rheumatoid arthritis [J]. J Immunol, 2015, 195(1): 5-7.
- [25] FELDMANN M, BRENNAN FM, MAINI RN. Rheumatoid arthritis [J]. Cell, 1996, 85(3): 307-310.
- [26] HESS A, AXMANN R, RECH J, et al. Blockade of TNF- α rapidly inhibits pain responses in the central nervous system [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(9): 3731-3736.
- [27] YARILINA A, XU K, CHAN C. Regulation of inflammatory responses in tumor necrosis factor-activated and rheumatoid arthritis synovial macrophages by JAK inhibitors [J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(12): 3856-3866.
- [28] ATREYA R, MUDTER J, FINOTTO S, et al. Blockade of interleukin-6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in Crohn's disease and experimental colitis in vivo [J]. Nat Med, 2000, 6(5): 583-588.
- [29] YOSHIDA Y, TANAKA T. Interleukin 6 and rheumatoid arthritis [J]. Biomed Res Int, 2014; 698313. doi: 10.1155/2014/698313.
- [30] KORN T, BETTELLI E, OUKKA M, et al. IL-17 and Th17 cells [J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27(1): 485-

- 517.
- [1] KIMURA A, KISHIMOTO T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance [J]. Eur J Immunol, 2010, 40(7): 1830 – 1835.
- [2] SUZUKI M, HASHIZUME M, YOSHIDA H, et al. IL-6 and IL-1 synergistically enhanced the production of MMPs from synovial cells by up-regulating IL-6 production and IL-1 receptor I expression [J]. Cytokine, 2010, 2(51): 178 – 183.
- [3] STEINMAN L. A brief history of T(H) 17, the first major revision in the T(H) 1/T(H) 2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage [J]. Nat Med, 2007, 13(2): 139 – 145.
- [4] LUNDY SK, SARKAR S, TESMER LA, et al. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes [J]. Arthritis Res Ther, 2007, 9 (1): 202. doi: 10. 1186/ar2107.
- [5] SATO K, SUEMATSU A, OKAMOTO K, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction [J]. J Exp Med, 2006, 203(12): 2673 – 2682.
- [6] GUO JT, CAO XQ, WU LL, et al. Effect of IL-1 β on apoptosis of synovial cells in rheumatoid arthritis rats via the NF- κ B pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(23): 10211 – 10217.
- [7] MCDONALD S, REED R, BARICEVIC-JONES I. Can serum interleukin-17 and interleukin-10 levels predict response to biologic treatments in patients with rheumatoid arthritis? [J]. Rheumatology (Oxford), 2019, 58(10): 1872 – 1873.

Effects of Xiaowugui Decoction (小乌桂汤) on Th17/Treg Balance in the Spleen and Inflammatory Factors in Plasma of Collagen-induced Arthritis Model Mice

SHAN Wenjun¹, LI Changzheng², QI Jieying¹, XIE Lifan¹, ZHANG Qiaoying¹, NIE Xiaoli¹

1. Traditional Chinese Medicine-Integrated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, 510315; 2. School of Chinese Medicine, Southern Medical University

ABSTRACT Objective To explore the mechanism of *Xiaowugui Decoction* (XWGD, 小乌桂汤) for the treatment of rheumatoid arthritis. **Methods** Sixty male DBA/1 mice were randomly divided into normal group ($n = 8$) and model group ($n = 52$). To establish mice model of collagen-induced arthritis (CIA), chicken type II collagen emulsion was intracutaneously injected into the tail root and back of the mice at 3 points. Forty successful CIA model mice were randomly divided into model group, methotrexate group, XWGD low, medium, and high-dose groups, with 8 mice per group. The mice in methotrexate group were given 0.1 mg/ml methotrexate once a week, and the mice in XWGD low, medium and high-dose groups were respectively given 19.5, 39, 75 g/ (kg · d) XWGD once a day. The mice in the normal group and model group were administered with 0.2 ml/10 g normal saline once a day. All the interventions were given by gavage for 4 weeks. The arthritis index score, thickness of the diseased paws and the histopathology of the ankle joint were evaluated. The ratio of helper T cell 17 (Th17) and regulatory T cell (Treg) in spleens, and the expression levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-17 (IL-17), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-10 (IL-10) in plasma were detected. **Results** Compared to model group, the methotrexate group and XWGD medium and high-dose groups significantly decreased the arthritis index score, the thickness of the diseased paws, the ratio of Th17, the expression levels of plasma TNF- α , IL-6, IL-17, and IL-1 β , the total ankle joint pathology score, and the pannus-bone destruction score, as well as increased the ratio of Treg; the methotrexate group and XWGD high-dose group significantly decreased the ratio of Th17/Treg and the synovitis score ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to methotrexate group, XWGD low-dose group had significantly higher Th17 and Th17/Treg in spleen as well as higher total ankle joint pathology score and pannus-bone destruction score; the XWGD low and medium-dose groups had significantly lower ratio of Treg ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to XWGD low-dose group, the Th17 and Th17/Treg ratio in the medium and high groups significantly reduced, Treg level increased; the total ankle joint pathology score and the pannus-bone destruction score in the high-dose group also significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The level of Treg in XWGD high-dose group was significantly higher than that of medium-dose group ($P < 0.01$). **Conclusion** XWGD has anti-inflammatory and immune regulation effects on CIA model mice, and the high-dose works best. It may reduce the joint inflammation by regulating the balance of Th17/Treg and inhibiting the expression of TNF- α , IL-6, IL-17, and IL-1 β .

Keywords collagen-induced arthritis, *Xiaowugui Decoction* (小乌桂汤); helper T cell 17; regulatory T cell; inflammatory factors

(收稿日期: 2020 - 07 - 07; 修回日期: 2020 - 12 - 07)

编辑: 王利芬