

蠲痹颗粒醇提物抑制Th17细胞表达治疗类风湿关节炎作用机制研究

吴招, 邹楠婷, 顾茜兰, 杨海浩, 应赛, 李小丝, 祁燕, 彭江云, 万春平

云南中医药大学, 云南 昆明 650500

[摘要] 目的: 研究蠲痹颗粒醇提物抑制致病性Th17细胞表达治疗类风湿关节炎(RA)的作用机理, 阐述扶阳学派及吴生元教授运用扶阳理论治疗RA的分子机制。方法: 构建牛Ⅱ型胶原诱导的DBA/1小鼠关节炎(CIA)模型, 模型小鼠按随机数字表法分为CIA模型组(Model组)和蠲痹颗粒醇提物干预组(JBKL组)各10只。苏木精-伊红(HE)染色检测CIA小鼠关节炎病理损伤程度; 流式细胞术检测Th17、Treg细胞表达水平; 荧光定量PCR法检测Th17细胞相关基因的表达。结果: 与Model组比较, JBKL组小鼠关节组织学评分降低($P<0.05$)。与Model组比较, JBKL组Foxp3⁺CD4⁺T(调节性T细胞)表达水平上调($P<0.05$)。与Model组比较, JBKL组小鼠脾淋巴细胞IL-17⁺CD4⁺比例降低($P<0.05$), Treg/Th17比值增加($P<0.05$)。JBKL组小鼠脾淋巴细胞IL-17A、IL-23p19、IL-21、IFN- γ 的mRNA表达水平低于Model组, Th17特异转录因子ROR γ t的转录水平低于Model组($P<0.05$)。结论: 蠲痹颗粒醇提物可能抑制Th17细胞相关基因表达来抑制Th17细胞分化, 上调具有负调控作用的Treg细胞表达, 从而介导对RA的治疗作用。该研究为温阳散寒除湿法治疗寒湿痹阻型RA提供科学基础, 丰富和发展了中医治疗痹证理论的科学内涵。

[关键词] 类风湿关节炎; 温阳散寒除湿法; 蠲痹颗粒醇提物; Th17细胞; Treg细胞; ROR γ t

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2023) 09-0007-05

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2023.09.002

Study on Mechanism of Alcohol Extract of Juanbi Granules in Inhibiting Th17 Cell Expression in the Treatment of Rheumatoid Arthritis

WU Zhao, ZOU Nanting, GU Qianlan, YANG Haihao, YING Sai,
LI Xiaosi, QI Yan, PENG Jiangyun, WAN Chunping

Abstract: **Objective:** To study the mechanism of alcohol extract of Juanbi Granules in inhibiting pathogenic Th17 cell expression to treat rheumatoid arthritis (RA), and expound the molecular mechanism of yang-reinforcing theory in treating RA by Yang-Reinforcing School's Prof. WU Shengyuan. **Methods:** The models of DBA/1 mice with type II collagen-induced arthritis (CIA) were established, and the model mice were divided into the CIA model group (Model group) and the alcohol extract of Juanbi Granules intervention group (JBKL group), with 10 mice in each group. The pathological injury of arthritis in CIA mice was detected by hematoxylin-eosin (HE) staining; the expression levels of Th17 cell and Treg cell were detected by flow cytometry; the expressions of genes related to Th17 cell were detected by quantitative real-time PCR. **Results:** Comparing with those in the Model group, the scores of joint histology in the JBKL group were decreased ($P<0.05$). Comparing with that in the Model group, the Foxp3⁺CD4⁺T (Treg cell) expression level was up-regulated ($P<0.05$). Comparing with those in the Model group, the IL-17⁺CD4⁺ proportion in lymphocytes of the spleen in the JBKL group was decreased ($P<0.05$), and the Treg/

[收稿日期] 2022-08-25

[修回日期] 2023-02-17

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81360543); 云南省卫生科技计划项目(2017NS166, 2016NS2177)

[作者简介] 吴招(1995-), 男, 在读硕士研究生, E-mail: wuzhao1005@163.com。

[通信作者] 万春平(1981-), 男, 副研究员, E-mail: wanchunping1012@163.com。

Th17 ratio was increased ($P < 0.05$). The mRNA expression levels of IL-17A, IL-23p19, IL-21 and IFN- γ in the JBKL group were lower than those in the Model group, and the transcriptional level of Th17 specific transcription factor ROR γ t was lower than that in the Model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The alcohol extract of Juanbi Granules may inhibit Th17 cell differentiation by inhibiting the expressions of genes related to Th17 cell and up-regulate the Treg cell expression with negative regulation effect, which thus mediates the curative effect of Juanbi Granules on RA. This study provides scientific basis for treating RA with cold-damp obstruction syndrome by the method of warming yang, dissipating cold and eliminating dampness, and enriches and develops the scientific connotations of theory of traditional Chinese medicine for the treatment of impediment syndrome.

Keywords: Rheumatoid arthritis; Method of warming yang, dissipating cold and eliminating dampness; Alcohol extract of Juanbi Granules; Th17 cell; Treg cell; ROR γ t

类风湿关节炎(RA)是临床常见的慢性、全身性、自身免疫性疾病,病理表现为关节部位产生软骨侵蚀、淋巴细胞浸润、滑膜组织增生等而导致软骨和骨的破坏,引起关节畸形^[1]。目前治疗 RA 的现代医学药物主要有抗风湿药、非甾体类抗炎药、糖皮质激素、免疫抑制剂等,也采用基因治疗和免疫治疗^[2]。温阳散寒除湿方(蠲痹颗粒)是云南省名老中医吴生元教授根据扶阳理论,针对 RA 的临床治疗总结出的效验方,主要由川芎、附子、五加皮、桂枝等组成,具有祛风除湿、温经散寒、通络止痛的作用,主要治疗寒湿痹阻型 RA。前期临床研究证实,蠲痹颗粒(JBKL)能改善寒湿痹阻型 RA 患者临床症状,降低红细胞沉降率(ESR)、C-反应蛋白(CRP)、类风湿因子(RF)等指标,具有良好的临床疗效;此外,前期实验研究结果亦表明,蠲痹颗粒具有较好的镇痛作用和抗炎作用^[3-4]。

Th17 细胞是一类与白细胞介素-23(IL-23)密切相关的 Th 细胞亚群,其主要分泌 IL-21, IL-17F, IL-17A 等。Th17 细胞主要介导机体自身免疫性反应、炎症反应等的发生与发展,具有高致病性^[5]。前期研究结果显示,RA 患者体内的 Th17 阳性细胞数量增加,与 RA 的发展密切相关^[6-7]。因此,本研究以 Th17 细胞分化为切入点,研究蠲痹颗粒醇提物通过调控 Th17 细胞而介导治疗 RA 的作用机制,揭示蠲痹颗粒醇提物治疗寒湿痹阻型 RA 的内在规律及临床应用的现代生物学特征。

1 材料与方法

1.1 动物 7~8 周龄 SPF 级雄性 DBA/1 小鼠,体质量(20.00 ± 2.00)g,购买于斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2019-0010]。动物饲养于 SPF 级动物房,饲料和水消毒后由动物自由摄取,环境温度(20 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(50 ± 5)%,12 h 昼夜循环,适应性饲养 7 d。所有实验过程均遵循实验动物有关条例进行。

1.2 蠲痹颗粒浸膏醇提物的制备 称取 289.4 g 蠲痹颗粒,加水溶解混匀后加入乙醇,使含醇量达到 80%,静置过滤,减压回收乙醇,得浸膏。将浸膏放入真空干燥箱干燥 2 d 后,获固体浸膏,得蠲痹颗粒浸膏醇提物 3.658 g。蠲痹颗粒醇提物保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.3 试剂及主要仪器 牛 II 型胶原、弗氏完全佐剂(CFA)(Sigma 公司);APC-小鼠 IL-17A 抗体(TC11-18H10)、FITC-小鼠 IFN- γ 抗体(XMG1.2)、PE-Cy7 小鼠 CD4 抗体(RM4.5)、PE-小鼠 Foxp3(MF23)抗体(BD PharMingen 公司);RPMI-1640 培养基(GibcoBRL 公司);其他试剂均为分析纯。流式细胞仪(美国 BD Biosciences)、离心机(德国 Thermo Scientific Heraeus)、石蜡切片机(德国莱卡仪器有限公司)、二氧化碳培养箱(美国 Thermo-fisher);组织包埋机、烘片机、正置显微镜、全自动组织脱水机(德国莱卡仪器有限公司)。

1.4 关节炎模型的建立、分组及给药 参照文献[8]

构建 DBA/1 小鼠关节炎(CIA)模型,具体方法为:牛Ⅱ型胶原加入醋酸,使牛Ⅱ型胶原与等体积的弗氏完全佐剂(CFA)充分乳化,DBA/1 小鼠麻醉后,对其尾根部致敏。1 周后以相同剂量进行第 2 次免疫攻击,进行第 2 次免疫攻击时,肉眼观察小鼠四肢关节炎严重程度,并进行评分,评分等级和标准为:1 级为正常、2 级为出现趾关节发红或红肿、3 级为踝关节以下中度红肿、4 级为包括膝关节在内的严重红肿、包括膝关节在内的完全红肿,关节变形、残废^[9]。评分大于或等于 2 级时说明小鼠造模成功。模型小鼠分为 CIA 模型组(Model 组)和薏苡仁颗粒醇提取物干预组(JBKL 组),每组 10 只。JBKL 组灌胃给予薏苡仁颗粒醇提取物 21 mg/kg(相当于生药 1.66 g/kg),Model 组给予相同剂量的 0.9%氯化钠溶液作为对照。给药剂量按照实验动物与人用药量的换算公式计算得出。每天给药 1 次。

1.5 细胞制备 免疫 20 d 后,处死小鼠,消毒后取出脾脏和淋巴结。用载玻片磨碎脾脏和淋巴结,培养基冲洗过膜,离心后弃去上清,弹匀,加入红细胞裂解液,混匀,静置后加入培养基,离心后弃去上清。再加入培养基,过膜,离心。培养基洗 2 次后,加入含血清的 RPMI-1640,进行细胞计数,并将细胞调至所需浓度。

1.6 组织病理学检测 小鼠处死后,取其后肢,福尔马林固定,脱钙后进行石蜡包埋,切片(5 μ m 厚度),苏木精-伊红(HE)染色后显微镜下观察,按照关节组织学评分标准进行评定。见表 1。

1.7 流式细胞术检测 胞内细胞因子染色:调至所需浓度的小鼠脾淋巴细胞与刺激剂于 CO₂培养箱中共培养 4 h,收集培养后的细胞,洗液清洗 2 次,加入相应抗体并进行表面染色。染色结束后,进行固定和穿膜,加入荧光标记的抗 IL-17 抗体,流式细胞仪检测分析。对于 Treg 胞内荧光染色,按胞内染色方法染色,无需加入刺激剂,流式细胞仪收集细胞并进行分析。

1.8 荧光定量 PCR 检测 Th17 细胞相关基因的表达 抽提小鼠脾淋巴细胞,提取总 RNA 后,操作合成 cDNA。然后应用 SYBR GreenI 嵌合荧光法在实时定量 PCR 仪进行 Th17 细胞相关基因(IL-17A、IL-17F、IL-21、IL-23p19、IFN- γ 和 ROR γ t)表达检测。PCR 反应程序结束后,设置 β -actin 为内参基因,计算出 2 组基因表达差异倍数及标准差,即 $2^{-\Delta\Delta C_t} \pm$ 标准差

值。目的基因特异性引物序列见表 2。

表 1 关节组织学评分标准		分
严重程度	病理表现	评分
出现滑膜炎	血管翳面伴随少量软骨侵蚀	1
中度改变	出现大面积软骨缺失、侵蚀的血管翳面以及伴随着单个核细胞和多形核细胞浸润的滑膜增生	2
严重的滑膜炎	关节和骨侵蚀	3
极严重	关节结构被完全破坏	4

表 2 目的基因特异性引物序列	
基因名称	引物序列 (5'-3')
Mouse β -actin	Forward: 5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3'
	Reverse: 5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'
Mouse IL-17A	Forward: 5'-TTTAACCTCCCTTGGCGCAAAA-3'
	Reverse: 5'-CTTTCCCTCCGCATTGACAC-3'
Mouse IL-17F	Forward: 5'-CTGTTGATGTTGGGACTTGCC-3'
	Reverse: 5'-TCACAGTGTATCCTCCAGG-3'
Mouse IL-21	Forward: 5'-TCATCATTTGACCTCGTGGCCC-3'
	Reverse: 5'-ATCGTACTTCTCCACTTGCAATCC-3'
Mouse IL-23p19	Forward: 5'-ATGCTGGATTGCAGACAGTA-3'
	Reverse: 5'-ACGGGGCACATTATTTTATGCT-3'
Mouse IFN- γ	Forward: 5'-ATGAACGCTACACACTGCATC-3'
	Reverse: 5'-CCATCCTTTTGCCAGTTCCTC-3'
Mouse ROR γ t	Forward: 5'-TGTCTGGGCTACCTACTGA-3'
	Reverse: 5'-CACATTACACTGCTGGCTGC-3'

1.9 统计学方法 运用 GraphPad Prism、SPSS20.0 软件进行数据分析,符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验,组内比较采用配对 t 检验;计数资料以百分比(%)表示,采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

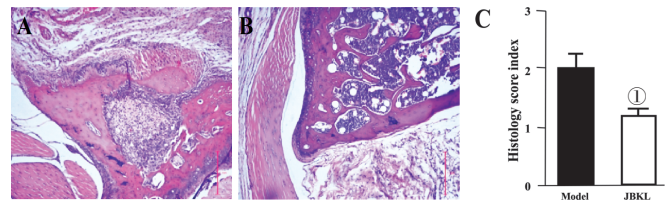
2 结果

2.1 薏苡仁颗粒醇提取物对 CIA 模型小鼠关节炎组织病理的影响 见图 1。在 CIA 模型组小鼠中观察到明显的关节炎病理表现:产生滑膜组织增生、淋巴细胞浸润、软骨和骨的侵蚀等,见图 1A;而与 Model 组比较,JBKL 组小鼠关节滑膜炎和关节损伤明显减轻,见图 1B。与 Model 组比较,JBKL 组关节组织学评分降低($P < 0.05$),见图 1C。

2.2 薏苡仁颗粒醇提取物对 CIA 模型小鼠调节性 T 细胞的影响 见图 2。与 Model 组比较,JBKL 组 Foxp3⁺CD4⁺ T(调节性 T 细胞)表达水平上调($P < 0.05$)。

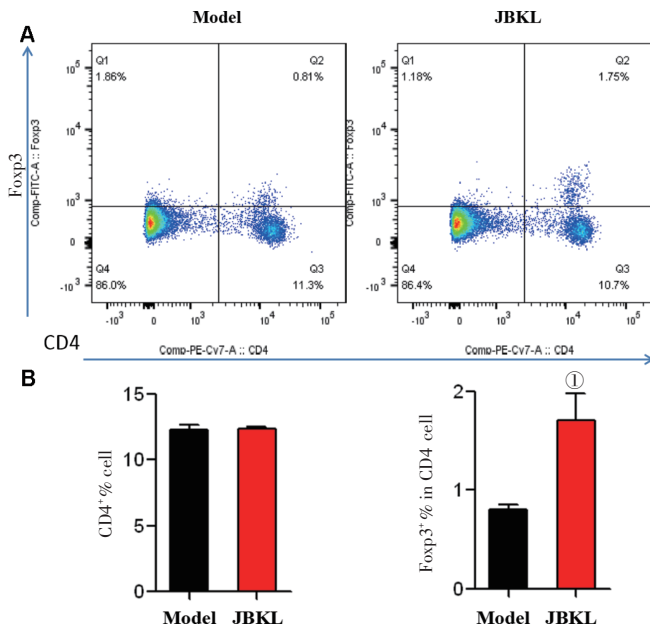
2.3 蠲痹颗粒醇提物对 CIA 模型小鼠脾淋巴细胞 Th17 表达的影响 见图 3。与 Model 组比较,JBKL 组小鼠脾淋巴细胞 IL-17⁺CD4⁺ 比例降低 ($P < 0.05$), Treg/Th17 比值增加 ($P < 0.05$)。

2.4 蠲痹颗粒醇提物对 CIA 模型小鼠 Th17 相关基因表达的影响 见图 4。JBKL 组小鼠脾淋巴细胞 IL-17A、IL-23p19、IL-21、IFN- γ 的 mRNA 的表达水平低于 Model 组, Th17 特异转录因子 ROR γ t 的转录水平低于 Model 组 ($P < 0.05$)。



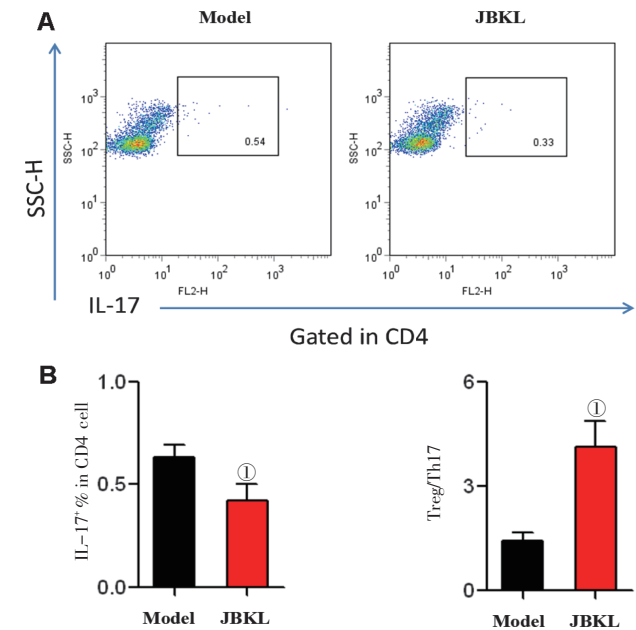
注: 图 1A、图 1B 分别为 Model 组、JBKL 组小鼠组织病理 HE 染色, 图 1C 为组织学评分。①与 model 组比较, $P < 0.05$

图 1 蠲痹颗粒醇提物对 CIA 模型小鼠关节炎组织病理的影响



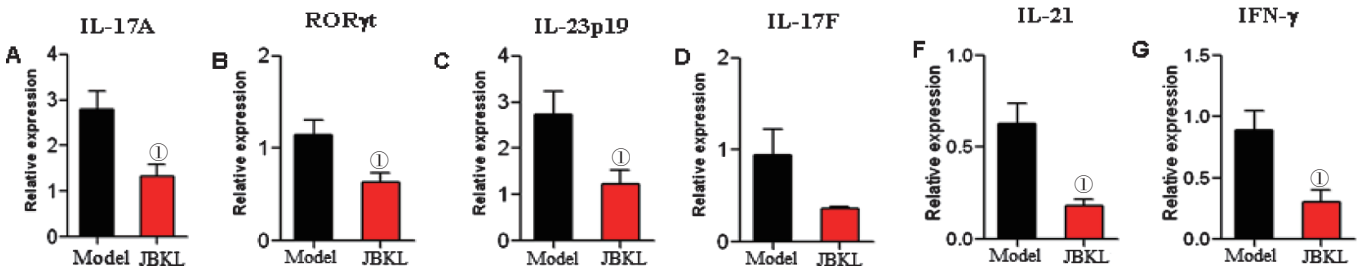
注: ①与 model 组比较, $P < 0.05$

图 2 蠲痹颗粒醇提物对 CIA 模型小鼠调节性 T 细胞的影响



注: ①与 model 组比较, $P < 0.05$

图 3 蠲痹颗粒醇提物对 CIA 模型小鼠脾淋巴细胞 Th17 表达的影响



注: ①与 model 组比较, $P < 0.05$

图 4 蠲痹颗粒醇提物对 CIA 模型小鼠 Th17 细胞相关基因表达的影响

3 讨论

RA 是主要以关节破坏性、关节侵蚀性及关节滑膜炎为病变特征的全身性自身免疫性疾病, 临床表现为侵蚀性、对称性多关节炎性病变。伴随着疾病

的发展, 不仅影响患者的心脏、肾脏、肺部等器官, 且对患者造成心理压力和经济负担^[10]。疾病的发生主要与机体内 T 细胞反应有关^[11-12]。T 淋巴细胞主要分化为以 Treg、Th17 为代表的两个细胞亚群。最

新研究表明, Treg、Th17 细胞的功能和分化过程具有相同之处, 两者却又相互对抗。Treg 细胞主要分泌抑炎细胞因子, 对于 RA 的发病起免疫抑制作用; Th17 细胞主要分泌促炎细胞因子, 对于 RA 的发病起促炎作用。Treg 细胞/Th17 细胞比例之间的平衡与失调影响着 RA 病情的转移和发展^[13-15]。本实验结果显示, 薏苡颗粒醇提物能够改善 CIA 模型小鼠关节炎病理表现。流式细胞术检测结果表明, 薏苡颗粒醇提物干预后能下调 Th17 细胞表达, 上调 Treg 细胞表达水平, 即维持着 Treg 细胞/Th17 细胞之间的平衡, 下调促炎细胞因子白细胞介素 IL-17A 表达, 与前期研究结果一致^[16]。

在 Th17 的产生和分化过程中转录因子 ROR γ t 起重要调控作用^[17-18]。基于此, 本研究进一步应用实时荧光定量 PCR 深入研究薏苡颗粒醇提物调控 Th17 细胞分化的分子机制。实时荧光定量 PCR 结果显示, 薏苡颗粒醇提物药物干预后显著下调 Th17 相关基因 IL-17A、IL-23p19、IL-21、IFN- γ 及转录因子 ROR γ t mRNA 表达水平。综合上述研究结果推测, 薏苡颗粒醇提物可能通过干预 Th17 分化所需的关键细胞因子及转录因子的表达, 阻止了 CD4⁺T 细胞向高致病性 Th17 细胞分化, 维持 Treg 细胞/Th17 细胞比例之间平衡, 从而介导对 RA 的治疗作用。

本研究不仅为扶阳学派吴生元教授运用扶阳理论治疗 RA 提供一定的临床科学基础, 同时也发展并丰富了中医治疗痹证理论的科学内涵。

[参考文献]

- [1] 张晓攀, 李艳贞, 李珊珊, 等. 类风湿性关节炎治疗药物研究进展[J]. 药物评价研究, 2018, 41(10): 1906-1910.
- [2] NARVÁEZ J. Treatment of rheumatoid arthritis[J]. Med Clin (Barc), 2016, 147(4): 176-180.
- [3] 彭江云, 李兆福, 刘维超, 等. 薏苡颗粒治疗类风湿关节炎 40 例临床疗效观察[J]. 云南中医中药杂志, 2009, 30(12): 12-14.
- [4] 彭江云, 李兆福, 杨洲, 等. 薏苡颗粒抗炎镇痛作用的实验研究

[C]/国家中医药管理局, 国务院台湾事务办公室. 海峡两岸中医药发展大会风湿论文集, 2009.

- [5] KIKLY K, LIU L, NA S, et al. The IL-23/Th17 axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation[J]. Current Opinion in Immunology, 2006, 18(6): 670-675.
- [6] YE L, JIANG B, DENG J, et al. IL-37 alleviates rheumatoid arthritis by suppressing IL-17 and IL-17-triggering cytokine production and limiting Th17 cell proliferation[J]. J Immunol, 2015, 194(11): 5110-5119.
- [7] 万春平, 彭江云, 李兆福, 等. 薏苡颗粒对胶原诱导性小鼠关节炎的抑制作用及机制研究[J]. 中药材, 2013, 36(8): 1505-1507.
- [8] PIETROSIMONE K M, JIN M, POSTON B, et al. Collagen-Induced Arthritis: A model for Murine Autoimmune Arthritis[J]. Bio Protoc, 2015, 5(20): e1626.
- [9] JOU I M, SHIAU A L, CHEN S Y, et al. Thrombospondin 1 as an effective gene therapeutic strategy in collagen-induced arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2005, 52(1): 339-344.
- [10] DERKSEN V F A M, HUIZINGA T W J, VAN DER WOUDE D. The role of autoantibodies in the pathophysiology of rheumatoid arthritis[J]. Semin Immunopathol, 2017, 39(4): 437-446.
- [11] 潘立文. 中西医结合治疗类风湿关节炎特点探析[J]. 辽宁中医药大学报, 2018, 20(1): 173-177.
- [12] 曹顺金. 中医药治疗类风湿性关节炎概况[J]. 湖南中医杂志, 2017, 33(7): 202-204.
- [13] LITTMAN D R, RUDENSKY A Y. Th17 and Regulatory T Cells in Mediating and Restraining Inflammation[J]. Cell, 2010, 140(6): 845-858.
- [14] BETTELLI E, CARRIER Y, GAO W. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells[J]. Nature, 2006, 441(7090): 235-238.
- [15] 徐雪, 吕玲. Th17 与 Treg 在系统性红斑狼疮发病机制中的作用[J]. 现代免疫学, 2010, 30(3): 257-261.
- [16] 刘维超, 李玲玉, 万春平, 等. 薏苡颗粒对胶原诱导性关节炎小鼠 Th17/Treg 细胞平衡调控作用的研究[J]. 风湿病与关节炎, 2014, 3(4): 31-33, 38.
- [17] FRANCESCO A, LORENZO C, FRANCESCO L. Type 17 T helper cells—origins, features and possible roles in rheumatic disease[J]. Nat Rev Rheumatol, 2009, 5(6): 325-331.
- [18] ZHOU L, LOPES J E, CHONG M M W, et al. TGF- β induced Foxp3 inhibits Th17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function[J]. Nature, 2008, 453(7192): 236-240.

(责任编辑: 郑锋玲)