

栀子苷对类风湿性关节炎大鼠 Th17/Treg 平衡和局部炎症因子的影响

俞云¹, 时乐¹, 喻斌¹, 卞勇^{2*}

(1.南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023; 2.南京中医药大学科学技术与产业处, 江苏 南京 210023)

摘要:目的 考察栀子苷对类风湿性关节炎大鼠 Th17/Treg 平衡和局部炎症因子的影响。方法 建立大鼠胶原诱导关节炎模型, 通过病理切片观察踝关节组织变化, ELISA 检测血清 TNF- α , Western blot 法检测转录因子 Foxp3 和 ROR- γ t 的蛋白表达, 免疫组化法检测关节滑膜组织 IL-10、IL-17 表达。结果 模型组血清 TNF- α 、IL-17 以及 ROR- γ t 和关节滑膜 IL-17 表达较正常组显著升高 ($P < 0.01$), 而模型组血清 IL-10 浓度以及 Foxp3 和关节滑膜 IL-10 表达较正常组显著降低 ($P < 0.01$), 栀子苷中、高剂量组血清 TNF- α 、IL-17 浓度以及 ROR- γ t 和关节滑膜 IL-17 表达较模型组显著降低 ($P < 0.05 \sim 0.01$), 而血清 IL-10 浓度、Foxp3 和关节滑膜 IL-10 表达较模型组显著升高 ($P < 0.05 \sim 0.01$)。结论 大鼠胶原诱导关节炎模型成模之后 Treg/Th17 会失衡, 栀子苷可升高 IL-10、Foxp3 表达, 降低 IL-17、ROR- γ t 表达, 提示其可能通过诱导 Treg 细胞生成同时抑制 Th17 细胞分化, 从而恢复病变部位 Treg/Th17 的平衡。

关键词: 栀子苷; 类风湿性关节炎; Th17/Treg

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-0482(2018)05-0499-05

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2018.0499

The Effects of Geniposide on Th17/Treg Balance and Local Inflammatory Factors in Rats with Rheumatoid Arthritis

YU Yun¹, SHI Le¹, YU Bin¹, BIAN Yong^{2*}

(1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China; 2. Science and Technology and Industry Department, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of geniposide on Th17/Treg balance and local inflammatory factors in rats with rheumatoid arthritis. **METHODS** We established the CIA model to observe the histopathological changes of ankle joints in rats. ELISA was used to detect plasma TNF- α , and Western blot was used to detect the protein contents of transcription factor Foxp3 and ROR γ t. The expression of IL-10 and IL-17 in joint synovial tissue was detected by immunohistochemistry. **RESULTS** Compared with the normal control group, the serum concentration of TNF- α , IL-17 and ROR- γ t and the expression of IL-17 in joint synovial tissue were significantly higher in the model group ($P < 0.01$), while the concentration of IL-10 and Foxp3 and the expression of IL-10 in joint synovial tissue decreased significantly in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the serum concentration of TNF- α , IL-17 and ROR- γ t and the expression of IL-17 in joint synovial tissue were significantly lower in the middle- and high-dose groups of geniposide ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while the concentration of IL-10 and Foxp3 and the expression of IL-10 in joint synovial tissue increased significantly in the middle- and high-dose groups of geniposide ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **CONCLUSION** There was an imbalanced Treg/Th17 differentiation in the joint synovium of CIA rats. By inhibiting the differentiation of Th17 cells in joint synovium, geniposide might induce the generation of Treg cells and then restore the Treg/Th17 balance in the diseased area.

KEY WORDS: Geniposide; rheumatoid arthritis; Th17/Treg

类风湿性关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)是一种表现出缓慢侵蚀性周围关节炎的自身免疫性疾病,

全世界发病率大约 1%, 其发病机制尚不完全清楚, 可能受遗传和环境等因素的影响。RA 在中医

收稿日期: 2018-05-15

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81703835)

作者简介: 俞云(1981-), 男, 助理研究员。* 通信作者: 卞勇, 男, 实验师, 主要从事中药药理学研究, E-mail: 13770779655@163.com

理论中归属于“骨痹”“历节”“顽痹”“痹证”等范畴,中医治疗 RA 历史悠久,早在《黄帝内经》就有记载“风寒湿三气杂至,合而为痹”,阐述其病机为外邪侵袭、痹阻经络关节,致气血不通、筋失濡养为病^[1]。中药栀子 *Fructus Gardeniae* 是茜草科植物山栀子 *Gardenia Jasminoides Ellis* 的干燥成熟果实,性寒、味苦,归心肺三焦经,有泄火祛烦、清热利尿、凉血解毒之效,主产于我国浙江、广东、江西、福建、湖南和江西^[2]。栀子苷(Jasminoidin,JA)是栀子主要的活性成分,是栀子干燥成熟果实中的一种环烯醚萜苷类,前期研究表明栀子苷可通过抑制大鼠细胞免疫从而对其佐剂性关节炎有一定治疗作用。大量研究结果表明 RA 发病与淋巴细胞免疫失调及其产生的大量相关炎性细胞因子在滑膜组织中浸润有关^[3]。其中辅助性 T 细胞的亚型 Th17 细胞和调节性 T 细胞及相关细胞因子的平衡在 RA 的发生和发展中发挥了重要作用^[4]。本研究将观察栀子苷对 CIA 大鼠滑膜 Th17 细胞与 Treg 细胞的平衡和对局部炎症因子的影响,在前期研究的基础上进一步探讨其免疫调节方面的作用,为临床使用提供理论依据和研究线索。

1 材料与方法

1.1 动物

雄性 SD 大鼠,体质量 160~200 g,生产许可证号:SCXK(浙)2014-0001。

1.2 试剂和仪器

栀子苷(纯度 98.5%,江苏永健医药,160815),雷公藤多苷片(浙江得恩德制药有限公司,规格:10 mg/片),牛源性 II 型胶原(Chondrex,365u7482),不完全弗氏佐剂(Chondrex,651i5816),肿瘤坏死因子 α (TNF- α),ELISA 试剂盒(武汉伊艾博生物科技有限公司,070562005),兔抗大鼠 CD4 多克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,4205),大鼠 Foxp3 单克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,5463),大鼠转录因子维甲酸受体相关孤儿受体 γ t(ROR γ t),单克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,6544),兔抗大鼠 IL-10 多克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,4604),兔抗大鼠 IL-17 多克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,4651),DAB 显色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,070556342550)。

电热恒温培育箱(上海一恒科技有限公司);流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司);倒置显微镜(德国徕卡);超声波清洗器(昆山市超声仪器有限

公司)。

1.3 动物分组及模型制备

大鼠 36 只,分 6 组:正常组、模型组、雷公藤多苷组,栀子苷低、中、高剂量组。模型制备:取牛 II 型胶原 20 mg 溶于 10 mL 乙酸(0.1 mol/L)中,混匀后于 4 ℃ 保存,按 1:1 比例加至弗氏完全佐剂中,充分乳化。除正常组外其余各组大鼠右后背部、足底、尾根 3 点共注射乳化剂 0.1 mL,正常组大鼠于相同部位 3 点注射生理盐水,1 周后以 0.1 mL 乳化剂加强免疫 1 次。

1.4 给药

加强免疫后 7 d 开始灌胃给药,给药剂量为每 10 g 灌胃 0.1 mL,栀子苷低、中、高剂量组分别为 15、30、60 mg/kg(用蒸馏水溶解,超声 15 min,4 ℃ 保存,灌胃前摇匀),雷公藤多苷组剂量为 10 mg/kg(用蒸馏水溶解,超声 15 min,4 ℃ 保存,灌胃前摇匀),正常组和模型组给等体积蒸馏水,每日 1 次,给药时间 4 周。

1.5 观察指标及方法

成模后 28 d 处死大鼠,心脏取血。静置 1.5 h 后 4 000 r/min 离心 30 min。取上清,于 -80 ℃ 保存。

取后踝关节,部分分离关节滑膜组织,于 -80 ℃ 保存,备用;其余于 10% 甲醛溶液中固定 24 h,经脱钙、脱水、透明、包埋等处理制成石蜡块,室温保存。切片,HE 染色,光学显微镜下观察病理组织学变化。

采用 ELISA 方法检血清 TNF- α 、IL-17、IL-10 的浓度,Western Blot 方法检测关节滑膜组织转录因子 Foxp3 和 ROR γ t 的蛋白量:取各组大鼠后踝关节滑膜组织,提取总蛋白并采用 BCA 法定量,进行 SDS-PAGE 蛋白电泳、转膜、杂交。显影结果采用 Quantity One 软件分析各组条带灰度值,以目标蛋白与内参比值反应蛋白表达情况。免疫组化检测关节滑膜组织 IL-10、IL-17 表达:采用 PBS 代替一抗作为阴性对照,抗 IL-17 多克隆抗体(1:100),抗 IL-10 多克隆抗体(1:100),应用免疫组化检测试剂盒检测,具体操作步骤按试剂盒说明书进行,光镜下观察染色结果,阳性表达呈棕褐色。用 ImageProPlus 软件对关节滑膜组织中 IL-10、IL-17 的阳性染色信号进行半定量分析,同一张切片随机选取 5 个不重叠的高倍镜视野,计算每个视野下阳性染色的平均光密度值。

1.6 统计学方法

采用 SPASS16.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布的采用 t 检验,不符合正态分布的采用秩和检验;计数资料以百分率表示,采用 χ^2 检验,等级资料采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 关节组织病理学检查

病理学观察结果显示,正常组大鼠膝关节滑膜

组织完整,细胞排列整齐,无充血及水肿,无炎性细胞浸润,关节软骨完整,无剥离及坏死;模型组膜细胞显著增生,滑膜内血管增生,肉芽组织形成,关节软骨面糜烂;雷公藤多苷组大鼠膝关节滑膜表层细胞增生,呈“栅栏”状排列,见炎性细胞浸润,滑膜血管充血、水肿。给药组滑膜肿胀、充血程度及滑膜细胞增生较模型组减轻,未见明显炎细胞浸润及血管增生,纤维化不明显,间质多为脂肪组织。见图 1。

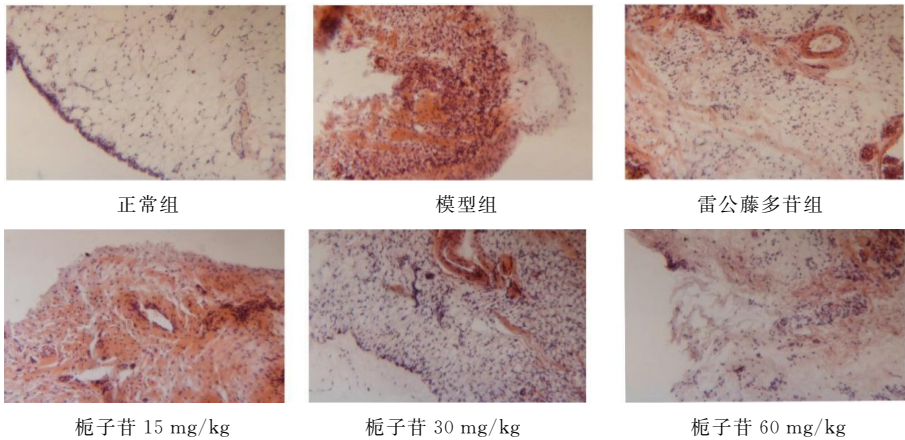


图 1 各组大鼠关节滑膜病理学改变(HE, $\times 400$)

2.2 各组大鼠 Foxp3, ROR- γ t 蛋白表达比较

结果显示 Foxp3:和正常组相比,模型组显著降低($P < 0.01$);和模型组相比,雷公藤多苷组、中剂量组、高剂量组显著升高 $P < 0.05 \sim 0.01$,低剂量组有升高趋势但无显著性差异。ROR- γ t:和正常组相比,模型组显著升高($P < 0.01$);和模型组相比,雷公藤多苷组、中剂量组、高剂量组显著降低 $P < 0.05 \sim 0.01$,低剂量组有降低趋势但无显著性差异,见表 1。

表 1 不同组别 Foxp3, ROR- γ t 的蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	Foxp3	ROR- γ t
正常组	—	1.37 ± 0.17	0.41 ± 0.11
模型组	—	0.71 ± 0.15 ^{##}	1.12 ± 0.19 ^{##}
雷公藤多苷组	10	1.27 ± 0.14 ^{**}	0.59 ± 0.14 ^{**}
低剂量组	15	0.83 ± 0.12	1.01 ± 0.27
中剂量组	30	1.18 ± 0.09 [*]	0.97 ± 0.21
高剂量组	60	1.23 ± 0.11 ^{**}	0.79 ± 0.03 [*]

注:与正常组比较, ^{##} $P < 0.01$,与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

2.3 各组大鼠血清 Th17/Treg 类细胞因子表达变化

方差分析显示各组间的 TNF- α 、IL-10、IL-17

表达均存在统计学差异,其中一部分存在显著差异。TNF- α :模型组血浆 TNF- α 浓度显著升高,与模型组相比,雷公藤多苷组、中剂量组、高剂量组血浆 TNF- α 浓度显著降低($P < 0.05 \sim 0.01$),低剂量组有降低趋势但无显著性差异。IL-10:和正常组相比,模型组显著升高($P < 0.01$);和模型组相比,雷公藤多苷组、中剂量组、高剂量组显著降低 $P < 0.05 \sim 0.01$,低剂量组有降低趋势但无显著性差异;IL-17:和正常组相比,模型组显著升高($P < 0.01$);和模型组相比,雷公藤多苷组、中剂量组、高剂量组显著降低 $P < 0.05 \sim 0.01$,低剂量组有降低趋势但无显著性差异。见表 2。

2.4 免疫组织化学检测关节滑膜组织 IL-10、IL-17 表达

免疫组织化学分析结果显示,IL-10、IL-17 主要位于滑膜衬里细胞层及血管周围。方差分析显示各组间的 IL-10、IL-17 表达均存在统计学差异,其中一部分存在显著差异。和正常组相比,模型组 IL-10 显著升高($P < 0.01$),和模型组相比,雷公藤多苷组、中剂量组、高剂量组显著降低 $P < 0.05 \sim 0.01$,低剂量组有降低趋势但无显著性差异($P > 0.05$)。和正常组相比,模型组 IL-17 显著升高($P < 0.01$),

与模型组相比,雷公藤多苷组、中剂量组、高剂量组 无显著性差异,见图 2~3,表 3。
显著降低 $P<0.05\sim 0.01$),低剂量组有降低趋势但

表 2 不同组别 Th17/Treg 类细胞因子表达变化($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)	IL-10/(pg·mL ⁻¹)	IL-17/(pg·mL ⁻¹)
正常组	—	7.32±1.08	15.21±0.66	90.17±12.11
模型组	—	36.25±8.39 ^{##}	7.13±0.59	300.50±19.15 ^{##}
雷公藤多苷组	10	19.25±5.63 ^{**}	11.31±0.027 ^{**}	190.57±019.16 ^{**}
低剂量组	15	33.46±9.76	8.21±0.73	279.18±30.02
中剂量组	30	27.61±7.64 [*]	9.27±0.82 [*]	236.71±33.23 [*]
高剂量组	60	20.56±5.9 ^{**}	10.15±0.92 ^{**}	213.28±27.86 ^{**}

注:与正常组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

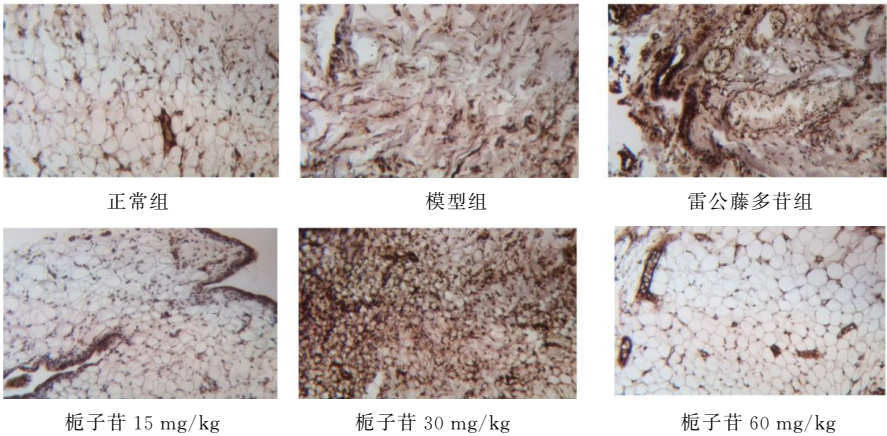


图 2 各组关节滑膜组织 IL-10 免疫组化图片

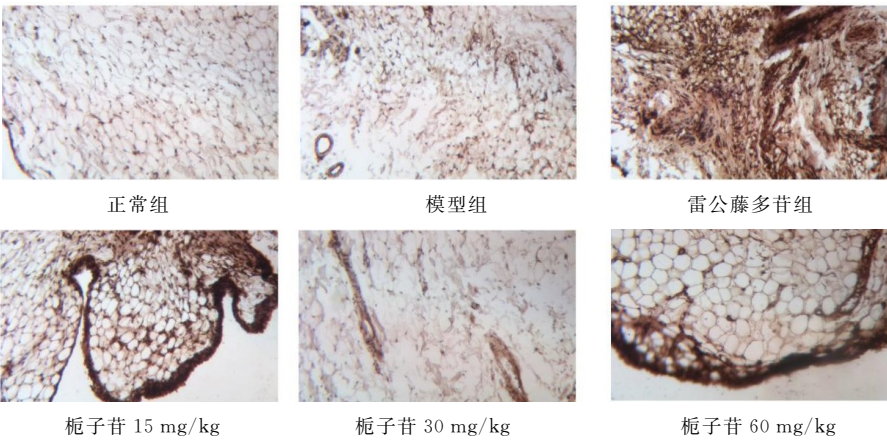


图 3 各组关节滑膜组织 IL-17 免疫组化图片

表 3 大鼠关节滑膜 IL-10、IL-17 免疫组化半定量
分析结果($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-10	IL-17
正常组	—	0.025 1±0.003 1	0.010 5±0.003 4
模型组	—	0.012 3±0.003 7 ^{##}	0.039 4±0.005 5 ^{##}
雷公藤多苷组	10	0.022 3±0.004 5 ^{**}	0.026 6±0.004 3 ^{**}
低剂量组	15	0.014 8±0.003 9	0.034 1±0.005 1
中剂量组	30	0.019 7±0.003 3 [*]	0.031 6±0.003 7 [*]
高剂量组	60	0.021 5±0.005 1 ^{**}	0.029 7±0.004 5 ^{**}

注:与正常组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<$

0.01。

3 讨论

RA 是一种主要表现为滑膜细胞肿瘤样增生、血管异常增生、炎性细胞向关节软骨及附近组织浸润的全身性免疫疾病,其主要病理特征为关节滑膜慢性炎症^[5]。RA 的发病机制尚未完全明确,研究表明免疫细胞及细胞因子相互作用在其发生和发展的过程中有重要作用,前期认为 Th1 在 RA 的发病过程中占主要地位,但越来越多的研究结果提示 Treg 和 Th17 细胞同样有着重要的影响。Treg 是

T 细胞亚群中具有免疫抑制活性的一类, Treg 细胞通过释放细胞因子 IL-10 等降低炎症因子的产生及抗体分泌, 发挥免疫效应; Foxp3 是 Treg 的特异性标记物, 其持续表达是维持 Treg 活性的关键因素^[6]。Treg 细胞数量或功能的改变可对 RA 的产生很重要的影响^[7], 一些研究已经证实, 和健康人群相比早期 RA 患者的外周血中的 Treg 的数量更低^[8]。Th17 细胞主要分泌 IL-17, 还能分泌 TNF- α 、IL-21 等, ROR- γ t 是 Th17 细胞特异性的转录调控因子, 其作为促进细胞分化的关键转录调节因子参与了体外细胞因子诱导的 Th17 细胞的分化以及体内 Th17 细胞介导的炎症反应。研究发现 RA 患者关节滑液中 IL-17 的含量明显升高^[9], 在 RA 发生发展过程中, IL-17 起着重要的作用, IL-17 不仅对组织炎症具有明显的促进作用, 而且能够对细胞外基质损伤起到促进愈合作用, IL-17 能抑制蛋白聚糖及胶原等修复基质的成分, 加重骨损伤^[10]。在 RA 的发病中的免疫细胞比例异常的主要原因之一是机体 Th17/Treg 的失衡和相关细胞因子的异常^[11]。牛倩^[12]等发现随着 RA 活动性的增加, 患者外周血细胞中 Th17 细胞的比率增加, Treg 细胞的比率降低, RA 患者体内的免疫抑制效应减弱而免疫炎性效应增强, 二者作用导致外周血 T 细胞亚群紊乱, 破坏外周免疫耐受, 促进疾病的发生发展。

本研究采用 CIA 模型, 建模完成后通过病理学观察发现模型组大鼠关节滑膜组织重度增生, 滑膜层变厚, 排列紊乱, 大量中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞浸润, 软骨重度缺失, 检测大鼠血清 TNF- α 显示模型组大鼠 TNF- α 水平显著升高, 提示模型建立成功。本研究考察栀子苷对类风湿性关节炎大鼠外周血 Th17/Treg 平衡和关节滑膜炎炎症细胞因子的影响。结果表明, CIA 模型大鼠的 Th17 细胞比率明显升高, Treg 细胞比率明显降低, 栀子苷中、高剂量组及阳性药对照组可以显著地降低 Th17 细胞比率, 同时栀子苷中、高剂量组及阳性药对照组可以显著上调 Treg 细胞比率。低剂量组的 Th17 和 Treg 的趋势和其他剂量组一样, 但无显著性差异,

结合检测结果, 栀子苷中、高剂量组和阳性药组治疗后, 大鼠血清中 TNF- α 、IL-17 以及关节滑膜中 IL-17 表达明显降低, 同时可明显上调血清和关节滑膜中 IL-10 水平。综上所述, 提示栀子苷可抑制 Th17 细胞分化, 促进 Treg 细胞生成, 诱导免疫耐受, 对 CIA 大鼠外周 Th17/Treg 失衡起到调节作用, 可重新建立体内免疫稳态。这可能是其抑制 RA 的炎症反应、延缓病理进展、防止关节畸变等重要药效的机制之一。

参考文献:

- [1] 周萍, 陈欧娜, 苏咏梅, 等. 温经散寒通络汤联合针灸治疗类风湿性关节炎寒湿痹的临床研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(4): 784-789.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 173.
- [3] 陈俊伟, 张少然, 闫成兰, 等. Th17/Treg 细胞在类风湿关节炎中的作用及其意义[J]. 中华风湿病学杂志, 2012, 16(4): 229-232.
- [4] 杨金娜, 刘晓, 李覃, 等. Th17/Treg 平衡在类风湿关节炎中作用的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(8): 1045-1048.
- [5] 段一娜, 王明娟, 杨佳琪, 等. 穿山龙水溶性总皂苷对 RA 细胞模型及其下游因子的影响[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(6): 1396-1400.
- [6] 杨金娜, 刘晓光, 李覃, 等. Th17/Treg 平衡在类风湿关节炎中作用的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(8): 1045-1048.
- [7] 王庆保, 刘健, 万磊. 类风湿关节炎患者外周血 CD4⁺CD25⁺CD127⁻调节 T 细胞的检测及临床意义[J]. 安徽医学, 2010, 31(2): 131-134.
- [8] LAWSON CA, BROWN AK, BEJARANO V, et al. Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4⁺CD25⁺ high regulatory T cell population in peripheral blood[J]. Rheumatology, 2006, 45(10): 1210-1217.
- [9] MCKNNE IB, SCHETT G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7(6): 429-442.
- [10] 史浩, 朱平. Th17 细胞及相关细胞因子在类风湿关节炎中的检测及临床意义[J]. 中国现代医生, 2013, 51(11): 101-102, 105.
- [11] 姚寿林, 徐建华. Th17 细胞/调节性 T 细胞平衡与类风湿关节炎[J]. 中华风湿病学杂志, 2010, 14(12): 835-837.
- [12] 牛倩, 黄卓春, 蔡蓓, 等. 类风湿性关节炎患者外周血 Th17/Treg 细胞比率失衡的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(3): 267-272.

(编辑: 董宇)