

# 积雪草苷对DBA/1小鼠胶原诱导型关节炎中Th17/Treg细胞表达的影响

栾慧杰<sup>1,2</sup>, 何莲花<sup>1,2</sup>, 何娟<sup>1,2</sup>, 单宏颖<sup>1,2</sup>, 虎义平<sup>1,2</sup>, 王庆文<sup>1,2\*</sup>

(1. 北京大学深圳医院, 广东深圳 518036;

2. 深圳市炎症与免疫性疾病重点实验室, 广东深圳 518036)

**[摘要]** 目的:观察积雪草苷对DBA/1小鼠胶原诱导型关节炎(CIA)中辅助性T细胞17(Th17)和调节性T细胞(Treg)表达的影响。方法:将SPF级DBA/1雄性小鼠按体重随机分为6组:正常组,CIA组,甲氨蝶呤组(MTX组,0.5 mg·kg<sup>-1</sup>),积雪草苷低、中、高剂量(5,15,45 mg·kg<sup>-1</sup>)组。除正常组外,其余组小鼠均构建CIA模型,分别于第1天给予牛Ⅱ型胶原和完全弗氏佐剂进行一次免疫,第21天给予牛Ⅱ型胶原和不完全弗氏佐剂进行二次免疫,并在二次免疫当天开始给药,MTX腹腔注射方式给药,积雪草苷灌胃方式给药,每天1次,共给药28 d。第49天小鼠取材后,小鼠关节组织进行苏木素-伊红(HE)染色观察病理改变;免疫组化检测Th17细胞标志物IL-17和Treg细胞标志物叉头样转录因子3(FoxP3)的表达情况;免疫荧光双染法检测小鼠关节组织CD4<sup>+</sup>T细胞中IL-17和FoxP3的表达情况;流式细胞术检测小鼠淋巴结中Th17和Treg细胞比例。结果:与正常组比较,CIA组小鼠关节结构严重紊乱,关节软骨及骨破坏明显,骨侵蚀严重( $P<0.01$ );小鼠关节组织CD4及IL-17阳性染色明显增多,且积分吸光度IA值显著升高( $P<0.01$ ),FoxP3阳性染色减少且IA值显著降低( $P<0.01$ ),Th17/Treg值显著升高( $P<0.01$ );小鼠淋巴结中Th17细胞表达比例明显增高( $P<0.01$ ),Treg细胞的表达比例显著减少( $P<0.01$ );与CIA组比较,MTX组和积雪草苷各剂量组小鼠关节结构均相对正常,骨侵蚀、骨破坏较轻,关节面相对完整光滑;MTX组和积雪草苷中、高剂量组小鼠关节组织中CD4阳性染色减少且IA值明显降低( $P<0.05$ );MTX组和积雪草苷各剂量组IL-17阳性染色明显减少且IA值明显降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ );积雪草苷中、高剂量组FoxP3阳性表达明显增加且IA值明显升高( $P<0.05$ , $P<0.01$ );MTX组和积雪草苷中、高剂量组Th17/Treg值明显降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ );小鼠淋巴结组织中,积雪草苷各剂量组Th17细胞表达比例明显降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),Treg细胞的表达比例明显增加( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。结论:积雪草苷可抑制CIA小鼠Th17细胞的表达,促进Treg细胞的表达,从而调节Th17/Treg平衡。

**[关键词]** 积雪草苷; 胶原诱导型关节炎; DBA/1小鼠; 辅助性T细胞17; 调节性T细胞

**[中图分类号]** R2-0;R285;R33;R593.22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)04-0076-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220437

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211214.1655.002.html>

**[网络出版日期]** 2021-12-16 17:39

## Effect of Asiaticoside on Expression of Th17/Treg Cells in DBA/1 Mice with Collagen-Induced Arthritis

LUAN Hui-jie<sup>1,2</sup>, HE Lian-hua<sup>1,2</sup>, HE Juan<sup>1,2</sup>, SHAN Hong-ying<sup>1,2</sup>, HU Yi-ping<sup>1,2</sup>, WANG Qing-wen<sup>1,2\*</sup>

(1. Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, China;

2. Shenzhen Key Laboratory of Immunity and Inflammatory Diseases, Shenzhen 518036, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of asiaticoside (AC) on the expression of T helper 17 (Th17) cells and regulatory T (Treg) cells in DBA/1 mice with collagen-induced arthritis (CIA). **Method:**

**[收稿日期]** 20211018(035)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81974253,81901641);深圳市科创委面上项目(JCYJ20210324110011031);广东省自然科学基金项目(2019A1515011112);广东省中医药局科研项目(20211333)

**[第一作者]** 栾慧杰,在读硕士,从事风湿免疫疾病临床与基础研究,E-mail:649695479@qq.com

**[通信作者]** \*王庆文,教授,主任医师,博士生导师,从事风湿免疫病临床工作,E-mail:wqw\_sw@163.com

Male SPF DBA/1 mice were randomized into six groups according to body weight: control group, CIA group, methotrexate group (MTX group, *ip*,  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), and AC low-, medium-, and high-dose groups (*ig*, 5, 15,  $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , respectively). Modeling was performed in rats other than the control group. To be specific, they were immunized with bovine type II collagen and complete Freund's adjuvant on the first day and with bovine type II collagen and incomplete Freund's adjuvant on the 21<sup>st</sup> day. Administration began on the day of the second immunization, once a day for 28 days. On the 49<sup>th</sup> day, related tissues were collected. Then, hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to observe the pathological changes of the joints. Immunohistochemical method was used to detect the expression of interleukin-17 (IL-17) and forkhead box protein-3 (FoxP3), the markers of Th17 and Treg cells, respectively, immunofluorescence double staining the expression of IL-17 and FoxP3 in CD4<sup>+</sup>T cells of mouse joint tissue, and flow cytometry the proportions of Th17 and Treg cells in mouse lymph nodes. **Result:** Compared with the control group, CIA group demonstrated joint disorder, damage of articular cartilage and bone, severe bone erosion ( $P < 0.01$ ), increase in stained CD4 and IL-17 and the integral absorbance (*IA*) ( $P < 0.01$ ), decrease in stained FoxP3 and the *IA* ( $P < 0.01$ ), rise of Th17/Treg ratio ( $P < 0.01$ ), elevation of Th17 expression in mouse lymph nodes ( $P < 0.01$ ), and reduction in Treg expression ( $P < 0.01$ ). Compared with CIA group, MTX group and three AC groups showed normal joints, alleviated bone erosion and damage, intact and smooth joint surface, and decrease in stained IL-17 and *IA* ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and MTX group and AC medium-dose and high-dose groups registered decrease in stained CD4 and *IA* ( $P < 0.01$ ) and reduction in Th17/Treg ratio ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Moreover, AC medium-dose and high-dose groups showed rise in stained FoxP3 and *IA* ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). In the lymph nodes of mice, decrease in expression of Th17 cells ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) and the increase in expression of Treg cells ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) were observed in all the three AC group. **Conclusion:** AC can regulate Th17/Treg balance by inhibiting the expression of Th17 cells and promoting the expression of Treg cells in CIA mice.

**[Keywords]** asiaticoside; collagen-induced arthritis; DBA/1 mice; T helper 17 (Th17) cell; regulatory T (Treg) cell

类风湿关节炎(RA)是一种常见的慢性炎症性自身免疫性疾病,主要临床特征为关节肿胀疼痛,关节软骨与骨进行性破坏,最终引起关节功能障碍和畸形<sup>[1-2]</sup>。流行病学调查显示,我国RA的患病率为0.42%<sup>[3]</sup>,目前我国大约有500万类风湿关节炎患者<sup>[4]</sup>,给家庭和社会都带来了沉重的负担。近年来研究发现,RA的发生与机体免疫失衡密切相关<sup>[5-7]</sup>,其中辅助性T细胞17(Th17)/调节性T细胞(Treg)失衡在RA的发生中发挥着重要作用<sup>[8-10]</sup>。既往研究表明RA患者外周血及滑膜组织中Th17细胞增多,白细胞介素-17(IL-17)分泌显著升高<sup>[11]</sup>,IL-17是一种致炎细胞因子,能够促进滑膜成纤维细胞(FLS)增殖并分泌炎症因子导致滑膜增生<sup>[12]</sup>,同时还可以通过上调基质蛋白酶家族(MMPs)的表达<sup>[6]</sup>和激活核转录因子- $\kappa$ B受体活化因子配体(RANKL),打破骨保护素(OPG)与RANKL平衡,促进软骨和骨破坏<sup>[5]</sup>,引起骨侵蚀。RA患者外周血及滑膜组织中Treg数量下降或功能下调,其分泌的白细胞介素-10(IL-10)等免疫炎症抑制性细胞因子

减少<sup>[7,9]</sup>。因此,调节Th17细胞和Treg细胞之间的平衡可能成为治疗RA的一个新策略。

目前临床上用于治疗RA的药物如非甾体类抗炎药、改变病情抗风湿药物、糖皮质激素以及肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )靶向药和白细胞介素靶向药等,虽然对RA也有较好的治疗效果,但存在着不良反应多、副作用大或者价格昂贵等缺点,因此,寻求对治疗RA便宜有效、毒副作用小的药物是目前研究的一个热点。传统中药积雪草具有免疫调节、消炎、镇痛等作用<sup>[13]</sup>,常作为活血化瘀药用于风湿免疫疾病中,可缓解关节局部炎症<sup>[14-15]</sup>。积雪草苷是积雪草的提取物三萜皂甙的主要成分之一,是积雪草中发挥相关药理作用的主要组分,药理学研究表明积雪草苷具有免疫调节、抗炎等作用<sup>[16]</sup>。积雪草苷已被证实对小鼠胶原诱导型关节炎(CIA)模型有效<sup>[17]</sup>,可降低小鼠炎症因子TNF- $\alpha$ 和IL-6的水平,但其具体机制尚不明确。因此,本研究采用CIA小鼠模型观察积雪草苷对免疫细胞Th17和Treg表达的影响,为积雪草苷可能用于治疗RA提供理论

支持。

## 1 材料

**1.1 动物** 36只SPF级雄性DBA/1小鼠,8周龄,18~20g,购买于上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号SCXK(沪)2017-0005,饲养在北京大学深圳医院动物实验室SPF级环境,适应性饲养1周后开展相关实验。实验操作符合深圳北京大学香港科技大学医学中心实验动物福利伦理审查委员会标准,伦理审查号2020-007。

**1.2 药物与试剂** 积雪草苷(美国MedChemExpress公司,批号HY-N0439,纯度99.72%,溶解于二甲基亚砜中);甲氨蝶呤(MTX,上海脉铂医药科技有限公司,批号MED10811);牛Ⅱ型胶原( $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),完全弗氏佐剂(CFA, $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),不完全弗氏佐剂(IFA,美国Chondrex公司,批号分别为20022,7008,7002);通用型试剂盒(小鼠/兔聚合物法检测系统),DBA显色液,苏木素染液,伊红染液(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为PV-6000,ZLI-9017,ZLI-9610,ZLI-9613);CD4,IL-17免疫组化抗体(美国Abcam公司,批号分别为ab237722,ab214588);CD4免疫荧光抗体,叉头样转录因子3(FoxP3)抗体(美国CST公司,批号分别为96127,12653);IL-17免疫荧光抗体(美国ABclonal公司,批号A0688);DAPI(美国AAT Bioquest公司,批号17510);封片剂(美国Southern Biotech公司,批号0100-01);细胞刺激剂(美国Invitrogen公司,批号00-4975);CD4,IL-17,FoxP3流式抗体,转录因子缓冲液(美国BD公司,批号分别为553730,560814,560403,562574);细胞快速固定破膜液(美国Biolegend公司,批号426803)。

**1.3 仪器** VS-35S型手持式匀浆机(无锡沃信仪器制造有限公司);Tissue-Tek VIP 5J-F2型脱水机(日本Sakura公司);Histostar型组织包埋机[上海赛默飞世尔科技(中国)有限公司];BX53型正置荧光显微镜(日本Olympus公司);SM2000R滑动式切片机和819切片刀(德国Leica公司);Tec-2500型病理组织漂烘仪(江苏常州郝思琳公司);GYXH-115型制冰机(厦门国仪科学仪器有限公司);CytoFLEX S型流式分析细胞仪(美国Beckman公司)。

## 2 方法

**2.1 CIA模型的制备** 36只SPF级雄性DBA/1小鼠除正常组的6只外其余30只均进行CIA造模。初次免疫:取适量牛Ⅱ型胶原加入4mL离心管中,

将等体积的CFA逐滴加入离心管内,加入胶原时匀浆机转速档位调到1,进行充分乳化混匀时转速档位调到5,每次乳化1min,间隔1min,约进行6~7次,当胶原和佐剂混合物在水面形成油包水状态并保持不散开时代表乳化成功,整个过程均在冰水混合浴中进行。每只小鼠尾根部皮下注射乳化好的胶原和佐剂混合物0.1mL进行初次免疫,记为第1天;于第21天进行二次免疫:将适量牛Ⅱ型胶原与等体积IFA进行乳化混匀,方法同初次免疫,每只小鼠尾根部皮下注射乳化好的胶原和佐剂混合物0.1mL完成二次免疫。当小鼠出现关节肿胀症状时即为造模成功<sup>[18]</sup>。

**2.2 分组和给药** 36只8周龄的雄性DBA/1小鼠,按体质量随机分为6组,分别为正常组,CIA组,MTX组,积雪草苷低、中高剂量组<sup>[17,19-20]</sup>,每组6只。在完成二次免疫当天(即第21天)开始给药,甲氨蝶呤给药剂量为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,通过腹腔注射给药,积雪草苷通过灌胃方式给药,正常组和CIA组给予生理盐水灌胃,各组每天给药1次,共给药28d,于第49天取材。

**2.3 苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠关节病理变化** 将小鼠关节经过固定、脱钙、修片、脱水、浸蜡等操作后进行石蜡包埋,制成石蜡切片,进行HE染色。HE染色步骤如下:石蜡切片经二甲苯进行切片脱蜡;梯度乙醇脱水;自来水3min使切片水化;苏木素染液2min染细胞核;1%盐酸乙醇分化返蓝;伊红染液25s使细胞质染色;无水乙醇10min使切片脱水;二甲苯10min使切片透明;中性树脂封片。根据切片炎症程度进行病理学评分,包括炎性细胞浸润、血管翳、软骨侵蚀和骨破坏严重情况。分为5个等级:0分,正常;1分,最轻;2分,轻度;3分,中度;4分,明显;5分,严重<sup>[21]</sup>。

**2.4 免疫组化检测CD4,IL-17,FoxP3的表达** 如2.3项下所述步骤完成石蜡切片制作和切片脱蜡及水化,于微波炉中进行抗原修复;滴加适量内源性过氧化物阻断剂,室温孵育10min;根据组织块大小滴加适量稀释后的一抗(CD4 1:100,IL-17 1:100,FoxP3 1:200),于湿盒中4℃过夜孵育;磷酸盐缓冲液(PBS)洗3次,每次3min;滴加适量的酶标山羊抗小鼠/兔免疫球蛋白(Ig)G聚合物,室温孵育10min;滴加适量DBA显色液室温孵育进行显色;双蒸水洗涤终止显色。苏木素复染20s,盐酸乙醇分化2s;切片脱水透明后进行中性树脂封片。拍片后,采用Image Pro Plus分析积分吸光度IA。

**2.5 免疫荧光双染法检测 CD4<sup>+</sup>IL-17 和 CD4<sup>+</sup>FoxP3 的表达** 小鼠关节组织完成包埋、切片、脱蜡、水化和抗原修复后,用封闭用羊血清室温封闭 20 min;弃掉封闭液,根据组织块大小直接滴加适量稀释后的一抗(CD4 1:50, IL-17 1:50, FoxP3 1:50),于湿盒中 4 °C 过夜孵育;PBS 洗 3 次,每次 3 min;将山羊抗小鼠 CD4 和山羊抗兔 IL-17, FoxP3 的免疫荧光二抗稀释混匀后,取适量滴加至组织切片上,室温孵育 1 h,注意避光;将 DAPI 1:1 000 的比例稀释后滴加至组织切片,室温孵育 10 min;用防淬灭封片剂封片,注意避光。

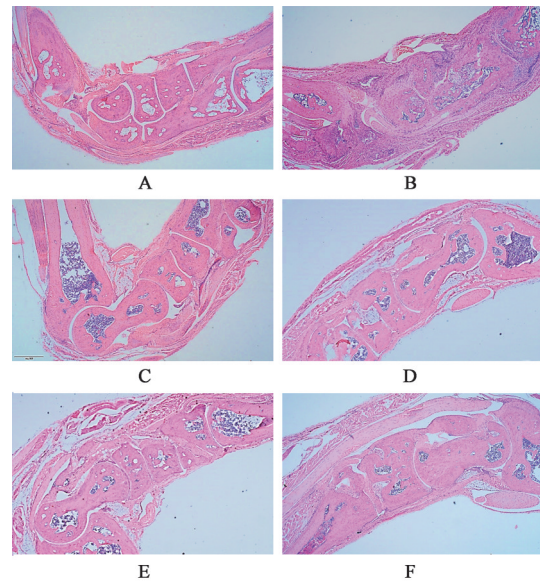
**2.6 流式细胞术检测 Th17 细胞和 Treg 细胞的比例** 将小鼠淋巴结研磨后过滤至离心管,以 300×g 离心 5 min(离心半径 9.6 cm,下同),弃上清用 PBS 重悬后分为 2 管。一管用细胞刺激剂(含离子霉素、PMA 和 BFA)进行体外刺激,37 °C 孵育 4 h 后用 PBS 洗 1 次,加入 CD4 流式抗体 0.5 μL,室温避光孵育 30 min 后离心弃上清,根据细胞膜破膜试剂盒操作说明对细胞进行破膜操作后,加入抗小鼠 IL-17 流式抗体 1 μL,室温避光孵育 20 min;加破膜工作缓冲液 1 mL,离心后弃上清, PBS 重悬上机检测;另一管进行 Treg 检测,按上述步骤先进行 CD4 染色,然后用细胞核膜试剂盒操作说明对细胞进行破核膜操作,然后加入 FoxP3 流式抗体 1 μL,孵育 40 min, PBS 重悬上机检测。

**2.7 统计学方法** 采用 SPSS 20.0 软件进行分析,实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,两独立样本间比较使用独立样本 *t* 检验,多组间比较使用 One-way ANOVA, *P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 CIA 小鼠关节组织病理学的影响** 正常组小鼠关节结构无异常,无炎性细胞浸润和滑膜细胞增生,关节软骨表面光滑;与正常组比较, CIA 组小鼠关节结构严重紊乱,且有大量炎症细胞浸润,关节软骨及骨破坏明显,骨侵蚀严重,组织学评分显著升高(*P* < 0.01);与 CIA 组比较, MTX 组和积雪草苷各剂量组关节结构均相对正常,未见明显炎症细胞浸润,骨破坏较轻,关节面相对完整光滑,组织学评分均明显降低(*P* < 0.05, *P* < 0.01)。该结果提示 MTX 和积雪草苷均可有效减轻 CIA 小鼠关节组织病理学变化,改善 CIA 小鼠关节破坏情况。见图 1,表 1。

**3.2 对 CIA 小鼠关节组织 CD4, IL-17 及 FoxP3 表达的影响** 正常组小鼠关节组织可见极少数 CD4 和 IL-17 阳性染色。与正常组比较, CIA 组小鼠关节



A. 正常组; B. CIA 组; C. MTX 组; D. 积雪草苷低剂量组; E. 积雪草苷中剂量组; F. 积雪草苷高剂量组(图 2~6 同)

图 1 积雪草苷对 CIA 小鼠踝关节组织病理学的影响(HE, ×40)

Fig. 1 Effect of asiaticoside on histopathology of ankle joint in CIA mice (HE, ×40)

表 1 积雪草苷对 CIA 小鼠关节组织学评分的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 1 Effect of asiaticoside on joint histological score in CIA mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	组织学评分/分
正常		0
CIA		2.833±0.408 <sup>2)</sup>
MTX	0.5	0.667±0.516 <sup>4)</sup>
积雪草苷	5	1.167±0.753 <sup>3)</sup>
	15	0.833±0.752 <sup>4)</sup>
	45	1.167±0.683 <sup>3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>*P* < 0.05, <sup>2)</sup>*P* < 0.01;与 CIA 组比较<sup>3)</sup>*P* < 0.05, <sup>4)</sup>*P* < 0.01(表 2~4 同)。

组织 CD4 及 IL-17 阳性染色明显增多,且 IA 值显著升高(*P* < 0.01);与 CIA 组比较, MTX 组及积雪草苷中、高剂量组 CD4 阳性染色减少, IA 值明显降低(*P* < 0.05),且 MTX 组及积雪草苷各剂量组 IL-17 阳性染色也明显减少, IA 值明显降低(*P* < 0.05, *P* < 0.01)。正常组小鼠关节组织 FoxP3 阳性表达较多,与正常组比较, CIA 组 FoxP3 阳性染色减少,且 IA 值显著降低(*P* < 0.01);与 CIA 组比较,积雪草苷各剂量组 FoxP3 阳性表达明显增加,且 IA 值明显升高,其中积雪草苷中、高剂量组有明显统计学差异(*P* < 0.05, *P* < 0.01)。见图 2~4,表 2。

**3.3 对 CIA 小鼠关节组织 CD4 细胞中 IL-17 和 FoxP3 表达的影响** 与正常组比较, CIA 组 CD4<sup>+</sup>IL-

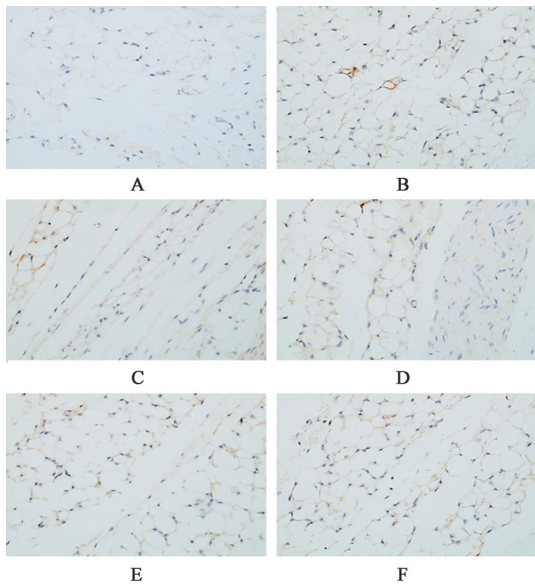


图2 积雪草苷对CIA小鼠关节组织中CD4表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 2 Effect of asiaticoside on CD4 expression in joint tissue of CIA mice (IHC,×400)

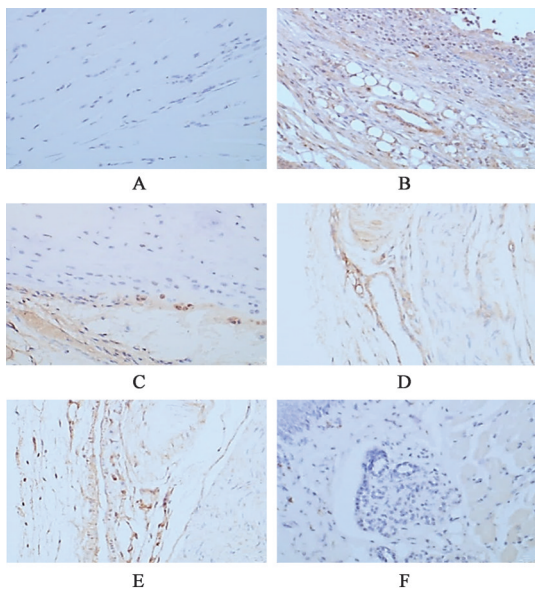


图3 积雪草苷对CIA小鼠关节组织中IL-17表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 3 Effect of asiaticoside on IL-17 expression in joint tissue of CIA mice (IHC,×400)

17<sup>+</sup>的表达明显增多,CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>表达也增多;与CIA组比较,MTX组及积雪草苷各剂量组CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>的表达明显减少,CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>表达也减少。与正常组比较,CIA组Th17/Treg值显著升高( $P<0.01$ ),与CIA组比较,MTX组及积雪草苷中、高剂量组Th17/Treg值明显降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。见图5,6,表3。

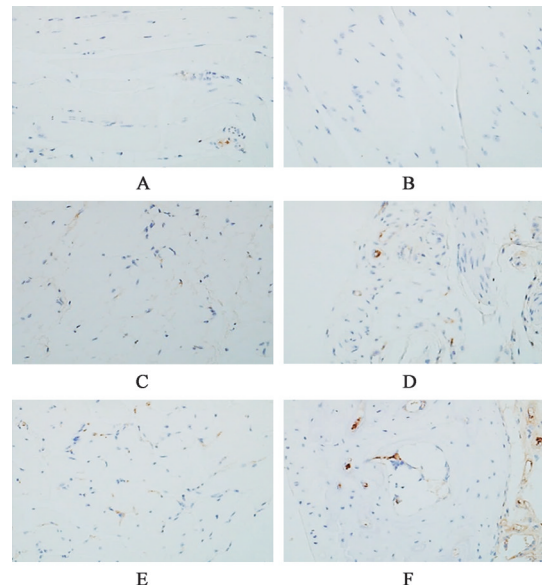


图4 积雪草苷对CIA小鼠关节组织中FoxP3表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 4 Effect of asiaticoside on FoxP3 expression in joint tissue of CIA mice (IHC,×400)

3.4 对CIA小鼠淋巴结Th17细胞及Treg细胞表达的影响 流式细胞术检测小鼠淋巴结细胞Th17和Treg细胞的表达比例,与正常组比较,CIA组Th17细胞表达比例显著增高( $P<0.01$ ),Treg细胞的表达比例显著减少( $P<0.01$ );与CIA组比较,积雪草苷各剂量组Th17细胞表达比例明显降低,差异有明显统计学意义( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),Treg细胞的表达比例明显增加,差异有明显统计学意义( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。见表4。

#### 4 讨论

RA是以多关节肿痛、产生大量炎症因子以及多种自身抗体为疾病特征的免疫性疾病。虽然RA的发病原因和机制尚未完全阐明,随着免疫学的发展,近年来研究发现Th17/Treg免疫平衡异常在RA的发生发展中的发挥着重要作用。Th17细胞分泌致炎因子IL-17通过促进滑膜成纤维细胞增殖导致滑膜增生<sup>[12]</sup>及上调MMPs表达和打破OPG与RANKL平衡,从而参与RA关节滑膜炎、软骨损伤以及骨侵蚀等病理过程<sup>[22]</sup>。Treg细胞则分泌抑制性细胞因子,如IL-2,IL-10等,可抑制CD4<sup>+</sup>,CD8<sup>+</sup>T细胞的活化增殖,发挥其抗炎和维持免疫耐受的作用<sup>[23]</sup>。

胶原诱导型关节炎是受到普遍认可的类风湿关节炎实验研究的动物模型。本研究通过CIA模型小鼠,对其给予积雪草苷药物治疗干预,实验结果显示,积雪草苷治疗组相较于CIA组小鼠关节破

表2 积雪草苷对CIA小鼠CD4, IL-17及FoxP3表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 2 Effect of asiaticoside on CD4, IL-17 and FoxP3 expression of CIA mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	CD4/×10 <sup>3</sup>	IL-17/×10 <sup>3</sup>	FoxP3/×10 <sup>3</sup>
正常		414.46±71.30	384.11±73.23	570.55±131.24
CIA		963.13±56.13 <sup>2)</sup>	1 313.04±202.89 <sup>2)</sup>	204.62±79.57 <sup>2)</sup>
MTX	0.5	582.52±138.59 <sup>3)</sup>	638.85±104.46 <sup>4)</sup>	398.11±36.77
积雪草苷	5	699.35±159.94	843.60±93.83 <sup>3)</sup>	344.68±75.52
	15	571.42±179.47 <sup>3)</sup>	659.43±114.03 <sup>4)</sup>	481.78±80.59 <sup>3)</sup>
	45	511.16±144.27 <sup>3)</sup>	560.15±207.41 <sup>3)</sup>	546.84±100.28 <sup>4)</sup>

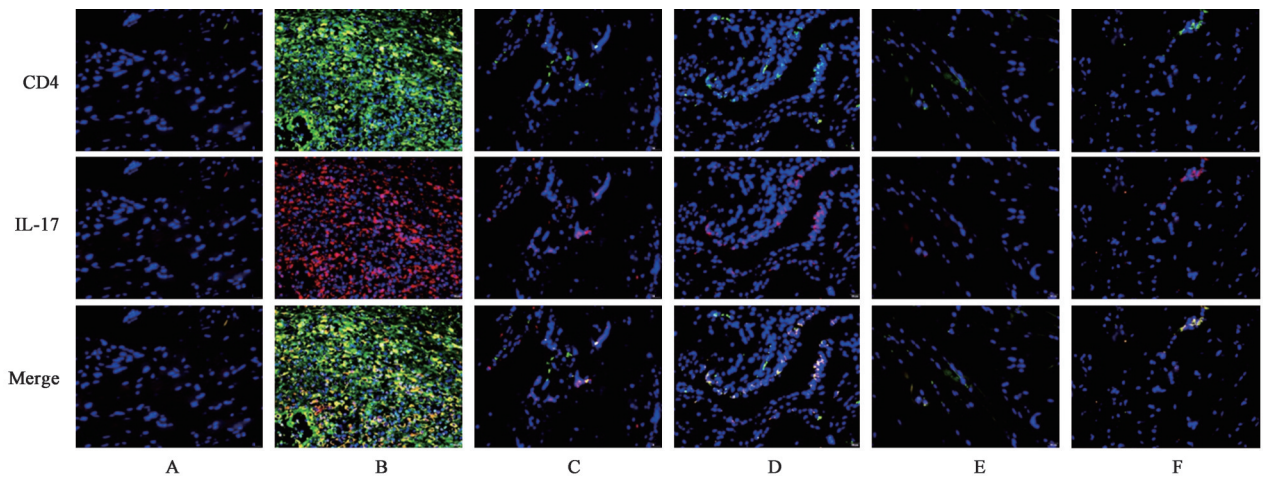


图5 积雪草苷对CIA小鼠关节组织CD4细胞中IL-17表达的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 5 Effect of asiaticoside on IL-17 expression in CD4 cell of joint tissue of CIA mice (IF, ×400)

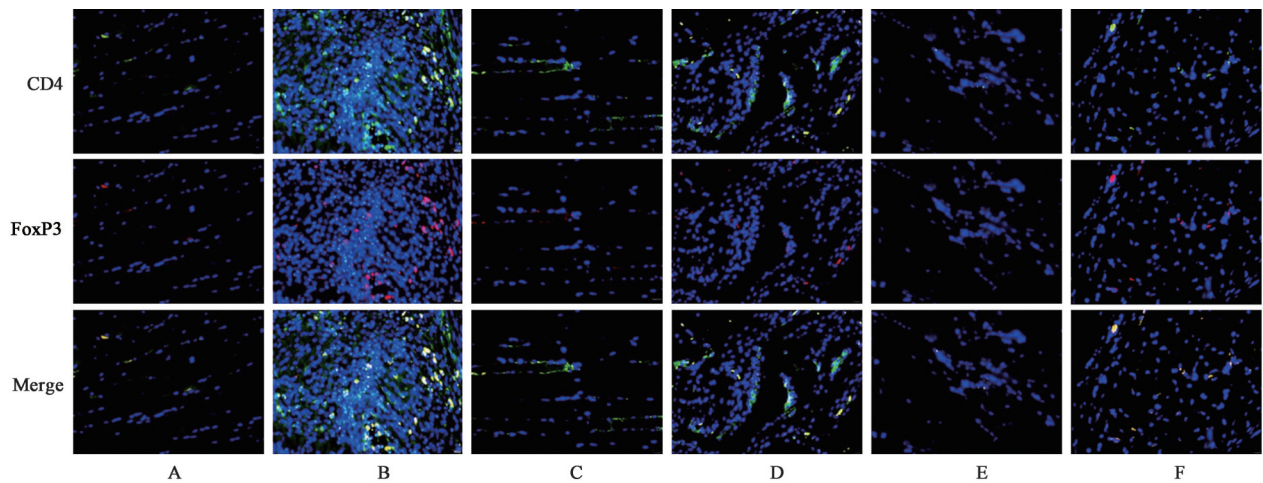


图6 积雪草苷对CIA小鼠关节组织CD4细胞中FoxP3表达的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 6 Effect of asiaticoside on FoxP3 expression in CD4 cell of joint tissue of CIA mice (IF, ×400)

坏程度减轻,关节结构相对完整,关节面较为光滑,骨质破坏轻,炎症细胞浸润更少,说明积雪草苷可有效减轻CIA小鼠关节组织病理学变化,改善CIA小鼠关节破坏情况。同时积雪草苷可减少小鼠关节组织中CD4<sup>+</sup>T细胞及Th17细胞的表达,并增加Treg细胞的比例,调节Th17/Treg值。既往研究证实,初始CD4<sup>+</sup>T细胞在不同的细胞因子微环境作用

下,可分别分化为Th17细胞和Treg细胞。低浓度TGF-β协同IL-6可以诱导维甲酸相关核孤儿受体γt(RORγt)的表达,从而促进Naïve CD4<sup>+</sup>T细胞向Th17方向分化,而在IL-6缺失时,高浓度TGF-β可与IL-10共同作用诱导FoxP3表达,促进其向Treg方向分化<sup>[24-25]</sup>。因此,TGF-β信号通路在Th17细胞与Treg细胞分化的过程中发挥着重要作用。有研

表 3 积雪草苷对 CIA 小鼠关节组织 CD4 细胞中 Th17/Treg 值的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 3 Effect of asiaticoside on Th17/Treg in CD4 cell of joint tissue of CIA mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	Th17/Treg
正常		0.433±0.193
CIA		2.751±0.621 <sup>2)</sup>
MTX	0.5	1.147±0.869 <sup>3)</sup>
积雪草苷	5	1.662±1.008
	15	0.676±0.418 <sup>4)</sup>
	45	0.947±0.794 <sup>4)</sup>

表 4 积雪草苷对 CIA 小鼠淋巴细胞中 Th17 和 Treg 表达比例的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 4 Effect of asiaticoside on Th17 and Treg expression in lymph cell of CIA mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	Th17	Treg
正常		2.173±0.478	29.233±3.648
CIA		5.492±1.139 <sup>2)</sup>	14.867±4.188 <sup>2)</sup>
积雪草苷	5	3.008±0.816 <sup>3)</sup>	19.917±1.807 <sup>3)</sup>
	15	2.298±0.297 <sup>4)</sup>	20.967±3.529 <sup>4)</sup>
	45	2.286±0.922 <sup>4)</sup>	18.983±2.155 <sup>3)</sup>

究表明, TGF- $\beta$  信号通路中的抑制性调控蛋白 Smad7 在 RA 患者的滑膜组织中表达显著下调, 而在敲除 Smad7 的 CIA 小鼠中, 小鼠炎症表型加重, 滑膜组织中 Th17 的数量显著增加, Th17/Treg 比例上调, 提示 Smad7 下调与 RA 的发病相关<sup>[26]</sup>。Smad7 可能是参与了 Th17 的分化, 从而影响了 Th17/Treg 的平衡, 进而促进 RA 的发生。而在过往的研究中, 已经证实, 积雪草苷可以上调 Smad7 的表达<sup>[27-28]</sup>, 因此, 在本研究中, 积雪草苷调节 Th17/Treg 平衡, 可能是通过上调 TGF- $\beta$  信号中 Smad7 的表达, 从而引起 T 细胞亚群的变化, 这有待继续进一步的研究阐明。

综上所述, 积雪草苷可减轻 CIA 小鼠关节破坏程度, 改善 Th17/Treg 平衡, 从而对胶原诱导型关节炎小鼠有一定的治疗效果。本研究为积雪草苷可能用于 RA 治疗提供一定的理论依据, 具体机制有待进一步探索。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] SMOLEN J S, ALETAHA D, BARTON A, et al. Rheumatoid arthritis[J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4: 18001.

[2] VAN DER WOUDE D, VAN DER HELM-VAN MIL A. Update on the epidemiology, risk factors, and disease outcomes of rheumatoid arthritis[J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2018, 32(2): 174-187.

[3] 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.

[4] LI Z G. A new look at rheumatology in China-opportunities and challenges[J]. Nat Rev Rheumatol, 2015, 11(5): 313-317.

[5] GIZINSKI A M, FOX D A. T cell subsets and their role in the pathogenesis of rheumatic disease[J]. Curr Opin Rheumatol, 2014, 26(2): 204-210.

[6] TESMER L A, LUNDY S K, SARKAR S, et al. Th17 cells in human disease[J]. Immunol Rev, 2008, 223: 87-113.

[7] WU S, ZHOU Y, LIU S, et al. Regulatory effect of nicotine on the differentiation of Th1, Th2 and Th17 lymphocyte subsets in patients with rheumatoid arthritis[J]. Eur J Pharmacol, 2018, 831: 38-45.

[8] BOISSIER M C, ASSIER E, FALGARONE G, et al. Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/Treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm[J]. Joint Bone Spine, 2008, 75(4): 373-375.

[9] LINA C, CONGHUA W, NAN L, et al. Combined treatment of etanercept and MTX reverses Th1/Th2, Th17/Treg imbalance in patients with rheumatoid arthritis[J]. J Clin Immunol, 2011, 31(4): 596-605.

[10] 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): 267-269, 272.

[11] LI N, WANG J C, LIANG T H, et al. Pathologic finding of increased expression of interleukin-17 in the synovial tissue of rheumatoid arthritis patients[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(7): 1375-1379.

[12] LAVOCAT F, OSTA B, MIOSSEC P. Increased sensitivity of rheumatoid synoviocytes to Schnurri-3 expression in TNF- $\alpha$  and IL-17A induced osteoblastic differentiation[J]. Bone, 2016, 87: 89-96.

[13] 项佳媚, 肖伟, 许利嘉, 等. 积雪草的研究进展[J]. 中国现代中药, 2016, 18(2): 233-238, 258.

[14] YANG C L, OR T C, HO M H, et al. Scientific basis of botanical medicine as alternative remedies for rheumatoid arthritis[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2013, 44(3): 284-300.

[15] SHARMA S, GUPTA R, THAKUR S C. Attenuation of collagen induced arthritis by Centella asiatica methanol fraction via modulation of cytokines and oxidative stress[J]. Biomed Environ Sci, 2014, 27

- (12):926-938.
- [16] 丁元,张翥,王锁刚. 积雪草苷的研究进展[J]. 时珍国医国药,2016,27(3):697-699.
- [17] 李洪忠,万敬员,张力,等. 积雪草苷对小鼠胶原诱导性关节炎的抑制作用[J]. 药学学报,2007,42(7):698-703.
- [18] 何莲花,栾慧杰,单宏颖,等. 防己黄芪汤对DBA/1小鼠胶原诱导型关节炎及血管新生的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(17):16-23.
- [19] WANG X, CAI X, WANG W, et al. Effect of asiaticoside on endothelial cells in hypoxia-induced pulmonary hypertension[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(2):2893-2900.
- [20] ZHANG Z, LI X, LI D, et al. Asiaticoside ameliorates  $\beta$ -amyloid-induced learning and memory deficits in rats by inhibiting mitochondrial apoptosis and reducing inflammatory factors[J]. Exp Ther Med, 2017, 13(2):413-420.
- [21] 王靖霞,刘春芳,何莲花,等. 风湿祛痛胶囊对大鼠胶原诱导性关节炎的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019,25(2):89-95.
- [22] 卢月,曹雅晶,钱瑞琴. IL-17在类风湿性关节炎发病机制中的作用[J]. 中国免疫学杂志,2011,27(9):855-859.
- [23] ZAISS M M, AXMANN R, ZWERINA J, et al. Treg cells suppress osteoclast formation: a new link between the immune system and bone [J]. Arthritis Rheum, 2007,56(12):4104-4112.
- [24] SCHINNERLING K, AGUILLÓN J C, CATALÁN D, et al. The role of interleukin-6 signalling and its therapeutic blockage in skewing the T cell balance in rheumatoid arthritis[J]. Clin Exp Immunol, 2017, 189(1):12-20.
- [25] BETTELLI E, CARRIER Y, GAO W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells [J]. Nature, 2006,441(7090):235-238.
- [26] ZHOU G, SUN X, QIN Q, et al. Loss of Smad7 promotes inflammation in rheumatoid arthritis [J]. Front Immunol, 2018,9:2537.
- [27] 潘姝,利天增,李叶扬,等. 积雪草甙对增生性瘢痕成纤维细胞增殖与Smad7蛋白的影响[J]. 第三军医大学学报,2005,27(1):49-52.
- [28] 马继伟,王宏天,刘浩飞,等. 积雪草对转染TGF- $\beta_1$ 基因的大鼠肾小球系膜细胞Smad2/3、Smad7和胶原蛋白IV表达的影响[J]. 中国应用生理学杂志,2018,34(2):122-125,149.

[责任编辑 孙丛丛]