

二妙散对DBA/1小鼠胶原诱导型关节炎中 Th17/Treg细胞分化的影响

何莲花^{1,2,3}, 栾慧杰¹, 何娟¹, 王小成¹, 虎义平¹, 王庆文^{1*}

(1. 北京大学深圳医院, 广东 深圳 518036;

2. 广州中医药大学第四临床医学院, 广东 深圳 518033;

3. 深圳华润三九医药贸易有限公司, 广东 深圳 518109)

[摘要] 目的:观察古代经典名方二妙散(EMS)对DBA/1小鼠胶原诱导型关节炎(CIA)中辅助性T细胞17(Th17)/调节性T细胞(Treg)分化的影响。方法:按体质量将20只DBA/1小鼠随机分为正常组、CIA组,EMS(5.4 g·kg⁻¹)组及甲氨蝶呤(MTX,0.5 mg·kg⁻¹)组。CIA组、EMS组及MTX组在第1天以等体积牛Ⅱ型胶原和完全弗氏佐剂免疫DBA/1小鼠,于第21天以等体积牛Ⅱ型胶原和不完全弗氏佐剂于尾根部有别于第1次免疫部位免疫DBA/1小鼠建立CIA模型(此为第2次免疫),并于第2次免疫当天开始灌胃给药,除MTX为每周3次外,其余每天1次,共给药28 d。第22天开始观察CIA小鼠的关节红肿等症并评分,第49天取材后,采用苏木素-伊红(HE)染色观察CIA小鼠关节滑膜炎的情况;免疫荧光(IF)双标法检测CIA小鼠关节中CD4⁺T细胞中Th17细胞标志物白细胞介素-17(IL-17)和Treg细胞标志物叉头框转录因子P3(FoxP3)在关节滑膜中的表达情况;流式细胞术检测小鼠脾脏及淋巴结中Th17和Treg的细胞比例情况。结果:与正常组比较,CIA组小鼠关节滑膜炎情况明显,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($P<0.01$);小鼠关节组织中Th17/Treg值显著升高($P<0.01$);小鼠脾脏及淋巴结中Th17的细胞表达比例显著增高($P<0.01$),Treg细胞表达比例显著减少($P<0.01$);与CIA组比较,EMS组和MTX组两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;EMS组和MTX组两组中Th17/Treg值显著降低($P<0.01$);小鼠脾脏及淋巴结组织中,EMS组、MTX组Th17细胞表达比例显著降低($P<0.01$),Treg细胞的表达比例显著增加($P<0.01$)。结论:EMS通过调节Th17/Treg平衡,抑制CIA小鼠中Th17细胞的表达,促进Treg细胞的表达,进而治疗RA。

[关键词] 二妙散; 胶原诱导型关节炎; 辅助性T细胞17(Th17)/调节性T细胞(Treg); 分化

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R684.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)02-0066-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20222338

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20221017.1632.001.html>

[网络出版日期] 2022-10-18 11:04

Effect of Ermiaosan on Expression of Th17/Treg Cells in DBA/1 Mice with Collagen-induced Arthritis

HE Lianhua^{1,2,3}, LUAN Huijie¹, HE Juan¹, WANG Xiaocheng¹, HU Yiping¹, WANG Qingwen^{1*}

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

2. The Fourth Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen 518033, China; 3. Shenzhen China Resources Sanjiu Medicine Trading Co. Ltd., Shenzhen 518109, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of classic prescription Ermiaosan (EMS) on the differentiation of T helper 17 (Th17) /regulatory T (Treg) cells in collagen-induced arthritis (CIA) DBA/1 mice.

[收稿日期] 2022-07-08

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82204712);深圳市炎症与免疫性疾病重点实验室项目(ZDSYS20200811143756018);广东省中医药局科研项目(20211333)

[第一作者] 何莲花,博士后,助理研究员,从事中药抗类风湿关节炎相关研究,E-mail:helianhua126@126.com

[通信作者] *王庆文,博士,教授,主任医师,博士生导师,博士后合作导师,从事风湿免疫病的诊断与治疗,E-mail:wqw_sw@163.com

Method: DBA/1 mice were randomized into normal group, CIA group, EMS (5.4 g·kg⁻¹) group, and methotrexate (MTX, 0.5 mg·kg⁻¹) group according to the body weight. DBA/1 mice in CIA group, EMS group, and MTX group were immunized with equal volume of bovine type II collagen and complete Freund's adjuvant on the first day and were immunized with equal volume of bovine type II collagen and incomplete Freund's adjuvant on the 21st day to induce CIA. On the day of the secondary immunization, intragastric administration started and lasted 28 days (three times/week for MTX group, and once/day for other groups). The symptoms of CIA mice such as joint redness and swelling were observed from the 22nd day, and the arthritis was scored. After the sampling on the 49th day, synovitis of CIA mice was observed based on hematoxylin-eosin (HE) staining. Double-labeling immunofluorescence (IF) method was used to detect the expression of Th17 cell marker IL-17 and Treg cell marker forkhead transcription factor P3 (FoxP3) in CD4⁺T cells in CIA mouse joints. The proportion of Th17 and Treg cells in the spleen and lymph nodes of mice was detected by flow cytometry. **Result:** Compared with the normal group, CIA group had obvious synovitis, disordered joint structure, severely damaged articular cartilage and bone, serious bone erosion ($P<0.01$), high Th17/Treg value in joint tissue ($P<0.01$), high proportion of Th17 cells in spleen and lymph nodes ($P<0.01$), and low proportion of Treg cells ($P<0.01$). Compared with CIA group, EMS group and MTX group had normal joint structure, mild bone erosion and bone destruction, complete and smooth joint surface, low Th17/Treg value ($P<0.01$), low proportion of Th17 cells in spleen and lymph nodes ($P<0.01$), and high proportion of Treg cells in spleen and lymph nodes ($P<0.01$). **Conclusion:** EMS regulates the balance of Th17/Treg, inhibits the expression of Th17 cells, and promotes the expression of Treg cells in CIA mice, thereby exerting therapeutic effect on RA.

[Keywords] Ermiaosan; collagen-induced arthritis; T helper 17 (Th17)/regulatory T (Treg) cells; differentiation

类风湿关节炎(RA)是全身性难治性自身免疫性疾病,以侵蚀性关节炎为主要临床特征,最终可导致关节破坏和畸形^[1]。虽然RA一般情况下不是致命的疾病,但与RA相关的并发症如心脏病和呼吸道问题可导致死亡率增加。RA影响了全球0.5%~1%的人口^[2]。研究表明我国RA的患病率是0.4%,总患病人数约有500万^[3]。且RA好发于20~40岁的青壮年,且女性约是男性的2~3倍。RA被称之为“不死的癌症”,其严重危害人类健康和生存质量,从而给社会和家庭带来严重的负担。RA的发病机制由于其复杂性,至今尚未完全阐明,目前也无理想的治疗药物。目前临床常用的治疗药物要么价格昂贵,要么使用不方便,要么不良反应大,因此寻找一种价廉物美使用方便的药物是目前的重点和难点。

中医药在治疗疑难杂症方面优势明显,已有多种中药方剂对RA有疗效的报道。由苍术和黄柏所组成的二妙散临床常用于治疗RA等,其最早见于《世医得效方》卷九,名为苍术散,《丹溪心法》更名为二妙散。二妙散具有清热燥湿功效,主湿热下注,筋骨疼痛,脚膝无力;或足膝红肿热痛等证。由于其抗炎作用,二妙散被广泛用于治疗RA。现代

医学研究也证明,二妙散可有效作用于实验性RA^[4]。且较多的研究表明,二妙散可有效作用于RA中的免疫细胞,如二妙散可抑制大鼠骨髓来源的巨噬细胞M1的极化^[5]。

随着学者们对RA研究的深入,研究发现调节性T(Treg)细胞和辅助性T细胞(Th)17免疫调节异常,尤其是两者平衡失调,是RA发病机制研究的热点。Th17细胞主要分泌白细胞介素(IL)-17,主要介导炎症反应过程,是RA发病过程中的主要效应细胞;Treg细胞主要通过分泌转化生长因子(TGF)- β 、IL-10等发挥作用,是具有独特调节作用的免疫抑制细胞^[6]。两种细胞的分化发育相互制约,Th17细胞的增多,Treg细胞的减少,从而使Th17/Treg比例失衡,而出现滑膜炎、关节破坏、骨侵蚀等,加剧RA的发生、发展。近年来,中医药针对Th17/Treg失衡的治疗发现,阻止Th17对RA的致病作用,提高Treg细胞对RA的保护作用,调节Th17/Treg的平衡成为治疗RA的新途径。因此,本研究针对Th17/Treg细胞平衡在RA中的重要作用,用DBA/1小鼠建立胶原诱导型关节炎(CIA),并探讨二妙散对CIA小鼠中Th17/Treg细胞分化的影响。

1 材料

1.1 动物 实验所有动物购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 20只, 雄性, SPF级DBA/1小鼠, 体质量18~20 g, 合格证号SCXK(沪)2017-0005。动物饲养于深圳北京大学香港科技大学医学中心实验动物中心SPF级动物房, 本实验由深圳北京大学香港科技大学医学中心实验动物福利伦理委员会批准, 编号为2020-046。

1.2 药物与试剂 黄柏及苍术(北京同仁堂, 货号分别为73980901、180515009), 完全弗氏佐剂(CFA)、不完全弗氏佐剂(IFA)及牛Ⅱ型胶原(美国Chondrex, Inc公司, 货号分别为7001、7002、20022), 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ZLI-9610、ZLI-9613), 甲氨蝶呤(MTX, 上海源叶生物科技有限公司, 批号S18026), CD4免疫荧光抗体、叉头框转录因子P3(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), 488山羊抗兔荧光二抗、594山羊抗小鼠荧光二抗(美国Abcam公司, 批号分别为ab150077、ab150116), 细胞刺激剂(美国Invitrogen公司, 批号00-4975), CD4、转录因子缓冲液、IL-17、FoxP3流式抗体(美国BD公司, 批号分别为553730、562574、560814、560403)。

1.3 仪器 Tec 2500型病理组织漂烘仪(江苏常州郝思琳公司), DM18型倒置荧光显微镜(德国Leica公司), HM315型石蜡切片机(美国Thermo Fisher公司), BMJ-1B型组织冰冻台及包埋机(天津天利航空机电有限公司), Tec-2500型病理组织漂烘仪(江苏常州郝思琳公司), CytoFLEX S型流式分析细胞仪(美国Beckman公司)。

2 方法

2.1 二妙散的制备 二妙散由黄柏和苍术组成, 均购自北京同仁堂药店, 饮片均由广州中医药大学吴锦俊副研究员鉴定为正品。取组成二妙散的中药(黄柏和苍术)5剂, 加入12倍于药材的水, 将全部药材没过水面, 并浸泡0.5 h后, 开大火煮, 沸后转小火继续煎煮1 h, 待凉后, 用无菌纱布双层过滤, 得到煎液Ⅰ; 加8倍水于上述药渣中, 将所有药渣全部没过液面, 重复上面的步骤, 得到煎液Ⅱ; 将此煎液Ⅰ及Ⅱ混合, 大火加热浓缩至1 g·mL⁻¹备用。

2.2 CIA模型的制备^[4,6] 取适量CFA或IFA弗氏佐剂(第1次免疫加CFA, 第2次免疫时加IFA)加至10 mL软管中, 全程均在冰浴中进行。手持匀浆机

在最低档逐滴将等体积牛Ⅱ型胶原溶液加入佐剂中。用手持匀浆机进行乳化, 乳化至以滴加水不扩散为度, 整个过程保持冰浴。第1次免疫于尾根注射乳化好的胶原, 0.1 mL/只, 标记为第1天。第2次免疫于尾根部避开第1次免疫的地方注射乳化胶原, 0.1 mL/只, 标记为第21天。

2.3 动物分组及给药 将20只DBA/1小鼠按体质量随机分为正常组、CIA组, 二妙散组及MTX组, 每组5只。于第2次免疫当天(第21天)开始给药, 二妙散组及MTX组按10 mL·kg⁻¹给予灌胃, 同时给与正常组及CIA组10 mL·kg⁻¹生理盐水灌胃, MTX组按0.5 mg·kg⁻¹每周3次, 其余各组每天给药, 共给药28 d, 于第49天取材。二妙散原文组方记载为“黄柏(炒)、苍术(米泔水浸, 炒)等份(各15 g)”, 因此本实验根据原方组成, 二妙散的生药量为30 g。根据人和动物的体表面积计算法、不同种类动物之间药物剂量换算法, 计算小鼠实验剂量为5.4 g·kg^{-1[7-9]}。

2.4 小鼠关节滑膜组织病理学观察^[4,10] 小鼠麻醉取血后, 从股骨大转子处将小鼠双后肢取下, 4%多聚甲醛固定72 h, 脱钙、冲洗、乙醇逐级脱水、二甲苯透明、包埋、按厚度5 μm进行切片。之后进行苏木素-伊红(HE)染色, 苏木素3~8 min, 伊红2~10 min, 乙醇脱水及透明, 中性树胶封片。观察每只小鼠的关节炎严重程度, 采用3分制进行评估^[11]: 0分, 正常踝关节; 1分, 正常滑膜, 偶尔有单核细胞; 2分, 有几层扁平至圆形滑膜衬里细胞和散在的单核细胞并伴有单核细胞的密集浸润; 3分, 滑膜明显增生, 有3层或多层松散排列的衬里细胞和单核细胞密集浸润, 或伴有血管翳和关节软骨和软骨下骨侵蚀。

2.5 免疫荧光双染法检测小鼠关节中Th17和Treg的表达^[9] 按2.4项方法进行脱蜡、水化和柠檬酸钠微波抗原修复后, 用免疫荧光专用封闭血清于室温下进行封闭约20 min; 倾倒入封闭液, 按CD4 1:50, IL-17 1:50及FoxP3 1:50稀释抗体后, 根据组织块大小滴加一抗(稀释后的CD4、IL-17及FoxP3), 4℃过夜孵育; 滴加免疫荧光二抗, 室温避光孵育1 h; DAPI室温孵育10 min, 倾去多余液体, 封片后拍照。

2.6 流式细胞术检测脾脏中Th17细胞和Treg细胞的比例^[12] 取出小鼠脾脏, 磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗脾脏, 磨碎组织, 用PBS将磨碎的组织细胞悬液冲入离心管。70 μm尼龙网过滤单细胞悬液至新的离心管, 裂解红细胞1~2次, 再用70 μm尼龙网过滤单细胞悬液至新的离心管并做好标记。于4℃离心机300×g离心5 min(离心半径9.6 cm, 下同), 小心

吸取上清丢弃,加入PBS 200 μL ,吹打重悬管中单细胞。将上述细胞分2管分别进行Th17及Treg检测。用含离子霉素、PMA和BFA的细胞刺激剂进行体外刺激,于37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中孵育4 h,PBS洗1次,加入CD4流式抗体0.5 μL ,室温下避光孵育0.5 h,离心弃上清,按照细胞膜破膜试剂盒中的操作说明对上述细胞进行破膜操作,加入抗小鼠IL-17/FoxP3流式抗体1 μL ,室温避光孵育20 min;加入破膜工作缓冲液1 mL,离心弃上清,PBS重悬,上机检测。

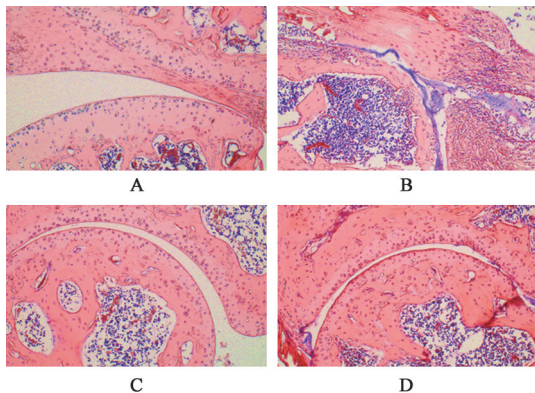
2.7 流式细胞术检测淋巴结Th17细胞和Treg细胞的比例^[9] 小鼠麻醉取血后,取小鼠淋巴结(腋下4个、腹股沟2个、腠窝2个及尾根部2个的淋巴结,每只小鼠共取10个),磨碎淋巴结,用PBS将磨碎的组织细胞悬液冲入离心管。70 μm 尼龙网过滤单细胞悬液至新的离心管并做好标记。于4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机300 \times g离心5 min,弃上清,用PBS 200 μL 重悬单细胞。余下步骤同2.6项。

2.8 统计方法 所有统计在SPSS 16.0软件中进行分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对CIA小鼠关节滑膜中组织病理学的影响

与正常组小鼠膝关节比较,CIA组小鼠膝关节结构不清楚,关节面不完整且不光滑,关节腔可见大量炎症细胞浸润,且关节骨和软骨破坏严重,组织学评分亦显著升高($P < 0.01$);与CIA组比较,二妙散组和MTX组膝关节的结构均相对正常,可见相对完整光滑的关节面,未见明显炎症细胞浸润的关节腔,骨破坏较轻或几乎未见,组织学评分亦均显著降低($P < 0.01$)。见图1、表1。



注:A.正常组;B.CIA组;C.二妙散组;D.MTX组(图2-图5同)

图1 二妙散对CIA小鼠膝关节组织病理学的影响(HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of Erniaosan on histopathology of knee joint in CIA mice (HE, $\times 200$)

表1 二妙散对CIA小鼠膝关节中组织病理学的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Effect of Erniaosan on histopathology of knee joint in CIA mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	组织学评分/分
正常组		0.000 \pm 0.000
CIA组		2.893 \pm 0.428 ¹⁾
二妙散组	5.4	0.648 \pm 0.613 ²⁾
MTX组	5 $\times 10^{-4}$	0.836 \pm 0.541 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与CIA组比较²⁾ $P < 0.01$ (表2-表4同)

3.2 对CIA小鼠关节组织Th17和Treg表达的影响

与正常组比较,CIA组小鼠关节组织中CD4⁺IL-17⁺及CD4⁺FoxP3⁺的表达增多,CD4⁺IL-17⁺较CD4⁺FoxP3⁺增多明显;与CIA组比较,二妙散组及MTX组两组小鼠关节中CD4⁺IL-17⁺及CD4⁺FoxP3⁺表达减少,CD4⁺IL-17⁺较CD4⁺FoxP3⁺减少明显。与正常组比较,CIA组小鼠关节组织中Th17/Treg值显著升高($P < 0.01$),与CIA组比较,二妙散组及MTX组小鼠关节中Th17/Treg值显著降低($P < 0.01$)。见图2和图3、表2。

3.3 对CIA小鼠脾脏中Th17细胞及Treg细胞表达的影响

与正常组比较,CIA组脾脏明显肿大,且颜色加深;与CIA组比较,二妙散组脾脏与正常组大小接近,颜色鲜红;MTX组脾脏在大小与颜色与CIA组均无明显差异。流式细胞术结果显示,与正常组比较,CIA组脾脏Th17的细胞表达比例显著增高($P < 0.01$),与CIA组比较,二妙散组及MTX组脾脏中Th17细胞表达比例显著降低($P < 0.01$)。与正常组比较,CIA组Treg细胞比例显著减少($P < 0.01$);与CIA组比较,二妙散组及MTX组脾脏中Treg细胞表达比例显著增加($P < 0.01$)。见图4、表3。

3.4 对CIA小鼠淋巴结Th17细胞及Treg细胞表达的影响

与正常组比较,CIA组淋巴结(每组10个,包括腋下4个、腹股沟2个、腠窝2个及尾根部2个的淋巴结)明显肿大,变化最大的是腹股沟淋巴结,其次依次分别是腋下淋巴结、腠窝淋巴结及尾根淋巴结;与CIA组淋巴比较,二妙散组及MTX组淋巴结肿胀稍有减轻;流式细胞仪检测结果显示,二妙散组与MTX组均可有效作用于CIA小鼠淋巴结中T细胞,可显著降低Th17的比例,升高Treg的比例($P < 0.01$)。见图5、表4。

4 讨论

二妙散之名最早见于元·朱丹溪《丹溪心法》:“黄柏(炒)苍术(米泔浸炒)各等分,上二味研为末,

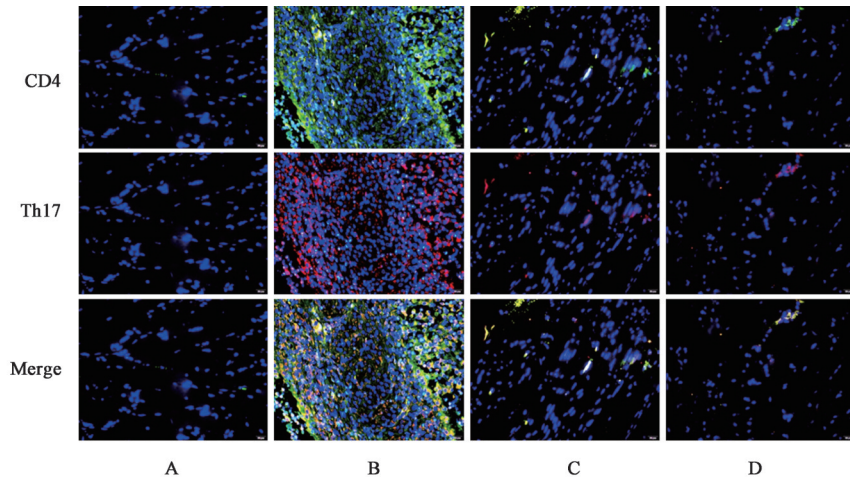


图2 二妙散对CIA小鼠关节组织CD4细胞中IL-17的表达的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 2 Effect of Ermiaosan on expression of IL-17 in CD4 cell of joint tissue in CIA mice (IF,×400)

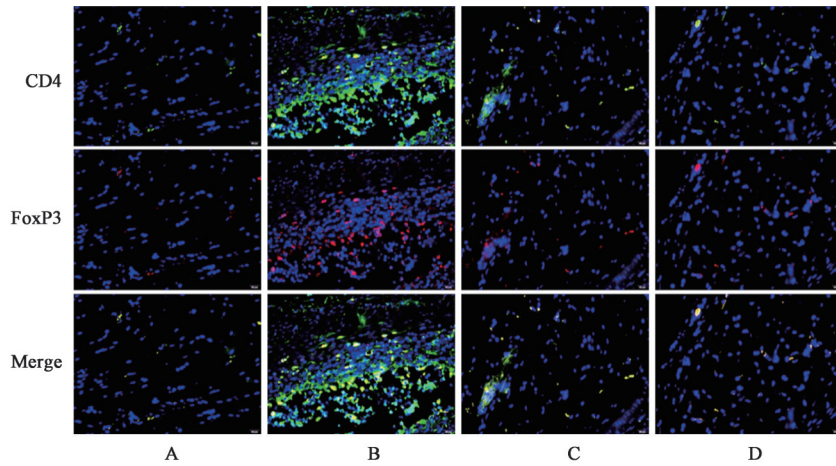


图3 二妙散对CIA小鼠关节组织CD4细胞中FoxP3的表达的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 3 Effect of Ermiaosan on expression of FoxP3 in CD4 cell of joint tissue in CIA mice (IF,×400)

表2 二妙散对CIA小鼠关节CD4细胞中Th17/Treg的影响
($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Effect of Ermiaosan on expression of Th17/Treg in CD4 cell of joint tissue in CIA mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Th17/Treg
正常组		0.000±0.000
CIA组		0.400±0.286 ¹⁾
二妙散组	5.4	2.864±0.524 ²⁾
MTX组	5×10 ⁻⁴	1.634±0.368 ²⁾

沸汤,入姜汁调服。”明·吴昆所撰《医方考》记载:“苍术妙于燥湿,黄柏妙于去热,二物皆有雄壮之性,亦简易之方也。”清·王晋三所著《绛雪园古方选注》:“二妙散,偶方之小治也。苍术生用入阳明经,能发二阳之汗。黄柏炒黑入太阴经,能除至阴之湿。一生一熟,想为表里,治阴分之湿热,有如鼓应桴之妙。”清·张秉成《成方便读》:“二妙丸苍术黄柏,治湿盛于下焦,而成痿证者。方中苍术,辛苦而

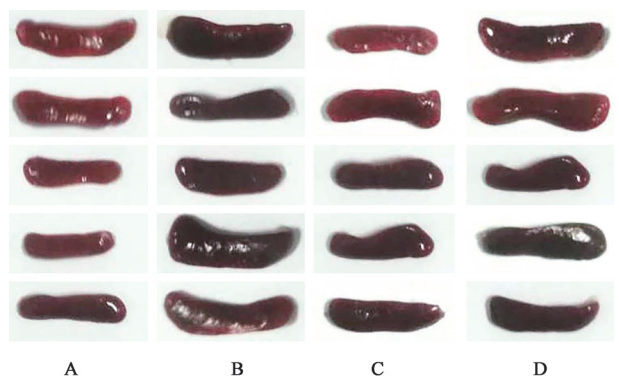


图4 二妙散对CIA脾脏大小和颜色的影响

Fig. 4 Effect of Ermiaosan on size and color of CIA spleen

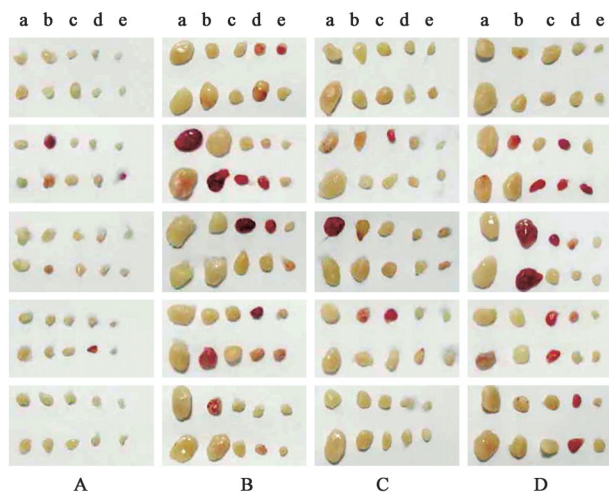
温,芳香而燥,直达中州,为燥湿强脾之主药。但病既传于下焦,又非治中可愈,故以黄柏苦寒下降之品,开入肝肾直清下焦之湿热,标本并治,中下两宜。如邪气盛而正不虚者,即可用之。”

RA是一种起源于多种因素的慢性自身免疫性疾病,以关节炎及骨和软骨受损为特征,RA的发病

表3 二妙散对CIA小鼠脾脏细胞中Th17和Treg的表达比例的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 3 Effect of Ermiaosan on expression of Th17 and Treg in spleen cell of CIA mice ($\bar{x}\pm s, n=5$) %

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Th17	Treg
正常组		2.346±0.209	30.256±0.214
CIA组		6.015±0.187 ¹⁾	13.364±0.605 ¹⁾
二妙散组	5.4	2.312±0.401 ²⁾	22.364±0.427 ²⁾
MTX组	5×10 ⁻⁴	2.435±0.346 ²⁾	21.548±0.354 ²⁾



注:a、b.小鼠腹股沟淋巴结;c、d.小鼠腋窝淋巴结;e.小鼠尾根淋巴结

图5 二妙散对CIA淋巴结的影响

Fig. 5 Effect of Ermiaosan on lymph in CIA mice

表4 二妙散对CIA小鼠淋巴结细胞中Th17和Treg的表达比例的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 4 Effect of Ermiaosan on expression of Th17 and Treg in lymph cell of CIA mice ($\bar{x}\pm s, n=5$) %

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Th17	Treg
正常组		2.634±0.211	31.250±0.321
CIA组		6.128±0.302 ¹⁾	12.364±0.208 ¹⁾
二妙散组	5.4	2.451±0.258 ²⁾	23.541±0.265 ²⁾
MTX组	5×10 ⁻⁴	2.651±0.244 ²⁾	20.365±0.351 ²⁾

机制目前尚不完全清楚。现在人们普遍认为, Th17和Treg反应之间的失衡与RA的发展密切相关。Treg与Th17之间关系复杂, 两者只有维持动态平衡, 才能保证机体处于免疫稳态。首先在功能上, 两者相互拮抗, Th17可促进炎症反应, 而Treg具有抗炎反应和维持机体自身免疫耐受的功能; 其次在分化上相互抑制, 在不同炎症因子存在时, 初始CD4⁺T细胞的完全不同^[13]。WANG等^[14]研究发现RA患者的CD4⁺T及Th17的百分比较高, 且RA患者的 γ 干扰素(IFN- γ)、IL-4、IL-17A和IL-22水平升

高, 与正常人相比, 高疾病活动性患者的Th17百分比较高; 与正常人比较, 低、中、高疾病活动期Treg细胞百分比降低, 而IL-17A水平升高, 由此可见RA患者存在Th17、Treg亚群失调。Treg细胞在预防自身免疫中起关键作用。NIU等^[15]发现与健康对照组比较, 在DAS28 \leq 3.2的RA患者中, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg细胞绝对计数和比例显著降低。

随着CD4⁺T细胞亚群中Th17及Treg的发现及其在RA发病机制作用研究的不断深入, 医学研究者越来越重视Th17的促炎作用、Treg的抑炎作用及Th17/Treg细胞平衡与RA发生发展的密切联系^[16], 因而现阶段治疗RA的热点也聚焦在Th17/Treg细胞上。研究发现, 通过调节体内Th17/Treg平衡, 可实现有效控制RA的发病及病情进展, 这为RA的防治提供了新的方向^[16]。类黄酮化合物花青素通过调节Th17/Treg平衡, 从而减轻RA的疾病严重程度^[17]。选择性CXCR3拮抗剂AMG487通过下调T盒子转录因子(T-bet)、IL-17A、孤独核受体(ROR γ T)和IL-22, 上调FoxP3和IL-10 mRNA和蛋白水平发挥AMG487在CIA动物模型中的作用, 并支持CXCR3拮抗剂作为新的炎症和关节炎的治疗策略^[18]。金属硫蛋白-1通过改变Th17/Treg平衡而表现为参与RA发病机制的免疫抑制的蛋白^[19]。DAI等^[20]通过组织病理学检查、爪肿胀和多关节炎指数评估、细胞增殖与活性检测(CCK-8)、流式细胞仪及酶联免疫吸附测定法(ELISA)证实二妙散通过调节细胞因子平衡及Th17和Treg细胞的比例, 在SD大鼠佐剂性关节炎模型中显示出抗关节炎活性。

一项研究二妙散和组成该方的单味药黄柏和苍术对植皮小鼠皮片存活时间和细胞免疫功能的影响的研究表明用药各组移植皮片的半数生存期均有明显的延长, 二妙散、黄柏和苍术可在一定程度上抑制植皮小鼠的细胞免疫功能, 且其抑制强度由强到弱分别为二妙散, 黄柏, 苍术^[21]。陈婷等^[22]通过提取和分离二妙散水提物, 并其定性分析其有效部位, 发现二妙散的免疫活性成分之一是生物碱类组分。本文章的实验结果显示二妙散可抑制CIA小鼠中Th17细胞的表达, 促进Treg细胞的表达。然其机制有待进一步研究。近期有较多的学者对二妙散的抗RA机制进行研究。如采用网络药理学和分子对接方法, 对二妙散调治RA的核心活性成分及其治类风湿关节炎的生物学通路进行了研究, 初步揭示了二妙散通过多成分、多靶点、多通路调控的特点发挥治疗类风湿关节炎的分子药理

学作用机制^[23]。这为后期的机制研究提供了方向。

综上,二妙散通过调节 Th17/Treg 平衡,抑制 CIA 小鼠中 Th17 细胞的表达,促进 Treg 细胞的表达,进而治疗 RA。然而其机制有待进一步研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] YAP H Y, TEE S Z, WONG M M, et al. Pathogenic role of immune cells in rheumatoid arthritis: Implications in clinical treatment and biomarker development [J]. *Cells*, 2018, doi: 10.3390/cells7100161.
- [2] SMOLEN J S, ALETAHA D, MCINNES I B. Rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2016, 388(10055): 2023-2038.
- [3] 秦淑霞,易利丹,李斯妮,等. 我国类风湿性关节炎治疗的药物经济学评价研究现状[J]. *中国医院药学杂志*, 2022, 42(2): 172-179.
- [4] HE L H, QIN Q X, HE J, et al. Ermiaosan inhibits angiogenesis in rheumatoid arthritis by suppressing JAK/STAT signaling pathways [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, doi: 10.1155/2020/4381212.
- [5] 何莲花,覃清霞,王晗,等. 二妙散对大鼠骨髓来源的巨噬细胞 M1/M2 极化的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(11): 71-77.
- [6] 李平顺,周孟茹,王钢,等. 中医药干预类风湿关节炎 Th17/Treg 平衡的研究进展[J]. *中国医药导刊*, 2019, 21(7): 421-425.
- [7] 王泽,高玉亭,李振,等. 二妙散对 CIA 大鼠关节 NF- κ B p50 和 ERK1/2 表达特性的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(16): 1951-1956.
- [8] 李振,郝慧琴,王泽,等. 经方二妙散对胶原诱发关节炎大鼠脾和关节中 CHRNA7 表达的影响[J]. *山西医药杂志*, 2020, 49(6): 647-650.
- [9] 王勇. 二妙散对类风湿关节炎大鼠抗炎免疫效果研究[J]. *中国民族民间医药*, 2010, 19(18): 24.
- [10] 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.
- [11] PRADO C, UGALDE V, GONZALEZ H, et al. STAT3 activation in combination with NF- κ B inhibition induces tolerogenic dendritic cells with high therapeutic potential to attenuate collagen-induced arthritis [J]. *J Immunol Res*, 2019, doi: 10.1155/2019/1982570.
- [12] 栾慧杰,何莲花,何娟,等. 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[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(4): 76-83.
- [13] 肖勇洪,万春平,彭江云. 针对 Th17/Treg 平衡的中医药抗类风湿关节炎研究进展[J]. *江西中医药*, 2017, 48(6): 68-71.
- [14] WANG T, RUI J, SHAN W, et al. Imbalance of Th17, Treg, and helper innate lymphoid cell in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis [J]. *Clin Rheumatol*, 2022, 41(12): 3837-3849.
- [15] NIU H Q, LI Z H, ZHAO W P, et al. Sirolimus selectively increases circulating Treg cell numbers and restores the Th17/Treg balance in rheumatoid arthritis patients with low disease activity or in DAS28 remission who previously received conventional disease-modifying anti-rheumatic drugs [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2020, 38(1): 58-66.
- [16] 张甲倩,张升校,乔军,等. 辅助性 T 细胞 17/调节性 T 细胞失衡在类风湿关节炎发病与治疗的研究进展[J]. *中国药物与临床*, 2022, 22(5): 465-469.
- [17] SAMARPITA S, RASOOL M. Cyanidin restores Th17/Treg balance and inhibits T follicular helper cell differentiation via modulation of ROCK2 signaling in an experimental model of rheumatoid arthritis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 101(Pt B): 108359.
- [18] BAKHEET S A, ANSARI M A, NADEEM A, et al. CXCR3 antagonist AMG487 suppresses rheumatoid arthritis pathogenesis and progression by shifting the Th17/Treg cell balance [J]. *Cell Signal*, 2019, 64: 109395.
- [19] SUN J, LI L, LI L, et al. Metallothionein-1 suppresses rheumatoid arthritis pathogenesis by shifting the Th17/Treg balance [J]. *Eur J Immunol*, 2018, 48(9): 1550-1562.
- [20] DAI X, YANG D, BAO J, et al. Er Miao San, a traditional Chinese herbal formula, attenuates complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats by regulating Th17/Treg cells [J]. *Pharm Biol*, 2020, 58(1): 157-164.
- [21] 邱全璞,杨燕玲. 二妙散对植皮小鼠细胞免疫功能的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 1994(1): 34-36.
- [22] 陈婷,李昌勤,徐强,等. 二妙散免疫抑制活性成分的研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 1995(1): 7-10.
- [23] 赵雨薇,高玉亭,李振,等. 二妙散治疗类风湿关节炎的作用机制[J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(5): 742-748.

[责任编辑 孙丛丛]