

双氢青蒿素对 AA 大鼠外周血 T 淋巴细胞的调节作用

易剑峰^{*}, 易少波, 雷波
(宜春学院 美容医学院, 江西 宜春 336000)

[摘要] 目的:探讨双氢青蒿素对佐剂性关节炎(AA)大鼠外周血 T 细胞的调节作用。方法:采用佐剂性关节炎动物模型,将体重 160~180 g 的 SD 大鼠随机设为 6 组:正常对照组、模型对照组、甲氨蝶呤对照组($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、双氢青蒿素高、中、低剂量($11.2, 5.6, 2.8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,造模 2 周后灌胃给药,连续给药 28 d,并采用流式细胞术检测外周血 T 淋巴细胞亚群、酶联免疫法检测血清白介素-4(IL-4)、干扰素- γ (IFN- γ)的水平。结果:相较于正常组,模型组外周血 $\text{CD4}^{+}\text{T}$, $\text{CD4}^{+}\text{T}/\text{CD8}^{+}\text{T}$ 和血清 IFN- γ 水平显著升高($P<0.01$),血清 IL-4 水平显著降低($P<0.01$), $\text{CD3}^{+}\text{T}$, $\text{CD8}^{+}\text{T}$ 则无明显变化;高、中剂量双氢青蒿素组 $\text{CD4}^{+}\text{T}$ 所占百分比分别是 $(34.81\pm3.80)\%$, $(34.92\pm5.14)\%$, $\text{CD4}^{+}\text{T}/\text{CD8}^{+}\text{T}$ 分别是 2.21 ± 0.43 , 2.27 ± 0.48 , 与模型组相比显著降低($P<0.05$, $P<0.01$);双氢青蒿素高、中、低剂量组血清 IFN- γ 水平分别是 (15.90 ± 2.05) , (16.27 ± 2.11) , $(18.15\pm2.15)\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, 与模型组相比显著降低($P<0.01$);IL-4 水平分别是 (40.21 ± 4.89) , (40.04 ± 4.56) , $(34.81\pm4.02)\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, 与模型组相比显著升高($P<0.01$),其调节作用在 $2.8\sim5.6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 范围呈剂量依赖性($P<0.05$)。结论:双氢青蒿素能有效改善 AA 大鼠 T 细胞功能紊乱状况,为其应用于类风湿关节炎治疗奠定实验基础。

[关键词] 双氢青蒿素; T 淋巴细胞; 佐剂性关节炎

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)18-0203-03

Effect of Dihydroartemisinin on Immune-regulation
of T-lymphocytes from Peripheral Blood in AA Rats.

Yi Jian-feng^{*}, Yi Shao-bo, LEI Bo
(Cosmetology Medical College, Yichun University, Yichun 336000, China)

[Abstract] Objective: To study the effect of dihydroartemisinin on immune-regulation of T-lymphocytes from peripheral blood in adjuvant-induced arthritis (AA) rats. Method: Sprague Dawley rats with a mean weight of 160-180 g were randomly divided into 6 groups, including normal group, AA model group, methotrexate group ($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), dihydroartemisinin high-dose, medium-dose and low-dose group ($11.2, 5.6, 2.8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). The rat adjuvant arthritis model were induced. The drugs were administrated by ig for consecutive 28 days after inducing AA model. T-lymphocyte in peripheral blood was detected by flow cytometry, and the levels of interferon- γ (IFN- γ) and interleukin-4 (IL-4) in serum were measured by ELISA on AA animal model treated bydihydroartemisinin. Result: Compared with the normal group, the ratio of $\text{CD4}^{+}\text{T}$, $\text{CD4}^{+}\text{T}/\text{CD8}^{+}\text{T}$ from peripheral blood in model group and IFN- γ levels in serum were significantly increased ($P<0.01$), and the levels of IL-4 were significantly decreased ($P<0.01$). In high and medium dose group, the percentages of $\text{CD4}^{+}\text{T}$ was $(34.81\pm3.80)\%$, $(34.92\pm5.14)\%$, the ratio of $\text{CD4}^{+}\text{T}/\text{CD8}^{+}\text{T}$ was 2.21 ± 0.43 , 2.27 ± 0.48 , respectively, compared with model group they were significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). In dihydroartemisinin three dose group, the levels of IFN- γ were (15.90 ± 2.05) , (16.27 ± 2.11) , $(18.15\pm2.15)\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, and the levels of IL-4 were (40.21 ± 4.89) , (40.04 ± 4.56) , $(34.81\pm4.02)\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, compared with the model group they had significant changes ($P<0.01$). For IL-4, dihydroartemisinin's effect

[收稿日期] 20111201(013)
[基金项目] 江西省教育厅科技项目(GJJ08409)
[通讯作者] ^{*} 易剑峰,副教授,硕士,从事类风湿关节炎发病机理与中医药现代化研究,Tel:0795-3201300,E-mail:rainbowyjf@126.com

showed a dose-dependent manner at concentrations between 2.8-5.6 mg · kg⁻¹ (*P* < 0.05). **Conclusion:** Dihydroartemisinin could effectively improve the immunity mess in T-lymphocytes from peripheral blood in AA rats, which is useful for curing rheumatoid arthritis.

[**Key words**] dihydroartemisinin; T-lymphocytes ; AA

类风湿关节炎(RA)是一种以滑膜炎症并关节软骨破坏为主要特征的自身免疫性疾病,抑制免疫是治疗 RA 的主要手段,现有临床应用的免疫抑制药物均被普遍观察到具有相当大的毒副作用,如产生肾毒性、肝脏毒性、感染、恶性肿瘤等,因此寻找新型的高效低毒药物用于联合或交替用药具有重要意义。青蒿素是从中药青蒿提取的有效成分,除抗疟功效外,近年来发现青蒿素类药物具有治疗类风湿关节炎(RA)作用。青蒿素类药物具有低毒的特点,双氢青蒿素(dihydroartemisinin,DHA)是青蒿素的一个重要衍生物,研究显示双氢青蒿素是青蒿素类药物在体内的主要活性代谢产物,可能此类药物都是通过其在体内起作用^[1]。T 淋巴细胞功能异常是在 RA 的病理发展中十分关键,临床上经常将 T 淋巴细胞功能作为观察药物疗效的重要指标,体外实验证实双氢青蒿素能抑制 CD4⁺T 细胞增殖^[2],因此有必要在动物体内进一步探讨双氢青蒿素对 T 淋巴细胞免疫调节作用。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠,清洁级,6~8 周龄,体重(160~180)g,由南昌大学医学院实验动物中心提供,许可证号 SYXK(赣)2006-0001,本校动物室饲养。

1.2 药物 双氢青蒿素片(北京万辉药业集团,批号 070711),甲氨蝶呤片(上海信谊药厂有限公司,批号 070803),弗氏完全佐剂(Gibco 公司),白介素-4(IL-4)、干扰素-γ(INF-γ) ELISA 检测试剂盒(南京建成生物工程有限公司),CD3,CD4,CD8 单克隆抗体(Caltag 公司)。

1.3 仪器 Multiskan MK3 型酶标仪(Thembo Labsystems),EPICS(XL)型流式细胞仪(Coulter 公司)。

2 方法

2.1 分组及给药 将实验大鼠随机分为 6 组,每组 10 只,分别为空白对照组、模型组、双氢青蒿素高、中、低剂量组(11.2,5.6,2.8 mg · kg⁻¹)、甲氨蝶呤组(1 mg · kg⁻¹)。造模 2 周后开始给药,双氢青蒿素按 10 mL · kg⁻¹ ig,1 次/d;甲氨蝶呤组每周 2 次,连续给药 28 d;正常和模型组灌服同体积的蒸馏水。

所有动物在给药结束后处死。

2.2 造模 每只 SD 大鼠右后足跖皮内注射 0.1 mL 弗氏完全佐剂诱导关节炎(AA),正常组足跖皮内注射同体积的生理盐水。

2.3 指标检测

2.3.1 外周血 T 淋巴细胞亚群水平测定 动物处死时眼球取血,加肝素抗凝,分别取血 50 μL 与 5 μL CD4 单克隆抗体和 5 μL CD8 单克隆抗体的离心管中震匀,4℃下保存 30 min;加入适量红细胞溶解液,1 000 r · min⁻¹离心 1.5 min,弃其上清;加入适量生理盐水以 1 000 r · min⁻¹,离心 1.5 min,反复几次,以试管底部不见红色为度,过滤后上流式细胞仪检测。

2.3.2 血清 IL-4、INF-γ 水平测定 动物处死时眼球取血,3 000 r · min⁻¹离心 30 min 后取血清。按照 ELISA 试剂盒测定说明书操作测定血清中 IL-4、INF-γ 含量。

2.4 统计学方法 统计学分析采用 SPSS 16.0 统计平台,试验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *q* 检验。*P* < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 对外周血 T 淋巴细胞亚群水平的影响 双氢青蒿素中、高剂量能够显著降低 AA 大鼠外周血 CD4⁺T 细胞的比率,而对 CD3⁺T,CD8⁺T 影响却并不明显;同时双氢青蒿素对 CD4⁺T/CD8⁺T 表现出下调趋势,但无统计学意义。见表 1。

3.2 对血清 IL-4、INF-γ 水平的影响 分析大鼠血清 IL-4、INF-γ 水平,发现双氢青蒿素 3 个剂量组都能下调 AA 大鼠血清 INF-γ 水平,并且在 2.8~5.6 mg · kg⁻¹范围与给药剂量明显相关;而 IL-4 则能显著升高,在 2.8~5.6 mg · kg⁻¹间呈明显剂量依赖性。见表 2。

4 讨论

佐剂性关节炎(AA)具有人类类风湿关节炎相似的病理特点,是研究 RA 理想的动物模型。T 淋巴细胞尤其是 CD4⁺T 细胞对 RA 病理发展具有十分关键的作用。关节炎模型鼠外周血 CD4⁺T 异常增殖,导致 CD4⁺T/CD8⁺T 细胞比例失衡,纠正失衡是 RA 治疗药物的治疗机制之一,双氢青蒿素能通

表 1 双氢青蒿素连续给药 28d 对佐剂性关节炎大鼠外周血 T 细胞亚群的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	CD3 ⁺ /%	CD4 ⁺ /%	CD8 ⁺ /%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
正常	—	44.65 ± 3.79	31.80 ± 3.84 ²⁾	16.58 ± 3.71	1.93 ± 0.36 ²⁾
模型	—	47.11 ± 5.71	43.09 ± 4.37	16.01 ± 3.09	2.81 ± 0.44
双氢青蒿素	11.2	45.45 ± 4.35	34.81 ± 3.80 ^{2,5)}	16.26 ± 4.28	2.21 ± 0.43 ¹⁾
	5.6	45.30 ± 5.11	34.92 ± 5.14 ^{2,5)}	16.14 ± 3.51	2.27 ± 0.48 ¹⁾
	2.8	46.76 ± 5.17	39.77 ± 4.59 ⁴⁾	15.81 ± 4.80	2.54 ± 0.51
甲氨蝶呤	1	44.19 ± 5.02	33.07 ± 4.71 ²⁾	15.84 ± 4.01	2.01 ± 0.49 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与甲氨蝶呤比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与双氢青蒿素 2.8 mg·kg⁻¹ 组比较⁵⁾ $P < 0.05$,甲氨蝶呤组大鼠每周给药 2 次,其余各组每天给药 1 次(表 2 同)。

表 2 双氢青蒿素连续给药 28 d

对佐剂性关节炎大鼠血清 IL-4,IFN- γ 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	ng·L ⁻¹	
		IFN- γ	IL-4
正常	—	13.61 ± 1.19 ²⁾	57.17 ± 3.75 ²⁾
模型	—	20.42 ± 2.12	21.41 ± 2.77
双氢青蒿素	11.2	15.90 ± 2.05 ^{2,3,5)}	40.21 ± 4.89 ^{2,4,5)}
	5.6	16.27 ± 2.11 ^{2,3,5)}	40.04 ± 4.56 ^{2,4,5)}
	2.8	18.15 ± 2.15 ^{2,4)}	34.81 ± 4.02 ^{2,4)}
甲氨蝶呤	1	13.59 ± 1.38 ²⁾	24.33 ± 4.71

过下调外周血 CD4⁺T 调节 CD4⁺T/CD8⁺T 比例失衡。有报道指出,青蒿素类药物抑制疟原虫或肿瘤细胞增殖是在铁元素介导下,通过分子内过氧桥裂解产生活性自由基发挥作用的,靶细胞内高铁浓度是其发挥作用的基础^[3],铁同样是 T 细胞增殖的必要物质之一^[4],双氢青蒿素能剂量依赖性地抑制 T 细胞 CD71(转铁蛋白受体)的表达^[2],这将导致 T 细胞内铁浓度降低,在一定程度上限制了药物的抗增殖功效,因此在 5.6 ~ 11.2 mg·kg⁻¹ 浓度范围内对 CD4⁺T 的抑制无明显提高。

CD4⁺T 按其功能可进一步分为 Th1,Th2 亚群,Th1 主要介导机体细胞免疫,Th2 主要介导体液免疫,INF- γ 主要由 Th1 分泌,IL-4 主要是 Th2 分泌,正常情况下,Th1,Th2 功能相互抑制且处于动态平衡中,但在 RA 中,由于免疫系统紊乱,出现 Th1,Th2 功能出现失衡,且 Th1 功能强于 Th2。本研究显示双氢青蒿素在下调 INF- γ 的同时还能明显上调 IL-4 表达,提示双氢青蒿素能对 Th0→Th1 抑制、而对 Th0→Th2 则表现为促进,进而恢复 Th1/Th2 功能平衡。Th1,Th2 的分化分别受 T-bet,GATA-3 转录因子调控,Th1/Th2 分化与 MAPA 信号通路密切相关^[5],研究发现青蒿素类药物能够影响 MAPK 信号通路,可以多重抑制 T 细胞激活过程中的效应信号转导通路^[6-7],调节不同转录因子的活性,这可能

是双氢青蒿素诱导 Th1/Th2 向右漂移的原因。

RA 在祖国医学中属于痹证范畴,其发病机制认为是外邪(风寒湿)入侵人体、并伏于肢节脉络而阻滞气血为病。青蒿味苦性寒,入肝、胆经,具有清热除湿之功,以治其本。青蒿气禀芳香,芳香药物而具苦寒之性者舍此别无他药。其味苦而不伤阳,寒而不碍湿,气芳香而化浊,质轻清而透邪,无论邪在卫分、气分、营分、血分各个阶段,不论上中下何焦,均可相机应用。故《本经》谓本品能治“留热在骨节之间”。本实验研究有利于阐释青蒿透邪外出的现代医学内涵。

[参考文献]

[1] Posner G H, Pai I H, Sur S, et al. Orally active, antimalarial anticancer artemisinin-derived trioxane dimers with high stability and efficacy[J]. J Med Chem, 2003,46(6):1060.

[2] 叶燕霞,曾耀英,黄秀艳,等. 双氢青蒿素对小鼠 T 细胞的免疫抑制作用[J]. 中国病理生理杂志,2010,26(3):417.

[3] Rosenthal P J, Meshnick S R. Hemoglobin catabolism and iron utilization by malaria parasites [J]. Mol Biochem Parasitol,1996,83(2):131.

[4] Aron P T, James F A, David B, et al. A high yield purification of the human transferrin receptor and properties of its major extracellular fragment [J]. J Biol Chem,1998,263(7):8318.

[5] 于哲,邢飞跃,曾耀英. MAPK 信号通路在诱导 Th1/Th2 分化中的作用[J]. 现代免疫学,2007,27(1):81.

[6] Zhou W L, Wu J M, Wu Q L, et al. A novel artemisinin derivatives, 3-(12- β -artemisininoxy) phenoxy succinic acid (SM735), mediates immunosuppressive effects *in vitro* and *in vivo* [J]. Acta Pharmacologica Sinica,2005,26(11):1352.

[7] Wang J X, Tang W, Yang Z S. Suppressive effect of a novel water-soluble artemisinin derivative SM905 on T cell activation and proliferation *in vitro* and *in vivo* [J]. Eur J Pharmacol,2007,564(1/3):211.

[责任编辑 聂淑琴]