

全蝎-蜈蚣对 CIA 大鼠外周血协同刺激分子 B7-1, B7-2 表达的影响

黄小英¹, 赵海梅², 左志琴², 程绍民³, 刘端勇^{2*}

(1. 江西中医学院科研处, 南昌 330004; 2. 江西中医学院科技学院, 南昌 330025;
3. 江西中医学院基础医学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 观察全蝎-蜈蚣对胶原免疫性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 大鼠外周血协同刺激分子 B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86) 表达的影响。方法: Wistar 大白鼠 60 只, 随机分成 6 组, 即正常组, 模型组, 全蝎-蜈蚣高, 中, 低剂量组, II 型胶原蛋白 (type II collagen, C II) 组。采用 II 型胶原蛋白诱导法复制大鼠关节炎模型, 并 ig 给予全蝎-蜈蚣混悬液 (0.4, 0.2, 0.1 g·kg⁻¹) 进行干预, C II 组予 C II 白冻干粉 60 μg·kg⁻¹ig 进行对照, 共计 40 d。并采用流式细胞术检测大鼠外周血单核细胞表达 CD80, CD86 情况。结果: 与正常组大鼠外周血 CD80⁺ (44.8 ± 11.61)% CD80⁺CD86⁻ (32.4 ± 9.18)% 比较, 模型组大鼠外周血 CD80⁺ 细胞 (55.7 ± 6.31)% 及 CD80⁺CD86⁻ 细胞 (43.7 ± 10.26)% 水平显著升高 (P < 0.05); 与模型组比较, 全蝎-蜈蚣中、低剂量组大鼠外周血 CD80⁺ 细胞 (46.6 ± 6.34)%, (30.8 ± 15.14)% 明显降低 (P < 0.05), 且全蝎-蜈蚣低剂量组大鼠外周血 CD80⁺CD86⁻ 细胞 (25.3 ± 12.67)% 水平显著下降 (P < 0.05)。结论: 全蝎-蜈蚣药对治疗 CIA 大鼠的作用机制可能与降低外周血单核细胞表达 CD80⁺ 及 CD80⁺CD86⁻ 分子表达水平相关。

[关键词] 全蝎; 蜈蚣; 类风湿性关节炎; B7-1; B7-2

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)14-0151-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120515.1514.006.html>

[网络出版时间] 2012-05-15 15:14

[收稿日期] 20111022(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30860377); 江西省自然科学基金项目(2009GZY0118); 江西省科技厅科技计划(20092052)

[通讯作者] *刘端勇, 硕士, 副教授, 从事自身免疫性疾病及免疫药理研究, Tel: 0791-86526385, E-mail: liuduanyong@163.com

[参考文献]

[1] 张伯礼, 王永炎. 方剂关键科学问题的基础研究—以组分配伍研制现代中药[J]. 中国天然药物, 2005, 3(5): 258.

[2] 张伯礼, 王永炎, 商洪才. 组分配伍研制现代中药的理论和方法[J]. 继续医学教育杂志, 2006, 20(19): 89.

[3] 吴凤镗. 从单方成药到“分子中药学”和组合中药学[J]. 中草药, 2002, 33(9): 769.

[4] 商洪才, 张伯礼, 王永炎, 等. 一种适用于中药小复方配伍优选设计方法的建立[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(3): 1.

[5] 吴玉生, 李士林, 王占奎, 等. ET、CGRP 对天麻钩藤饮治疗阴虚阳亢型原发性高血压疗效的评估[J]. 中国实验方剂学杂志, 1998, 4(5): 52.

[6] 江春艳, 许激扬, 卞筱泓, 等. 杜仲降血压成分的组合

及血管舒张作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 218.

[7] 许激扬, 赵芳, 卞筱泓, 等. 杜仲降压组分对大鼠胸主动脉的舒张作用[J]. 药物生物技术, 2009, 16(4): 338.

[8] 巫龙, 卞筱泓, 许激扬, 等. 降压中药有效成分组合对大鼠胸主动脉的舒张作用[J]. 西北药学杂志, 2011, 26(2): 113.

[9] Yang Yifan, Jeremy R. Theories and concepts in the composition of Chinese herbal formulas [M]. First Edition. New York: Churchill Livingstone, 2010: 1.

[10] 王阶, 郭丽丽, 王永炎, 等. 中药方剂药效(成分)组分配伍研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(1): 5.

[11] 张春晖, 张贵君, 杨晶凡, 等. 中药组方新药研究的思路与方法[J]. 中国中医药报, 2006, 10: 447.

[责任编辑 聂淑琴]

Express of B7-1 and B7-2 in Peripheral Blood from Rats with Collagen-Induced Arthritis Treated by Scorpio-Scolopendra

HUANG Xiao-ying¹, ZHAO Hai-mei², ZUO Zhi-qin², CHENG Shao-min³, LIU Duan-yong^{2*}

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Scientific Research Department, Nanchang 330004, China; 2. Jiangxi University of TCM Science and Technology College, Nanchang 330025, China; 3. Jiangxi University of TCM, College of Basic Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] Objective: To observe express of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) in peripheral blood from rats with collagen-induced arthritis (CIA) treated by Scorpio-Scolopendra. **Method:** Sixty female Wistar rats were randomly divided into 6 groups, the normal control group, the model control group, the low-dose, the middle-dose and the high-dose Scorpio-Scolopendra group (1: 1), and the type II collagen group. Rat arthritis model was induced by injection of collagen. The number of CD80⁺ and CD86⁺ cell in peripheral blood was tested by flow cytometry. **Result:** Compared with the model groups, the level of CD80⁺ cell (55.7 ± 6.31)% was decreased obviously in the middle and low dose of Scorpio-Scolopendra groups (46.6 ± 6.34, 30.8 ± 15.14)% (P < 0.05). While the level of the CD80⁺CD86⁻ cell (43.7 ± 10.26)% in peripheral blood from rats in the model groups was higher than in the low dose of Scorpio and Scolopendra group (25.3 ± 12.67)% (P < 0.05). **Conclusion:** The mechanism of Scorpio and Scolopendra treated RA is likely to down-regulate express of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) in peripheral blood.

[Key words] Scorpio; Scolopendra; rheumatoid Arthritis; B7-1; B7-2

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是以慢性多关节炎为主要表现的全身性自身免疫性疾病, 是一种医学界关注的难治性疾病, 发病机制不明, 多认为其是一种 T 细胞介导的关节炎, T 细胞介导的免疫应答异常, 尤其是 CD4⁺ T 细胞持续性地活化是 RA 发病的重要机制之一^[1], 协同刺激分子 B7-1 (CD80) 和 B7-2 (CD86) 在效应性 CD4⁺ T 的活化过程中发挥了重要作用^[2], 干预其表达在 RA 治疗和研究中日益受到人们的重视。作为治疗 RA 的经典药对——全蝎-蜈蚣^[3-4] 能否阻断协同刺激分子 B7-1, B7-2 表达鲜见报道。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大白鼠 60 只, 雌性, 体重 (160 ± 20) g, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 许可证号 SCXK (沪) 2008-0016。清洁级动物房饲养, 适应性喂养 1 周后开始试验。

1.2 药物与试剂 全蝎、蜈蚣购于江西省黄庆仁华氏大药房, 全蝎 (Scorpio), 钳蝎科动物东亚钳蝎 *Buthus martensii* Karsch 的干燥体, 产于山东, 蜈蚣 (Scolopendra), 大蜈蚣科少棘巨蜈蚣 *Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch 的全虫体, 产于江苏, 经江西中医学院中药鉴定教研室葛菲教授鉴定合格。

各等分研末, 加适量生理盐水混匀, 质量浓度为 0.4 g·mL⁻¹, 置 4 ℃ 冰箱保存备用。液态牛 II 型胶原蛋白 (C II, 批号 2002-2)、C II 冻干粉 (批号 2002-1) 及不完全弗氏佐剂 (批号 7002), 均购自 Chondrex 公司, FITC-抗 CD86 mAb (小鼠抗大鼠 IgG1, EBioscience 公司), PE-CD80 mAb (小鼠抗大鼠 IgG1, Biolegend 公司), 红细胞裂解液 (pharmLyseTM, 美国 BD 公司)。

1.3 仪器 LD5-2A 离心机 (长沙湘仪离心机有限公司), FACSCalibur 型流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 大鼠 CIA 模型的建立 参照文献 [5-6] 进行复制, 即将液态 C II 与等量完全弗氏佐剂混合 (C II 的终质量浓度为 1 g·L⁻¹)。用高速搅拌仪在冰浴状态下混匀, 直至混合物完全、充分乳化 (以乳化液滴入水中不松散为度)。取乳化后的混合物于大鼠尾根皮下注射, 0.1 mL/只, 注射后第 7 天, 以相同剂量、相同部位再次免疫, 即造模成功。

2.2 分组及给药 将雌性 Wistar 大鼠 60 只随机分为 6 组, 即正常对照组、模型对照组、全蝎-蜈蚣高、中、低剂量组和 II 型胶原蛋白治疗组 (C II 组)。于第 8 天, 按体重换算, 全蝎-蜈蚣高、中、低剂量组分

别 ig 给予全蝎-蜈蚣混悬液 0.4,0.2,0.1 g·kg⁻¹,C II 组予 II 型胶原蛋白冻干粉 60 μg·kg⁻¹ 复核剂量 ig,正常对照组和模型对照组分别用等容积生理盐水 ig,连续给药 40 d。

2.3 流式细胞术检测外周血 CD80,CD86 分子的表达 大鼠摘眼球取血,EDTA 抗凝收集;分别取血 100 μL 加入含有 0.5 μg CD80-PE 和 CD86-FITC 单克隆抗体的离心管中震匀,设 IgG1 为同型对照,室温避光孵育 30 min,加入适量红细胞溶解液,以 1 500 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃其上清,反复几次;加入 0.1 mol·L⁻¹ PBS,以 1 500 r·min⁻¹ 离心 5 min,反复清洗几次,以试管底部不见红色为度,加 0.1 mol·L⁻¹ PBS 调定至 300 μL,过滤后上流式细胞仪检测。

2.4 统计学分析 采用 SPSS13.0 软件统计,检测结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 *P* <

0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

大鼠外周血协同刺激分子 CD80,CD86 表达水平 采用双色荧光标记法进行流式细胞术检测,与正常组比较发现,模型组 CIA 大鼠外周血单核细胞 CD80⁺ 表达明显升高 (*P* < 0.05),其主要表现在表达 CD80⁺CD86⁻ 细胞数量明显升高 (*P* < 0.05),而 CD86⁺,CD80⁺CD86⁺ 细胞、CD80⁻CD86⁺ 细胞和 CD80⁻CD86⁻ 的细胞则无明显变化。与模型组比较,在 CD80⁺ 的表达方面,全蝎-蜈蚣中、低剂量组外周血单核细胞 CD80⁺ 表达水平明显下降,同时低剂量组 CD80⁺CD86⁻ 表达亦均明显下降 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。而在 CD86⁺ 的表达方面,包括 CD80⁺CD86⁺ 和 CD80⁻CD86⁺ 的表达则均作用不明显。见表 1~2。

表 1 大鼠外周血单核细胞 CD80,CD86 分子表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CD80/%	CD86/%	CD80 ⁺ CD86 ⁺ /%
正常	-	44.8 ± 11.61	19.5 ± 6.76	11.4 ± 4.02
模型	-	55.7 ± 6.31 ¹	16.1 ± 7.33	8.4 ± 4.35
全蝎-蜈蚣	0.4	61.8 ± 11.17	17.5 ± 5.40	10.8 ± 2.69
	0.2	46.6 ± 6.34 ²⁾	17.9 ± 4.72	9.4 ± 2.98
	0.1	30.8 ± 15.14 ³⁾	11.8 ± 2.98	5.5 ± 2.95
C II	60 × 10 ⁻⁵	32.9 ± 8.74 ³⁾	11.0 ± 1.71	5.3 ± 0.91

注:与正常组比较¹⁾ *P* < 0.05;与模型组比较²⁾ *P* < 0.05,³⁾ *P* < 0.01(表 2 同)。

表 2 大鼠外周血单核细胞 CD80,CD86 分子表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CD80 ⁻ CD86 ⁺ /%	CD80 ⁺ CD86 ⁻ /%	CD80 ⁻ CD86 ⁻ /%
正常	-	10.4 ± 2.89	32.4 ± 9.18	47.3 ± 16.20
模型	-	7.7 ± 3.82	43.7 ± 10.26 ¹⁾	40.2 ± 11.16
全蝎-蜈蚣	0.4	6.7 ± 3.79	51.0 ± 10.69	30.7 ± 10.11
	0.2	8.5 ± 2.00	37.2 ± 5.89	45.0 ± 6.28
	0.1	6.4 ± 2.22	25.3 ± 12.67 ³⁾	62.8 ± 14.03 ³⁾
C II	60 × 10 ⁻⁵	5.7 ± 1.33	27.6 ± 8.18 ³⁾	61.4 ± 8.31 ³⁾

4 讨论

协同刺激分子 B7-1/B7-2 (CD80/CD86) 是免疫球蛋白超家族成员,他们能为抗原提呈过程提供协同刺激信号,通常在活化的 B 细胞、单核细胞、树突状细胞、巨噬细胞和 T 细胞等表面表达^[7]。这两个分子能与调节性 T 细胞表面的 CD28 和 CTLA-4 相结合,从而调节其功能^[8]。尤其是 CD80 分子可与调节性 T 细胞表面的 CTLA-4, GITR 分子竞争性结合,致使调节性 T 细胞数量下降或抑制性功能水平下降,从而诱导自身免疫性疾病^[9-10]。而且在免

疫反应中,CD86 介导的协同刺激作用是激发 T 淋巴细胞反应的关键,激发 Th2 型细胞反应,而 CD80 介导的协同刺激作用可能是维持和扩展 T 淋巴细胞反应的进行,激发 Th1 型细胞反应,二者功能维系着 Th1/Th2 免疫反应间的平衡^[11-12]。作为一种自身免疫性疾病,研究报道表明,RA 患者外周血及关节滑膜液 CD80,CD86 均呈现高表达,可能与 RA 患者局部淋巴细胞过度活化 T 淋巴细胞亚群及其分泌的因子比例失调,以及促炎性细胞因子与抑炎性细胞因子间的不平衡密切相关,进而提示 RA 的发

病和 CD80/CD86 分子的表达异常密切相关^[13]。在我们的实验中,模型组大鼠外周血单核细胞的 CD80⁺ 分子及 CD80⁺CD86⁻ 分子表达显著升高,提示在该模型发病过程中 B7-1 分子表达升高是其发病的重要因素之一,而全蝎-蜈蚣中、低剂量组则可显著降低其表达,我们以前的实验也已经证明^[5,14],全蝎-蜈蚣在明显改善关节炎大鼠关节损伤的同时,可明显下调肠道派伊尔淋巴结 CD4⁺,CD8⁺T 细胞水平,升高 CD4/CD8 水平,恢复细胞免疫的平衡,同时可下调关节炎大鼠关节组织匀浆中 IL-1 β ,IL-2 水平,升高 IL-4,IL-10 水平,提示,在我们复制的 CIA 大鼠关节损伤过程中,主要可能是通过活化 B7-1 (CD80 细胞),从而激发 Th1 型细胞反应,以 IL-1 β 为代表的 Th1 型细胞因子分泌增多,而以 IL-10 为代表的 Th2 型细胞因子分泌减少,炎症朝着 Th1 型发展,造成组织损伤,而全蝎-蜈蚣在一定剂量下,可明显抑制 B7-1 (CD80 细胞)的活化,进而调节 Th1/Th2 型细胞反应平衡,促进抑炎因子的表达,促进组织修复,达到治疗目的,研究报道表明抑制 B7-1 (CD80 细胞)、B7-2 (CD86 细胞)的水平有助于细胞免疫平衡^[15],我们的实验恰与此一致,提示全蝎-蜈蚣药对治疗 CIA 大鼠的可能途径是降低外周血单核细胞表达 CD80⁺ 及 CD80⁺CD86⁻ 分子表达水平相关。至于全蝎-蜈蚣如何阻断 B7-1/B7-2 分子信号途径及其各自功能的发挥,还有待于进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Skapenko A, Leipe J, Lipsky P, et al. The role of the T cell in autoimmune inflammation [J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7: S4.

[2] Dragana Odobasic, Michelle T Leech, Jin R Xue, et al. Distinct *in vivo* roles of CD80 and CD86 in the effector T-cell responses inducing antigen-induced arthritis [J]. *Immunology*, 2008, 124 (4): 503.

[3] 王国朗. 动物药治疗类风湿性关节炎浅谈 [J]. *湖南中医杂志*, 2000, 16 (4): 55.

[4] 何绍奇. 学习朱良春先生用虫类药的经验 [J]. *中国临床医生*, 2003, 31 (10): 55.

[5] 刘端勇, 赵海梅, 程绍民, 等. 全蝎蜈蚣对胶原诱导型关节炎大鼠肠黏膜免疫状态的调节作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17 (3): 146.

[6] 赵海梅, 刘端勇, 程绍民, 等. II 型胶原蛋白对 CIA 大鼠外周血 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ 调节性 T 细胞的影响 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011, 27 (3): 290.

[7] Mocizuki K, Hayashi N, Katayama K, et al. B7/BB21 expression and hepatitis activity in liver tissues of patients with chronic hepatitis C [J]. *Hepatology*, 1997, 25 (3): 713.

[8] Yong Z, Claire N M, Michael L, et al. CD80 and CD86 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells [J]. *J Immunol*, 2004, 172 (5): 2778.

[9] Paust S, Lu L, Mc Carty N, et al. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101 (28): 10398.

[10] Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, et al. Stimulation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells through GITR breaks immunological self tolerance [J]. *Nat Immunol*, 2002, 3 (2): 135.

[11] Rogers N J, Game D S, Camara N O, et al. Distinct effects of CD86-mediated costimulation on resting versus activated human CD4⁺ T cells [J]. *Eur J Immunol*, 2005, 35 (10): 2909.

[12] 程金华. 类风湿关节炎患者淋巴细胞协同刺激分子和活化标志的表达及意义 [J]. *中国医药指南*, 2010, 8 (14): 296.

[13] 陈海燕, 韩捷, 周洁如等. 类风湿性关节炎外周血和关节液树突状细胞的膜分子表达和功能研究 [J]. *同济大学学报:医学版*, 2010, 31 (4): 70.

[14] Liu Duan-Yong, Zhao Hai-Mei, Cheng Shao-Min, et al. Scorpio and Scolopendra attenuate inflammation and articular damage in rats with collagen-induced arthritis [J]. *J Ethnopharmacol*. (2011), doi:10.1016/j.jep.2011.08.056.

[15] 王青, 胡明华, 董燕, 等. 茯苓多糖对小鼠肠道分泌型免疫球蛋白 A, CD80, CD86 表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17 (13): 127.

[责任编辑 聂淑琴]