

• 药理 •

# 湿热痹片对佐剂性关节炎大鼠T细胞及 细胞因子网络的调节作用

辛增辉<sup>1</sup>, 肖丹<sup>1</sup>, 甘丽<sup>1</sup>, 吴启富<sup>1</sup>, 吴永军<sup>2</sup>, 佟丽<sup>1\*</sup>  
(1. 南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515;  
2. 辽宁好护士药业集团, 辽宁 桓仁 117201)

[摘要] 目的: 观察湿热痹片对灭活结核分枝杆菌(Mtb)诱导的佐剂性关节炎大鼠T细胞及细胞因子水平的影响。方法: 采用热杀死结核分枝杆菌(H37Ra Mtb)免疫SD大鼠, 以诱导佐剂性关节炎, 用ELISA法检测大鼠外周血T淋巴细胞亚群、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平; 同时测定大鼠踝关节滑膜组织中IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10及血管内皮细胞生长因子(VEGF)水平的变化。结果: 与模型对照组比较, 湿热痹组CD8<sup>+</sup>T细胞水平升高( $P < 0.05$ ), CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值降低( $P < 0.05$ ); 促炎细胞因子TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 及IL-6水平下调( $P < 0.01$ ), VEGF含量降低( $P < 0.01$ ), 同时抗炎因子IL-10水平上升( $P < 0.01$ )。结论: 湿热痹片通过调节T细胞及细胞因子网络平衡而发挥对类风湿关节炎的治疗作用。

[关键词] 湿热痹片; 类风湿关节炎; T淋巴细胞亚群; 细胞因子网络

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)10-0052-04

## Regulation Effect of SHI-re-bi Tablet on T Lymphocyte and Cytokine Network in the Adjuvant-induced Arthritis Rats

XIN Zeng-hui<sup>1</sup>, XIAO Dan<sup>1</sup>, GAN Li<sup>1</sup>, WU Qifu<sup>1</sup>, WU Yongjun<sup>2</sup>, TONG Li<sup>1\*</sup>

(1. Southern Medical University, School of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510515, China;  
2. Liaoning Herbapex Pharmaceutial Group, Huanren 117201, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the influence of Shi-re-bi Tablet on T lymphocyte and cytokine network in the adjuvant-induced arthritis SD rats. **Methods:** Induce the model of adjuvant arthritis in SD rats through the immunization of heat-killed Mycobacterium Tuberculosis H37RA (Mtb). Measure the level of TNF- $\alpha$  and T lymphocyte subsets in the experimental animal's peripheral blood by ELISA. At the same time, measure the level of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and VEGF in the synovial tissues of ankle joint in the rheumatoid arthritis rats. **Results:** Compared with the model group, Shi-re-bi Tablet could raise the level of CD8<sup>+</sup>T lymphocyte ( $P < 0.05$ ) and reduce the ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ( $P < 0.05$ ), proinflammatory TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 ( $P < 0.01$ ), at the same time, the content of VEGF is reduced ( $P < 0.01$ ) and the level of anti-inflammatory IL-10 is raised ( $P < 0.01$ ). **Conclusions:** Shi-re-bi Tablet can regulate the balance of T lymphocyte and cytokine network, and thus may be its mechanism for treatment of rheumatoid arthritis.

[Key words] Shi-re-bi Tablet; rheumatoid arthritis; T lymphocyte; cytokine network

[收稿日期] 2008-12-19

[基金项目] 广东省科技计划项目基金(2006B35604001); 广州市科技局基金(20072007JF-C0081)

[通讯作者] \* 佟丽, Tel: 020-61648539; E-mail: zyxy2@fimmu.com

中医痹证是指由风、寒、湿、热等邪气闭阻经络,影响气血运行,导致肢体筋骨、关节、肌肉等处发生疼痛、酸楚、麻木或关节屈伸不利、僵硬、肿大,变形等症状的一类疾病的总称。根据其发病特点和临床表现,中医将痹证分为寒湿痹、湿热痹等不同证型<sup>[1]</sup>,湿热痹片是专为湿热痹证而研制的纯中药复方制剂,临床观察表明湿热痹片对湿热痹阻型风湿病具有显著疗效<sup>[2]</sup>。类风湿关节炎属于中医痹症的范畴,本研究采用灭活结核分枝杆菌(Mtb)诱导 SD 大鼠佐剂性关节炎(Adjuvant Arthritis, AA)模型,观察湿热痹片对类风湿关节炎大鼠 T 淋巴细胞亚群和 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, 肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), 血管内皮细胞生长因子(VEGF)水平的影响,探讨湿热痹片治疗 RA 的免疫学机制,为临床用药提供科学依据。

### 1 材料

**1.1 实验动物** SPF 级 SD 大鼠 50 只, 雄性, 体重(150 $\pm$ 10)g, 合格证号: 2006-A015, 由南方医科大学实验动物中心提供。

**1.2 药物及试剂** 湿热痹片, 辽宁好护士药业集团提供, 批号 20071101; 来氟米特(Leflunomide, LEF), 苏州长征-欣凯制药有限公司, 批号 H20000550; 灭活结核分枝杆菌(heat-killed Mycobacterium Tuberculosis H37RA·Mtb), 美国 Voigt Global Distribution Inc; 矿物油(Mineral oil), 美国 Sigma 公司; TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒, 深圳晶美生物有限责任公司; IL-1 ELISA 试剂盒, 武汉博士德生物有限责任公司; VEGF 和 IL-6 ELISA 试剂盒, 美国 Invitrogen Corporation; 抗大鼠 FITC-CD3, APC-CD4, PE-CD8a 单克隆抗体, 美国 BioLegend 公司。

**1.3 主要仪器** FACS Calibur 流式细胞仪, 美国 Becton Dickinson 公司; Diagnostics 2101 酶标仪, 美国 Sigma 公司。

### 2 方法

**2.1 分组及给药** SD 大鼠随机分为 5 组, 即空白对照组、模型对照组、湿热痹片低剂量组(1.62 g·kg<sup>-1</sup>)、高剂量组(3.24 g·kg<sup>-1</sup>)及 LEF 组(0.005 g·kg<sup>-1</sup>)。药物组从免疫 Mtb 当天开始 ig 给药, 空白对照组、模型对照组给予等体积蒸馏水, 连续给药 28 d。

**2.2 AA 大鼠模型的制备**<sup>[3-4]</sup> 准确称取 Mtb, 在无菌条件下充分研磨, 渐加矿物油自制成 5 mg·mL<sup>-1</sup> 的 Mtb 诱导剂, 于大鼠尾根部 sc Mtb 诱导剂 1 mg/

只。

**2.3 T 淋巴细胞亚群测定** 大鼠给药 28 d 后, 以水合氯醛麻醉(10% 水合氯醛 3.33 mL·kg<sup>-1</sup> 体重, ip), 经腹主动脉取抗凝血液标本, 依次加入 FITC-CD3, APC-CD4, PE-CD8 抗体, 漩涡混匀, 加入红细胞裂解液, 离心, 以 PBS 洗涤 3 次, 流式细胞仪检测 CD3、CD4 及 CD8 水平。

**2.4 大鼠血清及关节滑膜组织中细胞因子的测定** 大鼠给药 28 d 后, 以水合氯醛麻醉, 经腹主动脉取不抗凝血液标本, 离心后测定血清 TNF- $\alpha$  水平; 处死大鼠后取出膝关节滑膜及周围组织, 按试剂盒说明进行提取并测定 IL-1, IL-6, IL-10 和 VEGF 浓度, 细胞因子测定均采用 ELISA 方法。

**2.5 统计学分析** 所有数据用均数 $\pm$ 标准差表示( $\bar{x}\pm s$ ), 组间比较进行 One-way ANOVA 检验。所有资料统计分析均采用 SPSS 13.0 完成,  $P < 0.05$  具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 SD 大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群的影响** SD 大鼠免疫 Mtb 28 d 后, 外周血 T 淋巴细胞亚群与空白对照组比较, CD8<sup>+</sup> T 细胞水平显著降低( $P < 0.01$ ), CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 升高( $P < 0.05$ ), 提示关节炎大鼠 T 淋巴细胞亚群失调。与模型对照组比较, 给予湿热痹治疗后, 大鼠 CD8<sup>+</sup> T 细胞水平显著升高( $P < 0.05$ ), 同时 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值降低( $P < 0.05$ ), 表明湿热痹片通过降低关节炎大鼠 CD8<sup>+</sup> T 细胞水平, 调节 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值。结果见表 1。

表 1 湿热痹片对类风湿关节炎大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

组别	剂量 (g·kg <sup>-1</sup> )	CD3 <sup>+</sup> (pg·mL <sup>-1</sup> )	CD4 <sup>+</sup> (pg·mL <sup>-1</sup> )	CD8 <sup>+</sup> (pg·mL <sup>-1</sup> )	CD4 <sup>+</sup> / CD8 <sup>+</sup>
空白对照组	—	52.57 $\pm$ 7.77	32.07 $\pm$ 7.51	19.87 $\pm$ 5.10 <sup>1)</sup>	1.76 $\pm$ 0.75 <sup>1)</sup>
模型对照组	—	48.27 $\pm$ 7.77	28.72 $\pm$ 6.75	11.00 $\pm$ 1.25	2.61 $\pm$ 0.54
LEF 组	0.005	45.75 $\pm$ 8.58	17.70 $\pm$ 4.40	23.53 $\pm$ 8.60 <sup>2)</sup>	1.34 $\pm$ 0.59 <sup>2)</sup>
湿热痹组	1.62	51.00 $\pm$ 8.95	35.40 $\pm$ 9.47	17.88 $\pm$ 4.44 <sup>1)</sup>	2.09 $\pm$ 0.69
	3.24	48.20 $\pm$ 7.77	31.90 $\pm$ 6.95	17.57 $\pm$ 2.56 <sup>1)</sup>	1.86 $\pm$ 0.50 <sup>1)</sup>

注: 与模型组比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (下同)

**3.2 对 IL-1 $\beta$ , IL-6, VEGF 及 TNF- $\alpha$  水平的影响** SD 大鼠免疫 Mtb 28 d 后, 外周血 TNF- $\alpha$  水平及滑膜组织中 IL-1 $\beta$ , IL-6, VEGF 水平与空白对照组比较显著上升( $P < 0.01$ ), 结果见表 2~ 3。与模型组比较, 湿热痹高剂量组大鼠滑膜组织中 IL-1 $\beta$  水平显著降低

( $P < 0.01$ ), 湿热痹低、高剂量组大鼠滑膜组织中 IL-6 和 VEGF 水平均显著降低 ( $P < 0.01$ ), 见表 2; 湿热痹低、高剂量组大鼠外周血血清中 TNF- $\alpha$  水平显著下调 ( $P < 0.01$ ), 见表 3。以上结果提示湿热痹片对关节炎大鼠外周血 TNF- $\alpha$  及滑膜组织中 IL-1 $\beta$ , IL-6, VEGF 水平具有显著的抑制作用。

表 2 湿热痹片对大鼠关节滑膜细胞因子水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 (g·kg <sup>-1</sup> )	IL-1 $\beta$ (pg·mL <sup>-1</sup> )	IL-6 (pg·mL <sup>-1</sup> )	VEGF (pg·mL <sup>-1</sup> )
空白组	—	246.39 ± 40.39 <sup>2)</sup>	47.76 ± 32.15 <sup>2)</sup>	131.40 ± 22.83 <sup>2)</sup>
模型组	—	379.42 ± 44.7	171.53 ± 62.25	296.14 ± 164.69
LEF 组	0.005	252.33 ± 42.09 <sup>2)</sup>	91.43 ± 38.83 <sup>2)</sup>	129.06 ± 21.64 <sup>2)</sup>
湿热痹组	1.62	342.93 ± 40.24	92.04 ± 58.07 <sup>2)</sup>	168.81 ± 39.37 <sup>2)</sup>
	3.24	182.66 ± 34.43 <sup>2)</sup>	89.89 ± 46.51 <sup>2)</sup>	153.56 ± 67.88 <sup>2)</sup>

表 3 湿热痹片对大鼠外周血 TNF- $\alpha$  水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量(g·kg <sup>-1</sup> )	TNF- $\alpha$ (pg·mL <sup>-1</sup> )
空白组	—	20.39 ± 6.33 <sup>2)</sup>
模型组	—	77.72 ± 13.70
LEF 组	0.005	47.02 ± 11.06 <sup>2)</sup>
湿热痹组	1.62	48.66 ± 6.08 <sup>2)</sup>
	3.24	54.35 ± 8.72 <sup>2)</sup>

**3.3 对滑膜组织中 IL-10 水平的影响** 如表 4 所示, 模型组大鼠 IL-10 水平与空白组比较无显著性差异; 湿热痹低、高剂量组与模型组比较显著升高 ( $P < 0.01$ )。湿热痹片能显著提高 AA 大鼠滑膜组织中抗炎因子 IL-10 的含量, 以对抗促炎因子带来的损害作用。

表 4 湿热痹片对大鼠关节滑膜 IL-10 水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量(g·kg <sup>-1</sup> )	IL-10(pg·mL <sup>-1</sup> )
空白组	—	807.93 ± 132.48
模型组	—	840.71 ± 108.91
LEF 组	0.005	1214.02 ± 217.34 <sup>2)</sup>
湿热痹组	1.62	1606.24 ± 632.41 <sup>2)</sup>
	3.24	3243.65 ± 930.57 <sup>2)</sup>

#### 4 讨论

RA 是一类与免疫紊乱等因素有关的累及全身的慢性自身免疫性疾病, 在其致病过程中伴随多种免疫活性细胞的活化及细胞因子、炎症介质的共同参与。临床检测中发现, RA 患者 CD3<sup>+</sup> T 细胞和 CD4<sup>+</sup> T 细胞无明显变化, 而 CD8<sup>+</sup> T 细胞明显减少, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值显著增加<sup>[5]</sup>, 在本项研究中, 由 Mtb 诱导的 AA 大鼠外周血 T 细胞亚群的变化与临床检

测结果相吻合。湿热痹片对关节炎模型大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群的紊乱有显著的调节作用, 主要是上调 CD8<sup>+</sup> T 细胞水平, 下调 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值, 改善其内分泌环境, 调节 T 细胞亚群的平衡而发挥治疗 RA 的作用。

近来大量研究表明 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  均参与了 RA 的炎症过程, 是关节炎及软骨破坏的最重要的炎症介质<sup>[6-7]</sup>; IL-6 也是 RA 关节炎中主要的炎症介质, 但其致病作用有所不同, IL-6 不能直接刺激滑膜成纤维细胞和软骨细胞产生基质金属酶、胶原酶等, 而是诱导肝细胞分泌急性期蛋白并诱导其他细胞因子如 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的产生而发挥作用<sup>[8]</sup>; RA 的主要病理特征是关节滑膜炎性增生和滑膜血管翳形成, VEGF 是在滑膜血管翳中高度表达, 促进血管翳的形成并维持其生物状态的重要因子<sup>[9]</sup>, VEGF 可作为监测类风湿关节炎活动期、关节损害程度及病情进展的可靠指标<sup>[10]</sup>; 而 IL-10 属于 Th2 型细胞因子, 它通过下调抗原提呈细胞功能, 抑制 Th1 增生并抑制 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 TNF- $\alpha$  等炎性细胞因子的功能和生成<sup>[11]</sup> 而发挥其抗炎作用。我们的研究结果显示, 湿热痹片能够抑制促炎细胞因子 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  及 VEGF 水平的升高, 同时提高抑炎因子 IL-10 的水平, 上述研究结果提示, 湿热痹片通过调节细胞因子网络平衡, 达到抑制炎症、缓解 RA 病情进展的作用。

湿热痹片由苍术、忍冬藤、地龙、连翘、黄柏、薏苡仁、防风、川牛膝、威灵仙、粉萆薢、防己组成, 方中苍术、薏苡仁健脾利湿; 防风、粉萆薢祛风除湿; 忍冬藤、连翘、黄柏清热散结; 再配与防己、威灵仙、地龙、川牛膝、桑枝祛风湿通络止痛。诸药相配合, 共奏祛风除湿、清热消肿、通络定痛之功。我们的实验结果也表明, 通过合理配伍诸药而成的湿热痹片能对实验性类风湿关节炎起到缓解和治疗作用, 因此我们认为湿热痹片在临床上有着广阔的应用前景。

#### [参考文献]

[1] 李梢, 冯菁, 唐大睦, 等. 类风湿关节炎的中医证候学研究进展[J]. 北京中医药大学学报, 2001, 24(1): 72-74.

[2] 韩新峰, 杜天信, 李无阴. 湿热痹颗粒治疗湿热痹阻型风湿病的临床观察[J]. 中医正骨, 2002, 14(4): 9-11.

[3] X Cai, Y F Wong, H Zhou, et al. The comparative study of Sprague-Dawley and Lewis rats in adjuvant-induced arthritis [J]. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2006, 373: 140-147.

- [ 4 ] 佟 丽,辛增辉,陈育尧,等. Mtb 诱导的 SD 大鼠类风湿性关节炎模型的建立及评价[ J]. 中国药理学通报, 2009, 25( 2) : 141-145.
- [ 5 ] 吴福国,邱翠娥,韩晓琳,等. 类风湿性关节炎患者 2H4~ + T 淋巴细胞亚群的流式细胞仪分析[ J]. 中国免疫学杂志, 1999, 15( 3) : 132-134.
- [ 6 ] 蔡 青,孟 齐. 实验研究 IL-1 和 TNF- $\alpha$  与类风湿性关节炎[ J]. 上海免疫学杂志, 1998, 18( 1) : 62-63.
- [ 7 ] STRAND V, KAVANAUGH A F. The role of interleukin-1 in bone resorption in rheumatoid arthritis[ J]. Rheumatology ( Oxford ), 2004, 43( Supp 13) : III10- III16.
- [ 8 ] Wong PK, Campbell IK, Egan PJ, *et al.* The role of the interleukin-6 family of cytokines in inflammatory arthritis and bone turnover[ J]. Arthritis Rheum, 2003, 48: 1177-11891.
- [ 9 ] Lu J, Kasama T, Kobayashi K, *et al.* Vascular endothelial growth factor expression and regulation of murine collagen-induced arthritis [ J]. J Immunol, 2000, 164 ( 11) : 5922-5927.
- [ 10 ] 李 芳,姚建华,张凤肖,等. 类风湿性关节炎患者血清血管内皮生长因子、肿瘤坏死因子  $\alpha$  的检测及其临床意义[ J]. 临床荟萃, 2007, 22( 18) : 1332-1333.
- [ 11 ] Jossten LAB, Lubberts E. Role of IL-4 and IL-10 in murine collagen-induced arthritis: protective effect of IL-4 and IL-10 treatment on cartilage destruction [ J]. Arthritis Rheum, 1997, 40: 249-254.