

# 桂枝汤对痹证(胶原诱导免疫性关节炎)小鼠肠黏膜免疫系统中 $CD_4^+$ 、 $CD_8^+$ T 淋巴细胞及 SIgA 的影响

周桂琴 肖 诚 周 静 张丽坤 张 浩 吴 皓

贾宏伟 王少君 滕静如 李 艳 吕爱平

**摘要** 目的 观察桂枝汤对痹证(胶原诱导免疫性关节炎)小鼠肠黏膜免疫学指标的影响。方法 将 80 只雄性 DBA 小鼠随机分为 4 组(即正常组、模型组、桂枝汤高剂量组(简称桂高组)、桂枝汤低剂量组(简称桂低组))。模型组采用 II 型胶原诱导性关节炎作为痹证模型,运用免疫组织化学染色法标记小鼠小肠及 PP 结中  $CD_4^+$ 、 $CD_8^+$  T 淋巴细胞及 SIgA 数量,用图像分析仪进行统计计算其含量。结果 与正常组比较,模型组 II 型胶原免疫后小鼠肠黏膜免疫系统中  $CD_4^+$ 、 $CD_8^+$  T 淋巴细胞及 SIgA 数量明显减少,差异有显著性( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。应用桂枝汤(高、低剂量)后,  $CD_4^+$  T 淋巴细胞及 SIgA 数量明显升高,但只有桂高组与模型组比较差异有显著性( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结论 桂枝汤可以增强痹证小鼠肠道黏膜免疫功能,从而可能诱导免疫耐受和免疫抑制。

**关键词** 桂枝汤 痹证 胶原诱导免疫性关节炎 肠黏膜免疫

**Effect of Guizhi Decoction on  $CD_4^+$ ,  $CD_8^+$  T-Lymphocytes and SIgA in Mucosal Immune System in Intestine of Mice with Bi Syndrome (Collagen Induced Immune Arthritis)** ZHOU Gui-qin, XIAO Cheng, ZHOU Jing, et al *Department of Pathology, Institute of Basic Theory, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing (100700)*

**Objective** To observe the effect of Guizhi Decoction (GZD) on immunological indexes in intestinal mucosal immune system of mice with Bi syndrome (collagen induced immune arthritis). **Methods** Eighty male DBA mice were randomly divided into 4 groups, the normal group, the model group and the high and low dosage GZD groups. Model of Bi syndrome was induced by collagen type II.  $CD_4^+$ ,  $CD_8^+$  T-lymphocytes and SIgA in mice' small intestine and PP node were labeled by immunohistochemical staining and their number was calculated using imaging analyzer. **Results** Compared with the normal group, in the model group, after immunization with collagen type II, numbers of  $CD_4^+$  and  $CD_8^+$  T-lymphocytes and SIgA in mice' intestinal mucosal immune system reduced significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). After treatment with GZD of both high and low dosage,  $CD_4^+$  T-lymphocytes and SIgA increased significantly, but significant difference only showed in comparison between the high dosage GZD group and the model group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion** GZD could enhance the immune function in intestinal mucosa in mice with Bi syndrome, thus it might induce immune tolerance and immune inhibition.

**Key words** Guizhi decoction; Bi Syndrome; collagen induced immune arthritis; intestinal mucosal immunity

黏膜免疫系统因其是机体与外界接触的第一道防线,也因为其功能的特殊性,一方面能对入侵的致病微生物产生免疫,同时也能对食物中的抗原物质产生耐受,已引起越来越多的学者的关注<sup>[1,2]</sup>。本实验我们应用免疫组织化学的方法对痹证(胶原诱导免疫性关节

炎)小鼠在应用桂枝汤前后肠黏膜免疫系统中的  $CD_4^+$ 、 $CD_8^+$  T 淋巴细胞及 SIgA 的数量进行了计数,现报道如下。

## 材料与方法

1 动物及分组 清洁级健康 DBA 小鼠 80 只,雄性,体重  $(20 \pm 2)$  g,由中国医学科学院实验动物研究所提供。将小鼠随机分成正常组、模型组、桂枝汤高剂量

组(桂高组)、桂枝汤低剂量组(桂低组)4组,每组20只。

2 药物及试剂 选用桂枝汤原方:桂枝、白芍、甘草、生姜、大枣(购于北京同仁堂股份有限公司),上述各药以10:10:7:10:10比例配伍,常规混合采用水煮醇沉法,由中国中医研究院基础所药化室制得汤药,4℃保存备用;CII,从大鼠软骨肉瘤组织中获得,经电泳分析,CII纯度达99.9%以上,由瑞典Lund大学提供;L-多聚赖氨酸、DAB显色剂(Sigma公司产品);CD<sub>4</sub>、CD<sub>8</sub>、SIgA免疫组化试剂盒(SANTA公司产品)。

3 仪器 Bright冰冻切片机(德国产);Leica图像分析仪(德国产);Qwin 100图像分析处理系统(德国产);Olympus光学显微镜(日本产)。

4 方法

4.1 造模方法 采用Trentham<sup>[3]</sup>的方法。将Ⅱ型胶原溶于0.1mol/L的乙酸中,配成浓度为2mg/mlⅡ型胶原溶液,此溶液再与等量完全弗氏佐剂(CFA)混合为Ⅱ型胶原终浓度1mg/ml溶液,然后用注射器反复抽吸,充分乳化,以滴加于水中不扩散为度。用此乳化物免疫模型组、桂高组及桂低组小鼠,按每只小鼠每足50μg进行双侧足底皮下注射,正常组小鼠足底皮下注射等体积生理盐水对照。

4.2 给药方法 按小鼠体表面积折算,桂高组为每kg体重30g生药,桂低组为每kg体重8.75g生药,正常组及模型组给予等体积生理盐水灌胃,每日1次,于造模后两周开始给药,连续3周。

4.3 免疫组织化学染色 免疫组织化学法显示肠黏膜及PP结中的CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T淋巴细胞及SIgA的表达:冰冻切片冷丙酮固定10min,室温下干燥40min,0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>阻断内源性过氧化物酶的活性10min,非免疫马血清封闭非特异性背景10min,依次加入一抗(羊抗鼠CD<sub>4</sub>、CD<sub>8</sub>抗体1:100,室温下2h),二抗(生物素化兔抗羊,室温下15min),链亲和素-过氧化物酶室温下孵育10min,以上各步间均以PBS缓冲液洗3次,DAB显色,苏木素复染,上行梯度酒精脱水、透明、中性树胶封片。以细胞膜上出现棕黄色颗粒为阳性反应。实验中以模型组阳性片作为阳性对照,用PBS代替一抗作为阴性对照。SIgA染色过程中不需加入二抗。

5 统计学方法 运用Stata软件进行统计学处理,采用方差分析。

结 果

1 各组小鼠肠黏膜及PP结中CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T淋巴细胞及SIgA检测结果 经免疫组化染色,用DAB

作为显色剂,它们在切片上显示的是棕红色的致密点状,高倍镜下可见棕红色致密点位于胞膜上或胞浆处。肠黏膜中CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T淋巴细胞在固有层及黏膜上皮间均有表达,但主要位于肠黏膜固有层中。肠黏膜中CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T淋巴细胞表达于肠黏膜固有层与黏膜上皮间,主要位于肠黏膜上皮间。肠黏膜中SIgA主要位于肠黏膜固有层中。在肠道集合淋巴小结处CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞出现于PP结边缘比较固定的部位,即滤泡间区和滤泡旁区,与文献报道相一致<sup>[4,5]</sup>。

2 各组小鼠肠黏膜及PP结中CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T淋巴细胞及SIgA比较 用图像分析仪计数,每张切片取4个区域,这样基本保证所有被染上的细胞都收集在内,而又避免重复计数。用Qwin 100软件进行图像处理,测定结果见表1、图1。与正常组比较,模型组肠黏膜中CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞及SIgA明显降低,差异有显著性( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。与模型组比较,桂高组CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T细胞及SIgA明显升高,差异有显著性( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),桂低组无明显差异;桂高组、桂低组CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞均无明显差异( $P>0.05$ )。

表1 小鼠肠黏膜及PP结中CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞及SIgA的比较(像素,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	CD <sub>4</sub> <sup>+</sup> T	CD <sub>8</sub> <sup>+</sup> T	SIgA
正常	10	492.7±156.7	446.5±122.5	565.2±176.3
模型	10	337.5±101.6*	272.8±165.6*	307.1±64.1**
桂高	10	491.8±58.6△	423.9±58.9	562.3±117.7△△
桂低	10	410.1±131.4	338.4±131.4	412.3±125.9

注:与正常组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,△ $P<0.05$ ,△△ $P<0.01$

讨 论

黏膜免疫系统是指被覆于机体的呼吸道、消化道、泌尿生殖道表面黏膜内的淋巴组织及淋巴细胞,它构成了机体与外界的第一道防线,使机体免受外界抗原及致病微生物的干扰<sup>[6]</sup>。如果黏膜免疫系统的功能发生紊乱可能会导致一系列的疾病<sup>[7]</sup>,如自身免疫疾病或免疫功能低下。这与中医学营卫的功能具有相似性。痹证的产生,虽为风、寒、湿等外邪侵袭所致,但机体的正气在疾病发生发展中亦起着很重要的作用。

桂枝汤功能核心是调和营卫,而黏膜免疫的功能与营卫的功能具有相似性,这就意味着用桂枝汤后黏膜免疫的功能有可能受到影响,在我们的研究中模型组CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T细胞、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞、SIgA均较正常组有减少的趋势,表明痹证小鼠的黏膜免疫是降低的,经应用桂枝汤后痹证小鼠的黏膜免疫发生了变化,肠道黏膜中CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T细胞数量较模型组有增加的趋势,表明黏

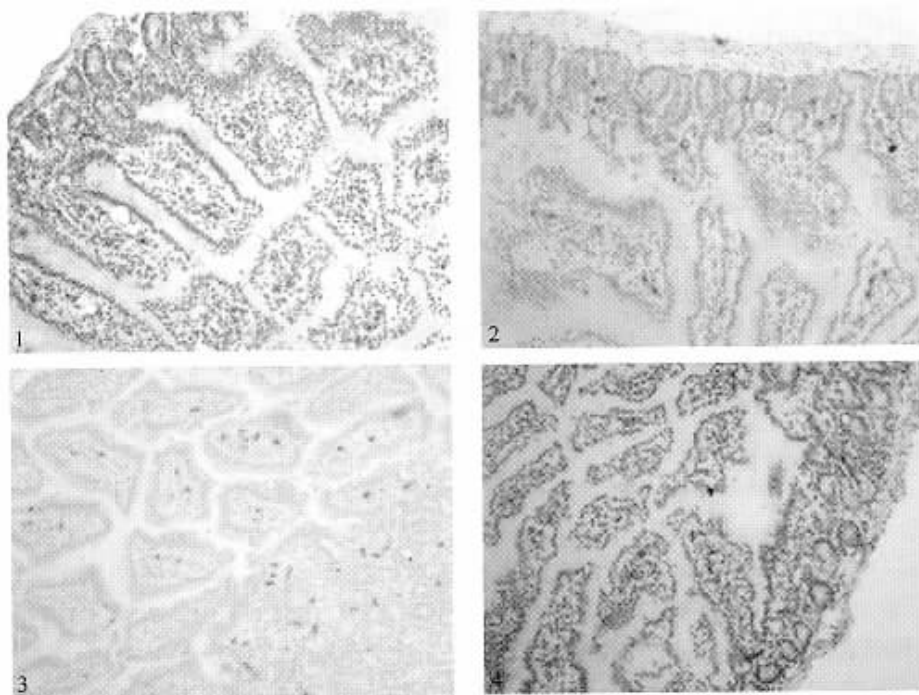


图 1 各组小鼠肠黏膜及 PP 结中  $CD_4^+$ T 细胞变化

注:1.正常组( $\times 200$ );2.模型组( $\times 200$ );3.桂枝高组( $\times 200$ );4.桂枝低组( $\times 200$ )

膜局部的细胞免疫发生上调,而我们另有实验证明应用桂枝汤作用与痹证小鼠其外周血中  $CD_4^+$ T 细胞、 $CD_8^+$ T 细胞数量是下降的,脾脏中 T 细胞增殖功能也是下降的,表明外周细胞免疫功能被下调。这一现象可能是由于桂枝汤能主动诱导黏膜中发挥下调全身免疫作用的细胞被激活而引起除黏膜部位外的外周细胞免疫的抑制。在本实验中 SIgA 经免疫组化染色观察模型组与正常组及桂枝汤组间比较,模型组低于正常组,模型组也低于桂枝高组。表明 II 型胶原免疫后也引起黏膜局部体液免疫的下调,应用桂枝汤后黏膜局部的 SIgA 表达增加,这种现象出现的原因可能是因为黏膜局部的 T 细胞免疫增强后激活了共同黏膜免疫系统中的 B 细胞<sup>[8-11]</sup>,B 细胞分泌 IgA 增加,表明黏膜的防御能力增强,抗击外邪的能力增加。

#### 参 考 文 献

- Didierlaurent A, Sirard JC, Kraehenbuhl JP. How the gut senses its content. *Cell Microbiol* 2002 ;4(2):61—72.
- Tlaskalova Hogenova H, Tuckova L, Lodinova Zadnikova R, et al. Mucosal immunity: Its role in defense and allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2002 ;128(2):77—89.
- Trentham DE, Townes AS, Kang AH, et al. Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis. *J Exp Med* 1977 ;146:857—868.
- Brandtzaeg P, Farstad IN, Helgeland L. Phenotypes of T cells in the gut. See: MacDonald TT. *Mucosal T cells*. Basel: Karger, 1998:1—26.
- Kelsall BL, Strober W. Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. *J Exp Med* 1996 ;183:237.
- Mowat AM, Viney JL. The anatomical basis of intestinal immunity. *J Immunol Rev* 1997 ;156:145—166.
- Tishler M, Caspi D, Almog Y, et al. Increased incidence of urinary tract infection in patients with rheumatoid arthritis and secondary Sjogren's syndrome. *Ann Rheumatol* 1992 ;51(5):604—606.
- Beagley KW, Wltridge GH, Kiyono H, et al. Recombinant murine IL-5 induces high rate IgA synthesis in cycling IgA-positive Peyer's patch B cells. *J Immunol* 1988 ;141:2035.
- Beagley KW, Wltridge GH, Lee F, et al. Interleukins and IgA synthesis: Human and murine IL-6 induce high rate IgA secretion in IgA-committed B cells. *J Exp Med* 1989 ;169:2133.
- Harriman GR, Kunitomo DY, Elliot JF, et al. The role of IL-5 in IgA B cell differentiation. *J Immunol* 1988 ;140:3033.
- Golovkina TV, Shlomchik M, Hannum L. Organogenic role of B lymphocytes in mucosal immunity. *Sci* 1999 ;286:1965—1968.

(收稿 2003-08-06 修回 2003-12-25)