雷公藤多甙对大鼠胶原免疫性关节炎及佐剂性关节炎黏膜免疫功能影响的对比研究

周 静 赵 宁 贾红伟 肖 诚 何颖辉 吕爱平

摘要 目的 观察雷公藤多甙对大鼠胶原免疫性关节炎(collagen-Ⅱ induced arthritis, CIA)及佐剂性关节炎(adjuvant arthritis, AA)黏膜免疫功能的影响。**方法** 分别以Ⅱ型胶原加完全弗氏佐剂和完全弗氏佐剂单独致炎免疫大鼠造成 CIA 和 AA 模型,以雷公藤多甙治疗,观察大鼠黏膜、全身免疫指标(外周血 T 细胞亚群)以及关节局部炎症因子(IL-6、TNF-α、COX-2 和 NF-κB 等)的变化。**结果** CIA 模型组派伊尔结(Peyer's patch, PP)CD_4^+、血中 CD_4^+、CD_8^+ 均升高;AA 模型组 PP CD_4^+ 降低,CD_8^+ 升高,血中的 CD_4^+,CD_8^+ 均升高。雷公藤对两模型组的 PP 和血中 T 细胞亚群存在不同影响。两种模型大鼠关节可见高水平 IL-6、TNF-α、COX-2 和 NF-κB 表达,雷公藤多甙可以抑制这些炎症介质的表达。**结论** 两种关节炎模型在黏膜免疫反应方面及雷公藤多甙对这两种模型的影响存在异同。

关键词 黏膜免疫;胶原免疫性关节炎;佐剂性关节炎;雷公藤多甙;对比研究

Comparative Study on Effect of Tripterygium Polyglycosides on Mucous Immune Function of Rat Models of Arthritis Induced by Collagen Ⅱ and by Adjuvant ZHOU Jing, ZHAO Ning, JIA Hong-wei, et al. *Institute of Basic Theory, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing (100700)*

Abstract Objective To observe the effects of Tripterygium polyglycosides (TWP) on mucous immune function in rat models of arthritis induced respectively with collagen-Ⅱ induced arthritis (CIA) & adjuvant arthritis (AA). **Methods** CIA and AA model rats were induced by immunization with collagen Ⅱ emulsified with complete Freund's adjuvant and complete Freund's adjuvant respectively and treated with TWP. Rats' mucus, systemic immunological indexes (peripheral subsets of T cells), local inflammatory factors (IL-6, TNF-α, COX-2, and NF-κB, etc.) were observed. **Results** In CIA model group, CD_4^+ in Peyer's Patch (PP), peripheral CD_4^+ and CD_8^+ positive T cells all raised, while in the AA model group, CD_4^+ lowered and CD_8^+ raised on PP, with both subsets increased. Effects of TWP on T lymphocyte subsets in PP and blood of the two models were different. High leveled IL-6, TNF-α, COX-2 and NF-κB expression could be seen in both model groups, and these inflammatory media could be inhibited by TWP. **Conclusion** There exist similarities and differences between the two models in aspects of mucus immune response and effect of TWP on them.

Key words mucus immune; collagen-Ⅱ induced arthritis; adjuvant arthritis; Tripterygium polyglycosides; comparative study

在类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)动物模型中,目前多采用佐剂性关节炎(adjnvant arthritis, AA)模型和胶原免疫性关节炎(collagen-Ⅱ induced arthritis, CIA)模型。前者为最早使用的关节炎模型,其局部病变[1]及血中细胞因子变化与 RA 相似[2],被广泛运用于研究 RA 炎症改变;而 CIA 在主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)相关、性别相关、关节局部病变、collagen Ⅱ(CⅡ)自身免疫等方面与 RA 有很多的相似之处[3,4],是目前比较公认的 RA 动物模型。

运用口服抗原的方法来诱导产生口服耐受治疗 RA 及 CIA 已经有了大量的报道[5,6],这表明黏膜免疫与 RA 有一定的相关性[7]。

本研究从黏膜免疫指标[包括肠道派伊尔结(peyer's patch, PP),关节局部 IL-6,TNF-α,COX-2 和 NF-κB 的表达]角度对 AA 与 CIA 两种动物模型做初步比较研究,并观察雷公藤多甙对两种模型的影响。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30171133, No. 39870952)

作者单位:中国中医研究院基础理论研究所(北京 100700)

通讯作者:吕爱平,Tel:010-64067611,E-mail:lap@jzjt.com

万方数据

材料与方法

1　动物　选择健康 SD 雄性大鼠 50 只，体重(200±20)g，清洁级，由中国医学科学院实验动物研究中心提供。

2　药物　雷公藤多甙片：成分为雷公藤多甙，湖南株州制药三厂生产，批号 20030304，以蒸馏水溶解后，按 8.75 mg/kg 给药。

3　试剂及仪器　CⅡ：由瑞典 Lund 大学提供；Freund's 完全佐剂，Sigma 公司产品；CD_3、CD_4、CD_8 单克隆抗体：其中 CD_3 由 FITC 标记，CD_4、CD_8 由 PE 标记，均为 Caltag 公司产品；IL-6、TNF-α、COX-2 和 NF-κB 免疫组化试剂盒：武汉博士德生物技术公司产品；流式细胞仪：EPICS XL，TOMUSEICO 公司产品；冰冻切片机：机号：801011080，Bright 产品；图像分析仪：0 90－134，713－000，德国 Leica 公司产品。

4　实验方法

4.1　造模方法　CIA 模型给予乳化后的 100μg Ⅱ型胶原与完全弗氏佐剂混合物于动物右后足跖皮下注射；AA 模型右后足跖皮下注射完全弗氏佐剂 0.1ml 致炎。

4.2　分组及给药方法　将 50 只动物随机分为 5 组：正常组、CIA 模型组和 CIA 雷公藤多甙治疗组(简称 CIA 治疗组)，AA 模型组和 AA 雷公藤多甙治疗组(简称 AA 治疗组)，每组 10 只。两治疗组在造模后给予雷公藤多甙片灌胃治疗(8.75 mg/kg)，每天 1 次，共 4 周。

4.3　观察指标及检测方法　取肠道 PP：打开腹腔，取空、回肠的肠系膜对侧的小肠壁上有圆顶状隆起，即为要取的 PP。流式细胞仪检测 PP 及外周血 T 细胞亚群；膝关节做冰冻切片，免疫组化法测 IL-6、TNF-α、COX-2 和 NF-κB 的表达，采用图像分析仪分析。

5　统计学方法　采用方差分析。

结　果

1　各组 PP T 细胞亚群流式检测结果比较　见表 1。与正常组比较，CIA 模型组 CD_4^+、CD_4^+/CD_8^+ 比值均显著升高($P<0.05$，$P<0.01$)；与 CIA 模型组比较，CIA 治疗组 CD_4^+ 细胞无显著变化，CD_8^+ 细胞显著升高($P<0.01$)，CD_4^+/CD_8^+ 比值显著降低($P<0.01$)。与正常组比较，AA 模型组 CD_4^+ 细胞显著降低($P<0.05$)，CD_8^+ 细胞显著升高($P<0.05$)，CD_4^+/CD_8^+ 比值显著降低($P<0.01$)；与 AA 模型组比较，AA 治疗组 CD_4^+ 和 CD_8^+ 细胞无显著变化，CD_4^+/CD_8^+ 比值显著升高($P<0.05$)。说明 CIA 和 AA 两种模型的 T 细胞亚群出现不同的变化趋势，而雷公藤对两者的影响也是不同的。

表 1　各组派伊尔结 T 细胞亚群检测结果比较　($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CD_4^+(%)	CD_8^+(%)	CD_4^+/CD_8^+
正常	10	22.27±2.53	4.06±0.59	5.52±0.88
CIA 模型	10	26.63±3.34*	3.35±0.96	8.69±2.46**
CIA 治疗	10	24.85±3.11	5.46±0.93**△△	4.51±0.63*△△
AA 模型	10	20.61±6.74*	7.21±1.89*	2.85±0.52**
AA 治疗	10	24.76±4.89	6.39±1.63*	3.96±0.91△

注：与正常组比较，* $P<0.05$，** $P<0.01$；与同类模型组比较，△$P<0.05$，△△$P<0.01$；下表同

2　各组外周血 T 细胞亚群流式检测结果比较　见表 2。与正常组比较，CIA 模型组及 CIA 治疗组 CD_4^+、CD_8^+ 均高于正常组($P<0.01$，$P<0.05$)。AA 模型组 CD_4^+ 低于正常组($P<0.01$)。AA 治疗组 CD_4^+ 水平较 AA 模型组上升($P<0.01$)，与正常组接近，差异无显著性。CD_8^+ 差异无显著性。CD_4^+/CD_8^+ 各组间比较差异均无显著性。说明 CIA 模型组和 AA 模型组的均会出现全身免疫功能紊乱，雷公藤多甙对这两种模型均有一定免疫调节作用。

表 2　各组外周血中 T 细胞亚群流式检测结果比较　($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CD_4^+(%)	CD_8^+(%)	CD_4^+/CD_8^+
正常	10	32.71±5.84	12.82±3.39	2.42±0.60
CIA 模型	10	40.15±2.96**	14.53±2.27*	2.52±0.37
CIA 治疗	10	38.28±3.43*	16.70±2.21*	2.31±0.20
AA 模型	10	25.66±4.13**	11.61±3.74	2.45±0.98
AA 治疗	10	35.63±4.31△△	11.48±2.72	2.76±0.88

3　各组大鼠关节软骨 IL-6、TNF-α、COX-2 及 NF-κB 表达比较　见表 3。与正常组比较，CIA 模型组及 AA 模型组 IL-6、TNF-α、COX-2 及 NF-κB 明显升高，差异均有显著性($P<0.01$)；与 CIA 模型组比较，CIA 治疗组 IL-6、TNF-α、COX-2 及 NF-κB 表达均下降，差异有显著性($P<0.01$)，与 AA 模型组比较，AA 治疗组 IL-6、COX-2 及 NF-κB 表达均有下降，差异亦有显著性($P<0.01$)。TNF-α 虽有下降，但差异无显著性($P>0.05$)。说明两种模型均存在细胞因子表达异常，而雷公藤多甙对抑制局部免疫炎症介质的表达具有一定作用。

万方数据

表 3 各组大鼠关节软骨 IL-6、TNF-α、COX-2 及 NF-κB 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-6	TNF-α	COX-2	NF-κB
正常	10	0.026±0.009	0.020±0.007	0.010±0.002	0.020±0.008
CIA 模型	10	0.061±0.012**	0.049±0.020**	0.034±0.008**	0.042±0.008**
CIA 治疗	10	0.033±0.009△△	0.029±0.009*△△	0.027±0.005**△△	0.027±0.009△△
AA 模型	10	0.060±0.017**	0.038±0.011**	0.030±0.011**	0.040±0.009**
AA 治疗	10	0.028±0.008△△	0.032±0.010**	0.018±0.006**△△	0.025±0.007△△

讨 论

本实验对 RA 常用的两种动物模型(CIA 和 AA)从黏膜免疫角度进行了探讨,为临床治疗提供更适合的实验载体。

本实验结果表明:两种模型关节局部 TNF-α、IL-6、COX-2 和 NF-κB 都较正常组有明显升高。这些细胞因子是引起炎症免疫、蛋白质水解、细胞募集和增殖的重要媒介,能激发关节局部炎症反应和急性应答[8-12],说明两种模型关节病变局部存在炎症反应和细胞因子的调节作用。

另外,两种模型 T 细胞亚群在 PP 和血中的变化是不一致的。说明黏膜免疫是不同于全身免疫的,黏膜免疫有其自身的特点。雷公藤对于关节炎的治疗机理似乎更倾向于调节全身免疫系统的功能。从 PP T 细胞亚群的变化来看,CIA 和 AA 模型在黏膜免疫方面存在差异,这可能是两种模型免疫方法的不同导致的,但尚需更进一步的实验研究来证实。

通过对两种模型的比较研究,我们认为,两种模型都可以用于 RA 的研究,但探索 RA 自身免疫的机制,CIA 更为适合。因为 CIA 的发病机制更能反应 RA 作为自身免疫性疾病的特点,其细胞免疫和体液免疫变化与 RA 相似。

雷公藤(*Tripterginum Wilfordii* Hook. F)是一种具有清热解毒,祛风通络,舒筋活血,除湿消肿止痛的中药[13]。现代研究发现雷公藤多甙可以有效治疗 RA 和强直性脊柱炎[14,15],其作用机制主要在于抗炎和免疫抑制。

本实验中,从 PP 和血中 T 细胞亚群的变化可以看出,雷公藤对于 CIA 和 AA 的影响主要是针对全身免疫系统的。雷公藤对于 CD_4^+/CD_8^+ 的比例存在一定影响,可以纠正 T 细胞亚群的失调、调节免疫应答,从而取得临床疗效。雷公藤多甙对 T 淋巴细胞亚群有非选择性非平衡性的抑制作用,使患者机体内存在的各免疫细胞亚群之间的病理性平衡产生改变,纠正免疫系统紊乱,这也许是雷公藤多甙治疗免疫性疾病的药理学基础[16]。

雷公藤多甙还抑制局部炎症介质的表达。雷公藤多甙可以抑制多种细胞因子的合成,并可在转录水平调节细胞因子的表达及活化。T 细胞释放各种细胞因子及酶类引起组织破坏,雷公藤多甙对 CD_4^+ 和 CD_8^+ 细胞均有抑制作用,从而相应的影响 T 细胞的细胞因子生成,从而减轻关节局部炎症反应对关节产生的破坏,对组织起到保护作用。CIA 模型和 AA 模型大鼠体内免疫功能被激活,CIA 和 AA 模型大鼠关节都可见高水平的炎症介质表达,说明两种模型关节病变局部存在炎症反应。两种模型均存在黏膜免疫和全身免疫功能的失调。雷公藤对于它们的治疗作用主要是调节全身免疫系统的功能,同时也可以抑制局部炎症介质的表达。

参 考 文 献

1 Van Eden W, Waksman BH. Immune regulation in adjuvant-induced arthritis: possible implications for innovative therapeutic strategies in arthritis. Arthritis Rheum 2003;48(7):1788—1796.

2 张华东,常志遂,杨怡坤,等.和血祛风冲剂对类风湿关节炎大鼠细胞因子的影响.中国中医基础医学杂志 2001;7(11):41—44.
Zhang HD, Chang ZS, Yang YK, et al. Effects of Hexui Qufeng Chongji on cytokines of RA rats. Chin J Basic Med Tradit Chin Med 2001;7(11):41—44.

3 Cook AD, Rowley MJ, Wines BD, et al. Antibodies to the collagen-like region of Clq and type Ⅱ collagen are independent non-cross-reactive populations in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. J Autoimmun 1994;7(3):369—378.

4 Choi EK, Gatenby PA, Bateman JF, et al. Antibodies to type Ⅱ collagen in SLE: a role in the pathogenesis of deforming arthritis? Immunol Cell Biol 1990;68(Pt1):27—31.

5 Thompson HS, Staines NA. Gastric administration of type Ⅱ collagen delays the onset and severity of collagen-induced arthritis in rats. Clin Exp Immunol 1986;64(3):581—586.

6 Naglar-Anderson C, Bober LA, Robinson ME, et al. Suppression of type Ⅱ collagen-induced arthritis by intragastric administration of soluble type Ⅱ collagen. Proc Natl Acad Sci USA 1986;83(19):7443—7446.

7 赵 宁,贾红伟,吴 萍,等.从黏膜免疫探讨中医治疗类风

万方数据

湿性关节炎的作用机理.中国中医基础医学杂志 2002;8(3):6—8.
Zhao N, Jia HW, Wu P, et al. Discussion of the mucosal immune function of RA treated by TCM. Chin J Basic Med Tradit Chin Med 2002;8(3):6—8.

8 Dayer JM, Beutler B, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E_2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. J Exp Med 1985;162(6):2163—2168.

9 Peacock DJ, Banquerigo ML, Brahn E. Angiogenesis inhibition suppresses collagen arthritis. J Exp Med 1992;175(4):1135—1138.

10 William RA, Dayer JM. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1990;33(3):305—315.

11 宋震坤,陈文照.环氧化酶-2 与关节炎.中国骨伤 2003;16(5):314—317.
Song ZK, Chen WZ. COX-2 and arthritis. Chin J Orthop Traumat 2003;16(5):314—317.

12 张玲玲,沈玉先,魏　伟.类风湿关节炎的关节滑膜病理生理机制.生理科学进展 2003;34(2):144—147.
Zhang LL, Shen YX, Wei W. Pathophysiological mechanism of synovium in joints of RA. Progr Physiol Sci 2003;34(2):144—147.

13 杨　芳.雷公藤的研究进展.第一军医大学分校学报 2003;26(2):159—160.
Yang F. Progress of study on tripterginum wilfordii. J Branch Campus First Milit Med Univ 2003;26(2):159—160.

14 李瑞琳.全国雷公藤临床应用学术研讨会纪要.中西医结合杂志 1988;8(5):315.
Li RL. Summary of seminar on clinical application of tripterginum wilfordii. Chin J Integr Tradit West Med 1988;8(5):315.

15 袁晓英.雷公藤多甙治疗类风湿性关节炎剂量与副作用的相关性分析.中国临床康复 2002;6(12):1808.
Yuan XY. Analysis on the relation of dose and side-effect of tripterginum wilfordii polyglycoside on RA. Chin J Clin Rehabil 2002;6(12):1808.

16 李玉峰,洪　萍,李夏新.雷公藤多甙对 T 淋巴细胞亚群影响的研究.中华微生物学和免疫学杂志 2001;21(1):65.
Li YF, Hong P, Li XX. Effects of tripterginum wilfordii polyglycoside on T lymphocyte. Chin J Microbiol Immunol 2001;21(1):65.

(收稿:2005-01-31　修回:2005-05-08)

《中国中西医结合杂志》第六届编委会名单

名誉总编　季钟朴

总 编 辑　陈可冀

副总编辑　沈自尹　肖培根　陈维养(常务)

顾　　问　吴咸中　辛育龄　关幼波　邓铁涛　尚天裕　王永炎　侯　灿

编辑委员　马必生　王一涛　王书臣　王今达　王宁生　王　阶　王学美　王　佩　王宝恩
王硕仁　王雪苔　尹光耀　史大卓　史载祥　刘干中　刘建勋　刘耕陶　刘猷枋
危北海　匡调元　朱　兵　吕爱平　吕维柏　齐清会　孙　燕　李　恩　李乃卿
李大金　李玉光　李连达　李廷谦　李国贤　李国栋　李鸣真　李顺成　李恩宽
杨任民　杨秀伟　时毓民　陈士奎　陈小野　陈冬燕　陈香美　吴伟康　陆付耳
张大钊　张之南　张永祥　张伯礼　张国玺　张亭栋　张荣华　张家庆　张梓荆
林求诚　林志彬　林瑞超　郁仁存　周文泉　周　俊　周霭祥　金益强　赵伟康
唐由之　顾振纶　郭赛珊　徐治鸿　梁晓春　黄晓愚　曹小定　葛秦生　谢宗万
谢竹藩　董福慧　曾晓春　雷　燕　蔡定芳　裴正学　黎磊石　廖家桢　廖福龙
戴瑞鸿

万方数据