

新风胶囊对佐剂性关节炎大鼠肺功能、Th 细胞漂移及调节性 T 细胞的影响

万磊¹ 刘健¹ 黄传兵¹ 湛曦¹ 汪元¹ 张晓军² 刘磊³ 程园园⁴ 冯云霞⁵

摘要 **目的** 观察新风胶囊不同剂量组对佐剂性关节炎 (adjuvant arthritis, AA) 大鼠肺功能、Th1/Th2 细胞、调节性 T 细胞 (Treg) 的影响。**方法** 将 84 只大鼠随机分为正常对照 (NC) 组、模型 (M) 组、甲氨喋呤 (MTX) 组、雷公藤多苷片 (TGT) 组和新风胶囊低剂量 (XFC-L) 组、新风胶囊中剂量 (XFC-M) 组、新风胶囊高剂量 (XFC-H) 组, 每组 12 只, 分别向除 NC 组外的其余动物右后足跖皮内注射弗氏完全佐剂 0.1 mL 致炎, 致炎后第 19 d 开始给药。NC 组及 M 组给予生理盐水, 其余 5 组分别给予 MTX、TGT、XFC。观察各组大鼠各指标的变化。**结果** (1) 与 NC 组比较, M 组大鼠足跖肿胀度 (E)、关节炎指数 (AI)、肺系数 (LI)、1 秒内平均呼气流量 (FEV1/FVC%)、肺泡炎积分、TNF- α 、Th1/Th2 细胞、TGF- β_1 表达明显升高 ($P < 0.01$); 用力肺活量 (FVC)、25% 肺活量的最大呼气流量 (FEF25)、50% 肺活量的最大呼气流量 (FEF50)、75% 肺活量的最大呼气流量 (FEF75)、最大呼气中期流量 (MMF)、用力最大呼气流量 (PEF)、CD4⁺ Treg、CD4⁺ CD25⁺ Treg、IL-10、Foxp3 表达明显降低 ($P < 0.01$)。 (2) 与 M 组比较, 各治疗组大鼠体重、FVC、FEF25、FEF50、FEF75、MMF、PEF、IL-10 及 Treg、Foxp3 的表达升高; E、AI、LI、FEV1/FVC% 及 TNF- α 、Th1/Th2 细胞、TGF- β_1 表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。 (3) 与 XFC-M 组比较, 其他各治疗组 LI、肺泡炎积分及 TNF- α 、Th1/Th2 细胞、TGF- β_1 升高; FVC、FEF25、FEF50、FEF75 及 IL-10、CD4⁺ Treg、CD4⁺ CD25⁺ Treg、Foxp3 降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** AA 大鼠在关节局部肿胀同时肺功能降低; 新风胶囊能明显改善 AA 大鼠足跖肿胀度、关节炎指数和提高肺功能, 其机制是通过促进 IL-10、CD4⁺ Treg、CD4⁺ CD25⁺ Treg 及 Foxp3 的表达、抑制 TNF- α 、Th1/Th2 细胞及 TGF- β_1 的表达, 降低炎症反应和免疫复合物对组织器官的损伤, 改善关节和肺部症状。

关键词 佐剂性关节炎; 肺功能; Th1/Th2 细胞; 调节性 T 细胞; 新风胶囊

Effect of Xinfeng Capsule on Pulmonary Function, Th1/Th2 Cells, and Regulatory T Cells of Adjuvant Arthritis Rats WAN Lei¹, LIU Jian¹, HUANG Chuan-bing¹, SHEN Xi¹, WANG Yuan¹, ZHANG Xiao-jun², LIU Lei³, CHENG Yuan-yuan⁴, and FENG Yun-xia⁵ 1 Department of Rheumatism Immunity, First Affiliated Hospital, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei (230031); 2 Department of Basic Research, Clinical College of Traditional Chinese Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei (230038); 3 Graduate School, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan (430065); 4 Department of Internal Medicine, Anqing Hospital of Chinese Medicine, Anhui (246000); 5 Department of Internal Medicine, Integrated Chinese and Western Medicine Hospital, Anhui University of TCM, Hefei (230000)

ABSTRACT **Objective** To observe the effects of Xinfeng Capsule (XFC) at different doses on lung function, Th1/Th2 cells, regulatory T cells (Treg) in adjuvant arthritis (AA) rats. **Methods** Totally 84 rats were randomly divided into 5 groups, i.e., the normal control group (NC), the model group (M),

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目资助 (No.81403388); 国家自然科学基金资助项目 (No.81173211); 安徽省自然科学基金项目 (No.1508085QH159); 国家科技支撑计划课题: 新安医学防治中医疑难病临床研究 (No.2012BA126B02); 国家中医药重点学科中医痹病学建设项目 (No.国中医药发[2009][30 号])

作者单位: 1. 安徽中医药大学第一附属医院风湿免疫科 (合肥 230031); 2. 安徽中医药大学中医临床学院基础科 (合肥 230038); 3. 湖北中医药大学研究生院 (武汉 430065); 4. 安徽省安庆市中医院内科 (安徽 246000); 5. 安徽中医药大学中西医结合医院内科 (合肥 230000)

通讯作者: 刘健, Tel: 0551-62850053, E-mail: liujianahzy@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2017.02.0225

the methotrexate (MTX) group, the Tripterygium Glycosides Table (TGT) group, the low dose XFC (XFC-L) group, the medium dose XFC (XFC-M) group, the high dose XFC (XFC-H) group, 12 in each group. Freund's complete adjuvant (FCA; 0.1 mL) was intradermally injected to all rats except those in the NC group from right rear paw to induce inflammation. Medication was started from the 19th day after inflammation. Normal saline was administered to rats in the NC group and the M group. Rats in the rest groups were correspondingly administered with MTX, TGT, XFC, respectively. Changes of each index were observed in all groups. Results (1) Compared with the NC group, rat paw swelling degree (E), arthritis index (AI), lung index (LI), average expiratory flow in 1 second (FEV1/FVC%), alveolitis integral, TNF- α , Th1/Th2 cells, transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) expression significantly increased in the M group ($P < 0.01$); forced vital capacity (FVC), peak expiratory flow 25% of vital capacity (FEF25), peak expiratory flow 50% of vital capacity (FEF50), peak expiratory flow 75% of vital capacity (FEF75), the maximum mid-expiratory flow (MMF), peak expiratory flow (PEF), CD4⁺Treg, CD4⁺CD25⁺Treg, IL-10, and Foxp3 expression significantly decreased in the M group ($P < 0.01$). (2) Compared with the M group, body weight, FVC, FEF25, FEF50, FEF75, MMF, PEF, IL-10, Treg, and Foxp3 expression increased in all treatment groups; E, AI, LI, FEV1/FVC%, TNF- α , Th1/Th2 cells, and TGF- β_1 expression decreased in all treatment groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). (3) Compared with the XFC-M group, LI, alveolitis integral, TNF- α , Th1/Th2 cells, and TGF- β_1 increased; FVC, FEF25, FEF50, FEF75, IL-10, CD4⁺Treg, CD4⁺CD25⁺Treg, and Foxp3 decreased in other treatment groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusions AA rats had local swollen paws and decreased lung function. XFC could significantly improve paw swelling and AI of AA rats, and improve lung function. It could reduce inflammatory reaction and immune complexes on tissue and organ damage, improve joint and pulmonary symptoms possibly through promoting expressions of IL-10, CD4⁺Treg, CD4⁺CD25⁺Treg, and Foxp3, and inhibiting TNF- α , Th1/Th2 cells, and TGF- β_1 expression.

KEYWORDS adjuvant arthritis; pulmonary function; Th1/Th2 cell; regulatory T cell; Xinfeng Capsule

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是以慢性多关节炎为主要临床表现的全身性自身免疫性疾病,它不仅导致关节畸形,而且还常伴有关节以外的其他脏器病变^[1,2]。肺组织含有丰富的结缔组织和血液供应,故肺部最常受累,表现为肺功能的下降和肺组织的损害^[3]。前期研究我们发现,佐剂关节炎(adjuvant arthritis, AA)大鼠存在肺功能的损伤,而且肺功能下降与辅助T细胞(helper T cells, Th)1型和2型细胞因子、调节T细胞(regulatory T cells, Treg)表达的失衡密切相关^[4]。同时研究发现,新风胶囊不但能明显改善RA患者关节症状,提高生活质量^[5],还能显著降低AA大鼠关节肿胀,提高肺功能水平^[6,7]。本文在既往研究的基础上进一步观察健脾化湿通络中药新风胶囊对AA大鼠肺功能、Th1/Th2细胞及Treg的影响,更深入地探讨新风胶囊治疗RA肺功能损伤的作用机制。

材料与方法

1 动物 清洁级雄性Wistar大鼠84只,鼠龄

5~6个月,体重(160±20)g,由南京医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(苏)2008-0004。清洁级标准饲养。

2 药物 新风胶囊(Xinfeng Capsule, XFC:黄芪、薏苡仁、蜈蚣、雷公藤):由安徽中医药大学第一附属医院制剂中心提供,批号20081129。每粒含生药0.4g,制作工艺为以均匀设计法和正交设计法对新风胶囊的提取工艺进行优选,以薄层扫描法测定确定黄芪、薏苡仁、蜈蚣、雷公藤乙醇回流提取的工艺参数及工艺条件。将薄荷脑进行 β -环糊精包合后,黄芪、薏苡仁、蜈蚣、雷公藤提取物混合制粒;干燥、整粒、灭菌,填充胶囊外包,送检,入库。质控:采用薄层色谱法对黄芪、薏苡仁、蜈蚣、雷公藤进行定性鉴别,按药典要求对新风胶囊进行检查。甲氨喋呤(MTX):2.5mg/片,由上海医药(集团)有限公司信谊制药总厂生产,批号20090104。雷公藤多苷片(TGT):10mg/片,由上海医科大学红旗制药厂生产,批号20081102。

3 试剂 弗氏完全佐剂(freund's complete adjuvant, FCA):由美国Sigma公司出品,批号:

098k8729。肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-10(interleukin-10, IL-10)检测试剂盒购自美国 R&D 公司;血清转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) 兔 IgG 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司(批号:sc-146), 叉状头转录因子 p3 (Forkhead Box p3, Foxp3) 兔 IgG 单克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司(批号:bs-0269R), SP 试剂盒和 DAB 试剂免疫组化染色试剂盒购自北京中杉金桥生物有限公司;异硫氢酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的 anti-rat CD4 单抗(抗鼠 CD4-FITC) 购自美国 eBioscience 公司(批号:11-0040, Clone: OX35)、藻红蛋白 (phycoerythrin, PE) 标记的 anti-rat CD25 单抗(抗鼠 CD25-PE) 购自美国 BioLegend 公司(批号:202105, Clone:OX-39)。

4 仪器 动物肺功能分析系统 (AniRes2003) 由北京贝兰博科技有限公司生产。病理切片机(型号:KMI135, 德国莱卡公司), 光镜(型号: DMLB, 德国莱卡公司), 全自动显微摄像系统(型号: CX21, 日本奥林巴斯公司);电子天平(型号: JA5003, 上海精密仪器仪表有限公司)。电热恒温水温箱(型号: HH-W21-600, 上海医用恒温设备厂), 混匀机(型号: SK-1, 江苏常州国华电器有限公司), 洗板机(型号: ELX50, 美国 Bio-TEK 公司), 酶标仪(型号: ELX800, 美国 Bio-TEK 公司)。流式细胞仪(型号: Epics XL, 美国 Beckman Coulter 公司)。

5 方法

5.1 模型复制、分组及给药方法 将 84 只 Wistar 雄性大鼠适应性喂养 1 周后, 采用随机数字表的方法将大鼠随机分为正常对照组(NC 组, 12 只)和模型组(M 组, 72 只), 除 NC 组外, 向每只大鼠右足跖皮内注射 FCA0.1 mL 致炎, 复制成 AA 大鼠模型^[8]; NC 组右足跖皮内注射生理盐水 0.1 mL。模型复制成功与否根据大鼠足趾肿胀度及关节滑膜病理学变化判定^[8]。致炎后第 19 天, 将 AA 大鼠模型组按随机数字表分为 6 组: 新风胶囊高剂量(XFC-H)组、新风胶囊中剂量(XFC-M)组、新风胶囊低剂量(XFC-L)组、甲氨喋呤(MTX)组、雷公藤多苷片(TGT)组及 M 组, 当天开始给药, 根据药理实验方法学方法, 根据人体体表面积计算动物给药剂量^[9]。各组的给药量如下: XFC 组: 将 XFC 去除胶囊壳研成细末, 加生理盐水制成混悬液, 3 组给药浓度分别为: XFC-H 0.6 g/mL, XFC-M 0.3 g/mL, XFC-L 0.15 g/mL, 每组按 1 mL/100 g 的剂量灌胃, 每天 1 次; MTX 组: 将

MTX 研成细末, 加生理盐水制成混悬液, 浓度为 0.3 mg/mL, 按 1 mL/100 g 的剂量灌胃, 每周 1 次, 未给药的实验日, 给予生理盐水灌胃, 1 mL/100 g, 每天 1 次; TGT 组: 将 TGT 研成细末, 加生理盐水制成混悬液, 浓度为 1 mg/mL, 按 1 mL/100 g 的剂量灌胃, 每天 1 次; NC 组及 M 组给予生理盐水灌胃, 1 mL/100 g, 每天 1 次。各组连续用药 30 天。

5.2 检测指标及检测方法

5.2.1 大鼠足跖肿胀度、关节炎指数(AI)的测算 分别在造模前 1 天、致炎后第 18 天、给药后每 3 天测量各组大鼠右后足跖的容积, 计算各组大鼠足跖肿胀度^[9]。肿胀度 $E(\%) = (V_t - V_n) / V_n \times 100\%$ (V_n 、 V_t 分别代表造模前后的容积)。致炎后第 12 天开始观察并记录全身关节病变程度, 每 3 天 1 次。全身病变按 5 级评分法评价, 根据未注射 FCA 的其余 3 只肢体的病变程度累积积分, 计算出 AI^[10]。0 分: 无红肿; 1 分: 小趾关节红肿; 2 分: 趾关节和足跖肿胀; 3 分: 踝关节以下的足爪肿胀; 4 分: 包括踝关节在内的全部足爪肿胀。把各个关节的积分累计起来, 即为每只大鼠的 AI, 最高分为 12 分。

5.2.2 大鼠肺系数的测定 肺系数 = 肺湿重 (mg)/体重 (g) $\times 100\%$ 。

5.2.3 大鼠肺病理组织学观察 将肺组织于 4% 多聚甲醛中固定 8 h 后依次予脱水、透明、浸蜡和包埋, 并切片 (6 μm) 作 HE 染色。根据 Szapiel SV^[11] 等的方法确定肺炎的程度: 无肺炎(-); 轻度肺炎(+): 肺泡隔因细胞浸润增宽, 病变范围局限在全肺的 20% 以下; 中度肺炎(++): 病变范围占全肺的 20% ~ 50%; 重度肺炎(+++): 呈弥漫性分布, 病变范围大于 50%; 分别记为 0、1、2、3 分。

5.2.4 肺功能测定 致炎后 48 天, 两组随机各取 10 只大鼠, 用小动物肺功能仪测定肺功能^[12]。测定指标有用力肺活量(forced vital capacity, FVC)、1 秒内平均呼气流量(the average expiratory flow in one second, FEV1/FVC%)、25% 肺活量的最大呼气流量(peak expiratory flow 25% of vital capacity, FEF25)、50% 肺活量的最大呼气流量(peak expiratory flow 50% of vital capacity, FEF50)、75% 肺活量的最大呼气流量(peak expiratory flow 75% of vital capacity, FEF75)、最大呼气中期流量(the maximum mid-expiratory flow, MMF)、用力最大呼气流量(peak expiratory flow, PEF)。操作过程: 10% 水合氯醛 (0.35 mL/100 g) 腹腔注射麻醉, 气管切开后行气管插管, 将大鼠置于体描箱

内,保持头低位,与呼吸机管路相连,行机械通气测肺功能。在测定过程中,采用外加压力的办法,使动物深吸气/深呼气,电脑自动快速而准确地测出各项指标。

5.2.5 TNF- α 、IL-10 及 Th1/Th2 细胞因子的测定 严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作测定 TNF- α 、IL-10 的含量,并以细胞因子 TNF- α 与 IL-10 含量的比值作为 Th1/Th2 细胞。

5.2.6 Foxp3、TGF- β_1 蛋白的测定 参照试剂盒链霉抗生物素蛋白-过氧化酶(streptavidin-biotin peroxidase, SP)法进行操作。Foxp3、TGF- β_1 单克隆抗体 1:100 稀释,每组切片中任选 1 张用 0.01 mol/L 磷酸缓冲盐溶液代替一抗进行染色,为阴性对照。每张切片任选 5 个视野,以细胞胞浆、胞质、胞核中出现黄色或棕褐色颗粒为阳性反应。免疫组化染色的半定量判定:积分光密度(integrated optical density, IOD)采用图像分析软件(美国 Image-pro plus 专业图像分析软件系统,美国 Media Cybernetics 公司)进行图像分析,用 IOD 表示 Foxp3、TGF- β 蛋白的表达;计算公式:积分光密度 IOD = 面积密度 $\times$ 平均光密度。阳性反应 IOD 越大,表示蛋白表达越强。

5.2.7 流式细胞术检测大鼠血液 CD4⁺CD25⁺ Treg 的表达 取大鼠新鲜血液 100 μ L,按每 10⁶ 个细胞/管分别加入抗-鼠 CD4-FITC 0.25 μ g、抗-鼠 CD25-PE 1.0 μ g,避光 20~30 min;加红细胞裂解液 1 mL,避光 15~25 min;用 PBA 洗两遍,离心弃上清,流式细胞仪检测 CD4⁺CD25⁺ Treg 比例。

5.3 统计学方法 采用 SPSS 11.5 软件包进行统计学处理,实验数据为连续性变量采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,样本均采用 Kolmogorov-Smirnov 正态性检验, AI 等级计数资料通过 0、1、2、3、4 分换算为计量积分,多组间计量资料采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠体重、足跖肿胀度及 AI 的比较(表 1) 致炎前各组大鼠体重、足跖肿胀度均无明显差异。给药前大鼠体重低于 NC 组, AI 显著高于 NC 组($P < 0.01$);给药后, M 组大鼠足跖肿胀度、AI 显著高于 NC 组($P < 0.01$);XFC 各剂量组大鼠足跖肿胀度、AI 显著低于 M 组,体重高于 NS 组($P < 0.05$, $P < 0.01$),而 XFC-M 组与其他各治疗组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。XFC-M 组与其他各治疗组比较,大鼠体重显著升高,且差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2 各组对 AA 大鼠肺功能参数比较(表 2) 与 NC 组比较, M 组 FVC、FEF25、FEF50、FEF75、MMF、PEF 明显降低($P < 0.01$), FEV1/FVC 显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 M 组比较,各治疗组 FVC、FEF25、FEF50、FEF75、MMF、PEF 明显升高, FEV1/FVC 显著降低,大多数指标差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 XFC-M 组比较, MTX 组 FEF25、FEF50、FEF75、MMF、PEF 明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);TGT 组 FVC、FEF25、FEF50、FEF75、MMF 明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);XFC-H 组 FVC 明显降低($P < 0.01$)。

3 各组对大鼠肺系数、肺泡炎积分及细胞因子表达水平的影响(表 3) 与 NC 组比较, M 组大鼠肺系数、肺泡炎、血清中 TNF- α 、Th1/Th2 细胞明显升高,而血清 IL-10 明显降低($P < 0.01$)。与 M 组比较,各治疗组大鼠肺系数、肺泡炎、血清中 TNF- α 、Th1/Th2 细胞降低,血清 IL-10 升高,大多数有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 XFC-M 组比较, MTX 组肺系数、Th1/Th2 细胞升高,血清 IL-10 降低($P < 0.05$);XFC-L 组肺系数、肺泡炎、Th1/Th2 细胞升高,血清 IL-10 水平降低($P < 0.05$);XFC-H 组 Th1/Th2 细胞升高,血清 IL-10 明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠体重、足跖肿胀度及 AI 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体 重(g)			足跖肿胀度(%)		AI	
		致炎前	给药前	给药后	致炎前	给药后	致炎 12 天	给药后
NC	12	179 $\pm$ 13	234 $\pm$ 12	302 $\pm$ 9	1.44 $\pm$ 0.10	7.54 $\pm$ 1.70	0.08 $\pm$ 0.28	0.17 $\pm$ 0.38
M	12	184 $\pm$ 16	211 $\pm$ 12 [*]	254 $\pm$ 12 [*]	1.45 $\pm$ 0.16	21.5 $\pm$ 7.89 [*]	1.08 $\pm$ 0.66 [*]	7.08 $\pm$ 0.79 [*]
MTX	12	190 $\pm$ 17	222 $\pm$ 14	275 $\pm$ 12 $\Delta\Delta\Delta$	1.48 $\pm$ 0.15	12.8 $\pm$ 7.46 Δ	1.00 $\pm$ 0.60	5.42 $\pm$ 1.24 $\Delta\Delta$
TGT	12	188 $\pm$ 19	215 $\pm$ 16	283 $\pm$ 13 $\Delta\Delta\Delta$	1.47 $\pm$ 0.13	11.9 $\pm$ 9.18 Δ	1.17 $\pm$ 0.57	5.00 $\pm$ 1.12 $\Delta\Delta$
XFC-L	12	180 $\pm$ 15	212 $\pm$ 11	268 $\pm$ 9 $\Delta\Delta\Delta$	1.48 $\pm$ 0.20	14.2 $\pm$ 8.89 Δ	1.33 $\pm$ 0.65	6.17 $\pm$ 0.93 Δ
XFC-M	12	189 $\pm$ 16	219 $\pm$ 12	302 $\pm$ 12 $\Delta\Delta$	1.46 $\pm$ 0.13	11.4 $\pm$ 5.85 $\Delta\Delta$	1.25 $\pm$ 0.75	5.33 $\pm$ 1.15 $\Delta\Delta$
XFC-H	12	179 $\pm$ 19	206 $\pm$ 14	271 $\pm$ 10 $\Delta\Delta\Delta$	1.43 $\pm$ 0.11	12.9 $\pm$ 12.4 Δ	1.71 $\pm$ 0.71	5.58 $\pm$ 1.31 $\Delta\Delta$

注:与 NC 组比较, $^*P < 0.01$;与 M 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与 XFC-M 组比较, $\Delta^*P < 0.01$

4 各组大鼠 CD4⁺ Treg、CD4⁺ CD25⁺ Treg、Foxp3 表达明显降低, TGF-β₁ 表达明显升高 ($P < 0.01$)。与 M 组比较, MTX 组、TGT 组及 XFC 各组 CD4⁺ CD25⁺ Treg、Foxp3 表达升高, TGF-β₁ 表达降

表 2 各组大鼠肺功能参数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	FVC (mL)	FEV1/FVC (%)	FEF25 (mL/s)	FEF50 (mL/s)	FEF75 (mL/s)	MMF (mL/s)	PEF (mL/s)
NC	6.1 ± 2.0	57.7 ± 5.8	45.2 ± 6.2	39.4 ± 6.8	37.7 ± 5.9	39.2 ± 5.7	39.1 ± 4.9
M	5.1 ± 0.3 [*]	68.6 ± 6.4 [*]	30.7 ± 2.8 [*]	27.0 ± 6.1 [*]	20.9 ± 5.3 [*]	28.5 ± 2.96 [*]	29.4 ± 2.5 [*]
MTX	5.3 ± 0.3 ^{△△}	64.5 ± 7.6	36.8 ± 3.7 ^{△△▲}	30.3 ± 4.9 ^{▲▲}	24.1 ± 5.8 [▲]	31.7 ± 4.4 [▲]	33.1 ± 3.1 [▲]
TGT	5.4 ± 0.3 ^{△▲▲}	61.2 ± 8.2 [△]	35.8 ± 3.2 ^{△△▲▲}	32.3 ± 5.1 ^{△▲▲}	25.7 ± 4.6 ^{△▲}	31.9 ± 3.3 ^{△▲}	34.7 ± 4.5 ^{△▲}
XFC-L	5.4 ± 0.1 ^{△△}	63.6 ± 8.9	36.3 ± 3.2 ^{△△}	32.7 ± 7.2	25.2 ± 7.0	30.5 ± 3.8	32.1 ± 3.4
XFC-M	5.9 ± 0.3 ^{△△}	60.2 ± 7.3 ^{△△}	42.2 ± 4.7 ^{△△}	40.2 ± 4.4 ^{△△}	34.4 ± 10.5 ^{△△}	37.1 ± 4.6 ^{△△}	7.8 ± 4.3 ^{△△}
XFC	5.4 ± 0.4 ^{△▲▲}	64.4 ± 6.6	39.6 ± 2.2 ^{△△}	42.2 ± 4.7 ^{△△}	31.6 ± 7.0 ^{△△}	35.2 ± 4.0 ^{△△}	34.3 ± 5.4 [△]

注:与 NC 组比较, ^{*} $P < 0.01$; 与 M 组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$; 与 XFC-M 组比较, [▲] $P < 0.01$; 每组样本数为 10

表 3 各组大鼠肺系数、肺泡炎积分及细胞因子表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

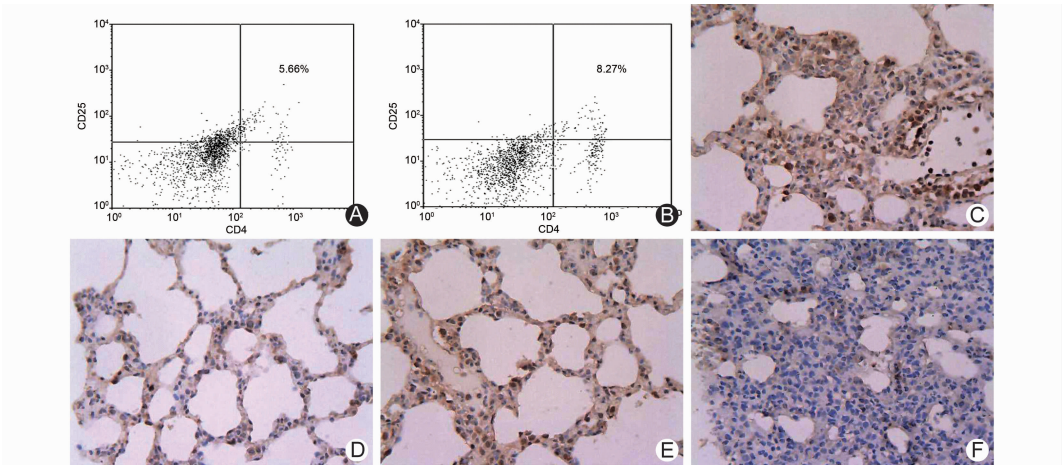
组别	<i>n</i>	肺系数	肺泡炎 (分)	TNF-α (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	Th1/Th2
NC	10	2.61 ± 0.08	0.37 ± 0.74	32.1 ± 7.4	106.6 ± 14.7	0.33 ± 0.10
M	10	3.36 ± 0.36 [*]	2.75 ± 0.70 [*]	80.5 ± 10.7 [*]	51.5 ± 20.1 [*]	2.08 ± 0.62 [*]
MTX	10	2.83 ± 0.11 ^{△△▲}	1.87 ± 0.35 ^{△△}	59.8 ± 20.3 [△]	74.2 ± 23.6 ^{△▲}	1.15 ± 0.48 ^{△△▲}
TGT	10	2.74 ± 0.12 ^{△△}	1.62 ± 0.51 ^{△△}	53.2 ± 19.7 ^{△△}	90.2 ± 21.8 ^{△△}	0.65 ± 0.30 ^{△△}
XFC-L	10	2.87 ± 0.13 ^{△△▲}	2.37 ± 0.51 [▲]	65.9 ± 19.8	71.3 ± 22.6 [▲]	1.46 ± 0.84 [▲]
XFC-M	10	2.71 ± 0.14 ^{△△}	1.75 ± 0.46 ^{△△}	55.1 ± 20.0 ^{△△}	95.4 ± 19.7 ^{△△}	0.75 ± 0.34 ^{△△}
XFC-H	10	2.79 ± 0.15 ^{△△}	2.12 ± 0.83	67.1 ± 17.1 [△]	67.9 ± 20.6 ^{▲▲}	1.20 ± 0.53 ^{△△▲}

注:与 NC 组比较, ^{*} $P < 0.01$; 与 M 组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$; 与 XFC-M 组比较, [▲] $P < 0.01$

表 4 各组 CD4⁺ Treg、CD4⁺ CD25⁺ Treg、TGF-β₁、Foxp3 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	CD4 ⁺ Treg (%)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg (%)	TGF-β ₁ (IOD)	Foxp3 (IOD)
NC	40.92 ± 6.51 (8)	9.45 ± 0.81 (8)	0.12 ± 0.07 (6)	0.41 ± 0.10 (6)
M	29.51 ± 3.60 (8) [*]	5.78 ± 0.85 (8) [*]	0.48 ± 0.09 (6) [*]	0.13 ± 0.03 (6) [*]
MTX	35.22 ± 4.49 (8) [△]	6.92 ± 1.23 (8) ^{△△▲}	0.28 ± 0.08 (6) ^{△△}	0.33 ± 0.05 (6) ^{△△}
TGT	38.32 ± 8.84 (8) [△]	8.75 ± 0.85 (8) ^{△△}	0.24 ± 0.06 (6) ^{△△}	0.40 ± 0.04 (6) ^{△△}
XFC-L	31.81 ± 3.02 (8)	8.26 ± 1.37 (8) ^{△△}	0.33 ± 0.07 (6) ^{△△▲}	0.29 ± 0.06 (6) ^{△△▲}
XFC-M	38.75 ± 8.68 (8) ^{△△}	8.64 ± 1.88 (8) ^{△△}	0.22 ± 0.07 (6) ^{△△}	0.37 ± 0.07 (6) ^{△△}
XFC-H	30.26 ± 2.36 (8) [▲]	6.90 ± 1.12 (8) ^{△▲}	0.29 ± 0.09 (6) ^{△△}	0.33 ± 0.04 (6) ^{△△}

注:与 NC 组比较, ^{*} $P < 0.01$; 与 M 组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$; 与 XFC-M 组比较, [▲] $P < 0.01$; () 内数据为样本数



注:A、C、E 为 M 组;B、D、F 为 XFC 组;其中,A、B 分别为 CD4⁺ CD25⁺ Treg 表达;C、D 分别为肺组织 TGF-β₁ 表达 (SP 法, ×400);E、F 分别为肺组织 Foxp3 表达

图 1 M 组及 XFC 组大鼠 CD4⁺ CD25⁺ Treg 表达及肺组织 TGF-β₁、Foxp3 表达水平比较

低,MTX、TGF、XFC-M 组 $CD4^+$ Treg 表达升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与 XFC-M 组比较,MTX 组 $CD4^+$ $CD25^+$ Treg 表达降低;XFC-L 组 Foxp3 表达降低,TGF- β_1 表达升高;XFC-H 组 $CD4^+$ Treg、 $CD4^+$ $CD25^+$ Treg 表达降低($P < 0.05$)。

讨 论

本组研究发现,AA 大鼠在 FCA 造模后足跖肿胀度、AI、肺系数、FEV1/FVC%、肺泡炎积分、TNF- α 、Th1/Th2 细胞、TGF- β_1 的表达均明显升高($P < 0.01$);肺功能参数 FVC、FEF25、FEF50、FEF75、MMF、PEF、IL-10 水平明显降低。说明 AA 大鼠在致炎后免疫复合物沉积于关节,进一步刺激机体释放炎症介质参与局部的炎症反应,促使肺组织病变、肺功能降低,表现为小气道的损伤和通气功能障碍。而 AA 大鼠血液中 $CD4^+$ Treg、 $CD4^+$ $CD25^+$ Treg 和肺组织 Foxp3 表达明显降低,提示肺功能的降低可能与调节 T 细胞的表达有关, $CD4^+$ $CD25^+$ Treg 抑制 $CD4^+$ $CD25^-$ T 细胞的表达降低,促使大量致炎性细胞的释放而抑制了抑炎性细胞的表达,从而加大了肺组织和关节的损伤。通过新风胶囊治疗后,AA 大鼠体重、FVC、FEF25、FEF50、FEF75、MMF、PEF、IL-10、及 Treg、Foxp3 的表达明显升高;E、AI、LI、FEV1/FVC% 及 TNF- α 、Th1/Th2 细胞、TGF- β_1 的表达降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。并且同阳性对照组比较,新风胶囊能明显提高 IL-10、Foxp3、 $CD4^+$ Treg、 $CD4^+$ $CD25^+$ Treg 水平,降低 TNF- α 、Th1/Th2 细胞、TGF- β_1 表达水平。说明健脾化湿通络药物新风胶囊能明显改善 AA 大鼠肺功能,并且改善肺功能的机制与调节免疫平衡、降低炎症反应有关,通过上调 IL-10、 $CD4^+$ Treg、 $CD4^+$ $CD25^+$ Treg 及 Foxp3 的表达、下调 TNF- α 、Th1/Th2 细胞及 TGF- β_1 的表达,降低炎症反应和免疫复合物对组织器官的损伤,改善关节和肺部症状。

细胞因子的表达异常在 RA 中发挥重要作用^[13]。Th1、Th2 细胞是由不同的细胞系演变形成的,Th 细胞根据其分泌的细胞因子不同可分为 Th1、Th2^[14]。在本次观察中我们研究了 Th1、Th2 的典型细胞因子 TNF- α 和 IL-10,TNF- α 是加强细胞炎症反应的免疫促进因子,IL-10 是细胞炎症反应的免疫抗炎因子^[15]。TNF- α 是机体炎症反应与免疫应答的重要调节因子,主要导致 RA 初期的关节肿胀,能刺激滑膜细胞和软骨细胞合成 PGE2 和胶原酶,导致关节局部滑膜炎症和软骨组织破坏,TNF- α 能刺激其自身的合成,在 RA 的细胞因子网络中起中心作用^[16,17]。IL-10 主要由

Th2 细胞分泌,对 T 细胞、嗜酸性粒细胞、NK 细胞、B 细胞和肥大细胞等起抑制作用,抑制它们产生前炎症因子和趋化因子^[18]。IL-10 主要是通过抑制抗原递呈细胞(APC),诱导 T 细胞不应答和对气道内炎性细胞直接抑制作用,从而抑制 RA 肺部病变^[19]。

在 RA 的发病中 Th1、Th2 细胞的平衡打破,Th 细胞向 Th1 细胞漂移,炎症反应增加,直接诱导 RA 病情的加重。在本组研究中,新风胶囊能降低 TNF- α 含量、提高 IL-10 的表达,降低 AA 大鼠 Th1/Th2 细胞,Th 细胞向 Th2 细胞漂移,促使 Th1、Th2 细胞趋向平衡。血液中 $CD4^+$ $CD25^+$ Treg 可分泌免疫抑制因子 IL-10 和 TGF- β_1 ,对效应 T 细胞产生抑制作用,同时,IL-10 可进一步阻止 T 细胞受体介导的 $CD4^+$ T 细胞的活化。有研究发现,以 IL-10 处理 T 细胞会导致持久的抗原特异性 T 细胞无效应^[20,21]。Foxp3 作为 $CD4^+$ $CD25^+$ Treg 的特异性标记,在 AA 大鼠肺组织中的 Foxp3 表达水平低于正常对照组,说明 AA 大鼠 $CD4^+$ $CD25^-$ T 细胞受刺激后转化 $CD4^+$ $CD25^+$ Treg 的能力降低, $CD4^+$ $CD25^+$ Treg 不能有效地抑制 $CD4^+$ $CD25^-$ T 细胞增殖,使得致炎因子 TNF- α 大量释放和肺组织 TGF- β_1 富集,Th1/Th2 细胞平衡紊乱,导致 AA 大鼠关节肿胀、功能减退和肺功能降低。健脾化湿抗通络药物新风胶囊可以提高大鼠血液中 IL-10、 $CD4^+$ $CD25^+$ Treg 水平,在升高肺组织 Foxp3 表达的同时降低 TGF- β_1 ,Th 细胞向 Th2 细胞漂移,炎症反应降低,从而降低在关节炎基础上进一步发展为肺间质纤维化的可能。而我们在研究中发现经过新风胶囊治疗后肺组织中 TGF- β_1 含量降低,可能是由于 TGF- β_1 参与炎症反应游离于血液中,从而在血液中大量聚集,使得肺组织中 TGF- β_1 表达降低,从而降低了肺纤维化的风险,至于血液中 TGF- β_1 水平是否升高我们将作进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 汪元,刘健,朱艳,等.新风胶囊对佐剂性关节炎大鼠心肌纤维化的影响及机制研究[J].中国中西医结合杂志,2013,33(5):668-673.
- [2] 刘健,曹云祥,朱艳,等.新风胶囊对佐剂性关节炎大鼠心功能及心肌超微结构影响[J].中国中西医结合杂志,2012,32(11):1543-1548.
- [3] 刘健,范海霞,杨梅云,等.佐剂性关节炎大鼠肺功能、肺部 HRCT 及细胞因子的变化[J].中国临床保健杂志,2006,9(6):586-588.
- [4] Lei W, Jian L. Changes of $CD4^+$ $CD25^+$ regulatory T cells, FoxP3 in adjuvant arthritis rats

- with damage of pulmonary function and effects of *Tripterygium Glycosides Tablet* [J]. *Int J Rheumatol*, 2012; 348450.
- [5] 黄传兵,刘健,谌曦,等. 新风胶囊治疗类风湿性关节炎疗效观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(12): 1599 – 1602.
 - [6] 刘健,张皖东,陈光亮,等. 新风胶囊对佐剂性关节炎大鼠疗效及滑膜 *fas*、*fasL* 及 *bcl-2* 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(8): 599 – 602.
 - [7] 刘健,郑志坚,方朝晖,等. 新风胶囊对佐剂性关节炎大鼠滑膜细胞及脾脏淋巴细胞超微结构作用的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2001, 21(12): 917 – 919.
 - [8] 马玉琛,段斐,孟明,等. 改良弗氏完全佐剂制备大鼠类风湿性关节炎模型[J]. 现代预防医学, 2008, 35(10): 1989 – 1991.
 - [9] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 第 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2002: 919 – 921.
 - [10] 张钧田. 现代药理实验方法[M]. 北京:北京医科大学,中国协和医科大学联合出版社, 1998: 1383.
 - [11] Szapiel SV, Elson NA, Fulmer JD, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude athymic mouse [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120(4): 893 – 899.
 - [12] Wan L, Liu J, Huang CB, et al. Effect of *Tripterygium Glycosides* on pulmonary function in adjuvant arthritis rats [J]. *J Chin Med Assoc*, 2013, 76(12): 715 – 723.
 - [13] Adlan AM, Panoulas VF, Smith JP, et al. Association between corrected QT interval and inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis [J]. *J Rheumatol*, 2015, 42(3): 421 – 428.
 - [14] Talaat RM, Mohamed SF, Bassyouni IH, et al. Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: correlation with disease activity [J]. *Cytokine*, 2015, 72(2): 146 – 153.
 - [15] Lubahn CL, Lorton D, Schaller JA, et al. Targeting α - and β -adrenergic receptors differentially shifts Th1, Th2, and inflammatory cytokine profiles in immune organs to attenuate adjuvant arthritis [J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 346.
 - [16] Osta B, Roux JP, Lavocat F, et al. Differential effects of IL-17A and TNF- α on osteoblastic differentiation of isolated synoviocytes and on bone explants from arthritis patients [J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 151.
 - [17] Castro-Villegas C, Pérez-Sánchez C, Escudero A, et al. Circulating miRNAs as potential biomarkers of therapy effectiveness in rheumatoid arthritis patients treated with anti-TNF α [J]. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17(1): 49.
 - [18] Ireland SJ, Monson NL, Davis LS. Seeking balance: potentiation and inhibition of multiple sclerosis autoimmune responses by IL-6 and IL-10 [J]. *Cytokine*, 2015, 73(2): 236 – 244.
 - [19] Liang L, Huang M, Xiao Y, et al. Inhibitory effects of niclosamide on inflammation and migration of fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis [J]. *Inflamm Res*, 2015, 64(3–4): 225 – 233.
 - [20] Salim PH, Xavier RM. Influence of genetic polymorphisms (IL-10/CXCL8/CXCR2/NF κ B) on the susceptibility of autoimmune rheumatic diseases [J]. *Rev Bras Reumatol*, 2014, 54(4): 301 – 310.
 - [21] Tong B, Yu J, Wang T, et al. Sinomenine suppresses collagen-induced arthritis by reciprocal modulation of regulatory T cells and Th17 cells in gut-associated lymphoid tissues [J]. *Mol Immunol*, 2015, 65(1): 94 – 103.

(收稿:2015-04-26 修回:2016-11-15)