

三水白虎汤对滑膜成纤维细胞增殖及 IL-6、IL-17 分泌的影响

高 燕 肖长虹 潘 超 左芳芳 李凯芹

摘要 **目的** 观察三水白虎汤含药血清对体外培养的类风湿关节炎(RA)、骨关节炎(OA)滑膜成纤维细胞(FLS)增殖及分泌白细胞介素-6(IL-6)、IL-17 的影响,探讨三水白虎汤的作用机制。**方法** 组织块培养法收集 RA、OA 患者的关节 FLS,体外培养传代,取 3~6 代细胞,加入 20% 三水白虎汤含药血清培养 72 h,MTT 法连续检测 FLS 的增殖率,ELISA 法检测上清液中 IL-6、IL-17 的水平,以来氟米特和生理盐水含药血清作对照。**结果** 三水白虎汤含药血清对 RA、OA FLS 增殖有显著抑制作用,同时还能显著抑制 RA-FLS 分泌 IL-17,抑制效率与来氟米特相当;但对 RA-FLS 的 IL-6 分泌无影响。对 OA-FLS 的 IL-17、IL-6 的分泌均无显著影响。**结论** 复方中药三水白虎汤能抑制 FLS 的增殖,并能抑制 RA-FLS 分泌 IL-17,这可能是该方治疗 RA 的药理机制之一。

关键词 三水白虎汤;滑膜成纤维细胞;增殖;白细胞介素-17

Effect of Sanshui Baihu Decoction on the Proliferation of Fibroblast-like Synoviocytes and Its Secretion of IL-6 and IL-17 GAO Yan, XIAO Chang-hong, PAN Chao, ZUO Fang-fang, and LI Kai-qin Department of Rheumatology and Immunology, Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Southern Medical University, Guangzhou (510315), China

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Sanshui Baihu Decoction (SBD) containing serum on the proliferation of *in vitro* cultured fibroblast-like synoviocytes (FLS) derived from rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA) and its secretion of interleukin-6 (IL-6) and IL-17, and to explore the pharmacological mechanism of SBD. **Methods** The FLS obtained from cultured RA and OA patients' synovial tissue were cultured and passaged *in vitro* in a routine way. The cultured medium was changed to DMEM with 20% SBD containing serum and cultured for 72 h after cultured for 3 to 6 generations. The proliferation rate of FLS was detected by MTT assay. Levels of IL-6 and IL-17 in the supernatant were detected by ELISA. Leflunomide and saline containing serum were used as positive and negative control respectively. **Results** SBD containing serum significantly inhibited the proliferation of RA-FLS and OA-FLS, and decreased the secretion of IL-17 in RA-FLS. Its inhibition efficiency of SBD was equivalent to that of Leflunomide. No obvious inhibition on the secretion of IL-6 in RA-FLS was observed. It had no significant effect on the secretion of IL-17 and IL-6 in OA-FLS. **Conclusion** SBD could inhibit the proliferation of FLS and the secretion of IL-17 in RA-FLS, which might be one of its pharmacological mechanisms for treating RA.

KEYWORDS Sanshui Baihu Decoction; fibroblast-like synoviocyte; proliferation; interleukin-17

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是临床常见的一种以关节滑膜炎为主要病理表现,异常活化的滑膜成纤维细胞(fibroblast-like synovio-

cytes, FLS)过度增殖并释放大量炎症介质,以持续的滑膜炎和多关节进行性软骨、骨破坏为特点的自身免疫性疾病。白细胞介素-6(interleukins-6, IL-6)、IL-17 是多效性前炎症细胞因子,与 RA 中的炎症和破坏过程有关^[1,2],在 RA 的发病中起重要作用。三水白虎汤是我科应用于活动期 RA 的经验方,本实验通过观察三水白虎汤含药血清对体外培养的 RA、骨关节炎(osteoarthritis, OA)患者 FLS 增殖及 IL-6、IL-17 分泌的影响,以探讨其治疗 RA 的作用机制。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81072936)

作者单位:南方医科大学中西医结合医院风湿免疫科(广州 510315)

通讯作者:肖长虹, Tel: 13189098313, E-mail: chngnhngxiao@ya-

hoo.com.cn

DOI: 10. 7661/CJIM. 2013. 10. 1385

材料与方

1 滑膜组织及动物 滑膜组织来自南方医科大学南方医院脊柱骨科收治行膝关节置换术确诊的 RA、OA 患者。诊断均符合 1987 年美国风湿病协会 (American College of Rheumatology, ACR) 修订的分类标准^[3]。实验动物为 SPF 级 SD 雄性大鼠 45 只, 体重(200 ± 20)g, 由南方医科大学动物中心实验室提供。动物质量合格证号: SCXK(粤)2011-0015。

2 药物 三水白虎汤, 由《千金要方》犀角散及《广济总录》白虎方化裁而来, 主要药物由生地 20 g 水牛角 20 g(先煎) 丹皮 10 g 寒水石 20 g(先煎) 知母 12 g 青蒿 15 g 虎杖 15 g 薏苡仁 20 g 白芥子 3 g 独活 15 g 细辛 6 g 桑枝 15 g 鸡血藤 20 g 蜈蚣 2 条 全蝎 3 g 地龙 5 g 南蛇藤 10 g 甘草 5 g 组成, 药材由南方医科大学中西医结合医院中药房提供。水煎三水白虎汤 2 次, 混合两次煎取液进行浓缩, 最终浓度为含生药 2 g/mL; 来氟米特片(妥抒, 10 mg × 10 片, 福建汇天), 将粉末溶于生理盐水中制成含药浓度 0.2 mg/mL 悬液。

3 试剂及仪器 DMEM 高糖型培养液、胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶(含 EDTA)及青、链霉素(美国 HyClone 公司); 平衡盐溶液(PBS)、4% 多聚甲醛(广州威佳); 鼠抗人 Vimentin 单克隆抗体、鼠抗人 CD68 单克隆抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology); 四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)(美国 Sigma); TritonX-100、羊血清封闭液、苏木素 Mayor、DAB 反应显色试剂盒(武汉博士德); SP 免疫组化试剂盒(北京中杉金桥); ELISA 试剂盒(武汉 CUSABIO)。3K18 冷冻离心机(美国 Sigma); 低速离心机(上海安亭科学仪器厂); 低温高速离心机(美国 HITACHI 公司); 倒置显微镜(日本 Olympus)。酶联免疫检测仪(MJPTC-200, 美国 BIORAD 公司)、TDA8002 型水浴箱(上海跃进医疗器械厂)。

4 方法

4.1 三水白虎汤、来氟米特及生理盐水的含药血清制备 将 SD 雄性大鼠 45 只随机分成 3 组, 每组 15 只, 即空白对照组(生理盐水组)、阳性对照组(来氟米特组)、三水白虎汤组。三水白虎汤组给予含三水白虎汤 2 g/mL 的浓缩液, 来氟米特组给予含来氟米特 0.2 mg/mL 悬液。每组每只灌胃 2 mL, 生理盐水组给与等体积的生理盐水, 连续给药 1 周, 采血前夜禁食不禁水, 次晨末次给药 90 min 后腹主动脉采血, 无菌操

作, 将大鼠血离心 3 000 r/min, 10 min 取血清, 每组血清混匀后予 56 °C 恒温水浴槽水浴 30 min 灭活, 经 0.22 μm C 除菌滤膜抽滤除菌后 -20 °C 保存备用。

4.2 滑膜细胞原代培养 将术中取下的滑膜组织于无菌条件下漂洗 1 ~ 2 遍, 仔细剔除脂肪组织, 用无菌眼科剪、镊小心地将滑膜组织分离出来, 将滑膜组织剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小, 均匀排列于培养瓶的培养面, 将培养瓶翻转, 向瓶中加入适量 20% 胎牛血清完全培养液, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养; 孵育 4 h 待组织块贴附后, 将培养瓶缓慢翻转平放, 继续静置培养; 3 ~ 4 d 镜下观察发现组织块周围 FLS 涡旋状成片生长后, 去除组织块后进行继续培养, 待滑膜细胞生长至约覆盖培养瓶底面 > 80% 时进行消化传代。实验采用 3 ~ 6 代的 FLS, 通过倒置相差显微镜、免疫细胞化学染色鉴定合格后备用。

4.3 免疫细胞化学染色鉴定 将细胞经消化重悬制成 1 × 10⁵/mL 的单细胞悬液, 加入 48 孔板中贴壁培养 24 h, 40 g/L 多聚甲醛液固定, 加一抗(鼠抗人 Vimentin 单克隆抗体、鼠抗人 CD68 单克隆抗体, 1:100 稀释)、加生物素化羊抗小鼠 IgG, DAB 显色, 苏木素轻度复染, 置镜下观察并拍照。

4.4 细胞增殖抑制实验(MTT 法) (1) 取对数生长期细胞, 0.25% 胰蛋白酶消化制成 1 × 10⁵/mL 细胞悬液, 接种于 96 孔板各实验孔中, 贴壁培养 24 h 后吸出培养液。(2) 通过前期预实验结果显示, 在设定的 10% ~ 50% 5 个浓度梯度的含药血清中, 20% ~ 30% 浓度附近时达最大抑制细胞增殖效应。故本实验采用 20% 含药血清分别作用 24、48、72 h 进行实验。每板设三水白虎汤组、来氟米特组、生理盐水组共 3 组, 每组设 4 个复孔, 分别加入 20% 含药血清于作用后 24、48、72 h 后进行以下操作: 每孔加 5 mg/mL 的 MTT 20 μL 继续培养 4 h, 弃上清液, 于每孔加入 150 μL DMSO 室温下振荡 10 min, 直至蓝紫色结晶完全溶解。酶联免疫检测仪(490 nm 波长)测定各孔吸光度, 即 OD 值, 计算各组药物干预后的细胞生长抑制率。细胞生长抑制率(%) = (1 - 实验组光吸收值/对照组光吸收值) × 100%

4.5 上清液中 IL-6、IL-17 含量检测 采用 ELISA 法, 收集 20% 浓度含药血清作用 72 h 后细胞各培养上清液, ELISA 法检测上清液中 IL-6、IL-17 的水平。严格按照试剂盒操作说明进行。最后于全自动酶标仪读取 A450 值, 根据标准反应曲线求得样品的 IL-6、IL-17 水平。

4.6 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件进行

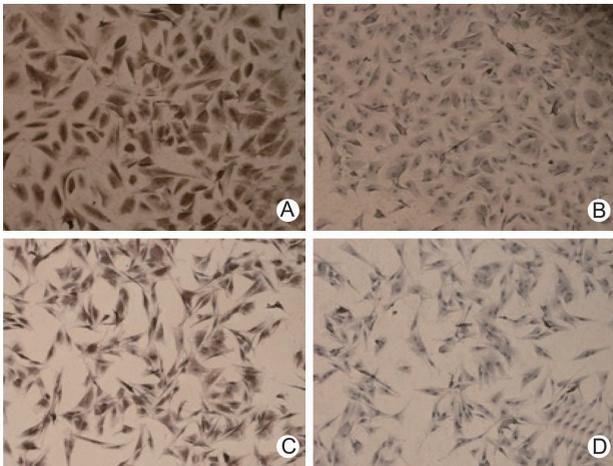
分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数的比较采用单因素方差分析,多组间均数的两两比较采用 *Bonferroni* 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 FLS 的培养鉴定

1.1 光镜观察 在倒置显微镜下,所培养细胞形态符合 FLS 的形态特征,呈纺锤状、星形或梭形,部分可呈大多角形。细胞核边界清楚,呈卵圆形,位于细胞的中间,核仁清晰。在 FLS 培养至第 3 代时,经镜下观察,具有典型形态特征的树突状细胞和内皮细胞、脂肪细胞、血管内皮细胞基本消失,未见悬浮细胞。传代至第 3 代及以上时,成纤维细胞样细胞所占比例均 $>98\%$ 。

1.2 Vimentin、CD68 免疫细胞化学染色结果 (图 1) Vimentin、CD68 免疫细胞化学染色结果显示第 3~6 代 FLS Vimentin 染色阳性,胞浆内见大量棕黄色颗粒,CD68 染色阴性。



注:A 为 OA Vimentin;B 为 OA CD68;C 为 RA Vimentin;D 为 RA CD68

图 1 Vimentin、CD68 免疫细胞化学染色结果 (DAB 显色, $\times 100$)

2 3 组不同时间段 OA、RA 患者 FLS 细胞增殖 OD 值比较(表 1、2) 无论是来源于 RA 还是 OA,三水白虎汤和来氟米特含药血清作用于 FLS 48 h 后即

表 1 3 组不同时间段 OA 患者 FLS 细胞增殖 OD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	吸光度(OD 值)		
		24 h	48 h	72 h
生理盐水	4	0.231 \pm 0.045	0.280 \pm 0.009	0.305 \pm 0.005
三水白虎汤	4	0.204 \pm 0.006	0.185 \pm 0.004 **	0.162 \pm 0.006 **
来氟米特	4	0.205 \pm 0.017	0.207 \pm 0.030 *	0.183 \pm 0.005 **

注:与生理盐水组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;下表同

表 2 3 组不同时间段 RA 患者 FLS 细胞增殖 OD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	吸光度(OD 值)		
		24 h	48 h	72 h
生理盐水	4	0.152 \pm 0.003	0.163 \pm 0.004	0.185 \pm 0.008
三水白虎汤	4	0.135 \pm 0.015	0.117 \pm 0.005 **	0.105 \pm 0.004 **
来氟米特	4	0.129 \pm 0.007 *	0.127 \pm 0.019 *	0.113 \pm 0.006 **

表现出对细胞增殖的显著抑制作用,72 h 达到高峰 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。对 RA、OA FLS,来氟米特组与三水白虎汤含药血清的抑制效率大致相当。

3 各组细胞上清液 IL-6、IL-17 的含量比较(表 3、4) 三水白虎汤和来氟米特均可显著抑制 RA-FLS 上清液中 IL-17 的含量,与生理盐水组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);但三水白虎汤组与来氟米特组比较,差异无统计学意义。三水白虎汤及来氟米特对 RA-FLS 上清液中的 IL-6 含量却无显著影响。三水白虎汤含药血清对 OA-FLS 的 IL-6 和 IL-17 分泌量均未见明显影响。

表 3 3 组 RA-FLS 上清液中 IL-6、IL-17 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-6 (pg/mL)	IL-17 (pg/mL)
生理盐水	6	554.240 \pm 24.841	157.039 \pm 18.571
来氟米特	6	540.195 \pm 26.354	109.527 \pm 16.822 **
三水白虎汤	6	539.637 \pm 17.724	105.484 \pm 11.008 **

表 4 2 组 OA-FLS 上清液中 IL-6、IL-17 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-6 (pg/mL)	IL-17 (pg/mL)
生理盐水	6	544.715 \pm 25.654	202.025 \pm 36.674
三水白虎汤	6	544.699 \pm 24.773	203.926 \pm 28.038

讨 论

三水白虎汤具有清热除湿、祛风通络、活血止痛的功效。课题组前期研究提示三水白虎汤可能具有抗炎镇痛、调节免疫、阻断软骨和骨质侵蚀等多种药理作用^[4],其作用机制包括:抑制基质金属蛋白酶、核因子- κB (NF- κB) 在关节局部的表达;抑制 TNF- α 的产生;抑制滑膜成纤维细胞内 P38MAPK 的激活^[5]。既往体外培养实验发现三水白虎汤含药血清对体外培养的 OA-FLS 的细胞增殖存在抑制效应^[6]。为了进一步探讨该方是否对 RA-FLS 增殖也存在相同的抑制作用,本实验采用 20% 三水白虎汤含药血清同时作用于 RA、OA 滑膜细胞 72 h,结果显示该方可显著抑制两种关节炎来源的 FLS 的细胞增殖,这可能是其治疗关节炎的作用机制之一;同时来氟米特与三水白虎汤含药血清对体外培养 RA、OA 滑膜细胞增殖抑制效应相

当,提示两者均能抑制关节滑膜增生,具有协同效应,该结果与文献[6]报道一致。

RA 滑膜细胞及滑膜组织中浸润的单核/巨噬细胞、淋巴细胞等产生的炎性细胞因子在滑膜病变中起核心作用,这些因子在 OA 的发生、发展中同样起着重要的作用^[7]。在 RA 发病过程中,IL-17 由促进关节炎的 T 细胞产生,亦可由培养的滑膜细胞自发产生^[8]。大量的研究表明 IL-17 在 RA 炎症、软骨破坏及随后的骨侵蚀的各个阶段发挥致病作用^[9,10]。本实验结果显示,三水白虎汤和来氟米特能显著抑制 RA-FLS 培养上清液中 IL-17 的含量,两者含药血清的抑制效应相当。三水白虎汤抑制 IL-17 的分泌既可能是由于细胞增殖受到抑制所致,也可能是通过抑制 IL-17 的表达进一步抑制 RA-FLS 的增殖,究竟是因果关系还是伴生关系对三水白虎汤的作用机制研究还需要进一步探讨。从三水白虎汤并不能抑制 OA-FLS 的 IL-17 分泌却同样抑制 OA-FLS 的增殖来看,可能并不是伴生关系;同时也提示,RA-FLS 与 OA-FLS 的病理、生理机制有差异,即便是体外传代培养这种差异仍然保留。但三水白虎汤能抑制滑膜成纤维细胞增殖同时显著减少 IL-17 的产生应该是其治疗 RA 的重要机制之一。关于 IL-17 引起 OA 发生的机制,实验证明是由于它能上调与炎症和软骨破坏的基因表达有关,包括可诱导的一氧化氮合酶(iNOS),环氧化酶(COX-2)、IL-6 和基质渗解素等的基因^[11]。但三水白虎汤并不能抑制 OA-FLS 的 IL-17 的生成,提示三水白虎汤可能对 RA 具有特异性。

IL-6 是 RA 关节炎中主要的前炎症因子,通过增强 IL-1 和 NF- κ B 的效应,并且诱导其他细胞因子如 IL-1、IL-2、TNF- α 的产生并发挥致病作用,还能促进 B 细胞产生免疫球蛋白 IgG、IgM 及合成类风湿因子(RF)^[12]。IL-6 在 OA 的全层软骨及滑膜中也呈现过量表达^[13],关节内局部高水平的 IL-6 可能与软骨损伤和增强关节炎性反应有关^[14]。但本实验未能发现该方对 RA-FLS 中 IL-6 分泌有明显的影响,可能是这类前炎症因子本身在体内有复杂的调控网络,体外细胞培养只能说明三水白虎汤对 FLS 的直接作用靶点不是抑制 IL-6。在 OA 滑膜细胞中三水白虎汤含药血清对 IL-6 和 IL-17 改变均不明显,也间接提示,三水白虎汤对 FLS 的细胞增殖抑制作用不依赖于这两种前炎症因子,其抑制细胞增殖的靶点还需要进一步研究。

参 考 文 献

[1] Chabaud M, Garneró P, Dayer JM, et al. Contri-

bution of interleukin 17 to synovium matrix destruction in rheumatoid arthritis [J]. *Cytokine*, 2000, 12(7): 1092-1099.

- [2] Legrand A, Fermor B, Fink C, et al. Interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-17 synergistically up-regulate nitric oxide and prostaglandin E₂ production in explants of human osteoarthritic knee menisci [J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(9): 2078-2083.
- [3] 中华医学会风湿病学分会. 类风湿关节炎诊治指南(草案)[J]. *中华风湿病学杂志*, 2003, 7(4): 250-254.
- [4] 肖长虹,杨敏,吴启富,等. 三水白虎汤对大鼠胶原诱导性关节炎的抑制作用[J]. *第四军医大学学报*, 2008, 20(24): 2288-2291.
- [5] Yang M, Xiao C, Wu Q, et al. Anti-inflammatory effect of Sanshui Baihu Decoction may be associated with nuclear factor-kappa B and p38 MAPK alpha in collagen-induced arthritis in rat [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 127(2): 264-273.
- [6] 陈德超,肖长虹,吴启富,等. 四甲基偶氮唑盐法观察三水白虎汤含药血清对体外培养关节炎滑膜细胞增殖的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(19): 3669-3672.
- [7] 熊林波,张弛,谢羽婕,等. 白细胞介素家族与骨关节炎相关性研究[J]. *西南军医*, 2011, 13(6): 1104-1106.
- [8] Hot A, Miossec P. Effects of interleukin (IL)-17A and IL-17F in human rheumatoid arthritis synovio-cytes[J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(5): 727-732.
- [9] 施青,王美美. IL-17 和 RANKL 在胶原诱导性关节炎大鼠关节滑膜的表达及⁹⁹Tc-TDP 的干预作用[J]. *现代医学*, 2010, 38(2): 116-122.
- [10] Sylvester J, Liacini A, Li WQ, et al. Interleukin-17 signal transduction pathways implicated in inducing matrix metalloproteinase-3, -13 and aggrecanase-1 genes in articular chondrocytes [J]. *Cell Signal*, 2004, 16(4): 469-476.
- [11] Rowan AD, Koshy PJ, Shingleton WD, et al. Synergistic effects of glycoprotein 130 binding cytokines in combination with interleukin-1 on cartilage collagen breakdown [J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(7): 1620-1632.
- [12] 徐晓玲,梁瑞霞,黄君健,等. 细胞因子在类风湿关节炎发病机制中的作用[J]. *生物技术通讯*, 2008, 19(1): 111-114.
- [13] 谢辉晋,杜远立. 骨关节炎相关细胞因子作用机制研究进展[J]. *重庆医学*, 2011, 40(4): 395-398.
- [14] Bjornsson GL, Thorsteinsson L, Gudmundsson KO, et al. Inflammatory cytokines in relation to adrenal response following total hip replacement [J]. *Scand J Immunol*, 2007, 65(1): 99-105.

(收稿:2012-12-06 修回:2013-06-05)