

左归丸加减对雌激素缺乏骨丢失小鼠 Th17/Treg 亚群的影响

李霞 王丽 郭钰琪 周宪宾 张巧凤 姚成芳 姜国胜

摘要 **目的** 观察左归丸加减对雌激素缺乏骨丢失模型小鼠脾脏辅助性 T 细胞亚群 17 (Th17)/调节性 T 细胞亚群 (Treg) 亚群平衡的影响,并探讨其作用机制。**方法** 50 只 BALB/c 小鼠按随机数字表法随机分为假手术组、卵巢切除模型组、左归丸加减 (简称中药) 小、中、大剂量组,共 5 组,每组 10 只。中药组分别给予中药小、中、大剂量 (7.25、14.50、29.00 g/kg),1 天 1 次,1 次约 0.5 mL,连续用药 12 周;同时假手术组及模型组给予等量的生理盐水。采用酶联免疫吸附 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测各组血清雌二醇 (E_2) 水平,双能 X 线骨密度仪检测股骨骨密度 (bone mineral density, BMD),流式细胞仪胞内外双染色法检测脾脏单个核细胞 Th17/Treg 亚群比例,RT-PCR 法检测脾脏单个核细胞 IL-17A、TGF- β mRNA 表达。**结果** 与假手术组比较,模型组 E_2 、BMD 均降低 ($P < 0.05$),Th17 亚群比例、Th17/Treg 比值均升高 ($P < 0.05$),Treg 亚群比例明显降低 ($P < 0.05$),IL-17A mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$),TGF- β mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,中药中、大剂量组 BMD 值明显升高 ($P < 0.05$),Th17 亚群比例、Th17/Treg 比值降低 ($P < 0.05$),Treg 亚群比例升高 ($P < 0.05$),IL-17A mRNA 表达降低 ($P < 0.05$) 及 TGF- β mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)。相关性分析显示 BMD 与血清 E_2 水平、Treg 亚群比例呈明显正相关 ($P < 0.05$),与 Th17 亚群比例呈明显负相关 ($P < 0.05$);血清 E_2 水平与 Treg 亚群比例呈明显正相关 ($P < 0.05$),与 Th17 亚群比例呈明显负相关 ($P < 0.05$)。**结论** Th17/Treg 亚群平衡状态与雌激素缺乏骨丢失存在相关性,左归丸加减能降低雌激素缺乏骨丢失小鼠 Th17 亚群比例,升高雌激素缺乏骨丢失小鼠 Treg 亚群比例。左归丸加减可能通过调节雌激素缺乏骨丢失小鼠 Th17/Treg 亚群平衡达到治疗作用,且该方无明显雌激素样作用。

关键词 左归丸加减;雌激素缺乏;辅助性 T 细胞亚群 17;调节性 T 细胞;骨代谢

Effect of Modified Zuoguiwan on Th17/Treg Subpopulation of Estrogen Deficiency Induced Bone Loss Mice LI Xia, WANG Li, GUO Yu-qi, ZHOU Xian-bin, ZHANG Qiao-feng, YAO Cheng-fang, and JIANG Guo-sheng *Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Key Laboratory for Tumor Immunity and Traditional Chinese Drug Immunity, Key Laboratory for Rare & Uncommon Diseases, Key Laboratory of Biotechnological Drugs of Ministry of Public Health, Laboratory for Immunopharmacology of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250062), China*

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Modified Zuoguiwan (MZ) on the balance between helper T cell subsets 17 (Th17) and regulatory T cell subsets (Treg) in estrogen deficiency induced bone loss mice and to explore its mechanism. **Methods** Totally 50 BALB/c mice were divided into the sham-operation group, the ovariectomy model group, the low dose MZ group, the middle dose MZ group, and the high dose MZ group by random digit table, 10 in each group. Mice in the low, middle, and high dose MZ

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (No. 81373670);山东省自主创新成果转化专项 (No. 2013ZHXX2A0405);山东省自然科学基金项目 (No. ZR2010HQ066);山东省科技发展计划项目 (No. 2012GSF11840);山东省计生委项目 (No. [2014]25);山东省中管局项目 (No. 2013-216, 2013-218);济南市科技明星计划项目 (济科合字 2012);山东省博士基金 (No. BS2011SW045);山东省医药卫生科技发展计划项目 (No. 2011QW024)

作者单位:山东省医学科学院基础医学研究所 山东省医药卫生肿瘤免疫与中药免疫重点实验室 山东省罕见病重点实验室 卫生部生物技术药物重点实验室 国家中医药管理局免疫药理 (三级) 实验室 (济南 250062)

通讯作者:姜国胜, Tel: 0531-82629368, E-mail: jiangguosheng@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.11.1359

groups were respectively administered with MZ at the daily dose of 7.25, 14.50, and 29.00 g/kg by gastrogavage, 0.5 mL each time for 12 successive weeks. Meanwhile, mice in the sham-operation group and the ovariectomy model group were administered with equal volume by gastrogavage, 0.50 mL each time. The serum estradiol (E_2) level was assessed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Bone mineral density (BMD) of thigh bone was measured with dual energy X ray absorptiometry. In addition, the population of Th17/Treg subsets in spleen mononuclear cells was analyzed by extracellular and intracellular staining method using flow cytometry. Moreover, the mRNA expression of IL-17A and TGF- β in the spleen mononuclear cells was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Results Compared with the sham-operation group, both E_2 and BMD significantly decreased, the percentage of Th17 subset and Th17/Treg ratio both increased, the percentage of Treg subset obviously decreased, the expression of IL-17A mRNA significantly increased, and the expression of TGF- β mRNA significantly decreased in the ovariectomy model group (all $P < 0.05$). Compared with the model group, BMD obviously increased, the percentage of Th17 subset and Th17/Treg ratio both decreased, the percentage of Treg subset obviously increased, the expression of IL-17A mRNA significantly decreased, and the expression of TGF- β mRNA significantly increased in the middle dose MZ group and the high dose MZ group (all $P < 0.05$). Correlation analyses showed that BMD was positively related to both the serum E_2 level and the percentage of Treg subset ($P < 0.05$), but negatively related to the percentage of Th17 subset ($P < 0.05$). In addition, the serum E_2 level was positively related to the percentage of Treg subset, but obviously negatively related to that of Th17 subset ($P < 0.05$). Conclusions There was correlation between Th17/Treg imbalance and E_2 deficient bone loss. MZ could decrease the proportion of Th17 subset, but elevate the proportion of Treg subset in E_2 deficient bone loss mice. It could achieve therapeutic effect through adjusting the balance of Th17/Treg in E_2 deficient bone loss mice.

KEYWORDS Modified Zuoguiwan; estrogen deficiency; helper T cell subsets; regulatory T cell subsets; bone metabolism

随着社会人口老龄化,雌激素缺乏导致的骨代谢疾病逐年增加^[1]。绝经后骨质疏松是常见的雌激素缺乏骨丢失性疾病,由于女性绝经后雌激素水平急剧下降,导致骨吸收大于骨形成,全身骨量减少,骨骼脆性增加,极易发生骨折。雌激素缺乏骨丢失性疾病严重影响患者健康,也给家庭和社会带来沉重的经济负担,其治疗日益受到关注。正常骨代谢是成骨细胞与破骨细胞参与的骨形成和骨吸收之间的动态平衡过程,此过程受机体内分泌、免疫系统调节,形成内分泌-免疫-骨代谢调节网络,此网络失衡将导致多种骨代谢性疾病发生^[2]。T 细胞是免疫调节的主体,T 细胞亚群 17 (Th17)/调节性 T 细胞亚群 (Treg) 平衡参与了维持机体免疫内环境稳定,其失衡状态参与了多种代谢性疾病的发生与发展,但其在雌激素缺乏骨丢失中的作用尚未明确,更缺乏药物靶向逆转 Th17/Treg 亚群失衡调节骨代谢的相关研究。本研究通过建立雌激素缺乏骨丢失小鼠动物模型,探讨雌激素缺乏状态下 Th17/Treg 亚群失衡与骨丢失的相关性及左归丸加减的干预调节作用与机制,为临床治疗提供新的靶点与实验依据。

材料与方法

1 动物 50 只 BALB/c 小鼠,清洁级,雌性,由北京维通利华有限公司提供,许可证编号:SLXK(京)2009-0004。鼠龄 10 周,体重(22 ± 2)g,置于室温 24℃,相对湿度 60%~65%的超净动物饲养柜内,给予 12 h 光照,12 h 暗室,自由饮水摄食。

2 药物 左归丸加减由熟地 60 g 山药 24 g 枸杞子 24 g 杜仲 18 g 龙骨 18 g 牡蛎 18 g 甘草 12 g 共 7 味药组成,药物按 10:4:4:3:3:3:2 比例组成,常规法水煎、醇沉、回收乙醇,制成含生药为 2.6 g/mL 的原液,灭菌后 4℃ 冰箱保存,用于小鼠灌胃给药。

3 主要试剂及仪器 大鼠抗小鼠荧光抗体:PC5-CD25(批号:B132151)、FITC-CD4(批号:39613)、PE-IL-17A(批号:B138114)、PE-Foxp3(批号:B150419)均购自美国 BD Pharmigen 公司;雌二醇(E_2) ELISA 试剂盒(批号:20121028)购自美国 RD 公司;M-MLV 购于 MBI 公司(批号:0000084144),RNA 酶抑制剂购于康为世纪(批号:2214D),DEPC(批号:0920S06)、Agarose(批号:GI-

011202) 为 AMRESCO 公司产品。 β -actin、IL-17A、TGF- β 引物由上海博尚生物技术有限公司合成,引物序列见表 1。FACSCalibur 流式细胞仪(Becton Dickinson 公司);高速低温离心机(Sorvall Super T21, 美国);紫外分光光度计(ND1000, 美国);梯度 PCR 扩增仪(T-Gradient, Biometra, 德国);凝胶成像系统(Alpha ImagerTM 2200, 美国);超低温冰柜(725 Thermo Forma, 美国);电泳仪(Thermo, 美国);酶标仪(Thermo, 美国);双能 X 线 BMD 仪(LUNAR, 美国)。

表 1 PCR 引物序列及产物长度

基因	引物序列	产物长度 (bp)
IL-17A	上游: 5'-TCCACCGCAATGAAGACC-3'	420
	下游: 5'-CACGAAGCAGTTTGGGAC-3'	
TGF- β	上游: 5'-TGAGTGGCTGTCTTTTGACG-3'	456
	下游: 5'-TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC-3'	
β -actin	上游: 5'-GGCACCACACCTTCTACAATG-3'	374
	下游: 5'-ACGCACGATTTCCCTCTCAG-3'	

4 动物模型的制备 参照文献[3]。40 只小鼠禁食 12 ~ 18 h, 10% 水合氯醛注射液按 100 mg/kg 剂量腹腔注射麻醉, 小鼠经腹腔行常规手术切除双侧卵巢; 40 只大鼠均造模成功, 造模过程中无动物死亡。同时 10 只小鼠行假手术不切除卵巢, 仅切除卵巢周围与卵巢等大的脂肪组织。

5 动物分组及干预方法 40 只 BALB/C 卵巢切除模型小鼠按随机数字表法分为模型组、左归丸加减(简称中药)小、中、大剂量组, 每组 10 只, 同时设假手术组(不切除卵巢)10 只, 共 5 组。术后自由进食水, 中药小、中、大剂量组分别灌胃左归丸加减提取液(7.25、14.50、29.00 g/kg), 相当于成人临床用量的 5、10、20 倍; 1 天 1 次, 1 次 0.5 mL, 连续灌胃 12 周; 同时假手术、模型组灌胃等量的生理盐水, 给药结束后进行指标检测。

6 标本采集 末次给药后 1 h 小鼠眼球取血, 颈椎脱臼处死, 分离血清, ELISA 法检测血清 E_2 水平; 无菌分离脾脏, 200 目铜网研磨过滤, 冷 PBS 冲洗, Ficoll 密度梯度离心法分离单个核细胞, 分别用于流式抗体标记与 RT-PCR 检测; 取右侧股骨, 剔除软组织, 用于骨密度(bone mineral density, BMD)检测。

7 检测指标及检测方法

7.1 血清 E_2 水平 采用 ELISA 检测方法, 按试剂盒操作说明操作。

7.2 股骨前后位 BMD 含量 采用双能 X 射线骨密度仪测量小鼠股骨前后位 BMD。

7.3 脾脏 Th17 亚群($CD4^+IL-17A^+$)及 Treg 亚群($CD4^+CD25^+Foxp3^+$)的比例 采用流式细胞术胞内外双因子检测法。收集脾脏单个核细胞, 加入大鼠血清, 室温避光孵育 30 min; 将外标抗体(FITC-CD4、PC5-CD25)按说明书分别加入到细胞悬液中, 4 ℃ 避光孵育 30 min; 1 × PBS 洗 2 次; 去上清, 加入 100 μ L 固定液, 4 ℃ 避光孵育 30 min; 1 × PBS 洗 1 次, 加入 100 μ L 穿膜液重悬细胞, 将内标抗体(PE-IL-17A、PE-Foxp3)加入细胞悬液中, 4 ℃ 避光孵育 12 h; 加入 1 mL 穿膜液洗 1 次, 去上清, 1 × PBS 洗 2 次, 1 × PBS 重悬细胞, 转管, 上机检测; 采用 Winmidi 2.9 分析 Th17 亚群($CD4^+IL-17A^+$)及 Treg 亚群($CD4^+CD25^+Foxp3^+$)比例。

7.4 血清 E_2 BMD、Th17 亚群及 Treg 亚群相关性分析 上述方法检测血清 E_2 水平、BMD、Th17 亚群及 Treg 亚群比例, 采用 Pearson 相关性分析探讨血清 E_2 水平、BMD、Th17 亚群及 Treg 亚群比例间相关性。

7.5 IL-17A、TGF- β mRNA 转录水平 采用 RT-PCR 检测法。引物设计使用 Primer 5.0 软件; RNA 提取: 采用异硫氰酸胍一步法提取脾脏单个核细胞总 mRNA, 紫外分光光度仪检测 A260/A280 比值, 验证 RNA 浓度和纯度; RT 反应: 采用 oligo dT 为 RT 反应引物, 取 2.5 μ g 总 RNA 按 RT 试剂盒说明书逆转录合成 cDNA 20 μ L; PCR 反应: 总反应体系为 25 μ L, 包含 RT 产物 5 μ L, 10 × PCR buffer 2.5 μ L, 25 mmol/L $MgCl_2$ 2 μ L, 上、下游引物各 0.25 μ L (25 pmol), 10 mmol/L dNTP 0.5 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L, DEPC 水 14 μ L; 反应条件为 95 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 1 min, 58 ~ 60 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 26 个循环后, 70 ℃ 延长 10 min。1.5 % 凝胶(EB 染色)水平电泳, 采用 Alpha 凝胶成像系统分析图像: 以 β -actin 为内参照, 计算目的基因与同步 β -actin 灰度值比值作为相对表达量。

8 统计学方法 应用 SPSS 11.5 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 两组间比较采用 Turkey 法检验, 数据间相关性用 Pearson 相关性分析, 相关系数(r 值)为正, 表示正相关, r 值为负, 表示负相关。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组血清 E_2 水平及股骨 BMD 比较(表 2) 与假手术组比较, 模型组 E_2 、BMD 水平降低($P < 0.05$); 与模型组比较, 中药各剂量组 E_2 水平差异无统计学意义($P > 0.05$), 中药中、大剂量组 BMD 明显升高, 差异有

表 2 各组血清 E ₂ 及 BMD 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	n	E ₂ (ng/L)	BMD (g/cm ²)
假手术	10	26.45 ± 4.75	0.301 ± 0.082
模型	10	6.20 ± 1.92 *	0.206 ± 0.070 *
中药小剂量	10	6.15 ± 2.06	0.225 ± 0.072
中药中剂量	10	6.42 ± 2.76	0.256 ± 0.089 [△]
中药大剂量	10	6.77 ± 2.80	0.285 ± 0.088 [△]

注:与假手术组比较,**P* < 0.05;与模型组比较,[△]*P* < 0.05

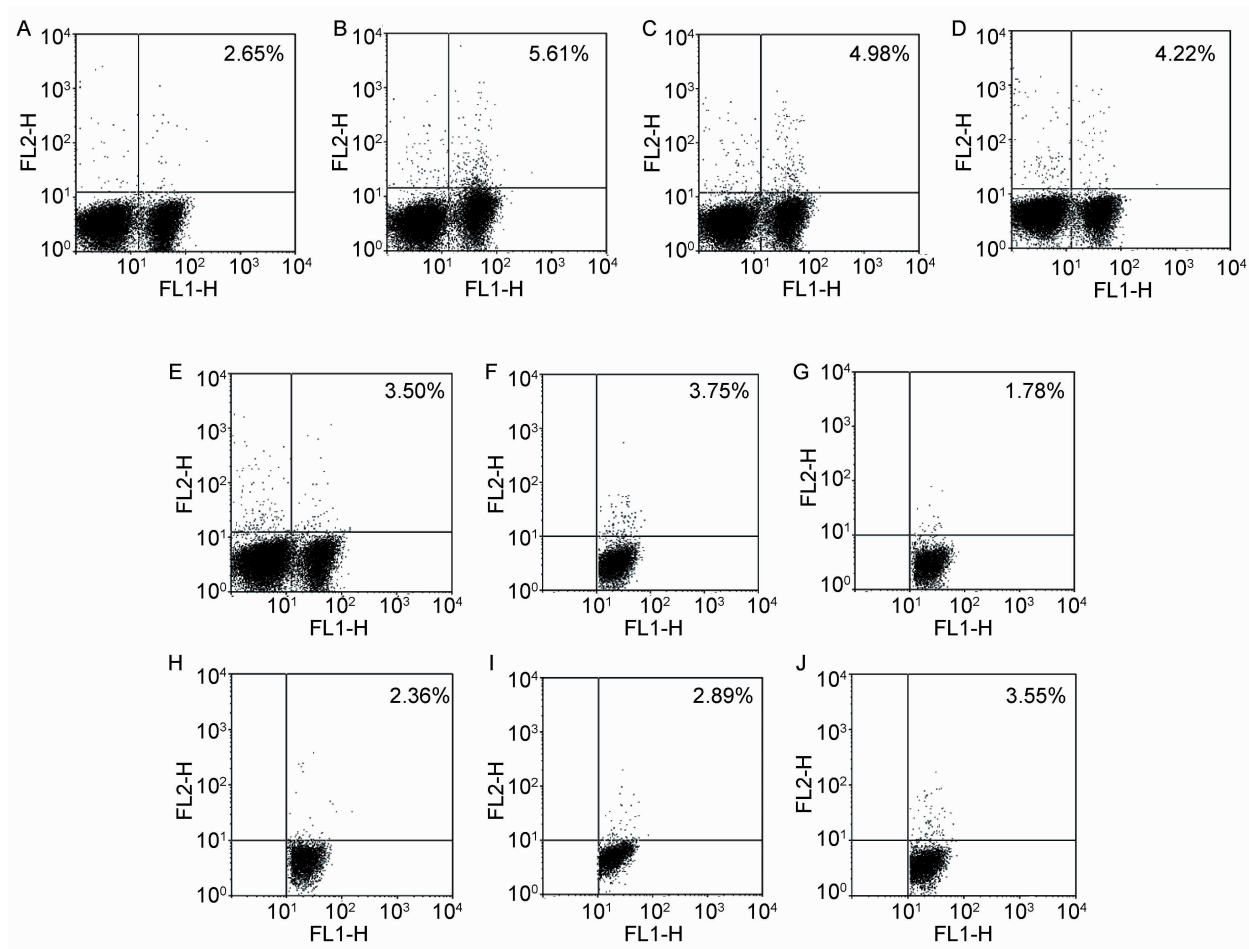
统计学意义(*P* < 0.05),且呈药物剂量依赖性。

2 各组小鼠脾脏单个核细胞 Th17、Treg 亚群及 Th17/Treg 比例比较(图 1,表 3) 与假手术组比较,模型组小鼠 Th17 亚群比例明显高(*P* < 0.05),Treg 亚群比例明显降低(*P* < 0.05),Th17/Treg 比值明显升高(*P* < 0.05);与模型组比较,中药中、大剂量组小鼠 Th17 亚群比例明显降低,Treg 亚群比例明显升高,Th17/Treg 比值明显降低(*P* < 0.05),且呈药物剂

表 3 各组脾脏单个核细胞 Th17、Treg 亚群及 Th17/Treg 比例变化 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	n	Th17 亚群	Treg 亚群	Th17/Treg
假手术	10	2.56 ± 0.76	3.75 ± 0.69	0.71 ± 0.23
模型	10	5.61 ± 0.99 *	1.78 ± 0.63 *	3.15 ± 0.75 *
中药小剂量	10	4.98 ± 0.74	2.36 ± 0.73	2.11 ± 0.58
中药中剂量	10	4.22 ± 0.77 [△]	2.89 ± 0.85 [△]	1.46 ± 0.54 [△]
中药大剂量	10	3.50 ± 0.69 [△]	3.57 ± 0.75 [△]	0.98 ± 0.32 [△]

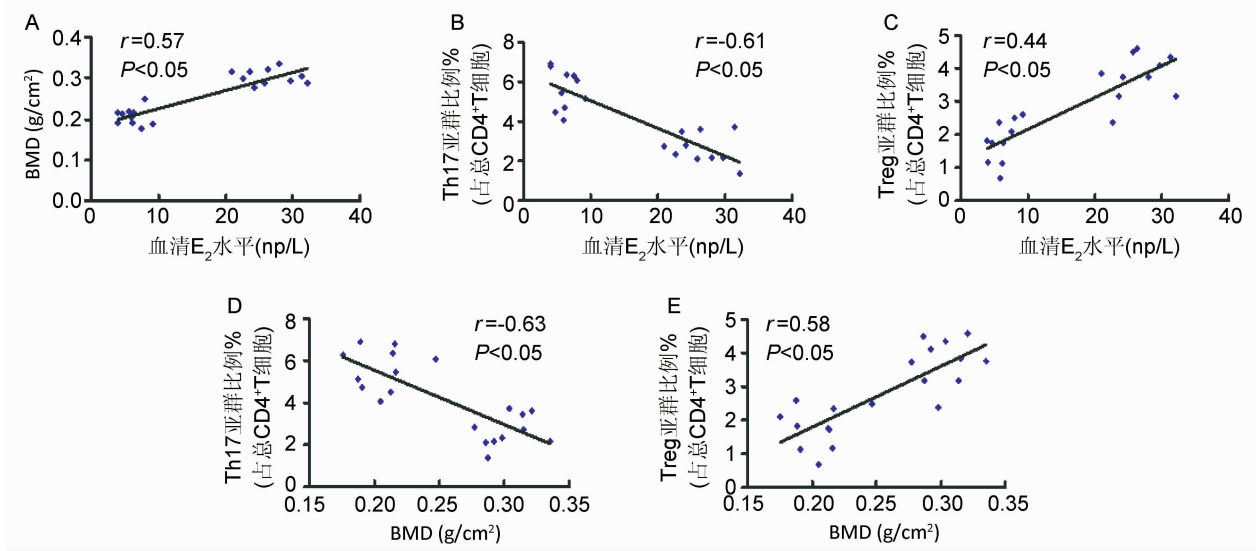
注:与假手术组比较,**P* < 0.05;与模型组比较,[△]*P* < 0.05

量依赖性。
3 E₂、BMD 及 Th17/Treg 亚群比例相关性(图 2) 相关性分析显示 E₂ 水平与 BMD 及 Treg 亚群比例呈明显正相关(*r* = 0.44, *P* < 0.05),与 Th17 亚群比例呈明显负相关(*r* = - 0.61, *P* < 0.05); BMD 与 Th17 亚群比例呈明显负相关(*r* = - 0.63, *P* < 0.05),与 Treg 亚群比例呈明显正相关(*r* = 0.58, *P* < 0.05)。



注:A~E 为各组 Th17 亚群比例;G~J 为各组 Treg 亚群比例;A 为假手术组;B 为模型组;C 为中药小剂量组;D 为中药中剂量组;E 为中药大剂量组;F 为假手术组;G 为模型组;H 为中药小剂量组;I 为中药中剂量组;J 为中药大剂量组

图 1 各组脾脏 Th17 及 Treg 亚群流式图



注:A 为 BMD 与血清 E₂ 水平相关性;B 为 Th17 亚群与血清 E₂ 水平相关性;C 为 Treg 亚群与血清 E₂ 水平相关性;D 为 Th17 亚群与 BMD 相关性;E 为 Treg 亚群与 BMD 相关性

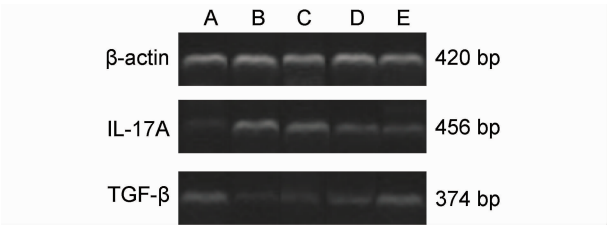
图 2 血清 E₂ 与 BMD 及 Th17/Treg 亚群比例相关性图

4 各组脾脏单个核细胞 IL-17A 及 TGF-β mRNA 表达情况比较(图 3,表 4) 与假手术组比较,模型组 IL-17A mRNA 水平升高($P < 0.05$),TGF-β mRNA 水平降低($P < 0.05$)。与模型组比较,中药中、大剂量组 IL-17A mRNA 水平降低($P < 0.05$),TGF-β mRNA 水平升高($P < 0.05$),且呈药物剂量依赖性。

表 4 各组 IL-17A 及 TGF-β mRNA 相对灰度值比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-17A mRNA	TGF-β mRNA
假手术	10	14.96 ± 3.84	19.93 ± 5.81
模型	10	31.98 ± 6.93 *	6.34 ± 2.90 *
中药小剂量	10	27.34 ± 5.44	9.69 ± 2.92
中药中剂量	10	22.99 ± 4.84 ^Δ	13.99 ± 4.55 ^Δ
中药大剂量	10	18.75 ± 4.64 ^Δ	19.10 ± 4.68 ^Δ

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,^Δ $P < 0.05$



注:A 为假手术组;B 为模型组;C 为中药小剂量组;E 为中药中剂量组;F 为中药大剂量组

图 3 各组脾脏 IL-17A 及 TGF-β 电泳图

讨 论

骨代谢是骨形成和骨吸收的动态平衡过程,内分

泌-免疫-骨代谢系统间形成复杂精细的调控网络,调节骨代谢过程。女性绝经后雌激素水平下降,骨丢失速度明显加快。雌激素是人体重要的性激素,T 细胞是机体免疫系统中重要的细胞群体,雌激素-T 细胞-骨代谢三者的关系成为本领域研究的热点^[4,5]。Th1、Th2 是经典的 T 细胞亚群,Th1/Th2 亚群平衡在维持正常骨代谢中具有重要作用^[6]。本研究的前期研究已证实雌激素缺乏状态诱导 Th1/Th2 亚群向 Th1 偏移,促进溶骨性细胞因子产生,进而导致骨丢失^[7]。近年来,两种新的 T 细胞亚群 Th17、Treg 相继发现,使经典的 Th1/Th2 模式扩展为 Th1/Th2/Th17/Treg 模式^[8]。Th17/Treg 亚群平衡在维持机体内环境稳定、抵抗外源性微生物感染中发挥着重要作用,随着内分泌-免疫-骨代谢系统研究不断深入,其在正常骨代谢及骨代谢性疾病中的作用日益受到关注。

Th17 和 Treg 产生于同一前体细胞,分化过程受多种相同诱导因子及转录因子调控。Th17 通过产生 IL-17A 等细胞因子介导炎症反应,在机体防御病原微生物感染中发挥重要作用,但其过度表达则可能造成机体组织损伤^[9]。有研究报道雌激素缺乏状态能诱导分泌 IL-17 的 Th17 亚群,进而促进破骨细胞活化,提示 Th17 在雌激素缺乏导致的骨丢失中扮演了重要角色^[10]。Treg 高表达 CD25, Foxp3 是其特异性核转录因子,Treg 通过产生 TGF-β 等细胞因子或通过细胞间直接接触发挥免疫抑制与调节作用,能够通过抑制破骨细胞功能减少骨丢失^[11]。研究证实,雌激素通过促进 Treg 亚群比例抑制破骨细胞分化,较少骨吸收^[2]。本研究发

现,去卵巢小鼠雌激素水平明显降低,同时 BMD 明显下降, E_2 水平与 BMD 呈明显正相关,证实雌激素缺乏状态导致骨丢失。同时,本研究发现,雌激素缺乏状态下,Th17 亚群比例明显升高,Treg 亚群比例明显降低,Th17/Treg 平衡向 Th17 偏移,相关性分析显示 E_2 水平及 BMD 均与 Th17 亚群比例、Th17/Treg 亚群比值呈明显负相关,与 Treg 亚群比例呈明显正相关,提示雌激素缺乏诱导的 Th17/Treg 失衡可能在骨丢失中发挥了重要作用,逆转 Th17/Treg 失衡有望成为减轻雌激素缺乏骨丢失的有效靶点与途径。

目前西医治疗雌激素缺乏骨丢失相关疾病主要采用雌激素替代疗法,但存在诱发子宫内膜癌、宫颈癌、乳腺癌、代谢紊乱等不良反应;中医治疗从整体出发,辨证论治,治疗骨代谢性疾病具有疗效确切、不良反应小等独特优势,成为本领域研究的热点。中医学认为肾藏精,精生髓,髓养骨;绝经后女性肾气衰退,肾精亏虚,骨髓失养。因此,肾阴不足,髓失所养是雌激素缺乏骨丢失的基本病机。左归丸是滋阴补肾经典方剂,本课题组依据补肾滋阴,益精添髓原则在左归丸基础上加减组方,方中君药熟地滋肾益精;臣药山药、枸杞子滋补肝肾;佐药杜仲、龙骨、牡蛎补肾壮骨、益精添髓;使药甘草补中益气,调和诸药。全方标本兼顾、攻补兼施,共奏补肾益精、填髓壮骨之功,从而达到防治雌激素缺乏骨丢失的目的。本研究显示,左归丸加減作用后雌激素缺乏小鼠骨丢失明显减轻,该方能明显降低卵巢切除小鼠 Th17 亚群比例、升高 Treg 亚群比例,降低 Th17/Treg 亚群比值,提示左归丸加減通过逆转 Th17/Treg 亚群失衡状态减轻雌激素缺乏骨丢失。本研究发现左归丸加減能明显下调雌激素缺乏小鼠 Th17 亚群特征性细胞因子 IL-17A mRNA 转录水平,上调 Treg 亚群特征性细胞因子 TGF- β mRNA 转录水平,提示干预 Th17/Treg 亚群特征性细胞因子转录是该方逆转 Th17/Treg 亚群失衡的重要机制。同时结果显示,左归丸加減治疗后去卵巢小鼠血清 E_2 水平无明显升高,证实该复方无明显雌激素样作用。

综上所述,雌激素缺乏骨丢失小鼠存在 Th17/Treg 亚群失衡现象,提示 Th17/Treg 亚群失衡可能参与了雌激素缺乏导致的骨丢失过程。左归丸加減通过干预 Th17/Treg 亚群特征性细胞因子转录水平,逆转 Th17/Treg 亚群失衡状态,这可能是该方减轻雌激素缺乏导致骨丢失的关键机制。本研究为进一步明确雌激素缺乏骨丢失发病机制提供了新的思路,为临床治疗提供了新的方法与途径,但左归丸加減逆转 Th17/Treg 亚群失衡治疗雌激素缺乏导致骨丢失的确切靶

点与分子机制有待进一步深入探讨。

参 考 文 献

- [1] Corina M, Vulpoi C, Brănisteanu D. Relationship between bone mineral density, weight, and estrogen levels in pre- and postmenopausal women [J]. Rev Med Chir Soc Med Nat Lasi, 2012, 116 (4): 946-950.
- [2] Luo CY, Wang L, Sun C, et al. Estrogen enhances the functions of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells that suppress osteoclast differentiation and bone resorption *in vitro* [J]. Cell Mol Immunol, 2011, 8(1): 50-58.
- [3] 邹军,董苗森,张丽,等. 运动配合左归丸对去卵巢大鼠骨质疏松的偶联信号 IL-1、IL-6 及 COX-2 传递的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2010, 16(6): 407-411.
- [4] 吴迎星,谭家余,吴赛珠,等. 绝经后妇女雌激素缺乏与外周血 T 淋巴细胞亚群改变的关系研究 [J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2003, 2(2): 110-113.
- [5] Zhao W, Liu Y, Cahill CM, et al. The role of T cells in osteoporosis: an update [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2009, 2(6): 544-552.
- [6] 蒋竞,张绍芬,陆维仙,等. 更年期大鼠血清雌二醇水平与 Th1/Th2 平衡的增龄性改变 [J]. 复旦学报(医学版), 2005, 32(6): 755-756.
- [7] 李霞,孙建丽,王彬,等. 绝经妇女外周血单个核细胞骨代谢调控因子表达变化 [J]. 中国免疫学杂志, 2011, 27(8): 49-53.
- [8] Li X, Wang B, Li Y, et al. The Th1/Th2/Th17/Treg paradigm induced by stachydrine hydrochloride reduces uterine bleeding in RU486-induced abortion mice [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 145(1): 241-253.
- [9] Katayama M, Ohmura K, Yukawa N, et al. Neutrophils are essential as a source of IL-17 in the effector phase of arthritis [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e62231.
- [10] Tyagi AM, Srivastava K, Mansoori MN, et al. Estrogen deficiency induces the differentiation of IL-17 secreting Th17 cells: a new candidate in the pathogenesis of osteoporosis [J]. PLoS One, 2012, 7(9): e44552.
- [11] Kong N, Lan Q, Chen M, et al. Induced T regulatory cells suppress osteoclastogenesis and bone erosion in collagen-induced arthritis better than natural T regulatory cells [J]. Ann Rheum Dis, 2012, 71(9): 1567-1572.

(收稿:2013-06-13 修回:2014-07-21)