

薏苡仁酯对胶原诱导性关节炎小鼠 Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞影响的研究

郑红霞¹ 章伟明² 周红娟¹ 张 雯¹ 于健宁¹ 汪 卫¹

摘要 目的 研究薏苡仁酯对胶原诱导性关节炎(collagen induced arthritis, CIA)小鼠外周血中 Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞(Treg)的影响,探讨薏苡仁酯类风湿关节炎治疗中的可能机制。**方法** 从 25 只小鼠随机选取 5 只为正常组,剩余 20 只小鼠进行 CIA 造模。造模成功后随机分为造模对照组 10 只及薏苡仁酯组 10 只。薏苡仁酯组予薏苡仁酯注射液 25 mL/kg,正常组及造模对照组注射生理盐水 25 mL/kg,均每天腹腔内注射 1 次。共用药 21 天。用药后对各组关节炎进行评分,计算关节炎指数,并应用流式细胞术测定小鼠外周血 Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ Treg 比例。**结果** 与正常组比较,造模对照组关节炎指数明显升高($P < 0.01$),薏苡仁酯组较造模对照组小鼠关节炎指数明显下降($P < 0.01$)。与正常组比较,造模对照组 Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ Treg 水平均明显下降($P < 0.01$),薏苡仁酯组较造模对照组用药后 Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ Treg 水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 薏苡仁酯能上调 CIA 小鼠 Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ Treg 比例,可能在 CIA 的发病中具有一定的免疫调节作用。

关键词 胶原诱导性关节炎;薏苡仁酯;Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ Treg

Effect of Coixenolide on Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells in Collagen-induced Arthritis Mice
ZHENG Hong-xia¹, ZHANG Wei-ming², ZHOU Hong-juan¹, ZHANG Wen¹, YU Jian-ning¹, and WANG Wei¹
1 Department of Rheumatology, Zhejiang Provincial Hospital of Traditional Chinese and Western Medicine, Hangzhou (310003); 2 Department of Pharmacy, Hangzhou First People's Hospital, Hangzhou (310009)

ABSTRACT Objective To study the effect of coixenolide on Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells (Treg) in collagen induced arthritis (CIA) mice, and to explore its possible mechanism for treating rheumatoid arthritis. **Methods** Five mice were recruited as a normal control group from 25 mice, and the rest 20 were used in CIA modeling. After successful modeling they were randomly divided in the model control group and the coixenolide group, 10 in each group. Coixenolide injection at 25 mL/kg was intraperitoneally injected to mice in the coixenolide group, while normal saline at 25 mL/kg was intraperitoneally injected to mice in the normal control group and the model control group. The injection lasted for 21 days. Scoring for CIA was performed after injection and arthritis index was calculated. The peripheral blood Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ Treg ratio was determined by flow cytometry (FCM). **Results** Compared with the normal control group, the arthritis index obviously increased in the model control group ($P < 0.01$). The arthritis index obviously decreased more in the coixenolide group than in the model control group ($P < 0.01$). Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ Treg levels obviously decreased more in the model control group than in the normal control group ($P < 0.01$). Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ Treg levels obviously increased more in the coixenolide control group than in the model control group ($P < 0.01$). **Conclusion** Coixenolide could up-regulate Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ Treg ratios in CIA mice, which might play certain immunoregulation roles in the incidence of CIA.

KEYWORDS collagen induced arthritis; coixenolide; Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ Treg

基金项目:浙江省中医药管理局资助课题(No. 2011ZB106)

作者单位:1.浙江省中西医结合医院风湿免疫科(杭州 310003);2.杭州市第一人民医院药剂科(杭州 310009)

通讯作者:郑红霞, Tel:13588458857, E-mail:zhx7854@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.03.0348

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节滑膜炎为特征的慢性自身免疫性疾病。炎症反复发作致使患者疼痛难忍,还可导致关节内软骨和骨的破坏,最终导致关节功能障碍,甚至致残。近年来发现的 Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(Treg)可能在 RA 发病中起重要作用^[1]。薏苡仁因具有健脾、补肺、清热、利湿的功效,是治疗 RA 的常用中药之一,其活性成分薏苡仁酯、薏苡仁油及总提取物均有抗肿瘤及免疫调节作用^[2]。因此,本研究将薏苡仁酯作用于胶原诱导性关节炎(collagen induced arthritis, CIA)小鼠,观察其对小鼠体内 Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺Treg 的影响。

材料与方法

1 动物 SPF 级 7~8 周 DBA/1 雄性小鼠 25 只,体重(18±2)g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号:SCXK(沪)2012-0002。

2 药物 薏苡仁酯注射液(100 mL/瓶,浙江康莱特药业有限公司生产,批号:1401032-1);生理盐水(100 mL/袋,杭州民生药业有限公司生产,批号:C1404031)。

3 试剂及仪器 卡介苗购自中国药品生物制品检定所,牛Ⅱ型胶原(CII)购自 Chondrex 公司,不完全弗氏佐剂购自美国 Sigma 公司;APC-抗 CD4 mAb (IgG2a)、PE-Foxp3 mAb 均购于 eBioscience 公司,FTTC-抗 CD25 mAb (IgG1)购于 Biolegend 公司;红细胞裂解液购自美国 BD 公司;流式细胞仪购自美国 Beckman Coulter 公司,型号为 EPICS XL。

4 方法

4.1 分组及造模方法 从 25 只小鼠中按随机数字表法选取 5 只为正常组,剩余 20 只小鼠进行造模。具体造模方法为:取等体积 C II 与完全弗氏佐剂 1:1 混合,充分研磨至混合物完全乳化,以乳化液滴入水中不松散为度(冰浴中操作),取乳化后的 C II 于小鼠尾根部皮内注射(0.1 mL/只),并使乳化液吸收完全。模型小鼠制备初次免疫(第 0 天)时每只小鼠尾根部、背部多点(4~5 点)皮内注射 0.1 mL 乳化后 C II。加强免疫(第 21 天),尾根部、背部多点皮内注射同等剂量的该乳剂作为激发。正常组正常饲养。20 只小鼠均造模成功,并按随机数字表法分为造模对照组及薏苡仁酯组,每组 10 只。

4.2 给药方法 造模后(即第 22 天)开始给药,薏苡仁酯组予薏苡仁酯注射液 25 mL/kg 每天腹腔内注射 1 次(相当于成人用量的 10 倍)。正常组及造模对照组注射生理盐水 25 mL/kg,每天腹腔内注射 1

次。共用药 21 天。

4.3 关节炎指数检测 末次用药 24 h 后对各组关节炎进行评分,按 5 级评分法^[3]:0 分为无红肿;1 分为红肿局限于 1 个足趾;2 分为红肿多于 1 个足趾;3 分为红肿涉及所有足趾和足背;4 分为整只爪子和踝重度红肿。按关节最严重程度评分,不能重复评分,因此每只小鼠关节评分总分不超过 16 分。计算各组关节炎指数(关节炎指数=各组所有小鼠关节炎分数的总和/该组小鼠的只数)。

4.4 各组 Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺Treg 的流式细胞术检测 末次用药 24 h 后用木槌击打小鼠头部处死,各组小鼠眼眶取血,EDTA 抗凝收集,分别取血 100 μL 加入到含有 APC-抗 CD4 mAb、PE-抗 Foxp3 mAb、FTTC-抗 CD25 mAb 的离心管中震匀,在 4℃下避光孵育 30 min。加入适量红细胞裂解液,离心弃上清。加入生理盐水同上进行离心,重复 2~3 次,过滤后用流式细胞仪进行检测。

4.5 统计学方法 利用 SPSS 12.0 软件进行统计分析,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间采用两独立样本 *t* 检验,多组间两两比较采用方差分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组关节炎指数结果比较(表 1) 实验用药第 22 天小鼠关节炎变化,造模对照组与正常组比较关节指数明显升高,差异有统计学意义(*P* < 0.01)。薏苡仁酯组小鼠关节炎指数较造模对照组明显下降,两组比较,差异有统计学意义(*t* = 11.012, *P* < 0.01)。

表 1 各组小鼠关节炎指数结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	关节炎指数
正常	5	0.0 ± 0.0
造模对照	10	15.0 ± 1.33 *
薏苡仁酯	10	8.6 ± 1.26 [△]

注:与正常组比较, **P* < 0.01;与造模对照组比较, [△]*P* < 0.01。

2 各组 Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺Treg 比例结果比较(表 2,图 1) 与正常组比较,造模对照组 Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺Treg 水平明显下降,差异有统计学意义(*P* < 0.01)。薏苡仁酯组较造模对照组用药后 Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺Treg 水平明显升高,差异有统计学意义(*t* = -0.192, *P* < 0.01)。

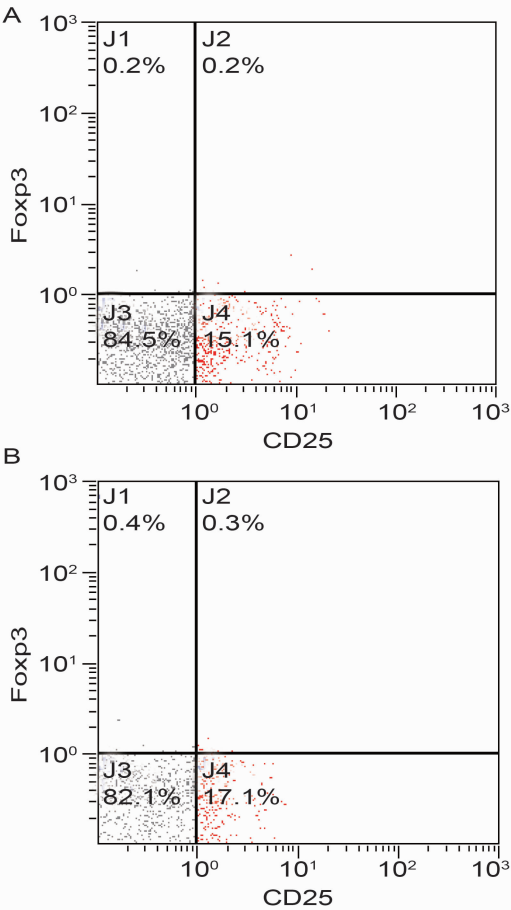
讨 论

薏苡仁酯是中药薏苡仁中提取的有效成分,李大鹏^[4]1975 年开始研究从薏苡仁中提取分离抗癌活性

表 2 各组 Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺Treg 比例结果比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	Foxp3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg
正常	5	1.724 ± 0.640
造模对照	10	0.117 ± 0.033 *
薏苡仁酯	10	0.221 ± 0.022 [△]

注:与正常组比较,*P<0.01;与造模对照组比较,[△]P<0.01



注: A 为造模对照组; B 为薏苡仁酯组

图 1 FCM 检测用药后 Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺Treg 比例

成分,发现薏苡仁中的薏苡仁甘油酯具有抗肿瘤作用,又研制成功静脉注射用的“康莱特注射液”。有研究表明采用康莱特注射液治疗肿瘤,患者的免疫状况有所提高^[4]。Treg 表面高表达 CD25 分子,只有 CD25 高表达的细胞才是 Treg,这类细胞具备人叉头型基因 P3 (Foxp3) 表达, Foxp3 是 Treg 最关键的细胞内标志物,是鉴定 Treg 的标志^[5]。有研究表明 RA 患者中

Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺Treg 较健康人群明显下降^[6],因此,上调 RA 患者体内 Treg 能阻止或延缓骨破坏进展^[7]。目前 RA 治疗中常用的改善病情类药物不良反应大,因此使用低毒且有效控制 RA 关节破坏的中药非常重要。

中药薏苡仁其性凉味甘淡,具健脾渗湿、除痹止泻、清热排毒之效,且无毒性,因此本实验将薏苡仁中的提取物薏苡仁酯注射液用于 RA 的动物模型 CIA 小鼠,发现薏苡仁酯作用于 CIA 小鼠后可使 CIA 小鼠体内原本下降的 Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺Treg 水平升高,与造模对照组比较,差异有统计学意义(P<0.01),同时小鼠关节炎症状逐渐得到改善,在治疗 21 天后比较,薏苡仁酯组关节炎指数较造模对照组明显好转(P<0.01)。可见薏苡仁酯存在上调 CIA 小鼠 Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺Treg 比例的作用,其在治疗 RA 中可能存在免疫调节作用。但是仍不清楚薏苡仁酯是否能控制 RA 关节破坏以及抑制相关炎症因子,故还需更深入的研究。

参 考 文 献

[1] 魏建波,秦斐,钟瑜. 类风湿关节炎患者外周血和关节液中 Foxp3⁺调节性 T 细胞的检测及意义[J]. 医学研究杂志, 2013, 42(4): 84-88.

[2] 张汀荣,陆向东,张瑶,等. 康莱特注射液对晚期肺癌患者免疫功能影响的研究[J]. 中国社区医师, 2013, 15(10): 206.

[3] Brand DD, Kang AH, Rosloniec EF. The mouse model of collagen-induced arthritis [J]. Methods Mol Med, 2004, 102: 295-312.

[4] 李大鹏. 康莱特注射液药效学及临床研究进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2007, 26(10): 778-782.

[5] Kryczek I, Liu R, Wang G, et al. FOXP3 defines regulatory T cells in human tumor and autoimmune disease [J]. Cancer Res, 2009, 69(9): 3995-4000.

[6] 郝轶群,刘秀梅,闫欣,等. 类风湿关节炎患者单个核细胞 Foxp3 启动子区甲基化研究[J]. 中华风湿病学杂志, 2013, 17(4): 264-267.

[7] Esensten JH, Wofsy D, Bluestore JA. Regulatory T cells as therapeutic targets in rheumatoid arthritis [J]. Nat Rev Rheumatol, 2009, 5(10): 560-565.

(收稿:2014-06-06 修回:2015-07-10)