研究报告

补骨脂素对类风湿性关节炎小鼠模型的免疫调节作用

张引红[1],李美宁[2],王春芳[1],郭民[1],张锐虎[1],陈朝阳[1*]

(1. 山西医科大学实验动物中心,实验动物与人类疾病动物模型山西省重点实验室,太原 030001;
2. 山西医科大学生物化学与分子生物学教研室,太原 030001)

【摘要】 目的 探讨补骨脂素对 II 型胶原诱导的小鼠类风湿性关节炎的作用并初步探讨其作用的分子机制。**方法** 选用 DBA/1J 小鼠,利用牛 II 型胶原诱导构建类风湿性关节炎小鼠模型。将造模成功的小鼠随机分为补骨脂素(PSO)、甲氨蝶呤(MTX)和模型对照(vehicle)三组,灌胃给药,观察关节改变情况并评分。称重并计算脾指数;流式细胞术测定脾淋巴细胞中 Th1、Th2 细胞数;ELISA 检测血清相关炎症因子 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 的表达量变化。**结果** 与 vehicle 组相比,PSO 组足踝肿胀、活动受限程度明显减轻; PSO 组脾指数显著低于模型对照组,Th1 淋巴细胞所占比例亦较 Vehicle 组显著下降,Th2 淋巴细胞比例差异无显著性;ELISA 结果显示 PSO 组血清 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 显著低于 Vehicle 组。各项结果 PSO 组与 MTX 组无统计学差别。**结论** 补骨脂素通过调节 Th1/Th2 细胞平衡及抑制 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 起到免疫调节作用,从而缓解 RA 进程。

【关键词】 补骨脂素;类风湿性关节炎小鼠模型;炎症因子;Th1/Th2;免疫调节
【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017) 02-0207-04
Doi:10. 3969/j. issn. 1005 - 4847. 2017. 02. 017

Immunoregulatory effect of Psoralen on collagen-induced arthritis in mice

ZHANG Yin-hong[1], LI Mei-ning[2], WANG Chun-fang[1], GUO Min[1], ZHANG Rui-hu[1], CHEN Zhao-yang[1*]

(1. Department of Laboratory Animal Science, Shanxi Key Laboratory of Laboratory Animal and Animal Model of Human Diseases, Taiyuan 030001, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001)

【Abstract】 Objective This study was designed to explore the therapeutic effect of psoralen on type II collagen-induced rheumatoid arthritis in mice and its molecular mechanism. **Methods** DBA/1J mice were immunized with type II bovine collagen to induce rheumatoid arthritis. The model mice were randomly divided into Psoralen group (PSO), methotrexate group (MTX) and model group (Vehicle). Clinical signs of arthritis in the mice were monitored. The spleen index was assessed. Splenic Th1 and Th2 cells were counted by flow cytometry. ELISA was used to detect the levels of inflammation-associated factors TNF-α, IL-6 and IL-1β in the serum. **Results** Compared with the vehicle group, the ankle swelling and limitation of joint activity in the PSO group were significantly reduced, the spleen index and Th1 cell percentage were significantly decreased, and the Th2 cell percentage showed no significant change in the PSO group. Expression of TNF-α, IL-6 and IL-1β in serum was notably decreased in the PSO group. All the indexes showed no significant difference between the PSO and MTX groups. **Conclusions** Psoralen may attenuate the severity of type II collagen-induced rheumatoid arthritis in mice by regulating the balance of Th1/Th2 cells and inhibiting the expression of TNF-α, IL-6 and IL-1β.

【Key words】 Psoralen; Rheumatoid arthritis; Mouse model; Inflammatory factor; Th1/Th2; Immunoregulation
Corresponding author: CHEN Zhao-yang, E-mail: ccytycn@163. com

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种引发机体多个关节发生炎症、以关节疼痛、关节囊肿胀等病变为主要表现的全身性自身免疫性疾病。RA 的发生发展与大量致炎细胞因子和炎症介质释

[基金项目]山西省实验动物专项资金项目(2009k03,2013k12);山西省重点实验室建设项目(2015012001 - 09)。
[作者简介]张引红(1972 -), 女, 硕士,实验师, 研究方向:实验动物学。E-mail: sxndzyh@163. com
[通讯作者]陈朝阳(1972 -), 男,副教授, 主要研究方向:实验动物学。E-mail: ccytycn@163. com

放有关,最后引起关节部位的软骨组织和骨质不可逆破坏,是我国造成劳动力丧失和致残的主要病因之一。临床目前尚无有效缓解 RA 的药物,主要应用非甾体抗炎药、糖皮质激素、甲氨蝶呤等控制病情对症治疗。这些药物可改善 RA 的症状,但长期使用有较强的毒副作用,如抑制机体免疫功能等。因此寻找安全有效治疗 RA 的药物具有重要意义。补骨脂素(psoralen,PSO)来源于豆科植物补骨脂的果实,属于呋喃香豆素类化合物,是补骨脂最重要的活性成分之一[1]。补骨脂被广泛应用于各类补肾健骨的方剂中,而且现代药理研究结果表明补骨脂具有治疗骨质疏松、抗肿瘤等药理作用,提示其可能在骨质代谢中发挥作用[2-4]。本研究利用胶原诱导与人 RA 发生机制相似的小鼠类风湿性关节炎模型,给予 40mg/kg 补骨脂素干预,与甲氨蝶呤组及模型对照组比较,探讨补骨脂素对类风湿性关节炎小鼠关节软骨的保护作用及相关炎症因子分泌的影响,为 RA 的治疗提供新的药物奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

DBA/1J 小鼠,SPF 级,雄性,6 ~ 8 周龄,体重 20 ~ 22 g,35 只,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪)2012 - 0002】,实验在山西医科大学实验动物中心 SPF 级动物实验室【SYXK(晋)2015 - 0001】进行。适应 1 周后开始实验。饲养环境:温度(25 ± 2)℃和湿度(55 ± 2)%,自由饮水,每日光照/黑暗各 12 h。

1.1.2 试剂与仪器

牛 II 型胶原(CII)醋酸溶液、完全弗氏佐剂(CFA)、不完全弗氏佐剂(IFA):Chondrex 公司;补骨脂素:成都曼斯特生物有限公司;注射用甲氨蝶呤:江苏恒瑞医药股份有限公司;ELISA 试剂盒(TNF-α, IL-6 和 IL-1β):北京四正柏生物科技有限公司;Anti-Mouse CD4(FITC)、Anti-Mouse IFN-γ(PerCP)、Anti-Mouse IL-4(APC):eBioscience 公司。

微孔板分光光度计(BioTek 公司,Epoch 型),流式细胞仪(美国 BD 公司,FACSCalibur 型)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠胶原性关节炎(CIA)的诱导

模型复制方法根据文献描述方法稍作修改[5]。在超净工作台内,将 CII 醋酸溶液与 CFA 等体积混和并充分乳化(在冰上操作),将乳化好的液体滴在水中后,呈圆形且不扩散,即为乳化完全。于 DBA1/J 小鼠尾根处后 1 ~ 2 cm 处皮下注射 100 μL CII 与 CFA 的混合乳液(含 CII0.1μg)进行初次免疫,当天记为 1 d,到 21 d 用同样的方法进行第 2 次免疫。将 CII 醋酸溶液与 IFA 等体积混和充分乳化,乳化和注射方法同初次免疫。此后,隔日观察关节症状,记录关节计分。

1.2.2 CIA 小鼠关节炎评分标准[5]

无红斑或肿胀,记 0 分;1 = 踝关节有轻微的红斑或一个趾的肿胀,记 1 分;2 = 踝关节出现红斑和超过一个趾的肿胀,记 2 分;3 = 红斑和踝部或腕部肿胀,记 3 分;4 = 全部红斑及脚趾和踝部或手指和腕部等多关节的肿胀,踝或腕不能弯曲,记 4 分;每个小鼠四肢评分之和为关节计分。

1.2.3 分组及给药

将造模成功的 35 只 CIA 小鼠随机分为以下 3 组:CIA 模型组(12 只)、甲氨蝶呤阳性对照组(11 只)、补骨脂素组(12 只)。甲氨蝶呤阳性对照组和补骨脂素组在二免当天开始给药,连续灌胃给药 21 d。隔日观察关节情况评分记录。

1.2.4 炎症因子测定

酶联免疫吸附法测定各组小鼠血清中的 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 含量。将小鼠眼眶采血后,静置 30 min,于 4℃,3000 r/min 离心 10 min,小心吸取出上层血清,由酶联免疫吸附法测得,操作步骤严格按照试剂盒所附说明书进行。

1.2.5 流式分析

常规提取脾淋巴细胞,计数后,严格按照试剂盒所附说明书进行细胞染色,上机测试。

1.3 统计方法

SPSS13.0 统计学分析软件处理,组间比较采用单因素方差分析,实验结果用($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 关节外观变化及评分

初次免疫后前 3 周,小鼠未出现足趾及足踝红肿。进行二免,并随机分为补骨脂素(PSO)、甲氨蝶呤(MTX)、模型对照(vehicle)三组,给予相应的灌胃处理,观察记录关节外观并计分。二免后第 1 周各组小鼠均出现足踝及足趾肿胀、活动受限等关节炎症状,但各组间差异无显著性;在第 8 天后,随时间延长,PSO 组关节肿胀较前减弱,关节僵直及活动

受限程度均显著优于模型对照组($P < 0.01$),与 MTX 组相比差异无显著性($P > 0.05$),评分结果见表 2。如图 1 所示,给药 7 d 后,补骨脂素组与甲氨蝶呤组的关节计分无显著增加,并进而呈现略微下降趋势,表明补骨脂素能够减慢关节炎发病进程,缓解症状。

2.2　脾及 Th1 淋巴细胞变化

实验终止时解剖取出脾,模型对照组小鼠脾体积明显大于 PSO 组和 MTX 组。脾实体图片如图 3。称重计算各组小鼠脾指数,模型对照组(54.23 ± 5.12)、PSO 组(34.86 ± 3.32)、MTX 组(35.03 ± 3.63)。PSO 组脾指数显著低于模型对照组($P < 0.01$),与 MTX 组差异无显著性($P > 0.05$)(图 4)。

分离脾淋巴细胞,利用流式细胞仪分析各组 $CD4^+$、$IFN\text{-}\gamma^+$ 标记的 Th1 占 $CD4^+$ T 细胞比例,如图 5 所示:PSO 组(14.58 ± 0.42)% 显著低于模型对照组(28.17 ± 1.56)%,与 MTX 组差异无显著性(15.02 ± 0.59)%。而 $CD4^+$、$IL\text{-}4^+$ 标记的 Th2 细胞占 $CD4^+$ T 细胞比例在各组间差异无显著性。

2.3　炎症因子水平的变化

实验终止时取各组小鼠血清,利用 ELISA 检测 TNF-α、IL-6 和 IL-1β。结果显示模型对照组小鼠血清中 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 水平均显著高于 PSO 组和 MTX 组,差异有显著性($P < 0.01$),结果见表 2。

表 1　二免后关节计分结果($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1　Joint scores after the second immunization

组别 Groups	第 1 周 First week	第 2 周 Second week	第 3 周 Third week
模型对照组 Vehicle group	2.71 ± 0.56	3.26 ± 0.65	5.58 ± 0.62
甲氨蝶呤组 MTX group	2.04 ± 0.39	1.95 ± 0.46	2.38 ± 0.54
补骨脂素组 PSO group	2.56 ± 0.46	2.63 ± 0.62	2.83 ± 0.67 **

注:与模型对照组相比 ** $P < 0.01$。表 2 同。

Note. Compared with the vehicle group, ** $P < 0.01$. The same as in Tab. 2.

表 2　血清中细胞因子 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 比较($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

Tab. 2　Comparison of serum cytokines TNF-α, IL-6 and IL-1β in the 3 groups

组别 Groups	TNF-α	IL-1β	IL-6
模型对照组 Vehicle group	28.56 ± 5.86	40.62 ± 6.54	46.94 ± 7.32
甲氨蝶呤组 MTX group	16.58 ± 2.48	23.84 ± 3.36	34.43 ± 3.84
补骨脂素组 PSO group	15.62 ± 2.26 **	24.38 ± 3.82 **	33.76 ± 3.52 **

图 1　关节外形变化图

Fig. 1　Gross changes in the joint shape

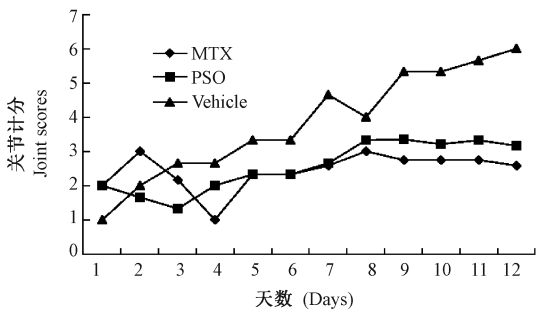


图 2　关节计分图

Fig. 2　Joint scores

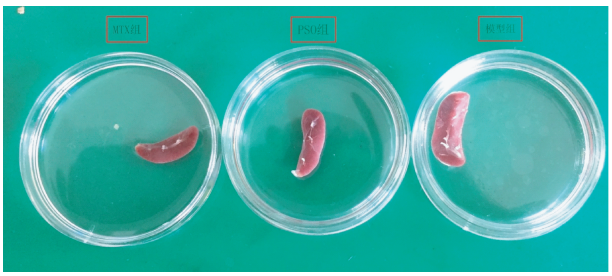
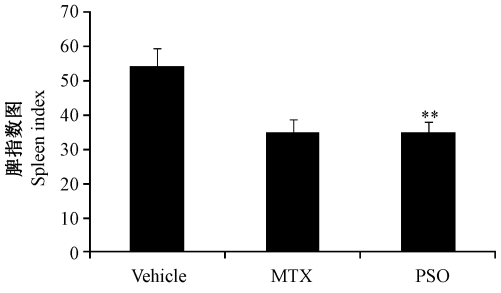


图 3　脾实体图片

Fig. 3　Gross appearance of the spleens



注:与模型对照组相比 ** $P<0.01$。

图 4 脾指数图

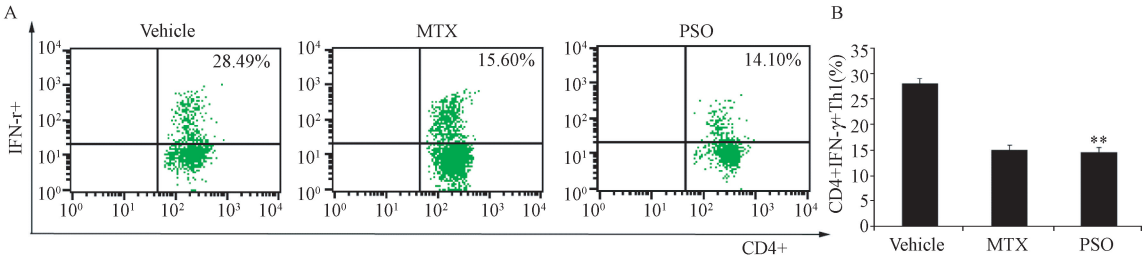
Note. Compared with the vehicle group, ** $P<0.01$.

Fig. 4 Spleen indexes in the three groups

3 讨论

在模型构建过程中,我们用注射器抽吸法制备乳化液,为避免注射器反复抽吸产生热量,采取冰袋包绕注射器的方法,在 50 mL 三角瓶中进行抽吸,比文献用匀浆器乳化操作简单,且大大减少了试剂损耗,经济实惠。在初次免疫 21 d 时进行二免,此时,初免造成的尾根溃烂已脱痂,避免了因为尾根溃烂而造成二免失败。

我们利用牛 II 型胶原成功诱导构建了 DBA/1J 小鼠的 CIA 模型。研究显示在 CII 免疫之后,



注:A:流式分析代表图;B:统计分析图(与模型对照组相比, ** $P<0.01$)。

图 5 脾淋巴细胞中 Th1 细胞比例流式分析结果

Note. A. Flow cytometry chart; B: Histogram. Compared with the vehicle group, ** $P<0.01$.

Fig. 5 Ratio of Th1 cells in the splenic lymphocytes determined by flow cytometry

补骨脂素组的小鼠关节计分明显降低,实验证实了补骨脂素对 CIA 病变关节有保护作用。CIA 模型与人类 RA 患者在免疫学和病理变化方面具有较高的相似性,是广泛使用的研究 RA 模型。

RA 属于自身性免疫疾病,目前研究者普遍认为 RA 是抗原递呈细胞和 $CD4^+$ T 细胞作用的结果。根据分泌细胞因子的不同可将 $CD4^+$ T 细胞分为 Th1、Th2 等细胞亚群。其中 Th1 细胞介导的免疫反应启动了 RA 的发生,而 Th2 细胞主要释放抑制炎症作用的细胞因子,因此 Th1/Th2 细胞的平衡与 RA 的进展密切相关[6,7]。

我们的实验结果显示补骨脂素干预后病变处炎性细胞浸润程度显著降低,并可有效减少脾淋巴细胞中 $CD4^+$ 细胞向 Th1 细胞分化,调节 Th1/Th2 比例平衡。RA 促进炎性因子 TNF-α 的释放,TNF-α 有进一步促进 IL-6 和 IL-1β 等炎性因子的释放。我们检测了在 RA 发病中具有关键作用的三种细胞因子 TNF-α、IL-6 和 IL-1β,补骨脂素处理后均呈显著下降。提示补骨脂素可能通过抑制 Th1 细胞分化,减少 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 的分泌,显示出一定的抗炎作用和免疫调节作用,从而缓解 CIA 病情,使发病程度降低. 为临床上 RA 的治疗提供新的药物奠定实验基础。补骨脂素发挥作用的详细分子机制及毒副作用等有待于进一步研究。

参 考 文 献

[1] 黄剑,赵陆华,邹巧根,等. 补骨脂化学成分及药理研究进展[J]. 药学进展,2000,24(4): 212 – 214.

[2] 闰晓光,吴军正,陈建元,等. 补骨脂素与维甲酸联合应用对 Mc3 细胞膜表面四种凝聚素受体表达的影响[J]. 现代口腔医学杂志,2000,14(4):233 – 235.

[3] 蔡宇. 补骨脂素逆转人乳腺癌细胞多药耐药性的研究[J]. 肿瘤,2004,24(3):204 – 214.

[4] 翟远坤,潘亚磊,牛银波,等. 补骨脂素与异补骨脂素对乳鼠颅骨成骨细胞分化成熟影响的比较研究[J]. 中国药理学通报 2012,28(3) : 355 – 361.

[5] David D, Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. collagen-induced arthritis (CIA) in mice. Nature Protoc, 2007, 2: 1269 – 1275.

[6] Chen Z, Guo M, Song G et al. Schisandrin B inhibits Th1/Th17 differentiation and promotes regulatory T cell expansion in mouse lymphocytes[J]. Int Immunopharmacol. 2016, 35(1):257 – 264.

[7] 封桂英, 宋鸿儒, 邢恩鸿,等. 黄芩茎叶总黄酮对胶原性关节炎小鼠 TH1/Th2 细胞平衡的调节[J]. 免疫学杂志, 2014, 30(6): 525 – 528.

[收稿日期] 2016 – 11 – 17