蕲蛇 II 型胶原蛋白治疗胶原诱导性关节炎大鼠的相关作用机制研究

陈妙月 丁兴红 吴素玲 陈俊松

【摘要】 目的 探讨蕲蛇 II 型胶原蛋白(C II)治疗胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠的相关作用机制。方法 60 只 10 周龄 Wistar 雄性大鼠按随机数字表法分为蕲蛇 C II 高、中、低剂量组和空白组、模型组、塞来昔布(对照)组,每组 10 只。除空白组外,其余 5 组采用牛 C II-弗氏完全佐剂乳剂注射法构建 CIA 大鼠模型,2 周后分别给予相应药物治疗,治疗 30 d 后处死大鼠,获得左后足膝关节滑膜组织和肠系膜淋巴结。采用 HE 染色法观察大鼠关节滑膜组织病理学变化,ELISA 法检测大鼠肠系膜淋巴结淋巴细胞(MLNLs)中 IL-2、IL-4、IL-17 和转化生长因子- β (TGF- β)水平,流式细胞术检测辅助性 T 细胞 17(Th17)、调节性 T 细胞(Treg)细胞比例。结果 与空白组比较,模型组大鼠膝关节滑膜组织细胞体积增大、炎症细胞浸润、新生血管生成,MLNLs 中 IL-2、IL-4 水平明显降低(均 $P < 0.05$),TGF- β 、IL-17 水平明显升高(均 $P < 0.05$),Th17、Treg 细胞比例明显升高(均 $P < 0.05$);与模型组比较,对照组和蕲蛇 C II 高、中、低剂量组大鼠膝关节滑膜组织内炎症细胞聚集、新生血管明显减少,MLNLs 中 IL-2、IL-4、TGF- β 水平明显升高(均 $P < 0.05$),IL-17 水平明显降低($P < 0.05$),Treg 细胞比例升高而 Th17 细胞比例降低(均 $P < 0.05$),其中蕲蛇 C II 不同剂量组间呈一定的量效关系(均 $P < 0.05$)。结论 蕲蛇 C II 治疗能改善 CIA 大鼠关节滑膜组织的病理性改变,其作用机制可能是通过调节 MLNLs 中细胞因子水平和 Th17、Treg 细胞比例实现的。

【关键词】 蕲蛇 II 型胶原蛋白 胶原诱导性关节炎 大鼠 免疫调节 细胞因子

Efficacy of agkistrodon type II collagen in treatment of rats with collagen-induced arthritis and related mechanism CHEN Miaoyue, DING Xinghong, WU Suling, CHEN Junsong, Department of Internal Medicine, Hangzhou Children's Hospital, Hangzhou 310014, China

Corresponding author: CHEN Miaoyue, E-mail: miaoyuechen@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the efficacy of agkistrodon type II collagen(C II) in treatment of rats with collagen-induced arthritis(CIA) and related mechanism. Methods Sixty Wistar male rats of 10 weeks old were randomly divided into six groups with 10 rats in each group: normal control group, model control group, celecoxib treatment control group, and high-, medium- and low-dose C II treatment groups. The CIA model was induced by injection with bovine C II emulsified in CFA at 2 weeks before corresponding drug treatment. The rats were sacrificed after 30 days of treatment, the synovial tissue of the knee joint of the left posterior foot and mesenteric lymph node samples were collected. The histopathological changes of synovium were observed by HE staining. The expression levels of IL-2, IL-4, IL-17 and transforming growth factor- β (TGF- β) in rat mesenteric lymph node lymphocytes(MLNLs) were detected and the ratio of helper T cell 17(Th17) and regulatory T cell(Treg) was calculated. Results Compared with the normal control group, the synovial tissue cells volume and inflammatory cell aggregation and neovascularization in the model group were significantly enhanced, the expression levels of IL-2 and IL-4 in MLNLs were significantly decreased(all $P < 0.05$), the levels of TGF- β and IL-17 were significantly increased (all $P < 0.05$), and the ratio of Th17/Treg was markedly increased(all $P < 0.05$). Compared with the model group, the inflammatory cell aggregation and neovascularization in the synovial tissue of celecoxib treatment group and three C II treatment groups rats were significantly reduced, the expression levels of IL-2, IL-4 and TGF- β in MLNLs were significantly increased(all $P < 0.05$), the levels of IL-17

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2021.43.5.2020-2607

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2017KY555)

作者单位:310014 杭州市儿童医院内科(陈妙月、吴素玲、陈俊松);浙江中医药大学基础医学院(丁兴红)

通信作者:陈妙月, E-mail: miaoyuechen@126.com

were significantly decreased(all $P < 0.05$), the ratio of Th17/Treg was decreased(all $P < 0.05$) in a dose-effect manner(all $P < 0.05$).
Conclusion The agkistrodon C II can alleviate the pathological changes of synovial tissue in CIA rats, which is associated with the regulating the expression levels of cytokines and Th17/Treg ratio in MLNLs.

【Key words】 Agkistrodon type II collagen Collagen-induced arthritis Rats Immunomodulation Cytokines

祖国传统医学中蕲蛇又名尖吻蝮,具有驱风邪、通经络等诸多功效,被证实是治疗风湿痹证的要药,蕲蛇 II 型胶原蛋白(type II collagen, C II)是其主要有有效活性成分。胶原诱导性关节炎(collagen induced arthritis, CIA)大鼠模型是以慢性、多发性末端关节炎,甚至关节损害等为主要表现的免疫性关节炎模型,被应用于关节炎病理生理、免疫机制的研究,以寻求新的治疗靶点和验证新的药物疗法^[1]。本文建立 CIA 大鼠模型,以探讨蕲蛇 C II 治疗 CIA 大鼠的相关作用机制,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物 10 周龄、清洁级 Wistar 雄性大鼠 60 只,由浙江中医药大学动物实验中心提供;体重(286.5 ± 4.3) g,饲养在标准环境中。

1.2 药物与试剂 弗氏完全佐剂,采用 20 ml 弗氏不完全佐剂与 200 mg 卡介苗(批号:200703001,上海生物制品研究所)充分混合制成;蕲蛇 C II,采用胰蛋白酶组合微透析等技术从蕲蛇粉末(去内脏、皮骨)中分离提取并用 0.9%氯化钠溶液溶解获得 20、10、5 $\mu\text{g/ml}$ 的溶液;塞来昔布(国药准字:J20140072,辉瑞制药有限公司),按 36 $\mu\text{g/g}$ 称取药物溶解于 0.9%氯化钠溶液中,获得 3.5 mg/ml 的溶液。Bovine Type II Collagen 购自美国 Chondrex 公司, FBS 购自美国 Gibco 公司, ConA 购自上海源叶生物科技有限公司, D-Hank's 液、DMEM、IL-2、IL-4、IL-17 转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 的 ELISA 试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司, FITC 标记的抗大鼠 CD4 抗体、PE 标记的抗大鼠 CD25 抗体、FITC 标记的抗大鼠 CD4 抗体、PE 标记的抗大鼠 IL-17A 抗体均购自杭州联科生物技术股份有限公司, Percoll 细胞分离液购自美国 GE 公司。

1.3 动物分组与处理 按随机数字表法将 60 只大鼠分为 6 组,每组 10 只,即高剂量组、中剂量组、低剂量组、空白组、模型组、塞来昔布(对照)组,每组 10 只。在大鼠右后足爪皮下和尾根部注射牛 C II-弗氏完全佐剂乳剂(将弗氏完全佐剂加入等体积的 Bovine Type II Collagen 中冰浴研磨均匀制成)0.2 ml 建立 CIA 大鼠模

型^[2], 1 周后尾根部追加 0.2 ml 进行免疫增强;而空白组注射等量的 0.9%氯化钠注射液。2 周后采用灌胃方式给予药物治疗:高剂量组、中剂量组、低剂量组按 10 ml/kg 分别给予 20、10、5 $\mu\text{g/ml}$ 的蕲蛇 C II 溶液,对照组按 10 ml/kg 给予塞来昔布溶液,其余两组按 10 ml/kg 给予等量的 0.9%氯化钠溶液,1 次/d,连续给药 30 d。治疗结束后处死大鼠,获得左后足膝关节滑膜组织和肠系膜淋巴结。

1.4 大鼠关节滑膜组织病理学观察 采用 HE 染色法。取左后足膝关节滑膜组织,经甲醛固定、乙醇梯度脱水、制作石蜡切片、HE 染色后在显微镜下观察。采用 0~4 级评分法评价滑膜病变程度:正常表现为 0 级;轻微炎症反应,可见少量炎症细胞聚集为 1 级;局灶性炎症细胞分布,滑膜轻度增生为 2 级;大量炎症细胞浸润,滑膜明显增生,新生血管增加为 3 级;炎症细胞浸润明显,滑膜增生明显,血管翳形成,累及关节软骨和周围组织为 4 级。

1.5 大鼠肠系膜淋巴结淋巴细胞(mesenteric lymph node lymphocytes, MLNLs)分离 将大鼠肠系膜淋巴结放入盛有含 5%FBS 的 D-Hank's 液平皿的沙网(200 目)中,去除脂肪及结缔组织,然后经组织碾碎、离心分离,最终获得重悬细胞。

1.6 MLNLs 中 IL-2、IL-4、IL-17 和 TGF- β 水平检测 采用 ELISA 法。MLNLs 悬液用 10%FBS-DMEM 培养液进行培养,调整细胞浓度为 5×10^9 个/L。在无菌的 24 孔培养板上,每孔加入 500 μl MLNLs 悬液、500 μl 含 ConA (终浓度为 5 mg/L) 的 10% FBS-DMEM 培养液,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度饱和的 5%CO₂ 培养箱中培养 48 h, 2 000 r 离心 10 min,取上清液,使用 ELISA 试剂盒检测 IL-2、IL-4、IL-17 水平。而 TGF- β 水平检测选择的是 5%CO₂ 培养箱中培养 8 h 的细胞、2 000 r 离心 5 min 后弃上清液、使用 D-Hank's 液洗涤 3 次后加入无血清的 DMEM 培养液继续培养 72 h、2 000 r 离心 10 min 获得的上清液,使用 ELISA 试剂盒进行检测。

1.7 MLNLs 中辅助性 T 细胞 17(T helper cell 17, Th17)、调节性 T 细胞(regulatory cell, Treg)细胞比例检测 采用流式细胞术。取 1 ml 的 MLNLs 悬液,与 1 ml 的 40% Percoll 工作液混合均匀后转至离心管中(含 2 ml 70%

Percoll 工作液), 4 ℃、1 200 r 离心 20 min, 收集淋巴细胞后调整细胞浓度为 1×10^9 个/L, 用 FITC 标记的抗大鼠 CD4 抗体、PE 标记的抗大鼠 CD25 抗体标记 Treg, 用 FITC 标记的抗大鼠 CD4 抗体、PE 标记的抗大鼠 IL-17A 抗体标记 Th17, 上流式细胞仪进行检测。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 23.0 统计软件。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠关节滑膜组织病理学观察 造模后, 大鼠的滑膜组织细胞体积增大, 排列紊乱, 炎症细胞浸润, 新生血管生成。蕲蛇 C II、塞来昔布对炎症反应均有一定的抑制作用, 给药后炎症细胞及微血管数量明显减少, 见图 1(插页)。

2.2 各组大鼠 MLNLs 中 IL-2、IL-4、IL-17 和 TGF- β 水平比较 各组大鼠 MLNLs 中 IL-2、IL-4、IL-17 和 TGF- β 水平比较, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 与空白组比较, 模型组 MLNLs 中 IL-2、IL-4 水平明显降低, 而 TGF- β 、IL-17 水平明显升高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 与模型组比较, 高剂量组、中剂量组及对照组 MLNLs 中 IL-2、IL-4、TGF- β 水平明显升高, 而 IL-17 水平明显降低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 与中剂量组比较, 高剂量组 MLNLs 中 IL-2、IL-4、TGF- β 水平明显升高, 而 IL-17 水平明显降低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), 见表 1。

2.3 各组大鼠 MLNLs 中 Th17、Treg 细胞比例比较 各组大鼠 MLNLs 中 Th17、Treg 细胞比例比较, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 与空白组比较, 模型组 MLNLs 中 Th17、Treg 细胞比例均明显升高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 与模型组比较, 高剂量组、中剂量组、低剂量组及对照组 MLNLs 中 Th17 细胞比例明显降

低, 高剂量组及对照组 Treg 细胞比例明显升高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 与中剂量组比较, 高剂量组 Th17 细胞比例明显降低, Treg 细胞比例明显升高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), 见表 2 和图 2(插页)。

3 讨论

本团队通过 X 线检查观察大鼠足趾肿胀程度及致炎关节, 已证实蕲蛇 C II 治疗能缓解大鼠关节的肿胀程度, 降低关节软骨的损害, 且相关作用具有一定的量效关系; 蕲蛇 C II 对大鼠 T 淋巴细胞具有免疫调节作用, 可调节 CIA 大鼠外周血 CD4⁺水平和 CD4⁺/CD8⁺, 与剂量呈一定的相关性(待发表)。而本研究通过构建 CIA 大鼠模型进一步探讨蕲蛇 C II 治疗 CIA 的相关作用机制, 结果显示蕲蛇 C II 能明显改善 CIA 大鼠病变关节的炎症程度, 可能是通过对大鼠 MLNLs 免疫调节机制产生影响而发挥作用的。其中减轻关节炎症可能与蕲蛇 C II 诱导体内产生口服耐受机制有关。口服耐受是指通过口服方式进食某种蛋白质后, 再次摄入时机体发生全身免疫低反应状态^[3]。口服抗原的剂量是关系到口服耐受效果的重要影响因素, 低剂量的抗原诱导自身反应性淋巴细胞主动免疫抑制, 高剂量的抗原诱导克隆清除或克隆无能^[4]。Th17、Treg 作为 2 种新型 Th 细胞亚群, 在关节炎自身免疫反应的发生、发展中起关键作用^[5]。Treg 特异性表达 Forkhead 家族蛋白 3, 具有抗炎作用, 且在维持机体对自身组织免疫耐受方面发挥重要作用。研究表明, Treg 可产生抑制性细胞因子, 通过上调抑制性免疫细胞表面分子表达和下调活化 T 细胞的相关基因来抑制靶细胞诱导的免疫应答^[6]。Th17 能分泌产生 IL-17、IL-21、IL-6、TNF- α 等细胞因子, 其中 IL-17 是 Th17 最重要的效应因子, 其受体在体内广泛表达, 可诱导其他炎症细胞因子如 IL-6、TNF- α 等表达, 引起炎症细胞浸润和组织损伤。可见,

表 1 各组大鼠 MLNLs 中 IL-2、IL-4、IL-17 和 TGF- β 水平比较(ng/L)

组别	n	IL-2	IL-4	IL-17	TGF- β
低剂量组	10	282.09 ± 122.81 ^{*▲}	11.19 ± 1.78 ^{*▲}	101.32 ± 2.40 ^{*▲▲}	98.94 ± 1.90 ^{*▲▲}
中剂量组	10	433.16 ± 44.47 ^{*△}	15.18 ± 2.96 [△]	66.45 ± 1.11 ^{*△}	120.08 ± 4.79 ^{*△}
高剂量组	10	789.41 ± 105.80 ^{*▲▲}	20.85 ± 3.63 ^{▲▲}	52.02 ± 1.55 ^{*▲▲}	141.25 ± 2.97 ^{*▲▲}
对照组	10	506.50 ± 86.02 ^{*△}	22.32 ± 6.57 [△]	52.99 ± 2.05 ^{*△▲}	138.65 ± 3.54 ^{*△▲}
模型组	10	267.11 ± 46.14 [*]	9.36 ± 2.35 [*]	159.99 ± 1.91 [*]	75.36 ± 1.45 [*]
空白组	10	688.20 ± 107.24 [△]	18.38 ± 3.85 [△]	54.81 ± 1.87 [△]	28.17 ± 2.19 [△]
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注: MLNLs 为肠系膜淋巴结淋巴细胞, TGF- β 为转化生长因子- β ; 与空白组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$; 与中剂量组比较, [▲] $P < 0.05$

表 2 各组大鼠 MLNLs 中 Th17、Treg 细胞比例比较(%)

组别	n	Th17	Treg
低剂量组	10	1.85 ± 0.06 ^{*△▲}	1.25 ± 0.05 ^{*△▲}
中剂量组	10	1.36 ± 0.04 ^{*△}	1.61 ± 0.07 ^{*△}
高剂量组	10	1.02 ± 0.04 ^{*△▲}	3.77 ± 0.30 ^{*△▲}
对照组	10	0.81 ± 0.03 ^{*△▲}	3.56 ± 0.24 ^{*△▲}
模型组	10	3.05 ± 0.11 [*]	2.31 ± 0.12 [*]
空白组	10	0.75 ± 0.05 [△]	1.02 ± 0.06 [△]
P 值		<0.05	<0.05

注:MLNLs 为肠系膜淋巴结淋巴细胞,Th17 为辅助性 T 细胞 17,Treg 为调节性 T 细胞;与空白组比较,^{*}*P*<0.05;与模型组比较,[△]*P*<0.05;与中剂量组比较,[▲]*P*<0.05

免疫内环境的稳定与上述 2 种细胞的比例平衡显著相关。本研究结果显示,蕲蛇 C II 能使 CIA 大鼠 MLNLs 中 IL-2、IL-4 水平升高,且剂量越高效果越明显,高剂量组与塞来昔布的效果类似,可能存在同样的抗炎机制。此外,蕲蛇 C II 和塞来昔布均能使 CIA 大鼠 MLNLs 中 Treg 细胞比例升高,Th17 细胞比例降低,但相关比例较文献报道的数据偏低^[7],可能受实验方法和试剂的影响,亦可能是由于采集的细胞数量不足所致。

综上所述,蕲蛇 C II 治疗能改善 CIA 大鼠关节滑膜组织的病理性改变,其作用机制可能是通过调节 MLNLs 中细胞因子水平和 Th17、Treg 细胞比例实现的。

4 参考文献

- [1] Bessis N, Decker P, Assier E, et al. Arthritis models: usefulness and interpretation[J]. *Semin Immunopathol*, 2017, 39(4):469-486. DOI:10.1007/s00281-017-0622-4.
- [2] Zhou H, Wong YF, Wang J, et al. Sinomenine ameliorates arthritis via MMPs, TIMPs, and cytokines in rats[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 376(2):352-357. DOI:10.1016/j.bbrc.2008.08.153.
- [3] Park KS, Park MJ, Cho ML, et al. Type II collagen oral tolerance, mechanism and role in collagen-induced arthritis and rheumatoid arthritis[J]. *Mod Rheumatol*, 2009, 19(6):581-589. DOI:10.1007/s10165-009-0210-0.
- [4] 赵燕,蔡美英,王霞,等. II 型胶原对关节炎大鼠免疫功能的影响[J]. *临床和实验医学杂志*, 2009, 8(8):6-7. DOI:10.3969/j.issn.1671-4695.2009.08.003.
- [5] Noack M, Miossec P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases[J]. *Autoimmun Rev*, 2014, 13(6):668-677. DOI:10.1016/j.autrev.2013.12.004.
- [6] Ren J, Li B. The Functional Stability of FOXP3 and ROR γ t in Treg and Th17 and Their Therapeutic Applications[J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2017, 107:155-189. DOI:10.1016/bs.apcsb.2016.10.002.
- [7] 谭宁,贺守第,关丽,等. 蜂毒肽对胶原诱导关节炎大鼠模型 Th17/Treg 平衡及炎症的影响[J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(2):1-6. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2019.02.001.

(收稿日期:2020-06-30)

(本文编辑:陈丹)

(上接第 461 页)

- [27] de Ferranti SD, Milliren CE, Denhoff ER, et al. Using high-dose omega-3 fatty acid supplements to lower triglyceride levels in 10- to 19-year-olds[J]. *Clin Pediatr (Phila)*, 2014, 53(5):428-438. DOI:10.1177/0009922814528032.
- [28] Pastori D, Polimeni L, Baratta F, et al. The efficacy and safety of statins for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Dig Liver Dis*, 2015, 47(1):4-11. DOI:10.1016/j.dld.2014.07.170.
- [29] Raal FJ, Honarpour N, Blom DJ, et al. Inhibition of PCSK9 with evolocumab in homozygous familial hypercholesterolaemia (TESLA Part B): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *Lancet*, 2015, 385(9965):341-350. DOI:10.1016/S0140-6736(14)61374-X.
- [30] Bennett CF, Swayze EE. RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2010, 50:259-293. DOI:10.1146/annurev.pharmtox.010909.105654.
- [31] Vrablík M, Češka R. Treatment of hypertriglyceridemia: a review of current options[J]. *Physiol Res*, 2015, 64(Suppl3):S331-S340. DOI:10.33549/physiolres.933199.
- [32] Dewey FE, Gusarova V, Dunbar RL, et al. Genetic and Pharmacologic Inactivation of ANGPTL3 and Cardiovascular Disease[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(3):211-221. DOI:10.1056/NEJMoa1612790.
- [33] Thompson GR. LDL apheresis[J]. *Atheroscler*, 2003, 167(1):1-13. DOI:10.1016/s0021-9150(02)00251-4.
- [34] Tevfik K, Yucel Y, Turan K, et al. Liver transplantation as a treatment option for three siblings with homozygous familial hypercholesterolemia[J]. *Pediatr Transplant*, 2011, 15(3):281-284. DOI:10.1111/j.1399-3046.2010.01469.x.
- [35] Kassim SH, Wilson JM, Rader DJ. Gene therapy for dyslipidemia: a review of gene replacement and gene inhibition strategies[J]. *Clin Lipidol*, 2010, 5(6):793-809. DOI:10.2217/clp.10.73.
- [36] Gaudet D, Méthot J, Déry S, et al. Efficacy and long-term safety of alipogene tiparvovec (AAV1-LPLS447X) gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: an open-label trial[J]. *Gene Ther*, 2013, 20(4):361-369. DOI:10.1038/gt.2012.43.

(本文由浙江省医学会推荐)

(收稿日期:2020-10-09)

(本文编辑:陈丹)