

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2016.05.011

柳氮磺胺吡啶对胶原诱导关节炎 Th17/Treg 细胞的影响^①

汤 军, 丁嵩涛, 刘 莉,
秦启忠, 彭惠民, 刘含登

重庆医科大学 实验教学管理中心, 重庆 400016

摘要: 目的: 评价柳氮磺胺吡啶对胶原诱导性小鼠关节炎的治疗作用, 并探讨其对 Th17/Treg 细胞的调控作用. 方法: 构建胶原诱导关节炎(collagen induced arthritis, CIA)模型, II 型胶原免疫小鼠, 21 d 后将关节炎小鼠分为对照组和柳氮磺胺吡啶组, 记录关节炎临床评分, 观察病理切片, 比较关节炎发病严重程度; 流式细胞术检测脾脏淋巴细胞 Th17 及 Treg 细胞的比例. 结果: 柳氮磺胺吡啶能显著降低 CIA 小鼠关节炎的临床评分($p < 0.05$), 脾脏 Th17 细胞水平($p < 0.05$)在一定程度上促进 Treg 细胞的表达. 结论: 柳氮磺胺吡啶调控 Th17 细胞与 Treg 细胞平衡, 可能是其治疗类风湿关节炎的作用机制之一.

关键词: 类风湿关节炎; 柳氮磺胺吡啶; Th17 细胞; 调节性 T 细胞; 胶原诱导性关节炎

中图分类号: Q4; R392

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2016)05-0066-05

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以慢性、对称性、进行性为主要特征的自身免疫系统性疾病, 该病可导致关节严重畸形及功能障碍, 而且该病在人群中的发病比率高达 1%^[1]. 研究发现 Th17/Treg 细胞失衡在 RA 发病中起到重要作用, 与病情活动度等因素有关^[2]. 柳氮磺胺吡啶(sulphasalazine, SSZ)作为改变病情的抗风湿药, 可以单用或者联合其他抗风湿药治疗类风湿关节炎等疾病^[3]. 胶原诱导性关节炎模型(collagen induced arthritis, CIA), 是一种以 T 细胞介导为主的实验性自身免疫关节炎模型, 其遗传学背景和免疫病理学改变与 RA 相似, Th17/Treg 在其发病中同样起重要作用, 是目前研究 RA 较为理想的动物模型^[4]. 本研究通过分析柳氮磺胺吡啶对胶原诱导性关节炎小鼠脾脏 Th17/Treg 细胞的调控作用, 探讨了柳氮磺胺吡啶治疗 RA 的作用机制.

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 DBA/1 小鼠, 6~8 周龄, (20±2) g, 购自上海斯莱克实验动物中心, 实验动物生产证书号: 2007000573633. 分组: CIA 小鼠随机分为 2 组: 从初次胶原免疫后第 21 d 起, 连续灌服柳氮磺胺吡啶每周 3 次, 质量分数为 0.20 g/kg, 连续 4 周($n=10$); 对照组: 灌胃等体积的安慰剂磷酸盐缓冲液($n=10$).

1.2 制备小鼠胶原诱导关节炎模型

初次免疫, 制备免疫乳化剂: 2 mg/mL 完全弗氏佐剂与 2 mg/mL 牛 II 胶原等体积混合, 乳化. 小鼠尾

① 收稿日期: 2015-03-03

基金项目: 国家高技术产业发展计划项目(863 计划); 863 计划项目(2014AA022209); 国家自然科学基金(81370906).

作者简介: 汤 军(1983-), 女, 重庆人, 硕士, 助理实验师, 主要从事药理生理学研究.

部皮内注射 100 μL 乳化剂, 21 d 后再次免疫. 初次注射 II 型胶原后, 检测小鼠关节肿胀程度评分, 记录小鼠关节评分 3 次/周. 0 分: 无红斑、肿胀; 1 分: 跗骨或者踝关节, 单一部位的轻微红斑、肿胀; 2 分: 踝关节延伸至跗骨的轻度红斑、肿胀; 3 分: 踝关节蔓延至跗骨的中度红斑、肿胀; 4 分: 踝关节蔓延至跗骨的严重红斑、肿胀, 关节僵直、畸形.

1.3 检测关节滑膜病理组织学改变

2 次免疫 4 周后, 处死小鼠, 取小鼠右后肢膝关节, 保持小鼠的膝关节完整性, 放置于 4% 福尔马林中, 24 h 后转移至 70% 酒精, 脱钙处理, 石蜡包埋, 常规切片、HE 染色.

1.4 脾淋巴细胞分离制备

取小鼠脾脏, 剪碎标本, 研磨过 200 目滤网, 制备单细胞悬液, 500 g 离心 5 min, 弃上清. 裂解红细胞, 离心, 弃上清. 用 10% FCS 的 RPMI-1640 培养液洗涤细胞, 计数淋巴细胞, 调节浓度至 $2 \times 10^6/\text{mL}$. 佛波醇乙酯 2.5 μL (终质量浓度 50 ng/mL) 和离子霉素 2 μL (终质量浓度 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 刺激细胞 4 h, 加入布雷非德菌素 A 阻断剂 2 μL (终质量浓度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 2 h 后观察细胞形态.

1.5 Th17 细胞的流式细胞仪检测

收集细胞, 洗涤细胞. 标记脾脏淋巴细胞表面分子 CD4, 加入 FITC-CD4 单抗, 对照组加入 FITC-同型对照单抗. 避光孵育 20 min. 固定、破膜, 避光孵育 15 min. 破膜剂洗涤细胞 2 次, 加入 PE-IL17A 单抗, 对照组加入 PE-同型对照单抗, 避光孵育 30 min. 洗涤、重悬细胞. 上机分析.

1.6 Treg 细胞的流式细胞仪检测

收集细胞, 洗涤细胞. 标记脾脏淋巴细胞表面分子 CD4, CD25, 加入 FITC-CD4 单抗、APC-CD25 单抗, 对照组加入 FITC-同型对照单抗、APC-同型对照单抗. 避光孵育 20 min. 固定、破膜, 避光孵育 15 min. 加入 PE-Foxp3 单抗, 对照组加入 PE-同型对照单抗, 避光孵育 30 min. 洗涤、重悬细胞. 上机分析.

1.7 统计学方法

运用 SPSS 13.0 软件分析数据, 结果以 $\pm S$ 表示, 两组间均值比较采用独立样本 t 检验, $p < 0.05$ 为差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 柳氮磺胺吡啶对 CIA 小鼠关节炎评分的影响

安慰剂对照组 DBA1 小鼠在初次免疫后 27 d 关节炎发病; SSZ 治疗组小鼠在初次免疫后 29 d 关节炎发病, 发病晚于安慰剂对照组. 初次免疫后的第 31 天 SSZ 治疗组评分 (2.33 ± 0.76) 显著低于安慰剂组 (7.0 ± 1.83) ($p < 0.05$, $t = 2.36$) (图 1). 初次免疫第 31 天后关节炎评分均低于安慰剂对照组 ($p < 0.05$).

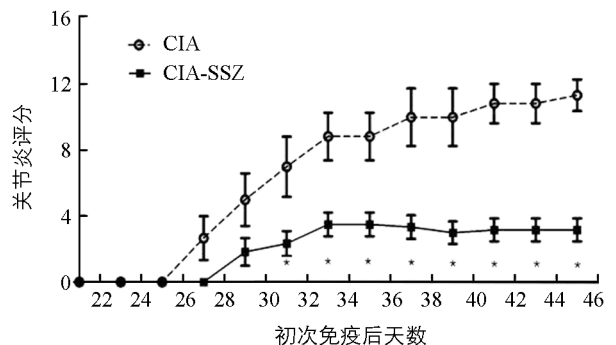
2.2 柳氮磺胺吡啶对 CIA 小鼠关节滑膜的保护作用

观察小鼠关节炎疾病程度, 安慰剂对照组 (图 2A) 小鼠关节肿胀程度高于 SSZ 治疗组 (图 2B).

进一步分析 CIA 小鼠关节组织病理切片, 结果发现安慰剂对照组关节面粗糙, 单核细胞浸润, 关节软骨损伤 (图 3A, 箭头所示), SSZ 治疗组 (图 3B), 正常对照组未见单核细胞浸润 (图 3C).

2.3 柳氮磺胺吡啶对胶原诱导关节炎小鼠 Th17 和 Treg 细胞的影响

流式细胞检测实验发现柳氮磺胺吡啶早期干预组, CIA 小鼠脾脏 Th17 含量低于安慰剂对照组, Treg 含量高于安慰剂对照组 (图 4A). 在正常对照组中, 小鼠脾脏 Th17 比例为 $0.12\% \pm 0.01\%$; 胶原诱导关节炎导致小鼠脾脏中 Th17 比例显著增加, 达到 $0.34\% \pm 0.38\%$ ($p < 0.05$); SSZ 治疗组 Th17



柳氮磺胺吡啶对 CIA 小鼠的治疗作用, DBA1 小鼠从初次免疫后 21 d 开始接受 SSZ 治疗, 每周 0.20 g/kg, 结果为 mean \pm SEM, * $p < 0.05$ 与 CIA-PBS 组比较.

图 1 关节炎小鼠临床评分

比例为 $0.21\% \pm 0.02\%$, 显著低于安慰剂对照组 $0.34\% \pm 0.38\%$ ($p < 0.05$) (图 4B). SSZ 治疗组小鼠脾脏 Treg 细胞比例为 $7.68\% \pm 0.60\%$, 显著高于安慰剂对照组 $5.19\% \pm 0.47\%$, 正常对照组 $4.02\% \pm 0.56\%$ ($p < 0.05$) (图 4C).



图 2 关节炎小鼠肿胀程度

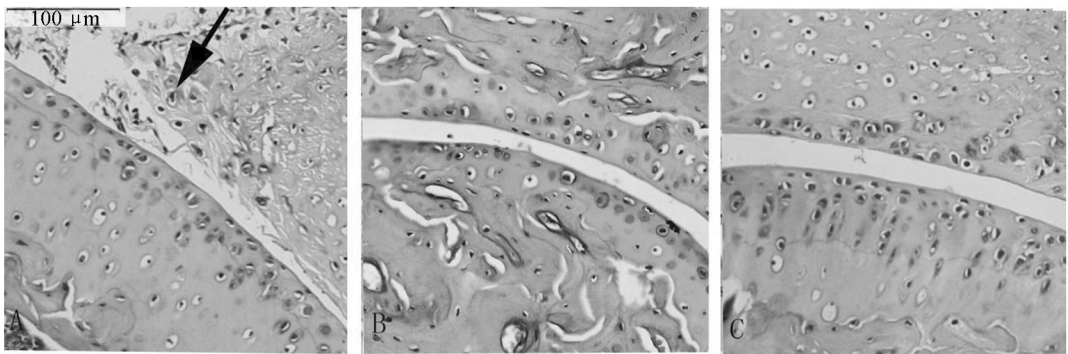


图 3 小鼠关节滑膜组织病理

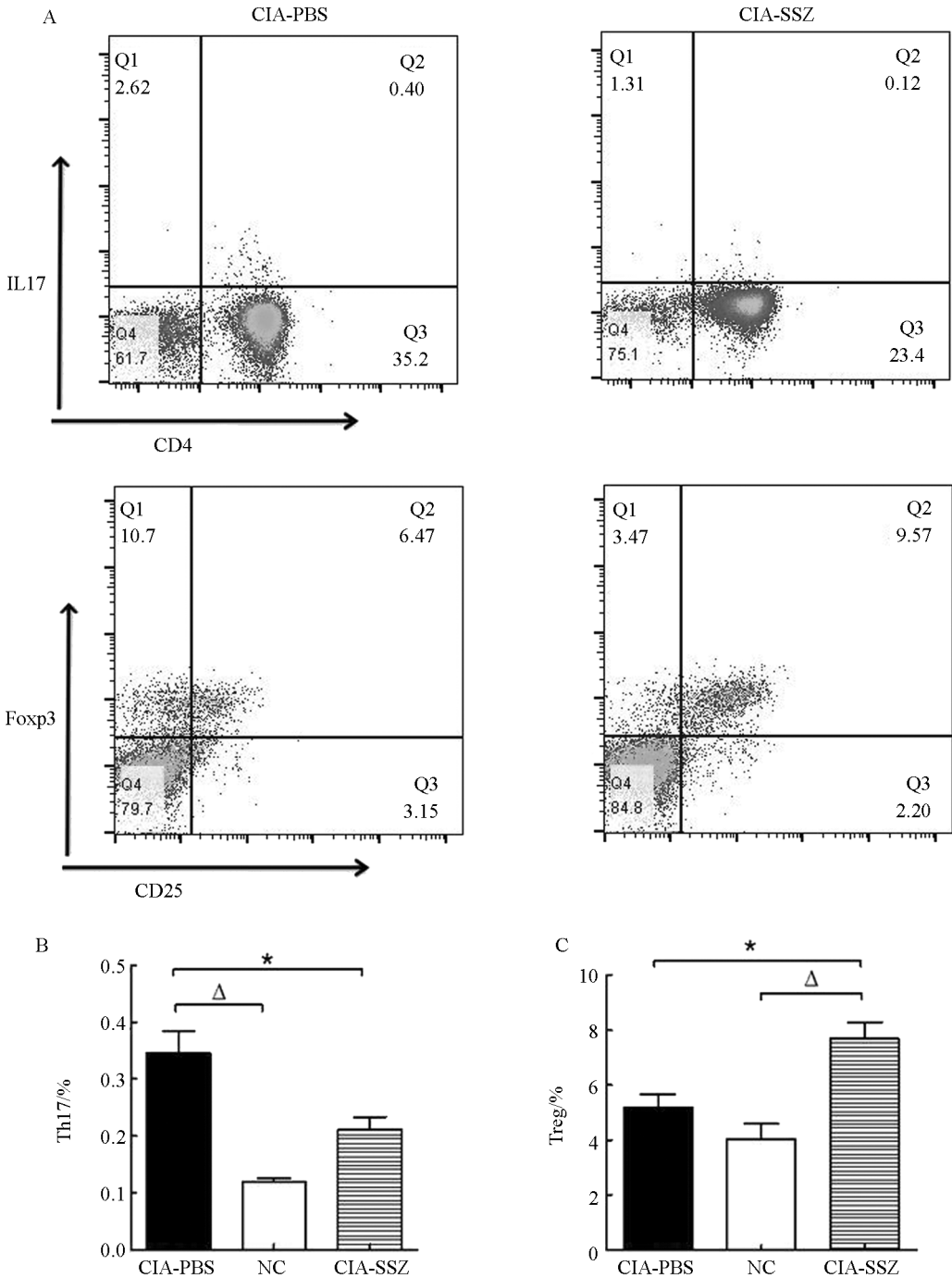
3 讨论

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性疾病,以自身免疫异常和滑膜炎为特征,因其疾病危害严重、致残率高,严重影响患者的生活质量.临床上针对类风湿性关节炎的推荐治疗方案主要是采用改变病情的抗风湿药延缓疾病进程,但因药物(例如甲氨蝶呤、来氟米特)具有较强的副作用,部分患者无法耐受.柳氮磺胺吡啶(sulphasalazine, SSZ)作为改变病情的抗风湿药,具有毒性小,起效快的优点,被广泛应用于临床治疗.

RA 发病主要部位在滑膜,患者滑膜组织中含有大量的单核细胞,30%~50%为 T 细胞,CD4+T 细胞浸润尤为重要.近年来人们发现了 CD4+T 细胞中除 Th1/Th2 细胞亚群外,还存在两种新亚群 Treg 细胞和 Th17 细胞. Th17 细胞主要分泌 IL17,协同 TNF- α 等细胞因子加重炎症; Th17 分泌的促炎因子 IL17,可使 RA 患者滑膜细胞活化,分泌基质金属蛋白酶,导致软骨和骨损伤^[5]. Treg 细胞释放 IL-10,可抑制 T 细胞及抗原呈递细胞的功能,降低炎性细胞因子的产生等^[6]. Th17 的促炎作用和 Treg 的抑炎作用以及 Th17/Treg 平衡与 RA 的密切关系越来越受到研究者的重视,与类风湿关节炎病的发生发展密切相关^[7].

在本研究中,课题组构建 CIA 小鼠模拟 RA 发病,关节炎发病早期运用柳氮磺胺吡啶片干预,能够显著减轻 CIA 小鼠胶原关节炎的临床评分.有研究证实 SSZ 具有多种抗炎作用,它能抑制 T 细胞活化, NK 细胞活性,减少 IL-2, IFN- γ , TNF- α 等细胞因子分泌^[8].在胶原免疫后第 21 天,关节炎发病早期,开始应用 SSZ 干预疾病进程,关注 SSZ 调控 Th17/Treg 细胞平衡的作用.本研究发现早期应用 SSZ 能显著减轻小鼠关节炎症状,降低脾脏 Th17 比例,并且增加 Treg 细胞比例.有研究表明在关节炎动物模型

中, 清除 Treg 细胞后, 关节炎症状加重; 将 Treg 细胞重新回输, 关节炎症状减轻, 增强 CIA 小鼠 Treg 的功能, 从而抑制关节症状的加重^[9]. 早期服用柳氮磺胺吡啶, CIA 小鼠 Th17 细胞的水平下降, Treg 细胞的水平上升, 小鼠关节炎发病程度减轻. 说明早期运用柳氮磺胺吡啶可预防关节炎发展, 延缓病情进展, 疾病预后良好.



*, $p < 0.05$, 与 CIA-PBS 比有统计学意义; Δ , $p < 0.05$, 与 NC(Normal Control)比有统计学意义.

图 4 柳氮磺胺吡啶对 CIA 小鼠脾脏 Th17/Treg 细胞的影响

RA 确切发病机制尚不明确, 而且没有根治方案, 严重影响患者生活质量. 近年来研究发现 Th17/Treg 细胞与 RA 病程进展密切相关. 研究柳氮磺胺吡啶对调节 Th17/Treg 平衡在治疗 RA 中的作用, 为临床早期运用柳氮磺胺吡啶干预 RA 发病提供依据. 因此, 早期运用药物预防及治疗 RA, 干预疾病进展有重要的研究意义.

参考文献:

- [1] ALAMANOS Y, DROSOS A A. Epidemiology of Adult Rheumatoid Arthritis [J]. *Autoimmunity Reviews*, 2005, 4(3): 130–136.
- [2] MIOSSEC P, KOLLS J K. Targeting IL-17 and TH17 Cells in Chronic Inflammation [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2012, 11(10): 763–776.
- [3] O'DELL J R, HAIRE C E, ERIKSON N, et al. Treatment of Rheumatoid Arthritis with Methotrexate Alone, Sulfasalazine and Hydroxychloroquine, or a Combination of All Three Medications [J]. *N Engl J Med*, 1996, 334(20): 1287–1291.
- [4] DOROZYNSKA I, MAJEWSKA-SZCZEPANIK M, MARCINSKA K, et al. Partial Depletion of Natural Gut Flora by Antibiotic Aggravates Collagen Induced Arthritis (CIA) in Mice [J]. *Pharmacological Reports*, 2014, 66(2): 250–255.
- [5] METAWI S A, ABBAS D, KAMAL M M, et al. Serum and Synovial Fluid Levels of Interleukin-17 in Correlation with Disease Activity in Patients with RA [J]. *Clinical Rheumatology*, 2011, 30(9): 1201–1207.
- [6] WANG W, SHAO S, JIAO Z, et al. The Th17/Treg Imbalance and Cytokine Environment in Peripheral Blood of Patients with Rheumatoid Arthritis [J]. *Rheumatology International*, 2012, 32(4): 887–893.
- [7] BETTELLI E, CARRIER Y, GAO W, et al. Reciprocal Developmental Pathways for the Generation of Pathogenic Effector TH17 and Regulatory T Cells [J]. *Nature*, 2006, 441(7090): 235–238.
- [8] OH J S, KIM Y G, LEE S G, et al. The Effect of Various Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs on the Suppressive Function of CD4(+) CD25(+) Regulatory T Cells [J]. *Rheumatology International*, 2013, 33(2): 381–388.
- [9] GONZALEZ-REY E, FERNANDEZ-MARTIN A, CHORNY A, et al. Vasoactive Intestinal Peptide Induces CD4+, CD25+ T Regulatory Cells with Therapeutic Effect in Collagen-Induced Arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(3): 864–876.

Modulating Effects of Sulphasalazine on The Balance of Th17/Treg Cells in Collagen Induced Arthritis

TANG Jun, DING Song-tao, QING Qi-zhong,
LIU Li, PENG Hui-ming, LIU Han-deng

Experimental Teaching Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: The aim is to evaluate the effect and mechanism of sulphasalazine (SSZ) in murine model of collagen-induced arthritis (CIA) on modulating the balance of Th17/Treg cells by establishing the CIA model. After 21 days, DBA1 mice were divided into CIA and CIA + SSZ group. The severity of arthritis joint was assessed by using arthritis score. The numbers of Th17 cells and CD4 + CD25 + Foxp3+ Tregs were determined by flow cytometry. In comparison with CIA group, CIA + SSZ group reduced the disease severity obviously ($p < 0.05$). Sulphasalazine reduced Th17 cells ($p < 0.05$). In addition, SSZ has effect on Treg cells' number. These results indicate that SSZ effect on the balance of Th17/Treg through suppressing Th17 cells, and stimulating Treg cells. Sulphasalazine may act as a potential immunomodulator for the treatment of rheumatoid arthritis (RA).

Key words: Rheumatoid Arthritis; Sulphasalazine; Th17 cells; Treg cells; Collagen-induced Arthritis

