



全蝎蜈蚣对 CIA 大鼠外周血和小肠黏膜 T 细胞亚群的影响

程绍民¹, 赵海梅², 左志琴², 王艳辉³, 王跃生⁴, 刘端勇^{2*}

(1. 江西中医学院 基础医学院, 江西 南昌 330004; 2. 江西中医学院 科技学院, 江西 南昌 330025;
3. 南昌大学 抚州医学分院, 江西 抚州 334000;
4. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006)

[摘要] 目的:观察全蝎蜈蚣对 CIA 大鼠外周血和小肠黏膜 T 细胞亚群的影响。方法:60 只 Wistar 大鼠除正常组外均复制胶原免疫性关节炎后,并随机分成模型组、全蝎蜈蚣高、中、低剂量组和Ⅱ型胶原蛋白治疗组,给药 40 d,采用流式细胞术检测大鼠外周血和小肠黏膜 T 细胞亚群水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠外周血和 PP 结 T 淋巴细胞均表现为 CD4⁺T 细胞明显升高或有升高趋势,CD4⁺/CD8⁺ 则在外周血升高而在 PP 结下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较,所有治疗组对 CD3⁺T 淋巴细胞作用不明显,全蝎蜈蚣各剂量组均可明显下调 PP 结 CD4⁺,CD8⁺T 细胞水平,升高 CD4⁺/CD8⁺ 水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),同时外周血方面高、中剂量组 CD4⁺T 淋巴细胞水平及 CD4⁺/CD8⁺ 显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但对 CD8⁺T 淋巴细胞作用不明显。结论:全蝎蜈蚣治疗类风湿性关节炎的可能途径是调节 CIA 大鼠外周血和肠黏膜局部 T 淋巴细胞平衡。

[关键词] 类风湿性关节炎;全蝎;蜈蚣;T 细胞亚群

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是以关节滑膜炎性改变为主要病理变化的一种自身免疫性疾病,其发病机制目前尚不十分清楚,大量的研究发现,在关节滑膜、关节滑液、肠黏膜中出现异常增多的免疫细胞,提示这些细胞可能是参与类风湿性关节炎发病的重要物质之一^[1]。全蝎蜈蚣外达经络,又内走筋骨,能祛风除湿、逐瘀定痛,是类风湿性关节炎治疗过程中使用频率最高的经典药对之一^[2],但作用机制和靶点不清楚,本实验拟通过观察二者配伍对外周血和肠黏膜 CD3⁺,CD4⁺,CD8⁺T 淋巴细胞水平变化,探索其治疗类风湿性关节炎的可能作用机制或靶点。

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar 大白鼠 60 只,雌性,体重(160 ± 20) g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,合

格证号 SCXK(沪)2008-0016。清洁级动物房饲养,适应性喂养 1 周后开始试验。全蝎蜈蚣,购于江西黄庆仁华氏大药房,全蝎产于山东沂蒙,蜈蚣产于陕西,取等份全蝎、蜈蚣机械粉碎后加适量生理盐水混匀,制备混悬液,4℃下保存备用。牛 CⅡ醋酸溶液(编号 2002-2),CⅡ冻干粉(编号 2002-1)及不完全弗氏佐剂均购于 Chondrex 公司。FITC-anti-CD3mAb(IgG3),APC-anti-CD4mAb(IgG2a),PE-anti-CD4mAb(IgG2a),PE-anti-CD8amAb(IgG1)均购于 eBioscience 公司,红细胞裂解液 pharmlyse™,LD5-2A 离心机及 FACSCalibur 型流式细胞仪均为美国 BD 公司产品。

1.2 大鼠 CIA 模型的建立 参照文献[3]的报道并适当改进,将液态 CⅡ与等量完全弗氏佐剂混合(CⅡ的终浓度为 1 g·L⁻¹)。用高速搅拌仪在冰浴状态下混匀,直至混合物完全、充分乳化(以乳化液滴入水中不松散为度)。取乳化后的混合物于大鼠尾根皮下注射,0.1 mL/只,注射后第 7 天,以相同剂量、相同部位再次免疫,即造模成功。

1.3 分组及给药 将雌性 Wistar 大鼠 60 只随机分为 6 组,即正常对照组、模型组、全蝎蜈蚣高、中、低剂量组和Ⅱ型胶原蛋白治疗组(CⅡ组)。于第 8 天,参考药典中各药研末人体口服剂量(全蝎蜈蚣取等量),按

[稿件编号] 20100926017

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30860377);江西省自然科学基金项目(2009GZY0118);江西省卫生厅科技计划项目(200920520,20092052)

[通信作者] *刘端勇,副教授,主要从事自身免疫性疾病及免疫药理研究,E-mail: liuduanyong@163.com

[作者简介] 程绍民,副教授,博士,主要从事方证规律的现代研究,E-mail: chengshaomin@189.com



体重换算,全蝎蜈蚣高、中、低剂量组分别给予全蝎蜈蚣混悬液 0.4, 0.2, 0.1 g · kg⁻¹、CII组予II型胶原蛋白冻干粉 60 μg · kg⁻¹灌胃;正常组和模型组分别用等容积生理盐水灌胃,连续给药 40 d。

1.4 流式细胞术双色荧光法检测 CIA 大鼠肠道 PP 结淋巴细胞亚群 用眼科弯剪剪下派伊尔淋巴结 (peyer's patch, PP),置于盛有 D-Hank's 液的平皿中,4 °C 备用。用机械挤压的方式从剪下的 PP 结中分离出淋巴细胞,用 300 目的尼龙网过滤,用 D-Hank's 将其过滤液细胞调整为 1 × 10⁶ 个/μL,分别取细胞悬液 100 μL 与 CD3 (0.5 μg)/CD4 单克隆抗体 (0.25 μg) 和 CD3 (0.5 μg)/CD8 单克隆抗体 (0.125 μg) 的离心管中震匀,4 °C 下孵育 30 min;加入适量生理盐水,以 1 000 r · min⁻¹ 离心 1.5 min,反复几次,弃其上清,加生理盐水恢复体积至 500 μL,过滤后上流式细胞仪检测。

1.5 流式细胞术三色荧光法检测 CIA 大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群 各组大鼠眼球取血,EDTA 抗凝收

集,分别取血 100 μL 加入到含有 0.25 μg APC-anti-CD4mAb, 0.5 μg FITC-anti-CD3mAb 和 0.5 μg PE-anti-CD8amAb 的离心管中震匀,于 4 °C 下保存 30 min。加入适量红细胞溶解液,以 1 000 r · min⁻¹ 离心 1.5 min,弃上清。加入适量生理盐水同上进行离心,反复几次,以试管底部不见红色为度,过滤后用流式细胞仪进行检测。

1.6 统计学分析 检测结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CIA 大鼠肠道 PP 结淋巴细胞亚群表达水平 与正常组比较,模型组大鼠肠道 PP 结淋巴细胞中 CD3⁺T 淋巴细胞数量明显下降 (*P* < 0.05),而 CD4⁺T 细胞仅有上升趋势,CD8⁺T 细胞仅有下降趋势,不过二者比值 (CD4⁺/CD8⁺) 则显著下降 (*P* < 0.01)。与模型组比较,各治疗组对 CD3⁺T 淋巴细胞作用不明显,均可明显下调 CD4⁺, CD8⁺T 细胞水平,升高 CD4⁺/CD8⁺ 水平 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01),见表 1。

表 1 CIA 大鼠肠道 PP 结淋巴细胞亚群表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g · kg ⁻¹	CD3 ⁺ /%	CD4 ⁺ /%	CD8 ⁺ /%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
正常	-	90.4 ± 7.22	80.7 ± 9.04	89.7 ± 8.30	0.9 ± 0.06
模型	-	68.6 ± 23.93 ¹⁾	83.7 ± 13.69	80.2 ± 11.66	0.7 ± 0.11 ²⁾
全蝎蜈蚣	0.4	62.1 ± 20.44	34.5 ± 10.80 ⁴⁾	52.4 ± 13.92 ⁴⁾	0.9 ± 0.13 ⁴⁾
	0.2	59.5 ± 20.15	43.0 ± 16.32 ⁴⁾	45.8 ± 4.60 ⁴⁾	0.9 ± 0.10 ⁴⁾
	0.1	54.8 ± 21.11	43.3 ± 25.14 ⁴⁾	41.5 ± 12.41 ⁴⁾	1.0 ± 0.27 ⁴⁾
C II	60	72.7 ± 15.56	53.1 ± 9.99 ⁴⁾	54.5 ± 19.26 ³⁾	1.1 ± 0.15 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01;与模型组比较³⁾ *P* < 0.05, ⁴⁾ *P* < 0.01; C II 组剂量单位为 μg · kg⁻¹ (表 2 同)。

2.2 CIA 大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群表达水平 与正常组比较,模型组大鼠外周血 T 淋巴细胞中 CD4⁺, CD8⁺T 淋巴细胞数量以及 CD4⁺/CD8⁺ 均明显升高 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01),与模型组比较,高、

中剂量组 CD4⁺T 淋巴细胞水平及 CD4⁺/CD8⁺ 显著下降 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01),但对 CD8⁺T 淋巴细胞作用不明显,见表 2。

3 讨论

表 2 CIA 大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g · kg ⁻¹	CD3 ⁺ /%	CD4 ⁺ /%	CD8 ⁺ /%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
正常	-	33.9 ± 5.56	36.3 ± 5.15	23.6 ± 3.47	1.5 ± 0.17
模型	-	38.7 ± 5.79	46.4 ± 6.93 ²⁾	40.5 ± 18.66 ¹⁾	1.9 ± 0.21 ¹⁾
全蝎蜈蚣	0.4	42.1 ± 8.08	34.4 ± 7.80 ⁴⁾	53.4 ± 7.17	1.5 ± 0.24 ³⁾
	0.2	44.3 ± 5.96	38.9 ± 4.24 ³⁾	54.1 ± 4.52	1.6 ± 0.23 ³⁾
	0.1	40.6 ± 4.28	53.5 ± 10.18	39.4 ± 8.00	2.3 ± 0.41
C II	60	40.2 ± 6.33	51.0 ± 3.98	19.0 ± 2.48 ³⁾	1.2 ± 0.38 ³⁾

类风湿关节炎是一种以 T 细胞介导异常免疫应答为主要特征的关节炎,尤其是作为具有引起、

控制和驱动免疫应答的基本价值的 CD4⁺T 淋巴细胞在 RA 的发病过程中发挥了重要作用^[4]。而



CD8⁺T 细胞会产生高水平的 TNF 等细胞因子,加剧病理性免疫应答的反应,直接或间接造成靶细胞的破坏,引起持续性炎症反应,但也有研究表明 CD8⁺T 细胞不但没有引起 CIA 的能力,相反可能对自身免疫炎症有保护作用^[5]。而肠黏膜免疫系统作为机体最大的免疫系统,是人体免疫防疫的第一道防线,PP 结是抗原进入肠组织并与免疫系统接触产生初级免疫反应的部位,属于黏膜免疫中主要的诱导部位,对黏膜免疫耐受和自身免疫应答反应的建立都起着初始诱导的关键性作用。有研究表明^[1],在胶原免疫性关节炎大鼠 PP 结中 CD4⁺T 淋巴细胞数量占优势,与本实验的结果相似,模型组大鼠无论外周血还是小肠 PP 结 T 淋巴细胞中,均表现为 CD4⁺T 淋巴细胞数量升高,但 CD4⁺/CD8⁺ 在外周血升高而在小肠 PP 结中下降,而 CD8⁺T 淋巴细胞则在外周血和 PP 结相反,总体而言作者复制的 CIA 大鼠模型在外周血和小肠黏膜均存在 CD4⁺T 淋巴细胞活化或有活化趋势,而全蝎蜈蚣在一定剂量下可降低 CD4⁺T 淋巴细胞数量水平,在外周血可降低 CD4⁺/CD8⁺,而在小肠 PP 结则可升高 CD4⁺/

CD8⁺,从而抑制 CD4⁺T 淋巴细胞活化,减少 Th1 型炎症因子的表达,促进外周细胞免疫和肠黏膜免疫维持平衡状态,从而缓解炎症反应,达到治疗目的。当然,全蝎蜈蚣治疗类风湿性关节炎的作用机制不可能仅仅如此,其使得肠黏膜免疫恢复到免疫抑制下的平衡状态,其作用类似于建立口服免疫耐受,但就其路径和机制仍然值得进一步探索。

[参考文献]

- [1] 肖诚,周静,贾红伟,等. 雷公藤多甙对大鼠胶原免疫性关节炎黏膜免疫的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2005,11(7):499.
- [2] 刘端勇,李家荣,赵海梅. 等. 虫类中药治疗类风湿性关节炎的辩证用药思路[J]. 新中医, 2009,41(12):92.
- [3] Hua Zhou, Yuen Fan Wong, Jue Wang, et al. Sinomenine ameliorates arthritis via MMPs, TIMPs, and cytokines in rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008,376: 352.
- [4] 张楠,高芳莹. 类风湿关节炎与免疫应答系统及其相关因子[J]. 中国临床康复, 2005,9(27):144.
- [5] Taneja V, Taneja N, Paisansinsup T, et al. CD4 and CD8 T cells in susceptibility / protection to collagen induced arthritis in HLA-DQ8-transgenic mice: implications for rheumatoid arthritis[J]. J Immunol, 2002,168: 5867.

Effect of oral scorpio and scolopendra powder on T-cell subsets in peripheral blood and intestine from rats with collagen induced arthritis

CHENG Shaomin¹, ZHAO Haimei², ZUO Zhiqin², WANG Yanhui³, WANG Yuesheng⁴, LIU Duanyong^{2*}

- (1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, College of Basic Medicine, Nanchang 330006, China;
2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Science and Technology College, Nanchang 330025, China;
3. Fuzhou Medical College of Nanchang University, Fuzhou 334000, China;
4. National Pharmaceutical Engineering Research Center, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To observe effect of oral scorpio and scolopendra powder on T-cell subsets in peripheral blood and intestine from rats with collagen induced arthritis (CIA). **Method:** 60 rats were randomly divided into 6 groups: normal control group, model control group, low-dose scorpio and scolopendra group, middle-dose scorpio and scolopendra group, high-dose scorpio and scolopendra group, and type II collagen group. Rat's rheumatoid arthritis was induced by collagen II (C II). Level of T-cell subsets from peripheral blood and intestine was measured by flow cytometry. **Result:** CD4⁺T cellular level was obviously increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) or kept increased tendency in peripheral blood and intestine from the model group compared with that of the normal group, while the ratio of CD4⁺/CD8⁺ in intestine was obviously descent but the contrary in peripheral blood ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). CD4⁺, CD8⁺T cellular level in intestine were obviously descent and the ratio of CD4⁺/CD8⁺ increased in all treated groups when compared with in the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). However, CD4⁺T cellular level and the ratio of CD4⁺/CD8⁺ in peripheral blood were remarkably decreased. **Conclusion:** The mechanism that scorpio and scolopendra could treat rat's rheumatoid arthritis may be regulating balance of T-lymphocyte subsets in peripheral blood and intestine.

[Key word] rheumatoid arthritis; scorpio; scolopendra; T-cell subsets