

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.23.009

## 重组 hIL-10 联合威灵仙总皂苷对 AA 大鼠关节影像的影响及机制\*

王斌<sup>1</sup>, 张燕<sup>2△</sup>, 金苏华<sup>3</sup>, 珍妮<sup>3</sup>

(内蒙古林业总医院:1. 医学影像科;2. 眼科;3. 医学影像科核磁共振室, 内蒙古牙克石 022150)

**[摘要]** **目的** 分析重组 hIL-10 联合威灵仙总皂苷对佐剂性关节炎大鼠(AA 大鼠)关节影像学表现的影像及其影响的机制。**方法** 将 150 只大鼠分为空白组、对照组、观察组 1、观察组 2、观察组 3。空白组不接受任何干预。对照组仅接受关节炎模型建立干预。3 个观察组大鼠除接受佐剂型关节炎模型建立干预外,分别接受威灵仙总皂苷治疗,重组 hIL-10 治疗和重组 hIL-10 联合威灵仙总皂苷治疗。于实验第 0、15、35 天分别行 X 线检查关节间隙和关节评分;35 d 后处死大鼠,取动脉血检测其淋巴细胞和血清炎症因子。**结果** 实验 15 d 后对照组和 3 个观察组骨侵蚀关节侵蚀评分显著高于空白组,关节间隙显著减小( $P < 0.05$ );实验 35 d 后观察组小鼠骨侵蚀关节侵蚀评分显著低于对照组,关节间隙显著大于对照组( $P < 0.05$ )。观察组 3  $CD4^+$  T 细胞、 $CD4^+/CD8^+$ 、IL-17A、IL-6 和 TNF- $\alpha$  显著低于对照组和观察组 1、2( $P < 0.05$ )。**结论** 重组 hIL-10 联合威灵仙总皂苷可以通过调节免疫有效保护 AA 大鼠关节。

**[关键词]** 重组 hIL-10;威灵仙总皂苷;AA 大鼠;影像学变化**[中图分类号]** R593.22**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)23-3035-04

## Effect and mechanism of recombinant hIL-10 combined with bauhinia championii benth flavones on the imaging findings of AA rats\*

WANG Bin<sup>1</sup>, ZHANG Yan<sup>2△</sup>, JIN Suhua<sup>3</sup>, ZHEN Ni<sup>3</sup>

(1. Department of Medical Imaging; 2. Department of Ophthalmology; 3. Department of Medical Imaging MRI Room, Inner Mongolia Forestry General Hospital, Yakeshi, Inner Mongolia 022150, China)

**[Abstract]** **Objective** To analyze the effect and mechanism of recombinant hIL-10 combined with bauhinia championii benth flavones on the imaging findings of adjuvant arthritis (AA) rats. **Methods** A total of 150 rats were divided into the blank group, the control group, the first observation group, the second observation group, the third observation group. The blank group did not receive any intervention. The control group only received AA model establishment intervention. In addition to the intervention of the AA model, the three observation groups respectively accepted the treatment of bauhinia championii benth flavones, recombinant hIL-10 and recombinant hIL-10 combined with bauhinia championii benth flavones. In the zeroth, 15th, 35th days of the experiment, the rats were underwent X-ray examination of joint space and joint score, and they were executed in the 35th day, the lymphocyte and serum inflammatory factors were detected from the arterial blood. **Results** After 15 d, the bone erosion scores of the control group and the three observation groups were significantly higher than that of the blank group, and the joint space decreased significantly ( $P < 0.05$ ). After 35 d, the bone erosion scores in the observation groups were significantly lower than that of the control group, and the joint space was significantly greater than that of the control group ( $P < 0.05$ ). The levels of  $CD4^+$  T cells,  $CD4^+/CD8^+$ , IL-17A, IL-6 and TNF- $\alpha$  in the third observation group were significantly lower than those in the control group and the first, second observation group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Recombinant hIL-10 combined with bauhinia championii benth flavones can effectively protect the joints of AA rats by regulating the immune system.

**[Key words]** recombinant hIL-10; bauhinia championii benth flavones; AA rat; imaging examination

类风湿性关节炎是一种以骨关节损伤为主要表现的疾病。佐剂性关节炎大鼠(AA 大鼠)是目前较为

公认的一种该病模型<sup>[1]</sup>。类风湿性关节炎存在难以治愈,疾病进展无法逆转的特点,因此找到一种能有效延缓疾病进展甚至治疗该病的治疗方法十分重要<sup>[2]</sup>。威灵仙总皂苷是一种从传统抗风湿药物威灵仙中提取出来的有效成分,有研究显示其对于 AA 大鼠的关节存在保护作用<sup>[3]</sup>。hIL-10 也常常被应用于 AA 大鼠的研究中,很多研究提示其也对于 AA 大鼠骨关节保护和免疫调节存在比较好的效果<sup>[4-5]</sup>,但是少见将上述两种药物联合用于干预 AA 大鼠的报道,因此本研究正是基于此而进行的,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验对象处理方法

150 只 SPF 级雄性大鼠分为空白组、对照组、观察组 1、观察组 2、观察组 3,每个小组 30 只。所有大鼠在入组前首先适应性饲养 5 d,不计入实验时间。适应性饲养完成后开始计算实验时间。空白组大鼠不接受任何处理。对照组和 3 个观察组先接受造模干预。具体方法为:(1)80 °C 灭活卡介苗,然后加入弗氏完全佐剂 10 mg/mL,作为造模药品。(2)将上述药品 1 mL 用皮下注射的方式注入大鼠左前足底,加强免疫后 15 d 造模成功。造模结束后对照组大鼠不接受其他干预。观察组 1:从第 15 天开始接受 200 mg 威灵仙总皂苷灌胃治疗,每天 1 次<sup>[6]</sup>。观察组 2:从第 15 天开始接受腹腔注射 hIL-10 剂量为 5 μg/kg<sup>[7]</sup>。观察组 3:从第 15 天开始接受腹腔注射剂量为 5 μg/kg hIL-10 联合 200 mg 威灵仙总皂苷灌胃治疗。

### 1.2 各项指标检测方法

#### 1.2.1 大鼠关节影像学评分方法

各组大鼠在实验开始当天,第 15 天和第 35 天分别接受左前足 X 线摄片检查,具体方法为:乳腺铅靶机(意大利吉特乳腺高频 X 线摄影仪)25 kV,1.0 s,4 mA。骨侵蚀评分如下,0 分:正常骨质;1 分:仅有 1 处微小病灶,或疑似存在病灶;2 分:存在两个病灶或病灶总和大于 50%;3 分:存在 3 个或以上病灶,或病灶面积总和大于等于 50%;4 分:整个关节面完全破坏或出现骨萎缩。骨关节间隙评分方法如下,0 分:关节间隙正常;1 分:关节

间隙出现异常狭窄,比正常关节间隙变窄 25%~50%;2 分:关节间隙出现异常狭窄,比正常关节间隙变窄超过 50%;3 分:关节间隙消失或关节强直<sup>[9]</sup>。

#### 1.2.2 大鼠关节间隙宽度检测方法

各组大鼠在实验开始当天,第 15 天和第 35 天按 1.2.1 条件分别接受左前足 X 线检查后直接测量大鼠关节间隙。在摄片后,取得大鼠关节片,然后使用分规测量大鼠右后膝关节中心处关节间隙。每次关节间隙测量必须由 3 位不同实验者重复进行。

#### 1.2.3 大鼠外周血淋巴细胞检测方法

各组大鼠被处死后,立即取大鼠外周血 200 μL,分为两管,每管 100 μL。第一管加入 EDTA 抗凝,然后加入抗大鼠 FITC-CD4 抗体 10 μL,PE-CD8 抗体 10 μL,震荡避光静置 30 min,加入溶血素 2 mL,10 min 后离心,弃上清液,加入 PBS 洗涤 1 次,最后加入多聚甲醛 10 滴重悬,流式细胞分析仪检测 CD4<sup>+</sup>T 细胞,CD8<sup>+</sup>T 细胞,最后比较 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>水平。

#### 1.2.4 大鼠外周炎症因子检测方法

各组大鼠被处死后,立即取大鼠外周血 100 μL,3 000 r/min 下离心 10 min,小心分离血清,按 ELISA 试剂盒(新博生物科技公司)使用说明分别检测 IL-17A、IL-6、TNF-α。反应终止后用酶标仪检测吸光度,根据标准曲线计算外周血中 IL-17A、IL-6 和 TNF-α 浓度。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件进行分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 *t* 检验,计数资料用率表示,组间采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠关节影像学评分

实验进行 35 d 以后,3 个观察组骨侵蚀、关节侵蚀评分均低于对照组 ( $P < 0.05$ )。观察组 3 骨侵蚀、关节侵蚀评分低于观察组 2 和观察组 1 ( $P < 0.05$ ),见表 1。

### 2.2 各组大鼠关节间隙宽度情况

实验进行第 35 天,3 组观察组大鼠关节间隙均宽于对照组。观察组 3 大鼠关节间隙大于观察组 1 和观察组 2 ( $P < 0.05$ )。观察组 1 大鼠关节间隙大于观察组 2 ( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 1 各组大鼠关节影像学评分( $\bar{x} \pm s, n=30, 分$ )

组别	0 d		15 d		35 d	
	骨侵蚀评分	关节侵蚀评分	骨侵蚀评分	关节侵蚀评分	骨侵蚀评分	关节侵蚀评分
对照组	0	0	3.88±0.10 <sup>a</sup>	2.85±0.15 <sup>a</sup>	3.89±0.10 <sup>a</sup>	2.92±0.06 <sup>a</sup>
空白组	0	0	0	0	0	0
观察组 1	0	0	3.82±0.13 <sup>a</sup>	2.83±0.12 <sup>a</sup>	2.53±0.25 <sup>adb</sup>	1.36±0.26 <sup>adb</sup>
观察组 2	0	0	3.84±0.14 <sup>a</sup>	2.87±0.10 <sup>a</sup>	3.16±0.35 <sup>abc</sup>	2.09±0.32 <sup>abc</sup>
观察组 3	0	0	3.87±0.11 <sup>a</sup>	2.81±0.12 <sup>a</sup>	1.35±0.20 <sup>abcd</sup>	0.80±0.12 <sup>abcd</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ,与空白组比较;<sup>b</sup>:  $P < 0.05$ ,与对照组比较;<sup>c</sup>:  $P < 0.05$ ,与观察组 1 比较;<sup>d</sup>:  $P < 0.05$ ,与观察组 2 比较

表 2 各组大鼠关节间隙宽度变化 (mm,  $\bar{x} \pm s, n=30$ )

组别	0 d	15 d	35 d
对照组	0.58±0.09	0.38±0.05 <sup>a</sup>	0.40±0.06 <sup>a</sup>
空白组	0.57±0.09	0.60±0.10	0.65±0.03
观察组 1	0.60±0.10	0.37±0.07 <sup>a</sup>	0.56±0.05 <sup>abd</sup>
观察组 2	0.59±0.10	0.38±0.09 <sup>a</sup>	0.50±0.09 <sup>abc</sup>
观察组 3	0.60±0.10	0.38±0.06 <sup>a</sup>	0.62±0.07 <sup>abcd</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与空白组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与观察组 1 比较; <sup>d</sup>:  $P < 0.05$ , 与观察组 2 比较

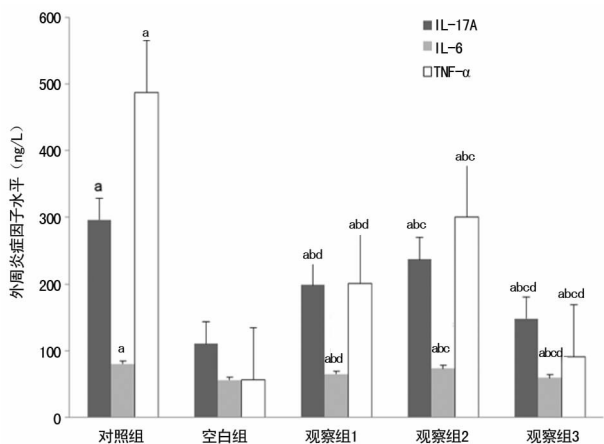
**2.3 各组大鼠外周血淋巴细胞情况** 观察组 3 CD4<sup>+</sup>T 细胞和 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 显著低于对照组、观察组 1、观察组 2。3 个观察组 CD8<sup>+</sup>T 细胞显著高于对照组和空白组, 见表 3。

表 3 各组大鼠外周血淋巴细胞变化情况 (% ,  $\bar{x} \pm s, n=30$ )

组别	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
对照组	48.32±5.32 <sup>a</sup>	19.20±1.56	2.45±0.35 <sup>a</sup>
空白组	27.02±2.63	19.26±1.01	1.31±0.04
观察组 1	39.25±1.25 <sup>abd</sup>	22.23±0.55 <sup>ab</sup>	1.76±0.22 <sup>abd</sup>
观察组 2	43.23±5.23 <sup>ab</sup>	22.25±1.01 <sup>ab</sup>	1.94±0.15 <sup>abc</sup>
观察组 3	30.59±2.36 <sup>abcd</sup>	23.25±1.23 <sup>ab</sup>	1.31±0.16 <sup>bcd</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与空白组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与观察组 1 比较; <sup>d</sup>:  $P < 0.05$ , 与观察组 2 比较

**2.4 各组大鼠外周血炎症因子情况** 空白组 IL-17A、IL-6、TNF- $\alpha$  低于对照组和 3 个观察组 ( $P < 0.05$ )。3 个观察组 IL-17A、IL-6、TNF- $\alpha$  均低于对照组 ( $P < 0.05$ )。上述指标观察组 3 低于观察组 1 ( $P < 0.05$ ), 观察组 1 低于观察组 2 ( $P < 0.05$ ), 见图 1。



<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与空白组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与观察组 1 比较; <sup>d</sup>:  $P < 0.05$ , 与观察组 2 比较

图 1 各组大鼠干预后外周血炎症因子水平情况

### 3 讨 论

类风湿性关节炎主要病理学特点为滑膜的慢性炎症和血管增生<sup>[10]</sup>。在疾病发生、发展的过程中,除了骨关节损伤外,伴随着较为严重的免疫失调<sup>[11-12]</sup>。

AA 大鼠是一种常见的用以模拟人类风湿性关节炎的动物模型,本研究以 AA 大鼠为研究对象,探讨重组 hIL-10 联合威灵仙总皂苷对患者骨关节的保护作用,和免疫细胞比例及炎症因子紊乱的改善作用。

本研究发现,重组 hIL-10 联合威灵仙总皂苷可以有效降低 AA 大鼠骨侵蚀评分和关节侵蚀评分。并且这种作用明显优于单用重组 hIL-10 和威灵仙总皂苷。这说明这两种药物在治疗类风湿性关节炎的时候存在着协同效应。为了进一步观察治疗方案对关节的保护作用本研究还测量了大鼠关节间隙,发现重组 hIL-10 联合威灵仙总皂苷也可以有效保护大鼠关节,防止大鼠关节强直维持正常的关节间隙。

本研究还检测了各组大鼠的外周血炎症因子和外周血淋巴细胞比例,随着疾病进展,AA 大鼠外周血 IL-17A、IL-6、TNF- $\alpha$  会显著升高,但是在使用了不同治疗方案后上述 3 种炎症因子均得到了不同程度的回落,尤其是使用重组 hIL-10 联合威灵仙总皂苷治疗的大鼠上述炎症因子回落尤其明显。这说明重组 hIL-10 联合威灵仙总皂苷可以有效地降低上述 3 种炎症因子。有研究提示 TNF- $\alpha$  抑制剂的使用可以有效地降低类风湿性关节炎患者的关节炎炎症情况,降低外周血类风湿因子的功能,延缓关节影像学进展<sup>[13]</sup>。也有文献支持 IL-10 可以有效降低可溶性 TNF 受体和 TNF- $\alpha$ <sup>[14]</sup>。IL-6 是与 RA 存在很多关联的多效细胞因子,可以介导 JAK/STAT3 通路导致类风湿性关节炎的发生<sup>[15]</sup>。IL-17A 是由 Th17 细胞分泌的一种促炎细胞因子可以促进滑膜炎<sup>[16]</sup>。重组 hIL-10 联合威灵仙总皂苷可以降低上述 3 种炎症因子,其改善 AA 大鼠关节影像学表现的重要机制之一。

本研究也发现 AA 大鼠相对于正常大鼠 CD4<sup>+</sup>T 细胞显著升高而 CD8<sup>+</sup>T 细胞数量未发生明显改变,因此 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 也显著升高。而经过治疗的 AA 大鼠 CD4<sup>+</sup>T 细胞显著下降,CD8<sup>+</sup>T 细胞显著升高,因此 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 也显著降低。接受重组 hIL-10 联合威灵仙总皂苷治疗的 AA 大鼠 CD4<sup>+</sup>T 细胞和 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 降低尤其明显。CD4<sup>+</sup>T 细胞可以有效刺激 B 细胞,导致自身抗体产生增加,从而导致抗原抗体复合物更多地沉积于滑膜,导致滑膜炎,而 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 也可以提示体内免疫状态,所以重组 hIL-10 联合威灵仙总皂苷可以有效地调理患者免疫状态<sup>[17-18]</sup>。

综上所述,重组 hIL-10 联合威灵仙总皂苷可以通过降低 AA 大鼠外周血促炎的炎症因子,降低 CD4<sup>+</sup>T 细胞调理 AA 大鼠免疫状态,从而改善 AA 大鼠关节影像学表现,可以进一步进行临床试验。

## 参考文献

- [1] 姜春霞. 宣痹汤对类风湿性关节炎模型小鼠的抗炎、镇痛机制研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2016.
- [2] 成满福, 刘晓艳. 类风湿性关节炎动物模型及中医病因病机研究概述[J]. 吉林中医药, 2015, 35(11): 1182-1184.
- [3] 高璠, 琚坚, 王伟, 等. 威灵仙总皂苷对实验性非酒精性脂肪性肝炎大鼠氧化应激的干预作用[J]. 世界华人消化杂志, 2016, 24(7): 1070-1075.
- [4] 潘建科, 罗斌, 郭达, 等. 龙螫胶囊对膝骨关节炎大鼠 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10 水平的影响[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(5): 1675-1679.
- [5] 赵海梅, 左志琴, 程绍民, 等. 全蝎、蜈蚣对胶原诱导型关节炎大鼠小肠黏膜 IL-2、IL-4、IL-10 表达及关节损伤的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(1): 80-83.
- [6] 缪成贵, 刘健, 张永和, 等. 滁菊总黄酮调控类风湿性关节炎模型大鼠滑膜组织 Wnt 通路 SFRP4 表达[J]. 中南大学学报(医学版), 2013, 38(7): 715-721.
- [7] 黄莉, 黄纯兰. 威灵仙总皂苷对 HL60 细胞株体外作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23): 311-315.
- [8] 郭锦锦, 孙万邦. IL-10 受体及其信号转导研究进展[J]. 临床医学工程, 2012, 19(1): 135-137.
- [9] 齐剑英, 郭荣, 叶贤龙, 等. scBsAb1/17 双特异性抗体对小鼠类风湿性关节炎模型的治疗效果[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(3): 366-371.
- [10] 曲道炜. 桂枝芍药知母汤对 AA 大鼠 COX 信号通路介导的免疫调控研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2016.
- [11] 沈文文. miR-20a 对 AA 大鼠模型滑膜细胞中 NLRP3 炎症小体的调控作用及其机制的研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2015.
- [12] 汪永忠, 邓龙飞, 韩燕全, 等. 威灵仙总皂苷对佐剂性关节炎(AA)大鼠 IL-6、IL-10 及滑膜中 p-JAK2、p-STAT3 表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(1): 86-90.
- [13] 万强, 周凤华, 崔小冰, 等. 小檗碱通过 JNK 通路降低内脏脂肪素诱导人脐静脉内皮细胞分泌 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的研究[J]. 中草药, 2015, 46(7): 1012-1017.
- [14] 刘铁钢, 于河, 张望, 等. 银菜汤对食积复合流感病毒感染小鼠肠黏膜 sIgA、TNF- $\alpha$ 、IL-10 的作用[J]. 北京中医药大学学报, 2014, 37(2): 86-89.
- [15] 苗平, 陆梅生, 张冬青. IL-6/IL-6 受体与类风湿关节炎关联性研究新进展[J]. 免疫学杂志, 2011, 27(4): 355-360.
- [16] 郭江燕, 高梓珊, 姜妹妹, 等. IL-17 和 NF- $\kappa$ B 通路与类风湿性关节炎的相关性研究[J]. 长春中医药大学学报, 2015, 31(1): 192-194.
- [17] 郭明, 安高, 封桂英, 等. CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群在类风湿性关节炎中的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(9): 1004-1007.
- [18] 王艳霞. 类风湿性关节炎滑膜淋巴细胞 CD3、CD4、CD8 的表达及意义[D]. 天津: 天津医科大学, 2012.
- (收稿日期: 2018-02-12 修回日期: 2018-05-26)
- (上接第 3034 页)
- scription-Yiqihuoxue formula as an effective anti-fibrotic treatment for systemic sclerosis [J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14(1): 224-234.
- [4] HAO Z F, SU Y M, LIU J Y, et al. Astragalus polysaccharide suppresses excessive collagen accumulation in a murine model of bleomycin-induced scleroderma [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(3): 3848-3854.
- [5] BEYER C, DISTLER J H. Morphogen pathways in systemic sclerosis [J]. Curr Rheumatol Rep, 2013, 15(1): 299-306.
- [6] FANG F, OOKA K, SUN X, et al. A synthetic TLR3 ligand mitigates profibrotic fibroblast responses by inducing autocrine IFN signaling [J]. J Immunol, 2013, 191(6): 2956-2966.
- [7] 李晶冰, 张彩萍, 季江, 等. 阿维 A 对系统性硬皮病成纤维细胞胶原合成及 I 型前胶原 mRNA 表达的影响[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2014, 30(7): 397-399.
- [8] 周茂松, 严煜林, 罗虹. 硬皮病皮损 CTGF、COL- I III 的检测及意义[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2008, 22(8): 456-469.
- [9] 闰小宁, 韩世荣, 李文彬, 等. “热敷药”对硬皮病小鼠模型 COL- I、COL- III 蛋白含量的影响[J]. 中国中西医结合皮肤性病学期刊, 2011, 10(6): 353-355.
- [10] 康小龙, 何承辉, 田红林, 等. 刺山柑总生物碱乳膏外用对系统性硬皮病小鼠组织纤维化的改善作用[J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(1): 32-35.
- [11] 康小龙, 何承辉, 刘晶, 等. 刺山柑总生物碱对系统性硬皮病小鼠 III 型胶原表达的影响[J]. 中国医科大学学报, 2016, 45(8): 688-691.
- [12] 宋克敏, 杨蓉娅. 转化生长因子- $\beta$ 、内皮素-1 及血管紧张素 II 与硬皮病纤维化关系研究进展[J]. 临床皮肤科杂志, 2011, 40(3): 184-186.
- [13] BECVAR R, HULEJOVA H, BRAUN M, et al. Collagen degradation products and proinflammatory cytokines in systemic and localized scleroderma [J]. Folia Biol(Praha), 2007, 53(2): 66-68.
- (收稿日期: 2018-02-09 修回日期: 2018-03-26)