

雷公藤甲素对类风湿性关节炎患者外周血 T 细胞的免疫抑制作用

周 铭^{1*}, 马丽华¹, 崔 颖¹, 谢 军^{2#}(1. 武汉科技大学附属天佑医院药剂科, 武汉 430064; 2. 武汉科技大学附属天佑医院内分泌风湿科, 武汉 430064)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)47-4441-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.47.08

摘要 目的: 研究雷公藤甲素对类风湿性关节炎(RA)患者外周血 T 细胞免疫功能的抑制作用。方法: 在 RA 患者外周血 T 细胞中加入 T 细胞多克隆刺激剂(0.2 μg/ml)以活化淋巴细胞并分泌细胞因子。实验分为空白对照(常规培养液)组、抗人 CD3 抗体(anti-CD3)刺激(0.2 μg/ml)组、雷公藤甲素(anti-CD3 0.2 μg/ml+雷公藤甲素 1 mmol/ml)组。采用密度梯度离心法分离 RA 患者的外周血单核细胞(PBMCs), 加入雷公藤甲素, 以酶联免疫吸附(ELISA)法检测细胞 γ 干扰素(IFN-γ)含量, 流式细胞仪检测分泌 IFN-γ、白细胞介素(IL)-2、IL-4 与 T 细胞活化分子 CD69 和 CD25 的 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞百分比。结果: 与 anti-CD3 刺激组比较, 雷公藤甲素组 PBMCs 中 IFN-γ 含量减少, 分泌 IFN-γ、IL-2、IL-4 的 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞百分比降低, 分泌 CD69 和 CD25 的 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞百分比降低, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结论: 雷公藤甲素可能通过抑制 T 细胞活化和细胞因子分泌来发挥免疫抑制作用, 从而发挥对 RA 的临床治疗作用。

关键词 雷公藤甲素; 类风湿性关节炎; T 细胞; 细胞因子; 活化分子

Inhibitory Effects of Triptolide on Immune Function of Peripheral Blood T Cells in Rheumatoid Arthritis Patients

ZHOU Ming¹, MA Li-hua¹, CUI Ying¹, XIE Jun²(1. Dept. of Pharmacy, Tianyou Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430064, China; 2. Dept. of Endocrine and Rheumatism, Tianyou Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430064, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To evaluate the inhibitory effect of triptolide on the immune function of peripheral blood T cells in patients with rheumatoid arthritis (RA). **METHODS:** Peripheral blood T cells of RA patients were treated with polyclonal stimulants (0.2 μg/ml) to activate leukomonocyte and produce cytokine. They were divided into blank control group (routine culture medium), anti-CD3 stimulation group (0.2 μg/ml) and triptolide group (anti-CD3 0.2 μg/ml+triptolide 1 mmol/ml). The peripheral blood mononuclearcell (PBMCs) were isolated by using density gradient centrifugation method, and were treated with triptolide. ELISA and flow cytometry were performed to determine the cell content and cell apoptosis. **RESULTS:** Compared with anti-CD3 stimulation group, the contents of IFN-γ, the percent of FN-γ, IL-2, IL-4 and CD69, CD25 in CD4⁺ and CD8⁺ T Cells of RA patients decreased, there was different significantly ($P < 0.01$). **CONCLUSIONS:** Triptolide might play a role of immunosuppression by inhibiting the activation and cytokine production of T cells, and thus take effect in the clinical treatment of RA.

KEYWORDS Triptolide; Rheumatoid arthritis; T cells; Cytokine; Activated molecule

类风湿性关节炎(RA)是一种常见的以关节滑膜慢性炎症及系统性血管炎为特征的慢性全身性自身免疫功能障碍性疾病^[1], 临床表现为关节滑膜炎、细胞浸润、滑膜翳形成, 当累及软骨和骨质时可导致关节结构破坏、畸形和功能性障碍, 其确切的病因目前尚不清楚。相关研究显示, 在 RA 疾病的发生和发展中, T 细胞扮演着重要的角色^[2]。当 RA 患者全身功能性 T 细胞受体库发生改变时, T 细胞自身稳定功能受损, 外周耐受机制紊乱, 增殖功能失常, 多样性减少。

雷公藤系卫矛科植物, 是目前临床用于治疗 RA 的首选药物^[3]。雷公藤化学成分复杂, 含有 150 多种化合物, 其中雷公藤甲素(Triptolide)被认为是其最主要的抗炎和免疫抑制成分

之一^[4]。目前, 雷公藤甲素用于自身免疫性疾病的临床治疗已有相关报道^[5-6], 但相关作用机制的研究还较为少见。本研究拟通过体外试验, 研究雷公藤甲素对 RA 患者外周血单核细胞(PBMCs)的细胞因子分泌和 T 细胞亚群活化分子表达的影响, 判断雷公藤甲素的临床治疗作用是否与 T 细胞的调节作用相关, 从而进一步探讨雷公藤在 RA 临床治疗中的作用机制, 以为临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

FACSCalibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司); EL×800 Universal Microplate Reader 型酶联免疫检测仪(美国 Bio-TEK 公司)。

1.2 试剂

雷公藤甲素(美国 Sigma 公司, 批号: 20130618, 纯度 > 98%); 抗人 CD3 抗体(anti-CD3)、APC 标记的抗 CD4 抗体

* 主管药师, 硕士。研究方向: 临床药学。E-mail: 42974497@qq.com

通信作者: 副主任医师, 副教授。研究方向: 内分泌风湿病的治疗。电话: 027-51163029

(APC-CD4)、Percp-CD8、FITC-CD8、FITC- γ 干扰素(IFN- γ)、PE-IL-2、PE-CD25、Pecy7-CD69抗体、IFN- γ 酶联免疫吸附(ELISA)检测盒均购自美国BD Pharmingen公司;RPMI 1640培养液(美国Gibco公司);葡聚糖泛影葡胺(上海华精生物科技公司)。

1.3 受试对象

选取2013年3—10月在武汉科技大学附属天佑医院内分泌风湿科就诊的12例活动期RA患者作为研究对象。诊断标准参照2010年美国风湿病学会与欧洲风湿病学会联合提出的RA诊断标准^[7]:受累关节数、血清学抗体[风湿因子(RF)或抗环瓜氨酸肽(CCP)]检测、滑膜炎持续时间、急性期反应物[红细胞沉降率(ESR)或C反应蛋白(CRP)]四项累计最高评分 ≥ 6 分的患者,且未合并其他关节疾病,未接受慢性风湿药物的治疗。患者年龄为15~49岁,平均年龄为(27.2 \pm 0.08)岁。

2 方法

2.1 PBMCs的分离

抽取RA患者静脉血10 ml,经肝素抗凝,加等量Hank's缓冲液稀释,混匀后用淋巴细胞分离液Ficoll进行密度梯度离心(22℃下,以离心半径为10 cm、2 000 r/min离心20 min)获取PBMCs。经Hank's缓冲液洗涤后,用RPMI 1640完全培养液调整PBMCs细胞密度为 $2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ 。

2.2 分组与细胞培养

将PBMCs细胞密度调整为 $2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$,培养在96孔板中,每孔200 μl ,试验分为3组,即空白对照(常规培养液)组、anti-CD3刺激(0.2 $\mu\text{g/ml}$)组与雷公藤甲素(antiCD3 0.2 $\mu\text{g/ml}$ +雷公藤甲素1 mmol/ml)组。每组设5个复孔,置5% CO₂、37℃的培养箱中培养3 d。

2.3 ELISA法检测细胞因子含量

收集培养细胞后的上清液,用ELISA法检测IFN- γ 的含量。

2.4 流式细胞仪检测细胞因子百分比

胞内细胞因子染色采用美国BD公司Fix/Perm(固定/破膜)染色试剂盒进行。用流式细胞仪检测分泌IFN- γ 、白介素(IL)-2、IL-4与T细胞活化分子CD69、CD25的CD4⁺、CD8⁺T细胞百分比。

2.5 统计学方法

采用SPSS 11.0统计软件进行单因素 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 雷公藤甲素对RA患者血清PBMCs中IFN- γ 含量的影响

经检测,空白对照组患者血清PBMCs中IFN- γ 含量为0;与anti-CD3刺激组比较,雷公藤甲素组患者血清PBMCs中IFN- γ 含量减少,差异有统计学意义($P < 0.01$)。这表明没有任何刺激时,PBMCs不分泌IFN- γ ,加入anti-CD3能够明显诱导IFN- γ 的产生,同时加入雷公藤甲素能够抑制RA患者血清PBMCs IFN- γ 的产生。雷公藤甲素对RA患者血清PBMCs中IFN- γ 含量的影响见图1。

3.2 雷公藤甲素对RA患者血清PBMCs中分泌IFN- γ 、IL-2的CD4⁺、CD8⁺T细胞百分比的影响

经检测,与空白对照组比较,anti-CD3刺激组分泌IFN- γ 、IL-2的CD4⁺、CD8⁺T细胞百分比增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);与anti-CD3刺激组比较,雷公藤甲素组分泌IFN- γ 、IL-2的CD4⁺、CD8⁺T细胞含量减少,差异有统计学意义($P <$

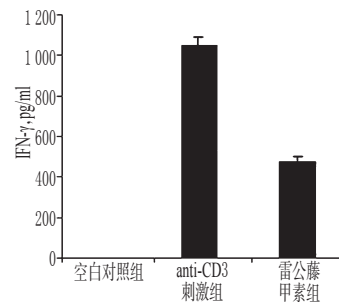


图1 雷公藤甲素对RA患者血清PBMCs中IFN- γ 含量的影响
Fig 1 Effect of triptolide on the production of IFN- γ in PBMCs of RA patients

0.01)。这表明没有刺激时,PBMCs分泌IFN- γ 的百分比非常低;而加入anti-CD3后,分泌IFN- γ 的CD4⁺和CD8⁺T细胞百分比分别为1.89%和10.07%;加入雷公藤甲素后,两种T细胞分泌IFN- γ 的百分比分别下降至0.97%和5.43%。anti-CD3主要诱导CD4⁺T细胞分泌IL-2,百分率为1.48%,而CD8⁺T细胞极少分泌IL-2,仅为0.07%;加入雷公藤甲素后,CD4⁺T细胞分泌IL-2的百分率为0.10%。雷公藤甲素对RA患者血清PBMCs中分泌IFN- γ 、IL-2的CD4⁺、CD8⁺T细胞百分比的影响见表1。

表1 雷公藤甲素对RA患者血清PBMCs中分泌IFN- γ 、IL-2的CD4⁺、CD8⁺T细胞百分比的影响

Tab 1 Effect of triptolide on percent of CD4⁺ and CD8⁺ T cell of IFN- γ and IL-2 in PBMCs of RA patients

组别	IFN- γ		IL-2	
	CD4 ⁺ T细胞,%	CD8 ⁺ T细胞,%	CD4 ⁺ T细胞,%	CD8 ⁺ T细胞,%
空白对照组	0.01	0.02	0.01	0.01
anti-CD3刺激组	1.89*	10.07*	1.48*	0.07*
雷公藤甲素组	0.97*	5.43*	0.10*	0.01*

与空白对照组比较: * $P < 0.01$;与anti-CD3刺激组比较: * $P < 0.01$ vs. blank control group: * $P < 0.01$; vs. anti-CD3 stimulation group: * $P < 0.01$

3.3 雷公藤甲素对RA患者血清PBMCs中分泌IL-4的CD4⁺、CD8⁺T细胞百分比的影响

与空白对照组比较,anti-CD3刺激组分泌IL-4的CD4⁺、CD8⁺T细胞含量增加,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与anti-CD3刺激组比较,雷公藤甲素组分泌IL-4的CD4⁺、CD8⁺T细胞含量减少,差异有统计学意义($P < 0.01$)。这表明anti-CD3主要诱导CD4⁺T细胞表达IL-4(0.54%),而CD8⁺T细胞几乎不表达IL-4(0);加入雷公藤甲素后,分泌IL-4的CD4⁺T细胞百分比降低为0.23%。雷公藤甲素对RA患者血清PBMCs中分泌IL-4的CD4⁺、CD8⁺T细胞百分比的影响见表2。

表2 雷公藤甲素对RA患者血清PBMCs中分泌IL-4的CD4⁺、CD8⁺T细胞百分比的影响

Tab 2 Effect of triptolide on percent of CD4⁺ and CD8⁺ T cell of IL-4 in PBMCs of RA patients

组别	IL-4	
	CD4 ⁺ T细胞,%	CD8 ⁺ T细胞,%
空白对照组	0.01	0.00
anti-CD3刺激组	0.54*	0.02*
雷公藤甲素组	0.23*	0.01*

与空白对照组比较: * $P < 0.01$;与anti-CD3刺激组比较: * $P < 0.01$ vs. blank control group: * $P < 0.01$; vs. anti-CD3 stimulation group: * $P < 0.01$

3.4 雷公藤甲素对RA患者血清PBMCs中分泌CD69、CD25的CD4⁺、CD8⁺T细胞百分比的影响

与空白对照组比较, anti-CD3刺激组分泌CD69、CD25的CD4⁺、CD8⁺T细胞含量增加, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与anti-CD3刺激组比较, 雷公藤甲素组分泌CD69、CD25的CD4⁺、CD8⁺T细胞含量减少, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。这表明anti-CD3刺激能诱导CD69和CD25的大量表达, 而同时加入雷公藤甲素能够明显降低CD4⁺和CD8⁺T细胞CD69和CD25的表达。雷公藤甲素对RA患者血清PBMCs中分泌CD69、CD25的CD4⁺、CD8⁺T细胞百分比的影响见表3。

表3 雷公藤甲素对RA患者血清PBMCs中分泌CD69、CD25的CD4⁺、CD8⁺T细胞百分比的影响

Tab 3 Effect of triptolide on percent of CD4⁺ and CD8⁺ T cell of CD69 and CD25 in PBMCs of RA patients

组别	CD69		CD25	
	CD4 ⁺ T细胞, %	CD8 ⁺ T细胞, %	CD4 ⁺ T细胞, %	CD8 ⁺ T细胞, %
空白对照组	0.11	0.20	2.32	0.23
anti-CD3刺激组	73.68*	77.89*	79.89*	80.28*
雷公藤甲素组	56.32*	50.23*	45.76*	40.41*

与空白对照组比较: * $P < 0.01$; 与anti-CD3刺激组比较: # $P < 0.01$

vs. blank control group: * $P < 0.01$; vs. anti-CD3 stimulation group:

$P < 0.01$

4 讨论

T细胞的活化、增殖是机体对抗原产生免疫应答反应的重要环节。细胞因子被公认为是RA炎症和关节损伤的重要介质。根据其产生的细胞因子不同, T淋巴细胞可分为Th1、Th2和Th17等不同的辅助性T细胞亚群。Th1细胞产生IFN- γ 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 和IL-2, 参与细胞介导的免疫反应; Th2细胞主要产生IL-4、IL-5、IL-10和IL-13等, 参与B细胞介导的体液免疫应答。随着对不同Th细胞亚群的研究不断深入, 目前已发现细胞因子的表达水平与RA的发生、发展密切相关。一般来讲, IFN- γ 和IL-4分别是最具有代表性的Th1型和Th2型细胞因子, 而来自临床试验及动物实验的结果表明, IFN- γ 在RA致病机制中发挥了重要的作用。

有报道认为, 雷公藤甲素对脾淋巴细胞增殖的抑制作用可能与T细胞凋亡及T细胞受体的信号传导有关^[8]。雷公藤甲素可通过抑制purine-box和核因子(NF)- κ B的转录活性而降低IL-2水平^[9]。动物实验结果显示, 雷公藤甲素制剂对小鼠淋巴细胞转化率、IL-2、迟发型过敏反应、巨噬细胞的吞噬能力及抗体溶血素的形成均呈抑制作用^[10-11]。

本研究通过体外细胞试验, 观察了雷公藤甲素对RA患者中细胞因子分泌和活化分子表达的影响。结果显示, 在T细胞多克隆刺激剂条件下, 分泌IFN- γ 、IL-2和IL-4的CD4⁺和CD8⁺T细胞明显增多; 加入雷公藤甲素后, 分泌IFN- γ 和IL-2的CD4⁺和CD8⁺T细胞百分比均明显减少, 而CD4⁺T细胞分泌IL-4的水平也明显减少。这一试验结果证实了雷公藤甲素可能是通过调节T细胞的细胞因子分泌功能来治疗RA疾病的理论推测。

CD69是目前已知T细胞活化后表达最早的一种膜表面分

子, 而CD25是IL-2受体, 在T细胞活化晚期表达, 而静止T细胞很少表达, 活化后可大量诱导IL-2受体表达, 其与 β 、 γ 亚基结合后形成具有高亲和力的IL-2R, IL-2R与IL-2结合后可诱导T细胞进入S期完成克隆增殖。

综上所述, 本研究通过体外细胞试验, 观察了雷公藤甲素对RA患者PBMCs中细胞因子分泌的影响, 结果发现雷公藤甲素可抑制RA患者外周血T细胞IFN- γ 、IL-2和IL-4的产生; 通过对细胞表面活化分子的检测发现, 其抑制作用可能是通过抑制CD4⁺和CD8⁺T细胞的活化而实现的。本研究可为临床应用雷公藤甲素治疗RA提供新的理论依据。

参考文献

- [1] Cooles FA, Isaacs JD. Pathophysiology of rheumatoid arthritis[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2011, 23(3):233.
- [2] Cornelissen F, van Hamburg JP, Lubberts E. The IL-12/IL-23 axis and its role in Th17 cell development, pathology and plasticity in arthritis[J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2009, 10(5):452.
- [3] 吴柏林. 雷公藤治疗类风湿性关节炎的机理探要[J]. 实用中医内科杂志, 2003, 17(3):150.
- [4] Qiu D, Kao PN. Immunosuppressive and anti-inflammatory mechanisms of triptolide, the principal active diterpenoid from the Chinese medicinal herb *Tripterygium wilfordii* Hook f [J]. *Drugs RD*, 2003, 4(1):1
- [5] 沈逸, 何东仪. 雷公藤免疫调节机制的研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2012, 46(5):97.
- [6] 涂胜豪, 陈哲. 雷公藤治疗类风湿性关节炎的现状和存在的问题[J]. 中西医结合研究, 2009, 1(1):42.
- [7] Yamanaka H. Rheumatoid arthritis: progress in diagnosis and treatment. Topics: IV. Treatment: 1. Treatment strategies, 1) guidelines for the management of rheumatoid arthritis[J]. *Nihon Naika Gakkai Zasshi*, 2012, 101(10):2860.
- [8] Ho LJ, Chang ML, Kuo SY, et al. Mechanism of immunosuppression of antirheumatic herb TWHF in human T cells[J]. *J Rheumatol*, 1999, 26(1):14.
- [9] Yang Y, Liu Z, Tolosa E, et al. Triptolide induces apoptotic death of T lymphocyte[J]. *Immunopharmacology*, 1988, 40(2):139.
- [10] Qiu D, Zhao G, Aoki Y, et al. Immunosuppressant PG 490 (triptolide) inhibits T-cell interleukin-2 expression at the level of purine-box/nuclear factor of activated T-cells and NF-kappa B transcriptional activation[J]. *J Bio Chem*, 1999, 274(19):1343.
- [11] Tao X, Fan F, Hoffmann V, et al. Effective therapy for nephritis in (NZBXNZW)F1 mice with triptolide and triptolide, the principal active components of the Chinese herbal remedy *Tripterygium wilfordii* Hook F[J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(6):1774.

(收稿日期:2014-07-15 修回日期:2014-08-06)