

· 科技之窗 ·

壮骨止痛胶囊对去卵巢骨质疏松大鼠骨组织 Treg/Th17 平衡的调节作用*

曾英¹ 李伟娟² 章文娟² 李劲平^{2#} 雷晓明³ 莫新民³

(1 湖南中医药大学第一附属医院 湖南 410007; 2 中南大学药学院; 3 湖南中医药大学)

摘要:目的 从骨组织调节性 T 细胞/辅助性 T 细胞(Treg/Th17)平衡角度探讨壮骨止痛胶囊抗绝经后骨质疏松作用机理。方法 72 只 8 月龄 SD 雌鼠随机分为假手术组、模型组、戊酸雌二醇组(0.21 mg/kg)、壮骨止痛胶囊高剂量组(1.28 g/kg)、中剂量组(0.64 g/kg)和低剂量组(0.32 g/kg),每组 12 只。除假手术组外,其余 5 组去卵巢复制绝经后骨质疏松动物模型。术后 1 周开始给药,连续给药 18 周,最后一次给药 1 h 后处死,快速取左股骨检测雌二醇(E₂)、白细胞介素 17A(IL-17A)、白细胞介素 10(IL-10),取右股骨 RT-PCR 检测维甲酸相关孤儿受体 γ t(ROR γ t)、叉状头转录因子(Foxp3)、IL-17A、IL-10 mRNA 的表达,取左胫骨病理切片免疫组化染色检测表达 ROR γ t、Foxp3 的细胞百分数。结果 壮骨止痛胶囊能显著升高去卵巢雌鼠骨组织 E₂、IL-10 水平($P < 0.01$),降低骨组织 IL-17A 水平($P < 0.05$);显著增强骨组织 Foxp3、IL-10 mRNA 的表达($P < 0.05$),显著抑制骨组织 ROR γ t、IL-17A mRNA 的表达($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);显著增加骨组织内表达 Foxp3 的细胞百分数($P < 0.05$),下调表达 ROR γ t 的细胞百分数($P < 0.05$)。Foxp3 阳性细胞百分数与 ROR γ t 阳性细胞百分数比值与 E₂ 水平呈正相关($r = 0.9905$, $P < 0.01$)。结论 壮骨止痛胶囊通过抑制去卵巢雌鼠骨组织 Th17 细胞数量和功能活动,增加骨组织 Treg 细胞数量并增强其活动而调节骨组织 Treg/Th17 平衡,该调节作用可能部分通过提高去卵巢雌鼠体内 E₂ 水平而实现。

关键词: 壮骨止痛胶囊; Treg/Th17 平衡; 绝经后骨质疏松; 大鼠

中图分类号: R285.5

doi: 10.3969/j.issn.1006-2157.2016.07.007

Regulatory effect of Zhuanggu Zhitong Capsule on Treg/Th17 balance in rats with osteoporosis induced by ovariectomy*

ZENG Ying¹, LI Weijuan², ZHANG Wenjuan², LI Jinping^{2#}, LEI Xiaoming³, MO Xinmin³

(1 The First Affiliated Hospital, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Hunan 410007; 2 School of Pharmacy Science, Central South University; 3 Hunan University of Traditional Chinese Medicine)

Abstract: Objective To investigate the anti-postmenopausal osteoporosis mechanism of *Zhuanggu Zhitong* Capsule (Bone-strengthening Pain-relieving Capsule, ZGZTC) in regulating Treg/Th17 balance in bone tissue. **Methods** Seventy-two 8-month-old SD female rats were allocated randomly into sham operation group, model group, estradiol group (0.21 mg/kg), ZGZTC high-dose group (1.28 g/kg), ZGZTC medium-dose group (0.64 g/kg) and ZGZTC low-dose group (0.32 g/kg). There were 12 rats in each group. Bilateral ovariectomy was performed on rats in all groups except for the sham operation group. After administration for 18 weeks, all rats were anaesthetized intraperitoneally with hydrazine hydrate. The content of E₂, IL-10 and IL-17A was measured with ELISA in left femur. Gene expression of

曾英,女,博士,副主任医师

* 通信作者: 李劲平,男,博士,副教授,硕士生导师, E-mail: pjingli@163.com

国家自然科学基金面上项目(No. 81273816)

Foxp3, ROR γ t, IL-17A and IL-10 in right femur was detected by using RT-PCR, and the number of cell with ROR γ t or Foxp3 was counted with immunohistochemistry in left tibia. **Results** Zhuanggu Zhitong Capsule significantly increased E₂ and IL-10 levels in bone tissue ($P < 0.01$), reduced the level of IL-17A in bone tissue ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). It significantly increased the Foxp3 and IL-10 mRNA expression and inhibited the ROR γ t mRNA expression in bone tissue ($P < 0.05$). The percentage of cell with Foxp3 was significantly increased by ZGZTC in bone tissue ($P < 0.05$), and the percentage of cell with ROR γ t was significantly reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The ratio of Foxp3 to ROR γ t presented a positive correlation with the E₂ level ($r = 0.9905$, $P < 0.01$). **Conclusion** Zhuanggu Zhitong Capsule could downregulate the number and function of Th17, upregulate the number and function of Treg in bone tissue in ovariectomized rats partly via improving the E₂ level.

Keywords: Zhuanggu Zhitong (Bone-strengthening Pain-relieving) Capsule; Treg/Th17; postmenopausal osteoporosis; rats

雌激素对维持骨组织内成骨细胞(osteoblast, OB)和破骨细胞(osteoclast, OC)功能活动平衡发挥了重要调节作用,雌激素减少或缺乏是促使绝经后妇女患骨质疏松的主要因素^[1]。成骨细胞和破骨细胞的功能活动除了受雌激素直接调节外,还受到骨微环境中的多种免疫细胞分泌的细胞因子调节,如白细胞介素 1(IL-1)、白细胞介素 17A(IL-17A)、肿瘤坏死因子 α (TNF α)等可促进骨吸收,白细胞介素 10(IL-10)、转化生长因子 β (TGF β)等则对骨吸收有抑制作用^[2-4]。骨免疫系统的调节性 T 细胞(Treg)和辅助性 T 细胞(Th17)的功能失衡在绝经后骨质疏松发生发展中扮演了重要角色^[5]。当体内雌激素减少或缺乏时,Treg 和 Th17 失去雌激素的调节,它们之间的平衡被破坏,促进破骨细胞活动的细胞因子如 IL-17、TNF α 等分泌增多,从而使骨吸收过程相对增强,骨代谢平衡也随之被破坏,导致骨质疏松的发生。因此,纠正失衡的 Treg/Th17 平衡成为治疗骨质疏松药物的新作用靶点。

壮骨止痛胶囊是本课题组研发的治疗绝经后骨质疏松症的六类中药新药,前期研究表明,对于双侧去卵巢骨质疏松大鼠具有良好的抗骨质疏松作用^[6-9]。本实验通过复制去卵巢骨质疏松大鼠模型,直接检测骨组织内 Treg 和 Th17 的数量和功能变化,探讨壮骨止痛胶囊对去卵巢骨质疏松大鼠骨组织 Treg/Th17 平衡的调节作用。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雌性 SD 大鼠 72 只,8 月龄,体重 280 ~ 310 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物质量合格证号 43004700005517,中南大学湘雅三医院动物实验中心屏障设施许可证号 SYXK(湘)

2013-0001。

1.2 药品

壮骨止痛胶囊(四川美大康药业股份有限公司,国药准字 Z20050118),戊酸雌二醇(拜耳医药保健有限公司广州分公司,批号 J20130009),青霉素钠(哈药集团制药总厂,批号 A1301022417)。

1.3 主要试剂

大鼠雌二醇(E₂)、IL-17A、IL-10 ELISA 检测试剂盒(上海邦奕生物科技有限公司),Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司,批号 28218),Go Taq Green Master Mix(美国 Promega 公司),PCR 引物(上海生物工程公司合成),DNA Marker(天能生物科技有限公司),兔抗大鼠叉状头转录因子(Foxp3)抗体、兔抗大鼠维甲酸相关核受体 γ t(ROR γ t)抗体(Santa Cruz Biotechnology 公司),山羊抗兔 IgG 抗体、HRP-链霉卵白素和 DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)

1.4 仪器

凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司),WD-9402A PCR 扩增仪(北京六一仪器厂),GPS-9160MBE 核酸蛋白分析仪(Eppendorf 公司),DYY-8c 电泳仪(北京六一仪器厂),酶标仪(美国 BioTek 公司),CP214 电子天平(奥豪斯仪器有限公司);BX51 型显微镜(Olympus 公司)。

2 方法

2.1 分组与造模

72 只雌性 SD 大鼠按体重随机分为假手术组,模型组,戊酸雌二醇组,壮骨止痛胶囊高剂量组、中剂量组、低剂量组,共 6 组,每组 12 只。每只大鼠分别用 2% 水合氯醛腹腔注射麻醉(3.5 mL/kg)后,无菌操作从背部两侧距第一腰椎外 1 cm 处纵向切开

皮肤和肌肉 除假手术组仅切除少许脂肪组织外,其余各组大鼠完整摘除双侧卵巢,结扎止血后分两层缝合切口。术后各组大鼠切口用络合碘消毒,连续3 d 肌注兽用青霉素,5 d 后拆线。

2.2 给药

各组均从术后1周开始每天灌胃给药1次,连续给药18周。除假手术组和模型组每天灌胃相应体积蒸馏水外,其余各组灌胃相应药物(10 mL/kg)。按大鼠体表面积折算剂量,戊酸雌二醇组按0.21 mg/kg 给药,壮骨止痛胶囊各组剂量分别为高剂量组1.28 g/kg、中剂量组0.64 g/kg、低剂量组0.32 g/kg。其中中剂量为临床等效剂量。

2.3 指标检测

2.3.1 取材 实验过程中,所有大鼠自由饮水摄食,每10 d 称一次体重调整灌胃体积。给药18周后,所有大鼠用2%水合氯醛腹腔注射麻醉3.5 mL/kg 后腹主动脉放血处死,快速剥取股骨。

2.3.2 ELISA 检测 去除左股骨上附着的肌肉组织后准确称量(保留完整骨膜),于研钵中用骨科剪将股骨剪成2 mm 左右大小的碎块,加入液氮研磨5 min,挥干液氮,按ELISA 检测试剂盒要求加入相应体积组织提取液,研磨,转入离心管离心(2 500 转/min,10 min,4 ℃),取上清检测 E_2 、IL-10、IL-17A 的含量。

2.3.3 RT-PCR 检测 于冰块上快速剥取右股骨,精确称量,剪成2 mm 左右大小的碎块后加液氮研磨,挥干液氮,加入相应体积 Trizol,抽提总 RNA,紫外分光光度计测定总 RNA 浓度及纯度。采用20 μ L 逆转录反应体系,内含2 μ g 待测 RNA,按照逆转录合成试剂盒说明书操作合成 cDNA。cDNA 合成反应完成后,取2 μ L cDNA 模板配成25 μ L PCR 反应体系扩增目的基因。IL-10: 有义链5'-CCAGTTT-TACCTGGTAGAAGTGATG-3',反义链5'-TGCTAG-GTCCTGGAGTCCAGCAAGCTCAA-3',扩增片段165 bp; IL-17A: 有义链5'-ATCCATGTGCCTGATGCTGT-3',反义链5'-GTTATTGGCCTCGGCGTTTG-3',扩增片段106 bp; Foxp3 有义链5'-GCAAACGGAGTCTG-CAAGTG-3',反义链5'-GCAGGAGCTTGTCCACT-GA-3',扩增片段258 bp; ROR γ _t: 有义链5'-GTCGTC-CTCGTCAGAATGT-3',反义链5'-AGAACCAAGGC-CGTGTAG-3',扩增片段340 bp; β -actin: 有义链5'-CCTAGCACCATGAAGATCAA-3',反义链5'-TTTCT-GCGCAAGTTAGTTTT-3',扩增片段227 bp。PCR 扩增循环参数:95 ℃ 预变性5 min,95 ℃ 变性30 s,

退火(IL-10 56 ℃,IL-17A 55 ℃,ROR γ _t 58 ℃,Foxp3 60 ℃, β -actin 55 ℃)30 s,72 ℃ 延伸30 s,35 个循环,最后72 ℃ 延伸10 min。分别取各基因3 μ L PCR 产物,用2%琼脂糖电泳及溴化已锭染色,经凝胶成像系统进行拍照,用 Image Lab 5.0 软件定量分析。分别计算 IL-10、IL-17A、Foxp3、ROR γ _t 产物电泳条带灰度与 β -actin 产物电泳条带灰度比值。

2.3.4 免疫组化检测 快速剥取完整的左胫骨,去除附着的肌肉后浸泡在10%福尔马林 PBS 中脱钙后,按常规切片、脱蜡至水洗后经抗原修复。加3% H₂O₂ PBS 溶液室温孵育10 min, PBS 冲洗3次,分别滴加正常羊血清(1:10)室温孵育10 min。滴加兔抗大鼠 Foxp3 或 ROR γ _t 多克隆抗体(1:150 稀释),阴性对照切片采用正常羊血清代替一抗,4 ℃ 孵育过夜。然后 PBS 浸洗3次,再滴加生物素标记羊抗兔 IgG,室温反应30 min, PBS 浸洗3次,然后滴加 HRP 链霉卵白素,室温反应20 min, PBS 浸洗3次,用0.06% DAB 显色8 min,苏木精复染,酒精脱水,二甲苯透明后中性树胶封片。显微镜下观察、拍照,用 Image-Pro Plus 4.5 进行图像分析。每张切片取5个视野,计数视野内所有细胞数和被染成黄褐色的细胞数,计算黄褐色的细胞数占所有细胞数的百分数。

2.4 统计方法

所有数据先经方差齐性检验和正态性检验,符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差齐性用多组单因素方差分析。采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理。以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 各组大鼠左股骨 E_2 、IL-10 和 IL-17A 水平的比较

与假手术组相比,模型组大鼠左股骨 E_2 、IL-10 水平明显下降($P < 0.01$),IL-17A 显著升高($P < 0.05$)。与模型组相比,戊酸雌二醇组 IL-17A 水平显著下降($P < 0.01$),IL-10 水平显著上升($P < 0.01$)。壮骨止痛胶囊高、中、低剂量明显提高去卵巢雌鼠股骨 E_2 、IL-10 水平($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),降低 IL-17A 水平($P < 0.05$)。结果见表1。

3.2 各组大鼠右股骨 IL-10、IL-17A、Foxp3 和 ROR γ _t mRNA 表达的比较

与假手术组相比,模型组大鼠右股骨 IL-10 和 Foxp3 mRNA 表达均显著降低($P < 0.05$),IL-17A 和 ROR γ _t mRNA 均显著升高($P < 0.01$)。戊酸雌二醇和不同剂量壮骨止痛胶囊使 IL-10 和 Foxp3 mRNA 表达均显著升高($P < 0.05$),IL-17A 和 ROR γ _t mRNA 均显著降低($P < 0.01$)。结果见表2、图1。

表1 各组大鼠左股骨 E₂、IL-17A、IL-10 水平比较(ng/L; $\bar{x} \pm s$; n = 12)Table 1 Comparison of levels of E₂, IL-10 and IL-17A in left femur of rats of all groups(ng/L; $\bar{x} \pm s$; n = 12)

组别 Group	剂量 Dose	E ₂	IL-17A	IL-10
假手术组 Sham operation group		9.243 ± 1.884	1.724 ± 0.215	9.141 ± 2.394
模型组 Model group		3.696 ± 0.729**	2.279 ± 0.346*	5.426 ± 1.905**
戊酸雌二醇组 Estradiol group	0.21 mg/kg	9.134 ± 1.815 ^{△△}	1.847 ± 0.318 [△]	8.950 ± 2.170 ^{△△}
壮骨止痛胶囊高剂量组 ZGZTC high-dose group	1.28 g/kg	8.546 ± 1.675 ^{△△}	1.858 ± 0.309 [△]	8.725 ± 2.509 ^{△△}
壮骨止痛胶囊中剂量组 ZGZTC medium-dose group	0.64 g/kg	7.521 ± 1.718 ^{△△}	1.907 ± 0.323 [△]	8.360 ± 2.017 [△]
壮骨止痛胶囊低剂量组 ZGZTC low-dose group	0.32 g/kg	6.637 ± 1.541 [△]	1.933 ± 0.327 [△]	7.490 ± 1.924 ^{△△}
F		19.13	4.07	4.57
P		0.01	0.01	0.01

注:与假手术组比较* P < 0.05 ** P < 0.01;与模型组比较[△]P < 0.05 ^{△△}P < 0.01。

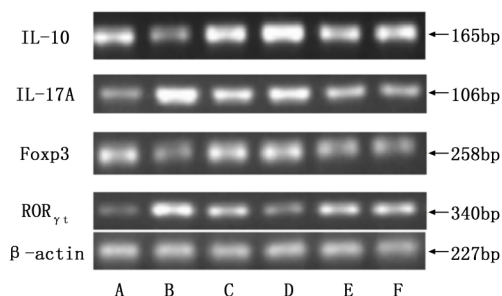
Note: * P < 0.05 ** P < 0.01 compared with sham operation group; [△]P < 0.05 ^{△△}P < 0.01 compared with model group.

表2 各组大鼠右股骨 IL-10、IL-17A、Foxp3 和 ROR_{γt} mRNA 表达的比较($\bar{x} \pm s$; n = 12)Table 2 Comparison of expression of IL-10, IL-17A, Foxp3 and ROR_{γt} mRNA in right femur of rats of all groups($\bar{x} \pm s$; n = 12)

组别 Group	剂量 Dose	IL-10	IL-17A	Foxp3	ROR _{γt}
假手术组 Sham operation group		1.86 ± 0.56	0.87 ± 0.29	1.17 ± 0.36	0.37 ± 0.19
模型组 Model group		1.17 ± 0.42*	2.16 ± 0.49**	0.57 ± 0.20*	2.36 ± 0.38**
戊酸雌二醇组 Estradiol group	0.21 mg/kg	1.84 ± 0.46 [△]	1.23 ± 0.38 ^{△△}	0.99 ± 0.26 [△]	1.37 ± 0.33 ^{△△}
壮骨止痛胶囊高剂量组 ZGZTC high-dose group	1.28 g/kg	1.73 ± 0.42 [△]	1.34 ± 0.32 ^{△△}	0.94 ± 0.22 [△]	0.74 ± 0.22 ^{△△}
壮骨止痛胶囊中剂量组 ZGZTC medium-dose group	0.64 g/kg	1.69 ± 0.32 [△]	1.57 ± 0.33 [△]	0.86 ± 0.20 [△]	1.69 ± 0.32 [△]
壮骨止痛胶囊低剂量组 ZGZTC low-dose group	0.32 g/kg	1.61 ± 0.39 [△]	1.60 ± 0.32 [△]	0.79 ± 0.22 [△]	1.85 ± 0.39 [△]
F		3.72	15.82	7.00	7.22
P		0.01	0.01	0.01	0.01

注:与假手术组比较* P < 0.05 ** P < 0.01;与模型组比较[△]P < 0.05 ^{△△}P < 0.01。

Note: * P < 0.05 ** P < 0.01 compared with sham operation group; [△]P < 0.05 ^{△△}P < 0.01 compared with model group.



A 假手术组; B 模型组; C 戊酸雌二醇组; D 壮骨止痛胶囊高剂量组; E 壮骨止痛胶囊中剂量组; F 壮骨止痛胶囊低剂量组。

A sham operation group; B model group; C estradiol group;

D ZGZTC high-dose group; E ZGZTC medium-dose group;

F ZGZTC low-dose group.

图1 壮骨止痛胶囊对去卵巢大鼠右股骨 IL-10、IL-17、Foxp3 和 ROR_{γt} mRNA 表达的影响

Fig. 1 Effect on the expression of IL-10, IL-17, Foxp3 and ROR_{γt} mRNA in right femur of ovariectomized rats

3.3 各组大鼠左胫骨表达 Foxp3、ROR_{γt} 阳性细胞数量的比较

表达 Foxp3、ROR_{γt} 细胞的胞浆与胞核均被染成

黄褐色,被染成黄褐色的细胞主要位于骨外膜、骨松质和骨内膜。与假手术组相比,模型组大鼠胫骨表达 Foxp3 的细胞百分数显著降低($P < 0.01$),而表达 ROR_{γt} 的细胞百分数显著升高($P < 0.01$)。戊酸雌二醇能显著提高去卵巢雌鼠胫骨表达 Foxp3 的细胞百分数($P < 0.01$),显著降低表达 ROR_{γt} 的细胞百分数($P < 0.05$)。壮骨止痛胶囊高剂量非常显著地提高去卵巢雌鼠胫骨表达 Foxp3 的细胞百分数($P < 0.01$),中、低剂量显著提高去卵巢雌鼠胫骨表达 Foxp3 的细胞百分数($P < 0.05$)。壮骨止痛胶囊高、中剂量非常显著地降低去卵巢雌鼠胫骨表达 ROR_{γt} 的细胞百分数($P < 0.01$),低剂量显著降低去卵巢雌鼠胫骨表达 ROR_{γt} 的细胞百分数($P < 0.05$)。结果见表3、图2、图3。

由于绝经后骨质疏松的始动因素是卵巢合成分泌 E₂ 功能下降,导致体内 E₂ 水平降低,因此,分析药物对 Treg/Th17 平衡的调节作用与 E₂ 水平之间的关系有助于探寻药物的作用机理。由表3可见,骨组织 E₂ 水平与骨组织 Treg/Th17 比值存在明显

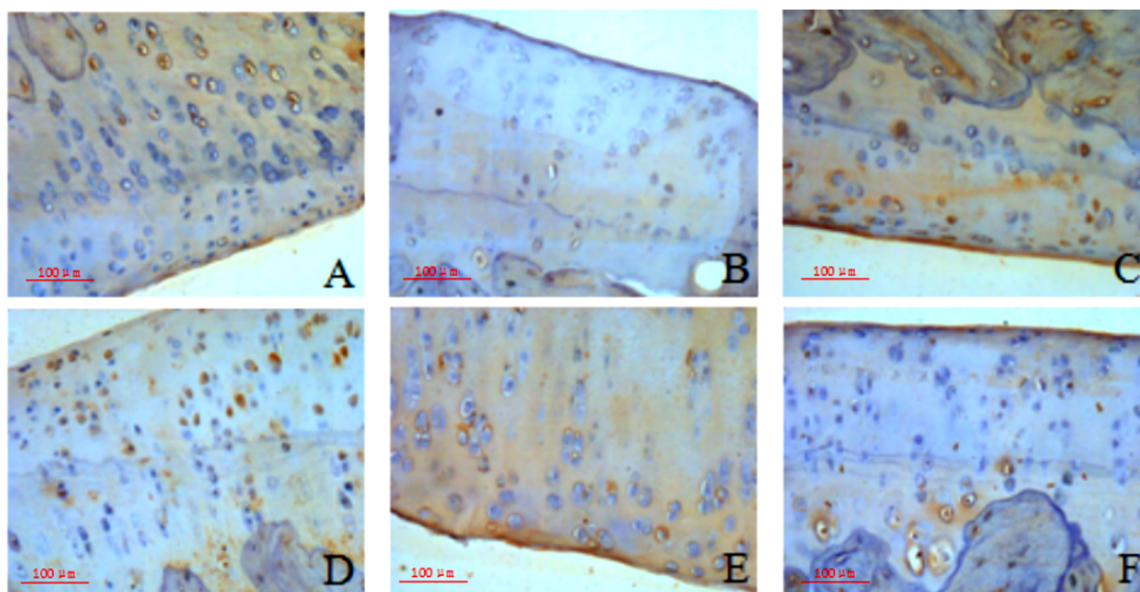
表 3 各组大鼠左胫骨 Foxp3、ROR γ_t 阳性细胞的数量 ($\bar{x} \pm s; n = 12$)

Table 3 Effect on the number of cells with Foxp3 or ROR γ_t in left tibia of ovariectomized rats ($\bar{x} \pm s; n = 12$)

组别 Group	剂量 Dose	Foxp3(%)	ROR γ_t (%)	Foxp3/ ROR γ_t	E ₂ (ng/L)
假手术组 Sham operation group		4.65 ± 1.83	6.43 ± 2.18	0.72	9.243 ± 1.884
模型组 Model group		1.82 ± 0.57**	10.57 ± 2.31**	0.17	3.696 ± 0.729**
戊酸雌二醇组 Estradiol group	0.21 mg/kg	4.59 ± 1.86 $\Delta\Delta$	6.51 ± 2.04 Δ	0.70	9.134 ± 1.815 $\Delta\Delta$
壮骨止痛胶囊高剂量组 ZGZTC high-dose group	1.28 g/kg	4.43 ± 1.73 $\Delta\Delta$	6.38 ± 2.12 $\Delta\Delta$	0.69	8.546 ± 1.675 $\Delta\Delta$
壮骨止痛胶囊中剂量组 ZGZTC medium-dose group	0.64 g/kg	3.95 ± 1.76 Δ	6.49 ± 2.09 $\Delta\Delta$	0.61	7.521 ± 1.718 $\Delta\Delta$
壮骨止痛胶囊低剂量组 ZGZTC low-dose group	0.32 g/kg	3.42 ± 1.53 Δ	7.54 ± 2.35 Δ	0.45	6.637 ± 1.541 Δ
F		4.71	5.92		19.13
P		0.01	0.01		0.01

注: 与假手术组比较* P < 0.05 **P < 0.01; 与模型组比较 Δ P < 0.05 $\Delta\Delta$ P < 0.01。

Note: * P < 0.05 **P < 0.01 compared with sham operation group; Δ P < 0.05 $\Delta\Delta$ P < 0.01 compared with model group.



A 假手术组; B 模型组; C 戊酸雌二醇组; D 壮骨止痛胶囊高剂量组; E 壮骨止痛胶囊中剂量组; F 壮骨止痛胶囊低剂量组。

A sham operation group; B model group; C estradiol group; D ZGZTC high-dose group; E ZGZTC medium-dose group; F ZGZTC low-dose group.

图 2 各组大鼠左胫骨 Foxp3 阳性细胞的表达(免疫组化染色 × 200)

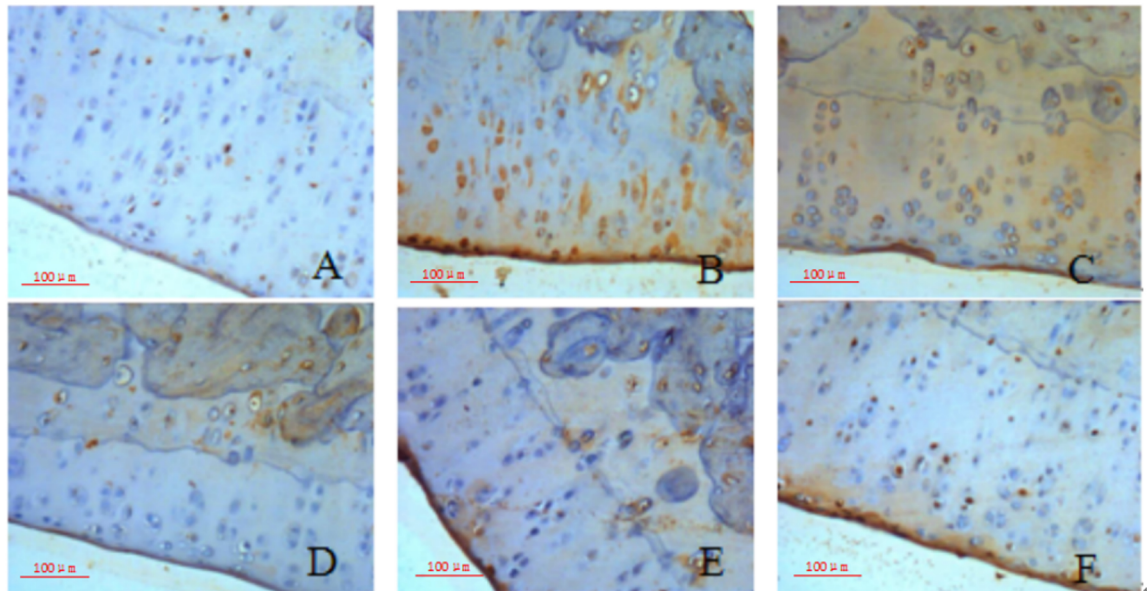
Fig. 2 Number of cells with Foxp3 in left tibia of rats of all groups(Immunohistochemical staining × 200)

的正相关, Treg/Th17 比值随骨组织 E₂ 水平升高而增大, 相互之间呈明显正相关关系 (r = 0.990 5, P < 0.01)。

4 讨论

Treg/Th17 失衡在许多疾病如多发性骨髓瘤^[10]、类风湿关节炎^[11] 发生发展中发挥了重要作用, 同时, 绝经后骨质疏松的 Treg/Th17 也处于失衡状态^[12-13]。Treg 和 Th17 除了的功能上相互调节外, 其分泌的细胞因子对维持成骨细胞和破骨细胞的功能活动平衡具有重要调节作用。Foxp3 是 Treg

的特异转录因子, 调控 Treg 的 IL-10、TGF β 等细胞因子的合成^[14]。ROR γ_t 是 Th17 的特异转录因子, 调控 Th17 合成分泌 IL-17、TNF α 等细胞因子^[15]。Foxp3 和 ROR γ_t 的表达受雌激素的调控, 在雌激素不足或缺乏时, Foxp3 和 ROR γ_t 的表达发生紊乱, 从而导致 Treg/Th17 功能失衡^[16]。一些学者从调节 Treg/Th17 平衡角度探讨药物抗骨质疏松作用, 结果表明左归丸可降低脾脏 Th17 细胞数, 升高 Treg 数量, 双磷酸盐可降低骨质疏松病人血液 IL-6、IL-17A、IL-23 水平, 提升血液中 IL-10、TGF β 水



A 假手术组; B 模型组; C 戊酸雌二醇组; D 壮骨止痛胶囊高剂量组; E 壮骨止痛胶囊中剂量组; F 壮骨止痛胶囊低剂量组。

A sham operation group; B model group; C estradiol group; D ZGZTC high-dose group; E ZGZTC medium-dose group; F ZGZTC low-dose group.

图 3 各组大鼠左胫骨 $ROR_{\gamma t}$ 阳性细胞的表达(免疫组化染色 $\times 200$)

Fig. 3 Number of cells with $ROR_{\gamma t}$ of left tibia in rats of all groups(Immunohistochemical staining $\times 200$)

平^[17-18]。这些研究多利用流式细胞术从外周血或脾检测 Treg/Th17 平衡,而没有直接检测骨组织内 Treg/Th17 平衡情况。由于细胞因子主要以自分泌和旁分泌为作用特点,因此,只有直接检测骨组织 Treg/Th17 平衡才能真正反映药物对骨组织 Treg/Th17 平衡的调节作用。但是由于骨组织的特殊组织结构特点,利用流式细胞术检测 Treg/Th17 细胞数量有困难,所以本研究通过免疫组化直接检测骨组织表达 $ROR_{\gamma t}$ 、Foxp3 的细胞数,同时检测骨组织内 IL-10、IL-17A、 $ROR_{\gamma t}$ 和 Foxp3 的基因表达,从细胞数量和细胞功能 2 方面考察壮骨止痛胶囊对骨组织 Treg/Th17 平衡的调节作用。

本研究结果显示,去卵巢骨质疏松大鼠的骨组织内表达 Foxp3 的细胞百分数和 IL-10 水平显著下降,IL-10 和 Foxp3 的 mRNA 表达均显著降低,而表达 $ROR_{\gamma t}$ 的细胞百分数和 IL-17A 水平显著升高,IL-17A 和 $ROR_{\gamma t}$ 的 mRNA 表达均显著增强。表明去卵巢骨质疏松大鼠骨组织内的 Treg 和 Th17 无论在细胞数量,还是在功能方面均处于失衡状态,即 Treg/Th17 平衡偏向于 Th17 发展,诱导骨组织代谢向骨吸收方向发展。戊酸雌二醇和壮骨止痛胶囊均能显著增加去卵巢骨质疏松大鼠骨组织表达 Foxp3 的细胞百分数和 IL-10 水平,增强 IL-10 和 Foxp3 在骨组

织的基因表达,同时降低骨组织表达 $ROR_{\gamma t}$ 的细胞百分数和 IL-17A 水平,抑制 IL-17A 和 $ROR_{\gamma t}$ 在骨组织的基因表达。提示壮骨止痛胶囊能逆转去卵巢骨质疏松大鼠骨组织的 Treg/Th17 失衡。

壮骨止痛胶囊由淫羊藿、补骨脂、女贞子、枸杞子、骨碎补、狗脊、川牛膝 7 味中药组成,具有补益肝肾、活血壮骨止痛作用。方中补骨脂、淫羊藿、女贞子、枸杞子均对免疫功能有调节作用^[19-21]。补骨脂具有类雌激素样作用^[22],淫羊藿、女贞子还可增强雌激素受体 β 的表达^[23]。课题组的拆方研究表明,方中补阳药(淫羊藿、补骨脂、狗脊)和滋阴药(女贞子、枸杞子)能提高去卵巢大鼠体内 E_2 水平和骨组织雌激素受体 β 基因表达,而活血药物(骨碎补、川牛膝)则主要表现为提高骨组织雌激素受体 β 基因表达水平。本实验显示壮骨止痛胶囊对骨组织 Treg/Th17 失衡的纠偏作用与其骨组织 E_2 水平呈正相关,由于免疫细胞均具有雌激素受体,因此,通过作用雌激素信号通路是壮骨止痛胶囊调节骨组织 Treg/Th17 平衡的重要机制之一。

至于壮骨止痛胶囊是否通过雌激素之外的其他途径调节 Treg/Th17 平衡,可通过雌激素合成相关基因敲除动物进行进一步研究。

参考文献:

- [1] JENNEKE KN, RENE FMO, ASTRID DB, et al. Bone cell mechanosensitivity, estrogen deficiency, and osteoporosis [J]. *J Biomech*, 2015, 48(5): 855-865.
- [2] JEAN-PIERRE D. Osteoimmunology: A view from the Bone [J]. *Adv Immunol*, 2007, 95: 149-165.
- [3] FAZZALARI NL. Bone remodeling: A review of the bone microenvironment perspective for fragility fracture(osteoporosis) of the hip [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2008, 2(19): 467-472.
- [4] 潘利平, 曹永平. T 细胞和 B 细胞对骨代谢的影响 [J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*. 2015, 8(1): 63-68.
- [5] PACIFICI R. Estrogen deficiency, T cells and bone loss [J]. *Cell Immunol*, 2008, 25(1-2): 68-80.
- [6] 曾英, 莫新民, 雷晓明, 等. 壮骨止痛胶囊对去卵巢雌鼠骨质疏松症骨密度及相关生化指标的影响 [J]. *湖南中医药大学学报* 2008, 28(2): 10-12.
- [7] 甘国兴, 莫新民, 李劲平, 等. 壮骨止痛方水提 B 部分对去势雌鼠骨质疏松的疗效及机理研究 [J]. *中国中医基础医学杂志* 2011, 17(2): 158-160.
- [8] 李劲平, 林清, 王小静, 等. 壮骨止痛胶囊 A 部分抗骨质疏松有效成分研究 [J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(5): 1049-1051.
- [9] 李劲平, 曾英, 雷晓明, 等. 壮骨止痛胶囊抗实验性绝经后骨质疏松作用的三维组学分析 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(16): 3203-3207.
- [10] 邢健, 鲁光, 刘国强, 等. 多发性骨髓瘤患者骨髓中 Treg/Th17 细胞失衡研究 [J]. *中国血液学杂志*, 2014, 22(5): 1321-1325.
- [11] 牛倩, 黄卓春, 蔡蓓, 等. 类风湿关节炎患者外周血 Th17/Treg 细胞比例失衡的研究 [J]. *细胞与分子免疫学杂志* 2010, 26(3): 267-270.
- [12] 张晶, 付勤. IL-17 在绝经后骨质疏松方面的相关研究 [J]. *中国骨质疏松杂志* 2013, 19(3): 310-313.
- [13] 李文艳. Treg 细胞、炎症细胞与增龄所致骨质疏松症的相关性 [D]. 昆明: 昆明医科大学, 2014.
- [14] HASBY EA, HASBY SAAD MA, SHOHIEB Z, et al. Foxp3⁺ T regulatory cells and immunomodulation after *Schistosoma mansoni* egg antigen immunization in experimental model of inflammatory bowel disease [J]. *Cell Immunol*, 2005(1): 67-76.
- [15] YANG X X, PAPPU B P, NURIEVA R, et al. T helper 17 linear differentiation is programmed by orphan nuclear receptor ROR alpha and ROR gamma [J]. *Immunity*, 2008, 28(1): 29-39.
- [16] AMELIO PD, GRIMALDI A, BELLA SD, et al. Estrogen deficiency increases osteoclastogenesis up-regulating T cells activity: A key mechanism in osteoporosis [J]. *Bone*, 2008, 43(1): 92-100.
- [17] LAI N N, ZHANG Z R, WANG B, et al. Regulatory effect of Traditional Chinese Medicinal Formula Zuo-Gui-Wan on the Th17/Treg paradigm in mice with bone loss induced by estrogen deficiency [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 166: 228-239.
- [18] TALAAT RM, SIDEK A, MOSALEM A, et al. Effect of bisphosphonates treatment on cytokine imbalance between Th17 and Treg in osteoporosis [J]. *Inflammo pharmacol*, 2015, 23(2): 119-125.
- [19] 赖新强, 黄秀艳, 曾耀英. 淫羊藿素、脱水淫羊藿素对 T 淋巴细胞的比较研究 [J]. *暨南大学学报: 自然科学与医学版* 2013, 34(3): 353-358.
- [20] 邱印利, 刘娟. 补骨脂淫羊藿总黄酮对兔成骨细胞增殖及抗氧化作用的影响 [J]. *中国兽医杂志*, 2010, 46(3): 55-57.
- [21] 李王米舛, 丁安伟, 孟丽. 女贞子多糖的免疫调节作用研究 [J]. *中药药理与临床* 2001, 17(2): 11-12.
- [22] 赵丕文, 牛建昭, 王继峰, 等. 异补骨脂素的植物雌激素作用及其机制的探讨 [J]. *中国药理学通报* 2009, 25(9): 1193-1197.
- [23] 蔡晶, 杜建, 曹治云. 补肾中药对雄性大鼠杏仁核和皮质顶叶雌激素受体 mRNA 表达的影响 [J]. *福建中医学院学报* 2006, 16(1): 34-36.

(收稿日期: 2016-01-11)