

## • 研究论文 •

## 桑色素抑制 Th17/Treg 失衡改善小鼠胶原关节炎

缪雨濛, 仲雨乐, 魏志凤\*

(中国药科大学中药学院, 江苏 南京 210000)

**摘要:** 本研究主要考察桑科植物活性成分桑色素对小鼠胶原关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 的影响, 并从恢复免疫平衡的角度初步展开机制探讨。以胶原为诱导剂建立小鼠 CIA 模型, 灌胃给予桑色素, 测定关节炎指数 (arthritis index, AI) 评分, 考察足趾、踝关节影像学和组织病理学变化情况, 测定血清中炎症因子、炎性介质和 IgG 类抗体水平。此外, 测定淋巴结/脾脏中辅助性 T 细胞 17 (T helper 17, Th17) 和调节性 T 细胞 (regulatory T, Treg) 比例及其转录和功能相关因子水平及血清中白细胞介素-17A (interleukin-17A, IL-17A) 和 IL-10 水平。结果显示, 桑色素经由灌胃给药可显著降低关节炎小鼠 AI 评分, 改善足趾关节肿胀和骨损伤, 降低组织病理学评分, 下调血清中炎症因子 [肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、IL-6 和 IL-1 $\beta$ ]、炎性介质 [前列腺素 E<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>)、基质金属蛋白酶-13 (matrix metalloproteinase-13, MMP-13) 和一氧化氮 (nitric oxide, NO)] 和 IgG 类抗体 (IgG 和 IgG2a) 水平。此外, 亦明显下调淋巴结/脾脏中 Th17 细胞比例及其特异性转录因子维甲酸相关孤儿核受体  $\gamma$ t (retinoic acid-related orphan receptor  $\gamma$ t, ROR $\gamma$ t) 和功能性因子 IL-17A、IL-21 和 IL-22 水平, 降低血清中 IL-17A 水平, 对淋巴结/脾脏中 Treg 细胞比例及其特异性转录因子叉头框蛋白 P3 (forkhead box P3, Foxp3) 和功能性因子 IL-10、转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 及血清中 IL-10 水平则呈现明显的上调作用。所有动物实验过程均经过中国药科大学动物伦理委员会批准, 严格遵循中国药科大学实验动物福利规定。综上, 本研究揭示桑色素对 CIA 小鼠的治疗作用, 且机制与恢复 Th17/Treg 平衡相关, 为桑色素的临床应用提供了药理学依据。

**关键词:** 桑色素; 胶原关节炎; 治疗作用; 机制; Th17/Treg 失衡

中图分类号: R967 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)04-1010-07

## Morin inhibits the imbalance of Th17/Treg to alleviate collagen-induced arthritis in mice

MIAO Yu-meng, ZHONG Yu-le, WEI Zhi-feng\*

*(School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210000, China)*

**Abstract:** This study investigated the effect of morin, an active ingredient of the family Moraceae, on collagen-induced arthritis (CIA) in mice, and explored the underlying mechanism from the perspective of recovering immune balance. The collagen was used to induce model of CIA in mice, morin was administered by gavage, and arthritis index (AI) score, imaging and histopathological changes of the paws and ankle joints, and the levels of proinflammatory factors, proinflammatory mediators as well as the IgG class antibodies in serum were detected. In addition, the frequencies of T helper 17 (Th17) and regulatory T (Treg) cells and the levels of relevant transcription factors and functional factors in lymph nodes/spleen as well as the levels of interleukin-17A (IL-17A) and IL-10 in serum were determined. The results showed that oral administration of morin significantly reduced the AI score, improved joint swelling and bone damage, reduced the pathological score, and down-regulated the levels of proinflammatory factors

收稿日期: 2021-09-15; 修回日期: 2021-11-09.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773970); 2019 年江苏高校“青蓝工程”优秀青年骨干教师项目; 中国药科大学 2021 年大学生创新创业计划项目 (202110316068).

\*通讯作者 Tel: 86-25-83271400, E-mail: 1020132346@cpu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1363

[tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-6 and IL-1 $\beta$ ], proinflammatory mediators [prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) and nitric oxide (NO)] and IgG class antibodies (IgG and IgG2a) in serum. Moreover, the percentage of Th17 cells, the expressions of Th17-specific transcription factor retinoic acid-related orphan receptor  $\gamma$ t (ROR $\gamma$ t) and functional factors IL-17A, IL-21 and IL-22 in lymph nodes/spleen, as well as the level of IL-17A in serum were down-regulated, while the percentage of Treg cells, the expressions of Treg-specific transcription factor forkhead box P3 (Foxp3) and functional factors IL-10 and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) in lymph nodes/spleen, as well as the level of IL-10 in serum were up-regulated. All animal treatments were approved by the Animal Ethics Committee of China Pharmaceutical University and strictly followed the welfare regulations of laboratory animals of China Pharmaceutical University. This study indicates the therapeutic effect of morin on mice with CIA, and the mechanism is associated with the improvement of Th17/Treg imbalance, which provides a theoretical basis for the clinical application of morin.

**Key words:** morin; collagen-induced arthritis; therapeutic effect; mechanism; Th17/Treg imbalance

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种常见的自身免疫性疾病, 以滑膜炎、滑膜组织增生、血管翳形成、关节软骨和骨侵蚀等为主要病变特征, 最终可出现进行性的关节破坏, 造成残疾, 严重影响患者的生活质量, 为个人、家庭和社会带来沉重负担<sup>[1-3]</sup>。随着对 RA 病理机制研究的不断深入, 越来越多的证据表明 CD4<sup>+</sup> T 细胞在其中扮演着重要的角色<sup>[4]</sup>。在抗原刺激和特定细胞因子的作用下, naïve CD4<sup>+</sup> T 细胞可分化为不同的亚型, 包括辅助性 T 细胞 1 (T helper 1, Th1)、Th2、Th17 和调节性 T 细胞 (regulatory T, Treg) 等<sup>[5]</sup>。它们在转录因子和功能性因子等层面发生相互作用, 维持着精妙的平衡, 一旦该平衡被破坏, 即可导致机体免疫紊乱。其中, Th17 和 Treg 细胞比例的失衡已被证实参与 RA 的发生和发展。资料显示, RA 患者滑液和外周血中 Th17 细胞比例明显上调, 且与疾病严重程度呈正相关性; Treg 细胞应答则处于相对不足的状态, 且活动期 RA 患者外周血单个核细胞中叉头框蛋白 P3 (forkhead box P3, Foxp3)/维甲酸相关孤儿受体  $\gamma$ t (retinoic acid-related orphan receptor  $\gamma$ t, ROR $\gamma$ t) 比值较非活动期 RA 患者明显降低<sup>[6-8]</sup>。因此, 恢复 Th17/Treg 平衡为 RA 治疗的有效策略。

桑色素 (2',3,4',5,7-pentahydroxyflavone, morin) 是从桑科植物中分离得到的一种黄酮类化合物。现代药理学研究显示, 桑色素具有抗炎、抗氧化、神经保护和抗菌等活性<sup>[9,10]</sup>。此外, 桑色素可显著抑制二丁酸佛波醇酯和离子霉素联用或刀豆蛋白 A 所致 T 细胞活化和增殖, 表明其具有良好的免疫调节作用<sup>[11,12]</sup>。然而, 桑色素对 CIA 小鼠的治疗作用及关节炎状态下 Th17/Treg 失衡的改善作用均未见报道。基于此, 本研究建立胶原诱导的小鼠关节炎模型, 考察桑色素的治疗效果, 并从恢复 Th17/Treg 平衡的角度展开机制初探。

## 材料与方法

**药品与试剂** 桑色素购自南京景竹生物科技有限公司; 来氟米特购自苏州长征-欣凯制药有限公司; 羧甲基纤维素钠购自国药集团化学试剂有限公司; 鸡 II 型胶原购自 Chondrex 公司; 弗氏完全佐剂购自 Sigma 公司; 佛波酯/离子霉素混合物、布雷非德菌素 A/莫能霉素混合物、固定 & 破膜试剂盒、小鼠 IgG ELISA 试剂盒、小鼠 IgG1 ELISA 试剂盒和小鼠 IgG2a ELISA 试剂盒购自杭州联科生物技术股份有限公司; Foxp3/转录因子染色试剂盒、异硫氰酸荧光素 (fluorescence isothiocyanate, FITC) 标记的抗小鼠 CD4 抗体、藻红蛋白 (phycoerythrin, PE) 标记的抗小鼠白细胞介素-17A (interleukin-17A, IL-17A) 抗体、别藻蓝蛋白 (allophycocyanin, APC) 标记的抗小鼠 CD25 抗体和 PE 标记的抗小鼠 Foxp3 抗体购自 eBioscience 公司; 小鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、IL-6 和 IL-1 $\beta$  ELISA 试剂盒购自达科为生物技术股份有限公司; 小鼠前列腺素 E<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>)、基质金属蛋白酶-13 (matrix metalloproteinase-13, MMP-13) ELISA 试剂盒和一氧化氮 (nitric oxide, NO) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所; HiScript™ Q RT SuperMix 和 AceQ™ qPCR SYBR Green Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

**实验仪器** 双蒸纯水仪 (型号: Direct-Q with pump), 美国 Milipore 公司; 超高速冷冻离心机 (型号: 3K-15), 湖南湘西仪器装备有限公司; 逆转录仪 (型号: T100) 和实时荧光定量 PCR 仪 (型号: CFX Connect), 美国 Bio-Rad 公司; Multiskan spectrum 酶标仪 (型号: 1500), 美国 Thermo Fisher 公司; 流式细胞仪 (型号: FACS Calibur), 美国 BD 公司; Micro-CT 成像系统 (型号: SkyScan 1176), Bruker 公司。

**实验动物** 雄性 DBA/1 小鼠, 6~8 周, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司 [动物生产许可证号: SCXK(沪) 2017-0005]。饲养于  $22 \pm 2$  °C 的环境中, 自由摄食和饮水, 适应 3 天后用于后续实验。本研究中动物福利和实验过程均遵循中国药科大学动物伦理委员会的相关规定。

**II 型胶原乳剂配制** 称取 II 型胶原适量, 溶解于  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酸中, 终浓度为  $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。将弗氏完全佐剂与  $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  II 型胶原溶液按体积比 1:1 充分混合, 乳化均匀, 4 °C 短暂保存备用。

**小鼠胶原关节炎模型的建立及后续处理** 将 DBA/1 小鼠随机分组, 选取 1 组为正常组, 其余各组小鼠于尾根部皮内注射 II 型胶原乳剂  $100 \mu\text{L}$  进行初次免疫, 记为第 0 天, 第 21 天尾根部皮内注射 II 型胶原乳剂  $100 \mu\text{L}$  进行二次免疫, 初次免疫后第 28 天小鼠出现明显的继发反应, 根据 AI 评分将小鼠再次随机分组, 分别为模型组、桑色素 ( $20, 40$  和  $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 组和来氟米特 ( $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 组。分组后即开始灌胃给药, 每天 1 次, 连续 14 天。同时, 每天记录各组小鼠全身病变程度, 进行 AI 评分, 评分标准如下<sup>[13,14]</sup>: 0 分: 无红肿; 1 分: 1 个足趾关节红肿; 2 分: 2 个关节受累; 3 分: 2 个以上关节受累; 4 分: 广泛红肿, 出现强直。每只小鼠最高评分为 16 分。初次免疫后第 41 天, 小鼠眼底静脉丛取血, 离心, 收集血清备用; 对小鼠足趾拍摄照片, 随后处死, 取后肢进行 micro-CT 扫描成像; 取踝关节, 石蜡包埋固定, 切片, 进行 H&E 染色和病理评分, 具体观察内容和评分标准如下<sup>[15]</sup>: 病变: ① 滑膜细胞有无受侵蚀 (变性、坏死)、增生; ② 有无炎性细胞浸润; ③ 有无血管翳形成 (由血管和成纤维细胞组成); ④ 有无骨质侵蚀 (关节骨和软骨受到破坏)。评分: 根据各部位病变轻重程度, 依次定量为 0~4 分。1 分 (轻度), 2 分 (中度), 3 分 (重度), 4 分 (极重度), 0 分 (基本正常), 累加所有分数, 分值越高提示病变程度越高。

**血清相关因子检测** 取小鼠血清, 按试剂盒说明书所述方法对 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、PGE<sub>2</sub>、MMP-13、NO、IL-17A 和 IL-10 水平进行测定。

**Th17 和 Treg 细胞比例测定** 取小鼠肠系膜淋巴结和脾脏, 研碎, 分离得到淋巴细胞。

**Th17 细胞比例测定** 在用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基重悬的淋巴细胞悬液中, 加入佛波酯/离子霉素混合物和布雷非德菌素 A/莫能霉素混合物, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下孵育 5 h。随后, 加入 FITC 标记的抗小鼠 CD4 抗体, 4 °C 避光孵育 30 min。按固定 & 破膜试剂盒说明书所述方法加入 Medium A 进行固定。预冷 PBS 缓冲液洗涤后加入 Medium B 和 PE 标

记的抗小鼠 IL-17A 抗体, 4 °C 避光孵育 1 h, 再次洗涤后重悬于预冷 PBS 缓冲液中, 采用流式细胞术测定 Th17 (CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>) 细胞比例。

**Treg 细胞比例测定** 在用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基重悬的淋巴细胞悬液中, 加入 FITC 标记的抗小鼠 CD4 抗体和 APC 标记的抗小鼠 CD25 抗体, 4 °C 避光孵育 30 min。预冷的 PBS 缓冲液洗涤后加入 Foxp3/转录因子染色试剂盒中的固定/破膜试剂, 4 °C 避光孵育 5 h。随后, 加入破膜缓冲液 (1 $\times$ ) 洗涤细胞, 并重悬于破膜缓冲液 (1 $\times$ ) 中。加入 PE 标记的抗小鼠 Foxp3 抗体, 4 °C 避光孵育 1 h。预冷 PBS 缓冲液洗涤细胞并重悬后采用流式细胞术测定 Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) 细胞比例。

**mRNA 水平测定** 取小鼠肠系膜淋巴结和脾脏, 分别提取总 RNA 并将其逆转录为 cDNA。随后, 采用 Q-PCR 法测定 ROR $\gamma$ t、IL-17A、IL-21、IL-22、Foxp3、IL-10 和 TGF- $\beta$  mRNA 水平。相关引物序列如表 1 所示。

**Table 1** Primers used in Q-PCR. ROR $\gamma$ t: Retinoic acid-related orphan receptor  $\gamma$ t; IL: Interleukin; Foxp3: Forkhead box P3; TGF- $\beta$ : Transforming growth factor- $\beta$

Gene		Sequence (5'-3')
$\beta$ -Actin	Forward	ATCACTATTGGCAACGAGCGGTTTC
	Reverse	CAGCACTGTGTTGGCATAGAGGTC
ROR $\gamma$ t	Forward	TACCCTACTGAGGACAGG
	Reverse	CCACATTACACTGCTGGCTG
IL-17A	Forward	TACCTCAACCGTCCACGTC
	Reverse	TTCCCAACCGCATTGACACA
IL-21	Forward	TGGATCCTGAACTTCTATCAGC
	Reverse	CACGAGGTCAATGATGAATGTC
IL-22	Forward	GCAGATAACAACACAGATGTCC
	Reverse	GTCTTCCAGGGTGAAGTTGAG
Foxp3	Forward	TTTACCTATGCCACCCTTATC
	Reverse	CATGCGAGTAAACCAATGGTAG
IL-10	Forward	TTCTTTCAAACAAAGGACCAGC
	Reverse	GCAACCCAAGTAACCCTTAAAG
TGF- $\beta$	Forward	AGCTGCCCTTGACAGATTA
	Reverse	CAGCCACTCAGGCGTATCAG

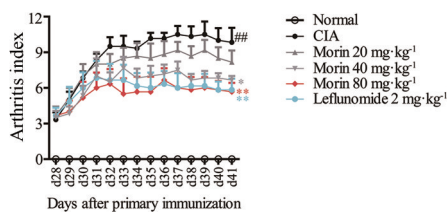
**统计学方法** 采用 SPSS 软件进行数据分析, 所有结果均以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。两组间比较采用 *t* 检验方法; 多组间比较采用 one-way ANOVA 方法。若方差非齐性, 则进一步采用非参数检验。  $P < 0.05$  表示有显著性差异。

## 结果

### 1 对小鼠胶原关节炎的抑制作用

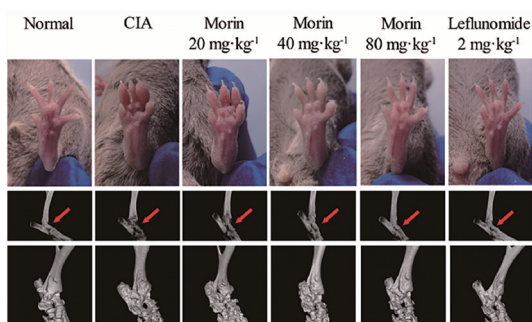
**1.1 对 AI 评分的影响** 如图 1 所示, 于初次免疫后第 28 天至第 41 天, CIA 小鼠全身关节呈现不同程度的红肿,

AI评分逐渐升高后趋于平缓。桑色素 (40 和 80 mg·kg<sup>-1</sup>) 显著改善 CIA 小鼠疾病症状, 降低 AI 评分, 且剂量为 80 mg·kg<sup>-1</sup> 时作用与阳性药来氟米特 (2 mg·kg<sup>-1</sup>) 相当。

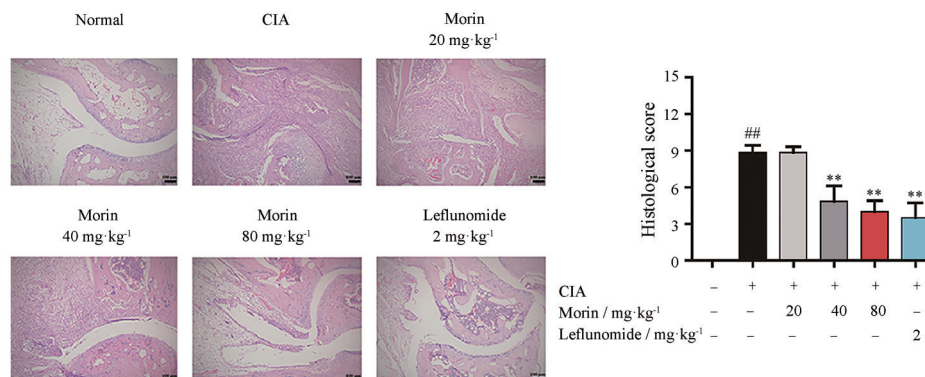


**Figure 1** Effect of morin on the arthritis index (AI) score in collagen-induced arthritis (CIA) mice.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ .  $^{###}P < 0.01$  vs normal group;  $^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  vs CIA group (model group)

**1.2 对足趾和关节影像学变化的影响** 如图 2 所示, 初次免疫后第 41 天, CIA 小鼠与正常小鼠相比足趾明显肿胀。桑色素 (40 和 80 mg·kg<sup>-1</sup>) 和来氟米特 (2 mg·kg<sup>-1</sup>) 灌胃给药呈现良好的抑制作用。此外, micro-CT 三维重建结果显示, 正常小鼠踝关节表面光滑、外形完整, CIA 小鼠踝关节表面凹凸不平、外形不完整, 表明与正常小鼠相比, CIA 小鼠踝关节骨质侵蚀严重, 关节完整性受到破坏。桑色素 (40 和 80 mg·kg<sup>-1</sup>) 和来氟米特 (2 mg·kg<sup>-1</sup>) 组小鼠踝关节表面粗糙程度减轻, 关节外形较完整, 骨损伤得到明显改善。



**Figure 2** Representative photo and micro-CT imaging of the paws and ankle joints



**Figure 3** Effect of morin on the histological changes of ankle joints in CIA mice. Scale bars: 100  $\mu\text{m}$ .  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ .  $^{###}P < 0.01$  vs normal group;  $^{**}P < 0.01$  vs CIA group

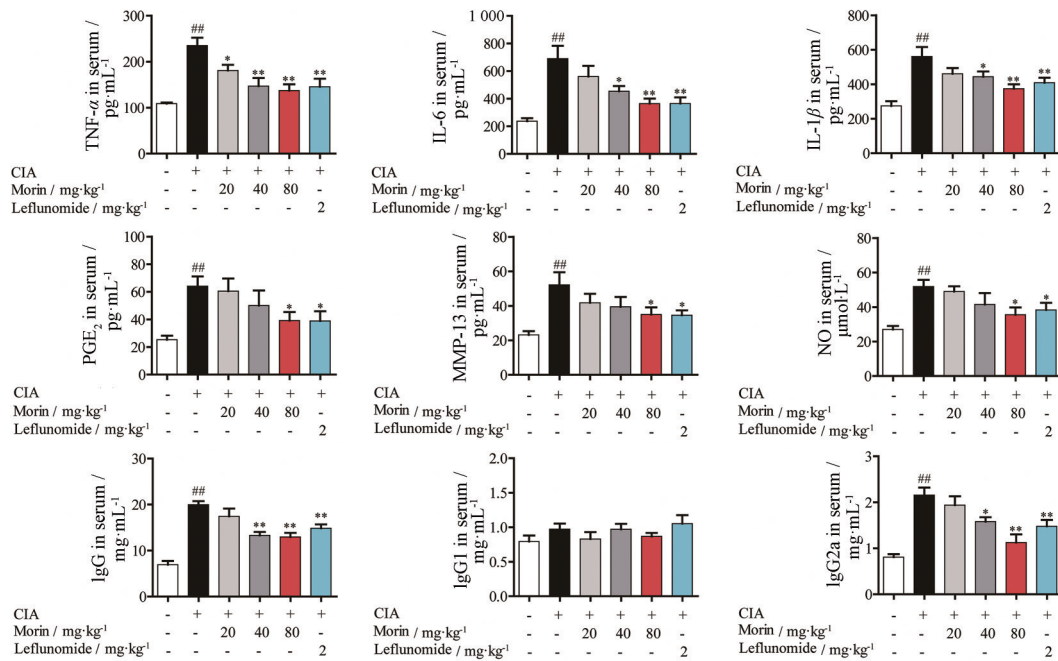
**1.3 对踝关节组织病理学改变的影响** 如图 3 所示, 正常组小鼠关节表面被覆薄层透明软骨, 无血管翳形成, 细胞排列整齐、表面光滑。关节骨、软骨无破坏, 滑膜组织无变性、坏死, 未见充血、水肿和炎细胞浸润; 模型组滑膜细胞变性、坏死, 滑膜组织内有不同程度的炎性细胞浸润和肉芽组织增生。关节骨和软骨受到明显破坏, 关节腔狭窄。桑色素 (40 和 80 mg·kg<sup>-1</sup>) 和来氟米特 (2 mg·kg<sup>-1</sup>) 明显减少炎性细胞浸润和滑膜增生, 减轻软骨和骨的损伤。

**1.4 对血清炎症因子、炎症介质和 IgG 类抗体水平的影响** 如图 4 所示, 与正常小鼠相比, CIA 小鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、PGE<sub>2</sub>、MMP-13、NO、IgG 和 IgG2a 水平明显升高, IgG1 水平无明显变化。桑色素 (80 mg·kg<sup>-1</sup>) 和来氟米特 (2 mg·kg<sup>-1</sup>) 对血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、PGE<sub>2</sub>、MMP-13、NO、IgG 和 IgG2a 水平均具有显著的下调作用, 对 IgG1 水平则无明显影响。

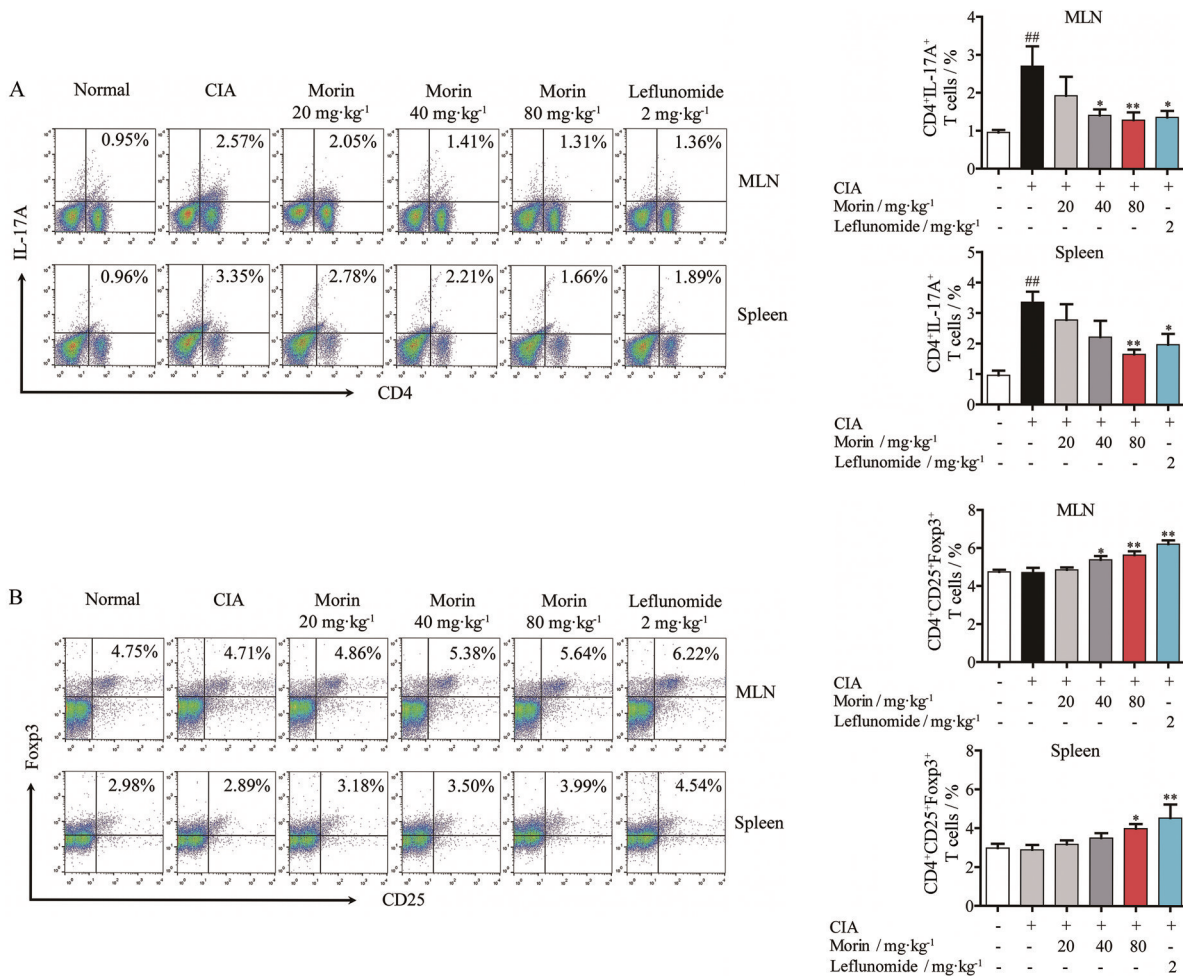
## 2 对胶原关节炎小鼠 Th17/Treg 失衡的改善作用

**2.1 对 Th17 和 Treg 细胞比例的影响** 如图 5 所示, CIA 小鼠肠系膜淋巴结和脾脏中 Th17 细胞比例明显升高, 桑色素 (80 mg·kg<sup>-1</sup>) 对此呈现抑制作用, 且作用强度与来氟米特相当。此外, 桑色素 (80 mg·kg<sup>-1</sup>) 能够明显升高肠系膜淋巴结和脾脏中 Treg 细胞比例。

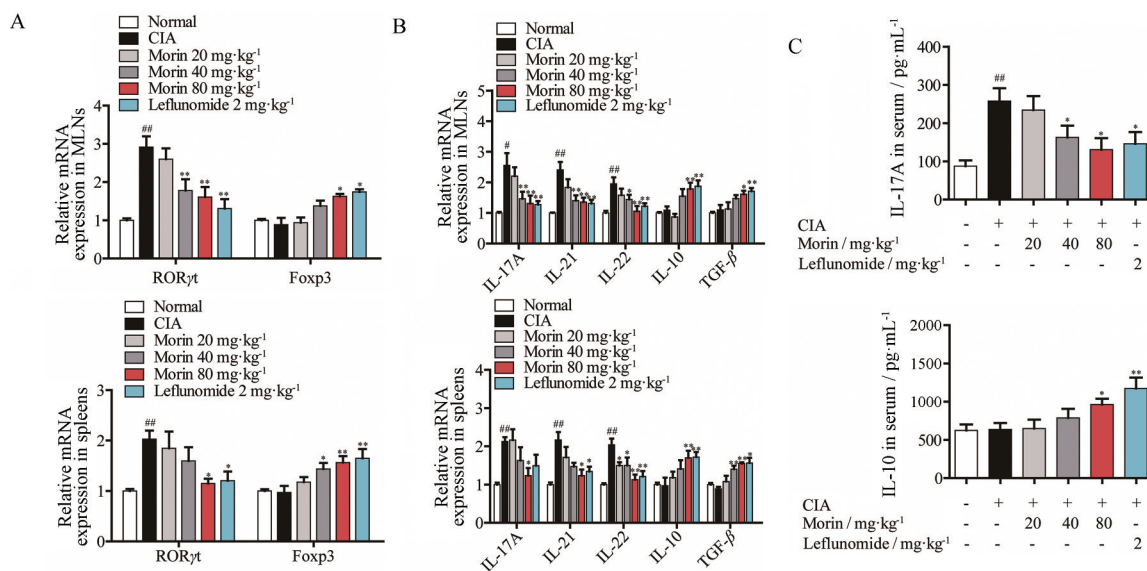
**2.2 对 Th17 和 Treg 细胞相关因子水平的影响** 如图 6 所示, CIA 小鼠淋巴结/脾脏中 Th17 特异性转录因子 ROR $\gamma$ t 及功能性因子 IL-17A、IL-21 和 IL-22 的 mRNA 水平较正常小鼠明显升高, 而 Treg 特异性转录因子 Foxp3 及功能性因子 IL-10 和 TGF- $\beta$  的 mRNA 水平与正常小鼠相当。桑色素 (80 mg·kg<sup>-1</sup>) 灌胃给药可明显下调 CIA 小鼠淋巴结/脾脏中 ROR $\gamma$ t、IL-17A、IL-21 和 IL-22 mRNA 水平, 上调 Foxp3、IL-10 和 TGF- $\beta$  mRNA 水平。此外, 桑色素 (80 mg·kg<sup>-1</sup>) 可显著下调 CIA 小鼠血清中 IL-17A 水平, 上调 IL-10 水平。



**Figure 4** Effect of morin on the levels of proinflammatory factors, proinflammatory mediators and IgG class antibodies in CIA mice.  $n = 6, \bar{x} \pm s$ . <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs normal group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs CIA group



**Figure 5** Effect of morin on the frequencies of Th17 and Treg cells in CIA mice. A: The frequencies of Th17 cells in mesenteric lymph nodes (MLNs) and spleen; B: The frequencies of Treg cells in MLNs and spleen.  $n = 6, \bar{x} \pm s$ . <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs normal group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs CIA group



**Figure 6** Effect of morin on the levels of Th17- and Treg-related factors in CIA mice. A: The mRNA expression levels of ROR $\gamma$ t and Foxp3 in MLNs and spleen; B: The mRNA expression levels of IL-17A, IL-21, IL-22, IL-10 and TGF- $\beta$  in MLNs and spleen; C: The levels of IL-17A and IL-10 in serum.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs normal group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs CIA group

### 讨论

RA为一种慢性自身免疫性疾病,主要表现为对称性多关节炎性病变,伴有晨僵、乏力和体重减轻等。除此之外,RA患者常出现累及全身多个器官的系统性综合征,如血管炎和间质性肺病等<sup>[16,17]</sup>。临床上用于RA的治疗药物主要包括非甾体抗炎药、类固醇激素、缓解病情的抗风湿药和生物制剂等。然而,上述药物仍存在诸多不足,如易引起胃肠道反应、视网膜病变和肝肾功能损害等不良反应,较高剂量或频繁的给药模式亦导致高治疗成本,无法切实满足患者的治疗需求<sup>[18,19]</sup>。因此,开发新型安全有效且价格低廉的RA治疗药物迫在眉睫。

由于建立合理的动物模型为筛选潜在疾病治疗药物的关键,研究人员对RA的动物模型进行了大量的探究。目前比较成熟和稳定的模型包括:佐剂诱导的关节炎模型、II型胶原诱导的关节炎模型、链球菌细胞壁诱导的关节炎模型、软骨寡聚基质蛋白诱导的关节炎模型、降植烷诱导的关节炎模型及转基因动物关节炎模型等<sup>[20]</sup>。上述模型各有优缺点,但II型胶原诱导的小鼠关节炎模型为使用最广泛的模型,尤其适用于免疫相关性研究<sup>[21]</sup>。在前期研究,本课题组通过建立弗氏完全佐剂诱导的大鼠关节炎模型,初步揭示了桑色素对RA的改善作用<sup>[10]</sup>。本研究则通过建立II型胶原诱导的小鼠关节炎模型,进一步明确桑色素在RA治疗中的潜力。结果显示,桑色素(20、40、80 mg·kg<sup>-1</sup>)灌胃给药,可剂量依赖性改善II型胶原所致小鼠关节炎疾病症状,且80 mg·kg<sup>-1</sup>桑色素的作用与阳性药来氟

米特(2 mg·kg<sup>-1</sup>)相当。

在RA发生发展过程中,普遍认为CD4<sup>+</sup>T细胞介导的免疫应答异常发挥着关键性作用。其中,Th17细胞受转录因子ROR $\gamma$ t调控,通过分泌IL-17A、IL-21和IL-22等,刺激滑膜成纤维细胞和巨噬细胞产生IL-6和TNF- $\alpha$ 等炎症因子,诱发滑膜炎,且能够促进破骨细胞形成、增强MMPs表达,引起软骨和骨破坏。相反,Treg细胞具有免疫抑制活性,可通过直接接触或分泌IL-10和TGF- $\beta$ 等抑制性因子,拮抗包括Th17细胞在内的炎性细胞的功能,发挥抗炎和维持免疫耐受的作用<sup>[6-8]</sup>。基于恢复Th17/Treg平衡在RA治疗中的重要意义,本研究从免疫调节角度进一步探究了桑色素改善小鼠CIA的机制。研究发现,桑色素(80 mg·kg<sup>-1</sup>)可显著下调Th17细胞比例、抑制其相关因子的表达及分泌,显著上调Treg细胞比例,对Treg相关因子表达及分泌亦具有明显的促进作用,表明桑色素可恢复CIA小鼠中Th17和Treg细胞的平衡。

综上所述,在一定剂量范围内,桑色素对小鼠CIA具有良好的治疗效果,且机制与改善Th17/Treg失衡相关。

**作者贡献:** 缪雨濛负责完成实验和论文撰写工作;仲雨乐参与部分实验的实施工作;魏志凤负责实验指导和论文修改工作。

**利益冲突:** 本研究与任何组织和个人均无利益冲突。

### References

[1] Sparks JA. Rheumatoid arthritis [J]. Ann Intern Med, 2019, 170: ITC1-ITC16.

- [2] Li P, Schwarz EM. The TNF-alpha transgenic mouse model of inflammatory arthritis [J]. Springer Semin Immunopathol, 2003, 25: 19-33.
- [3] Burmester GR, Pope JE. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis [J]. Lancet, 2017, 389: 2338-2348.
- [4] Lin YJ, Anzaghe M, Schülke S. Update on the pathomechanism, diagnosis, and treatment options for rheumatoid arthritis [J]. Cells, 2020, 9: 880.
- [5] Jiang Y, Wang X, Dong C. Molecular mechanisms of T helper 17 cell differentiation: emerging roles for transcription cofactors [J]. Adv Immunol, 2019, 144: 121-153.
- [6] Yang P, Zhang M, Wang X, et al. MicroRNA let-7g-5p alleviates murine collagen-induced arthritis by inhibiting Th17 cell differentiation [J]. Biochem Pharmacol, 2020, 174: 113822.
- [7] Jin S, Chen H, Li Y, et al. Maresin 1 improves the Treg/Th17 imbalance in rheumatoid arthritis through miR-21 [J]. Ann Rheum Dis, 2018, 77: 1644-1652.
- [8] Yang P, Qian FY, Zhang MF, et al. Th17 cell pathogenicity and plasticity in rheumatoid arthritis [J]. J Leukoc Biol, 2019, 106: 1233-1240.
- [9] Caselli A, Cirri P, Santi A, et al. Morin: a promising natural drug [J]. Curr Med Chem, 2016, 23: 774-791.
- [10] Yang L, Cao N, Miao Y, et al. Morin acts as a USP7 inhibitor to hold back the migration of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes in a "Prickle1-mTORC2" dependent manner [J]. Mol Nutr Food Res, 2021, 65: e2100367.
- [11] Zang N, Zeng YY, Huang XY, et al. The effect of morin on activation, proliferation and cell-cycle of murine T lymphocytes *in vitro* [J]. Chin J Cell Mol Immunol (细胞与分子免疫学杂志), 2007, 23: 197-200.
- [12] Zang N, Zeng YY, Ji YH, et al. The effect of morin on proliferation and cell-cycle of mouse T lymphocytes and NO secretion by macrophages [J]. J Jinan Univ (Med Ed) (暨南大学学报 (医学版)), 2007, 28: 341-344.
- [13] Xin W, Huang C, Zhang X, et al. Methyl salicylate lactoside inhibits inflammatory response of fibroblast-like synoviocytes and joint destruction in collagen-induced arthritis in mice [J]. Br J Pharmacol, 2014, 171: 3526-3538.
- [14] Tang KT, Lin CC, Lin SC, et al. Kurarinone attenuates collagen-induced arthritis in mice by inhibiting Th1/Th17 cell responses and oxidative stress [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22: 4002.
- [15] Yue M, Tao Y, Fang Y, et al. The gut microbiota modulator berberine ameliorates collagen-induced arthritis in rats by facilitating the generation of butyrate and adjusting the intestinal hypoxia and nitrate supply [J]. FASEB J, 2019, 33: 12311-12323.
- [16] Assayag D, Lee JS, King TE Jr. Rheumatoid arthritis associated interstitial lung disease: a review [J]. Medicina (B Aires), 2014, 74: 158-165.
- [17] Liao KP. Cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis [J]. Trends Cardiovasc Med, 2017, 27: 136-140.
- [18] Wasserman AM. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis [J]. Am Fam Physician, 2011, 84: 1245-1252.
- [19] Pirmardvand Chegini S, Varshosaz J, Taymouri S. Recent approaches for targeted drug delivery in rheumatoid arthritis diagnosis and treatment [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2018, 46: 502-514.
- [20] Xia Q, Ji YT, Liu HL, et al. Research progress on animal models of rheumatoid arthritis [J]. Chin J Comp Med (中国比较医学杂志), 2020, 30: 107-113.
- [21] Li AM, Li XJ, Li RS. Research progress of small animal models of rheumatoid arthritis [J]. Chin J Comp Med (中国比较医学杂志), 2021, 31: 151-156.