

·实验研究·

本文引用: 刘鑫鑫, 田松云, 崔建博, 葛 炎, 张国斌. 薏苡仁汤对寒湿痹阻型胶原性关节炎大鼠 Treg/Th17 细胞失衡的调节作用[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(3): 395–401.

## 薏苡仁汤对寒湿痹阻型胶原性关节炎大鼠 Treg/Th17 细胞失衡的调节作用

刘鑫鑫<sup>1</sup>, 田松云<sup>2</sup>, 崔建博<sup>1</sup>, 葛 炎<sup>1</sup>, 张国斌<sup>1\*</sup>

1.河南中医药大学, 河南 郑州 450046; 2.许昌仁和骨伤医院, 河南 许昌 461000

〔摘要〕目的 观察薏苡仁汤对寒湿痹阻型胶原性关节炎(CIA)大鼠的防治作用,探讨其对调节性T细胞(Treg)、辅助性T细胞17(Th17)的影响。方法 采用Ⅱ型胶原注射联合气候箱模拟寒湿环境的方法进行造模,大鼠随机分为空白组、模型组、阳性组(来氟米特 10 mg/kg)及薏苡仁汤低、高剂量组(生药量分别为 12、24 g/kg),每组 8 只。每日观察大鼠的整体情况,每周测量右后足的关节肿胀度。给药 4 周后,光学显微镜下观察踝关节切片的组织病理学;ELISA 法检测疾病活动度指标类风湿因子(RF)、抗环瓜氨酸肽抗体(ACPA)、C 反应蛋白(CRP)、血清转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )及白细胞介素-17A(IL-17A)水平;流式细胞术检测外周血中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞、CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> Th17 细胞所占 CD4<sup>+</sup>T 细胞的比例。结果 模型组大鼠整体情况符合寒湿痹阻型 CIA 的典型症状,关节可见强直、畸形、活动功能受限等现象;薏苡仁汤低、高剂量组大鼠整体情况和关节症状有所改善,关节肿胀度在给药 3、4 周时较模型组降低( $P<0.01$ )。给药 4 周后,与模型组比较,薏苡仁汤低、高剂量组踝关节在炎性细胞浸润、滑膜/纤维组织增生、骨和软骨结构破坏等方面均有不同程度的改善,血清 RF、ACPA、CRP 水平均降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),外周血 Treg 细胞比例及其标志性细胞因子 TGF- $\beta$  水平升高( $P<0.01$ ),Th17 细胞比例及其标志性细胞因子 IL-17A 水平降低( $P<0.01$ )。薏苡仁汤高剂量组血清 TGF- $\beta$  水平较薏苡仁汤低剂量组增高( $P<0.05$ ),其他指标两组间差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 薏苡仁汤可改善寒湿痹阻型 CIA 大鼠的整体情况及关节症状,其作用机制可能与调节 Treg/Th17 细胞间的免疫失衡状态、减轻关节组织和全身的炎性反应、缓解关节软骨和骨的破坏等有关。

〔关键词〕 胶原性关节炎;寒湿痹阻证;薏苡仁汤;调节性T细胞;辅助性T细胞 17;转化生长因子- $\beta$ ;白细胞介素-17A

〔中图分类号〕R285.5

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.03.001

## Regulatory effects of Yiyiren Decoction on Treg/Th17 cell imbalance in rats with collagen-induced arthritis of cold-dampness obstruction pattern

LIU Xinxin<sup>1</sup>, TIAN Songyun<sup>2</sup>, CUI Jianbo<sup>1</sup>, GE Yan<sup>1</sup>, ZHANG Guobin<sup>1\*</sup>

1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan 450046, China;

2. Xuchang Renhe Orthopedic Hospital, Xuchang, Henan 461000, China

〔Abstract〕Objective To observe the preventive and therapeutic effects of Yiyiren Decoction (YYRD) on collagen-induced arthritis (CIA) rats with cold-dampness obstruction pattern, and to investigate its impact on regulatory T cells (Treg) and T helper cell 17 (Th17) cells. Methods A rat model was established by injecting type II collagen combined with exposure to a climate

〔收稿日期〕2024-08-16

〔基金项目〕河南省高校科技创新人才支持计划项目(15HASTIT041)。

〔通信作者〕\* 张国斌,男,博士,副教授,E-mail:z-g-b@126.com。

chamber simulating a cold-dampness environment. Rats were randomly divided into blank group, model group, positive control group (leflunomide 10 mg/kg), and low- and high-dose YYRD groups (12 g/kg and 24 g/kg raw medicines, respectively), with eight rats in each group. The overall situation signs of the rats were observed daily, and the joint swelling in the right hind paw was measured weekly. After four weeks of administration, the histopathological changes in ankle joint sections were observed under an optical microscope. ELISA was used to determine the levels of rheumatoid factor (RF), anti-cyclic citrullinated peptide antibody (ACPA), C-reactive protein (CRP), serum transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), and interleukin-17A (IL-17A), which are indicators of disease activity. Flow cytometry was used to check the proportions of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg cells and CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> Th17 cells among CD4<sup>+</sup> T cells in peripheral blood. **Results** The overall situation signs of the rats in the model group were consistent with CIA of cold-dampness obstruction pattern, with visible joint stiffness, deformity, and limited mobility. The overall situation and joint symptoms of the rats in the low- and high- dose YYRD groups were alleviated, and the degree of joint swelling was lower than that in the model group at three and four weeks after administration ( $P<0.01$ ). After four weeks of administration, compared with the model group, both the low- and high-dose YYRD groups showed varying degrees of reduction in ankle joint inflammatory cell infiltration, synovial/fibrous tissue hyperplasia, and bone and cartilage structure damage. The serum levels of RF, ACPA, and CRP were all reduced ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), the proportion of Treg cells in peripheral blood and the level of their signature cytokine TGF- $\beta$  increased ( $P<0.01$ ), and the proportion of Th17 cells and the level of their signature cytokine IL-17A decreased ( $P<0.01$ ). The serum level of TGF- $\beta$  in the high-dose YYRD group was higher than that in the low-dose YYRD group ( $P<0.05$ ), with no statistically significant differences in other indicators between the two groups ( $P>0.05$ ). **Conclusion** YYRD can relieve the overall situation signs and joint symptoms of rats with CIA of cold-dampness obstruction pattern. Its mechanism of action may be related to regulating the immune imbalance between Treg/Th17 cells, reducing inflammatory reactions in joint tissue and the whole body, and alleviating bone and cartilage damage.

[**Keywords**] collagen-induced arthritis; cold-dampness obstruction pattern; Yiyiren Decoction; regulatory T cells; T helper cell 17; transforming growth factor- $\beta$ ; interleukin-17A

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是以滑膜炎症、增生、软骨破坏和骨侵蚀等关节病变为主的慢性自身免疫性疾病,目前难以治愈,关节功能受限及残疾发生率高<sup>[1]</sup>。中医药凭借其整体观念、辨证论治的自身优势,在难治病、慢性病的诊疗领域发挥重要作用<sup>[2-3]</sup>。薏苡仁汤出自皇甫中的《明医指掌·痹证》,是经典的除湿痹方剂,临床用于寒湿痹阻型 RA 疗效确切,可显著改善患者的关节疼痛、肿胀、晨僵等症状,且具备较好的安全性<sup>[4-5]</sup>。研究显示,RA 患者体内存在调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)、辅助性 T 细胞 17(T helper cell 17, Th17)的免疫失衡状态及其标志性细胞因子转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、白细胞介素-17A(interleukin-17A, IL-17A)的表达异常<sup>[6]</sup>。寒湿痹阻型 RA 患者的 Treg/Th17 细胞及血清 TGF- $\beta$ 、IL-17A 水平亦存在异常表达现象<sup>[7-8]</sup>。本研究从调控 Treg/Th17 细胞比例及 TGF- $\beta$ 、IL-17A 表达等角度出发,在胶原性关节炎(collagen induced arthritis, CIA)模型基础上诱导寒湿痹阻证型,以探讨薏苡仁汤的治疗效果和作用机制。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

健康 SPF 级 SD 大鼠 40 只,雌性,体质量(170 $\pm$ 10) g,由郑州市惠济区华兴实验动物养殖场提供,许可证号:SCXK(豫)2019-0002。置于河南中医药大学动物房屏障环境,明暗光照 12 h:12 h,温度 20~23 ℃,相对湿度 60%~70%,饲喂常规灭菌饲料及纯水。实验动物相关操作严格遵循河南中医药大学伦理委员会规定(审批号:HUCM-210049)。

### 1.2 药物和主要试剂

薏苡仁汤(组方:薏苡仁 30 g,白芍、苍术、当归各 12 g,川芎、独活、羌活、防风各 10 g,麻黄、桂枝、生姜各 8 g,甘草 6 g),饮片由河南中医药大学第二附属医院中药房提供,制成生药含量 1.2 g/mL 的水煎液。来氟米特片(商品名:爱若华,苏州长征欣凯制药有限公司,规格:10 mg/片,批号:210901)。

牛 II 型胶原蛋白(美国 Chondrex 公司,批号:CA20022);弗氏完全佐剂(美国 Sigma-Aldrich 公司,货号:F5881,含热灭活结核分枝杆菌 1 mg/mL);10%

甲醛固定液(货号:ABS9179)、淋巴细胞分离液(货号:ABS930)、RPMI-1640 培养液(货号:ABS9468)、HE 染色试剂盒(批号:220407)均购自爱必信(上海)生物科技有限公司;大鼠类风湿因子(rheumatoid factor, RF)、抗环瓜氨酸肽抗体(anti-cyclic citrullinated peptide antibody, ACPA)、C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、TGF- $\beta$ 、IL-17A ELISA 试剂盒(上海雅吉生物科技有限公司,批号:20220109、20220315、20220320、20220526、20220528);FITC 标记的抗鼠 CD4 抗体(anti-CD4 FITC)、PE 标记的抗鼠 CD25 抗体(anti-CD25 PE)、PE 标记的抗鼠 IL-17 抗体(anti-IL-17 PE)、APC 标记的抗鼠 Foxp3 抗体(anti-Foxp3 APC)(美国 Becton Dickinson 公司,批号:18-4651-73、16-9201-82、16-2553-82、17-6810-81)。

### 1.3 主要仪器

3112 型微量移液器、5418R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);BIC-300 型人工气候箱(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司);NEO-9 型动物标记仪(深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司);BW-PVM802 型足趾容积测量仪(上海软隆科技发展有限公司);H-100 型数字式动物体温计(上海玉研科学仪器有限公司);XHF-DY 型高速分散器(宁波新芝生物科技股份有限公司);BC/BD-200GHEPG 型超低温冰箱(海尔智家股份有限公司);6749 型细胞计数仪(美国 Corning 公司);DSZ-44LS-FN 型光学显微镜(日本 Carton 光学株式会社);xMark 型酶联免疫检测仪(美国 Bio-Rad 公司);BD FACS Aria III 型流式细胞检测仪(美国 Becton Dickinson 公司)。

## 2 方法

### 2.1 寒湿痹阻型 CIA 模型的建立

参照文献[9]的方法,采用Ⅱ型胶原联合气候箱的方法造模。将牛Ⅱ型胶原蛋白溶于 0.1 mol/L 的冰醋酸中配成 2 mg/mL 溶液,4℃过夜后,与等体积弗氏完全佐剂混合,置于冰上 3 000 r/min(离心半径 10 cm)高速离心分散搅拌,以充分乳化,制成Ⅱ型胶原乳剂(含牛Ⅱ型胶原蛋白 1 mg/mL、热灭活结核分枝杆菌 0.5 mg/mL)。于每只大鼠的右后足

趾垫处及尾根部消毒,多点皮内注射Ⅱ型胶原乳剂 0.1 mL;初次免疫 1 周后,于大鼠尾根部再次皮内注射Ⅱ型胶原乳剂 0.1 mL 以激发免疫。从初次免疫开始,每日将大鼠置于温度( $5\pm 1$ )℃、湿度  $85\%\pm 5\%$  的人工气候箱内,每次时长 4 h,持续 5 周,以诱导寒湿痹阻证型。造模后期,模型组大鼠均表现出寒湿痹阻证的典型症状且关节炎指数 $\geq 4$ 分,确定模型建立成功<sup>[10]</sup>。

### 2.2 分组和干预

初次免疫 1 周后,将造模大鼠随机分为 4 组( $n=8$ ):模型组(等体积溶媒)、阳性组(来氟米特 10 mg/kg)<sup>[11]</sup>及薏苡仁汤低、高剂量组(按人体表面积换算成大鼠等效剂量,生药量分别为 12、24 g/kg,相当于人用剂量的 6 倍、12 倍<sup>[12]</sup>)。另取未造模的正常大鼠 8 只,作为空白组(等体积溶媒)。各组灌胃干预,每日 1 次,持续 4 周。

### 2.3 观察指标

**2.3.1 整体情况** 初次免疫后,参照中医证候动物模型评价方法<sup>[13]</sup>,每日观察大鼠的整体情况,包括精神状态、活动量、大小便、舌象、皮毛光泽度、关节活动功能等,定期称取大鼠体质量、摄食量并通过数字式体温计探头测量其足掌温度。

**2.3.2 关节肿胀度** 造模前,在大鼠踝关节处做永久性标记,采用水容积法测量右后足容积;造模后(自给药前至给药 4 周),每周测量 1 次右后足容积,每次测量 3 次取均值。关节肿胀度按下列公式计算:关节肿胀度=(造模后容积-造模前容积)/造模前容积 $\times 100\%$ 。

**2.3.3 疾病活动度指标及细胞因子水平** 末次给药后,各组禁食不禁水 12 h,将大鼠麻醉,腹主动脉采血,4℃下静置 1 h,3 500 r/min 低温离心 15 min(离心半径 15 cm),收集血清。按 ELISA 试剂盒操作步骤,采用酶联免疫检测仪在 450 nm 波长处测定吸光度值,根据标准曲线回归方程计算血清 RF、ACPA、CRP、TGF- $\beta$  及 IL-17A 水平。

**2.3.4 关节组织病理学** 将大鼠处死后,取右后踝关节,置于 10%甲醛液固定 48 h,行石蜡包埋、关节矢状面切片(厚度约 5  $\mu$ m)、HE 染色、制片,光学显微镜下观察滑膜/纤维组织增生、炎性细胞浸润、骨结构破坏等病理变化。

**2.3.5 外周血 Treg、Th17 细胞比例** 自大鼠腹主

动脉采集新鲜的外周血,抗凝处理后,常规密度梯度离心法分离得到单核细胞,用 RPMI-1640 培养基洗涤单核细胞并调整浓度为  $1\times 10^7$  个细胞/mL。取 100  $\mu$ L 单核细胞悬液,加入 anti-CD25 PE 和(或) anti-CD4 FITC 染色,4  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,固定、破膜、洗涤,加入 anti-IL-17 PE 或 anti-Foxp3 APC 染色,4  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,洗涤,用 RPMI-1640 培养基重悬细胞,采用流式细胞仪检测分析。Treg 细胞比例表示为 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>细胞所占CD4<sup>+</sup> T 细胞的百分比,Th17 细胞比例表示为 CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>细胞所占 CD4<sup>+</sup> T 细胞的百分比。

2.4 统计学方法

数据导入 SPSS 22.0 软件进行处理,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较方差齐者采用 SNK 检验,同一指标的不同时段比较采用重复测量方差分析。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 薏苡仁汤对寒湿痹阻型 CIA 大鼠整体情况的影响

空白组大鼠表现正常,体质量平稳增长。初次免疫后,寒湿痹阻证型诱导期间,模型组大鼠表现出明显的精神萎靡、少动、便溏、舌质紫黯、皮毛无

光泽等症状,摄食量减少,体质量增长缓慢,足掌温度降低;初次免疫后 9~11 d 开始发病,后足首先出现炎性反应,逐渐累及前足及尾根部,后期关节有强直、畸形及活动功能受限等现象。各用药组大鼠上述体征及关节症状均有不同程度的改善。试验期间各组大鼠无死亡现象。

3.2 薏苡仁汤对寒湿痹阻型 CIA 大鼠关节肿胀度的影响

空白组大鼠足爪正常发育,无肿胀现象。与空白组比较,模型组关节肿胀度自造模后至给药 4 周均显著增大( $P<0.01$ )。与模型组比较,阳性组自给药 2 周后关节肿胀度显著减小( $P<0.05$ , $P<0.01$ );薏苡仁汤低、高剂量组关节肿胀度给药 3、4 周时显著减小( $P<0.01$ )。详见表 1。

3.3 薏苡仁汤对寒湿痹阻型 CIA 大鼠踝关节组织病理学的影响

空白组踝关节组织结构正常,无明显病理改变。模型组踝关节切片可见大量炎性细胞浸润、滑膜明显充血水肿、纤维组织过度增生、骨和软骨结构不完整等现象。阳性组及薏苡仁汤低、高剂量组踝关节在炎性细胞浸润、滑膜/纤维组织增生、骨和软骨结构破坏等方面均有不同程度的改善。详见图 1。

表 1 各组大鼠关节肿胀度比较( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ , %)

Table 1 Comparison of joint swelling among different groups of rats ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ , %)

| 组别       | 给药前                | 给药 1 周              | 给药 2 周              | 给药 3 周               | 给药 4 周                |
|----------|--------------------|---------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|
| 空白组      | 5.39 $\pm$ 2.39    | 10.24 $\pm$ 2.68    | 11.45 $\pm$ 2.80    | 12.81 $\pm$ 3.26     | 13.75 $\pm$ 4.23      |
| 模型组      | 16.02 $\pm$ 3.45** | 35.67 $\pm$ 13.39** | 50.58 $\pm$ 18.63** | 68.81 $\pm$ 21.92**  | 71.12 $\pm$ 17.13**   |
| 阳性组      | 15.86 $\pm$ 4.32** | 26.10 $\pm$ 8.47**  | 34.35 $\pm$ 6.20**# | 35.20 $\pm$ 7.57**## | 47.12 $\pm$ 7.27**##  |
| 薏苡仁汤低剂量组 | 16.63 $\pm$ 3.14** | 28.04 $\pm$ 5.07**  | 39.59 $\pm$ 10.87** | 42.82 $\pm$ 8.67**## | 45.54 $\pm$ 10.96**## |
| 薏苡仁汤高剂量组 | 16.27 $\pm$ 5.78** | 31.31 $\pm$ 9.45**  | 38.10 $\pm$ 7.92**  | 40.05 $\pm$ 8.69**## | 41.33 $\pm$ 10.39**## |

注:与空白组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ 。

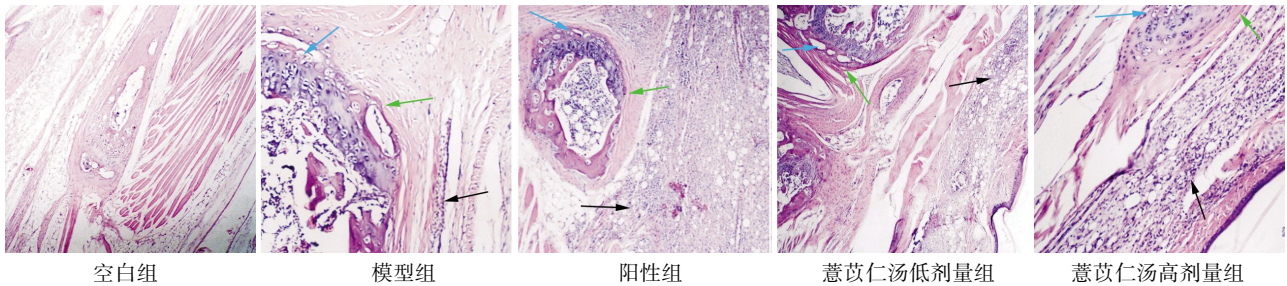


图 1 各组大鼠踝关节组织病理学图片(HE,×100)

Fig.1 Histopathological images of ankle joint tissue in each group of rats (HE, ×100)

注:黑色箭头指示炎性细胞浸润;绿色箭头指示滑膜/纤维组织增生;蓝色箭头指示骨和软骨结构破坏。

3.4 薏苡仁汤对寒湿痹阻型 CIA 大鼠疾病活动度指标的影响

与空白组比较,模型组血清 RF、ACPA、CRP 水平均明显增高( $P<0.01$ )。与模型组比较,阳性组及薏苡仁汤低、高剂量组血清 RF、ACPA、CRP 水平均降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。与阳性组比较,薏苡仁汤低剂量组血清 CRP 水平升高( $P<0.05$ )。详见表 2。

表 2 各组大鼠血清 RF、ACPA、CRP 水平比较( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )  
Table 2 Comparison of serum levels of RF, ACPA, and CRP among different groups of rats ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )

| 组别       | RF/(mIU/mL)          | ACPA/(IU/mL)        | CRP/( $\mu$ g/mL)   |
|----------|----------------------|---------------------|---------------------|
| 空白组      | 18.09 $\pm$ 3.35     | 20.96 $\pm$ 4.05    | 1.98 $\pm$ 0.50     |
| 模型组      | 72.63 $\pm$ 16.99**  | 50.99 $\pm$ 7.15**  | 10.33 $\pm$ 2.15**  |
| 阳性组      | 51.08 $\pm$ 10.70*** | 41.18 $\pm$ 8.31*** | 5.60 $\pm$ 1.97***  |
| 薏苡仁汤低剂量组 | 42.10 $\pm$ 8.44***  | 40.55 $\pm$ 8.59*** | 7.79 $\pm$ 1.86***▲ |
| 薏苡仁汤高剂量组 | 43.02 $\pm$ 8.94***  | 39.09 $\pm$ 9.75*** | 6.19 $\pm$ 1.47***  |

注:与空白组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$ ,\*\*\* $P<0.01$ ;与阳性组比较,▲ $P<0.05$ 。

3.5 薏苡仁汤对寒湿痹阻型 CIA 大鼠细胞因子的影响

与空白组比较,模型组大鼠血清 TGF- $\beta$ 、IL-17A 水平均明显增高( $P<0.01$ )。与模型组比较,阳性组及薏苡仁汤低、高剂量组血清 TGF- $\beta$  水平均增高( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),IL-17A 水平均降低( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。与阳性组比较,薏苡仁汤高剂量组血清 TGF- $\beta$  水平明显升高( $P<0.01$ ),IL-17A 水平降低( $P<0.05$ )。与薏苡仁汤低剂量组比较,薏苡仁汤高剂量组血清 TGF- $\beta$  水平增高( $P<0.05$ )。详见表 3。

表 3 各组大鼠血清细胞因子水平比较( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ , pg/mL)  
Table 3 Comparison of serum cytokines levels among different groups of rats ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ , pg/mL)

| 组别       | TGF- $\beta$            | IL-17A               |
|----------|-------------------------|----------------------|
| 空白组      | 15.96 $\pm$ 3.10        | 9.91 $\pm$ 1.32      |
| 模型组      | 59.90 $\pm$ 12.59**     | 28.26 $\pm$ 3.56**   |
| 阳性组      | 78.15 $\pm$ 17.12**     | 22.89 $\pm$ 5.72***  |
| 薏苡仁汤低剂量组 | 89.62 $\pm$ 15.97***    | 19.93 $\pm$ 4.35***  |
| 薏苡仁汤高剂量组 | 109.50 $\pm$ 16.61***▲▲ | 17.43 $\pm$ 3.08***▲ |

注:与空白组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$ ,\*\*\* $P<0.01$ ;与阳性组比较,▲ $P<0.05$ ,▲▲ $P<0.01$ ;与薏苡仁汤低剂量组比较,△ $P<0.05$ 。

3.6 薏苡仁汤对寒湿痹阻型 CIA 大鼠 Treg、Th17 细胞比例的影响

与空白组比较,模型组 Treg、Th17 细胞比例均显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,阳性组及薏苡仁汤低、高剂量组 Treg 细胞比例均升高( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),Th17 细胞比例均降低( $P<0.01$ )。与阳性组比较,薏苡仁汤高剂量组 Treg 细胞比例升高( $P<0.05$ ),薏苡仁汤低、高剂量组 Th17 细胞比例均降低( $P<0.05$ )。详见表 4、图 2。

表 4 各组大鼠外周血 Treg、Th17 细胞比例比较( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ , %)

Table 4 Comparison of the proportions of Treg and Th17 cells in peripheral blood among different groups of rats ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ , %)

| 组别       | Treg                 | Th17                |
|----------|----------------------|---------------------|
| 空白组      | 5.15 $\pm$ 1.12      | 0.97 $\pm$ 0.23     |
| 模型组      | 7.38 $\pm$ 1.01**    | 9.27 $\pm$ 2.16**   |
| 阳性组      | 8.59 $\pm$ 1.15***   | 6.29 $\pm$ 1.21***  |
| 薏苡仁汤低剂量组 | 10.20 $\pm$ 1.72***  | 5.11 $\pm$ 0.51***▲ |
| 薏苡仁汤高剂量组 | 11.09 $\pm$ 1.92***▲ | 4.81 $\pm$ 0.90***▲ |

注:与空白组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$ ,\*\*\* $P<0.01$ ;与阳性组比较,▲ $P<0.05$ 。

4 讨论

RA 可归属于中医学“尪痹”范畴<sup>[14]</sup>,其病因多为外邪凝滞于肢体筋脉、关节,气血运行不畅,经脉痹阻不通,致关节出现疼痛、肿胀、晨僵、变形、屈伸不利等。寒湿痹阻为 RA 人群较为常见的证型,因患者自体正气不足,且长期身处湿冷环境,风寒湿邪侵袭,常伴有神疲倦怠、畏寒恶风、舌暗苔白等症状<sup>[15]</sup>。本研究采用Ⅱ型胶原注射联合人工气候箱模拟湿冷环境的方法造模,可见大鼠的体征表现基本符合寒湿痹阻的证候特征,结合踝关节肿胀度及组织病理学结果,提示该模型能够一定程度上模拟寒湿痹阻型 RA 的疾病状态。

针对寒湿痹阻型 RA 内因和外因相互作用的病因病机特点,治宜内扶正、外祛邪。薏苡仁汤用大剂量的薏苡仁作为君药,意在利水渗湿、除痹散结、健脾和中;苍术、白芍、独活、羌活、防风为臣药,通痹散寒、祛风除湿、益气健脾、养血补虚;一佐麻黄、桂枝、生姜,温通经脉、消肿止痛,二佐当归、川芎,

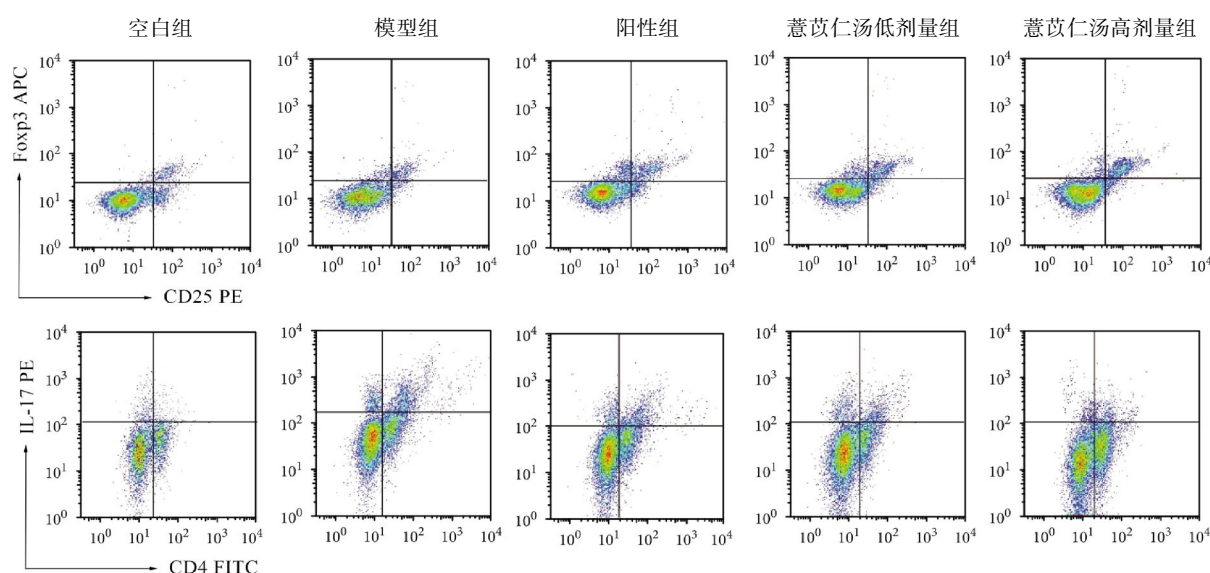


图2 各组大鼠外周血 Treg、Th17 细胞比例

Fig.2 Proportions of Treg and Th17 cells in peripheral blood in each group of rats

当归为血中之气药,川芎则是气中之血药,二者配伍,使得补血而气血不滞、逐瘀而气血无损;甘草调和诸药、引药入脾,为使药。诸药合用,共奏祛风燥湿散寒、通络除痹止痛、健脾和中、调和营卫之功。临床研究表明,薏苡仁汤口服用于寒湿痹阻型 RA 疗效确切,可显著减轻患者体内炎症反应,改善关节功能,降低红细胞沉降率和 CRP 等疾病活动度指标水平<sup>[16]</sup>。

RA 患者的关节损伤与其体内免疫系统功能紊乱及炎症反应异常密切相关。免疫学指标 RF、ACPA 及炎症指标 CRP 作为关节损害进展的预测因素,可为判断 RA 病情活动度提供参考<sup>[17]</sup>。本研究中,模型组大鼠血清自身抗体 RF、ACPA 及炎症因子 CRP 水平均显著增高,提示寒湿痹阻型 CIA 大鼠机体处于疾病活动期,并伴有明显的全身炎症反应。治疗 4 周后,薏苡仁汤低、高剂量组血清 RF、ACPA、CRP 水平均显著降低,关节肿胀度显著减小,关节切片的组织病理学亦有明显改善,说明口服薏苡仁汤可减轻寒湿痹阻型 CIA 大鼠的关节腔和全身的炎症反应,改善其关节受损和骨破坏程度。陈欢等<sup>[18]</sup>实验研究表明,长期寒湿环境能加重佐剂性关节炎大鼠踝关节的损伤程度,扩大全身炎症反应,可能与寒湿环境因素刺激机体产生异常的自身免疫反应,进而促使 RF、ACPA 及炎症因子的过度释放等有关,这与本研究结果一致。

免疫细胞尤其是 CD4<sup>+</sup>T 细胞的异常活化为 RA 发生、发展的中心环节。Treg、Th17 细胞亚群皆由活化的 CD4<sup>+</sup>T 细胞分化而成。Th17 细胞主要分泌促炎细胞因子 IL-17A,参与机体的进行性炎症,并增强关节软骨和骨破坏效应;Treg 细胞通过分泌 IL-10、TGF- $\beta$  等抑炎细胞因子,发挥免疫负调控的作用。二者在分化上相互抑制、在功能上相互拮抗,是维持体内免疫稳态的重要组成<sup>[19]</sup>。调控 Treg/Th17 细胞的分化平衡亦有望成为 RA 新的防治手段。来氟米特属于改善病情抗风湿药中的免疫抑制剂,临床使用率高、不良反应少,因其可干预 T 淋巴细胞及其亚群的表达、调节机体免疫应答,被选作本研究阳性对照药。本研究结果表明,模型组大鼠 Treg、Th17 细胞所占比例及其标志性细胞因子 TGF- $\beta$ 、IL-17A 水平均较空白组明显升高,提示寒湿痹阻型 CIA 大鼠体内 T 细胞处于高度活化状态,Th17 细胞比例的升高幅度更为显著,说明 Treg/Th17 细胞间的分化平衡向 Th17 细胞倾斜。治疗 4 周后,薏苡仁汤低、高剂量组 Treg 细胞比例及血清 TGF- $\beta$  水平均较模型组明显升高,Th17 细胞比例及血清 IL-17A 水平均较模型组明显降低,说明薏苡仁汤可调控 Treg/Th17 细胞间的免疫失衡状态,调节细胞因子网络,抑制炎症因子对滑膜组织的刺激作用及对关节软骨的侵蚀效应,进而干预寒湿痹阻型 CIA 的病变进程。

综上所述,薏苡仁汤可改善寒湿痹阻型 CIA 大鼠的整体情况及关节症状,其作用机制可能与调节 Treg/Th17 细胞间的免疫失衡状态、减轻关节组织和全身的炎症反应、抑制促炎细胞因子对关节软骨和骨的破坏等有关,其量效关系仍有待于进一步探索。

## 参考文献

- [1] TANCER S, WALLACE B I. Advances in the medical treatment of rheumatoid arthritis[J]. *Hand Clinics*, 2025, 41(1): 11–23.
- [2] 潘胡丹,肖 瑶,王婉莹,等. 传统中医药治疗类风湿性关节炎:从经验医学到循证医学[J]. 2019, 5(5): 178–202.
- [3] 李 明,尚双双,万 磊,等. 清热除痹方离子导入在活动期类风湿关节炎患者达标治疗中的应用[J]. *安徽中医药大学学报*, 2023, 42(3): 13–18.
- [4] 陶江涛. 薏苡仁汤治疗寒湿闭阻型类风湿性关节炎疗效分析[J]. *首都食品与医药*, 2017, 24(14): 103–104.
- [5] 杨 雪,李素华,丛 珊,等. 薏苡仁汤治疗寒湿痹阻型类风湿关节炎有效性和安全性的 Meta 分析[J]. *风湿病与关节炎*, 2022, 11(4): 26–31, 66.
- [6] SU R, LI B C, WU R H, et al. Stratified distribution of Th17 and Treg cells in patients with multi-stage rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2023, 25(1): 55.
- [7] 阮玲娟,陈春燕,莫娟芬. 散寒除湿法对寒湿痹阻型类风湿关节炎患者 Th17/Treg 细胞平衡的影响[J]. *新中医*, 2021, 53(11): 80–84.
- [8] 赵海燕,张鸿婷,郭丹丹,等. 独活寄生汤对肝肾不足寒湿痹阻型类风湿性关节炎 Th17/Treg 平衡的影响[J]. *西部中医药*, 2021, 34(6): 8–12.
- [9] 董小君,王永辉,侯 渊,等. 不同外感致病因素对病证结合 CIA 模型建立的比较研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2018, 45(9): 1987–1991, 2020.
- [10] LIM M A, LOUIE B, FORD D, et al. Development of the digital arthritis index, a novel metric to measure disease parameters in a rat model of rheumatoid arthritis[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2017, 8: 818.
- [11] NASHAAT D, ELSABAHY M, HASSANEIN K M A, et al. Development and in vivo evaluation of therapeutic phytosomes for alleviation of rheumatoid arthritis[J]. *International Journal of Pharmacaceutics*, 2023, 644: 123332.
- [12] 魏 伟,吴希美,李元建. 药理实验方法学[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社, 2010: 433.
- [13] 方肇勤,卢文丽. 辨证论治实验方法学:实验小鼠诊疗与辨证[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2006: 110–112.
- [14] 李满意,刘红艳,陈传榜,等. 尪痹的证治[J]. *风湿病与关节炎*, 2024, 13(1): 54–57.
- [15] 杨煜辰,姜 泉,巩 勋,等. 1 191 例寒湿痹阻证类风湿关节炎患者的证候演变特点及相关性分析[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2024, 30(6): 970–974.
- [16] 梁金梅. 薏苡仁汤治疗类风湿关节炎的临床研究[D]. 武汉:湖北中医药大学, 2012.
- [17] 中华医学会风湿病学分会. 2018 中国类风湿关节炎诊疗指南[J]. *中华内科杂志*, 2018, 57(4): 242–251.
- [18] 陈 欢,任香怡,魏江平,等. 寒湿环境对佐剂关节炎模型大鼠炎症反应的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2016, 22(3): 328–331.
- [19] FU T T, LIU Y R, JIA H Z, et al. Analysis of potential diagnostic markers and therapeutic targets for rheumatoid arthritis with comorbid depression immunologic indicators[J]. *Behavioural Brain Research*, 2024, 471: 115098.

(本文编辑 周 旦)