

溃结改良方改善 DSS 诱导的 UC 小鼠肠道炎症反应的机制研究

丁洋, 丁康, 谭妍妍, 黄士财, 李猛, 蔡梦玲, 宋妍, 张苏闽

(南京中医药大学附属南京中医院, 江苏 南京 210001)

摘要:目的 从效应 T 细胞活化的源头 Treg、Th17 细胞入手, 探讨溃结改良方(Kuijie Gailiang Prescription, KGP)调节 Th17 和 Treg 细胞的平衡转化机制, 揭示溃结改良方治疗溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)的深层次作用机理及作用靶点。方法 采用 3.5% DSS 诱导复制 UC 小鼠模型, 并随机分为正常组、模型组、5-ASA 组和溃结改良方低、高剂量组, 每组 8 只。观察各组小鼠体质量、大便黏稠度及出血情况, 计算疾病活动指数; 结肠组织 HE 染色, 观察远端结肠组织病理形态学变化; 流式细胞术检测小鼠脾脏淋巴细胞 Treg、Th17 细胞水平。结果 溃结改良方对 UC 小鼠具有治疗效应, 其疾病活动指数明显降低($P < 0.05$), 结肠病理改变得到改善。与正常组相比, 模型组 $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ Treg 细胞、IL-10、Foxp3、Smad3 下调, $CD3^+ CD4^+ IL-17A^+$ Th17 细胞、IL-17A、ROR γ t、STAT3 蛋白上调, 差异具有统计学意义($P < 0.01$); 溃结改良方治疗后, $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ Treg 细胞、IL-10、Foxp3、p-Smad3 上调, $CD3^+ CD4^+ IL-17A^+$ Th17 细胞、IL-17A、ROR γ t、p-STAT3 下降, 与模型组比较差异具有统计学意义($P < 0.01$)。结论 溃结改良方可能通过调控 UC 小鼠 Treg/Th17 免疫平衡起到治疗 UC 的作用。

关键词:溃结改良方; 溃疡性结肠炎; Treg; Th17

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-0482(2019)03-0297-06

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2019.0297

引文格式: 丁洋, 丁康, 谭妍妍, 等. 溃结改良方改善 DSS 诱导的 UC 小鼠肠道炎症反应的机制研究[J]. 南京中医药大学学报, 2019, 35(3): 297-302.

Effect of Kuijie Gailiang Prescription Regulating Treg/Th17 Balance on Intestinal Inflammatory Response in DSS Mice

DING Yang, DING Kang, TAN Yan-yan, HUANG Shi-cai, LI Meng, CAI Meng-ling, SONG Yan, ZHANG Su-min

(Nanjing Hospital of TCM Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the mechanism of balance transformation of Th17 and Treg by Kuijie Gailiang Prescription (KGP) and to investigate the role of KGP in the treatment of ulcerative colitis (UC) from the source of effector T cell activation Treg and Th17 cells. Deep-level mechanism of action and targets. **METHODS** The UC mouse model was induced by 3.5% DSS and randomly divided into normal group, model group, 5-ASA group and low and high dose KGP group, with 8 rats in each group. Observe the body mass, stool consistency and hemorrhage of each group, calculate the index of disease activity, observe the pathological changes of colon tissue by HE staining of colon tissue, and detect the levels of Treg and Th17 cells in mouse spleen by flow cytometry. **RESULTS** KGP had a therapeutic effect on UC mice. The disease activity index was significantly reduced ($P < 0.05$), and the pathological changes of colon tissue were improved. Compared with the normal group, the levels of $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ Treg, IL-10, Foxp3, and Smad3 were down-regulated, and the levels of $CD3^+ CD4^+ IL-17A^+$ Th17, IL-17A, ROR γ t, and STAT3 were up-regulated in the model group ($P < 0.01$); after KGP treatment, The levels of $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ Treg, IL-10, Foxp3, and p-Smad3 were up-regulated, and the levels of $CD3^+ CD4^+ IL-17A^+$ Th17, IL-17A, ROR γ t, and p-STAT3 were decreased. There was a statistically significant difference compared with the model group ($P < 0.01$). **CONCLUSION** KGP may play a role in the treatment of UC by regulating Treg/Th17 immune balance in UC mice.

收稿日期: 2019-01-05

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK20151082); 江苏省中医药科技一般项目(YB2015062); 南京市医学重点科技发展项目(ZKX16056); 江苏省研究生科研创新计划(KYCX18-1537)

第一作者: 丁洋, 男, 硕士研究生, E-mail: 2543775235@qq.com

通信作者: 张苏闽, 男, 主任中医师, 主要从事炎症性肠病研究, E-mail: njszyyzsm@163.com

丁康, 男, 副主任中医师, 主要从事肛门结直肠疾病研究, E-mail: 51422503@qq.com

KEY WORDS: Kuijie Gailiang Prescription; ulcerative colitis; Treg; Th17

溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)是一种病因尚不明确的慢性非特异性肠道炎症,病变局限于大肠黏膜及黏膜下层。病程漫长,常反复发作。本病以腹痛、腹泻、黏液脓血便为主要临床表现,病程迁延又易反复发作。根据该病的临床特点,可归属于中医“久痢”“肠癖”等范畴。一般认为该病在西方国家发病率较高,但近年研究发现我国的发病率呈明显升高趋势^[1]。其病因和发病机制尚不十分清楚,但是大多数研究者都赞同 UC 的发病与肠道黏膜免疫有着密切的关系。近年研究发现,介导炎症反应的辅助性 T 细胞 17(T helper17 cells, Th17)和介导免疫耐受的调节性 T 细胞(Regulatory T cell, Treg)所形成的免疫轴失衡可能是引发 UC 的重要发病基础^[2]。因此,促进 Treg 细胞分化生成,介导免疫耐受,抑制 Th17 细胞分化,减轻炎症反应,恢复 Treg/Th17 平衡,维持机体的免疫稳定状态,为治疗 UC 等自身免疫性疾病开辟了一条新航线。溃结改良方(KGP)是由著名老中医丁泽民教授、谢英彪教授的溃结灌肠液化裁而来,南京市中医院采用溃结灌肠液治疗 UC 数十年,疗效颇为显著^[3]。本实验以葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导小鼠 UC 模型,检测小鼠脾脏淋巴细胞中 Treg 和 Th17 细胞占总 CD4⁺T 细胞百分比,初步探讨溃结改良方在 UC 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

C57BL/6J 小鼠,雌性,6~8 周龄,18~22 g, SPF 级,扬州大学比较医学中心,动物许可证号:SYXK(苏)2012-0042,动物实验方案符合南京中医药大学动物实验伦理委员会标准。光照 12 h,黑暗 12 h 循环,室温(22±2)℃,湿度 50%~60%。

1.2 药物

溃结改良方由金银花 120 g,地榆 120 g,白及 40 g 组成,中药饮片由南京市中医院中药房提供。将药物加适量水浸泡 30 min,煎煮 2 次,合并药液滤过,将上清液浓缩至 400 mL。5-ASA 灌肠液,德国 Falk 公司生产,批号:H20100253。

1.3 试剂

葡聚糖硫酸钠分子量 36 000~50 000(MP Bio-medicals 公司,批号:02160110);小鼠淋巴细胞分离液(达科为生物技术有限公司,批号:7211011);

FITC-anti-mouse-CD4 抗体(批号:553651)、APC-anti-mouse-CD25 抗体(批号:558643)、PE-anti-mouse-Foxp3(批号:563101)抗体均购自 BD 公司;FITC-anti-mouse-CD3 抗体(批号:100204)、APC-anti-mouse-CD4 抗体(批号:100412)、PE-anti-mouse-IL-17A 抗体(批号:506904)均购自 BioLegend 公司;IL-17A(批号:70-EK2172/2)、IL-21(批号:70-EK2212/2)、IL-10(批号:70-EK2102/2)、IL-35 ELISA(批号:70-EK2215/2)试剂盒均购自杭州联科生物技术有限公司;ROR γ t(批号:ab207082)、STAT3(批号:ab119352)、p-STAT3(批号:ab30647)、Foxp3(批号:ab22510)、Smad3(批号:ab208182)、p-Smad3(批号:ab193297)抗体购自 Abcam 公司。

1.4 仪器

流式细胞仪,Becton Dickinson 公司;高速冷冻离心机,Thermo Fisher Scientific 公司;光学显微镜,徕卡公司;二氧化碳培养箱,昆山一恒仪器有限公司;酶标仪,BioTek 公司;凝胶成像仪,Bio-RAD 公司。

1.5 动物分组与造模

小鼠适应性喂养一周后,随机分为正常组、模型组、5-ASA 组和溃结改良方低、高剂量组,每组 8 只。让小鼠自由饮用 3.5% DSS 溶液,连续 7 d,构建急性 UC 模型。观察各组小鼠的精神、毛发、饮食、粪便等一般情况。记录质量、小鼠大便性状、隐血情况,计算每组小鼠疾病活动指数(Disease activity index)评分值(表 1)。DAI=(体质量评分+大便性状评分+出血情况评分)/3。根据小鼠体质量下降、大便不成形以及便血判断 UC 模型是否成功。

1.6 观察指标与治疗方法

确认造模成功后,正常组不作处理,模型组予生理盐水灌肠,溃结改良方组分别予 KGP 低剂量(2.1 g/kg)、KGP 高剂量(4.2 g/kg)灌肠,5-ASA 组(3.5 g/kg)予 5-ASA 灌肠液灌肠。连续给药 7 d,第 14 天所有小鼠摘眼球取血,分离血清保留在-80℃冰箱。断颈处死小鼠,截取并记录结肠长度,取出结肠内容物,沿纵轴剪开肠腔,用生理盐水冲洗干净,平铺于白纸上,记录结肠质量,根据如下公式计算肠质量指数,肠质量指数=结肠质量/体质量×100%。剖取病变结肠组织,4%甲醛预固定,石蜡包埋,切片

(5 μm)行 HE 染色。剩余结肠在冰上用载玻片刮取结肠黏膜分装于 1.5 mL 离心管中, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。剖取脾脏, 手术剪剪碎, 手动冰浴匀浆, 用 200 目不锈钢筛网滤过, 收集细胞悬液, 小鼠淋巴细胞分离液分离淋巴细胞, PBS 洗涤重悬细胞, 调整细胞终浓度为 $1 \times 10^6\text{ mL}^{-1}$ 的细胞悬液。

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞检测:细胞悬液中加入 FITC-anti-mouse-CD4 抗体 5 μL , APC-anti-mouse-CD25 抗体及相应同型对照各 5 μL , 室温避光孵育 25 min, PBS 洗涤离心弃上清; 加入破膜/固定剂 100 μL , 避光孵育 30 min, PBS 洗涤离心弃上清; 加入 PE-anti-mouse-Foxp3 抗体及相应同型对照各 10 μL , 室温避光孵育 25 min, 洗涤, 重悬细胞于鞘液; 流式细胞仪检测, Kaluza for Gallios 软件分析数据, 以 CD25⁺T 细胞设门, 散点图表示, 读取 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞比率。

CD3⁺CD4⁺IL-17A⁺Th17 细胞检测:细胞悬液中加入 Cell Activation Cocktail 2 μL 和 Brefeldin A 20 μL 混匀, 再加入 FITC-anti-mouse-CD3 抗体 5 μL , APC-anti-mouse-CD4 抗体抗体及相应同型对照各 5 μL , 室温避光孵育 25 min, PBS 洗涤离心弃上清; 加入破膜/固定剂 100 μL , 避光孵育 30 min, PBS 洗涤离心弃上清; 加入 PE-anti-mouse-IL-17A 抗体及相应同型对照各 10 μL , 室温避光孵育 25 min, 洗涤, 重悬细胞于鞘液; 流式细胞仪检测, Kaluza for Gallios 软件分析数据, 以 CD3⁺T 细胞设门, 散点图表示, 读取 CD3⁺CD4⁺IL-17A⁺Th17 细胞比率。

血清 IL-17A 和 IL-10 表达水平的测定:解冻备用血清, 严格按照试剂盒说明书操作, 酶标仪 450 nm 波长处测定光密度值(OD 值), 以标准品浓度为横坐标, 所对应的 OD 值为纵坐标, 绘制标准曲线, 然后对照标准曲线根据血清样品的 OD 值计算 IL-17A、IL-21、IL-10、IL-35 的表达水平。

Western blot 法检测小鼠结肠黏膜 ROR γ t、STAT3、p-STAT3、Foxp3、Smad3、p-Smad3 蛋白表达,取小鼠结肠黏膜进行裂解、匀浆, 提取胞浆蛋白, BCA 法测定蛋白含量。按比例各蛋白样品加入 $5 \times$ SDS-PAGE 上样缓冲液, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 取 40 μg 蛋白样品进行 10% SDS-PAGE 电泳, 用含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 2 h, 加一抗 ROR γ t(稀释

比例 1 : 1 000)、STAT3(1 : 5 000)、p-STAT3(1 : 1 000)、Foxp3(1 : 1 000)、Smad3(1 : 1 000)、p-Smad3(1 : 1 000), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体(稀释比例 1 : 2 000)室温孵育 1.5 h。ECL 显色曝光。

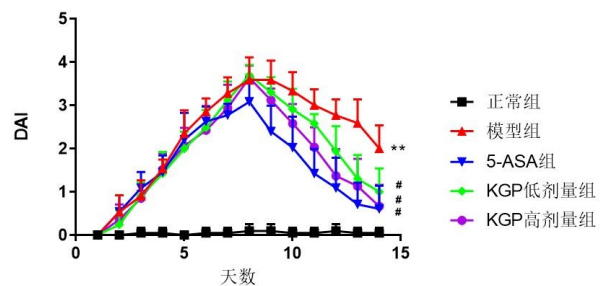
1.7 统计学方法

采用 SPSS22 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较选用单因素方差分析, 进一步的组间两两比较选用 LSD 法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。统计作图采用 GraphPad Prism7。

2 结果

2.1 小鼠一般状态及疾病活动指数

正常组小鼠毛发干净柔顺, 饮食和活动正常。模型组和各给药组小鼠均出现不同程度的饮食减少、毛发无光泽等情况。随着造模天数增加, 模型组小鼠肛门处有明显溃疡产生, 肉眼血便, 摄食量显著下降, 具有典型 UC 症状。第 8 天起, 各组小鼠上述表现逐渐减轻, 但模型组恢复情况较给药组明显缓慢。与正常组相比, 模型组 DAI 显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 给药组一般状况均改善, DAI 值明显降低 ($P < 0.05$)。见图 1。



注:与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;
与模型组比较, # $P < 0.05$ 。

图 1 各组对溃疡性结肠炎小鼠 DAI 评分的影响

2.2 病理形态、结肠长度及肠质量指数

图 2 为各组小鼠结肠组织 HE 染色直观图。正常组黏膜、腺体结构完整, 隐窝正常, 未见炎症细胞浸润。模型组黏膜见大片溃疡, 隐窝消失, 腺体减少, 大量炎症细胞浸润。5-ASA 组隐窝、腺体结构清晰, 少量炎症细胞浸润。KGP 低剂量组黏膜见少量溃疡, 腺体减少, 隐窝部有炎症细胞浸润。KGP 高剂量组黏膜轻度破坏, 局部充血, 腺体减少, 隐窝部有炎症细胞浸润。

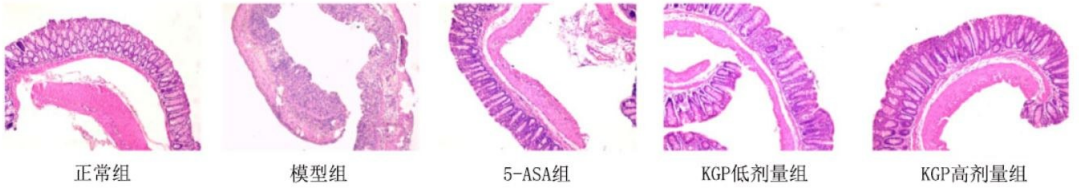


图 2 各组小鼠结肠组织学观察(HE, ×100)

表 1 显示,与正常组相比,模型组小鼠结肠长度明显缩短($P < 0.01$),5-ASA 组和 KGP 低、高剂量组结肠长度较接近正常组,与模型组比较均有显著差异($P < 0.01$)。模型组与正常组相比,肠质量指数明显升高($P < 0.01$),KGP 高剂量组和 5-ASA 组与模型组相比,肠质量指数减小,有显著差异($P < 0.01$),KGP 低剂量组与模型组相比,肠质量指数减小,且有明显差异($P < 0.05$)。

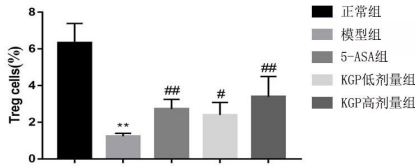
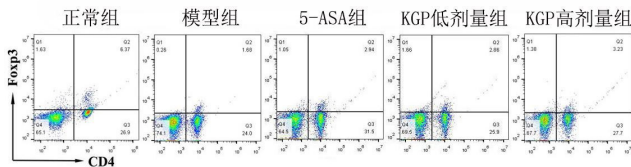
表 1 各组小鼠结肠长度及肠质量指数($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 结肠长度/cm | 肠质量指数/% |
|----------|-----------------|------------------|
| 正常组 | 6.89 ± 0.629 | 0.967 ± 0.097 |
| 模型组 | 5.05 ± 0.750 ** | 1.287 ± 0.077 ** |
| 5-ASA 组 | 6.64 ± 0.607 ## | 0.973 ± 0.059 ## |
| KGP 低剂量组 | 6.30 ± 0.450 ## | 1.163 ± 0.139 # |
| KGP 高剂量组 | 6.33 ± 0.311 ## | 1.146 ± 0.050 ## |

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

2.3 溃结改良方对小鼠脾脏 Treg/Th17 免疫平衡的影响

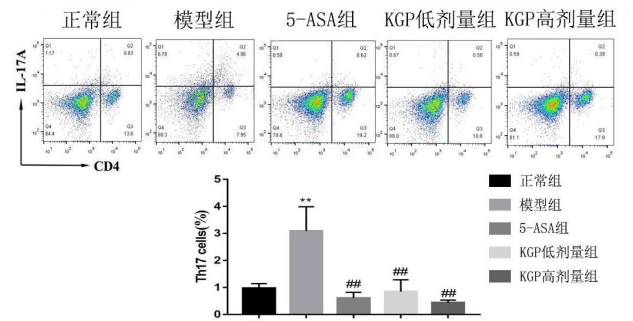
与正常组比较,模型组小鼠脾脏淋巴细胞 $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ Treg 细胞比例明显降低($P < 0.05$),KGP 各剂量组和 5-ASA 组脾脏淋巴细胞中相应的 $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ Treg 细胞比例与模型组比较均有显著升高($P < 0.01, P < 0.05$),见图 3。



注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 8$ 。

图 3 各组小鼠脾脏淋巴细胞中 Treg 细胞含量

模型组脾脏淋巴细胞 $CD3^+ CD4^+ IL-17A^+$ Th17 细胞比例显著升高($P < 0.01$)。KGP 各剂量组与 5-ASA 组相应的 $CD3^+ CD4^+ IL-17A^+$ Th17 细胞比例与模型组比较均显著降低($P < 0.01$),见图 4。



注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 8$ 。

图 4 各组小鼠脾脏淋巴细胞中 Th17 细胞含量

2.4 溃结改良方对小鼠外周血清 IL-17A、IL-21、IL-10、IL-35 的表达水平影响

由表 2 可知,模型组与正常组相比,IL-17A、IL-21 含量显著升高($P < 0.01$)。KGP 各剂量组和 5-ASA 与模型组相比,IL-17A、IL-21 含量显著下降($P < 0.01$),即其抑制了 DSS 诱导的 IL-17A 含量升高,说明给药后可改善小鼠结肠炎症状。模型组 IL-10、IL-35 含量与正常组相比,IL-10 明显降低($P < 0.05$),说明 DSS 诱导的结肠炎与 IL-10、IL-35 含量呈负相关,而 KGP 各剂量组和 5-ASA 组与模型组相比,IL-10、IL-35 含量显著升高($P < 0.01$)进而推测 KGP 各剂量组可能通过增强 IL-10、IL-35 含量来改善小鼠 UC 症状。

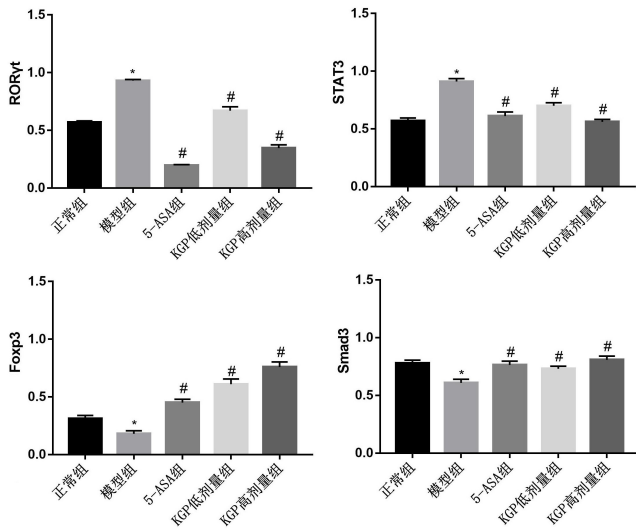
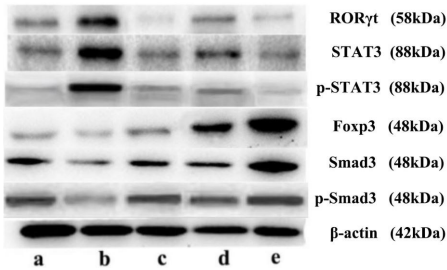
2.5 RORγt、STAT3、p-STAT3、Foxp3、Smad3、p-Smad3 在小鼠结肠黏膜的蛋白表达

模型组结肠黏膜中 RORγt、p-STAT3 蛋白表达明显高于正常组,KGP 低、高剂组和 5-ASA 组的蛋白表达低于模型组。而 Foxp3、p-Smad3 蛋白表达明显低于正常组,KGP 低、高剂组和 5-ASA 组的蛋白表达高于模型组,更接近正常组。见图 5。

表 2 溃结改良方对小鼠血清 IL-17A、IL-21、IL-10、IL-35 含量的影响($\bar{x} \pm s, \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}, n=8$)

| 组别 | IL-17A | IL-21 | IL-10 | IL-35 |
|----------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 正常组 | 80.9±41.14 | 137.64±11.24 | 112.23±13.79 | 213.35±20.80 |
| 模型组 | 365.1±39.06 ^{**} | 334.47±16.66 [*] | 23.95±6.50 [*] | 96.64±12.68 ^{**} |
| 5-ASA 组 | 152.9±27.34 ^{##} | 172.06±9.06 ^{##} | 173.57±51.50 ^{##} | 163.14±6.82 ^{##} |
| KGP 低剂量组 | 173.7±50.45 ^{##} | 182.74±5.81 ^{##} | 293.10±119.97 ^{##} | 176.89±13.00 ^{##} |
| KGP 高剂量组 | 162.9±21.52 ^{##} | 146.95±5.26 ^{##} | 353.57±58.59 ^{##} | 230.97±9.68 ^{##} |

注:与正常组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.05$,^{###} $P<0.01$ 。



注:a.正常组;b.模型组;c.5-ASA组;d.KGP低剂量组;e.KGP高剂量组

图 5 溃结改良方 UC 小鼠 ROR γ t、STAT3、p-STAT3、Foxp3、Smad3、p-Smad3 蛋白表达的影响

3 讨论

溃疡性结肠炎是一种病因不明的慢性、非特异性炎症性疾病。以腹痛、腹泻、黏液脓血便为主要临床表现,根据其临床特点,可归属于中医“久痢”范畴。从中医角度出发,认为该病的发生多因先天禀赋不足、脾胃功能失健,感受湿热之邪,或饮食不节,恣食肥甘厚味,酿生湿热,或思虑劳倦过度,情志不调,损伤脾胃,致湿邪化热蕴于大肠,气滞血瘀,肉腐血败,化而内疡。溃结改良方由金银花、地榆、白及组成,具有清热利湿解毒、活血化瘀、祛腐生肌之功效。有研究表明金银花中酚酸类成分对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 NO、TNF- α 和 IL-6 均具有不同程度的抑制作用,具有良好的抗炎作用;地榆能减

轻二甲苯引起的大鼠足跖肿胀,显著降低足跖肿胀大鼠血清 IL-1 β 和炎症足跖组织中 PGE2 含量;白及提取物白及多糖可促进结肠黏膜损伤修复和抑制相关免疫反应抑制小鼠结肠炎的发展。并且白及多糖对巨噬细胞有一定的免疫调节能力,可通过抑制巨噬细胞活性从而影响淋巴细胞的活化及相关细胞因子的分泌,缓解 UC 小鼠症状^[4-6]。

随着对 UC 发病机理更深入的了解,越来越多的研究认为 Treg/Th17 免疫轴失衡可能是引发 UC 的重要发病基础^[7]。Th17 和 Treg 细胞均来自 CD4⁺ T 细胞,多存在于正常机体的脾脏组织及外周血中,研究证实 Th17 和 Treg 细胞在分化和转化过程中密切相关,而它们在机体的免疫应答中是独立且统一的,两者具有分化相互制约、功能相互抑制的特点,从而维持机体自身免疫平衡^[8]。Th17 细胞作为炎症辅助性 T 细胞,其分化受到 IL-6、IL-21、IL-23、TGF- β 等细胞因子的正向反馈调节,同时需要活化 STAT3 通路,转录 ROR γ t,完成细胞扩增;其分泌的 IL-17 是免疫应答及后续炎症反应的起始,可介导炎症细胞因子、反应蛋白及前列腺素的表达促进炎症进展^[9]。黄晓丽等^[10]发现,普拉梭菌上清可以抑制脾脏 Th17 细胞的生成,减少外周血中 IL-17A 分泌,治疗 UC 小鼠。IL-21 在 TGF- β 和 IL-6 的联合作用下,通过 STAT3 转录因子诱导 CD4⁺ T 细胞向 Th17 细胞分化,驱动 IL-17 产生和转录因子 ROR γ t 表达^[11];而 IL-21 又由 Th17 细胞产生,还能间接抑制 CD4⁺ T 细胞向 Treg 细胞分化,抑制 Treg 介导的免疫耐受反应;Ge^[12]等通过流式细胞术检测 UC 患者外周血中 IL-21 的表达,发现与正常组相比,IL-21 表达明显增多,且表达量与患者临床活动指数存在明显的正相关;Yu^[13]等发现,给予 DSS 诱导的 UC 小鼠 IL-21 抗体治疗后,不仅降低了炎症 T 细胞的结肠浸润还减轻了黏膜损伤。Treg 细胞则介导免疫耐受,作为具有独特免疫调节作用的抑炎细胞而存在。其分化由 IL-2、TGF- β 、RA 介导,而 IL-1、IL-21、IL-23 则抑制它的分化。

Treg的发育和分化受转录因子 Foxp3 的特异性调控,并需要 Smad3 通路活化;其分泌的细胞因子,如 IL-10,具有免疫调节和抗炎作用,能下调单核细胞、巨噬细胞分泌 TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-1 β 等,在肠道免疫中起重要作用^[14]。张小艳等^[15]发现,与正常组相比,UC 小鼠 Treg 细胞和 IL-10 蛋白表达水平明显降低,而治疗后两者水平均显著升高。另一种分泌物 IL-35,是能够发挥抗炎作用的抑制性细胞因子,有研究^[16]发现 IL-35 表达水平的改变参与了炎性肠病的发生发展。最新研究^[17]将 IL-35 整合到间充质干细胞(MSC)中干预 UC 小鼠,发现 Foxp3⁺ Treg 细胞的百分比显著增加且肠固有层淋巴细胞产生的促炎细胞因子的水平明显降低。

本实验研究显示,与正常组相比,模型组脾脏淋巴细胞中 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 数量、血清中 IL-10、IL-35 水平和结肠组织中 Foxp3、Smad3 蛋白表达明显降低,而 CD3⁺ CD4⁺ IL-17A⁺ Th17 数量、IL-17A、IL-21 水平及 ROR γ t、STAT3 蛋白表达则明显升高,经溃结改良方治疗后,与模型组相比,Treg、IL-10、IL-35、Foxp3 和 Smad3 明显回升,而 Th17、IL-17A、IL-21、ROR γ t 和 STAT3 则明显降低;并能明显改善 UC 小鼠的一般症状、病理状况,综上所述,溃结改良方可能通过上调 Foxp3、Smad3 蛋白表达产生 Treg 细胞,促进 IL-10、IL-35 分泌,介导免疫耐受,下调 ROR γ t、STAT3 表达抑制 Th17 细胞生成,降低 IL-17A、IL-21 水平,减少其他炎症因子和趋化因子的产生,从而减轻肠道炎症反应,维持机体的免疫稳定状态,达到治疗 UC 的效果。

参考文献:

- [1] YE L, CAO Q, CHENG J. Review of inflammatory bowel disease in China[J]. Sci World J, 2013, 2013:296470.
- [2] BARBI J, PARDOLL D, PAN F. Metabolic control of the Treg/Th17 axis[J]. Immunol Rev, 2013, 252(1):52-77.
- [3] 陆琴,章蓓,张苏闽,等.溃结灌肠液治疗溃疡性结肠炎临床疗效回顾性多因素分析[J].时珍国医国药,2018,29(4):893-899.
- [4] 宋亚玲,王红梅,倪付勇,等.金银花中酚酸类成分及其抗炎活性研究[J].中草药,2015,46(4):490-495.
- [5] 俞浩,方艳夕,毛斌斌,等.地榆炮制前后水提物抗炎效果研究[J].中药材,2014,37(1):34-37.
- [6] 时松,黄振,罗熠,等.白及多糖对小鼠溃疡性结肠炎的治疗作用[J].中国药科大学学报,2012,43(6):535-540.
- [7] SABATINO AD, LENTI MV, GIUFFRIDA P, et al. New insights into immune mechanisms underlying autoimmune diseases of the gastrointestinal tract[J]. Autoimmun Rev, 2015, 14(12):1161-1169.
- [8] EASTAFFLEUNG N, MABARRACK N, BARBOUR A, et al. Foxp3⁺ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease[J]. J Clin Immunol, 2010, 30(1):80-89.
- [9] JIANG W, SU J, ZHANG X, et al. Elevated levels of Th17 cells and Th17-related cytokines are associated with disease activity in patients with inflammatory bowel disease[J]. Inflamm Res, 2014, 63(11):943-950.
- [10] 黄晓丽,张新,费先艳,等.普拉梭菌上清对葡聚糖酸钠诱导的溃疡性结肠炎小鼠 Th17 细胞及 IL-17A 的影响[J].中南大学学报(医学版),2015,40(12):1320-1326.
- [11] WANG Y, WANG LL, YANG HY, et al. Interleukin-21 is associated with the severity of psoriasis vulgaris through promoting CD4⁺ T cells to differentiate into Th17 cells[J]. Am J Transl Res, 2016, 8(7):3188.
- [12] GE J, ZHANG X, LIU J, et al. Elevated expression of interleukin-21 and its correlation to T-cell subpopulation in patients with ulcerative colitis[J]. Cent Eur J Immunol, 2015, 40(3):331-336.
- [13] YU J, HE S, LIU P, et al. Interleukin21 promotes the development of ulcerative colitis and regulates the proliferation and secretion of follicular T helper cells in the colitides microenvironment[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(2):1049.
- [14] WANG Y, LIU XP, ZHAO ZB, et al. Expression of CD4⁺ forehead box P3 (FOXP3)⁺ regulatory T cells in inflammatory bowel disease[J]. J Dig Dis, 2011,12(4):286-294.
- [15] 张小艳,杨雯,张英,等.1,25-(OH)2D3 和全反式视黄酸联合应用对溃疡性结肠炎小鼠 TREG 细胞 Foxp3 表达的影响[J].营养学报,2016,38(2):157-161.
- [16] FONSECA-CAMARILLO G, FURUZAWA-CARBALLEDA J, YAMAMOTO-FURUSHO J K. Interleukin 35 (IL-35) and IL-37: Intestinal and peripheral expression by T and B regulatory cells in patients with Inflammatory Bowel Disease[J]. Cytokine, 2015, 75(2):389-402.
- [17] YAN Y, ZHAO N, HE X, et al. Mesenchymal stem cell expression of interleukin-35 protects against ulcerative colitis by suppressing mucosal immune responses [J]. Cytotherapy, 2018,20(7):911-918.

(编辑:董宇)