

• 实验研究 •

彝药益元化腐汤浸膏对溃疡性结肠炎模型 T 细胞亚群干预机制研究*

顾茜兰, 曹江松, 马建国, 宫 毅, 徐 进, 万春平[△], 谢 钧[△]

(云南中医药大学, 云南 昆明 650500)

摘要: 目的 研究彝药益元化腐汤调控 T 细胞亚群介导治疗溃疡性结肠炎的效应机制, 为益元化腐汤临床应用治疗溃疡性结肠炎提供科学基础。方法 32 只 C57BL/6 健康雌性小鼠随机分为正常组、模型组、益元化腐汤中剂量(4.05 g·kg⁻¹)和高剂量组(8.1 g·kg⁻¹), 每组 8 只。除正常组, 其余以自由饮水的方式给予 3% 葡聚糖硫酸钠(sodium dextran sulfate, DSS)诱导建立溃疡性结肠炎小鼠模型, 每 2 d 更换 1 次饮用水, 自饮用 DSS 第 1 天起, 各组按相应剂量灌胃给药, 每日 1 次, 连续 8 d; 采用疾病活动指数(diseases activity index, DAI)和苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE)分别评价溃疡性结肠炎症状及结肠组织形态学变化; 荧光定量 PCR(qPCR)检测淋巴细胞 T 细胞亚群相关因子转录的相对表达水平; 流式细胞术(flow cytometry)检测 T 细胞亚群中辅助性 T 细胞 1(T-helper 1 cell, Th1)、辅助性 T 细胞 17(T-helper 17 cell, Th17)和调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)的表达水平。结果 与正常组比较, 病理模型组小鼠体质量和结肠质量显著下降、结肠长度显著缩短($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与病理模型组比较, 益元化腐汤组显著增加小鼠体质量、结肠质量及其长度($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 改善结肠病理损伤程度; 流式细胞术检测结果显示, 益元化腐汤药物干预显著下调 $\gamma\delta$ TCR 表达($P<0.05$), 且抑制 Th1 细胞(CD4⁺ IFN- γ ⁺ T 细胞)、Th17 细胞(CD4⁺ IL-17⁺ T 细胞)绝对数量和比例($P<0.01$), 然而对 Treg 细胞(CD4⁺ Foxp3⁺ 调节性 T 细胞)表达无明显影响。qPCR 检测结果显示, 益元化腐汤显著下调 UC 小鼠 Th17 细胞因子 IL-17A 和转录因子 ROR γ T mRNA 表达($P<0.01$)。结论 彝药益元化腐汤可能通过抑制 Th17 细胞诱导的炎症反应介导治疗溃疡性结肠炎。

关键词: 益元化腐汤; 溃疡性结肠炎; T 细胞亚群; 辅助性 T 细胞 17

中图分类号: R29

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2022)04-0047-08

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2022.04.012

Study on Intervention Mechanism of Yi Medicine Yiyuanhuafu Decoction Extractum on T Lymphocyte Subsets in Ulcerative Colitis Model

GU Qianlan, CAO Jiangsong, MA Jianguo, GONG Yi, XU Jin, WAN Chunping, XIE Jun

(Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: Objective To study the mechanism of Yi medicine Yiyuanhuafu Decoction regulating T cell subsets in the treatment of ulcerative colitis, and provide scientific basis for clinical application of Yiyuanhuafu Decoction. **Methods** Thirty-two healthy female C57BL/6 mice were randomly divided into four groups: vehicle group, model group, medium dose of Yiyuanhuafu Decoction group (4.05 g·kg⁻¹) and high dose of Yiyuanhuafu Decoction group (8.1 g·kg⁻¹). Except for the vehicle group, other models of ulcerative colitis were established by the way of free drinking water 3% sodium dextran sulfate (DSS) which replace every 2 days. From the first day of drinking DSS, the mice were given the corresponding dose by gavage in each group, once a day for 8 days. Diseases activity index (DAI) and hematoxylin-eosin staining (HE) were used to evaluate the symptoms and morphological changes of ulcerative colitis, respectively. Real-time quantitative polymerase

收稿日期: 2022-06-12

* 基金项目: 云南省科技厅-云南中医药大学应用基础联合专项[2019FF002(-044)]

第一作者简介: 顾茜兰(1995-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 抗炎免疫药理研究。

[△]通信作者: 万春平, E-mail: wanchunping1012@163.com; 谢钧, E-mail: 565805240@qq.com

chain reaction (q-PCR) assay was used to detect the transcriptional expression of T cell subsets related factors in lymphocytes. The expression of T cell subsets Th1、Th17 and regulatory T cell (Treg) was detected by flow cytometry. **Results** Compared with the vehicle group, the body mass and colon mass of the pathological model group was significantly decreased, and the colon length was significantly shortened ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the pathological model group, Yiyuanhuaifu Decoction group significantly increased body weight and colon length ($P<0.05$ or $P<0.01$), and improved the degree of colon pathological injury. The results of flow cytometry showed that Yiyuanhuaifu Decoction significantly down-regulated the expression of $\gamma\delta$ TCR ($P<0.05$), and inhibited the proportion and absolute number of Th1 cells ($CD4^+$ IFN- γ^+ T cells) and Th17 cells ($CD4^+$ IL-17 $^+$ T cells) ($P<0.01$), but had no significant effect on the expression of Treg cells ($CD4^+$ Foxp3 $^+$ regulatory T). The results of fluorescence q-PCR showed that Yiyuanhuaifu Decoction significantly down-regulated the expression of Th17 cell-related factor IL-17A and transcription factor ROR γ t mRNA in UC mice ($P<0.01$). **Conclusion** Yi medicine Yiyuanhuaifu Decoction may alleviate ulcerative colitis by inhibiting the inflammatory response mediated by Th17 cells.

KEY WORDS: Yiyuanhuaifu Decoction; ulcerative colitis; T cells; helper T cell 17 (Th17)

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种病因、病机复杂多样, 会影响直肠、乙状结肠黏膜, 甚至整个结肠的慢性肠黏膜非特异性炎症疾病^[1]。近年来, UC 的发病率在全球范围内不断上升, 甚至在原本发病率低下的发展中国家也有明显增高趋势^[2], 且发病年龄呈年轻化趋势, 严重影响患者的身体健康和生活质量, 目前发病机制尚未明确, 无有效治疗方法。最新研究表明, UC 的发生发展与 T 细胞亚群的失衡、促炎细胞因子和肠黏膜损伤密切相关^[3]。因此如何有效维持 T 细胞亚群间的平衡、抑制炎症因子和促进肠黏膜组织修复, 已成为治疗 UC 重要的药物靶点。既往研究已表明, 从传统医药挖掘治疗溃疡性结肠炎特色疗法具有巨大的前景和意义^[4-5]。彝医药益元化腐汤是基于彝医“腐肠理论、元气”的理论指导, 总结而成的治疗溃疡性结肠炎经验之方, 该方主要由鸡矢藤、紫花树皮、翻白叶等 6 味中药组成, 具有生肌敛疮、收敛止血等功效。临床常用于溃疡性结肠炎、肛肠疾病等肠道类疾病的治疗, 具有较好的临床疗效, 然而其治疗溃疡性结肠炎的免疫学机制尚未明确。

本研究通过予以 3%DSS 构建溃疡性结肠炎小鼠模型, 以 T 细胞亚群平衡为切入点, 旨在揭示彝药益元化腐汤调控 T 细胞亚群介导治疗溃疡性结肠炎的免疫学机制, 为彝药益元化腐汤临床治疗溃疡性结肠炎提供科学依据, 为深入挖掘云南彝族医药治疗溃疡性疾病提供思路。

1 实验材料

1.1 实验动物 32 只 6~8 周龄 SPF 级 C57BL/6 雌性小鼠, 体质量 18~20 g, 从斯贝福 (北京) 生物技术有限公司采购, 合格证号 SCXK (京)2019-0010, 在

SPF 级动物房里饲养, 其温度在 22~26 ℃, 湿度在 50%~55%, 自由饮食, 适应性饲养 1 周后使用。实验方案通过云南中医药大学第一附属医院 (云南省中医医院) 医学伦理委员会审查 (YW2022-008)。

1.2 益元化腐汤浸膏的制备 益元化腐汤生药由云南省中医医院药房提供。将生药以其质量的 10 倍体积纯水浸泡大约 30 min, 煎煮 3 次, 每次 1 h 左右, 过滤, 浓缩, 得浸膏, 折合原药材: 1 g 浸膏相当于 3.7 g 生药。置于 4 ℃冰箱中冷藏保存备用。

1.3 主要试剂 葡聚糖硫酸钠 (武汉华美生物工程有限公司, 生产批号: 02180139); 粪隐血试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 生产批号: 20211108); Trizol 裂解液 (天根生化 (北京) 科技有限公司, 生产批号: RK145); SYBR Premix Ex Taq 染料、RNA 逆转录试剂盒 (Takara 公司, 生产批号: RR820A、RR036A); 标记荧光的抗小鼠 IL-17A、Foxp3、IFN- γ 、CD4、CD3、B220 和 $\gamma\delta$ TCR 抗体 (eBioscience Inc, 生产批号: 506916、577540、505850、100422、100312、553089 和 118118)。

1.4 主要仪器 FACS Canto II 流式细胞仪 (美国 BD 公司); Veriti PCR 扩增仪 (美国 ABI 公司); Strata-gene MX3000P 荧光定量 PCR 仪 (美国 Aglient 公司); Multifuge R 4KR 大型台式离心机 (德国 Thermo Scientific Heraeus); SeptraMax-i3X 多功能酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司)。

2 实验方法及评价

2.1 溃疡性结肠炎动物模型的建立、分组和给药 32 只小鼠在适应性饲养 1 周后, 按体质量随机分为 4 组: 正常组、模型组、益元化腐汤中剂量组和益元化腐

汤高剂量组,每组 8 只。参照文献[6]构建溃疡性结肠炎模型,具体方法如下:模型组、益元化腐汤给药组给予含 3%DSS 的饮用水,每 2 d 更换 1 次饮用水,连续饮用 8 d;正常组自由饮用蒸馏水。参照《中药药理研究方法学》^[7],根据实验动物与人体表面积换算公式计算小鼠给药剂量,于造模当天开始灌胃给药,益元化腐汤中剂量、高剂量组分别给予益元化腐汤浸膏 4.05 g·kg⁻¹ 和 8.1 g·kg⁻¹。模型组和正常组给予等体积的生理盐水灌胃。每天给药 1 次,连续 8 d。

2.2 一般情况观察 每天认真观察且记录各个组小鼠的体质量、饮水量,精神状态,大便性状与大便潜血情况等一般情况。

2.3 疾病活动指数评分(DAI 指数) 实验造模给药期间,每天称量小鼠体质量,计算其体质量分数(当前体质量/前 1 d 体质量);观察并记录其粪便性状,同时采用联苯胺法观察记录便血情况,DAI 指数参照文献[8]评分,评分越高表示肠黏膜病理的损伤愈严重(表 1)。DAI=(体质量降低分数+粪便性状分数+血便分数)/3。

表 1 DAI 评分标准

分数	体质量降低/%	粪便性状	粪隐血
0	不变	正常	阴性(-)
1	1~5	稍软	阳性(+)
2	5~10	很软	阳性(++)
3	10~15	腹泻	阳性(+++)
4	>15	液体粪便	肉眼可见血痕

2.4 H&E 染色检测结肠病理损伤程度 取结肠中间部分约 1 cm 长度,10%福尔马林固定,固定后的结肠组织脱水(75%、85%、95%、100%乙醇浓度梯度),二甲苯透明,石蜡包埋,切成 4 μm 薄片,HE 染色,封片,而后在光学显微镜下观察结肠组织病理所受的损伤程度并拍照。

2.5 实时荧光定量 PCR 检测 常规制备各组小鼠肠系膜淋巴结、脾淋巴细胞,取 1×10⁷ 个总细胞,加入 1 mL RZ 裂解液,漩涡器上激烈混匀,提取总 RNA(根据 Trizol 试剂盒说明书)核酸蛋白仪定量,将总 RNA 定量为 1 000 ng,RT-PCR 法逆转成 cDNA,然后以 cDNA 为模板,采用 SYBRGreen 嵌合荧光法按照产品说明书实时定量 PCR,以 β-actin 为内参基

因,实时定量 PCR 测定 Th17 和 Treg 相关因子的 mRNA 表达水平。结果以 Ct 值显示,相对表达量按照 2^{-ΔΔCt} 法进行统计分析。特异基因引物序列见表 2。

表 2 基因特异性引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')
β-actin	(Forward):5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3'
	(Reverse):5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'
IL-17A	(Forward):5'-TTTAACTCCCTTGGCGCAAAA-3'
	(Reverse):5'-CTTTCCTCCGCATTGACAC-3'
RORγt	(Forward):5'-AATGTGGCCTACTCTGCAC-3'
	(Reverse):5'-CTTGGCCACTTGTTCCTGTT-3'
IFN-γ	(Forward):5'-ACTGGCAAAAGGATGGTGAC-3'
	(Reverse):5'-TGAGCTCATTGAATGCTTGG-3'
Foxp3	(Forward):5'-TTATCCAGCCTGCCTCTGAC-3'
	(Reverse):5'-AGGGGGTTCAAGGAAGAAGA-3'

2.6 流式细胞仪检测 T 细胞亚群相关因子及特异性转录因子的表达

2.6.1 脾、肠系膜淋巴结细胞的制备 将小鼠脱颈处死,在无菌环境下取其脾、肠系膜淋巴结。并将其磨碎,过膜,离心(1 200 r/min,5 min),上清弃去,弹散,脾脏加入红细胞裂解液 1 mL(淋巴结无需加裂解液,直接过膜),混匀,静置 1 min,加入 PBS 停止,过膜,离心,在洗涤了 2~3 次之后,使用含 10%FBS 的 RP-MI-1640 将细胞调到所需浓度。将制备好的淋巴细胞的细胞浓度调为 2×10⁶,进行后续流式细胞染色。

2.6.2 流式细胞染色 流式细胞术检测参照文献[9-10]。

(1)表面标志染色:取 2×10⁶ 个细胞于流式细胞管中,3 000 r/min,5 min 离心,流式细胞洗液洗 1 遍,加入抗 CD16/CD32 单抗阻断非特异性结合后,加入荧光标记的抗小鼠 CD4、CD3、B220、γδTCR 荧光抗体,4 ℃避光孵育 20 min,用洗液洗 1 次,流式细胞仪收集细胞。

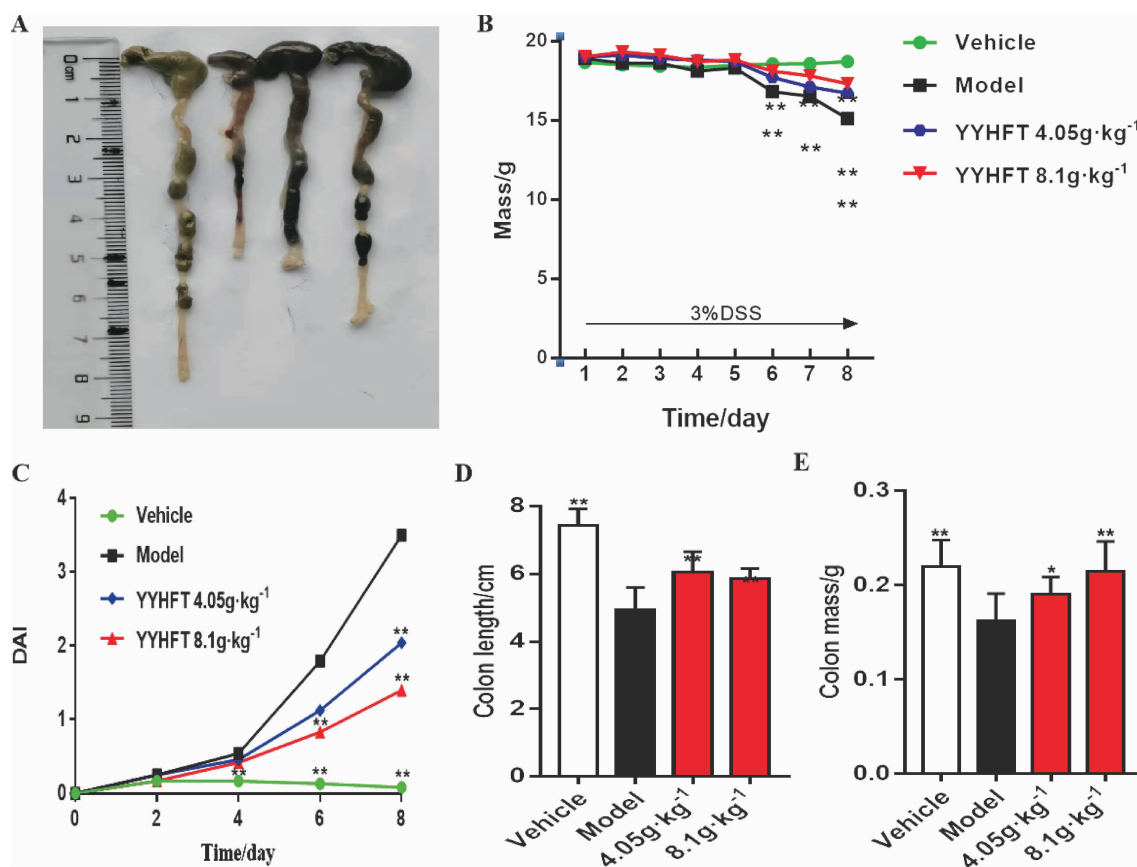
(2)胞内染色:选取 2×10⁶ 个细胞,加入刺激剂(PMA、Ionomycin 及 BFA)于 5% CO₂ 培养箱中培养 4 h 之后,把细胞收集于流式管中,流式细胞洗液洗 1 遍,加入抗 CD16/CD32 单抗阻断非特异性结合后,加入荧光标记抗小鼠 CD4 抗体,4 ℃避光孵育 20 min,离心(3 000 r/min,5 min),细胞收集、固定、穿膜,然

后加入荧光标记的抗 IL-17A、IFN- γ 流式抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 45 min,洗液洗 1 次,流式细胞仪检测。但 Treg 细胞胞内特异转录因子 Foxp3 的染色,不需要上述刺激,直接行胞内染色,上机分析。

2.7 统计分析 应用 SPSS 26.0 以及 GraphPad Prism 9 进行统计处理分析,计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。均值间差异比较使用 t 检验,进一步做两组间比较时,采用 SNK- q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 益元化腐汤对溃疡性结肠炎模型小鼠疾病活动度指数的影响 和正常组小鼠比较,模型组小鼠体质量、结肠长度和质量显著下降,疾病活动指数评分(DAI)升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);和模型组对比,益元化腐汤 $4.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $8.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组小鼠体质量明显比模型组高,差异具有统计学意义($P < 0.01$),DAI 评分明显下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结果见图 1。



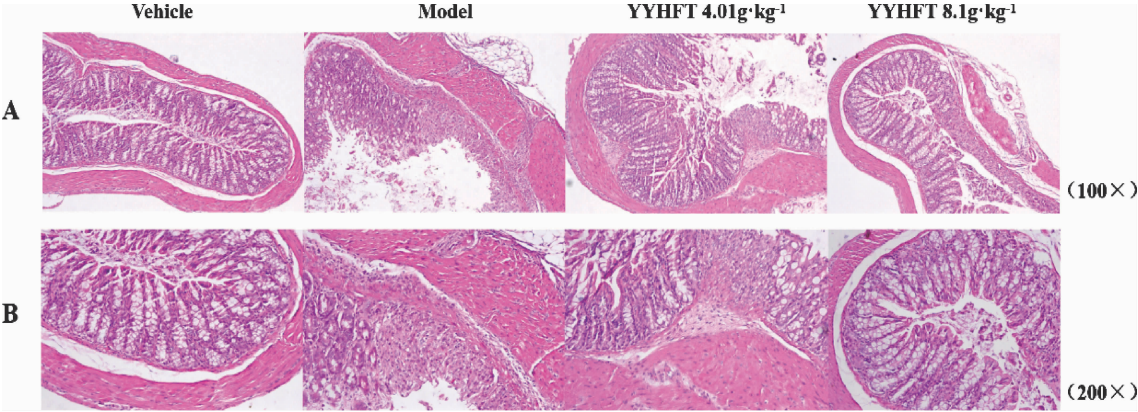
注:A.结肠直观图;B.小鼠体质量;C.DAI 评分;D.结肠长度;E.结肠质量。Vehicle(正常组);Model(模型组);YYHFT $4.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (益元化腐汤中剂量组);YYHFT $8.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (益元化腐汤高剂量组)。与模型组比较:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 1 益元化腐汤对溃疡性结肠炎模型小鼠疾病活动指数的影响

3.2 益元化腐汤对 UC 小鼠结肠组织病理损伤程度的影响 正常组结肠壁可见各层结构完整,排列整齐、完整的隐窝结构,杯状细胞丰富,无溃疡形成;模型组结肠组织表现为大片黏膜层缺失、脱落,弥漫性炎性细胞浸润;益元化腐汤 $4.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $8.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组较模型组结肠组织的炎性细胞浸润和黏膜层缺损减小,肠黏膜溃疡减轻。结果如图 2。

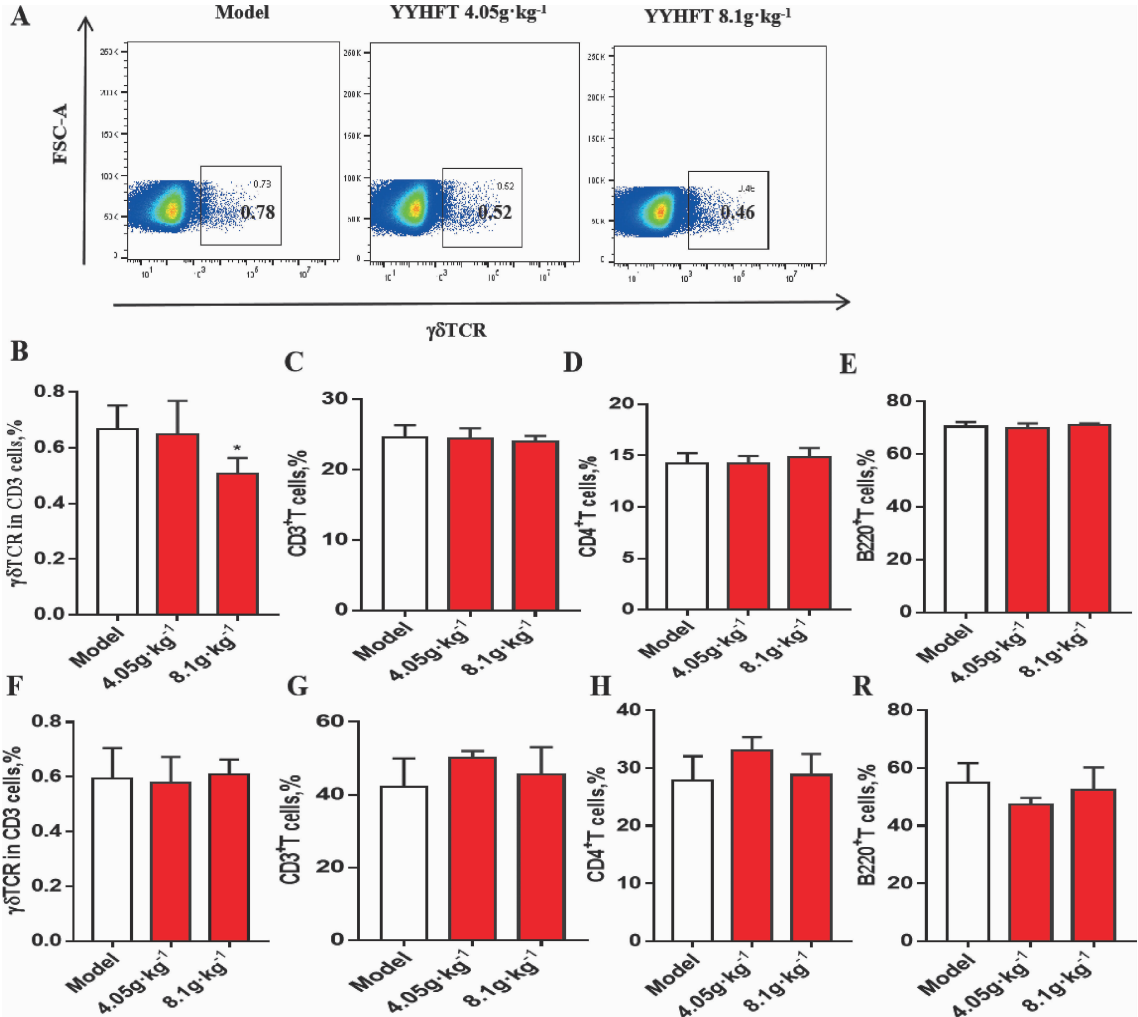
3.3 益元化腐汤对溃疡性结肠炎模型小鼠淋巴细胞

亚群的影响 流式细胞检测结果显示,与溃疡性结肠炎模型小鼠比较,益元化腐汤 $8.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组显著抑制小鼠脾淋巴细胞中 $\gamma\delta\text{TCR}$ 比例($P < 0.05$)。益元化腐汤 $4.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $8.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组对脾脏和肠系膜淋巴结淋巴细胞总 $\text{CD}3^+$ T 细胞及亚群 $\text{CD}4$ 细胞亚群比例变化不明显,差异无统计学意义($P > 0.05$)。B 细胞($\text{B}220^+$)染色结果显示,益元化腐汤治疗后 B 细胞表达亦无统计学意义($P > 0.05$)。见图 3。



注:结肠组织固定,脱水,透明,包埋,切片,染色,封片,镜下观察结肠组织病理所受损伤程度。A.100× H&E 染色;B.200× H&E 染色。

图 2 益元化腐汤对 UC 小鼠结肠组织病理损伤程度的影响

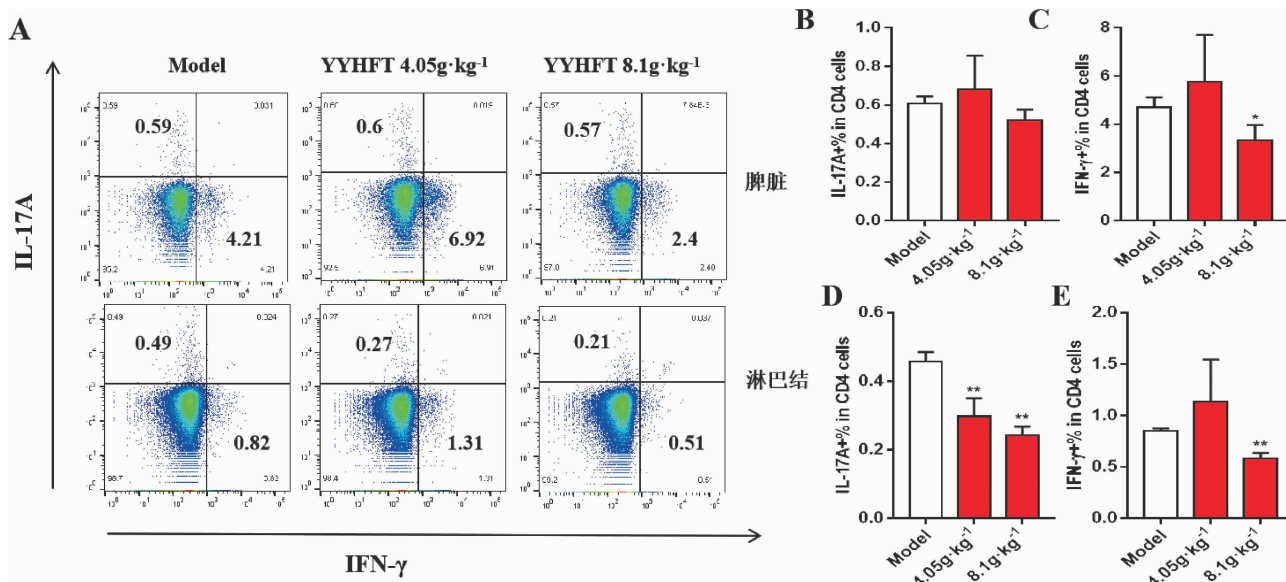


注:分离脾脏和淋巴结,制成悬液,流式细胞术检测其表面、胞内细胞因子和转录因子的表达。A. 脾脏 $\gamma\delta\text{TCR}^+\text{CD3}^+$ T 淋巴细胞流式图;B. 脾脏 $\gamma\delta\text{TCR}^+\text{CD3}^+$ T 淋巴细胞比例统计分析柱状图;C、D、E 分别为脾脏淋巴细胞 CD3^+ T 细胞、 CD4^+ T 细胞、 B220^+ T 细胞比例统计分析柱状图;G、H、R 分别为肠系膜淋巴结淋巴细胞 $\gamma\delta\text{TCR}^+\text{CD3}^+$ T 细胞、 CD3^+ T 细胞、 CD4^+ T 细胞以及 B220^+ T 细胞比例统计分析柱状图。与模型组比较: * $P<0.05$ 。

图 3 益元化腐汤对溃疡性结肠炎模型小鼠淋巴细胞亚群的影响

3.4 益元化腐汤对溃疡性结肠炎模型小鼠淋巴细胞 Th1/Th17/Treg 细胞表达影响 流式胞内染色结果显示,与溃疡性结肠炎模型小鼠比较,益元化腐汤 4.05 g·kg⁻¹ 和 8.1 g·kg⁻¹ 剂量治疗后,显著抑制 Th1 细胞

(CD4⁺IFN- γ ⁺ T 细胞)、Th17 细胞 (CD4⁺IL-17⁺ T 细胞)比例与绝对数量,差异具有统计学意义($P<0.01$),然而对 Treg 细胞(CD4⁺ Foxp3⁺ 调节性 T 细胞)表达无明显的影响。结果见图 4。



注:分离脾脏和淋巴结,制备淋巴细胞悬液,胞内染色检测淋巴细胞胞内细胞因子和转录因子的表达。A.脾脏和肠系膜淋巴结淋巴细胞 Th1(IFN- γ)、Th17(IL-17A)细胞流式图;B、C 分别为脾脏 Th1(IFN- γ)、Th17(IL-17A)细胞比例统计分析柱状图;D、E 分别为肠系膜淋巴结淋巴细胞 Th1(IFN- γ)、Th17(IL-17A)细胞比例统计分析柱状图。与模型组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 4 益元化腐汤对溃疡性结肠炎模型小鼠 Th1/Th17/Treg 的影响

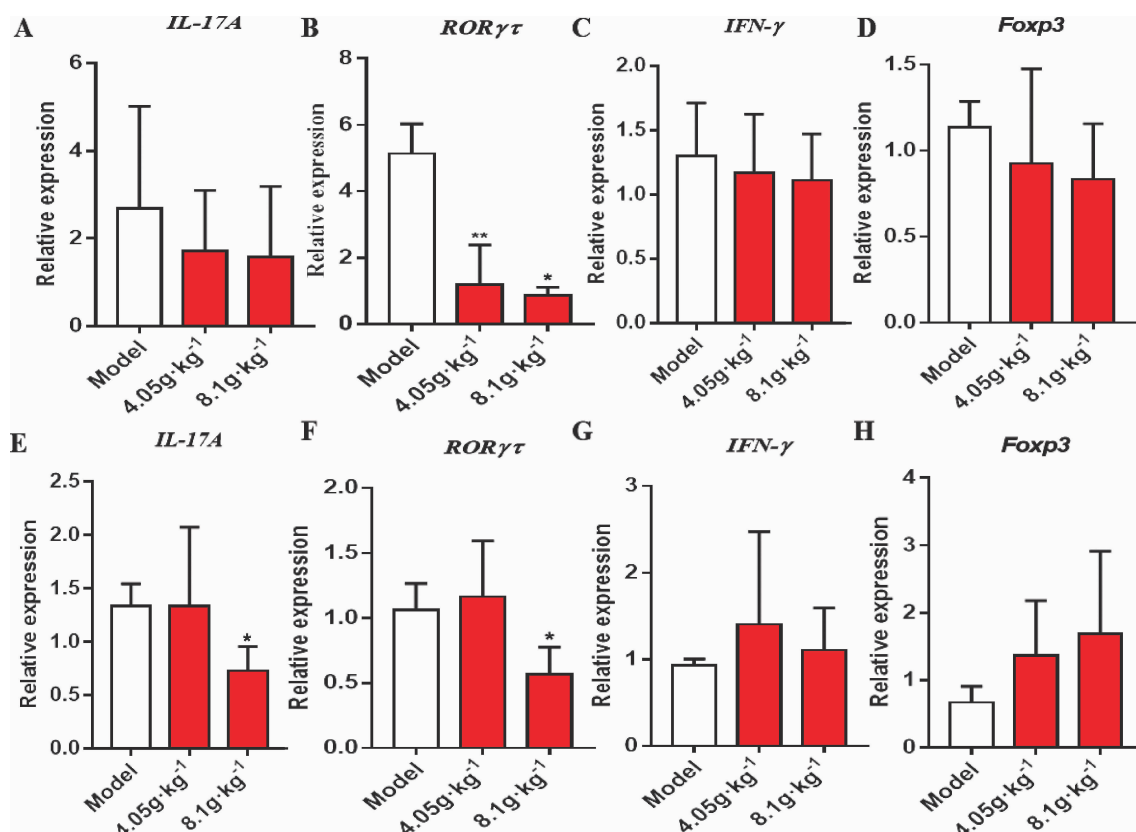
3.5 益元化腐汤对 UC 溃疡性结肠炎模型 T 细胞亚群相关因子 mRNA 表达的影响 如上所述,益元化腐汤药物干预显著下调 Th17 细胞的表达,为在转录水平,研究益元化腐汤对 Th17 细胞调控机制,笔者进一步采用荧光定量 PCR 检测 Th17 相关基因 IL-17A、维甲酸相关孤儿受体(retinoic acid-related orphan receptor, ROR γ T)的 mRNA 表达。结果显示,与模型组比较,益元化腐汤 8.1 g·kg⁻¹ 剂量组 IL-17A、ROR γ T mRNA 表达显著下调,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与流式细胞术检测结果一致,益元化腐汤 8.1 g·kg⁻¹ 药物干预对 Th1 细胞因子 IFN- γ 和调节性 T 细胞转录因子 Foxp3 mRNA 的表达无明显影响。结果见图 5。

4 讨论

彝医药,我国民族医药的重要组成部分,融合本民族丰富的医药知识,在治疗溃疡性结肠炎方面具有无可比拟的优势^[11]。“益元化腐汤”乃云南省名中医彝药民族大家方文才教授基于彝医理论“腐肠理论、元

气”理论总结治疗炎症性肠病的有效方剂,该方应用于炎症性肠病的临床治疗,疗效确切,但其治疗溃疡性结肠炎的免疫学机制还不明确,本研究通过 DSS 构建 UC 模型,益元化腐汤药物干预,减少 DAI 评分,减轻了 UC 小鼠结肠组织病理损伤程度,显示出对溃疡性结肠炎较好的疗效。

溃疡性结肠炎属于慢性炎性自身免疫性疾病,尽管其具体的病因、病机尚未明确,但最新的研究已表明,适应性免疫异常在溃疡性结肠炎肠道炎症和组织损伤中扮演关键角色^[12]。在机体适应性免疫反应中, T 淋巴细胞起着关键作用,它不仅承担细胞免疫功能的调节,还参与适应性免疫的调控^[13]。Th17、Th1、Treg 为 CD4⁺ T 细胞的 3 种亚型,在自身免疫疾病中起着关键作用^[14-15]。Th1 细胞分泌 γ 干扰素(interferon γ , IFN- γ)等细胞因子介导细胞免疫反应,有研究显示,在溃疡性结肠炎肠黏膜免疫应答中抑制炎症的发展^[16]。Th17 细胞主要由 IL-23 诱导分化、分泌促炎细胞因子 IL-17,主要介导机体的炎症反应,具有强大



注:制备淋巴细胞悬液。加入裂解液后匀浆,离心,提取总 RNA,定量,将其逆转成 cDNA 并为模板,进行实时定量 PCR 相关因子 mRNA 表达。A、B、C、D 分别为肠系膜淋巴结淋巴细胞的目的基因 IL-17A、ROR γ t、IFN- γ 、Foxp3 的 mRNA 表达;E、F、G 分别为脾脏淋巴细胞的目的基因 IL-17A、ROR γ t、IFN- γ 、Foxp3 的 mRNA 表达。与模型组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图5 益元化腐汤对 UC 溃疡性结肠炎模型 T 细胞亚群相关因子 mRNA 表达的影响

的促炎活性,作为 UC 严重程度的指标^[17]。Treg 细胞主要分泌细胞因子 IL-10、TGF- β ,刺激 Foxp3 表达,在细胞免疫系统中发挥负调控作用,在维持机体免疫耐受、免疫平衡中扮演不可替代的角色^[18]。因此,有效抑制初始 CD4⁺ T 细胞向高致病性 Th17 细胞分化,诱导 Treg 细胞扩增,维持 Th 细胞亚群间的平衡和自身内环境稳定,已成为治疗 UC 的一个重要的切入点。为进一步揭示益元化腐汤对溃疡性结肠炎模型小鼠的免疫靶细胞,我们使用流式细胞术检测 CD4⁺ T 细胞亚群(Th1、Th17 与 Treg)的表达水平,结果显示,益元化腐汤显著下调溃疡性结肠炎模型小鼠 Th1 和 Th17 细胞的表达水平,然而对 Treg 细胞比例无明显的影响,提示益元化腐汤可能通过下调 Th1 细胞适应性免疫反应,抑制 Th17 细胞介导炎症反应,从而治疗溃疡性结肠炎。

Th17 细胞分化主要通过初始 T 细胞在相关细胞因子刺激诱导下形成辅助性 T 细胞,产生 ROR γ t 特

异性转录因子,广泛参与促进多种自身免疫性疾病的发生发展,其中包括溃疡性结肠炎^[19-21]。为进一步研究益元化腐汤对 Th17 细胞分化调控的机制,我们采用 q-PCR 检测 Th17 细胞相关基因转录表达,结果显示,益元化腐汤抑制 UC 小鼠淋巴细胞因子 IL-17A 和特异性转录因子 ROR γ t mRNA 表达,与流式细胞检测结果一致,提示抑制初始 T 细胞向炎症性 Th17 细胞分化可能是益元化腐汤治疗溃疡性结肠炎的重要机制之一。然而彝药益元化腐汤调控 Th17 细胞的具体分子机制尚不明确,课题组将在后续研究中,通过构建 Th17 细胞分化模型,进一步研究益元化腐汤调控 Th17 细胞分化的分子机制。

综上所述,益元化腐汤能够显著改善溃疡性结肠炎,其作用机制可能与通过抑制 Th17 细胞诱导的炎症反应相关。该研究为彝药益元化腐汤临床治疗溃疡性结肠炎提供科学依据,为深入挖掘云南彝族医药治疗溃疡性疾病提供思路。

参考文献:

- [1] 张钧芳,耿蕊. 益气解毒汤结合美沙拉秦缓释颗粒治疗溃疡性结肠炎临床研究[J]. 国际中医中药杂志,2019(8): 832-835.
- [2] XU M,DUAN X Y,CHEN Q Y,et al. Effect of compound sophorae decoction on dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis in mice by regulating Th17/Treg cell balance[J]. Biomed Pharmacother,2019,109:2396-2408.
- [3] TATIYA -APHIRADEE N,CHATUPHONPRASERT W, JARUKAMJORN K. Immune response and inflammatory pathway of ulcerative colitis[J]. J Basic Clin Physiol Pharmacol,2018,30(1):1-10.
- [4] 谢晶日,孙涛,张冰. 溃疡性结肠炎的中医药治疗进展及相关优势探讨[J]. 辽宁中医杂志,2016,43(2):425-427.
- [5] 贺潇月,谢钧. 少数民族医药治疗溃疡性结肠炎研究进展[J]. 亚太传统医药,2021,17(4):8-12.
- [6] 万春平,熊尤龙,祁燕,等. 肠系膜淋巴结 Th1、Th17 细胞在小鼠结肠炎模型发病中作用的研究[J]. 胃肠病学,2013,18(8):477-481.
- [7] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:1103.
- [8] LI Z C,LIN M L,LI Y D,et al. Total flavonoids of *Sophora flavescens* and kurarinone ameliorated ulcerative colitis by regulating Th17/Treg cell homeostasis[J]. J Ethnopharmacol,2022,297:115500.
- [9] XU S K,ZUO A X,GUO Z J,et al. Ethyl caffeate ameliorates collagen-induced arthritis by suppressing Th1 immune response[J]. J Immunol Res,2017,2017:7416792.
- [10] 王敏,郑喜,祁燕,等. 黄芪皂苷 II 抗肝癌肺转移效应及作用机理的研究[J]. 中药药理与临床,2019,35(6): 41-45.
- [11] 陈泽谋. 彝药米太勒治疗慢性非特异性溃疡性结肠炎临床观察[J]. 中国民族医药杂志,2005(5):16.
- [12] 朱凤,韦春珠,范恒,等. 复方苦参汤通过调节肠道 Th1 及 Th17 细胞分化缓解溃疡性结肠炎肠道损伤[J]. 华中科技大学学报(医学版),2022,51(2):146-151.
- [13] MA H D,TAO W Y,ZHU S. T lymphocytes in the intestinal mucosa: defense and tolerance[J]. Cell Mol Immunol,2019,16(3):216-224.
- [14] DIXON L J,KABI A,NICKERSON K P,et al. Combinatorial effects of diet and genetics on inflammatory bowel disease pathogenesis[J]. Inflamm Bowel Dis,2015,21(4): 912-922.
- [15] LV Q,QIAO S M,XIA Y,et al. Norisoboldine ameliorates DSS-induced ulcerative colitis in mice through induction of regulatory T cells in colons[J]. Int Immunopharmacol,2015,29(2):787-797.
- [16] 刘滨,刘雅清,宋红新,等. 黄芩汤对溃疡性结肠炎小鼠 Th17/Treg、Th1/Th2 细胞平衡的影响[J/OL]. 中国实验方剂学杂志:1-9(2022-08-30).
- [17] CĂTANĂ C S,BERINDAN NEAGOE I,COZMA V,et al. Contribution of the IL-17/IL-23 axis to the pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. World J Gastroenterol,2015,21(19):5823-5830.
- [18] TONG L J,HAO H N,ZHANG Z,et al. Milk-derived extracellular vesicles alleviate ulcerative colitis by regulating the gut immunity and reshaping the gut microbiota [J]. Theranostics,2021,11(17):8570-8586.
- [19] HUA Y Z,LIU R Q,LU M,et al. Juglone regulates gut microbiota and Th17/Treg balance in DSS-induced ulcerative colitis[J]. Int Immunopharmacol,2021,97:107683.
- [20] YANG X O,PAPPU B P,NURIEVA R,et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma[J]. Immunity,2008,28(1):29-39.
- [21] LIN R,MA C Y,FANG L L,et al. TOB1 blocks intestinal mucosal inflammation through inducing ID2-mediated suppression of Th1/Th17 cell immune responses in IBD[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol,2022,13(4): 1201-1221.