

Th17/Treg 细胞在健脾方防治克罗恩大鼠中的作用机制

吴璐^{1,2} 翁志军² 季光³

(1 上海市气功研究所,上海,200030; 2 上海中医药大学,上海,201203; 3 上海中医药大学附属龙华医院,上海,200032)

摘要 目的:观察 Th17/Treg 细胞平衡在健脾方防治 TNBS 诱导的克罗恩大鼠中的作用机制;方法:24 只清洁级雄性 SD 大鼠随机分为:1) 正常对照组 NG($n=8$):从造模第 2 周起双蒸水灌胃,1 次/d,灌胃量按 1 mL/100 g,共 3 周;2) TNBS 模型组 MG($n=8$):从第 1 周开始 TNBS 灌肠,灌肠剂量(mL) = 体重(g) \times 0.003 mL/g,1 次/周,造模持续共 4 周;3) 模型 + 健脾方防治组 JP($n=8$):从造模第 2 周开始,在 TNBS 灌肠后的第 2 天新增中药健脾方灌胃治疗,灌胃量按 1 mL/100 g,1 次/d,灌胃持续 3 周;采用 ELISA、免疫组织化学、real-time PCR 等技术观察各组大鼠血液、结肠黏膜中与 Th17、Treg 分化和功能密切相关的 IFN- γ 、IL-17、ROR γ t、FoxP3 蛋白与基因的表达差异;结果:健脾方能通过下调 Th1 细胞释放的 IFN- γ , 进而调节 Th1/Th2 的平衡,同时也能通过下调 Th17 细胞分泌 IL-17、ROR γ t 炎性反应因子的分泌和促进 Treg 细胞分泌的抗炎因子 FoxP3 来调节 Th17/Treg 的平衡,进而达到防治 TNBS 诱导的大鼠克罗恩病的作用。结论:健脾方能够通过调节 Th17/Treg 细胞平衡中多个关键细胞因子和转录因子的方式,达到预防和治疗 TNBS 诱导的大鼠克罗恩病炎症反应程度之目的。

关键词 克罗恩病;健脾方;IFN- γ ;IL-17;ROR γ t;FoxP3

The Mechanism of Th17/Treg Cells in The Prevention and Treatment for Rat with Crohn's Disease with a Spleen-invigorating Prescription

Wu Luyi^{1,2}, Weng Zhijun², Ji Guang³

(1 Shanghai Qigong Institute, Shanghai 200030, China; 2 Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200030, China; 3 Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200030, China)

Abstract Objective: To observe the mechanism of TH17/Treg cells in the prevention and treatment for trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced rats with Crohn's disease using a spleen-invigorating prescription (SIP). **Methods:** A total of 24 SPF grade male Sprague - Dawley (SD) rats were randomly divided into 3 groups: (1) the normal rat control group (NG; $n=8$) received intragastrically administered double-distilled water once daily at 1 mL/100 g for 3 weeks; (2) the TNBS model group (MG; $n=8$) received enemas with TNBS once weekly at a dosage of body weight (g) \times 0.003 mL/g for 4 weeks; and (3) the TNBS model + SIP and treatment group (JP; $n=8$) was treated with an additional Chinese SIP 1 week after undergoing TNBS enema. The Chinese medicine was administrated intragastrically once daily for another 3 weeks at a dosage of 1 mL/100 g. Multiple techniques, including enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunohistochemistry, and real-time PCR, were used to observe the differential expression of particular genes and proteins in blood and colonic mucosa of rats which belong to different groups. This study focused on genes and proteins that are highly associated with Th17 and Treg cell differentiation and function, including interferon (INF)- γ , IL-17, retinoid-related orphan nuclear receptor (ROR) γ t, and FoxP3. **Results:** SIP effectively adjusted Th1/Th2 homeostasis by downregulating the Th1-secreted cytokines INF- γ . By downregulating Th17-secreted inflammatory factors, IL-17 as well as ROR γ t and suppressing the secretion of FoxP3, SIP also promoted Th17/Treg homeostasis. Then, the symptoms of TNBS-induced rat colitis were successfully prevented and treated. **Conclusion:** SIP prevented and treated inflammation associated with TNBS-induced rat with Crohn's disease by regulating multiple key cytokines and transcription factors related to Th1/Th2 and Th17/Treg cell homeostasis.

Key Words Colonitis; Spleen-invigorating; IFN- γ ; IL-17; ROR γ t; FoxP3

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2017.06.049

基金项目:上海市优秀青年教师项目(编号:ZZszy12011)

作者简介:吴璐(1984.07—),女,博士,助理研究员,业务副科长,研究方向:中医药防治炎症性肠病的基础与临床研究, E-mail: luyitem@163.com

通信作者:季光(1968.08—),男,博士,博士研究生导师,教授,副校长,研究方向:中医药防治酒精肝和脂肪肝的基础与临床研究, E-mail: jiliver@vip.sina.com

T 细胞介导的免疫反应在 IBD 组织破坏的发病机制中发挥重要的作用^[1-2], 目前研究发现, 幼稚 CD4⁺ T 淋巴细胞可分为 Th1、Th2、Th17 和 Treg, 4 个主要功能成熟的亚群, 分别通过不同的转录途径和特征性的细胞因子执行不同的生物学功能^[3]。如 Th1 细胞主要分泌干扰素- γ (IFN- γ)、白介素-2 (IL-2) 等细胞因子, 具有抗细胞内细菌、病毒感染等作用^[4-5]。而 Th2 型细胞则分泌 IL-4、IL-5 和 IL-13 等细胞因子, 参与介导体液免疫和变态反应^[6]。Th17 细胞是一类不同于 Th1 和 Th2 细胞的 CD4⁺ T 细胞, Th17 特异性分泌白介素 17 (IL-17) 效应因子, IL-17A 是 IL-17 家族的原型, 其主要介导炎性反应, IL-17 启动了其下游 NF- κ B、p38MAPK 等信号转导途径, 通过协同及负调控等信号转导机制影响众多炎症因子的转录和表达^[5]。同时维甲酸相关孤核受体 γ t (Retinoid-related Orphan Nuclear Receptor γ t, ROR γ t) 是 Th17 细胞特异性转录因子, 参与自身免疫性疾病、感染和肿瘤等多种病理过程, 在自身免疫性疾病和机体防御反应中具有重要的意义^[7]。Treg 依赖特异性转录因子叉头蛋白 P3 (FoxP3) 以维持稳定表达, 释放 IL-10、转化生长因子- β (TGF- β) 等细胞因子来抑制自身反应性 T 细胞的增殖活化, 维持自身免疫耐受^[8]。CD4⁺ T 细胞的亚群各自发挥不同的功能, 并相互制约并且在一定的条件下可以互相转化^[9]。研究发现, 与 Th1 和 Th2 相关的细胞因子 IFN- γ 和 IL-4 能够抑制 Th17 亚群的分化, 而 Treg 对 Th1、Th2 和 Th17 3 种效应细胞均有抑制作用^[10]。同时, Treg 和 Th17 在不同的环境下也可以相互转化, 说明了这些亚群之间存在非常复杂的关系^[11-12]。

肠道初始 Th 细胞活化后会向不同的亚型细胞分化如 Th1、Th2、Th17 和 Treg 细胞, 并各自在调控免疫反应中发挥了不同的作用。它们参与了免疫炎症反应级联反应中抗原的识别, 细胞信号通路的激活, 炎症反应效应的放大, 下游炎症反应因子的释放等诸多环节。研究表明 miRNA 作为 Th 细胞分化的重要调控因素, 课题组前期研究结果提示, CD 患者结肠黏膜存在较多的 miRNAs 表达异常, 参与免疫系统的调节^[13-14]。因此, 干预其中任何一个必要环节都可能起到缓解病情的作用^[15]。中医药治疗 IBD 的特点是多途径、多层次、多靶点并且可以长期维持用药治疗^[16-17], 不良反应较少。实验研究发现, 健脾方成分治疗 CD 效应显著^[18-19], 且具有一定的免疫调节作用, 但以往针对健脾方预防和治疗 CD 的机制研究有待于逐步揭示和阐明, 有必要对此进行深

入探讨。本实验是以 CD 中 Th17/Treg 细胞平衡为切入点。初步揭示健脾方在预防和治疗 CD 的可能作用机制, 为推广健脾方在临床预防和治疗 CD 方面的应用提供实验的证据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 24 只 SPF 级雄性 SD 大鼠, 重(160 ± 10) g, 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司[生产许可证号: SCXK(沪)2012-0002], 饲养于上海中医药大学附属龙华医院实验动物中心, 所有大鼠均自由饮水(药)、摄食, 饲养室内温度为(24 ± 2) °C, 湿度为(55 ± 10)%, 光照时间为 12 h(8:00-20:00)。适应性饲养后, 大鼠无不良反应、饮食饮水正常者, 大鼠按体重由小到大编号, 采用完全随机法分组并纳入实验。所有实验对动物的处理符合中国科学技术部指导建议。

1.1.2 药物 健脾方由以下中药(补骨脂 15 g、白头翁 15 g、马齿苋 30 g、茯苓 9 g、白术 9 g、藿香 9 g) 组成, 根据《中药药理学研究方法学》标准, 将中药加入蒸馏水中, 煎煮 2 次, 合并 2 次药液, 4 层纱布过滤, 水浴锅 95 °C 浓缩体积为 555.5 mL 的药液。置 4 °C 冰箱保存备用。根据《中药药理学》(全国高等中医药院校教材《中药药理学》陈长勋主编, 上海科学技术出版社, 2006 年 10 月第 1 版, 191 页, 表 22-3) 用药剂量按人鼠等效剂量灌胃, 大鼠为 1 mL/100 g。

1.1.3 试剂与仪器 TNBS (Sigma 公司)、EnVision 试剂盒 (Rabbit/mouse, Dako 公司)、兔抗大鼠一抗 IL-17A、RoR γ t、Foxp3 (Sigma 公司)、SYBRGreen PCR 试剂盒 (上海捷瑞生物工程公司)、c DNA 合成试剂盒 (Fermentas)、Trizol (Invitrogen)、DAB (Biobasic, Inc, 美国)、PCR 仪 (ependorf 公司)、全自动组织脱水机 SAKURA-PB-150 (日本樱花检验仪器株式会社)、StepOne™ plus 实时荧光定量 PCR (Applied Biosystems 公司)、ABI-7500 型 Real-time 检测仪 (美国应用生物仪器公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备

1.2.1.1 分组 24 只清洁级雄性 SD 大鼠随机分为: 1) 正常对照组; 2) TNBS 模型组; 3) 模型 + 健脾方防治组。

1.2.1.2 模型制备 按照 Morris^[20] 等方法制备 CD 大鼠模型, 5% TNBS 与 50% 的乙醇按 2:1 比例混合而成, 3% 戊巴比妥钠麻醉大鼠 (按体重计, 0.1 mL/100 g), 使其身体垂直, 处于倒立位, 每次灌肠剂量:

表1 Real-time qPCR. Real-time PCR 所用引物列表

基因	引物(sense)	引物(antisense)
IL-17a	5'CTGATGCTGTTCCTGCTACTGA3'	5'GTGAACTGGAACGGTTGAGGTA3'
FoxP3	5'GAGAAAGTGGCAGGGAAGGAGT3'	5'TCTGAGGCAGGCTGGATAACG3'
β -actin	5'CTAAGGCCAACCGTGAAAAGAT 3'	5'ACCAGAGGCATACAGGGACAAC

灌肠液(mL) = 体重(g) \times 0.003 mL/g, 5 mL 注射器连接灌肠针顺大鼠结肠生理曲度缓缓从肛门插入约 6~9 cm, 注入灌肠液。灌肠后将大鼠倒立体位约 5 min。每周第 1 天灌肠 1 次, 共 4 次, 持续 4 周。

1.2.2 给药方法 24 只清洁级雄性 SD 大鼠随机分为: 1) 正常对照组 NG($n=8$): 从造模第 2 周起双蒸水灌胃, 1 次/d, 灌胃量按 1 mL/100 g, 共 3 周; 2) TNBS 模型组 MG($n=8$): 从第 1 周开始 TNBS 灌肠, 灌肠剂量(mL) = 体重(g) \times 0.003 mL/g, 1 次/周, 造模持续共 4 周; 3) 模型 + 健脾方防治组 JP($n=8$): 从造模第 2 周开始, 在 TNBS 灌肠后的第 2 天新增中药健脾方灌胃治疗, 灌胃量按 1 mL/100 g, 1 次/d, 灌胃持续 3 周。

1.2.3 检测指标与方法 以 3% 戊巴比妥钠麻醉大鼠(按体重计, 0.1 mL/100 g), 腹主动脉取血, 静置约 0.5 h 后离心分离血清, -80°C 冰箱保存用于 ELISA 检测。截取距离肛门 6~9 cm 处病变明显结肠, 沿肠系膜纵行剖开, 用预冷的 4°C 生理盐水冲洗后, 肉眼观察并记录黏膜损伤情况。每只大鼠结肠标本分 3 份, 其中 2 份液氮保存用于 Real-time PCR 检测。另一份用 10% 的中性缓冲甲醛溶液固定, 石蜡包埋组织, 切片厚度为 4 μm , 用于 Masson 染色和免疫组化实验检测。所有实验对动物的处理符合中国科学技术部指导建议。

1.2.3.1 结肠组织病理观察(HE 染色) 切片常规脱蜡至水、苏木素核染、盐酸酒精分化、伊红胞质染色、梯度酒精脱水及二甲苯透明, 中性树脂胶封片干燥后经 Olympus-BX53 显微镜进行图像采集($\times 400$)。

ELISA 技术检测健脾方对克罗恩病大鼠血清 INF- γ 表达的影响: 本试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中大鼠 IFN- γ (Sigma, USA) 水平。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值), 通过标准曲线计算样品中大鼠 IFN- γ 浓度。

1.2.3.2 Real-time PCR 法检测 大鼠结肠组织 L-17A, FoxP3 mRNA: 组织总 RNA 的抽提, 组织匀浆, 采用 Trizol 法提取总 RNA, 检测浓度、纯度、完整性。取相等量的总 RNA, 采用 SYBRGreen PCR 试剂盒(上海捷瑞生物工程公司)逆转录 cDNA, 用于 Real-

time qPCR. Real-time PCR 所用引物序列。见表 1。

1.2.3.3 免疫组化检测大鼠结肠组织 IL-17A、ROR γ t、FoxP3 蛋白水平 切片 0.3% H_2O_2 抑制内源性过氧化物酶 20 min; 20% 正常羊血清室温孵育 30 min; 滴加一抗在 37°C 下孵育 2 h, IL-17A、ROR γ t、FoxP3 一抗(sigma, USA); EnVision 试剂(HRP/R)加入后保留 30 min; DAB 显色 1~2 min; 苏木素衬染色, 树脂封片; 采用 Olympus-BX53 显微镜进行图像采集($\times 400$), 数据分析采用 Image-Pro PLUS 软件。

1.3 统计学方法 数据分析采用 SPSS 18.0 统计软件进行统计学处理。对数据作正态分布检验。数据若符合正态分布, 组间差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 方差齐时采用最小显著差法(Least significant difference, LSD)比较组间差异性, 方差不齐时用 Games-Howell 比较组间差异性, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠结肠组织病理 HE 染色 大鼠结肠 HE 染色结果如图 1 所示。正常组大鼠结肠组织肉眼观察结肠肠管粗细均匀, 结肠壁厚薄一致, 柔软有弹性, 肠黏膜面光滑整齐, 黏膜皱襞完整, 无出血点、糜烂及溃疡。HE 染色镜下显示结肠黏膜上皮无缺损, 腺体排列整齐, 黏膜及黏膜下层无充血、水肿、炎性细胞浸润等异常改变, 结构完好。模型组: 大鼠结肠黏膜上皮细胞坏死、脱落, 肠壁全层大量炎性反应细胞浸润, 肉芽肿形成, 纤维组织增生。健脾方组: 清热健脾方干预后, HE 染色镜下显示结肠黏膜腺体排列较整齐, 上皮修复中, 黏膜下有少量水肿与炎性细胞。显示清热健脾方可有效改善克罗恩病大鼠结肠组织结构, 减轻结肠组织损伤, 具有良好的修复大鼠克罗恩病受损结肠组织的作用。

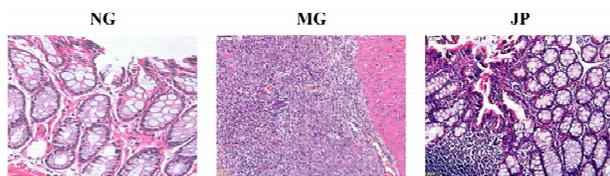


图1 大鼠结肠病理染色(HE, $\times 400$) NG: 正常对照组; MG: 模型组; JP: 健脾方组

2.2 CD大鼠血清INF- γ 浓度 我们选择检测与Th1细胞功能和分化密切相关的细胞因子IFN- γ 来观察健脾方对TNBS诱导的CD大鼠结肠炎性反应预防和治疗作用,用ELISA检测大鼠血清INF- γ 浓度的变化,结果如下图2。TNBS诱导的CD大鼠血清中INF- γ 的浓度为(519.3 \pm 9.8) ng/mL,比正常组(395.2 \pm 85.2) ng/mL升高,健脾方能够抑制TNBS诱导炎性反应过程中血清中INF- γ 的升高的程度(458.9 \pm 10.6) ng/mL。

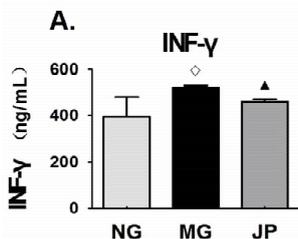


图2 大鼠血清中INF- γ 表达浓度值(ng/mL)

注:与正常组比较,模型组大鼠血清中INF- γ 含量明显增加($\diamond P < 0.05$),健脾方可显著降低大鼠大鼠血清中INF- γ 含量($\blacktriangle P < 0.05$)。

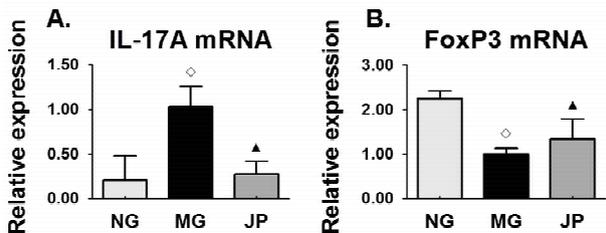


图3 大鼠结肠IL-17A、FoxP3 mRNA的表达($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

注:A:与正常组比较,模型大鼠结肠IL-17A mRNA显著升高($\diamond P < 0.01$);健脾方可显著降低模型大鼠结肠IL-17A mRNA水平($\blacktriangle P < 0.01$) (图3-A)。B:与正常组比较,模型大鼠结肠FoxP3 mRNA显著降低($\diamond P < 0.01$);与模型组比较,健脾方组FoxP3 mRNA显著增强($\blacktriangle P < 0.05$)。

2.3 CD大鼠结肠组织Th17/Treg细胞调节因子IL-17A、FoxP3 mRNA的表达 采用Real-time PCR法观察TNBS诱导的CD大鼠结肠组织中Th17/Treg细胞调节因子IL-17A、FoxP3 mRNA表达的变化,从基因层面证实Th17/Treg细胞平衡紊乱在TNBS诱导CD病理机制中的作用,并揭示Th17/Treg细胞平衡在健脾方对CD结肠炎性反应形成初期防治中的作用机制。实验结果如图3,图A为各组大鼠结肠组织IL-17A mRNA表达,正常组IL-17A mRNA为(0.2067 \pm 0.2706),模型组(1.025 \pm 0.2354),高于正常组($P < 0.01$),健脾方能够抑制CD大鼠结肠炎性反应形成初期这种增高的趋势,为(0.274 \pm 0.1398) ($P < 0.01$)。图B为各组大鼠结肠组织

FoxP3 mRNA表达,正常组FoxP3 mRNA为(2.241 \pm 0.185),模型组(1.006 \pm 0.1216),表达低于正常组($P < 0.01$),健脾方组能够上调FoxP3 mRNA表达,为(1.334 \pm 0.4564) ($P < 0.01$)。

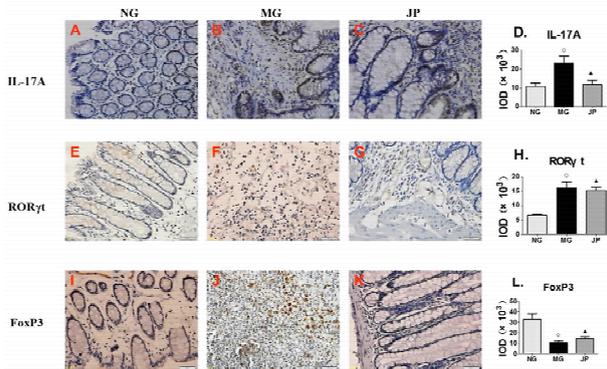


图4 大鼠结肠细胞调节因子IL-17A、ROR γ t、FoxP3蛋白表达(IOD)

注:A-D:与正常组(图A)比较,模型大鼠(图B)结肠IL-17A蛋白水平显著升高($\diamond P < 0.01$);健脾方可显著降低模型大鼠结肠IL-17A蛋白水平(图C) ($\blacktriangle P < 0.01$),组间比较结果如图D。E-H:与正常组(图E)比较,模型大鼠(图F)结肠ROR γ t蛋白显著升高($\diamond P < 0.01$);健脾方可显著降低模型大鼠结肠ROR γ t蛋白水平(图G) ($\blacktriangle P < 0.05$),组间比较结果如图H。I-L:与正常组(图I)比较,模型大鼠(图J)结肠FoxP3蛋白显著降低($\diamond P < 0.01$);健脾方可显著升高大鼠结肠FoxP3蛋白水平(图K) ($\blacktriangle P < 0.05$),组间比较结果如图L。

2.4 CD大鼠结肠组织Th17/Treg细胞调节因子IL-17A、ROR γ t、FoxP3蛋白的表达 基于上述Th17/Treg细胞调节因子IL-17A、FoxP3 mRNA在TNBS诱导的CD大鼠结肠组织表达的变化,以及健脾方在炎性反应初期能够起到对各个因子的基因发生调节作用的实验结果,继续观察相应调节IL-17A、ROR γ t、FoxP3蛋白在CD大鼠结肠组织中表达变化情况以及健脾方对这些细胞调节因子的影响,采用免疫组织化学法来观察3个蛋白的表达结果如下:(图4 A-L, $\times 400$ 倍图像采集)。IL-17A主要表达于大鼠结肠黏膜上皮细胞和结肠黏膜上皮间质非上皮细胞。正常组结肠黏膜上皮结构完整、腺体排列规则有序,肠黏膜IL-17A呈弱阳性表达(10.69 \pm 5.16),如图4,A。模型组结肠黏膜上皮有脱落,炎性反应细胞显著增生,肠黏膜IL-17A表达高于正常组(23.26 \pm 9.91) ($P < 0.01$),如图4,B。健脾方对结肠黏膜上皮结构较紊乱和炎性反应细胞增生具有防治作用,肠黏膜IL-17A呈中度-阳性表达(14.83 \pm 5.94) ($P < 0.01$),如图4,C。组间比较结果见图D。ROR γ t主要表达于大鼠结肠黏膜上皮细胞。正

常组结肠黏膜上皮结构完整、排列整齐,肠黏膜 ROR γ t 呈弱阳性表达(6.62 ± 1.39),如图 4,E。模型组结肠黏膜上皮大量脱落,腺体结构紊乱,肠黏膜 ROR γ t 呈强阳性表达(16.34 ± 5.69)($P < 0.01$),如图 4,F。健脾方能够在 CD 克罗恩病形成期间,改善结肠黏膜上皮结构较紊乱和炎性反应细胞增生的程度,肠黏膜 ROR γ t 呈中度-阳性表达(15.35 ± 3.11)($P < 0.05$),如图 4,G。组间比较结果见图 H。FoxP3 主要表达于大鼠结肠黏膜上皮细胞和结肠黏膜间质非上皮细胞。正常组结肠黏膜上皮结构完整、排列整齐,肠黏膜 FoxP3 呈强阳性表达(32.92 ± 15.53)如图 4,I。模型组结肠黏膜上皮有脱落,结构紊乱,肠黏膜 FoxP3 呈弱阳性表达(10.54 ± 5.40)($P < 0.01$),如图 4,J。健脾方防治结肠黏膜上皮结构较整齐,肠黏膜呈弱阳性表达(14.83 ± 3.39)($P < 0.05$),如图 4,K。组间比较结果见图 L。

3 讨论

目前,临床常用的治疗 CD 的药物主要有氨基水杨酸类、糖皮质激素、免疫抑制剂、炎性递质抑制剂、靶向生物免疫治疗、抗生素^[21]等。中医药治疗 CD 的特点是多途径、多层次、多靶点并且可以长期维持用药治疗,不良反应较少^[16-17]。实验研究发现健脾方中的中药组份治疗 IBD 疗效肯定且具有一定的免疫调节作用^[18-19],但健脾方治疗 IBD 的相关免疫机制研究很少,因此,有必要对此进行深入探讨。在我们的研究中,证实了健脾方能够抑制 CD 结肠炎性反应形成初期的炎性反应程度,模型制作过程中应用健脾方能够起到很好的防治作用。本研究以 CD4⁺T 细胞亚群为突破点,研究 Th17/Treg 平衡在健脾方防治 CD 中的作用,探讨健脾方治疗 CD 的免疫机制。

3.1 Th1/Th2 失衡与健脾方防治 IBD Th1 和 Th2 都参与了免疫炎性反应级联反应中抗原的识别、细胞信号通路的激活、炎性反应效应的放大以及下游炎性因子的释放等诸多环节,干预其中任何一个必要环节都可能起到缓解病情的作用^[22],因此,对 Th1 和 Th2 平衡的干预,成为 IBD 研究的热点和治疗的思路。基于这种思路,我们设计此实验初步探索健脾方治疗 CD 的作用机制。Th1 细胞主要分泌 IL-2、IL-12、IFN- γ 等细胞因子,IL-12 和 IFN- γ 还能通过促进 Th1 分化和抑制 Th2 分化使 Th1 细胞处于优势。Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5 和 IL-13 等细胞因子,其中 IL-4 和 IL-13 能够通过促进 Th2 分化和抑制 Th1 分化使 Th2 细胞占优势^[23],Neunath 等研

究认为 TNBS 诱导的 CD 大鼠是呈现 Th1 细胞优势状态而 Th2 细胞应答相对降低的克罗恩病症^[24-25],因此,通过抑制 Th1 的优势状态来调节 Th1/Th2 的失衡状态能降低其炎性反应并使病情得到缓解。我们的实验结果表明,在 CD 大鼠模型中,血清中 Th1 细胞因子 IFN- γ 含量升高,与正常对照组比较具有显著性差异,表现出了炎性反应过程中 Th1 细胞处于优势的状态,同时,增加的 IFN- γ 也可能进一步促进了这一优势状态,对 CD 大鼠施加健脾方干预,血清中的 IFN- γ 含量有所降低,使 IFN- γ 的促炎失衡的状态有所缓解。

3.2 Th17/Treg 失衡与健脾方防治 IBD 目前,恢复体内的 Th17/Treg 平衡对动物实验和 IBD 患者的疗效均已得到不断的验证^[26-30]。多种疗法进一步的研究证实,Th17/Treg 转化平衡是维持肠道免疫稳态的重要因素,这可能成为人类导致 IBD 的原因之一^[31]。除 Th17 细胞外,多种 T 细胞亚群均可分泌 IL-17A^[32],临床研究发现 IBD 患者肠黏膜组织和外周血中 IL-17 含量明显升高^[33]。在我们的 CD 大鼠结肠组织中发现了 IL-17A 基因和蛋白都出现表达的上调,结肠组织 HE 染色也发现也出现大量的炎性细胞因子浸润,应用健脾方干预后,能够对 IL-17A 起到下调的作用。表明健脾方在缓解 IL-17A 相关炎性反应方面起到了积极的调节作用。ROR γ t 是 Th17 分化的特异性转录因子已经得到业界的认可^[34-35]。实验发现,CD 大鼠的结肠组织中 ROR γ t 蛋白表达上调,从模型制作的第 2 周开始进行健脾方的干预,能够下调 ROR γ t,进而抑制 T 细胞向 Th17 细胞方向分化这个趋势,所以可以推断健脾方在防治 CD 过程中涉及可能涉及了 Th17 细胞分化的重要的细胞因子和转录因子,而且在恢复 Th17/Treg 细胞平衡方面发挥了积极的调节作用。

FoxP3 是 Treg 亚群分化的特异性核转录因子,在调控其分化发育和功能上起很重要的作用,FoxP3 的缺乏导致 CD4⁺、CD25⁺Treg 细胞的缺失^[36]。健脾方在 CD 结肠组织炎性反应初期的及早干预是否能够抑制 FoxP3 的降低?我们的实验中发现,大鼠结肠黏膜 FoxP3 mRNA 及其蛋白在经过 TNBS 刺激后都出现了下调,病理损伤可能和 FoxP3 的下调有关,健脾方灌胃 3 周后,对 FoxP3 基因和蛋白具有正向调节作用,出现的结肠组织病理损伤的程度减轻可能与健脾方干预调节有关,可上调 FoxP3 的表达,抑制 ROR γ t 的产生,从而抑制初始 CD4⁺T 细胞分化为 Th17 细胞^[37-38],表明 ROR γ t/FoxP3 平衡决定

了初始 CD4⁺ T 细胞受抗原刺激后向 Th17 细胞或 Treg 方向分化。

综上所述, Th17/Treg 相互转化的调控机制研究深化了对 IBD 免疫机制的认识, 并且可能为治疗 IBD 的研究提供新的策略。通过对细胞因子 IL-17、转录因子 FOXP3、ROR γ t 的影响, 健脾方能够调节 Th1/Th2 和 Th17/Treg 的平衡而恢复肠道免疫失衡状态, 这可能是健脾方防治 IBD 的免疫调节机制之一。

参考文献

- [1] Fina D, Caruso R, Pallone F, et al. Interleukin-21 (IL-21) controls inflammatory pathways in the gut[J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2007, 7(4): 288-291.
- [2] Sartor RB, Muehlbauer M. Microbial host interactions in IBD: implications for pathogenesis and therapy[J]. *Curr Gastroenterol Rep*, 2007, 9(6): 497-507.
- [3] Zenewicz LA, Antov A, Flavell RA. CD4 T-cell differentiation and inflammatory bowel disease[J]. *Trends Mol Med*, 2009, 15(5): 199-207.
- [4] Ravindran R, Foley J, Stoklasek T, et al. Expression of T-bet by CD4 T cells is essential for resistance to Salmonella infection[J]. *J Immunol*, 2005, 175(7): 4603-4610.
- [5] Globig AM, Hennecke N, Martin B, et al. Comprehensive intestinal T helper cell profiling reveals specific accumulation of IFN- γ + IL-17 + coproducing CD4⁺ T cells in active inflammatory bowel disease[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2014, 20(12): 2321-2329.
- [6] Maizels RM, Pearce EJ, Artis D, et al. Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections[J]. *J Exp Med*, 2009, 206(10): 2059-2066.
- [7] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(11): 1123-1132.
- [8] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Pillars Article: Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3[J]. *J Immunol*, 2017, 198(3): 981-985.
- [9] Ueno A, Jijon H, Chan R, et al. Increased prevalence of circulating novel IL-17 secreting Foxp3 expressing CD4⁺ T cells and defective suppressive function of circulating Foxp3 + regulatory cells support plasticity between Th17 and regulatory T cells in inflammatory bowel disease patients[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2013, 19(12): 2522-2534.
- [10] Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4⁺ T cell lineage differentiation[J]. *Immunity*, 2009, 30(5): 646-655.
- [11] Zhou L, Lopes JE, Chong MM, et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function[J]. *Nature*, 2008, 453(7192): 236-240.
- [12] Mucida D, Park Y, Kim G, et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid[J]. *Science*, 2007, 317(5835): 256-260.
- [13] 吴婷, 陈广洁. miRNA 调控 Th 细胞分化的研究进展[J]. *现代免疫学*, 2015, 35(4): 334-337.
- [14] Wu LY, Ma XP, Shi Y, et al. Alterations in microRNA expression profiles in inflamed and non-inflamed ascending colon mucosae of patients with active Crohn's disease[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2017, 150(4): S572.
- [15] Fitzpatrick LR. Inhibition of IL-17 as a pharmacological approach for IBD[J]. *Int Rev Immunol*, 2013, 32(5-6): 544-555.
- [16] Ng SC, Lam YT, Tsoi KK, et al. Systematic review: the efficacy of herbal therapy in inflammatory bowel disease[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2013, 38(8): 854-863.
- [17] Rahimi R, Nikfar S, Abdollahi M. Induction of clinical response and remission of inflammatory bowel disease by use of herbal medicines: a meta-analysis[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(34): 5738-5749.
- [18] Yu Z, Liu HJ, Dun HH, et al. Effect of Pulsatilla Decoction on the expression of proinflammatory cytokines in inflammatory bowel disease[J]. *Chinese Journal of Applied Physiology*, 2011, 27(4): 416-419.
- [19] Lu SW, Liu HJ, Zhao W, et al. Molecular mechanisms involved in the treatment of inflammatory bowel disease by Pulsatilla decoction[J]. *Chinese Journal of Applied Physiology*, 2011, 27(1): 106-109.
- [20] Morris GP, Beck PL, Herridge MS, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon[J]. *Gastroenterology*, 1989, 96(3): 795-803.
- [21] Gomollón F. Developments in the treatment of inflammatory bowel disease: 2014 overview[J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2014, 37(3): 14-21.
- [22] Yue WJ, Liu Y. Research Progress of T-helper cell in the Immune Pathogenesis of Inflammatory bowel disease[J]. *International Journal of Digestive Diseases*, 2009, 29(4): 238-240.
- [23] Fuss IJ. Is the Th1/Th2 paradigm of immune regulation applicable to IBD? [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2008, 14(2): S110-112.
- [24] Shi XZ, Winston JH, Sarna SK. Differential immune and genetic responses in rat models of Crohn's colitis and ulcerative colitis[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011, 300(1): G41-51.
- [25] Brand S. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease[J]. *Gut*, 2009, 58(8): 1152-1167.
- [26] Ogino H, Nakamura K, Ihara E, et al. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells suppress Th17-responses in an experimental colitis model[J]. *Dig Dis Sci*, 2011, 56(2): 376-386.
- [27] Kitani A, Xu L. Regulatory T cells and the induction of IL-17[J]. *Mucosal Immunol*, 2008, 1(1): S43-46.
- [28] Spadoni I, Iliev ID, Rossi G, et al. Dendritic cells produce TSLP that limits the differentiation of Th17 cells, fosters Treg development, and protects against colitis[J]. *Mucosal Immunol*, 2012, 5(2): 184-193.
- [29] Zhang H, Hu X, Liu X, et al. The Treg/Th17 imbalance in Toxoplasma gondii-infected pregnant mice[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2012, 67(2): 112-121.
- [30] Wang W, Shao S, Jiao Z, et al. The Th17/Treg imbalance and cytokine environment in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatol Int*, 2012, 32(4): 887-893.

我们在进一步形态学检测后发现,OA 模型动物膝关节的软骨及其滑囊等结果均出现不同程度的病理变化,在光镜下可见软骨表面粗糙,厚薄不均,完整性受破坏,软骨细胞不同程度坏死,细胞排列错乱,潮线扭曲断裂甚至重叠,小针刀疗法明显改善了 OA 的病理学表现,发挥了保护软骨的效应,这一发现与国内外诸多文献结果一致^[6-11]。

在对针刀作用机制的进一步探析中我们对各组实验兔关节软骨的 MMP-9 及 COX-2 进行检测,经过发现 MMP-9 及 COX-2 在 OA 发生后浓度均上调。MMP 家族在细胞外基质降解系统中占据重要位置,MMP-9 是该家族主要成员,承担基质溶解的角色,不但对蛋白多糖、层粘连蛋白、纤维结合素等有溶解效应,还可通过原胶原酶作用而灭除 I、II、III 型胶原的 N、C 末端肽。此外 MMP-9 还可激活其家族另一个成员 MMP-1,导致胶原病理性降解。本研究中我们发现 MMP-9 在 OA 模型中浓度上调,这说明在关节软骨的高表达导致其周围细胞外基质降解明显,从而出现了一系列病理变化^[12-14],而小针刀可一定程度通过松解关节粘连促使 MMP-9 趋于正常水平,纠正病理改变。我们还检测了 COX-2,其乃一类环氧化酶,与疼痛密切相关,当 COX-2 被激活后合成增加,进一步参与了机体炎性反应和应激反应,加剧了疼痛症状,在研究中我们亦发现 COX-2 在 OA 模型动物中有高表达,而随着针刀治疗的继续,其浓度随之降低,我们还发现 MMP-9 及 COX-2 存在一定相关性,说明小针刀可明显改善 OA,这个可能与通过抑制 MMP-9 及 COX-2 表达有关。

参考文献

[1] 石晓明,于占革.骨关节炎发病机制的研究进展[J].中华临床医

师杂志:电子版,2013,7(24):11607-11609.

[2] Goldring MB. Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases[J]. Best Pract Res Clin Rheumatol,2006,20(5):1003-1025.

[3] 黄武君,谈志龙,白人骁.细胞因子与骨性关节炎软骨退变的研究现状[J].中国骨伤,2006,19(10):635-637.

[4] Yasuda T, Poole AR. A fibronectin fragment induces type II collagen degradation by collagenase through an interleukin-1 mediated pathway[J]. Arthritis Rheum,2002,46(1):138-148.

[5] 黄木全,王勇.膝关节骨性关节炎中医证素的聚类分析研究[J].中医学报,2012,27(9):1134-1135.

[6] 宋阳春,孙奎,朱俊琛,等.针刀配合肌力平衡手法治疗膝骨性关节炎的临床研究[J].中医正骨,2012,24(9):20-23.

[7] 周忠良,孙奎,苏国宏,等.针刀松解联合手法调整肌力平衡治疗膝骨性关节炎的临床研究[J].中国中医骨伤科杂志,2012,20(9):25-26.

[8] 赵军,王庆甫,马玉峰,等.针刀联合玻璃酸钠与单纯玻璃酸钠治疗膝骨关节炎疗效的 Meta 分析[J].中国中医骨伤科杂志,2014,22(2):15-17.

[9] 刘福水,金德忠,吴翔.针刀与针灸治疗膝骨关节炎疗效比较的 Meta 分析[J].中国组织工程研究,2012,16(44):8235-8239.

[10] 嵇波,郭长青,钟鼎文,等.针刀松解法与电针对膝骨关节炎大鼠中枢啡肽类物质影响的比较研究[J].上海中医药大学学报,2011,25(4):83-85.

[11] 郭长青,嵇波,钟鼎文,等.针刀松解法对膝骨关节炎大鼠中枢 P 物质的影响[J].国际中医中药杂志,2011,33(4):309-312.

[12] 刘清国,嵇波,覃蔚岚,等.针刀松解法对骨性关节炎兔血清基质金属蛋白酶 3 和 13 含量的影响[J].针刺研究,2008,33(5):306-309.

[13] 丁琼浩,敖亮,潘正刚,等.膝骨性关节炎的病因病机及用药分析[J].中医临床研究,2014,6(7):14-17.

[14] 马春辉,阎作勤,郭常安,等. II 型胶原与 Bcl-2 在骨关节炎软骨细胞中的表达[J].中国矫形外科杂志,2012,20(19):1786-1789.

(2017-03-06 收稿 责任编辑:徐颖)

(上接第 1412 页)

[31] Xu J, Yang Y, Qiu G, et al. Stat4 is critical for the balance between Th17 cells and regulatory T cells in colitis[J]. J Immunol,2011,186(11):6597-6606.

[32] Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system[J]. Nat Rev Immunol,2010,10(7):479-489.

[33] Sugihara T, Kobori A, Imaeda H, et al. The increased mucosal mRNA expressions of complement C3 and interleukin-17 in inflammatory bowel disease[J]. Clin Exp Immunol,2010,160(3):386-393.

[34] Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17 + T helper cells[J]. Cell,2006,126(6):1121-1133.

[35] Huang Z, Xie H, Wang R, et al. Retinoid-related orphan receptor gamma t is a potential therapeutic target for controlling inflammatory autoimmunity[J]. Expert Opin Ther Targets, 2007, 11(6):737-743.

[36] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3 [J]. Science, 2003, 299(5609):1057-1061.

[37] Beissert S, Schwarz A, Schwarz T. Regulatory T cells[J]. J Invest Dermatol,2006,126(1):15-24.

[38] Hatton RD. TGF- β in Th17 cell development: the truth is out there [J]. Immunity,2011,34(3):288-290.

(2017-05-03 收稿 责任编辑:王明)