

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.22.014

胃肠安丸对溃疡性结肠炎模型小鼠 Treg/Th17 免疫平衡的影响

张涛¹, 苏晓兰¹, 毛心勇¹, 刘倩^{1,2}, 王欣¹, 杨洋¹,
国嵩¹, 吴宝麒¹, 宋耿青³, 韩娟⁴, 魏玮^{*}

1. 中国中医科学院望京医院/功能性胃肠病中医诊治北京市重点实验室, 北京市朝阳区望京中环南路 6 号, 100102; 2. 北京中医药大学; 3. Cleveland Clinic, USA.; 4. 中国中医科学院针灸研究所

摘要 **目的** 探讨胃肠安丸治疗溃疡性结肠炎的可能作用机制。 **方法** 60 只 C57BL/6 小鼠随机选取 10 只为正常组, 其余小鼠给予 2.5% 葡聚糖硫酸钠 (DSS) 水溶液自由饮用 7 天复制 UC 小鼠模型, 将造模成功的 50 只小鼠再随机分为模型组、美沙拉嗪组和胃肠安丸高、中、低剂量组, 每组 10 只。胃肠安丸低、中、高剂量组分别给予胃肠安丸混悬液 0.015、0.03、0.06 g/(kg·d) 灌胃, 美沙拉嗪组给予美沙拉嗪混悬液 0.52 g/(kg·d) 灌胃, 正常组和模型组给予 0.5 ml 纯净水灌胃, 每日 1 次, 连续 10 天。每天观察各组小鼠体质量、大便性状及便血情况, 并计算疾病活动指数 (DAI)。药物干预结束后处死小鼠, 测量结肠长度, 对结肠组织进行 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调节性 T 细胞 (Treg)、辅助性 T 细胞 17 (Th17) 百分比及比值。 **结果** 干预后与模型组和胃肠安丸低剂量组比较, 美沙拉嗪组、胃肠安丸高剂量组小鼠体重差值增加, DAI 评分差值升高 ($P < 0.05$)。与正常组比较, 模型组小鼠结肠长度减少, 病理学评分升高, Treg 细胞百分比、Treg/Th17 值降低, Th17 细胞百分比升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 美沙拉嗪组、胃肠安丸高剂量组小鼠结肠长度增长, 病理学评分降低, Treg 细胞百分比、Treg/Th17 值升高, Th17 细胞百分比降低 ($P < 0.05$)。美沙拉嗪组、胃肠安丸高剂量组各指标组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。 **结论** 胃肠安丸在改善 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠腹泻、便血、体质量下降等症状和修复肠道黏膜损伤方面与美沙拉嗪功效相近, 其作用机制可能与调节 Treg/Th17 免疫失衡有关。

关键词 溃疡性结肠炎; 胃肠安丸; 结肠组织; 免疫失衡; 调节性 T 细胞; 辅助性 T 细胞 17

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性疾病, 是消化系统难治病之一, 其特征结直肠黏膜的连续性、弥漫性炎症改变, 其病变主要限于大肠黏膜和黏膜下层^[1]。主要临床表现为腹泻、黏液脓血便伴腹痛, 病情轻重不等, 多呈反复发作的慢性病程。UC 治疗缺乏特异性, 治愈难度大, 局部 (肠穿孔、大出血、癌变等) 和全身 (多器官受累) 并发症多, 重度 UC 死亡率较高。中医药在治疗 UC 方面有自身的诊疗特色和客观疗效。胃肠安丸是一种广泛应用于消化系统疾病的中药制剂, 其临床疗效肯定^[2-3]。既往研究^[4-5]发现, 胃肠安丸中

木香、厚朴水煎剂均可有效缓解 UC 大鼠肠道症状, 如腹泻、血便等, 并且能修复肠道黏膜损伤, 促进溃疡愈合。本研究通过建立 UC 模型小鼠, 尝试从免疫平衡角度阐释胃肠安丸治疗 UC 的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

60 只 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠, 8 周龄, 体质量 (20 ± 2) g, 由北京斯贝福生物技术有限公司提供, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2015-0015。小鼠饲养于中国中医科学院针灸研究所 SPF 级动物房, 12 h 光照和黑暗循环, 室内温度 (24 ± 2) °C, 空气相对湿度 35% ~ 45%。

基金项目: 国家自然科学基金 (81973638)

* 通讯作者: sxxyy@sina.com, (010) 84739719

1.2 药物及制备

胃肠安丸由天津中新医药集团有限公司乐仁堂制药厂提供(国药准字: Z10880010, 批号: 1530606), 由木香、沉香、枳壳(麸炒)、檀香、大黄、厚朴(姜炙)、人工麝香、巴豆霜、大枣(去核)、川芎组成。将胃肠安丸碾成粉末, 储存备用, 每次用精密天平称取 0.06 g 胃肠安丸粉末充分溶于 25 ml 热水(80~90℃)中, 即为高剂量胃肠安丸混悬液, 取 5 ml 高剂量混悬液等比及 4 倍稀释, 得到中、低剂量混悬液。葡聚糖硫酸钠(DSS, 43kDa, 批号: 160110), 美国 MP Biomedicals 公司, 用 100 ml 纯水溶解 2.5 g DSS 配成 2.5% 的 DSS 溶液。美沙拉嗪肠溶片(0.5 g/片, LosanPharmma GmbH 公司, 进口药品注册证号: H20171358), 取 0.5 g 美沙拉嗪肠溶片, 将外部黄色包衣轻轻刮去, 溶于 24 ml 热水中, 充分溶解, 配制美沙拉嗪混悬液, 4℃ 冰箱保存备用。

1.3 主要试剂与仪器

PerCP/Cyanine5.5 抗小鼠 CD4 抗体(批号: 552838)、抗小鼠叉头状转录因子 p3(Foxp3)抗体(批号: E-AB-F1238D)、PE 抗小鼠白细胞介素 17A(IL-17A)抗体(批号: E-AB-F1199D)、PE 抗小鼠 CD25 抗体(批号: E-AB-F1102D), 均为 BD Pharmingen 公司产品; 细胞刺激剂(含布雷非德索 A, 货号: 423303), 上海恒斐生物科技有限公司; PBS 缓冲液(上海索莱宝生物科技有限公司, 批号: J30318); 莫能霉素(批号: 554724)、固定缓冲液(批号: 420801-1), 上海恒斐生物科技有限公司; 透化缓冲液(北京孚博生物科技有限公司, 批号: 92110-00-150); 水合氯醛(上海士锋生物科技有限公司, 批号: EB05980); 中性组织固定液(上海源叶生物科技有限公司, 批号: R20486); 苏木伊红染色液(北京赛因坦科技有限公司, 批号: H8070)。

流式细胞仪(型号: Callibur II, 美国 Becton Dickinson 公司); 台式高速冷冻离心机(型号: TGL-16, 湖南湘仪离心机仪器有限公司); 精密电子天平 型号: ML4002/02, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; 纯水机(型号: Milli-Q Integral, 德国默克密理博有限公司); 商用净水开水器(型号: JT-A20, 上海宏溪实业有限公司); 光学显微镜(型号: CX43, 奥林巴斯公司)。

1.4 分组及造模

60 只小鼠适应性喂养 1 周后, 标号、称重,

根据体重采用 2016 版 Excel 中的 Rand 函数随机选取 10 只为正常组, 其余小鼠参照 Wirtz S 等^[4]造模方法进行 UC 模型复制: 给予 2.5% DSS 水溶液自由饮用 7 天, 正常组自由饮水。造模结束后, 根据疾病活动指数(DAI)进行模型评价^[5], 剔除 DAI 评分 <1 分的小鼠。50 只小鼠均造模成功, 再随机分为模型组、美沙拉嗪组和胃肠安丸高剂量组、中剂量组、低剂量组, 每组 10 只。

1.5 干预方法

按实验动物与人体表面积比等效剂量换算比率^[6], 将人每天剂量折算成小鼠等效剂量作为中剂量, 胃肠安丸低、中、高剂量组分别给予胃肠安丸混悬液 0.015、0.03、0.06 g/(kg·d)灌胃, 美沙拉嗪组给予美沙拉嗪混悬液 0.52 g/(kg·d)灌胃, 正常组和模型组给予 0.5 ml 纯水灌胃, 每日 1 次, 连续灌胃 10 天, 治疗期间自由饮食、饮水。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 一般情况 每天观察并记录各组小鼠精神状态、活动情况、皮毛色泽、大便性状、体质量变化、大便潜血情况等。

1.6.2 DAI 评分^[5] 根据动物体质量下降率[体质量下降率 = (每日体质量 - 初始体质量) / 初始体质量 × 100%]、大便性状及隐血情况分别计分, 计算各组小鼠 DAI 评分, DAI 评分 = (体质量下降分数 + 大便性状分数 + 便血分数) / 3。

1.6.3 结肠组织形态学观察 药物干预结束, 使用 10% 水合氯醛(0.3 ml/100 g)麻醉处死小鼠, 分离小鼠结肠, 测量其长度, 然后取结肠远端约 1 cm 长度, 用 10% 中性甲醛固定后, 石蜡包埋, 切片, HE 染色, 光镜下观察切片组织学变化。病理学评分^[7] 详见表 1。

表 1 小鼠结肠组织病理学评分表

分值	病变深度	炎症程度	病变范围	腺体破坏
0	无	无	-	无
1	黏膜层	轻度	1% ~ 25%	1/3 被破坏
2	黏膜下层	中度	26% ~ 50%	2/3 被破坏
3	肌层	重度	51% ~ 75%	仅上皮层完整
4	浆膜层	-	76% ~ 100%	整个腺体和上皮层缺失

1.6.4 流式细胞术检测脾脏组织调节性 T 细胞(Treg)、辅助性 T 细胞 17(Th17)比例 将新鲜脾脏组织放入细胞筛网内, 加入 PBS 后研磨组织, 收集单细胞悬液, 500 g、4℃ 离心 5 min, 重悬单细胞悬液, 调整细胞密度为 1×10^6 个/ml。样品中

加入莫能霉素, 250g 离心 10 min, 弃上清, 用含 5% 胎牛血清 (FBS) 的 PBS 重悬洗涤细胞 2 次, 收集细胞。然后重悬细胞, 加入细胞表面蛋白抗体, 室温避光反应 30 min, 再加入 2 ml 预冷的固定缓冲液, 混匀, 4℃ 避光反应 30 min, 500 g 离心 5 min, 弃上清, 用透化缓冲液洗涤细胞 2 次, 500 g 离心 5 min, 弃上清, 加入 2 ml 预热的透化缓冲液, 37℃ 避光反应 30 min, 500 g 离心 5 min, 然后洗涤细胞 2 次, 500 g 离心 5 min, 弃上清, 重悬细胞沉淀, 分别加入胞内蛋白抗体, 室温避光反应 30 min, 500 g 离心 5 min, 加入 500 μl PBS 重悬细胞, 流式细胞仪检测收集, 根据抗体荧光标记确认荧光通道。检测组合为 CD4-PerPCy5. 5/CD25-PE/Foxp3-APC、CD4-PerPCy5. 5/IL-17A-PE, 其中 CD25 按胞外蛋白, Foxp3 和 IL-17A 按胞内蛋白。最后用 CellQuest 软件 (5.1 版本) 分析各组细胞比例。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 计量资料用均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 满足正态分布且方差齐时采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, 不满足正态分布或方差差不齐时采用 Kruskal-Wallis (K-W) 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况及死亡情况

适应性喂养期间 (造模前) 各组小鼠状态正常、活泼好动、毛色黑亮。造模期间: 造模小鼠造模 3~5 天, 部分小鼠可检测到便潜血阳性, 造模第 7 天, 大部分小鼠出现肉眼血便, 肉眼血便小鼠均活动迟缓, 精神萎靡, 眼窝凹陷, 喜蜷缩呈弓背状; 无肉眼血便小鼠试纸检测阳性。造模结束无小鼠死亡, 根据 DAI 评分进行模型评价, 50 只小鼠均成模。干预期间美沙拉嗪组死亡 1 只, 胃肠安丸高剂量组死亡 1 只, 胃肠安丸中剂量组死亡 3 只。统计分析时为保证每组动物数量的一致性, 以胃肠安丸中剂量组死亡的 3 只小鼠为准, 剔除其余组中模型评价时具有相近 DAI 评分的小鼠, 保证每组 7 只。

2.2 各组小鼠干预前后体质量变化比较

表 2 示, 干预前, 与正常组比较, 其余各组小鼠体质量降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。干预后, 模型组和胃肠安丸中、低剂量组小鼠体质量明显低于正常组 ($P < 0.05$); 与本组干预前比较, 美沙拉嗪组和胃肠安丸高剂量组小鼠体质量均

增加 ($P < 0.05$); 美沙拉嗪组、胃肠安丸高剂量组两组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。美沙拉嗪组、胃肠安丸高剂量组小鼠体重差值明显高于模型组和胃肠安丸低剂量组 ($P < 0.05$)。

表 2 各组小鼠干预前后体质量比较 (g, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	干预前	干预后	干预前后体质量差值
正常组	7	23.3 ± 0.4	24.8 ± 0.8	1.6 ± 0.7
模型组	7	21.4 ± 0.4 [#]	22.1 ± 0.7 [#]	0.7 ± 0.8
美沙拉嗪组	7	21.2 ± 1.0 [#]	24.1 ± 0.2 [*]	2.9 ± 1.0 ^{△▲}
胃肠安丸高剂量组	7	21.5 ± 0.8 [#]	24.3 ± 0.9 [*]	2.7 ± 1.3 ^{△▲}
胃肠安丸中剂量组	7	21.1 ± 1.7 [#]	22.2 ± 2.0 [#]	1.1 ± 2.9
胃肠安丸低剂量组	7	22.0 ± 0.5 [#]	22.5 ± 1.0 [#]	0.5 ± 0.8

注: 与本组干预前比较, * $P < 0.05$; 与正常组同时时间比较, [#] $P < 0.05$; 与模型组干预前后体质量差值比较, [△] $P < 0.05$; 与胃肠安丸低剂量组干预前后体质量差值比较, [▲] $P < 0.05$

2.3 各组小鼠干预前后 DAI 评分比较

表 3 示, 干预前, 与正常组比较, 其余各组小鼠 DAI 评分均升高 ($P < 0.05$)。干预后, 与本组干预前比较, 除正常组外其余各组小鼠的 DAI 评分均下降 ($P < 0.05$); 干预后美沙拉嗪组和胃肠安丸高剂量组小鼠 DAI 评分明显低于模型组, 且美沙拉嗪组低于胃肠安丸低剂量组 ($P < 0.05$)。各组评分差值比较, 与正常组比较, 其余各组评分差值升高 ($P < 0.05$); 美沙拉嗪组和胃肠安丸高、中剂量组小鼠 DAI 评分差值明显高于模型组、胃肠安丸低剂量组 ($P < 0.05$); 美沙拉嗪组和胃肠安丸高、中剂量组组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 各组小鼠干预前后 DAI 评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	干预前	干预后	干预前后评分差值
正常组	7	0	0	0
模型组	7	2.85 ± 0.60 [#]	1.43 ± 0.46 [#]	1.43 ± 0.46 [#]
美沙拉嗪组	7	3.05 ± 0.73 [#]	0 ^{*△▲}	3.05 ± 0.73 ^{△▲}
胃肠安丸高剂量组	7	2.71 ± 0.80 [#]	0.24 ± 0.32 ^{*△}	2.48 ± 0.69 ^{△▲}
胃肠安丸中剂量组	7	3.24 ± 0.50 [#]	0.62 ± 0.59 [*]	2.62 ± 0.89 ^{△▲}
胃肠安丸低剂量组	7	2.71 ± 0.95 [#]	1.33 ± 0.43 ^{*#}	1.38 ± 1.02 [#]

注: DAI, 疾病活动指数; 与本组干预前比较, * $P < 0.05$; 与正常组比较, [#] $P < 0.05$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$; 与胃肠安丸低剂量组比较, [▲] $P < 0.05$

2.4 各组小鼠结肠长度比较

表 4 示, 与正常组比较, 模型组和胃肠安丸中、低剂量组小鼠结肠长度减少 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 美沙拉嗪组、胃肠安丸高剂量组小鼠结肠长度增加 ($P < 0.05$), 且两组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。胃肠安丸中、低剂量组

小鼠结肠长度明显短于美沙拉嗪组和胃肠安丸高剂量组 ($P < 0.05$)。

表 4 各组小鼠结肠长度比较 (cm, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	结肠长度
正常组	7	7.14 $\pm$ 0.73
模型组	7	5.43 $\pm$ 0.46 [*]
美沙拉嗪组	7	6.73 $\pm$ 0.45 [#]
胃肠安丸高剂量组	7	6.60 $\pm$ 0.48 [#]
胃肠安丸中剂量组	7	5.81 $\pm$ 1.01 ^{*△▲}
胃肠安丸低剂量组	7	5.87 $\pm$ 0.45 ^{*△▲}

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$; 与美沙拉嗪组比较, △ $P < 0.05$; 与胃肠安丸高剂量组比较, ▲ $P < 0.05$

2.5 各组小鼠结肠组织 HE 染色结果

图 1 示, 正常组小鼠肠黏膜上皮完整, 固有层可见排列整齐、完整的隐窝结构, 杯状细胞数目较多, 无炎性细胞浸润。模型组小鼠肠黏膜上皮缺损, 基本无结构完整的隐窝, 杯状细胞明显减少, 可见大量淋巴细胞、中性粒细胞等炎性细胞浸润。胃肠安丸高剂量组、美沙拉嗪组小鼠结肠黏膜上皮几乎无缺损, 可见大量完整的隐窝, 杯状细胞数目多, 极少炎性细胞浸润。胃肠安丸中剂量组小鼠可见部分肠黏膜中断, 与模型组相比缺损面积小, 部分隐窝结构破坏, 可见大量炎细胞浸润。胃肠安丸

低剂量组仍见多处黏膜中断, 隐窝破坏严重, 杯状细胞明显减少, 大量炎性细胞浸润。

2.6 各组小鼠结肠组织病理学评分比较

表 5 示, 与正常组比较, 模型组和胃肠安丸中、低剂量组小鼠的病理学评分升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 美沙拉嗪组和胃肠安丸高剂量组小鼠病理学评分降低 ($P < 0.05$), 且两组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

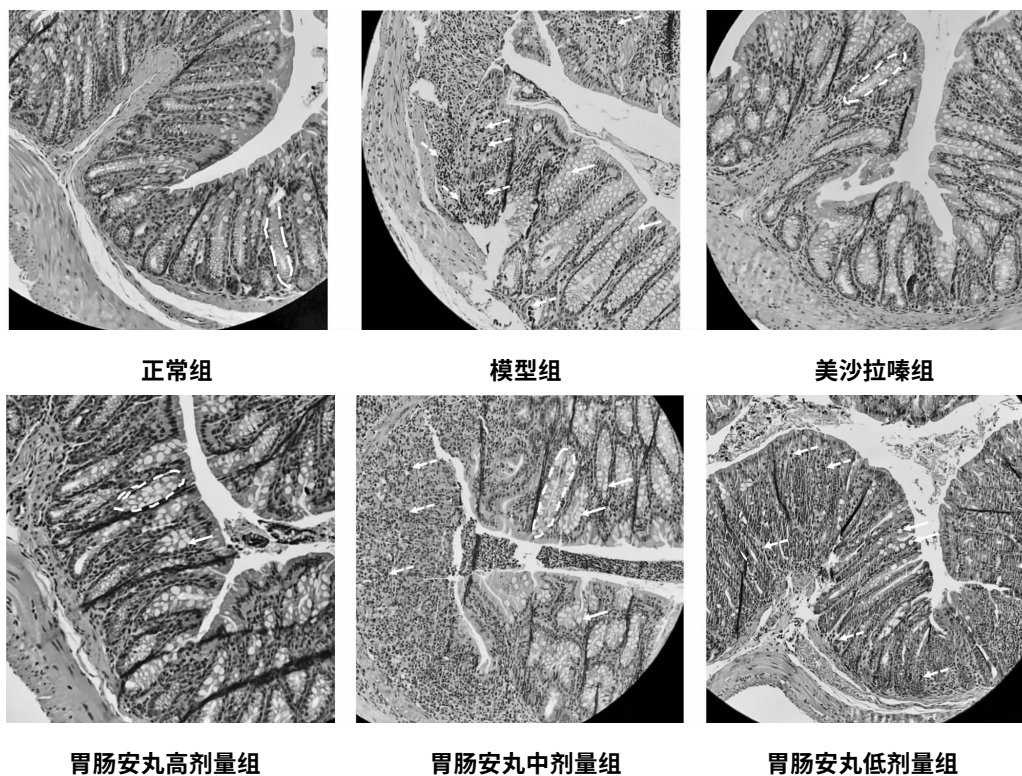
表 5 各组小鼠结肠组织病理学评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	病理学评分
正常组	7	0
模型组	7	7.62 $\pm$ 0.27 [*]
美沙拉嗪组	7	2.76 $\pm$ 0.74 [△]
胃肠安丸高剂量组	7	2.44 $\pm$ 0.46 [△]
胃肠安丸中剂量组	7	5.34 $\pm$ 0.12 [*]
胃肠安丸低剂量组	7	6.92 $\pm$ 0.29 [*]

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

2.7 各组小鼠脾脏 T 细胞亚群水平比较

表 6 示, 与正常组比较, 其余各组小鼠 Treg 细胞百分比降低, Th17 细胞百分比升高, 模型组和胃肠安丸中、低剂量组 Treg/Th17 值降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 美沙拉嗪组、胃肠安丸高剂量组小鼠 Treg 细胞百分比、Treg/Th17 值升高,



注: 虚线箭头为炎性细胞浸润; 实线箭头处为杯状细胞; 虚线圈处为隐窝结构

图 1 各组小鼠结肠组织病理结果 (HE 染色, $\times 400$)

表 6 各组小鼠脾脏 T 细胞亚群水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Treg (%)	Th17 (%)	Treg/Th17
正常组	7	29.98 ± 3.31	23.80 ± 6.33	1.36 ± 0.48
模型组	7	7.10 ± 4.43*	61.72 ± 5.14*	0.11 ± 0.07*
美沙拉嗪组	7	19.56 ± 2.95* [△]	37.85 ± 2.94* [△]	0.52 ± 0.08 [△]
胃肠安丸高剂量组	7	19.19 ± 3.91* [△]	36.91 ± 4.09* [△]	0.48 ± 0.05 [△]
胃肠安丸中剂量组	7	10.30 ± 2.25* [▲]	56.52 ± 6.14* [▲]	0.18 ± 0.03*
胃肠安丸低剂量组	7	8.86 ± 4.25* [▲]	56.53 ± 7.81* [▲]	0.16 ± 0.08*

注: Treg, 调节性 T 细胞; Th17, 辅助性 T 细胞; 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与美沙拉嗪组比较, $\#P < 0.05$; 与胃肠安丸高剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

Th17 细胞百分比降低 ($P < 0.05$), 且美沙拉嗪组、胃肠安丸高剂量组小鼠 Treg 细胞百分比高于胃肠安丸中、低剂量组, Th17 细胞百分比低于胃肠安丸中、低剂量组 ($P < 0.05$)。美沙拉嗪组、胃肠安丸高剂量组小鼠各指标组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

世界卫生组织相关资料显示, UC 全球发病率为 1/10000 ~ 2/10000, 我国 UC 的患病率约为 1.16/10000^[4]。根据 UC 临床表现, 可归属于中医学“久痢”“泄泻”“休息痢”等范畴。其病机以脾虚为本, 脾虚不足以运化水湿, 湿气不化, 聚为顽痰宿湿阻滞肠间, 久羁大肠不去, 痰湿内蕴化而为浊, 大肠传导失司而见泄泻。此外, 情志失调亦为久痢之证的病因, 肝气郁结多化火、生郁热, 热极为毒。浊与毒互结于肠腑, 弥散入血, 与气血胶结, 损伤肠络, 则为肿胀、糜烂、下利脓血, 遂成本病。初发或活动期的病理因素多涉及气滞、湿热、浊毒, 虚多在脾, 后可及肾, 故治以理气健脾、化浊解毒为主, 可配合清热、导滞、祛瘀等法^[1]。

胃肠安丸方中木香具有健脾导滞、疏肝解郁、行气止痛的功效; 厚朴能燥湿除满消滞、行气止痛, 二者共为君药, 具有化浊祛湿、理气止痛之功。檀香、沉香、枳壳三药合用以行气调中止痛, 共为臣药。大黄、巴豆霜二者相伍以攻积导滞, 大黄兼能泻热解毒; 川芎、麝香祛瘀通络止痛; 大枣健脾和中, 共为佐使。诸药合用共奏祛湿化浊、清热解郁、理气健脾功效。前期研究^[3]结果显示, 胃肠安丸具有稳定肠黏膜屏障, 降低肠黏膜通透性, 阻止内毒素扩散, 防止细菌易位的作用, 同时还有抗病原微生物和止泻的功效^[3]。本研究中, 我们采用 2.5% DSS 水溶液复制 UC 小鼠模型, 模

型复制成功后给予不同剂量胃肠安丸混悬液灌胃治疗。美沙拉嗪属于水杨酸制剂, 通过抑制结肠黏膜释放前列腺素、白三烯, 清除活性氧等损伤性因子, 减轻炎症因子对肠道黏膜的损伤^[4], 是目前临床上缓解轻、中度 UC 的首选药物之一, 故我们选作阳性对照药物。本研究结果显示, 中、高剂量胃肠安丸在改善 UC 模型小鼠体质量下降、腹泻、便血等症状方面疗效与美沙拉嗪相近。美沙拉嗪组、胃肠安丸高剂量组小鼠结肠组织损伤较轻, 结合组织病理学评分结果, 发现高剂量胃肠安丸在促进 UC 模型小鼠肠道黏膜损伤修复方面与美沙拉嗪的治疗效果相同。

UC 是一种有免疫因素参与的慢性非特异性肠炎, 既往研究发现, Th17 型细胞^[5-14]、Treg 细胞^[17]在 UC 发病中均发挥着重要作用。IL-17 由 Th17 细胞分泌而来, 具有强大的促炎反应活性, 在不同的疾病中发挥着不同作用。有研究报道, IL-17 通过 IL-17/IL-23 轴参与炎症性肠病的发生^[18], 在炎症性肠病患者中 IL-17 的血清含量较健康人明显增加^[19], 这在 UC 小鼠模型中也得到了证实^[20]。Treg 细胞是一组具有免疫负调节作用的 T 细胞亚群, 它在形成外周免疫耐受、维持机体免疫平衡方面具有重要作用^[21]。其在体外通过细胞接触依赖机制参与炎症反应^[22], 另外 Treg 细胞高表达细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4 与抗原提呈细胞上的 B7 结合, 诱导色氨酸裂解酶-吡啶胺 2, 3-二加氧酶活化, 从而介导免疫耐受^[23]。本研究结果显示, 模型组小鼠脾脏中的 Treg 细胞百分比低于正常组, Th17 细胞高于正常组, 且二者的比值亦显著降低, 说明模型组小鼠体内存在 Treg 和 Th17 比例失衡。美沙拉嗪组和胃肠安丸高剂量组小鼠 Treg/Th17 值高于模型组, 并接近正常组, 说明高剂量胃肠安丸和美沙拉嗪一定程度上纠正了 UC 模型小鼠 Treg 和 Th17 细胞的比例失衡, 这可能是药

物发挥治疗作用的关键所在。

综上所述,胃肠安丸能有效改善 DSS 诱导的 UC 小鼠一般情况并恢复结肠形态,降低组织病理学评分,其作用机制可能与调整 Treg/Th17 免疫失衡状态有关。但中药复方治疗 UC 的机制复杂,需进一步探索相关细胞因子和转录因子的影响,从而提供更有力的证据阐释胃肠安丸对 UC 的免疫调节作用。

参考文献

- [1] ALATAB S, SEPANLOU SG, IKUTA K, et al. The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2020, 5(1): 17–30.
- [2] 郜香敏,章文,卢文杰. 胃肠安丸联合美沙拉秦治疗溃疡性结肠炎的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2019, 34(11): 3319–3322.
- [3] 田旭,赵湘萍. 胃肠安丸联合奥替溴铵治疗腹泻型肠易激综合征的临床观察 [J]. *环球中医药*, 2015, 8(S2): 267–268.
- [4] 刘海荣,马露,唐方,等. 木香对溃疡性结肠炎大鼠干预作用的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2016, 24(3): 467–473.
- [5] 马露,邵利洁,唐方. 厚朴配方颗粒药效学评价方法初探 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(8): 154–158.
- [6] WIRTZ S, POP V, KINDERMAN M, et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation [J]. *Nat Protoc*, 2017, 12(7): 1295.
- [7] MURANO M, MAEMURA K, HIRATA I, et al. Therapeutic effect of intracolonic administered nuclear factor κ B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis [J]. *Clin Exp Immunol*, 2000, 120(1): 51–58.
- [8] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1103.
- [9] DIELEMAN LA, PALMEN MJ, AKOL H, et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines [J]. *Clin Exp Immunol*, 1998, 114(3): 385–391.
- [10] EL-TAWIL AM. Epidemiology and inflammatory bowel diseases [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(10): 1505–1507.
- [11] 任翔宇,武燕燕,任顺平. 分期论治溃疡性结肠炎 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2018, 18(72): 232–233.
- [12] 胡瑞,张桐茂,唐方. 胃肠安丸对腹泻型肠易激综合征大鼠的止泻作用及其机制研究 [J]. *中草药*, 2010, 41(12): 2039–2043.
- [13] HU R, TANG F. Effects of Wei Chang An pill on enzyme activity and levels of vasoactive peptide and substance P in the small intestine of rats with compound diarrhea [J]. *J Tradit Chin Med*, 2012, 32(1): 52–57.
- [14] 祝斌,张寒仙,曾今诚,等. 美沙拉嗪对 DSS 诱导小鼠溃疡性结肠炎模型 Th1、Th17 及 Treg 细胞亚群的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(12): 2219–2225.
- [15] HOLT TA V, KLEMETTI P, SALO HM, et al. Interleukin-17 immunity in pediatric Crohn disease and ulcerative colitis [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2013, 57(3): 287–292.
- [16] DAHLEN R, STRID H, LUNDGREN A, et al. Infliximab inhibits activation and effector functions of peripheral blood T cells in vitro from patients with clinically active ulcerative colitis [J]. *Scand J Immunol*, 2013, 78(3): 275–284.
- [17] YAMADA A, ARAKAKI R, SAITO M, et al. Role of regulatory T cell in the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(7): 2195.
- [18] RAFA H, SAOULA H, BELKHELFA M, et al. IL-23/IL-17A axis correlates with the nitric oxide pathway in inflammatory bowel disease: immunomodulatory effect of retinoic acid [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2013, 33(7): 355–368.
- [19] FUJINO S, ANDOH A, BAMBA S, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease [J]. *Gut*, 2003, 52(1): 65–70.
- [20] LI Q, SHAN Q, SANG X, et al. Total glycosides of peony protects against inflammatory bowel disease by regulating IL-23/IL-17 axis and Th17/Treg balance [J]. *Am J Chin Med*, 2019, 47(1): 177–201.
- [21] PELLERIN L, JENKS JA, BÉGIN P, et al. Regulatory T cells and their roles in immune dysregulation and allergy [J]. *Immunol Res*, 2014, 58(2–3): 358–368.
- [22] SAKAGUCHI S, WING K, ONISHI Y, et al. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? [J]. *Int Immunol*, 2009, 21(10): 1105–1111.
- [23] FURUZAWA-CARBALLEDA J, FONSECA-CAMARILLO G, LIMA G, et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase: expressing cells in inflammatory bowel disease: a cross-sectional study [J]. *Clin Dev Immunol*, 2013, 2013: 278035. doi: 10.1155/2013/278035.

Effects of *Weichang'an Pill* (胃肠安丸) on Treg/Th17 Immune Balance in Ulcerative Colitis Model Mice

ZHANG Tao¹, SU Xiaolan¹, MAO Xinyong¹, LIU Qian^{1,2}, WANG Xin¹, YANG Yang¹, GUO Song¹, WU Baoqi¹, SONG Gengqing³, HAN Juan⁴, WEI Wei¹

1. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences/Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Diagnosis and Treatment of Functional Gastrointestinal Diseases, Beijing, 100102; 2. Beijing University of Chinese Medicine; 3. Cleveland Clinic, USA.; 4. Institute of Acupuncture and Moxibustion, China Academy of Chinese Medical Sciences

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Weichang'an Pill* (胃肠安丸) in the treatment of ulcerative colitis. **Methods** A total of 10 in 60 C57BL/6 mice were randomly selected as the normal group, and the remaining mice were given 2.5% dextran sodium sulfate (DSS) aqueous solution drinking freely for 7 days to replicate the UC model. Fifty successfully modeled mice were randomly divided into a model group, a mesalazine group and a *Weichang'an Pill* high, medium and low dose groups, with 10 rats in each group. The low, medium, and high-dose *Weichang'an Pill* groups were given the *Weichang'an Pill* suspension 0.015, 0.03, 0.06 g/(kg · d) respectively by gavage, and the mesalazine group was given Mesalazine suspension 0.52 g/(kg · d) by gavage, the normal group and the model group were given 0.5 ml of purified water once a day for 10 consecutive days. The body weight, stool characteristics and stool blood in each group of mice were observed every day, and the disease activity index (DAI) was calculated. After the drug intervention, the mice were sacrificed, the colon length was measured, the colon tissue was stained with HE, and the pathological changes of the distal colon tissue were observed. Flow cytometry was used to detect the regulatory T cells (Treg) and helper T cells of the mouse spleen 17 (Th17) percentage and ratio. **Results** After intervention, compared with the model group and the *Weichang'an Pill* low-dose group, the body weight difference of mice in the mesalazine group and the *Weichang'an Pill* high-dose group increased, and the difference in DAI score increased ($P < 0.05$). Compared with the normal group, the mouse colon length in the model group decreased, the pathological score increased, the percentage of Treg cells, Treg/Th17 values decreased, and the percentage of Th17 cells increased ($P < 0.05$); compared with the model group, the mesalazine group, the colon length of mice in the *Weichang'an Pill* high-dose group increased, the pathological score decreased, the percentage of Treg cells and Treg/Th17 value increased, and the percentage of Th17 cells decreased ($P < 0.05$). There was no significant difference between the mesalazine group and the *Weichang'an Pill* high-dose group in all indexes ($P > 0.05$). **Conclusion** *Weichang'an Pill* is similar to mesalazine in improving the symptoms of DSS-induced ulcerative colitis, such as diarrhea, blood in the stool, and weight loss, and repairing intestinal mucosal damage. Its mechanism of action may be related to the regulation of Treg/Th17 immune imbalance.

Keywords ulcerative colitis; *Weichang'an Pill* (胃肠安丸); colon tissue; immune imbalance; regulatory T cells; helper T cells 17

(收稿日期: 2020-05-29; 修回日期: 2020-08-15)

编辑: 邓媛

欢迎邮购《中医杂志》光盘合订本

1951—1986 年(4 张光盘) 480 元; 1987—1994 年(1 张光盘) 260 元; 1995—2004 年(1 张光盘) 280 元; 2005—2013 年(1 张光盘) 300 元。

光盘合订本为计算机用数据光盘, 收入了同期出版的全部《中医杂志》内容, 可对所有文章进行任意字检索, 方便实用。

汇款地址: 北京东直门内南小街 16 号中医杂志社, 邮政编码: 100700, 收款人: 杨秋雷

电话: (010) 64035632, 网址: <http://www.jtcm.net.cn>