

## · 药效与毒理学研究 ·

## 左金丸对 DSS 诱导溃疡性结肠炎小鼠滤泡辅助性 T 细胞的调控作用

刘素萍<sup>1</sup>, 王海燕<sup>2</sup>, 赵海梅<sup>3</sup>, 钟友宝<sup>4</sup>, 龙健<sup>1</sup>, 左铮云<sup>2</sup>, 刘端勇<sup>5</sup>(1. 江西中医药大学研究生院, 江西南昌 330004; 2. 江西中医药大学, 江西南昌 330004; 3. 江西中医药大学中医学院, 江西南昌 330004; 4. 江西中医药大学实验动物科技中心, 江西南昌 330004; 5. 江西中医药大学科技学院, 江西南昌 330004)

**摘要:** 目的 探讨左金丸对溃疡性结肠炎(UC)小鼠滤泡辅助性 T 细胞(Tfh)的调控作用。方法 将 BALB/c 小鼠随机均分为正常组、模型组、左金丸组(3 g·kg<sup>-1</sup>)及美沙拉嗪组(300 mg·kg<sup>-1</sup>), 每组 10 只。除正常组外其余各组小鼠采用自由饮水的方式给予 3% 葡聚糖硫酸钠(DSS) 溶液, 连续 7 d, 构建 UC 小鼠模型。7 d 后按照相应剂量灌胃给药, 每日 1 次, 连续给药 7 d。每天称小鼠体质量并观察其一般症状; 采用流式细胞术检测 Tfh 及滤泡调节性 T 细胞(Tfr)数量; 测定小鼠结肠质量、结肠长度, 计算结肠质量指数; 采用 HE 染色法进行结肠组织病理学观察; Western Blot 法检测小鼠结肠组织 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达水平。结果 与模型组比较, 左金丸组小鼠的结肠质量指数明显降低( $P < 0.01$ ), 结肠长度明显恢复( $P < 0.01$ ), 结肠组织病理评分明显降低( $P < 0.05$ ); CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>及 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>细胞水平明显下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>及 CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>Blimp-1<sup>+</sup>细胞水平均明显升高( $P < 0.05$ ); 结肠组织中的 Caspase-3、Bax 蛋白表达明显下调( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), Bcl-2/Bax 蛋白比值明显升高( $P < 0.01$ )。结论 左金丸可能通过调控 Tfh/Tfr 细胞平衡, 以及结肠组织的 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达水平, 发挥对 UC 小鼠的治疗作用。

**关键词:** 左金丸; 溃疡性结肠炎; 滤泡辅助性 T 细胞; 滤泡调节性 T 细胞; Bax; Bcl-2; Caspase-3; 小鼠

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)03-0301-06

**doi:** 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.03.001

**Regulation of Zuojin Pill on Follicular Helper T Cells in DSS Induced Ulcerative Colitis Mice**

LIU Suping<sup>1</sup>, WANG Haiyan<sup>2</sup>, ZHAO Haimei<sup>3</sup>, ZHONG Youbao<sup>4</sup>, LONG Jian<sup>1</sup>, ZUO Zhengyun<sup>2</sup>, LIU Duanyong<sup>5</sup>  
(1. Department of Postgraduate, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China; 2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China; 3. School of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China; 4. Laboratory Animal Science and Technology Center, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China; 5. College of Science and Technology, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China)

**Abstract: Objective** To investigate the regulatory effect of *Zuojin* pill on follicular helper T cells(Tfh) in mice with ulcerative colitis(UC). **Methods** BALB/c mice were randomly divided into normal group, model group, *Zuojin* pill group(3 g·kg<sup>-1</sup>) and mesalazine group(300 mg·kg<sup>-1</sup>). In addition to the normal group, the other groups of mice drank 3% DSS freely to construct UC model. After 7 days, the drugs were given by gavage according to the corresponding doses for 7 days. Every day, the body mass of mice was weighed and the clinical symptoms of mice were observed. The number of Tfh and Tfr cells were detected by flow cytometry. After that, the mice were killed

收稿日期: 2020-07-18

**作者简介:** 刘素萍, 女, 硕士研究生, 研究方向: 方剂作用机理及药效物质基础研究。Email: 1093923563@qq.com。通信作者: 左铮云, 男, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 方剂配伍与现代药理研究。Email: zzy61@163.com。刘端勇, 男, 教授, 博士研究生导师, 博士, 研究方向: 炎症性肠病的中医药治疗与作用机制研究。Email: liuduanyong@163.com。

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81803988, 81760838, 81460679); 江西省卫生计生委中医药科研课题(2015A246); 江西省自然科学基金项目(20181BAB205082, 20171BAB205088); 江西省教育厅科技项目(GJJ151564)。

and the colon tissue was sampled, the colon weight, colon length and intestine weight index were measured and calculated. The histopathology of colon was observed by HE staining. The protein levels of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 were detected by Western Blot. **Results** Compared with the model group, the mice in *Zuojin* pill group have reduced the index of colon weight significantly ( $P < 0.01$ ), greatly recovered colon length ( $P < 0.01$ ), and evidently descended injury scores ( $P < 0.05$ );  $CD4^+CD44^+ICOS^+$ ,  $CD4^+CD44^+IL-17^+$  and  $CD4^+CD44^+CXCR5^+$  cells decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),  $CD4^+CXCR5^+Foxp3^+$ ,  $CD4^+CXCR5^+Blimp-1^+$  cells increased ( $P < 0.05$ ); Bax, Caspase-3 protein levels decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), Bcl-2/Bax protein ratio increased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** *Zuojin* pill may play a role in the treatment of UC by regulating the balance of Tfh/Tfr cells and the protein levels of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 in colon tissue.

**Keywords:** *Zuojin* pill; ulcerative colitis; follicular helper T cells; follicular regulatory T cells; Bax; Bcl-2; Caspase-3; mice

溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)属于炎症性肠病(Inflammatory bowel disease, IBD),是一种主要累及直肠和结肠黏膜的慢性非特异性炎症,虽其病因和发病机制至今尚未明确,但免疫状态紊乱是其公认的发病机制之一<sup>[1]</sup>。滤泡辅助性T细胞(Follicular helper T cells, Tfh)为 $CD4^+$ T细胞的一个特异亚群,在辅助B细胞体液免疫应答中发挥关键作用。研究<sup>[2]</sup>表明,Tfh的异常变化与多种自身免疫性疾病密切相关,如类风湿关节炎、系统性红斑狼疮、I型糖尿病、重症肌无力等。滤泡调节性T细胞(Follicular regulatory T cells, Tfr)是一类有着特殊转录信号的调节性效应T细胞亚型<sup>[3-4]</sup>,其免疫表型为 $CXCR5^+FOXP3^+$ ,Tfr能限制生发中心(GC)反应,调节Tfh分化,起到维持免疫耐受和防止自身免疫的作用<sup>[5]</sup>。因此,Tfh/Tfr细胞比例失衡可能是诱发自身免疫性疾病的关键因素<sup>[6]</sup>。

左金丸出自《丹溪心法》,由黄连和吴茱萸以6:1的比例组成,寒热并用、辛开苦降、阴阳并调,临床常用于UC属寒热错杂之证。药理研究<sup>[7-8]</sup>表明,左金丸能够改善UC小鼠的症状,修复肠黏膜充血、水肿、糜烂和炎性浸润等病理损伤,显示出了对UC较好的治疗作用。有关左金丸对Tfh分化平衡的调节机制尚不明确,故本实验拟采用葡聚糖硫酸钠(DSS)制备结肠炎小鼠模型,检测小鼠外周血中Tfh/Tfr细胞占 $CD4^+$ T细胞的百分比,探讨左金丸治疗UC的作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 动物** BALB/c小鼠40只,雄性,9~12周龄,SPF级,体质量( $20 \pm 2$ )g,由湖南斯莱克景达实验动物公司提供,动物生产许可证号:SCXK(湘)2016-

0002。小鼠置于万级屏障环境中适应性饲养7d,自由摄食饮水,动物使用许可证号:SYXK(赣)2017-0004。

**1.2 药物及试剂** DSS(分子量:36 000~50 000),美国MP Biomedicals公司,批号:Q8378;使用蒸馏水配制成3%(m/V)的DSS溶液。左金丸,温州海鹤药业有限公司,批号:20170706;美沙拉嗪肠溶片,葵花药业集团佳木斯鹿灵制药有限公司,批号:181003。 $CD4$ -APC-H7(货号:560181)、 $CD44$ -PerCP-CY5.5(货号:560570)、 $IL17$ -APC-CY7(货号:560821)、 $ICOS$ -PE(货号:565669)、 $CXCR5$ -FITC(货号:560577)、 $Blimp-1$  Alexa flour 647(货号:563643)、 $FoxP3$ -PerCP-CY5.5(货号:563902)荧光抗体,均购自美国BD公司;Anti-Bax antibody(货号:ab199677)、Anti-Bcl-2 antibody(货号:ab196495)、Anti-Caspase-3 antibody(货号:ab13847)、GAPDH抗体,均购自英国Abcam公司。

**1.3 主要仪器** OLYMPUS BX43F型显微镜,日本奥林巴斯公司;Neofuge13R型低温高速离心机,上海力申科学仪器有限公司;BD FACSVerser™型流式细胞仪,美国BD公司;Bio-Rad化学发光成像仪,美国伯乐公司。

**1.4 动物分组及模型复制** 适应性喂养1周后,将40只小鼠随机分为4组,即正常组、模型组、左金丸组和美沙拉嗪组,每组10只。正常组小鼠自由饮用蒸馏水,其余各组小鼠采用自由饮水的方式给予3% DSS溶液,连续7d,构建UC小鼠模型<sup>[9]</sup>。DSS自由饮水至第4~5天见血便者,提示模型复制成功。

**1.5 给药方法** UC小鼠造模成功后,依照人和动物间接体表面积折算的等效剂量,左金丸组小鼠给予 $3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 左金丸混悬液灌胃<sup>[8]</sup>,美沙拉嗪组小鼠给

予  $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  美沙拉嗪溶液灌胃<sup>[10]</sup>, 正常组和模型组小鼠灌胃等容积的生理盐水。每日 1 次, 连续给药 7 d。

**1.6 一般情况观察** 在造模及给药期间, 每日同一时间观察并记录各组小鼠体质量、粪便性状、活动度、精神状态及死亡率等情况。

**1.7 结肠长度、结肠质量指数测定** 给药 7 d 后, 用 2% 戊巴比妥钠深度麻醉小鼠, 采集新鲜血液,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  下保存。处死小鼠后, 迅速打开腹腔, 分离小鼠肛门至回盲部的结肠部分, 平铺于冰袋上, 测量结肠的长度。用预冷的磷酸盐缓冲溶液(PBS)清洗肠腔后, 用滤纸吸去多余水分, 称定结肠质量, 计算: 结肠质量指数(%)=结肠质量(g)/小鼠体质量(g) $\times$ 100%。将结肠剪为 2 部分, 取结肠近端 2 cm 组织置于 4% 甲醛溶液中固定 72 h; 其余样本组织置于液氮中速冻后, 转至  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱冻存备用。

**1.8 结肠组织病理形态学观察** 将固定后的结肠组织流水冲洗过夜, 梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋, 制成  $5 \mu\text{m}$  厚切片, 常规苏木精-伊红(HE)染色, 在显微镜下观察结肠组织的病理情况并采集图片。参考文献[11]方法对结肠组织的病理情况进行双盲法评分。

**1.9 流式细胞术检测  $\text{CD4}^+\text{CD44}^+\text{T}$  细胞及  $\text{CD4}^+\text{CXCR5}^+\text{T}$  细胞的水平** 严格按照 BD 公司抗体说明书步骤进行操作<sup>[12]</sup>, 检测(mTh17) $\text{CD4}^+\text{CD44}^+\text{IL-17}^+$ 、(mTfh) $\text{CD4}^+\text{CD44}^+\text{ICOS}^+$ 、(mTfh) $\text{CD4}^+\text{CD44}^+\text{CXCR5}^+$ 、(Tfr) $\text{CD4}^+\text{CXCR5}^+\text{Foxp3}^+$ 、 $\text{CD4}^+\text{CXCR5}^+\text{Blimp-1}^+$  细胞水平。将采集的小鼠外周血置于含有 EDTA-K2 抗凝剂的采血管内; 计算需要的抗体总量, 并按放大 10 倍进行稀释, 制备抗体混合液; 取  $100 \mu\text{L}$  抗凝血于 2 mL EP 管中, 加入抗体混合液进行表染, 避光孵育 30 min; 加 1 mL  $1\times$  溶血素, 混匀, 避光孵育 15 min; 以  $500\times g$  离心 5 min, 弃上清液; 加 1 mL Stain Buffer 洗涤 1 次, 以  $500\times g$  离心 5 min; 加入  $500 \mu\text{L}$  Stain Buffer 混匀, 置于  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱遮光保存; 上流式细胞仪检测, 采用 Flowjo 7.6.1 软件分析流式结果。

**1.10 Western Blot 法检测结肠组织中 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达** 取小鼠结肠组织, 称定质量后, 剪碎、裂解、匀浆、离心, 提取胞浆蛋白, 以 BCA 法测定蛋白浓度。各组蛋白样本按比例加入  $5\times$  SDS 上样缓冲液, 沸水煮 10 min, 以  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 2 min, 取上清液。严格按照说明书操作方法进行, 取  $40 \mu\text{g}$  蛋白样品进行 10% SDS-PAGE 电泳,

$90 \text{ V}$  下电泳 1.5 h 分离蛋白;  $200 \text{ mA}$  下 PVDF 转膜 2 h, 以 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液室温摇床封闭 1.5 h。加入 Bax (1 : 1 000)、Bcl-2 (1 : 1 000)、Caspase-3 (1 : 500)、GAPDH (1 : 4 000) 一抗,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  摇床孵育过夜; TBST 充分洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入相应的二抗 (1 : 2 000) 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次。ECL 显影, 暗室曝光, 化学成像仪扫描图片。以 GAPDH 为内参, 采用 ImageJ 软件对目的蛋白条带灰度值进行半定量分析。

**1.11 统计学处理方法** 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析; 计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示; 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 两两比较采用 LSD 检验; 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 左金丸对 UC 小鼠一般症状的影响** 正常组小鼠毛发干净、柔顺, 反应敏捷, 饮食、活动正常, 大便正常, 肛门无出血现象, 体质量正常增长。随着造模天数增加, 模型组小鼠逐渐出现不同程度的毛发晦暗, 反应迟钝, 精神欠佳, 大便不成形, 肛门污秽、出血, 体质量增长缓慢甚至负增长。与模型组比较, 左金丸组小鼠在给药干预后, 上述症状均出现明显好转。

**2.2 左金丸对 UC 小鼠结肠组织病理形态的影响** 结果见图 1、表 1。正常组小鼠的结肠黏膜上皮完整, 腺体结构清晰, 未见肠壁增厚, 无充血、水肿, 无炎性细胞浸润。与正常组比较, 模型组小鼠结肠黏膜明显可见上皮脱落, 腺体减少, 溃疡形成, 肠壁增厚, 大量炎性细胞浸润; 组织病理学评分显著升高, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 左金丸组小鼠的肠黏膜得到修复, 结肠上皮有所恢复, 趋于完整, 杯状细胞丰富度回升, 炎性细胞浸润减少, 无明显溃疡形成; 组织病理学评分明显降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结果表明, 左金丸能够有效改善 DSS 诱导的 UC 小鼠结肠黏膜的病理损伤。

**2.3 左金丸对 UC 小鼠结肠长度及其质量指数的影响** 结果见表 1。与正常组比较, 模型组小鼠的结肠长度明显缩短, 结肠质量指数明显升高, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 左金丸组小鼠的结肠长度明显延长, 结肠质量指数明显下降, 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。结果表明, 左金丸对 UC 具有一定的治疗效果。

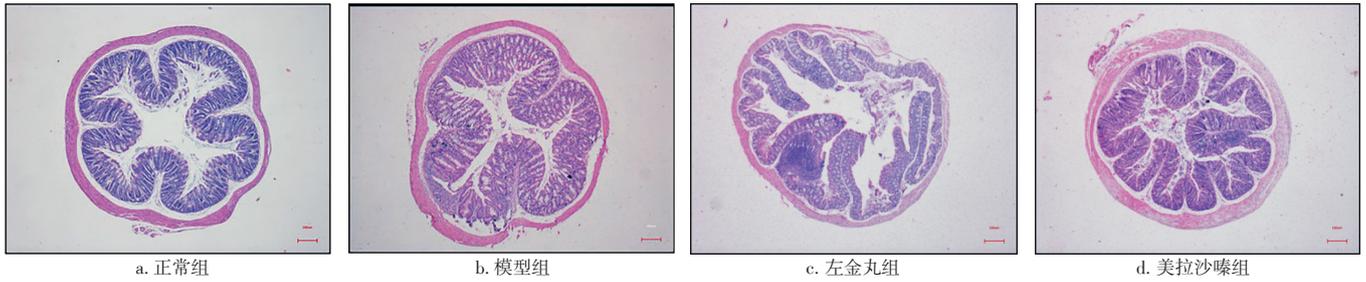


图 1 左金丸对溃疡性结肠炎小鼠结肠黏膜组织病理形态的影响(HE 染色, ×40)

Figure 1 Effect of Zuojin pill on the pathological injury of colon in UC mice(HE staining, ×40)

表 1 左金丸对溃疡性结肠炎小鼠结肠长度、结肠质量指数及病理学评分的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 1 Effect of Zuojin pill on colon length, index of intestinal weight and histopathological score in UC mice( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

| 组别    | 剂量                      | 结肠长度/cm        | 结肠质量指数/%      | 病理学评分/分        |
|-------|-------------------------|----------------|---------------|----------------|
| 正常组   | -                       | 12.69 ± 0.74   | 1.30 ± 0.10   | 1.20 ± 0.71    |
| 模型组   | -                       | 11.74 ± 0.59*  | 1.43 ± 0.06*  | 12.30 ± 2.67** |
| 左金丸组  | 3 g·kg <sup>-1</sup>    | 13.19 ± 1.14** | 1.20 ± 0.13** | 9.60 ± 2.07*   |
| 美沙拉嗪组 | 300 mg·kg <sup>-1</sup> | 13.53 ± 0.49** | 1.29 ± 0.05** | 9.70 ± 1.72*   |

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

**2.4 左金丸对 UC 小鼠 Tfh 细胞水平的影响** 结果见表 2。与正常组比较, 模型组小鼠的 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>及 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>细胞水平明显升高, 差异均有统计学意义(P < 0.05, P < 0.01)。与模型组比较, 左金丸组小鼠的 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>及 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>细胞水平明显下降, 差异均有统计学意义(P < 0.05, P < 0.01)。结果表明, 左金丸能够抑制 DSS 诱导 UC 小鼠的 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>T 细胞中 CXCR5、ICOS、IL-17 的过表达。

表 2 左金丸对溃疡性结肠炎小鼠 Tfh 细胞水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 2 Effects of Zuojin pill on the number of Tfh cell in UC mice( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

| 组别    | 剂量                      | CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> ICOS <sup>+</sup> /% | CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> IL-17 <sup>+</sup> /% | CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> CXCR5 <sup>+</sup> /% |
|-------|-------------------------|---|--|--|
| 正常组   | -                       | 5.42 ± 1.11   | 0.47 ± 0.12  | 2.59 ± 0.45  |
| 模型组   | -                       | 7.57 ± 2.33*  | 0.71 ± 0.10**  | 3.39 ± 0.61**  |
| 左金丸组  | 3 g·kg <sup>-1</sup>    | 5.75 ± 1.14 <sup>#</sup>                                | 0.53 ± 0.10**  | 2.52 ± 0.46**  |
| 美沙拉嗪组 | 300 mg·kg <sup>-1</sup> | 4.89 ± 0.98 <sup>#</sup>                                | 0.42 ± 0.13**  | 2.50 ± 0.45**  |

注: 与正常组比较, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01; 与模型组比较, <sup>#</sup>P < 0.05, \*\*P < 0.01

**2.5 左金丸对 UC 小鼠 Tfr 细胞水平的影响** 结果见表 3。与正常组比较, 模型组小鼠的 CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>及 CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>Blimp-1<sup>+</sup>细胞水平显著下降,

差异均有统计学意义(P < 0.01)。与模型组比较, 左金丸组小鼠的 CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>及 CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>Blimp-1<sup>+</sup>细胞水平明显升高, 差异均有统计学意义(P < 0.05)。结果表明, 左金丸能够促进 DSS 诱导 UC 小鼠 CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>T 细胞的 Foxp3、Blimp-1 表达。

表 3 左金丸对溃疡性结肠炎小鼠 Tfr 细胞水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 3 Effects of Zuojin pill on the number of Tfr cell in UC mice( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

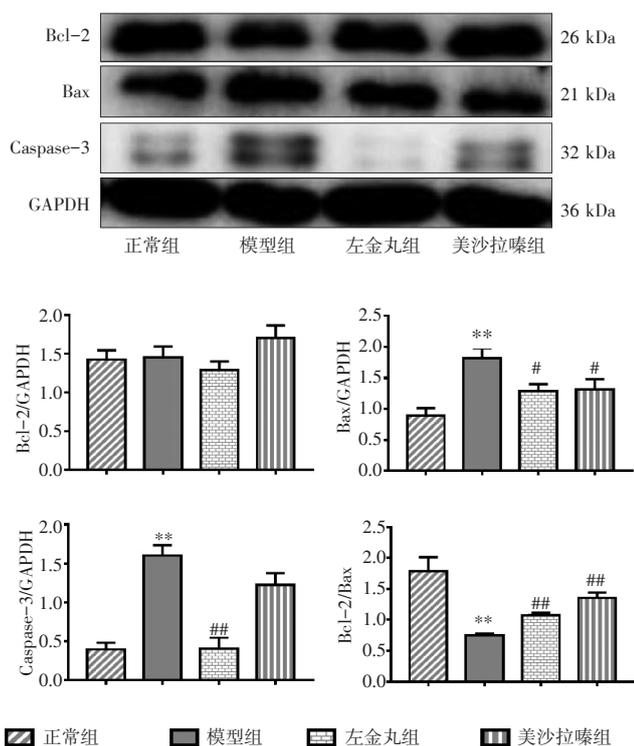
| 组别    | 剂量                      | CD4 <sup>+</sup> CXCR5 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> /% | CD4 <sup>+</sup> CXCR5 <sup>+</sup> Blimp-1 <sup>+</sup> /% |
|-------|-------------------------|---|---|
| 正常组   | -                       | 3.76 ± 2.28   | 14.58 ± 2.34  |
| 模型组   | -                       | 1.40 ± 0.97**   | 10.13 ± 3.70**  |
| 左金丸组  | 3 g·kg <sup>-1</sup>    | 2.52 ± 0.81 <sup>#</sup>                                  | 15.86 ± 8.15 <sup>#</sup>                                   |
| 美沙拉嗪组 | 300 mg·kg <sup>-1</sup> | 4.22 ± 2.63**   | 15.60 ± 6.88 <sup>#</sup>                                   |

注: 与正常组比较, \*\*P < 0.01; 与模型组比较, <sup>#</sup>P < 0.05, \*\*P < 0.01

**2.6 左金丸对 UC 小鼠结肠组织中凋亡蛋白表达的影响** 结果见图 2。与正常组比较, 模型组小鼠结肠组织中 Caspase-3、Bax 蛋白表达明显上调, Bcl-2/Bax 蛋白比值明显下降, 差异均有统计学意义(P < 0.01)。与模型组比较, 左金丸组小鼠结肠组织中的 Caspase-3、Bax 蛋白表达明显下调, Bcl-2/Bax 蛋白比值明显升高, 差异均有统计学意义(P < 0.05, P < 0.01)。结果表明, 左金丸能够下调 DSS 诱导的 UC 小鼠结肠组织中凋亡蛋白的表达。

### 3 讨论

溃疡性结肠炎(UC)是一种消化系统的慢性炎症性疾病, 属于中医学的“泄泻”“痢疾”“肠风”等病证范畴。其病变主要累及结肠黏膜层, 以溃疡病变为主, 临床以反复发作的腹泻、黏液脓血便、腹痛为主要表现。UC 以脾胃虚弱为本, 寒热错杂为病机特点, 临床上常以左金丸加减治疗<sup>[13]</sup>。研究<sup>[7]</sup>表明, 左金丸能降低 UC 小鼠血液中促炎因子肿瘤坏死因子 α(TNF-α)、白细胞介素 1β(IL-1β)、白细胞



注：与正常组比较，\*\* $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$   
 图 2 左金丸对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Figure 2 Effects of Zuojin pill on Bax, Bcl-2 and Caspase-3 protein expression in colon tissue of UC mice( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

介素 6(IL-6)的水平，抑制结肠组织中核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65 和巨噬细胞移动抑制因子(MIF)、CD74 的表达，改善肠黏膜的病理损伤，发挥对 UC 的治疗作用。本课题组前期研究<sup>[8,14]</sup>表明，左金丸可通过抑制 JAK1/STAT3 信号通路调节中枢免疫记忆性 T 细胞与效应免疫记忆性 T 细胞间的平衡，抑制 PI3K/Akt 信号活化调节 CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>T 细胞及其 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>亚群水平，从而发挥对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导 UC 小鼠的治疗作用。本研究结果证实，左金丸干预治疗能够改善 DSS 诱导的 UC 小鼠结肠黏膜上皮损伤，减少炎症细胞浸润，降低结肠质量指数及结肠组织病理学评分，对小鼠的实验性结肠炎有治疗作用，且该治疗作用可能与左金丸对滤泡辅助性 T 细胞(Tfh)分化平衡的调节机制有关。

UC 是一种自身免疫性疾病。Tfh 细胞分化和功能失调均会导致多种自身免疫性疾病的发生。Tfh 是一种新的 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群，其主要功能是辅助 B 细胞产生抗体，并参与体液免疫。CXCR5 是其表面趋化因子受体，ICOS 为其表面的共刺激分子，转录因子 Blimp-1 的过表达可抑制 Tfh 的产生<sup>[15]</sup>。滤泡调节

性 T 细胞(Tfr)从 Treg 细胞分化而来<sup>[16]</sup>，其表面不仅表达与 Tfh 细胞一样的趋化因子受体 CXCR5，而且还表达 Treg 细胞的特征性转录因子 Foxp3，并借助 Foxp3 发挥负向调控作用，抑制 B 细胞的分化以及抗体生成<sup>[17]</sup>。Th17 是一种新发现的分泌白细胞介素 17(IL-17)的 T 细胞亚群，参与了结肠组织的炎症反应<sup>[18]</sup>。本研究结果显示，与正常组比较，UC 模型组小鼠 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>T 细胞中 CXCR5、ICOS、IL-17 过度表达，CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>T 细胞中 Foxp3、Blimp-1 低表达，经左金丸干预治疗后，上述变化得到有效逆转。结果说明，左金丸可能通过上调 Blimp-1 转录因子水平，抑制 Tfh 细胞的趋化因子 CXCR5 及共刺激分子 ICOS 的过表达，防止 CD4<sup>+</sup>T 细胞过度分化为 Tfh 细胞；同时，左金丸能上调 Foxp3 转录因子的表达，有助于增强 Tfr 细胞的免疫应答，并发挥负向调控作用，抑制 B 细胞的分化以及抗体生成。因此，上调转录因子 Blimp-1、Foxp3 的表达水平，抑制 B 细胞的分化，促使肠道内 Tfh/Tfr 细胞趋于平衡，进而恢复肠道免疫平衡状态，可能是左金丸发挥对 DSS 诱导的 UC 小鼠治疗作用的重要机制之一。

除了免疫紊乱，肠黏膜上皮细胞的过度凋亡也是 UC 的重要病理特征之一<sup>[19]</sup>。Bax/Bcl-2/Caspase-3 是重要的细胞凋亡信号通路之一，Bax/Bcl-2 蛋白比例决定细胞的存活或死亡<sup>[20]</sup>。本研究结果显示，左金丸可有效降低 UC 小鼠肠黏膜 Caspase-3、Bax 蛋白表达水平，提高 Bcl-2/Bax 比值。提示左金丸可能通过调节 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白的表达，从而抑制肠黏膜上皮细胞的过度凋亡，促进肠黏膜修复，从而发挥治疗 UC 的作用。

综上所述，左金丸能够有效改善 UC 小鼠的症状，修复肠黏膜的病理损伤，可能与其调控 Tfh/Tfr 细胞平衡，以及结肠组织的 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达水平有关。

参考文献：

[1] 刘端勇, 刘雪珂, 鹿秀云, 等. 调控BCL-6信号干预Tfh细胞分化: 治疗炎症性肠病新策略[J]. 世界华人消化杂志, 2018, 26(14): 821-826.  
 [2] TANGYE S G, MA C S, BRINK R, et al. The good, the bad and the ugly-TFH cells in human health and disease[J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13: 412-426.  
 [3] LINTERMAN M A, PIERSON W, LEE S K, et al. Foxp3<sup>+</sup> follicular

- regulatory T cells control the germinal center response[J]. *Nat Med*, 2011, 17: 975-982.
- [4] CHUNG Y, TANAKA S, CHU F, et al. Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions[J]. *Nat Med*, 2011, 17: 983-988.
- [5] WOLLENBERG I, AGUA-DOCE A, HERNANDEZ A, et al. Regulation of the germinal center reaction by Foxp3<sup>+</sup> follicular regulatory T cells[J]. *J Immunol*, 2011, 187: 4553-4560.
- [6] 谢彦飞. BCL6、ICOS调控TNBS诱导的结肠炎小鼠中Th/Tfr的分泌[D]. 南宁: 广西医科大学, 2018.
- [7] 易文, 陈置丰, 石孟琼, 等. 左金丸阻断溃疡性结肠炎小鼠NF- $\kappa$ B激活MIF、TNF- $\alpha$ 及IL-1 $\beta$ 、IL-6表达[J]. *中药药理与临床*, 2014, 30(6): 9-13.
- [8] 吴甜甜, 刘雪珂, 刘馥春, 等. 左金丸对DSS诱导的溃疡性结肠炎小鼠免疫记忆性T细胞水平的调节作用[J]. *中药新药与临床药理*, 2020, 31(10): 1158-1164.
- [9] 孔鹏飞, 赵兵, 覃勤, 等. 葡聚糖硫酸钠致溃疡性结肠炎急性期大鼠模型的建立与评价[J]. *中华消化病与影像杂志(电子版)*, 2016, 6(1): 25-27.
- [10] 鹿秀云, 岳海洋, 刘億, 等. 黄芪多糖对结肠炎小鼠树突状细胞表面共刺激分子表达的调节作用[J]. *中成药*, 2018, 40(10): 2296-2298.
- [11] DIELEMAN L A, PALMEN M J, 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.
- [12] LIU X K, ZHAO H M, WANG H Y, et al. Regulatory effect of *Sishen* pill on Tfh cells in mice with experimental colitis[J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 589-598.
- [13] 黄建, 黄政德. 黄政德运用左金丸加减治疗溃疡性结肠炎经验[J]. *湖南中医杂志*, 2018, 34(5): 23-25.
- [14] 王海燕, 葛巍, 刘素萍, 等. 左金丸对结肠炎小鼠外周血CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>T细胞及其CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>亚群的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(5): 2384-2388.
- [15] NURIEVA R I, CHUNG Y, MARTINEZ G J, et al. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells[J]. *Science*, 2009, 325(5943): 1001-1005.
- [16] MACEIRAS A R, ALMEIDA S C P, MARIOTTI-FERRANDIZ E, et al. T follicular helper and T follicular regulatory cells have different TCR specificity[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15067-15078.
- [17] 李世权, 吕晓丹, 谢彦飞, 等. 溃疡性结肠炎小鼠外周血和结肠组织中Tfh、Tfr细胞水平变化及意义[J]. *山东医药*, 2018, 58(9): 9-12.
- [18] 尹凤荣, 战蓉蓉, 王冬, 等. TL1A通过调控IL-17和IFN- $\gamma$ 促进慢性实验性结肠炎相关肠纤维化的发生[J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(6): 1096-1103.
- [19] 沈雁, 王章流, 郑华君, 等. 小檗碱对溃疡性结肠炎模型小鼠肠上皮细胞凋亡的影响[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2018, 28(12): 992-996, 984.
- [20] 李莉, 韩俊岭. Bcl-2/Bax在溃疡性结肠炎肠黏膜中的表达及与细胞凋亡的关系[J]. *河北医药*, 2012, 34(5): 655-657.

(编辑: 邹元平)