

人参皂苷 Rg1 对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠 Treg/Th9 细胞平衡的调控作用

龙健¹, 康增平¹, 钟友宝^{1,2}, 董辛³, 王梦雪¹, 赵海梅⁴, 刘端勇⁵ (1. 江西中医药大学研究生院, 江西 南昌 330004; 2. 江西中医药大学实验动物科技中心, 江西 南昌 330004; 3. 南昌医学院, 江西 南昌 330004; 4. 江西中医药大学中医学院, 江西 南昌 330004; 5. 江西中医药大学方证研究中心, 江西 南昌 330004)

摘要: **目的** 探讨人参皂苷 Rg1 对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的溃疡性结肠炎小鼠调节性 T 细胞(Treg)/辅助性 T 细胞 9(Th9)细胞平衡的调控作用。**方法** 将 40 只 BALB/C 雄性小鼠随机分为正常组、模型组、人参皂苷 Rg1 组(200 mg·kg⁻¹)及美沙拉嗪组(300 mg·kg⁻¹), 每组 10 只。除正常组外, 其余各组小鼠采用 3% DSS 自由饮水 7 d 建立溃疡性结肠炎模型; 给药组同时按照上述剂量灌胃给药, 每日 1 次, 连续 10 d。观察记录小鼠一般情况及体质量; 测量结肠长度及其质量, 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, 并进行病理损伤评分; 采用 ELISA 法检测结肠组织中 IL-1 β 、IL-4、IL-15、IL-17A 表达水平; 采用流式细胞术检测小鼠外周血中 CD4⁺ CD44⁺ Foxp3⁺、CD4⁺ CD44⁺ IL-9⁺、CD4⁺ CD44⁺ IL-10⁺、CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺、CD4⁺ CD25⁺ PD-1⁺ 及 CD4⁺ CD25⁺ PD-L1⁺ T 细胞水平。**结果** 与正常组比较, 模型组小鼠结肠黏膜充血、水肿, 杯状细胞减少, 大量炎症细胞浸润, 部分区域溃疡形成; 小鼠体质量明显下降、结肠质量明显增加、结肠长度明显缩短、结肠质量指数及病理评分明显升高($P < 0.01$); 小鼠结肠组织中 IL-1 β 、IL-15、IL-17A 表达水平显著升高($P < 0.01$), IL-4 表达水平显著降低($P < 0.01$); 小鼠外周血的 CD4⁺ CD44⁺ Foxp3⁺、CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺、CD4⁺ CD44⁺ IL-10⁺ T 细胞水平均显著降低($P < 0.01$), 而 CD4⁺ CD44⁺ IL-9⁺、CD4⁺ CD25⁺ PD-1⁺、CD4⁺ CD25⁺ PD-L1⁺ T 细胞水平显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较, 人参皂苷 Rg1 组小鼠结肠黏膜充血、水肿明显减轻, 糜烂修复, 炎症细胞浸润明显减少; 体质量明显增加、结肠质量明显降低、结肠长度明显延长、结肠质量指数及病理评分明显降低($P < 0.05$); 小鼠结肠组织中 IL-1 β 、IL-15、IL-17A 表达水平明显下降($P < 0.01$), IL-4 表达水平明显升高($P < 0.05$); 小鼠外周血的 CD4⁺ CD44⁺ Foxp3⁺、CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺、CD4⁺ CD44⁺ IL-10⁺ T 细胞水平均显著升高($P < 0.01$), 同时 CD4⁺ CD44⁺ IL-9⁺、CD4⁺ CD25⁺ PD-1⁺、CD4⁺ CD25⁺ PD-L1⁺ T 细胞水平均显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 人参皂苷 Rg1 可能通过调控 Treg/Th9 细胞平衡治疗 DSS 诱导的小鼠溃疡性结肠炎。

关键词: 人参皂苷 Rg1; 溃疡性结肠炎; T 淋巴细胞; 调节性 T 细胞(Treg); 辅助性 T 细胞 9(Th9); 小鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2022)01-0020-07

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2022.01.004

Ginsenoside Rg1 Regulates Cell Balance of Treg/Th9 in Mice with DSS-induced Colitis

LONG Jian¹, KANG Zengping¹, ZHONG Youbao^{1,2}, DONG Xin³, WANG Mengxue¹, ZHAO Haimei⁴, LIU Duanyong⁵ (1. Graduate School of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China; 2. Experimental Animal Science and Technology Center of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China; 3. Nanchang Medical College, Nanchang 330004 Jiangxi, China; 4. College of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004

收稿日期: 2021-02-01

作者简介: 龙健, 女, 博士研究生, 研究方向: 方剂配伍及其现代化研究。Email: 1258996023@qq.com。通信作者: 刘端勇, 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 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(82060838, 82060799); 江西省自然科学基金项目(20202ACBL206028, 20181BAB205082); 江西省教育厅科技项目(GJJ196049); 江西省教育厅研究生创新项目(YC2020-B145)。

Jiangxi, China; 5. Fangzheng Research Center of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China)

Abstract: Objective To investigate the regulatory effect of Ginsenoside Rg1 on cell balance of Treg/Th9 in mice induced by dextran sulphate sodium (DSS). **Methods** Forty BALB/C male mice were randomly divided into the normal group, model group, Rg1 group (200 mg·kg⁻¹) and Mesalazine group (300 mg·kg⁻¹), each with 10 animals. Except for the normal group, mice were given 3% DSS free to drink for 7 days to establish ulcerative colitis model. The Rg1 group and Mesalazine group were administered intragastrically at the same time, once a day, for 10 consecutive days. The general condition and body weight of mice were observed and recorded. The length and weight of the colons were measured. HE staining was used to observe the histopathology changes of the colon and score the pathological damage under the microscope. The expression of IL-1 β , IL-4, IL-15 and IL-17A in colon tissues was detected by ELISA. The levels of CD4⁺ CD44⁺ Foxp3⁺, CD4⁺ CD44⁺ IL-9⁺, CD4⁺ CD44⁺ IL-10⁺, CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺, CD4⁺ CD25⁺ PD-1⁺, and CD4⁺ CD25⁺ PD-L1⁺ in peripheral blood were measured by flow cytometry. **Results** Compared with normal group, mice in the model group showed hyperemia and edema of colonic mucosa, number of goblet cells reduced, large infiltration of inflammatory cells, and partial ulceration. Body weights of the model mice significantly reduced along with increasing of colon weights; length of colon decreased obviously, intestinal weight index and colonic mucosal pathological injury score increased significantly ($P < 0.01$). The levels of IL-1 β , IL-15, IL-17A in colon tissues of model group mice significantly increased ($P < 0.01$), IL-4 level decreased ($P < 0.01$). The levels of CD4⁺ CD44⁺ Foxp3⁺, CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ and CD4⁺ CD44⁺ IL-10⁺ T cells in peripheral blood were significantly decreased ($P < 0.01$), while the levels of CD4⁺ CD44⁺ IL-9⁺, CD4⁺ CD25⁺ PD-1⁺, CD4⁺ CD25⁺ PD-L1⁺ T cells markedly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, of the mice in the ginsenoside Rg1 group, the hyperemia and edema of colonic mucosa was relieved obviously, colonic erosion was repaired, and inflammatory cell infiltration was significantly reduced. Body weight increased, colonic weight decreased, colonic length lengthened, intestinal weight index and colonic mucosal pathological injury score decreased significantly ($P < 0.05$). The levels of IL-1 β , IL-15, IL-17A in colon tissues were significantly decreased ($P < 0.01$), while the levels of IL-4 were significantly increased ($P < 0.05$). The levels of CD4⁺ CD44⁺ Foxp3⁺, CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ and CD4⁺ CD44⁺ IL-10⁺ T cells in peripheral blood were significantly increased ($P < 0.01$), while the levels of CD4⁺ CD44⁺ IL-9⁺, CD4⁺ CD25⁺ PD-1⁺, CD4⁺ CD25⁺ PD-L1⁺ T cells markedly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Ginsenoside Rg1 may regulate Treg/Th9 cell balance to exert the curative effect on DSS induced ulcerative colitis in mice.

Keywords: Ginsenoside Rg1; ulcerative colitis; T lymphocytes; regulatory T cells (Treg); T helper cell 9 (Th9); mice

溃疡性结肠炎 (Ulcerative colitis, UC) 是一种反复发作的非特异性炎性肠道疾病, 属于炎症性肠病 (Inflammatory bowel disease, IBD) 的一种类型, 具体病因及发病机制至今尚不明确, 其病理生理特征表现为结肠黏膜及其下层形成持续性、慢性炎症以及溃疡性损害。肠道 T 淋巴细胞介导的免疫异常是 IBD 重要的发病因素之一。新发现的 CD4⁺ T 淋巴细胞亚群——辅助性 T 细胞 9 (Th9) 与感染性疾病关系密切^[1], 调节性 T 细胞 (Treg)/Th9 细胞分化失衡与 IBD 的发生备受关注。人参皂苷 Rg1 (Ginsenoside, G-Rg1) 是中药人参的主要活性成分之一, 具有抗氧

化、抗炎、抗凋亡、抗疲劳、镇痛及神经保护等药理作用^[2], 可有效治疗实验性小鼠结肠炎^[3-4], 但其作用机制尚不完全明确。故本研究拟基于 Treg/Th9 细胞平衡探索人参皂苷 Rg1 治疗 IBD 的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 动物 BALB/c 雄性小鼠 40 只, SPF 级, 体质量 20 ~ 24 g, 购自湖南安生美药物研究院有限公司, 动物生产许可证号: SCXK(湘)2019-0004。动物饲养于江西中医药大学动物房, 使用许可证号: SYXK(赣)2006-0008, 恒温恒湿, 自由饮水摄食, 适应性

饲养 3 d 后开始实验。

1.2 药品及试剂 人参皂苷 Rg1(纯度 99.91%), 购于成都普瑞法科技开发有限公司, 批号: 1608005; 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: 170438。右旋葡聚糖硫酸钠(DSS, 分子量: 35 000~36 000), 美国 MP Biomedicals 公司, 批号: Q5756; 白细胞介素(IL)1 β 、IL-4、IL-15、IL-17A ELISA 检测试剂盒, 均购自联科生物公司; 流式细胞抗体 APC-H7-CD4⁺(货号: 560181)、PerCP-CY5.5-Foxp3⁺(货号: 563902)、PE-IL-9⁺(货号: 561463)、PE-PD-L1⁺(货号: 558091)、APC-IL-10⁺(货号: 554468)、APC-PD-1⁺(货号: 562671)、FITC-CD44⁺(货号: 561859)、FITC-CD25⁺(货号: 558689), 均购自美国 BD 公司。

1.3 主要仪器 Varioskan Flash 全波长多功能酶标仪, 美国赛默飞世尔科技公司; 722 型分光光度计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; 低温高速离心机, 德国 Eppendorf 公司; 漩涡混匀器, 德国 IKA 公司; BD FACSCanto II 型流式细胞仪, 美国 BD 公司。

1.4 动物分组及模型复制 将 40 只小鼠随机分为正常组、模型组、人参皂苷 Rg1 组、美沙拉嗪组, 每组 10 只。用正常饮用水配制成 3%(m/V)的 DSS 溶液; 参考有关研究^[5]构建溃疡性结肠炎小鼠模型, 除正常组外, 其余各组小鼠均给予 3% DSS 溶液自由饮用, 连续 7 d, 正常组予正常饮用水。

1.5 给药方法 自造模第 1 天开始, 人参皂苷 Rg1 组小鼠每天给予 200 mg·kg⁻¹ 人参皂苷 Rg1 溶液灌胃, 美沙拉嗪组小鼠每天给予 300 mg·kg⁻¹ 美沙拉嗪溶液灌胃^[6], 正常组和模型组小鼠给予同等体积饮用水灌胃。每日于同一时间点灌胃给药 1 次, 连续 10 d。

1.6 标本采集及处理 实验期间, 每日观察记录小鼠体质量变化。第 11 天, 小鼠麻醉后眼眶取血, 然后脱颈椎处死; 分离结肠组织, 测量结肠长度和质量, 计算: 结肠质量指数(%)=结肠质量(g)/小鼠体质量(g)×100%。剪取部分结肠近端(靠近盲肠)组织, 固定于含 4%多聚甲醛的 EP 管内, 其余结肠组织样本迅速放入液氮中冷冻, -80 °C 冰箱保存, 备用。

1.7 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 μ 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, 对结肠组织的病理情况进行双盲法评分^[7]。

1.8 ELISA 检测结肠组织 IL-1 β 、IL-4、IL-15、IL-17A 水平 取部分结肠组织, 将其剪碎后置于 EP 管内, 取每 1 g 组织加入 10 mL RIPA 蛋白裂解液, 并置于冰上孵育 1.5~2 h 后, 采用超声匀浆机匀浆。将组织匀浆置于 4 °C 超速冷冻离心机中, 以 13 000 r·min⁻¹(离心半径 7 cm)离心 30 min, 提取上清液。严格按照 ELISA 试剂盒说明书步骤进行操作, 检测结肠组织 IL-1 β 、IL-4、IL-15、IL-17A 水平。

1.9 流式细胞术检测外周血 Treg/Th9 细胞亚群 流式细胞术检测严格按照说明书进行。分 2 组流式, CD4⁺CD44⁺Foxp3⁺、CD4⁺CD44⁺IL-9⁺及 CD4⁺CD44⁺IL-10⁺刺激后表面染色加胞内染色; CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺、CD4⁺CD25⁺PD-1⁺及 CD4⁺CD25⁺PD-L1⁺胞内染色。取 100 μ L 抗凝血, 加入 100 μ L 1640 培养液混匀, 加 1 mL 1 \times 溶血素, 避光孵育 15 min, 4 °C 下以 500 \times g 离心 5 min, 弃上清液, 1 mL Stain buffer 清洗细胞 1 次; 4 °C 下以 500 \times g 离心 5 min, 弃上清液, 使用 100 μ L Stain buffer 重悬细胞; 第 1 组加入刺激剂, 培养箱培养 2 h 后, 同第 2 组加入 Fix/Perm 250 μ L; 4 °C 下孵育 40 min, 加入 1 mL Perm/Wash, 清洗 2 次; 4 °C 下以 500 \times g 离心 5 min, 弃上清; 使用 100 μ L Perm/Wash 重悬细胞, 加入一定浓度的流式一抗抗体, 室温下避光孵育 15 min, 清洗 2 遍; 加入 100 μ L Stain buffer 重悬细胞, 混匀, 上机检测。采用 FlowJo VX 软件分析流式结果。

1.10 统计学处理方法 采用 GraphPad Prism 8.0 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 *t* 检验; 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人参皂苷 Rg1 对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织病理形态及其长度、质量指数的影响 结果见图 1、表 1。与正常组比较, 模型组小鼠毛发稍稀疏, 暗淡无光泽, 大便稀溏, 肛周污秽, 少食少动; 肉眼观察, 可见结肠黏膜充血、水肿, 局部出现红斑、糜烂; HE 染色观察, 可见黏膜充血、水肿, 杯状细胞减少, 大量炎症细胞浸润, 部分区域溃疡形成; 小鼠体质量明显下降、结肠质量明显增加、结肠长度明显缩短, 结肠质量指数及病理评分明显升高, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较, 给药

组小鼠大便成形、食量增加、活跃多动；结肠黏膜充血、水肿明显减轻，糜烂修复，炎症细胞浸润明显减少；人参皂苷 Rg1 组小鼠体质量明显增加、结肠质量明显降低、结肠长度明显延长，结肠质量指数及病理评分明显降低，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果提示，人参皂苷 Rg1 可有效治疗 DSS 诱导的小鼠溃疡性结肠炎。

2.2 人参皂苷 Rg1 对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织炎性因子水平的影响 结果见图 2。与正常组比较，模型组小鼠结肠组织中 IL-1 β 、IL-15、IL-17A 表达水平显著升高 ($P < 0.01$)，IL-4 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较，人参皂苷 Rg1 组小鼠结肠组织中 IL-1 β 、IL-15、IL-17A 表达水平明显下降 ($P < 0.01$)，IL-4 表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。结果表明，人参皂苷 Rg1 可有效抑制溃疡性结肠炎小鼠结肠组织中 IL-1 β 、IL-15 及 IL-17A 促炎因子的表达，同时促进 IL-4 抑炎因子的表达。

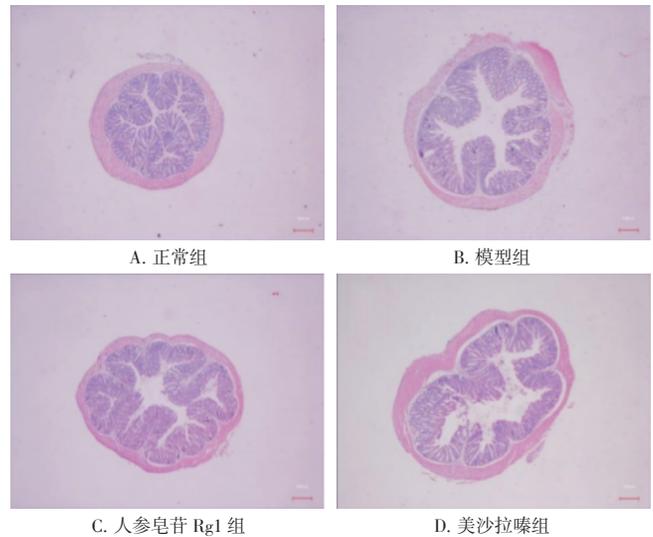


图 1 人参皂苷 Rg1 对溃疡性结肠炎小鼠结肠黏膜组织病理形态的影响(HE 染色, $\times 40$)

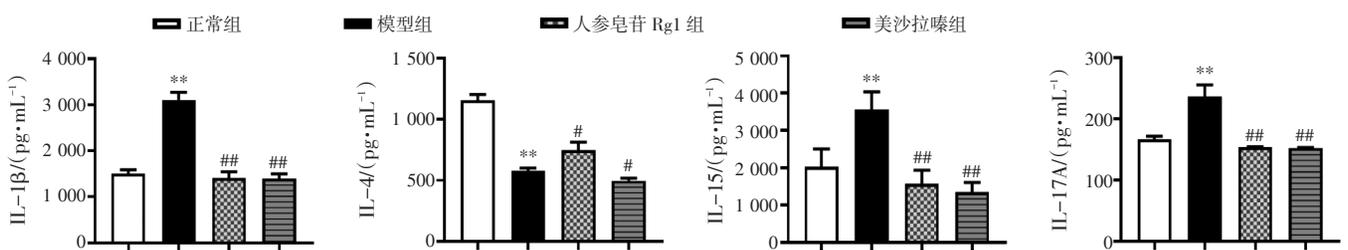
Figure 1 Effect of Ginsenoside Rg1 on the pathological injury of colon in colitis mice(HE staining, $\times 40$)

表 1 人参皂苷 Rg1 对溃疡性结肠炎小鼠体质量、结肠质量、结肠质量指数、结肠长度及病理学评分的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of Ginsenoside Rg1 on body weight, colon weight, index of intestinal weight, colon length and histopathological score in ulcerative colitis mice($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	体质量/g	结肠质量/g	结肠质量指数/%	结肠长度/cm	病理损伤评分/分
正常组	-	19.86 \pm 0.77	0.25 \pm 0.03	1.26 \pm 0.12	9.36 \pm 0.61	2.11 \pm 0.54
模型组	-	17.87 \pm 1.34**	0.31 \pm 0.04**	1.59 \pm 0.13**	8.29 \pm 0.77**	12.78 \pm 0.14**
人参皂苷 Rg1 组	200	19.27 \pm 0.98*	0.26 \pm 0.03*	1.41 \pm 0.21*	9.02 \pm 0.53*	8.22 \pm 0.31*
美沙拉嗪组	300	16.93 \pm 1.27	0.24 \pm 0.04**	1.41 \pm 0.15*	8.01 \pm 0.70	7.89 \pm 0.54*

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



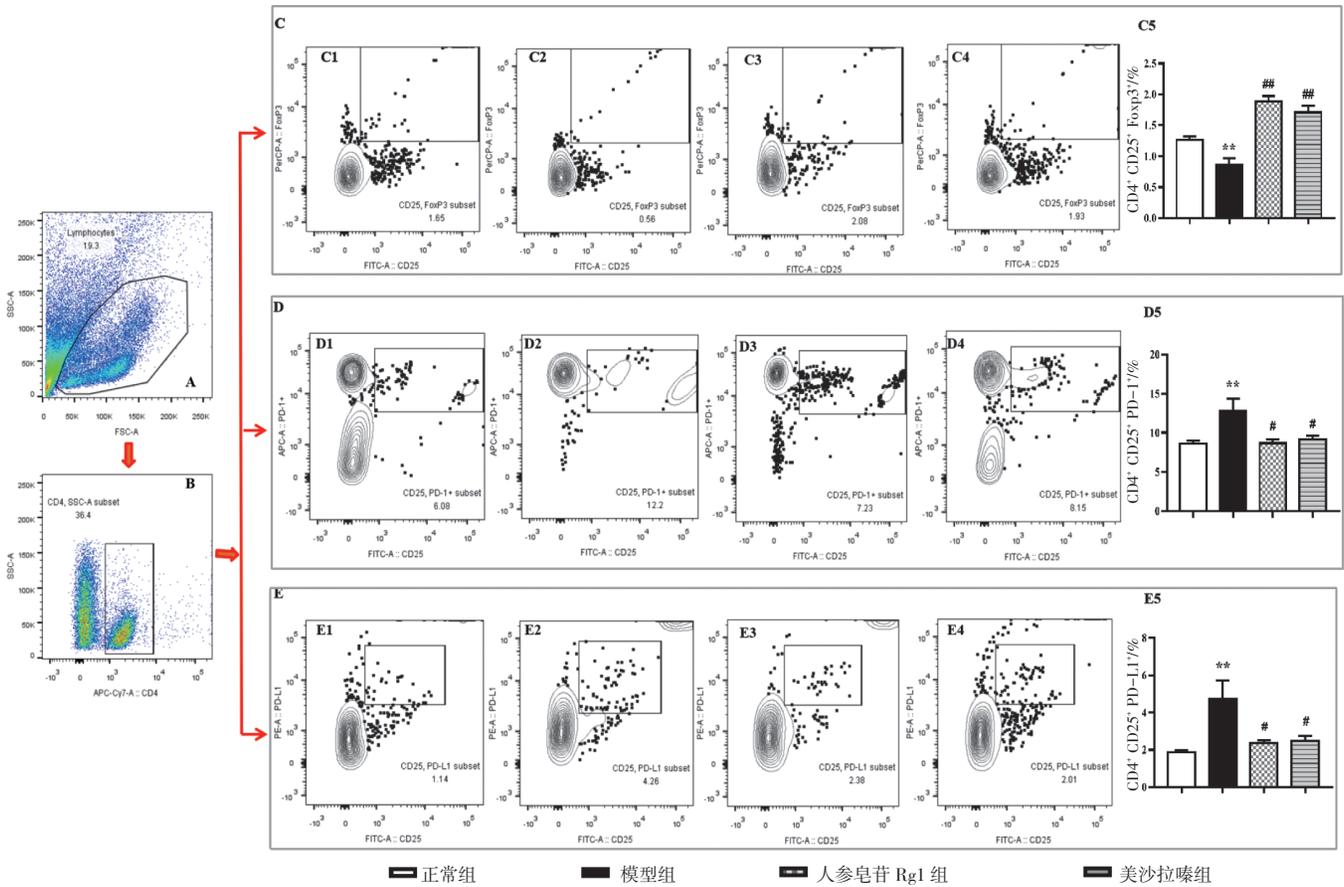
注：与正常组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

图 2 人参皂苷 Rg1 对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织炎性因子水平的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Figure 2 Effect of Ginsenoside Rg1 on inflammatory factors in colonic tissue of mice with ulcerative colitis($\bar{x} \pm s, n=10$)

2.3 人参皂苷 Rg1 对溃疡性结肠炎小鼠 Treg/Th9 细胞亚群的影响 结果见图 3、图 4。与正常组比较，模型组小鼠外周血的 CD4⁺ CD44⁺ Foxp3⁺、CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺、CD4⁺ CD44⁺ IL-10⁺ T 细胞水平均显著降低 ($P < 0.01$)，而 CD4⁺ CD44⁺ IL-9⁺、CD4⁺ CD25⁺ PD-1⁺、CD4⁺ CD25⁺ PD-L1⁺ T 细胞水平显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较，人参皂苷 Rg1 组小鼠外

周血的 CD4⁺ CD44⁺ Foxp3⁺、CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺、CD4⁺ CD44⁺ IL-10⁺ T 细胞水平均显著升高 ($P < 0.01$)，同时 CD4⁺ CD44⁺ IL-9⁺、CD4⁺ CD25⁺ PD-1⁺、CD4⁺ CD25⁺ PD-L1⁺ T 细胞水平均明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。结果表明，人参皂苷 Rg1 对溃疡性结肠炎小鼠外周血的 Treg/Th9 细胞失衡具有调控作用。



注：A. 外周血总淋巴细胞；B. CD4 标记的淋巴细胞；C. CD25、Foxp3 标记的淋巴细胞；D. CD25、PD-1 标记的淋巴细胞；E. CD25、PD-L1 标记的淋巴细胞。C1、D1、E1 为正常组；C2、D2、E2 为模型组；C3、D3、E3 为人参皂苷 Rg1 组；C4、D4、E4 为美沙拉嗪组。与正常组比较，***P*<0.01；与模型组比较，#*P*<0.05，##*P*<0.01

图 3 人参皂苷 Rg1 对溃疡性结肠炎小鼠外周血 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺、CD4⁺ CD25⁺ PD-1⁺ 及 CD4⁺ CD25⁺ PD-L1⁺ T 细胞的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Figure 3 Effects of Ginsenoside Rg1 on CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺、CD4⁺ CD25⁺ PD-1⁺ and CD4⁺ CD25⁺ PD-L1⁺ T cells in peripheral blood of mice with ulcerative colitis($\bar{x} \pm s, n=10$)

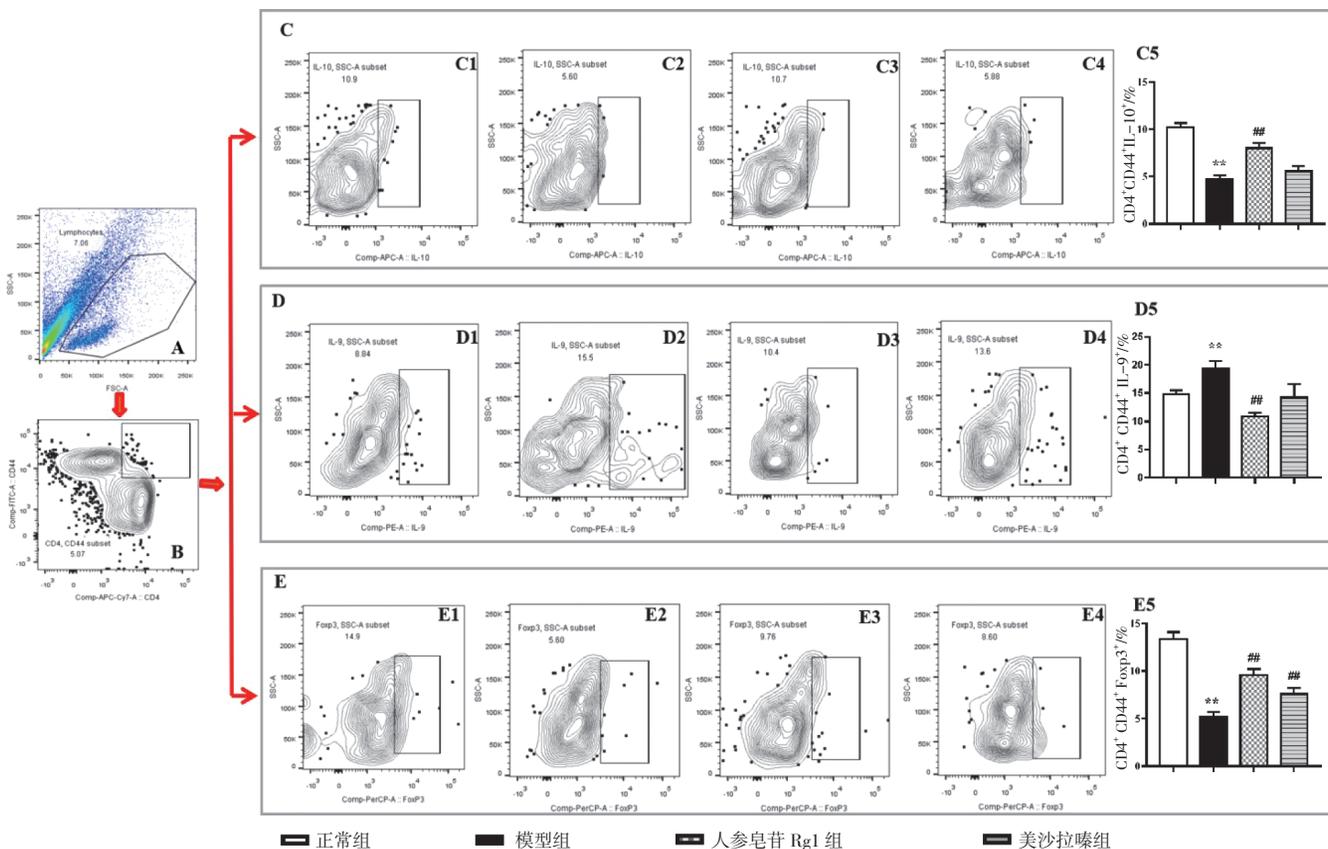
3 讨论

本研究采用 3% 葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导建立溃疡性结肠炎(UC)小鼠模型，结果显示模型小鼠结肠黏膜损伤、炎症细胞浸润、溃疡形成，病理损伤评分明显升高，与以往溃疡性结肠炎动物模型相似^[5]。同时，还观察到模型小鼠外周血 CD4⁺ CD44⁺ Foxp3⁺ 及 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 细胞水平均显著降低，而 CD4⁺ CD44⁺ IL-9⁺ T 细胞水平显著上升，提示 Treg 细胞减少伴 Th9 细胞分化增加。结果表明，DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠模型复制成功，且 Treg/Th9 细胞失衡是其重要特征之一。

Th9 和 Treg 是 2 种具有相反免疫功能的 CD4⁺ T 细胞亚群。有证据^[8]表明，Th9 细胞可在转移性结肠炎模型中诱发炎症。Th9 细胞主要分泌高浓度 IL-9，而 IL-9 可造成肠道正常菌群紊乱，阻止溃疡愈合，

促进炎症进展^[9]，其表达水平与溃疡性结肠炎的炎症反应呈正相关^[10]。Treg 细胞是一类具有维持机体免疫耐受功能的免疫调节细胞。Treg 细胞减少和功能异常引起免疫抑制作用减弱，可引发肠道过度免疫反应，最终导致肠黏膜损伤。研究^[11]表明，给予免疫缺陷小鼠注射不含 CD4⁺ CD25⁺ Treg⁺ 细胞的效应 T 细胞可诱发严重自身免疫性结肠炎，而给予 CD4⁺ CD25⁺ Treg⁺ 细胞后，炎症得到缓解。炎症性肠病(IBD)患者外周血中 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ (Treg) 细胞比例显著低于健康人，且与疾病复发有关^[12]。本研究结果进一步证实 Treg/Th9 细胞分化失衡与 IBD 的发生有关。

Th9 和 Treg 细胞在体内的发育相互关联，在多种因素调控下相互转化。在只有细胞因子 TGF-β 的微环境中，TGF-β 表现为促进转录因子 Foxp3⁺ 的高表达，诱导幼稚的 CD4⁺ T 细胞向 Treg 细胞分化，引



注：A. 外周血总淋巴细胞；B. CD4 标记的淋巴细胞；C. CD44 和 IL-10 标记的淋巴细胞；D. CD44 和 IL-9 标记的淋巴细胞；E. CD44 和 Foxp3 标记的淋巴细胞。C1、D1、E1 为正常组；C2、D2、E2 为模型组；C3、D3、E3 为人参皂苷 Rg1 组；C4、D4、E4 为美沙拉嗪组。与正常组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$

图 4 人参皂苷 Rg1 对溃疡性结肠炎小鼠外周血 CD4⁺ CD44⁺ IL-9⁺、CD4⁺ CD44⁺ IL-10⁺及 CD4⁺ CD44⁺ Foxp3⁺ T 细胞的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Figure 4 Effects of Ginsenoside Rg1 on CD4⁺ CD44⁺ IL-9⁺、CD4⁺ CD44⁺ IL-10⁺ and CD4⁺ CD44⁺ Foxp3⁺ T cells in peripheral blood of mice with ulcerative colitis($\bar{x} \pm s, n=10$)

起 Treg 细胞数量增多或功能增强，诱导具有抗炎作用的细胞因子 IL-4、IL-10、TGF-β 的分泌，从而发挥免疫抑制作用^[13-14]。然而，当炎性微环境中存在细胞因子 TGF-β 和 IL-4 共同存在时，幼稚的 CD4⁺ T 细胞能够向分泌致炎因子 IL-9 的 Th9 细胞分化^[15]，导致 Th9 细胞数量的增多及功能增强，从而导致组织损伤或自身免疫性疾病。溃疡性结肠炎活检组织中 IL-9 水平及 IL-9 mRNA 表达显著增高，并与溃疡性结肠炎严重程度呈正相关^[16-17]。与本研究所建立的小鼠模型相符合。IL-9 可诱导肠上皮细胞分泌炎症介质，抑制细胞增殖，改变肠道黏膜屏障的通透性，损伤屏障作用，阻止黏膜伤口愈合。IL-1β 是固有免疫反应中重要的前炎性因子，能够反映机体的炎症反应情况。有研究^[18]发现，IL-1β 能促进 Th9 细胞分泌高浓度的 IL-9。此外，Th9 细胞对 IL-17 具有促进发育的作用^[19]，而 IL-17 是公认的促炎细胞因子，与

IBD 等多种自身免疫性疾病及慢性炎症性疾病有关^[20]。

程序性细胞死亡蛋白-1(Programmed cell death-1, PD-1)属于免疫球蛋白超家族，是 T 细胞活化的共抑制受体，与程序性细胞死亡配体-1(Programmed cell death-ligand 1, PD-L1)结合后通过 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)传递抑制性信号，从而抑制机体的免疫反应^[21]。有研究^[22]表明，PD-1/PD-L1 信号可通过抑制信号转导与转录激活因子 5(STAT-5)磷酸化负性调节 Treg 细胞的数量，减少 Treg 细胞的增殖。另有研究^[23]指出，在 IBD 患者的肠上皮细胞中发现 PD-L1 的表达量增加，并发现 PD-1 抑制剂对 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的小鼠肠炎有治疗作用。本实验结果与上述研究结果一致，模型组小鼠外周血中 PD-1 及 PD-L1 表达均显著升高，且 Treg 细胞显著减少。人参皂苷 Rg1 组小鼠外周血中 CD4⁺

CD25⁺ Foxp3⁺ T 细胞水平显著上升, CD4⁺ CD25⁺ PD-1⁺、CD4⁺ CD25⁺ PD-L1⁺ T 细胞水平明显降低, 表明人参皂苷 Rg1 可能通过有效提高 Treg 细胞水平改善实验性小鼠的溃疡性结肠炎。有研究^[24]证明, 人参皂苷 Rg1 能够与 PD-1 蛋白发生有效结合, 并能够阻断 PD-L1 与 PD-1 的结合。因此, 人参皂苷 Rg1 可能发挥 PD-1/PD-L1 抑制作用, 通过调节 Treg/Th9 平衡而有效改善实验性小鼠的结肠炎。

综上所述, 人参皂苷 Rg1 能够改善溃疡性结肠炎模型小鼠的体质量、结肠质量、结肠质量指数、结肠长度及病理学评分等一般情况, 还能下调 Th9 细胞水平, 抑制小鼠结肠组织 IL-1 β 、IL-15 及 IL-17A 等促炎因子的表达, 抑制 PD-1/PD-L1 信号, 上调小鼠外周血 Treg 细胞水平, 增加 IL-4 抑炎因子的表达, 从而恢复 Treg/Th9 细胞分化平衡, 对 IBD 具有免疫保护作用。然而, 人参皂苷 Rg1 调节 Treg/Th9 细胞间平衡及其各自细胞分化的具体机制尚不明确, 有待通过基因组学、蛋白组学等技术进一步深入探讨。

参考文献:

- [1] 陈媛, 赵淑珍. Th9细胞在感染性疾病中的作用研究进展[J]. 现代医药卫生, 2020, 36(4): 542-545.
- [2] SUN J, ZHANG L, ZHANG J, et al. Protective effects of ginsenoside Rg1 on splenocytes and thymocytes in an aging rat model induced by dgalactose [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 58, 94-102.
- [3] GAO Y, CHU S, LI J, et al. Anti-inflammatory function of ginsenoside Rg1 on alcoholic hepatitis through glucocorticoid receptor related nuclear factor-kappa B pathway. *J Ethnopharmacol*, 2015, 173: 231-240
- [4] LEE S Y, JEONG J J, EUN S H, et al. Anti-inflammatory effects of ginsenoside Rg1 and its metabolites ginsenoside Rh1 and 20(S)-protopanaxatriol in mice with TNBS-induced colitis[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2015, 762: 333-343
- [5] 刘素萍, 王海燕, 赵海梅, 等. 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[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(3): 301-306.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] HOLMKVIST P, POOL L, HÄGERBRAND K, et al. IL-18R α -deficient CD4⁺ T cells induce intestinal inflammation in the CD45RB (hi) transfer model of colitis despite impaired innate responsiveness [J]. *Eur J Immunol*, 2016, 46(6): 1371-1382.
- [9] GERLACH K, HWANG Y, NIKOLAEV A, et al. Th9 cell that express the transcription factor PU 1 drive T cell-mediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells [J]. *Nat Immunol*, 2014, 15(7): 676-686.
- [10] HUFFORD M M, KAPLAN M H. A gut reaction to IL-9 [J]. *Nat Immunol*, 2014, 15(7): 599-600.
- [11] MOTTET C, UHLIG H H, POWRIE F. Cutting edge: cure of colitis by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells[J]. *J Immunol*, 2003, 170(8): 3939-3943.
- [12] 王轶, 刘雪平, 赵治斌, 等. 外周血CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺调节性T细胞与炎症性肠病疾病活动度的关系[J]. 胃肠病学, 2010, 15(4): 218-221.
- [13] 蒋学佩, 吴小丽, 黄智铭. Treg细胞和Th17细胞在炎症性肠病治疗中的作用[J]. 胃肠病学, 2018, 23(2): 109-112.
- [14] GOODMAN W A, COOPER K D, CORMICK T S. Regulation generation: the suppressive functions of human regulatory T cells[J]. *Crit Rev Immunol*, 2012, 32(1): 65-79.
- [15] KAPLAN M H. The transcription factor network in Th9 cells [J]. *Semin Immunopathol*, 2017, 39(1): 11-20.
- [16] NALLEWEG N, CHIRIAC M T, PODSTAWA E, et al. IL-9 and its receptor are predominantly involved in the pathogenesis of UC[J]. *Gut*, 2015, 64(5): 743-755.
- [17] LEAKE I. IBD. TH9 cells might have a role in the pathogenesis of ulcerative colitis[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014, 11(8): 455.
- [18] VÉGRAN F, BERGER H, BOIDOT R, et al. The transcription factor IRF1 dictates the IL-21 dependent anticancer functions of TH9 cells[J]. *Nat Immunol*, 2014, 15(8): 758-766.
- [19] THOMAS L S, TARGAN S R, TSUDA M, et al. The TNF family member TL1A induces IL-22 secretion in committed human Th17 cells via IL-9 induction[J]. *J Leukoc Biol*, 2017, 101(3): 727-737.
- [20] HUNDORFEAN G, NEURATH M F, MUDTER J. Functional relevance of T helper 17(Th17) cells and the IL-17 cytokine family in inflammatory bowel disease[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2012, 18(1): 180-186.
- [21] OHAEGBULAM K C, ASSAL A, LAZAR-MOLNAR E, et al. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway [J]. *Trends Mol Med*, 2015, 21(1): 24-33.
- [22] XI X, LIU J M, GUO J Y, et al. Correlation of PD-1/PD-L1 signaling pathway with Treg/Th17 imbalance from asthmatic children [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2018, 176(3-4): 255-267.
- [23] 王岱东, 屠鹏飞, 黄亚卓, 等. 人参中PD-1小分子抑制剂的筛选及活性验证[J]. 药学学报, 2020, 55(10): 2428-2434.
- [24] 徐豪明. PD-1抑制剂对TNBS诱导结肠炎小鼠肠道菌群及肠屏障作用的初步研究[D]. 广州: 广州医科大学, 2018.

(编辑: 邹元平)