

# 四神丸挥发油对溃疡性结肠炎小鼠滤泡辅助性 T 细胞亚群的调节作用

王梦雪<sup>1</sup>, 蒋青青<sup>1</sup>, 黄佳琦<sup>1</sup>, 刘端勇<sup>2</sup>, 黄小英<sup>3</sup>, 赵海梅<sup>4</sup>(1. 江西中医药大学研究生院, 江西 南昌 330004; 2. 江西中医药大学科技学院, 江西 南昌 330004; 3. 江西中医药大学/教育部重点实验室, 江西 南昌 330004; 4. 江西中医药大学中医学院, 江西 南昌 330004)

**摘要:** **目的** 探讨四神丸挥发油对溃疡性结肠炎小鼠滤泡辅助性 T 细胞(Tfh)亚群的调节作用。**方法** 将 BABL/c 雄性小鼠随机分为正常组、模型组、四神丸挥发油组(27.71  $\mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、二神丸挥发油组(19.45  $\mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、五味子散挥发油组(8.26  $\mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、美沙拉嗪组(300  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 每组 10 只。采用 3% 葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导溃疡性结肠炎小鼠模型, 以自由饮水的方式持续造模 7 d; 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 10 d。每日称小鼠体质量, 观察其一般症状并计算疾病活动指数(DAI)评分; 测定小鼠结肠长度、质量及结肠质量指数、单位长度结肠质量; 采用 HE 染色法观察结肠组织病理变化; 采用流式细胞术检测外周血 Tfh1、Tfh9、Tfh10、Tfh17、Tfh21 及 Tfr 细胞水平。**结果** 与模型组比较, 四神丸挥发油组及五味子散挥发油组的小鼠体质量明显升高( $P < 0.05$ ), DAI 评分明显下降( $P < 0.05$ ), 结肠长度显著增加( $P < 0.01$ ), 结肠质量、结肠质量指数及单位长度结肠质量明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 结肠组织病理损伤明显改善, Tfh1、Tfh9、Tfh17、Tfh21 细胞比例显著降低( $P < 0.01$ ), Tfh10、Tfr 细胞比例显著升高( $P < 0.01$ )。**结论** 四神丸挥发油能够有效改善溃疡性结肠炎小鼠的症状, 修复结肠黏膜损伤, 可能与其调控 Tfh 细胞亚群间的平衡有关。

**关键词:** 四神丸; 挥发油; 溃疡性结肠炎; 滤泡辅助性 T 细胞; 小鼠

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2022)03-0293-07

**doi:** 10.19378/j.issn.1003-9783.2022.03.003

## Regulatory Effect of Volatile Oil of *Sishen* Pills on Follicular T Cells Subsets in Mice with Ulcerative Colitis

WANG Mengxue<sup>1</sup>, JIANG Qingqing<sup>1</sup>, HUANG Jiaqi<sup>1</sup>, LIU Duanyong<sup>2</sup>, HUANG Xiaoying<sup>3</sup>, ZHAO Haimei<sup>4</sup>(1. Graduate School of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China; 2. Science and Technology College of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China; 3. Key Laboratory of Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China; 4. School of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China)

**Abstract: Objective** To investigate the regulatory effects of volatile oil from *Sishen* Pills on follicular helper T cells (Tfh) subsets in mice with ulcerative colitis (UC). **Methods** BABL/c male mice were randomly divided into normal group, model group, *Sishen* Pills volatile oil group(27.71  $\mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), *Ershen* Pills volatile oil group(19.45  $\mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), *Wuweizi* Powder volatile oil group(8.26  $\mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), and Mesalazine group(300  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 10 mice in each group. The model of UC was induced by 3% dextran sodium sulphate(DSS) and moulded continuously with free access to water for 7 days; From the first day of drinking DSS, each group was administered with the appropriate dose by gavage once daily for 10 days. The body mass of mice was weighed daily, and their general symptoms were observed and the disease activity index (DAI) score was calculated; the length and mass of mice's colon and colon mass index

收稿日期: 2021-06-08

作者简介: 王梦雪, 女, 硕士研究生, 研究方向: 炎症性肠病的中医药治疗与作用机制研究。Email: 937657732@qq.com。通信作者: 赵海梅, 女, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 方剂配伍与免疫药理。Email: haimei79@163.com。黄小英, 女, 副研究员, 硕士研究生导师, 研究方向: 抗炎与中药免疫药理。Email: 8842100@qq.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(20202ACBL206026, 20192ACB20015, 20202ACBL206028, 20181BAB205082); 江西省教育厅科技项目(GJJ196049, GJJ171536, GJJ170733); 江西中医药大学 2021 年国家级大学生创新创业训练计划项目(202110412007)。

were measured; the histopathological changes of colon were observed by HE staining; the levels of peripheral blood Tfh1, Tfh9, Tfh10, Tfh17, Tfh21 and Tfr cells were measured by flow cytometry (FCM). **Results** Compared with the model group, the mice body mass in the *Sishen* Pills volatile oil group and *Wuweizi* Powder volatile oil group was significantly increased ( $P < 0.05$ ), the DAI scores was significantly declined ( $P < 0.05$ ), the colon length was significantly increased ( $P < 0.01$ ), the colon mass, colon mass index and per unit length of colon mass were significantly decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), the histopathological lesion to the colon tissue was significantly improved, and the cell proportions of Tfh1, Tfh9, Tfh17 and Tfh21 were significantly reduced ( $P < 0.01$ ) and the cell proportions of Tfh10 and Tfr were significantly increased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** *Sishen* Pills volatile oil has significant effect in improving the symptoms and repairing injured colonic mucosa in UC mice, which may be related to its regulation of the balance between subpopulations of Tfh cells.

**Keywords:** *Sishen* Pills; volatile oil; ulcerative colitis(UC); follicular helper T cells(Tfh); mice

溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)属于炎症性肠病(Inflammatory bowel disease, IBD),是一种以溃疡为主要特点的慢性、复发性肠道疾病,病因病机复杂。滤泡辅助性T细胞(Follicular helper T cells, Tfh)是一类新型的CD4<sup>+</sup>T细胞亚群,可单独作为一种致病因素参与肠道炎性反应,并且在IBD发病中扮演了重要角色。研究<sup>[1]</sup>表明,通过干预Tfh细胞的水平和功能可有效治疗IBD。四神丸是治疗UC的经典方剂,被广泛应用于UC的临床治疗中<sup>[2]</sup>。四神丸由二神丸(补骨脂、肉豆蔻)和五味子散(五味子、吴茱萸)两方组成,富含挥发油成分,挥发油具有芳香走窜的功效,可快速发挥疗效,直达病所,同时具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、抗菌等多种药理作用<sup>[3]</sup>。故本研究拟从调节Tfh细胞亚群水平的角度出发,探讨四神丸挥发油治疗UC的作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 动物** BALB/c 雄性小鼠 60 只, 9~12 周龄, SPF 级, 体质量(22±2)g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 动物生产许可证号: SCXK(湘)2016-0002。饲养条件: 统一光照时间为 6:00~18:00, 恒温、恒湿, 自由饮水摄食。动物实验严格遵守江西中医药大学实验动物中心动物伦理委员会的要求, 批准号: JZLLSC-20190180。

**1.2 药品及试剂** 补骨脂(批号: 1808005)、肉豆蔻(批号: 1820204)、吴茱萸(批号: 150522)、五味子(批号: 1810006), 均购自江西樟树天齐堂中药饮片有限公司, 由江西中医药大学中药鉴定教研室葛菲教授鉴定符合 2020 年版《中华人民共和国药典》规定; 美沙拉嗪肠溶片, 葵花药业佳木斯鹿灵制药有

限公司, 批号: 200818。葡聚糖硫酸钠(DSS, 分子量: 36 000~50 000), 美国 MP Biomedicals 生物医学公司, 批号: Q5756; 使用蒸馏水配制成 3%(m/V) DSS 溶液。便隐血试剂(批号: BA-2020B), 珠海贝索生物技术有限公司; IL-9-PE(货号: 561463)、FoxP3-PerCP-CY5.5(货号: 563902)、IL-17-APC-Cy7(货号: 560821)、CXCR5-FITC(货号: 560577)、CD4-APC-H7(货号: 560181)、CD4-APC(货号: 553051)荧光抗体, 均购自美国 BD 公司; IL-21-PE(货号: 12-7211-80)荧光抗体, 美国 Invitrogen 公司; RPMI1640 培养基(批号: 31800), 北京索莱宝科技有限公司。

**1.3 主要仪器** Neofuge 13R 型高速冷冻离心机, 上海力申科学仪器有限公司; BX43F 型光学显微镜, 日本奥林巴斯公司; FACS-Canto II 型流式细胞仪, 美国 BD 公司。

**1.4 挥发油提取** 补骨脂挥发油、肉豆蔻挥发油、吴茱萸挥发油、五味子挥发油均由江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室制备, 采用超声辅助水蒸气蒸馏法提取: 称取一定量中药饮片(补骨脂: 肉豆蔻: 五味子: 吴茱萸=4:2:2:1), 视情况粉碎后加入圆底烧瓶中, 加入适量体积的蒸馏水; 连接挥发油提取器、冷凝管等, 自冷凝管上端加入蒸馏水至溢出挥发油提取器支口; 浸泡 1 h 后, 加热至挥发油体积无明显变化, 提取结束。单味药物平均得油率为补骨脂 0.17%、肉豆蔻 3.17%、五味子 1.43%、吴茱萸 0.09%。

**1.5 分组、模型复制及给药** 适应性喂养 3 d 后, 将 60 只小鼠随机分为正常组、模型组、四神丸挥发油组、二神丸挥发油组、五味子散挥发油组及美沙拉

啉组, 每组 10 只。正常组小鼠自由饮用蒸馏水, 其余各组小鼠以自由饮水的方式给予 3% DSS 溶液, 连续 7 d, 构建 UC 小鼠模型<sup>[4]</sup>。自由饮用 DSS 溶液至第 4~5 天出现血便者, 表明模型复制成功。

按人和动物间体表面积折算的小鼠等效剂量确定四神丸每日灌胃剂量为  $2.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 结合挥发油提取浓度计算, 从饮用 DSS 溶液的第 1 天开始, 各给药组按照如下剂量灌胃给药: 四神丸挥发油组给予  $27.71 \mu\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$  四神丸挥发油混悬液, 二神丸挥发油组给予  $19.45 \mu\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$  二神丸挥发油混悬液, 五味子散挥发油组给予  $8.26 \mu\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$  五味子散挥发油混悬液, 美沙拉嗪组给予  $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  美沙拉嗪混悬液; 正常组、模型组小鼠均给予等体积生理盐水, 固定时间段灌胃, 每日 1 次, 共 10 d。

### 1.6 小鼠一般症状观察及疾病活动指数(DAI)评分

每日同一时间观察并记录小鼠体质量变化、精神状态、毛发色泽、粪便性状、便血情况, 并根据 DAI 标准<sup>[5]</sup>对小鼠进行评分。①体质量: 无明显下降, 0 分; 下降 1%~5%, 1 分; 下降 6%~10%, 2 分; 下降 11%~20%, 3 分; 下降超过 20%, 4 分。②粪便黏稠度: 正常粪便, 0 分; 松软便(干性), 2 分; 稀便或腹泻(水样便), 4 分。③便血情况: 无出血, 0 分; 大便潜血阳性, 2 分; 粪便带血, 3 分; 肛门出血, 4 分。DAI 评分=体质量下降分数+粪便黏稠度分数+便血分数。

**1.7 结肠长度、质量及结肠质量指数、单位长度结肠质量测定** 末次给药后小鼠禁食 12 h, 称体质量后, 用 3% 戊巴比妥钠深度麻醉后安乐死。解剖, 分离结肠组织, 将其自然铺展于冰袋上测量结肠长度并拍照; 用预冷的磷酸盐缓冲溶液清洗肠腔后, 以滤纸吸去多余水分, 用电子天平称取结肠质量, 计算: 结肠质量指数(%)=[结肠质量(g)/小鼠体质量(g)] $\times$ 100%; 单位长度结肠质量=结肠质量(g)/结肠长度(cm)。

**1.8 结肠组织病理学观察** 将结肠组织用 4% 多聚甲醛固定后, 放入包埋盒; 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切成厚度为  $4 \mu\text{m}$  的结肠组织切片; 二甲苯脱蜡、梯度水化后进行 HE 染色, 中性树胶封片, 晾干后于光学显微镜下观察小鼠结肠组织病理变化。

**1.9 流式细胞术检测 Tfh 细胞亚群水平** 给药结束后, 次日以戊巴比妥钠深度麻醉小鼠, 采用摘眼球取血法收集外周血(预先加入  $\text{EDTA}_2\text{Na}$  抗凝剂), 取  $100 \mu\text{L}$  抗凝血, 加入  $100 \mu\text{L}$  1640 培养液, 混匀;

按照每  $100 \mu\text{L}$  样品量加入  $0.2 \mu\text{L}$  稀释后的 Cocktail, 混匀后置于  $\text{CO}_2$  培养箱中刺激 2 h; 加入  $1 \text{ mL}$   $1\times$  溶血素, 避光孵育 15 min; 加入  $1 \text{ mL}$  Stain buffer 洗涤, 以  $500\times g$  离心 5 min 后, 弃上清; 加入  $1 \text{ mL}$   $1\times$  Fix/Perm(562574 或 554714),  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  下避光孵育 40~50 min, 混匀细胞; 加入  $1 \text{ mL}$   $1\times$  Perm/Wash 洗涤 2 次,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  下以  $350 \times g$  离心 6 min 后, 弃上清; 加入  $100 \mu\text{L}$  Perm/Wash 重悬; 制备胞内及胞外抗体混合液(放大 10 倍进行稀释), 加入抗体染色, 混匀,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  下避光孵育 40 min; 加入  $1 \text{ mL}$   $1\times$  Perm/Wash 洗涤,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  下以  $350\times g$  离心 6 min 后, 弃上清; 加入  $500 \mu\text{L}$  Stain buffer 混匀, 上机检测。采用 FlowJo 软件分析流式结果。

**1.10 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  $t$  检验; 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

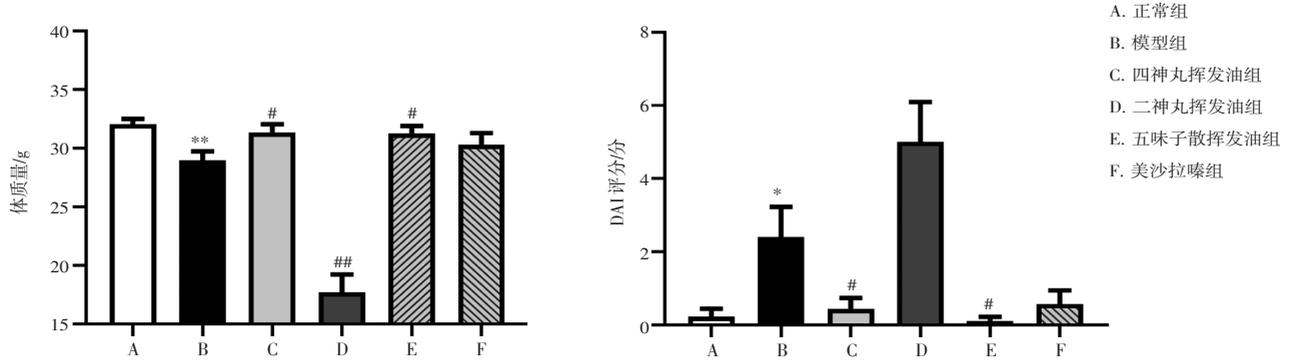
## 2 结果

**2.1 四神丸挥发油对 UC 小鼠一般症状、体质量及 DAI 评分的影响** 结果见图 1。正常组小鼠体质量稳步增长, 精神状态良好, 毛发有光泽, 大便正常, 肛门无出血。与正常组相比, 模型组小鼠体质量显著下降( $P < 0.01$ ), DAI 评分明显升高( $P < 0.05$ ), 精神萎靡, 食欲减退, 毛发暗淡, 出现腹泻、血便。与模型组比较, 四神丸挥发油组及五味子散挥发油组的小鼠体质量明显升高( $P < 0.05$ ), DAI 评分明显下降( $P < 0.05$ ), 小鼠精神状态良好, 食欲有增加, 毛发更有光泽, 腹泻及血便情况好转。结果表明, 四神丸挥发油和五味子散挥发油对 UC 小鼠一般症状、体质量及 DAI 评分的改善效果明显, 且优于美沙拉嗪, 而二神丸挥发油对上述指标无明显改善效果。

**2.2 四神丸挥发油对 UC 小鼠结肠长度、质量及结肠质量指数、单位长度结肠质量的影响** 结果见图 2。与正常组相比, 模型组小鼠结肠长度显著缩短( $P < 0.01$ ), 结肠质量、结肠质量指数及单位长度结肠质量明显升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与模型组比较, 四神丸挥发油组及五味子散挥发油组的小鼠结肠长度显著增加( $P < 0.01$ ), 结肠质量、结肠质量指数及单位长度结肠质量明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结果表明, 四神丸挥发油和五味子散挥发油对小鼠实验性 UC 有一定的治疗作用。

**2.3 四神丸挥发油对 UC 小鼠结肠组织病理变化的影响** 结果见图 3。正常组小鼠结肠黏膜完整, 腺体排列规则, 隐窝结构正常, 未见肠壁增厚, 无溃疡, 无充血、水肿, 无炎性细胞浸润。与正常组相比, 模型组小鼠结肠黏膜受损, 大量的炎性细胞浸

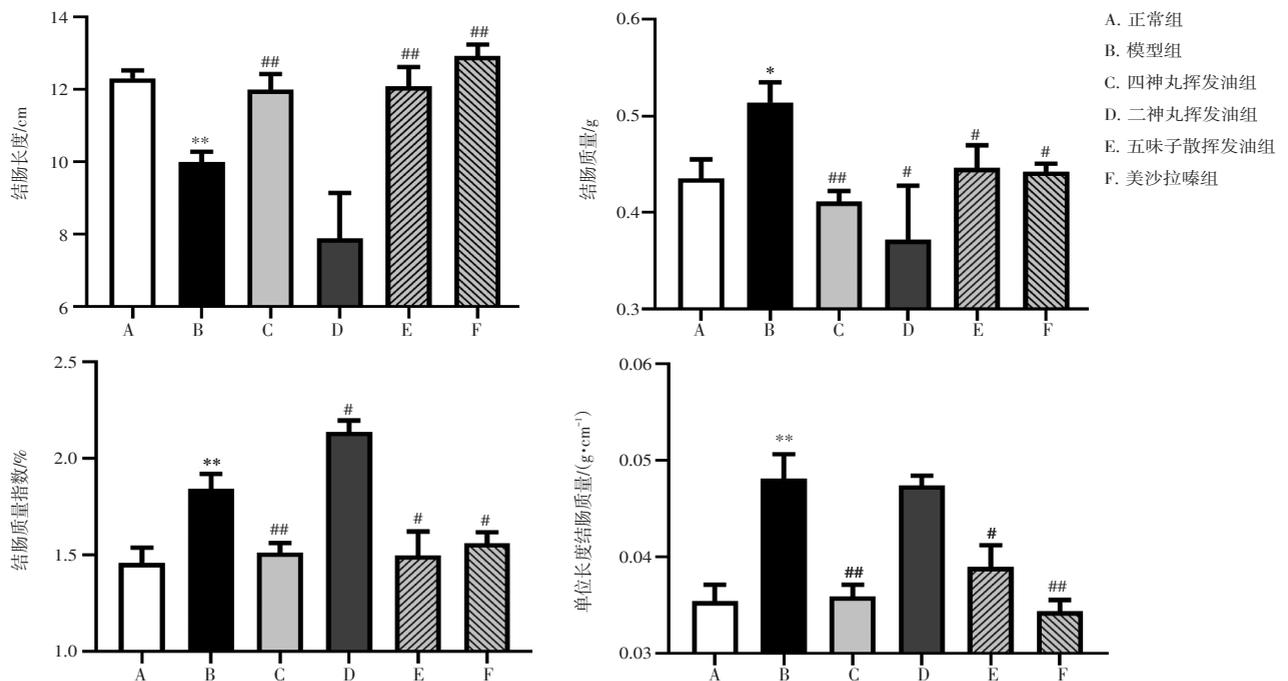
润, 溃疡增多, 腺体排列紊乱, 隐窝结构破坏, 隐窝数量减少, 杯状细胞减少。与模型组比较, 各给药组小鼠的结肠黏膜受损情况有所改善, 炎性细胞浸润减少, 溃疡减少, 腺体排列规则, 隐窝结构恢复, 隐窝数量增加, 杯状细胞明显增多。结果表



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

图 1 四神丸挥发油对溃疡性结肠炎小鼠体质量及疾病活动指数(DAI)评分的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

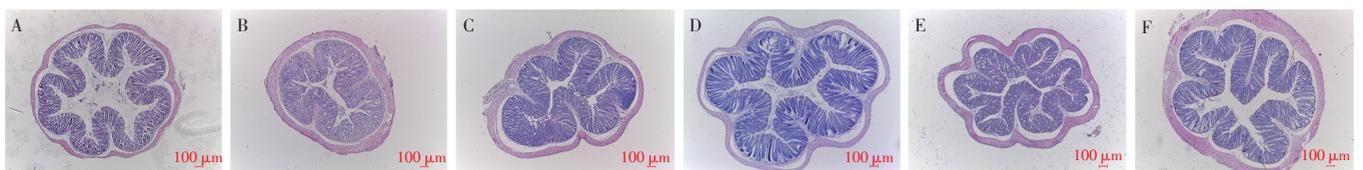
Figure 1 Effects of volatile oil from *Sishen* Pill on the body weight and DAI score of mice with ulcerative colitis( $\bar{x} \pm s, n=10$ )



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

图 2 四神丸挥发油对溃疡性结肠炎小鼠结肠长度、质量及结肠质量指数、单位长度结肠质量的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Figure 2 Effects of volatile oil from *Sishen* Pills on colonic length, colonic weight, colonic weight index and colonic weight/ colonic length of mice with ulcerative colitis( $\bar{x} \pm s, n=10$ )



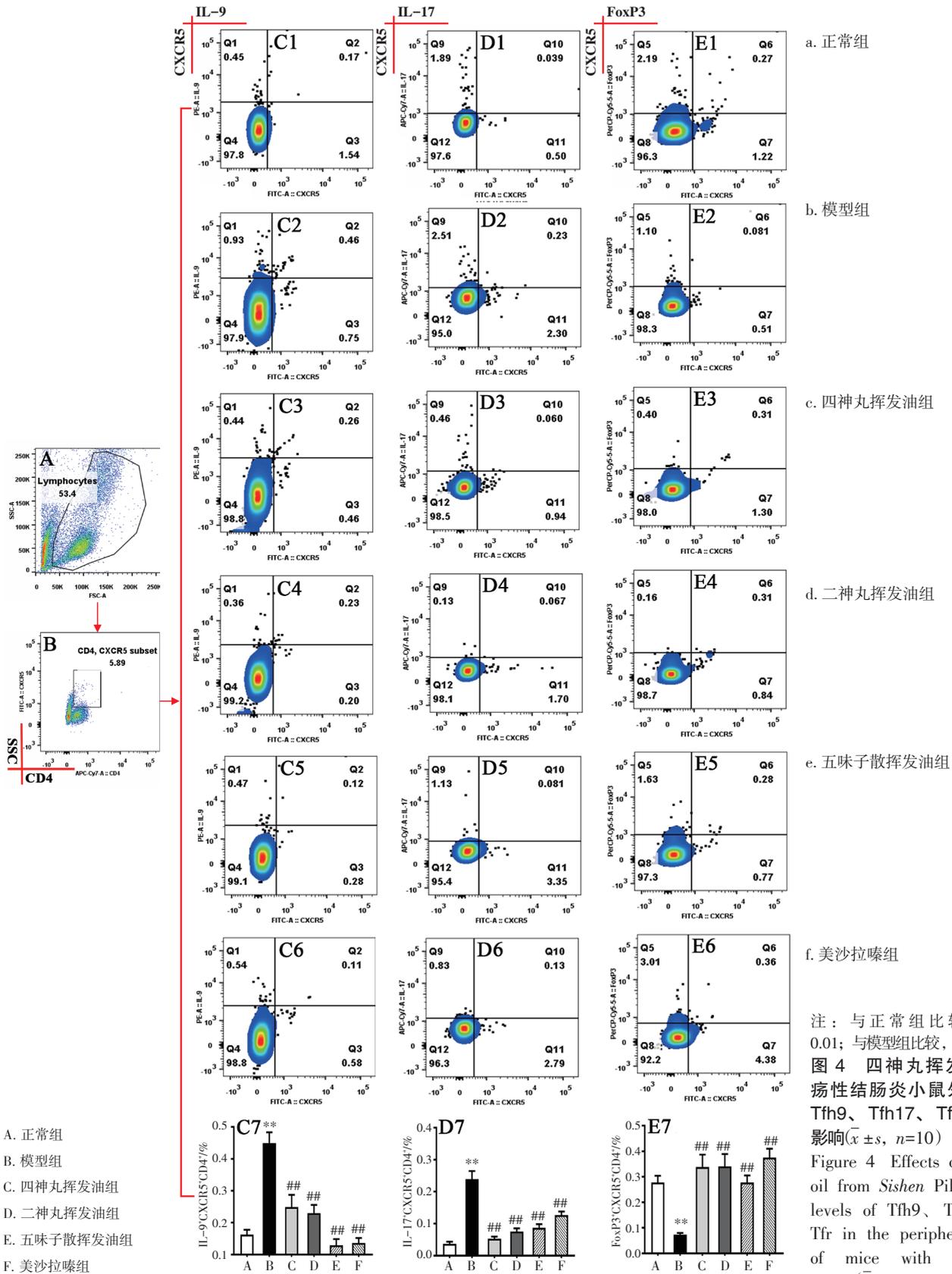
注: A. 正常组; B. 模型组; C. 四神丸挥发油组; D. 二神丸挥发油组; E. 五味子散挥发油组; F. 美沙拉嗪组

图 3 四神丸挥发油对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织病理变化的影响(HE 染色,  $\times 40$ )

Figure 3 Effects of volatile oil from *Sishen* Pills on pathological injury of colon in mice with ulcerative colitis(HE staining,  $\times 40$ )

明, 经四神丸挥发油、二神丸挥发油、五味子散挥发油和 mesalazine 治疗后, 能明显改善 UC 小鼠结肠组织的病理损伤, 减轻炎症浸润, 缓解结肠黏膜损伤。

**2.4 四神丸挥发油对 UC 小鼠 Tfh 细胞亚群的影响**  
结果见图 4、图 5。与正常组比较, 模型组小鼠的 Tfh1、Tfh9、Tfh17、Tfh21 细胞比例显著升高 ( $P <$



a. 正常组

b. 模型组

c. 四神丸挥发油组

d. 二神丸挥发油组

e. 五味子散挥发油组

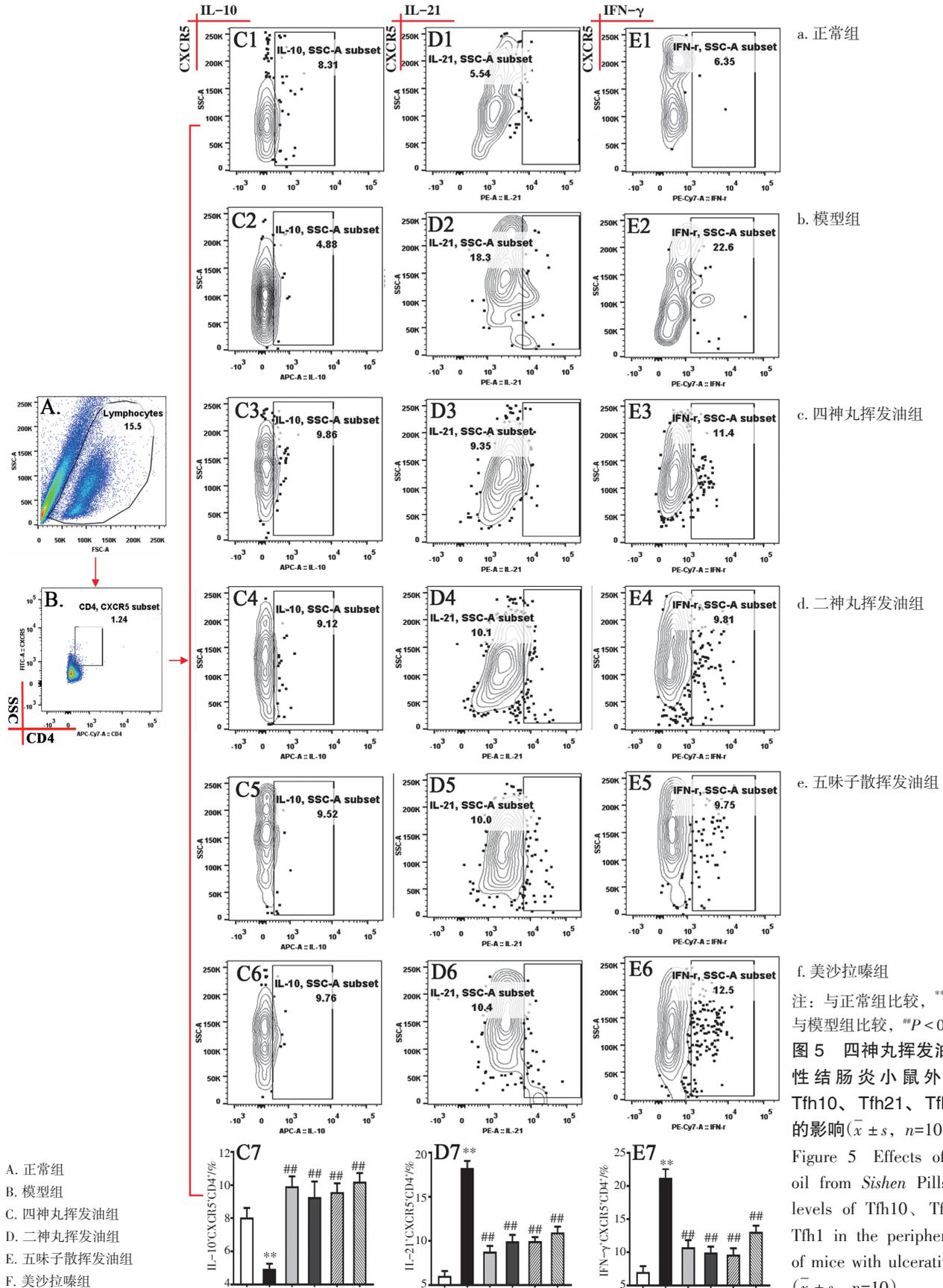
f. 美沙拉嗪组

注: 与正常组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较, ## $P < 0.01$   
 图 4 四神丸挥发油对溃疡性结肠炎小鼠外周血中 Tfh9、Tfh17、Tfr 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Figure 4 Effects of volatile oil from Sishen Pills on the levels of Tfh9、Tfh17 and Tfr in the peripheral blood of mice with ulcerative colitis ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

0.01), Tfh10、Tfr 细胞比例显著降低( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 各给药组小鼠的 Tfh1、Tfh9、Tfh17、Tfh21 细胞比例显著降低( $P < 0.01$ ), Tfh10、Tfr 细胞

比例显著升高( $P < 0.01$ )。结果表明, 四神丸挥发油、二神丸挥发油、五味子散挥发油均能调节 UC 小鼠的 Tfh 细胞亚群的水平, 恢复亚群间的平衡。



### 3 讨论

溃疡性结肠炎(UC)是以溃疡为主要症状的非特异性肠道炎症,好发于结肠或直肠黏膜层和黏膜下层,属于中医学的“肠风”“痢疾”“泄泻”“五更泻”等范畴。由于其病因病机复杂,西医目前尚无满意的治疗药物,而中医药在UC的治疗方面具有独特优势。

四神丸具有温脾补肾、固肠止泻之功,广泛应用于UC的临床治疗。本课题组前期研究表明,四神丸能显著改善UC小鼠的一般情况及DAI评分,减轻组织损伤及炎症浸润,有效改善小鼠实验性结肠炎<sup>[6]</sup>;调节CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞水平及Treg/Th17的平衡<sup>[7]</sup>;降低CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>(Tfh)细胞表面Bcl-6、ICOS、PD-1、PD-L1表达水平,上调Blimp-1表达<sup>[8]</sup>。现代药理研究<sup>[9]</sup>表明,中药挥发油分子量小,脂溶性强,容易透过生物膜,利用度高,吸收效果好,具有抑菌、抗炎、抗病毒、调节胃肠功能、改善微循环、抗过敏等作用。本研究结果证实,DSS诱导的UC小鼠经四神丸挥发油、五味子散挥发油干预后,体质量明显升高,DAI评分明显下降,结肠长度显著增加,结肠质量、结肠质量指数及单位长度结肠质量明显降低,炎性细胞浸润减少,结肠黏膜损伤减轻,且四神丸挥发油效果最佳。《医宗金鉴》记载“二神丸是承制之剂,五味子散是化生之剂也。”二者互用助效,合用建功,合为四神丸,乃制生之剂,制则化生,久泄自愈。但本研究中,二神丸挥发油在疗效评价上并未表现出明显的效果,推测可能与补骨脂和肉豆蔻皆使用生品提取挥发油有关。研究<sup>[10]</sup>表明,肉豆蔻挥发油中含有毒性成分,炮制后挥发油中的止泻成分甲基丁香酚、甲基异丁香酚含量增加,毒性成分肉豆蔻醚、黄樟醚含量降低。

Tfh细胞是一类特殊的CD4<sup>+</sup>辅助性T细胞,能够协助B细胞生成高亲和力抗体,其数量失衡和功能失调可导致多种自身免疫性疾病的发生<sup>[11]</sup>。有研究发现,UC小鼠的外周血和结肠组织中的Tfh细胞数量增加<sup>[12]</sup>;克罗恩病患者的Tfh细胞数量显著高于健康对照组<sup>[13]</sup>,结肠组织中Tfh细胞相关基因产物IL-21、CXCR5、ICOS、PD-1、Bcl-6表达显著上调<sup>[14]</sup>。因此,Tfh细胞与炎症性肠病的发生发展密切相关。本研究结果也表明,四神丸挥发油、二神丸挥发油、五味子散挥发油均能显著升高CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>(Tfh10)、CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>(Tfr)细胞水平,降低CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>(Tfh1)、CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>IL-9<sup>+</sup>(Tfh9)、CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>(Tfh17)、CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>IL-21<sup>+</sup>(Tfh21)细胞水平,可能通过调节Tfh细胞亚群的水平、恢复亚群间的平衡,从而调节免疫反应,缓解

结肠组织损伤,与Liu等<sup>[8]</sup>对四神丸的研究报道一致。

综上所述,四神丸挥发油能够有效改善UC小鼠的症状,修复结肠黏膜损伤,可能与其调控Tfh细胞亚群间的平衡有关。本研究结果丰富了四神丸有效成分治疗炎症性肠病(IBD)的理论依据,为四神丸挥发油的深入研究提供了基础。然而本研究也存在一定局限性,如四神丸中各药物均有一定的毒性,药效剂量与毒性剂量的交叉剂量尚未探讨;并未探究Tfh细胞各亚群的功能,以及各亚群在炎症发病过程中发挥何种作用;未通过体外实验验证四神丸挥发油对Tfh细胞的独特作用。而随着四神丸挥发油作用机制、作用靶点及其有效成分研究的不断深入,四神丸挥发油部分或将成为治疗UC的新途径。

### 参考文献:

- [1] YANG Y, LV X, ZHAN L, et al. Case report: IL-21 and Bcl-6 regulate the proliferation and secretion of tfh and tfr cells in the intestinal germinal center of patients with inflammatory bowel disease[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: e587445.
- [2] 王颀. 四神丸加味治疗溃疡性结肠炎26例[J]. *现代中医药*, 2012, 32(6): 13-14.
- [3] 汪镇朝, 张海燕, 宋远斌, 等. 中药挥发油抗肿瘤作用机制及其研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(24): 219-226.
- [4] WIRTZ S, NEUFERT C, WEIGMANN B, et al. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation[J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(3): 541-546.
- [5] MURTHY S N, COOPER H S, SHIM H, et al. Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin[J]. *Dig Dis Sci*, 1993, 38(9): 1722-1734.
- [6] 王旭丹, 袁学勤, 邱泽计, 等. 四神丸改善TNBS及DSS诱导小鼠实验性结肠炎的研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2014, 37(11): 781-785.
- [7] 刘端勇, 徐荣, 黄敏芳, 等. 四神丸调节结肠炎大鼠PP结Tfh细胞亚群及Treg/Th17间平衡的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(3): 107-111.
- [8] 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: e00589.
- [9] 王雅琪, 杨园珍, 伍振峰, 等. 中药挥发油传统功效与现代研究进展[J]. *中草药*, 2018, 49(2): 455-461.
- [10] 袁子民. 中药肉豆蔻炮制原理研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2006.
- [11] CROTTY S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease[J]. *Immunity*, 2014, 41(4): 529-542.
- [12] 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.
- [13] WANG Z, WANG Z, DIAO Y, et al. Circulating follicular helper T cells in Crohn's disease (CD) and CD-associated colorectal cancer[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(9): 9355-9359.
- [14] ZHANG R, QI C F, HU Y, et al. T follicular helper cells restricted by IRF8 contribute to T cell-mediated inflammation[J]. *J Autoimmun*, 2019, 96: 113-122.

(编辑: 邹元平)