DOI:10.16016/j.1000-5404.201511154

姜黄素通过调节肠道 IEL 亚群缓解 DSS 诱导的小鼠溃疡性结肠炎

蒲爱民,张治草,韩 宾,杨 桦 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院普通外科)

[摘要] **目的** 观察传统中药成分姜黄素对葡聚糖硫酸钠(dextran sulphate sodium,DSS)诱导的小鼠溃疡性结肠炎的炎症状况及 IEL 亚群的影响,探讨姜黄素对治疗溃疡性结肠炎的可能机制。**方法** 选取成年雄性 C57BL/6 小鼠 60 只,按照随机数字表法分为 3 组,每组 20 只,分别为正常组、DSS 组和 DSS+姜黄素组,通过对小鼠疾病活动程度指数(disease activity index, DAI)评分及结肠组织 HE 染色评估炎症状况,应用流式细胞术分析各组结肠 IEL 亚群。**结果** 与正常组对比,DSS 组 DAI 评分明显升高($P<0.01$);结肠黏膜损伤程度明显加重;CD8αα 和 TCRγδ 亚群比例降低($P<0.01$),CD4 亚群比例升高($P<0.05$)。而与 DSS 组比较,DSS+姜黄素组 DAI 评分明显降低($P<0.05$);结肠黏膜损伤程度明显减轻;CD8αα 和 TCRγδ 亚群比例升高($P<0.01$);CD4 亚群比例降低($P<0.05$)。**结论** 姜黄素缓解 DSS 诱导的小鼠溃疡性结肠炎可能通过调节 IEL 亚群变化。

[关键词] 姜黄素;溃疡性结肠炎;肠上皮间淋巴细胞;葡聚糖硫酸钠
[中图法分类号] R282.71; R285.6; R574.62 [文献标志码] A

Curcumin alleviates DSS-induced colonic inflammation by regulating intestinal IEL subsets in mice

Pu Aimin, Zhang Zhicao, Han Bin, Yang Hua (Department of General Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the effect of traditional Chinese medicine component curcumin on intestinal intraepithelial lymphocytes (IEL) subsets and dextran sulfate sodium (DSS)-induced colonic inflammation in ulcerative colitis mice, and investigate the potential therapeutic mechanism of curcumin in inflammatory bowel disease. **Methods** Sixty adult male C57BL/6 mice were randomly divided into 3 groups: normal group, DSS group and curcumin treatment group. Disease activity index (DAI) score and HE staining were used to evaluate the inflammatory conditions. The change of IEL subsets was analyzed by flow cytometry. **Results** Compared with the normal group, the DSS group showed higher DAI score ($P<0.01$), lower proportion of CD8αα subset ($P<0.01$) and TCRγδ subset ($P<0.01$), and higher proportion of CD4 subset ($P<0.05$). Interestingly, the curcumin treatment group showed lower DAI score ($P<0.01$), higher proportion of CD8αα subset ($P<0.01$) and TCRγδ subset ($P<0.01$), and lower proportion of CD4 subset ($P<0.05$) compared with the DSS group. **Conclusion** Curcumin attenuates DSS-induced ulcerative colitis through regulating IEL subsets in the mice.

[**Key words**] curcumin; ulcerative colitis; intestinal intraepithelial lymphocytes; dextran sulfate sodium

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (813300335). Corresponding author: Yang Hua, E-mail:huayang@tmmu.edu.cn

炎症性肠病(inflammatory bowel disease,IBD)是一种特殊的慢性肠道炎症性疾病,包括克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis,UC)。UC 以局限于结肠黏膜及黏膜下层的炎症为特征,并伴随着肠道免疫失衡的一种自身免疫性疾病[1]。目前针对 UC 的治疗主要包含传统的水杨酸制剂及一部分新研发的生物制剂,但传统药物长期服用存在较多毒副作用,且患者依从性差,新研发的药物虽然效果较好毒副作用较小,但是针对我国大多数且需要长期服药的患者而言经济压力大,难以大范围推广。因此,在我国传统中药成分中寻求经济实惠、效果好、毒副作用小的药物来治疗炎症性肠病具有非常重

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(813300335)
[通信作者] 杨 桦,E-mail:huayang@tmmu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160408.1356.001.html(2016-04-08)

要的意义。姜黄素橙黄色结晶粉末,味稍苦,不溶于水,是从姜科、天南星科植物的根茎中提取,含姜黄3%~6%,是植物界中少有含二酮的色素,为二酮类化合物。姜黄素在治疗炎症性肠病的临床报道已确认其疗效[2],但具体机制尚不明确。有研究报道姜黄素可以通过抑制肠道上皮中 STAT3 信号通路改善小鼠炎症性肠病[3],通过调控结肠组织中 P38MAPK 表达缓解 DSS 诱导的小鼠溃疡性结肠炎[4],通过调节肠道微生物菌群缓解炎症反应[5],但目前关于姜黄素对肠道免疫的调节尚不清楚。

肠上皮间淋巴细胞(intestinal intraepithelial lymphocytes,IEL)位于肠上皮细胞基底层内。肠道的 IEL 主要分为两大亚群,一种为诱导型 IEL 或者称为 a 型黏膜 T 细胞,表达 $CD4^+$ 或 $CD8\alpha^+$ 的 TCRαβ;另一群为天然型 IEL 或称 b 型黏膜 T 细胞,主要为 $CD8\alpha\alpha^+$ 或 $CD8\alpha\alpha^-$ 的 TCRγδ 和 TCRαβ,在维持肠道稳态中扮演着重要角色[6-7],比如可以直接对抗侵入肠道的病原菌、预防炎症性肠病的发生和维持肠道功能的完整[8]。本实验室前期的葡聚糖硫酸钠(dextran sulphate sodium, DSS)诱导的小鼠 UC 模型显示 IEL 亚群比例及活化的明显改变[9];在小鼠小肠急性缺血再灌注模型(ischemia reperfusion, IR)下,小肠 IEL 的亚群及功能发生了明显的变化[10];同样在肠道 IR 患者标本中也检测到肠道天然免疫处于一个过分激活的状态[11]。以上研究表明 IEL 细胞的功能和亚群比例失调与肠道炎症的严重程度具有明显的相关性。本实验通过 DSS 诱导小鼠结肠形成的 UC 模型,探讨姜黄素对小鼠 UC 模型中结肠 IEL 亚群的变化的影响,阐述其缓解 UC 的可能机制,以期为姜黄素在治疗炎症性肠病中的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

DSS 购自美国 Biosharp 公司,姜黄素、台盼蓝购自 Sigma 公司(由二甲亚砜溶解),Percoll 淋巴细胞分离液购自美国 Santa Cruz 公司,胎牛血清和 1640 培养基购自美国 Gibco 公司,邻联甲苯胺、乙二胺四乙酸(EDTA)和二硫苏糖醇(DTT)购自武汉博士德生物工程公司,IEL 分离缓冲液(含有 190 mg EDTA,80 mg DTT 1×PBS 液),流式细胞染色缓冲液(含有 1% 胎牛血清、0.1% 叠氮钠的 1×PBS),流式抗体 anti-mouse CD45-percp-cy5.5、anti-mouse CD8α-APC、anti-mouse CD8β-FITC、anti-mouse CD4-PE、anti-mouse TCRβ-APC、anti-mouse TCRγ/δ-FITC 购自美国 BD 公司(由北京达科为生物公司代理),磁力加热搅拌器购自上海江心仪器有限公司。

1.2 实验动物模型构建及分组

60 只 C57BL/6 雄性小鼠,6~8 周龄,体质量(23±2)g,由第三军医大学实验动物中心提供。按随机数字表法分为 3 组($n=20$):正常组(按照动物房的环境正常喂养)、DSS 组(含有 3% DSS 的饮用水喂养 7 d)和 DSS+姜黄素组(喂养 3% DSS 2 d 后,3% DSS+80 mg/mL 姜黄素继续喂养 5 d)。

1.3 方法

1.3.1 小鼠 DAI 评分及结肠组织标本采集 每天观察及记录小鼠的体质量及大便情况,疾病活动程度指数(DAI)=(体质量减轻率分数+粪便性状分数+隐血程度分数)/3[12],见表 1。7 d 后处死小鼠,取结肠组织进行 HE 染色,观察结肠损伤情况。

表 1 DAI 评分标准

计分	体质量下降(%)	粪便性状	便血情况
0	无	正常	阴性
1	1~5		+
2	6~10	半稀便	++
3	11~15		+++
4	>15	稀便	++++

正常大便:成形颗粒样便;半稀便:糊状或半成形不黏肛便;稀便:水样黏肛便

1.3.2 粪便隐血判断 向标本中先滴加邻联甲苯胺,后滴加 2% 过氧化氢,观察是否变为蓝色,如呈蓝色则该标本隐血阳性。

1.3.3 小鼠结肠组织的 IEL 细胞分离 对各实验组小鼠采取 1% 的戊巴比妥钠麻醉后,采用颈椎脱臼术处死,取出各组小鼠结肠(每次 5~6 只小鼠结肠聚集分离 IEL)放入盛满 RPMI1640 的培养皿中,然后纵行剖开结肠洗净肠腔的内容物洗涤重复 3 次直至清洁,用眼科剪将结肠剪碎至每小段 0.5 cm 长,将碎肠段放入事先预热的 IEL 分离缓冲液 60 mL(含 10% 胎牛血清)的烧杯中,在 37 ℃的环境中搅拌 30 min,然后以带有尼龙毛的 20 mL 的注射器过滤掉结肠碎块,经过 5 min 1 500 r/min 离心,留沉淀加入 40% Percoll 15 mL,2 200 r/min 离心 22 min,留沉淀加入 20 mL RPMI1640 培养基,1 500 r/min 离心 5 min 洗涤各管,沉淀即为 IEL 细胞,通过台盼蓝染色观察,分离出的 IEL 存活率超过 95%。

1.3.4 流式细胞术检测 向分离出的 IEL 细胞沉淀中加入流式缓冲液,缓慢吹散细胞沉淀,然后取洁净的 2.0 mL Ep 管数只,加入吹散的细胞悬液,每管 100 μL,编号向细胞悬液加入一定量的流式抗体吹散混匀,避光置于 20 ℃室温孵育 30 min,然后用流式细胞染色缓冲液洗涤每管 3 次,每次洗涤液量为 300 μL,最后将洗净的细胞悬浮在 300 μL 的流式缓冲液中,待上机检测(CD45 阳性为 IEL 设门检测各个细胞亚群),流式细胞仪由第三军医大学新桥医院中心实验

室提供,型号为贝克曼 MoFlo 购自美国贝克曼公司。

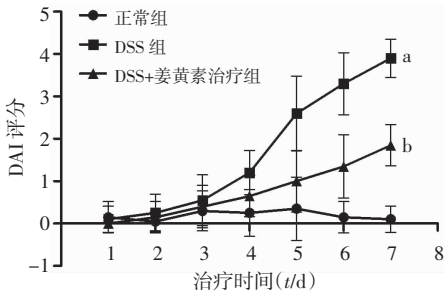
1.4　统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件,不同组别之间的比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha = 0.05$。

2　结果

2.1　小鼠 DAI 评分变化

与正常组比较,DSS 组前 3 d 情况平稳,体质量从第 4 ~ 7 天出现大幅度下降,活动量明显减少,出现稀便、血便等,DAI 评分明显升高($P < 0.01$);DSS + 姜黄素治疗组体质量也相对下降但其趋势较平缓,稀便、血便程度较 DSS 组明显偏轻且 DAI 评分明显低于 DSS 组($P < 0.05$,图 1)。



a:$P < 0.01$,与正常组比较;b:$P < 0.05$,与 DSS 组比较

图 1　各组小鼠的 DAI 评分变化情况

2.2　小鼠结肠黏膜组织学病理改变

正常组小鼠结肠黏膜完整、轮廓清晰,且肠道上皮连续,肠上皮细胞和腺体排列规整,细胞下基质、血管正常;DSS 组结肠黏膜完整性极差、断裂、裂解且分离、水肿明显,肠上皮空泡状的杯状细胞减少,黏膜下基层中出现大量的炎性细胞浸润;DSS + 姜黄素治疗组结肠黏膜尚完整、无断离、裂解、脱离,黏膜下基质浸润的淋巴细胞较少(图 2)。

2.3　小鼠结肠 IEL 亚群 CD8αα 和 CD8αβ 的变化

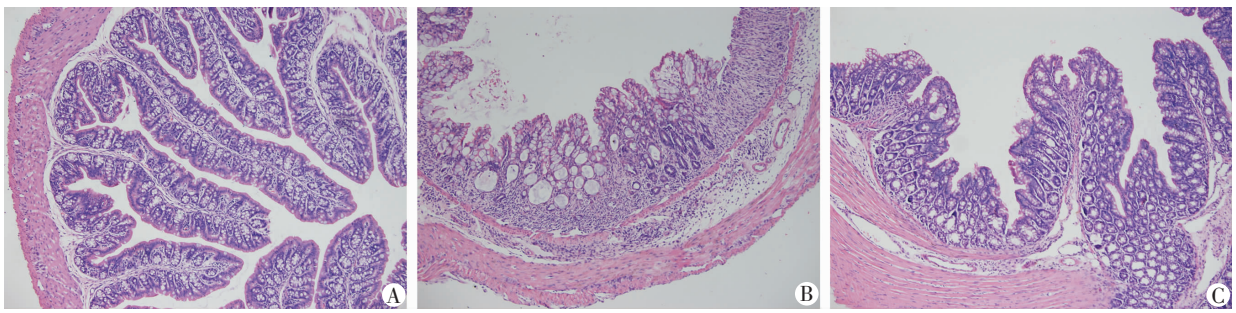
与正常组比较,DSS 组 CD8αα 亚群明显降低($P < 0.01$),CD8αβ 明显升高($P < 0.01$);DSS + 姜黄素治疗组结肠的 CD8αα 亚群比例明显高于 DSS 组($P < 0.01$),CD8αβ 的比例较 DSS 组明显降低($P < 0.01$,图 3、表 2)。

2.4　小鼠结肠 IEL 亚群 CD4 的改变

与正常组对比,DSS 组 $CD4^+$ T 细胞亚群比例明显升高($P < 0.05$);DSS + 姜黄素治疗组的 $CD4^+$ T 细胞亚群低于 DSS 组($P < 0.05$,图 4、表 2)。

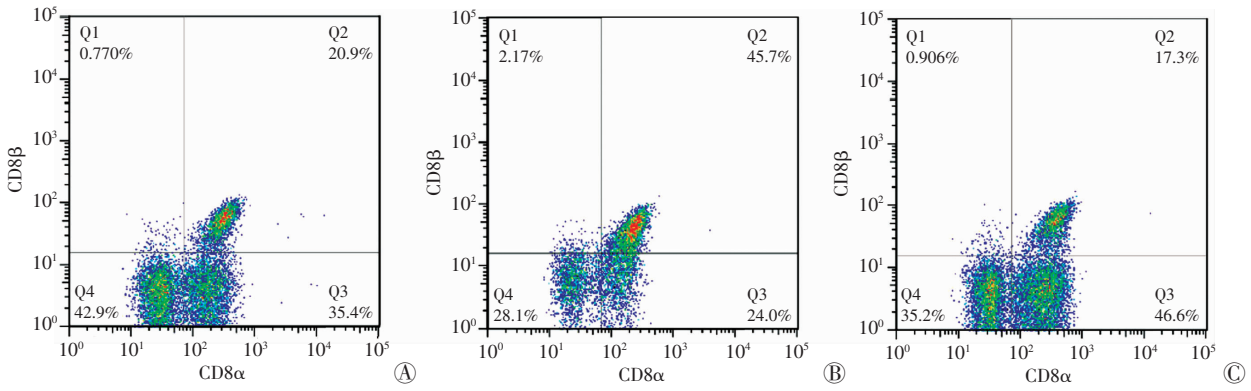
2.5　TCRαβ 和 TCRγδ 细胞亚群变化

与正常组比较,DSS 组的 TCRγδ 亚群比例明显降低($P < 0.01$),而 DSS + 姜黄素治疗组显著高于 DSS 组($P < 0.01$);DSS 组和正常组中 TCRαβ 亚群比例差异无统计学意义($P > 0.05$),而 DSS + 姜黄素治疗组中 TCRαβ 亚群比例较 DSS 组低($P < 0.05$,图 5、表 2)。



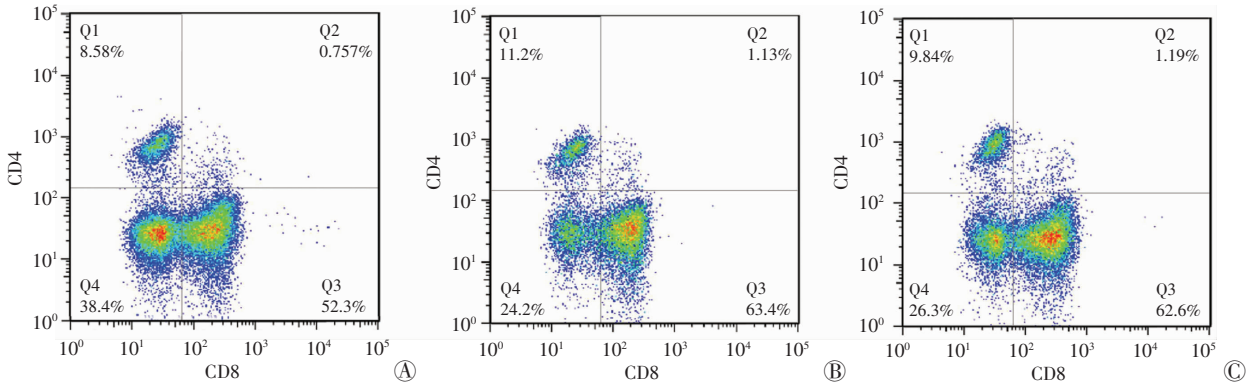
A:正常组;B:DSS 组;C:DSS + 姜黄素治疗组

图 2　各组小鼠结肠组织病理学改变　(HE ×200)



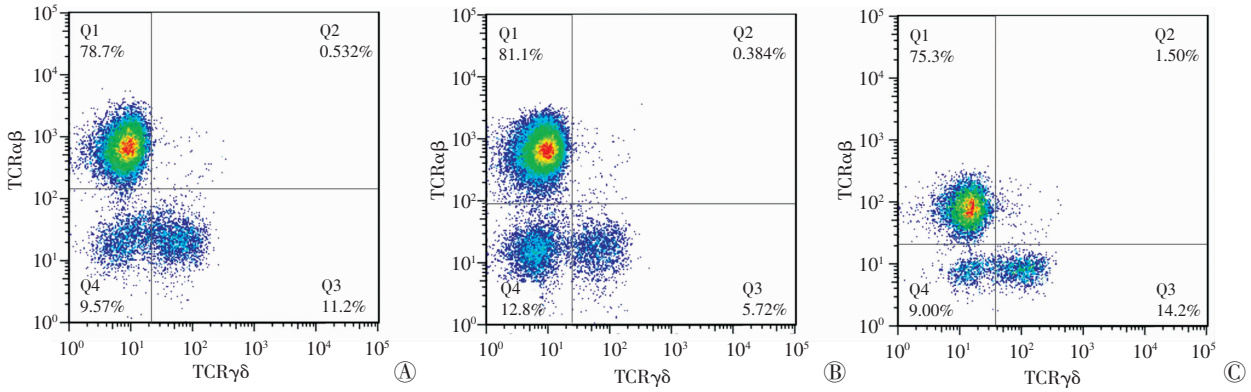
A:正常组;B:DSS 组;C:DSS + 姜黄素治疗组

图 3　流式细胞术检测各组小鼠结肠 IEL 中 CD8 分型



A:正常组;B:DSS 组;C:DSS + 姜黄素治疗组

图 4 流式细胞术检测各组小鼠结肠 IEL 中 CD4 分型



A:正常组;B:DSS 组;C:DSS + 姜黄素治疗组

图 5 流式细胞术检测各组小鼠结肠 IEL 中 TCRγδ 分型

表 2 各组小鼠结肠 IEL 流式细胞分型($n=20$, $\bar{x}\pm s$)

组别	CD8αα	CD8αβ	CD4	TCRαβ	TCRγδ
正常组	37.53 ± 2.30	20.30 ± 1.40	9.14 ± 0.43	78.37 ± 1.57	10.83 ± 1.90
DSS 组	26.73 ± 2.90[a]	45.50 ± 1.70[b]	14.80 ± 2.20[a]	80.94 ± 0.22	5.38 ± 0.43[b]
DSS + 姜黄素治疗组	43.47 ± 2.70[d]	17.67 ± 3.36[d]	10.56 ± 0.86[c]	74.24 ± 2.10[c]	13.73 ± 0.50[d]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与正常组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与 DSS 组比较

3 讨论

UC 主要以腹泻、腹痛、血便伴里急后重为主要临床症状,病变部位主要为结、直肠的黏膜及黏膜下层,且病情迁延不愈。目前 UC 的明确病因尚未详细阐述,但是病理检测和实验模型证明免疫系统的异常表现是造成肠道炎症和组织损伤的重要因素[13]。当前针对 UC 治愈难度大,其病情漫长,有癌变倾向,被全世界公认为现代难治病之一。治疗 UC 的传统药物长期服用副作用较大,近年开发的生物制剂等价格昂贵,不利于广泛运用于临床,因此寻找不良反应小、经济实惠的药物意义重大。

结合 IEL 在肠道炎症中所扮演的重要角色和姜黄素能够缓解相关炎症,本实验通过构建小鼠 DSS 溃疡性结肠炎模型,深入研究了姜黄素对肠道 IEL 亚群的影响。本实验中 DSS + 姜黄素治疗组小鼠的结肠炎症从 DAI 评分、结肠外观、HE 染色三方面观察均得到明显缓解。本实验发现姜黄素对 DSS 诱导的 IEL 变化有显著影响:姜黄素治疗组 CD8αα 和 TCRγδ 细胞亚群明显增高,CD8αβ、CD4 和 TCRαβ 细胞亚群明显减少。CD8αβ 为细胞毒性 T 细胞,其功能为促进炎症破坏。无论是 DSS 诱导的小鼠 UC 模型,还是小鼠小肠 IR 模型,CD8αβ 都显著增加[9-10]。本实验发现姜黄素能够显著地降低该细胞亚群的比例。CD8αα 在炎症中的作用已有报道,发现在脓毒血症的小鼠模型中通过注射外源性的谷氨酸处理后,该细胞分群比例增加,其可以通过产生 IL-10 促进肠上皮的修复[14]。CD4 细胞亚群在大多数炎症相关模型中升高明显[15],

大量研究报道其可以产生诸如 TNF-α、IFN-γ 等炎症介质加速炎症破坏[11]。有趣的是我们通过姜黄素处理,CD4 细胞亚群降低,同时伴随肠道黏膜炎症损伤的改善。TCRγδ 在正常小鼠结肠中占 IEL 的 10% 左右[16],TCRγδ 不仅可以通过直接清除入侵肠屏障的病原体,还可以通过产生 KGF 直接参与肠上皮的更新[17]。在 TCRγδ 细胞敲除老鼠溃疡性结肠炎模型中表现为更严重的结肠破坏并且伴有更高的死亡率[18]。本研究发现姜黄素处理能够使 TCRγδ 维持在一个相对高的比例,使其发挥重要的保护功能。

本实验发现姜黄素对 DSS 诱导的小鼠 UC 有显著的改善作用,并结合肠道的细胞免疫发现了姜黄素对肠道 IEL 的亚群有着明显的调控作用。在 DSS 诱导的溃疡性结肠炎模型中姜黄素主要通过维持 CD8αα 细胞亚群和 TCRγδ IEL 亚群稳定进一步维持肠道黏膜屏障的完整。虽然此研究发现了姜黄素对 IEL 有调节作用但未涉及具体的信号通路研究,接下来我们将通过具体的分子信号来解释姜黄素的调控作用,为其临床应用奠定可靠的基础。

参考文献:

[1] Shih D Q, Targan S R. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(3): 390 – 400. DOI: 10.3748/wjg.14.390

[2] Lang A, Salomon N, Wu J C, *et al*. Curcumin in Combination With Mesalamine Induces Remission in Patients With Mild-to-Moderate Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2015, 13(8): 1444 – 1449. e1. DOI: 10.1016/j.cgh.2015.02.019

[3] Yang J Y, Zhong X, Yum H W, *et al*. Curcumin Inhibits STAT3 Signaling in the Colon of Dextran Sulfate Sodium-treated Mice[J]. J Cancer Prev, 2013, 18(2): 186 – 191. DOI: 10.15430/JCP.2013.18.2.186

[4] 何双艳, 李珏宏, 李昌平, 等. 姜黄素对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠 p38MAPK 表达的影响[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(4): 539 – 541. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2014.04.012

[5] McFadden R M, Larmonier C B, Shehab K W, *et al*. The Role of Curcumin in Modulating Colonic Microbiota During Colitis and Colon Cancer Prevention[J]. Inflamm Bowel Dis, 2015, 21(11): 2483 – 2494. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000522

[6] Qiu Y, Yang Y, Yang H. The unique surface molecules on intestinal intraepithelial lymphocytes: from tethering to recognizing[J]. Dig Dis Sci, 2014, 59(3): 520 – 529. DOI: 10.1007/s10620-013-2933-1

[7] Cheroutre H, Lambolez F, Mucida D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes[J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(7): 445 – 456. DOI: 10.1038/nri3007

[8] Lord J D. Promises and paradoxes of regulatory T cells in inflammatory bowel disease[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(40): 11236 – 11245. DOI: 10.3748/wjg.v21.i40.11236

[9] Ji T, Xu C, Sun L, *et al*. Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Down-Regulates IL-7 and Reduces Inflammation in a Mouse Model of DSS-Induced Colitis[J]. Dig Dis Sci, 2015, 60(7): 1958 – 1966. DOI: 10.1007/s10620-015-3632-x

[10] Qiu Y, Yu M, Yang Y, *et al*. Disturbance of intraepithelial lymphocytes in a murine model of acute intestinal ischemia/reperfusion[J]. J Mol Histol, 2014, 45(2): 217 – 227. DOI: 10.1007/s10735-013-9544-1

[11] Egan C E, Maurer K J, Cohen S B, *et al*. Synergy between intraepithelial lymphocytes and lamina propria T cells drives intestinal inflammation during infection[J]. Mucosal Immunol, 2011, 4(6): 658 – 670. DOI: 10.1038/mi.2011.31

[12] Murthy S, Cooper H S, Yoshitake H, *et al*. Combination therapy of pentoxifylline and TNFalpha monoclonal antibody in dextran sulphate-induced mouse colitis[J]. Aliment Pharmacal Ther, 1999, 13(2): 251 – 260. DOI: 10.1515/pjs-2015-0075

[13] Edelblum K L, Singh G, Odenwald M A, *et al*. γδ Intraepithelial lymphocyte migration limits transepithelial pathogen invasion and systemic disease in mice[J]. Gastroenterology, 2015, 148(7): 1417 – 1426. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.02.053

[14] Tung J N, Lee W Y, Pai M H, *et al*. Glutamine modulates CD8αα(+) TCRαβ(+) intestinal intraepithelial lymphocyte expression in mice with polymicrobial sepsis[J]. Nutrition, 2013, 29(6): 911 – 917. DOI: 10.1016/j, nut.2013.01.001

[15] 乾灿, 王勇, 匡梅, 等. 羌活二黄汤对大鼠佐剂性关节炎的疗效及其机制[J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(3): 307 – 313. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201509066

[16] Chodaczek G, Papanna V, Zal M A, *et al*. Body-barrier surveillance by epidermal γδ TCRs [J]. Nat Immunol, 2012, 13(3): 272 – 282. DOI: 10.1038/ni.2240

[17] Cai Y J, Wang W S, Yang Y, *et al*. Up-regulation of intestinal epithelial cell derived IL-7 expression by keratinocyte growth factor through STAT1/IRF-1, IRF-2 pathway[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e58647. DOI: 10.1371/journal.pone.0058647

[18] Chen Y, Chou K, Fuchs E, *et al*. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial γδ T cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(22): 14338 – 14343. DOI: 10.1073/pnas.212290499

(**收稿**:2015-11-23;**修回**:2016-01-19)

(编辑 龙 亮)