DOI:10.16016/j.2097-0927.202212057

姜酮缓解葡聚糖硫酸钠盐诱导小鼠结肠炎的作用机制研究

李 敬,罗 娅,张晟伟,王 静,胡长江,杨仕明 400037 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院消化内科

[摘要] **目的** 探究姜酮(zingerone, Zin)对葡聚糖硫酸钠盐(dextran sodium sulfate,DSS)诱导小鼠结肠炎的治疗作用及其潜在免疫调节机制。**方法** 将 SPF 级 6~8 周龄 C57BL/6 雄性小鼠分为对照组(Water 组)、模型组(DSS 组)、姜酮干预组(DSS+ Zin 组,20 mg/kg),每组 5 只。利用 DSS 溶液建立急性溃疡性结肠炎模型,比较各组小鼠体质量变化、疾病活动指数(disease activity index, DAI)、结肠长度变化及组织病理学评分。RT-qPCR 和多因子试剂盒检测小鼠结肠组织中炎症因子 mRNA 和蛋白质的表达。流式细胞术检测姜酮对体内外 T 细胞亚群及转录因子 RORγt 表达的影响。双荧光素酶报告基因系统分析姜酮对 RORγt 的转录活性及 Rorc 启动子活性的影响。**结果** 与对照组小鼠比较,DSS 组小鼠结肠长度缩短,DAI 评分及组织病理学评分升高($P<0.05$),*IL-17A*、*IL-21*、*IL-22*、*IL-6*、*IL-1β*、*IFN-γ* mRNA 表达水平上调($P<0.05$),*TGF-β* mRNA 表达水平降低($P<0.05$),IL-17A、IL-17F、IL-22、IFN-γ 蛋白表达增加($P<0.05$);姜酮处理后可显著减轻上述临床症状,并逆转上述炎症因子的表达($P<0.05$)。流式细胞术结果显示:姜酮在体内外均可抑制 Th17 细胞分化及 RORγt 表达、促进 Treg 细胞分化($P<0.05$),但 Th1 亚群的分化不受影响。双荧光素酶基因结果显示姜酮处理后的 RORγt 的转录活性及 Rorc 启动子活性均被显著抑制($P<0.05$)。**结论** 姜酮可通过调 Th17/Treg 细胞平衡,抑制 RORγt 表达,从而发挥治疗小鼠溃疡性结肠炎作用。

[关键词] 姜酮;溃疡性结肠炎;Th17 细胞;Treg 细胞;RORγt;肠道免疫
[中图法分类号] R282.71; R574.62; R967 [文献标志码] A

Mechanism of zingerone alleviating colitis induced by dextran sodium sulfate in mice

LI Jing, LUO Ya, ZHANG Shengwei, WANG Jing, HU Changjiang, YANG Shiming Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Army Medical University(Third Military Medical University), Chongqing, 400037, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the efficacy of zingerone (Zin) on dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis in mice and its potential immunomodulatory mechanism. **Methods** SPF C57BL/6 male mice aged 6 to 8 weeks were divided into control group (Water), model group (DSS), and Zin intervention group (DSS+Zin), with 5 mice in each group. Acute ulcerative colitis model was constructed using DSS solution, and the changes in body weight, disease activity index (DAI), colon length, and histopathological scores were compared among the groups. RT-qPCR and corresponding reagents and kits were employed to detect the mRNA and protein expression of inflammatory cytokines in the colonic tissue, respectively. The effects of Zin on T cell subsets and on the expression of transcription factor RORγt were determined by flow cytometry *in vitro* and *in vivo*. Moreover, the transcriptional activity of RORγt and activity of Rorc promoter were examined using dual-luciferase reporter system. **Results** As compared with the control group, the mice in the DSS group showed shorter colon length, higher scores of DAI and histopathological index ($P<0.05$), with increased mRNA levels of *IL-17A*, *IL-21*, *IL-22*, *IL-6*, IL-1 β and *IFN-γ* ($P<$

[通信作者]杨仕明, E-mail: yangshiming@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

0.05), while decreased mRNA level of *TGF-β* ($P<0.05$). The protein levels of IL-17A, IL-17F, IL-22, and IFN-γ were also upregulated in the DSS group ($P<0.05$). However, Zin treatment significantly relieved the above clinical symptoms and reversed the expression of above inflammatory factors ($P<0.05$). Flow cytometry indicated that Zin inhibited the differentiation of Th17 cells and the expression of RORγt, and promoted the differentiation of Treg cells both *in vitro* and *in vivo* ($P<0.05$), but the differentiation of Th1 subset was not affected. The dual-luciferase reporter assay demonstrated that the transcriptional activity of RORγt and Rorc promoter activity were remarkably suppressed after Zin treatment ($P<0.05$). **Conclusion** Zin alleviates DSS-induced colitis in mice by regulating the balance of Th17/Treg cells and inhibiting RORγt expression.

[**Key words**] zingerone; ulcerative colitis; Th17 cells; Treg cells; RORγt; intestinal immunity

Corresponding author: YANG Shiming, E-mail: yangshiming@tmmu.edu.cn

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种病因尚未明确,由遗传、环境等多种因素共同参与的慢性非特异性肠道炎症性疾病,多累及直肠及远端结肠,病变以黏膜及黏膜下层弥漫性、连续性炎症分布为特征。临床主要表现为腹泻、腹痛、血便和体质量减轻等,病情反复,迁延不愈,与结直肠癌的发生发展有密切关系,严重危害人类健康及生活质量水平[1-2]。目前 UC 的发病机制及病因尚未完全阐明,研究认为,肠道免疫失调、肠道菌群失衡以及环境、遗传因素是导致 UC 发病的主要原因[3]。遗传易感个体暴露于各种危险因素中导致肠道黏膜屏障受损,进而触发肠道免疫细胞的激活[4-6]。在这些异常激活的免疫细胞中,Th17 和 Treg 细胞之间的分化平衡在维持肠道稳态中起着关键作用[7-8]。一般认为,Th17 细胞通过分泌 IL-17、IL-21 和 IL-22 等促炎因子参与炎症反应,而表达叉头盒蛋白 P3 (forkhead box protein P3, Foxp3)为特征的 Treg 细胞则分泌抑制性炎症因子如 TGF-β 抑制自身免疫反应。自 21 世纪初以来,以抗肿瘤坏死因子及免疫抑制剂治疗为主的新兴治疗手段逐渐成熟,但达到临床完全缓解仍有一定困难[9-10]。开发靶向肠道炎症信号通路及免疫调节的新药物,可对溃疡性结肠炎的防治提供新的思路。

姜酮 (zingerone, Zin)是一种从生姜中提取的天然无毒的酚类化合物,具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化的作用[11-13]。已有报道表明姜酮可通过抑制 NF-kB 活性和 IL-1β 信号通路改善三硝基苯磺酸(trinitro-benzene-sulfonic acid, TNBS)诱导的结肠炎[14],且最新研究发现姜酮可通过 T 细胞介导的免疫反应在乳腺癌中发挥抗癌活性[15],但是关于姜酮在肠道炎症 T 细胞免疫调节方面的作用尚未报道。本研究通过构建 DSS 诱导的急性结肠炎模型,观察姜酮对结肠炎小鼠的疗效,并分别在体内和体外分析姜酮对 CD4+ T 细胞亚群的影响,初步探讨姜酮治疗 UC 的免疫调节机制。

1 材料与方法

1.1 材料

15 只 6~8 周龄 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠,体质量为 22~25 g,购自陆军军医大学第二附属医院实验动物中心,实验前适应性饲养 1 周。实验按照陆军军医大学动物伦理要求进行(AMUWEC20226158)。

主要试剂:DSS 购自阿拉丁公司;RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司;马血清购自 Hyclone 公司;HEK 293T 细胞由本实验室保存, PrimeScriPt RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)、TB Green Premix *Ex Taq* Ⅱ(Tli RNaseH Plus)购自日本 Takara 公司;引物由上海生工合成;TRIzol RNA 提取试剂、eBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set 购自美国 Invitrogen 公司;姜酮购自 MCE 公司中国代理;豆蔻酰佛波醇乙酯(Phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA)、离子霉素(ionomycin)购自 Abcam 公司;anti-mouse CD3ε Antibody、anti-mouse CD28 Antibody、anti-mouse IL-12/IL-23 P40 Antibody、anti-mouse IFN-γ Antibody、Th17 多因子检测试剂盒选自美国 Biolegend 公司;Naive CD4+ T 细胞分离试剂盒购自 Miltenyi 公司;Ⅳ型胶原酶选自美国 Worthingdon;DNase I 购自 Roche 公司;Percoll 淋巴细胞分离液购自 Cytiva;流式抗体 anti-mouse CD45-PerCp、anti-mouse CD3-BV510、anti-mouse CD4-PB、anti-mouse IL-17A-FITC、anti-mouse IFN-γ-PE-Cy7、anti-mouse Foxp3-APC、anti-mouse CD25-PE-Cy7、anti-mouse CD4-PerCp 购自美国 Biolegend 公司;anti-mouse RORγt-PE 购自 BD 公司;pGL4.35 (luc2P/9XGAL4 UAS/Hygro)载体、PR-TK 载体、双荧光素酶(Dual-Luciferase)检测试剂盒均购自 Promega 公司;RORγ 79~518 pFN26A (BIND) hRluc-neo 质粒、pGL4-mRORc-promoter (-2206~+138) 质粒购自长沙优宝公司。

1.2　方法

1.2.1　药物溶液的配制　　对于动物实验,取 80 mg 姜酮粉末(分子量为 194.23)溶于 1 mL DMSO 溶液制备成 80 mg/mL 的储备液,该储备液用无菌 PBS 按照 1∶19 的体积稀释为 4 mg/mL 的工作液,每只小鼠每次尾静脉注射 100 μL 工作液(每只小鼠体积按 20 g 计算),使得每只小鼠的最终给药剂量为 20 mg/kg;对于细胞实验,取 194.23 mg 药物溶于 1 mL DMSO 溶液制备成 1 mol/L 的储备液,根据细胞实验所需的药物浓度用培养基稀释成合适的工作浓度。

1.2.2　UC 小鼠模型的建立与分组　　将 6~8 周龄的 SPF 级雄性老鼠按随机数字分为对照组(Water 组)、模型组(DSS 组)、姜酮干预组(DSS + Zin 组,20 mg/kg)。除对照组外各组小鼠自由饮用一定浓度的 DSS 溶液 7 d。造模第一天起即对姜酮干预组用姜酮处理,给药方法采取尾静脉注射的方式进行,具体喂养方法见图 1。

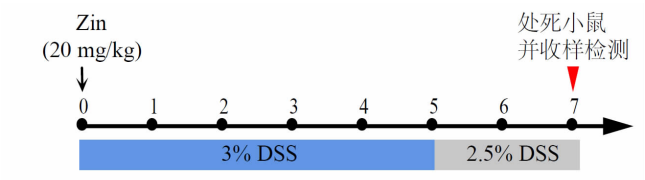


图 1　DSS 诱导结肠炎小鼠模型的建模方法

1.2.3　疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分　　自造模起,每日记录各组小鼠的体质量,观察并记录小鼠的粪便性状及大便隐血情况,根据参考文献进行评分[16]。

1.2.4　结肠长度测量、HE 染色及 HPS 评分　　造模完成后,对各组小鼠采用颈椎脱臼术处死。取各组小鼠结肠组织测量其长度后,去除盲肠,随后将结肠组织沿肠系膜纵行剪开,用预冷的 PBS 冲洗肠腔,迅速吸干水分,展平肠腔裹成瑞士卷,10%的中性福尔马林浸泡 24 h 后送病理切片,切片 HE 染色后由病理科专业人员参考文献进行盲法阅片[16]。

1.2.5　RT-qPCR 检测结肠组织炎症因子 mRNA 的表达水平　　取近端结肠组织 2 cm 于盛有 1 mL TRIzol 的研磨管中,用匀浆机充分研磨结肠组织,采用氯仿-异丙醇方法提取结肠组织总 RNA。根据逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA,然后采用实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)技术对 cDNA 进行定量检测。所有反应均以 β-肌动蛋白(*β-catenin*)为内源性对照,并使用 ΔΔCT 方法归一化到实验对照组。所用引物序列见表 1。

表 1　RT-qPCR 引物(mRNA)

引物名称		引物序列(5′→3′)
IL-17A	上游	TTCACTTTCAGGGICGAGA
	下游	GGGGTTTCTTAGGGGICA
IL-21	上游	TGAAGTGAGAACCAGACCAA
	下游	CCCAAGAAGATGACTACCAGA
IL-22	上游	ATCTCTGATGGCTGICCTG
	下游	GTATGGCTGCTGGAAGTTG
IL-1β	上游	AGTTGACGGACCCCAAA
	下游	TCTTGTTGATGIGCTGCTG
IL-6	上游	ACAGAAGGAGTGGCTAAGGA
	下游	AGGCATAACGCACTAGGTTT
IFN-γ	上游	ACTGGCAAAAGGATGGTG
	下游	GTTGCTGATGGCCTGATT
TGF-β	上游	TGGGGACTICTIGGCACT
	下游	ATAGGGGCGTCTGAGGAAC

1.2.6　多因子试剂盒检测小鼠结肠组织中相关细胞因子的含量　　造模结束后处死小鼠,取各组小鼠结肠组织称重,按 100 mg 结肠组织加入 200 μL EBC 裂解液,随后使用高通量研磨仪进行匀浆。匀浆完毕后取上清液,按照 Th17 多因子检测试剂盒厂家说明进行样本收集,所得样本最后用流式细胞术检测。

1.2.7　T 细胞的体外培养　　根据 Miltenyi 公司的小鼠 Naive CD4+ T 细胞分离试剂盒说明书,从 4 周龄的 C57BL/6 小鼠的脾脏和外周淋巴结中分离富集得到初始 CD4+ T 细胞,铺板于预先用 anti-CD3,anti-CD28 抗体包板的 48 孔板中,每孔 40 万个细胞。所有细胞在含 5% CO_2 的 37 ℃加湿培养箱中培养,对于不同的 T 细胞亚群用不同的诱导方案进行极化培养[17]。细胞极化 24 h 后加入不同浓度(0、0.062 5、0.125、0.25 mmol/L)的姜酮处理,继续培养 3 d,后续用于流式抗体染色并检测细胞因子和核内因子的表达。

1.2.8　小鼠结肠组织固有层单核细胞的分离　　收集模型组和姜酮干预组小鼠的结肠组织,纵向剪开结肠,用预冷的 PBS 冲洗干净后,加入预消化溶液(含有 5%胎牛血清、1 mmol/L DTT、5 mmol/L EDTA 的 HBSS 溶液),37 ℃连续涡旋震荡 20 min 以去除上皮细胞。再用消化液(含 10%胎牛血清、1 mg/mL Ⅳ型胶原酶、0.1 mg/mL DNase I 的 HBSS 溶液)在 37 ℃振荡器上涡旋震荡 30 min 得到固有层单个核细胞。离心后的细胞沉淀用 40%~70% Percoll 重悬,根据密度梯度离心得到淋巴细胞,后续用于流式抗体染色并检测相关细胞因子和核内因子的表达。

1.2.9　流式细胞术　　收获得到的淋巴细胞先用 PMA、Ionomycin 刺激 4 h,再用 Fixable Viability Dye eFluor©死活染料排除死细胞后用相应的细胞表面抗

体进行染色。对于核内因子的检测,使用 Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set 试剂盒固定、破膜细胞,最后用相应流式抗体染核内细胞因子。每次染色条件为 4 ℃避光孵育 30 min,PBS 液洗涤 2 次,2 000 r/min,离心 2 min;弃上清弹匀细胞后,加入 300 μL PBS 重悬细胞,上流式细胞仪检测。

1.2.10 细胞培养及质粒转染 293T 细胞在 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、10 mg/L 链霉素)中培养,培养条件:相对饱和湿度、37 ℃、5% CO_2 恒温培养箱中培养,细胞密度融合至 80%时进行传代。将鼠源性的 RORγ 79~518 氨基酸对应的 cDNA 序列克隆在 pFN26A (BIND) hRluc-neo 载体上,将构建的重组质粒命名为 RORγ 79~518 pFN26A (BIND) hRluc-neo。取对数期生长的 293T 细胞,胰酶消化后按照 1.0×10^5 个/孔的细胞数量种植在 6 孔板中,待细胞密度达到约 40%时,分别进行以下转染:20 ng RORγ 79~518 pFN26A (BIND) hRluc-neo 质粒和 980 ng pGL4.35 (luc2P/9XGAL4 UAS/Hygro)载体共转染 293T 细胞以检测嵌合 GAL4-RORγt 的荧光素酶活性;pGL4-mRORc-promoter (−2 206~+138) 质粒与海肾荧光素酶(renilla luciferase,R-Luc)报告基因质粒共转染 293T 细胞以检测 Rorc 的启动子活性。

1.2.11 双荧光素酶报告基因检测 按照双荧光素酶(luciferase)报告试剂盒说明书,6 孔板每孔用 100 μL 细胞裂解液裂解蛋白,充分裂解后,14 000×*g* 离心 5 min,吸取 20 μL 上清液至避光的 96 孔板中,每组设置三个复孔,各孔中依次加入酶作用底物,于荧光计数仪上测定萤火虫荧光素酶(firefly luciferase,F-Luc)的活性。

1.3 统计学方法

实验数据采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行统计学处理,数据以 $\bar{x}\pm se$ 表示,两组间差异用非配对 Student's *t* 检验分析,3 组以上实验采用单因素方差分析,$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

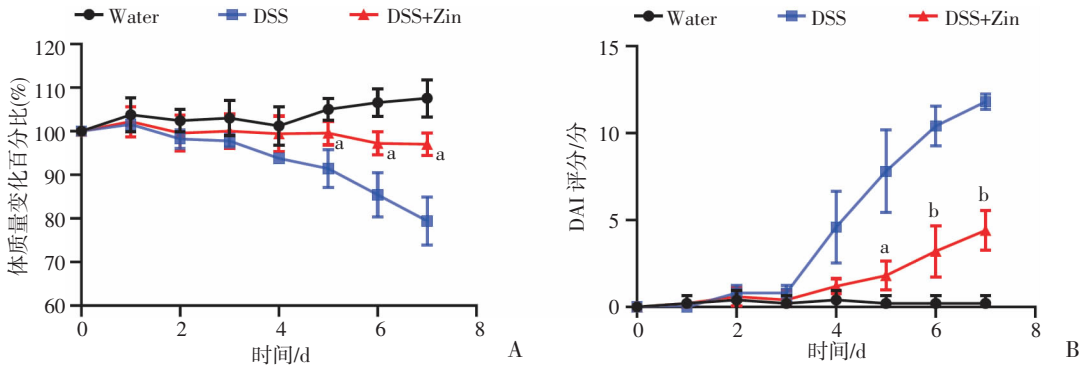
2.1 小鼠的临床症状及组织病理学改变

与对照组相比,DSS 组小鼠在 DSS 喂养第 4 天开始出现活动减少、精神萎靡、腹泻、肛门处肉眼可见血便,体重下降(图 2A)、DAI 评分增高(图 2B),且结肠长度明显缩短(图 2C);经姜酮干预后,小鼠上述临床症状减轻,体重较 DSS 组下降缓慢($P<0.05$,图 2A),DAI 评分下降($P<0.05$,图 2B)、结肠长度有一定增加,差异有统计学意义($P<0.001$,图 2C~D)。

光镜下见:对照组小鼠的结肠黏膜上皮连续完整,腺体排列规则,隐窝均匀分布,黏膜下血管清晰可见,少见炎性细胞浸润及肌肉增厚。DSS 组小鼠可见黏膜上皮结构破坏,腺体紊乱,隐窝缺失,黏膜有水肿、充血、溃疡,黏膜及黏膜下层可见大量炎性细胞浸润,杯状细胞减少,黏膜肌层有不同程度增厚。姜酮干预后小鼠结肠黏膜相对完整,腺体基本规则,充血水肿较轻,炎性浸润较 DSS 组减轻(图 2E),其组织病理学评分低于 DSS 组($P<0.001$,图 2F)。

2.2 小鼠结肠组织中炎症因子 mRNA 水平的变化

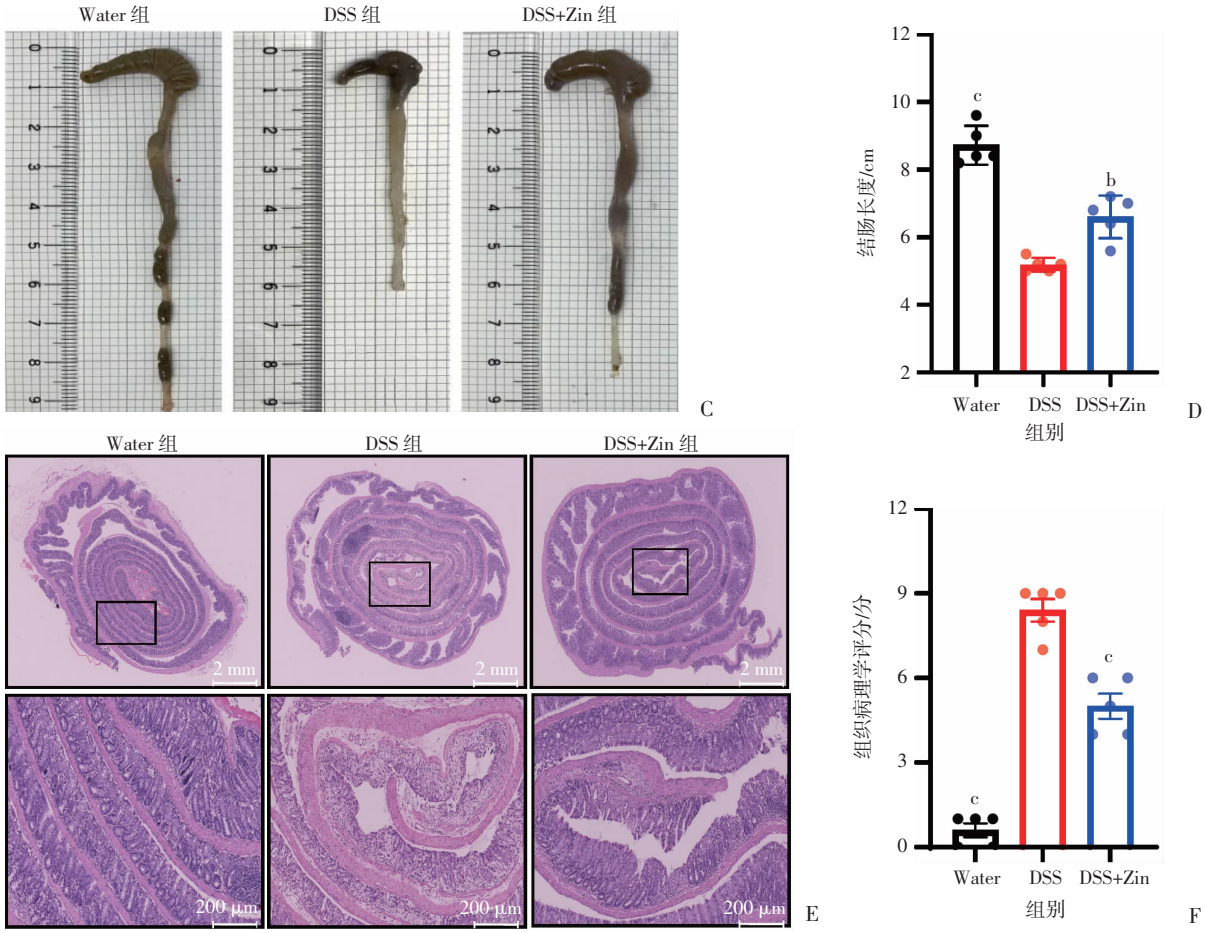
DSS 组小鼠结肠组织中的 *IL-17A*、*IL-21*、*IL-22*、*IL-6*、*IL-1β*、*IFN-γ* 促炎因子的 mRNA 水平均较对照组明显升高,有显著性差异,而抑炎因子 *TGF-β* 的 mRNA 水平降低($P<0.001$,图 3)。经姜酮干预后,上述促炎因子的 mRNA 的表达水平有明显下调,*TGF-β* 的 mRNA 水平呈上升趋势,差异均有统计学意义($P<0.05$,图 3)。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$,与 DSS 组比较 A:小鼠体质量变化统计图;B:DAI 评分统计图

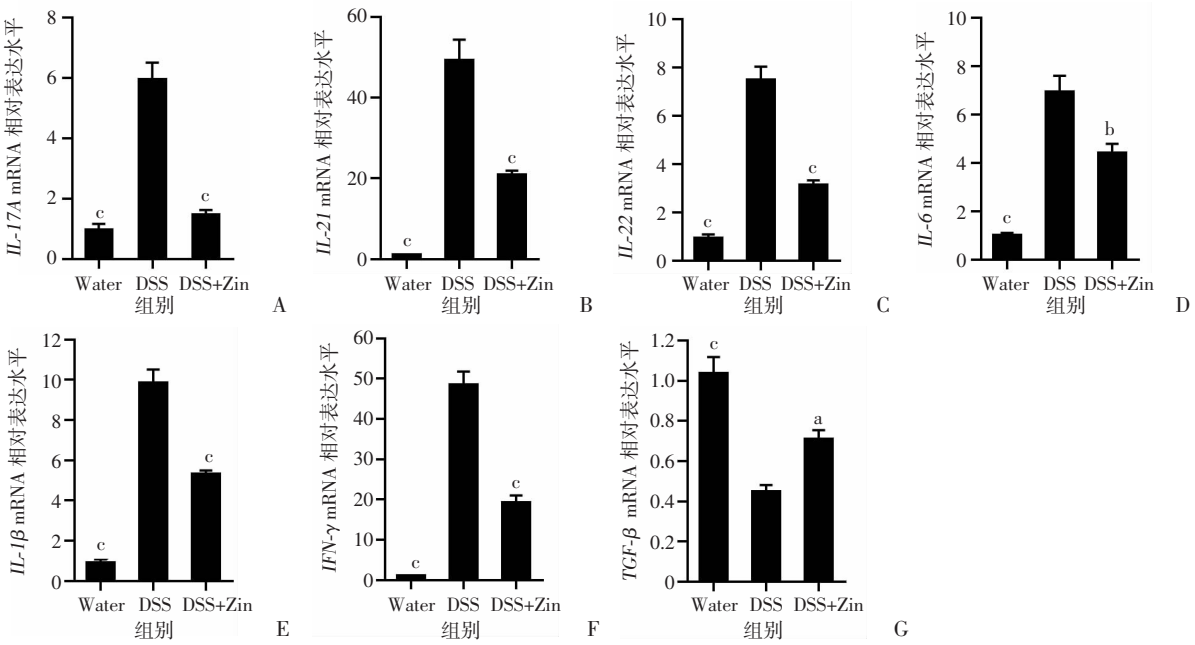
图 2 DSS 诱导前后临床症状及组织病理学比较 ($n=5$,$\bar{x}\pm se$)

(图 2C、D、E、F 续下页)



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$,与 DSS 组比较　C:DSS 诱导前后各组小鼠结肠长度代表图;D:结肠长度统计图;E:各组小鼠结肠组织 HE 代表图;F:结肠组织病理学评分统计图

续图 2　DSS 诱导前后临床症状及组织病理学比较　($n=5,\bar{x}\pm se$)



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$,与 DSS 组比较　A:*IL-17A* mRNA;B:*IL-21* mRNA;C:*IL-22* mRNA;D:*IL-6* mRNA;E:*IL-1β* mRNA;F:*IFN-γ* mRNA;G:*TGF-β* mRNA

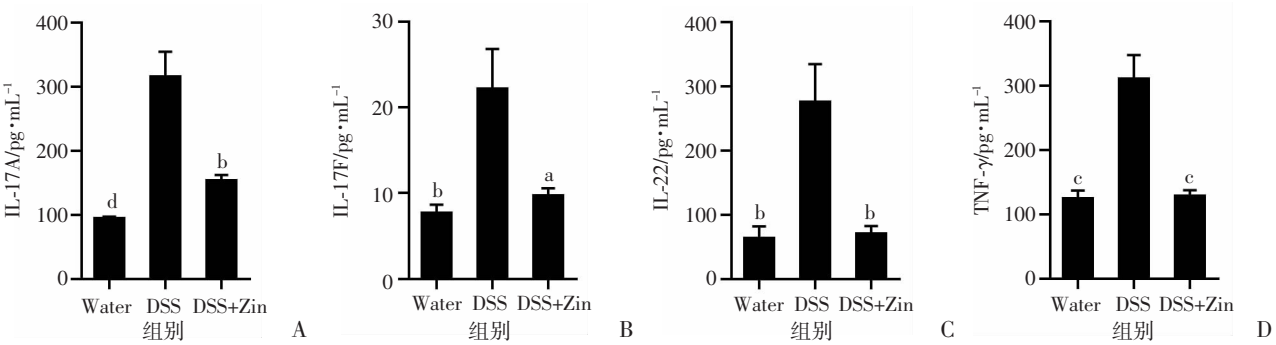
图 3　各组小鼠结肠组织 RT-qPCR 结果比较　($n=5,\bar{x}\pm se$)

2.3 多因子试剂盒检测结肠组织中相关细胞因子的蛋白含量变化

与对照组相比,DSS 诱导的急性结肠炎小鼠模型肠道中促炎因子如 IL-17A、IL-17F、IL-22 和 IFN-γ 的蛋白表达水平显著增高($P<0.05$),而姜酮干预后的小鼠结肠组织中上述炎症因子蛋白含量下降($P<0.05$,图 4)。

2.4 小鼠结肠组织固有层淋巴细胞 CD4+ T 细胞的变化

分离得到小鼠结肠固有层单个核细胞后,首先通过多色流式对不同的 CD4+ T 细胞亚群进行圈门分析(图 5)。结果显示,与 DSS 组小鼠相比,姜酮干预后小鼠结肠组织固有层淋巴细胞中 IL-17A+ CD4+ T 细胞比例明显下调,而 CD25+Foxp3+ T 细胞数量高于模型组,差异均有统计学意义($P<0.05$,图 6)。在两组小鼠中,IFN-γ+CD4+ T 细胞的发育均未受到影响($P>0.05$,图 6)。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$,d:$P<0.000\ 1$,与 DSS 组比较

A:结肠组织 IL-17A 含量;B:结肠组织 IL-17F 含量;C:结肠组织 IL-22 含量;D:结肠组织 IFN-γ 含量

图 4 各组小鼠结肠组织 IL-17A、IL-17F、IFN-γ、IL-22 蛋白水平比较 ($n=5$,$\bar{x}\pm se$)

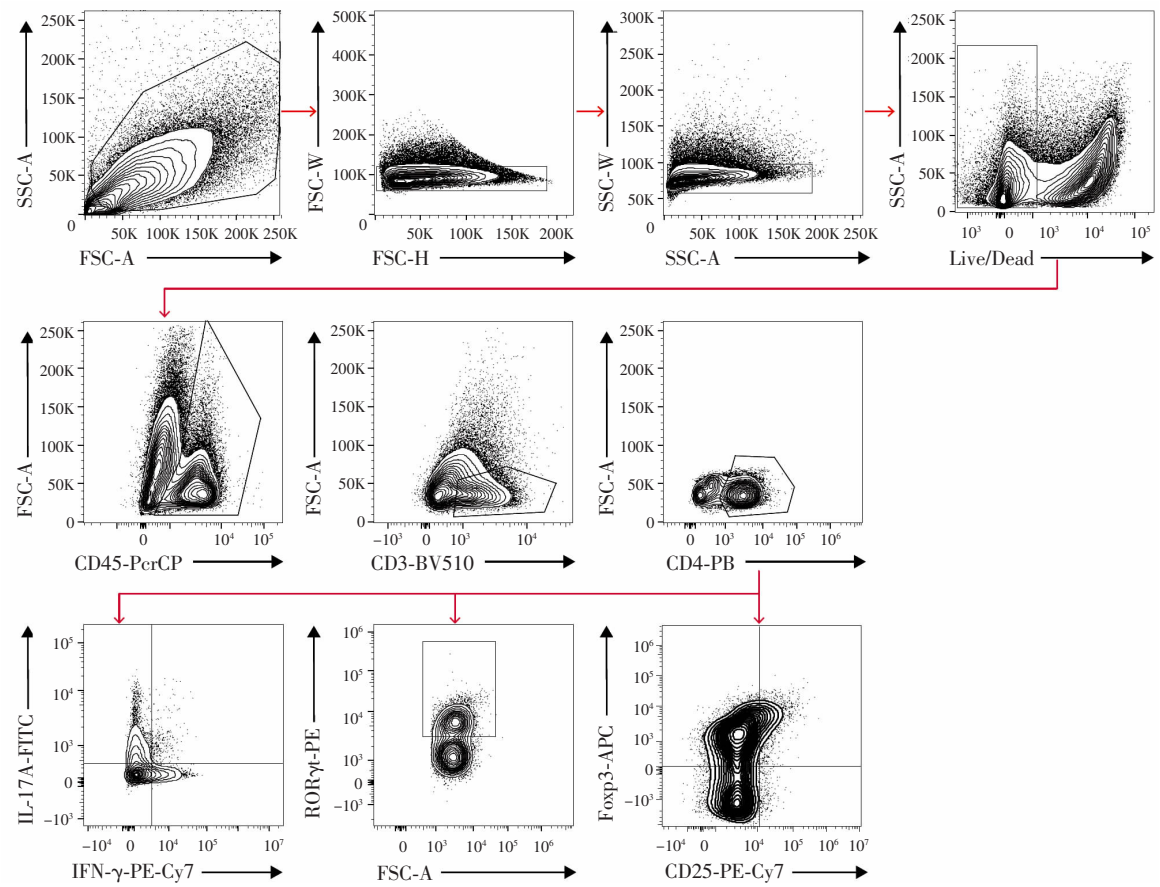
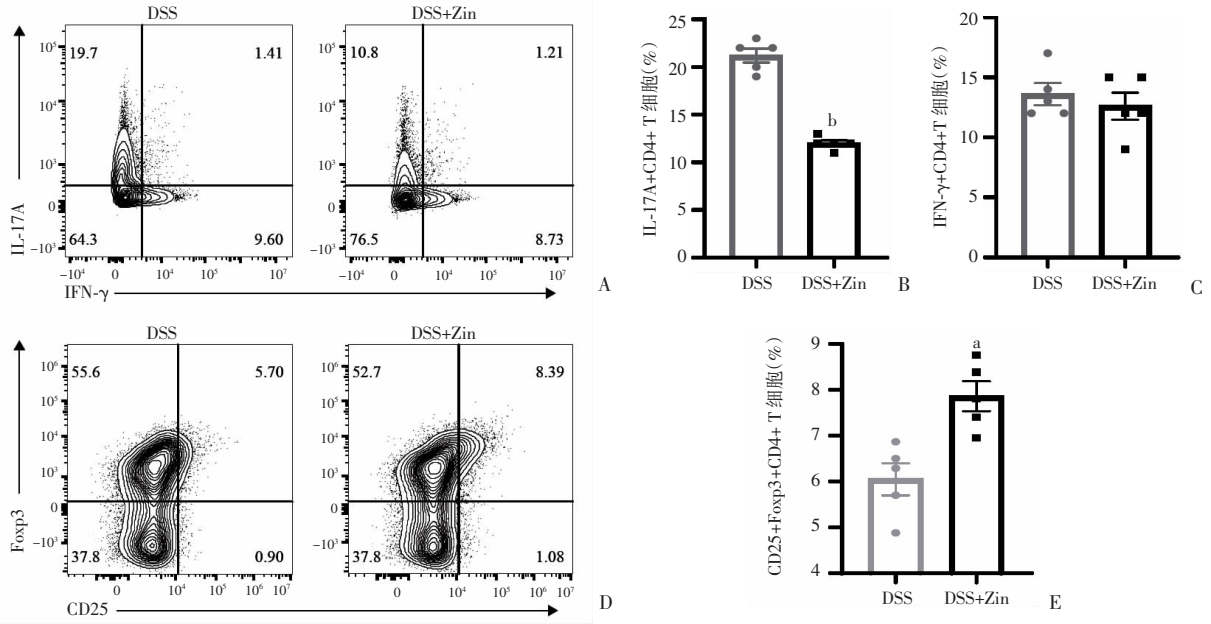


图 5 小鼠结肠固有层淋巴细胞多色流式圈门策略图

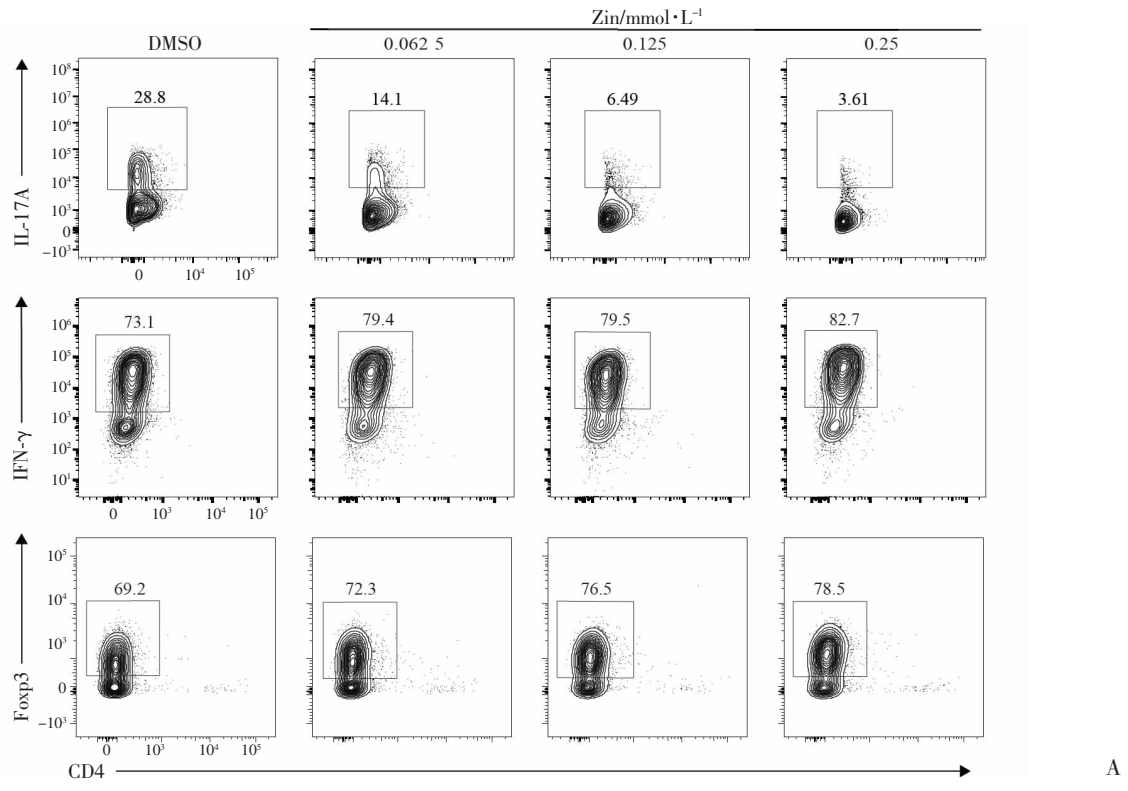
2.5　姜酮对初始 CD4+ T 细胞体外诱导分化的影响

体外诱导分化的流式结果显示:与 DMSO 组相比,姜酮对 Th1 亚群的分化并无影响($P>0.05$,图 7),而以剂量依赖性的方式抑制 Th17 细胞的分化并诱导 Treg 细胞分化增强(图 7A),分别表现为其特征性的效应因子 IL-17A 分泌减少,Foxp3 表达增加(图 7B),组间差异有统计学意义($P<0.05$,图 7B)。



a:$P<0.01$;b:$P<0.000\ 1$,与 DSS 组比较　A、D:流式分析小鼠 LP 组织中不同 CD4+ T 细胞亚群的代表流式图;B、C、E:各 CD4+ T 细胞亚群统计分析结果

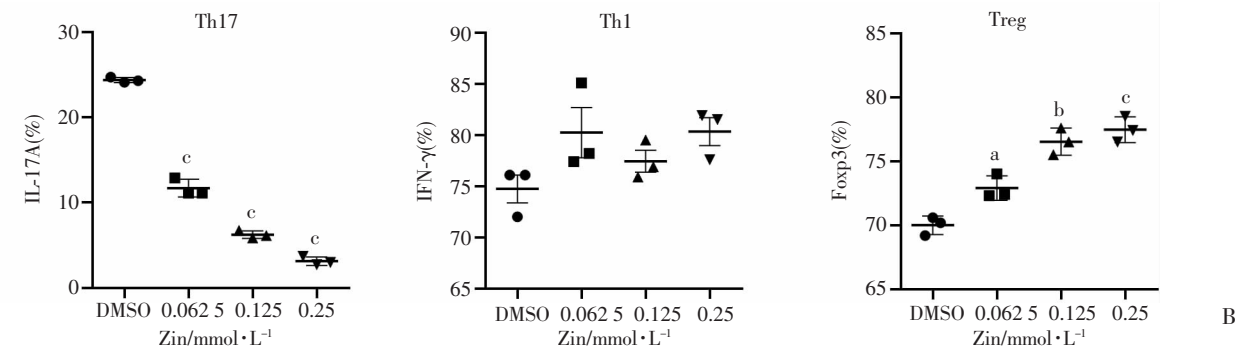
图 6　小鼠结肠固有层淋巴组织中 CD4+ T 细胞亚群分型比较　($n=5,\bar{x}\pm se$)



A:不同浓度的姜酮对 Th17、Th1、Treg 细胞分化的影响

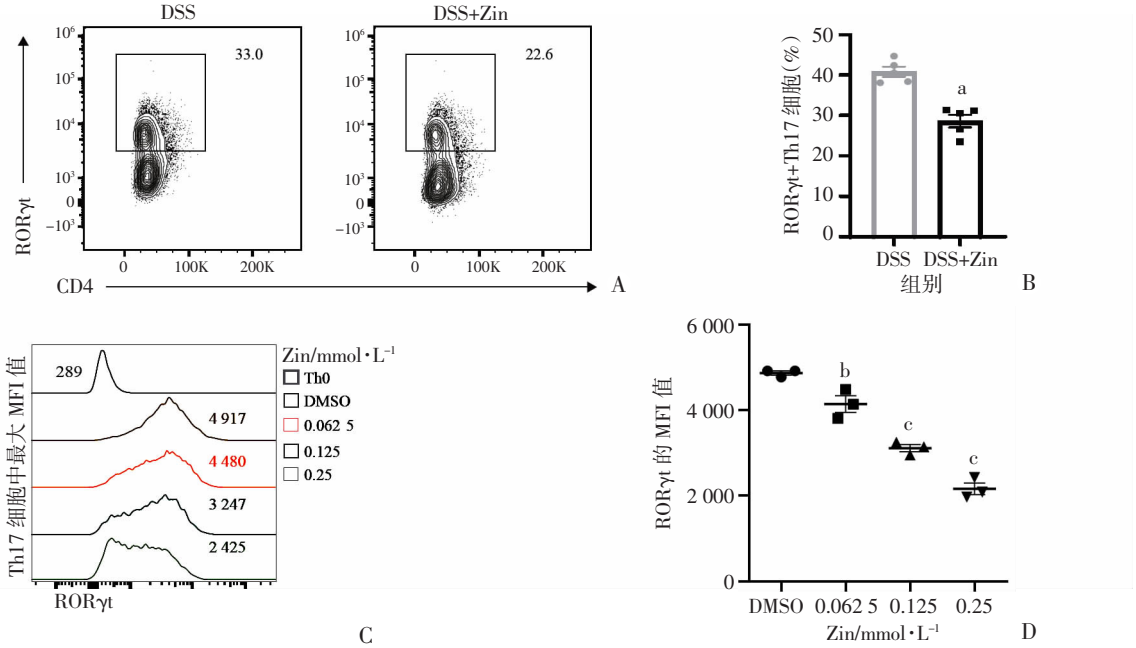
图 7　不同浓度的姜酮对初始 CD4+ T 细胞亚群分化的影响　($n=3,\bar{x}\pm se$)

(图 7B 续下页)



B:各浓度间统计分析结果 a:$P<0.05$, b:$P<0.001$, c:$P<0.000\ 1$,与 DMSO 组比较

续图 7 不同浓度的姜酮对初始 CD4+ T 细胞亚群分化的影响 ($n=3, \bar{x}\pm se$)



A:小鼠结肠固有层淋巴细胞中 CD4+RORγt+ Th17 细胞的代表流式图;B:RORγt+ Th17 细胞统计分析结果 a:$P<0.001$,与 DSS 组相比;C:不同浓度的姜酮对体外 Th17 亚群中 RORγt 表达的最大 MFI 值总结图;D:Th17 亚群中 RORγt 的 MFI 值统计分析结果 b:$P<0.05$, c:$P<0.01$,与 DMSO 组比较

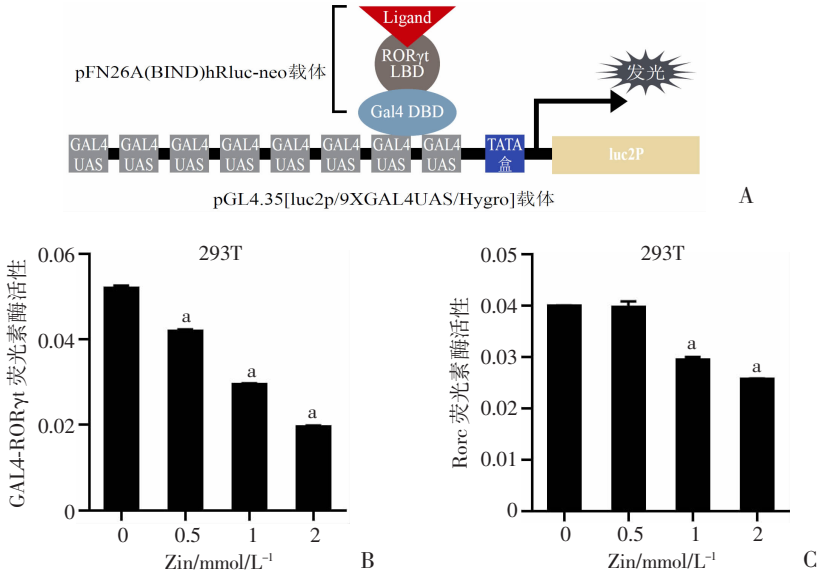
图 8 姜酮对 Th17 细胞中 RORγt 的影响

2.6 姜酮在 Th17 细胞中抑制 RORγt 表达

体内流式结果显示:与 DSS 组相比,给予姜酮干预后,小鼠结肠固有层淋巴细胞中 RORγt+ Th17 细胞比例降低($P<0.001$,图 8A~B),体内多色流式门控策略见图 5。体外诱导分化结果显示:与 DMSO 组相比,姜酮处理后以剂量依赖性的方式抑制 RORγt 的平均荧光强度值(mean fluorescence intensity, MFI)($P<0.05$,图 8C~D)。上述结果表明,姜酮可能通过抑制 RORγt 的表达抑制 Th17 细胞分化。

2.7 姜酮在转录水平对 RORγt 活性的影响

嵌合 GAL4-RORγt 报告系统广泛适用于核受体蛋白配体结合域(ligand binding domain, LBD)的研究(图 9A),可测试感兴趣蛋白质序列的转录激活域。Luciferase 实验结果显示,姜酮以浓度依赖的方式抑制 RORγt 的转录活性($P<0.000\ 1$,图 9B)。此外,Rorc 启动子驱动的 Luciferase 实验结果表明:低浓度(0.5 mmol/L)姜酮处理 293T 细胞时,Rorc 启动子活性的差异无统计学意义;1、2 mmol/L 浓度下的姜酮处理均可抑制 Rorc 启动子的活性($P<0.000\ 1$,图 9C),且这种抑制效应为浓度依赖性。



a:P<0.000 1,与 0 mmol/L 药物浓度比较

A:嵌合 GAL4-RORγt 报告系统原理;B:GAL4-RORγt 的转录活性统计结果;C:Rorc 启动子荧光素酶活性统计结果

图 9 姜酮在 293T 细胞中对 RORγt 转录水平的影响

3 讨论

UC 是一种反复发作且有癌变可能性的慢性疾病,被世界卫生组织列为现代难治性疾病之一。姜酮具有广泛的药理活性,对多种组织器官的炎症具有良好的抗炎效应,但在肠道炎症中的作用尚不清楚,本研究基于 DSS 诱导的急性结肠炎模型对姜酮改善肠道炎症的机制进行了初步探索。

3.1 姜酮对 DSS 小鼠模型临床症状的改善作用

适合的动物疾病模型对药物临床前评价十分重要。目前,UC 的动物模型主要分为三类:自发模型、诱导模型及基因修饰模型。DSS 诱导的结肠炎属于化学药物诱导模型中的一种,其诱导的结肠炎症状、体征及病理与人类 UC 基本一致,是目前研究 UC 比较成熟的模型之一。本研究采用 2%~3%浓度的 DSS 溶液饲喂小鼠,持续一周,成功建立了急性结肠炎模型,并对 DSS 诱导后的肠道炎性介质进行了测定。研究结果显示,DSS 组小鼠的体重下降、DAI 评分升高、结肠缩短,结肠黏膜出现严重的病理损伤,且结肠组织中促炎细胞因子如 *IL-17A*、*IL-21*、*IL-22*、*IL-6*、*IL-1β*、*IFN-γ* 的 mRNA 水平显著上调,分泌蛋白如 IL-17A、IL-17F、IL-22、IFN-γ 表达也有所增加,这与既往报道的 DSS 结肠炎小鼠模型结果相符[18-19]。这些突出的临床症状及促炎因子的上调,提示 DSS 组小鼠的结肠发生了显著的急性炎症。经过姜酮治疗后,小鼠的肠道炎症得到明显缓解,表明姜酮对 DSS 诱导的结肠炎具有良好的治疗效果,并且这种治疗效果可能与恢复小鼠肠道细胞因子紊乱有关。

3.2 姜酮抑制 Th17 细胞分化,促进 Treg 细胞分化

肠道中 CD4+ T 细胞介导的免疫失调是导致 UC 发病的重要因素之一。初始的 CD4+ T 细胞被激活时可分化为不同的辅助性 T 细胞(helper T cell, Th),主要包括 Th1、Th2、Th17、Treg 细胞[20-21],不同的 Th 谱系可产生特异性的细胞因子参与免疫反应。现有文献表明,Th17 细胞及其分泌的细胞因子如 IL-6、IL-17、IL-21 在 UC 中显著升高,可促进炎症的发展;Treg 细胞则作为一种具有免疫抑制效应的细胞在肠道免疫耐受中发挥重要作用,其分泌的抗炎因子 TGF-β、IL-10 等可抑制炎症发生[22-23]。目前有大量文献报道,通过改善肠道中 Th17 细胞和 Treg 细胞的平衡可限制结肠炎的发展[24-27]。本研究发现姜酮可调控促炎因子 *IL-6*、*IL-17A*、*IL-21*、*IL-22* 及抑炎因子 *TGF-β* 的表达,提示姜酮可能是通过影响 Th17/Treg 细胞的分化,进而调节了相关效应细胞因子的分泌。结合体内多色流式分析,姜酮选择性地抑制了 DSS 结肠炎小鼠肠道固有层淋巴细胞中致病性的 IL-17A+ Th17 细胞,促进了 Treg 细胞在肠道中的积累,说明姜酮的确具有发挥 T 细胞免疫调节的药理能力[15],可通过调节肠道中 Th17/Treg 细胞平衡维持肠道稳态,从而缓解了结肠炎。同时,初始 CD4+ T 细胞体外诱导分化实验进一步验证了姜酮对不同 Th 细胞分化的作用。这种在体外诱导 T 细胞分化的方法排除了体内复杂生物因素

的影响,可单独、直接的观察姜酮对不同 Th 谱系分化的作用,有力地论证了姜酮具有选择性调控 T 细胞分化的能力。然而,T 细胞的分化伴随着细胞活化、增殖、凋亡等一系列生理过程,并且在体内受到细胞微环境复杂精密的调控,姜酮是否特异性靶向 Th17/Treg 细胞的转分化来减轻结肠炎仍需要更多的动物模型进行验证。

3.3 姜酮抑制 RORγt 表达

由于在实验中发现姜酮具有调节 Th17 细胞分化的作用,本研究对影响 Th17 细胞命运的关键转录因子 RORγt 进行了初步探索。体内外的流式结果显示,姜酮可抑制 RORγt 的表达。RORγt 的主要作用是促进 Th17 细胞分化和产生 IL-17。IL-17 是一种促炎细胞因子,主要由 Th17 细胞分泌,可参与许多炎症性疾病的进展。文献证实,在炎症性肠病、自身免疫性脑脊髓炎以及多发性硬化等多种小鼠模型中,特异性地抑制 IL-17 可减轻小鼠炎症的发生[28-30]。由于 RORγt 是 IL-17 的主要转录因子,因此抑制 RORγt 的活性已成为治疗由 IL-17 驱动的自身免疫性疾病的重要策略[31]。研究报道,地高辛和 SR1001 是 RORγt 的有效抑制剂,可抑制 IL-17 表达并减轻自身免疫性脑脊髓炎的疾病程度[32-33]。此外,熊果酸、胆汁酸代谢物 3-oxoLCA 以及多种地高辛衍生物可通过结合 RORγt 抑制其转录活性,从而抑制 Th17 细胞分化[34-35]。本研究结果发现,姜酮也可以抑制 RORγt 的转录活性,从而初步解释了姜酮抑制 Th17 细胞分化并改善小鼠结肠炎的原因。同时,基于 GAL4-RORγt 双荧光素酶报告系统原理,该实验还说明了姜酮可作为一种外源性小分子配体,具有直接结合 RORγt 配体结构域(ligand binding domain, LBD)的潜在能力,很有可能成为一种新型的 RORγt 抑制剂,但关于这一结论还需要更多的机理研究。此外,考虑到 RORγt 是由 Rorc 基因编码,且 Rorc 启动子水平的调控也是影响 Th17 细胞分化的重要机制[36],本研究还利用 Rorc 荧光素酶报告基因证实了姜酮在启动子水平即可影响 RORγt 基因的表达,这可能也是姜酮破坏 Th17 稳定性的机制之一。

综上所述,姜酮对 DSS 诱导的 UC 具有较好的治疗作用,其机制上可能是通过调控 Th17/Treg 细胞平衡和抑制 RORγt 表达改善肠道炎症反应。本项研究首次证明了姜酮通过调节 T 细胞免疫应答发挥抗炎活性,丰富了其在炎症免疫调节上的机制探索,不仅为姜酮在治疗 UC 提供了机制上的见解,而且为开发基于生姜提取物用于药物治疗 UC 和相关自身免疫性疾病提供了新的思路。但是该研究关于姜酮通过何种途径调控 Th17/Treg 细胞平衡目前尚未阐清,其抑制 RORγt 的机理也需要进一步探索。

参考文献:

[1] KAPLNA G G, NG S C. Understanding and preventing the global increase of inflammatory bowel disease[J]. Gastroenterology, 2017, 152(2): 313-321. e2. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.10.020.

[2] XAVIER R J, PODOLSKY D K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory boweldisease[J]. Nature, 2007, 448(7152): 427-434. DOI: 10.1038/nature06005.

[3] DE SOUZA H S, FIOCCHI C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2016, 13(1): 13-27. DOI: 10.1038/nrgastro.2015.186.

[4] PRINZ I, KLEMM U, KAUFMANN S H, *et al*. Exacerbated colitis associated with elevated levels of activated CD4+T cells in TCR alpha chain transgenic mice[J]. Gastroenterology, 2004, 126(1): 170-181. DOI: 10.1053/j.gastro.2003.10.062.

[5] DAVIDSON N J, LEACH M W, FORT M M, *et al*. T helper cell 1-type CD4+ T cells, but not B cells, mediate colitis in interleukin 10-deficient mice[J]. J Exp Med, 1996, 184(1): 241-251. DOI: 10.1084/jem.184.1.241.

[6] 徐燕, 何树泉, 李洪亮. 溃疡性结肠炎的肠黏膜免疫细胞研究进展[J]. 赣南医学院学报, 2013, 33(1): 156-160. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5779.2013.01.076.
XU Y, HE S Q, LI H L. Research progress of intestinal mucosal immune cells in ulcerative colitis[J]. J Gannan Med Univ, 2013, 33(1): 156-160. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5779.2013.01.076.

[7] UENO A, JEFFERY L, KOBAYASHI T, *et al*. Th17 plasticity and its relevance to inflammatory bowel disease[J]. J Autoimmun, 2018, 87: 38-49. DOI: 10.1016/j.jaut.2017.12.004.

[8] YAN J B, LUO M M, CHEN Z Y, *et al*. The function and role of the Th17/treg cell balance in inflammatory bowel disease[J]. J Immunol Res, 2020, 2020: 8813558. DOI: 10.1155/2020/8813558.

[9] DANESE S, VUITTON L, PEYRIN-BIROULET L. Biologic agents for IBD: practical insights[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2015, 12(9): 537-545. DOI: 10.1038/nrgastro.2015.135.

[10] NEURATH M F. Current and emerging therapeutic targets for IBD[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 14(5): 269-278. DOI: 10.1038/nrgastro.2016.208.

[11] AHMAD B, REHMAN M U, AMIN I, *et al*. A review on pharmacological properties of zingerone [4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-butanone][J]. Sci World J, 2015, 2015: 816364. DOI: 10.1155/2015/816364.

[12] BALIGA M S, HANIADKA R, PEREIRA M M, *et al*. Update on the chemopreventive effects of ginger and its phyto-

chemicals[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2011, 51(6): 499-523. DOI: 10.1080/10408391003698669.

[13] KIYAMA R. Nutritional implications of ginger:chemistry, biological activities and signaling pathways[J]. J Nutr Biochem, 2020, 86: 108486. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2020.108486.

[14] HSIANG C Y, LO H Y, HUANG H C, *et al*. Ginger extract and zingerone ameliorated trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in mice via modulation of nuclear factor-κB activity and interleukin-1β signalling pathway[J]. Food Chem, 2013, 136(1): 170-177. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.07.124.

[15] KAZEMI M, JAFARZADEH A, NEMATI M, *et al*. Zingerone improves the immune responses in an animal model of breast cancer[J]. J Complement Integr Med, 2021, 18(2): 303-310. DOI: 10.1515/jcim-2019-0135.

[16] KIM J J, SHAJIB M S, MANOCHA M M, *et al*. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD[J]. J Vis Exp, 2012(60): 3678. DOI: 10.3791/3678.

[17] FLAHERTY S, Reynolds J M. Mouse naïve CD4+ T cell isolation and *in vitro* differentiation into T cell subsets[J]. J Vis Exp, 2015 Apr 16, (98):52739. DOI: 10.3791/52739.

[18] ZHAO Y, LUAN H, JIANG H,*et al*. Gegen qinlian decoction relieved DSS-induced ulcerative colitis in mice by modulating Th17/Treg cell homeostasis *via* suppressing IL-6/JAK2/STAT3 signaling[J]. Phytomedicine, 2021, 84: 153519. DOI: 10.1016/j.phymed.2021.153519.

[19] EICHELE D D, KHARBANDA K K. Dextran sodium sulfate colitis murine model: an indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(33): 6016-6029. DOI: 10.3748/wjg.v23.i33.6016.

[20] ZHOU L, CHONG M M, LITTMAN D R. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation[J]. Immunity, 2009, 30(5): 646-655. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.05.001.

[21] TUMES D J, PAPADOPOULOS M, ENDO Y,*et al*. Epigenetic regulation of T-helper cell differentiation, memory, and plasticity in allergic asthma[J]. Immunol Rev, 2017, 278(1): 8-19. DOI: 10.1111/imr.12560.

[22] XU M, DUANX Y, CHEN Q Y, *et al*. Effect of compound sophorae decoction on dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis in mice by regulating Th17/Treg cell balance[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 2396-2408. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.11.087.

[23] SCHMITT H, ULMSCHNEIDER J, BILLMEIER U, *et al*. The TLR9 agonist cobitolimod induces IL10-producing wound healing macrophages and regulatory T cells in ulcerative colitis[J]. J Crohns Colitis, 2020, 14(4): 508-524. DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjz170.

[24] CUI H, CAI Y, WANG L,*et al*. Berberine regulates treg/Th17 balance to treat ulcerative colitis through modulating the gut microbiota in the colon[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 571. DOI: 10.3389/fphar.2018.00571.

[25] LIU Y J, TANG B, WANG F C,*et al*. Parthenolide ameliorates colon inflammation through regulating Treg/Th17 balance in a gut microbiota-dependent manner[J]. Theranostics, 2020, 10(12): 5225-5241. DOI: 10.7150/thno.43716.

[26] WEN S, HE L, ZHONG Z, *et al*. Stigmasterol restores the balance of treg/Th17 cells by activating the butyrate-PPARγ axis in colitis[J]. Front Immunol, 2021, 12: 741934. DOI: 10.3389/fimmu.2021.741934.

[27] CHANG Y, ZHAI L, PENG J, *et al*. Phytochemicals as regulators of Th17/Treg balance in inflammatory bowel diseases[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 141: 111931. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111931.

[28] FITZPATRICK L R. Inhibition of IL-17 as a pharmacological approach for IBD[J]. Int Rev Immunol, 2013, 32(5/6): 544-555. DOI: 10.3109/08830185.2013.821118.

[29] KOMIYAMA Y, NAKAE S, MATSUKI T,*et al*. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. J Immunol, 2006, 177(1): 566-573. DOI: 10.4049/jimmunol.177.1.566.

[30] WAISMAN A, HAUPTMANN J, REGEN T. The role of IL-17 in CNS diseases[J]. Acta Neuropathol, 2015, 129(5): 625-637. DOI: 10.1007/s00401-015-1402-7.

[31] IVANOV I I, MCKENZIE B S, ZHOU L, *et al*. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells[J]. Cell, 2006, 126(6): 1121-1133. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.035.

[32] HUH J R, LEUNG M W, HUANG P, *et al*. Digoxin and its derivatives suppress TH17 cell differentiation by antagonizing RORγt activity[J]. Nature, 2011, 472(7344): 486-490. DOI: 10.1038/nature09978.

[33] SOLT L A, KUMAR N, NUHANT P,*et al*. Suppression of TH17 differentiation and autoimmunity by a synthetic ROR ligand[J]. Nature, 2011, 472(7344): 491-494. DOI: 10.1038/nature10075.

[34] XUT, WANG X, ZHONG B, *et al*. Ursolic acid suppresses interleukin-17 (IL-17) production by selectively antagonizing the function of RORgamma T protein[J]. J Biol Chem, 2011, 286(26): 22707-22710. DOI: 10.1074/jbc.c111.250407.

[35] HANG S, PAIK D, YAO L, *et al*. Bile acid metabolites control T_H17 and T_{reg} cell differentiation[J]. Nature, 2019, 576(7785): 143-148. DOI: 10.1038/s41586-019-1785-z.

[36] ICHIYAMA K, SEKIYA T, INOUE N,*et al*. Transcription factor Smad-independent T helper 17 cell induction by transforming-growth factor-β is mediated by suppression of eomesodermin[J]. Immunity, 2011, 34(5): 741-754. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.02.021.

(收稿:2022-12-07;修回:2023-01-04)

(编辑 刘秋池)