

# 基于IL-6/STAT3通路探讨芍药汤对溃疡性结肠炎 Th17/Treg平衡的调节机制

吴东升<sup>1</sup>, 曹晖<sup>1\*</sup>, 张彧<sup>2</sup>, 邹博<sup>2</sup>, 胡启华<sup>1</sup>, 谢念佳<sup>2</sup>, 阳玉婷<sup>2</sup>, 芦易<sup>2</sup>

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007;

2. 湖南中医药大学, 长沙 410208)

**[摘要]** **目的:**探讨白细胞介素-6(IL-6)/信号传导及转录激活因子3(STAT3)通路在湿热内蕴证溃疡性结肠炎(UC)辅助性T细胞17(Th17)/调节性T细胞(Treg)失衡中的作用及芍药汤的干预机制。**方法:**将60只SD大鼠随机分为空白组、模型组、美沙拉嗪组(0.42 g·kg<sup>-1</sup>)、芍药汤低、中、高剂量组(11.1、22.2、44.4 g·kg<sup>-1</sup>),除空白组外,其他各组采用复合病因造模建立湿热内蕴证溃疡性结肠炎模型,各组分别给予生理盐水、美沙拉嗪组、芍药汤低、中、高剂量治疗14 d。末次给药24 h后处死大鼠提取脾脏、结肠组织,采用苏木素-伊红(HE)染色观察结肠组织病理学改变,免疫组化(IHC)法检测结肠组织白细胞介素-17(IL-17)、转化生长因子-β<sub>1</sub>(TGF-β<sub>1</sub>)水平;流式细胞术检测脾脏Th17/Treg细胞水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测结肠组织IL-6、STAT3蛋白水平。**结果:**与空白组比较,模型组结肠出现充血、糜烂等病变,脾Treg细胞百分比显著降低( $P<0.01$ ),Th17细胞百分比显著升高( $P<0.01$ ),结肠组织IL-6、STAT3蛋白水平显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,各药物组结肠损伤减轻,脾Treg细胞百分比显著升高( $P<0.01$ ),Th17细胞百分比显著降低( $P<0.01$ ),结肠组织中IL-6、STAT3蛋白水平显著降低( $P<0.01$ )。**结论:**芍药汤通过抑制IL-6/STAT3信号通路调节Th17/Treg平衡,进而改善湿热内蕴证UC大鼠的病理损伤,影响其免疫功能。

**[关键词]** 芍药汤; 湿热内蕴证; 溃疡性结肠炎; 白细胞介素-6(IL-6)/信号传导及转录激活因子3(STAT3)信号通路; 辅助性T细胞17(Th17)/调节性T细胞(Treg)平衡

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)09-0046-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20221602

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220803.1550.002.html>

**[网络出版日期]** 2022-08-03 17:41:19

## Shaoyatong Alleviates Ulcerative Colitis by Regulating Th17/Treg Balance Through IL-6/STAT3 Signaling Pathway

WU Dongsheng<sup>1</sup>, CAO Hui<sup>1\*</sup>, ZHANG Yu<sup>2</sup>, ZOU Bo<sup>2</sup>, HU Qihua<sup>1</sup>, XIE Nianjia<sup>2</sup>, YANG Yuting<sup>2</sup>, LU Yi<sup>2</sup>

(1. *The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China;*

2. *Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China*)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the role of interleukin-6 (IL-6)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway in the balance of T helper 17 (Th17)/regulatory T (Treg) cells in ulcerative colitis (UC) with internal dampness-heat accumulation syndrome and the intervention mechanism of Shaoyatong. **Method:** A total of 60 SD rats were randomized into blank group (equivalent volume of normal saline), model group (equivalent volume of normal saline), western medicine control group (0.42 g·kg<sup>-1</sup>

**[收稿日期]** 2022-05-31

**[基金项目]** 湖南省教育厅科学研究重点项目(19A373);湖南省中医药科研计划项目(2021022、B2023030);长沙市自然科学基金项目(kq2014221);湖南省卫健委科研课题(202204134275、B202304134275);湖南中医药大学中医学一流学科开放基金项目(2021ZYX26)

**[第一作者]** 吴东升, 硕士, 医师, 从事肠道慢性疾病合并肛周病变的中医药研究, Tel: 0731-89669129, E-mail: 987909401@qq.com

**[通信作者]** \* 曹晖, 硕士, 主任医师, 从事中医药防治肠道慢性疾病合并肛周病变的研究, E-mail: Caohui001818@sina.com

mesalazine), and low-dose ( $11.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), medium-dose ( $22.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), and high-dose ( $44.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) Shaoyao tang groups. UC with internal dampness-heat accumulation syndrome was induced in rats with the compound method except for the blank group. The administration lasted 14 days for each group. At 24 h after the last administration, rats were killed and the spleen and colon tissues were separated. The histopathological changes of colon were observed based on hematoxylin and eosin (HE) staining and the levels of interleukin-17 (IL-17) and transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) in colon tissue were detected by immunohistochemistry (IHC). Flow cytometry was employed to determine the levels of Th17/Treg cells in the spleen, and Western blot to measure the levels of IL-6 and STAT3 proteins in colon tissue. **Result:** Compared with the blank group, the model group had lesions such as congestion and erosion, low percentage of spleen Treg cells ( $P<0.01$ ), high percentage of Th17 cells ( $P<0.01$ ), and high levels of IL-6 and STAT3 proteins in colon tissue ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the administration groups showed alleviation of colon injury, high percentage of spleen Treg cells ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), low percentage of Th17 cells ( $P<0.01$ ), and low levels of IL-6 and STAT3 proteins in colon tissue ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** Shaoyao tang regulates the balance of Th17/Treg by inhibiting the IL-6/STAT3 pathway, thereby relieving the pathological damage of UC rats with internal dampness-heat accumulation syndrome and affecting their immune function.

**[Keywords]** Shaoyao tang; internal dampness-heat accumulation syndrome; ulcerative colitis; interleukin-6 (IL-6)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling pathway; T helper 17 (Th17)/Treg balance

溃疡性结肠炎(UC)是一种常见的慢性非特异性炎症性肠病,一般以反复腹痛、腹泻和脓血便为临床特征<sup>[1]</sup>。UC治疗难度大,患病率在全球呈不断上升趋势,对公共健康构成了严重的影响<sup>[2]</sup>。UC的发病机制尚未完全明确,免疫反应的失调被认为是UC发展的一个重要因素<sup>[3]</sup>。辅助性T细胞17(Th17)、调节性T细胞(Treg)均是CD4<sup>+</sup>T效应细胞亚群之一,研究发现Th17和Treg通过调节、抑制和维持炎症在UC发病机制中发挥关键作用,在UC进展期间,引起炎症的Th17数量通常增加,而抑制Th17活性的Treg数量减少<sup>[4-5]</sup>。Th17主要产生白细胞介素(IL)-17等促炎因子分泌,加重肠上皮细胞及组织损伤,促进UC炎症的发展<sup>[6]</sup>,而Treg细胞主要分泌IL-10等抗炎因子抑制肠道炎症反应<sup>[7]</sup>。Th17/Treg细胞失衡引起的促炎/抗炎因子失衡是UC的重要发病机制之一<sup>[8]</sup>,他们在免疫炎症反应机制中发挥了重要作用。研究证实,IL-6/信号传导及转录激活因子3(STAT3)信号通路对Th17和Treg细胞的分化有很大影响,IL-6/STAT3通路的过度激活可诱导肠道幼稚T细胞中视黄酸受体相关孤儿受体 $\gamma\text{t}$ (ROR $\gamma\text{t}$ )(Th17转录因子)表达,并诱导Treg细胞转录因子叉头框蛋白P3(FoxP3)过度表达减少对ROR $\gamma\text{t}$ 的抑制,这将促使幼稚T细胞向Th17分化,从而导致Th17/Treg细胞失衡<sup>[9-10]</sup>。因此,IL-6/STAT3信号通路介导的Th17/Treg细胞失衡是

UC发生发展的重要病理机制。

目前西医治疗UC的常规方法包括5-氨基水杨酸、糖皮质激素、免疫抑制剂和生物制剂等,这些方法临床中伴随有胃肠道不良反应、严重的并发症、复发和沉重的经济负担等问题<sup>[11]</sup>,因此探索一系列新颖、安全、高效的UC治疗方法至关重要<sup>[12]</sup>。芍药汤出自《黄帝内经·素问·病机气宜保命集》,是临床治疗UC的代表方之一,具有清热燥湿、调气和血等功效。课题组前期研究证实芍药汤可以调节肠道免疫功能,其通过下调促炎因子和上调抗炎因子来调节Th17/Treg平衡,从而减轻肠道炎症<sup>[13-16]</sup>。既往有一些研究表明通过调节IL-6信号通路来调节Th17/Treg平衡可能是治疗UC的有效方法<sup>[17-18]</sup>,但少有研究从调节IL-6/STAT3信号通路调控Th17/Treg细胞平衡的角度来说明芍药汤对UC的药理作用。故此,本实验建立UC湿热内蕴证模型,进一步阐明IL-6/STAT3信号通路与Th17/Treg细胞平衡间的关系,以及研究芍药汤调控Th17/Treg平衡是否与IL-6/STAT3信号通路相关,以期进一步明确芍药汤治疗UC的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 60只雄性SD大鼠,体质量( $160\pm 10$ )g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物合格证号SCXK(湘)2019-0004,动物质量合格证编号430727211101295026,所有大鼠在温度24~26℃和

湿度40%~60%的特定条件下饲养,实验方案已取得湖南中医药大学第一附属医院动物伦理委员会批准,伦理编号ZYFY20210615。

**1.2 药物** 芍药汤由白芍30 g,当归、黄连、黄芩各15 g,大黄9 g,槟榔、木香、甘草各6 g,肉桂5 g组成,购自湖南中医药大学附一院门诊中药房,所有药材由湖南三湘中药饮片公司生产,批号均为2021062103,并由该院邓桂明副主任药师鉴定均为正品。用双蒸水浸泡饮片2 h,煮沸后再用小火煎煮0.5 h,重复1次,第1煎加入饮片量8倍水,第2煎加入饮片量6倍水,获得的中药煎剂以 $1\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ (离心半径13.5 cm)离心10 min,过滤后取上清液,并将2次药液浓缩至 $1.1\ \text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 后置于4℃冰箱中备用。美沙拉嗪缓释颗粒剂购自上海爱的发制药有限公司,批号H20143164,规格0.5 g/袋,精密称取美沙拉嗪缓释颗粒剂4.2 g,研细成粉末后溶于10 mL蒸馏水中即配制成 $0.42\ \text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度的美沙拉嗪溶液。

**1.3 试剂** 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS,美国Sigma公司,批号3LBD6811V);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(上海碧云天生物公司,批号C0105);兔抗鼠IL-17、转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )、IL-6、STAT3抗体、兔抗鼠 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G二抗(北京博奥森生物公司,批号分别为BS-2609R、BSM-33287M、BS-4539R、BS-20382R、BS-0061R、BS-0295G)。

**1.4 仪器** KD-BM.BL型组织包埋机(浙江金华科迪仪器设备有限公司);WD-9405C型电泳仪、DYCZ-24DN型转膜仪(北京六一仪器厂);RM2235型精密轮转切片(德国Leica公司);YD-AB型组织摊烤片机(浙江益迪医疗设备有限公司);DXP Athena型流式细胞仪(美国Cytex公司)。

## 2 方法

**2.1 动物模型制备** 随机抽取10只SD大鼠作为空白组,剩余50只SD大鼠采用复合病因(高糖高脂饮食+湿热环境+免疫干预+TNBS)建立UC湿热内蕴证大鼠模型。在普通饲料喂养基础上, $200\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蜂蜜水自由饮用,隔日灌服油脂 $15\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 或52%白酒 $20\ \text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,交替灌服20 d,并置于人工气候箱中(温度35℃、湿度95%,每天6 h),在造模的第6、20天于大鼠腹股沟、背部及左、右侧足跖皮下注射 $40\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 抗原乳化液。在第21天,大鼠禁食不禁水24 h,麻醉大鼠后用石蜡油润滑0.4 mm直径的聚乙烯软管,插入直肠,深度为8 cm,注入5% TNBS

$75\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}+50\%$ 乙醇0.25 mL,再将大鼠提尾倒置60 s,使药液充分停留结直肠<sup>[19]</sup>。造模第28天通过观察大鼠毛发、精神状态、活动量、大便性状、便血情况、饮水量、体质量变化等,以及HE染色观察肠黏膜组织病理学改变及炎症程度,综合判断是否造模成功,而后进行下一步实验。

**2.2 分组给药** 采用随机数字表法将造模成功的50只SD大鼠随机均分为5组:模型组、美沙拉嗪组、芍药汤低、中、高剂量组。于造模第28天后开始对应给药,其中芍药汤低、中、高剂量组的给药剂量分别为 $11.1$ 、 $22.2$ 、 $44.4\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,美沙拉嗪组给予美沙拉嗪 $0.42\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,灌胃容积为 $10\ \text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,余各组灌服等体积生理盐水,连续灌胃14 d。根据人和动物按体表面积折算的等效剂量比值表,以60 kg成人每日服用药物剂量与160 g大鼠体表面积换算比值换算出大鼠1 d用量。

**2.3 标本采集和检测** 末次给药后禁食24 h,3%戊巴比妥钠( $30\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )腹腔注射麻醉大鼠,在低温下迅速剖取脾脏及距肛门上约8 cm的结肠组织,以生理盐水冲洗,滤纸吸干,将新鲜脾脏送检行流式细胞术检测,另选取0.5 cm结肠放于4%多聚甲醛中,余结肠组织-80℃保存备测。

**2.4 HE染色观察结肠组织病理变化** 将结肠组织置于4%多聚甲醛溶液中,石蜡包埋,切成5  $\mu\text{m}$ 切片。切片用二甲苯溶液脱蜡,梯度乙醇溶液脱水后,依次用苏木素溶液染色,1%盐酸-乙醇分化,伊红溶液染色,中性树脂封片,在光学显微镜下观察结果。

**2.5 免疫组化法检测结肠组织中IL-17、TGF- $\beta_1$ 蛋白表达** 结肠切片在二甲苯溶液中脱蜡,并在梯度递减的乙醇溶液中水化,然后用柠檬酸盐抗原修复溶液处理切片,用0.5% Triton X-100溶液透化20 min,用3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液孵育,用5%牛血清白蛋白封闭切片20 min,再与IL-17(1:500)、TGF- $\beta_1$ (1:500)在37℃下温育1 h,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后,将切片与羊抗兔IgG(1:1 000)在37℃温育20 min,经DAB显色、复染、脱水、透化、固定后,显微镜下观察,并封片、拍照,以Image-Pro Plus软件测定积分吸光度IA和阳性表达面积,计算平均积分吸光度AA(积分吸光度/阳性表达面积)。

**2.6 流式细胞仪检测脾脏中Th17/Treg细胞比例** 收集脾淋巴细胞并以 $1\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min(半径13.5 cm,下同),采集脾的单细胞悬液。对于Treg分析,将FITC、PE和FoxP3 PerCP-cy5.5用于对

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Treg细胞染色及其相应的同种型对照。对于Th17分析,对每组脾的淋巴细胞用离子霉素,PMA和莫能菌素刺激5h。将FITC、PE和IL-17A PerCP-cy5.5用于对CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>Th17细胞染色及其各自的同种型对照,然后将脾的单细胞悬液温育并洗涤,用流式细胞仪检测脾淋巴细胞中Th17和Treg细胞比例。

**2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测结肠组织IL-6、STAT3的蛋白水平** 用预冷的裂解液处理结肠组织,并以12 000 r·min<sup>-1</sup>离心30 min,通过12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析等量的蛋白质(50 μg),并在室温下用5% BSA的TBST封闭印迹膜60 min,按1:1 000加入一抗,在4 °C下过夜。用β-actin作上样对照。按1:2 000加入辣根酶标记羊抗兔IgG,室温反应1 h,等体积混合ECL AB液,与PVDF膜共孵育1 min,放入化学发光仪中曝光,用双色红外荧光扫描成像仪器Odyssey扫描成像,用Image J软件测定目的条带与内参β-actin灰度值,以两者比值表达其相对含量。

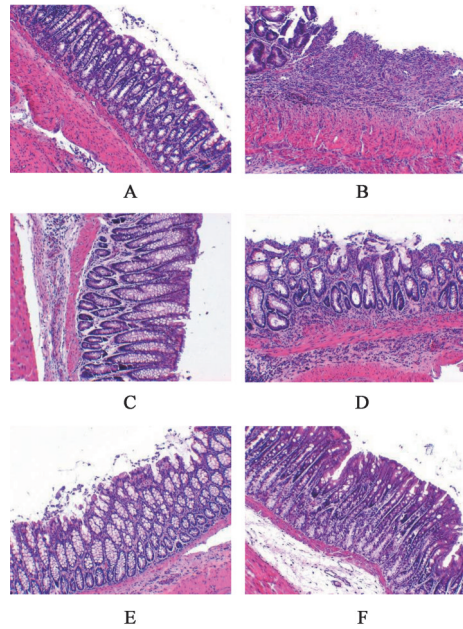
**2.8 统计学分析** 采用SPSS 21.0统计软件进行数据处理,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,对样本先进行正态性检验、方差齐性检验,方差齐时,用单因素方差分析检验,并进行组间的多重比较;方差不齐时,用非参数秩和检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对UC大鼠结肠组织病理学变化的影响** 正常组大鼠结肠组织结构完整,肠黏膜未见充血、水肿、糜烂等变化;模型组结肠结构受损,腺体破损,隐窝扭曲,大量炎性细胞浸润,部分可见溃疡形成,符合典型的炎性改变;与模型组比较,各给药组结肠结构受损相对减轻,炎性细胞浸润及隐窝受损减少,溃疡周围呈愈合性改变,部分溃疡周围伴见新生腺体。见图1。

**3.2 对UC大鼠结肠组织IL-17、TGF-β<sub>1</sub>蛋白表达的影响** 与空白组比较,模型组大鼠结肠组织IL-17蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$ ),TGF-β<sub>1</sub>蛋白表达水平显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组大鼠结肠组织IL-17蛋白表达水平显著降低( $P<0.01$ ),TGF-β<sub>1</sub>蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$ );与芍药汤低剂量组比较,芍药汤高剂量组IL-17蛋白表达水平显著降低( $P<0.01$ ),TGF-β<sub>1</sub>蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$ )。见图2、图3、表1。

**3.3 对UC大鼠脾脏Th17/Treg细胞比例的影响** 与空白组比较,模型组CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>(Th17)/CD4<sup>+</sup>



注:A.空白组;B.模型组;C.美沙拉嗪组;D.芍药汤低剂量组;E.芍药汤中剂量组;F.芍药汤高剂量组(图2-图4同)

图1 芍药汤对UC大鼠结肠组织病理学的影响(HE,×100)

Fig. 1 Effect of Shaoyao tang on intestinal mucosal pathology in UC rats (HE, ×100)

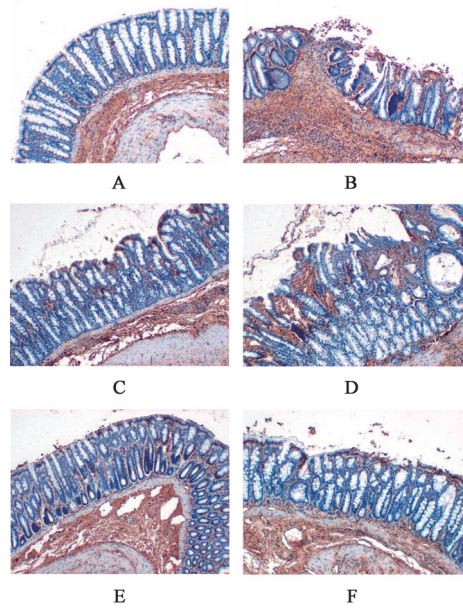


图2 芍药汤对UC大鼠结肠组织IL-17蛋白表达的影响(免疫组化,×100)

Fig. 2 Effect of Shaoyao tang on expression of IL-17 protein in colon tissue of UC rats (IHC, ×100)

淋巴细胞显著升高( $P<0.01$ ),CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>(Treg)/CD4<sup>+</sup>淋巴细胞显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>(Th17)/CD4<sup>+</sup>淋巴细胞降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>(Treg)/CD4<sup>+</sup>淋巴细胞升高( $P<0.01$ );与芍药汤低剂量组比较,芍药汤

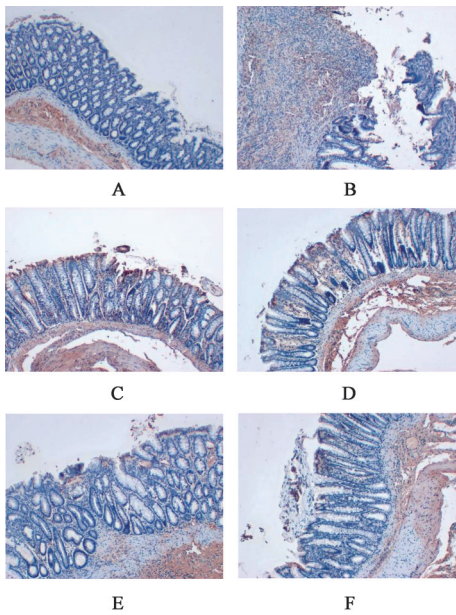


图3 芍药汤对UC大鼠结肠组织TGF-β<sub>1</sub>蛋白表达的影响(免疫组化, ×100)

Fig. 3 Effect of Shaoyaotang on expression level of TGF-β<sub>1</sub> protein in colon tissue of UC rats (IHC, ×100)

表1 芍药汤对UC大鼠结肠组织IL-17、TGF-β<sub>1</sub>蛋白表达的影响(̄x±s, n=8)

Table 1 Effect of Shaoyaotang on protein expression of IL-17 and TGF-β<sub>1</sub> in rat colon tissue (̄x±s, n=8)

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IL-17	TGF-β <sub>1</sub>
空白组		0.012±0.009	0.010 9±0.002 4
模型组		0.028±0.010 <sup>1)</sup>	0.005 6±0.001 6 <sup>1)</sup>
美沙拉嗪组	0.42	0.019±0.008 <sup>3)</sup>	0.007 4±0.002 4 <sup>3,4)</sup>
芍药汤低剂量组	11.1	0.020±0.009 <sup>3)</sup>	0.006 9±0.001 3 <sup>3)</sup>
芍药汤中剂量组	22.2	0.018±0.004 <sup>3,4)</sup>	0.007 1±0.001 8 <sup>3)</sup>
芍药汤高剂量组	44.4	0.014±0.005 <sup>3,5)</sup>	0.008 2±0.002 0 <sup>3,5)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.01;与模型组比较<sup>2)</sup>P<0.05,<sup>3)</sup>P<0.01;与芍药汤低剂量组比较<sup>4)</sup>P<0.05,<sup>5)</sup>P<0.01(表2和表3同)

中、高剂量组和美沙拉嗪组CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>(Th17)/CD4<sup>+</sup>淋巴细胞比值显著降低(P<0.01),CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>(Treg)/CD4<sup>+</sup>淋巴细胞比值显著升高,差异有显著统计学意义(P<0.01)。见表2。

**3.4 对UC大鼠结肠组织IL-6、STAT3蛋白表达的影响** 与空白组比较,模型组大鼠结肠组织IL-6、STAT3蛋白表达水平显著升高(P<0.01);与模型组比较,各给药组结肠组织IL-6、STAT3蛋白表达水平显著降低(P<0.01);与芍药汤低剂量组比较,美沙拉嗪组及芍药汤中、高剂量组结肠组织IL-6、STAT3蛋白表达水平明显降低(P<0.05, P<0.01)。见表3、图4。

表2 芍药汤对UC大鼠脾脏CD4<sup>+</sup>细胞室中Th17/Treg细胞比例的影响(̄x±s, n=8)

Table 2 Effect of Shaoyaotang on ratio of Th17/Treg cells in spleen CD4<sup>+</sup> cell compartment of UC rats (̄x±s, n=8)

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Th17	Treg
空白组		2.288±0.095	14.725±3.368
模型组		8.647±1.443 <sup>1)</sup>	2.241±0.880 <sup>1)</sup>
美沙拉嗪组	0.42	2.630±0.215 <sup>3,5)</sup>	11.201±0.850 <sup>3,5)</sup>
芍药汤低剂量组	11.1	4.271±0.466 <sup>3)</sup>	5.267±1.273 <sup>2)</sup>
芍药汤中剂量组	22.2	2.873±0.258 <sup>3,5)</sup>	8.348±1.866 <sup>3,5)</sup>
芍药汤高剂量组	44.4	2.571±0.146 <sup>3,5)</sup>	12.482±2.082 <sup>3,5)</sup>

表3 芍药汤对UC大鼠结肠组织IL-6、STAT3蛋白相对表达量的影响(̄x±s, n=8)

Table 3 Effect of Shaoyaotang on relative expression of IL-6 and STAT3 proteins in colon tissue of UC rats (̄x±s, n=8)

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IL-6/β-actin	STAT3/β-actin
空白组		0.109±0.003	0.176±0.007
模型组		0.303±0.004 <sup>1)</sup>	0.432±0.017 <sup>1)</sup>
美沙拉嗪组	0.42	0.181±0.009 <sup>3,4)</sup>	0.125±0.012 <sup>3,5)</sup>
芍药汤低剂量组	11.1	0.226±0.005 <sup>3)</sup>	0.284±0.022 <sup>3)</sup>
芍药汤中剂量组	22.2	0.196±0.004 <sup>3,4)</sup>	0.232±0.032 <sup>3,4)</sup>
芍药汤高剂量组	44.4	0.145±0.006 <sup>3,5)</sup>	0.189±0.015 <sup>3,5)</sup>

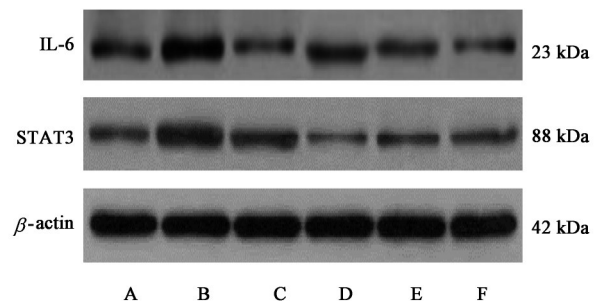


图4 各组大鼠结肠组织IL-6、STAT3蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of IL-6 and STAT3 protein expression in colon tissue of rats in each group

#### 4 讨论

UC以肠道免疫系统失衡、肠黏膜屏障的完整性受损为发病特点, Th17/Treg免疫轴比例失衡与UC免疫系统失衡直接相关<sup>[20-22]</sup>。Treg细胞主要通过分泌TGF-β、IL-10等抗炎细胞因子调节免疫细胞的活性,具有负性免疫调节作用,通过抑制炎症级联反应进而控制肠道炎症,维持外周免疫耐受<sup>[23-24]</sup>。Th17和Treg共享TGF-β介导的共同信号通路<sup>[25-26]</sup>。TGF-β可作用于Th细胞,激活STAT3通路,促进Th17细胞分化<sup>[27]</sup>;此外, TGF-β通过旁分泌作用于Treg细胞,导致Treg细胞内的STAT3通路被激活,

促进 Treg 细胞的募集,促进免疫耐受<sup>[28]</sup>。

UC 湿热内蕴证临床常见,其实质可能为湿热胶结,潜伏于内,致“湿热伏邪”<sup>[29]</sup>。结合临床及前期研究,认为 UC 肠黏膜损伤、肠道免疫紊乱多是湿热伏邪致病的结果,祛除湿热伏邪既是“正-邪”斗争的过程,亦是维持肠黏膜屏障、稳定肠道免疫功能的过程。芍药汤治疗湿热内蕴证 UC 临床疗效肯定<sup>[30]</sup>。本实验发现,芍药汤可以显著改善结肠组织的组织病理学变化,并可明显降低结肠中 IL-17、TGF- $\beta$  蛋白表达,表明芍药汤可以减轻结肠炎症程度,调节肠道免疫功能。

研究证实,IL-6/STAT3 信号通路在 Th17 和 Treg 细胞的分化中起关键作用,IL-6 信号通路过度激活介导的 Th17 和 Treg 细胞失衡是 UC 的重要发病机制,抑制或阻断 IL-6/STAT3 信号通路可以有效防治 UC<sup>[31-33]</sup>。本研究发现,与空白组比较,模型组结肠 IL-6、STAT3 蛋白表达明显升高,脾 Treg/CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞比值明显降低,Th17/CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞明显升高。芍药汤中、高剂量不仅可以明显降低结肠 IL-6、STAT3 的蛋白表达,还可以明显降低 UC 大鼠脾脏中 Th17/CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞,升高 Treg/CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞比值。IL-6/STAT3 信号通路对 Th17 和 Treg 细胞的分化有很大影响,IL-6/STAT3 通路的过度激活可诱导肠道幼稚 T 细胞中 ROR- $\gamma$ t(Th17 转录因子)表达,并诱导 Treg 细胞转录因子 FoxP3 过度表达减少对 ROR- $\gamma$ t 的抑制,这将促使幼稚 T 细胞向 Th17 分化,从而导致 Th17/Treg 细胞失衡<sup>[9-10]</sup>。

综上所述,芍药汤可以调节湿热内蕴证 UC 肠道免疫功能,减轻肠道炎症,其作用机制可能是通过下调促炎因子 IL-6,抑制 IL-6/STAT3 信号通路的过度表达,进而促使 Th17/Treg 恢复平衡,这为进一步探讨芍药汤治疗 UC 的机制提供了参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] YIN Y, LIU K, LI G. Protective effect of prim-O-glucosylcimifugin on ulcerative colitis and its mechanism[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 882924.  
[2] MIAO Z, CHEN L, FENG H, et al. Baitouweng decoction ameliorates ulcerative colitis in mice partially attributed to regulating Th17/Treg balance and restoring intestinal epithelial barrier [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 11: 531117.  
[3] ZHU Y, YANG S, ZHAO N, et al. CXCL8 chemokine in ulcerative colitis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021,

138: 111427.

[4] 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.  
[5] FAN Y, FAN Y, LIU K, et al. Edible bird's nest ameliorates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in C57BL/6J mice by restoring the Th17/Treg cell balance [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 632602.  
[6] LI K, DONG J, GE D, et al. The effects of sishen wan on T cell responses in mice models of ulcerative colitis induced by dextran sodium sulfate [J]. *eCAM*, 2021, doi:10.1155/2021/9957709.  
[7] SHENG Y, WU T, DAI Y, et al. The effect of 6-gingerol on inflammatory response and Th17/Treg balance in dss-induced ulcerative colitis mice [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(7): 442.  
[8] LI XH, SUN LJ, CHEN L, et al. Upregulation of microRNA-219-5p relieves ulcerative colitis through balancing the differentiation of Treg/Th17 cells [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2020, 32(7): 813-820.  
[9] LAI H, YANG Z, LOU Z, et al. Root extract of *lindera aggregata* (sims) kosterm. modulates the Th17/Treg balance to attenuate dss-induced colitis in mice by IL-6/STAT3 signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 615506.  
[10] WEI C, WANG J Y, XIONG F, et al. Curcumin ameliorates DSS-induced colitis in mice by regulating the Treg/Th17 signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(1): 34.  
[11] ZHU L, GU P, SHEN H. Protective effects of berberine hydrochloride on DSS-induced ulcerative colitis in rats [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 68: 242-251.  
[12] CHEN F, YIN Y T, ZHAO H M, et al. Sishen pill treatment of dss-induced colitis via regulating interaction with inflammatory dendritic cells and gut microbiota [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 801.  
[13] 吴东升,曹晖,张彧,等. 芍药汤通过抑制 HIF-1 $\alpha$  调节 Th17/Treg 平衡治疗溃疡性结肠炎 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(16): 9-15.  
[14] 曹晖,吴东升,张彧,等. 基于高通量测序技术研究芍药汤对溃疡性结肠炎大鼠肠道菌群的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2021, 28(1): 61-66.  
[15] 曹晖,吴东升,张彧,等. 芍药汤对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织病理变化及免疫功能的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2019, 26(6): 59-63.  
[16] 吴东升,曹晖,张彧,等. 芍药汤对溃疡性结肠炎大鼠

- 肠黏膜免疫屏障的干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(9): 6-11.
- [17] XU M, DUAN X 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.
- [18] XUAN Q C, XIANG Y L, SHI I L. Baitouweng decoction alleviates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis by regulating intestinal microbiota and the IL-6/STAT3 signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 265: 113357.
- [19] 楼伟, 王伟东, 曹生辉. 芍药汤加减治疗溃疡性结肠炎效果及对 YKL-40、IL-17 变化的研究[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(1): 19-21.
- [20] 徐胜艳, 胡响当, 杨宗亮, 等. 黄芩甲苷对结肠炎小鼠的抑炎作用及对外周血 Th17 细胞比例的影响研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(2): 469-475.
- [21] FAN L, QI Y, QU S, et al. Adolescentis ameliorates chronic colitis by regulating Treg/Th2 response and gut microbiota remodeling [J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1-17.
- [22] 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.
- [23] KHAN I, ULLAH N, ZHA L, et al. Alteration of gut microbiota in inflammatory bowel disease (IBD): Cause or consequence? IBD treatment targeting the gut microbiome[J]. Pathogens, 2019, 8(3): 126.
- [24] AHLAWAT S, KUMAR P, MOHAN H, et al. Inflammatory bowel disease: Tri-directional relationship between microbiota, immune system and intestinal epithelium [J]. Crit Rev Microbiol, 2021, 47(2): 254-273.
- [25] XU H, WU L, NGUYEN H H, et al. Arkadia-SKI/SnoN signaling differentially regulates TGF- $\beta$ -induced iTreg and Th17 cell differentiation [J]. J Exp Med, 2021, 218(11): e20210777.
- [26] RAPAPORT A S, OUYANG W. TRIMming TGF- $\beta$  signals in Th17 cells [J]. J Exp Med, 2018, 215(7): 1775-1776.
- [27] 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.
- [28] BAYIK D, LATHIA J D. Cancer stem cell-immune cell crosstalk in tumour progression [J]. Nat Rev Cancer, 2021, 21(8): 526-536.
- [29] 郭星, 田云, 王延秋, 等. 杜晓泉运用湿热伏邪理论辨治溃疡性结肠炎临床经验[J]. 江苏中医药, 2020, 52(8): 24-27.
- [30] 姚承佼, 李奕霖, 罗利红, 等. 芍药汤调控 Th17/Treg 细胞平衡改善大肠湿热证溃疡性结肠炎炎症反应的机制研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2021, 23(8): 2635-2642.
- [31] 陈光华, 陈教华, 张磊昌. 姜黄素通过 IL-6/STAT3 信号通路调控 Th17/Treg 平衡治疗溃疡性结肠炎[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(11): 2092-2097, 2102.
- [32] 张婷, 施敏, 廖陈敏, 等. 痛泻要方治疗溃疡性结肠炎的作用机制研究进展[J]. 世界中医药, 2021, 16(10): 1643-1648.
- [33] 朱茜, 龙再菊. 基于网络药理学探讨大黄牡丹汤治疗溃疡性结肠炎的作用机制[J]. 世界中医药, 2021, 16(12): 1775-1780.

[责任编辑 周冰冰]