

· 论著 ·

实验性结肠炎大鼠树突状细胞表型的变化及黄芪多糖的作用

戴佳原 高永健 朱峰

【摘要】 目的 观察黄芪多糖 (APS) 对 2,4,6-三硝基苯磺酸 (TNBS) 诱导的实验性结肠炎大鼠肠道炎症及树突状细胞 (DCs) 的作用。**方法** 44 只雄性 SD 大鼠用简单随机抽样法分为 4 组 ($n=11$): 空白对照组、TNBS 模型组、APS 治疗组、5-氨基水杨酸 (5-ASA) 治疗组。除空白对照组外, 其余 3 组均给予 TNBS 灌肠造模。造模后第 2 天, APS 治疗组和 5-ASA 治疗组分别给予 APS ($0.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 和 5-ASA ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 灌胃治疗 10 d。治疗结束后处死大鼠取材。对大鼠结肠炎症进行评估, 包括疾病活动指数 (DAI) 评分、大体形态损伤评分、病理组织学评分和髓过氧化物酶 (MPO) 活性测定; 流式细胞仪检测 DCs 表面标志 MHC II 和 CD86 的表达。**结果** APS 治疗组较 TNBS 组大鼠的 DAI 评分 ($P=0.007$)、大体形态损伤评分 ($P=0.017$)、病理组织学评分 ($P=0.016$) 均显著降低, MPO 活性亦下降, 但差异无统计学意义 ($P=0.183$)。TNBS 模型组大鼠肠系膜淋巴结 DCs 表面标志 MHC II 和 CD86 的表达率较空白对照组 ($P=0.005$, $P=0.008$)、APS 治疗组 ($P=0.023$, $P=0.018$) 及 5-ASA 治疗组 ($P=0.017$, $P=0.013$) 均显著升高。**结论** APS 治疗可部分缓解 TNBS 诱导的大鼠实验性结肠炎, 下调肠系膜淋巴结中活化的 DCs。

【关键词】 2,4,6-三硝基苯磺酸; 结肠炎; 黄芪多糖; 树突状细胞; 炎症性肠病

【中图分类号】 R574.62

【文献标志码】 A

【文章编号】 1674-635X(2011)02-0093-05

Modulation of dendritic cells phenotype by Astragalus polysaccharides in experimental colitis in rats

DAI Jia-yuan*, GAO Yong-jian, ZHU Feng. *Department of Gastroenterology, PUMC Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100730, China

Corresponding author: ZHU Feng, E-mail: zhufeng67@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Astragalus polysaccharides (APS) on 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)-induced colitis in rats and on dendritic cells (DCs) in mesenteric lymph nodes.

Methods Forty-four male Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups ($n=11$) using simple random sampling: normal control group, TNBS group, APS group, and 5-aminosalicylic acid (5-ASA) group. Experimental colitis was induced in rats by TNBS enema in the last three groups. Rats in APS and 5-ASA groups were treated by gavage with APS ($0.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and 5-ASA ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) on the 10 consecutive days following TNBS administration. The rats were then sacrificed and the colonic inflammatory scores of rats were measured, including the scores of disease activity index (DAI), macroscopic lesions, and histological damages, as well as the activity of myeloperoxidase (MPO). The expressions of major histocompatibility complex class II (MHC II) and costimulatory molecule CD86 on DCs were determined by flow cytometry. **Results** Compared with the TNBS group, APS group had significantly decreased scores of DAI ($P=0.007$), macroscopic lesions ($P=0.017$), and histological damages ($P=0.016$). Moreover, its level of the activity of MPO dropped but without statistical significance ($P=0.183$). TNBS group had significantly higher expressions of MHC II and CD86 molecules on DCs than the normal control group ($P=0.005$, $P=0.008$), APS group ($P=0.023$, $P=0.018$), and 5-ASA group ($P=0.017$, $P=0.013$). **Conclusion** APS may attenuate TNBS-induced colitis in rats and down-regulate the activation of DCs in mesenteric lymph nodes.

【Key words】 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid; Colitis; Astragalus polysaccharides; Dendritic cells; Inflammatory bowel disease

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 可能是遗传因素和环境因素共同作用导致肠道黏膜对肠道菌群免疫反应失常而引起的慢性非特异性炎症^[1], 具体发病机制尚不清楚。树突状细胞 (dendritic cells, DCs) 是目前所知功能最强的抗原提呈细胞, 在抗原富集的肠道环境中起着调节免疫应答的重要作用, 这种调节功能缺陷可能导致 IBD。

营养不良在 IBD 患者中多见^[2], 营养支持是 IBD 的重要治疗手段之一^[3]。动物实验证实小剂量黄芪多糖 (Astragalus polysaccharides, APS) 对 2,4,6-三硝基苯磺酸 (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS) 诱导的大鼠实验性结肠炎有一定治疗效果^[4]。本研究使用 TNBS 诱导的大鼠 IBD 模型, 观察 APS 对大鼠实验性结肠炎的疗效及肠系膜淋巴结中 DCs 表型的变化, 旨在探讨 IBD 的免疫学发病机制, 为寻找一种新型的肠内营养添加剂应用于 IBD 的治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

TNBS (Sigma 公司, 5% W/V 水溶液, 批号: 128K5001); APS (陕西森弗生物技术有限公司, 纯度 90%, 批号: HQ090430); 5-氨基水杨酸 (5-aminosalicylic acid, 5-ASA, 美沙拉嗪, 深圳康哲药业有限公司)。

1.2 动物及分组

雄性 SD 大鼠 44 只, 6~8 周龄, 体重 180~220 g, 由北京维通利华实验动物有限公司提供。动物于中国医学科学院阜外心血管病医院实验动物中心 SPF 级实验室饲养, 在实验前适应性饲养 1 周, 用简单随机抽样法分为 4 组 ($n=11$): 空白对照组、TNBS 模型组、APS 治疗组和 5-ASA 治疗组。每次实验每组各取 1 只大鼠。

1.3 结肠炎模型的建立和药物干预

除空白对照组外, 所有大鼠均根据 Morris 等^[5]的方法建立 TNBS 诱导的结肠炎模型。将 TNBS 30 mg 和 50% 乙醇溶液 0.25 ml 混合后注入大鼠肠道。造模后第 2 天, APS 治疗组和 5-ASA 治疗组大鼠分别给予 APS ($0.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 和 5-ASA ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 灌胃治疗 10 d, 空白对照组和 TNBS 模型组大鼠给予正常饮食。10 d 后无菌取出大鼠肠系膜淋巴结, 采

集结肠组织, 处死大鼠。本研究通过中国医学科学院阜外心血管病医院动物伦理中心审核批准。

1.4 造模后大鼠结肠炎症情况评估

根据 Cooper 等^[6]的方法进行疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分, 由体重减轻百分比和大便情况的分数相加而得。取距大鼠肛门约 3 cm 处结肠至回盲部结肠, 根据 Wallace 和 Keenan^[7]标准进行大体形态损伤评分。取结肠组织 1 cm, 10% 中性福尔马林固定, HE 染色, 根据 Sykes 等^[8]标准进行病理组织学评分。取距肛门约 4 cm 处结肠组织约 1 cm, -80°C 冰箱保存, 1 周内检测髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 活性, 以每克组织在 37°C 的反应体系中分解 1 mol 的 H_2O_2 为 1 个酶活力单位。进行 DAI 评分、大体形态损伤评分、病理组织学评分、MPO 活性测定的数据统计时均除外死亡组次的大鼠。

1.5 肠系膜淋巴结中 DCs 表型的检测

1.5.1 免疫磁珠分离 DCs

无菌取出大鼠肠系膜淋巴结, 制备单细胞悬液。根据 Brennan 等^[9]的方法, 采用 MiniMACS (Miltenyi Biotec, 德国) 免疫磁性分离系统分离大鼠肠系膜淋巴结 DCs。共 7 个组次的大鼠进行了免疫磁珠分离 DCs。

1.5.2 DCs 表面标志 MHC II 和 CD86 的表达

将分离后的细胞计数, 每只大鼠细胞悬液分两管, 各管分别加入 PE-OX62 (serotec 公司, 英国)、FITC-MHC II (eBioscience 公司, 美国) 及 PE-OX62、FITC-CD86 (eBioscience 公司, 美国), 然后 4°C 孵育 30 min, 1% 多聚甲醛固定, 24 h 内流式细胞仪检测。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示, 组间数据比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模后一般情况

大鼠在造模后第 1 天均出现少动, 皮毛不光滑, 体重减轻, 肛周皮毛被粪便污染, 腹泻、血便等现象, 第 3 天时达到高峰。造模后有 6 只大鼠死亡 (TNBS 模型组 3 只, APS 治疗组 2 只, 5-ASA 治疗

组 1 只), 这 6 只大鼠明显消瘦、腹部膨隆, 解剖见距肛门约 8 cm 处结肠明显狭窄, 与周围组织重度黏连。

2.2 DAI 评分

所有造模大鼠均出现体重减轻, TNBS 模型组、APS 治疗组和 5-ASA 治疗组与空白对照组相比体重变化差异均有统计学意义 ($P=0.019$, $P=0.027$, $P=0.033$), 但 TNBS 模型组与 APS 和 5-ASA 治疗组间差异无统计学意义 ($P=0.077$, $P=0.080$)。10 d 内 TNBS 模型组 DAI 评分显著高于 APS 治疗组和 5-ASA 治疗组 ($P=0.007$, $P=0.001$) (表 1)。

2.3 大体形态损伤及评分

空白对照组大鼠结肠皱襞纹理清晰, 黏膜光滑。TNBS 模型组大鼠结肠可见 1~2 处活动期溃疡, 部分大鼠可见透壁性溃疡, 肠壁节段性充血、水肿、增厚, 结肠与周围组织不同程度黏连。APS 治疗组和 5-ASA 治疗组大体损伤评分较 TNBS 模型组下降, 且差异有统计学意义 ($P=0.017$, $P=0.011$) (表 1)。

2.4 病理组织学改变及评分

空白对照组大鼠结肠结构清晰, 上皮完整, 固有层杯状细胞丰富。TNBS 模型组大鼠结肠全层普遍增

厚, 腺管扭曲, 杯状细胞丢失, 固有层增厚, 有大量中性粒细胞、淋巴细胞浸润。APS 治疗组和 5-ASA 治疗组较 TNBS 模型组病理学评分有所下降 ($P=0.016$, $P=0.001$), 两治疗组间差异无统计学意义 ($P=0.274$) (表 1)。

2.5 结肠组织 MPO 活性

TNBS 模型组 MPO 活性显著高于空白对照组和 5-ASA 治疗组 ($P=0.004$, $P=0.005$)。APS 治疗组 MPO 活性较 TNBS 模型组有所下降, 但两组间差异无统计学意义 ($P=0.183$) (表 1)。

2.6 肠系膜淋巴结 DCs 表面分子 MHC II 和 CD86 的表达

空白对照组大鼠 DCs 表面分子 MHC II 和 CD86 的表达率较低, TNBS 模型组表达率均显著高于空白对照组 ($P=0.005$, $P=0.008$)。APS 治疗组 MHC II 和 CD86 表达率较 TNBS 模型组明显降低 ($P=0.023$, $P=0.018$), 但仍高于空白对照组 ($P=0.006$, $P=0.001$); 5-ASA 治疗组 MHC II 和 CD86 表达率较 TNBS 模型组亦明显降低 ($P=0.017$, $P=0.013$), 高于空白对照组 ($P=0.074$, $P=0.020$) (表 2, 图 1)。

表 1 各组大鼠 DAI、大体损伤、组织病理学评分及 MPO 活性 ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

Table 1	Scores of DAI, macroscopic damage, histological damage, and MPO activity in rats of four groups ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)			
组别	DAI 评分	大体损伤评分	组织病理学评分	MPO (U/g 组织)
空白对照组	0	0	0	0.23 $\pm$ 0.10 ^b
TNBS 模型组	32.13 $\pm$ 4.16	4.00 $\pm$ 1.30	3.25 $\pm$ 0.89	0.57 $\pm$ 0.34
APS 治疗组	26.50 $\pm$ 3.18 ^b	2.13 $\pm$ 1.13 ^a	2.38 $\pm$ 0.52 ^a	0.43 $\pm$ 0.22
5-ASA 治疗组	24.38 $\pm$ 3.42 ^b	1.13 $\pm$ 0.64 ^a	2.00 $\pm$ 0.53 ^b	0.25 $\pm$ 0.11 ^b

注: DAI: 疾病活动指数; MPO: 髓过氧化物酶; TNBS: 2,4,6-三硝基苯磺酸; APS: 黄芪多糖; 5-ASA: 5-氨基水杨酸; 与 TNBS 模型组比较, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$

表 2 各组大鼠肠系膜 DCs 表面分子 MHC II 和 CD86 的表达率 ($n=7$, %, $\bar{x} \pm s$)

Table 2	Expression rates of MHC II and CD86 on DCs in rats of four groups ($n=7$, %, $\bar{x} \pm s$)	
组别	MHC II	CD86
空白对照组	27.09 $\pm$ 6.59 ^b	22.96 $\pm$ 6.70 ^b
TNBS 模型组	55.43 $\pm$ 5.72	50.37 $\pm$ 7.42
APS 治疗组	37.10 $\pm$ 7.58 ^a	35.47 $\pm$ 5.28 ^a
5-ASA 治疗组	33.29 $\pm$ 12.24 ^a	31.44 $\pm$ 6.88 ^a

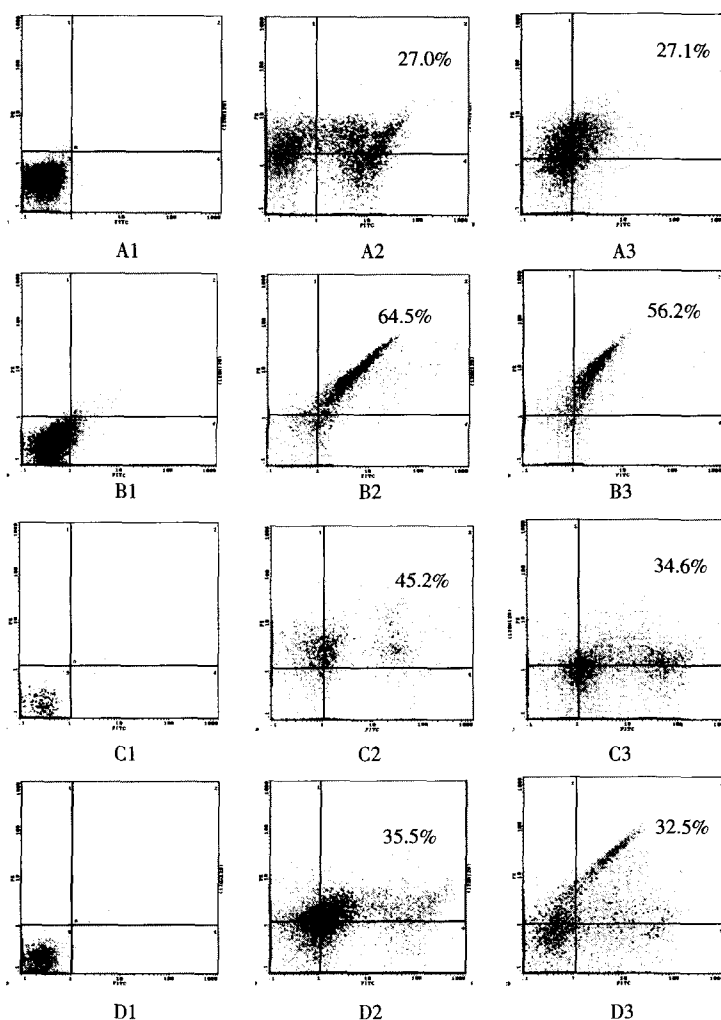
注: DCs: 树突状细胞; 与 TNBS 模型组比较, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$

3 讨论

近年来, IBD 的发病率呈上升趋势, 其病因及

确切的发病机制尚不清楚, 免疫调节异常在其中占有重要地位。TNBS 诱导的大鼠实验性结肠炎是一种细胞免疫法动物模型^[10], 目前已广泛应用于人类肠道病变免疫发病机制的研究。本研究中, TNBS 造模大鼠在临床症状上出现腹泻、血便、体重下降; 肠道组织的 MPO 活性显著升高; 肠道大体可见糜烂、溃疡、组织黏连; 组织病理学可见肠壁坏死、炎性细胞浸润肠壁全层。以上结果均表明, 本研究成功诱导了 TNBS 实验性结肠炎, 炎症为急性损伤期。

越来越多的研究证实, 中药对 IBD 的治疗有积极意义。黄芪是一种常用中药, 含有多种生物活性物质, 其中多糖的免疫活性尤为突出。本研究组之



注: A1~3: 空白对照组; B1~3: TNBS 模型组; C1~3: APS 治疗组; D1~3: 5-ASA 治疗组; A1、B1、C1、D1: 阴性对照; A2、B2、C2、D2: MHC II; A3、B3、C3、D3: CD86

图 1 各组大鼠肠系膜 DCs 表面分子 MHC II 和 CD86 的表达率

Fig 1 Expression rates of MHC II and CD86 on DCs in four groups

前的研究结果表明, 剂量为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的 APS 对肠道炎症有一定治疗作用, 而 APS 剂量为 $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 时则可轻度加重肠道炎症^[4]。本研究在之前研究的基础上, 选择 APS 的治疗剂量为 $0.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 在结肠炎症急性期, 可见大鼠的一般情况较 TNBS 模型组好转, 大体形态损伤评分、病理组织学评分及 MPO 活性均较 TNBS 模型组有所下降。笔者认为 APS $0.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 对急性期大鼠实验性结肠炎有一定治疗作用, 效果略优于 $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的剂量。本研究选择 5-ASA 作为阳性对照, 发现该组大鼠结肠炎症各项评分及 MPO 活性均较 TNBS 模型组显著下降, 且较 APS 治疗组有所降低, 提示 5-ASA 对大鼠实验性结肠炎急性期的治疗效果优于 APS。这说明在急性肠道免疫性炎症

的治疗中 5-ASA 仍为一线药物, 而 APS 有望成为二线辅助治疗药物。

肠道 DCs 通过调节肠道天然和获得性免疫在保护肠黏膜屏障中发挥着重要作用。在抗原的刺激活化下, DCs 从未成熟发育至成熟, 发挥其抗原呈递功能, 表面逐渐高表达 MHC II、CD86 等标志物分子, 诱发并加重肠道炎症。因此, 检测这些表面分子的表达, 可反映肠道免疫炎症反应的严重程度。另外, 由于肠系膜淋巴结中大部分 DCs 来源于肠道固有层, 故对肠系膜淋巴结 DCs 进行检测, 能反映肠道 DCs 的变化。本研究应用 Anti-rat (OX62) 磁珠快速有效地分离大鼠肠系膜淋巴结中的 DCs 并进行分选后流式检测^[11], 结果显示 TNBS 模型组大鼠 DCs 表面标志 MHC II 和 CD86 的表达率较空白对照组

均显著升高,提示 DCs 的成熟度增高且发挥了抗原呈递功能。给予 APS $0.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 后, MHC II 和 CD86 的表达率较模型组下降,提示 APS 发挥了免疫调节剂的作用,减弱了 DCs 的抗原呈递功能,抑制了体内过度激活的免疫反应,减轻了肠道的炎症损伤。作为治疗对照药物 5-ASA 也具有同样的功效。以上结果表明,在肠道的炎症反应中,DCs 的确承担着重要的免疫调节作用,有望成为今后 IBD 治疗的重要靶向分子。

APS 作为一种免疫调节剂,不同剂量发挥的调节作用有所不同。国内研究 APS 对红斑狼疮小鼠抗磷脂抗体影响的结果显示,APS 25 mg/kg 组小鼠抗磷脂抗体水平比对照组升高,而 50 mg/kg 组小鼠的抗磷脂抗体水平比对照组显著降低^[12]。骆殊等^[13]用浓度不等的 APS 体外刺激 DCs,发现随剂量增加,APS 刺激 DCs 表面标志的表达逐渐增加,当 APS 增加到一定剂量时,则下调其表面标志的表达,抑制 DCs 成熟和增殖。本研究组前期的研究结果证实不同剂量 APS 发挥的免疫调节作用不同^[4]。本研究选用高纯度(90%)的 APS,治疗剂量下在体内发挥免疫调节作用,抑制了 DCs 活化及过度激活的免疫反应。

IBD 患者因摄食不足、肠道吸收障碍、能量消耗等常伴营养不良。肠内营养(enteral nutrition, EN)在克罗恩病的诱导和维持缓解治疗中均有较好的作用。EN 添加剂应用于 IBD 的治疗目前尚缺乏循证证据支持。特殊的 EN 配方(含谷氨酰胺、 ω -3 脂肪酸、转化生长因子- β 等添加剂)与普通 EN 配方相比,对活动期克罗恩病患者的结局无显著影响,我国克罗恩病营养治疗指南和规范中不推荐对活动期克罗恩病患者常规使用特殊 EN 配方^[2]。本研究证实,水溶性良好的中药 APS 具有免疫调节作用,对大鼠急性期实验性结肠炎有一定的治疗作用,有望在今后成为新型 EN 添加剂应用于 IBD 的治疗。

综上所述,适当剂量的 APS 可以通过调节肠道

DCs 抗原呈递的免疫功能,缓解 TNBS 诱导的大鼠实验性结肠炎。

参 考 文 献

- [1] Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. *Nature*, 2007, 448(7152):427-434.
- [2] 朱峰, 钱家鸣, 韦军民. 炎症性肠病 [J]. *中国临床营养杂志*, 2008, 16(2):67-69.
- [3] 朱峰. 克罗恩病内科治疗与营养支持的作用 [J]. *中华临床营养杂志*, 2010, 18(4):204-208.
- [4] 高永健, 朱峰, 钱家鸣. 黄芪多糖对 2, 4, 6-三硝基苯磺酸诱导的大鼠结肠炎的作用 [J]. *中华临床营养杂志*, 2010, 18(4):209-213.
- [5] Morris GP, Beck PL, Herridge MS, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon [J]. *Gastroenterology*, 1989, 96(3):795-803.
- [6] Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis [J]. *Lab Invest*, 1993, 69(2):238-249.
- [7] Wallace JL, Keenan CM. An orally active inhibitor of leukotriene synthesis accelerates healing in a rat model of colitis [J]. *Am J Physiol*, 1990, 258(4Pt1):G527-G534.
- [8] Sykes AP, Bhogal R, Brampton C, et al. The effect of an inhibitor of matrix metalloproteinases on colonic inflammation in a trinitrobenzenesulphonic acid rat model of inflammatory bowel disease [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 1999, 13(11):1535-1542.
- [9] Brenan M, Rees DJ. Sequence analysis of rat integrin α E1 and α E2 subunits: tissue expression reveals phenotypic similarities between intraepithelial lymphocytes and dendritic cells in lymph [J]. *Eur J Immunol*, 2000, 30(6):1527-1537.
- [10] 朱峰, 钱家鸣, 潘国宗. 细胞免疫反应性炎症性肠病动物模型的建立 [J]. *中国医学科学院学报*, 1998, 20(4):271-278.
- [11] Brenan M, Puklavec M. The MRC OX-62 antigen: a useful marker in the purification of rat veiled cells with the biochemical properties of an integrin [J]. *J Exp Med*, 1992, 175(6):1457-1465.
- [12] 王晓琴. 黄芪多糖对红斑狼疮小鼠抗磷脂抗体、尿蛋白及生存时间影响的研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2003.
- [13] 骆殊, 邵佳. 黄芪多糖对树突状细胞免疫活性的影响 [J]. *中医药临床杂志*, 2009, 21(1):66-69.

(收稿日期: 2011-01-03)