

• 论著—实验研究 •

# 清肠温中方对溃疡性结肠炎小鼠组织驻留记忆 CD4<sup>+</sup>T 细胞的调控作用\*

王木源<sup>1</sup> 李军祥<sup>1</sup> 卢心毓<sup>1</sup> 袁亚利<sup>1</sup> 张文基<sup>1</sup> 云逸飞<sup>1</sup> 邢韵洪<sup>1</sup> 毛堂友<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的:探究清肠温中方对溃疡性结肠炎(UC)小鼠组织驻留记忆 CD4<sup>+</sup>T 细胞(CD4<sup>+</sup>T<sub>RM</sub> 细胞)的调控作用,为中医药治疗 UC 提供新的理论依据。方法:将 SPF 级健康雌性 C57BL/6 小鼠随机分为空白组、模型组、清肠温中方低剂量组、清肠温中方中剂量组、清肠温中方高剂量组。空白组小鼠全程自由进食饮水,模型组和清肠温中方低、中、高各剂量组均采用自由饮用 2.5 % (w/v) DSS 溶液 7 d 复制 UC 模型,同时模型组给予去离子水灌胃,清肠温中方各剂量组给予相应浓度的中药干预 1 周,期间每日观察小鼠一般情况,测量体重、检测便潜血、记录粪便性状,计算疾病活动指数(DAI)。干预结束后留取结肠组织,制备单细胞混悬液,流式细胞术检测 CD4<sup>+</sup>T<sub>RM</sub> 细胞的水平,应用 RT-qPCR 测定葡萄糖转运蛋白 *Glut1*、*Glut2*、*Glut4* mRNA 及糖酵解相关因子 *HK2*、*PKM2*、*G6PC*、*LDHA*、*LepR*、*HIF-1α* mRNA 的含量。结果:与空白组比较,UC 小鼠呈现明显的肠道炎症,表现出不同程度的便血、腹泻、体重下降等,清肠温中方各剂量组小鼠体重较模型组明显升高( $P < 0.05$ );模型组小鼠 DAI 较空白组升高明显( $P < 0.05$ ),清肠温中方各剂量组小鼠 DAI 下降明显( $P < 0.05$ )。机制方面,模型组小鼠结肠固有层 CD4<sup>+</sup>T<sub>RM</sub> 细胞含量均明显高于空白组( $P < 0.05$ ),而经清肠温中方干预后,CD4<sup>+</sup>T<sub>RM</sub> 细胞含量显著降低( $P < 0.05$ );模型组小鼠的 *Glut1*、*Glut2*、*Glut4*、*LepR*、*HIF-1α*、*HK2*、*PKM2*、*G6PC*、*LDHA* mRNA 水平较空白组升高( $P < 0.05$ )或有升高趋势,清肠温中方组所检测的 mRNA 较模型组降低( $P < 0.05$ )或有降低趋势。结论:清肠温中方可能通过抑制糖酵解代谢,从而调控 CD4<sup>+</sup>T<sub>RM</sub> 细胞免疫稳态,达到治疗 UC 的目的。

**[关键词]** 溃疡性结肠炎;清肠温中方;组织驻留记忆 CD4<sup>+</sup>T 细胞;免疫调控

DOI:10.3969/j.issn.1671-038X.2023.08.02

[中图分类号] R574.62 [文献标志码] A

## Regulation mechanism of Qingchang Wenzhong Decoction on tissue-resident memory CD4<sup>+</sup>T cells in mice with ulcerative colitis

WANG Muyuan<sup>1</sup> LI Junxiang<sup>1</sup> LU Xinyu<sup>1</sup> YUAN Yali<sup>1</sup> ZHANG Wenji<sup>1</sup>  
YUN Yifei<sup>1</sup> XING Yunqi<sup>1</sup> MAO Tangyou<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Gastroenterology, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100078, China; <sup>2</sup>Center for Experimental Medicine, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine)

Corresponding author: MAO Tangyou, E-mail: maotangyouqun@126.com

**Abstract Objective:** To explore the regulatory effect of Qingchang Wenzhong Decoction(QCWZD) on tissue-resident memory CD4<sup>+</sup>T cells(CD4<sup>+</sup>T<sub>RM</sub> cells) in mice with DSS-induced colitis. **Methods:** Healthy female C57BL/6 mice were randomly divided into control group, model group, QCWZD low-dose group, QCWZD medium-dose group, QCWZD high-dose group. Mice in control group were fed and watered freely throughout the whole process. Model group and doses group of QCWZD were used to replicate the UC model by freely drinking 2.5 % (w/v) DSS solution for 7 days. At the same time, model group was given deionized water gavage, each dose group of QCWZD were given the corresponding concentration of QCWZD intervention for 1 week. During this period, the mice were observed daily for general condition, weight measurement, detection of fecal occult blood, recording of fecal properties, and calculation of disease activity index(DAI). After the intervention, colonic

\*基金项目:首都卫生发展科研专项项目(No:首发 2022-4-4205);国家自然科学基金青年基金(No:81903990);中华中医药学会(2022-2024 年度)青年人才托举工程项目(No:CACM-2022-QNRC2-A02)

<sup>1</sup>北京中医药大学东方医院脾胃肝胆科(北京,100078)

<sup>2</sup>北京中医药大学东方医院实验医学中心

通信作者:毛堂友,E-mail:maotangyouqun@126.com

tissues were retained, single cell suspensions were prepared, and the levels of  $CD4^+ T_{RM}$  cells were detected by flow cytometry. Application of RT-qPCR for the determination of glucose transporter proteins *Glut1/2/4* mRNA and glycolysis-related *HK2* mRNA, *PKM2* mRNA, *G6PC* mRNA, *LDHA* mRNA, *LepR* mRNA, *HIF-1 $\alpha$*  mRNA. **Results:** Compared with control group, UC mice showed obvious intestinal inflammation, and exhibiting different degrees of blood in the stool, diarrhea and weight loss. The body weight of mice in each dose group of Chinese medicine were significantly higher than that of model group ( $P < 0.05$ ). The DAI of mice in model group was significantly higher than that of control group ( $P < 0.05$ ), and the DAI of mice in each dose group of the QCWZD decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Mechanistically, the content of  $CD4^+ T_{RM}$  cells in the lamina propria of mice in the model group were significantly higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ). While the  $CD4^+ T_{RM}$  cells content was significantly reduced ( $P < 0.05$ ) after the intervention with the QCWZD. The levels of *Glut1/2/4* mRNA, *LepR* mRNA, *HIF-1 $\alpha$*  mRNA, *HK2* mRNA, *PKM2* mRNA, *LDHA* mRNA, *G6PC* mRNA were increased ( $P < 0.05$ ) or tended to be decreased in model group mice compared with control group, and their mRNA detected in QCWZD group were decreased ( $P < 0.05$ ) or tended to be decreased compared with model group. **Conclusion:** QCWZD may be used to treat UC by inhibiting glycolytic metabolism, thereby regulating  $CD4^+ T_{RM}$  cells immune homeostasis.

**Key words** ulcerative colitis; Qingchang Wenzhong Decoction; tissue-resident memory  $CD4^+$  T cells; immunoregulation

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种主要累及黏膜及黏膜下层结肠、直肠的慢性非特异性炎症性疾病,其病程长,临床症状如腹痛腹泻、黏液脓血便等严重影响患者的生存质量<sup>[1-2]</sup>。目前 UC 治疗主要以 5-氨基水杨酸、糖皮质激素、免疫抑制剂和生物制剂等为主,但这些药物存在药物不耐受、不良反应明显、疗程长、复发率较高等问题<sup>[3-5]</sup>。相关临床回顾性研究发现接受生物制剂治疗的患者在停药后复发率可高达 54%<sup>[6]</sup>,抗肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 治疗的复发率为 38%<sup>[7]</sup>。故难治愈、易复发成为 UC 当前治疗的主要难点。组织驻留记忆  $CD4^+$  T 细胞 (tissue-resident memory T cells,  $CD4^+ T_{RM}$  细胞) 长期驻留在结肠固有层中,在无抗原刺激时处于静息状态;当再次遇到同种抗原时,  $CD4^+ T_{RM}$  细胞会迅速启动响应,发挥更快、更强的再次免疫应答效应,即“免疫记忆”。而  $CD4^+ T_{RM}$  细胞的过度激活,会导致免疫记忆功能紊乱,参与 UC 的发生发展。我们前期研究发现,清肠温中方可有效减轻 UC 患者的临床症状、修复患者肠黏膜损伤<sup>[8-9]</sup>,同时还能有效维持缓解期 UC 的长期缓解,防治 UC 的复发<sup>[10]</sup>,但具体机制尚不清楚。因此,本研究以  $CD4^+ T_{RM}$  细胞为切入点,进一步探讨清肠温中方治疗 UC 小鼠的免疫学机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

6~8 周的 SPF 级健康雌性 C57BL/6 小鼠,购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司,许可证号: SCXK(京)2019-0010。饲养于北京中医药大学东方医院 SPF 级动物房,12 h 光照/黑夜循环,温度 25℃,湿度 60%,自由摄食饮水饲养。

### 1.2 实验用药

本团队前期的临床试验<sup>[8-9]</sup>以及动物实验<sup>[11]</sup>

均采用清肠温中方配方颗粒对 UC 患者及小鼠具有明确的疗效,因此本次研究继续采用配方颗粒剂型。

药物组成:黄连 6 g,炮姜 10 g,青黛 3 g,苦参 9 g,三七 6 g,木香 6 g,地榆炭 15 g,炙甘草 6 g,购自北京中医药大学东方医院配方颗粒药房。

### 1.3 试剂及仪器

DSS (MW 36000-50000, MP Biomedicals), 便潜血试纸 (珠海贝索生物技术有限公司), RPMI1640 培养液 (Hyclone), FBS (Gibco), Percoll, 红细胞裂解液、1×PBS、双抗、Hank's、1MHepes、0.5MEDTA、1MDTT、胶原酶 III、牛血清白蛋白 (均购自索莱宝), 流式抗体  $CD4$ -PerCP (Biolegend)、 $CD69$ -PECy7 (Biolegend), Trizol 试剂 (Invitrogen), One Step TB Green PrimeScript<sup>®</sup>™ RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) (Takara), 流式细胞仪 (BD Biosciences), 7300 型实时荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems)。

### 1.4 造模及给药方法

SPF 级雌性 C56BL/6 小鼠适应性饲养 7 d 后,按体质量随机分为空白组、模型组、清肠温中方低剂量组 (0.36 g/kg)、清肠温中方中剂量组 (1.8 g/kg)、清肠温中方高剂量组 (9 g/kg)。空白组小鼠全程自由进食饮水,模型组、清肠温中方低剂量组、清肠温中方中剂量组、清肠温中方高剂量组均采用自由饮用 2.5% (w/v) DSS 溶液 7 d 复制 UC 模型,同时模型组给予去离子水灌胃,清肠温中方各剂量组给予相应浓度的中药干预 1 周,期间每日观察小鼠一般情况,测量体重、检测便潜血、记录粪便性状,计算疾病活动指数 (DAI)。

### 1.5 DAI

DAI = (体质量下降指数 + 粪便性状 + 粪便潜血) / 3,具体评价标准见表 1。

表1 疾病活动指数的评分标准<sup>[12]</sup>

评分项目	0	1	2	3	4
体重下降指数	无下降	>1%~5%	>5%~10%	>10%~15%	>15%
粪便性状	正常	/	松散	/	稀便
粪便潜血	无	/	阳性	/	肉眼血便

### 1.6 流式检测 UC 小鼠结肠固有层 CD4<sup>+</sup>T<sub>RM</sub> 细胞的含量

将小鼠全结肠去除脂肪组织及粪便,清洗、剪段后分别置于含有 20 mL 组织洗液(含 4% 500 mM EDTA)的 50 mL 离心管中,清洗后将组织剪成肉糜状,加入消化液(含 0.2% 胶原酶Ⅲ)进行消化,消化结束后使用注射器胶栓轻轻研碎组织,经 70 μm 细胞筛网过滤,离心后加入 5 mL 40% Percoll 混匀,以 22 °C 3 000 r/min 离心 25 min,经过裂红、重悬、封闭,以 4 °C 1 600 r/min 离心 5 min 后重悬细胞。加入 CD4、CD69 流式抗体,4 °C 避光孵育 40 min 进行细胞膜表面染色,洗涤离心后重悬细胞,进行流式细胞检测,并利用 FlowJo 对流式细胞术数据进行分析。

### 1.7 RT-qPCR 法测定 UC 小鼠结肠糖酵解相关基因的表达

按照试剂盒说明书步骤使用 Trizol 试剂(Invitrogen)从结肠中提取总 RNA。然后,使用 One Step TB Green PrimeScript<sup>®</sup>™ RT-PCR Kit II (Perfect Real Time)(Takara)在 7300 实时荧光定量 PCR 仪进行扩增反应,在温度为 42 °C 5 min、95 °C 10 s,然后在 95 °C 5 s、60 °C 31 s 的条件下循环 40 次,随后在 95 °C 15 s、60 °C 1 min、95 °C 15 s 的条件下进行熔解曲线分析。通过甘油三磷酸酯脱氢酶(GAPDH)对基因的相对表达归一化,根据公式  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算目的基因表达水平。引物序列见表 2。

表2 本实验所用引物序列

基因	上游(5'-3')	下游(5'-3')
GAPDH	CTTCCAGCCTTCCTTCCTTGG	AATGCCTGGGTACATGGTGG
LepR	GGTCCAGGTGAGGAGCAAGA	AAAGAAGCATTTCGATCCAACACTA
HIF-1α	GGGTACAAGAAACCACCCAT	GAGGCTGTGTCGACTGAGAA
Glut1	TCAACACGGCCTTCACTG	CACGATGCTCAGATAGGACATC
Glut2	TGTGCTGCTGGATAAATTCGCCTG	AACCATGAACCAAGGGATTGGACC
Glut4	GTAACCTCATTGTCGGCATGG	AGCTGAGATCTGGTCAAACG
HK2	TCGCCCTGCTTATTCACGGAG	CCATCCGGAGTTGACCTCAC
G6PC	GGTTCATCCTTGTGTCTGTG	GCTGTAGTAGTCGGTGTCC
PKM2	TGTCTGGAGAAACAGCCAAG	CGAATAGCTGCAAGTGGTAGA
LDHA	CGTCTCCCTGAAGTCTCTTAAC	TTCAGCTTGATCACCTCGTAG

### 1.8 统计学方法

应用 GraphPad prism 9 进行数据统计及绘图。计量资料以  $\bar{X} \pm S$  表示。组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠一般情况及行为表现观察

各组小鼠均良好耐受造模及药物干预。观察各组小鼠的行为表现,空白组小鼠无异常情况,精力充沛,善食好动,毛发光泽柔顺。与空白组比较,经 DSS 诱导的 UC 小鼠表现出明显的肠道症状,如不同程度的便血、腹泻、体重下降,并表现出精神不振、行动迟缓、食欲不佳、毛发暗淡、拱背聚群等现象。当给予清肠温中方后,小鼠的精神状态、行动表现、毛发暗淡程度、腹泻便血等症状较模型组

小鼠组明显减轻。

### 2.2 清肠温中方对 UC 小鼠体重的影响

与空白组比较,模型组小鼠体重明显下降( $P < 0.05$ );与模型组比较,清肠温中方各剂量组小鼠的体重明显升高( $P < 0.05$ )。见表 3、图 1。

表3 清肠温中方对 UC 小鼠体重的影响

分组	例数	$\bar{X} \pm S$ 体重/g
空白组	5	18.82 ± 0.47
模型组	5	13.56 ± 0.84 <sup>1)</sup>
清肠温中方低剂量组	4	14.55 ± 0.72 <sup>2)</sup>
清肠温中方中剂量组	5	15.74 ± 0.58 <sup>2)</sup>
清肠温中方高剂量组	4	15.33 ± 0.45 <sup>2)</sup>

与空白组比较,<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

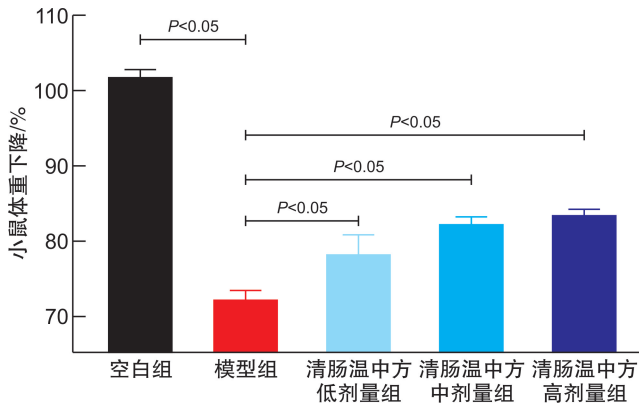


图 1 清肠温中方对各组小鼠体重的影响

### 2.3 清肠温中方对各组小鼠 DAI 的影响

与空白组比较,模型组小鼠 DAI 升高明显 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,清肠温中方低剂量组小鼠 DAI 差异无统计学意义,但可见下降的趋势,清肠温中方中剂量组、高剂量组小鼠 DAI 下降明显 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

### 2.4 清肠温中方对 UC 小鼠结肠 CD4<sup>+</sup>T<sub>RM</sub> 细胞调节作用

通过上述结果发现,清肠温中方高剂量组的小鼠在一般状况、体重及 DAI 方面,较其他剂量组的改善更为明显,因此本实验选用高剂量为优效剂

量,以进一步探讨其作用机制。我们收集小鼠结肠组织,制备单细胞混悬液,使用流式细胞术检测发现,模型组 CD4<sup>+</sup>T<sub>RM</sub> 细胞含量明显高于空白组 ( $P < 0.05$ ),清肠温中方组小鼠 CD4<sup>+</sup>T<sub>RM</sub> 细胞含量较模型组含量明显下降 ( $P < 0.05$ )。见表 5、图 2。

表 4 清肠温中方对 UC 小鼠 DAI 评分的影响

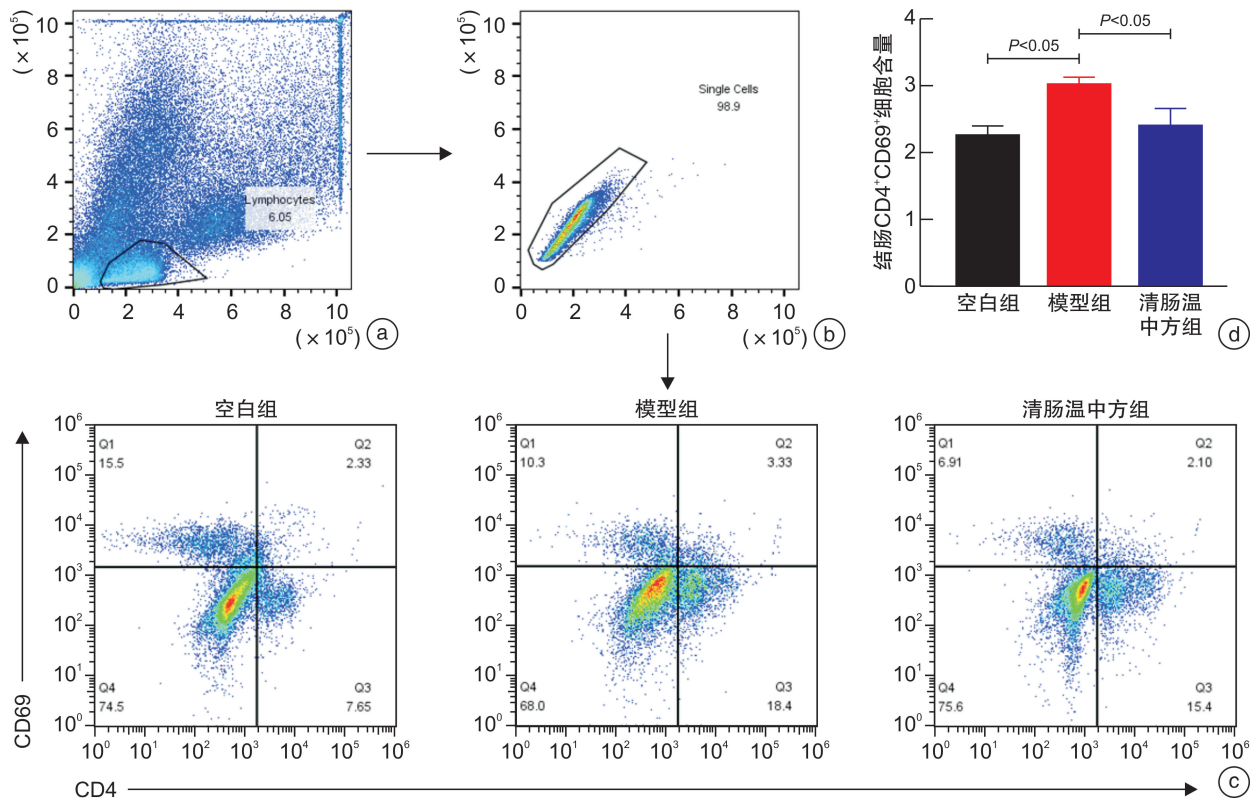
分组	例数	$\bar{X} \pm S$
		DAI
空白组	5	0
模型组	5	3.600 ± 0.163 <sup>1)</sup>
清肠温中方低剂量组	4	3.000 ± 0.136
清肠温中方中剂量组	5	2.267 ± 0.386 <sup>2)</sup>
清肠温中方高剂量组	4	1.833 ± 0.319 <sup>2)</sup>

与空白组比较,<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

表 5 清肠温中方对 UC 小鼠 CD4<sup>+</sup>T<sub>RM</sub> 细胞的调节作用

分组	例数	$\bar{X} \pm S$
		CD4 <sup>+</sup> T <sub>RM</sub> 细胞含量
空白组	5	2.276 ± 0.118
模型组	5	3.063 ± 0.073 <sup>1)</sup>
清肠温中方组	4	2.423 ± 0.244 <sup>2)</sup>

与空白组比较,<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。



使用流式细胞术检测 CD4<sup>+</sup>T<sub>RM</sub> 细胞的含量。a:淋巴细胞;b:排除粘连体;c:CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>细胞;d:CD4<sup>+</sup>T<sub>RM</sub> 细胞的定量分析。

图 2 清肠温中方对 UC 小鼠 CD4<sup>+</sup>T<sub>RM</sub> 细胞调节作用

## 2.5 清肠温中方对 UC 小鼠结肠葡萄糖转运蛋白 mRNA 的影响

通过 RT-qPCR 分析发现,模型组小鼠的 *Glut1*、*Glut2*、*Glut4* mRNA 水平显著高于空白组 ( $P < 0.05$ ),而经过清肠温中方治疗,UC 小鼠的 *Glut1*、*Glut2*、*Glut4* mRNA 水平较模型组均明显下降 ( $P < 0.05$ )。见表 6。

## 2.6 清肠温中方对 UC 小鼠结肠糖酵解关键酶基因的调控作用

应用 RT-qPCR 法检测发现,模型组小鼠的 *LDHA*、*G6PC* mRNA 水平显著高于空白组 ( $P <$

0.05),模型组 *HK2*、*PKM2* mRNA 较模型组无显著差异,但可见 *HK2*、*PKM2* mRNA 水平有高于空白组的趋势;清肠温中方组 *HK2*、*PKM2*、*G6PC*、*LDHA* mRNA 水平显著低于模型组 ( $P < 0.05$ )。见表 7。

## 2.7 清肠温中方对 UC 小鼠 LepR/HIF-1 $\alpha$ 信号轴的调控作用

应用 RT-qPCR 法检测发现,模型组小鼠的 *LepR*、*HIF-1 $\alpha$*  mRNA 水平显著高于空白组 ( $P < 0.05$ );清肠温中方组 *LepR*、*HIF-1 $\alpha$*  mRNA 水平显著低于模型组 ( $P < 0.05$ )。见表 8。

表 6 清肠温中方对 UC 小鼠结肠葡萄糖转运蛋白 mRNA 的影响

分组	例数	<i>Glut1</i> mRNA	<i>Glut2</i> mRNA	<i>Glut4</i> mRNA
空白组	5	1.015 $\pm$ 0.072	0.965 $\pm$ 0.044	1.030 $\pm$ 0.140
模型组	5	1.670 $\pm$ 0.204 <sup>1)</sup>	1.284 $\pm$ 0.123 <sup>1)</sup>	2.574 $\pm$ 0.105 <sup>1)</sup>
清肠温中方组	4	1.070 $\pm$ 0.142 <sup>2)</sup>	0.917 $\pm$ 0.078 <sup>2)</sup>	1.242 $\pm$ 0.391 <sup>2)</sup>

与空白组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

表 7 清肠温中方对 UC 小鼠结肠糖酵解关键酶基因的调控作用

分组	例数	<i>HK2</i> mRNA	<i>PKM2</i> mRNA	<i>G6PC</i> mRNA	<i>LDHA</i> mRNA
空白组	5	0.938 $\pm$ 0.083	1.027 $\pm$ 0.156	1.190 $\pm$ 0.199	1.034 $\pm$ 0.041
模型组	5	2.715 $\pm$ 1.385	1.167 $\pm$ 0.118	3.543 $\pm$ 1.017 <sup>1)</sup>	1.927 $\pm$ 0.472 <sup>1)</sup>
清肠温中方组	4	0.633 $\pm$ 0.064 <sup>2)</sup>	0.934 $\pm$ 0.024 <sup>2)</sup>	0.488 $\pm$ 0.177 <sup>2)</sup>	1.166 $\pm$ 0.047 <sup>2)</sup>

与空白组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

表 8 清肠温中方对 UC 小鼠 LepR/HIF-1 $\alpha$  信号轴的调控作用

分组	例数	<i>LepR</i> mRNA	<i>HIF-1<math>\alpha</math></i> mRNA
空白组	5	1.083 $\pm$ 0.256	1.008 $\pm$ 0.081
模型组	5	4.533 $\pm$ 0.956 <sup>1)</sup>	1.810 $\pm$ 0.382 <sup>1)</sup>
清肠温中方组	4	2.248 $\pm$ 0.343 <sup>2)</sup>	1.030 $\pm$ 0.058 <sup>2)</sup>

与空白组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

UC 病程长,并具有高复发率的特点,是目前的治疗难点之一,但目前 UC 的病因和发病机制尚不完全清楚,越来越多的研究表明,UC 的发生发展及反复发作,都与免疫记忆功能紊乱密切相关<sup>[13]</sup>。CD4<sup>+</sup>T<sub>RM</sub> 细胞是记忆性 T 细胞中的重要亚群,长期驻留在结肠固有层中。在没有抗原刺激的情况下,CD4<sup>+</sup>T<sub>RM</sub> 细胞处于静息状态;当再次遇到同种抗原时,CD4<sup>+</sup>T<sub>RM</sub> 细胞会迅速启动响应,发挥更快、更强的再次免疫应答效应。然而,CD4<sup>+</sup>T<sub>RM</sub> 细胞的过度激活,会导致免疫记忆功能紊乱,参与 UC 的发生发展。临床研究发现,活动期 UC 患者结肠黏膜固有层中 CD4<sup>+</sup>T<sub>RM</sub> 细胞较健康人群明显增加<sup>[14-15]</sup>。实验研究也有类似发现,在 DSS 诱导的结肠炎小鼠中,CD4<sup>+</sup>T<sub>RM</sub> 细胞的水平较正常组小鼠均明显升高<sup>[16]</sup>。由此可见,CD4<sup>+</sup>T<sub>RM</sub> 细

胞介导的免疫记忆失调是 UC 发病的主要临床特征,靶向调控 CD4<sup>+</sup>T<sub>RM</sub> 细胞,重塑免疫记忆稳态,是防治 UC 复发的重要策略。

糖代谢对 CD4<sup>+</sup>T<sub>RM</sub> 细胞的长期存活及其免疫功能起着关键作用。静息状态下,CD4<sup>+</sup>T<sub>RM</sub> 细胞的能量需求低,以氧化磷酸化(oxidative phosphorylation,OXPHOS)为主,以满足细胞的基本需求。当受到抗原刺激时,CD4<sup>+</sup>T<sub>RM</sub> 细胞能量需求明显增加,代谢类型从 OXPHOS 转为糖酵解途径,产生氨基酸、胆固醇等代谢物,以满足其增殖分化,从而快速适应炎症环境的能量需求<sup>[17]</sup>。若免疫细胞糖酵解途径异常激活,导致组织乳酸堆积,则会诱导 CD4<sup>+</sup>T<sub>RM</sub> 细胞向促炎细胞分化,从而进一步加重炎症。瘦素受体(leptin receptor,LepR)/缺氧诱导因子 1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ ,HIF-1 $\alpha$ )信号轴是调控糖酵解的重要信号。LepR 属于糖尿病基因编码的 I 型细胞因子受体家族,在能量代谢和免疫系统的相互作用中发挥调节作用;HIF-1 $\alpha$  是 LepR 的下游因子,是低氧状态下产生的一种 DNA 结合蛋白,可与糖酵解相关基因(*Glut1*、*HK1*、*HK2*、*PGK2* mRNA 等)的启动子区 HRE 反应元件结合,诱导上述基因的转录激活,从而促使机体适应低氧环境。研究发现,UC 患者 LepR 和 HIF-1 $\alpha$  的表达均异常增加,导致葡

葡萄糖转运体及糖酵解活性明显增强,从而促进 CD4<sup>+</sup> T<sub>RM</sub> 细胞分化为促炎性 Th1、Th17 细胞,抑制向 Treg 细胞的分化,致使 Th1/Th17/Treg 细胞免疫失衡,诱导肠道炎症,导致 UC 反复发作<sup>[18]</sup>。

清肠温中方是李军祥教授结合多年治疗 UC 经验所总结的经验方,其主要组成为:黄连 6 g、炮姜 10 g、青黛 6 g、苦参 15 g、三七 6 g、木香 6 g、地榆炭 15 g、炙甘草 6 g。本方以黄连、炮姜为君药,以清热燥湿、温脾止泻,三七、苦参、青黛为臣药以增清热燥湿之功、并兼化瘀止血之效;以木香、地榆炭为佐药以行气导滞、凉血止血;以炙甘草为使药以补益脾气、调和诸药。本团队的前期临床研究<sup>[8-10,19]</sup>、动物实验<sup>[11-12]</sup> 皆提示清肠温中方治疗 UC 疗效显著、并可以调控肠黏膜免疫,但其具体机制尚不明确。本研究以 CD4<sup>+</sup> T<sub>RM</sub> 细胞为切入点,进一步探究清肠温中方治疗 UC 的免疫学机制。研究发现 UC 小鼠结肠 CD4<sup>+</sup> T<sub>RM</sub> 细胞较空白组小鼠明显升高,经清肠温中方干预后,CD4<sup>+</sup> T<sub>RM</sub> 细胞的数量明显降低,提示 CD4<sup>+</sup> T<sub>RM</sub> 细胞是清肠温中方治疗 UC 的潜在靶点。随后我们检测了 CD4<sup>+</sup> T<sub>RM</sub> 细胞能量代谢的相关指标,结果显示清肠温中方能够显著降低葡萄糖转运蛋白 *Glut1/2/4* mRNA 的表达,降低糖酵解途径关键酶基因 (*HK2*、*PKM2*、*G6PC*、*LDHA* mRNA) 的水平,提示清肠温中方对糖酵解代谢具有抑制作用。进一步研究发现,清肠温中方能够抑制 *LepR*、*HIF-1α* mRNA 的表达,说明清肠温中方可能通过抑制 *LepR*/*HIF-1α* 信号轴的活性而调控 CD4<sup>+</sup> T<sub>RM</sub> 细胞的糖酵解代谢。

综上所述,本次研究发现清肠温中方可能通过抑制糖酵解代谢,从而调控 CD4<sup>+</sup> T<sub>RM</sub> 细胞免疫稳态,达到治疗 UC 的目的,但具体机制尚需进一步探索。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] 李军祥,陈詒. 溃疡性结肠炎中西医结合诊疗共识意见(2017年)[J]. 中国中西医结合消化杂志,2018,26(2):105-111,120.
- [2] Magro F, Gionchetti P, Eliakim R, et al. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 1: Definitions, Diagnosis, Extra-intestinal Manifestations, Pregnancy, Cancer Surveillance, Surgery, and Ileo-anal Pouch Disorders[J]. J Crohns Colitis, 2017, 11(6): 649-670.
- [3] Raine T, Bonovas S, Burisch J, et al. ECCO Guidelines on Therapeutics in Ulcerative Colitis: Medical Treatment[J]. J Crohns Colitis, 2022, 16(1): 2-17.
- [4] Lamb CA, Kennedy NA, Raine T, et al. British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults[J]. Gut, 2019, 68(Suppl 3): s1-s106.
- [5] Hazel K, O'Connor A. Emerging treatments for inflammatory bowel disease[J]. Ther Adv Chronic Dis, 2020, 11: 2040622319899297.
- [6] Little D, Tabatabavakili S, Shaffer SR, et al. Effectiveness of Dose De-escalation of Biologic Therapy in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review[J]. Am J Gastroenterol, 2020, 115(11): 1768-1774.
- [7] Gisbert JP, Marin AC, Chaparro M. The Risk of Relapse after Anti-TNF Discontinuation in Inflammatory Bowel Disease: Systematic Review and Meta-Analysis [J]. Am J Gastroenterol, 2016, 111(5): 632-647.
- [8] 毛堂友,程佳伟,魏仕兵,等. 清肠温中方治疗溃疡性结肠炎 84 例[J]. 环球中医药, 2016, 9(4): 479-481.
- [9] 王志斌,陈晨,郭一,等. 清肠温中方治疗轻中度溃疡性结肠炎的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(1): 15-19.
- [10] 孙中美,陈晓伟,胡立明,等. 清肠温中方对缓解期溃疡性结肠炎的远期作用研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2021, 29(9): 619-623.
- [11] Sun Z, Li J, Wang W, et al. Qingchang Wenzhong Decoction Accelerates Intestinal Mucosal Healing Through Modulation of Dysregulated Gut Microbiome, Intestinal Barrier and Immune Responses in Mice[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 738152.
- [12] Sun Z, Li J, Dai Y, et al. Indigo Naturalis Alleviates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Rats via Altering Gut Microbiota[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 731.
- [13] 甄建华,黄光瑞. 溃疡性结肠炎病因和发病机制的现代医学研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2019, 27(4): 245-251.
- [14] Iwamuro M, Takahashi T, Watanabe N, et al. Enriched CD45RA<sup>-</sup> CD62 L<sup>+</sup> central memory T and decreased CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> natural killer T lymphocyte subsets in the rectum of ulcerative colitis patients[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2022, 36: 20587384211051982.
- [15] Zundler S, Becker E, Spocinska M, et al. Author Correction: Hobit and Blimp-1-driven CD4<sup>+</sup> tissue-resident memory T cells control chronic intestinal inflammation[J]. Nat Immunol, 2019, 20(4): 514.
- [16] Chen B, Ye B, Li M, et al. TIGIT Deficiency Protects Mice From DSS-Induced Colitis by Regulating IL-17A-Producing CD4<sup>+</sup> Tissue-Resident Memory T Cells[J]. Front Immunol, 2022, 13: 931761.
- [17] Geltink R, Kyle RL, Pearce EL. Unraveling the Complex Interplay Between T Cell Metabolism and Function[J]. Annu Rev Immunol, 2018, 36: 461-488.
- [18] Pérez-Pérez A, Vilarino-García T, Fernández-Riejos P, et al. Role of leptin as a link between metabolism and the immune system[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2017, 35: 71-84.
- [19] 陈晓伟,高康丽,李世荣,等. 清肠温中方治疗轻中度溃疡性结肠炎 56 例[J]. 环球中医药, 2018, 11(11): 1826-1829.

(收稿日期:2023-03-08)