

人参皂甙 Rd 对 EAE 模型小鼠 Tregs/Th17 细胞失衡的调节作用研究

刘媚 黄绮玲 马晓萌 刘莹莹 陈晓红

中山大学附属第三医院神经病学科, 广州 510630

刘媚现在浙江省人民医院(杭州医学院附属人民医院)神经内科, 杭州 310014

通信作者: 陈晓红, Email: xiaohongchenzssy@aliyun.com

【摘要】 目的 探讨人参皂甙 Rd 对实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)模型小鼠调节性 T 细胞(Tregs)/辅助性 T 细胞 17(Th17)失衡的影响。**方法** 将 54 只 6~8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠按随机数字表法分为人参皂甙 Rd 组、磷酸盐缓冲液(PBS)组、空白对照组, 每组 18 只。前 2 组采用经典的髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 35-55(Mog35-55)肽段免疫诱导方法制备成 EAE 模型, 并在接种免疫后第 13 天起将人参皂甙 Rd 40 mg/(kg·d)溶解于 PBS 中腹腔注射入人参皂甙 Rd 组(1 次/d), PBS 组和空白对照组予同等剂量 PBS 腹腔注射。各组小鼠于接种免疫后第 1~20 天每天进行临床症状评分, 并于评分结束当天取小鼠腰髓进行组织病理学评估(炎症评分及脱髓鞘评分)。在接种免疫后第 20 天, 取各组小鼠脾脏, 行体外脾细胞培养 48 h 后取上清液, 采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测白介素-10(IL-10)、白介素-17(IL-17)水平; 采用流式细胞仪检测脾组织中 Tregs 细胞、Th17 细胞的比例; 取各组小鼠腰髓, 采用实时荧光定量 PCR 检测腰髓中 Janus 激酶 1(JAK1)、Janus 激酶 2(JAK2)、信号转导与转录激活因子 3 (STAT3)、维甲酸相关核受体 γ t (ROR- γ t)、叉头型基因 p3 (Foxp3) mRNA 的表达水平。**结果** (1) 人参皂甙 Rd 组的临床症状评分、炎症评分均明显低于 PBS 组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。PBS 组腰髓中有大量炎性细胞浸润及大片髓鞘脱失, 而人参皂甙 Rd 组的髓鞘脱失较 PBS 组明显减少, 2 组间脱髓鞘评分比较差异有统计学意义($P<0.05$)。(2) 与 PBS 组相比, 人参皂甙 Rd 组脾细胞培养上清液中 IL-10 水平明显升高, IL-17 水平明显降低, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。(3) 与 PBS 组相比, 人参皂甙 Rd 组脾组织中 CD4⁺IL-17⁺ 细胞比例明显降低, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 细胞比例明显升高, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。(4) 与 PBS 组相比, 人参皂甙 Rd 组腰髓中 JAK1、JAK2、STAT3、ROR- γ t mRNA 的表达水平明显降低, Foxp3 mRNA 的表达水平明显升高, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 人参皂甙 Rd 可通过改变与 Tregs/Th17 细胞分化相关的 Foxp3/ROR γ t/STAT3 信号通路分子的表达, 升高 IL-10 水平和 Tregs 细胞比例, 降低 IL-17 水平和 Th17 细胞比例, 从而改善 EAE 模型小鼠的临床症状。

【关键词】 人参皂甙 Rd; 实验性自身免疫性脑脊髓炎; 调节性 T 细胞; 辅助性 T 细胞 17; 细胞失衡

基金项目: 广东省医学科研基金(A2015337); 浙江省自然科学基金青年项目(LQ19H090013)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2019.05.013

Regulatory effect of ginsenoside Rd on regulatory T cells/helper T cell 17 imbalance in experimental autoimmune encephalomyelitis mice models

Liu Mei, Huang Qiling, Ma Xiaomeng, Liu Yingying, Chen Xiaohong

Department of Neurology, Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China

Liu Mei is working on Department of Neurology, Zhejiang Provincial People's Hospital (People's Hospital of Hangzhou Medical College), Hangzhou 310014, China

Corresponding author: Chen Xiaohong, Email: xiaohongchenzssy@aliyun.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of ginsenoside Rd on regulatory T cells (Tregs)/helper T cell 17 (Th17) imbalance in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice models. **Methods** Fifty-four female C57BL/6 mice, aged 6-8 weeks, were randomly divided into ginsenoside Rd group, phosphate buffered saline (PBS) group and blank-control group (n=18). The EAE mice models in the first two groups were induced by classical Mog35-55 peptide immunoinduction method; ginsenoside

Rd of 40 mg/ (kg · d) was dissolved in PBS and intraperitoneally injected into the mice daily in the ginsenoside Rd group on 13th d of immunization; the mice in the PBS group and control group were intraperitoneally injected with same dose of PBS. Daily clinical symptom scale scores were obtained from the first d to the 20th d of immunization, and the lumbar spinal cords of the mice were taken for histological evaluation (inflammation scale and demyelinating scale) after the last symptom scale. On the 20th d of immunization, the spleens of each group were taken for cultivation; splenocytes were cultured *in vitro* for 48 h, and the culture supernatant was taken for detecting interleukin (IL)-10 and IL-17 levels by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); the proportions of Tregs and Th17 in spleen tissues were detected by flow cytometry; real-time quantitative PCR was used to detect the mRNA expressions of Janus kinase 1 (JAK1), Janus kinase 2 (JAK2), signal transduction and activator of transcription 3 (STAT3), retinoic acid-related orphan nuclear receptors γ t (ROR- γ t) and forkhead gene p3 (Foxp3) in the lumbar spinal cords of mice in each group. **Results** (1) The clinical symptom scale scores and inflammation scale scores of ginsenoside Rd group were significantly lower than those of PBS group ($P<0.05$); there were a large number of inflammatory cells infiltration and loss of myelin in the lumbar spinal cord of PBS group, while the loss of myelin sheath in ginsenoside Rd group was obviously decreased as compared with that in PBS group; the demyelination scale scores between the two groups showed statistical differences ($P<0.05$). (2) As compared with those in the PBS group, the IL-10 level was significantly increased and the IL-17 level was significantly decreased in the splenocyte culture supernatant of ginsenoside Rd group ($P<0.05$). (3) As compared with the PBS group, the ginsenoside Rd group had significantly decreased proportion of CD4⁺IL-17⁺ cells and significantly increased proportion of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells in the spleen ($P<0.05$). (4) As compared with those in the PBS group, the mRNA expression levels of JAK1, JAK2, STAT3 and ROR- γ t were significantly decreased, and Foxp3 mRNA expression level was significantly increased in the lumbar spinal cords of the ginsenoside Rd group ($P<0.05$). **Conclusion** Ginsenoside Rd can improve the condition of EAE mice models by altering the expressions of Foxp3/ROR γ t/STAT3 signaling pathway molecules related to differentiation of Tregs/Th17, increasing the IL-10 level and Tregs ratio, and decreasing the IL-17 level and Th17 ratio.

【Key words】 Ginsenoside Rd; Experimental autoimmune encephalomyelitis; Regulatory T cell; Helper T cell 17; Cell imbalance

Fund program: Guangdong Medical Research Fund (A2015337); Zhejiang Natural Science Foundation Youth Project (LQ19H090013)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2019.05.013

多发性硬化(MS)是一种常见的中枢神经系统慢性炎症性脱髓鞘性疾病,是导致青壮年致残的主要疾病之一^[1]。实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis,EAE)模型是研究 MS 的免疫病理学机制及其实验治疗的最佳动物模型^[2]。目前,虽然 MS 的发病机制尚未完全阐明,但已有研究表明调节性 T 细胞(Tregs)/辅助性 T 细胞 17(Th17)失衡与 MS 的发病密切相关^[3-4]。幼稚 T 细胞在转化生长因子- β (TGF- β)和白介素-6(IL-6)的共同诱导下,经由信号转导与转录激活因子 3(STAT3)通路激活 Th17 细胞的特异性核转录因子维甲酸相关孤儿核受体 γ t(ROR γ t),促使活化的 CD4⁺T 细胞向 Th17 细胞分化并分泌促炎因子促进 MS 发病。而在 MS 中起保护作用的 Tregs 细胞主要受叉头型基因 p3(Foxp3)调控,其在幼稚 T

细胞向 Tregs 细胞分化中起关键作用。另外,作为 Tregs/Th17 细胞分化的效应产物,白介素-10(IL-10)和白介素-17 (IL-17)可直接分别由 Tregs 细胞和 Th17 细胞分泌,而其中 IL-10 可限制过度的免疫应答,IL-17 可促进炎症反应致 MS 病情发生发展,两者均在 MS 的发病中起着重要作用^[4-6]。

人参皂甙 Rd 是从三七人参根部提取出来的一种达玛烷型的类固醇化合物,具有抗炎、抗氧化、抗细胞凋亡和神经保护等多种药效作用,同时其具高度亲脂性,能通过生物膜,这使得它成为治疗中枢神经系统疾病的一种潜在有效药物^[7-11]。本课题组曾在前期实验中证实人参皂甙 Rd 能有效改善 EAE 模型小鼠的病情和炎症浸润情况^[12],但人参皂甙 Rd 可否通过改善 EAE 模型小鼠体内 Tregs/Th17 细胞失衡从而产生抗炎作用尚不清楚。

因此,为探讨人参皂甙 Rd 对 EAE 模型小鼠抗炎作用的具体机制,本研究通过观察人参皂甙 Rd 对 EAE 模型小鼠促炎因子 IL-17、抗炎因子 IL-10 水平的影响,对脾组织中 Tregs 细胞、Th17 细胞比例的影响,以及对调控 Tregs/Th17 细胞分化的 Foxp3/ROR γ t/STAT3 信号通路分子及其上游激酶 Janus 激酶 1(JAK1)、Janus 激酶 2(JAK2)表达水平的影响,从而为进一步明确人参皂甙 Rd 在治疗 MS 中的重要作用提供实验依据,也为开发新型的抗 MS 药物提供新的思路。

材料与方法

一、实验材料

1. 实验动物及分组:6~8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠 54 只,体质量 16~18 g,购自中山大学动物实验中心 [合格证号:SCXK (粤)2011-0029]。小鼠置于 SPF 级环境中饲养,给予充足食物及水,光暗各 12 h 循环模拟昼夜环境。采用随机数字表法将其分为人参皂甙 Rd 组、磷酸盐缓冲液(PBS)组、空白对照组,每组 18 只。

2. 实验仪器和试剂:ABI Prism 7500 序列检测仪购自美国 Applied Biosystems 公司。Beckman 流式细胞仪 -GALLIOS 购自美国 Beckman 公司。纯度为 98% 的人参皂甙 Rd 购自南京泽朗医药技术有限公司。髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 35-55(Mog35-55)肽段由美国美联(西安)生物科技有限公司合成。纯度超过 95% 的结核分枝杆菌 H37Ra 购自德国 Difco 公司。百日咳菌苗毒素(PTX)购自瑞士 Alexis 公司。完全弗氏佐剂购自美国 Sigma 公司。IL-10、IL-17 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 试剂盒购自美国 Norcross 公司。AF50 标记抗鼠 CD4 流式抗体 (CD4-AF450)、PECY7 标记抗鼠 CD25 流式抗体 (CD25-PECY7)、PE 标记抗鼠 Foxp3 流式抗体 (Foxp3-PE) 和 AF647 标记抗鼠 IL-17 流式抗体 (IL-17-AF647)均购自美国 BD 公司。Trizol 试剂购自日本 Takara 公司。PrimeScriptTM 逆转录试剂盒、SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒购自大连宝生物工程公司。PCR 引物由日本 Takara 公司合成。

二、EAE 模型制备及干预措施

参考文献[13]报道,采用经典的 Mog35-55 肽段免疫诱导方法将人参皂甙 Rd 组、PBS 组小鼠制备成 EAE 模型:首先将 200 μ g Mog35-55 肽段乳化于含结核分支杆菌 H37Ra 500 μ g 的完全弗氏佐剂中,然后对小鼠经皮下注射,同时经腹腔注射含 PTX 300 ng 的 PBS,并在 48 h 后经腹腔注射相同剂量的

PTX,在第 7 天经皮下追加注射含 Mog35-55 肽段的完全弗氏佐剂。空白对照组小鼠在其余组小鼠制备 EAE 模型同时以等量 PBS 于相应部位经多点皮下注射及腹腔注射。

在接种免疫后第 13 天,将人参皂甙 Rd 40 mg/(kg·d)(剂量的选择依据参考文献[8,12]报道)溶解于 PBS 中并对人参皂甙 Rd 组进行腹腔注射,1 次/d;而 PBS 组予相同剂量的 PBS 腹腔注射,1 次/d。

三、临床症状评估

各组随机挑选 6 只小鼠自接种免疫后第 1 天起持续观察,至接种免疫后第 20 天结束。每天进行临床症状评分以评估小鼠的残障程度,临床症状评分的标准参考文献[13]报道:0 分,无标志;1 分,尾部张力减退;2 分,松弛尾;3 分,后肢共济失调和(或)轻瘫;4 分,后肢完全瘫痪;5 分,垂死或死亡,临床症状评分越高,小鼠的残障程度越重。统计分析时以观察过程中每只小鼠的临床症状评分总和的平均值为临床症状评分均值。另外,本研究中以小鼠出现第一种症状的时间为疾病的发病时间。

四、组织病理学评估

在接种免疫后第 20 天,对完成临床症状评分的各组 6 只小鼠,分别应用常规 HE 染色和依来铬花青浸渍染色对小鼠腰髓组织进行炎性细胞浸润和髓鞘脱失情况的评估。具体过程如下:小鼠麻醉后剪开腹腔,充分暴露心脏,剪开右心耳,经左心室插入针管,往其中注入预冷的 PBS,直至肝脏完全肿胀变白。然后经左心室注入预冷的 40 g/L 多聚甲醛,直至小鼠尾部向上翘起及全身僵硬。翻转小鼠,剪开背部皮肤,从小鼠背部分离出完整的脊髓,置于固定液中浸泡过夜作外固定。切取腰髓段脊髓,将组织块置于 30%~100%乙醇中梯度脱水,充分脱水后将组织块置于二甲苯中透明处理。将已透明处理的组织块置于事先融化了的石蜡中,待石蜡完全浸入组织块后冷却,使其凝固成块。将备好的蜡块置于切片机中连续横切,厚度设定为 5 μ m。间隔取片,进行贴片后分别予 HE 染色和依来铬花青浸渍染色,在光学显微镜下观察炎性细胞浸润及髓鞘脱失情况。炎症评分的标准参考文献[14]报道:0 分,没有炎性细胞;1 分,一些散在的炎性细胞;2 分,炎性细胞浸润在血管周围;3 分,广泛血管周围袖套带形成并扩展到相邻实质,或实质浸润无明显的袖套。脱髓鞘评分的标准参考文献[15]报道:1 分,软脑膜下脱髓鞘;2 分,软脑膜下及血管周围发生明显的脱髓鞘;3 分,血管周围或软脑膜下脱髓鞘发生融合;4 分,血管周围和软脑膜下脱髓鞘,并累及一个半腰

髓,伴随着大量细胞侵入中枢神经系统实质;5分,血管周围和软脑膜下脱髓鞘,并累及整个腰髓,伴随着大量细胞侵入中枢神经系统实质。

五、脾细胞分离、提取及腰髓分离

1. 脾细胞分离、提取:在接种免疫后第20天,各组随机挑选6只小鼠用过量的100 g/L水合氯醛处死,取出脾脏并用无菌眼科剪剪碎脾组织,于200目细胞筛上将脾组织用2 mL玻璃注射针芯反复研磨,并用RPMI-1640液冲洗,制备成脾细胞悬液用于下一步实验。

2. 腰髓分离:在接种免疫后第20天,各组随机挑选6只小鼠用过量的100 g/L水合氯醛处死,剪开小鼠背部皮肤,分离肌肉等软组织,暴露全部脊椎,用剪刀剪断棘突,用咬骨钳小心咬碎脊柱骨以暴露完整的脊髓,用镊子把脊髓夹出放置于装有生理盐水的平皿中,选取腰髓部分用刀片切断后装入冻存管,标记后放入液氮中速冻后转移至-80℃冰箱保存。

六、ELISA检测IL-10、IL-17水平

在96孔平底板上,将来自各组小鼠的脾细胞培养于含有10%胎牛血清的RPMI-1640液中,并用Mog35-55(15 μg/mL)进行免疫。培养48 h后收集细胞培养上清液并储存于-80℃环境中。细胞培养上清液中IL-10、IL-17水平的检测根据ELISA试剂盒说明书的操作步骤进行,单位以pg/mL表示。

七、流式细胞仪检测Tregs细胞、Th17细胞的比例

将来自各组小鼠的脾细胞悬液浓度调整为 1×10^6 个/mL后装于流式管中,350×g 4℃离心5 min,弃上清;用1 mL流式染色缓冲液重悬沉淀,350×g 4℃离心5 min,弃上清;封闭:取适量小鼠血清全IgG抗体与样品细胞充分混匀,4℃静置15 min,350×g 4℃离心5 min,弃上清;用1 mL流式染色缓冲液重悬沉淀,分别加入适当比例稀释的CD4-AF450、CD25-PECY7及相应阴性同型对照抗体以标记相应的CD4、CD25表面抗体,混匀,室温避光染色20 min;加1 mL流式染色缓冲液洗去未结合的抗体,350×g 4℃离心5 min,弃上清;用1 mL流式染色缓冲液重悬沉淀,加入破膜剂破膜;加1 mL流式染色缓冲液终止反应,350×g 4℃离心5 min,弃上清;用1 mL流式染色缓冲液重悬沉淀,分别加入适当比例稀释的Foxp3-PE、IL-17-AF647及相应阴性同型对照抗体以标记相应的Foxp3、IL-17胞内/核内抗体,混匀,室温避光染色20 min;加1 mL流式染色缓冲液洗去未结合的抗体,350×g 4℃离心5 min,弃

上清;用200 μL流式染色缓冲液重悬沉淀,上机分析,检测CD4⁺IL-17⁺细胞(Th17细胞)和CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺细胞(Tregs细胞)的比例。

八、实时荧光定量PCR检测JAK1、JAK2、STAT3、ROR-γt、Foxp3 mRNA的表达水平

使用Trizol试剂从腰髓组织中提取总RNA,根据PrimeScript™逆转录试剂盒说明书进行逆转录操作合成cDNA,逆转录反应条件为:37℃ 15 min→85℃ 5 s后终止。根据SYBR Premix Ex Taq™试剂盒说明书将合成的cDNA进行实时荧光定量PCR反应,反应体系20 μL,反应条件为:95℃ 30 s→95℃ 5 s、60℃ 30 s、72℃ 20 s(循环40次)→65℃缓慢加热至95℃以制作溶解曲线,其余为默认值。对每个样本进行3次平衡检测,取平均值为最终结果。利用Primer5软件并参照小鼠在Genbank上序列设计JAK1、JAK2、STAT3、ROR-γt、Foxp3基因的特异性引物和内参GAPDH的特异性引物,引物序列如下:JAK1:上游:5'-ATGCCACCATACCTCTGT-3',下游:5'-ATCCCCTCTTCACTCCCTTC-3',产物大小133 bp;JAK2:上游:5'-CATAGACGAGTCAACCAGGCA-3',下游:5'-AAAGTCATCAAGCAGAGGAGC-3',产物大小136 bp;STAT3:上游:5'-GCCATCCTAAGCACAAAGC-3',下游:5'-GTGAAAGTGACCCCTCCTT-3',产物大小80 bp;ROR-γt:上游:5'-CTGACGGCCAATTACTCTT-3',下游:5'-TGTCTGTCAGAGAGGCATATG-3',产物大小150 bp;Foxp3:上游:5'-GCATGTTTCGCTACTTCA-3',下游:5'-AGCCTCAGTCTCATGGTT-3',产物大小242 bp;GAPDH:上游:5'-GGCCTCCAAGGAGTAAGAAA-3',下游:5'-GCCCCTCCTGTTATTATGG-3',产物大小141 bp。所得数据参考文献[16]报道采用相对基因表达法($2^{-\Delta\Delta CT}$)进行分析,数据以基因表达倍数变化来表示,即与内参标准化后,与空白对照组结果相比的变化倍数。

九、统计学方法

采用SPSS 13.0软件对数据进行统计学分析。呈正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2组间比较采用t检验;多组间比较采用单因素方差分析,组内进一步两两比较采用LSD-t法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、人参皂甙Rd对EAE模型小鼠病情严重程度影响

在空白对照组中,无任何小鼠发病,临床症状评

分均为 0 分。PBS 组与人参皂甙 Rd 组的发病时间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。人参皂甙 Rd 组的临床症状评分明显低于 PBS 组,差异有统计学意义($P<0.05$),表明人参皂甙 Rd 改善了 EAE 模型小鼠的临床症状。具体内容见表 1。

二、人参皂甙 Rd 对 EAE 模型小鼠组织病理学结果的影响

在接种免疫后第 20 天,空白对照组未见炎症和脱髓鞘改变,炎症评分和脱髓鞘评分均为 0 分。人参皂甙 Rd 组的炎症评分明显低于 PBS 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。PBS 组脊髓中有大片的髓鞘脱失,而人参皂甙 Rd 组的脱髓鞘病变较少,2 组脱髓鞘评分比较差异有统计学意义($P<0.05$),表明人参皂甙 Rd 减轻了 EAE 模型小鼠腰骶段脊髓的炎症和脱髓鞘程度。具体内容见图 1 和表 1。

三、人参皂甙 Rd 对 EAE 模型小鼠 IL-10、IL-17 水平的影响

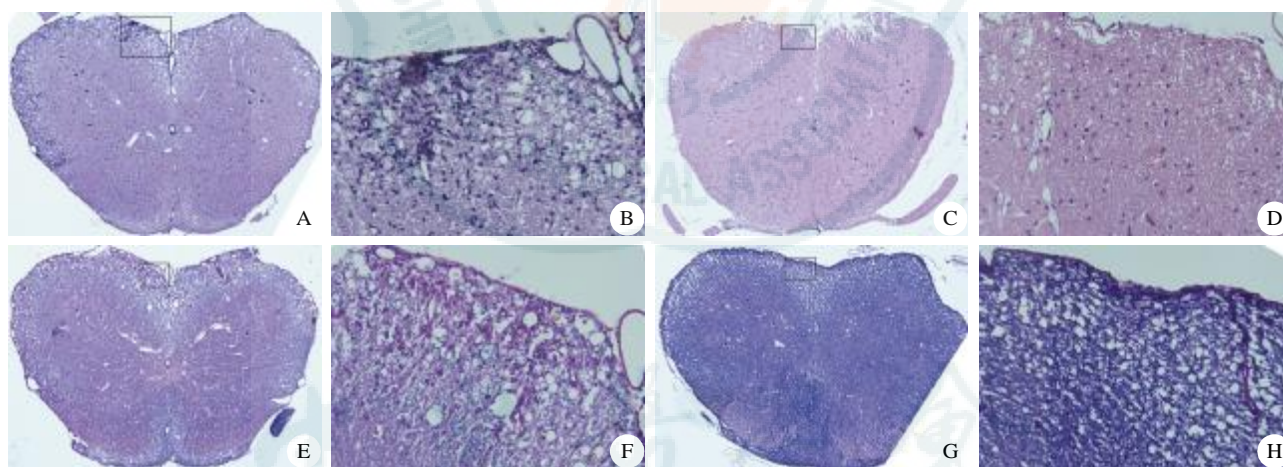
PBS 组和人参皂甙 Rd 组的脾细胞培养上清液中 IL-10 水平明显低于空白对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与 PBS 组相比,人参皂甙 Rd 组的

IL-10 水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。具体内容见表 2。

PBS 组和人参皂甙 Rd 组的脾细胞培养上清液中 IL-17 水平明显高于空白对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与 PBS 组相比,人参皂甙 Rd 组的 IL-17 水平明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。具体内容见表 2。

四、人参皂甙 Rd 对 EAE 模型小鼠 Tregs 细胞、Th17 细胞比例的影响

PBS 组和人参皂甙 Rd 组的 $CD4^+IL-17^+$ 细胞比例明显高于空白对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。PBS 组的 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 细胞比例与空白对照组相比有所降低,但差异无统计学意义($P>0.05$);而人参皂甙 Rd 组的 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 细胞比例较空白对照组明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 PBS 组相比,人参皂甙 Rd 组的 $CD4^+IL-17^+$ 细胞比例明显降低、 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 细胞比例明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$),表明人参皂甙 Rd 可以降低 EAE 模型小鼠外周的 Th17 细胞亚群比例、升高 Tregs 细胞亚群比例,从



A:PBS 组炎性细胞浸润情况(HE 染色,×50);B:图 A 中黑框处放大图(HE 染色,×200);C:人参皂甙 Rd 组炎性细胞浸润情况(HE 染色,×50);D:图 C 中黑框处放大图(HE 染色,×200);E:PBS 组脱髓鞘情况(依来铬花青浸渍染色,×50);F:图 E 中黑框处放大图(依来铬花青浸渍染色,×200);G:人参皂甙 Rd 组脱髓鞘情况(依来铬花青浸渍染色,×50);H:图 G 中黑框处放大图(依来铬花青浸渍染色,×200);PBS:磷酸盐缓冲液

图 1 人参皂甙 Rd 组和 PBS 组小鼠腰髓组织病理结果

Fig.1 Histopathology results of lumbar spinal cords in the Ginsenoside Rd group and phosphate buffer group

表 1 人参皂甙 Rd 组和 PBS 组小鼠发病时间、临床症状评分和组织病理学结果的比较($\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Comparison of onset time, clinical symptom scale scores and pathology scale scores between Ginsenoside Rd group and phosphate buffer group (Mean±SD)

组别	只数	发病时间(d)	临床症状评分(分)	炎症评分(分)	脱髓鞘评分(分)
PBS组	6	13.500±1.049	2.750±0.822	2.833±0.408	3.500±1.225
人参皂甙 Rd 组	6	13.333±0.577	1.167±1.291	1.667±0.516	1.833±0.408
t值		0.251	2.534	4.341	3.162
P值		0.809	0.030	0.001	0.016

PBS:磷酸盐缓冲液

而改善 EAE 模型小鼠 Tregs/Th17 细胞失衡情况。具体内容见图 2 和表 2。

五、人参皂甙 Rd 对 EAE 模型小鼠 JAK1、JAK2、STAT3、ROR- γ t、Foxp3 mRNA 表达水平的影响

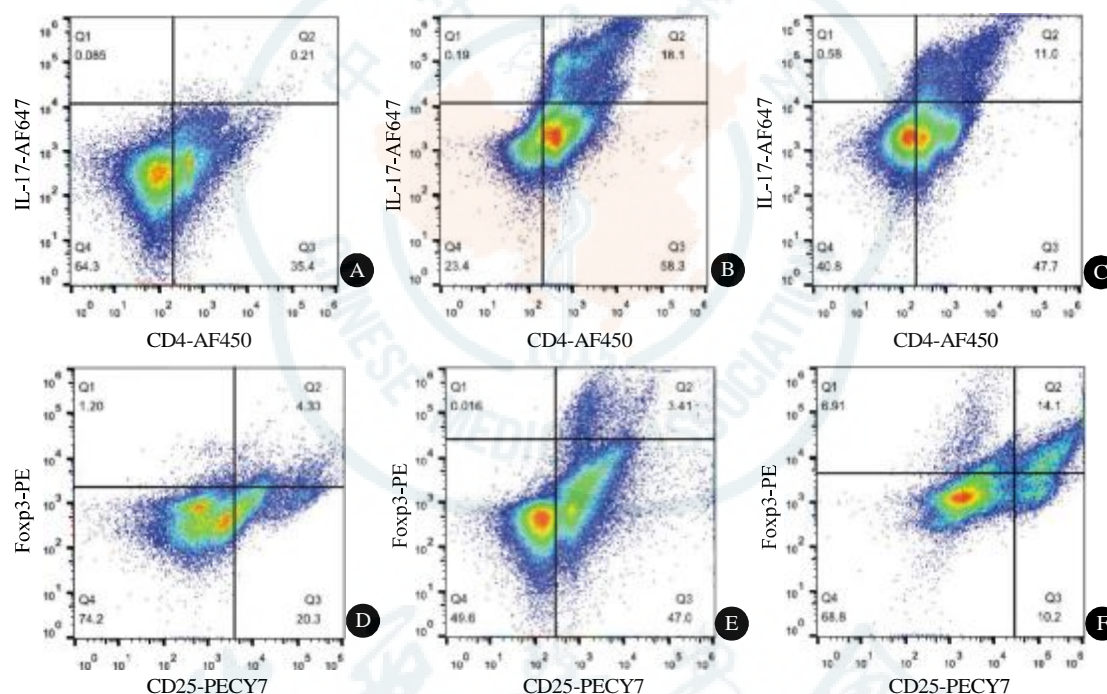
PBS 组腰髓中 JAK1、JAK2、STAT3、ROR- γ t mRNA 表达水平明显高于空白对照组, Foxp3 mRNA 表达水平明显低于空白对照组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。与 PBS 组相比, 人参皂甙 Rd 组的 JAK1、JAK2、STAT3、ROR- γ t mRNA 表达水平明显降低, Foxp3 mRNA 表达水平明显升高, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 表明人参皂甙 Rd 可以通过 Foxp3/ROR γ t/STAT3 信号通路调控 Tregs/Th17 细胞分化, 从而影响 EAE 模型小鼠 Tregs/Th17 细胞

比例的调整。具体内容见表 3。

讨 论

MS 是一种常见于年轻人的致残性自身免疫性疾病, 发病机制尚不十分明了, 炎症、广泛的轴突和神经元病理改变是其病理学基础, 髓鞘自身反应的外周 T 细胞和巨噬细胞通过受损的血脑屏障进入中枢神经系统, 启动一系列有害的炎症链式反应, 导致髓鞘脱失、轴突和神经元发生病理性改变。MS 尚无有效的治疗方法, 目前对于 MS 的治疗主要是通过抑制炎症和免疫系统异常激活等, 特别是免疫调节抗炎治疗, 从而延缓病情和降低神经损伤^[17]。

本课题组的前期实验已证实, 给予人参皂甙 Rd 治疗能显著减轻 EAE 模型小鼠病情, 降低 γ - 干扰



A: 空白对照组 Th17 细胞比例; B: PBS 组 Th17 细胞比例; C: 人参皂甙 Rd 组 Th17 细胞比例; D: 空白对照组 Tregs 细胞比例; E: PBS 组 Tregs 细胞比例; F: 人参皂甙 Rd 组 Tregs 细胞比例; PBS: 磷酸盐缓冲液; Tregs: 调节性 T 细胞; Th17: 辅助性 T 细胞 17

图 2 流式细胞仪检测各组小鼠脾组织中 Th17 细胞比例和 Tregs 细胞比例

Fig.2 Proportions of regulatory T cells and helper T cell 17 cells in the spleen of each group detected by flow cytometry

表 2 各组小鼠脾细胞培养上清液中 IL-10、IL-17 水平及脾组织中 Tregs、Th17 细胞比例的比较($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 Comparison of levels of interleukin-10 and interleukin-17 in the spleen cell cultured supernatant and proportion of regulatory T cells/helper T cell 17 in the spleen tissues of mice in each group (Mean \pm SD)

组别	只数	IL-10(pg/mL)	IL-17(pg/mL)	Tregs细胞比例(%)	Th17细胞比例(%)
空白对照组	6	126.866 \pm 7.218	3.738 \pm 3.161	5.950 \pm 0.714	0.187 \pm 0.049
PBS组	6	83.822 \pm 11.158 ^a	111.653 \pm 35.348 ^a	3.830 \pm 1.413	17.188 \pm 3.210 ^a
人参皂甙 Rd 组	6	90.705 \pm 15.684 ^{ab}	30.375 \pm 8.740 ^{ab}	9.710 \pm 2.249 ^{ab}	13.417 \pm 2.579 ^{ab}
F值		24.696	48.719	17.408	41.808
P值		0.000	0.000	0.000	0.000

与空白对照组比较, ^a $P<0.05$; 与 PBS 组比较, ^b $P<0.05$; PBS: 磷酸盐缓冲液; IL-10: 白介素 -10; IL-17: 白介素 -17;

Tregs: 调节性 T 细胞; Th17: 辅助性 T 细胞 17

表 3 各组小鼠腰髓中 JAK1、JAK2、STAT3、ROR- γ t、Foxp3 mRNA 表达水平的比较($\bar{x}\pm s$)

Tab.3 Comparison of mRNA expressions of Janus kinase 1, Janus kinase 2, signal transduction and activator of transcription 3, retinoic acid-related orphan nuclear receptors γ t and forkhead gene p3 in the lumbar spinal tissues of mice in each group (Mean \pm SD)

组别	只数	JAK1	JAK2	STAT3	ROR- γ t	Foxp3
空白对照组	6	1.000 \pm 0.000	1.000 \pm 0.000	1.000 \pm 0.000	1.000 \pm 0.000	1.000 \pm 0.000
PBS组	6	3.501 \pm 0.362 ^a	3.156 \pm 0.559 ^a	3.842 \pm 0.204 ^a	2.824 \pm 0.513 ^a	0.760 \pm 0.067 ^a
人参皂甙 Rd 组	6	1.389 \pm 0.148 ^b	0.825 \pm 0.133 ^b	1.043 \pm 0.138 ^b	1.461 \pm 0.138 ^b	0.990 \pm 0.227 ^b
F值		212.661	91.737	787.389	57.357	5.901
P值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.013

与空白对照组比较,^aP<0.05;与 PBS 组比较,^bP<0.05;PBS:磷酸盐缓冲液;JAK1:Janus 激酶 1;JAK2:Janus 激酶 2;STAT3:信号转导与转录激活因子 3;ROR- γ t:维甲酸相关孤儿核受体 γ t;Foxp3:叉头型基因 p3

素(interferon- γ , IFN- γ)及增加 IL-4 水平,以及增加辅助性 T 细胞 2(Th2)漂移^[12]。而本研究进一步发现了人参皂甙 Rd 在 EAE 模型小鼠中的潜在抗炎作用的证据,我们观察到人参皂甙 Rd 在减轻 EAE 模型小鼠病情严重程度及其腰髓炎性细胞浸润、脱髓鞘征象的同时,也降低了促炎因子 IL-17 水平和升高了抗炎因子 IL-10 水平,从而发挥出抗炎作用。

已有研究证实人参皂甙 Rd 在大鼠 N9 小胶质细胞中能通过抑制核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)表达,从而抑制脂多糖诱导的一氧化氮(NO)形成和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)产生以及抑制 IL-6 表达^[18-19],而 IL-6 是促进 CD4⁺T 细胞向 Th17 细胞分化的重要因子^[20]。另外,人参皂甙 Rd 在小鼠实验中被发现能提高辅助性 T 细胞 1(Th1)和 Th2 细胞水平,促进 Th1 和 Th2 免疫反应和发挥免疫调节作用^[21-22]。在类风湿性关节炎模型大鼠中,人参皂甙 Rd 与雷公藤多甙联合应用还能促进 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺细胞分化,升高 TGF- β 1、IL-10 水平,降低 IL-17 水平,促使 Tregs/Th17 细胞平衡向 Tregs 细胞偏移^[23]。这说明了人参皂甙 Rd 能影响 T 细胞的分化,可以通过调节 Tregs/Th17 细胞分化而发挥抗炎作用。自身免疫是 MS 发病的重要因素,CD4⁺Th 细胞在 MS 发生及发展过程中发挥着重要作用,其中 T 细胞亚群失衡特别是 Tregs/Th17 细胞失衡引起的对自身抗原髓鞘碱性蛋白的攻击被认为是导致 MS 发病的最直接原因^[4]。本研究在发现人参皂甙 Rd 降低 EAE 模型小鼠中促炎因子 IL-17 水平和升高抗炎因子 IL-10 水平的基础上,应用流式细胞仪检测发现人参皂甙 Rd 可以降低外周的 Th17 细胞比例和升高 Tregs 细胞比例,从而改善了 Tregs/Th17 细胞失衡情况。

ROR- γ t 是 Th17 细胞分化所必需的关键转录因子,可经 STAT3 通路及其上游激酶 JAK1、JAK2

激活,促使活化的 CD4⁺T 细胞分化成 Th17 细胞。Th17 细胞分泌包括 IL-17 等细胞因子,参与 MS 免疫发病机制的促炎效应^[24]。Foxp3 是 Tregs 细胞的主要调控基因,在幼稚 T 细胞向 Tregs 细胞分化中起关键作用,可抑制 Th17 细胞分化,分泌 IL-10 等细胞因子,在体内执行免疫抑制功能,限制过度的免疫应答,发挥抗炎作用^[5, 24-26]。本研究通过实时荧光定量 PCR 检测 JAK1、JAK2、STAT3、ROR- γ t、Foxp3 这些与 Tregs/Th17 细胞分化相关的信号通路分子,发现人参皂甙 Rd 可阻止 EAE 模型小鼠腰髓中 JAK1、JAK2、STAT3、ROR- γ t mRNA 表达水平的升高和抑制 Foxp3 mRNA 表达水平的降低,提示人参皂甙 Rd 可在 mRNA 水平上,通过 Foxp3/ROR- γ t/STAT3 信号通路及其上游激酶 JAK1、JAK2 来调控 EAE 模型小鼠中 Tregs/Th17 细胞的分化,从而影响 Tregs/Th17 细胞比例的调整。

综上所述,本研究表明人参皂甙 Rd 可能通过阻止 EAE 模型小鼠 JAK1、JAK2、STAT3、ROR- γ t mRNA 表达水平的上调和抑制 Foxp3 mRNA 表达水平的下降,降低 Th17 细胞比例和升高 Tregs 细胞比例,改善 Tregs/Th17 细胞失衡情况,减少促炎因子 IL-17 的分泌和阻止抗炎因子 IL-10 的下降,从而有效改善 EAE 模型小鼠的病情严重程度。因此,人参皂甙 Rd 可能是一种可用于 MS 治疗的潜在药物。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Karussis D. The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: a critical review [J]. J Autoimmun, 2014, 48-49: 134-142. DOI: 10.1016/j.jaut.2014.01.022.
- [2] Stromnes IM, Goverman JM. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis[J]. Nat Protoc, 2006, 1(4): 1810-1819.

- DOI: 10.1038/nprot.2006.285.
- [3] van Noort JM, Baker D, Amor S. Mechanisms in the development of multiple sclerosis lesions: reconciling autoimmune and neurodegenerative factors [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2012, 11(5): 556-569.
- [4] Furuzawa-Carballeda J, Vargas-Rojas MI, Cabral AR. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective [J]. *Autoimmun Rev*, 2007, 6(3): 169-175. DOI: 10.1016/j.autrev.2006.10.002.
- [5] Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance[J]. *Eur J Immunol*, 2010, 40 (7): 1830-1835. DOI: 10.1002/eji.201040391.
- [6] Lovett-Racke AE, Yang Y, Racke MK. Th1 versus Th17: are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis?[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812(2): 246-251. DOI: 10.1016/j.bbdis.2010.05.012.
- [7] Ye R, Li N, Han J, et al. Neuroprotective effects of ginsenoside Rd against oxygen-glucose deprivation in cultured hippocampal neurons[J]. *Neurosci Res*, 2009, 64(3): 306-310. DOI: 10.1016/j.neures.2009.03.016.
- [8] Ye R, Kong X, Yang Q, et al. Ginsenoside Rd attenuates redox imbalance and improves stroke outcome after focal cerebral ischemia in aged mice[J]. *Neuropharmacology*, 2011, 61(4): 815-824. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2011.05.029.
- [9] Liu J, Yan X, Li L, et al. Ginsenoside rd attenuates cognitive dysfunction in a rat model of Alzheimer's disease [J]. *Neurochem Res*, 2012, 37(12): 2738-2747. DOI: 10.1007/s11064-012-0866-2.
- [10] Ren K, Jin C, Ma P, et al. Ginsenoside Rd alleviates mouse acute renal ischemia/reperfusion injury by modulating macrophage phenotype[J]. *J Ginseng Res*, 2016, 40(2): 196-202. DOI: 10.1016/j.jjgr.2015.12.003.
- [11] Liu X, Wang L, Wen A, et al. Ginsenoside-Rd improves outcome of acute ischaemic stroke-a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial[J]. *Eur J Neurol*, 2012, 19(6): 855-863. DOI: 10.1111/j.1468-1331.2011.03634.x.
- [12] Zhu D, Liu M, Yang Y, et al. Ginsenoside Rd ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice[J]. *J Neurosci Res*, 2014, 92(9): 1217-1226. DOI: 10.1002/jnr.23397.
- [13] Chen X, Hu X, Zou Y, et al. Combined treatment with minocycline and prednisone attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in C57 BL/6 mice[J]. *J Neuroimmunol*, 2009, 210(1-2): 22-29. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2009.02.016.
- [14] Racke MK, Quigley L, Cannella B, et al. Superantigen modulation of experimental allergic encephalomyelitis: activation of anergy determines outcome[J]. *J Immunol*, 1994, 152(4): 2051-2059.
- [15] Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy[J]. *Blood*, 2005, 106(5): 1755-1761. DOI: 10.1182/blood-2005-04-1496.
- [16] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C_T) (T) Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- [17] Tavazzi E, Rovaris M, La Mantia L. Drug therapy for multiple sclerosis[J]. *CMAJ*, 2014, 186(11): 833-840. DOI: 10.1503/cmaj.130727.
- [18] Wu CF, Bi XL, Yang JY, et al. Differential effects of ginsenosides on NO and TNF-alpha production by LPS-activated N9 microglia [J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7(3): 313-320. DOI: 10.1016/j.intimp.2006.04.021.
- [19] Wang L, Zhang Y, Wang Z, et al. Inhibitory effect of ginsenoside-Rd on carrageenan-induced inflammation in rats[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2012, 90(2): 229-236. DOI: 10.1139/y11-127.
- [20] Rioux N, Castonguay A. The induction of cyclooxygenase-1 by a tobacco carcinogen in U937 human macrophages is correlated to the activation of NF-kappaB[J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(9): 1745-1751.
- [21] Sun HX, Qin F, Ye YP. Relationship between haemolytic and adjuvant activity and structure of protopanaxadiol-type saponins from the roots of panax notoginseng[J]. *Vaccine*, 2005, 23(48-49): 5533-5542. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.07.036.
- [22] Yang Z, Chen A, Sun H, et al. Ginsenoside Rd elicits Th1 and Th2 immune responses to ovalbumin in mice[J]. *Vaccine*, 2007, 25(1): 161-169. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.05.075.
- [23] 张秋媛. 雷公藤多甙联合人参皂甙对胶原诱导关节炎大鼠 CD4+CD25+Foxp3+ 调节性 T 细胞的影响及骨免疫学机制探讨 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2012.
- Zhang QY. Effect of tripterygium glycoside combine with ginsenosides on level of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in rat of collagen-induced arthritis and its mechanism of ontoimmunology [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2012.
- [24] Parastouei K, Mirshafiey A, Eshraghian MR, et al. The effect of 1, 25 (OH)₂ D₃ (calcitriol) alone and in combination with all-trans retinoic acid on ROR-γt, IL-17, TGF-β, and FOXP3 gene expression in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *Nutr Neurosci*, 2018, 21(3): 210-218. DOI: 10.1080/1028415X.2016.1263039.
- [25] Noori-Zadeh A, Mesbah-Namin SA, Saboor-Yaraghi AA. Epigenetic and gene expression alterations of FOXP3 in the T cells of EAE mouse model of multiple sclerosis[J]. *J Neurol Sci*, 2017, 375: 203-208. DOI: 10.1016/j.jns.2017.01.060.
- [26] Ziegler SF, Buckner JH. FOXP3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation[J]. *Microbes Infect*, 2009, 11(5): 594-598. DOI: 10.1016/j.micinf.2009.04.002.

(收稿日期: 2018-12-12)

(本文编辑: 刘凯)