

宋雨, 张小莉, 陈换换, 等. 熊果酸改善 I 型糖尿病大鼠胰岛 β 细胞损伤的实验研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 74-83.

Song Y, Zhang XL, Chen HH, et al. Ursolic acid ameliorates pancreatic β -cell injury in type I diabetic rats via the TLR4/NF- κ B pathway and Th17/Treg cell homeostasis [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5): 74-83.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.05.008

熊果酸改善 I 型糖尿病大鼠胰岛 β 细胞损伤的实验研究

宋雨, 张小莉*, 陈换换, 唐聪

(河南中医药大学医学院, 郑州 450046)

【摘要】 **目的** 探究熊果酸(UA)对 I 型糖尿病(T1DM)大鼠 TLR4/NF- κ B 信号通路及 Th17/Treg 细胞的影响。**方法** 腹腔注射链脲佐菌素(STZ)制备 T1DM 大鼠模型, 随机分为空白组(Control 组)、模型组(Model 组)、二甲双胍组(MET 组)和熊果酸组(UA 组)。记录大鼠体重、血糖等一般情况, 灌胃 6 周后采集大鼠外周血、胰腺组织评估胰岛素干预情况。免疫组化观察胰腺组织病理变化; 鲎试剂检测血清脂多糖(LPS)含量变化; qRT-PCR 法检测胰腺 TLR4、MyD88、IkB α 、NF- κ B p65 mRNA 的表达, 以及转录因子 ROR γ t、Foxp3 mRNA 的表达; Western blot 法检测胰腺 TLR4、MyD88、IkB α 、NF- κ B p65 蛋白的表达, 以及转录因子 ROR γ t、Foxp3 蛋白的表达; 流式细胞术检测外周血 Th17、Treg 细胞比例变化; ELISA 法检测血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量变化。**结果** 经 STZ 诱导的糖尿病大鼠经 6 周灌胃处理, 与模型组相比, 二甲双胍组大鼠和熊果酸组大鼠空腹血糖(FBG)均明显下降, 体重均明显升高; 胰岛 β 细胞炎症浸润减少; TLR4、MyD88、IkB α 、NF- κ B p65、ROR γ t mRNA 和蛋白的表达明显降低; LPS 含量明显下降; IkB α 、Foxp3 mRNA 和蛋白表达明显升高; Th17/Treg 比值明显下降; TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量明显下降。**结论** UA 可通过减少 LPS 移位, 抑制 TLR4/NF- κ B 通路, 下调 ROR γ t 并上调 Foxp3 的表达纠正 T1DM 大鼠 Th17/Treg 细胞比例失衡来改善大鼠症状。

【关键词】 I 型糖尿病; 熊果酸; TLR4/NF- κ B 通路; Th17/Treg 细胞

【中图分类号】 R-33

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-7856 (2024) 05-0074-10

Ursolic acid ameliorates pancreatic β -cell injury in type I diabetic rats via the TLR4/NF- κ B pathway and Th17/Treg cell homeostasis

SONG Yu, ZHANG Xiaoli*, CHEN Huanhuan, TANG Cong

(Medicine College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of ursolic acid (UA) on the TLR4/NF- κ B signaling pathway and Th17/Treg cells in type 1 diabetes mellitus (T1DM) rats. **Methods** T1DM rat models were established by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) and randomly divided into blank (Control), Model, metformin (MET), and UA groups. General conditions, such as body weight and blood glucose, were recorded, and peripheral blood and pancreatic tissues were collected after 6 weeks of gavage to assess insulin treatment. Immunohistochemistry was used to observe pathological changes in pancreatic tissues. Horseshoe crab reagent was used to assess changes in serum lipopolysaccharide (LPS).

【基金项目】 河南省科技攻关项目(212102311081); 河南中医药大学研究生科研创新基金(2022KYCX082)。

【作者简介】 宋雨(1993—), 男, 硕士, 研究方向: 免疫相关疾病与感染性疾病机理及中医药防治。E-mail: 740708970@qq.com

【通信作者】 张小莉(1963—), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药与免疫性疾病相关性研究。E-mail: zxl7666@163.com

content. qRT-PCR was used to measure expression of pancreatic TLR4, MyD88, I κ B α , and NF- κ B p65 mRNAs, and mRNA expression of transcription factors ROR γ t and Foxp3. Western blot was used to assess pancreatic TLR4, MyD88, I κ B α , NF- κ B p65, ROR γ t, and Foxp3. Flow cytometry was used to assess changes Th17/Treg cell ratio in peripheral blood. ELISA were used to measure serum contents of TNF- α , IL-6, and IL-1 β . **Results** After STZ-induced diabetic rats were treated by gavage for 6 weeks, compared with the Model group, the fasting blood glucose of rats in MET and UA groups was significantly decreased and their body weights were increased. Inflammatory infiltration of pancreatic islet β -cells was reduced. Expression of TLR4, MyD88, I κ B α , NF- κ B p65, and ROR γ t mRNAs and proteins was significantly decreased. LPS content was significantly decreased. I κ B α and Foxp3 mRNA and protein expression was significantly increased. The Th17/Treg ratio was significantly decreased, and TNF- α , IL-6, and IL-1 β contents were significantly decreased. **Conclusions** UA improves the symptoms of rats by reducing the LPS shift, inhibiting the TLR4/NF- κ B pathway, down-regulating ROR γ t expression, and up-regulating Foxp3 expression to correct the imbalance in the Th17/Treg cell ratio in T1DM rats.

【Keywords】 type 1 diabetes mellitus; ursolic acid; TLR4/NF- κ B pathway; Th17/Treg cells

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

I 型糖尿病 (type 1 diabetes mellitus, T1DM) 是胰岛 β 细胞被自身免疫系统进行性破坏所导致的胰岛素分泌不足引发的自身免疫性疾病。T1DM 患者血糖高、控制难度大;易出现酮症酸中毒、肾病、心血管疾病等并发症^[1-2]。目前,T1DM 的治疗仍以胰岛素注射为主^[3],新的治疗方式包括干细胞疗法、抗体治疗等^[4-5],但由于其造价昂贵、技术要求高,目前仍以胰岛素注射为主要治疗方式,缺乏有效的治疗手段。据世界糖尿病联盟最新统计,2021 年中国 T1DM 发病率位居世界第五位,T1DM 人数位居世界第四位^[6],成人出现 T1DM 常被误诊为 II 型糖尿病,T1DM 的危害性被严重低估。因此,探究有效药物作用新靶点、开发新药物对于治疗 T1DM 具有重要意义。

Toll 样受体 (Toll like receptors, TLR) 是参与非特异性免疫的一类重要分子蛋白,研究表明,TLR 参与自身免疫性疾病炎症的发生发展,在治疗自身免疫性疾病中具有巨大潜力^[7]。TLR 等先天免疫受体在宿主防御和炎症反应中有着重要作用,可直接识别并结合病原相关分子受体模式,导致炎症因子和趋化因子的释放^[8],可通过感知来自外源性微生物的特定配体触发先天免疫反应,从而诱导适应性免疫,在防御感染方面发挥关键作用^[9]。有研究显示,TLR4 是 β 细胞上的主要受体,在自身免疫性糖尿病的发展过程中,TLR4 信号通路选择性地损伤 β 细胞^[10]。辅助性 T 细胞 17 (T helper cell 17, Th17) 细胞和调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 是 CD4⁺T 细胞的两个功能相反的亚群。Th17 细胞能够诱导炎症反应,Treg 细胞在 T1DM 的发病过程中具有保护作用^[11]。最新研究表明,TLR4 在 CD4⁺

T 细胞上的表达普遍较高,与总 CD4⁺T 细胞相比,Treg 细胞始终表现出 TLR 表达的增加^[12]。TLR4/NF- κ B 通路可通过调控 Th17 细胞来改变 Th17/Treg 细胞平衡,Th17/Treg 细胞失衡也可通过调控 TLR4/MyD88/NF- κ B 途径调节 Th17 细胞和 Treg 细胞的转录因子 ROR γ t 和 Foxp3^[13-15]在 T1DM 患者中,CD4⁺T 细胞中 IL-6 的反应性增强,其通过调控先天免疫反应以促进 Th17 细胞并抑制 Treg 细胞。因此,IL-6 反应性增强有可能促进炎症和自身免疫^[16]。

熊果酸 (ursolic acid, UA) 是一种天然的五环三萜化合物,能够从木瓜、夏枯草、枇杷叶等水果和中药中提取^[17],具有抗炎、降糖、降脂、抑菌等作用^[18-20]。其降糖的分子机制尚未明确。

本研究通过链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 诱导 T1DM 大鼠模型^[21],UA 灌胃 6 周后取外周血、胰腺组织,检测 UA 对 TLR4/NF- κ B 通路相关指标及 Th17/Treg 细胞比例的变化,以此探究 UA 对 T1DM 的改善作用,为深入研究 UA 对 T1DM 的治疗作用,探究治疗 T1DM 的新靶点及 UA 的临床应用提供了重要基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 50 只,6 周龄,体重 160 ~ 180 g,由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供 [SCXK (鲁) 2022-0006],所有实验动物均按照 12 h/12 h 光照黑暗循环,温度 (22 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C 的标准在河南中医药大学动物房进行饲养 [SYXK (豫) 2021-0015]。动物实验操作均遵守河南中医药大学实验

动物伦理规范 (DWLL201903001),按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

UA (纯度 95%,毕得医药,批号:ALT428);链脲佐菌素 (纯度 98%,SIGMA-ALDRICH,批号:WXBD1402V);二甲双胍 (每片 0.25 g,上海信宜天平药业有限公司,批号:67180806);0.1 mol/L 柠檬酸钠缓冲液 (Solarbio 公司,批号:20190917);通用组织固定液 (批号:HP193504)、柠檬酸 (pH=6.0) 抗原修复液 (批号:G1202)、3% 双氧水 (批号:G0115)、BSA (批号:G5001)、胰岛素抗体 (批号:GB11334)、HRP 标记的山羊抗兔抗体 (批号:GB23303)、DAB 显色剂 (批号:G1211)、RIPA 裂解液 (批号:G2002)、BCA 蛋白定量检测试剂盒 (批号:G2026)、抗大鼠 β -actin (批号:LS203204)、抗大鼠 TLR4 (批号:LS203045)、抗大鼠 MyD88 (批号:00077168)、抗大鼠 $\text{IkB-}\alpha$ (批号:542619112702)、抗大鼠 NF- κ B p65 (批号:LS203564) 均购自武汉塞维尔生物科技有限公司;鲎试剂 (厦门鲎试剂生物科技有限公司,批号:20100154);无酶无菌水 (Solarbio,批号:20210315);RNA 提取液 (Solarbio,批号:20210205);无水乙醇 (上海沃凯生物技术有限公司,批号:20200220);TRIpure Reagent (艾德莱生物技术有限公司,批号:312326AX);HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (Vazyme,批号:7E452K0);SYBRTM Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific,批号:01000432)。血糖仪 (爱奥乐医疗器械有限公司,型号:G-425-3);正置荧光显微镜 (日本 OLYMPUS 公司,型号:DP73);实时荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司,型号:7500);蛋白电泳仪 (美国 BIO-RAD 公司,型号:POWER PAC 1000);自动凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司,型号:ChemiDoc);低温离心机 (美国 SCIOLOGEX 公司,型号:9013121121)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组、造模及给药

50 只 SPF 雄性 Wistar 大鼠,适应性喂养 7 d 后,造模组一次性腹腔注射 1% 链脲佐菌素 60 mg/kg,空白组 (Control 组) 注射等体积柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,7 d 后,连续 3 次空腹血糖 (fasting blood glucose,FBG) ≥ 16.7 mmol/L 为造模成功标准。将造模成功的大鼠随机分为模型组 (Model 组, $n=12$)、二甲双胍组 (metformin,MET 组, $n=12$) 和熊果酸组 (UA 组, $n=12$)。根据课题组前期实验,用药

组每天给药 100 mg/kg,空白组和模型组给予等体积羧甲基纤维素钠灌胃,每天 9:00 定时灌胃 1 次,每周根据体重调整灌胃量。

1.3.2 一般情况

每天检测大鼠体重、毛发、排便情况;每周提前 12 h 禁食不禁水,同一时间测大鼠 FBG。

1.3.3 采集标本

末次灌胃后禁食 12 h,采集大鼠血液和胰腺组织,用于后续实验。

1.3.4 免疫组化观察大鼠胰腺组织病理变化

将大鼠胰腺组织置于 4% 多聚甲醛固定 24 h 后,进行脱水、包埋、切片、中性树胶封片后,进行胰岛素抗体染色,镜下观察组织病理状态、炎性浸润情况,并拍摄照片。

1.3.5 鲎试剂检测内毒素含量

采用内毒素定量检测鲎试剂盒检测脂多糖 (lipopolysaccharide,LPS),微板定量显色基质法。严格按照试剂盒说明书进行操作,酶标仪于 450 nm 波长读取吸光度值。

1.3.6 qRT-PCR 法检测大鼠胰腺 TLR4、MyD88、 $\text{IkB}\alpha$ 、NF- κ B p65 mRNA 的表达

用 PCR 试剂盒提取胰腺组织 RNA,微型分光光度计检测 A260/A280 比值,逆转录合成 cDNA,使用 15 μ L 体系进行 qRT-PCR 反应程序:50 $^{\circ}$ C,2 min;95 $^{\circ}$ C,2 min;95 $^{\circ}$ C,15 s,60 $^{\circ}$ C,1 min,40 个循环。绘制溶解曲线用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算基因的相对表达量。基因引物序列见表 1。

表 1 PCR 基因引物序列

Table 1 PCR gene primer sequences

名称 Name	引物 Primer
GAPDH-F	5'-ACAGCAACAGGCTGCTGGAC-3'
GAPDH-R	5'-TTTGAGGTCAGCGAACTT-3'
TLR4-F	5'-TCCACAAGAGCCGAAAGTT-3'
TLR4-R	5'-TGAAGATGATGCCAGAGCGG-3'
MyD88-F	5'-GAGCAGTGTCCACAGACAA-3'
MyD88-R	5'-AGTAGCAGATGAAGCGCTCG-3'
IkB α -F	5'-CCACTCCACTTGCTGTGAT-3'
IkB α -R	5'-TTCCTCGAAAGTCTCGGAGC-3'
NF- κ B p65-F	5'-TGTATTTACGGGACCTGGC-3'
NF- κ B p65-R	5'-CAGGCTAGGGTCAGCGTATG-3'
ROR γ t-F	5'-TGGAAGACGTGGACTTCAGC-3'
ROR γ t-R	5'-CGTCTCTCGGTAGACTTCGC-3'
Foxp3-F	5'-CCATAATATCGGCCCCCTT-3'
Foxp3-R	5'-GCGGGGTGGTTTCTGAAGTA-3'

1.3.7 Western blot 法检测大鼠胰腺 TLR4、MyD88、IκBα、NF-κB p65 及转录因子 RORγt、Foxp3 蛋白表达水平

取大鼠胰腺组织,匀浆提取蛋白,电泳、转膜、封闭、孵育一抗(1:1000 稀释)、二抗、ELC 化学发光检测,使用 Alpha 软件处理目标条带光密度值,计算蛋白相对表达量。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 进行数据统计分析,多组间数据比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采用 LSD 检验,结果以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

空白组精神状态良好,进食进水正常,二便正常。模型组出现明显“三多一少”症状,FBG 升高,体重减轻,精神状态不佳,大便稀溏。二甲双胍组和熊果酸组随着用药时间延长,较模型组 FBG 明显下降($P<0.01$),体重增加($P<0.05$),精神状态明显

好转,毛发泛黄,大便成形,小便减少。见表 2、表 3。

2.2 胰腺组织病理改变

空白组胰岛形状完整,胰岛 β 细胞胞浆呈黄褐色,胞核呈蓝色,排列整齐,与周围组织界限清晰。模型组与空白组相比,胰岛形状不规则,胰岛 β 细胞有大量炎性浸润,细胞体积缩小,排列不规则,与周围组织界限不清。二甲双胍组和熊果酸组与模型组相比,胰岛形状较规则,胰岛 β 细胞有少量炎性浸润,细胞体积变大,排列较规则,与周围组织界限清楚。见图 1。

2.3 血清 LPS 水平变化

模型组与空白组相比,大鼠血清 LPS 含量明显升高($P<0.01$),二甲双胍组和熊果酸组与模型组相比,大鼠血清 LPS 含量明显降低($P<0.01$)。见图 2。

2.4 TLR4、MyD88、IκBα、NF-κB p65、RORγt、Foxp3 mRNA 表达变化

表 4 结果显示,模型组与空白组相比,大鼠胰腺 TLR4、MyD88、NF-κB p65、RORγt mRNA 表达水平明显升高($P<0.01$),IκBα、Foxp3 mRNA 表达水平明显降低。二甲双胍组和熊果酸组与模型组相比,

表 2 各组大鼠 FBG 变化(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)
Table 2 Changes in FBG in rats in each group

组别 Groups	数量 <i>n</i>	0 周 0 week	3 周 3 weeks	6 周 6 weeks
空白组 Control group	10	4.63±0.54	4.90±0.90	5.15±0.41
模型组 Model group	12	22.90±2.31**	23.73±5.04**	25.38±5.30**
二甲双胍组 MET group	12	22.20±2.84	17.10±5.06##	9.82±3.78##
熊果酸组 UA group	12	22.17±3.53	16.80±2.33##	9.53±2.03##

注:与空白组相比, ** $P<0.01$;与模型组相比, ## $P<0.01$ 。
Note. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with Model group, ## $P<0.01$.

表 3 各组大鼠体重变化(g, $\bar{x}\pm s$)
Table 3 Changes in body weight of rats in each group

Groups	数量 <i>n</i>	0 周 0 week	3 周 3 weeks	6 周 6 weeks
空白组 Control group	10	218.75±10.81	319.25±14.86	373.50±21.61
模型组 Model group	12	189.67±14.40**	197.83±6.91**	199.83±11.41**
二甲双胍组 MET group	12	190.83±11.03	220.00±17.04##	244.17±19.19##
熊果酸组 UA group	12	185.17±17.61	215.33±12.23#	236.17±14.15##

注:与空白组相比, ** $P<0.01$;与模型组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。
Note. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with Model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

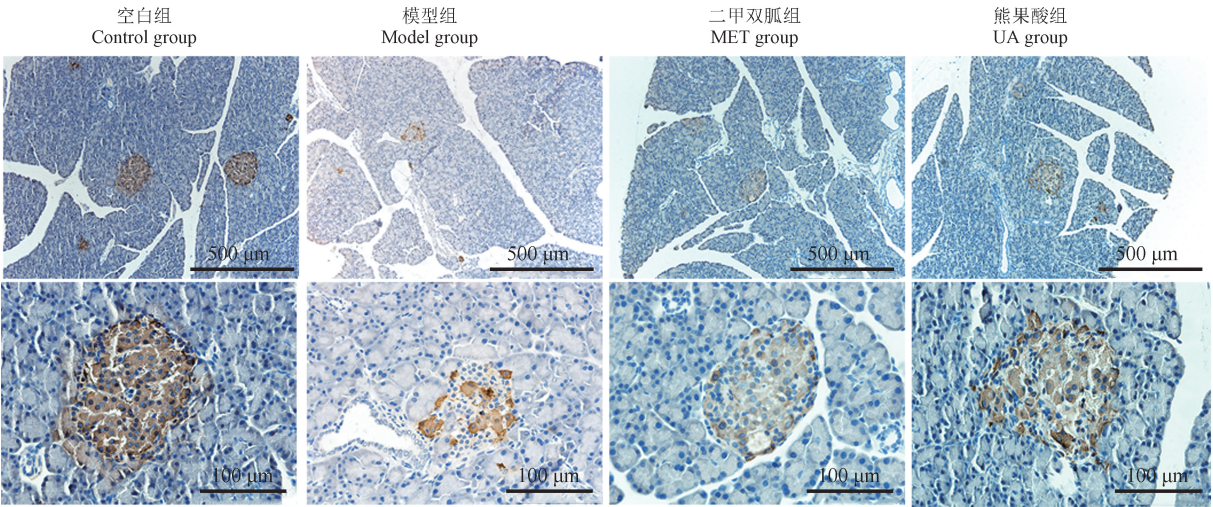


图 1 各组大鼠胰腺组织免疫组化(IHC)

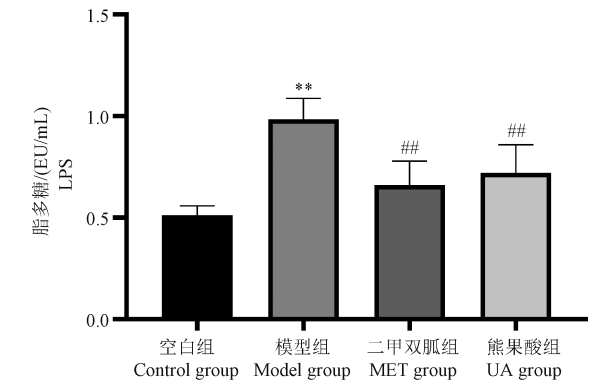
Figure 1 Immunohistochemistry of rat pancreatic tissue in various groups (IHC)

表 4 各组大鼠胰腺 TLR4、MyD88、IκBα、NF-κB p65、RORγt、Foxp3 mRNA 表达变化(̄x±s,n=6)

Table 4 Changes in pancreatic TLR4, MyD88, IκBα, NF-κB p65, RORγt, Foxp3 mRNA expression in rats in each group

组别 Groups	TLR4	MyD88	IκBα	NF-κB p65	RORγt	Foxp3
空白组 Control group	1	1	1	1	1	1
模型组 Model group	2.15±0.30**	2.06±0.60**	0.72±0.13**	1.35±0.24**	2.53±0.58**	0.66±0.09**
二甲双胍组 MET group	1.26±0.25##	1.28±0.19##	1.34±0.22##	1.09±0.12#	1.42±0.35##	1.39±0.20##
熊果酸组 UA group	1.37±0.27##	1.14±0.13##	1.14±0.09##	1.06±0.18##	1.26±0.18##	1.50±0.31##

注:与空白组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。
Note. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with Model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.



注:与空白组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,## $P<0.01$ 。

图 2 各组大鼠血清 LPS 水平变化

Note. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with Model group, ## $P<0.01$.

Figure 2 Changes in serum LPS levels in various groups of rats

大鼠胰腺 TLR4、MyD88、RORrt mRNA 表达水平明显降低($P<0.01$),NF-κB p65 mRNA 表达水平降低

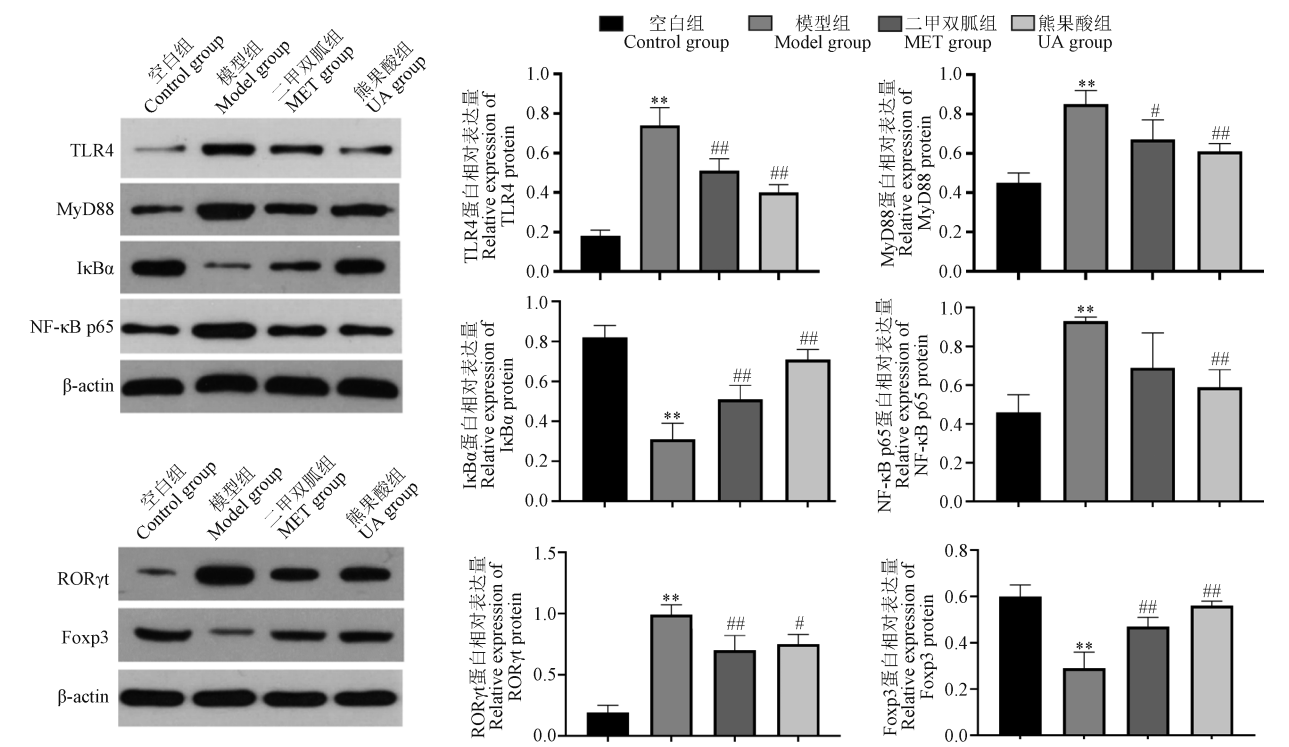
($P<0.05$, $P<0.01$),IκBα、Foxp3 mRNA 表达水平明显升高($P<0.01$)。

2.5 TLR4、MyD88、IκBα、NF-κB p65 及转录因子 RORγt、Foxp3 蛋白表达变化

模型组与空白组相比,大鼠胰腺 TLR4、MyD88、NF-κB p65 蛋白表达水平明显升高($P<0.01$),IκBα 蛋白表达水平明显降低。二甲双胍组和熊果酸组与模型组相比,TLR4 蛋白表达水平明显降低($P<0.01$),MyD88 蛋白表达水平降低($P<0.05$, $P<0.01$),IκBα 蛋白表达水平明显升高($P<0.01$),熊果酸组大鼠 NF-κB p65 蛋白表达水平明显降低($P<0.01$),见图 3。

2.6 外周血 Th17、Treg 细胞比例变化

如图 4~图 6 所示,连续灌胃 6 周后,模型组与空白组大鼠相比,外周血 CD4⁺IL-17A⁺Th17 细胞比例明显升高($P<0.01$),CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞比例明显降低($P<0.01$),Th17/Treg 比值明显升高

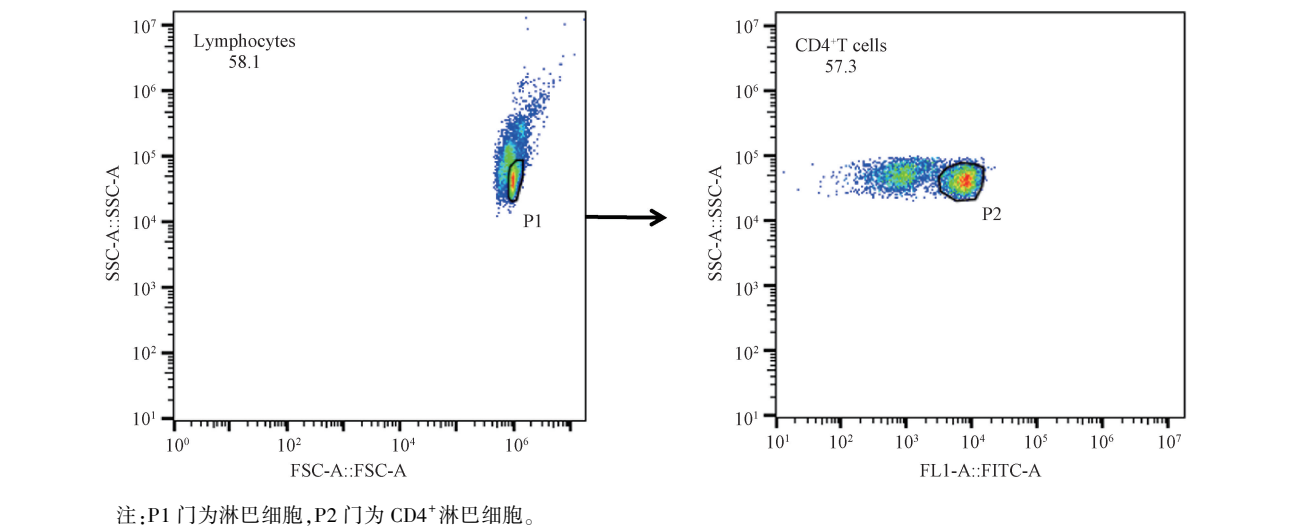


注:与空白组相比, ** $P<0.01$;与模型组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图3 各组大鼠胰腺 TLR4、MyD88、IκBα、NF-κB p65、RORγt、Foxp3 蛋白表达情况

Note. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with Model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 3 Protein expression of TLR4, MyD88, IκBα, NF-κB p65, RORγt, Foxp3 in pancreas of rats in each group



注:P1 门为淋巴细胞,P2 门为 CD4⁺ 淋巴细胞。

图4 设门信息

Note. Gate P1 for lymphocytes, gate P2 for CD4⁺ lymphocytes.

Figure 4 Gate information

($P<0.01$)。二甲双胍组和熊果酸组分别与模型组相比,大鼠外周血 CD4⁺IL-17A⁺Th17 细胞比例明显降低($P<0.01$),CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞比例明显升高($P<0.01$),Th17/Treg 比值明显降低($P<0.01$)。

2.7 血清 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平变化

连续灌胃 6 周后,与空白组相比,模型组大鼠血清 TNF-α、IL-6、IL-1β 含量明显升高($P<0.01$),与模型组相比,二甲双胍组、熊果酸组大鼠血清 TNF-α、IL-6、IL-1β 含量明显降低($P<0.01$,图 7)。

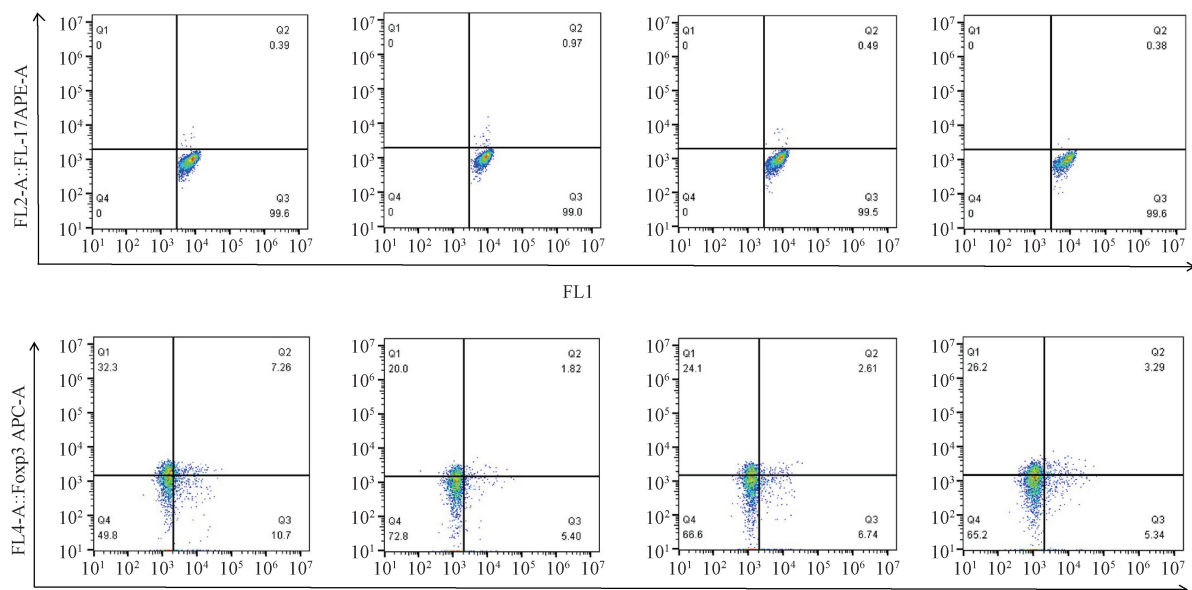
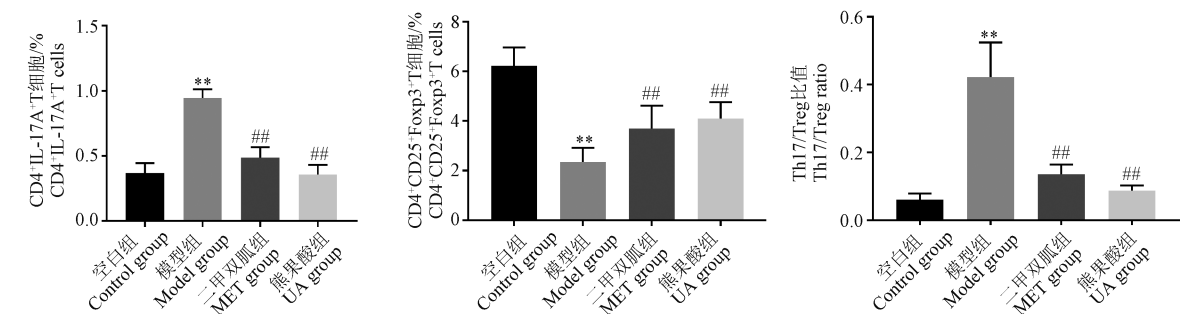


图 5 各组大鼠外周血 CD4⁺IL-17A⁺Th17、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞比例

Figure 5 Percentage of peripheral blood CD4⁺IL-17A⁺Th17, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg cells in each group of rats

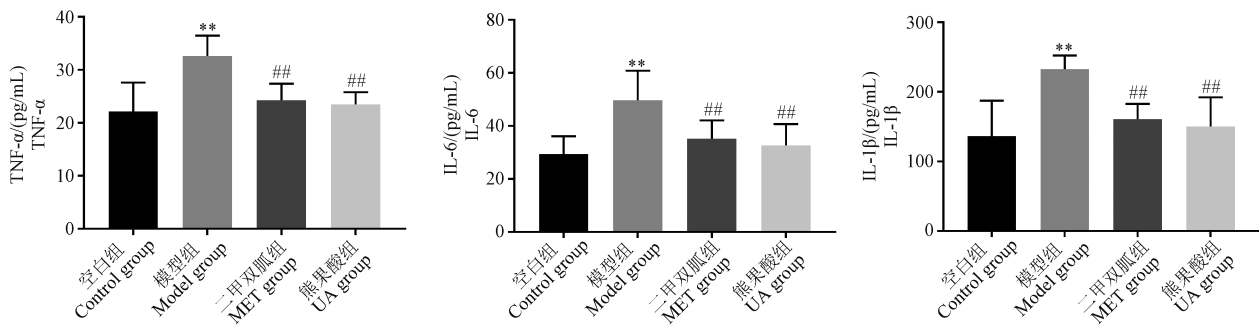


注:与空白组相比, ** $P<0.01$;与模型组相比, ## $P<0.01$ 。

图 6 各组大鼠外周血 Th17、Treg 细胞比例

Note. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with Model group, ## $P<0.01$.

Figure 6 Percentage of peripheral blood Th17 and Treg cells in each group of rats



注:与空白组相比, ** $P<0.01$;与模型组相比, ## $P<0.01$ 。

图 7 各组大鼠血清 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 表达的变化

Note. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with Model group, ## $P<0.01$.

Figure 7 Changes in the expression of serum TNF-α, IL-6 and IL-1β in rats of all groups

3 讨论

T1DM 是一种以胰岛素分泌受损和持续性高血糖为特征的异质性自身免疫性疾病。目前, T1DM 的发病机制尚不完全清楚, 主要认为是由环境、遗传等因素引起的一类自身免疫性疾病, T1DM 发病率呈逐年上升的趋势, 患者易出现酮症酸中毒、肾病、心血管疾病等并发症^[2,22]。研究证实, 先天免疫和获得性免疫都参与了 T1DM 的发生^[23]。研究表明, UA 是一种广泛存在于植物中的亲脂性五环三萜类化合物, 具有降糖、抗炎、抗氧化等作用^[18,20], 但其降糖机制尚不明确。

TLR4/NF- κ B 通路及 Th17/Treg 细胞平衡的破坏在自身免疫性疾病中起着重要作用。研究表明, TLR4/NF- κ B 信号通路可能是增强天然免疫和获得性免疫的潜在机制^[24]。TLR4 是革兰氏阴性菌外膜的主要成分 LPS 的受体, TLR4 的促炎活性与自身免疫性疾病对内源性配体的病理反应有关。当微生物突破肠道屏障, TLR4 与 LPS 结合可激活级联反应触发适应性免疫的启动^[25]。TLR4 通过受体二聚化与下游的 NF- κ B 联系, NF- κ B 被激活后, 使磷酸化抑制剂 I κ B 被磷酸化并降解, NF- κ B 二聚体释放转移到细胞核并激活基因表达, 在免疫调节中发挥核心作用。最近, TLR4 被证实在 T1DM 发展过程中促进炎症状态和胰岛 β 细胞的自身免疫性破坏^[26-27]。研究表明, 炎症触发因子可能通过 TLR4 发出信号, 选择性损伤 β 细胞^[28]。与非糖尿病相比, T1DM 的 TLR4 mRNA 明显增加, TLR4 阻断可降低 CD4⁺T 细胞活化和自身抗原特异性增值, 降低浸润性胰岛炎症, 防止糖尿病的发生发展^[29]。Th17 和 Treg 细胞平衡对保护性免疫和自身免疫疾病的发展至关重要。Duan 等^[11]发现 MET 以剂量依赖的方式抑制 T 细胞的增值, 通过抑制 Th17 细胞分化, 促进 Treg 的产生, 可显著缓解自身免疫性胰岛炎症。Th17 细胞特异性表达 ROR γ t 产生促炎细胞因子, 介导炎症反应, Treg 细胞在 Foxp3 的调控下能阻止 Th17 细胞的诱导和增值, 恢复免疫平衡^[30-31]。靶向 ROR γ t 的小分子通过抑制 Th17 细胞分化能抑制自身免疫性疾病^[32]。Th17 细胞能够促进炎症发展, Treg 细胞能够抑制自身免疫, 因此, Th17/Treg 细胞平衡对于炎症发展至关重要^[33]。研究表明, Th17/Treg 细胞平衡和 TLR4/NF- κ B 通路参与组织

损伤和免疫应答, Th17/Treg 细胞比例失衡也可以通过调节 Th17 和 Treg 细胞的转录因子 RoR γ t 和 Foxp3, 通过 TLR4/NF- κ B 信号转导途径来改变^[34]。有研究证明, 当小鼠中的 TLR4 被敲低之后, NF- κ B 也随之被抑制, 同时, 血浆中的 IL-1 β 等也显著降低^[35]。

本实验采用 STZ 复制 T1DM 大鼠模型, 通过单次注射 STZ (50~65 mg/kg) 诱导胰岛 β 细胞发生结构改变^[36]。以 MET 作为阳性药物, 观察熊果酸组 T1DM 改善效果。研究表明, MET 可通过抑制 Th17, 并促进 Treg 改善自身免疫性胰岛炎症^[11], 可改善 T1DM 患者体重, 胰岛素抵抗, 对患者心脏有着保护作用^[37]。本实验以 UA 作为治疗药物, 课题组前期通过对 T1DM 大鼠转录因子 T-bet/GATA-3 表达的研究发现, UA 不仅能通过下调 T-bet, 上调 GATA-3 的表达纠正 Th1/Th2 细胞因子失衡, 从而发挥降糖作用; 还可通过调节肠道微生物群并纠正 Th17/Treg 细胞失衡改善 T1DM 大鼠胰岛 β 细胞损伤, 降低 FBG 水平^[38-39]。Wang 等^[40]研究发现, UA 能通过抑制 TLR4/NF- κ B 并激活 Nrf2/HO-1 来改善小鼠的皮炎症状。

本研究证明, T1DM 大鼠存在 LPS 的移位, 激活 TLR4/NF- κ B 通路, 使 Th17/Treg 细胞比例失衡, 增加炎性细胞因子的分泌。通过 UA 干预 T1DM 大鼠 6 周后, 不仅能减少 LPS 移位, 抑制 TLR4/NF- κ B 通路, 还能纠正 Th17/Treg 细胞比例失衡, 减少炎性细胞因子的分泌, 进而改善 T1DM 大鼠症状, 减缓胰岛 β 细胞的进行性破坏。

综上所述, 本研究表明 UA 能够通过调控 TLR4/NF- κ B 通路及 Th17/Treg 细胞平衡降低大鼠 FBG, 抑制大鼠胰岛炎症水平, 减轻胰岛 β 细胞损伤, 有效改善 T1DM 症状。本研究为 UA 的新应用提供了实验基础, 也进一步为 UA 等中药单体成分在糖尿病等自身免疫性疾病中的应用提供了理论依据。

参考文献:

- [1] COLOM C, RULL A, SANCHEZ-QUESADA J L, et al. Cardiovascular disease in type 1 diabetes mellitus: epidemiology and management of cardiovascular risk [J]. J Clin Med, 2021, 10(8): 1798.
- [2] VERONIKI AA, SEITIDIS G, STEWART L, et al. Comparative efficacy and complications of long-acting and intermediate-acting

insulin regimens for adults with type 1 diabetes: an individual patient data network meta-analysis [J]. *BMJ Open*, 2022, 12 (11): e058034.

[3] TAKITA M. Multicenter trial of closed-loop control in type 1 diabetes [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(6): 577.

[4] 张芮, 司维. 干细胞移植治疗 1 型糖尿病的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(6): 128-132.

ZHANG R, SI W. Progress in the treatment of type 1 diabetes mellitus with stem cell transplantation [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(6): 128-132.

[5] ZHANG X, DONG Y, LIU D, et al. Antigen-specific immunotherapies in type 1 diabetes [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2022, 73: 127040.

[6] SUN H, SAEEDI P, KARURANGA S, et al. IDF Diabetes Atlas: global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2022, 183: 109119.

[7] DASGUPTA S, DASGUPTA S, BANDYOPADHYAY M. Regulatory B cells in infection, inflammation, and autoimmunity [J]. *Cell Immunol*, 2020, 352: 104076.

[8] 杨冬晗, 张文龙, 侯瑞丽, 等. Toll 样受体 4 信号途径在酒精性肝损伤中的作用研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(10): 126-130.

YANG D H, ZHANG W L, HOU R L, et al. The role of the toll-like receptor 4 signaling pathway in alcoholic liver injury [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(10): 126-130.

[9] KIM T K, LEE M S. Innate immune receptors in type 1 diabetes: the relationship to cell death-associated inflammation [J]. *Biochem Soc Trans*, 2020, 48(3): 1213-1225.

[10] LI M, SONG L, GAO X, et al. Toll-like receptor 4 on islet β cells senses expression changes in high-mobility group box 1 and contributes to the initiation of type 1 diabetes [J]. *Exp Mol Med*, 2012, 44(4): 260-267.

[11] DUAN W, DING Y, YU X, et al. Metformin mitigates autoimmune insulinitis by inhibiting Th1 and Th17 responses while promoting Treg production [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11 (4): 2393-2402.

[12] SCHARMACH J, WARTENBERG M, SAUER H. The pro-inflammatory signature of lipopolysaccharide in spontaneous contracting embryoid bodies differentiated from mouse embryonic stem cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2023, 27(14): 2045-2058.

[13] QU X, HAN J, ZHANG Y, et al. TLR4-RelA-miR-30a signal pathway regulates Th17 differentiation during experimental autoimmune encephalomyelitis development [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 183.

[14] CHANG Y, ZHAI L, PENG J, et al. Timosaponin AIII and its metabolite sarsasapogenin ameliorate colitis in mice by inhibiting NF- κ B an [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 141: 111931.

[15] 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.

[16] IHANTOLA E L, VIISANEN T, GAZALI A M, et al. Effector T cell resistance to suppression and STAT3 signaling during the development of human type 1 diabetes [J]. *J Immunol*, 2018, 201(4): 1144-1153.

[17] 刘慧妍, 黄馨慧, 张艳海. HPLC 法快速测定 8 种中药中齐墩果酸和熊果酸 [J]. *中草药*, 2017, 48(10): 1998-2001.

LIU H Y, HUANG X H, ZHANG Y H. Rapid determination of oleanolic acid and ursolic acid in eight kinds of Chinese materia medica by HPLC [J]. *Acupunct Res*, 2017, 48(10): 1998-2001.

[18] PIRONI A M, DE ARAÚJO P R, FERNANDES M A, et al. Characteristics, biological properties and analytical methods of ursolic acid: a review [J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2018, 48(1): 86-93.

[19] MA X, BAI Y, LIU K, et al. Ursolic acid inhibits the cholesterol biosynthesis and alleviates high fat diet-induced hypercholesterolemia via irreversible inhibition of HMGCS1 *in vivo* [J]. *Phytomedicine*, 2022, 103: 154233.

[20] ZHAO J, ZHENG H, SUI Z, et al. Ursolic acid exhibits anti-inflammatory effects through blocking TLR4-MyD88 pathway mediated by autophagy [J]. *Cytokine*, 2019, 123: 154726.

[21] 蒋升, 谢自敬, 张莉. 链脲佐菌素诱导 1 型糖尿病大鼠模型稳定性观察 [J]. *中国比较医学杂志*, 2006, 16(1): 16-18.

JIANG S, XIE Z J, ZHANG L. Observation of stability of type I diabetic rat models induced by streptozotocin [J]. *Chin J Comp Med*, 2006, 16(1): 16-18.

[22] CALIMAG A P P, CHLEBEK S, LERMA E V, et al. Diabetic ketoacidosis [J]. *Dis Mon*, 2023, 69(3): 101418.

[23] SUN L, XI S, HE G, et al. Two to tango: dialogue between adaptive and innate immunity in type 1 diabetes [J]. *J Diabetes Res*, 2020, 2020: 4106518.

[24] LAI J L, LIU Y H, LIU C, et al. Indirubin inhibits LPS-induced inflammation via TLR4 abrogation mediated by the NF- κ B and MAPK signaling pathways [J]. *Inflammation*, 2017, 40 (1): 1-12.

[25] ZENG X, LIU G, PENG W, et al. Combined deficiency of SLAMF8 and SLAMF9 prevents endotoxin-induced liver inflammation by downregulating TLR4 expression on macrophages [J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(2): 153-162.

[26] CHEN M, ZHANG Q, WEI Y, et al. Anti-CD20 therapy ameliorates β cell function and rebalances Th17/Treg cells in NOD mice [J]. *Endocrine*, 2022, 76(1): 44-52.

[27] BEHL T, SHARMA E, SEHGAL A, et al. Expatriating the molecular approaches of HMGB1 in diabetes mellitus: highlighting signalling pathways via RAGE and TLRs [J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(2): 1869-1881.

[28] SAVCHENKO L G, DIGTIAR N I, SELIKHOVA L G, et al. Liraglutide exerts an anti-inflammatory action in obese patients with type 2 diabetes [J]. *Rev Roum De Med Interne*, 2019, 57

- (3): 233–240.
- [29] ALIBASHE-AHMED M, BRIOUDES E, REITH W, et al. Toll-like receptor 4 inhibition prevents autoimmune diabetes in NOD mice [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 19350.
- [30] XIE J, NIE S, YU Q, et al. *Lactobacillus plantarum* NCU116 attenuates cyclophosphamide-induced immunosuppression and regulates Th17/treg cell immune responses in mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(6): 1291–1297.
- [31] 丁习, 赵洋, 伍丽萍, 等. 不同条件下建立自身免疫性甲状腺炎小鼠模型的比较研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(4): 449–458.
- DING X, ZHAO Y, WU L P, et al. Mouse models of experimental autoimmune thyroiditis under different conditions; a comparative study [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(4): 449–458.
- [32] TAN J, LIU H, HUANG M, et al. Small molecules targeting ROR γ t inhibit autoimmune disease by suppressing Th17 cell differentiation [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(8): 697.
- [33] 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.
- [34] WEI C B, TAO K, JIANG R, et al. Quercetin protects mouse liver against triptolide-induced hepatic injury by restoring Th17/Treg balance through Tim-3 and TLR4-MyD88-NF- κ B pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 53: 73–82.
- [35] 李嘉慧, 王欣佩, 冷静. TLR4/NF- κ B 参与动脉粥样硬化发生发展机制的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(4): 137–142.
- LI JH, WANG X P, LENG J. The mechanism of TLR4/NF- κ B in atherosclerosis [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(4): 137–142.
- [36] WANG-FISCHER Y, GARYANTES T. Improving the reliability and utility of streptozotocin-induced rat diabetic model [J]. *J Diabetes Res*, 2018, 2018: 8054073.
- [37] BJORNSTAD P, SCHÄFER M, TRUONG U, et al. Metformin improves insulin sensitivity and vascular health in youth with type 1 diabetes mellitus [J]. *Circulation*, 2018, 138(25): 2895–2907.
- [38] 宋超杰, 张小莉, 陈维维, 等. 熊果酸对 1 型糖尿病大鼠转录因子 T-bet/GATA-3 表达的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2020, 36(18): 2489–2494.
- SONG C J, ZHANG X L, CHEN W W, et al. Effect of ursolic acid on the expression of transcription factor T-bet/GATA-3 in type 1 diabetic rats [J]. *J Pract Med*, 2020, 36(18): 2489–2494.
- [39] CHEN W, YU Y, LIU Y, et al. Ursolic acid regulates gut microbiota and corrects the imbalance of Th17/Treg cells in T1DM rats [J]. *PLoS One*, 2022, 17(11): e0277061.
- [40] WANG Z, ZHANG H, QI C, et al. Ursolic acid ameliorates DNCB-induced atopic dermatitis-like symptoms in mice by regulating TLR4/NF- κ B and Nrf2/HO-1 signaling pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 118: 110079.

[收稿日期]2023-09-07