

· 中医药抗肝衰竭炎症反应的免疫学机制研究专题 ·

[编者按] 湖南中医药大学第一附属医院中医肝胆病学科立足传统中医理论基础,通过对老中医临床经验的继承与挖掘,运用现代流行病学调查方法,发现在肝衰竭黄疸症证候分布与演变过程中存在一种以“脾虚”为本,虚实夹杂的特殊证候阶段,提出“阴阳黄证”证候名,并依据清温并用治法制定“温阳解毒化瘀方”,发展与丰富了肝衰竭黄疸症的中医学基础理论与治疗体系。该法经全国多中心临床研究证实能有效降低肝衰竭病死率,并根据肠-肝轴理论,从肠道菌群、肠道屏障功能和 T 淋巴细胞免疫功能等,揭示炎症反应在肝衰竭发病中的作用机制,及其与中医证候“阳黄-阴阳黄-阴黄”的相关性,发现中医常用治法清热化湿法和温阳健脾法能调节肝衰竭患者肠道菌群,有效保护肠道屏障功能,从而有效改善肠源性内毒素血症。并进一步选择与肝衰竭炎症反应密切相关的 T 淋巴细胞亚群 Treg/Th17 细胞为研究切入点,探讨肝衰竭不同分期和不同中医证候的细胞免疫学特征,并通过动物实验和体外细胞培养模拟了人体肝衰竭的进展期和平台期炎症反应状态,研究清法、温法、清温并用法对其 Treg/Th17 细胞及细胞因子表达的影响,以期从肝衰竭炎症反应的免疫学调控机制,逐步阐明清温并用法抗肝衰竭的作用靶点及可能机制。

清温并用法对慢加急性肝衰竭肠源性内毒素血症大鼠结肠组织 FoxP3, ROR- γ t 表达的影响

陈斌^{1*}, 丁秀丽², 彭杰¹, 黎运芳², 王若宇¹, 周意¹

(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: 研究清温并用法(即温阳解毒化瘀方)对慢加急性肝衰竭(ACLF)大鼠结肠组织叉头样转录因子 3(FoxP3), 维甲酸相关核孤儿受体- γ t(ROR- γ t)表达的影响, 探索其对肝衰竭肠源性内毒素血症(IETM)的可能调节机制。方法: 130 只 SD 大鼠随机分为正常组 10 只, 造模组 120 只。造模组以皮下注射牛血清白蛋白致敏法, 腹腔注射 D-氨基半乳糖(D-Gal) + 脂多糖(LPS)建立 ACLF 大鼠模型。将成模的大鼠随机分为模型组, 清法组(茵陈蒿汤 6.68 g·kg⁻¹), 温法组(茵陈术附汤 7.09 g·kg⁻¹), 清温并用法组(温阳解毒化瘀方 19.53 g·kg⁻¹)。正常组及模型组予蒸馏水灌胃, 其余各组予等容积相应中药灌胃, 共 1 周。检测各项指标在 1, 12, 24 h 时间点的数值, 流式细胞仪检测外周血调节性 T 淋巴细胞(Treg)/辅助性 T 淋巴细胞(Th)17 细胞比值变化, 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测结肠组织 FoxP3, ROR- γ t mRNA 表达, 原位杂交法、免疫组化法观察大鼠结肠组织 FoxP3, ROR- γ t mRNA 及蛋白表达。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠 Treg/Th17 细胞在上述时间点显著下降($P < 0.01$); 与模型组比较, 清法、温法组 Treg/Th17 细胞差异无统计学意义, 清温并用法 Treg/Th17 细胞升高($P < 0.05$); 与正常组比较, 模型组大鼠 FoxP3, ROR- γ t mRNA 在上述时间点表达均显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 清法、温法组 FoxP3, ROR- γ t mRNA 在上述时间点均有所降低($P < 0.05$), 清温并用法组显著降低($P < 0.01$); 清温并用法组 FoxP3, ROR- γ t mRNA 较清法组、温法组有所下降($P < 0.05$)。结论: 清温并用法治疗肝衰竭 IETM 的机制可能与调节 FoxP3, ROR- γ t 表达有关。

[关键词] 清温并用法; 慢加急性肝衰竭; 肠源性内毒素血症; 叉头样转录因子 3; 维甲酸相关核孤儿受体- γ t

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2020)02-0019-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200225

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191011.1502.005.html>

[网络出版时间] 2019-10-11 17:15

[收稿日期] 20190621(011)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81673959); 湖南省高层次卫生人才“225”工程培养项目

[通信作者] * 陈斌, 博士, 主任医师, 从事中医药防治肝病研究, E-mail: chenbin0410@126.com

Effect of Warming and Heat-clearing Method on Expressions of FoxP3 and ROR- γ t in Colon Tissue of Rats with Intestinal Endotoxemia Caused by Acute-on-chronic Liver Failure

CHEN Bin^{1*}, DING Xiu-li², PENG Jie¹, LI Yun-fang², WANG Ruo-yu¹, ZHOU Yi¹

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

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

[Abstract] **Objective:** To study the effect of warming and heat-clearing method (Wenyang Jiedu Huayu decoction) on the expressions of Forkhead box P3 (FoxP3), Retinoic acid-related orphan receptor gamma t (ROR- γ t) in colon tissue of mice with acute-on-chronic liver failure (ACLF), in order to explore the possible regulatory mechanism on intestinal endotoxemia (IETM) in liver failure mice. **Method:** The 130 SD rats were randomly divided into normal group (10 rats) and model group (120 rats). The ACLF mice model was established through the subcutaneous injection with bovine serum albumin and the intraperitoneal injection with *D*-galactosamine (*D*-Gal) and lipopolysaccharide (LPS). The model mice were randomly divided into model group, heat-clearing group (Yinchenhao decoction, 6.68 g · kg⁻¹), warming group (Yinchen Zhufu decoction, 7.09 g · kg⁻¹) and warming and heat-clearing group (Wenyang Jiedu Huayu decoction, 19.53 g · kg⁻¹). The normal group and the model group were given distilled water by gastric lavage, while the other groups were given equal volume of corresponding Chinese herbal medicines for a week. The value of each index at 1, 12 and 24 h was measured. The ratio of Treg/Th17 cell in peripheral blood were detected and calculated by flow cytometry. Real-time fluorescence quantitative PCR (Real-time PCR) was used to detect the expressions of FoxP3 and ROR- γ t in colon tissues of mice at different time points. In situ hybridization and immunohistochemistry were used to observe the expressions of FoxP3 and ROR- γ t genes and proteins. **Result:** Compared with normal group, the ratio of Treg/Th17 in the model group decreased significantly at each time point ($P < 0.01$). Compared with the model group, the Treg/Th17 ratio increased only in the warming and heat-clearing method group ($P < 0.05$). Compared with normal group, the expression of ROR- γ t in the model group was significantly higher ($P < 0.01$), and the expression of ROR- γ t in the model group was higher than FoxP3. Compared with the model group, the expressions of FoxP3 and ROR- γ t mRNA in the heat-clearing group and the warming group decreased at each time point ($P < 0.05$), and the expressions of FoxP3 and ROR- γ t in the warming and heat-clearing method group decreased significantly ($P < 0.01$). The expressions of FoxP3 and ROR- γ t mRNA in warming and heat-clearing group decreased compared with those in the warming group and heat-clearing group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The mechanism of the warming and heat-clearing method on IETM in liver failure may be related to the regulation of FoxP3 and ROR- γ t expressions.

[Key words] warming and heat-clearing method; acute-on-chronic liver failure; intestinal endotoxemia; Forkhead box P3 (FoxP3); retinoic acid-related orphan receptor-gamma t (ROR- γ t)

肝衰竭是临床危急重症,以黄疸、腹水、凝血功能障碍、器官严重衰竭为主要表现,预后极差,病死率高^[1]。肝衰竭时炎症反应应答决定着肝组织损伤的严重程度,而抑炎与促炎因子失衡引起“炎症反应失控”,加重了肝损伤。调节性 T 淋巴细胞 (Treg),辅助性 T 淋巴细胞(Th)17 细胞作为辅助性 CD4⁺ T 淋巴细胞的新亚群,分别以叉头样转录因子 3 (FoxP3),维甲酸相关核孤儿受体 γ t (ROR- γ t) 为

特异性转录因子,其与炎症反应调控的关系日益受到重视^[2]。相关研究表明,Treg/Th17 细胞失衡及其特异性转录因子表达异常与慢性乙型肝炎、慢加急性肝衰竭 (ACLF) 的免疫学发病机制、患者生存率密切相关。肝衰竭属于中医“黄疸”“急黄”范畴,黄疸常以阴阳为纲,阳黄常用清热利湿法(简称清法),阴黄常用温阳健脾法(简称温法)^[3-6]。课题组长期临床实践发现,肝衰竭后期湿、热、瘀、虚,相互

交织^[7],强调以“温阳健脾”法为代表的温法全程干预,治疗上重视在清热利湿基础上配合温阳健脾(简称清温并用法),并由清法、温法代表方剂茵陈蒿汤和茵陈术附汤化裁形成清温并用法代表方温阳解毒化瘀方。前期研究证明清温并用法对 ACLF 疗效确切,可降低 Treg/Th17 相关细胞因子水平,以减轻肠源性内毒素血症(IETM)^[8-9]。但是否与调节其转录因子 FoxP3, ROR- γ t 的表达有关,尚不清楚。为明确二者的相关性,实验拟观察清温并用法对 ACLF 模型大鼠结肠组织 FoxP3, ROR- γ t 表达的影响,探究其减轻肝衰竭 IETM 的可能机制,为中医药治疗肝衰竭提供一定理论依据。

1 材料

1.1 动物 130 只健康 SD 大鼠,体质量(140 ± 10) g,均为雄性,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号 SCXK(湘)2016-0002。实验在湖南中医药大学动物实验中心开展,经湖南中医药大学动物伦理委员会批准,编号 HN-LL-2017-016。

1.2 药物 茵陈蒿汤(茵陈 30 g,栀子 10 g,大黄 10 g,甘草片 6 g);茵陈术附汤(茵陈 30 g,肉桂 3 g,附子 10 g,干姜 5 g,白术 15 g,甘草片 6 g);温阳解毒化瘀方(茵陈 30 g,赤芍 60 g,丹参 30 g,黑附片 10 g,白术 30 g,薏苡仁 30 g)。中药饮片均由湖南中医药大学第一附属医院中药房提供,药材质量经本单位药学部张志国主任药师鉴定均为正品。

1.3 试剂 牛血清白蛋白, D-氨基半乳糖,脂多糖(Solarbio 公司,批号分别为 630G056/518H052, 210E052, 426H032);原位杂交试剂盒(Boster 公司,批号 MK2402);免疫组化试剂盒(中杉金桥公司,批号 PV-9000);弗氏不完全佐剂(Sigma 公司,批号 1002453350);FoxP3 多克隆抗体, ROR- γ t 多克隆抗体(ABclonal 公司,批号分别为 A8024, A10240);CD4, 白细胞介素(IL)-17A, FoxP3 抗体试剂盒(BD 公司,批号分别为 561005, 560486, 560045);YBR Green PCR 试剂盒(KAPA Biosystems 公司,批号 KM4101);逆转录试剂盒(TAKARA 公司,批号 639505)。

1.4 仪器 JY92-II 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝公司);FACSCanto II 型流式细胞仪(美国 BD 公司);Real-Time System 型荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rid 公司);FA 型电子天平(上海台之横公司);Centrifuge 5424 R 型离心机(德国 Eppendorf 公司);RM2235 型轮转石蜡切片机(德国徕卡公司);SW-CJ-2D 型超净工作台(苏州净化设置有限公司);YD-A 型生物组织摊片机(上海五相公司);

DHP-9052 型 37 °C 恒温培养箱(上海齐欣公司);PiPet-Lite 型微量移液枪(美国 Rainin 公司);BA410 研究型显微镜(中国 Motic 公司)。

2 方法

2.1 分组及造模 大鼠适应性饲养 1 周后,按体质量随机分组,正常组 10 只,剩余 120 造模。参考文献[10]并加以改进,采用皮下多点注射牛血清白蛋白致敏法,血清白蛋白乳化液 0.5 mL/次(其中牛血清白蛋白 4 mg),于第 1, 15, 25, 35 天注射,共 4 次,建立免疫性肝纤维化大鼠模型。再以尾静脉注射牛血清白蛋白(含量从 2 mg/次增加到 4 mg/次后维持,每次增加 0.5 mg)注射,每周 2 次,共 6 周。第 6 周末,予以 D-氨基半乳糖 + 脂多糖液(含 D-氨基半乳糖 400 mg·kg⁻¹, 脂多糖 100 μg·kg⁻¹)腹腔注射急性攻击,最终制备 ACLF 大鼠模型。大鼠氨基转移酶及胆红素变化符合肝细胞大片坏死时的功能改变,光镜下观察肝脏病理表现为肝硬化再生结节内发生大块或亚大块坏死,纤维间隔保留则表示模型制备成功。模型制备成功 81 只,按体质量随机分为模型组、清法组、温法组各 20 只,清温并用法组 21 只。急性攻击后,各组在 1, 12, 24 h 各时间点处死大鼠,采集血液及结肠组织标本。

2.2 给药 清法组予茵陈蒿汤、温法组予茵陈术附汤、清温并用法组予温阳解毒化瘀方灌胃。每剂中药均以传统煎药方法煎煮后浓缩成 100 mL,参考文献[11],以大鼠与人的给药剂量系数 6.17 计算,上述各组分别按生药含量 6.68, 7.09, 19.53 g·kg⁻¹·d⁻¹给药。各组在第 6 周开始时予相应灌胃处理,持续至急性攻击前,共 1 周。

2.3 流式细胞仪检测 Treg, Th17 细胞比例 采集大鼠外周血 2 mL 于肝素钠真空抗凝管中,加入 CD4 抗体 10 μL,室温避光孵育 20 min;400 × g 离心 5 min,去上清,清洗;加入 IC Fixation buffer 100 μL,混匀,避光孵育 40 min,加入 Permeabilization buffer 2 000 μL,400 × g 离心 5 min,去上清;加 IL-17A PE 抗体 5 μL,混匀,室温避光孵育 4 min;加 300 μL 的 PBS,涡旋,避光存放,上机检测。Treg 细胞检测方法相同,采用 CD4, FoxP3 抗体标记。

2.4 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测结肠组织 FoxP3, ROR- γ t mRNA 的表达 试剂盒提取组织中总 RNA,检测 RNA 的完整性以及 RNA 的纯度、浓度,放入 -80 °C 冰箱备用;经总 RNA 中 DNaseI 和 DNA 的消除,反转录合成 cDNA,反转录产物于 -20 °C 存放备用。将制备好的 cDNA

进行 PCR 扩增。反应参数为 95 °C 3 min, 95 °C 5 s, 56 °C 10 s, 72 °C 25 s, 39 个循环; 65 °C 5 s, 95 °C 50 s。使用 qbase plus 分析结果, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示 mRNA 相对表达量。PCR 引物序列由武汉华联生物技术有限公司设计合成, 见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列	长度/bp
FoxP3	上游 5'-TTGTTTGTCTGCGGAGA-3'	118
	下游 5'-TGGCATAGGTGAAAGGGG-3'	
ROR- γ t	上游 5'-CAGCAGACTTTAAGCGCA-3'	116
	下游 5'-TCGTGCAGATCACCATTGGC-3'	
β -actin	上游 5'-CGTTGACATCCGTAAGAC-3'	110
	下游 5'-TAGGAGCCAGGGCACT-3'	

2.5 原位杂交检测结肠组织 FoxP3, ROR- γ t mRNA 表达 取结肠组织(厚度 ≤ 4 mm)固定、脱水、石蜡包埋、切片; 然后处理玻片、石蜡切片、脱蜡至水、暴露 mRNA 核酸片段、固定; 进行预杂交、杂交后洗涤; 依次滴封闭液、生物素化鼠抗地高辛, SABC, 生物素化过氧化物酶后予以 DAB 显色、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、封片、阅片。

2.6 免疫组化检测结肠组织 FoxP3, ROR- γ t 蛋白表达 取结肠组织固后脱蜡、水化组织切片、预处理; 滴加一抗(FoxP3, ROR- γ t, 1:200), 37 °C 孵育 1~2 h, 滴加二抗, 37 °C 孵育 30 min, DAB 显色、冲洗, 复染, 脱水, 透明, 封片。Lecia Applaction Stiuue 图像系统采集分析。

2.7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 满足正态性与方差齐性, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 组间

两两比较采用 LSD, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 清温并用法对大鼠外周血 Treg/Th17 的影响 与正常组比较, 模型组大鼠外周血 Treg/Th17 在 1, 12, 24 h 各时间点均显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 清法组、温法组 Treg/Th17 在时间点无明显改变, 清温并用法组 Treg/Th17 在各时间点有所增高 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 清温并用法对大鼠外周血 Treg/Th17 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of warming and heat-clearing method on Treg/Th17 ratio peripheral blood in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	Treg/Th17		
			1 h	12 h	24 h
正常	-	10	2.43 ± 0.26	2.43 ± 0.26	2.43 ± 0.26
模型	-	5	0.81 ± 0.42 ²⁾	0.79 ± 0.42 ²⁾	0.75 ± 0.25 ²⁾
清法	6.68	6	0.76 ± 0.41	0.81 ± 0.25	0.84 ± 0.43
温法	7.09	6	0.77 ± 0.42	0.77 ± 0.41	0.79 ± 0.32
清温并用法	19.53	7	0.91 ± 0.35 ³⁾	0.94 ± 0.36 ³⁾	1.02 ± 0.26 ³⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与清法组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$; 与温法组比较⁷⁾ $P < 0.05$, ⁸⁾ $P < 0.01$ (表 3~5 同)。

3.2 清温并用法对大鼠结肠组织 FoxP3, ROR- γ t mRNA 体外扩增的影响 与正常组比较, 模型组 FoxP3, ROR- γ t mRNA 表达在 1, 12, 24 h 各时间点显著增多 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 清法组、温法组、清温并用法各组 FoxP3, ROR- γ t mRNA 在上述时间点都所下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 清温并用法 FoxP3, ROR- γ t mRNA 在上述时间点较清法组、温法组有所降低 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 清温并用法对大鼠结肠组织 FoxP3, ROR- γ t mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of warming and heat-clearing method on FoxP3 and ROR- γ t mRNA expressions in colon tissue of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	FoxP3			ROR- γ t		
			1 h	12 h	24 h	1 h	12 h	24 h
正常	-	10	3.28 ± 0.782	3.28 ± 0.782	3.28 ± 0.782	2.69 ± 1.242	2.69 ± 1.242	2.69 ± 1.242
模型	-	5	20.13 ± 2.392 ²⁾	24.94 ± 3.044 ²⁾	30.98 ± 3.358 ²⁾	21.99 ± 1.162 ²⁾	27.13 ± 3.284 ²⁾	32.95 ± 3.505 ²⁾
清法	6.68	6	10.97 ± 3.121 ³⁾	15.17 ± 3.42 ³⁾	17.07 ± 4.002 ³⁾	14.64 ± 3.02 ³⁾	17.55 ± 3.791 ³⁾	22.17 ± 3.791 ³⁾
温法	7.09	6	10.41 ± 1.863 ³⁾	14.54 ± 1.86 ³⁾	16.43 ± 2.714 ³⁾	13.57 ± 2.882 ³⁾	17.01 ± 3.351 ³⁾	20.37 ± 3.947 ³⁾
清温并用法	19.53	7	4.36 ± 1.65 ^{3,5,7)}	7.50 ± 2.12 ^{3,5,7)}	9.99 ± 2.02 ^{4,5,7)}	6.17 ± 1.55 ^{4,5,7)}	7.98 ± 2.17 ^{4,5,7)}	9.89 ± 2.89 ^{4,5,7)}

3.3 清温并用法对大鼠结肠组织 FoxP3, ROR- γ t mRNA 表达的影响 与正常组比较, 模型组 FoxP3,

ROR- γ t mRNA 表达在 1, 12, 24 h 各时间点均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 清法组、温法组 FoxP3,

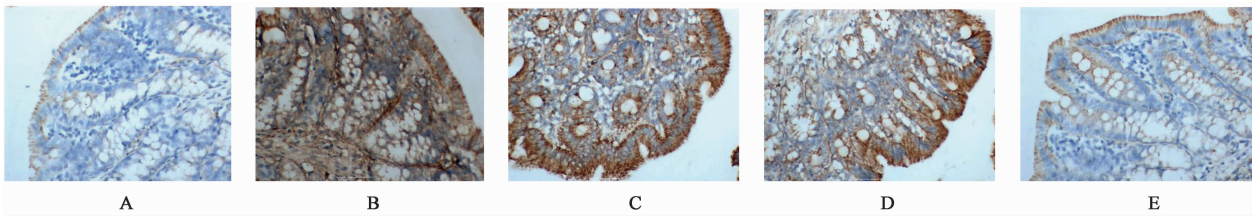
ROR- γ t mRNA 表达各时间点表达均有降低 ($P < 0.05$), 其中清温并用组显著下降 ($P < 0.01$)。清

温并用组 FoxP3, ROR- γ t mRNA 表达较清法组、温法组有所下降 ($P < 0.05$)。见表 4, 图 1, 2。

表 4 清温并用组对大鼠结肠组织 FoxP3, ROR- γ t mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of warming and heat-clearing method on FoxP3 and ROR- γ t gene expressions in colon tissue of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	FoxP3			ROR- γ t		
			1 h	12 h	24 h	1 h	12 h	24 h
正常	-	10	0.247 ± 0.021	0.247 ± 0.021	0.247 ± 0.021	0.205 ± 0.026	0.205 ± 0.026	0.205 ± 0.026
模型	-	5	0.406 ± 0.04 ²⁾	0.573 ± 0.063 ²⁾	0.631 ± 0.072 ²⁾	0.388 ± 0.037 ²⁾	0.588 ± 0.063 ²⁾	0.657 ± 0.077 ²⁾
清法	6.68	6	0.350 ± 0.04 ³⁾	0.500 ± 0.059 ³⁾	0.560 ± 0.066 ³⁾	0.340 ± 0.036 ³⁾	0.510 ± 0.059 ³⁾	0.571 ± 0.067 ³⁾
温法	7.09	6	0.352 ± 0.04 ³⁾	0.511 ± 0.066 ³⁾	0.570 ± 0.062 ³⁾	0.342 ± 0.049 ³⁾	0.518 ± 0.054 ³⁾	0.579 ± 0.065 ³⁾
清温并用组	19.53	7	0.292 ± 0.04 ^{4,5,7)}	0.420 ± 0.049 ^{4,5,7)}	0.480 ± 0.057 ^{4,5,7)}	0.262 ± 0.045 ^{4,5,7)}	0.432 ± 0.046 ^{4,5,7)}	0.471 ± 0.051 ^{4,5,7)}



A. 正常组; B. 模型组; C. 清法组; D. 温法组; E. 清温并用组 (图 2~4 同)

图 1 清温并用组对大鼠结肠组织 FoxP3 mRNA 表达的影响 (原位杂交, ×400)

Fig. 1 Effect of warming and heat-clearing method on FoxP3 positive expressions in rats colon tissue using in situ hybridization (ISH, ×400)

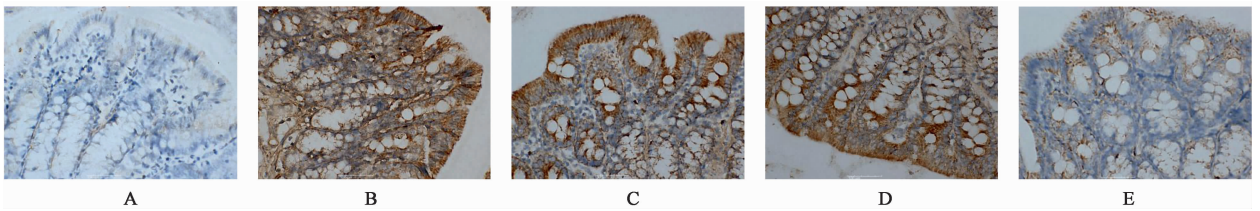


图 2 清温并用组对大鼠结肠组织 ROR- γ t mRNA 表达的影响 (原位杂交, ×400)

Fig. 2 Effect of warming and heat-clearing method on ROR- γ t positive expressions in rats colon tissue using in situ hybridization (ISH, ×400)

3.4 清温并用组对大鼠结肠组织 FoxP3, ROR- γ t 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组 FoxP3, ROR- γ t 蛋白表达在 1, 12, 24 h 各时间点显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 清法组、温法组 FoxP3,

ROR- γ t 蛋白表达有所下降 ($P < 0.05$), 清温并用组显著减少 ($P < 0.01$); 清温并用组 FoxP3, ROR- γ t 蛋白表达低于清法组、温法组 ($P < 0.05$)。见表 5, 图 3, 4。

表 5 清温并用组对大鼠结肠组织 FoxP3, ROR- γ t 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effect of warming and heat-clearing method on FoxP3 and ROR- γ t protein expressions in colon tissue of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	FoxP3			ROR- γ t		
			1 h	12 h	24 h	1 h	12 h	24 h
正常	-	10	0.181 ± 0.015	0.181 ± 0.015	0.181 ± 0.015	0.153 ± 0.014	0.153 ± 0.014	0.153 ± 0.014
模型	-	5	0.326 ± 0.039 ²⁾	0.483 ± 0.049 ²⁾	0.546 ± 0.053 ²⁾	0.310 ± 0.044 ²⁾	0.501 ± 0.050 ²⁾	0.580 ± 0.069 ²⁾
清法	6.68	6	0.282 ± 0.029 ³⁾	0.411 ± 0.055 ³⁾	0.472 ± 0.052 ³⁾	0.261 ± 0.030 ³⁾	0.448 ± 0.057 ³⁾	0.508 ± 0.060 ³⁾
温法	7.09	6	0.284 ± 0.039 ³⁾	0.421 ± 0.048 ³⁾	0.484 ± 0.068 ³⁾	0.260 ± 0.030 ³⁾	0.452 ± 0.053 ³⁾	0.511 ± 0.068 ³⁾
清温并用组	19.53	7	0.241 ± 0.036 ^{4,5,7)}	0.357 ± 0.039 ^{4,5,7)}	0.396 ± 0.044 ^{4,5,7)}	0.210 ± 0.037 ^{4,5,7)}	0.375 ± 0.041 ^{4,5,7)}	0.394 ± 0.046 ^{4,5,7)}

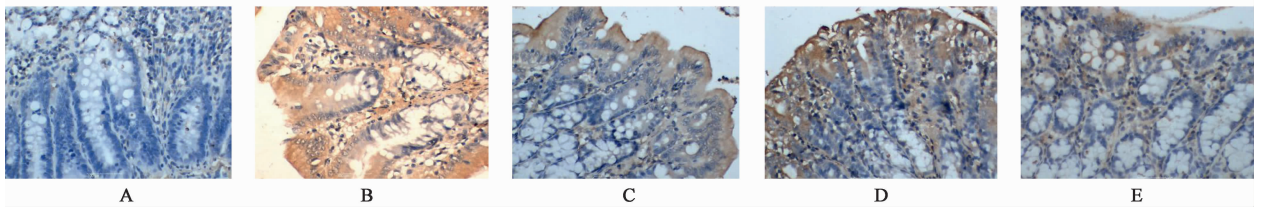


图 3 清温并用法对大鼠结肠组织 FoxP3 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effect of warming and heat-clearing method on FoxP3 protein expression in colon tissue of rats (IHC, ×400)

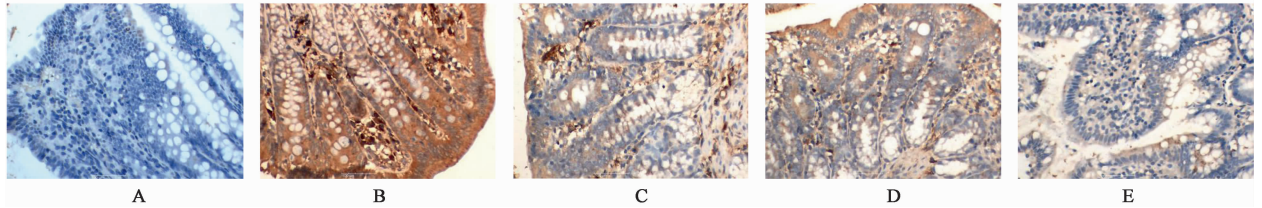


图 4 清温并用法对大鼠结肠组织 ROR- γ t 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 4 Effect of warming and heat-clearing method on ROR- γ t immunohistochemical positive expression in colon tissue of rats (IHC, ×400)

4 讨论

肝衰竭时,由于肠道菌群失调、内毒素、炎症介质等损伤肠黏膜屏障,使肠黏膜通透性增高,造成肠道细菌和内毒素无法有效代谢而易位,通过门静脉进入肝脏,形成 IETM。在肝衰竭病程进展中,约 93.3% ~ 100% 的患者会出现 IETM^[12]。IETM 介导的“二次打击”在肝衰竭中后期会引起肝细胞大量坏死,使肝功能严重受损。此外,IETM 可成为炎症介质的起源,进而诱发全身炎症反应,进一步加重病情,严重影响肝衰竭的治疗和预后^[13]。因此,肝衰竭中后期的治疗重点在于如何有效的防治 IETM。

Treg, Th17 细胞作为 CD4⁺ 细胞新亚群,是目前炎症反应调控研究的热点^[14]。Treg 细胞和 Th17 细胞源于初始的 CD4⁺ T 细胞(Th0)在分化与功能上相互拮抗,二者可由特异性转录因子 FoxP3, ROR- γ t 调控分化,分别起着促进炎症和抑制炎症的作用,关系密切,其平衡变化影响着免疫应答及炎症反应的结局。Treg 可表达影响转录因子 FoxP3,主要通过释放细胞因子 IL-10, TGF- β , IL-35 等,发挥抑炎作用。Th17 可表达影响转录因子 ROR- γ t,主要分泌 IL-17A, IL-17F 及低水平的 IL-23, TNF- α , IL-6, 诱发炎症反应,发挥促炎作用。在正常情况下,机体内 Treg 和 Th17 细胞及 Treg/Th17 是保持平衡的,确保机体的免疫反应处于稳定状态。但肝衰竭时,Treg/Th17 细胞比例失衡,Treg 细胞数目减少,Th17 细胞增多,促炎作用占主导地位。针对 HBV-ACLF 患者 Treg/Th17 细胞失衡,早期干预促进平衡恢复,对调控免疫炎症反应,减轻肝损伤,降低肝衰竭病死率具

有重要意义。

肝衰竭的中医病机演变规律可归纳为“湿热-热毒致瘀-瘀毒互结”,早期以实证为主,以湿、热、瘀、毒显著,中晚期则虚实夹杂,瘀、毒、虚交织^[7,15],治疗以清热利湿,解毒化瘀为主,辅以温阳健脾^[16-17]。温阳解毒化瘀方(即清温并用法)由茵陈、白术、黑附片、丹参、赤芍、薏米组成。方中重用赤芍以活血化瘀,配茵陈以利湿退黄,共为君药;丹参功能活血凉血、祛瘀止痛。附片大辛大热,温补脾肾,可防茵陈、赤芍、丹参寒凉太过,共为臣药。再佐以白术、薏米以燥湿健脾益气,防诸药损伤脾胃,诸药合用,共奏热利湿,解毒化瘀,温阳健脾之功。

本实验通过观察肝衰竭 IETM 大鼠外周血 Treg/Th17 及结肠组织 FoxP3, ROR- γ t 表达,造模后,与正常组比较,模型组大鼠 Treg/Th17 细胞比例失衡,向 Th17 方向偏移,结肠组织 FoxP3, ROR- γ t 表达增多, FoxP3/ROR- γ t mRNA 倒置。通过清法、温法、清温并用法干预后,仅清温并用法可有效调节 Treg/Th17 细胞失衡向 Treg 方向恢复,使 Treg/Th17 细胞比值升高。与模型组比较,清法、温法、清温并用法各组 ROR- γ t, FoxP3 表达均下降,其中以清温并用法组降低最明显,且对 ROR- γ t 表达的抑制作用高于 FoxP3。

综上所述,肝衰竭 Treg/Th17 细胞失衡, FoxP3, ROR- γ t 表达异常,导致炎症反应失控,加重病情。清温并用法可改善肝衰竭 IETM,其机制可能与通过调控 FoxP3, ROR- γ t 的表达,促进 Treg/Th17 细胞失衡向 Treg 方向恢复有关。本研究阐释了 FoxP3,

ROR- γ t 与肝衰竭 IETM 的相关性,为中医药防治肝衰竭 IETM 提供新的治疗思路及方法,但是否还存在其他调控通路有待进一步研究。

[参考文献]

[1] YANG Y, GONG X B, HUANG L G, et al. Diosmetin exerts anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects to protect against endotoxin-induced acute hepatic failure in mice[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(19):30723-30733.

[2] WANG X, LANG M, ZHAO T, et al. Cancer-FOXP3 directly activated CCL5 to recruit FOXP3⁺ Treg cells in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Oncogene*, 2016, 36(21):3048-3058.

[3] LIU B, GAO W, ZHANG L, et al. Th17/Treg imbalance and increased interleukin-21 are associated with liver injury in patients with chronic severe hepatitis B[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 46(5): 48-55.

[4] BAO S, ZHENG J, LI N, et al. Role of interleukin-23 in monocyte-derived dendritic cells of HBV-related acute-on-chronic liver failure and its correlation with the severity of liver damage [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2017, 41(2):147-155.

[5] LIANG X S, LI C Z, ZHOU Y, et al. Changes in circulating Foxp3⁺ regulatory T cells and interleukin-17-producing T helper cells during HBV-related acute-on-chronic liver failure[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(26):8558-8571.

[6] 赵文轩, 王山军, 张瑞娟, 等. 慢性乙型重型肝炎患者外周血单个核细胞 ROR γ t 和 Foxp3 mRNA 表达分析[J]. *中国医学前沿杂志: 电子版*, 2015, 7(10): 115-118.

[7] 王雅, 陈斌, 龙远雄, 等. 基于数据挖掘的慢加急性(亚急性)肝衰竭证素分布特点及用药规律研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2017, 37(11):1234-1237.

[8] 陈斌, 张涛, 朱文芳, 等. 清温并用法对慢加急性肝衰

竭大鼠调节性 T 淋巴细胞/辅助性 T 淋巴细胞 17 表达的影响[J]. *临床肝胆病杂志*, 2018, 34(12): 2642-2647.

[9] 宋征福. 基于 Treg/Th17 型细胞因子探讨清温并用法调控 HBV-ACLF 非阳黄证炎症反应的临床研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2017.

[10] 刘旭华, 陈煜, 张晶, 等. 大鼠慢加急性肝衰竭实验模型的建立及其病理机制初步研究[J]. *科技导报*, 2007(18):32-37.

[11] 陈奇. *中药药理研究方法学*[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006:194.

[12] NIU Y H, YIN D L, LIU H L, et al. Restoring the Treg cell to Th17 cell ratio may alleviate HBV-related acute-on-chronic liver failure [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(26):4146-4154.

[13] 孙新锋, 韩志毅, 张卫, 等. 中西医结合疗法对慢加急性肝衰竭患者内毒素的影响[J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(8):1923-1924.

[14] SHEN C, YAN W Z, ZHAO C Y, et al. Increased CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells correlate with poor short-term outcomes in hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure patients [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2015, 48(2):137-146.

[15] 张向磊, 卢立伟, 胡冬青, 等. 护肠消毒微丸结肠靶向给药阻断瘀毒内蕴证乙型肝炎相关慢加急性肝衰竭肠源性内毒素血症临床观察[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(18):191-197.

[16] 莫小艾, 蒋开平, 黄清华, 等. 甘露消毒丹治疗乙肝病毒相关慢加急性肝衰竭湿热证疗效及 FibroScan 变化的临床观察[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(16):170-175.

[17] 龙富立, 陈小明, 谢丽, 等. 解毒化瘀颗粒对急性肝衰竭大鼠细胞因子及肝组织的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(20):101-105.

[责任编辑 张丰丰]