

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.02.018

# 调肝理脾方对原发性胆汁性肝硬化小鼠 调节性 T 细胞及肝组织病理的影响

郭晓霞<sup>\*</sup>, 李良学, 武玉鹏, 贾力莉, 刘改萍, 白崇智

(山西省中医院, 山西省太原市并州西街 46 号, 030012)

**摘要** 目的 探讨调肝理脾方治疗原发性胆汁性肝硬化的可能作用机制。方法 120 只 C57BL/6 小鼠随机分为正常组、模型组、阳性组和治疗组, 每组 30 只。除正常组外其余各组应用聚肌胞苷酸腹腔注射 (5 mg/kg, 2 次/周, 共 24 周) 建立原发性胆汁性肝硬化动物模型, 造模同时阳性组给予熊去氧胆酸胶囊 0.1 g/(kg·d), 治疗组给予调肝理脾方 27 g/(kg·d), 正常组及模型组给予等体积生理盐水, 每日灌胃 1 次, 共 24 周。于实验第 8、16、24 周时检测各组小鼠血清抗线粒体抗体 M<sub>2</sub> 亚型 (AMA-M<sub>2</sub>) 阳性率、外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞 (Treg) 细胞计数、肝组织病理学检查及肝组织细胞角蛋白 19 (CK19) 表达。结果 除正常组外, 第 8、16、24 周时各组血清 AMA-M<sub>2</sub> 阳性率比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与正常组比较, 模型组小鼠第 8、16、24 周时外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞计数明显下降 ( $P < 0.05$ ); 在第 24 周时, 阳性组和治疗组外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞计数均较模型组升高 ( $P < 0.05$ ), 且治疗组升高较阳性组明显 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 治疗组在第 8、16、24 周时肝组织病理分期差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与正常组比较, 模型组第 8、16、24 周时 CK19 表达均明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 治疗组第 24 周时 CK19 表达降低 ( $P < 0.05$ )。结论 调肝理脾方能够上调原发性胆汁性肝硬化模型小鼠外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞计数、降低肝组织 CK19 蛋白表达, 从而改善胆小管损伤和肝组织纤维化。

**关键词** 原发性胆汁性肝硬化; 调肝理脾方; 调节性 T 细胞; 肝组织病理; 细胞角蛋白 19

原发性胆汁性肝硬化 (primary biliary cirrhosis, PBC) 是一种自身免疫性、慢性进行性胆汁淤积性肝脏疾病, 其特征是胆道上皮细胞损伤和胆小管破坏, 从而导致胆道纤维化和最终肝硬化<sup>[1]</sup>, 对患者生活质量产生严重影响。临床应用熊去氧胆酸治疗仅对部分 PBC 患者有效<sup>[2]</sup>。我们临床实践中应用调肝理脾方治疗 PBC, 前期研究结果显示, 其能抑制 PBC 小鼠肝组织、胆小管的增生及胶原纤维的沉积, 减轻肝损伤<sup>[3]</sup>。为进一步探讨调肝理脾方治疗 PBC 的作用机制, 我们观察了其对 PBC 模型小鼠调节性 T 细胞 (Treg) 及肝组织病理学改变的影响, 报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠 120 只, 雌性, 6~8 周,

体重 (20±2) g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2009-0004。本研究经山西省中医院动物伦理委员会审批通过。

### 1.2 药品与试剂

熊去氧胆酸胶囊 (批号: H20100502) 购自德国福克制药股份有限公司; 调肝理脾方: 北柴胡 10 g, 白芍 10 g, 茯苓 15 g, 丹参 30 g, 郁金 12 g, 山药 20 g, 炙黄芪 10 g, 姜黄 10 g, 枸杞子 30 g, 陈皮 6 g, 药材由山西省中医院药剂科统一加工为免煎颗粒剂, 用温水将药液混匀后浓缩至 270 g/100 ml。聚肌胞苷酸 (PolyI:C, 太原博科生物有限公司, 批号: CAS24939-03-5)、FITC 标记抗小鼠 CD4 (批号: 100510)、APC 标记抗小鼠 CD25 (批号: 101904)、PE 标记抗小鼠 Foxp3 试剂盒 (批号: NBP2-34432AF405) 均购自美国 Beckman Coulter 公司; 抗线粒体抗体 M<sub>2</sub> 亚型 (AMA-M<sub>2</sub>)

基金项目: 山西省卫生厅科研课题计划 (201301019)

<sup>\*</sup> 通讯作者: gxxsunny@hotmail.com, 13834548276

ELISA 试剂盒 (上海基尔顿公司, 批号: 201311)、细胞角蛋白 19 (CK19, SantaCruz 公司, 批号: SC-25724)。

### 1.3 主要仪器

流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司, FC500 型), 溶血仪 (美国 Beckman Coulter 公司, Q-Prep 型), 微孔读板机 (美国 BioTek 公司, 伯腾 H1 型), 恒温水浴箱 (江苏太仓医用仪器厂, DSHZ-300 型), 离心机 (北京离心机厂, LDZ5-2 型), 多功能真彩色细胞图像分析管理系统 (美国 Media Cybernetics 公司, Image-Pro Plus 6.0)。

### 1.4 动物分组和处理方法

120 只小鼠适应性饲养 1 周后, 采用随机数字表法取 30 只作为正常组, 剩余 90 只小鼠随机分为模型组、阳性组、治疗组, 每组 30 只, 均给予 Poly I : C 5 mg/kg 腹腔注射建立 PBC 小鼠模型, 每周 2 次, 直至 24 周<sup>[4]</sup>。造模同时阳性组给予熊去氧胆酸胶囊 0.1 g/ (kg · d), 治疗组给予调肝理脾方 27 g/ (kg · d), 正常组及模型组给予等体积生理盐水, 每日灌胃 1 次, 共 24 周。

### 1.5 观察指标及方法

于给药后第 8、16、24 周颈脱位法处死小鼠 (处理前禁食 1 天), 每个时间点 10 只, 采集小鼠血清、肝脏, 肝脏 10% 甲醛固定或快速冷冻进行组织学评价。小鼠血清及肝脏组织标本储存于 -80℃ 冰箱备用。

1.5.1 血清 AMA-M<sub>2</sub> 检测 采用双抗原夹心酶联免疫法检测, 按照试剂盒说明书操作, 计算样品中 AMA-M<sub>2</sub> 阳性率。

1.5.2 外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 检测 将抗 CD4、CD25 和 Foxp3 组合抗体分别加入到 100 μl 抗凝血中, 振荡混匀, 避光放置 15 min, 在溶血仪裂解红细胞后上机检测。以 FITC、PE 和 PC5 标记的小鼠 IgG 作为同型对照, 计算各组小鼠外周血 T 淋巴细胞中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞计数。

1.5.3 肝组织病理学检查 每组选取 5 只小鼠, 取肝脏于冰生理盐水中清洗, 在 10% 缓冲福尔马林固定液中固定, 石蜡包埋, 切片, 分别用苏木精-伊红 (HE)、Masson 染色, 肝组织病理根据 Scheuer 组织学分期<sup>[5]</sup>分为 4 期: I 期胆总管炎期、II 期胆总管增生期、III 期纤维化期和 IV 期肝硬化期。

1.5.4 肝组织 CK19 蛋白表达 选取与常规 HE 切片系同一个蜡块组织的连续切片, 根据 HE 切片中

的组织学表现, 选定各级别病变所对应的区域, 应用免疫组织化学法检测肝组织中 CK19 的表达。CK19 为胆管上皮细胞的特异表达, 染色后棕色为 CK19 阳性表达, 应用多功能真彩色细胞图像分析管理系统计算各组标本阳性细胞数与阳性细胞染色强度。免疫组化方法结果判断参照 IHS 评分<sup>[6]</sup>: IHS = A × B; A 为阳性细胞数分级, 0 ~ 1% 计 0 分, 2% ~ 10% 计 1 分, 11% ~ 50% 计 2 分, 51% ~ 80% 计 3 分, 81% ~ 100% 计 4 分; B 为阳性细胞显色强度分级, 阴性计 0 分, 弱阳性计 1 分, 阳性计 2 分, 强阳性计 3 分。

### 1.6 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学处理, 计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 等级资料采用非参数检验的 Kruskal-Wallis *H* 精确概率法检验, 以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠不同时间肝组织病理学表现

HE 染色结果显示, 正常组小鼠肝小叶结构清晰, 肝索排列整齐, 肝细胞大小正常, 染色均匀, 核圆形, 核仁清晰, 汇管区及胆管周围未见明显的炎性细胞浸润及纤维化形成。模型组小鼠肝小叶结构紊乱, 汇管区周围肝细胞肿胀, 可见少量双核肝细胞, 部分出现点状及灶性坏死, 第 16 周可见汇管区扩大, 周围区域胆小管损伤严重, 出现细小的胆管增生, 胆管上皮细胞空泡变性, 形态大小不规则, 核浓缩, 个别细胞消失; 第 24 周可见汇管区及损伤的胆管周围淋巴细胞浸润, 散在嗜酸性粒细胞及类上皮肉芽肿围绕损伤胆管, 界板出现碎屑样坏死, 并可见明显的纤维间隔形成。阳性组小鼠肝细胞肿胀较模型组减轻, 第 8 周可见汇管区点灶状坏死; 第 16 周可见汇管区周围淋巴细胞及浆细胞浸润, 并可见淋巴滤泡形成; 第 24 周有少量胆小管增生畸形。治疗组小鼠肝小叶结构基本正常, 未见双核肝细胞, 汇管区轻度扩大, 周围少量炎细胞浸润, 胆小管损伤较模型组及阳性组明显减轻, 胆管上皮细胞排列整齐, 形态大小基本正常, 未见明显的胆小管增生及纤维化形成。

Masson 染色结果显示, 正常组小鼠肝小叶结构正常, 汇管区未见明显蓝绿色胶原纤维分布。模型组小鼠汇管区扩大水肿, 第 16 周汇管区及纤维间隔内胆小管数量明显增加, 胆小管管腔扩大并扭曲; 第 24 周可见管周有大量的蓝色胶原纤维环绕、

相互连接且分布异常,向四周延伸,形成较厚的纤维间隔,个别出现索条状增生,但未见形成假小叶。与模型组比较,阳性组小鼠胶原纤维有所减少,少量胆小管增生;第 24 周汇管区周边可见少量蓝色胶原纤维形成。治疗组小鼠汇管区周围未见明显的胶原纤维及胆小管增生。

表 1 示,与正常组比较,模型组和阳性组在第 8、16、24 周时肝组织病理分期差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,治疗组在第 8、16、24 周时肝组织病理分期差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );与阳性组比较,治疗组在第 16、24 周时肝组织病理分期差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

表 1 各组小鼠不同时间肝组织病理学分期比较 (只)

| 组别  | 时间   | 鼠数 | 0 期 | I 期 | II 期 | III 期 |
|-----|------|----|-----|-----|------|-------|
| 正常组 | 8 周  | 5  | 5   | 0   | 0    | 0     |
|     | 16 周 | 5  | 4   | 1   | 0    | 0     |
|     | 24 周 | 5  | 4   | 1   | 0    | 0     |
| 模型组 | 8 周  | 5  | 0   | 2   | 2    | 1     |
|     | 16 周 | 5  | 0   | 1   | 3    | 1     |
|     | 24 周 | 5  | 0   | 0   | 2    | 3     |
| 阳性组 | 8 周  | 5  | 1   | 2   | 2    | 0     |
|     | 16 周 | 5  | 0   | 1   | 2    | 2     |
|     | 24 周 | 5  | 0   | 1   | 1    | 3     |
| 治疗组 | 8 周  | 5  | 4   | 1   | 0    | 0     |
|     | 16 周 | 5  | 3   | 2   | 0    | 0     |
|     | 24 周 | 5  | 1   | 4   | 0    | 0     |

## 2.2 各组小鼠不同时间血清 AMA-M<sub>2</sub> 阳性率比较

表 2 示,正常组小鼠血清 AMA-M<sub>2</sub> 在各时间均为阴性。随着造模时间的延长,模型组、阳性组及治疗组血清 AMA-M<sub>2</sub> 阳性率呈逐渐升高趋势。除正常组外,第 8、16、24 周时各组血清 AMA-M<sub>2</sub> 阳性率比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 2 各组小鼠不同时间血清 AMA-M<sub>2</sub> 阳性率比较 [只 (%)]

| 组别  | 鼠数 | 8 周    | 16 周   | 24 周   |
|-----|----|--------|--------|--------|
| 正常组 | 10 | 0      | 0      | 0      |
| 模型组 | 10 | 5 (50) | 7 (70) | 9 (90) |
| 阳性组 | 10 | 2 (20) | 5 (50) | 8 (80) |
| 治疗组 | 10 | 3 (30) | 5 (50) | 7 (70) |

注: AMA-M<sub>2</sub>, 抗线粒体抗体 M<sub>2</sub> 亚型

## 2.3 各组小鼠不同时间外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞计数比较

表 3 示,与正常组比较,模型组小鼠第 8、16、24 周时外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞计数明显下降 ( $P < 0.05$ )。在第 8 周时,阳性组和治疗组外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞计数仍

明显低于正常组 ( $P < 0.05$ );在第 16 周时,治疗组外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞计数较模型组和阳性组升高,但仍低于正常组 ( $P < 0.05$ );在第 24 周时,阳性组和治疗组外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞计数均较模型组升高,且治疗组升高较阳性组明显 ( $P < 0.05$ ),并且与正常组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 3 各组小鼠不同时间外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞计数比较 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | 鼠数 | 8 周              | 16 周                                       | 24 周                                      |
|-----|----|------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------|
| 正常组 | 10 | 7.24 $\pm$ 0.66  | 6.49 $\pm$ 0.64                            | 6.00 $\pm$ 1.01                           |
| 模型组 | 10 | 3.47 $\pm$ 0.63* | 3.50 $\pm$ 0.88*                           | 2.46 $\pm$ 0.87*                          |
| 阳性组 | 10 | 3.70 $\pm$ 1.00* | 3.78 $\pm$ 1.06*                           | 4.56 $\pm$ 1.17* $\Delta$                 |
| 治疗组 | 10 | 3.92 $\pm$ 0.62* | 5.63 $\pm$ 0.56* $\Delta$ $\blacktriangle$ | 5.78 $\pm$ 1.07 $\Delta$ $\blacktriangle$ |

注: Treg, 调节性 T 细胞;与正常组比较, \*  $P < 0.05$ ;与模型组比较,  $\Delta P < 0.05$ ;与阳性组比较,  $\blacktriangle P < 0.05$

## 2.4 各组小鼠不同时间肝组织 CK19 表达情况

正常组汇管区周围未见胆小管增生,管腔正常,胆管上皮细胞形态大小规整,细胞界限清楚,CK19 表达于胆小管,周围无淋巴细胞浸润。模型组肝组织 CK19 表达明显,随着造模时间的延长,汇管区和纤维间隔内阳性胆小管数量明显增加,管腔小而畸形,胆管上皮细胞形态大小不规则,排列紊乱,部分细胞消失,肝细胞索间出现淡染的胆小管样上皮细胞和胆小管,周围大量淋巴细胞浸润;第 24 周肝内胆小管破坏,可见散在分布的 CK19 阳性细胞,周围淋巴细胞浸润。与模型组比较,阳性组 CK19 表达有所降低,第 16 周可见 CK19 少量表达于增生的胆小管,并可见周围淋巴细胞浸润;第 24 周肝内胆小管破坏,可见散在分布的 CK19 细胞。治疗组免疫组化同正常组小鼠,CK19 表达于胆小管,周围无淋巴细胞浸润。表 4 示,与正常组比较,模型组第 8、16、24 周时 IHS 评分均明显升高 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,治疗组第 24 周时 IHS 评分降低 ( $P < 0.05$ )。

表 4 各组小鼠不同时间肝内胆管 CK19 免疫组化 IHS 评分比较 (分,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | 鼠数 | 8 周              | 16 周             | 24 周                     |
|-----|----|------------------|------------------|--------------------------|
| 正常组 | 5  | 3.20 $\pm$ 1.10  | 3.60 $\pm$ 0.89  | 4.40 $\pm$ 0.89          |
| 模型组 | 5  | 5.20 $\pm$ 1.10* | 6.20 $\pm$ 1.79* | 7.20 $\pm$ 1.64*         |
| 阳性组 | 5  | 5.20 $\pm$ 1.10* | 5.80 $\pm$ 2.05* | 6.20 $\pm$ 1.79          |
| 治疗组 | 5  | 4.40 $\pm$ 0.89  | 4.80 $\pm$ 1.10  | 4.80 $\pm$ 1.10 $\Delta$ |

注: CK19, 细胞角蛋白 19;与正常组比较, \*  $P < 0.05$ ;与模型组比较,  $\Delta P < 0.05$

### 3 讨论

PBC 的组织学特征主要表现为自身免疫介导的肝内胆小管进行性破坏,肝细胞损伤,最终导致纤维化及肝硬化,而胆管周围嗜酸性粒细胞及浆细胞的浸润并形成肉芽肿对于其最有诊断价值<sup>[8]</sup>,胆道上皮细胞的损伤可能是 PBC 的发病机制的初始步骤<sup>[9]</sup>。PBC 患者的血清学特征是抗线粒体抗体 (AMA) 阳性,其阳性率可达 90%~95%,在患者出现症状前几年甚至几十年就可以检测到 AMA 的存在<sup>[8]</sup>,其中尤以 AMA-M<sub>2</sub> 对于 PBC 的诊断最具特异性<sup>[8]</sup>。研究表明,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 对 PBC 发生、发展及胆小管和肝细胞的破坏起重要作用<sup>[10]</sup>。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 的形成及活化对维持外周免疫耐受、控制过度免疫应答及免疫相关疾病的发生至关重要<sup>[11]</sup>。Foxp3<sup>+</sup> 是控制 Treg 分化的核心转录因子,在 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 的产生和功能发挥方面都起到决定性的作用<sup>[12]</sup>。研究显示, Foxp3<sup>+</sup>Treg 参与 PBC 患者的肝脏慢性炎症的维护,对减轻 PBC 发病早期免疫损伤起到积极作用<sup>[13]</sup>。

中医学根据 PBC 发病的不同阶段及合并症的不同,分别归属于“黄疸”“胁痛”“积聚”“臌胀”“水肿”等范畴。中医学认为,肝为将军之官,肾为先天之本,肝主藏血,肾主藏精,精血同源而互化。临床中我们发现 PBC 患者发病早期,由于长期的情志异常导致肝气郁结,肝郁日久,肝木克伐脾土则致脾虚,脾失运化水谷则纳差,精微不输布四肢,肌肉失于濡养则见乏力。因此,认为其病位涉及肝、脾、肾等,病机多以虚实夹杂为主。临床治疗以调肝健脾为基本治法,自拟调肝理脾方,方以柴芍六君子汤为主方加减化裁,佐以补肾以固本,共奏调肝健脾、补肾之效,主要用于早期 PBC 的治疗。

本研究发现,造模第 24 周时, PBC 模型组小鼠血清中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞计数较造模前呈下降趋势,这与其他学者对 PBC 患者的研究结果<sup>[14]</sup>一致,提示 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 表达低下或绝对量缺乏可能是 PBC 发病以及病情加重的因素之一。本研究还发现,模型组出现肝组织汇管区炎症伴有肉芽肿形成、胆小管异常增生和破坏及胶原纤维沉积,但未见肝硬化形成,CK19 表达的胆管上皮增生明显。本研究直至第 24 周也并未发现胆管缺失、闭锁等晚期病理改变,提示该模型

符合人类 PBC 早期病理变化,而胆管上皮细胞的增生及胶原纤维的沉积则是其病变早期的主要特征,在其发病中起着重要的作用。研究结果显示,在 PBC 造模同时给予熊去氧胆酸胶囊和调肝理脾方治疗均可增强 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞计数,病理组织学分析显示二药均可明显抑制汇管区炎症、胆小管损伤及胶原沉积,从而改善或缓解 PBC 的发生发展,并且中药调肝理脾方在第 16 周、24 周时的疗效明显优于熊去氧胆酸胶囊。

综上所述,调肝理脾方具有明显的抗炎、抑制肝纤维化及胆小管增生的作用,且具有明显优于熊去氧胆酸胶囊的远期疗效,其干预 PBC 小鼠的启动靶点还有待于我们的进一步研究。

### 参考文献

- [1] TALWALKAR JA, SOUTO E, JORGENSEN RA, et al. Natural history of pruritus in primary biliary cirrhosis [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2003, 1(4): 297-302.
- [2] KUIPER EM, HANSEN BE, DE VRIES RA, et al. Improved prognosis of patients with primary biliary cirrhosis that have a biochemical response to ursodeoxycholic acid [J]. Gastroenterology, 2009, 136(4): 1281-1287.
- [3] 郭晓霞,李良学,武玉鹏,等. 调肝理脾方干预原发性胆汁性肝硬化小鼠肝损伤的组织学观察 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2015, 25(1): 36-38.
- [4] 马欢,王邦茂. 原发性胆汁性肝硬化动物模型研究进展 [J]. 国际消化病杂志, 2012, 32(2): 93-95.
- [5] 中华医学会风湿病学分会. 自身免疫性肝病诊断和治疗指南 [J]. 中华风湿病学杂志, 2011, 15(8): 556-558.
- [6] 许良中,杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准 [J]. 中国癌症杂志, 1996, 6(4): 229-231.
- [7] Working Subgroup (English version) for Clinical Practice Guidelines for Primary Biliary Cirrhosis. Guidelines for the management of primary biliary cirrhosis: the intractable hepatobiliary disease study group supported by the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan [J]. Hepatol Res, 2014, 44 (Suppl S1): 71-90.
- [8] KOHJIMA M, ENJOJI M, YADA R, et al. Pathophysiological analysis of primary biliary cirrhosis focusing on choline/phospholipid metabolism [J]. Liver Int, 2015, 35(3): 1095-1102.
- [9] INVERNIZZI P, SELMI C, GERSHWIN ME. Update on primary biliary cirrhosis [J]. Dig Liver Dis, 2010, 42(6): 401-408.
- [10] 刘然,陆伦根. 抗线粒体抗体对原发性胆汁性肝硬化诊断价值研究进展 [J]. 实用肝脏病杂志, 2014, 17(2): 218-221.

- [1] BERNUZZI F, FENOGLI D, BATTAGLIA F, et al. Phenotypical and functional alterations of CD8 regulatory T cells in primary biliary cirrhosis [J]. Autoimmune, 2010, 35(3): 176-180.
- [2] 刘娟, 曹雪涛. 2012 年度免疫学研究重要进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29(1): 3-13.
- [3] RAMSDELL F. Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? [J]. Immunity, 2003, 19(2): 165-168.
- [4] 许茵, 杨小娟, 蒯守刚. 原发性胆汁性肝硬化患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>调节性 T 细胞检测及其临床意义 [J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(4): 592-594.

## Effect of *Tiaogan Lipi Fang* (调肝理脾方) on the Regulation of T Cells and Liver Tissues in Mice With Primary Biliary Cirrhosis

GUO Xiaoxia, LI Liangxue, WU Yupeng, JIA Lili, LIU Gaiping, BAI Chongzhi

(TCM Hospital of Shanxi Province, Taiyuan, Shanxi 030012)

**ABSTRACT Objective** To study the possible mechanism of *Tiaogan Lipi Fang* (调肝理脾方) in the treatment of primary biliary cirrhosis. **Methods** Totally 120 C57BL/6 rats were randomly divided into normal group, model group, positive group and treatment group, with 30 rats in each group. Except the normal group, the rats in the other groups received intraperitoneal injection of poly I-poly (C) 5 mg/kg, twice a week, for 24 weeks to establish the animal model of primary biliary cirrhosis. Meanwhile, the positive group was given Ursodeoxycholic Acid Capules 0.1 g/(kg·d), the treatment group was given *Tiaogan Lipi Fang* 27 g/(kg·d), the normal group and the model group were given equal volume of normal saline, all by gavage once a day for 24 weeks. At the 8th, 16th, and 24th week of the experiment, the positive rate of anti mitochondrial antibody M2 subtype (AMA-M2), peripheral blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell (Treg) count, and liver tissue pathological examination and expression of liver tissue and cell keratin 19 (CK19) were detected in all rats. **Results** There was no significant difference in the positive rate of AMA-M2 between the model group, positive group and treatment group at the 8th, 16th and 24th week ( $P > 0.05$ ). Compared with the normal group, the number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg cells in peripheral blood in the model group was significantly decreased at 8th, 16th and 24th week ( $P < 0.05$ ); At the 24th week, the number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg cells in peripheral blood in the positive group and the treatment group was higher than that in the model group, but the treatment group was significantly higher than that in the positive group ( $P < 0.05$ ). There was significant difference in the pathological staging of liver tissues between the treatment group and the model group at the 8th, 16th and 24th week ( $P < 0.05$ ). Compared with the normal group, the expression of CK19 in the model group was much higher than that in normal group at the 8th, 16th and 24th week ( $P < 0.05$ ); Compared with the model group, CK19 expression was decreased in the treatment group at the 24th week ( $P < 0.05$ ). **Conclusion**

*Tiaogan Lipi Fang* can up-regulate the activity of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg in peripheral blood and reduce the expression of CK19 protein in liver tissue of rats model with primary liver cirrhosis, so as to improve the bile duct injury and hepatic fibrosis.

**Keywords** primary biliary cirrhosis; *Tiaogan Lipi Fang*; regulatory T cells; liver tissue pathology; cell keratin 19

(收稿日期: 2015-03-13; 修回日期: 2015-05-26)

编辑: 邓 媛