

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.19.013

扶肝化纤汤对肝纤维化正虚毒蕴血瘀证模型大鼠 Th17/Treg 平衡及相关转录因子的影响

钟燕¹, 谭芊任², 崔峻松², 李青¹, 卢露星¹, 肖政华²✉

1. 贵州中医药大学, 贵州省贵阳市南明区市东路50号, 550005; 2. 贵州中医药大学第二附属医院

[摘要] **目的** 从免疫角度探讨扶肝化纤汤抗肝纤维化的可能作用机制。**方法** 48只SD大鼠随机分为空白组、模型组、秋水仙碱组及扶肝化纤汤高、中、低剂量组, 每组8只。除空白组外, 其余各组大鼠建立肝纤维化正虚毒蕴血瘀证大鼠病证结合模型, 共6周。造模成功后, 扶肝化纤汤高、中、低剂量组分别给予扶肝化纤汤颗粒37.50、18.75、9.38 g/(kg·d)灌胃, 秋水仙碱组给予秋水仙碱片2 mg/(kg·d)灌胃, 空白组与模型组给予纯净水10 ml/(kg·d)灌胃, 连续干预3周。实验期间记录大鼠一般情况。干预结束后HE染色观察肝脏组织病理学形态; ELISA法检测血清中白细胞介素10(IL-10)、白细胞介素17(IL-17)含量; 流式细胞术检测外周血中辅助性T细胞17(Th17)、调节性T细胞(Treg)表达, 计算Th17/Treg值; qRT-PCR法检测肝脏组织中维甲酸相关核孤儿受体 γ (ROR γ t)、叉状头/翅膀状螺旋转录因子(FoxP3)mRNA表达。**结果** 与空白组比较, 模型组大鼠一般情况为精神萎靡, 活动减少、扎堆, 弓背喜卧, 灌胃无抵抗, 进食量明显减少, 大便溏薄、肛门污秽, 体质量增加缓慢, 毛发枯燥无光泽, 四肢皮肤青紫瘀斑变暗, 尾部皮肤有不同程度紫黑斑; HE染色显示肝脏组织肝纤维化增生明显; 血清IL-17、外周血Th17表达及Th17/Treg值、肝组织ROR γ t mRNA表达升高, IL-10、Treg表达、FoxP3 mRNA表达降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 各药物干预组大鼠一般情况及HE染色肝脏组织肝纤维化情况均有改善, 扶肝化纤汤高、中剂量组及秋水仙碱组IL-17、Th17表达、Th17/Treg值、ROR γ t mRNA表达降低, IL-10、Treg表达、FoxP3 mRNA表达升高, 扶肝化纤低剂量组IL-17、Th17表达、ROR γ t mRNA表达降低, IL-10、FoxP3 mRNA表达升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 且扶肝化纤汤高剂量组各指标改善效果优于秋水仙碱组和扶肝化纤汤中、低剂量组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 扶肝化纤汤可能通过调节特异性转录因子FoxP3、ROR γ t表达, 影响Th17、Treg细胞分化及Th17/Treg平衡, 调节IL-10、IL-17分泌, 进而调节免疫平衡发挥抗肝纤维化的作用。

[关键词] 肝纤维化; 辅助性T细胞17; 调节性T细胞; 免疫平衡; 扶肝化纤汤

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是各种慢性肝病的共同病理阶段, 主要特征为细胞外基质合成与降解不平衡, 早期有效地抗HF对降低肝癌的发病率和死亡率具有重要意义^[1]。肝星状细胞(HSC)的活化增殖在HF的发生发展中起核心作用, HSC活化受到肝脏中复杂微环境的影响, 包括T细胞、B细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞等直

接或间接作用^[2-3]。研究^[4-5]表明, 辅助性T细胞17(Th17)/调节性T细胞(Treg)的平衡及与其相关的特异性转录因子、细胞因子能够影响HSC活化增殖, 参与HF的进展或消退。

扶肝化纤汤是我们基于中医学“肝病实脾、培土荣木”理论确立的临床治疗HF的经验方, 具有健脾益气、补益肝肾、行气活血、扶正解毒之效。前期研究已证实其对HF有较好疗效, 如临床研究表明其能够改善HF患者的症状、肝功能和肝纤维化四项指标^[6]; 实验研究显示其可能通过丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、转化生长因子 β 1(TGF- β 1)/

基金项目:国家自然科学基金(81660790); 国家中医药管理局青年岐黄学者支持项目(国中医药人教发[2020]7号); 贵州省高等学校中西医结合防治疾病转化医学重点实验室项目(黔教技[2023]017号)

✉ 通讯作者: 435204673@qq.com

信号转导蛋白 (Smad) 信号通路延缓或逆转 HF 进展^[7-8]。鉴于 HF 与 Th17/Treg 平衡之间的联系, 本研究拟从免疫调控角度探讨扶肝化纤汤对 HF 正虚毒蕴血瘀证模型大鼠 Th17/Treg 平衡及相关转录因子、细胞因子的影响, 进一步探索扶肝化纤汤防治 HF 的可能作用机制, 为其临床应用提供依据。本实验已通过贵州中医药大学实验动物伦理委员会审批, 批准号: 20210035。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 48 只, 6~8 周龄, 体质量 200~220 g, 购于湖南长沙天勤有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (湘) 2019-0014。饲养于贵州中医药大学动物实验科研服务平台, 自由饮水, 普通饮食, 温度 18~25℃, 干燥、通风, 光照 12 h 明暗交替, 湿度 50%~60%。

1.2 药物

扶肝化纤汤, 组成: 黄芪 20 g、白术 20 g、鳖甲 20 g、黄精 15 g、当归 20 g、北柴胡 10 g、绞股蓝 10 g、白芍 20 g、枳实 15 g、丹参 20 g、三七粉 5 g、炙甘草 6 g, 药物颗粒剂采购于贵州中医药大学第二附属医院同济堂, 溶解于 200 ml 纯净水, 浓缩为含生药 2 g/ml 的溶液。秋水仙碱片 (0.5 mg/片, 国药准字: H53020166, 云南植物药业有限公司), 纯净水配制成浓度为 0.5 mg/ml 的溶液。

1.3 主要实验试剂及仪器

0.9% 氯化钠注射液 (国药准字: H20033974), 贵州科伦药业有限公司; CD25 单克隆抗体 (货号: 17-0390-82)、白细胞介素 17A (IL-17A) 单克隆抗体 (货号: 25-7177-82), Ebioscience 公司; FITC 抗鼠 CD3 抗体 (货号: 201403)、PerCP 抗鼠 CD8a 抗体 (货号: 201712)、PE 抗鼠叉状头/翅膀状螺旋转录因子 (FoxP3) 抗体 (货号: 320008), Biolegend 公司; PMA/Ionomycin 混合物 (250X, 货号: 70-CS1001)、BFA/Monensin 混合物 (250X, 货号: 70-CS1002)、Fix & Perm 试剂盒固定破膜剂 (货号: 70-GAS005/2)、白细胞介素 17 (IL-17, 货号: 70-EK317HS) ELISA 试剂盒、白细胞介素 10 (IL-10, 货号: 70-EK310HS) ELISA 试剂盒, 杭州联科生物技术有限公司; 总 RNA 提取试剂盒 (货号: DP451), 天根生化科技有限公司; 四氯化碳 (CCl₄, 货号: 20210308), 福晨化学试剂有限公司; HE 染色试剂 (货号: 220608), 南昌雨露实验

器材有限公司; 橄榄油 (货号: O8320), 索莱宝生物科技有限公司; 10% 中性甲醛 (货号: ZY65015PB), 上海泽叶生物科技有效公司; 乌拉坦 (货号: 30191218), 沪试实验器材有限公司。

BD canto II plus 型流式细胞仪, BD 公司; HM325 型病理切片机、YZB/GER1806 型离心机, Thermo Fisher 公司; CFX96 型荧光定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司; BX43 型正置光学显微镜, 奥林巴斯公司; MK3 型酶标仪, Thermo Multikan 公司。

1.4 大鼠分组、造模及干预方法

将 48 只 SD 大鼠采用随机数字表法分为空白组、模型组、秋水仙碱组及扶肝化纤汤高、中、低剂量组, 每组 8 只。除空白组外, 其余各组大鼠采用经典的 CCL₄ 造模法^[9]建立 HF 大鼠模型: CCL₄ 与橄榄油配制成的 40% CCL₄ 混合油剂, 按 0.3 ml/100 g 剂量, 选择大鼠大腿部、颈背部交替皮下注射, 每周 2 次 (周三、周日给药), 共 6 周。第 4 周开始, 除空白组外, 其余各组在上述造模方法基础上, 参考前期病证结合造模法^[10-12]建立 HF 正虚毒蕴血瘀证大鼠模型: 止血钳夹尾 1 h 给予疼痛刺激; 2 g/ml 高浓度大黄溶液 10 mg/kg 灌胃大鼠每日 1 次、间断禁食不禁水 24 h; 将大鼠放入盛满清水的光滑大铁桶中进行游泳疲劳实验 (连续游泳以下沉为准, 每日 2 次); 束缚大鼠双后足倒立悬挂 30 min、予超声波驱鼠器置于鼠笼中刺激 2 h, 使其处于惊恐应急状态; 以上 6 种不同的刺激项目, 每天采用随机数字表法选择 2 种, 并且相邻两天不能重复使用同一种刺激项目, 连续 3 周。造模第 6 周结束后, 大鼠明显表现出活动减少、扎堆、反应迟钝, 困倦嗜睡, 进食量明显减少, 脱毛、毛发枯燥无光泽, 大便溏薄, 四肢皮肤青紫瘀斑变暗, 尾部有不同程度紫黑或黄褐色斑等正虚毒蕴血瘀相关表现, 且 HE 染色结果显示模型大鼠有肝组织炎症、坏死表现及肝纤维化, 证明 HF 正虚毒蕴血瘀证大鼠造模成功^[12]。根据文献^[12]标准, 所有大鼠造模成功。

造模结束后次日进行药物干预, 按照人与大鼠体表面积临床等效剂量折算系数^[13]计算, 扶肝化纤汤低、中、高剂量组 (以中剂量为临床等效剂量) 分别给予扶肝化纤汤颗粒 9.38、18.75、37.50 g/(kg·d) 灌胃; 秋水仙碱组给予秋水仙碱片 2 mg/(kg·d) 灌胃; 空白组与模型组给予纯净水 10 ml/(kg·d) 灌胃。各组均每日灌胃 1 次, 每周根据大鼠体质量调整用药量, 连续干预 3 周。

1.5 观察指标及方法

末次灌胃结束，禁食禁水 12 h 后处死大鼠，麻醉前称重，予腹腔注射 20% 乌拉坦 0.5 ml/100 g 麻醉，打开腹腔，剥离腹主动脉取血，一部分血收集于肝素钠抗凝管中，4 h 之内完成流式细胞分析的细胞制备；另一部分血收集于促凝管中，4℃、3500 r/min 离心 10 min（离心半径 10 cm），取上层血清，冻存于-80℃冰箱备用。取一部分肝右叶组织放入无酶冻存管中，冻存于-80℃冰箱中用于 qRT-PCR 检测；取一部分肝脏组织浸泡于 10% 中性甲醛中，用于 HE 染色观察病理学形态。

1.5.1 大鼠一般情况 实验期间观察大鼠精神状态、皮肤、毛发、行为活动、进食及大便情况，观察腹部有无包块，全身有无出血，注射部位皮肤有无肿块、破溃、感染，每周称重记录体质量变化情况。

1.5.2 大鼠肝脏组织 HE 染色 采用随机数字表法各组选取 4 只大鼠肝脏组织固定，梯度酒精脱水，二甲苯透明，浸蜡 3 h，包埋，切片，烘烤片，二甲苯中脱蜡，梯度酒精洗去二甲苯，苏木素染色，苏木素返蓝液，酒精脱水，伊红染液染色，脱水，二甲苯透明，中性树胶封片，显微镜下观察肝脏组织的病理学形态。

1.5.3 ELISA 法检测大鼠血清 IL-17、IL-10 含量 采用随机数字表法各组选取 4 只大鼠血清按 ELISA 试剂盒步骤进行操作，绘制标准曲线，根据曲线公式计算 IL-10、IL-17 含量。

1.5.4 流式细胞术检测大鼠外周血 Treg、Th17 细胞表达 采用随机数字表法各组选取 4 只大鼠外周血，流式细胞技术检测 Th17 细胞表达：大鼠低温保存的现采 4 h 内的外周血，加入淋巴分层液取得单个核细胞，调节细胞计数；加入 1 倍体积 RPMI 1640 培养液制成细胞悬液，加入 PMA/Ionomycin 混合物、BFA/Monensin 混合物孵育，PBS 洗涤后加入 FITC 抗鼠 CD3 抗体和 PerCP 抗鼠 CD8a 抗体孵育 30 min，PBS 洗涤后加入 Fix A、Fix B 和 IL-17A 单克隆抗体孵育 30 min，PBS 洗涤后用流式细胞仪检测。

流式细胞技术检测 Treg 细胞：取 100 μl 全血加入流式管中，加入 PBS 重悬，4℃、2500 r/min 离心 5 min（离心半径 7 cm），去上清；加入 FITC 抗鼠 CD3 抗体、PerCP 抗鼠 CD8a 抗体孵育 45 min，加入红细胞裂解液，室温避光 10 min，PBS 重悬后加入破膜剂孵育 50 min，加入 Perm/Wash Buffer 缓冲液和 FoxP3、CD25 抗体，孵育 45 min，PBS 洗涤后用流

式细胞仪检测。

1.5.5 qRT-PCR 法检测大鼠肝脏组织中维甲酸相关核孤儿受体 γ (ROR γ t)、FoxP3 mRNA 表达 首先从 NCBI Gene 数据库中查找 ROR γ t 和 FoxP3 基因序列，选择大鼠物种，设计引物序列如表 1，以 β -action 为内参，引物由赛默飞公司合成。采用随机数字表法各组选取 4 只大鼠肝脏组织，每只大鼠取 30~35 mg，全自动匀浆机研磨均匀，按照试剂步骤提取总 RNA。然后取 2 μ g 总 RNA 加入反转录液，热循环仪 42℃ 孵育 30 min，95℃ 下加热 5 min，合成 cDNA。然后按照预变性 95℃ 15 s，40 次循环（变性 95℃ 15 s；退火/延伸 60℃ 30 s）进行扩增。将扩增产物的 Ct 值分别导出，以 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算出转录产物的相对表达量。

表 1 引物序列表

Table 1 List of primer sequences

基因	引物序列 5'-3'	产物片段长度/bp
FoxP3	上游 TCACACGCATGTTGCGCTACTTC	104
	下游 CTCACTCTCCACTCGCACAAAGC	104
ROR γ t	上游 GGAAGTCGTCCCTCGTCAGAATGTG	84
	下游 TCCACACCACCGTATTTGCTTC	84
β -action	上游 ATCATTGCTCCTCTGAGCG	163
	下游 CAGCTCAGTAACAGTCCGCC	163

注：ROR γ t，维甲酸相关核孤儿受体 γ ；FoxP3，叉状头/翅膀状螺旋转录因子。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。计量资料均符合正态分布，用均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示，方差齐性者采用方差分析，两组间比较采用 LSD 检验；方差不齐者采用 Welch 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较

空白组大鼠精神良好，反应灵敏，活泼好动，皮肤红润，毛发密集光泽，进食良好，干燥颗粒状粪便，体重增加。与空白组比较，模型组大鼠精神萎靡，活动减少、喜扎堆，弓背喜卧，灌胃无抵抗，进食量明显减少，大便溏薄、肛门污秽，体质量增加缓慢，毛发枯燥无光泽，四肢皮肤青紫瘀斑变暗，尾部皮肤有不同程度紫黑斑。扶肝化纤汤低剂量组大鼠表现与模型组大鼠表现相似；扶肝化纤汤高、中剂量组及秋水仙碱组大鼠较模型组、扶肝化纤汤低剂量组大鼠精神状态良好，反应稍灵敏，

活动增加, 随药物干预时间延长, 大鼠毛发稍有光泽, 进食正常, 四肢皮肤青紫瘀斑稍变红润, 大便由稀溏变正常, 体质量逐渐增加但缓于空白组。

2.2 各组大鼠肝脏组织 HE 染色结果

图 1 示, 空白组大鼠肝细胞排列整齐, 无炎症、坏死, 汇管区未见纤维组织增生。模型组大鼠肝细胞呈现脂肪样变性, 伴随大量炎症细胞浸润, 其中部分肝细胞变性坏死, 小叶结构紊乱, 汇管区可见纤维组织增生。扶肝化纤汤高剂量组、秋水仙碱组有少量肝细胞变性坏死及炎症细胞浸润, 无假小叶形成, 少量胶原纤维沉积; 扶肝化纤汤中、低剂量组部分肝细胞变性坏死, 小叶结构稍紊乱, 炎症细胞浸润, 胶原纤维沉积。

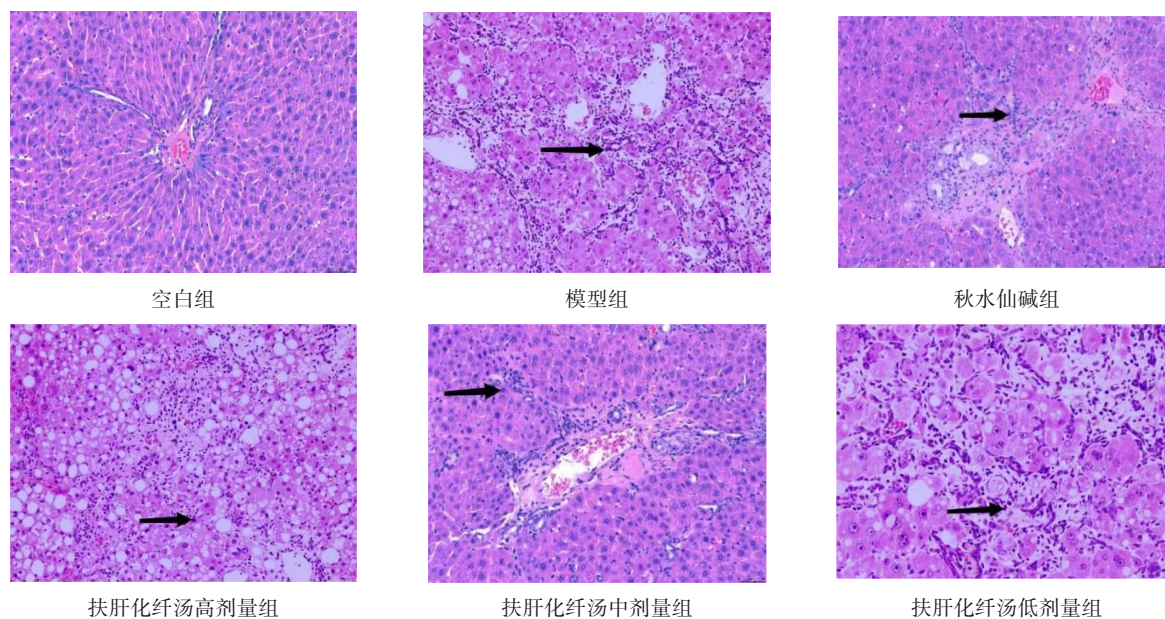
2.3 各组大鼠血清中 IL-10、IL-17 含量比较

表 2 示, 与空白组比较, 其余各组大鼠血清中

IL-10 明显降低, IL-17 明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各药物干预组大鼠血清中 IL-10 升高, IL-17 降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与秋水仙碱组比较, 扶肝化纤汤高剂量组 IL-10 升高、IL-17 降低, 扶肝化纤汤低剂量组 IL-10 降低、IL-17 升高, 扶肝化纤汤中剂量组 IL-17 亦升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与扶肝化纤汤高剂量组比较, 扶肝化纤汤中、低剂量组 IL-10 降低、IL-17 升高 ($P < 0.01$)。扶肝化纤汤中、低剂量组 IL-10、IL-17 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 各组大鼠外周血 Treg、Th17 细胞表达比较

表 3 示, 与空白组比较, 其余各组大鼠外周血 Treg 表达降低, Th17 表达及 Th17/Treg 值升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 扶肝化纤汤高、中剂量组及秋水仙碱组外周血 Treg 升高, Th17 及



注: 图中箭头指示为肝细胞变性坏死。

图 1 各组大鼠肝脏组织病理学形态 (HE 染色, $\times 200$)

Figure 1 Histopathological morphology of liver in each group (HE, $\times 200$)

表 2 各组大鼠血清 IL-10、IL-17 含量比较

Table 2 Comparison of serum IL-10 and IL-17 content among groups

(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IL-10	IL-17
空白组	4	41.824 $\pm$ 3.513	23.441 $\pm$ 1.941
模型组	4	14.732 $\pm$ 2.191 ^{a)}	234.410 $\pm$ 4.908 ^{a)}
秋水仙碱组	4	24.345 $\pm$ 0.402 ^{a)b)}	58.222 $\pm$ 2.965 ^{a)b)}
扶肝化纤汤高剂量组	4	28.098 $\pm$ 3.475 ^{a)b)d)}	39.374 $\pm$ 3.145 ^{a)b)e)}
扶肝化纤汤中剂量组	4	21.663 $\pm$ 1.271 ^{a)b)f)}	110.284 $\pm$ 6.529 ^{a)b)e)f)}
扶肝化纤汤低剂量组	4	19.010 $\pm$ 0.441 ^{a)c)e)f)}	130.761 $\pm$ 6.049 ^{a)b)e)f)}

注: IL-10, 白细胞介素 10; IL-17, 白细胞介素 17。

a) 与空白组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.01$; c) 与模型组比较, $P < 0.05$; d) 与秋水仙碱组比较, $P < 0.05$; e) 与秋水仙碱组比较, $P < 0.01$; f) 与扶肝化纤汤高剂量组比较, $P < 0.01$ 。

表 3 各组大鼠外周血 Treg、Th17 细胞表达及 Th17/Treg 值比较

Table 3 Comparison of Treg and Th17 expression in peripheral blood and Th17/Treg value among groups (x±s)				
组别	鼠数	Treg/%	Th17/%	Th17/Treg
空白组	4	8.375±1.670	5.700±0.942	0.686±0.080
模型组	4	2.675±0.922 ^{a)}	25.175±1.526 ^{a)}	10.010±2.328 ^{a)}
秋水仙碱组	4	6.050±0.480 ^{a) c)}	9.525±1.372 ^{a) c)}	1.568±0.110 ^{a) d)}
扶肝化纤汤高剂量组	4	6.900±0.483 ^{b) c)}	7.950±1.109 ^{b) c)}	1.153±0.156 ^{b) d) e)}
扶肝化纤汤中剂量组	4	4.625±0.250 ^{a) c) e) g)}	16.150±1.529 ^{a) c) f) g)}	3.502±0.424 ^{a) d) e) g)}
扶肝化纤汤低剂量组	4	2.925±1.100 ^{a) f) g)}	19.350±1.308 ^{a) c) f) g)}	7.293±2.467 ^{a) f) g)}

注：Treg，调节性T细胞；Th17，辅助性T细胞17。
a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与空白组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与模型组比较， $P<0.05$ ；f) 与秋水仙碱组比较， $P<0.01$ ；e) 与秋水仙碱组比较， $P<0.05$ ；g) 与扶肝化纤汤高剂量组比较， $P<0.01$ 。

Th17/Treg 值降低；扶肝化纤低剂量组 Th17 降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与秋水仙碱组比较，扶肝化纤汤高剂量组 Th17/Treg 值降低；扶肝化纤汤中、低剂量组 Treg 降低，Th17 及 Th17/Treg 值升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与扶肝化纤汤高剂量组比较，扶肝化纤汤中、低剂量组 Treg 降低，Th17、Th17/Treg 值升高 ($P<0.01$)。扶肝化纤汤中、低剂量组 Treg、Th17、Th17/Treg 值比较，差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.5 各组大鼠肝脏组织中 RORγt、FoxP3 mRNA 表达比较

表 4 示，与空白组比较，其余各组大鼠肝脏组织中 RORγt mRNA 表达明显升高，FoxP3 mRNA 表达明显降低 ($P<0.01$)。与模型组比较，各药物干预组大鼠肝脏组织中 RORγt mRNA 表达明显降低，FoxP3 mRNA 表达明显升高 ($P<0.01$)。与秋水仙碱组比较，扶肝化纤汤高剂量组 RORγt mRNA 表达降低，FoxP3 mRNA 表达升高；扶肝化纤汤低

剂量组 RORγt mRNA 表达升高 ($P<0.01$)。与扶肝化纤汤高剂量组比较，扶肝化纤汤中、低剂量组 RORγt mRNA 表达升高，FoxP3 mRNA 表达降低 ($P<0.01$)。扶肝化纤汤中、低剂量组 RORγt、FoxP3 mRNA 表达比较，差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

3 讨论

肝纤维化属于中医学“癥瘕”“积聚”“肝着”等范畴。《医宗必读》曰：“积之成者，正气不足，而后邪气踞之”，《景岳全书》云：“凡脾肾不足及虚弱失调之人，多有积聚之病”，提示正气亏虚是 HF 发生发展的根本。正气亏虚，易感邪毒或祛邪无力，加之情志久郁、滋食肥甘厚味、嗜酒过度、劳倦内伤等因素影响，邪毒易深入，损伤肝络，日久则肝气郁结，气滞血瘀，瘀血结于腹中，久而成积，正如《四圣心源》所言：“积聚者，气血之凝瘀也”。基于此，我们提出正虚毒蕴血瘀是 HF 的关键病机。正气抵御邪气入侵的能力主要体现在卫气的防御作用上，这与西医学免疫功能有相似之处。脾胃为后天之本，脾胃运化的水谷精微是卫气的物质基础，脾胃健运则机体正常运转，正如《灵枢·五癯津液别篇》所言：“五脏六腑，心为之主，耳为之听……脾为之卫”。《金匱要略》中“见肝之病，知肝传脾，当先实脾”治未病思想与现代医学防治 HF 进展为终末期肝病的预防理念高度契合，扶肝化纤汤正是基于“肝病实脾”理论指导而创立^[14]。方中君药以黄芪、白术健脾气、扶正气，培土以荣木；臣药以黄精、当归、鳖甲补益肝肾、软坚散结，丹参、三七粉活血化瘀、散结消积，绞股蓝益气扶正解毒；佐药以北柴胡、枳实疏肝理气，白芍柔肝养阴；使药以炙甘草调和诸药，同时柴胡、白芍、枳实、炙甘草寓调和肝脾的基本方四逆散之意。全方奏健脾益气、补益肝肾、行气活

表 4 各组大鼠肝脏组织中 RORγt、FoxP3 mRNA 表达比较

Table 4 Comparison of RORγt and FoxP3 mRNA expression in liver tissues of rats in each group (2 ^{-ΔΔCt} , x±s)			
组别	鼠数	RORγt	FoxP3
空白组	4	1.009±0.164	1.009±0.151
模型组	4	7.407±0.206 ^{a)}	0.039±0.003 ^{a)}
秋水仙碱组	4	5.703±0.162 ^{a) b)}	0.354±0.094 ^{a) b)}
扶肝化纤汤高剂量组	4	4.203±0.121 ^{a) b) c)}	0.590±0.069 ^{a) b) c)}
扶肝化纤汤中剂量组	4	5.568±0.204 ^{a) b) d)}	0.354±0.034 ^{a) b) d)}
扶肝化纤汤低剂量组	4	6.738±0.111 ^{a) b) c) d)}	0.281±0.098 ^{a) b) d)}

注：RORγt，维甲酸相关核孤儿受体γ；FoxP3，叉状头/翅膀状螺旋转录因子。
a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与秋水仙碱组比较， $P<0.01$ ；d) 与扶肝化纤汤高剂量组比较， $P<0.01$ 。

血、扶正解毒之效，重在培土荣木，扶正祛邪。本研究结果显示，模型组大鼠出现精神萎靡、活动减少、大便溏薄、肛门污秽、体质量增加缓慢、四肢皮肤青紫瘀斑变暗等表现，符合典型的正虚毒蕴血瘀证，且肝组织 HE 染色呈现典型 HF 表现，如肝细胞呈现脂肪样变性，伴随大量炎症细胞浸润，汇管区可见纤维组织增生。而扶肝化纤汤高、中剂量及秋水仙碱干预后，大鼠精神状态、活动、毛发光泽、大便等情况均明显改善，且肝纤维组织增生有不同程度减轻，其中以秋水仙碱组和扶肝化纤汤高剂量组改善最为明显，考虑秋水仙碱和扶肝化纤汤高剂量抗纤维化疗效可能相当。

近年来，人们关注到免疫细胞及细胞因子在 HF 进展或消退中的重要作用。IL-17 是 Th17 细胞分泌的特征性细胞因子，启动早期炎症，通过释放大量前炎症因子而募集中性粒细胞，介导炎症反应，其表达量与 HF 程度呈正相关^[15]。IL-17 可以直接激活信号转导和转录激活因子 3 (STAT3) 信号通路，促进 HSC 活化，使其向肌成纤维细胞转化，增加胶原蛋白 I 的表达，导致细胞外基质大量沉积而产生 HF^[16]。另外，IL-17 通过刺激库弗细胞分泌白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等细胞因子，增加 α 平滑肌肌动蛋白、胶原蛋白表达，间接激活 HSC 从而驱动 HF 进展^[17]。IL-10 是 Treg 细胞分泌的特征性细胞因子，直接下调 TGF- β 1 表达，抑制 HSC 活化增殖，发挥抗 HF 作用^[18]。IL-10 亦通过诱导 p53 和 p21 基因表达而促进 HSC 凋亡，抑制 HF 进展^[19]。秋水仙碱具有抗炎作用，其可能通过下调促炎因子 IL-1 β 、IL-6 分泌而抑制炎症反应而减轻肝脏炎症，进而延缓肝纤维化进展^[20]，故本研究选择其为对照药物。本实验结果显示，经扶肝化纤汤各剂量及秋水仙碱干预后，大鼠血清中 IL-17 含量降低，IL-10 含量升高，提示扶肝化纤汤可能一方面通过下调 IL-17 水平，抑制炎症反应而抑制 HF 进展；另一方面通过促进 IL-10 大量分泌，发挥抗纤维化作用。同时结果亦显示，扶肝化纤汤高剂量组在升高血清中 IL-10 含量、降低 IL-17 含量方面优于秋水仙碱组和扶肝化纤汤中、低剂量组，提示扶肝化纤汤高剂量干预效果最佳。

HF 的进展、消退与 Th17/Treg 失衡密切相关，Th17 细胞分泌的 IL-17 参与多种炎症反应，Treg 细胞主要发挥免疫负调控，减轻机体炎症损害，其分泌的 IL-10 为主要效应因子^[21]。在 HBV 相关的 HF

模型中，发现存在 Th17/Treg 失衡且向 Th17 细胞偏移^[22]。本研究结果显示，与空白组比较，模型组大鼠外周血 Th17 明显升高而 Treg 降低，Th17/Treg 值升高，说明 HF 正虚毒蕴血瘀证模型大鼠存在 Th17/Treg 失衡现象。经扶肝化纤汤中、高剂量干预后，大鼠外周血 Th17 降低，Treg 升高，相应 Th17/Treg 失衡得到改善，且扶肝化纤汤高剂量干预效果优于秋水仙碱，提示扶肝化纤汤高剂量在一定程度上能够调节 Th17、Treg 细胞分化及 Th17/Treg 平衡，从而逆转肝纤维化。

ROR γ t 是 Th17 细胞特异性转录因子，其表达能过诱导 Th17 细胞的分化^[23]。FoxP3 是 Treg 细胞分化、功能发挥所必须的关键转录因子，亦是 Treg 细胞的表面标记物^[24]。因此，FoxP3、ROR γ t mRNA 表达情况大致反映了大鼠 Treg、Th17 细胞变化趋势。qRT-PCR 检测表明，扶肝化纤汤各剂量及秋水仙碱均能够抑制转录因子 ROR γ t mRNA 的表达，促进转录因子 FoxP3 mRNA 表达，且以扶肝化纤汤高剂量效果明显，从分子水平证实上述实验结论。

综上所述，扶肝化纤汤可能通过调节特异性转录因子 FoxP3、ROR γ t mRNA 表达，影响 Th17、Treg 细胞分化及 Th17/Treg 平衡，调节细胞因子 IL-10、IL-17 的分泌，从而调节免疫平衡，影响人体免疫系统，发挥抗肝纤维化作用。然而中药复方有效成分多，且 HF 机制复杂，参与其中免疫细胞及细胞因子繁多、信号通路错综交互，本研究仅针对 Th17/Treg 平衡进行探讨，有一定的局限性，仍需进一步探索扶肝化纤汤抗 HF 的作用机制。

参考文献

- [1] FORNER A, REIG M, BRUIX J. Hepatocellular carcinoma [J]. Lancet, 2018, 391(10127): 1301-1314.
- [2] CALIGIURI A, GENTILINI A, PASTORE M, et al. Cellular and molecular mechanisms underlying liver fibrosis regression [J]. Cells, 2021, 10(10): 2759.
- [3] 朱璐璐, 王汉裕, 吕东勇, 等. 基于中医阴阳学说探讨巨噬细胞极化在肝纤维化中的作用 [J]. 中医杂志, 2019, 60(12): 1025-1029.
- [4] YANG F, LI H, LI Y, et al. Crosstalk between hepatic stellate cells and surrounding cells in hepatic fibrosis [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 99: 108051. doi: 10.1016/j.intimp. 2021. 108051.
- [5] DRESCHER HK, BARTSCH LM, WEISKIRCHEN S, et al. Intrahepatic Th17/Treg cells in homeostasis and disease: it's all about the balance [J]. Front Pharmacol,

- 2020, 11:588436. doi:10.3389/fphar.2020.588436.
- [6] 崔峻松, 谭芊任, 肖政华. 扶肝化纤汤治疗慢性乙型病毒性肝炎肝纤维化临床研究[J]. 亚太传统医药, 2017, 13(4):131-133.
- [7] 肖政华, 杨辉, 杨君, 等. 扶肝化纤汤对肝纤维化模型大鼠 MAPK 信号通路的影响[J]. 中草药, 2019, 50(14):3374-3381.
- [8] 肖政华, 邹艳, 杨辉, 等. 扶肝化纤汤含药血清对 TGF- β 1 诱导 HSC-T6 细胞增殖及 TGF- β 1/Smad 信号通路的影响[J]. 中医杂志, 2019, 60(19):1673-1678.
- [9] 程明亮, 杨长青. 肝纤维化的基础研究及临床[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002:20.
- [10] 周玉平. 肝纤维化病证结合动物模型评析[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(6):1504-1505.
- [11] 徐珊, 包剑锋, 周敏, 等. 肝纤维化病证结合模型的研制[J]. 中国中医药科技, 2009, 16(2):81-83, 79.
- [12] 傅柳, 严小军, 尚广彬, 等. 肝纤维化病证结合动物模型的建立及评价方法研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(6):3330-3334.
- [13] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2011:1263.
- [14] 邹艳, 陈贵赏, 肖政华, 等. 浅析扶肝化纤汤的处方组成、药理作用及临床应用[J]. 当代医药论丛, 2017, 15(22):204-206.
- [15] LAN YT, WANG ZL, TIAN P, et al. Treg/Th17 imbalance and its clinical significance in patients with hepatitis B-associated liver cirrhosis[J]. Diagn Pathol, 2019, 14(1):114.
- [16] ZHANG XW, MI S, LI Z, et al. Antagonism of interleukin-17A ameliorates experimental hepatic fibrosis by restoring the IL-10/STAT3-suppressed autophagy in hepatocytes[J]. Oncotarget, 2017, 8(6):9922-9934.
- [17] TAN Z, QIAN X, JIANG R, et al. IL-17A plays a critical role in the pathogenesis of liver fibrosis through hepatic stellate cell activation[J]. J Immunol, 2013, 191(4):1835-1844.
- [18] STEEN EH, WANG X, BALAJI S, et al. The role of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in tissue fibrosis[J]. Adv Wound Care (New Rochelle), 2020, 9(4):184-198.
- [19] HUANG YH, CHEN MH, GUO QL, et al. Interleukin-10 promotes primary rat hepatic stellate cell senescence by upregulating the expression levels of p53 and p21[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(4):5700-5707.
- [20] 章蓝月, 陶春鹤, 轩晨, 等. 益气化痰柔肝方通过调控 NLRP3 炎性小体活性缓解 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化[J]. 免疫学杂志, 2021, 37(10):829-836, 853.
- [21] ZHENG JR, WANG ZL, FENG B. Hepatitis B functional cure and immune response[J]. Front Immunol, 2022, 13:1075916. doi:10.3389/fimmu.2022.1075916.
- [22] 冯锦, 吴建红, 熊响莲, 等. 紫杉醇通过调控 JAK2/STAT3 通路对肝纤维化模型大鼠 Th17/Treg 影响的研究[J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(13):1564-1569.
- [23] REN J, LI B. The functional stability of FOXP3 and ROR γ t in Treg and Th17 and their therapeutic applications[J]. Adv Protein Chem Struct Biol, 2017, 107:155-189. doi:10.1016/bs.apcsb.2016.10.002.
- [24] KONOPACKI C, PRITYKIN Y, RUBTSOV Y, et al. Transcription factor Foxp1 regulates Foxp3 chromatin binding and coordinates regulatory T cell function[J]. Nat Immunol, 2019, 20(2):232-242.

Effect of *Fugan Huaxian Decoction* (扶肝化纤汤) on Th17/Treg Balance and Related Transcription Factors in Hepatic Fibrosis with Healthy *Qi* Deficiency and Toxin Accumulation Pattern Model Rats

ZHONG Yan¹, TAN Qianren², CUI Junsong², LI Qing¹, LU Luxing¹, XIAO Zhenghua²

1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, 550005; 2. The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of *Fugan Huaxian Decoction* (扶肝化纤汤, FHD) against hepatic fibrosis (HF) from the perspective of immunity. **Methods** Forty-eight SD rats were randomly divided into blank group, model group, colchicine group, FHD high-, medium- and low-dose group, with eight rats in each group. Except for the blank group, the disease-syndrome combined model of HF with healthy *qi* deficiency and toxin accumulation pattern was established during six weeks in the other five groups. After successful modeling, the high-, medium- and low-dose FHD groups were respectively given 37.5, 18.75 and 9.38 g/(kg·d) of FHD granules by gavage, while the colchicine group received 2 mg/(kg·d) of colchicine tablets by gavage, and the blank group and the model group were given 10 ml/(kg·d) of purified water, all for 3 weeks. The general condition of the rats was recorded. After the treatment, the histopathological morphology of the liver was observed by HE staining, and the levels of interleukin 10 (IL-10) and interleukin 17 (IL-17) in serum were determined by enzyme-linked immunosorbent

assay (ELISA). The expression of helper T cells 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in peripheral blood were detected by flow cytometry, and the Th17/Treg value was calculated. The mRNA expression of retinoic acid-related nuclear orphan receptor γ (ROR γ t) and fork-head/wing-like helix transcription factor (FoxP3) in liver tissue were detected by qRT-PCR. **Results** Compared to the general condition of rats in the blank group, those in the model group were listless, less active, stretched and pushed, arched and prone, having no resistance to gavage, significantly reduced food intake, loose stools, dirty anus, slow weight gain, dry and dull hair, purple and darkening skin of the limbs with ecchymoses, purple and black spots with varying degrees of the skin of the tail; hepatic fibrosis and hyperplasia of rats in model group were more obvious; serum IL-17, peripheral blood Th17 expression and Th17/Treg value, ROR γ t mRNA expression in the liver tissue significantly increased in the model group, while expression of IL-10, Treg and FoxP3 mRNA significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those in the model group, the general condition of the rats and the liver fibrosis of HE stained liver tissue were improved in all the medication groups; the expression of IL-17 and Th17, Th17/Treg, and ROR γ t mRNA expression significantly decreased, while expression of IL-10, Treg, and FoxP3 mRNA increased in the high- and medium-dose FHD groups and the colchicine group; the expression of IL-17, Th17, and ROR γ t mRNA decreased, while the expression of IL-10 and FoxP3 mRNA increased in the low-dose FHD group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). And more improvements were found in the FHD high-dose group than FHD medium- and low-dose groups and colchicine group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** FHD can may regulate immune balance and act against fibrosis by regulating the expression of specific transcription factors FoxP3 and ROR γ t, affecting the differentiation of Th17 and Treg cells and Th17/Treg balance, and regulating the secretion of IL-10 and IL-17.

Keywords hepatic fibrosis; T helper cells 17; regulatory T cells; immune balance; *Fugan Huaxian Decoction* (扶肝化纤汤)

(收稿日期: 2023-06-02; 修回日期: 2023-07-05)

[编辑: 邓 媛]

广告

欢迎订阅 2023 年《中医杂志》

《中医杂志》(ISSN 1001-1668, CN 11-2166/R)是由中华中医药学会和中国中医科学院主办的全国性中医药综合性学术期刊。创刊以来始终坚持“以提高为主, 兼顾普及”的办刊方针, 是我国中医药界创刊早、发行量大、具有较高权威性和学术影响力的国家级中医药期刊之一, 是中文核心期刊和科技核心期刊、中国精品科技期刊、首届国家期刊奖获得者和中国期刊方阵双奖期刊、新中国 60 年有影响力的期刊、中国百强科技期刊、中国百种杰出学术期刊, 中医药科技期刊分级目录 T1 级期刊。荣获第五届中国出版政府奖期刊奖, 第二届、第三届、第四届中国出版政府奖期刊奖提名奖。

《中医杂志》主要栏目中当代名医和临证心得分别介绍名老中医和临床医生辨证用药治疗疑难病的经验; 临床研究介绍中医药治疗的新方法、新成果; 学术探讨、思路与方法、循证中医药、病例讨论、综述、百家园等栏目, 提供最新学术观点、研究成果与治疗方法, 成为学习中医药、研究中医药, 不断提高临床及研究水平的良师益友。

《中医杂志》为半月刊, 每月 2 日和 17 日出版, 每期定价 30.00 元, 全年 720 元。国内读者可以到全国各地邮局办理订阅手续(邮发代号: 2-698), 也可以与本刊读者服务部联系邮购, 邮购免邮费。电话: 010-64035632, 010-64089195。国外发行: 中国国际图书贸易集团有限公司(北京 399 信箱, 邮编: 100044, 代号: SM140)。

本社地址: 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 邮政编码: 100700。

网址: <http://www.jtcm.net.cn>。

