

茵芪三黄解毒汤抑制中性粒细胞-胞外诱捕网的 抗肝纤维化作用机制

李彦波, 雷超, 武庆娟, 吕文良*

(中国中医科学院 广安门医院, 北京 100053)

[摘要] 目的:旨在验证茵芪三黄解毒汤(YQSH)对四氯化碳(CCl₄)诱导的肝纤维化小鼠模型的治疗作用,并探究其作用是否与抑制中性粒细胞浸润及中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)的形成相关。方法:将36只C57BL/6J小鼠随机分为正常组、模型组、阳性药物水飞蓟宾(SF)组(55 mg·kg⁻¹·d⁻¹),YQSH低剂量(YQSH-L)组、YQSH中剂量(YQSH-M)组及YQSH高剂量(YQSH-H)组(8.325、16.65、33.3 g·kg⁻¹·d⁻¹),每组6只。除正常组外,其余各组腹腔注射CCl₄诱导肝纤维化。造模成功后,各给药组给予相应药物灌胃8周。采用苏木素-伊红(HE)、天狼星红、马松(Masson)染色观察肝组织病理改变;利用彩色多普勒超声系统进行肝脏弹性检测;免疫组化法、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测C-X-C基序趋化因子配体1(CXCL1)、C-X-C基序趋化因子配体2(CXCL2)、C-X-C基序趋化因子配体5(CXCL5)的表达及mRNA水平;流式细胞术检测中性粒细胞水平;免疫荧光法(IF)观察中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)、髓过氧化物酶(MPO)阳性蛋白表达比较;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测MPO、NE、瓜氨酸化组蛋白H3(CitH3)含量。结果:与正常组比较,模型组小鼠肝脏出现明显炎症细胞浸润和胶原沉积,肝脏弹性值、CXCL1、CXCL2、CXCL5的表达、中性粒细胞水平,以及MPO、NE和CitH3水平均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较,YQSH治疗后小鼠肝组织炎症细胞浸润、胶原沉积减轻;肝弹性降低($P<0.01$);CXCL1、CXCL2、CXCL5蛋白表达降低($P<0.01$),mRNA水平降低($P<0.05$, $P<0.01$);中性粒细胞水平下降($P<0.01$);MPO、NE阳性蛋白表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);MPO、NE、CitH3水平下降($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:YQSH的抗肝纤维化作用可能与其抑制趋化因子(CXCL1、CXCL2、CXCL5)水平,减轻中性粒细胞浸润,抑制NETs的生成的作用有关。

[关键词] 肝纤维化; 茵芪三黄解毒汤; 中性粒细胞; 中性粒细胞胞外诱捕网; 趋化因子

[中图分类号] R289;R259;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)10-0103-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20252308

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20251030.1615.004>

[网络出版日期] 2025-10-31 09:11:27 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>



Anti-hepatic Fibrosis Mechanism of Yinqi Sanhuang Jiedu Decoction via Inhibiting Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps

LI Yanbo, LEI Chao, WU Qingjuan, LYU Wenliang*

(Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

[Abstract] **Objective:** To verify the therapeutic effect of Yinqi Sanhuang Jiedu decoction (YQSH) on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatic fibrosis in mice, and to explore whether its effect was related to the inhibition of neutrophil infiltration and the formation of neutrophil extracellular traps (NETs). **Methods:** The 36 C57BL/6J mice were randomly divided into control group, model group, positive drug silybin (SF) group (55 mg·kg⁻¹·d⁻¹), YQSH-L group, YQSH-M group, and YQSH-H group (8.325, 16.65, 33.3 g·kg⁻¹·d⁻¹, respectively), $n=6$ in each group. Except for the control group, mice in all other groups were intraperitoneally injected with CCl₄ to induce hepatic fibrosis. After successful modeling, each drug administration group was given the corresponding drugs by gavage for eight weeks. Hematoxylin-eosin (HE) staining, Sirius red staining and Masson staining were

[收稿日期] 2025-09-04

[基金项目] 中央高水平中医医院临床研究和成果转化能力提升项目-中医药临床循证研究专项(HLCMHPP2023086);国家自然科学基金面上项目(82374332)

[第一作者] 李彦波,在读硕士,从事肝病的中西医结合防治研究,E-mail:lyb8520@126.com

[通信作者] * 吕文良,博士,主任医师,从事肝病的中西医结合防治研究,E-mail:lvwenliang@sohu.com

used to observe the pathological changes of liver tissue. Liver elasticity was detected by a color Doppler ultrasound system. Immunohistochemistry and real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) were performed to detect the protein expression and mRNA levels of C-X-C motif chemokine ligand 1 (CXCL1), CXCL2 and CXCL5. Neutrophil levels were detected by flow cytometry. The expression of neutrophil elastase (NE) and myeloperoxidase (MPO) positive protein was observed by immunofluorescence. The contents of MPO, NE and CitH3 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** Compared with the control group, the liver of the model group showed obvious inflammatory cell infiltration and collagen deposition, and the liver elasticity, CXCL1, CXCL2, CXCL5 expression, neutrophil level, and MPO, NE and CitH3 levels were significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, inflammatory cell infiltration and collagen deposition in the liver tissue of mice were reduced after YQSH treatment. Moreover, the liver elasticity was reduced ($P<0.01$). The protein expression ($P<0.01$) and mRNA level of CXCL1, CXCL2 and CXCL5 were decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). The neutrophil level was decreased ($P<0.01$), the expression of MPO and NE positive protein was significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), and the levels of MPO, NE and CitH3 were decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** The anti-hepatic fibrosis effect of YQSH may be related to its inhibition of chemokines (CXCL1, CXCL2, CXCL5), reduction of neutrophil infiltration, and inhibition of NETs generation.

[Keywords] hepatic fibrosis; Yinqi Sanhuang Jiedu decoction; neutrophil; neutrophil extracellular trap net; chemokines

肝纤维化作为慢性肝损伤后的修复反应,其病理特征包括细胞外基质过度沉积和肝组织结构破坏,最终可导致肝硬化甚至肝癌^[1-3]。流行病学研究显示,我国晚期肝纤维化和肝硬化的患病率分别为2.85%和0.87%^[4]。近年来,趋化因子介导的中性粒细胞浸润及中性粒细胞胞外诱捕网的释放被证实是促进肝纤维化的关键环节^[5-6]。然而,现有的治疗手段在靶向调控上述关键环节方面仍存在局限性。岐黄学者吕文良教授长期致力于慢性肝病的中西医结合防治,他结合络病学说及原创的中医火候学思想,提炼出肝纤维化“肝郁脾虚、湿热内结、瘀血阻络”的核心病机和“疏肝健脾、清热利湿、活血通络、消瘀化癥”的基本治法,在大量临床实践的基础上形成了基本方-茵芪三黄解毒汤^[7-8]。前期临床研究结果显示,茵芪三黄解毒汤与常规西医治疗联合治疗慢性乙肝患者能有效降低肝硬化的年发生率、改善临床症状、提高胆红素代谢等。基础研究结果显示,茵芪三黄解毒汤能有效改善肝纤维化小鼠模型的肝功能及肝组织病理损害,其机制可能与降低细胞因子水平、调节免疫有关^[9],但其调控免疫的具体机制尚不深入。本研究在前期研究的基础上,系统评估了茵芪三黄解毒汤对肝纤维化模型小鼠肝内中性粒细胞募集、中性粒细胞胞外诱捕网的蓄积的影响,进一步探讨茵芪三黄解毒汤治疗肝纤维化的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性C57BL/6J小鼠36只,体重(20±5)g,6~8周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产合格证号SCXK(京)2021-0006。实验动物饲养于国家纳米科学中心实验动物房,可以自由饮水,将安置在温度受控

(23℃)和明/暗(12 h/12 h)循环的受限出入室中。

1.2 伦理 实验方案通过中国中医科学院广安门医院伦理委员会批准,伦理号IACUC-GAMH-2025-045。

1.3 药物 茵芪三黄解毒汤由黄芪(批号25020102)、茵陈(批号250160151)、麸炒白术(批号25020509)、焦山楂(批号25012205)、醋鳖甲(批号24121404)、白花蛇舌草(批号24123102)、黄芩(批号250161241)、黄连(批号25010303)、黄柏(批号24111903)、醋莪术(批号62412090)、茯苓(批号250160781)、白芍(批号25020101)、凌霄花(批号24112504)、柴胡(批号25012005)等组成,所有药物均购于中国中医科学院广安门医院药剂科,经药剂科杨响光副研究员鉴定为正品。将上述药材加10倍量蒸馏水浸泡30 min,武火煮沸后转文火煎煮30 min,滤取药液。药渣再加适量水,同法煎煮30 min,过滤。合并2次滤液,作为汤药母液,4℃保存。本研究设置茵芪三黄解毒汤高剂量组(YQSH-H组)、中剂量组(YQSH-M组)、低剂量组(YQSH-L组)。其中,YQSH-M组的小鼠给药量通过体表面积折算(按成人临床剂量 $1.85\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 换算);YQSH-H组、YQSH-L组分别为中剂量的2倍和0.5倍。将中药母液浓缩并制成0.74、0.37、0.185 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的水煎液,4℃保存备用。水飞蓟宾(上海麦克林生化科技股份有限公司,批号22888-70-6)由纯水配制成质量浓度为 $1.65\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 混悬液。

1.4 试剂 改良马松(Masson)三色染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号G1346);小鼠瓜氨酸化组蛋白H3(CitH3)、小鼠中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(江苏酶免实业有限公司,批号分别为MM-1005M2、

MM-0603M2);小鼠髓过氧化物酶(MPO)ELISA试剂盒(北京迈瑞达科技有限公司,批号M150898-48T);DAB显色试剂盒、逆转录试剂盒、磷酸盐缓冲液(PBS)(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为G1212、G3337、G4202);通用二步法检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号PV-9000);别藻蓝蛋白(APC)CD45抗体、异硫氰酸荧光素(FITC)CD11b抗体、藻红蛋白(PE)Ly6G抗体、细胞染色缓冲液、流式细胞固定液(美国Biolegend公司,批号分别为982304、982614、127608、420201、422101);红细胞裂解液、ActivAb™FITC标记的羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)、ActivAb™Solar Fluor 555标记的羊抗小鼠IgG、改良苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、改良天狼猩红(Sirius Red)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为R1010-500ml、SF134、K1031G-AF555、G1121、G1472);C-X-C基序趋化因子配体(CXCL)2抗体、CXCL1抗体(美国Thermo Fisher公司,批号分别为701126、PA5-86508);CXCL5、重组髓MPO、NE、CitH3抗体[艾比玛特医药科技(上海)有限公司,批号分别为PK86041S、T62224S、TA0010S、P63763-1B1];四氯化碳(CCl₄,上海安谱实验科技股份有限公司,批号CFEQ-4-011340-0500);橄榄油(美国Med Chem Express公司,批号HY-108749);二甲苯(国药集团化学试剂有限公司,批号1330-20-7)。

1.5 仪器 KD-2260型轮转式切片机、KD-TK型生物组织摊烤片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);CX40型生物显微镜(宁波舜宇仪器有限公司);FACSCalibur-2型流式细胞仪(美国碧迪公司);Varioskan LUX型多功能酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);CFX Connect型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Bio-Rad公司);KZ-5F-3D型三维冷冻研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司);EQTouch UD9800型彩色多普勒超声系统(无锡海斯凯尔医学技术有限公司)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药 采用随机数字表法将36只小鼠分为正常、模型组、水飞蓟宾组(SF组)、YQSH-L组、YQSH-M组、YQSH-H组,每组6只。在适应性喂养3 d后,除正常组外其余各组予连续6周的10% CCl₄橄榄油溶液腹腔注射,给药体积为5 μL·g⁻¹,给药频率为每周2次。

造模结束后第0天起开始灌胃,YQSH-L组、YQSH-M组、YQSH-H组予茵芪三黄解毒汤药液灌

胃,根据课题组前期研究结果确定给药剂量^[18],给药剂量分别为8.325、16.65、33.3 g·kg⁻¹·d⁻¹;SF组予水飞蓟宾混悬液灌胃,给药剂量0.055 g·kg⁻¹·d⁻¹,给药时间持续8周。

2.2 HE、天狼猩红、马松(Masson)法观察小鼠肝组织病理学形态变化 各组小鼠处死后取肝脏,用4%多聚甲醛固定后进行常规包埋,利用轮转式切片机切出6 μm厚的石蜡切片,进行常规HE、天狼猩红、Masson染色,生物显微镜下观察肝组织病理学改变。

2.3 小鼠肝脏弹性检测 各组小鼠吸入异氟烷进行麻醉后,仰卧固定在手术台上,剔除剑突以下腹部毛发,并使用碘伏消毒,利用彩色多普勒超声系统进行肝脏弹性检测。

2.4 免疫组化法检测小鼠肝组织CXCL1、CXCL2、CXCL5表达 将各组的石蜡切片进行脱蜡、水化后用枸橼酸修复缓冲液进行抗原修复,使用专用阻水笔圈定组织区域,滴加MPO阻断剂后滴加稀释后的一抗CXCL1(1:100)、CXCL2(1:20)、CXCL5(1:50),4℃孵育过夜后按通用二步法检测试剂盒说明书先后滴加反应增强液、增强酶标山羊抗小鼠/兔IgG聚合物,进行DAB显色。利用Image J软件测量采集视野的阳性染色面积。

2.5 Real-time PCR检测小鼠肝组织中CXCL1、CXCL2、CXCL5 mRNA表达 取各组小鼠肝组织并按试剂盒说明提取总RNA,按照逆转录试剂盒说明书将RNA逆转录为cDNA,之后进行PCR扩增,扩增程序如下:95℃预变性30 s;40个循环的95℃变性15 s、60℃退火/延伸30 s;最后绘制各目标基因及内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的溶解曲线,采用2^{-ΔΔC_t}法计算基因相对表达量。引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences		
引物	序列(5'-3')	长度/bp
CXCL1	上游 CACCCAAACCGAAGTCATAGC	109
	下游 GGGGACACCTTTTAGCATCTTT	
CXCL2	上游 GCCCAGACAGAAGTCATAGCCA	116
	下游 CAGTTAGCCTTGCCCTTTGTTC	
CXCL5	上游 GCTGGCATTCTGTTGCTGTTTC	184
	下游 TATGACTTCCACCGTAGGGCAC	
GAPDH	上游 CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	133
	下游 TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT	

2.6 流式细胞术检测小鼠肝组织中性粒细胞水平

采用随机数字表法各组选取4只大鼠取新鲜肝组织,将组织剪碎后研磨,加入红细胞裂解液4℃孵育10~15 min, PBS洗涤后加入APC抗鼠CD45抗体、FITC抗鼠CD11b抗体、PE抗鼠Ly6G抗体避光孵育30 min, PBS洗涤后加入流式细胞固定液孵育1 h, 用细胞染色缓冲液重悬后转移至流式管中,使用流式细胞仪检测,FlowJo v.10.8.1软件进行分析。

2.7 免疫荧光法观察小鼠肝组织中NE、MPO阳性蛋白表达

取小鼠肝组织石蜡切片,经脱蜡,抗原修复,山羊血清室温封闭30 min后,加一抗:MPO(1:100)、NE(1:250),于4℃湿盒孵育过夜, PBS冲洗后加稀释后荧光二抗(1:500),室温避光1 h,经PBS冲洗后加含4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)封片剂进行封片,荧光显微镜观察采集图像。

2.8 ELISA检测小鼠肝组织MPO、NE、CitH3含量

取各组小鼠肝组织置于PBS中,利用三维冷冻研磨仪制备肝组织匀浆。按MPO、NE、CitH3的

ELISA试剂盒步骤进行操作,绘制标准曲线,根据曲线公式计算MPO、NE、CitH3含量。

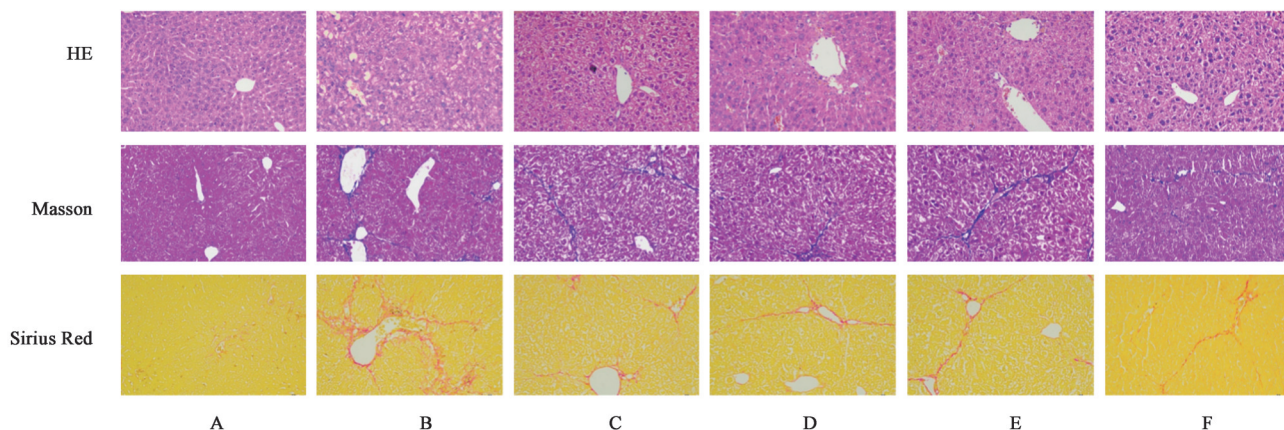
2.9 统计学方法

使用GraphPad Prism 9.5.0软件进行数据分析并作图,本研究符合正态分布的数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行多组比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 茵芪三黄解毒汤对小鼠肝组织病理学的影响

正常组小鼠肝组织结构完整,肝小叶呈典型放射状排列,肝索单层细胞排列规整,汇管区结构清楚,无炎性细胞浸润。与正常组比较,模型组肝组织呈现显著病理损伤,肝小叶结构破坏、肝细胞气球样变性、炎性细胞浸润密度显著升高;胶原沉积明显,主要分布在汇管区及肝小叶间隔之间,肝小叶正常结构遭到破坏。SF组、YQSH-L组、YQSH-M组、YQSH-H组肝索排列趋于正常,炎性细胞浸润及胶原沉积明显减少,肝小叶及汇管区的形态更接近正常组。见图1。



注:A.正常组;B.模型组;C.SF组;D.YQSH-L组;E.YQSH-M组;F.YQSH-H组(图2、图3同)

图1 茵芪三黄解毒汤对小鼠肝组织病理学的影响($\times 400$)

Fig. 1 Effect of Yinqi Sanhuang Jiedu decoction on liver tissue of mice ($\times 400$)

3.2 茵芪三黄解毒汤对小鼠肝脏弹性的影响

与正常组比较,模型组小鼠的肝脏弹性值明显升高($P<0.05$);与模型组比较,YQSH-M组小鼠的肝脏弹性值显著下降($P<0.01$),其余各组肝脏弹性值也呈不同程度的下降趋势,但差异无统计学意义。见表2。

3.3 茵芪三黄解毒汤对小鼠肝组织中CXCL1、CXCL2、CXCL5蛋白表达水平的影响

与正常组比较,模型组小鼠肝组织CXCL1、CXCL2、CXCL5蛋白表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠肝组织CXCL1、CXCL2、CXCL5蛋白表达显著下降($P<0.01$);与SF组比较,YQSH-L组、YQSH-

表2 茵芪三黄解毒汤对小鼠肝脏弹性的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Yinqi Sanhuang Jiedu decoction on liver elasticity of mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	肝脏弹性值
正常组		5.10 ± 2.07
模型组		$8.89\pm 1.90^{1)}$
SF组	0.055	8.37 ± 1.21
YQSH-L组	8.325	7.95 ± 2.14
YQSH-M组	16.65	$5.51\pm 2.01^{4)}$
YQSH-H组	33.3	7.35 ± 2.78

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SF组比较⁵⁾ $P<0.05$,⁶⁾ $P<0.01$ (表3-表7同)

M组肝组织CXCL1蛋白表达明显升高($P<0.05$, $P<0.01$), YQSH-L组、YQSH-M组、YQSH-H组肝组织CXCL2、CXCL5蛋白表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。见图2、表3。

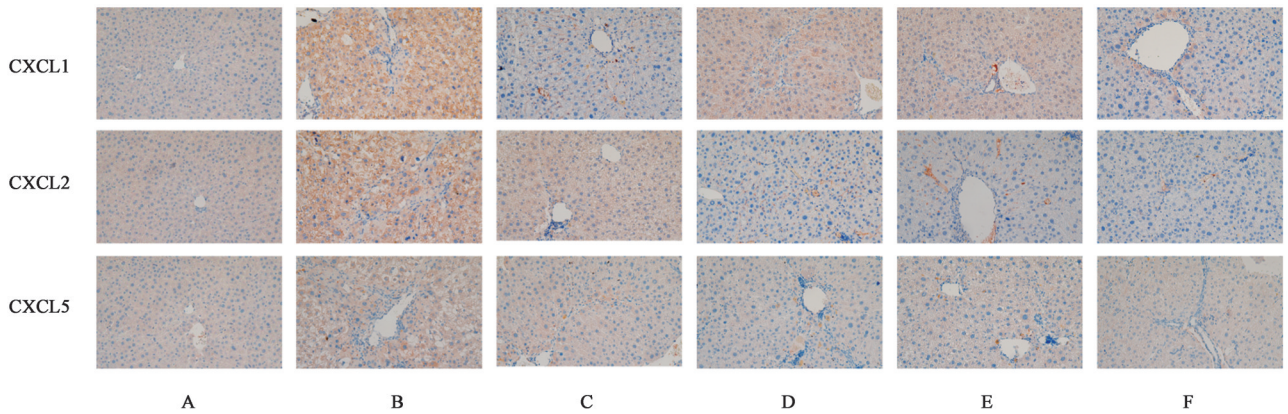


图2 茵芪三黄解毒汤对小鼠肝组织CXCL1、CXCL2、CXCL5蛋白表达水平的影响(免疫组化, $\times 400$)

Fig. 2 Effect of Yinqi Sanhuang Jiedu decoction on CXCL1, CXCL2 and CXCL5 in liver tissue of mice (IHC, $\times 400$)

表3 茵芪三黄解毒汤对小鼠肝组织中CXCL1、CXCL2、CXCL5蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 3 Effect of Yinqi Sanhuang Jiedu decoction on protein expression levels of CXCL1, CXCL2 and CXCL5 in liver tissues of mice ($\bar{x}\pm s$, $n=6$) %

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	CXCL1	CXCL2	CXCL5
正常组		0.99 $\pm$ 0.73	0.90 $\pm$ 0.38	0.87 $\pm$ 0.40
模型组		11.74 $\pm$ 0.96 ²⁾	16.03 $\pm$ 1.12 ²⁾	9.44 $\pm$ 0.82 ²⁾
SF组	0.055	4.10 $\pm$ 1.01 ⁴⁾	5.22 $\pm$ 0.65 ⁴⁾	6.66 $\pm$ 0.74 ⁴⁾
YQSH-L组	8.325	6.53 $\pm$ 0.74 ^{4,6)}	3.39 $\pm$ 0.35 ^{4,6)}	4.43 $\pm$ 0.37 ^{4,6)}
YQSH-M组	16.65	5.77 $\pm$ 0.28 ^{4,5)}	3.04 $\pm$ 0.15 ^{4,6)}	5.21 $\pm$ 0.35 ^{4,5)}
YQSH-H组	33.3	2.93 $\pm$ 0.55 ⁴⁾	3.49 $\pm$ 0.41 ^{4,6)}	5.01 $\pm$ 0.66 ^{4,6)}

3.4 茵芪三黄解毒汤对小鼠肝组织中CXCL1、CXCL2、CXCL5 mRNA表达水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠肝组织的CXCL1、CXCL2、CXCL5 mRNA表达水平均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,SF组小鼠肝组织CXCL1 mRNA表达水平显著下降($P<0.01$),YQSH-L组、YQSH-H组小鼠肝组织的CXCL1、CXCL2 mRNA表达水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),YQSH-M组小鼠肝组织的CXCL1、CXCL2、CXCL5 mRNA表达水平显著降低($P<0.01$);与SF组比较,YQSH-M组的CXCL2 mRNA表达水平显著下降($P<0.01$),YQSH-H组CXCL1、CXCL2 mRNA表达水平明显下降($P<0.05$, $P<0.01$)。见表4。

3.5 茵芪三黄解毒汤对小鼠肝组织内中性粒细胞水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠肝组织内中性粒细胞水平显著上升($P<0.01$);与模型组比较,SF组、YQSH-L组、YQSH-M组、YQSH-H组中性粒

表4 茵芪三黄解毒汤对小鼠肝组织中CXCL1、CXCL2、CXCL5 mRNA表达水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 4 Effect of Yinqi Sanhuang Jiedu decoction on CXCL1, CXCL2 and CXCL5 mRNA expression levels in liver tissue of mice ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	CXCL1	CXCL2	CXCL5
正常组		1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
模型组		40.76 $\pm$ 5.29 ²⁾	1.59 $\pm$ 0.16 ²⁾	2.31 $\pm$ 0.20 ²⁾
SF组	0.055	6.19 $\pm$ 0.26 ⁴⁾	1.45 $\pm$ 0.21	1.64 $\pm$ 0.66
YQSH-L组	8.325	1.27 $\pm$ 0.14 ⁴⁾	1.23 $\pm$ 0.14 ³⁾	1.87 $\pm$ 0.47
YQSH-M组	16.65	4.00 $\pm$ 0.59 ⁴⁾	0.91 $\pm$ 0.08 ^{4,6)}	0.92 $\pm$ 0.23 ⁴⁾
YQSH-H组	33.3	0.62 $\pm$ 0.26 ^{4,5)}	0.06 $\pm$ 0.01 ^{4,6)}	1.58 $\pm$ 0.27

细胞水平显著下降($P<0.01$);与SF组比较,YQSH-M组、YQSH-H组中性粒细胞水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。见表5及增强出版附加材料。

表5 茵芪三黄解毒汤对小鼠肝组织内中性粒细胞水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

Table 5 Effect of Yinqi Sanhuang Jiedu decoction on neutrophil level in liver tissue of mice ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	CD4 ⁺ CD11b ⁺ Ly6G ⁺ 细胞/CD4 ⁺ 细胞
正常组		0.730 $\pm$ 0.757
模型组		7.333 $\pm$ 0.157 ²⁾
SF组	0.055	5.498 $\pm$ 0.444 ⁴⁾
YQSH-L组	8.325	4.855 $\pm$ 1.105 ⁴⁾
YQSH-M组	16.65	3.388 $\pm$ 0.505 ^{4,6)}
YQSH-H组	33.3	4.203 $\pm$ 0.116 ^{4,5)}

3.6 茵芪三黄解毒汤对小鼠肝组织中MPO、NE阳性蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠肝组织内MPO、NE阳性表达显著升高($P<0.01$);与模

型组比较, SF组小鼠肝组织内NE阳性水平明显下降($P<0.05$), YQSH-L组、YQSH-M组、YQSH-H组肝组织内MPO、NE阳性表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);与SF组比较, YQSH-M组的MPO阳性表达显著下降($P<0.01$), YQSH-H组的MPO、NE阳性表达明显下降($P<0.05$, $P<0.01$)。见图3、表6。

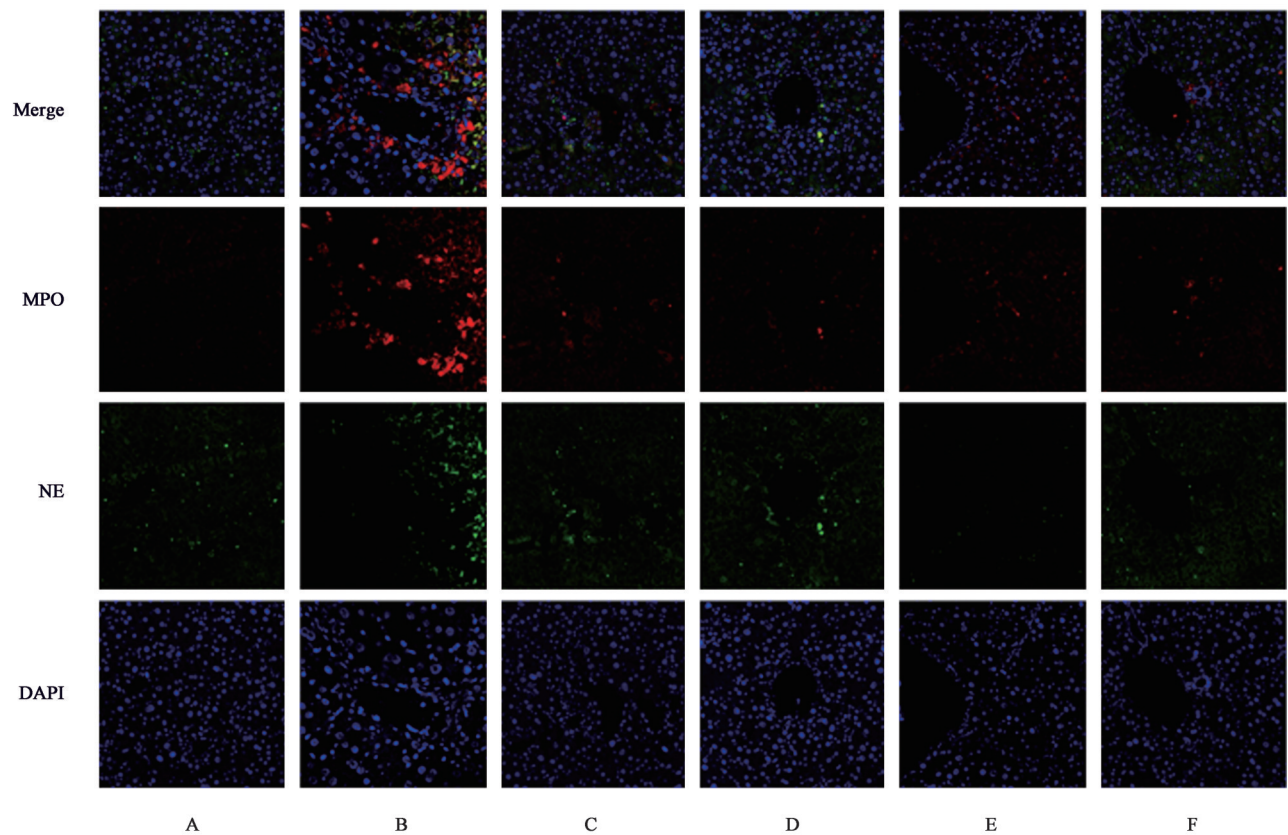


图3 茵芪三黄解毒汤对小鼠肝组织中MPO、NE阳性蛋白表达的影响(免疫荧光, ×400)
Fig. 3 Effect of Yinqi Sanhuang Jiedu decoction on MPO and NE positive protein expression in liver tissue of mice (IF, ×400)

表6 茵芪三黄解毒汤对小鼠肝组织中MPO、NE阳性蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 6 Effect of Yinqi Sanhuang Jiedu decoction on MPO and NE positive protein expression in liver tissue of mice ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	MPO	NE
正常组		141.69±6.61	147.23±6.05
模型组		196.05±21.20 ²⁾	176.34±3.20 ²⁾
SF组	0.055	192.70±7.39	160.25±1.36 ³⁾
YQSH-L组	8.325	163.64±7.05 ³⁾	160.74±7.18 ⁴⁾
YQSH-M组	16.65	142.92±22.36 ^{4, 6)}	148.60±8.02 ⁴⁾
YQSH-H组	33.3	140.68±2.76 ^{4, 6)}	145.02±1.43 ^{4, 5)}

3.7 茵芪三黄解毒汤对小鼠肝组织中MPO、NE、CitH3水平的影响 与正常组比较, 模型组小鼠肝组织的MPO、NE、CitH3水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较, SF组小鼠肝组织的MPO、NE、CitH3水平明显下降($P<0.05$, $P<0.01$), YQSH-L组、YQSH-H组小鼠肝组织的NE、CitH3水平显著下降($P<0.01$), YQSH-M组小鼠肝组织的MPO、NE、

CitH3水平明显下降($P<0.05$, $P<0.01$);与SF组比较, YQSH-L组、YQSH-M组、YQSH-H组的NE、CitH3水平显著下降($P<0.01$)。见表7。

表7 茵芪三黄解毒汤对小鼠肝组织中MPO、NE、CitH3水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 7 Effect of Yinqi Sanhuang Jiedu decoction on MPO, NE and CitH3 levels in liver tissue of mice ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	MPO	NE	CitH3
正常组		22.60±4.25	73.96±2.54	12.45±1.01
模型组		35.26±9.93 ¹⁾	95.21±10.18 ²⁾	18.97±1.27 ¹⁾
SF组	0.055	22.54±3.50 ³⁾	63.98±14.87 ⁴⁾	11.63±5.20 ³⁾
YQSH-L组	8.325	23.80±2.83	16.24±2.55 ^{4, 6)}	3.40±2.27 ^{4, 6)}
YQSH-M组	16.65	19.57±4.27 ³⁾	13.53±3.07 ^{4, 6)}	2.53±1.74 ^{4, 6)}
YQSH-H组	33.3	23.11±2.89	12.30±4.51 ^{4, 6)}	2.35±1.79 ^{4, 6)}

4 讨论

肝纤维化是慢性肝病从代偿期发展至失代偿期的共同病理过程与关键转折点, 如果损伤因素长

期不能去除,纤维化持续进行就会发展成肝硬化甚至肝癌^[10]。最新流行病学调查显示,在一般人群中晚期肝纤维化患病率为2.85%^[4]。目前,国际研究主要集中于肝纤维化逆转机制探索与新靶点开发^[11-12]。病因治疗虽可延缓疾病进展,但对于已形成的肝纤维化逆转作用有限。干扰素- α 联合疗法、免疫治疗、基因编辑等新兴策略虽显示出潜力^[13-15],但大多仍处于临床前或早期临床阶段。因此迫切需要更高效且有效的抗肝纤维化治疗策略。在这一领域,中药复方展现出了独特优势,凭借其多靶点、多通路、多环节调控的独特优势,在抗肝纤维化治疗中展现出显著潜力,已在临床人群、动物模型和细胞分子层面逐步得到验证^[16-17]。

根据肝纤维化的临床症状,可将其归为中医学中“胁痛”“积聚”“痞满”等范畴。吕文良教授总结肝纤维化的基本病机为肝郁脾虚、湿热内结、瘀血阻络,在临床辨治时当以扶正祛邪为基本治则,并总结形成了经验方茵芪三黄解毒汤,具有益气清热、活血通络的功效。茵芪三黄解毒汤方中黄芪、炒白术、茯苓益气健脾,茵陈、黄芩、黄连、黄柏、白花蛇舌草清热利湿、解毒,莪术、凌霄花活血化瘀,消食化积之焦山楂亦可助活血祛瘀。本研究结果显示,茵芪三黄解毒汤能够抑制肝组织内的炎性细胞浸润与胶原沉积,与既往结果一致^[9,18],同时能降低小鼠肝脏的弹性值,降低肝脏的硬度。值得注意的是,在降低肝脏弹性值方面,YQSH-M组的效果优于YQSH-MH组。由于YQSH-M组模拟了临床实际给药量,中剂量的优势提示中药复方在临床应用中需遵循“精准剂量”原则,其多成分、多通路的特性可能通过温和调节免疫-炎症平衡实现最优的抗肝纤维化疗效。

CXC趋化因子家族包括CXCL1、CXCL2及CXCL5的释放能通过CXCR1/2受体介导嗜中性粒细胞由外周血向炎症部位迁移,是中性粒细胞浸润的关键环节^[19-21]。本研究结果显示,肝纤维化模型组小鼠肝组织内CXCL1、CXCL2水平升高,伴随中性粒细胞水平升高,与既往结果一致^[22-23]。值得注意的是,本研究首次发现在CCl₄的肝纤维化小鼠模型中CXCL5水平升高,且与中性粒细胞浸润有关。但CXCL5是否在中性粒细胞浸润中起到关键作用尚需进一步研究。结果显示茵芪三黄解毒汤能够有效抑制肝纤维化模型小鼠肝脏中CXCL1、CXCL2及CXCL5水平的同时,减轻肝内中性粒细胞的浸润。这些结果共同揭示了茵芪三黄解毒汤对趋化因子水平及中性粒细胞浸润的抑制作用。茵芪三黄解毒汤对趋化因子及中

性粒细胞水平的抑制作用,可能归因于方中有效成分槲皮素和黄芪甲苷的协同效应。槲皮素已被证实对CXCL1有显著的抑制作用^[24]。黄芪甲苷也被证实能有效地抑制C-X-C基序趋化因子受体2(CXCR2)的表达,同时抑制中性粒细胞的迁移^[25]。

中性粒细胞被激活后可以通过程序性细胞死亡方式NETosis释放中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)^[26-27]。NETs由DNA骨架、组蛋白及多种颗粒蛋白构成^[28-29],于2024年首次发现被发现在肝纤维化模型中蓄积并具有促纤维化作用^[5,26]。目前对NETs的促肝纤维化机制的认识主要集中于NETs通过Toll样受体(TLR)3/环氧化酶-2途径诱导肝星状细胞的代谢重编程,从而促进肝星状细胞(HSCs)向肌成纤维细胞转化^[30],以及NETs直接接触肝细胞的坏死和焦亡^[31]。本研究的免疫荧光、ELISA结果显示,与正常组比较,茵芪三黄解毒汤能够显著降低NETs标志物MPO、NE、CitH3的水平。其作用可能与其降低第五组分激活肽(C5a)水平及抑制C5a R表达有关,黄芪-莪术已被发现能通过C5a/NETs途径抑制NETs的生成起到抑制Lewis肺癌小鼠肿瘤转移的作用^[32]。此外,方中有效成分汉黄芩苷可能通过抑制上游通路高迁移率族蛋白B1(HMGB1)/TLR4/p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK),影响CitH3的形成和NETs的释放^[33]。结合本研究结果,提示茵芪三黄解毒汤可能从更上游的途径,即抑制关键趋化因子水平减轻中性粒细胞浸润起到抑制NETs抗肝纤维化的作用。在肝纤维化模型中,CXCL1、CXCL2和CXCL5除了募集中性粒细胞外,还能通过CXCR2或其他机制募集多种免疫细胞,包括促进单核细胞的激活及向促炎性(M1型)的转化,募集CD8⁺T细胞和Th1细胞加剧肝细胞损伤等^[34-36]。茵芪三黄解毒汤通过上游调控机制实现对免疫细胞群的整体调节,体现了中药复方多靶点、多途径的治疗优势。

综上所述,茵芪三黄解毒汤能够抑制CXCL1、CXCL2及CXCL5的水平,减轻中性粒细胞浸润和NETs的形成,起到抗肝纤维化的效果。本研究为茵芪三黄解毒汤通过调节免疫治疗肝纤维化提供了实验依据,但其抑制趋化因子水平和NETs形成的具体机制尚需进一步探索。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

[1] PAROLA M, PINZANI M. Liver fibrosis: Pathophysiology,

- pathogenetic targets and clinical issues[J]. Mol Aspects Med, 2019, 65: 37-55.
- [2] KISSELEVA T, BRENNER D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(3): 151-166.
- [3] BERUMEN J, BAGLIERI J, KISSELEVA T, et al. Liver fibrosis: Pathophysiology and clinical implications [J]. WIREs Mech Dis, 2021, 13(1): e1499.
- [4] MAN S, DENG Y, MA Y, et al. Prevalence of liver steatosis and fibrosis in the general population and various high-risk populations: A nationwide study with 5.7 million adults in China[J]. Gastroenterology, 2023, 165(4): 1025-1040.
- [5] BABUTA M, MOREL C, DE CARVALHO RIBEIRO M, et al. Neutrophil extracellular traps activate hepatic stellate cells and monocytes via NLRP3 sensing in alcohol-induced acceleration of MASH fibrosis[J]. Gut, 2024, 73(11): 1854-1869.
- [6] CHANG N, LIU Y, LI W, et al. Neutrophil-secreted S100A8/A9 participates in fatty liver injury and fibrosis by promoting myofibroblast migration[J]. J Mol Med (Berl), 2024, 102(9): 1117-1133.
- [7] 江鸿, 魏超, 万雪梅, 等. 茵芪三黄解毒汤联合双歧杆菌三联活菌胶囊对慢性乙型肝炎患者肝纤维化、免疫功能及肠道菌群的影响[J]. 四川中医, 2023, 41(6): 133-137.
- JIANG H, WEI C, WAN X M, et al. Effects of Yinqi Sanhuang Jiedu decoction combined with *Bifidobacterium* triple viable capsule on liver fibrosis, immune function and intestinal flora in patients with chronic hepatitis B [J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2023, 41(6): 133-137.
- [8] 魏超, 江鸿, 邓先桂, 等. 茵芪三黄解毒汤联合常规西医治疗慢性乙型肝炎肝胆湿热证患者的疗效观察[J]. 实用临床医药杂志, 2021, 25(9): 37-40, 51.
- WEI C, JIANG H, DENG X G, et al. Effect observation of Yinqi Sanhuang Jiedu decoction combined with conventional western medicine in treatment of patients with chronic hepatitis B differentiated as syndrome of dampness and heat in liver and gallbladder[J]. J Clin Med Pract, 2021, 25(9): 37-40, 51.
- [9] 强睿, 姚子昂, 韩东, 等. 基于TMT标记联合LC-MS/MS阐释茵芪三黄解毒汤抗肝纤维化的药效作用机制[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(12): 5987-5992.
- QIANG R, YAO Z A, HAN D, et al. Explanation on the pharmacodynamic mechanism of Yinqi Sanhuang Jiedu decoction against hepatic fibrosis based on TMT labeling combined with LC-MS/MS technology[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2023, 38(12): 5987-5992.
- [10] GINÈS P, CASTERA L, LAMMERT F, et al. Population screening for liver fibrosis: Toward early diagnosis and intervention for chronic liver diseases[J]. Hepatology, 2022, 75(1): 219-228.
- [11] ROEHLEN N, CROUCHET E, BAUMERT T F. Liver fibrosis: Mechanistic concepts and therapeutic perspectives [J]. Cells, 2020, 9(4): 875.
- [12] PEI Q, YI Q, TANG L. Liver fibrosis resolution: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(11): 9671.
- [13] GILGENKRANTZ H, SAYEGH R A, LOTERSZTAJN S. Immunoregulation of liver fibrosis: New opportunities for antifibrotic therapy[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2025, 65(1): 281-299.
- [14] LIANG H, ZHENG X, LIU Y, et al. Effects of different antiviral treatments on liver inflammation and fibrosis in patients with chronic hepatitis B[J]. J Viral Hepat, 2025, 32(4): e70019.
- [15] WAN T, ZHONG J, PAN Q, et al. Exosome-mediated delivery of Cas9 ribonucleoprotein complexes for tissue-specific gene therapy of liver diseases[J]. Sci Adv, 2022, 8(37): eabp9435.
- [16] ZHAO Q, BAI J, CHEN Y, et al. An optimized herbal combination for the treatment of liver fibrosis: Hub genes, bioactive ingredients, and molecular mechanisms [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 297: 115567.
- [17] DAN L, HAO Y, SONG H, et al. Efficacy and potential mechanisms of the main active ingredients of *Astragalus mongholicus* in animal models of liver fibrosis: A systematic review and Meta-analysis [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 319(Pt 1): 117198.
- [18] 王宁, 吕文良, 武庆娟. 茵芪三黄解毒汤对肝纤维化模型小鼠肝脏硬度及上皮间质转化的影响[J]. 中医杂志, 2023, 64(17): 1792-1798.
- WANG N, LYU W L, WU Q J. Effects of Yinqi Sanhuang Jiedu decoction on liver stiffness and epithelial-mesenchymal transition in a mouse model of hepatic fibrosis [J]. J Tradit Chin Med, 2023, 64(17): 1792-1798.
- [19] MATSUSHIMA K, SHICHINO S, UEHA S. Thirty-five years since the discovery of chemotactic cytokines, interleukin-8 and MCAF: A historical overview [J]. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2023, 99(7): 213-226.
- [20] KORBECKI J, BARCZAK K, GUTOWSKA I, et al. CXCL1: Gene, promoter, regulation of expression, mRNA stability, regulation of activity in the intercellular space [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(2): 792.
- [21] DAY R B, LINK D C. Regulation of neutrophil trafficking from the bone marrow [J]. Cell Mol Life Sci, 2012, 69(9): 1415-1423.
- [22] SHI W P, JU D, LI H, et al. CD147 promotes CXCL1 expression and modulates liver fibrogenesis[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(4): 1145.
- [23] WREE A, MCGEOUGH M D, INZAUGARAT M E, et al. NLRP3 inflammasome driven liver injury and fibrosis: Roles of IL-17 and TNF in mice [J]. Hepatology, 2018, 67(2): 736-749.
- [24] YANG S C, CHANG Z Y, HSIAO C Y, et al. Topical anti-inflammatory effects of quercetin glycosides on atopic

- dermatitis-like lesions: Influence of the glycone type on efficacy and skin absorption[J]. *Inflammation*, 2025, 48(5): 2856-2873.
- [25] HUANG P, LU X, YUAN B, et al. Astragaloside IV alleviates *E. coli*-caused peritonitis via upregulation of neutrophil influx to the site of infection[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 39: 377-382.
- [26] THIAM H R, WONG S L, WAGNER D D, et al. Cellular mechanisms of NETosis[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2020, 36: 191-218.
- [27] HUANG J, HONG W, WAN M, et al. Molecular mechanisms and therapeutic target of NETosis in diseases[J]. *Med Comm (2020)*, 2022, 3(3): e162.
- [28] HERRE M, CEDERVALL J, MACKMAN N, et al. Neutrophil extracellular traps in the pathology of cancer and other inflammatory diseases[J]. *Physiol Rev*, 2023, 103(1): 277-312.
- [29] MUTUA V, GERSHWIN L J. A review of neutrophil extracellular traps (NETs) in disease: Potential anti-nets therapeutics[J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2021, 61(2): 194-211.
- [30] XIA Y, WANG Y, XIONG Q, et al. Neutrophil extracellular traps promote MASH fibrosis by metabolic reprogramming of HSC[J]. *Hepatology*, 2025, 81(3): 947-961.
- [31] ORTEGA-RIBERA M, ZHUANG Y, BABUTA M, et al. A novel multi-organ male model of alcohol-induced acute-on-chronic liver failure reveals NET-mediated hepatocellular death, which is prevented by RIPK3 inhibition[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2025, 19(4): 101446.
- [32] 田培裕, 于泓洋, 李潇, 等. 黄芪-莪术基于 C5a/NETs 途径抑制 Lewis 肺癌小鼠肿瘤转移的机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(14): 27-36.
- TIAN P Y, YU H Y, LI X, et al. Mechanism of *Astragalus-Curcuma* in inhibiting tumor metastasis in Lewis lung cancer mice via the C5a/NETs pathway[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2024, 30(14): 27-36.
- [33] 朱艳慧, 韩德恩, 陈俭双, 等. 金花清感颗粒中抑制中性粒细胞胞外诱捕网形成活性成分的筛选与验证[J]. *中国医院药学杂志*, 2023, 43(11): 1191-1200.
- ZHU Y H, HAN D E, CHEN J S, et al. Screening and verification of active components inhibiting neutrophil extracellular traps formation in Jinhua Qinggan granules[J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2023, 43(11): 1191-1200.
- [34] WANG L, ZHANG Y L, LIN Q Y, et al. CXCL1-CXCR2 axis mediates angiotensin II -induced cardiac hypertrophy and remodelling through regulation of monocyte infiltration[J]. *Eur Heart J*, 2018, 39(20): 1818-1831.
- [35] WANG S, BAI J, ZHANG Y L, et al. CXCL1-CXCR2 signalling mediates hypertensive retinopathy by inducing macrophage infiltration[J]. *Redox Biol*, 2022, 56: 102438.
- [36] CHEN T, ZHOU Z, LIU Y, et al. Neutrophils with low production of reactive oxygen species are activated during immune priming and promote development of arthritis[J]. *Redox Biol*, 2024, 78: 103401.
- [责任编辑 周冰冰]