

· 配伍 ·

## 基于巨噬细胞极化研究“赤芍-附片”治疗慢加急性肝衰竭的作用机制

谭年花<sup>1</sup>, 曹钰楠<sup>1</sup>, 唐陈琴<sup>1</sup>, 彭杰<sup>2</sup>, 陈斌<sup>2\*</sup>

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007)

**[摘要]** 目的:研究赤芍-附片对慢加急性肝衰竭(ACLF)大鼠的治疗作用及其对M1/M2型巨噬细胞极化的影响。方法:将SD雄性大鼠随机分为正常组、模型组、乳果糖组(乳果糖 1.8 g·kg<sup>-1</sup>)、中药组(赤芍-附片 5.85 g·kg<sup>-1</sup>),每组6只。采用牛血清白蛋白皮下及尾静脉注射联合腹腔注射D-半乳糖+脂多糖急性攻击建立ACLF模型,并予以相应药物灌胃1周,空白组和模型组予以蒸馏水灌胃。利用苏木素-伊红(HE)染色观察肝组织病理变化,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)、蛋白免疫印迹法(Western blot)、免疫组化等方法比较各组大鼠肝组织CD86、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、CD206、精氨酸酶1(Arg1) mRNA和蛋白表达水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠肝组织假小叶形成,肝细胞形态变化、坏死,伴大量炎性细胞浸润,CD86、iNOS mRNA及蛋白表达均显著上调( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组肝组织坏死及炎性浸润均改善,CD86、iNOS mRNA及蛋白表达下调( $P<0.01$ ),而CD206、Arg1 mRNA及蛋白表达上调( $P<0.05, P<0.01$ ),与乳果糖组比较,中药组上调CD206、Arg1作用更优( $P<0.01$ )。结论:ACLF大鼠存在M1/M2型巨噬细胞极化失衡,失衡向M1方向偏移,赤芍-附片通过促进肝脏巨噬细胞向M2方向极化,抑制M1型巨噬细胞活化,减轻肝衰竭炎症反应。

**[关键词]** 慢加急性肝衰竭; 赤芍; 附片; 巨噬细胞极化; 炎症

**[中图分类号]** R242;R285.5;R2-031;R966;R256.4;R575.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)15-0035-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20221595

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220321.1538.022.html>

**[网络出版日期]** 2022-03-22 14:04

### Mechanism of Radix Paeoniae Rubra-Radix Aconiti Lateralis in Treatment of Acute-on-chronic Liver Failure Based on Macrophage Polarization

TAN Nianhua<sup>1</sup>, CAO Yunan<sup>1</sup>, TANG Chenqin<sup>1</sup>, PENG Jie<sup>2</sup>, CHEN Bin<sup>2\*</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the therapeutic effect of Radix Paeoniae Rubra-Radix Aconiti Lateralis on acute-on-chronic liver failure (ACLF) rats and its effect on M1/M2 macrophage polarization. **Method:** Male SD rats were randomly divided into normal group, model group, positive group (lactulose, 1.8 g·kg<sup>-1</sup>) and traditional Chinese medicine (TCM) group (Radix Paeoniae Rubra-Radix Aconiti Lateralis, 5.85 g·kg<sup>-1</sup>), six in each group. The ACLF rat model was established by subcutaneous and tail vein injection of bovine serum albumin combined with intraperitoneal injection of D-galactosamine+lipopolysaccharide. Then the modeled rats were intervened with corresponding drugs for one week. The normal group and model group were

**[收稿日期]** 2021-12-22

**[基金项目]** 湖南省自然科学基金面上项目(2020JJ4475);湖南省卫生健康委科研课题(重点课题)(202103081452);湖南省研究生科研创新项目(CX20200799);湖南省高层次卫生人才“225”工程学科带头人培养项目(湘卫函[2019]196号)

**[第一作者]** 谭年花,在读博士,从事中医药防治肝病研究,E-mail:1726018427@qq.com

**[通信作者]** \*陈斌,博士,主任医师,从事中医药防治肝病研究,Tel:0731-85369154,E-mail:chenbin0410@126.com

given the same dose of distilled water. The histopathological changes of liver tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The mRNA and protein expression levels of CD86, inducible nitric oxide synthase (iNOS), CD206 and arginase 1 (Arg1) were detected by real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR), Western blot and immunohistochemistry. **Result:** Compared with the conditions in the normal group, pseudolobule formation in liver tissue and morphological changes and necrosis of hepatocytes were observed in ACLF rats, accompanied by a large number of inflammatory cell infiltration. Moreover, the mRNA and protein expression levels of CD86, iNOS were up-regulated ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the treatment groups had improved necrosis and inflammatory infiltration of hepatocytes, down-regulated mRNA and protein expression of CD86 and iNOS ( $P < 0.01$ ) and up-regulated mRNA and protein expression of CD206 and Arg1 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), with the up regulation in the TCM group better than that in the positive group. **Conclusion:** ACLF rats had unbalanced M1/M2 macrophage polarization, and the imbalance shifted towards M1. Radix Paeoniae Rubra-Radix Aconiti Lateralis inhibited the activation of M1 macrophages and reduced the inflammatory response of liver failure by promoting the polarization of liver macrophages towards M2.

**[Keywords]** acute-on-chronic liver failure; Radix Paeoniae Rubra; Radix Aconiti Lateralis; macrophage polarization; inflammation

慢加急性肝衰竭(ACLF)是临床常见的危重肝病症候群,以凝血功能障碍、黄疸、腹水和器官严重衰竭为主要临床表现,预后差,病死率高<sup>[1]</sup>。持续性炎症反应与免疫失衡是贯穿ACLF病理生理的核心机制<sup>[2-3]</sup>,其中天然免疫失衡介导的炎症反应是肝衰竭发病的首要机制,决定了组织损伤的严重程度,严重影响机体免疫重建及患者的预后。而占全身巨噬细胞总数高达80%~90%的肝脏巨噬细胞(又称Kupffer cells)则是肝脏在面对各种病原微生物时的第一道屏障<sup>[4-5]</sup>,其M1/M2型巨噬细胞极化状态贯穿肝衰竭整个发病过程,是肝衰竭炎症级联反应的重要一环,影响疾病的进展和预后<sup>[6]</sup>。

近年来课题组所在学科在国内提出“阴阳黄”证候,创立了肝衰竭“阳黄-阴阳黄-阴黄”辨证论治模式,以及“清温并用”的中医治法,疗效确切<sup>[7]</sup>。赤芍、附片作为清温并用法中分别代表“清法”“温法”的核心药对,在临床配伍应用中具有高度代表性,分别起凉血化瘀解毒、温阳健脾之功,前期研究也表明大剂量赤芍合用附子具有减轻炎症反应、利胆退黄、免疫调节等作用,可有效拮抗肝衰竭<sup>[8]</sup>。其免疫炎症调节机制与巨噬细胞极化是否有关,需要进一步研究。因此,本研究基于赤芍-附片清温并用治法,以巨噬细胞极化为切入点,探讨其抗肝衰竭的协同作用机制,对不断完善肝衰竭中医药防治体系及清温并用的临床应用具有重要意义。

## 1 材料与方法

**1.1 动物** SPF级健康雄性SD大鼠24只,体质量130~150 g,所有大鼠皆由湖南斯莱克景达实验动物

有限公司提供,质量合格编号ZS-202103230023。大鼠饲养于湖南中医药大学动物实验中心,实验操作均遵循实验动物伦理委员会的相关规定,并接受湖南中医药大学伦理委员会的监督,伦理批号LLBH-202103160006。

**1.2 药物与试剂** 赤芍、附片均采用湖南中医药大学第一附属医院中药房,经湖南中医药大学第一附属医院药学部邓桂明研究员鉴定为道地药材,产品批号分别为2012003C、21030068S,经本单位药学部药师鉴定质量和协助制备,制备方法为称取赤芍50 g、附片15 g置于烧杯中,加入10倍量的冷水浸泡30 min后,煎煮2 h后倒出药液,再加入8倍量水煎煮1 h,2次药液混合后用双层纱布过滤,再用旋转蒸发仪浓缩药液至65 mL(药液生药含量为 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),灭菌后置4℃保存备用。乳果糖口服溶液(湖南科伦制药有限公司,批号国药准字H20093523,66.7 g/100 mL),牛血清白蛋白、D-半乳糖、脂多糖、Tris(美国Sigma公司,货号分别为A1933-5G、MB1853-1、MB5198-1、V900483),CD86、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、CD206、精氨酸酶1(Arg1)、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)一抗、辣根过氧化物酶(HRP)山羊抗鼠免疫球蛋白G(IgG)、HRP山羊抗兔IgG二抗(美国Proteintech公司,货号分别为13395-1-AP、18985-1-AP、60143-1-Ig、16001-1-AP、60008-1-Ig、SA00001-1、SA00001-2),RIPA裂解液(中国上海碧云天生物技术有限公司,货号P0013B),SuperECL Plus超敏发光液(美国Advansta公司,货号K-12045-D50),mRNA逆转录试剂盒、

miRNA 逆转录试剂盒、UltraSYBR Mixture、DM2000 Plus DNA Marker(中国北京康为世纪公司,货号分别为CW2569、CW2141、CW2601、CW0632),TRIzol 试剂盒(美国 Thermo 公司,货号15596026),苏木素、伊红、枸橼酸盐缓冲液(中国上海威奥生物科技有限公司,货号分别为WH1144、WH2144、WH2007),核酸染料、脱脂奶粉、蛋白磷酸酶抑制剂(中国北京普利莱生物公司,货号分别为PB11141、P1622、P1260),十二烷基硫酸钠(SDS,中国大连美伦生物技术有限公司,货号为MB2479),丙烯酰胺、蛋白酶抑制剂(中国北京金泰宏达生物科技有限公司,货号分别为0341、583794)。

**1.3 仪器** PIKOREAL96型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time RCP)仪、SPL0960型荧光PCR板(美国 Thermo 公司),DYY-2C型电泳仪、DYCP-31DN型水平琼脂糖电泳槽、DYCZ-40D型转膜仪、DYY-6C型恒温箱(中国北京六一仪器厂),TS-1型摇床(中国江苏其林贝尔仪器制造有限公司),H1650R型台式冷冻离心机(中国湖南湘仪集团),DHP-500型电热恒温培养箱(北京市永光明医疗仪器有限公司),YD-315型切片机(中国浙江金华益迪医疗设备有限公司),BMJ-A型包埋机(中国常州中威电子仪器有限公司),BA210T型显微镜(北京 Motic 公司)。

**1.4 动物造模** 构建 ACLF 大鼠模型。先采用牛血清白蛋白乳化液 0.5 mL(含牛血清白蛋白 4 mg)皮下多点注射致敏,注射 4 次,分别间隔 14、10、10 d;然后联合尾静脉注射牛血清白蛋白攻击建立免疫性肝纤维化大鼠模型,2 次/周,初始含量为 2 mg/次,依次递加 0.5 mg/次,达 4 mg/次后维持此剂量,共注射 12 次,为期 6 周;最后在第 6 周末,通过腹腔注射 D-半乳糖+脂多糖(D-半乳糖 600 mg·kg<sup>-1</sup>,脂多糖 100 μg·kg<sup>-1</sup>)急性攻击,构建 ACLF 大鼠模型。急性攻击 8 h 后予以 10% 水合氯醛进行腹腔注射麻醉(0.4 mL/100 g)并采集肝组织样本。

**1.5 分组与给药** 将 24 只大鼠随机分为正常组、模型组、阳性对照组(乳果糖组)、中药组,每组 6 只。按人与大鼠体表面积关系换算出大鼠每日中药等效剂量,得出大鼠日用等效剂量为 5.85 g·kg<sup>-1</sup>。乳果糖组予以乳果糖灌胃,计算大鼠日用等效剂量为 1.8 g·kg<sup>-1</sup>。在造模期间尾静脉注射的第 6 周开始进行药物灌胃干预,2 次/d,持续至急性攻击前。

## 1.6 观察检测

**1.6.1 HE 染色观察肝组织病理变化** 分离大鼠肝

脏,取各组大鼠同一位置约 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 大小的肝组织,石蜡包埋后制片。60 °C 烤片 12 h;将烤制好的切片分别置于二甲苯和不同浓度乙醇中脱蜡至水,蒸馏水浸洗 5 min;苏木素染 1 min,冲洗后磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2~7.6)返蓝;伊红染 0.5 min 后冲洗;梯度乙醇(95%~100%)脱水;取出后置于二甲苯 10 min,2 次,中性树胶封片。显微镜下观察并取片。

**1.6.2 Real-time PCR 检测 CD86、iNOS、CD206、Arg1 的 mRNA 表达** 取适量肝组织充分研磨匀浆,混匀后裂解 5 min;加入三氯甲烷并振荡 15 s 后室温静置 3 min;12 000 r·min<sup>-1</sup>,4 °C 离心 15 min(离心半径 10 cm,下同)后取上层液相转移到 RNase-Free 离心管中;加入等体积异丙醇并室温静置 10 min 后离心去上清;加入无菌 DEPC 处理水配制的 75% 乙醇洗涤沉淀,离心去上清;空气干燥 5~10 min 后溶解沉淀;紫外分光光度计于 260 nm 与 280 nm 处测其吸光度值 A,计算浓度跟纯度。以组织总 mRNA 为模板,逆转录 cDNA。以逆转录产物 cDNA 为模板进行定量 PCR 扩增实验,扩增程序为 95 °C 反应 10 min,95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 30 s,共循环 40 次。依据原始检测结果,运用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法计算 mRNA 的相对表达量。引物于美国国家生物技术信息中心(NCBI)上搜索目的基因的序列,运用 Primer 5 软件设计,由北京擎科合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
CD86	上游 AGCAAGGATACCCGAAAC	127
	下游 GATAGGCTGATGGAGACACT	
iNOS	上游 TTCAGCTACGCCTTCAACACC	109
	下游 CTCCATTGCCAAATGTGCTTG	
CD206	上游 ACACACTGGAACGCTGACAT	79
	下游 CCCATAAACCACCTGCCACT	
Arg1	上游 CATATCTGCCAAGGACATCGT	135
	下游 TCCATCACTTTGCCAATTCCC	
β-actin	上游 ACATCCGTAAGACCTCTATGCC	223
	下游 TACTCCTGCTTGCTGATCCAC	

**1.6.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝组织 CD86、iNOS、CD206、Arg1 的蛋白表达** 剪取适量肝组织 PBS 洗涤后加入 RIPA 裂解液,于生物样品均质仪中充分研磨后至于冰上裂解 10 min;12 000 r·min<sup>-1</sup>,4 °C 离心 15 min 后取上清。配制

10%分离胶和4.8%浓缩胶和准备蛋白上清,测定蛋白浓度;根据蛋白定量的结果,第1孔点入Marker 2  $\mu\text{L}$ ,其他每孔上样10  $\mu\text{L}$ 已变性蛋白,开始电泳(75 V, 130 min);300 mA恒定电流转膜(CD86, 85 min; iNOS, 145 min; CD206, 150 min; Arg1, 51 min; $\beta$ -actin, 60 min),PBST洗膜3次,5%脱脂奶粉封闭90 min;封闭稀释相应的一抗(CD86, 1:1 000; iNOS, 1:1 000; CD206, 1:2 000; Arg1, 1:1 000; $\beta$ -actin, 1:5 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,次日室温放置30 min, PBST洗3次;将稀释后的二抗(HRP山羊抗鼠IgG, 1:5 000; HRP山羊抗兔IgG, 1:6 000)与膜共同室温孵育90 min, PBST洗3次;加入ECL化学发光液与膜孵育1 min,凝胶成像系统成像,显影冲洗。使用Quantity One专业灰度分析软件进行分析。

**1.6.4 免疫组化法检测 CD86、iNOS、CD206、Arg1 的蛋白定位和表达** 60 $^{\circ}\text{C}$ 烤片12 h;切片脱蜡至水;枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)热修复抗原,冷却后PBS洗涤3次;加入1%高碘酸灭活内源性酶10 min, PBS洗涤3次;孵育一抗:滴加适当稀释的一抗(CD86、iNOS、CD206、Arg-1 1:200),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, PBS洗涤3次;37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育二抗30 min, PBS洗涤3次;DAB显色,蒸馏水洗涤;苏木素复染5~10 min,蒸馏水冲洗,返蓝;梯度乙醇脱水后置于二甲苯10 min, 2次,中性树胶封片、显微镜观察。

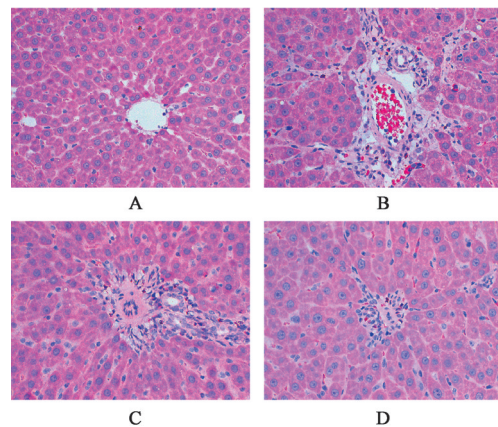
**1.7 统计学方法** 所有数据采用SPSS 25.0 进行统计分析处理,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行多组间比较,各组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD)检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 赤芍-附片对 ACLF 大鼠肝组织病理学的影响

正常组可见大鼠肝脏表面光滑,切片显示肝细胞结构完整,肝小叶结构清晰,肝细胞围绕中央静脉呈放射状排列、未见变形坏死、纤维增生及炎性细

胞浸润。模型组可见大鼠肝脏表面粗糙,可见颗粒状结节,切片显示肝细胞形态变化,呈融合性坏死、桥接坏死,多发性假小叶形成,部分假小叶结构不清,伴大量炎性细胞浸润。乳果糖组及中药组切片显示肝细胞坏死程度较模型组减轻,大多呈点灶状,肝小叶结构破坏程度减轻,汇管区仅见少量炎性细胞浸润,以中药组肝组织坏死及炎性浸润改善更为显著。见图1。



注:A. 正常组;B. 模型组;C. 乳果糖组;D. 中药组(图2-图4同)

图1 赤芍-附片对大鼠肝组织病理的影响(HE,  $\times 400$ )

Fig. 1 Effect of Radix Paeoniae Rubra-Radix Aconiti Lateralis on liver histopathology of ACLF rats (HE,  $\times 400$ )

### 2.2 赤芍-附片对 ACLF 大鼠 CD86、iNOS、CD206、Arg1 mRNA 表达水平的影响

与正常组比较,模型组 M1 型巨噬细胞标志物 CD86、iNOS 和 M2 型巨噬细胞标志物 CD206、Arg1 mRNA 表达均上调,其中 CD86、iNOS 差异具有统计学意义( $P<0.01$ );与模型组比较,乳果糖组和中药组 CD86、iNOS mRNA 表达下调( $P<0.01$ ),而 CD206、Arg1 mRNA 表达上调( $P<0.01$ );与乳果糖组比较,中药组下调 CD86、iNOS mRNA 的作用弱于乳果糖组( $P<0.01$ ),而上调 CD206、Arg1 mRNA 的作用优于乳果糖组( $P<0.01$ )。见表2。

表2 赤芍-附片对各组大鼠肝组织 CD86、iNOS、CD206、Arg1 mRNA 表达水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 2 Effect of Radix Paeoniae Rubra-Radix Aconiti Lateralis on expression levels of CD86, iNOS, CD206 and Arg1 mRNA in liver tissues of each group rats ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	CD86	iNOS	CD206	Arg1
正常组		1.13±0.09	0.70±0.24	1.14±0.12	1.28±0.42
模型组		3.55±0.30 <sup>1)</sup>	2.37±0.43 <sup>1)</sup>	1.84±0.32	2.59±0.94
乳果糖组	1.8	1.62±0.54 <sup>3)</sup>	1.17±0.32 <sup>3)</sup>	2.83±0.75 <sup>2)</sup>	5.55±1.20 <sup>3)</sup>
中药组	5.85	2.82±0.41 <sup>3,4)</sup>	1.60±0.28 <sup>3,4)</sup>	4.96±0.93 <sup>3,4)</sup>	8.50±2.31 <sup>3,4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ ,<sup>3)</sup> $P<0.01$ ;与乳果糖组比较<sup>4)</sup> $P<0.01$ (表3和表4同)

**2.3 赤芍-附片对 ACLF 大鼠 CD86、iNOS、CD206、Arg1 蛋白表达量的影响** 与正常组比较,模型组 M1 型巨噬细胞标志物 CD86、iNOS 和 M2 型巨噬细胞标志物 CD206、Arg1 蛋白表达量均显著上调 ( $P<0.01$ );与模型组比较,乳果糖组和中药组 CD86、iNOS 蛋白表达量下调 ( $P<0.01$ ),而 CD206、Arg1 蛋白表达量上调 ( $P<0.05, P<0.01$ );与乳果糖组比较,中药组在下调 CD86、iNOS 方面弱于乳果糖组,而上调 CD206、Arg1 方面优于乳果糖组,但差异无统计学意义。见图 2,表 3。

**2.4 赤芍-附片对 ACLF 大鼠 CD86、iNOS、CD206、Arg1 蛋白定位和表达量的影响** 免疫组化法检测结果显示,CD86、CD206 表达于细胞膜中,iNOS、Arg1 表达于细胞浆中。与正常组比较,模型组 M1 型巨噬细胞标志物 CD86、iNOS 和 M2 型巨噬细胞标志物 CD206、Arg1 蛋白表达量均上调,其中 CD86、iNOS 差异具有统计学意义 ( $P<0.01$ );与模型组比较,乳果糖组和中药组 CD86、iNOS 蛋白表达量

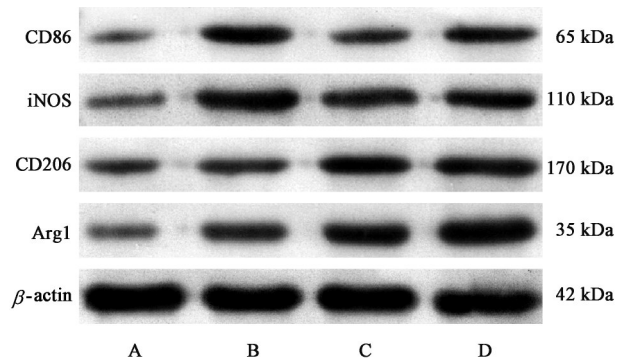


图 2 各组大鼠肝组织 CD86、iNOS、CD206、Arg1 蛋白表达电泳  
Fig. 2 Electrophoresis of CD86, iNOS, CD206 and Arg1 protein in liver tissue of rats in each group

下调 ( $P<0.05$ ),而 CD206 蛋白表达量上调 ( $P<0.05, P<0.01$ ),Arg1 蛋白表达有上调趋势,但差异无统计学意义;与乳果糖组比较,中药组在下调 CD86、iNOS 方面弱于乳果糖组,而上调 CD206、Arg1 方面优于乳果糖组,其中 CD206 差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。见图 3 和图 4,表 4。

表 3 赤芍-附片对各组大鼠肝组织 CD86、iNOS、CD206、Arg1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 3 Effect of Radix Paeoniae Rubra-Radix Aconiti Lateralis on CD86, iNOS, CD206 and Arg1 protein expression in liver tissue of rats in each group ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	CD86/ $\beta$ -actin	iNOS/ $\beta$ -actin	CD206/ $\beta$ -actin	Arg1/ $\beta$ -actin
正常组		0.16±0.03	0.18±0.05	0.19±0.05	0.20±0.05
模型组		0.59±0.14 <sup>1)</sup>	0.54±0.12 <sup>1)</sup>	0.34±0.06 <sup>1)</sup>	0.40±0.06 <sup>1)</sup>
乳果糖组	1.8	0.34±0.02 <sup>3)</sup>	0.31±0.08 <sup>3)</sup>	0.46±0.07 <sup>3)</sup>	0.51±0.07 <sup>2)</sup>
中药组	5.85	0.40±0.02 <sup>3)</sup>	0.41±0.09 <sup>2)</sup>	0.51±0.06 <sup>3)</sup>	0.57±0.08 <sup>3)</sup>

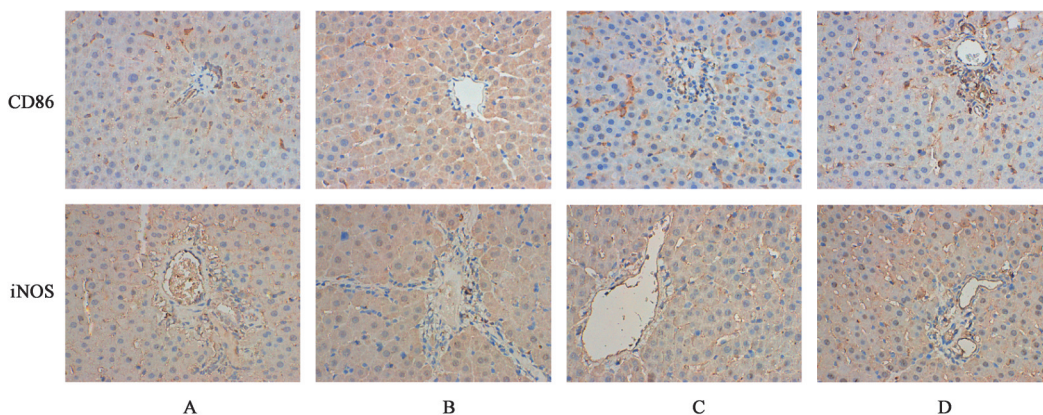


图 3 赤芍-附片对各组大鼠肝组织 CD86、iNOS 免疫组化的影响 (免疫组化,×400)

Fig. 3 Effect of Radix Paeoniae Rubra-Radix Aconiti Lateralis on immunohistochemistry of CD86 and iNOS in liver tissue of rats in each group (IHC,×400)

### 3 讨论

慢加急性肝衰竭发病以身目黄染为主要症状,故中医学将其归属于“瘟黄”“急黄”范畴,中医辨证以阴阳为纲的认识基本达成共识,病机特点为湿热

血瘀兼脾虚,属正虚邪实,三者通过不同阶段病理因素的侧重贯穿了疾病的整个过程,中医证型是从阳黄到阴黄的渐进演变过程<sup>[9-10]</sup>,与西医学中所认为的肝衰竭发病后依次经受免疫损伤、缺血缺氧和

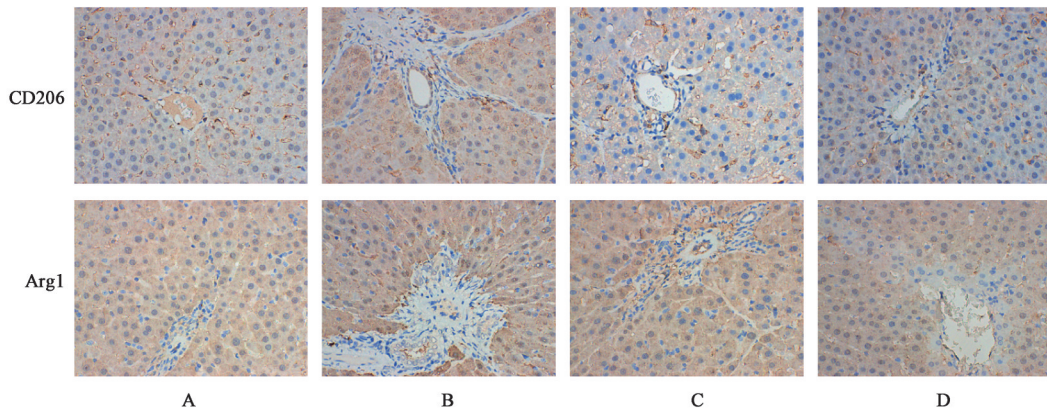


图4 赤芍-附片对各组大鼠肝组织CD206、Arg1免疫组化的影响(免疫组化,×400)

Fig. 4 Effect of Radix Paeoniae Rubra-Radix Aconiti Lateralis on immunohistochemistry of CD206 and Arg1 in liver tissue of rats in each group (IHC, ×400)

表4 赤芍-附片对各组大鼠肝组织CD86、iNOS、CD206、Arg1免疫组化的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 4 Effect of Radix Paeoniae Rubra-Radix Aconiti Lateralis on immunohistochemistry of CD86, iNOS, CD206 and Arg1 in liver tissues of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	CD86	iNOS	CD206	Arg1
正常组		0.015 9±0.004 2	0.016 4±0.003 3	0.020 4±0.008 8	0.057 1±0.004 2
模型组		0.040 0±0.014 0 <sup>1)</sup>	0.040 0±0.008 1 <sup>1)</sup>	0.020 6±0.007 6	0.072 6±0.004 9
乳果糖组	1.8	0.020 4±0.005 8 <sup>2)</sup>	0.022 8±0.009 6 <sup>2)</sup>	0.033 9±0.007 2 <sup>2)</sup>	0.082 0±0.013 3
中药组	5.85	0.023 5±0.009 3 <sup>2)</sup>	0.027 4±0.013 4 <sup>2)</sup>	0.047 9±0.012 4 <sup>3,4)</sup>	0.109 6±0.042 0 <sup>2)</sup>

内毒素血症三重打击的病理机制基本符合<sup>[11]</sup>。肝衰竭初期和进展期,病情急,机体免疫功能亢进,介导肝组织炎症反应;后期免疫功能进一步紊乱,免疫抵抗功能低下,以内毒素介导的炎症反应为主,诱导并使先天免疫处于持续活化状态,导致抗炎/促炎因素失衡<sup>[2,12]</sup>,这种持续性炎症反应与免疫失衡是贯穿肝衰竭病理生理的核心机制,严重影响机体免疫重建及患者的预后。因此,积极寻找有效的中医药帮助减轻肝衰竭炎症反应及促进重建免疫的方法是当前研究的重点<sup>[13]</sup>。

巨噬细胞主要表现为经典活化的M1型和替代活化的M2型,M1型巨噬细胞主要由脂多糖(LPS)单独或与 $\gamma$ 干扰素(IFN- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )等协同诱导活化,分泌表达CD86、iNOS、TNF- $\alpha$ 、白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6等促炎因子;M2型巨噬细胞由IL-4、IL-13、IL-10、转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )等诱导活化,分泌表达Arg1、CD206、IL-10等抗炎因子<sup>[14]</sup>。巨噬细胞作为肝衰竭先天免疫应答中炎症瀑布效应的激活点,一旦被激活,则呈现M1/M2型巨噬细胞极化状态,分泌大量促炎/抗炎因子,导致机体免疫炎症失控,与病情进展与否息息相关。相关研究表明,通过诱导肝脏和外周血中的巨噬细胞/单核细胞表型从M1型向M2型转变,

能保护肝脏免受缺血再灌注损伤<sup>[15]</sup>。在硫代乙酰胺(TAA)诱导的急性肝损伤模型中,精胺(SPM)通过抑制肝脏巨噬细胞向M1极化,促进肝脏巨噬细胞向M2极化,抑制促炎因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和iNOS的表达,促进抗炎因子IL-10表达,减轻急性肝损伤<sup>[16]</sup>。本研究从肝衰竭病理机制出发,联动中医辨证,基于清温并用治法采用其临床常用经典药对赤芍-附片干预治疗,研究赤芍-附片对肝衰竭巨噬细胞极化的影响,也符合肝衰竭虚实夹杂的中医证候学特征。

研究结果显示,在ACLF大鼠模型中,肝脏巨噬细胞免疫状态处于活化状态,M1型巨噬细胞标志物CD86、iNOS与M2型巨噬细胞标志物Arg1、CD206基因及蛋白表达均较正常大鼠明显上调,以CD86、iNOS上调明显,表现为以M1型为主的促炎状态,说明ACLF大鼠存在M1/M2极化失衡。一项关于单核/巨噬细胞在肝衰竭中的作用及调节机制研究也发现在肝衰竭早期外周血炎症性单核细胞亚群在总单核细胞中的比例逐渐增高,肝脏巨噬细胞表达促炎因子水平也增高,主要呈现促炎活化状态<sup>[17]</sup>,二者结论基本一致。而经过乳果糖及赤芍、附片干预后的ACLF大鼠,CD86、iNOS表达下调,而Arg1、CD206表达继续上调,说明乳果糖及赤芍、

附片具有抑制肝脏巨噬细胞向M1型极化,促进巨噬细胞向M2型极化的作用。同时研究也发现,赤芍、附片干预组在下调CD86、iNOS方面弱于乳果糖组,而上调CD206、Arg1方面优于乳果糖组,提示乳果糖的抗炎作用与促进产生肠道氢气,通过氧化还原作用抑制炎症因子及肠源性内毒素入血<sup>[18]</sup>,进而抑制M1巨噬细胞诱导活化有关,而赤芍、附片则倾向于增强机体自生抗炎效应,通过调节免疫平衡间接抑制机体过度的炎症反应。

综上所述,持续性炎症反应及免疫失衡是肝衰竭的关键病理环节,肝脏巨噬细胞作为肝衰竭先天免疫应答炎症瀑布效应中的主要成员,在肝衰竭的发病机制中发挥了重要作用<sup>[19]</sup>。研究也证实ACLF大鼠存在明显的M1/M2型巨噬细胞极化失衡,失衡向M1方向偏移,赤芍、附片通过促进肝脏巨噬细胞向M2方向极化,抑制M1型巨噬细胞激活,可以有效改善肝衰竭炎症反应。这一免疫学调控机制,为肝衰竭免疫重建及炎症反应控制的研究提供了新视角和新思路,对促进中医药在肝衰竭的治疗与应用中具有一定意义。但其具体调控机制及发挥作用的主要有效组分有待进一步深入探索,也是课题组下一步研究的重点研究方向。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组,中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊治指南(2018年版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(1):38-44.
- [2] SARIN S K, CHOUDHURY A. Acute-on-chronic liver failure: Terminology, mechanisms and management [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016, 13(3): 131-149.
- [3] LI Q, WANG J, LU M, et al. Acute-on-chronic liver failure from chronic-hepatitis-B, who is the behind scenes[J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 583423.
- [4] LI L, ZENG Z. Live imaging of innate and adaptive immune responses in the liver [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 564768.
- [5] 周顺. 巨噬细胞免疫应答调控在急性肝损伤中的作用及机制研究[D]. 南京:南京医科大学, 2019.
- [6] NIELSEN M C, HVIDBJERG GANTZEL R, CLÀRIA J, et al. Macrophage activation markers, CD163 and

CD206, in acute-on-chronic liver failure [J]. *Cells*, 2020, 9(5):1175.

- [7] 陈斌,丁秀丽,彭杰,等. 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- $\gamma$ t 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(2): 19-25.
- [8] 黄裕红,陈斌. 重用赤芍、附子治疗慢性重型乙型肝炎 98 例[J]. 中国中医急症, 2010, 19(6): 1030-1031.
- [9] 中国中西医结合学会. 慢加急性肝衰竭中西医结合诊疗专家共识[J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(9): 2045-2053.
- [10] 彭杰,陈斌,孙克伟,等. 慢性乙型肝炎"湿热-血瘀-脾虚"证候分布与演变特点的回顾性分析[J]. 中西医结合肝病杂志, 2011, 21(3): 135-138.
- [11] 黄湛镰,高志良. 肝衰竭的三重打击及治疗策略[J]. 内科急危重症杂志, 2014, 20(3): 154-156.
- [12] KRENKEL O, TACKE F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(5): 306-321.
- [13] 张耿林,高志良. 探索乙型肝炎相关慢加急性肝衰竭免疫调节治疗的新思路[J]. 中国病毒病杂志, 2019, 9(1): 1-5.
- [14] YUNNA C, MENGRU H, LEI W, et al. Macrophage M1/M2 polarization [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 877: 173090.
- [15] XIE Y, ZHAO D, DONG P, et al. Macrophage-targeting Fasudil treatment protects liver from the ischemia/reperfusion injury by promoting M2 macrophage polarization [J]. *Biosci Rep*, 2018, doi: 10. 1042/BSR20171734.
- [16] ZHOU S, GU J, LIU R, et al. Spermine alleviates acute liver injury by inhibiting liver-resident macrophage pro-inflammatory response through ATG5-dependent autophagy [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 948.
- [17] 阳乔. 单核/巨噬细胞在肝衰竭中的作用及调节机制研究[D]. 杭州:浙江大学, 2013.
- [18] 刘刚,江宇,陈迎晓. 口服乳果糖治疗急性及亚急性肝衰竭的疗效观察与机制探讨[J]. 保健医学研究与实践, 2014, 11(2): 34-36.
- [19] KHANAM A, KOTILIL S. Abnormal innate immunity in acute-on-chronic liver failure: immunotargets for therapeutics [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 2013.

[责任编辑 王鑫]