

加味四逆汤抗免疫性肝损伤的作用机制

杨辉¹, 陈梨², 张奉学³, 刘妮³, 李向阳³, 赵昉³

(1. 广州医科大学第一附属医院中医科, 广州 510120; 2. 广州医科大学, 广州 510120;
3. 广州中医药大学病毒研究所, 广州 510120)

[摘要] **目的:**研究加味四逆汤保护免疫性肝损伤和 T 淋巴细胞在其中的作用。**方法:**将健康雌性 NIH 小鼠 50 只, 随机分为 5 组: 正常对照组、刀豆蛋白 A (Con A) 模型组、联苯双酯组 (LB, 150 mg·kg⁻¹)、加味四逆汤高、低剂量 (120, 240 mg·kg⁻¹) 组。所有的小鼠均经尾静脉注射 Con A (18 mg·kg⁻¹) 来建立急性免疫性肝损伤动物模型, 在造模成功 12 h 后摘取小鼠眼球采血。通过流式细胞术测定全血中 CD4⁺, CD8⁺ T 细胞亚群, 并以酶联免疫 (ELISA) 法测定血清中天冬氨酸转氨酶 (AST)、丙氨酸转氨酶 (ALT) 的活性和肿瘤坏死因子- α (TNF- α), γ -干扰素 (IFN- γ) 和白介素-10 的水平。**结果:**模型组小鼠血清 ALT, AST 活性和 TNF- α , IFN- γ 水平明显高于正常组 ($P < 0.01$), 全血中 CD4⁺, CD8⁺ 比率较正常对照组明显下降 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 加味四逆汤高、低剂量组均能降低 Con A 介导的肝损伤小鼠血清中 AST, ALT 的活性 ($P < 0.05$), 剂量组间差异无统计学意义; 且能明显降低模型组血清中已升高的炎症细胞因子 IFN- γ , TNF- α 的含量 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而提高肝损伤中已经降低的抗炎因子 IL-10 的活性和 T 细胞亚群 CD4⁺, CD8⁺ 的比率 ($P < 0.05$)。**结论:**加味四逆汤对免疫性肝损伤具有保护作用, 其作用机制可能通过调整 T 细胞亚群的活性、减少炎症细胞因子和增加抗炎细胞因子的释放有关。

[关键词] 加味四逆汤; 刀豆蛋白 A; 免疫性肝损伤; T 淋巴细胞亚群

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0138-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190138

Role and Mechanism of Modified Sini Decoction Against Immunological Liver Injury in Mice

YANG Hui¹, CHEN Li², ZHANG Feng-xue³, LIU Ni³, LI Xiang-yang³, ZHAO Fang³

(1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Department of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China; 2. Guangzhou Medical College, Guangzhou 510120, China;
3. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Department of Virus Research Institute, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] **Objective:** To observe protective effect of Modified Sini decoction on immunological liver injury in mice induced by concanavalin A (Con A) and the role of T lymphocyte subsets in which. **Method:** The mouse were randomly divided into normal saline (NS) group, Con A group, bifendate group (LB, 150 mg·kg⁻¹), Modified Sini decoction low, high dosage group (120, 240 mg·kg⁻¹). All groups, except for the NS group, were given Con A aqueous solution (18 mg·kg⁻¹) via tail vein injection 1 hour after drug administration at d1 and d3, peripheral blood was collected 12 h after Con A was injected. The percentage of T lymphocyte subsets CD4⁺, CD8⁺ cells were detected in plasma by a flow cytometer, using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determination the serum cytokines: interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin (IL) -10 and activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST). **Result:** The activity of AST and ALT of Modified Sini decoction treatment groups significantly dropped in mice of

[收稿日期] 20140320(015)

[基金项目] 广东省科技厅项目(2012B061700043;20098030801356)

[第一作者] 杨辉, 博士, 主任医师, Tel:13682292280, E-mail:doctor_yh@163.com

Con A-mediated liver injury; SND-treated groups could significantly reduced the liver injury model group had elevated inflammatory cytokines IFN- γ or TNF- α level ($P < 0.05$, $P < 0.01$); Modified Sini decoction groups could improve the liver injury model group had lowed T- cell subsets CD4⁺, CD8⁺ rate ($P < 0.05$). **Conclusion:** Modified Sini decoction is effective in protecting immunological liver injury in mice induced by Con A and this mechanism maybe closely associated with its action in regulating the T- cell subsets and in reducing the inflammatory cytokines.

[Key words] Modified Sini decoction; concanavalin-A; immunological liver injury; T lymphocyte subsets

免疫反应在乙型肝炎发病中的作用越来越受到重视,目前研究认为,T淋巴细胞及其分泌的细胞因子是乙型肝炎病毒感染后引起肝细胞损害的主要致病机制^[1]。四逆汤是《伤寒论》中的经典方,具有回阳救逆之功效,现代关于四逆汤在治疗心、脑血管疾病等方面进行了大量的实验研究,其效果确切^[2];同时朱新华等^[3]研究发现四逆汤可使环磷酰胺所致巨噬细胞吞噬功能的降低恢复至正常水平从而证明了其免疫调节方面的作用,而四逆汤对肝脏疾病方面的实验研究却鲜见报导。因此本课题根据《伤寒论》及近代医家郑钦安的扶阳理论,以阴阳为纲,以阳为主导,在四逆汤原方基础上加入山茱萸等具有补益肝肾的中药构成加味四逆汤,应用此方的免疫调节功能,建立小鼠刀豆蛋白A(Con A)肝损伤实验动物模型,采用流式细胞术及ELISA法对加味四逆汤抗肝损伤作用中T淋巴细胞亚群活性的变化及其细胞因子的作用做一初步探讨,为临床上加味四逆汤治疗肝炎提供实验理论基础。

1 材料

1.1 动物 SPF级NIH雌性小鼠50只,体重18~20g,4~5周龄,购自广东省实验动物中心,生产许可证号SCXK(粤)2008-0002,正常饲养1d后待用。

1.2 药物和试剂 加味四逆汤(附子30g,干姜15g,甘草15g,山萸肉10g)购于广州医科大学第一附属医院,于广州中医药大学实验室用水煎煮2次,合并提取液后加热浓缩至1g·mL⁻¹,储存于-20℃备用,实验时用蒸馏水稀释至所需浓度。联苯双酯滴丸(北京协和药厂,批号H-11020980),Con A(Sigma公司,批号C-8110,使用时溶于0.9%生理盐水注射液),小鼠丙氨酸转氨酶(AST),天冬氨酸转氨酶(ALT)酶联免疫检测试剂盒,小鼠白介素10(IL-10)ELISA试剂盒,小鼠干扰素- γ (INF- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)试剂盒(均为上海京津生物科技有限公司);Per cp-CD3⁺,FITC-CD4⁺,PE-CD8⁺单克隆抗

体(美国Bio Legend,批号C-400617,100405,100707);RBC Lysis buffer(美国Bio Legend,批号C-420301)。

1.3 仪器 EL800型自动酶标检测仪(美国保特),22R型冷冻高速离心机(德国Heraeus公司),FACS BD型流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司)。

2 方法

2.1 动物分组 小鼠50只,随机分为5组:正常对照组,Con A模型组,Con A+联苯双酯组(150mg·kg⁻¹),Con A+加味四逆汤低、高剂量组(120,240mg·kg⁻¹)剂量组,每组10只。

2.2 造模 参照Tiegs和李常青等的造模方法^[4-5],正常组给予生理盐水尾静脉注射,其余于实验首日给予Con A 18mg·kg⁻¹尾静脉注射,阳性对照组每日ig给予联苯双酯混悬液150mg·kg⁻¹,中药高、低剂量组每日分别ig给予240,120mg·kg⁻¹加味四逆汤悬液,正常对照组和模型对照组每日ig给同体积生理盐水,每日1次,连续3d,末次给药后4h,再次尾静脉注射Con A 18mg·kg⁻¹。所有的小鼠均禁食12h后全部动物摘眼球取全血,其中一部分放入EDTA-Na₂抗凝管内,另一部分离心(3000r·min⁻¹,离心10min)取血清-20℃冻存备用。

2.3 血清ALT和AST测定 根据ALT和AST测定试剂盒说明书进行测定,查标准曲线,求得相应的ALT和AST活力(U·mL⁻¹)。

2.4 小鼠血清细胞因子含量的测定 取血清以ELISA方法分别检测TNF- α ,INF- γ 和IL-10。分别向TNF- α ,INF- γ ,IL-10单抗包被的96孔板样本孔中加入样本稀释液40 μ L和待检样本50 μ L,并设空白对照和对照品孔。各对照品操作步骤按试剂盒说明进行。终止反应后即酶标仪均于450nm处测定相应的吸光度(A)。绘制标准曲线,根据标准曲线方程求得样品值(ng·L⁻¹)。

2.5 小鼠外周血中CD4⁺,CD8⁺比率的测定 向

流式细胞管内加入抗 CD4-PE 2 μL、抗 CD8-FITC1 μL、抗 CD3-Per CP 单克隆抗体 2 μL,混匀;取 60 μL 抗凝全血加入流式管内,混匀后,置 4 ℃ 避光反应 30 min;在各管内加入稀释致工作浓度的溶血素 1 mL,混匀,室温避光反应 5 min;加入 PBS 液 2 mL,室温下 1 500 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃上清;加入 0.5 mL 的 PBS 重悬细胞沉淀并充分混匀,4 ℃ 避光保存,24 h 内上机检测。另取 3 管 60 μL 正常小鼠抗凝血,分别加入 2 μL Per cp-CD3⁺,2 μL FITC-CD4⁺ 和 1 μL PE-CD8⁺ 作为对照。每份标本检测 15 000 个淋巴细胞,采用 CELL Quest 软件测定和分析结果。

2.6 统计学分析 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 SPSS 17.0 软件进行统计分析,计量资料两组间比较用 *t* 检验,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法检验,统计前均对各组数据进行正态性检验和方差齐性检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对免疫性肝损伤小鼠 ALT,AST 水平的影响 模型组小鼠 ALT,AST 水平明显高于正常组,与正常组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.01$),表明实验造模成功;与模型组比较,联苯双酯组和加味四逆汤组能不同水平减低转氨酶水平 ($P < 0.05$),说明加味四逆汤高、低剂量组能降低免疫性肝损伤小鼠 ALT 和 AST 活性。见表 1。

表 1 加味四逆汤对免疫性肝损伤小鼠血清 ALT,AST 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	ALT /U·L ⁻¹	AST /U·L ⁻¹
正常对照	-	48.40 ± 4.36	141.29 ± 12.09
模型	-	73.99 ± 2.38 ¹⁾	195.54 ± 9.39 ¹⁾
联苯双酯	150	64.85 ± 3.26 ²⁾	171.65 ± 3.80 ²⁾
加味四逆汤	240	60.91 ± 4.27 ³⁾	168.69 ± 6.60 ³⁾
	120	61.24 ± 3.52 ³⁾	168.48 ± 19.50 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$,³⁾ $P < 0.05$ (表 2~3 同)。

3.2 对 TNF-α,IFN-γ 和 IL-10 分泌的影响 模型组 TNF-α,IFN-γ 明显高于正常对照组 ($P < 0.01$);联苯双酯组和不同剂量加味四逆汤组相比,模型组小鼠 TNF-α,IFN-γ 分泌明显降低 ($P < 0.01$)。而血清 IL-10 含量模型组较正常组明显减低 ($P < 0.01$);联苯双酯组与模型组比较 IL-10 活性提高 ($P < 0.01$);加味四逆汤各剂量组作用于肝损伤小鼠后,

IL-10 的含量较模型组也显著提高 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 加味四逆汤对免疫性肝损伤小鼠 TNF-α,IFN-γ 和 IL-10 分泌的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量 /mg·kg ⁻¹	IFN-γ /ng·L ⁻¹	TNF-α /ng·L ⁻¹	IL-10 /ng·L ⁻¹
正常对照	-	355.1 ± 17.4	275.1 ± 15.7	414.0 ± 80.4
模型	-	443.4 ± 36.1 ¹⁾	316.1 ± 19.5 ¹⁾	274.9 ± 14.5 ¹⁾
联苯双酯	150	343.3 ± 15.8 ³⁾	245.8 ± 20.4 ²⁾	338.9 ± 36.2 ²⁾
加味四逆汤	240	331.9 ± 14.4 ³⁾	263.1 ± 15.3 ³⁾	325.5 ± 37.8 ³⁾
	120	335.6 ± 10.6 ³⁾	227.3 ± 915.3 ³⁾	325.5 ± 36.2 ³⁾

3.3 对免疫性肝损伤小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群 CD4⁺,CD8⁺ 比率的影响 由表 3 中可知模型组小鼠全血中 CD4⁺,CD8⁺ 比率较正常对照组明显下降,与正常组比较差异有显著性 ($P < 0.05$);与模型组比较,加味四逆汤各剂量组和联苯双酯组能引起小鼠全血 CD4⁺,CD8⁺ 比率明显升高 ($P < 0.05$),说明加味四逆汤能明显上调在免疫性肝损伤中已经明显降低的小鼠全血中 CD4⁺,CD8⁺ 比率,即提高外周血 T 淋巴细胞亚群的比率,减少其向肝脏的浸润,从而减小其细胞毒性作用对肝细胞的损伤。

表 3 加味四逆汤对免疫性肝损伤小鼠 T 淋巴细胞亚群的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量 /mg·kg ⁻¹	CD4 ⁺ /%	CD8 ⁺ /%
正常对照	-	39.32 ± 6.64	16.03 ± 2.86
模型	-	13.77 ± 6.81 ¹⁾	7.53 ± 4.56 ¹⁾
联苯双酯	150	27.88 ± 3.35 ³⁾	18.44 ± 4.22 ³⁾
加味四逆汤	240	22.66 ± 5.15 ³⁾	12.20 ± 2.67 ³⁾
	120	20.28 ± 7.58 ³⁾	13.47 ± 4.52 ³⁾

4 讨论

据报道,乙肝病毒侵入机体后并不直接引起肝细胞的破坏,而是通过机体的免疫反应造成的,其中 T 淋巴细胞是肝损伤中重要的免疫细胞,它不仅和肝细胞膜表面抗原发生特异性的结合,对肝损伤具有直接杀伤作用,另一方面还可以激发大量的炎症因子(如 TNF-α,IFN-γ)的释放,从而加重肝细胞的破坏^[6-7]。

因此,本文采用了 Con A 诱导小鼠免疫性肝损伤的模型,其基本病变特点是活化 T 淋巴细胞各亚群,并分泌各种细胞因子产生细胞毒性作用而致免疫性肝损伤,其病理机制与病毒性肝炎相似^[8-9]。

通过酶联免疫法检测小鼠血清 ALT, AST 转氨酶的活性和细胞因子 TNF- α , IFN- γ , IL-10 的含量,从结果中可以看出,小鼠经尾静脉注射 Con A 12 h 后 ALT, AST 水平明显升高,而加味四逆汤高、低剂量组都能够显著降低肝损伤小鼠血清转氨酶 ALT, AST 活性,说明加味四逆汤对免疫性肝损伤具有明显的保护作用,且与保肝药联苯双酯效果相当;对肝损伤中重要的致病因子 TNF- α , IFN- γ 和抗炎因子 IL-10 水平检测结果显示,经加味四逆汤治疗后 TNF- α , IFN- γ 水平明显降低 ($P < 0.05$), 而 IL-10 水平明显提高。同时流式细胞术对小鼠外周血 CD4⁺, CD8⁺ T 淋巴细胞数量分析的结果也显示,加味四逆汤各剂量组可明显提高模型组小鼠外周血中已经降低了的 CD4⁺, CD8⁺ T 淋巴细胞含量 ($P < 0.05$), 减少其向肝脏内浸润。

本研究通过四逆汤传统方剂理论并结合其现代药理立法组方,不单纯着眼于抗氧化、改善微循环等作用,更强调对整体的免疫功能的调节,特别是 T 淋巴细胞亚群、致炎因子和抗炎因子的关系和变化,针对免疫性肝损伤机制的全过程进行干预,从而影响其愈后。结合上述实验结果,笔者推测加味四逆汤可能一方面通过提高实验小鼠外周血淋巴细胞亚群比例,从而减少它们向肝脏的浸润,调节了 T 细胞亚群间相互平衡,而另一方面减弱了免疫炎性因子和增加抗炎性细胞因子的释放起到保护免疫性肝损伤的作用,但其深入的机制需要进一步研究。

综上所述,加味四逆汤与联苯双酯在抗免疫性肝损伤方面效果相当,有望成为治疗急性免疫性肝损伤药物中的有效选择之一。

[参考文献]

- [1] Gao B, Jeong W I, Tian Z. Liver: An organ with predominant innate immunity [J]. *Hepatology*, 2008, 47 (2):729.
- [2] 冯秋荣,李必坚,杨西晓. 四逆汤的现代药理及作用机制研究进展[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2014, 2 (12):239.
- [3] 朱新华,梁先念,王曙光. 四逆汤免疫调节活性的实验研究[J]. *中国实验临床免疫学杂志*, 2012, 8(2):44.
- [4] Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. T cell dependent experimental hepatitis. The NF-kappa B regulatory network [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2006, 6(2):111.
- [5] 李常青,刘丽丽,朱宇同,等. 中药清肝排毒饮对刀豆蛋白 A 所致小鼠免疫性肝损伤的保护作用[J]. *世界华人消化杂志*, 2005, 11(4):1283.
- [6] Shimizu Y. T cell immunopathogenesis and immunotherapeutic strategies for chronic hepatitis B virus infection [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18 (20):2443.
- [7] Reherman B. Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells [J]. *Nat Med*, 2013, 19(7):859.
- [8] Itoh A, Isoda K, Kondoh M, et al. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin A induced liver injury [J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32 (7):1215.
- [9] 姚晓敏,李宏伟,曲均革,等. 刀豆蛋白 A 引起小鼠免疫性肝损伤机制研究[J]. *蚌埠医学院学报*, 2011, 36 (5):445.

[责任编辑 聂淑琴]

欢迎订阅 2015 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国中文核心期刊”、“中国科技论文统计源期刊(2013 年扩刊版)”、“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊、美国《化学文摘》统计源期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创建于 1995 年 10 月,主要设置栏目:学术专论、综述、工艺与制剂、化学与分析、药物代谢、药理、毒理、临床、数据挖掘等。本刊的读者对象是从事中西医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊现为半月刊,16 开本,242 页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价 35 元,全年 840 元。国内外公开发行,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:SM4655,欢迎订阅。本刊编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街 16 号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:syfjx_2010@188.com,网址:www.syfjxzz.com。