

补中益气汤对刀豆蛋白 A 致小鼠急性肝衰竭的保护作用

朱鏐雯, 李蕊, 张剑平, 曾辉, 王宪波*

(首都医科大学附属北京地坛医院 传染病研究所新发突发传染病研究
北京市重点实验室, 中西医结合中心, 北京 100015)

[摘要] **目的:** 研究补中益气汤对刀豆蛋白 A (ConA) 致急性肝衰竭小鼠的保护作用及机制。**方法:** 80 只小鼠随机分为正常组, 模型组, 环孢素 A (CsA) 组, 补中益气汤低、高剂量(10.5, 21 g·kg⁻¹) 组, 每组 16 只。除正常组外, 其余各组静脉注射 15 mg·kg⁻¹ ConA 诱导小鼠急性肝衰竭模型。治疗组于 ConA 注射 30 min 后分别静脉注射 50 mg·kg⁻¹ CsA, 口服灌胃补中益气汤, 正常组和模型组采用同时间、同体积双蒸水灌胃对照。造模 3, 10 h 后取眼球血、肝脏、脾脏, 采用流式微球技术检测血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素 (IL)-6, IL-12, γ -干扰素 (IFN- γ) 和单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 水平, 采用全自动生化分析仪检测血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT), 天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 活性, 苏木素-伊红 (HE) 染色观察肝组织病理学变化, 流式细胞术分析脾脏 CD4⁺ T 淋巴细胞活化程度, 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测肝脏细胞外调节蛋白激酶 1/2 (ERK1/2), p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK) 的表达及磷酸化水平。**结果:** 与正常组比较, 模型组小鼠血清 ALT 和 AST 水平均显著升高 ($P < 0.01$), 肝组织病理损伤明显, 血清炎性细胞因子 TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ 和 MCP-1 水平显著升高 ($P < 0.01$), 脾脏 CD4⁺ T 淋巴细胞中 IL-2, IFN- γ 和 IL-4 表达显著上调 ($P < 0.01$), 肝脏 ERK1/2 和 p38 MAPK 磷酸化水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 补中益气汤高剂量组血清 ALT 和 AST 水平明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 肝组织病理损伤程度减轻, 血清炎性细胞因子 TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ 和 MCP-1 水平明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 脾脏 CD4⁺ T 淋巴细胞中 IL-2 和 IFN- γ 表达明显下调 ($P < 0.05, P < 0.01$), 肝脏 ERK1/2 和 p38 MAPK 磷酸化水平明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:** 补中益气汤对 ConA 诱导的急性肝衰竭小鼠具有明显的保护作用, 其保护作用机制可能通过抑制 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路, 从而降低 T 淋巴细胞活化和炎性细胞因子分泌。

[关键词] 补中益气汤; 急性肝衰竭; 炎性细胞因子; T 淋巴细胞

[中图分类号] R2-0; R289; R285.5; R333.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)01-0010-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200137

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190918.1114.007.html>

[网络出版时间] 2019-09-18 14:31

Protective Effect and Mechanism of Buzhong Yiqitang on Concanavalin A-induced Acute Liver Failure in Mice

ZHU Liu-luan, LI Rui, ZHANG Jian-ping, ZENG Hui, WANG Xian-bo*

(Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Institute of Infectious Diseases,
Center of Integrative Medicine, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the hepatoprotective effect and the mechanism of Buzhong Yiqitang (BZYQT) on mice with acute liver failure induced by Concanavalin A (ConA). **Method:** A total of 80 mice were randomly divided into normal group, model group, Cyclosporine A (CsA) group, BZYQT low and high dose group (10.5, 21 g·kg⁻¹), 16 mice per group. All the mice except for normal group were injected intravenously with 15 mg·kg⁻¹ ConA. The treatment group mice were orally administrated with BZYQT, or intravenously

[收稿日期] 20190704(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273743, 81774234); 北京市医管中心“青苗”计划项目(QML20161802)

[第一作者] 朱鏐雯, 博士, 副教授, 从事感染免疫工作, E-mail: zhuliuluan@ccmu.edu.cn

[通信作者] *王宪波, 博士, 主任医师, 教授, 从事中西医结合肝病工作, E-mail: wangxianbo638@163.com

administrated with $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ CsA 30 min post ConA injection, normal and model group mice were orally administrated with ddH₂O at the same time. Blood, liver and spleen were collected 3 and 10 h post ConA injection. Cytokine levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-12 (IL-12), interferon-gamma (IFN- γ) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the serum were detected with cytometric bead array. The alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels in the serum were analyzed with fully automatic biochemical analyzer. The pathological changes of liver tissues were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The activation of splenic CD4⁺ T lymphocytes was analyzed by flow cytometry. The expression and phosphorylation of extracellular regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2) and p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) was analyzed by Western blot. **Result:** Compared with normal group, model group showed higher levels of ALT and AST in the serum ($P < 0.01$), obvious pathological damage of liver tissue, higher levels of TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ and MCP-1 in the serum ($P < 0.01$), higher expression of IL-2, IFN- γ and IL-4 CD4⁺ T lymphocytes in the spleen ($P < 0.01$), and elevated levels of phosphorylation of ERK1/2 and p38 MAPK ($P < 0.01$). Compared with the model group, BZYQT high dose group showed decreased levels of ALT and AST ($P < 0.05$, $P < 0.01$), reduced liver injury, decreased levels of TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ and MCP-1 in the serum ($P < 0.05$, $P < 0.01$), reduced level of IL-2 and IFN- γ CD4⁺ T lymphocytes in the spleen ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and reduced levels of phosphorylation of ERK1/2 and p38 MAPK ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** BZYQT has a protective effect on mice with acute liver failure induced by ConA. The mechanism may be through inhibiting ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathways, thereby reducing T lymphocyte activation and inflammatory cytokine secretion.

[Key words] Buzhong Yiqitang; acute liver failure; inflammatory cytokine; T lymphocyte

肝衰竭是由多种原因引起的肝脏损害,进而导致肝脏合成、解毒、代谢和生物转化功能严重障碍或失代偿,以短期内出现黄疸、凝血功能障碍、肝性脑病等表现为特征^[1]。其中急性肝衰竭进展迅速、病死率极高^[2]。目前肝衰竭的内科治疗尚缺乏特效药物和手段^[2-3],短时期内出现大量炎性细胞浸润和肝细胞坏死是急性肝衰竭主要的临床病理特点^[4-6]。

中医学没有“肝衰竭”病名,根据其临床表现可归属于“急黄”“瘟黄”“血症”“肝瘟”等范畴。古代医家多认为本病在外主要是感受湿热疫疔之邪,在内主要是湿热相搏、瘀热交结^[7]。现代中医认为,肝衰竭以正虚标实为证候特点,“毒”“瘀”“湿”“热”胶结,其中正虚乃致病之根本,湿热为致病之病因,血瘀是病理之产物,故治疗上应扶正补虚、清热解毒、活血化瘀等。研究者也按照辨证论治的方法,采用经方或自拟方剂治疗,其中以扶正补虚法、解毒凉血活血法、清热利湿法为典型代表^[7-10]。

补中益气汤是金元医家李东垣根据其脾胃理论创立的经典名方,由炙甘草、党参片、白术、北柴胡、当归、升麻和陈皮 8 味药物组成,是调补脾胃,升阳举陷的古方^[11],现代则广泛应用于各科^[12-13]。随着对补中益气汤的深入研究,发现其具有广泛的抗肿

瘤和免疫调节作用^[14-15]。既往研究显示补中益气汤还能缓解慢性萎缩性胃炎,减轻癌性发热,调节支气管哮喘缓解期患儿炎症指标、免疫功能,表明其具有抗炎功能^[10-11,16-19]。过度的炎症反应也是急性肝衰竭的病理损伤机制之一,然而,补中益气汤对急性肝衰竭的作用尚未见报道。因此,本研究拟利用刀豆蛋白 A (ConA) 诱导的急性肝衰竭小鼠模型探讨补中益气汤的保护作用及机制。

1 材料

1.1 动物 80 只 SPF 级 C57BL/6 小鼠,雄性,6~8 周,体质量(20 ± 2)g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号 SCXK(京)2014-0004。小鼠采用标准饲料分笼饲养,自由饮水,室内温度(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,室内湿度 $45\% \pm 5\%$,光照时间为 12 h/12 h 明暗交替。动物实验符合首都医科大学附属北京地坛医院伦理委员会标准。

1.2 药物与试剂 补中益气汤:黄芪 36 g,炙甘草 18 g,党参片 12 g,白术 18 g,北柴胡 12 g,当归 6 g,升麻 12 g,陈皮 12 g,均购自北京同仁堂公司。上述中药饮片水煎浓缩到 75 mL,生药质量浓度为 $1.68 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, -20°C 分装保存;ConA(美国 Sigma 公司,批号 SLBJ740 IV);环孢素 A (CsA,美国 MCE 公司,批号 34562);流式微球技术(CBA)细胞因子

检测试剂盒,小鼠 CD4⁺T 淋巴细胞磁珠分选试剂盒(美国 BD 公司,批号分别为 5126755,5160606598);佛波酯(PMA)/离子霉素复合物(美国 Thermo Fisher 公司,批号 1993948);抗 CD3-PerCP, CD4-APC, CD8-FITC 流式抗体,BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司,批号分别为 44569,7073727,4329219,SE253117A);抗 IL-2-PE, IFN- γ -PE, IL-4-PE 流式抗体(美国 BD 公司,批号分别为 13533,25374,08528);抗细胞外调节蛋白激酶 1/2(ERK1/2), p-ERK1/2, p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK), p-p38 MAPK, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体及辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗(美国 CST 公司,批号分别为 14,12,6,10,12,28);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号 20141205)。

1.3 仪器 MEGAFUGE 1.0R 型多用途离心机(美国 Thermo Fisher 公司);FACS Calibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司);Bp2215 型精密电子分析天平(美国 Sartorius 公司);Microfuge 22R 型低温梯度离心机(美国 Hettich 公司);SIM-F124 型制冰机(日本三洋公司);7020 型全自动生化分析仪(日本日立公司);Power Blotter-Semi-dry 型转膜仪,Mini Gel Tank 型电泳仪(美国 Thermo Fisher 公司)。

2 方法

2.1 造模、分组及给药 将 80 只小鼠随机分成 5 组,每组 16 只,分别为正常组,模型组,CsA 组(50 mg·kg⁻¹),补中益气汤高剂量组(即临床等效剂量组,21 g·kg⁻¹)^[14]及补中益气汤低剂量组(10.5 g·kg⁻¹)。临床等效剂量按人与小鼠体表面积比值计算得出,即小鼠剂量为人剂量的 9.1 倍。除正常组外,其余各组随机选取 10 只小鼠按 15 mg·kg⁻¹静脉注射 ConA,分别于造模 3,10 h 后取材检测。补中益气汤低、高剂量组分别于造模后 30 min 单次灌胃给药,正常组和模型组给予同体积双蒸水灌胃,CsA 组进行单次静脉注射给药。ConA 注射 8 h 后血清肝功能各指标水平达正常小鼠的 10 倍则为造模成功^[20]。

2.2 标本采集及处理 ConA 注射 3,10 h 后,眼球取血,3 000 r·min⁻¹离心 20 min 取上清液,-80 ℃分装保存,用于血清肝功能和细胞因子检测。留取肝脏最大一片肝叶置于 4% 多聚甲醛中固定,保持组织结构完整,用于制作病理切片。留取新鲜脾脏用于分选 T 淋巴细胞。

2.3 全自动生化分析仪检测血清 ALT,AST 水平

留取造模后 10 h 的血清,吸取 50 μ L 加入到含有 150 μ L 生理盐水的离心管中稀释,充分混匀后,放进质控后的 7020 型全自动生化分析仪样品盘中,ALT,AST 试剂均为即用液体试剂,直接放入仪器试剂盘中,混匀,37 ℃ 恒温 10 min。在主波长 340 nm 和副波长 405 nm 处,准确测定各孔吸光度 A。

2.4 CBA 法检测血清细胞因子 留取造模后 3,10 h 的血清 50 μ L,加入到已混合好 6 种细胞因子微球的流式管中(包括标准品和阳性对照),加 PE 检测抗体,充分混匀后,室温下避光孵育 2 h。在此期间,进行流式细胞仪的设定步骤。孵育完成后,加入 Wash Buffer 1 mL 并 200 \times g 离心 5 min。小心吸走各检测管中的上清,每管加入 Wash Buffer 300 μ L,重悬微球沉淀物,振荡试管,立即上流式细胞仪检测细胞因子 TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ , MCP-1 水平。TNF- α , IL-6, IL-12, MCP-1 为造模后 3 h 检测,IFN- γ 为造模后 10 h 检测。

2.5 HE 染色检测肝组织病理变化 肝组织浸泡于 4% 多聚甲醛溶液室温固定 24 h 后,按照标准步骤脱水、包埋,切片 3 μ m,烤片,HE 染色、树胶封片等,光学显微镜下观察各组之间肝组织病理学变化。

2.6 流式细胞术检测 T 淋巴细胞活化 采用小鼠 CD4⁺T 淋巴细胞磁珠分选试剂盒分选造模后 10 h 小鼠脾脏 CD4⁺T 细胞,流式细胞术鉴定纯度 90% 以上方可进行后续实验。细胞按 1 \times 10⁵ 个/L 接种于 96 孔板,除正常组外,其余各组细胞采用 PMA/离子霉素复合物刺激 5 h,随后采用抗 CD3-PerCP, CD4-APC, CD8-FITC 抗体进行细胞表面染色,IL-2-PE, IFN- γ -PE, IL-4-PE 抗体进行胞内染色,流式检测 IL-2, IFN- γ 及 IL-4 的表达情况。

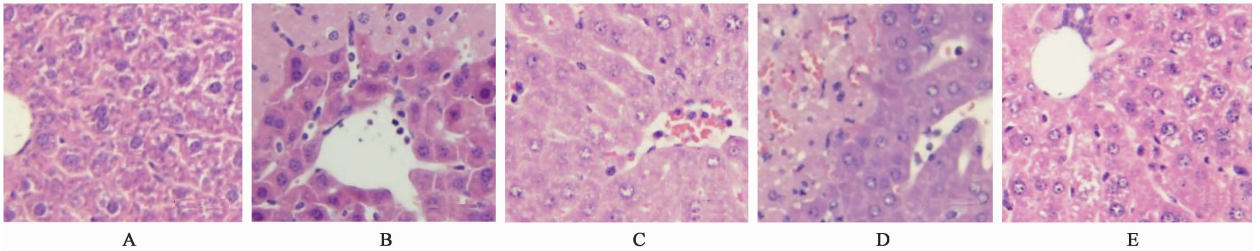
2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠肝脏 ERK1/2, p38 MAPK 蛋白的表达及磷酸化 提取小鼠肝组织总蛋白,采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定各组蛋白浓度。取总蛋白 50 μ g 进行 SDS-PAGE 电泳,转膜后封闭 1 h,按抗体说明书加入 ERK1/2, p-ERK1/2, p38 MAPK, p-p38 MAPK 一抗(1:1 000); GAPDH (1:3 000)置 4 ℃ 冰箱过夜,洗膜,加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗(1:5 000),化学发光法曝光。采用 Image J 软件分析目标条带灰度值。

2.8 统计学分析 本实验数据处理采 GraphPad Prism 7 软件进行统计学分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析结合 Tukey's 检验进行多组间比较, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对 ConA 致急性肝衰竭小鼠血清肝功能水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清中 ALT 和 AST 水平均显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,CsA 组和补中益气汤高剂量组 ALT 和 AST 水平明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

3.2 对 ConA 致急性肝衰竭小鼠肝组织病理形态的影响 光镜下观察 HE 染色肝组织形态,正常组小鼠肝小叶形态结构完整,表面光滑,肝索呈放射状,肝血窦及汇管区清晰,无明显炎性细胞浸润;模型组出现广泛的肝细胞变性,肝小叶结构紊乱,大量炎性细胞浸润,甚至出现大片坏死灶;与模型组比较,CsA 组肝细胞结构基本完整,仅少量炎性细胞浸润;补中益气汤低剂量组肝细胞变性明显,肝小叶结构紊乱,大量炎性细胞浸润,肝损伤未见明显减轻;



A. 正常组;B. 模型组;C. CsA 组;D. 补中益气汤低剂量组;E. 补中益气汤高剂量组(图 2 同)

图 1 补中益气汤对 ConA 致急性肝衰竭小鼠肝组织损伤的影响(HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of BZYQT on pathological damage of liver tissues in ConA-injected mice (HE, $\times 200$)

3.3 对 ConA 致急性肝衰竭小鼠炎性细胞因子分泌的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清 TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ 和 MCP-1 含量均显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,CsA 组和补中益气汤高剂量组

表 1 补中益气汤(BZYQT)对 ConA 致急性肝衰竭小鼠血清 ALT 和 AST 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of Buzhong Yiqitang (BZYQT) on serum levels of ALT and AST in ConA-induced acute liver failure mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
U·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALT	AST
正常	-	27.9 \pm 4.0	88.6 \pm 8.8
模型	-	2 025.1 \pm 563.1 ¹⁾	2 270.0 \pm 614.3 ¹⁾
环孢素 A	0.05	104.4 \pm 35.5 ³⁾	300.3 \pm 72.9 ²⁾
补中益气汤	10.5	1 779.3 \pm 391.2	1 941.2 \pm 523.7
	21	159.2 \pm 26.8 ³⁾	183.0 \pm 23.3 ³⁾

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

补中益气汤高剂量组肝细胞、肝索结构完整,未见明显的炎性细胞浸润和肝细胞坏死。见图 1。

TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ 和 MRP-1 水平均明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$),补中益气汤低剂量组 IL-12 水平明显降低 ($P < 0.05$),其他指标与模型组比较无明显差异。见表 2。

表 2 补中益气汤对 ConA 致急性肝衰竭小鼠血清细胞因子 TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ , MCP-1 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of BZYQT on cytokine levels of TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ and MCP-1 in ConA-induced acute liver failure mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
mg·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF- α	IL-6	IL-12	IFN- γ	MCP-1
正常	-	0.007 \pm 0.001	0.025 \pm 0.009	0.002 \pm 0.001	0.006 \pm 0.001	0.024 \pm 0.010
模型	-	0.544 \pm 0.049 ¹⁾	2.084 \pm 0.052 ¹⁾	0.204 \pm 0.056 ¹⁾	0.772 \pm 0.151 ¹⁾	4.961 \pm 0.119 ¹⁾
环孢素 A	0.05	0.241 \pm 0.038 ³⁾	0.561 \pm 0.043 ³⁾	0.125 \pm 0.021 ³⁾	0.187 \pm 0.049 ²⁾	1.649 \pm 0.313 ²⁾
补中益气汤	10.5	0.456 \pm 0.228	1.815 \pm 0.474	0.168 \pm 0.039 ²⁾	0.621 \pm 0.254	3.645 \pm 1.824
	21	0.203 \pm 0.036 ³⁾	0.632 \pm 0.104 ³⁾	0.110 \pm 0.013 ³⁾	0.379 \pm 0.082 ²⁾	1.801 \pm 0.168 ³⁾

3.4 对 ConA 致急性肝衰竭小鼠脾脏 T 淋巴细胞活性的影响 与正常组比较,模型组小鼠脾脏 CD4⁺ T 淋巴细胞中 IL-2, IFN- γ 和 IL-4 表达显著上调 ($P < 0.01$);与模型组比较,CsA 组小鼠 CD4⁺ T

淋巴细胞中 IL-2, IFN- γ 和 IL-4 表达显著下调 ($P < 0.01$);补中益气汤低剂量组与模型组比较无明显差异;补中益气汤高剂量组 IL-2 和 IFN- γ 表达明显下调 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

表 3 补中益气汤对 ConA 致急性肝衰竭小鼠脾脏 T 淋巴细胞中 IL-2, IFN- γ , IL-4 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of BZYQT on expression of IL-2, IFN- γ and IL-4 in T lymphocytes in spleen of ConA-induced acute liver failure mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	IL-2	IFN- γ	IL-4
正常	-	0.8 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.0
模型	-	29.1 ± 0.9 ¹⁾	4.2 ± 0.3 ¹⁾	5.5 ± 0.6 ¹⁾
环孢素 A	0.05	11.1 ± 1.2 ³⁾	0.8 ± 0.1 ³⁾	1.9 ± 0.1 ³⁾
补中益气汤	10.5	25.5 ± 2.8	3.8 ± 0.4	5.6 ± 0.8
	21	14.4 ± 1.1 ²⁾	1.5 ± 0.3 ³⁾	4.9 ± 0.3

3.5 对 ConA 致急性肝衰竭小鼠肝脏 ERK1/2 及 p38 MAPK 信号通路的影响 与正常组比较,模型组小鼠肝脏 ERK1/2, p38 MAPK 磷酸化水平显著上调 ($P < 0.01$); 与模型组比较, CsA 组 p-ERK1/2 水

表 4 补中益气汤对 ConA 致急性肝衰竭小鼠肝组织 ERK1/2 及 p38 MAPK 蛋白表达及磷酸化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of BZYQT on expression and phosphorylation of ERK1/2 and p38 MAPK in liver of ConA-injected mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ERK1/GAPDH	p-ERK1/GAPDH	ERK2/GAPDH	p-ERK2/GAPDH	p38 MAPK/GAPDH	p-p38 MAPK/GAPDH
正常	-	0.33 ± 0.06	0.09 ± 0.02	0.46 ± 0.08	0.22 ± 0.04	0.45 ± 0.07	0.23 ± 0.04
模型	-	0.33 ± 0.05	0.26 ± 0.04 ¹⁾	0.43 ± 0.05	0.62 ± 0.11 ¹⁾	0.54 ± 0.09	0.50 ± 0.08 ¹⁾
环孢素 A	0.05	0.35 ± 0.07	0.19 ± 0.04 ²⁾	0.50 ± 0.09	0.49 ± 0.05 ²⁾	0.50 ± 0.07	0.49 ± 0.06
补中益气汤	10.5	0.31 ± 0.05	0.32 ± 0.05	0.44 ± 0.08	0.46 ± 0.10	0.41 ± 0.06	0.54 ± 0.07
	21	0.28 ± 0.04	0.15 ± 0.03 ³⁾	0.40 ± 0.07	0.27 ± 0.06 ³⁾	0.40 ± 0.06	0.07 ± 0.02 ³⁾

4 讨论

急性肝衰竭由多种因素引起,在我国主要是以肝炎病毒(尤其是乙型肝炎病毒)为主,其次是药物及自身抗原^[2,21]。尽管引起急性肝衰竭的病因复杂,但是肝脏免疫应答紊乱是病毒性肝炎、药物性肝炎和自身免疫性肝炎的共同发病机制^[22]。ConA 是一种植物来源的凝集素,能快速激活 T 淋巴细胞(尤其是 CD4⁺ T 淋巴细胞)并特异性攻击肝脏^[20]。采用 ConA 注射小鼠能很好地模拟急性肝衰竭的病理特点,是国际上广泛应用的动物模型^[23-26]。基于 ConA 致急性肝衰竭小鼠模型的药效分析研究中,血清转氨酶活性和肝组织病理损伤是评价药效的核心指标。本研究采用造模后治疗性给药,通过以上三方面评估,充分证明了高剂量补中益气汤对急性肝衰竭的保护作用。

在肝衰竭发生发展过程中,肝组织依次经历了免疫损伤、缺血缺氧损伤以及内毒素血症三重打击,其中免疫损伤至关重要。肝衰竭发病过程中,天然

平显著降低,补中益气汤高剂量组 p-ERK1/2 及 p-p38 水平显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 2, 表 4。

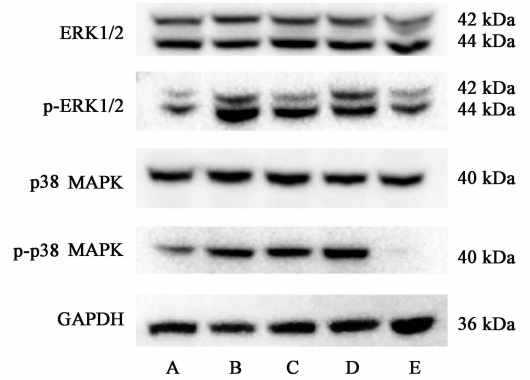


图 2 各组小鼠肝组织 ERK1/2, p38 MAPK, p-ERK1/2, p-p38 MAPK 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of ERK1/2, p38 MAPK, p-ERK1/2, p-p38 MAPK protein in liver of mice in each group

免疫和适应性免疫均参与了肝脏免疫损伤^[27]。临床和基础研究显示,单核-巨噬细胞、中性粒细胞、自然杀伤(NK)细胞、树突状细胞(DC)等天然免疫细胞,以及 T 淋巴细胞, B 淋巴细胞等适应性免疫细胞,均有不同程度的肝脏浸润^[28-30]。在 ConA 诱导的急性肝衰竭模型中,脾中的 T 淋巴细胞增殖活化,成为效应 T 细胞,经趋化因子和黏附分子的作用,被肝窦内皮细胞募集至肝窦和肝小叶部位,浸润的效应 T 细胞持续增殖活化,分泌 IL-2, IFN- γ 等细胞因子,启动 Th1 免疫应答^[31-32]。研究表明,采用地塞米松, CsA 等免疫抑制剂提前处理 ConA 诱导的急性肝衰竭小鼠,能有效减少肝脏中 T 淋巴细胞的浸润,减轻肝脏损伤^[33-34]。提前注射抗 CD4 抗体能明显改善肝损伤、降低血清氨基转移酶水平,而注射抗 CD8 抗体则没有这种保护作用^[20]。说明 CD4⁺ T 细胞是 ConA 诱导肝损伤的主要效应细胞。本研究结果表明高剂量补中益气汤能显著抑制脾脏 CD4⁺ T 淋巴细胞活化,降低 IL-2, IFN- γ 分泌水平,

发挥类似免疫抑制剂 CsA 的效应。

此外,在肝衰竭的发生机制中,细胞因子风暴也具有十分重要的作用。细胞因子风暴不仅表现为多种细胞因子快速释放,更重要地,细胞因子之间还会形成瀑布样级联活化反应,对组织、器官造成严重损伤^[35-36]。临床研究表明,肝衰竭患者血清中 TNF- α , IL-6 和 IFN- γ 等炎性细胞因子水平显著高于健康人,其中 TNF- α 和 IL-6 水平随疾病严重程度的增加而增加,检测其血清水平有助于判断疾病严重程度和预后转归情况^[35]。TNF- α , IL-6, IL-12 和 MCP-1 主要由单核-巨噬细胞,DC 等髓系细胞分泌,IFN- γ 主要来自于活化的 NK, T 淋巴细胞。高剂量补中益气汤对 TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ 以及 MCP-1 分泌均有显著的抑制作用,表明其具有多靶点的抗炎作用,也体现了中药方剂配伍“多组分、多靶点”的优势。

MAPK 通路是一组能被不同的细胞外刺激,如病原分子、神经递质、激素、细胞应激及细胞黏附等激活的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶。其中 ERK1/2 (p44/42), p38 MAPK 是重要的家族成员。在受到刺激的情况下,细胞启动一个连续的蛋白激酶三级级联反应,由 MAP 激酶激酶激酶(MAP3K), MAP 激酶激酶(MAP2K)和 MAP 激酶(MAPK)组成。级联反应通过分别使活化环残基 Thr202/Tyr204 和 Thr185/Tyr187 磷酸化,从而激活 p44 和 p42,即 ERK1/2 分子。p38 MAPK 也是参与控制细胞因子的关键信号分子,可通过各种细胞应激被激活,包括渗透休克,炎性细胞因子,脂多糖,紫外线和生长因子。本研究中,发现补中益气汤能显著抑制 ERK1/2 和 p38 MAPK 磷酸化,表明该方剂对 MAPK 通路活化起重要的抑制作用,也提示 MAPK 通路可能是补中益气汤发挥抗炎作用的重要机制。

补中益气汤方中重用黄芪,补中益气,升阳固表,为君药;臣以党参片、炙甘草、白术补气健脾,以增强黄芪补益中气之功;血为气之母,气虚时久,营血亦亏,故用当归养血和营,协党参片、黄芪以补气养血;陈皮理气和胃,使诸药补而不滞;以少量升麻、柴胡升阳举陷,协助君药以升提下陷之中气,共为佐使。诸药合用,共奏补气升阳、甘温除热之功。本研究中,补中益气汤对急性肝衰竭的保护作用,充分体现了该方不仅有补益中气、升阳举陷之功,还具有甘温除热、扶正祛邪之效,也为补中益气汤古方新用拓宽了思路。

综上所述,补中益气汤对 ConA 所致急性肝衰

竭小鼠具有良好的保护作用,其作用机制可能与抑制 CD4⁺ T 淋巴细胞活化、减轻细胞因子风暴有关。该方对急性肝衰竭的药理机制还体现出多靶点的抗炎作用,通过拆方分析及网络药理学等手段进一步解析药物关键起效成分及作用机制,将有助于促进补中益气汤的现代化应用。

[参考文献]

- [1] GAO B, Jeong W I, TIAN Z. Liver: an organ with predominant innate immunity[J]. Hepatology, 2008, 47(2):729-736.
- [2] 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]. 西南医科大学学报, 2019, 42(2):99-106.
- [3] 罗森,孟忠吉,龚作炯. 慢加急性肝衰竭的免疫调节治疗研究进展[J]. 疑难病杂志, 2018, 17(1):101-106.
- [4] 王晓晶,张小平,宁琴. 肝衰竭的免疫发病机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2014, 30(10):984-991.
- [5] 杨晓丹. 中蒙药对急性肝衰竭的作用及机制[J]. 中国民族医药杂志, 2019, 25(4):41-44.
- [6] 黄娜娜,孙蓉. 适宜于中药抗急性肝损伤活性发现与药效评价的动物模型应用概况[J]. 中国药物警戒, 2015, 12(11):669-673.
- [7] 杨瑞华,李芹. 中医药治疗肝衰竭研究进展[J]. 中西医结合研究, 2014, 6(3):158-162.
- [8] 张咏,吴银亚,谭善忠,等. 基于正虚机制观察益气健脾法治疗慢性乙型肝炎肝衰竭的临床疗效[J]. 中国中医急症, 2012, 21(6):872-873, 892.
- [9] 胡振斌,邓桂元,韦艾凌,等. 中医药治疗肝衰竭的研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育, 2011, 9(4):196-197.
- [10] 刘慧敏,王宪波,王融冰. 基于解毒凉血法的中西医结合方案治疗乙型肝炎慢加急性肝衰竭疗效分析[J]. 中西医结合肝病杂志, 2011, 21(4):197-200.
- [11] 胡兵,安红梅,沈克平. 补中益气汤现代药理学研究[J]. 中西医结合学报, 2008, 6(7):752-755.
- [12] 刘军彤,杨宇峰,王仁和,等. 补中益气汤加减对糖尿病心肌病大鼠心功能及心肌细胞 FABP3, PPAR γ 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(12):35-42.
- [13] 王玉娥,席颖颖,李媛,等. 补中益气汤配伍规律现代研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(7):221-226.
- [14] 黄颖,蓝登科,李绵莎,等. 补中益气汤治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期合并呼吸衰竭疗效研究[J]. 亚太传统医药, 2018, 14(10):191-193.

- [15] 吴艳菲,何海荣. 补中益气汤合四妙丸加减联合重组人干扰素治疗宫颈 HPV 感染疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2019, 28(2): 178-180, 184.
- [16] 王媛. 孟鲁司特片联合补中益气汤治疗对支气管哮喘缓解期患儿炎症指标、免疫功能的影响[J]. 亚太传统医药, 2017, 13(24): 146-148.
- [17] 赵欣,周宁. 补中益气汤加减治疗慢性萎缩性胃炎临床观察[J]. 实用中医药杂志, 2019, 35(1): 28-29.
- [18] 王翠,马燕. 补中益气汤治疗癌性发热疗效观察[J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(5): 155.
- [19] 葛婷,周建伟,潘龙赐,等. 补中益气汤治疗气虚发热型肿瘤性发热的临床疗效评价研究[J]. 浙江临床医学, 2018, 20(4): 650-652.
- [20] Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A [J]. *J Clin Invest*, 1992, 90(1): 196-203.
- [21] 周忠豪,郑伟强. 肝衰竭预后评估模型的研究进展[J]. 海南医学, 2019, 30(2): 245-251.
- [22] 张嘉宁. 多谱学联合分析在干细胞救治暴发性肝衰竭中的应用[D]. 杭州:浙江大学, 2018.
- [23] Billerbeck E, Wolfisberg R, Fahnøe U, et al. Mouse models of acute and chronic hepatitis B virus infection[J]. *Science*, 2017, 357(6347): 204-208.
- [24] Maes M, Vinken M, Jaeschke H. Experimental models of hepatotoxicity related to acute liver failure[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016, 290: 86-97.
- [25] 申弘,聂红明,叶青艳,等. 免疫性肝损伤动物模型研究进展[J]. 肝脏, 2014, 19(10): 790-792, 796.
- [26] 凌银婵,刘海燕,黄巨恩,等. 急性肝损伤实验动物模型的研究进展[J]. 解剖学杂志, 2012, 35(3): 389-391.
- [27] WU Z, HAN M, CHEN T. Acute liver failure: mechanisms of immune-mediated liver injury[J]. *Liver International*, 2010, 30(6): 782-794.
- [28] McDonald B, Kubes P. Innate immune cell trafficking and function during sterile inflammation of the liver[J]. *Gastroenterology*, 2016, 151(6): 1087-1095.
- [29] Bonder C S, Ajuebor M N, Zbytnik L D, et al. Essential role for neutrophil recruitment to the liver in concanavalin induced hepatitis[J]. *J Immunol*, 2004, 172(1): 45-53.
- [30] BI Y, LI J, YANG Y, et al. Human liver stem cells attenuate concanavalin A-induced acute liver injury by modulating myeloid-derived suppressor cells and CD4⁺ T cells in mice [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 22.
- [31] Horst A K, Wegscheid C, Schaefers C, et al. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 controls IL-2-dependent regulatory T-cell induction in immune-mediated hepatitis in mice [J]. *Hepatology*, 2018, 68(1): 200-214.
- [32] ZHAO X, DING S, GENG C, et al. Anti-CD200 attenuates concanavalin A induced hepatitis via modulating the imbalance of CD4⁺ T lymphocyte differentiation in mice [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(12): 4202-4209.
- [33] ZHANG X, QUAN Q, SUN Z, et al. Protective effects of cyclosporine A on T-cell dependent ConA-induced liver injury in Kunming mice [J]. *World J Gastroenterol*, 2001, 7(4): 569-571.
- [34] CHOU M Y, HUANG L T, TIAN Y L, et al. Age-dependent effects of prenatal dexamethasone exposure on immune responses in male rats [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2017, 241(3): 225-237.
- [35] 陈智,朱海红,杨英. 细胞因子风暴与肝衰竭[J]. 临床肝胆病杂志, 2014, 30(10): 981-983.
- [36] DU X X, SHI Y, YANG Y, et al. DAMP molecular IL-33 augments monocytic inflammatory storm in hepatitis B-precipitated acute-on-chronic liver failure [J]. *Liver Int*, 2018, 38(2): 229-238.

[责任编辑 孙丛丛]