

doi:10.11920/xnmdzk.2025.02.007

三草保肝汤抑制 MDSCs 抗肝纤维化作用研究

沈立都¹,代鑫燕²,吉胡日布¹,张诗盈²,郭嘉诚²,姜慧玲¹,严亨秀¹

(1. 西南民族大学药学与食品学院,四川 成都 610041;2. 西南民族大学草地资源学院,四川 成都 610225)

摘要:旨在探讨三草保肝汤(Sancao Baogan decoction,SBD)对CCl₄诱导小鼠肝纤维化的治疗作用及可能机制。小鼠按4 mL/kg腹腔注射5%CCl₄溶液诱导肝纤维化。自造模之日起,用SBD按高、低剂量连续灌胃给药6周,每天1次。通过HE、微板法、免疫组化、比色法、TUNEL法、ELISA、流式细胞术等检测SBD对肝纤维化的抑制作用及对MDSCs、T淋巴细胞和相关细胞因子的影响。结果显示,SBD组小鼠肝组织病理损伤、炎症浸润及胶原沉积得到明显改善;小鼠血清中AST和ALT活性显著下降;肝脏中MDA含量及 α -SMA、IL-1 β 、IL-6、TGF- β 1水平下调;肝脏和血液中MDSCs的表达明显下降;HSCs被显著抑制,肝细胞凋亡减少;GSH含量、CD4⁺T淋巴细胞和CD8⁺T淋巴细胞表达以及抗炎因子IL-10水平上调。以上结果表明,SBD对小鼠肝纤维化有较好的保护作用,并可能通过抑制肝脏MDSCs的免疫抑制作用提高小鼠免疫力进而减轻肝纤维化。

关键词:三草保肝汤(SBD);MDSCs;肝纤维化;免疫调节

中图分类号:R285

文献标志码:A

文章编号:2095-4271(2025)02-0166-11

Study on the anti-hepatic fibrosis effect of Sancao Baogan decoction by inhibiting MDSCs

SHEN Lidu¹,DAI Xinyan²,JIHU Ribu¹,ZHANG Shiyong²,GUO Jiacheng²,JIANG Huiling¹,YAN Hengxiu¹

(1. School of Pharmacy and Food, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China;

2. School of Grassland Resources, Southwest Minzu University, Chengdu 610225, China)

Abstract: This study investigated the intervention effect of Sancao Baogan decoction (SBD) on CCl₄-induced hepatic fibrosis in mice. The mouse hepatic fibrosis model was prepared by intraperitoneal injection of 5% CCl₄ solution at a dose of 4 mL/kg. Commencing from the modeling date, SBD was administered via continuous intragastric delivery at high or low doses once a day for 6 weeks. The inhibitory effect of SBD on hepatic fibrosis and its effect on MDSCs, T-lymphocytes and related cytokines were detected by methods including HE, microplate assay, immunohistochemistry, colorimetric assay, TUNEL assay, ELISA and flow cytometry. The results showed that the pathological injury, inflammatory infiltration and collagen deposition of liver tissue in SBD groups were significantly improved. The activities of AST and ALT in mouse serum exhibited a significant reduction. The MDA content and levels of α -SMA, IL-1 β , IL-6, and TGF- β 1 in the liver were significantly down-regulated. The expression of MDSCs in liver and blood was significantly decreased. HSCs was significantly inhibited and hepatocyte apoptosis was reduced. Whereas the expression of GSH, CD4⁺ T lymphocytes and CD8⁺ T lymphocytes, as well as the anti-inflammatory factor IL-10 were upregulated. The above results indicate that SBD has a good protective effect against hepatic fibrosis in mice, and the mechanism may be related to improving the immunity of mice by inhibiting the immunosuppressive effect of hepatic MDSCs and thus alleviating hepatic fibrosis.

Keywords: Sancao Baogan decoction (SBD); MDSCs; hepatic fibrosis; regulation of immunity

收稿日期:2024-09-04

通信作者:严亨秀(1971-),女,博士,教授,研究方向:生理学、药理学、民族药学.E-mail:yhx003@swun.edu.cn

基金项目:四川省科技厅应用基础项目(2021YJ0256);西南民族大学中央高校基本科研业务费专项资金优秀学生培养工程项目(2023NYXXS086,ZYN2024075)

肝纤维化是肝脏受到慢性损伤后的自我修复过程,其特征是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积^[1].肝脏持续受到损伤刺激会导致ECM积累,这在很大程度上会破坏肝脏的正常结构和功能,从而大大增加肝硬化和肝细胞癌的风险,并导致世界范围内的重大公共卫生问题^[2-3].肝纤维化的病因复杂,酒精性或非酒精性脂肪肝、自身免疫性肝病、病毒性感染等多种诱导因素都参与了肝纤维化的发生和发展^[4].此外,药物毒性、代谢紊乱和胆汁淤积也与肝纤维化的病程发展相关^[5].目前,肝移植(liver transplantation, LT)被认为是治疗终末期肝病的唯一方法^[6].因此,开发新的肝纤维化治疗方法至关重要.

中药因其安全性高、副作用低的特点,被认为是一种治疗肝纤维化很有前景的药物^[7-8].研究发现源自中药的黄酮类、皂苷、多糖和生物碱等多种天然产物具有显著的抗纤维化作用^[9].三草保肝汤(Sancao Baogan decoction, SBD)是一种民间验方,由夏枯草、金钱草、车前草等8种中药组成,多用于肝脏疾病的治疗,但其作用的具体机制尚不明确.本课题前期研究发现在体外模型中,SBD可抑制白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)诱导的髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)的增殖和分化^[10].MDSCs是一群具有免疫调控功能的髓系细胞群,活化的MDSCs具有免疫抑制作用,可诱导自然杀伤细胞以及抑制CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的功能^[11-12].肝脏是诱导和积累MDSCs的重要器官,在人类和啮齿动物肝脏疾病的模型中显示,MDSCs会驱动炎症过程^[13].越来越多的研究表明,MDSCs与急慢性肝炎、肝纤维化、肝癌及肝脏移植耐受等多种肝脏疾病密切相关^[14-16].

因此本研究使用CCl₄建立肝纤维化动物模型,探讨SBD在肝纤维化中的药理作用及相关机制,为临床治疗肝纤维化提供实验依据.

1 材料与方法

1.1 实验药物

三草保肝汤由夏枯草14g,金钱草14g,车前草14g,玉米须12g,蛇莓12g,茵陈10g,薄荷10g,鱼腥草10g这8味中药材组成,饮片均购自北京同仁堂

药房,经西南民族大学药学院任艳副教授鉴定为正品.将96g SBD加入2L蒸馏水,浸泡2h,武火烧开后转文火煮10min,使用0.22μm微孔滤膜过滤,将所得滤液于旋转蒸发仪(60℃,60r/min)中浓缩至1.28g/mL(即1mL水煎剂中含1.28g生药),置于4℃冰箱储存.在课题组前期研究的基础上得出有效剂量为6.4g/kg(高剂量),3.2g/kg(低剂量)^[17].

1.2 动物

SPF级6~8周龄C57BL/6J雄性小鼠购自北京华阜康生物技术有限公司(中国北京),实验动物生产许可证号SCXK-2019-0008.所有小鼠饲养于西南民族大学药学院SPF级实验动物房,喂养标准小鼠饲料购自北京华阜康生物技术有限公司,自由饮用纯净水,饲养环境为12h光照/12h黑暗,温度为(25±1)℃,相对湿度为(60±10)%.所有实验均经西南民族大学实验动物伦理委员会批准(伦理号2023MDLS071).

1.3 试剂

四氯化碳(CCl₄)(上海麦克林生化科技有限公司);秋水仙碱(成都普思生物科技股份有限公司);丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)试剂盒(南京建成生物工程研究所);H&E、Masson试剂盒(bio-sharp生物公司);FITC anti-mouse-CD4、PE anti-mouse-CD8、FITC anti-mouse-CD11b、Percep-cyanine5.5 anti-MouseGr-1荧光标记抗体(Biolegend公司);Mouse IL-6 ELISA Kit、Mouse IL-1β ELISA Kit、Mouse TGF-β1 ELISA Kit、Mouse IL-10 ELISA Kit试剂盒(上海将来实业股份有限公司);二抗:Goat anti-Rabbit IgG(联科生物公司);Tunel试剂盒(Elabscience);二抗:CY3标记的山羊抗兔IgG,枸橼酸抗原修复液(pH6.0),DAPI(赛维尔生物科技有限公司);自发荧光淬灭剂苏丹黑B(生工生物工程股份有限公司);免疫组化DAB显色剂试剂盒(Solarbio).

1.4 仪器

HBS-1096A酶标仪(Betie公司);BD FACS CantoII流式细胞仪(BD FACS公司);Pannoramic SCAN II病理切片扫描仪(3DHISTECH Kft);CF1524R台式高速冷冻离心机(SciloEGX公司),荧光显微镜(CX40,SOPTOP).

1.5 方法

1.5.1 分组及造模

C57BL/6J 小鼠适应性饲养 1 w 后,将小鼠随机分为 5 组,每组 10 只.分别为:正常组、模型组、秋水仙碱组、SBD 高剂量组及 SBD 低剂量组($n=10$).模型组、秋水仙碱组和 SBD 组按 4 mL/kg 腹腔注射 5% CCl_4 溶液,正常组小鼠腹腔注射等量橄榄油,每周 2 次,注射 6 w.自造模之日起正常组和模型组均给予等量 0.9% NaCl;阳性对照组给予 0.1 mg/kg 秋水仙碱溶液;高、低剂量实验组分别给予 6.4 g/kg 和 3.2 g/kg SBD 水煎剂.5 组小鼠每天灌胃给药 1 次,连续 6 w.实验期间,小鼠每周称 2 次体重.取材前对小鼠断食、不断水 12 h,眼球取血,颈椎脱臼处死.在作用机制探讨中为了节约成本,故每组只选择具有代表性的 6 个样本进行分析.

1.5.2 肝脏指数测定

小鼠末次给药 24 h 后称重,颈椎脱臼处死小鼠,取出小鼠肝脏,用预冷的生理盐水漂洗肝脏表面,吸水纸吸干血渍,称重,计算公式如下:

$$\text{肝脏指数}(\%) = \frac{\text{肝重}}{\text{体重}} \times 100\% \quad (1)$$

1.5.3 肝组织病理学分析

肝组织用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,切成 5 μm 厚的切片.切片用苏木精和伊红(H&E)染色观察形态学变化并用表 1 评分标准统计量化各组小鼠肝纤维化程度,用 Masson 染色评估胶原沉积.用 Image-Pro+6.0 法定量测定肝脏中胶原蛋白的积累情况.

表 1 小鼠肝纤维化病理 Ishak 评分标准

Table 1 Pathologic Ishak scoring criteria for hepatic fibrosis in mice

病理描述	评分
正常	0
一些门静脉区域纤维扩张,伴或不伴短纤维间隔	1
大多数门静脉区域纤维扩张,伴或不伴短纤维间隔	2
大多数门静脉区域的纤维性扩张,偶尔有 P-P	3
门静脉区域纤维扩张,伴有明显的 P-P 和 P-C	4
明显的 P-P 和 P-C 并伴有结节(不完全性肝硬化)	5
超过 3 个假小叶或肯定肝硬化	6

注:P-P:汇管-汇管桥接纤维化;P-C:汇管-中央桥接纤维化

1.5.4 免疫组化法检测肝组织纤维化标志物 α -SMA 表达情况

取出石蜡包埋的肝组织制备切片,脱蜡脱水,修复抗原,封闭,滴加 α -SMA 一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,滴加二

抗,DAB 显色,自来水充分冲洗,苏木精复染,脱水,树脂封片,置于光镜下观察.

1.5.5 肝功能生化分析

采血后,以 3 500 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min 分离血清.根据试剂盒说明书采用微板法分别测定小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)的活性.

1.5.6 TUNEL 染色检测肝细胞凋亡情况

组织切片 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 20 min,PBS 洗涤 10 min.滴加 50 μL TUNEL 检测液,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 60 min,PBS 洗涤 3 次.滴加 DAPI 染液,室温孵育 10 min,PBS 洗涤 3 次.封片后荧光显微镜下观察.

1.5.7 肝脏氧化应激评估

称取约 100 mg 肝组织,用 900 μL 生理盐水匀浆.在 3 500 rpm/15 min 后,取上清液,根据试剂盒说明书采用微板法测定丙二醛(MDA)的含量,比色法检测谷胱甘肽(GSH)的含量.

1.5.8 流式细胞术检测肝脏及血液中 MDSCs 及 T 淋巴细胞表达情况

小鼠眼球取血后加红细胞裂解液并离心弃上清,用适量 PBS 重悬制成外周血单细胞悬液;将肝组织放入装有预冷培养基的六孔板中,研磨成组织匀浆并过 200 目细胞筛,加红细胞裂解液后离心弃上清,用 PBS 重悬制成单细胞悬液.为了表征 MDSCs,肝脏和外周血的单细胞悬液用以下抗体进行表面染色:CD11b-FITC 和 Gr-1-PE.此外,CD4-FITC 和 CD8-PE 抗体用于表征肝脏和外周血单细胞悬液中的 T 淋巴细胞.空白试管和单个染色试管用于荧光补偿.最后,使用 BD FACS Canto II 和 Novo Express 软件进行分析.

1.5.9 酶联免疫吸附试验(ELISA)

称取约 100 mg 小鼠肝组织,置于含 90 mL 生理盐水的匀浆器中,于冰浴中制备肝组织匀浆液,根据试剂盒说明书采用 ELISA 法检测肝组织中 IL-1 β 、IL-6、IL-10 和 TGF- β 1 的浓度.

1.6 统计分析

所有数据均以 $\bar{X} \pm s$ 表示.统计意义采用单因素方差分析,多组采用费舍尔最小显著性差异检验.所有统计分析均使用 GraphPad Prism 9 软件. $P < 0.05$ 为具有统计学意义.

2 结果

2.1 SBD 对 CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠肝脏形态及肝脏病理损伤的影响

各组小鼠肝脏指数见表 2, 肝脏形态及组织病理学切片见图 1. 如表 2 所示, 模型组小鼠较正常组小鼠肝脏指数升高 ($P < 0.01$), 而秋水仙碱组及 SBD 组较模型组肝脏指数均降低 ($P < 0.05$). 如图 1 所示, 正常组小鼠肝脏表面呈鲜红色而模型组肝脏表面偏黄, 粗糙, 有颗粒状病变, 质地变硬, 边缘变厚. 与模型组相比, 经 SBD 治疗后, 小鼠肝脏组织损伤有明显改善, 颗粒状病变明显变少, 肝脏边缘厚度减小, 同样秋水仙碱组小鼠相较于模型组, 肝脏组织损伤也有明显改善.

HE 染色结果显示, 正常组小鼠肝细胞排列整齐, 肝小叶结构正常, 未见坏死细胞; 模型组小鼠肝脏损伤严重, 出现炎症细胞浸润及肝细胞气球样变性, 有

多空泡分布, 汇管区周围纤维增生明显, 纤维化评分较正常组显著升高 ($P < 0.01$); 秋水仙碱组、SBD 组小鼠肝脏病理损伤和炎性细胞浸润较模型组显著减轻 ($P < 0.01$), 说明 SBD 能够有效减轻肝损伤小鼠的肝脏形态学和病理学改变.

表 2 小鼠肝脏重量和肝脏指数的比较 ($\bar{X} \pm S, n = 10$)

Table 2 Comparison of liver weight and liver index

in mice ($\bar{X} \pm S, n = 10$)

组别	肝重(g)	肝脏指数 (%)
正常组	1.05±0.03	4.48±0.06
模型组	1.23±0.05 ^{##}	5.11±0.16 ^{##}
秋水仙碱组	1.12±0.03 [*]	4.79±0.12 [*]
SBD 低剂量组	1.16±0.04 [*]	4.92±0.11 [*]
SBD 高剂量组	1.14±0.02 [*]	4.88±0.14 [*]

注: ^{##} $P < 0.01$, 与正常组比较; ^{*} $P < 0.05$, 与模型组比较

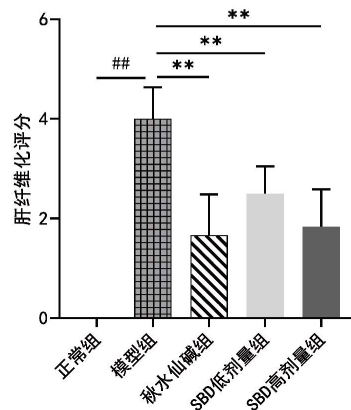
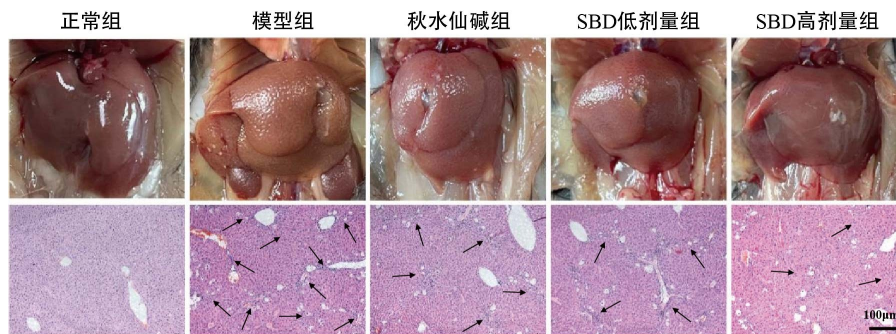


图 1 各组小鼠肝外观形态及组织 HE 染色结果 (100×)

Fig. 1 Appearance and morphology of mouse liver and tissue HE staining results in each group (100×)

注: ^{##} $P < 0.01$, 与正常组比较; ^{**} $P < 0.01$, 与模型组比较

2.2 SBD 对 CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠肝脏胶原纤维沉积的影响

通过 Masson 染色检测小鼠肝脏胶原分布, 如图 2 结果显示, 正常组小鼠肝脏细胞排列整齐, 具有正常

的肝脏结构; 模型组小鼠的肝脏细胞排列紊乱, 肝细胞大面积坏死, 肝小叶结构紊乱, 主要在门脉周围区域形成明显肝纤维瘢痕区域, 早期纤维化隔膜发展为细纤维化, 肝脏纤维化面积为 7.66%; SBD 高剂量组

小鼠肝脏纤维化面积为 2.40%,SBD 低剂量组小鼠肝脏纤维化面积为 5.14%,秋水仙碱组小鼠肝脏纤维化面积为 2.01%,均较模型组显著降低 ($P < 0.01, P < 0.05, P < 0.01$),同时秋水仙碱组、SBD 高剂量组及 SBD 低剂量组小鼠较模型组肝细胞坏死和肝小叶结构紊乱情况有所改善,纤维间隔明显减少说明 SBD 对小鼠慢性肝损伤模型有一定的保护效果。

2.3 SBD 对 CCl_4 诱导的肝纤维化小鼠纤维化标志物 α -SMA 表达的影响

α -SMA 是 HSC 活化的生物标志物之一,其大量表达导致细胞外基质沉积,加速慢性肝损伤发展为肝纤维化,模型组中 α -SMA 阳性细胞表达较正常组显著增多 ($P < 0.01$);相较于模型组,SBD 高剂量组、SBD 低剂量组以及秋水仙碱组小鼠肝脏中 α -SMA 阳性细胞表达显著下降 ($P < 0.01, P < 0.05, P < 0.01$) 见图 2.说明经 SBD 干预后,HSC 活化被显著抑制,同时抑制了小鼠体内由 CCl_4 引起的肝损伤向肝纤维化发展进程。

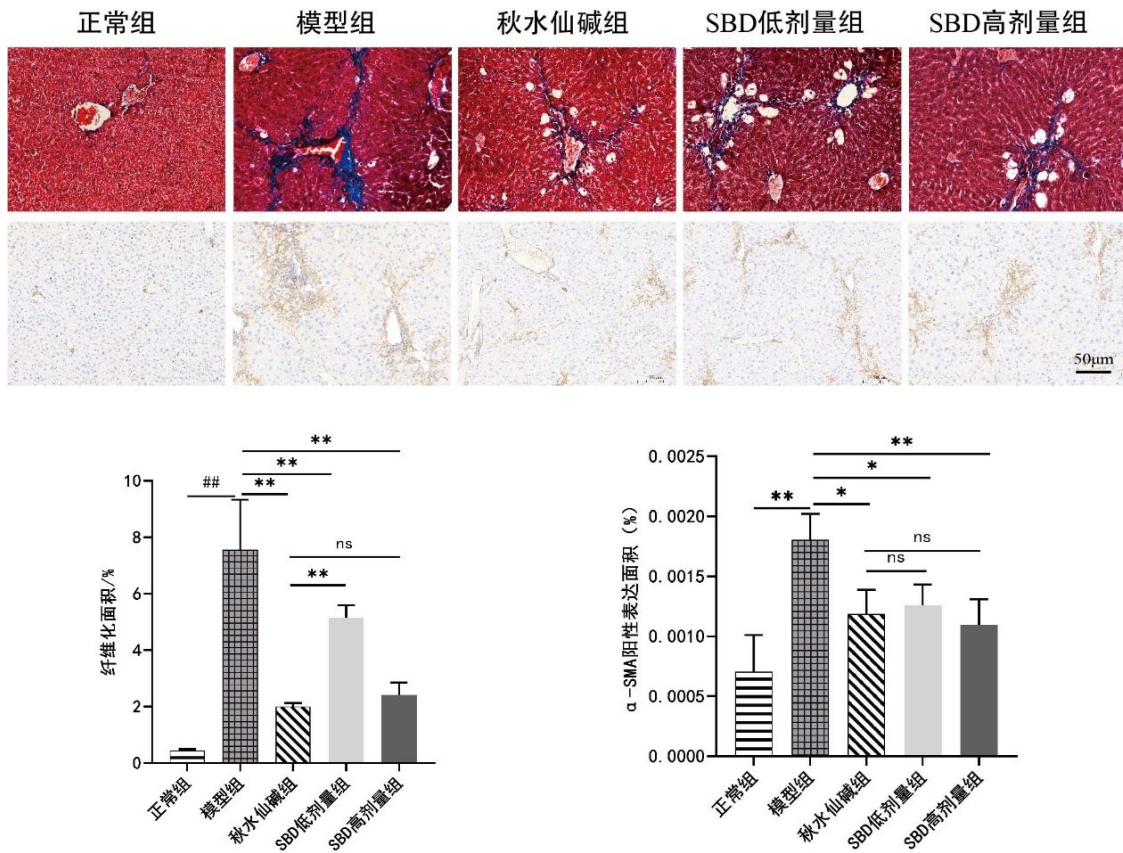


图 2 各组小鼠肝脏胶原纤维分布及肝中 α -SMA 表达的情况 (200 \times)

Fig. 2 Distribution of collagen fibers in the liver and expression of α -SMA in the liver of mice in each group(200 \times)

注: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$,与正常组比较; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,与模型组比较.下同

2.4 SBD 对 CCl_4 诱导的肝纤维化小鼠血清 AST 和 ALT 活性的影响

如表 3 所示,与正常组相比较,模型组小鼠血清中 ALT 和 AST 的活性明显升高 ($P < 0.01$);秋水仙碱组、SBD 高剂量组及 SBD 低剂量组小鼠血清中 ALT 和 AST 的活性较模型组明显下降 ($P < 0.01, P < 0.01, P < 0.05$).表明 SBD 可以降低 CCl_4 诱导的肝纤维化小鼠血清中 ALT 和 AST 的活性,改善肝功能。

表 3 小鼠血清中 AST 和 ALT 活性的比较 ($\bar{X} \pm S, n = 10$)

Table 3 Comparison of AST and ALT activity in mouse of serum ($\bar{X} \pm S, n = 10$)

分组	ALT(U/L)	AST(U/L)
正常组	16.99 \pm 2.61	20.64 \pm 4.59
模型组	205.07 \pm 9.03##	114.82 \pm 27.08##
秋水仙碱组	110.50 \pm 13.41**	39.87 \pm 5.06**
SBD 低剂量组	163.71 \pm 7.40*	73.93 \pm 6.04*
SBD 高剂量组	113.68 \pm 18.31**	47.92 \pm 4.40**

2.5 SBD 对 CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠肝细胞凋亡、氧化应激的影响

TUNEL 染色用于检测肝纤维化小鼠肝细胞的凋亡状况.如图 3 所示,模型组小鼠肝脏中发生凋亡的肝细胞数量明显高于正常组($P < 0.01$),结果表明长

期注射 CCl₄ 已引起小鼠肝细胞凋亡.给予 SBD 及秋水仙碱治疗后,SBD 高剂量组、SBD 低剂量组以及秋水仙碱组小鼠肝细胞凋亡数量较模型组显著减少($P < 0.01$),表明 SBD 可抑制 CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠肝细胞凋亡.

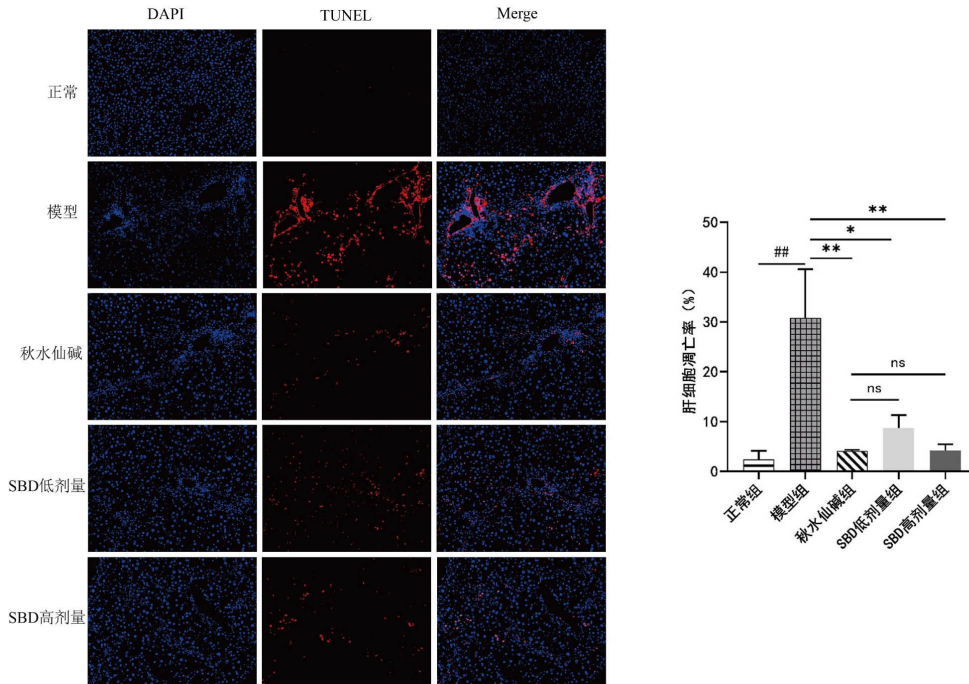


图 3 各组小鼠肝中肝细胞的凋亡情况 (200×)

Fig. 3 Apoptosis of hepatocytes in the liver of mice in each group (200×)

MDA 是脂质过氧化的终产物,可以间接反映肝脏自由基损伤的程度,同时抗氧化防御系统中 GSH 可以保护肝细胞免受氧化损伤,通过清除脂质过氧化物和氧自由基,保护肝细胞免受 ROS 损伤,结果如图 4 所示,模型组小鼠肝脏 MDA 含量较正常组显著升高($P < 0.01$),而经秋水仙碱及 SBD 高剂量和 SBD 低剂量治疗后的

小鼠肝脏中的 MDA 含量较模型组显著下降($P < 0.01, P < 0.01, P < 0.05$);模型组小鼠肝脏中的 GSH 含量较正常组显著下降($P < 0.01$),而秋水仙碱组、SBD 高剂量组和 SBD 低剂量组小鼠肝脏中 GSH 含量较模型组明显升高($P < 0.01, P < 0.01, P < 0.05$).表明 SBD 可能通过抗氧化应激减轻小鼠由 CCl₄ 引起的肝纤维化.

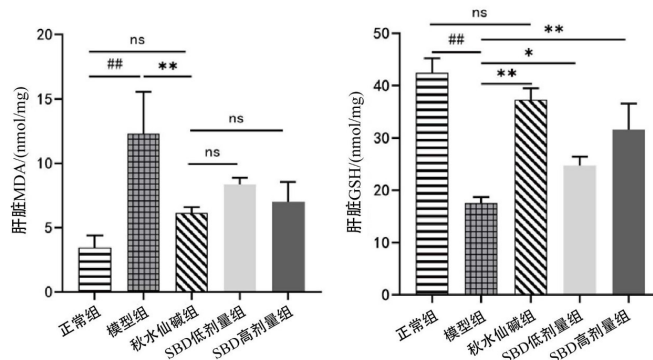


图 4 各组小鼠肝组织中 MDA 和 GSH 含量 (n = 6)

Fig. 4 The MDA and GSH level in liver tissue of mice in each group (n = 6)

2.6 SBD 对 CCl₄ 诱导肝纤维化小鼠肝脏及血液中 MDSCs 募集的影响

有研究表明 MDSCs 是肝脏免疫稳态重建的重要驱动因素^[18],如图 5 所示,模型组小鼠肝脏 MDSCs 平均百分比(5.20±0.74)%,相较于正常组 MDSCs 平均百分比(2.29±0.17)%显著升高($P<0.01$),给予高剂量 SBD 治疗后,小鼠肝脏 MDSCs 平均百分比降为(3.4±0.39)%,较模型组显著下降($P<0.05$).模型组小鼠血液 MDSCs 平均百分比为(32.8±1.98)%,相

于正常组平均百分比(21.34±1.14)%显著升高($P<0.01$),经 SBD 治疗后,小鼠血液 MDSCs 在 SBD 高剂量中降为(24.50±2.64)%,在 SBD 低剂量组中降为(25.08±3.17)%,均较模型组有差异且具有统计学意义($P<0.01, P<0.01$),秋水仙碱组小鼠肝脏及血液 MDSCs 较模型组降低但无显著性差异($P>0.05$).以上结果表明,在肝纤维化形成过程中 SBD 可能通过抑制 MDSCs 的向肝脏的募集来保护肝脏.

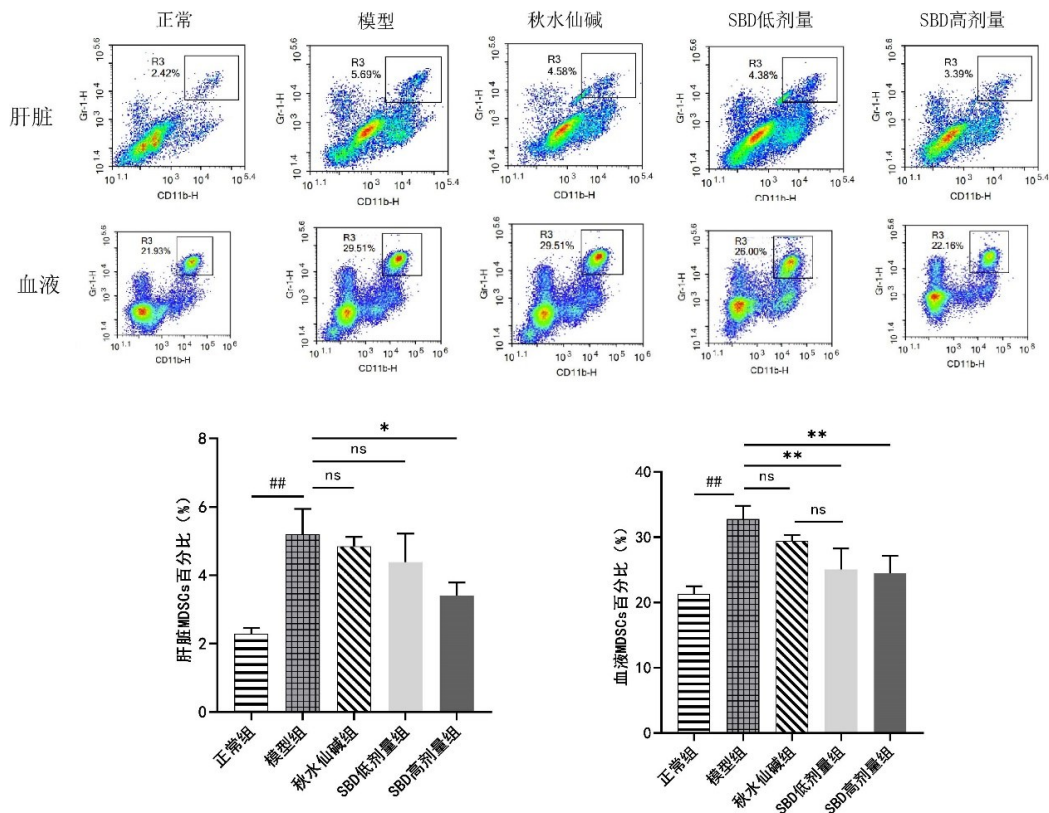


图 5 各组小鼠肝、血液 MDSCs 流式细胞图及百分比 (n=6)

Fig. 5 Flow cytometry figure and percentage of liver and blood MDSCs in each group of mice (n=6)

2.7 SBD 对 CCl₄ 诱导肝纤维化小鼠肝及血液中 CD4⁺T 和 CD8⁺T 淋巴细胞比例的影响

如图 6 所示,模型组小鼠肝脏中 CD4⁺T 淋巴细胞的平均百分比为(4.12±0.83)%,相比正常组平均百分比(7.35±0.81)%显著下降($P<0.01$),给予高剂量 SBD、低剂量 SBD 及秋水仙碱后,小鼠肝脏 CD4⁺T 淋巴细胞的平均百分比上升为(4.98±0.38)%、(4.73±0.27)%、(4.45±0.79)%,较模型组有差异但不具有统计学意义($P>0.05$).

模型组小鼠肝脏中 CD8⁺T 淋巴细胞的平均百分

比为(5.21±1.53)%,相比正常组平均百分比(8.34±0.30)%显著下降($P<0.01$),给予高剂量 SBD、低剂量 SBD 及秋水仙碱后,小鼠肝脏中 CD8⁺T 淋巴细胞的平均百分为(13.31±1.14)%、(11.37±0.84)%、(10.44±1.06)%,较模型组显著升高($P<0.01, P<0.05, P<0.05$).

模型组小鼠血液中 CD4⁺T 淋巴细胞百分比(17.50±2.26)%,较正常组小鼠血液中的 CD4⁺T 淋巴细胞百分比(31.41±1.25)%显著下降($P<0.01$),给予高剂量 SBD 后,小鼠血液中 CD4⁺T 淋巴细胞占

比(22.61±1.35)%,较模型组显著上升($P<0.05$),而给予低剂量 SBD 及秋水仙碱后,小鼠血液中 CD4⁺T 淋巴细胞占比分别为(19.21±1.08)%和(16.07±1.67)%,较模型组上升但无显著性差异($P>0.05$, $P>0.05$).

模型组小鼠血液中 CD8⁺T 淋巴细胞百分比(10.67±1.73)%,较正常组小鼠(17.52±2.27)%显著下降($P<0.05$),给予高剂量 SBD 后,小鼠血液中 CD8⁺T 淋巴细胞百分比(16.19±2.19)%较模型组显

著上升($P<0.05$),但给予低剂量 SBD 及秋水仙碱后,小鼠血液中 CD8⁺T 淋巴细胞占比分别为(15.26±1.74)%和(14.03±1.38)%,较模型组上升但无显著性差异($P>0.05$, $P>0.05$).以上实验结果表明,由 CCl₄ 诱导的肝纤维化降低小鼠的 T 淋巴细胞,而经 SBD 作用后升高小鼠肝脏的 T 淋巴细胞,尤其是升高 CD8⁺T 淋巴细胞平均百分比,同时 SBD 还可以通过显著升高小鼠血液中的 T 淋巴细胞,提高小鼠适应性免疫力,保护肝脏.

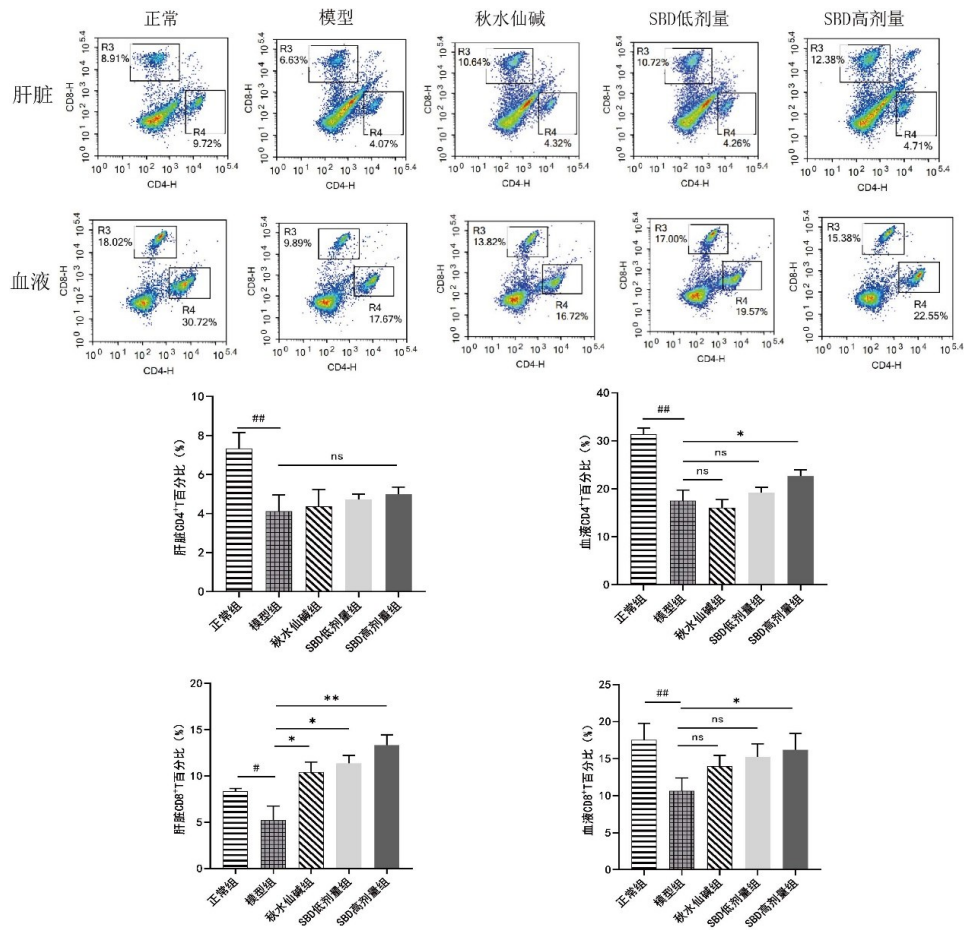


图 6 各组小鼠肝、血液 CD4⁺T 和 CD8⁺T 流式细胞图及百分比 (n=6)

Fig. 6 Flow cytometry figure and percentage of liver and blood CD4⁺T and CD8⁺T in each group of mice (n=6)

2.8 SBD 对 CCl₄ 诱导肝纤维化小鼠肝脏 MDSCs 相关炎症因子水平的影响

MDSCs 可通过分泌多种细胞因子发挥免疫抑制作用,如 IL-6、IL-1β、IL-10 和 TGF-β1 等.如图 7 所示,与正常组相比,模型组小鼠肝脏中的炎症因子 IL-6、IL-1β 和 TGF-β1 水平显著升高($P<0.01$),抗炎因子 IL-10 水平也升高($P<0.05$);与模型组相比,秋水仙碱组、SBD 高剂量组小鼠肝脏中的 IL-1β 水平显著降

低($P<0.01$, $P<0.01$),SBD 低剂量组小鼠肝脏中的 IL-1β 水平与模型组无显著性差异($P>0.05$).同时与模型组相比,秋水仙碱组、SBD 高剂量组、SBD 低剂量组小鼠肝脏中 IL-6 的水平显著降低($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.05$),TGF-β1 的水平显著降低($P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.05$),抗炎因子 IL-10 水平显著升高($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.05$).提示 SBD 可能通过调控炎症因子表达来减轻 CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠肝脏炎症.

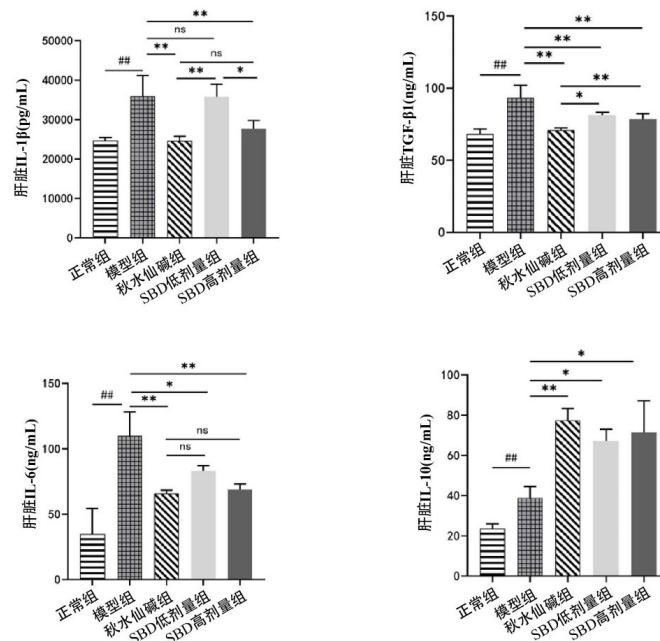
图 7 小鼠肝组织中 IL-6、IL-10、IL-1 β 、TGF- β 1 表达水平 ($n=6$)

Fig. 7 Expression level of IL-6, IL-10, IL-1 β , and TGF- β 1 in liver tissue of mice ($n=6$)

3 讨论

肝纤维化是由多种肝脏疾病引起的慢性肝损伤,若未得到有效治疗,最终可能发展为肝衰竭、肝硬化,甚至肝细胞癌^[19-20].至今临床上尚无治疗肝纤维化的有效药物.

中药具有多渠道、多层次、多靶点的综合药理作用,因此从中药中寻找和发现抗纤维化药物已成为一个研究热点.有研究表明源自中药的天然产物,如生物碱、黄酮、醌类、萜类、皂苷、苯丙醇和多糖等具有显著的抗纤维化效应^[9].SBD 是一种民间验方,多用于肝脏疾病的治疗.前期研究通过质谱定性发现 SBD 中含有酚酸类、黄酮类、三萜类等 40 个化学成分^[21].其中槲皮素、木犀草素、山奈酚等多种化合物具有抗癌、抗炎、调节免疫等作用^[22-23].

本实验通过 CCl₄ 建立小鼠肝纤维化模型,研究 SBD 抗肝纤维化作用,并探讨其可能的作用机制.实验结果显示在经 CCl₄ 诱导后小鼠肝脏有大量胶原纤维沉积,在门脉周围区域形成明显肝纤维瘢痕区域,表明肝纤维化模型复制成功.在经 SBD 干预后,小鼠肝组织病理损伤、炎症浸润和胶原沉积等问题得到明显改善,血清中 AST 和 ALT 活性较模型组显著下降,说明 SBD 对 CCl₄ 诱导的小鼠肝纤维化具有较好的保护作用.

肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSCs) 在肝纤维化的进展中起着关键作用,肝损伤会引起 HSCs 激活,同时 HSCs 激活使得 α 平滑肌肌动蛋白 (alpha-smooth muscle actin, α -SMA) 表达增加.因此, α -SMA 被认为是评估 HSCs 活化和增殖的重要标志物^[24-25].本实验研究显示,经 SBD 干预后,肝脏中 α -SMA 表达量较模型组明显减少.

有研究表明黄芪可通过调节肝星状细胞的活化和凋亡来缓解肝纤维化,通过抑制肝细胞凋亡发挥抗纤维化作用^[26-27].这提示抑制肝细胞凋亡可能是减轻肝纤维化的一种重要途径,本实验研究显示 SBD 可显著抑制肝细胞凋亡.

由 CCl₄ 诱导的氧化应激,被认为是肝损伤和纤维化的主要原因.抗氧化防御系统中的谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 是主要的抗氧化剂之一,它可以通过清除脂质过氧化物和氧自由基,保护肝细胞免受活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 损伤^[28].本实验结果显示模型组小鼠肝脏中的 GSH 显著降低,表明小鼠肝脏中的抗氧化系统被破坏,肝细胞受到严重的氧化损伤,而这种损伤通常会伴随着脂质氧化和过氧化物的产生,其中丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 是典型的脂质过氧化物之一^[29],本实验结果显示模型组小鼠肝脏中 MDA 显著升高,给予 SBD 治疗后,小鼠肝脏

中 MDA 显著降低。

MDSCs 是一种免疫抑制细胞,具有很强的免疫调控作用,有研究表明,MDSCs 与急慢性肝炎、肝纤维化、肝癌等多种肝脏疾病密切相关^[14-16,30-32]。先前研究发现在免疫性肝损伤和肝癌模型上,SBD 能够靶向抑制 MDSCs,治疗免疫性肝损伤和肝癌肺转移^[17]。在体外模型中,SBD 可抑制 IL-6 和 GM-CSF 诱导的 MDSCs 的增殖和分化^[10]。T 细胞是参与适应性免疫系统的关键淋巴细胞^[33]。MDSCs 可通过不同的方式对 T 细胞发挥抑制作用,包括抑制 T 细胞活化和增殖,诱导 T 细胞功能失活,通过诱导细胞凋亡消耗 T 细胞等^[34-36]。有研究表明 CD4⁺T 和 CD8⁺T 淋巴细胞参与 CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠的免疫反应^[37]。另有研究发现当小鼠肝脏发生纤维化时,机体会处于免疫耐受状态,纤维化组织中的 CD4⁺T 淋巴细胞比例会下降,MDSCs 比例会升高^[38]。在肝硬化模型中 CD4⁺T 淋巴细胞和 CD8⁺T 淋巴细胞减少^[39]。本研究发现在给予 SBD 后,小鼠肝脏及血液中 MDSCs 平均百分比比较模型组显著下降 ($P < 0.01$)。提示 SBD 能显著改善由 CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠肝脏和血液中 MDSCs 的聚集。同时发现在给予 SBD 后,小鼠肝脏及血液中 T 淋巴细胞较模型组上升,其中肝脏中的 CD8⁺T 淋巴细胞平均百分比显著升高 ($P < 0.01$),血液中 CD4⁺T 和 CD8⁺T 淋巴细胞平均百分比都显著上升 ($P < 0.05$)。

此外 MDSCs 还可通过调节多种细胞因子发挥免疫抑制作用,如 IL-6、IL-1 β 、IL-10 和 TGF- β 1 等。IL-6 和 IL-1 β 是 MDSCs 扩增和募集的重要触发因素,MDSCs 还可以通过 IL-10 和 TGF- β 1 抑制 T 细胞的作用^[40-42]。因此本研究进一步检测了肝脏中这些因子的表达。在经 SBD 处理后发现小鼠肝脏中的 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.01$),IL-1 β 和 TGF- β 1 的水平明显降低 ($P < 0.05$),抗炎因子 IL-10 水平显著升高 ($P < 0.01$)。其中,IL-10 作为炎症的重要调节因子,可以抑制 IL-6、IL-1 β 等促炎因子的表达,从而缓解炎症损伤。其可由先天性免疫系统和适应性免疫系统的大多数细胞产生,包括单核细胞、巨噬细胞、NK 细胞、B 细胞和 T 细胞^[43]。在肝脏中,当肝细胞受到感染或损伤时,肝细胞会激活先天免疫和适应性免疫,从而释放像 IL-10 等抗炎因子来保护炎症损伤^[44]。因此在本研究用 CCl₄ 诱导的肝纤维化模型中,IL-10 的水平上调,

而经过 SBD 作用后,CD4⁺T 和 CD8⁺T 淋巴细胞的表达升高,IL-10 的水平进一步上调。

综上所述,SBD 具有抗肝纤维化作用,可能通过抑制肝脏 MDSCs 的免疫抑制作用,升高小鼠肝脏和血液中的 CD4⁺T 淋巴细胞和 CD8⁺T 淋巴细胞,提高小鼠免疫力,减轻肝脏氧化应激和炎症反应,减少胶原沉积,恢复肝功能,进而减轻肝纤维化。

参考文献

- [1] LI B W, WANG H, ZHANG Y D, et al. Current perspectives of neuroendocrine regulation in liver fibrosis[J]. *Cells*, 2022, 11(23): 3783.
- [2] KISSELEVA T, BRENNER D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2021, 18(3): 151-166.
- [3] LI J H, DENG X L, WANG S H, et al. Resolvin D1 attenuates CCl₄ induced liver fibrosis by inhibiting autophagy-mediated HSC activation via AKT/mTOR pathway[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 792414.
- [4] WU H, CHEN G Y, WANG J Y, et al. TIM-4 interference in kupffer cells against CCL4-induced liver fibrosis by mediating Akt1/Mitophagy signalling pathway[J]. *Cell Proliferation*, 2020, 53(1): e12731.
- [5] IREDALE J, CAMPANA L. Regression of liver fibrosis[J]. *Seminars in Liver Disease*, 2017, 37(1): 1-10.
- [6] HOFMANN J, HACKL V, ESSER H, et al. Cell-based regeneration and treatment of liver diseases[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(19): 10276.
- [7] DANIYAL M, AKRAM M, ZAINAB R, et al. Prevalence and current therapy in chronic liver disorders[J]. *Inflammopharmacology*, 2019, 27(2): 213-231.
- [8] LI W Q, LIU W H, QIAN D, et al. Traditional Chinese medicine: An important source for discovering candidate agents against hepatic fibrosis[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 962525.
- [9] SHAN L, LIU Z N, CI L L, et al. Research progress on the anti-hepatic fibrosis action and mechanism of natural products[J]. *International Immunopharmacology*, 2019, 75: 105765.
- [10] 何虹丹. 基于网络药理学探讨复方 SC01 的物质基础及对 MDSCs 的调节作用[D]. 成都: 西南民族大学, 2022.
- [11] CRIPPS J G, WANG J, MARIA A, et al. Type 1 T helper cells induce the accumulation of myeloid-derived suppressor cells in the inflamed Tgfb1 knockout mouse liver[J]. *Hepatology*, 2010, 52(4): 1350-1359.
- [12] JOYCE D, FUJINO M, MORITA M, et al. Induced pluripotent stem cells-derived myeloid-derived suppressor cells regulate the CD8⁺T cell response[J]. *Stem Cell Research*, 2018, 29: 32-41.
- [13] SEHGAL R, KAUR N, RAMAKRISHNA G, et al. Immune surveillance by myeloid-derived suppressor cells in liver diseases[J]. *Digestive Diseases*, 2022, 40(3): 301-312.
- [14] LI T Y, YANG Y, ZHOU G, et al. Immune suppression in chronic hepatitis B infection associated liver disease: A review[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2019, 25(27): 3527-3537.

- [15] LIU H, LING C C, YEUNG W H O, et al. Monocytic MDSC mobilization promotes tumor recurrence after liver transplantation via CXCL10/TLR4/MMP14 signaling[J]. *Cell Death & Disease*, 2021, 12(5): 489.
- [16] ZHOU J Y, LIU M, SUN H Y, et al. Hepatoma-intrinsic CCRK inhibition diminishes myeloid-derived suppressor cell immunosuppression and enhances immune-checkpoint blockade efficacy[J]. *Gut*, 2018, 67(5): 931-944.
- [17] 吉胡日布, 彭靖兰, 李亚南, 等. 中药复方 SC01 联合环磷酰胺抑制肝癌肺转移作用及机制研究[J]. *西南民族大学学报(自然科学版)*, 2023, 49(2): 156-164.
- [18] TUO Y L, ZHANG Z J, TIAN C, et al. Anti-inflammatory and metabolic reprogramming effects of MENK produce antitumor response in CT26 tumor-bearing mice[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2020, 108(1): 215-228.
- [19] BLAYA D, AGUILAR-BRAVO B, HAO F J, et al. Expression of microRNA-155 in inflammatory cells modulates liver injury[J]. *Hepatology*, 2018, 68(2): 691-706.
- [20] DONG G, MA M, LIN X H, et al. Treatment-damaged hepatocellular carcinoma promotes activities of hepatic stellate cells and fibrosis through GDF15[J]. *Experimental Cell Research*, 2018, 370(2): 468-477.
- [21] 刘香易, 曾锐, 杨长传, 等. 基于 UPLC-ESI-HRMSⁿ 技术的三草保肝汤化学成分分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(7): 141-147.
- [22] 孙佳, 赵冬耕, 王明艳, 等. 槲皮素对 SMMC-7721 肝癌细胞 PI3K/AKT 信号通路影响的探讨[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(18): 223-226.
- [23] 钟晨. 鞣花酸抑制肝癌的分子机制及其与两种化疗药物协同作用的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2019.
- [24] DING Q, LI Z, LIU B, et al. Propranolol prevents liver cirrhosis by inhibiting hepatic stellate cell activation mediated by the PDGFR/Akt pathway[J]. *Human Pathology*, 2018, 76: 37-46.
- [25] GRACIA-SANCHO J, MAESO-DIAZ R, FERNANDEZ-IGLESIAS A, et al. New cellular and molecular targets for the treatment of portal hypertension[J]. *Hepatology International*, 2015, 9(2): 183-191.
- [26] DU X S, LI H D, YANG X J, et al. Wogonin attenuates liver fibrosis via regulating hepatic stellate cell activation and apoptosis[J]. *International Immunopharmacology*, 2019, 75: 105671.
- [27] KURDI A, HASSAN K, VENKATARAMAN B, et al. Nootkatone confers hepatoprotective and anti-fibrotic actions in a murine model of liver fibrosis by suppressing oxidative stress, inflammation, and apoptosis[J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2018, 32(2): e22017.
- [28] GLADE M J, MEGUID M M. A Glance At ethanol consumption, GSH suppression, and oxidative liver damage[J]. *Nutrition*, 2017, 33: 199-203.
- [29] TIMOUMI R, AMARA I, NEFFATI F, et al. Acute triflumuron exposure induces oxidative stress responses in liver and kidney of Balb/C mice[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26(4): 3723-3730.
- [30] HSIEH C C. Hepatic immune tolerance induced by hepatic stellate cells[J]. *World Journal Of Gastroenterology*, 2015, 21(42): 11887-11892.
- [31] LIU G Y, WANG Q Y, DENG L J, et al. Hepatic RACK1 deficiency protects against fulminant hepatitis through myeloid-derived suppressor cells[J]. *Theranostics*, 2022, 12(5): 2248-2265.
- [32] LIU M, ZHANG H X, ZHANG L, et al. RIP3 blockade prevents immune-mediated hepatitis through a myeloid-derived suppressor cell dependent mechanism[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2022, 18(1): 199-213.
- [33] SHEN H, SHENG L, XIONG Y, et al. Thymic NF-kappaB-inducing kinase regulates CD4⁺T cell-elicited liver injury and fibrosis in mice[J]. *Journal of Hepatology*, 2017, 67(1): 100-109.
- [34] CONSONNI F M, PORTA C, MARINO A, et al. Myeloid-derived suppressor cells; Ductile targets in disease[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 949.
- [35] GABRILOVICH D I, NAGARAJ S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9(3): 162-174.
- [36] GROTH C, HU X Y, WEBER R, et al. Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) during tumour progression[J]. *British Journal of Cancer*, 2019, 120(1): 16-25.
- [37] WANG Y N, YANG Z Y, WEI Y, et al. Apolipoprotein A4 regulates the immune response in carbon tetrachloride-induced chronic liver injury in mice[J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 90: 107222.
- [38] 郭全娟. CRISPR/Cas9 基因编辑技术及尼莫地平对肝脏疾病的治疗研究[D]. 济南: 山东大学, 2018.
- [39] RAMACHANDRAN P, DOBIE R, WILSON-KANAMORI J R, et al. Resolving the fibrotic niche of human liver cirrhosis at single-cell level[J]. *Nature*, 2019, 575(7783): 512-518.
- [40] BALLBACH M, DANNERT A, SINGH A, et al. Expression of checkpoint molecules on myeloid-derived suppressor cells[J]. *Immunology Letters*, 2017, 192: 1-6.
- [41] TENGESDAL I W, MENON D R, OSBORNE D G, et al. Targeting tumor-derived NLRP3 reduces melanoma progression by limiting MDSCs expansion[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(10): e2000915118.
- [42] ZHANG W W, JIANG M M, CHEN J Y, et al. SOCS3 suppression promoted the recruitment of CD11b(+) Gr-1(-) F4/80(-) MHCII(-) early-stage myeloid-derived suppressor cells and accelerated interleukin-6-related tumor invasion via affecting myeloid differentiation in breast cancer[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 1699.
- [43] NEUMANN C, SCHEFFOLD A, RUTZ S. Functions and regulation of T cell-derived interleukin-10[J]. *Seminars in Immunology*, 2019, 44: 101344.
- [44] AN S Y, PETRESCU A D, DEMORROW S. Targeting certain interleukins as novel treatment options for liver fibrosis[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 645703.

(责任编辑: 和力新, 殷锋, 付强, 张阳, 肖丽; 英文编辑: 周序林, 郑玉才)