

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230058

· 论 著 ·

五灵胶囊对刀豆蛋白 A 诱导自身免疫性肝炎小鼠的保护作用

陈琳¹, 曹凡², 宋忠兴¹, 孔鑫², 唐志书^{1,3*}, 刘红娜⁴, 周建平⁴, 曹兆军⁴

1. 陕西省中药资源产业化协同创新中心, 秦药特色资源研究开发国家重点实验室(培育), 陕西省创新药物研究中心, 陕西中医药大学, 咸阳 712083

2. 陕西中医药大学药学院, 西安 712046

3. 北京中医药大学, 北京 100105

4. 清华德人西安幸福制药有限公司, 西安 710043

[摘要] **目的** 探讨五灵胶囊对自身免疫性肝炎(AIH)小鼠的保护作用。**方法** 小鼠随机分为对照组、AIH模型组、五灵胶囊低剂量组($0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、五灵胶囊中剂量组($1.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、五灵胶囊高剂量组($2.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), 每组10只。五灵胶囊各剂量组按 10 mL/kg 的体积灌胃给予五灵胶囊混悬液, 每天1次; 对照组和AIH模型组灌胃给予等体积生理盐水。给药14 d后, AIH模型组和五灵胶囊各剂量组小鼠尾静脉注射刀豆蛋白A(20 mg/kg), 注射8 h后收集血清、肝脏和脾脏。采用全自动生化分析仪检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)水平, 用H-E染色观察肝组织病理结构, 用ELISA法测定肝组织中IL-6、IL-4和TNF- α 含量, 用qPCR法测定肝组织中IL-6、IL-4、TNF- α 、Toll样受体4(TLR4)和NF- κ B mRNA的相对表达量, 用免疫荧光法分析肝组织中NF- κ B p65蛋白表达和核移位情况。**结果** 与对照组相比, AIH模型组小鼠肝脏形态结构异常, 血清ALT和AST水平升高, 肝组织中IL-4、IL-6和TNF- α 含量升高, 肝组织中IL-6、IL-4、TNF- α 、TLR4和NF- κ B mRNA的相对表达量上调, NF- κ B p65的入核增加。五灵胶囊明显改善AIH模型小鼠的肝脏病理结构, 降低血清ALT和AST水平, 降低肝组织中IL-4、IL-6和TNF- α 含量及TLR4、NF- κ B、IL-4、IL-6 mRNA的相对表达量, 并抑制NF- κ B p65的入核激活。**结论** 五灵胶囊对AIH小鼠具有明显的保护作用, 其机制可能与TLR4/NF- κ B信号通路有关。

[关键词] 五灵胶囊; 刀豆蛋白A; 自身免疫性肝炎; Toll样受体4; 核因子 κ B

[引用本文] 陈琳, 曹凡, 宋忠兴, 等. 五灵胶囊对刀豆蛋白A诱导自身免疫性肝炎小鼠的保护作用[J]. 海军军医大学学报, 2025, 46(1): 65-71. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230058.

Protective effects of *Wuling* capsule on concanavalin A-induced autoimmune hepatitis mice

CHEN Lin¹, CAO Fan², SONG Zhongxing¹, KONG Xin², TANG Zhishu^{1,3*}, LIU Hongna⁴, ZHOU Jianping⁴, CAO Zhaojun⁴

1. Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicine Resources Industrialization, State Key Laboratory of Research and Development of Characteristic *Qin* Medicine Resources (Cultivation), Shaanxi Innovative Drug Research Center, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, Shaanxi, China

2. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, Shaanxi, China

3. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100105, China

4. Tsinghua Deren Xi'an Happiness Pharmaceutical Co., Ltd., Xi'an 710043, Shaanxi, China

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effects of *Wuling* capsule on mice with autoimmune hepatitis (AIH). **Methods** Mice were randomly divided into control group, AIH model group, *Wuling* capsule low-dose group ($0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), *Wuling* capsule middle-dose group ($1.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), and *Wuling* capsule high-dose group ($2.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), with 10 mice in each group. The *Wuling* capsule groups were administered with *Wuling* capsule suspension of different doses orally at a

[收稿日期] 2023-02-17 **[接受日期]** 2024-02-20

[基金项目] 国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-21), 中药大品种品牌价值提升示范研究项目(202190025), 陕西省科技厅重点研发计划项目(2024SF-YBXM-458), 陕西省教育厅重点科学研究计划项目(22JY019), 咸阳市2020重大科技专项项目(2020K01-20), 陕西高校青年创新团队项目(2023). Supported by Project of National Modern Agricultural Industrial Technology System (CARS-21), Demonstration Research Project on Brand Value Enhancement of Large Chinese Medicine Varieties (202190025), Key Research and Development Project of Science and Technology Department of Shaanxi Province (2024SF-YBXM-458), Key Project of Scientific Research of Education Department of Shaanxi (22JY019), 2020 Major Science and Technology Project of Xianyang (2020K01-20), and Shaanxi University Youth Innovation Team Project (2023).

[作者简介] 陈琳, 博士, 副教授. E-mail: chanlin24@sina.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 029-38182201, E-mail: tzs6565@163.com

volume of 10 mL/kg once daily; the control group and AIH model group were given the same volume of saline by gavage. After 14 d of administration, mice in the AIH model group and *Wuling* capsule groups were injected with concanavalin A (20 mg/kg) via the tail vein, and the serum, liver, and spleen were collected 8 h after injection. Serum alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) levels were measured using an automatic biochemical analyzer; hematoxylin-eosin staining was used to observe the pathological structure of the liver tissue; the contents of interleukin (IL)-6, IL-4, and tumor necrosis factor (TNF)- α in liver were determined by enzyme-linked immunosorbent assay, and quantitative polymerase chain reaction was used to determine the relative mRNA expression levels of *IL-6*, *IL-4*, *TNF- α* , Toll-like receptor 4 (*TLR4*), and nuclear factor κ B (*NF- κ B*) in the liver. Fluorescence immunoassay was used to analyze the expression and nuclear translocation of NF- κ B p65 protein in the liver. **Results** Compared with the control group, the AIH model group showed abnormal liver morphology and structure, increased serum ALT and AST levels, increased contents of IL-4, IL-6, and TNF- α in the liver, upregulated mRNA expression levels of *IL-6*, *IL-4*, *TNF- α* , *TLR4*, and *NF- κ B* in the liver, and increased nuclear entry of NF- κ B p65. *Wuling* capsule significantly improved the pathological structure of the liver in AIH mice, reduced serum ALT and AST levels, decreased the contents of IL-4, IL-6, and TNF- α in the liver and the mRNA expression levels of *TLR4*, *NF- κ B*, *IL-4*, *IL-6*, and inhibited the nuclear activation of NF- κ B p65. **Conclusion** *Wuling* capsule has significant protective effects on AIH mice, which may be related to the TLR4/NF- κ B signaling pathway.

[**Key words**] *Wuling* capsule; concanavalin A; autoimmune hepatitis; Toll-like receptor 4; nuclear factor κ B

[**Citation**] CHEN L, CAO F, SONG Z, et al. Protective effects of *Wuling* capsule on concanavalin A-induced autoimmune hepatitis mice[J]. Acad J Naval Med Univ, 2025, 46(1): 65-71. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230058.

自身免疫性肝炎 (autoimmune hepatitis, AIH) 是一种由免疫系统介导的肝细胞疾病, 主要病理改变是肝组织中大量炎症细胞浸润^[1]。若不进行及时有效治疗, AIH 可进一步发展为肝纤维化、肝硬化、肝癌等。目前对于 AIH 的防治尚缺乏有效药物, 临床主要用硫唑嘌呤、糖皮质激素等药物缓解患者肝脏炎症, 但长期使用存在严重不良反应^[2]。中药有多功能、多靶点的作用特点, 对 AIH 的防治具有显著优势。五灵胶囊是药理作用明确的保肝药物, 由丹参、柴胡、五味子、灵芝四味药材组成, 被收录入 2020 版《中华人民共和国药典》, 具有疏肝、健脾、活血之功效, 用于慢性乙型肝炎肝郁脾虚挟瘀证^[3]。研究表明, 五灵胶囊可降低脂多糖诱导肝损伤小鼠的 IL-6、IL-8、TNF- α 水平及 TNF- α 、CD14 表达强度; 五灵胶囊抑制各种诱因导致肝实质与非实质细胞释放大量细胞因子是其治疗肝损伤的机制之一^[4]。本研究以刀豆蛋白 A (concanavalin A, Con A) 诱导 AIH 模型, 探究五灵胶囊对 AIH 小鼠的保护作用, 为其临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物、药品和试剂 雄性 BALB/c 小鼠, 体重 (18 $\pm$ 2) g, 6~8 周龄, 由成都达硕实验动物中心提供, 动物生产许可证号为 SCXK (川) 2020-

030。自由摄食及饮水, 饲养环境温度 (21 $\pm$ 3) $^{\circ}$ C、相对湿度 (50 $\pm$ 5) %, 照明时间为 12 h, 小鼠适应性饲养 1 周后使用。

五灵胶囊 (批号 210304) 由清华德人西安幸福制药有限公司提供, Con A (货号 C2010) 购于美国 Sigma 公司。

丙氨酸转氨酶 (alanine transaminase, ALT) 测定试剂盒和天冬氨酸转氨酶 (aspartate transaminase, AST) 测定试剂盒购于深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司; 小鼠 IL-6、IL-4 和 TNF- α ELISA 检测试剂盒购于深圳欣博盛生物科技有限公司; TRIzol 试剂 (货号 T9424) 购于美国 Sigma 公司, PrimeScriptTM RT Master Mix 反转录试剂盒 (货号 RR036A) 和 SYBR[®] Premix Ex TaqTM II 试剂盒 (货号 RR820A) 购于日本 TaKaRa 公司。

1.2 实验仪器 BS-330E 全自动生化分析仪 (深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司), Synergy H1 多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司), Sorvall LegendTM Micro 17R 高速冷冻离心机 (美国 Thermo Scientific 公司), NanoDrop One 分光光度计 (AZY1810928, 美国 Thermo Scientific 公司), qTOWER2.2 实时荧光定量 PCR 仪 (德国 Analytik Jena 公司)。

1.3 Con A 注射剂量和注射时间探索 参照既往报道的方法, 采用 Con A 尾静脉注射诱导 AIH 小鼠模型^[5-6]。实验方案如下: (1) 小鼠随机分为不同剂

量 Con A 组 (分别尾静脉注射 Con A 15、20 和 30 mg/kg) 和正常对照组 (尾静脉注射等体积生理盐水), 每组 5 只。注射 8 h 后采样。(2) 小鼠随机分为 Con A 注射后不同时间组 (均尾静脉注 Con A 20 mg/kg, 分别于尾静脉注射 Con A 后 4、6、8 和 12 h 采样) 和正常对照组 (尾静脉注射等体积生理盐水), 每组 5 只。以上 2 组实验方案均观察肝脏外观变化, 称全肝、全脾湿重, 计算脏器指数 [脏器指数 (%) = 脏器重量 / 小鼠体重 $\times 100\%$], 检测血清 ALT、AST 水平。

1.4 五灵胶囊给药 小鼠随机分为对照组、AIH 模型组、五灵胶囊低剂量组 ($0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、五灵胶囊中剂量组 ($1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、五灵胶囊高剂量组 ($2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 每组 10 只。五灵胶囊的剂量设置参照既往报道^[4]及临床使用剂量: $5 (\text{粒}) \times 0.35 (\text{g/粒}) \times 3 (\text{次/d}) / 60 (\text{kg, 人平均体重}) = 0.0875 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。换算为小鼠用药剂量^[7]: $0.0875 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 9.01 = 0.788 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 因此在本实验中, 选择 0.5、1.0 和 $2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 作为五灵胶囊的低、中、高剂量。

取五灵胶囊粉末适量, 加水配成 50、100、200 mg/mL 混悬液, 分别用作五灵胶囊低、中、高剂量组的灌胃药物, 按 10 mL/kg 的体积灌胃给药, 每天 1 次, 连续 14 d。对照组和 AIH 模型组灌胃给予等体积生理盐水。预防性给药 14 d 后, 采用尾静脉注射 Con A 制作 AIH 模型。AIH 模型组和五灵胶囊各剂量组小鼠按 20 mg/kg 剂量尾静脉注射 Con A, 正常对照组小鼠尾静脉注射等体积的生理盐水。注射 8 h 后采用摘除眼球法收集血液, 以 1.5 mL 无菌试管采血约 1 mL, 静置 30 min 后, $1200 \times g$ 离心 10 min, 分离血清。之后脱颈处死小鼠, 摘取肝脏和脾脏, 计算脏器指数。部分肝脏于 4% 多聚甲醛溶液内固定, 其余部分于 -80°C 保存备用。

1.5 血清肝功能指标的检测 应用全自动生化分析仪通过国际临床化学和实验室医学联合会推荐的方法检测小鼠血清 ALT 和 AST 水平。

1.6 肝组织病理结构的观察 剪取小鼠肝左叶, 以 4% 多聚甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 连续切片 (厚 $5 \mu\text{m}$), 进行 H-E 染色, 于光学显微镜下观察肝组织病理变化。

1.7 肝组织 IL-6、IL-4 和 TNF- α 含量的测定 称取肝组织 100 mg, 加入纯化水 900 μL , 匀浆、 $17000 \times g$

离心 10 min, 取上清液, 采用 ELISA 方法, 依照试剂盒说明书操作, 测定肝组织匀浆中 IL-6、IL-4 和 TNF- α 的含量。

1.8 qPCR 分析 采用 TRIzol 法提取小鼠肝组织总 RNA, 用 NanoDrop One 分光光度计检测总 RNA 的浓度和纯度。采用 PrimeScriptTM RT Master Mix 反转录试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA, 采用实时荧光定量 PCR 仪和 SYBR[®] Premix Ex TaqTM II 试剂盒进行 qPCR 扩增。反应体系为 20 μL , 内参为 β -肌动蛋白, 根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 IL-6、IL-4、TNF- α 、Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, *TLR4*) 和 NF- κB mRNA 的相对表达量。IL-6 正向引物序列为 5'-CTCCCAACAGACCTGTCTATAC-3', 反向引物序列为 5'-CCATTGCACAACTCTTTTCTCA-3'; IL-4 正向引物序列为 5'-GGTCTCAACCCCCAGCTAGT-3', 反向引物序列为 5'-GCCGATGATCTCTCTCAAGTGAT-3'; TNF- α 正向引物序列为 5'-CATCTTCTCTCAAAATTCGAGTGACAA-3', 反向引物序列为 5'-TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3'; *TLR4* 正向引物序列为 5'-GCCATCATTATGAGTGCCAATT-3', 反向引物序列为 5'-AGGGATAAGAACGCTGAGAATT-3'; NF- κB 正向引物序列为 5'-TCCAGGCTCCTGTTCGAGTCTC-3', 反向引物序列为 5'-CGGTGGCGATCATCTGTGTCTG-3'; β -肌动蛋白正向引物序列为 5'-AGGGAAATCGTGCGTGACATCAAA-3', 反向引物序列为 5'-ACTCATCGTACTCCTGCTTGCTGA-3'。

1.9 免疫荧光法检测 NF- κB p65 入核激活 对小鼠肝组织石蜡切片进行脱蜡、水化, 加入枸橼酸缓冲液煮沸, 冷却到室温后, 加入 NF- κB p65 抗体孵育过夜, 然后滴加荧光二抗, 室温孵育 1~2 h。使用 Image-Pro Plus 6.0 软件对染色结果进行半定量分析。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行统计学分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 Con A 注射剂量浓度和注射后时间对小鼠肝损伤的影响 与正常对照组比较, Con A 各剂量

组小鼠的肝脏指数、脾脏指数、血清 ALT 和 AST 水平均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 并随 Con A 注射剂量增加而增高 (表 1)。与正常对照组比较, Con A (20 mg/kg) 注射后各时间点小鼠的肝脏指数、脾脏指数、血清 ALT 和 AST 水平均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 肝脏指数随 Con A 注射后时间延长而减小, 脾脏指数在 Con A 注射后 6 h

时最大, 血清 ALT 和 AST 水平随 Con A 注射后时间延长而增高 (表 2)。

Con A 注射剂量为 30 mg/kg 时各指标数值最高, 但此时小鼠的状态较差; 12 h 时肝功能数值最高, 但出现小鼠在采集血液前死亡的现象。综合考虑小鼠状态和死亡率, 选择 Con A 的注射剂量为 20 mg/kg、注射后 8 h 制作 AIH 小鼠模型。

表 1 Con A 注射剂量对小鼠脏器指数和肝功能指标的影响

Tab 1 Effects of Con A injection dose on viscera indexes and liver function indexes of mice

$n=5, \bar{x} \pm s$

Indicator	Control	Con A		
		15 mg•kg ⁻¹	20 mg•kg ⁻¹	30 mg•kg ⁻¹
Liver index/%	4.12±0.21	4.47±0.24*	4.57±0.22*	4.82±0.25**
Spleen index/%	0.37±0.04	0.64±0.18*	0.92±0.15**	1.26±0.09**
ALT/(U•L ⁻¹)	34.0±5.2	782.3±509.3**	1 932.9±1 408.7*	2 978.2±2 428.6**
AST/(U•L ⁻¹)	107.7±31.1	568.2±360.5**	1 567.5±866.5**	1 592.4±881.4**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group. Con A: Concanavalin A; ALT: Alanine transaminase; AST: Aspartate transaminase.

表 2 Con A (20 mg/kg) 注射后不同时间点小鼠脏器指数和肝功能指标的变化

Tab 2 Changes of viscera indexes and liver function indexes at different time points after Con A (20 mg/kg) injection in mice

$n=5, \bar{x} \pm s$

Indicator	Control	Time after Con A injection/h			
		4	6	8	12
Liver index/%	4.12±0.21	5.41±0.21**	5.35±0.37**	5.12±0.31**	5.03±0.45*
Spleen index/%	0.37±0.04	1.30±0.19**	1.44±0.52*	1.41±0.16**	1.06±0.04**
ALT/(U•L ⁻¹)	53.4±19.0	563.6±661.4*	1 529.1±1 772.1*	2 375.0±1 738.3**	2 824.5±1 816.5**
AST/(U•L ⁻¹)	185.6±106.2	726.8±584.3*	1 050.9±1 008.5*	2 230.5±1 924.2*	3 975.7±5 090.4*

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group. Con A: Concanavalin A; ALT: Alanine transaminase; AST: Aspartate transaminase.

2.2 五灵胶囊对 AIH 小鼠肝组织病理学形态的影响 H-E 染色结果 (图 1) 显示, 对照组小鼠肝小叶结构完整, 肝细胞形态正常; AIH 模型组小鼠可

见肝小叶结构紊乱, 炎症细胞浸润, 大面积片状肝细胞死亡; 五灵胶囊各剂量组小鼠肝脏病理结构皆有改善, 损伤区域面积减小, 肝细胞形态较为完好。

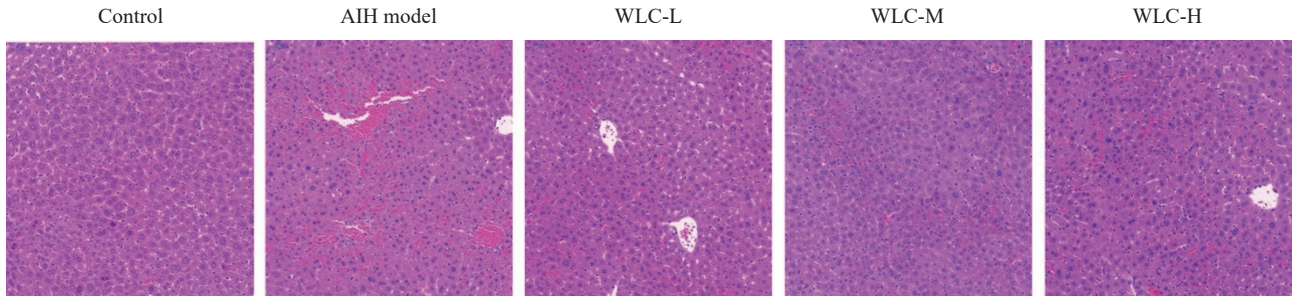


图 1 各组小鼠肝组织病理学变化 (H-E 染色, 200×)

Fig 1 Pathology of liver tissue of mice in each group (H-E staining, 200×)

WLC-L, WLC-M, and WLC-H indicate low-dose (0.5 g•kg⁻¹•d⁻¹), middle-dose (1.0 g•kg⁻¹•d⁻¹) and high-dose (2.0 g•kg⁻¹•d⁻¹) *Wuling* capsule groups, respectively. H-E: Hematoxylin-eosin; AIH: Autoimmune hepatitis.

2.3 五灵胶囊对 AIH 小鼠血清 ALT 和 AST 水平的影响 与对照组相比, AIH 模型组小鼠血清 ALT 和 AST 水平均升高 (均 $P<0.01$)。与 AIH 模型组相比, 五灵胶囊低、中、高剂量组小鼠血清 ALT 水平均降低 (均 $P<0.01$), 中剂量组的 AST 水平降低 ($P<0.01$)。五灵胶囊高剂量组的 ALT 水平高于中剂量组 ($P<0.05$), 五灵胶囊低、高剂量组的 AST 水平高于中剂量组(均 $P<0.05$)。见表 3。

表 3 五灵胶囊对 AIH 小鼠血清 ALT 和 AST 水平的影响
Tab 3 Effects of *Wuling* capsule on serum ALT and AST levels in AIH mice

(U · L ⁻¹), $n=10, \bar{x} \pm s$		
Group	ALT	AST
Control	34.9±9.9**	103.6±27.0**
AIH model	2 644.2±804.9	1 999.4±1 128.4
WLC-L	1 042.4±1 204.4**	1 526.5±643.7 [△]
WLC-M	714.5±599.7**	906.3±341.2**
WLC-H	1 444.5±948.6** [△]	1 622.2±908.0 [△]

** $P<0.01$ vs AIH model group; [△] $P<0.05$ vs WLC-M group. WLC-L, WLC-M, and WLC-H indicate low-dose (0.5 g·kg⁻¹·d⁻¹), middle-dose (1.0 g·kg⁻¹·d⁻¹) and high-dose (2.0 g·kg⁻¹·d⁻¹) *Wuling* capsule groups, respectively. AIH: Autoimmune hepatitis; ALT: Alanine transaminase; AST: Aspartate transaminase.

2.4 五灵胶囊对 AIH 小鼠肝组织 IL-4、IL-6 和 TNF-α 含量的影响 与对照组相比, AIH 模型组小鼠肝组织 IL-4、IL-6 和 TNF-α 含量均升高 (均 $P<0.01$) ; 与 AIH 模型组相比, 五灵胶囊中、高剂量组小鼠肝组织 IL-4、IL-6 和 TNF-α 含量均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$) , 且随着剂量增加降低程度愈明显。见表 4。

表 4 五灵胶囊对 AIH 小鼠肝组织 IL-4、IL-6 和 TNF-α 含量的影响

Tab 4 Effects of *Wuling* capsule on IL-4, IL-6 and TNF-α contents in the liver of AIH mice

(ng · mL ⁻¹), $n=10, \bar{x} \pm s$			
Group	IL-4	IL-6	TNF-α
Control	111.4±50.9**	8.39±5.29**	2 058±1 189**
AIH model	182.4±25.7	15.85±4.77	3 695±820
WLC-L	158.7±37.0	13.78±4.43	3 253±1 038
WLC-M	139.6±36.7**	11.18±4.04*	2 835±887**
WLC-H	139.0±24.4**	8.22±2.14**	2 532±386**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs AIH model group. WLC-L, WLC-M, and WLC-H indicate low-dose (0.5 g·kg⁻¹·d⁻¹), middle-dose (1.0 g·kg⁻¹·d⁻¹) and high-dose (2.0 g·kg⁻¹·d⁻¹) *Wuling* capsule groups, respectively. AIH: Autoimmune hepatitis; IL: Interleukin; TNF-α: Tumor necrosis factor α.

2.5 五灵胶囊对 AIH 小鼠肝脏炎症相关基因 mRNA 表达的影响 与对照组相比, AIH 模型组小鼠肝组织 *TLR4*、*NF-κB*、*IL-4*、*IL-6* 和 *TNF-α* mRNA 表达均上调 (均 $P<0.05$) ; 与 AIH 模型组相比, 五灵胶囊低、中、高剂量组小鼠肝组织的 *TLR4*、*NF-κB*、*IL-4* 和 *IL-6* mRNA 表达均下调 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$) , 五灵胶囊中剂量组的 *TNF-α* mRNA 表达下调 ($P<0.05$)。见表 5。

2.6 五灵胶囊对 AIH 小鼠肝组织 NF-κB p65 入核激活的影响 如图 2 所示, 与对照组相比, AIH 模型组小鼠肝组织绿色荧光明显增强, 细胞核呈明显的蓝绿色荧光, 说明模型组 NF-κB p65 在细胞核内有较高的表达。与 AIH 模型组相比, 五灵胶囊给药组视野中的绿色荧光明显减少, 且绿色荧光主要附着在细胞核附近, 核内较少。

表 5 五灵胶囊对 AIH 小鼠肝脏炎症相关基因 mRNA 表达的影响
Tab 5 Effect of *Wuling* capsule on mRNA expression of liver inflammation genes in AIH mice

$n=10, \bar{x} \pm s$					
Group	<i>TLR4</i>	<i>NF-κB</i>	<i>IL-4</i>	<i>IL-6</i>	<i>TNF-α</i>
Control	1.02±0.93*	1.03±1.31*	0.97±0.80*	1.03±1.06*	1.03±1.42*
AIH model	3.32±2.60	6.24±3.89	2.59±1.36	22.92±23.76	10.93±9.23
WLC-L	0.81±1.17*	2.01±1.58*	0.70±0.98*	5.51±5.85*	4.81±4.34
WLC-M	0.87±0.77*	2.31±1.62*	0.49±0.54**	6.96±5.92*	4.77±2.93*
WLC-H	0.35±0.27*	2.38±2.83*	0.28±0.28**	5.47±3.45*	8.36±5.16

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs AIH model group. WLC-L, WLC-M, and WLC-H indicate low-dose (0.5 g·kg⁻¹·d⁻¹), middle-dose (1.0 g·kg⁻¹·d⁻¹) and high-dose (2.0 g·kg⁻¹·d⁻¹) *Wuling* capsule groups, respectively. AIH: Autoimmune hepatitis; TLR4: Toll-like receptor 4; NF-κB: Nuclear factor κB; IL: Interleukin; TNF-α: Tumor necrosis factor α.

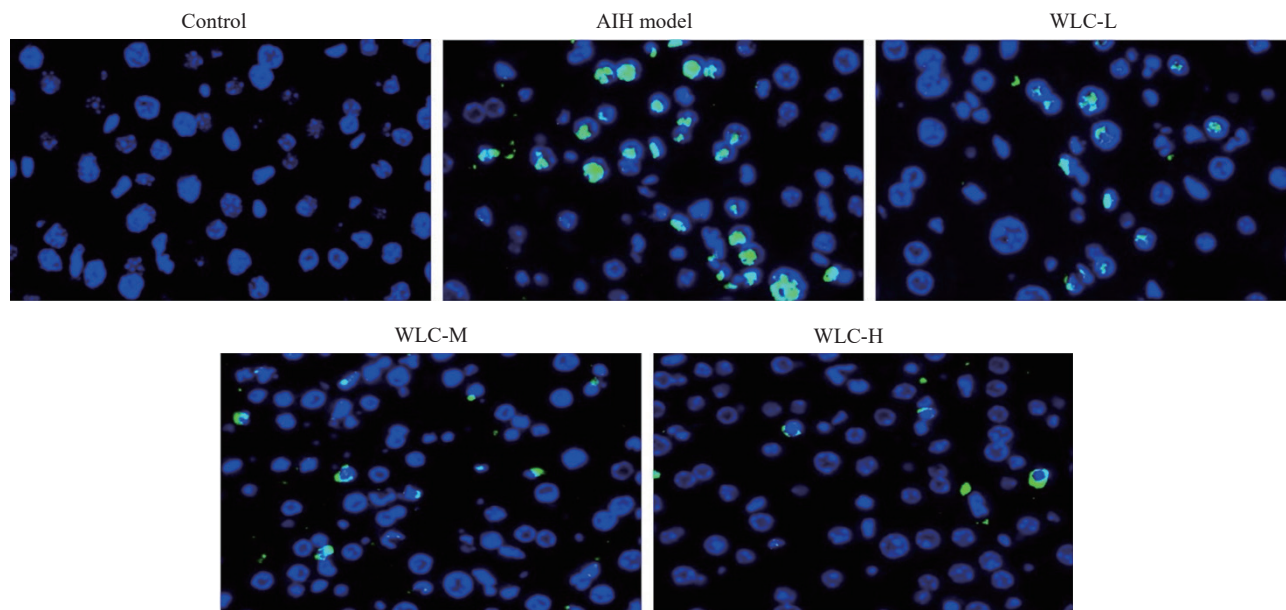


图2 五灵胶囊对 AIH 小鼠肝组织 NF- κ B p65 入核激活的影响 (免疫荧光法, 200 $\times$)

Fig 2 Effect of *Wuling* capsule on liver NF- κ B p65 nucleation activation in AIH mice (immunofluorescence, 200 $\times$)

WLC-L, WLC-M, and WLC-H indicate low-dose ($0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), middle-dose ($1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and high-dose ($2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) *Wuling* capsule groups, respectively. AIH: Autoimmune hepatitis; NF- κ B: Nuclear factor κ B.

3 讨论

AIH 是以细胞免疫为主、多种免疫应答参与的肝细胞损伤坏死, 主要特征是大量炎症因子释放并浸润细胞质, 引起肝脏急性出血性坏死, 主要表现为周身无力、睡眠不足、上消化道出血等。目前 AIH 的病理病机尚不明确。Con A 诱导的免疫肝损伤模型是国内外较为认可的 AIH 动物模型, 可模拟人类 AIH 发病过程中的病理变化特征^[5-6]。通过注射 Con A 可在短时间内使小鼠肝脏部位浸润大量的炎症细胞, 诱导小鼠肝脏出现肝细胞变性、坏死^[5-6]。本实验考察了尾静脉注射不同剂量 Con A 和注射后不同时间小鼠的肝损伤情况, 根据小鼠脏器指数、肝功能指标和小鼠状态, 选取了 Con A 20 mg/kg 注射后 8 h 的小鼠作为 AIH 小鼠模型, 用于五灵胶囊预防性给药对 Con A 诱导的 AIH 小鼠保护作用研究。

本实验中, H-E 染色发现 AIH 模型组小鼠肝脏内肝小叶中央静脉及门管区可见大量炎症细胞浸润, 并可见肝小叶内部分肝细胞变性、坏死, 血清 AST 及 ALT 水平升高, 表明该小鼠模型符合 AIH 早期肝脏组织学和血清免疫学的变化特征, 提示 AIH 模型构建成功。五灵胶囊可明显改善 AIH 小鼠的肝脏病理结构, 降低 AIH 小鼠血清 ALT 和

AST 水平, 表明五灵胶囊对 Con A 诱导的 AIH 小鼠具有保护作用。

TNF- α 是一种重要的炎症细胞因子, 在 Con A 致肝损伤的发病机制中发挥关键作用^[8]。TNF- α 由肝巨噬细胞 (Kupffer 细胞) 和活化的 T 细胞分泌, 其表达过多可诱导肝细胞凋亡引起肝损伤^[9]。经 TNF- α 抑制剂和 TNF- α 抗体预处理均对 Con A 诱导的 AIH 小鼠有保护作用^[9-11]。除了 TNF- α , 其他炎症因子如 IL-4 和 IL-6 也被认为在 Con A 诱导的免疫肝损伤中起重要作用, 其中 IL-6 为促炎因子, IL-4 为抗炎因子, 但注射 Con A 后, IL-4 和 IL-6 含量均显著升高^[6]。本实验中 Con A 诱导的 AIH 小鼠肝组织中 IL-6 和 TNF- α 含量均较对照组升高, IL-4 含量变化呈相同趋势, 说明当促炎因子增加时机体也会调动抗炎因子表达, 以维持平衡。与 AIH 模型组相比, 五灵胶囊给药组的 IL-6、TNF- α 和 IL-4 含量均降低, 说明五灵胶囊可通过调节炎症因子水平减轻免疫肝损伤。这些炎症因子上调与 TLR4/NF- κ B 信号通路密切相关^[12-14]。在本研究中, 五灵胶囊可下调 Con A 诱导的 AIH 小鼠肝脏中的 *TLR4* 和 *NF- κ B* mRNA 表达, 并可抑制 NF- κ B p65 入核激活, 说明抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路可能是五灵胶囊抗肝纤维化的作用机制, 但该结论还需要通过五灵胶囊和 TLR4 诱导剂/抑制剂

在动物实验中一同给药或在细胞实验中共孵育等进一步验证。

[参考文献]

- [1] 王海峰. 自身免疫性肝炎临床、免疫学及病理学特征分析[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(85): 27-28. DOI: 10.19613/j.cnki.1671-3141.2017.85.014.
- [2] 王翔鹏, 武璐璐, 李丽丽, 等. 枫杨醇提物对刀豆蛋白A诱导的免疫性肝损伤的保护作用[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2020, 41(1): 157-160. DOI: 10.7652/jdyxb202001030.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 644-645.
- [4] 王胜春, 赵辉平, 皇甫孟娟, 等. 五灵胶囊对脂多糖诱导肝细胞因子所致肝损伤的作用机制[J]. 中国现代应用药学, 2007, 24(6): 442-445. DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2007.06.003.
- [5] WANG H X, LIU M, WENG S Y, et al. Immune mechanisms of concanavalin A model of autoimmune hepatitis[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(2): 119-125. DOI: 10.3748/wjg.v18.i2.119.
- [6] HEYMANN F, HAMESCH K, WEISKIRCHEN R, et al. The concanavalin A model of acute hepatitis in mice[J]. Lab Anim, 2015, 49(1 Suppl): 12-20. DOI: 10.1177/0023677215572841.
- [7] 刘涛, 季光. 科研思路与方法[M]. 2版. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 222.
- [8] GANTNER F, LEIST M, LOHSE A W, et al. Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor[J]. Hepatology, 1995, 21(1): 190-198. DOI: 10.1016/0270-9139(95)90428-x.
- [9] MIZUHARA H, O'NEILL E, SEKI N, et al. T cell activation-associated hepatic injury: mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin 6[J]. J Exp Med, 1994, 179(5): 1529-1537. DOI: 10.1084/jem.179.5.1529.
- [10] KSONTINI R, COLAGIOVANNI D B, JOSEPHS M D, et al. Disparate roles for TNF-alpha and Fas ligand in concanavalin A-induced hepatitis[J]. J Immunol, 1998, 160(8): 4082-4089.
- [11] KÜSTERS S, TIEGS G, ALEXOPOULOU L, et al. *In vivo* evidence for a functional role of both tumor necrosis factor (TNF) receptors and transmembrane TNF in experimental hepatitis[J]. Eur J Immunol, 1997, 27(11): 2870-2875. DOI: 10.1002/eji.1830271119.
- [12] SERRYA M S, ZAGHLOUL M S. Mycophenolate mofetil attenuates concanavalin A-induced acute liver injury through modulation of TLR4/NF-κB and Nrf2/HO-1 pathways[J]. Pharmacol Rep, 2020, 72(4): 945-955. DOI: 10.1007/s43440-019-00055-4.
- [13] SANG R, YU Y, GE B, et al. Taraxasterol from *Taraxacum* prevents concanavalin A-induced acute hepatic injury in mice via modulating TLRs/NF-κB and Bax/Bcl-2 signalling pathways[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1): 3929-3937. DOI: 10.1080/21691401.2019.1671433.
- [14] FENG D, MEI Y, WANG Y, et al. Tetrandrine protects mice from concanavalin A-induced hepatitis through inhibiting NF-kappaB activation[J]. Immunol Lett, 2008, 121(2): 127-133. DOI: 10.1016/j.imlet.2008.10.001.

[本文编辑] 尹 茶