

刘政芳,周文,李振挺,等. 基于TLR4/JNK/NF- κ B通路探讨凉血解毒化癥方治疗慢加急肝衰竭的作用机制[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(8): 1032-1038.

LIU Z F, ZHOU W, LI Z T, et al. Liangxue-jiedu decoction alleviates acute-on-chronic liver failure by inhibiting TLR4/JNK/NF- κ B signaling pathway [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(8): 1032-1038.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.08.009

基于TLR4/JNK/NF- κ B通路探讨凉血解毒化癥方治疗慢加急肝衰竭的作用机制

刘政芳¹, 周文¹, 李振挺¹, 李芹¹, 廖乃顺^{1,2*}

(1. 福建医科大学孟超肝胆医院, 福州 350028; 2. 福建省孟超肝胆技术联合创新重点实验室, 福州 350028)

【摘要】 目的 探讨凉血解毒化癥方对慢加急性肝功能衰竭(acute-on-chronic liver failure, ACLF)模型小鼠的治疗作用及其对受体Toll样受体4(TLR4)/c-Jun氨基末端激酶(JNK)/核因子 κ B(NF- κ B)通路的影响。**方法** 采用四氯化碳、细菌脂多糖(LPS)和D-氨基半乳糖(D-GalN)联合诱导法构建慢加急肝衰竭小鼠模型;生化分析检测谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总胆红素(TBIL)肝功能指标。肝组织病理学检查。荧光定量PCR检测肝组织白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)、TLR4的mRNA表达。CCK8筛选凉血解毒化癥方对Raw264.7细胞的干预浓度,酶联免疫吸附法检测巨噬细胞上清TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量。蛋白免疫印迹法检测TLR4/JNK/NF- κ B通路相关蛋白(TLR4、NF- κ B、细胞外调节蛋白激酶(ERK1/2)、p-ERK1/2、p-JNK、JNK)的表达。**结果** 与ACLF模型组比较,凉血解毒化癥方可降低血清ALT、AST、TBIL含量,减少肝组织细胞坏死、纤维化、炎症细胞浸润程度,及肝组织TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、TLR4的mRNA表达,并降低肝组织TLR4/JNK/NF- κ B通路相关蛋白表达。细胞实验进一步发现凉血解毒化癥方可抑制巨噬细胞TNF- α 、IL-6、IL-1 β 分泌,下调TLR4/JNK/NF- κ B通路相关蛋白表达。**结论** 凉血解毒化癥方能有效改善ALCF小鼠肝功能、抑制其炎症反应的疗效,其机制与其下调TLR4/JNK/NF- κ B通路有关。

【关键词】 凉血解毒化癥方;慢加急性肝功能衰竭;肝功能;炎症反应;TLR4

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2024)08-1032-07

Liangxue-jiedu decoction alleviates acute-on-chronic liver failure by inhibiting TLR4/JNK/NF- κ B signaling pathway

LIU Zhengfang¹, ZHOU Wen¹, LI Zhenting¹, LI Qin¹, LIAO Naishun^{1,2*}

(1. Mengchao Hepatobiliary Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350028, China;

2. the United Innovation of Mengchao Hepatobiliary Technology Key Laboratory of Fujian Province, Fuzhou 350028, China)

Corresponding author: LIAO Naishun. E-mail: liaons046@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the therapeutic effect of Liangxue-jiedu decoction on acute-on-chronic liver failure (ACLF) model mice and the Toll-like receptor 4 (TLR4)/c-Jun amino terminal kinase (JNK)/nuclear factor κ B (NF- κ B) signaling pathway. **Methods** An ACLF mouse model was established using combined treatment of carbon tetrachloride, lipopolysaccharide, and D-galactosamine. Biochemical analysis was performed to evaluate liver function indicators, including alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and total bilirubin. Histopathological

【基金项目】 福建省自然科学基金面上项目(2023J011465)。

Funded by the National Natural Science Foundation of Fujian Province(2023J011465).

【作者简介】 刘政芳,女,副主任医师,硕士,研究方向:中西医结合肝病研究。Email: zhengfang1683399@126.com

【通信作者】 廖乃顺,男,助理研究员,博士,研究方向:肝病治疗的基础与临床研究。Email: liaons046@163.com

examination was conducted to assess liver tissue morphological changes. Quantitative PCR was used to detect the mRNA expression of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin (IL)-6, IL-1 β , and TLR4 in liver tissues. A CCK8 assay was used to evaluate the optimal interventional concentration of Liangxue-jiedu decoction on Raw 264.7 cells. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the contents of TNF- α , IL-6, and IL-1 β in the cell supernatant. Protein immunoblotting was performed to measure the expression of TLR4/JNK/NF- κ B signaling pathway-related proteins, including TLR4, NF- κ B, p-ERK1/2, ERK1/2, p-JNK, and JNK. **Results** Compared with the ACLF model group, the Liangxue-jiedu decoction-treated group showed reduced cell necrosis, fibrosis, and inflammatory cell infiltration in liver tissues; decreased serum levels of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and total bilirubin; and lower expression of TNF- α , IL-6, IL-1 β , and TLR4 mRNA. Liangxue-jiedu decoction reduced TLR4/JNK/NF- κ B signaling pathway-related protein expression in liver tissues. The *in vitro* result also showed that Liangxue-jiedu decoction reduced TNF- α , IL-6, and IL-1 β secretion by macrophage cells and down-regulated the expression of TLR4/JNK/NF- κ B signaling pathway proteins. **Conclusions** Liangxue-jiedu decoction effectively improved liver function in ACLF mice in a manner closely related to the downregulation of TLR4/JNK/NF- κ B pathway proteins.

[Keywords] Liangxue-jiedu decoction; acute-on-chronic liver failure; liver function; inflammation; TLR4
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

慢加急性肝功能衰竭 (acute-on-chronic liver failure, ACLF) 是一种在慢性肝炎或肝硬化基础上, 短时间内出现急性肝功能失代偿的临床综合征^[1-2]。ACLF 的死亡率较高, 常伴随器官功能衰竭^[3-5]。中药复方制剂对肝衰竭治疗具有多组分、多靶点、低毒副作用等优势^[6], 在防治 ACLF 上具有较好的临床应用前景。ACLF 在中医属“黄疸”范畴^[7-8], 其治疗法则从经典的治黄三法“但利其小便”“当以汗解之”“当下之”的理论基础上, 逐步衍生到从“血、毒、痰”论治的新理论, 并系统归纳了 ACLF 的病机在于“湿、热、瘀、毒、虚”, 病性多虚实夹杂, 且传变迅速^[9-10]。

凉血解毒化瘀方由赤芍、栀子、茵陈、丹参、白芨、白花蛇舌草、茜草、炒白术、豨莶草组成, 课题组前期通过参与“十二五”和“十三五”国家科技重大专项的全国多中心、前瞻性、随机对照的临床研究证实了凉血解毒化瘀方干预 ACLF 的安全性和有效性^[11-12]。本研究以 ACLF 小鼠为模型, 从 TLR4/JNK/NF- κ B 通路探讨凉血解毒化瘀方对 ACLF 的治疗作用及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

30 只 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 (5 ~ 6 周龄, 体重 18 ~ 20 g), 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK (沪) 2022-0004】, 饲养于福建医科大学实验动物中心 SPF 级屏障实验室内【SYXK (闽) 2022-0003】, 其环境温度 23 ~ 25 $^{\circ}$ C、相对湿度

40%左右、昼夜交替、光照/黑暗各半, 可自由摄食和饮水。动物实验前, 动物适应性饲养 1 周, 本动物实验获得福建医科大学孟超肝胆医院实验动物伦理中心审批 (MCHH-AEC-2022-06)。

1.1.2 药物组成与制备

凉血解毒化瘀方包括赤芍 60 g, 茵陈、白花蛇舌草、丹参、炒白术、茜草、豨莶草各 30 g, 白芨 15 g, 栀子 9 g, 并由北京康仁堂药业有限公司浓缩制备成颗粒剂 (200513012)。每剂中药制备成约 14.2 g 的颗粒剂, 实验前用注射用生理盐水溶解成 1 g/mL。按照人与小鼠体表面积折算系数 (相当于成人剂量的 12.3 倍), 以成人 70 kg 体重计算, 小鼠的给药剂量约为 2.5 mg/kg。

1.1.3 细胞株

Raw264.7 巨噬细胞株购自武汉普诺赛生命科技有限公司, 在含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、1% 双抗的 DMEM 培养基中培养。

1.1.4 主要试剂与仪器

引物 (由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成), TLR4 (AF8187)、NF- κ B (AF0246)、p-ERK1/2 (AF5818)、ERK1/2 (AF1051)、p-JNK (AF1762)、JNK (AF1048)、 β -actin 抗体 (AF0003)、D-GalN (ST1213)、LPS (S1732)、4% 多聚甲醛 (P0099) 购自碧云天生物技术有限公司, CCl₄ (10006464) 购自国药集团化学试剂有限公司, IL-6 (EK0411)、IL-1 β (EK0391)、TNF- α (EK0527) 酶联免疫检测 (ELISA) 试剂盒购自博士德生化科技有限公司, RNA 提取试剂盒 (19221ES50)、逆转录试剂盒 (11141ES) 购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司。

ABI7500 荧光定量 PCR 仪 (Thermo, 美国), STR16R 型台式水平离心机 (Thermo, 美国), GelDoc XR 凝胶成像系统 (Bio-Rad, 美国), NanoDrop 分光光度计 (Thermo, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与造模

动物造模方法参考文献^[2]。动物适应性饲养 1 周后,按体重随机分为正常组、ACLF 模型组、凉血解毒化瘀方组,每组 10 只。除正常组外其余小鼠腹腔注射 5 mL/kg 20% CCl₄,每周 2 次,连续 CCl₄ 诱导 8 周。凉血解毒化瘀方组在继续 CCl₄ 诱导的同时,给予 2.5 mg/kg 凉血解毒化瘀方灌胃;正常组、ACLF 模型组给予等体积生理盐水灌胃;各组每日给药 1 次,连续诱导 4 周,接着 ACLF 模型组、凉血解毒化瘀方组动物给予一次性腹腔注射 10 μg/kg LPS 和 1 g/kg D-GalN。并于末次干预 3 d 后,取材进行疗效分析。

1.2.2 生化分析血清 ALT、AST 和 TBIL 含量

动物经 100 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉后,进行眼眶静脉取血。血液室温静置 30 min 后,4000 r/min、4 ℃离心 10 min,收集血清,并送至福建医科大学孟超肝胆医院检验科检测。

1.2.3 病理学检查

肝组织经 4%多聚甲醛固定 24 h 后,进行乙醇梯度脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋;然后进行石蜡切片、苏木素-伊红 (HE) 染色,最后利用显微镜进行病理学检查与分析。

1.2.4 qPCR 检测肝组织 IL-6、TNF-α、IL-1β、TLR4 mRNA 表达

提取肝组织总 RNA,定量后,利用反转录试剂盒反转录合成 cDNA,添加引物(序列见表 1),qPCR 反应液等进行检测。qPCR 反应条件按照 95 ℃、15 s,60 ℃、30 s,70 ℃、30 s,40 个反应循环进行。

1.2.5 CCK8 检测药物对 Raw264.7 细胞活性的影响

Raw264.7 细胞按 10⁴ 个/孔接种于 96 孔板中,待细胞贴壁后,分别添加 0.125、0.25、0.5、1 mg/mL 凉血解毒化瘀方进行共孵育 24、48 h,利用 CCK8 检测细胞活性的变化,筛选最佳干预浓度。设立空白对照(各中药浓度)以减少背景信号干扰。

1.2.6 ELISA 分析细胞上清 IL-6、TNF-α、IL-1β 含量

Raw264.7 细胞按 10⁵ 个/孔接种于 6 孔板中,

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence	
引物 Primers	序列(5'-3') Sequences(5'-3')
IL-6	F: GAGGATACCACTCCCAACAGACC R: ACATACTTGTGCTACTACGTGAA
TNF-α	F: GGGACAGTGACCTGGACTGT R: GGACTCAAGACGTTTCCTC
IL-1β	F: CTCAACTGTGAAATGCCACC R: GAGTGATACTGC CTGCCTGA
TLR4	F: AATGAGGACTGGGTGAGAAATGAGC R: TCCTGGATGATGTTGGCAGCAATG
GAPDH	F: TCAACAGCAACTCCCACTCTTCCA R: ACCCTGTGCTGTAGCCGTATTCA

待细胞贴壁后,分别添加 0.25 mg/mL 凉血解毒化瘀方、1 μg/mL LPS 进行共孵育 24 h,然后收集细胞上清,采用 ELISA 检测分析细胞上清 IL-6、TNF-α、IL-1β 含量。

1.2.7 蛋白免疫印迹 (Western Blot) 检测 TLR4/JNK/NF-κB 通路相关蛋白表达

收集肝组织或细胞裂解液、提取总蛋白,经 BCA 蛋白定量后,进行蛋白变性处理,配制凝胶,经上样、SDS-PAGE 蛋白电泳、转膜、封闭后,将转印膜与一抗 4 ℃过夜孵育 (TLR4、NF-κB、p-ERK1/2、ERK1/2、p-JNK、JNK 均按 1 : 500; β-actin, 1 : 5000),经洗涤后,添加二抗兔/鼠 (1 : 5000) 室温孵育 2 h。最后利用凝胶成像仪进行蛋白显影。

1.3 统计学分析

用 GraphPad Prism 9.0 进行柱状图作图。用 SPSS 20.0 软件、单因素方差分析、LSD 方法进行统计学分析,定量资料用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 凉血解毒化瘀方对血清肝功能的影响

与正常组比较,ACLF 模型组的 ALT、AST、TBIL 水平显著提高 ($P < 0.001$);与 ACLF 模型组比较,凉血解毒化瘀方组的 ALT、AST、TBIL 水平呈显著性下调 ($P < 0.01$),说明凉血解毒化瘀方可改善 ACLF 血清肝功能。见表 2。

2.2 凉血解毒化瘀方对肝组织形态学的影响

ACLF 模型组的肝组织呈大量细胞坏死病变,而凉血解毒化瘀方组的肝细胞坏死区域明显减少,说明凉血解毒化瘀方可减少 ACLF 的肝细胞坏死。见图 1。

表 2 凉血解毒化瘀方对 ACLF 小鼠血清 ALT、AST 和 TBIL 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Liangxue-jiedu decoction on serum levels of ALT, AST and TBIL in ACLF mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)			
组别 Groups	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	TBIL/($\mu\text{mol/L}$)
正常组 Normal group	24.23 $\pm$ 2.18	56.22 $\pm$ 5.18	1.12 $\pm$ 0.25
ACLF 模型组 ACLF model group	3153.91 $\pm$ 526.32 ^{***}	2859.61 $\pm$ 589.31 ^{***}	17.23 $\pm$ 2.59 ^{***}
凉血解毒化瘀方组 Liangxue-jiedu group	845.26 $\pm$ 185.36 ^{##}	798.25 $\pm$ 398.22 ^{##}	5.25 $\pm$ 1.99 ^{##}

注:与正常组相比,^{***} $P < 0.001$;与 ACLF 模型组相比,^{##} $P < 0.01$ 。(下表同)
Note. Compared with normal group, ^{***} $P < 0.001$. Compared with ACLF model group, ^{##} $P < 0.01$. (The same in the following tables)

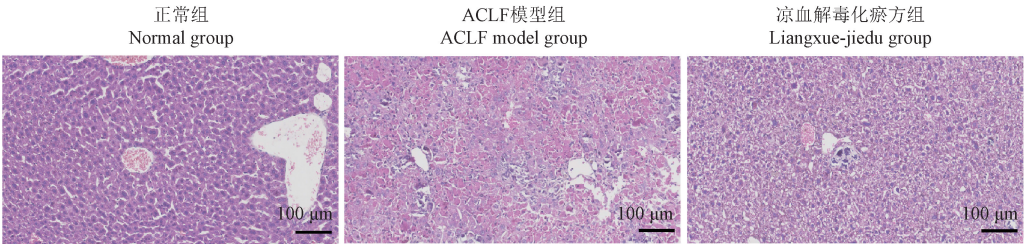


图 1 凉血解毒化瘀方对肝组织形态学的影响(HE 染色)
Figure 1 Effect of Liangxue-jiedu decoction on hepatic histopathology(HE staining)

2.3 凉血解毒化瘀方对肝组织 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、TLR4 mRNA 表达的影响

与正常组比较,ACLF 模型组的 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、TLR4 mRNA 表达增加($P < 0.001$);与 ACLF 模型组比较,凉血解毒化瘀方组的 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、TLR4 mRNA 表达减少($P < 0.01$),说明凉血解毒化瘀方可抑制 ACLF 的炎症反应。见表 3。

2.4 凉血解毒化瘀方对肝组织 TLR4/JNK/NF- κ B 通路相关蛋白表达的影响

如图 2、表 4,与正常组比较,ACLF 模型组的 TLR4、NF- κ B、p-ERK1/2、ERK1/2、p-JNK、JNK 蛋白表达增加($P < 0.001$);与 ACLF 模型组比较,凉血解毒化瘀方组的 TLR4、NF- κ B、p-ERK1/2、ERK1/2、p-JNK、JNK 蛋白表达减少($P < 0.01$),说明凉血解毒化瘀方可下调肝组织 TLR4/JNK/NF- κ B 通路蛋白的表达。

2.5 凉血解毒化瘀方对巨噬细胞活性的影响

与正常组比较,0.125、0.25 mg/mL 浓度组对巨噬细胞活性无明显影响,而在 0.5、1 mg/mL 高浓度下,巨噬细胞的活性减少($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$),为此选用 0.25 mg/mL 用于细胞干预实验。见表 5。

2.6 凉血解毒化瘀方对巨噬细胞上清 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 含量的影响

与正常组比较,LPS 组细胞上清 IL-6、TNF- α 、

IL-1 β 含量明显增加($P < 0.0001$),说明 LPS 可刺激巨噬细胞发生炎症反应。与 LPS 组比较,凉血解毒化瘀方组细胞上清 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 含量减少($P < 0.001$),说明凉血解毒化瘀方可抑制巨噬细胞分泌 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 。见表 6。

2.7 凉血解毒化瘀方对巨噬细胞 TLR4/JNK/NF- κ B 通路相关蛋白表达的影响

与正常组比较,LPS 组的 TLR4、NF- κ B、

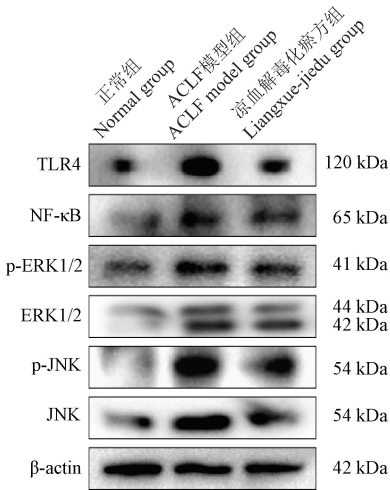


图 2 肝组织中 TLR4/JNK/NF- κ B 通路相关蛋白表达电泳
Figure 2 Electrophoresis of TLR4/JNK/NF- κ B pathway-related proteins in liver tissues

表 3 凉血解毒化癥方对 ACLF 小鼠肝组织 IL-6、TNF-α、IL-1β 和 TLR4 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of Liangxue-jiedu decoction on mRNA levels of IL-6, TNF-α, IL-1β and TLR4 in ACLF mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	IL-6/GAPDH	TNF-α/GAPDH	IL-1β/GAPDH	TLR4/GAPDH
正常组 Normal group	1.00 ± 0.12	1.05 ± 0.25	1.03 ± 0.36	1.03 ± 0.06
ACLF 模型组 ACLF model group	8.76 ± 1.43***	17.26 ± 3.26***	38.95 ± 9.85***	5.15 ± 1.25***
凉血解毒化癥方组 Liangxue-jiedu group	4.12 ± 0.55##	5.87 ± 1.22##	10.28 ± 1.65##	2.45 ± 0.27##

表 4 凉血解毒化癥方对 ACLF 小鼠肝组织 TLR4/JNK/NF-κB 通路相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of Liangxue-jiedu decoction on TLR4/JNK/NF-κB pathway-related protein expression in ACLF mice($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别 Groups	TLR4/β-actin	NF-κB/β-actin	p-ERK1/2/β-actin	ERK1/2/β-actin	p-JNK/β-actin	JNK/β-actin
正常组 Normal group	1.05 ± 0.12	1.01 ± 0.11	1.02 ± 0.18	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.10	1.04 ± 0.12
ACLF 模型组 ACLF model group	2.98 ± 0.56***	1.95 ± 0.28***	1.98 ± 0.25***	2.13 ± 0.22***	2.88 ± 0.34***	1.89 ± 0.12***
凉血解毒化癥方组 Liangxue-jiedu group	1.56 ± 0.23##	1.32 ± 0.32##	1.28 ± 0.16##	1.85 ± 0.13##	1.75 ± 0.53##	1.31 ± 0.13##

表 5 凉血解毒化癥方对巨噬细胞活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Effect of Liangxue-jiedu decoction on macrophage cell viability($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	浓度/(mg/mL) Concentration/ (mg/mL)	相对细胞活性/% Relative cell viability/%
正常组 Normal group	0	100.25 ± 2.36
	0.125	105.26 ± 3.21
凉血解毒化癥方组 Liangxue-jiedu group	0.25	101.12 ± 5.12
	0.5	90.33 ± 6.23*
	1	80.52 ± 4.33**

注:与正常组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(下图同)
Note. Compared with normal group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

p-ERK1/2、ERK1/2、p-JNK、JNK 蛋白表达增加($P < 0.01$);与 LPS 组比较,凉血解毒化癥方组的 TLR4、NF-κB、p-ERK1/2、ERK1/2、p-JNK、JNK 蛋白表达减少($P < 0.05$),说明凉血解毒化癥方可下调巨噬细胞 TLR4/JNK/NF-κB 通路蛋白的表达。见图 3 和表 7。

表 6 凉血解毒化癥方对巨噬细胞上清 IL-6、TNF-α 和 IL-1β 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 6 Effect of Liangxue-jiedu decoction on the content of IL-6, TNF-α and IL-1β in macrophage cell supernatant ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	IL-6/(pg/mL)	TNF-α/(pg/mL)	IL-1β/(pg/mL)
正常组 Normal group	29.56 ± 2.51	28.50 ± 4.30	3.59 ± 0.95
LPS 组 LPS group	828.76 ± 42.10****	3853.03 ± 206.28****	116.15 ± 6.57****
凉血解毒化癥方组 Liangxue-jiedu group	274.52 ± 49.78&&&	1104.29 ± 89.75&&&	56.75 ± 16.21&&&

注:与正常组相比, **** $P < 0.0001$;与 LPS 组比较, &&& $P < 0.001$ 。
Note. Compared with normal group, **** $P < 0.0001$. Compared with LPS group, &&& $P < 0.001$.

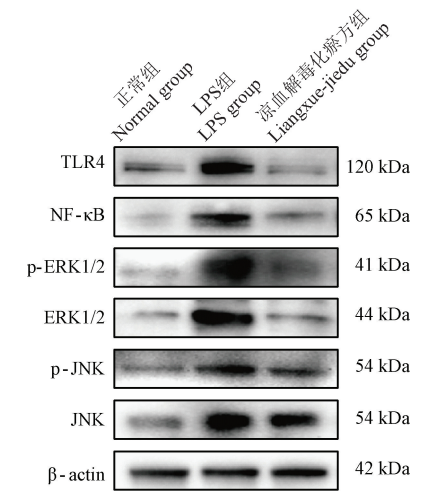


图 3 巨噬细胞中 TLR4/JNK/NF-κB 通路相关蛋白表达电泳
Figure 3 Electrophoresis of TLR4/JNK/NF-κB pathway-related proteins in macrophage cells

表 7 凉血解毒化癉方对巨噬细胞 TLR4/JNK/NF-κB 通路相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Effect of Liangxue-jiedu decoction onTLR4/JNK/NF-κB pathway-related protein expression in macrophage cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)						
组别 Groups	TLR4/β-actin	NF-κB/β-actin	p-ERK1/2/β-actin	ERK1/2/β-actin	p-JNK/β-actin	JNK/β-actin
正常组 Normal group	1.00 ± 0.10	1.01 ± 0.32	1.00 ± 0.15	1.01 ± 0.22	1.02 ± 0.15	1.01 ± 0.15
LPS 组 LPS group	2.62 ± 0.35 **	1.87 ± 0.14 **	3.26 ± 0.85 **	3.13 ± 0.26 **	2.12 ± 0.10 **	1.99 ± 0.11 **
凉血解毒化癉方组 Liangxue-jiedu group	1.12 ± 0.36 ^{&}	1.18 ± 0.22 ^{&}	1.35 ± 0.20 ^{&}	1.52 ± 0.38 ^{&}	1.56 ± 0.26 ^{&}	1.51 ± 0.29 ^{&}

注:与 LPS 组相比, [&] $P < 0.05$ 。
Note. Compared with LPS group, [&] $P < 0.05$.

3 讨论

ACLF 目前主要证型以湿热发黄证、瘀热发黄证、气虚瘀黄证为主,其中湿热发黄证最常见;早期多以实证为主,后期病势渐衰,正气受损,虚证居多^[11]。在该中医理论的基础上,确立了 ACLF 的核心证候(即湿热瘀黄证、气虚瘀黄证),并形成对应的核心治法包括凉血解毒化癉法和益气解毒化癉法^[12]。其中凉血解毒化癉方已被临床研究初步证实了用于改善 ACLF 肝功能及其预后的疗效,但是相关机制尚未明确。本研究通过构建 ACLF 小鼠模型进一步证实了凉血解毒化癉方改善 ACLF 肝功能、抑制炎症反应、减少肝细胞坏死的疗效。

Toll 样受体是人体免疫细胞识别病原微生物的主要受体^[13-14],在先天免疫和获得性免疫中均发挥重要的作用^[15]。它可特异性识别 LPS,然后通过髓样分化因子 88(MyD88)依赖和非依赖两种信号传导途径^[16],分别激活 NF-κB 和 MAPK 的表达^[17],引起 IL-6 和 TNF-α 等多种促炎细胞因子的释放^[18],诱导炎症级联反应,参与机体炎症损伤进程^[19]。本研究发现凉血解毒化癉方可下调肝组织 TLR4/JNK/NF-κB 通路相关蛋白的表达,提示凉血解毒化癉方改善 ACLF 肝功能、抑制炎症反应可能与该通路相关。

TLR4 是 Toll 样受体中的一种,主要在单核细胞和巨噬细胞中表达^[20]。本研究中也进一步证实 ACLF 小鼠肝组织 TLR4 蛋白高表达。通过细胞实验进一步发现,凉血解毒化癉方可下调巨噬细胞 TLR4/JNK/NF-κB 通路相关蛋白的表达,说明凉血解毒化癉方调控 TLR4/JNK/NF-κB 通路可能通过靶向巨噬细胞来实现的,后续应深入研究凉血解毒化癉方对巨噬细胞的干预机制。

综上所述,凉血解毒化癉方可改善 ACLF 小鼠肝功能、减少肝细胞坏死,其分子机制与 TLR4/JNK/NF-κB 信号通路密切相关。本研究通过体内、体外实验证实了凉血解毒化癉方改善 ACLF 小鼠肝功能、抑制炎症反应的作用,为临床应用凉血解毒化癉方治疗 ACLF 提供了新的实验依据。

参 考 文 献(References)

[1] LANGER M M, EICKELMANN C, KLEINBONGARD P, et al. Impaired mitochondrial complex IV respiration in peripheral blood mononuclear cells discriminates acute-on-chronic liver failure from acute decompensation [J]. J Hepatol, 2022, 77(3): 874–876.

[2] LIN J, LING Q, YAN L, et al. Ancient herbal formula Mahuang Lianqiao Chixiaodou Decoction protects acute and acute-on-chronic liver failure via inhibiting von willebrand factor signaling [J]. Cells, 2022, 11(21): 3368.

[3] HE L, CAI Q, LIANG X, et al. ETS2 alleviates acute-on-chronic liver failure by suppressing excessive inflammation [J]. J Med Virol, 2023, 95(4): e28710.

[4] ENGELMANN C, HABTESION A, HASSAN M, et al. Combination of G-CSF and a TLR4 inhibitor reduce inflammation and promote regeneration in a mouse model of ACLF [J]. J Hepatol, 2022, 77(5): 1325–1338.

[5] KHANAM A, KOTTILIL S. Acute-on-chronic liver failure: pathophysiological mechanisms and management [J]. Front Med, 2021, 8: 752875.

[6] 刘成海. 重视肝硬化的中西医结合诊治研究 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2023, 31(2): 77–78.

LIU C H. More research on the diagnosis and treatment of cirrhosis with integrative medicine [J]. Chin J Integr Trad West Med Dig, 2023, 31(2): 77–78.

[7] 吕建林, 毛德文, 柳琳琳, 等. 中西医结合治疗慢加急性肝衰竭的临床研究进展 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2021, 31(11): 1047–1050.

LYU J L, MAO D W, LIU L L, et al. Clinical research progress on treatment of acute liver failure with combination of traditional Chinese and western medicine [J]. Chin J Integr Tradit West

- Med Liver Dis, 2021, 31(11): 1047–1050.
- [8] 吕生霞, 王章程, 朱颖, 等. 基于肠道菌群的视角探讨中医药治疗肝纤维化 [J]. 世界华人消化杂志, 2023, 31(21): 889–895.
- LV S X, WANG Z C, ZHU Y, et al. Discussion on treatment of liver fibrosis with traditional Chinese medicine from the perspective of gut microbiota [J]. World Chin J Dig, 2023, 31(21): 889–895.
- [9] 王宪波, 王晓静. 慢加急性肝衰竭中医内科临床诊疗指南 [J]. 北京中医药, 2019, 38(3): 200–206.
- WANG X B, WANG X J. Clinical guideline for diagnosis and treatment of acute-on-chronic liver failure in TCM internal medicine [J]. Beijing J Tradit Chin Med, 2019, 38(3): 200–206.
- [10] 周超, 宫嫚, 张宁, 等. 中西医结合治疗方案干预乙型肝炎病毒相关慢加急性肝衰竭的疗效分析 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2019, 29(3): 203–207.
- ZHOU C, GONG M, ZHANG N, et al. Study on the intervention of integrated traditional Chinese and Western medicine therapy in patients with hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure [J]. Chin J Integr Trad West Med Liver Dis, 2019, 29(3): 203–207.
- [11] 李筠. 乙型肝炎肝衰竭的中西医结合治疗策略 [J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31(1): 42–47.
- LI J. Clinical research progress in integrated traditional Chinese and Western medicine therapy for HBV-related liver failure [J]. J Clin Hepatol, 2015, 31(1): 42–47.
- [12] 刘丽, 李芹, 林恢, 等. 凉血解毒化瘀方治疗乙肝相关慢加急性肝衰竭的临床研究 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(12): 2936–2937.
- LIU L, LI Q, LIN H, et al. Clinical research on Liangxue Jiedu Huayu Formula in the treatment of HBV-related acute on chronic liver failure [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2015, 26(12): 2936–2937.
- [13] ROTH S. Neofunctionalization of toll signaling in insects: from immunity to dorsoventral patterning [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2023, 39: 1–22.
- [14] TAMADA M, SHI J, BOURDOT K S, et al. Toll receptors remodel epithelia by directing planar-polarized Src and PI3K activity [J]. Dev Cell, 2021, 56(11): 1589–1602.
- [15] DUAN T, DU Y, XING C, et al. Toll-like receptor signaling and its role in cell-mediated immunity [J]. Front Immunol, 2022, 13: 812774.
- [16] CLABBERS M T B, HOLMES S, MUUSSE T W, et al. MyD88 TIR domain higher-order assembly interactions revealed by microcrystal electron diffraction and serial femtosecond crystallography [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 2578.
- [17] YANG J, PAN Y, ZENG X, et al. Discovery of novel aporphine alkaloid derivative as potent TLR2 antagonist reversing macrophage polarization and neutrophil infiltration against acute inflammation [J]. Acta Pharm Sin B, 2023, 13(9): 3782–3801.
- [18] TIAN X, NANDING K, DAI X, et al. Pattern recognition receptor mediated innate immune response requires a Rif-dependent pathway [J]. J Autoimmun, 2023, 134: 102975.
- [19] SUN X, ZHENG Y, TIAN Y, et al. Astragalus polysaccharide alleviates alcoholic-induced hepatic fibrosis by inhibiting polymerase I and transcript release factor and the TLR4/JNK/NF- κ B/MyD88 pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 314: 116662.
- [20] LIU G, LIU D, LI Z, et al. Overexpression of transcriptional regulator and tailoring enzyme leads to the discovery of anti-inflammatory meroterpenoids from marine-derived fungus *Alternaria alternata* JJY-32 [J]. Front Mar Sci, 2022, 9: 1015684.

[收稿日期] 2023–12–05