

【实验研究】

殷学伟 刘滨 魏慧霞 唐凯 毕宏生 郭大东

【摘要】 目的 探讨龙胆泻肝汤(Longdan Xiegan Decoction, LXD)对实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis, EAU)大鼠Notch信号通路活化的抑制作用及其对辅助性T细胞17(T helper 17, Th17)和调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)表达水平的影响。**方法** 随机将雌性Lewis大鼠分为正常对照(NC)组、EAU模型组、LXD干预组。EAU模型组和LXD干预组大鼠诱导EAU,免疫后LXD干预组大鼠每天给予LXD灌胃处理,EAU模型组大鼠给予等量生理盐水灌胃。免疫后12 d观察大鼠眼部炎症表现,取三组大鼠眼球进行病理切片,观察病理学变化;实时荧光定量PCR(quantitative polymerase chain reaction, QT-PCR)和酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测免疫后12 d三组大鼠脾脏、淋巴结及眼组织中Notch1、DLL4、白细胞介素10(interleukin 10, IL-10)和IL-17 mRNA及蛋白的表达;流式

细胞仪检测三组大鼠各组织中 Th17、Treg 细胞的表达。**结果** 病理检查结果表明,LXD 对 EAU 大鼠眼部组织结构有明显的保护作用。QT-PCR 和 ELISA 检测结果发现,与 NC 组相比,LXD 干预组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织中 Notch1、DLL4、IL-10、IL-17 mRNA 和蛋白表达水平均升高,但除 IL-10 外,其他明显低于 EAU 模型组(均为 $P < 0.05$);流式细胞仪检测结果发现,EAU 模型组大鼠的各组织中 Th17/Treg 比例均高于 NC 组,经 LXD 干预后,Th17 细胞表达水平下降,Treg 表达水平升高,两者比例趋向平衡。**结论** LXD 可有效降低 EAU 大鼠脾脏、淋巴结、眼组织中 Notch1、DLL4、IL-10 和 IL-17 mRNA 和蛋白的表达水平,改善 Th17/Treg 细胞比例的平衡,从而有效减轻 EAU 大鼠的眼部炎症,保护眼部组织结构,调节全身及眼部的免疫状态。**【关键词】** 龙胆泻肝汤;实验性自身免疫性葡萄膜炎;辅助性 T 细胞;调节性 T 细胞;Notch1;DLL4**【中图分类号】** R773

葡萄膜炎是一类临床常见、反复发作的自身免疫性眼病,可造成眼组织不可逆性损害。辅助性 T 细胞 17 (T helper 17, Th17) 和调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg) 是近年来研究人员发现的 $CD4^+$ T 淋巴细胞亚群,其中 Th17 细胞介导免疫应答,而 Treg 细胞介导免疫抑制,二者在功能上互相拮抗^[1]。在葡萄膜炎的发生发展过程中,Th17 和 Treg 细胞发挥了重要作用。Notch 信号通路是调节炎症反应和自身免疫性疾病、维持机体免疫平衡的重要信号通路,可通过调控 naïve $CD4^+$ T 细胞向 Th17、Treg 细胞的分化而影响 Th 细胞的比例平衡^[2]。有研究发现,龙胆泻肝汤(Longdan Xiegan Decoction, LXD)具有较强的免疫调节作用,对前葡萄膜炎有较好的治疗效果^[3]。动物实验表明,LXD 可有效减少实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis, EAU)大鼠前房炎症细胞浸润,促进机体免疫功能恢复^[4],但是 LXD 对 Notch 信号通路的调控以及对 Th 细胞分化的影响尚未完全清楚。本研究拟通过检测 LXD 对 EAU 大鼠脾脏、淋巴结和眼组织中 Notch1、DLL4、白细胞介素 10(interleukin 10, IL-10)、IL-17 基因和蛋白的表达变化,探讨 LXD 在葡萄膜炎发病过程中对 Notch 信号通路的调控及对 Th17/Treg 细胞比例平衡影响的作用,初步阐释 LXD 治疗葡萄膜炎的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 LXD 配方颗粒(产品批号:1311007W, 华润三九医药股份有限公司);FITC-CD4、PE-CD8、PE-IL-17、APC-CD25、PE-Foxp3 (eBioscience 公司, 美国);固定破膜试剂盒(BD 公司,美国);miRNA 组织/细胞快速提取试剂盒(艾德莱生物科技有限公司,北京);cDNA 逆转录试剂盒、2 × SYBR Green I 试剂盒(QIAGEN 公司,德国);β-巯基乙醇、谷氨酰胺(Amresco 公司,美国);胎牛血清、1640 培养液(HyClone 公司,美国);淋巴细胞分离液(Solarbio 公司,北京);大鼠 Notch1、DLL4、IL-10、IL-17 蛋白 ELISA 试剂盒(基因美生物科技有限公司,武汉)。

1.2 实验动物分组及处理 选取 45 只 6~8 周龄成年健康 Lewis 雌性大鼠(体质量 160~180 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司),随机将其分

为正常对照组(NC 组, $n = 15$)、EAU 模型组($n = 15$)和 LXD 干预组($n = 15$)。其中 EAU 模型组和 LXD 干预组大鼠在后肢足垫、腹壁两侧和后背皮下各点一次性注射 200 μ L 含光感受器间维生素 A 结合蛋白(interphotoreceptor retinoid-binding protein, IRBP)、完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)和结核分枝杆菌(*mycobacterium tuberculosis*, TB) H37RA 混合的乳糜液以诱导 EAU,而 NC 组大鼠在相同部位注射等量不含 IRBP 的乳糜液。LXD 干预组大鼠诱导 EAU 后每天给予 LXD 1000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (大鼠使用剂量为临床等效剂量折算的 5 倍)灌胃处理,每天 1 次,直至大鼠处死。免疫后 12 d 收集各组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织,流式细胞仪检测各组织分离的 T 淋巴细胞中 Th17、Treg 细胞的表达水平,分析 Th17/Treg 比例的变化情况,实时荧光定量 PCR (quantitative polymerase chain reaction, QT-PCR) 检测 Notch1、DLL4、IL-10 和 IL-17 mRNA 在脾脏、淋巴结及眼组织中的表达;ELISA 检测其相应的蛋白表达水平。

1.3 眼底炎症表现及组织病理学检查 免疫后 12 d,各组随机选择 3 只大鼠,Genesis-D 眼部照相机观察三组大鼠眼底炎症表现,腹腔注射 100 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水合氯醛麻醉法处死,摘除同侧眼球,立即置于眼球固定液中固定 24 h,之后眼球标本脱水、包埋、切片,行 HE 染色,观察睫状体和视网膜病理学变化。

1.4 QT-PCR 检测 Notch1、DLL4、IL-10 及 IL-17 mRNA 的表达水平 三组大鼠随机各取 6 只,无菌条件下分离脾脏、淋巴结和眼组织,每只大鼠各取部分组织冻存于 -80°C 冰箱中用于 ELISA 检测,其余样品用 Trizol 法在液氮中研磨后分别提取总 RNA,超微量分光光度计(K5600,北京凯奥科技发展有限公司)检测 RNA 的纯度和浓度(A_{260}/A_{280} 为 1.8~2.1)。用 cDNA 反转录试剂盒分别将提取的总 RNA 反转录成 cDNA, Q-PCR 检测 Notch1、DLL4、IL-10 和 IL-17 基因的表达(反应体系为 20 μ L,每个基因设 3 个复孔),GAPDH 为 Notch1、DLL4、IL-10 和 IL-17 基因的内参。引物序列分别为:GAPDH:上游引物:5'-GACCACAGTCCATGACATCACT-3',下游引物:5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'; Notch1:上游引物:5'-ATGGCCCCACCTGCAGACAAGATG-3',下游引物:5'-GGCACGGCAGGCACAGCGATAG-3';

DLI4:上游引物:5'-CAAGAATAGCGGCAGTGGTTCG-TAA-3',下游引物:5'-GTAGCGCAGTCTTGT-GAGGGTGT-3';IL-10:上游引物:5'-TTCCATC-CGGGGTGACAATAA-3',下游引物:5'-TTCTGGGC-CATGGTTCTCTGC-3';IL-17:上游引物:5'-TTGCT-GCTACTGAACCTGGAG-3',下游引物:5'-GCATG-GCGGACAATAGAG-3'。LightCycler®480Q-PCR仪(Roche公司,美国)检测大鼠脾脏、淋巴结和眼组织中Notch1、DLL4、IL-10和IL-17基因表达水平的变化。Q-PCR反应条件为:94℃5s,循环1次;94℃5s,57℃15s,72℃10s,反应循环45次。Q-PCR检测结束后,按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算Notch1、DLL4、IL-10和IL-17基因表达情况,并进行数据统计分析。

1.5 ELISA检测Notch1、DLL4、IL-10和IL-17蛋白的表达变化 用液氮分别将各组大鼠的脾脏、淋巴结和眼组织研磨至细粉状,加入350μL RIPA裂解液溶解后电动匀浆30s,将样品置于冰上,然后超声波细胞粉碎机冰超声20min,8000r·min⁻¹、4℃离心20min。离心后样品去沉淀,将上清转移至新的EP管中,各样品按照ELISA试剂盒说明书的要求进行操作,使用多功能酶标仪(Perkin-Elmer公司,美国)检测各组样品的吸光度(A)值,通过用标准曲线法计算各组样品中Notch1、DLL4、IL-10和IL-17蛋白的表达。

1.6 流式细胞仪检测Th17、Treg细胞水平 分别取三组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织,研磨后通过细胞筛进行细胞初滤,然后通过尼龙毛过滤收集总T淋巴细胞。-80℃冰箱取出cocktail细胞刺激液,37℃水浴解冻。加入6μL的cocktail刺激液和4μL的Golgistop蛋白转运抑制剂,移液器轻轻吹打混匀。用锡箔纸将EP管严密包裹避光,放入37℃、体积分数5%CO₂培养箱中孵育5h;孵育后首先进行细胞表面染色,然后用破膜溶液对细胞固定破膜后再进行胞内染色。染色结束后滤网过滤,流式细胞仪检测各组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织中Th17、Treg细胞表达水平。

1.7 统计学分析 所有实验均重复三次,数据采用SPSS 17.0统计学软件进行分析,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经Levene检验方差齐。各组间两两比较采用LSD检验,检验水准: $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 大鼠眼部炎症表现及组织病理学变化 通过Genesis-D眼部照相机观察发现,NC组大鼠眼部未见虹膜血管扩张充血;EAU模型组大鼠免疫后12d眼部炎症严重,表现为虹膜严重扩张充血,前房大量纤维蛋白渗出、粘连,瞳孔膜闭,积脓等症状(图1)。根据临床表现记录进行炎症评分,EAU模型组大鼠炎症评分为(3.30±0.52)分,LXD干预组大鼠炎症评分为(2.09±0.33)分,炎症明显轻于EAU模型组($P<0.05$),仅表现为轻度虹膜血管充血。组织病理学检查结果显示,NC组大鼠眼部组织结构清晰,无炎性细胞浸润;EAU模型组大鼠睫状体和视网膜内可见大量炎性细胞浸润,眼组织结构紊乱、视网膜全层破坏;LXD干预组大鼠睫状体和视网膜仅表现为轻、中度炎性细胞浸润。

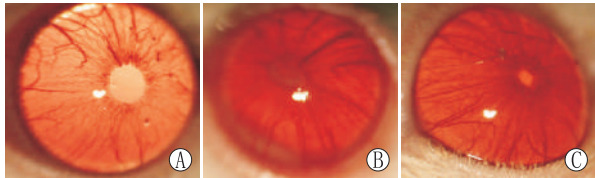


图1 免疫后12d各组大鼠眼部炎症情况。A:NC组;B:EAU模型组;C:LXD干预组

2.2 QT-PCR检测Notch1、DLL4、IL-10及IL-17 mRNA表达水平 Q-PCR检测结果显示,与NC组相比,EAU模型组大鼠各组织中Notch1、DLL4、IL-10及IL-17 mRNA表达水平均明显升高(均为 $P<0.05$);LXD干预组大鼠各组织中Notch1、DLL4及IL-17 mRNA的表达较NC组升高,但明显低于EAU模型组,且其IL-10 mRNA表达水平高于EAU模型组(图2)。

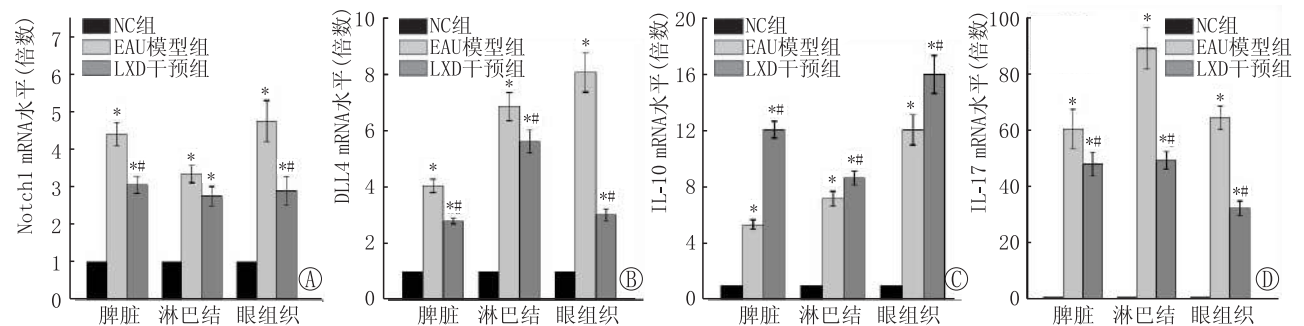


图2 Notch1、DLL4、IL-10、IL-17 mRNA在NC组、EAU模型组和LXD干预组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织的表达水平。A:Notch1 mRNA表达水平;B:DLL4 mRNA表达水平;C:IL-10 mRNA表达水平;D:IL-17 mRNA表达水平。与NC组比较,* $P<0.05$;与EAU模型组比较,# $P<0.05$

2.3 ELISA 检测 Notch1、DLL4、IL-10 及 IL-17 蛋白表达水平 ELISA 检测结果显示,EAU 模型组和 LXD 干预组大鼠免疫后脾脏、淋巴结和眼组织中 Notch1、DLL4、IL-10 及 IL-17 的蛋白表达水平趋势与 mRNA 基本一致。与 NC 组大鼠相比,EAU 模型组

大鼠的脾脏、淋巴结和眼组织中 Notch1、DLL4、IL-10 及 IL-17 蛋白表达水平均明显升高(均为 $P < 0.05$); LXD 干预组大鼠各组织中 Notch1、DLL4 及 IL-17 蛋白的表达较 NC 组升高,但明显低于 EAU 模型组,且其 IL-10 蛋白表达水平高于 EAU 模型组(图 3)。

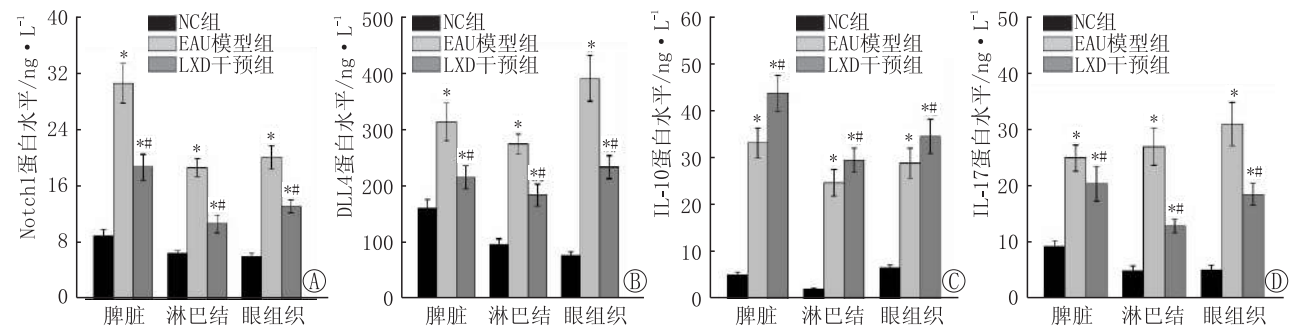


图3 Notch1、DLL4、IL-10、IL-17 蛋白在 NC 组、EAU 模型组和 LXD 干预组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织的表达水平。A:Notch1 蛋白表达水平;B: DLL4 蛋白表达水平;C:IL-10 蛋白表达水平;D:IL-17 蛋白表达水平。与 NC 组比较,* $P < 0.05$;与 EAU 模型组比较,# $P < 0.05$

2.4 流式细胞仪检测 Th17、Treg 细胞表达水平 流式细胞仪分别检测各组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织中 Th17、Treg 细胞的表达水平发现,与 NC 组的 Th17、Treg 细胞水平相比,免疫后 EAU 模型组大鼠中 Th17/Treg 比例显著增高、呈现不平衡表达(均为 $P < 0.05$);经过 LXD 干预后,LXD 干预组大鼠的 Th17 细胞表达水平明显降低,Treg 细胞表达水平显著升高,Th17/Treg 比例趋向于平衡(均为 $P < 0.05$),见图 4。

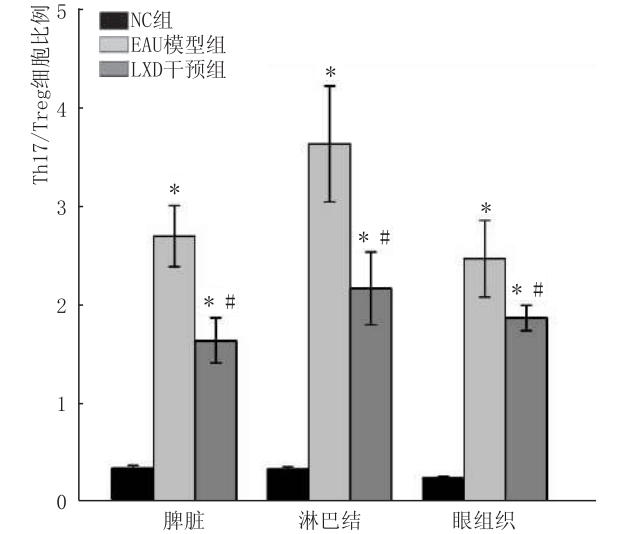


图4 流式细胞仪检测免疫后 12 d NC 组、EAU 模型组和 LXD 干预组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织中 Th17/Treg 细胞比例变化。与 NC 组比较,* $P < 0.05$;与 EAU 模型组比较,# $P < 0.05$

3 讨论

Notch 信号通路是调节炎症反应和自身免疫性疾病的重要通路,可通过调控 naïve CD4⁺ T 细胞的分化而影响 T 辅助(Th)细胞的比例平衡发挥作用^[2]。Treg 细胞数量减少或功能紊乱、Th17/Treg 细

胞比例失衡均可导致葡萄膜炎的发生^[5-6]。因此,Th17/Treg 细胞比例异常在 EAU 发病过程中发挥重要作用。临床研究证实,葡萄膜炎患者发病过程中 Th17/Treg 细胞的表达呈不平衡状态,Th17 细胞比例及相关细胞因子的水平在葡萄膜炎患者活动期均升高,而 Treg 细胞比例及相关细胞因子的水平均下降^[7]。LXD 可有效缓解 EAU 大鼠的前房炎症,减少炎性细胞浸润,保护眼组织超微结构的完整性,降低 TNF- α 等炎症因子的表达水平,调节免疫状态,促进机体免疫功能恢复,有效维持眼局部免疫平衡,对 EAU 发挥一定的治疗作用^[8]。本研究结果发现,与 NC 组相比,免疫后 12 d EAU 模型组大鼠脾脏、淋巴结、眼组织中 Notch1、DLL4、IL-10 及 IL-17 mRNA 和蛋白表达水平均明显升高,Th17/Treg 细胞比例明显失衡,提示 Notch 信号通路活化可能在葡萄膜炎病理机制中发挥作用;LXD 可明显降低 EAU 大鼠组织中 Notch1、DLL4 及 IL-17 的 mRNA 和蛋白表达水平,减轻 Th17/Treg 细胞比例失衡,提示 LXD 可能通过抑制 Notch 信号通路活化、调控 naïve CD4⁺ T 细胞向 Th17、Treg 细胞分化、均衡 Th17/Treg 细胞比例,进而发挥治疗葡萄膜炎的作用,其作用机制可能与 LXD 干预 Notch 信号通路调节的 naïve CD4⁺ T 细胞向 Th17 和 Treg 细胞的分化有关^[9]。

EAU 小鼠眼组织可表达 Notch 1、Notch 2、Jag1 和 DLL4,Notch 信号通过负调控 EAU 小鼠组织中 Treg 细胞的免疫功能加重 EAU 的发展^[10]。药理学研究表明,LXD 能调节机体免疫功能,对淋巴细胞及非特异性免疫功能均有一定的正向调节作用。白桦等^[11]研究发现,LXD 对带状疱疹患者的外周血中 Th17 细胞的表达具有显著抑制作用,提高患者免疫功能的恢复;有研究证实,LXD 可通过多种途径在 EAU 的治疗中发挥免疫调节作用,促进机体免疫功

能的恢复^[12]。本研究结果表明,LXD 可通过下调 EAU 大鼠眼组织、脾脏和淋巴结中 Notch 信号通路中 Notch1 和 DLL4 分子的表达、抑制 Notch 信号通路的活化,进而减少 naïve CD4⁺ T 细胞向 Th17 细胞的定向分化,纠正 Th17/Treg 细胞比例失衡、促进全身和眼内免疫环境“双平衡”,从而达到治疗葡萄膜炎的目的。

总之,LXD 可显著抑制 Notch 信号通路的活化、改善 Th17/Treg 细胞比例平衡,从而有助于机体免疫功能的恢复,减轻 EAU 大鼠的炎症表现。本研究为临床应用 LXD 治疗葡萄膜炎提供了新的理论依据,但其发挥作用的具体机制还需要进一步研究证实。

参考文献

[1] FASCHING P,STRADNER M,GRANINGER W,DEJACO C,FESSLER J. Therapeutic potential of targeting the Th17/Treg axis in autoimmune disorders[J]. *Molecules*,2017,22(1):134.

[2] TINDEMANS I,PEETERS M J W,HENDRIKS R W. Notch signaling in T helper cell subsets:instructor or unbiased amplifier[J]? *Front Immunol*,2017,8:419.

[3] XIANG S J,WANG Y Q,LI Y,ZHENG M Q. Effect of Longdan-xiegan capsule on the levels of cytokine in patients with positive HLA-B27 acute anterior uveitis[J]. *J Med Res*,2013,42(1):58-61.

向圣锦,王毓琴,李艳,郑美琴. 龙胆泻肝胶囊对 HLA-B27 相关性急性前葡萄膜炎患者血清相关细胞因子水平的影响[J]. 医学研究杂志,2013,42(1):58-61.

[4] YANG D. To observe the curative effect of Longdan xiegan Decoction in the treatment of anterior uveitis[J]. *Med People*,2014,5(1):39.

杨东. 龙胆泻肝汤加减治疗前葡萄膜炎的疗效观察[J]. 药物与人,2014,5(1):39.

[5] ZHUANG Z,WANG Y,ZHU G,GU Y,MAO L,HONG M,et al. Imbalance of Th17/Treg cells in pathogenesis of patients with human leukocyte antigen B27 associated acute anterior

uveitis[J]. *Sci Rep*,2017,7:40414.

[6] ZOU W,WU Z,XIANG X,SUN S,ZHANG J. The expression and significance of T helper cell subsets and regulatory T cells CD4⁺ CD25⁺ in peripheral blood of patients with human leukocyte antigen B27-positive acute anterior uveitis[J]. *Graefes Arch Clin Exp*,2014,252(4):665-672.

[7] ZHANG L. Dynamic expression of Th17/Treg cells and related inflammatory factors in the pathogenesis of autoimmune uveitis[D]. Jinan:Shandong University of Traditional Chinese Medicine,2016.

张莲. 自身免疫性葡萄膜炎发病过程中 Th17/Treg 细胞及其相关炎症因子的动态表达研究[D]. 济南:山东中医药大学,2016.

[8] TANG K,GUO D D,ZHANG L,SI J K,DU Y X,BI H S. Treatment efficacy of Longdan Xiegan Tang on rats with experimental autoimmune uveitis[J]. *Rec Adv Ophthalmol*,2015,35(4):305-309.

唐凯,郭大东,张莲,司俊康,杜宇翔,毕宏生. 龙胆泻肝汤对大鼠实验性自身免疫性葡萄膜炎的治疗作用[J]. 眼科新进展,2015,35(4):305-309.

[9] LIU B,RONG L Y,SUN Y Y,YIN X W,TANG K,BI H S,et al. Inhibitory effects of Longdan Xiegan Decoction on Notch signaling in rats with experimental autoimmune uveitis[J]. *Rec Adv Ophthalmol*,2018,38(2):106-110.

刘滨,荣立洋,孙园园,殷学伟,唐凯,毕宏生,等. 龙胆泻肝汤对葡萄膜炎大鼠 Notch 信号通路的干预作用[J]. 眼科新进展,2018,38(2):106-110.

[10] RONG H,SHEN H,XU Y,YANG H. Notch signaling suppresses regulatory T-cell function in murine experimental autoimmune uveitis[J]. *Immunology*,2016,149(4):447-459.

[11] BAI H,LIU F. Longdan xiegan Decoction clinical observation of herpes zoster and effect on immune function[J]. *World J Tradit Chin Med*,2015,10(7):1022-1025.

白桦,刘法. 龙胆泻肝汤加减对带状疱疹的临床疗效观察及对免疫功能的影响[J]. 世界中医药,2015,10(7):1022-1025.

[12] TANG K,GUO D D,LU X Z,SUN Y Y,LIU B,BI H S. Effect of Longdanxiegan Decoction on the expression of key factors of inflammatory cells in rats with uveitis[J]. *Rec Adv Ophthalmol*,2017,37(7):610-614.

唐凯,郭大东,卢秀珍,孙园园,刘滨,毕宏生. 龙胆泻肝汤对葡萄膜炎大鼠关键炎症细胞因子表达的影响[J]. 眼科新进展,2017,37(7):610-614.