

引文格式:魏慧霞,殷学伟,吴姗姗,毕宏生,郭大东.龙胆泻肝汤对实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠补体 C4、MBL2 表达的影响[J].眼科新进展,2020,40(2):105-109. doi:10.13389/j.cnki.rao.2020.0026

【实验研究】

龙胆泻肝汤对实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠补体 C4、MBL2 表达的影响[△]

魏慧霞 殷学伟 吴姗姗 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)大鼠的治疗作用及对血清中 C4、MBL2 蛋白表达水平的影响。方法 54 只 Lewis 大鼠用随机数字表法分为正常对照组、EAU 组和 LXD 组,其中 EAU 组、LXD 组大鼠制备 EAU 模型,LXD 组造模后使用 LXD 每天灌胃处理,EAU 组给予等量生理盐水灌胃。免疫后 12 d 使用激光扫描检眼镜(scanning laser ophthalmoscope,SLO)观察三组大鼠眼底炎症,并取三组大鼠同侧眼球进行病理切片,观察视网膜组织病理学变化;分离三组大鼠的脾脏和淋巴结,收集 T 淋巴细胞,流式细胞仪检测 CD4⁺/CD8⁺ 细胞比例的变化;酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)检测血清中 C4、MBL2 蛋白的表达水平。结果 SLO 检查结果显示,与正常对照组相比,EAU 组大鼠屈光间质不清,无法观察眼底视网膜及血管情况;LXD 组大鼠眼底血管迂曲扩张,屈光间质混浊,视盘边界模糊不清,但较 EAU 组大鼠症状轻。组织病理学检查结果显示,与正常对照组相比,EAU 组大鼠眼组织结构紊乱,视网膜全层破坏,视网膜内可见大量炎性细胞浸润;LXD 组大鼠视网膜仅表现为轻、中度炎性细胞浸润。流式细胞仪检测结果发现,EAU 组大鼠脾脏、淋巴结中 CD4⁺/CD8⁺ 比值均高于正常对照组;LXD 组大鼠的 CD4⁺ T 细胞表达水平下降,CD8⁺ T 细胞表达水平升高,两者比例趋于平衡。ELISA 检测结果发现,与正常对照组相比,EAU 组大鼠免疫后 12 d、16 d、20 d 血清 C4 蛋白水平均显著升高,与 EAU 组相比,LXD 组免疫后 12 d、16 d、20 d 血清 C4 蛋白水平均明显降低,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$) ;同时,EAU 组各时间点血清 MBL2 蛋白水平明显降低,而 LXD 组较 EAU 组各时间点血清 MBL2 蛋白水平均显著升高,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.01$) 。结论 LXD 可有效缓解 EAU 大鼠眼内炎症,改善脾脏、淋巴结中 CD4⁺/CD8⁺ 细胞比例失衡,同时降低血清中补体 C4 蛋白表达水平,上调 MBL2 蛋白表达水平,促进补体系统恢复平衡,加快葡萄膜炎的炎症消退,从而达到治疗 EAU 的作用。

【关键词】 龙胆泻肝汤;实验性自身免疫性葡萄膜炎;C4;MBL2

【中图分类号】 R773

作者简介:魏慧霞,女,1992 年 7 月出生,河北邢台人,在读硕士研究生。研究方向:眼科疾病分子诊断及纳米生物技术临床检验诊断。联系电话:18330103860;E-mail:1833-0103860@163.com;ORCID:0000-0002-4901-3967

通信作者:郭大东,男,1968 年 12 月出生,山东淄博人,山东中医药大学眼科研究所实验中心副主任。研究方向:眼科疾病分子诊断及纳米生物技术临床检验诊断。E-mail:da-donggene@163.com;ORCID:0000-0002-1712-0055

收稿日期:2019-08-01
修回日期:2019-09-11
本文编辑:臧赫

△ 基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81873163);山东省自然科学基金项目(编号:ZR2017LH042);山东省中医药科技发展计划项目(编号:2015-145);山东省医药卫生科技发展计划项目(编号:2013-WS0251)

作者单位:250014 山东省济南市,山东中医药大学第二临床医学院(魏慧霞,殷学伟);250014 山东省济南市,山东中医药大学眼科与视光医学院(吴姗姗);250002 山东省济南市,山东省中西医结合眼病防治重点实验室,山东中医药大学眼科研究所(毕宏生,郭大东)

主的实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis,EAU)动物模型^[5]。Yin 等^[6]研究表明,EAU 大鼠眼内炎症明显浸润时,CD4⁺/CD8⁺ 以及 Th17/Treg 比例明显升高。临床研究表明,与正常对照组相比,葡萄膜炎患者外周血中 Th17 细胞水平显著增加,Treg 细胞水平明显减少,提示 Th17/Treg 细胞比例失衡可能在葡萄膜炎的病理机制中发挥重要作用^[7]。可见,葡萄膜炎的发生发展与免疫系统的平衡紊乱密切相关。

补体是免疫系统的重要组成部分,具有免疫调节功能。研究证实,补体蛋白在调节适应性免疫、桥接先天免疫和适应性免疫中起重要作用^[8]。补体系统的紊乱会增加多种自身免疫疾病的患病风险,如系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus,SLE)、类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis,RA)、血

葡萄膜炎主要是由 T 淋巴细胞介导,涉及虹膜、睫状体和脉络膜的一类自身免疫性疾病^[1-3]。研究表明,葡萄膜炎造成了世界上 5%~10% 人群的视力损害^[4]。为探讨人类葡萄膜炎的发病机制,科研人员建立了以大鼠、小鼠为管炎和干燥综合征等^[9]。研究发现,经典途径中 C1q、C1r、C1s、C2 和 C4 等成分遗传缺陷会增加 SLE 的患病风险^[10]。伴有糜烂性关节炎及严重关节外疾病的 RA 患者,其血清甘露糖结合凝集素(mannose binding lectin,MBL)水平明显低于非 RA 患者,血清低水平 MBL 可能是我国南方人罹患严重 RA 的危险因素^[11]。Zipplies 等^[12]研究发现,全身或眼组织内 iC3b 和 C3d 活化可能与自发性复发性葡萄膜炎发病有关。由此可知,补体系统紊乱会影响自身免疫性疾病的发生发展。

龙胆泻肝汤(Longdan Xiegan decoction,LXD)是传统的中医汤药,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。唐凯等^[13]研究发现,LXD 可通过抑制 Th17、Th1 等相关炎症因子的表达发挥其在

葡萄膜炎中的抗炎作用。但 LXD 对 EAU 大鼠发病过程中补体系统的作用机制尚缺乏足够研究。本研究拟从补体通路出发,探讨 LXD 对葡萄膜炎大鼠血清中 C4、MBL2 表达的影响,研究 LXD 在 EAU 发病机制中的作用,为中药临床治疗葡萄膜炎提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物来源及喂养 6~8 周龄体重 160~180 g 雌性 SPF 级 Lewis 大鼠 54 只(北京维通利华实验动物有限公司)。实验大鼠饲养于山东中医药大学眼科研究所动物房。实验研究方案、实验动物的使用 and 喂养过程均得到山东中医药大学眼科研究所实验动物管理和使用委员会的批准。实验动物的饲养和使用遵循 ARVO 关于眼科研究动物实验的要求。

1.2 主要试剂及仪器 光感受器间维生素 A 结合蛋白(interphotoreceptor retinoid-binding protein, IRBP; 1177-1191, 氨基酸序列: ADGSSWEGVGVVP-DV; 上海生工生物工程股份有限公司); 结核菌素(tuberculin, TB; 美国 Difco 公司); 完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA; 美国 Sigma 公司); LXD 配方颗粒(产品批号: 1311007W; 华润三九医药股份有限公司); Ficoll 淋巴细胞分离液(北京 Solarbio 公司); 大鼠 C4、MBL2 蛋白酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(武汉基因美生物科技有限公司); 流式细胞仪(美国 BD FACSVerser TM 公司); FITC-CD4、PE-CD8(美国 eBioscience 公司); 激光扫描检眼镜(scanning laser ophthalmoscope, SLO; 英国 OPTOPROBE SCIENCE LTD 公司)。

1.3 动物分组及处理 采用随机数字表法将大鼠分为正常对照组(18 只)、EAU 组(18 只)和 LXD 干预组(18 只)。参照文献[14-15]方法建立 EAU 大鼠模型,在 EAU 组和 LXD 组每只大鼠后肢足垫、两侧腹壁及躯干上皮下注射 200 μL 含有 IRBP 和 TB 的 CFA 乳糜液;正常对照组大鼠注射等量只含 TB 的 CFA 乳糜液。LXD 组大鼠自免疫后第一天起,每只大鼠每天给予 1000 mg·kg⁻¹ LXD(使用剂量为临床等效剂量折算的 5 倍)灌胃处理,每天一次,直至大鼠处死。

1.4 大鼠眼底炎症表现及组织病理学检查 免疫后 12 d,每组各随机选取 3 只大鼠使用 SLO 观察大鼠眼底炎症情况;之后,腹腔注射 100 g·L⁻¹水合氯醛麻醉处死,摘除同侧眼球,立即置于眼球固定液中固定 24 h,之后将眼球标本脱水、包埋、切片,行 HE 染色,观察视网膜病理学变化。

1.5 流式细胞仪检测脾脏和淋巴结中 CD4⁺/CD8⁺细胞比例变化 取 1.4 各组大鼠脾脏和淋巴结研磨后分别离心,尼龙毛过滤收集 T 淋巴细胞,然后用大鼠淋巴细胞分离液进一步纯化得到的 T 淋巴细胞,并将各组细胞浓度调整为约 10⁶ 个·mL⁻¹。于淋巴细胞中加入 FITC-CD4、PE-CD8 各 1.2 μL,轻轻吹打混匀,然后用锡箔纸将 EP 管严密包裹,放入 4℃ 冰箱避光孵育 30 min。染色结束后用 40 μm 细胞筛网过滤,流式细胞仪检测各组大鼠脾脏和淋巴结中 CD4⁺、CD8⁺ 细胞水平,计算二者比值并分析结果。

1.6 ELISA 检测大鼠血清中 C4、MBL2 蛋白的表达水平 3 组大鼠分别于免疫后 4 d、8 d、12 d、16 d、20 d 各随机选取 3 只行心脏采血(每只 3 mL),分离血清,用 ELISA 试剂盒检测各组大鼠血清中 C4、MBL2 蛋白的表达水平。

1.7 统计学分析 所有数据均采用 SPSS 21.0 统计学软件进行分析,所有实验均重复 3 次并计算平均值,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 Levene 检验方差齐性。统计学差异比较均采用单因素方差分析,各组间两两比较采用 LSD 检验,检验水准: $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 大鼠眼底炎症表现 免疫后 12 d SLO 检查结果显示,正常对照组大鼠屈光间质清晰,视盘边界分明,血管无扩张;EAU 组大鼠屈光间质不清,无法观察眼底视网膜及血管情况;LXD 组大鼠眼底血管迂曲扩张,屈光间质混浊,视盘边界模糊不清,但较 EAU 组大鼠症状轻。免疫后 12 d 组织病理学检查结果显示,正常对照组大鼠眼组织结构排列清晰,无炎性细胞浸润;EAU 组大鼠眼组织结构紊乱,视网膜全层破坏,视网膜内可见大量炎性细胞浸润;LXD 组大鼠视网膜仅表现为轻、中度炎性细胞浸润。见图 1。

2.2 大鼠脾脏、淋巴结中 CD4⁺/CD8⁺细胞比例变化 与正常对照组大鼠脾脏和淋巴结中 CD4⁺/CD8⁺

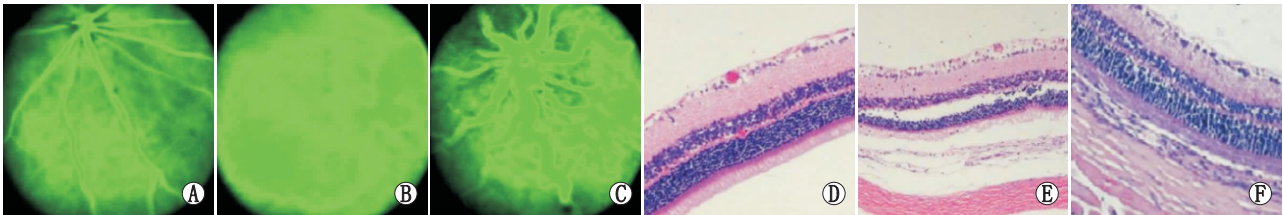


图1 免疫后 12 d 各组大鼠眼底炎症情况及组织病理学检查结果 A:正常对照组 SLO 检查;B:EAU 组 SLO 检查;C:LXD 组 SLO 检查;D:正常对照组组织病理学检查;E:EAU 组组织病理学检查;F:LXD 组组织病理学检查

细胞比例相比,免疫后 12 d 的 EAU 组大鼠脾脏和淋巴结中 $CD4^+/CD8^+$ 细胞比值均显著增高,比例失衡,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.01$);LXD 组大鼠细胞 $CD4^+$ 细胞水平均降低, $CD8^+$ 细胞水平均升高, $CD4^+/CD8^+$ 细胞比值逐渐恢复平衡,与 EAU 组相比差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$),但 LXD

组脾脏和淋巴结中的 $CD4^+/CD8^+$ 细胞比例均仍未恢复至正常水平,与正常对照组相比差异亦均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。见图 2、图 3。

2.3 ELISA 检测血清中 C4、MBL2 蛋白表达水平

ELISA 检测结果表明,免疫后 EAU 组和 LXD 组血清 C4 蛋白表达水平逐渐升高,但是 EAU 组血清 C4

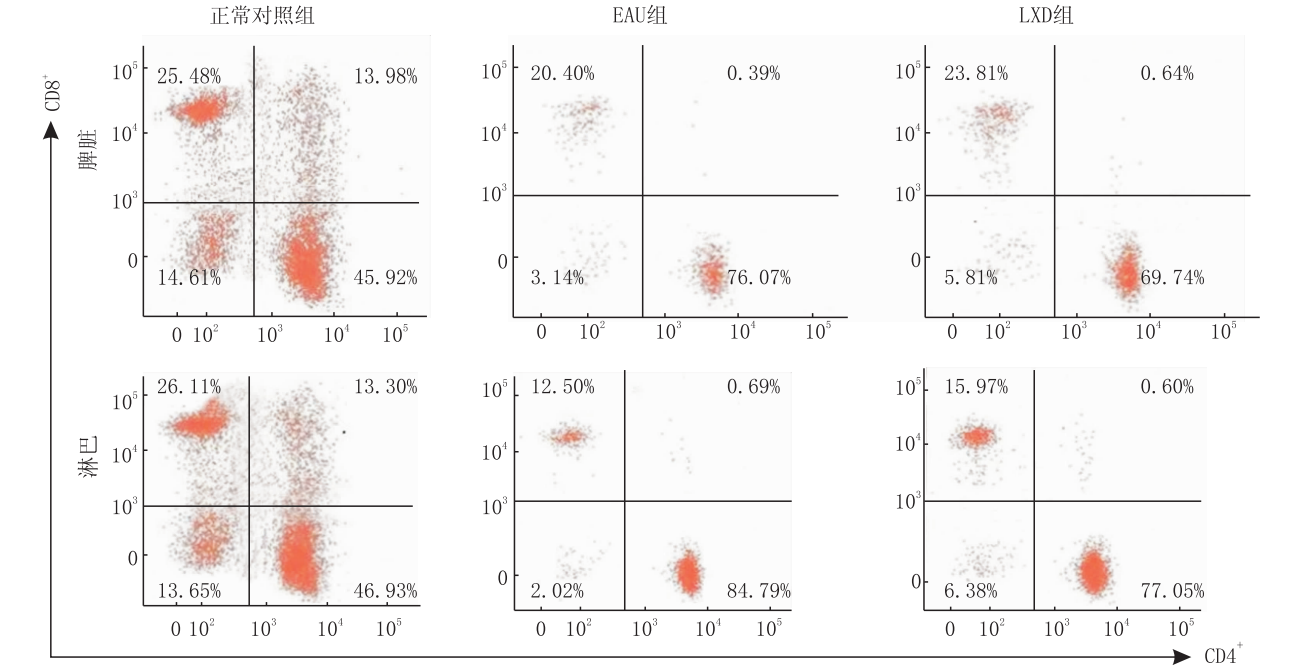


图2 流式细胞仪检测各组大鼠脾脏和淋巴结中 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 细胞水平

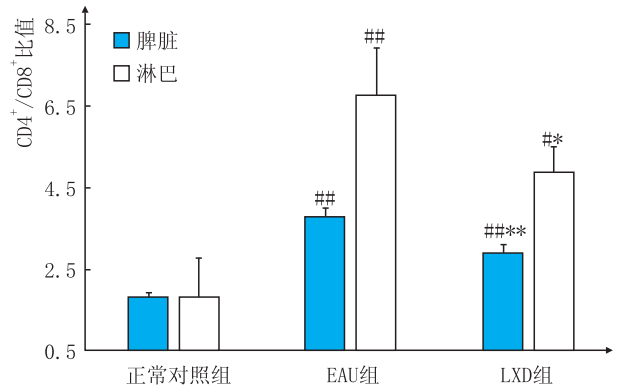


图3 免疫后 12 d 各组 $CD4^+/CD8^+$ 细胞比例比值变化 与正常对照组相比, $^{###}P < 0.01$, $^{\#}P < 0.05$; 与 EAU 组相比, $^{**}P < 0.01$, $^*P < 0.05$

蛋白水平始终高于 LXD 组。与正常对照组(0 d)相比,EAU 组大鼠免疫后 12 d、16 d、20 d 血清 C4 蛋白水平均显著升高,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.01$);与 EAU 组相比,LXD 组免疫后 12 d、16 d、20 d 血清 C4 蛋白水平均明显降低,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。免疫后 EAU 组和 LXD 组血清 MBL2 蛋白表达水平迅速下降,4 d 时达到最小值,然后随时间延长逐渐升高,与正常对照组(0 d)相比,EAU 组各时间点血清 MBL2 蛋白水平均明显降低,而 LXD 组各时间点血清 MBL2 蛋白水平均显著高于 EAU 组,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.01$);免疫后 16 d、20 d,LXD 组血清 MBL2 蛋白水平与正常对照组相比,差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。见图 4。

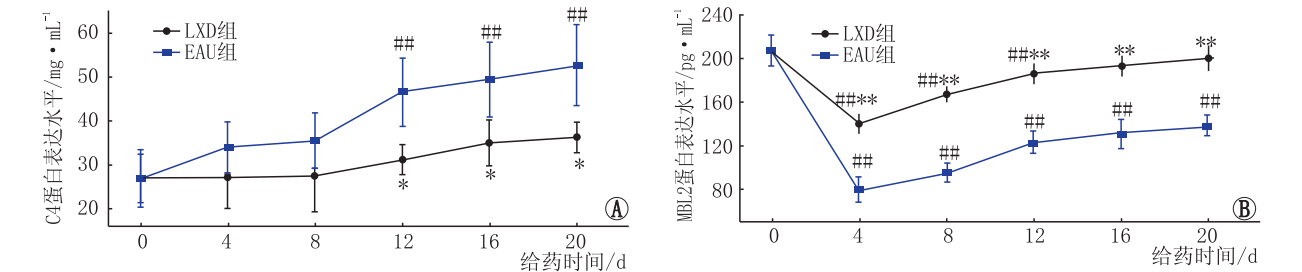


图4 各组血清中 C4 (A)、MBL2 (B) 蛋白表达水平 与正常对照组相比, $^{###}P < 0.01$, $^{\#}P < 0.05$; 与 EAU 组相比, $^{**}P < 0.01$, $^*P < 0.05$

3 讨论

葡萄膜炎是导致人类失明的重要原因之一,但其确切发病机制尚不清楚。目前研究认为,葡萄膜炎发病是眼部免疫监视功能失调、补体系统紊乱的结果^[16]。Guo等^[17]研究发现,补体系统的活化在葡萄膜炎病理机制中发挥重要作用。C4是补体系统的主要成分之一,与人类自身免疫性疾病的发病相关。临床研究发现,白塞病(Behcet's disease, BD)缓解期和非BD患者血清C4水平显著低于BD活动期患者^[18]。Zhang等^[19]研究发现,敲除C4基因的EAU小鼠视网膜炎症严重程度显著低于野生型小鼠,且视网膜中T细胞的浸润减少也表明补体C4可调节T细胞的免疫应答作用,从而影响T细胞介导的自身免疫性疾病的发展。MBL是聚集蛋白家族的成员之一,由人类10号染色体上的基因编码而成^[20]。MBL血清水平与疾病之间的关系相当复杂^[21]。低水平的MBL与感染性、自身免疫性和心血管疾病易感性相关。但由于组织损伤可有效激活补体,因此,若自身免疫性疾病和心血管疾病的患者血清MBL含量较高,其临床表现往往更严重^[22]。有研究发现,MBL等位基因变异的SLE患者其SLE反复活动发病的可能性较高,并且肾脏受累、动脉血栓形成、反复呼吸道感染风险增加^[23-24]。MBL血清浓度较低的RA患者容易形成治疗抵抗,影响疾病治疗进展,并且低水平的MBL与RA早期及进展期的放射性关节损伤相关,表明较高水平的MBL是RA的保护性因素^[25]。本课题组前期研究发现,在免疫后的11 d,EAU组大鼠血清C4水平显著升高,同时血清MBL2水平显著降低^[17],提示C4、MBL2的异常表达可能与葡萄膜炎的发生发展有关。但补体系统在葡萄膜炎发病过程中的变化尚不清楚。本研究发现,EAU大鼠血清C4蛋白在免疫后12 d、16 d、20 d显著升高,而血清MBL2蛋白在免疫后各时间点均明显降低,该结果表明,葡萄膜炎的发生发展与免疫性系统紊乱、补体系统失调密切相关。

LXD具有较强的免疫调节作用。研究表明,LXD可显著增强巨噬细胞的吞噬功能,促进淋巴母细胞的转化,提高机体抗炎能力^[26]。雷鸣等^[27]研究发现,LXD对寻常型银屑病患者NF- κ B蛋白表达有明显抑制作用,从而抑制血清中促炎因子的表达,促进疾病恢复。本研究发现,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,从而发挥对EAU的治疗作用。总之,LXD可有效降低大鼠CD4⁺细胞表达水平,提高CD8⁺细胞表达水平,使两者比值趋于平衡,有效保护EAU大鼠眼组织的超微结构、改善并维持眼局部免疫平衡;此外,LXD还可降低EAU大鼠血清补体C4表达水平,提高MBL2血清表达水平,调节全身补体系统,有助于机体免疫功能的恢复,促进葡萄膜炎的炎症消退。

参考文献

- [1] TOUHAMI S, DIWO E, SÈVE P, TRAD S, BIELEFELD P, SÈNE D, et al. Expert opinion on the use of biological therapy in non-infectious uveitis [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2019, 19 (5): 477-490.
- [2] CASPI R R. A look at autoimmunity and inflammation in the eye [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120 (9): 3073-3083.
- [3] BAR-YEHUDA S, LUGER D, OCHAION A, COHEN S, PATOKAA R, ZOZULYA G, et al. Inhibition of experimental autoimmune uveitis by the A3 adenosine receptor agonist CF101 [J]. *Int J Mol Med*, 2011, 28 (5): 727-731.
- [4] MISEROCCHI E, FOGLIATO G, MODORATI G, BANDELLO F. Review on the worldwide epidemiology of uveitis [J]. *Eur J Ophthalmol*, 2013, 23 (5): 705-717.
- [5] AGARWAL R K, CASPI R R. Rodent models of experimental autoimmune uveitis [J]. *Methods Mol Med*, 2004, 102: 395-419.
- [6] YIN X, LIU B, WEI H, WU S, GUO L, XU F, et al. Activation of the Notch signaling pathway disturbs the CD4⁺/CD8⁺, Th17/Treg balance in rats with experimental autoimmune uveitis [J]. *Inflamm Res*, 2019, 68 (9): 761-774.
- [7] 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.
- [8] WALPORT M J. Complement. First of two parts [J]. *N Engl J Med*, 2001, 344 (14): 1058-1066.
- [9] BALLANTI E, PERRICONE C, GRECO E, BALLANTI M, DI MUZIO G, CHIMENTI M S, et al. Complement and autoimmunity [J]. *Immunol Res*, 2013, 56 (2-3): 477-491.
- [10] IBERNON M, MORESO F, SERÓN D. Innate immunity in renal transplantation; the role of mannose-binding lectin [J]. *Transplant Rev (Orlando)*, 2014, 28 (1): 21-25.
- [11] IP W K, LAU Y L, CHAN S Y, MOK C C, CHAN D, TONG K K, et al. Mannose-binding lectin and rheumatoid arthritis in southern Chinese [J]. *Arthritis Rheum*, 2000, 43 (8): 1679-1687.
- [12] ZIPPLIES J K, KIRSCHFINK M, AMANN B, HAUCK S M, STANGASSINGER M, DEEG C A. Complement factor B expression profile in a spontaneous uveitis model [J]. *Immunobiology*, 2010, 215 (12): 949-955.
- [13] 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, 618.
- [14] TANG K, GUO D D, LU X Z, SUN Y Y, LIU B, BI H S. Immunomodulatory effects of Longdan Xiegan Tang on related inflammatory cytokines in rats with experimental autoimmune uveitis [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2017, 37 (7): 610-614, 618.
- [15] FREDHOLM B B, IJZERMAN A P, JACOBSON K A, LINDEN J, MÜLLERII C E. Nomenclature and classification of adenosine receptors—an update [J]. *Pharmacol Rev*, 2011, 63 (1): 1-34.
- [16] TARAZI F I, SAHLI Z T, WOLNY M, MOUSA S A. Emerging therapies for Parkinson's disease: from bench to bedside to bedside [J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 144 (2): 123-133.
- [17] MOHLIN C, SANDHOLM K, EKDAHL K N, NILSSON B. The link between morphology and complement in ocular disease [J]. *Mol Immunol*, 2017, 89: 84-99.
- [18] GUO D D, HU B, TANG H Y, SUN Y Y, LIU B, TIAN Q M, et al. Proteomic profiling analysis reveals a link between experimental autoimmune uveitis and complement activation in rats [J]. *Scand J Immunol*, 2017, 85 (5): 331-342.
- [19] HOU S, QI J, LIAO D, FANG J, CHEN L, KLJLSTRA A, et al. High C4 gene copy numbers protects against Vogt-Koyanagi-Harada syndrome in Chinese Han [J]. *Br J Ophthalmol*, 2014, 98 (12): 1733-1737.
- [20] ZHANG L, BELL B A, LI Y, CASPI R R, LIN F. Complement component C4 regulates the development of experimental autoimmune uveitis through a T cell-intrinsic mechanism [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1116.
- [21] TURNER M W. The role of mannose-binding lectin in health and disease [J]. *Mol Immunol*, 2003, 40 (7): 423-429.
- [22] HIGGINS R, MITCHELL D. Mannose-binding lectin; the sugary-sticky side of transplantation [J]. *Transplantation*,

- 2009,88(2):149-150.
- [22] BOUWMAN L H, ROEP B O, ROOS A. Mannose-binding lectin: clinical implications for infection, transplantation, and autoimmunity[J]. *Hum Immunol*, 2006, 67(4-5):247-256.
- [23] GARRED P, VOSS A, MADSEN H O, JUNKER P. Association of mannose-binding lectin gene variation with disease severity and infections in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients [J]. *Genes Immun*, 2001, 2(8):442-450.
- [24] OHLENSCHLAEGER T, GARRED P, MADSEN H O, JACOBSEN S. Mannose-binding lectin variant alleles and the risk of arterial thrombosis in systemic lupus erythematosus [J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(3):260-267.
- [25] SAEVARSDOTTIR S, VIKINGSDDOTTIR T, VIKINGSSON A, MANFREDSDOTTIR V, GEIRSSON A J, VALDIMARSSON H. Low mannose binding lectin predicts poor prognosis in patients with early rheumatoid arthritis. A prospective study [J]. *J Rheumatol*, 2001, 28(4):728-734.
- [26] 杨利敏. 龙胆泻肝汤联合黄连解毒汤加减治疗带状疱疹的疗效评价[J]. *海峡药学*, 2019, 31(3):211-213.
- YANG L M. The efficacy evaluation of Longdan Xiegan Decoction combined with Huanglian Jiedu Decoction in the treatment of herpes zoster [J]. *Strait Pharmaceut J*, 2019, 31(3):211-213.
- [27] 雷鸣, 李伟宁, 姚斌, 顾雅蕊, 张晓杰. 龙胆泻肝汤加減治疗寻常型银屑病(血热型)的临床观察[J]. *中国药房*, 2017, 28(33):4640-4643.
- LEI M, LI W N, YAO B, GU Y R, ZHANG X J. Clinical observation of modified longdan xiegan tang in the treatment of psoriasis vulgaris (blood heat type) [J]. *CHN Pharm*, 2017, 28(33):4640-4643

Effect of Longdan Xiegan decoction on expression levels of C4 and MBL2 in experimental autoimmune uveitis rats

WEI Huixia¹, YIN Xuwei¹, WU Shanshan², BI Hongsheng³, GUO Dadong³

1. The Second Clinical Medical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong Province, China
2. Medical College of Optometry and Ophthalmology, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong Province, China
3. Shandong Provincial Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Therapy of Ocular Diseases, Eye Institute of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002, Shandong Province, China

Corresponding author: GUO Dadong, E-mail: dadonggene@163.com

[Abstract] Objective To investigate the therapeutic effect of Longdan Xiegan decoction (LXD) on rats with experimental autoimmune uveitis (EAU) and its effect on serum levels of C4 and MBL2 proteins. **Methods** Totally 54 Lewis rats were randomly divided into normal control group, EAU group and LXD group by random number table. Rats in both EAU group and LXD group were used to establish EAU models. After modeling, rats in LXD group received intragastric administration of LXD every day, and those in EAU group received same volume of normal saline by gavage. After immune treatments for 12 days, the symptom of ocular fundus inflammation was observed under scanning laser ophthalmoscope (SLO) and then the pathological sections of eyeballs at the same side were extracted to observe the pathological changes of retina. Meanwhile, the spleen and lymph nodes were isolated to collect T lymphocytes for detecting the levels of CD4⁺/CD8⁺ cells by flow cytometry. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the expressions levels of C4 and MBL2 proteins in serum. **Results** Compared with control group, SLO results showed that rats in EAU group had unclear refractive stroma, fundus retina and vessels could not be observed. Rats in LXD group had tortuous and distended fundus vessels, turbid refractive stroma and unclear boundary of optic disk, but the symptoms were milder than those in EAU group. Compared with normal control group, histopathological examination results demonstrated that structure of ocular tissues were in disorder and the full-thickness retina was damaged for rats in EAU group, in addition, the retina was infiltrated by a large number of inflammatory cells. However, the retina of the rats in LXD group showed mild to moderate infiltration of inflammatory cells. Flow cytometry results showed that the levels of CD4⁺/CD8⁺ in spleen and lymph nodes for rats in EAU group were higher than those in normal control group. LXD group had lower levels of CD4⁺ T cells, whereas the levels of CD8⁺ cells increased, and the level of CD4⁺/CD8⁺ tended to balance. ELISA test showed that serum C4 levels in EAU group were apparently higher than those in normal control group on day 12, 16 and 20 after immune treatment, while the C4 levels in LXD group was apparently lower than those in EAU group on day 12, 16 and 20, and statistical differences were observed (all $P < 0.05$). In the meantime, serum MBL2 levels in EAU group apparently decreased at different time points, and were lower than those in LXD group (all $P < 0.01$). **Conclusion** LXD can effectively alleviate the intraocular inflammation in EAU rats, improve the imbalance of CD4⁺/CD8⁺ ratio in spleen and lymph nodes, decrease the expression level of C4 protein and up-regulate the expression level of MBL2 protein, promote the recovery of complement system balance, and accelerate the regression of inflammation of uveitis. LXD can play a role in treating EAU.

[Key words] Longdan Xiegan decoction; experimental autoimmune uveitis; C4; MBL2