

引文格式: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. doi:10.13389/j.cnki.rao.2018.0023

【实验研究】

# 龙胆泻肝汤对葡萄膜炎大鼠 Notch 信号通路的干预作用<sup>△</sup>

刘滨 荣立洋 孙园园 殷学伟 唐凯 毕宏生 郭大东

## Inhibitory effects of Longdan Xiegan Decoction on Notch signaling in rats with experimental autoimmune uveitis

LIU Bin, RONG Li-Yang, SUN Yuan-Yuan, YIN Xue-Wei, TANG Kai, BI Hong-Sheng, GUO Da-Dong

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of Longdan Xiegan Decoction on the expression of Notch signaling-related genes in rats with experimental autoimmune uveitis (EAU). **Methods** Totally 24 Lewis rats were randomly divided into normal control group, EAU model group and Longdan Xiegan Decoction treatment group. A rat model of EAU was established in the EAU model group and Longdan Xiegan Decoction treatment group, followed by intragastrical administration of Longdan Xiegan Decoction in the latter group after successful modeling. On day 12 after different treatments, the spleen and lymph nodes were isolated from rats of all the three groups for the collection of CD4<sup>+</sup> T cells, and the levels of both Th17 and Treg cells were analyzed by flow cytometry to calculate the ratio of Th17 to Treg cells. Meanwhile the levels of Notch1, Notch2, Notch3, Notch4 mRNAs expression were monitored by qRT-PCR. Moreover, the expressions of Notch signaling-related proteins were further detected using ELISA technique. **Results**

Flow cytometry showed increased Th17 cell level but decreased Treg cell level in the EAU model group when compared with the normal control group. However, after treatment with Longdan Xiegan Decoction, the Th17 level was decreased, whereas the Treg level was increased, and the ratio of Th17 to Treg gradually restored to equilibrium when compared to EAU model group. qRT-PCR results showed that the expression levels of Notch1, Notch2 and Notch4 mRNAs in Longdan Xiegan Decoction treatment group were significantly higher than those in the normal control group (all  $P < 0.01$ ), but lower than those in EAU model group on day 12 after treatment (all  $P < 0.01$ ), without Notch 3 expression in the spleen and lymph nodes. In addition, Notch 1, Notch 2 and Notch 4 protein levels of the spleen and lymph nodes in Longdan Xiegan Decoction treatment group showed the similar tendency as compared to those of Notch 1, Notch 2 and Notch 4 mRNAs (all  $P < 0.01$ ), and the expression of Notch 3 protein was still not observed. **Conclusion** Longdan Xiegan Decoction can effectively relieve the imbalance of Th17/Treg cells in EAU rats, and its mechanism may involve the differentiation of naive CD4<sup>+</sup> T cells into Th17 and Treg cells, which is regulated by Notch signaling.

**【Key words】** Longdan Xiegan Decoction; experimental autoimmune uveitis; Notch signaling pathway; Th17/Treg

**【摘要】 目的** 探讨龙胆泻肝汤对实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis, EAU)大鼠 Notch 信号通路相关基因表达的影响。**方法** Lewis 大鼠用随机数字表法分为正常对照组、EAU 模型组和龙胆泻肝汤干预组,后两组诱导 EAU 模型,龙胆泻肝汤干预组造模后用龙胆泻肝汤灌胃。免疫后 12 d 分别分离三组大鼠的脾脏和淋巴结收集 CD4<sup>+</sup> T 细胞,流式细胞仪检测 Th17、Treg 细胞的表达水平;实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 Notch1、Notch2、Notch3、Notch4 基因的表达情况;ELISA 检测 Notch 信号通路相关蛋白的表达水平。**结果** 流式细胞仪检测发现,与正常对照组相比,EAU 模型组大鼠脾脏和淋巴结中 Th17 细胞水平明显升高,Treg 细胞水平降低;与 EAU 模型组相比,龙胆泻肝汤干预组大鼠的 Th17 细胞水平明显下降,Treg 细胞水平升高,两者比例逐渐恢复均衡;qRT-PCR 检测发现龙胆泻肝汤干预组大鼠脾脏和淋巴结中 Notch1、Notch2 和 Notch4 基因的表达在免疫后 12 d 高于正

作者简介:刘滨,女,1993 年 2 月出生,黑龙江哈尔滨人,在读硕士研究生。联系电话:15628854787;E-mail:liubinbing2011@sina.com;ORCID:0000-0001-9697-2987

**About LIU Bin:** Female, born in February, 1993. Postgraduate student. Tel: 15628854787;E-mail:liubinbing2011@sina.com;ORCID:0000-0001-9697-2987

收稿日期:2017-10-19

修回日期:2017-11-06

本文编辑:盛丽娜

<sup>△</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助(编号:81674032, 81373826);山东省自然科学基金资助(编号:ZR2016HP27、ZR2017LH042);山东中医药科技发展计划项目(编号:2015-145)

作者单位:250014 山东省济南市,山东中医药大学[刘滨(2016 级硕士研究生),荣立洋,孙园园(2015 级硕士研究生),殷学伟(2017 级硕士研究生)];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(唐凯,毕宏生,郭大东)

通讯作者:毕宏生,E-mail:hongshengbi@163.com;ORCID:0000-0002-6965-9626。郭大东,E-mail:dadonggene@163.com;ORCID:0000-0002-1712-0055

Received date:Oct 19, 2017

Accepted date:Nov 6, 2017

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No: 81674032, 81373826); Natural Science Foundation of Shandong Province (No: ZR2016HP27, ZR2017LH042); Development Project of Science and Technology of Traditional Chinese Medicine of Shandong Province (No: 2015-145)

From the Shandong University of Traditional Chinese Medicine (LIU Bin, RONG Li-Yang, SUN Yuan-Yuan, YIN Xue-Wei), Jinan 250014, Shandong Province, China; 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 (TANG Kai, BI Hong-Sheng, GUO Da-Dong), Jinan 250002, Shandong Province, China

**Responsible author:** BI Hong-Sheng, E-mail: hongshengbi@163.com; ORCID: 0000-0002-6965-9626. GUO Da-Dong, E-mail: dadonggene@163.com; ORCID: 0000-0002-1712-0055

常对照组(均为  $P < 0.01$ ),但显著低于EAU模型组(均为  $P < 0.01$ ),Notch3基因在大鼠脾脏和淋巴结未检测到表达;ELISA检测结果发现,龙胆泻肝汤干预组大鼠脾脏和淋巴结中Notch1、Notch2和Notch4蛋白表达水平在免疫后12 d虽然高于正常对照组(均为  $P < 0.01$ ),但显著低于EAU模型组大鼠(均为  $P < 0.01$ )。结论 龙胆泻肝汤可有效缓解EAU大鼠中Th17/Treg比例失衡状态,其作用机制可能涉及到Notch信号通路调节的naïve CD4<sup>+</sup>T细胞向Th17和Treg细胞的分化。

【关键词】 龙胆泻肝汤;葡萄膜炎;Notch基因;Th17/Treg细胞

【中图分类号】 R773.4

葡萄膜炎是一类眼科常见、严重危害视觉健康的复发性自身免疫性疾病。据统计,我国葡萄膜炎患病率占眼病的5.7%~8.2%,大约有500万人罹患此病,并呈逐年上升趋势<sup>[1]</sup>。Notch信号通路是调节机体炎症反应和自身免疫性疾病发展的重要通路,可通过调控相关细胞因子的表达水平诱导细胞分化,进而影响机体的免疫状态。在免疫性血小板减少症中调节失活的Notch信号可以扭转Treg-Th17细胞的比例失衡状态<sup>[2]</sup>。有研究证实,过敏性哮喘患儿外周血中存在Th17/Treg细胞失调,这种变化伴随着Notch1的表达,说明Th17/Treg比例失调与Notch表达升高有关<sup>[3]</sup>。不同时间给予C57BL/6葡萄膜炎小鼠Notch信号通路阻断剂,均可抑制葡萄膜炎的发展<sup>[4]</sup>。B10.RIII葡萄膜炎小鼠Notch信号通路中Notch1、Notch4、Dll4及NICD等均表达上调。腹腔注射Notch信号通路阻断剂DAPT可明显减轻葡萄膜炎的发病程度<sup>[5]</sup>。

龙胆泻肝汤源自《医方集解》,方由龙胆草、柴胡、泽泻、车前子、生地、木通、当归、栀子、黄芩、甘草十味药物组成。其中龙胆草为君,栀子、黄芩为臣,柴胡、泽泻、车前子、生地、木通、当归、甘草为佐,诸药共奏清泻肝胆实火、清利肝经湿热的功效<sup>[6]</sup>。研究表明,龙胆泻肝汤能够通过多种途径改善机体免疫反应,从而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,减轻炎症,保护眼部组织结构,促进机体免疫功能恢复<sup>[7]</sup>。但是,龙胆泻肝汤对葡萄膜炎Notch信号通路相关基因表达的影响尚不清楚。本研究拟通过流式细胞仪检测脾脏和淋巴结中Th17/Treg细胞的比例变化,实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测大鼠脾脏和淋巴结中Notch信号通路Notch1、Notch2、Notch3、Notch4基因的表达水平变化,ELISA方法检测Notch信号通路相关蛋白的表达情况,以进一步探讨龙胆泻肝汤治疗葡萄膜炎的作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及处理** 24只成年健康Lewis大鼠(6~8周,体质量160~180 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司)用随机数字表法分为正常对照组、EAU模型组和龙胆泻肝汤干预组,每组各8只。EAU模型组和龙胆泻肝汤干预组大鼠在后肢足垫、两侧腹壁及躯干上皮下各点共注射200 μL含有光感受器间维生素A结合蛋白(1177-1191)、结核分

枝杆菌H37RA(tuberculin, TB)、完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)和无菌PBS的乳糜液诱导EAU;正常对照组大鼠在相同的部位注射等剂量只含TB和CFA的乳糜液。龙胆泻肝汤干预组大鼠自诱导造模后第1天起,每只大鼠给予1000 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>龙胆泻肝汤(大鼠使用剂量为临床等效剂量折算的5倍)灌胃处理,每日1次,直至大鼠处死。在免疫后12 d每组随机选取4只大鼠,取其脾脏和淋巴结用qRT-PCR及ELISA方法检测Notch基因和蛋白表达情况;另外4只大鼠分别取脾脏和淋巴结收集CD4<sup>+</sup>T细胞,用于流式细胞术检测Th17、Treg细胞的水平测定。

**1.2 主要试剂及仪器** 光感受器间维生素A结合蛋白(1177-1191;氨基酸序列:ADGSSWEGVGVVP-DV,上海生工生物工程股份有限公司合成);TB(美国Difco公司);CFA(美国Sigma公司);龙胆泻肝汤配方颗粒(产品批号:1311007W,华润三九医药股份有限公司);microRNA组织/细胞快速提取试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司);cDNA逆转录试剂盒,2×SYBR Green I试剂盒和LightCycler® 480 qRT-PCR仪(购自美国Roche公司);大鼠Notch蛋白ELISA试剂盒(武汉基因美生物科技有限公司);流式细胞仪(BD FACSVerse™,美国);FITC-CD4、PE-IL-17、APC-CD25、PE-Foxp3(美国eBioscience公司);miRNA转染试剂盒(广州锐博生物科技有限公司);固定破膜试剂盒(美国BD公司)。

**1.3 Genesis-D眼底相机观察大鼠眼底炎症表现** 大鼠免疫后用Genesis-D眼底相机每天观察大鼠眼底炎症表现,并记录相关结果。

**1.4 流式细胞仪检测脾脏和淋巴结中Th17/Treg细胞比例变化** 将三组大鼠脾脏和淋巴结研磨后分别离心,尼龙毛过滤收集细胞,然后用大鼠淋巴细胞分离液分离得到的单核细胞(每条约10<sup>6</sup>个细胞)。<sup>-80℃</sup>冰箱取出cocktail细胞刺激液,37℃水浴解冻。加入6 μL cocktail刺激液和4 μL Golgistop蛋白转运抑制剂,移液器轻轻吹打混匀。用锡箔纸严密包裹,放入37℃、体积分数5% CO<sub>2</sub>培养箱中避光孵育5 h;孵育后进行细胞表面染色,固定破膜后进行胞内染色。染色后滤网过滤,流式细胞仪检测大鼠脾脏和淋巴结中Th17、Treg细胞水平及二者比例并分析结果。

**1.5 qRT-PCR检测脾脏和淋巴结中Notch基因的表达** 脾脏和淋巴结用液氮研磨,取适量研磨后的组织按照组织RNA快速提取试剂盒说明书提取

总 RNA,用 K5600 分光光度计检测 RNA 的纯度和浓度( $A_{260}/A_{280}$  为 1.8 ~ 2.1)。提取的 RNA 用 cDNA 反转录试剂盒合成 cDNA,进行 qRT-PCR 检测(20  $\mu$ L 反应体系,每个基因设 3 个复孔)。 $\beta$ -actin 作为 Notch1 ~ 4 基因的内参。引物序列分别为: $\beta$ -actin 上游引物:5'-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3',下游引物:5'-CCCATACCCACCATCACACC-3'; Notch1 上游引物:5'-ATGGCCCCACCTGCAGACAA-GATG-3',下游引物:5'-GGCACGGCAGGCACAGCG-ATAG-3'; Notch2 上游引物:5'-GCAGCCGCCGT-CAATAATGTGG-3',下游引物:5'-GTCCCGGTTG-GCAAAGTGGTCTAA-3'; Notch3 上游引物:5'-GCCGGGTGCCCACTGCATAGACAA-3',下游引物:5'-GCCAGGGGGACAGGA-GCAGAGATA-3'; Notch4 上游引物:5'-GGGGCTGCGCTGTGAGGGGATGT-3',下游引物:5'-CTCG-GGGCAGCGGCAGGTGAAG-3'。反应条件为:95  $^{\circ}$ C、5 min,循环 1 次;95  $^{\circ}$ C、20 s,55  $^{\circ}$ C、25 s,60  $^{\circ}$ C、25 s,循环 45 次。qRT-PCR 检测结束后,按照  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算各基因表达水平,并对各组数据进行统计学分析。

**1.6 ELISA 检测脾脏和淋巴结中 Notch 相关蛋白的表达水平** 分别取三组大鼠的脾脏和淋巴结,用液氮研磨至细粉状,加入 350  $\mu$ L TRI pure 裂解。然后用超声波细胞粉碎机冰上超声 20 min,超声后 8000  $r \cdot \min^{-1}$ 、4  $^{\circ}$ C 离心 20 min。取上清测定蛋白浓度,然后用 ELISA 试剂盒检测相关 Notch 蛋白的表达水平。

**1.7 统计学分析** 所有实验均重复三次,所得数据采用 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。统计学差异比较均采用单因素方差分析,各组间的两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大鼠眼底炎症表现** 在大鼠免疫后 12 d,Genesis-D 眼底照相机观察发现 EAU 模型组大鼠出现明显眼底炎症,表现为虹膜血管严重充血扩张,前房重度混浊,纤维索性渗出、积脓,瞳孔膜闭。而龙胆泻肝汤干预组大鼠炎症表现轻于 EAU 模型组,仅表现为虹膜血管轻度扩张充血(图 1)。

图 1 免疫后 12 d 大鼠眼底炎症表现。A:正常对照组;B:EAU 模型组;C:龙胆泻肝汤干预组

**2.2 三组大鼠脾脏和淋巴结中 Th17/Treg 细胞比例变化** 流式细胞仪分别检测三组大鼠脾脏和淋巴结中 Th17、Treg 细胞的表达水平,发现与正常对照组大鼠的细胞水平相比,免疫后 12 d 的 EAU 模型组大鼠中 Th17 细胞水平明显升高,而 Treg 细胞水平明显下降,Th17/Treg 比例显著增高,呈现不平衡表达;龙胆泻肝汤干预组大鼠的 Th17 细胞水平较 EAU 模型组明显降低,而 Treg 细胞水平显著升高,Th17/Treg 比例逐渐恢复平衡,差异均有统计学意义(图 2 - 图 4)。

**2.3 三组大鼠脾脏和淋巴结中 Notch1、Notch2、Notch3、Notch4 基因的表达** qRT-PCR 检测发现(图 5),EAU 模型组大鼠脾脏和淋巴结中 Notch1、Notch2、Notch4 基因的表达水平均显著高于正常对照组大鼠(均为  $P < 0.01$ );龙胆泻肝汤干预组大鼠脾脏和淋巴结中 Notch1、Notch4 基因的表达虽然高于正常对照组(均为  $P < 0.01$ ),但显著低于 EAU 模

图 2 流式细胞仪检测各组大鼠脾脏和淋巴结中 Th17 细胞的表达水平。A:正常对照组淋巴结;B:EAU 模型组淋巴结;C:龙胆泻肝汤干预组淋巴结;D:正常对照组脾脏;E:EAU 模型组脾脏;F:龙胆泻肝汤干预组脾脏

型组(均为  $P < 0.01$ );Notch3 基因在三组大鼠的脾

脏和淋巴结中均未检测到有表达;与 EAU 模型组 Notch2 基因表达相比,龙胆泻肝汤干预组 Notch2 基因表达虽有下降,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

图3 流式细胞仪检测大鼠脾脏和淋巴结中 Treg 细胞的表达水平。A:CD25 阳性细胞 P2;B:正常对照组淋巴结;C:EAU 模型组淋巴结;D:龙胆泻肝汤干预组淋巴结;E:正常对照组脾脏;F:EAU 模型组脾脏;G:龙胆泻肝汤干预组脾脏

图4 正常对照组、EAU 模型组和龙胆泻肝汤干预组大鼠脾脏和淋巴结中 Th17/Treg 细胞比例变化。与正常对照组比较, \*  $P<0.05$ ;与 EAU 模型组比较, #  $P<0.05$

图6 正常对照组、EAU 模型组和龙胆泻肝汤干预组大鼠脾脏和淋巴结中 Notch1、Notch2 和 Notch4 蛋白的表达。与正常对照组比较, \*\*  $P<0.01$ ;与 EAU 模型组比较, ##  $P<0.01$ 。A:Notch1 蛋白;B:Notch2 蛋白;C:Notch4 蛋白

减少或功能紊乱、Th17/Treg 细胞失衡均可导致 EAU 的发生<sup>[11-12]</sup>。有研究已证实 EAU 大鼠 Th17/Treg 细胞比例失衡与 EAU 病程发展密切相关<sup>[13]</sup>。因此, Th17/Treg 比例变化可影响机体免疫反应、调控 EAU

图5 正常对照组、EAU 模型组和龙胆泻肝汤干预组大鼠脾脏和淋巴结中 Notch1、Notch2、Notch3 和 Notch4 基因的表达。与正常对照组比较, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ 。A:淋巴结;B:脾脏

2.4 大鼠脾脏和淋巴结中 Notch1、Notch2 和 Notch4 蛋白的表达 由于在 qRT-PCR 中未检测到 Notch3 基因的表达,因此我们用 ELISA 方法检测了大鼠脾脏和淋巴结中 Notch1、Notch2 和 Notch4 蛋白的表达。结果发现,龙胆泻肝汤干预组大鼠脾脏和淋巴结中 Notch1、Notch2 和 Notch4 蛋白在免疫后 12 d 均显著高于正常对照组(均为  $P<0.01$ ),但明显低于 EAU 模型组(均为  $P<0.01$ ;图6)。

### 3 讨论

naïve CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞接收抗原刺激信号,在共刺激信号分子的作用下活化,并在不同条件下分化成不同亚型的 T 淋巴细胞。白细胞介素(interleukin,IL)-6 与转化生长因子-β 是决定 naïve CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞向 Th17 或 Treg 细胞分化的关键细胞因子<sup>[8]</sup>,而 Th17、Treg 在分化上相互联系,在功能上相互拮抗<sup>[9]</sup>。Th17 细胞已被证实在 EAU 发生发展中起重要作用<sup>[10]</sup>。临床研究证实,Th17/Treg 细胞比例异常在 EAU 发病中发挥重要作用。Treg 细胞数量

的发生发展。Notch 信号通路是维持机体免疫平衡的重要信号通路,能通过调节相关细胞因子的表达水平诱导细胞分化。研究发现,经特异性 γ-分泌酶抑制剂 DAPT 阻断 Notch 信号通路后,通路中 Jagged-1 信号

分子可显著降低 CD4<sup>+</sup>T 细胞中 ROR- $\gamma$ t 的表达并下调与 Th17 相关的炎性细胞因子 IL-17A、IL-17F、IL-23a 和 IL-12rb1 的表达水平,进而抑制 CD4<sup>+</sup>T 细胞向 Th17 细胞分化,提示 Notch 信号在 Th17 细胞的分化中发挥重要作用<sup>[14]</sup>。Jiao 等<sup>[15]</sup>发现,DAPT 可显著减少 naïve T 细胞向 Th17 细胞分化,抑制 Th1 和 Th17 细胞在脾脏和淋巴结中的应答,减少血清中干扰素- $\gamma$  和 IL-17 的水平。免疫性血小板减少症患者用 DAPT 阻断 Notch 信号通路后,其外周血中 Th17 细胞和 Th17/Treg 比例均显著降低,同时伴随 IL-17 和 ROR $\gamma$ t mRNA 表达的减少<sup>[16]</sup>。上述结果表明,Notch 信号分子通过调控 naïve CD4<sup>+</sup>T 细胞向 Th17、Treg 细胞分化,在 Th17/Treg 平衡中发挥重要作用。有实验发现,不同时间给予 C57BL/6 EAU 小鼠 Notch 信号通路阻断剂,均可抑制 EAU 的发展,B10.RIII EAU 小鼠 Notch 信号通路中 Notch1、Notch4、Dll4 及 NICD 等均表达上调<sup>[4]</sup>。临床证实,活动性 Behcet 患者 Notch 信号分子高度激活,并伴随 Th17 高水平应答,阻断 Notch 信号通路可选择性抑制 Th17 应答<sup>[17]</sup>。

白桦等<sup>[18]</sup>研究发现,龙胆泻肝汤可显著抑制带状疱疹患者外周血中 Th17 细胞的表达,减少 IL-6、IL-17、IL-23 的分泌,改善患者的免疫功能。我们前期研究表明,龙胆泻肝汤能有效减轻 EAU 大鼠前房炎症反应,减少炎症细胞浸润,保护眼部组织结构,增强机体抗氧化能力,调节免疫状态<sup>[19]</sup>,其机制可能通过抑制干扰素- $\gamma$ 、IL-17 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  相关炎症因子的表达发挥其抗炎作用,促进 IL-10 的表达,加速自身免疫炎症的恢复,从而有效治疗 EAU<sup>[20]</sup>。本研究我们发现,与正常对照组相比,EAU 大鼠免疫后 12 d Th17/Treg 比例明显失衡,脾脏和淋巴结中 Notch1、Notch2 和 Notch4 的表达异常增高,提示 EAU 的发生可能与 Notch 信号通路的活化有关;龙胆泻肝汤干预 EAU 大鼠后,Notch 信号通路相关分子表达水平降低,Th17/Treg 比例失衡状况减轻,因而推测龙胆泻肝汤可通过调节 Notch 信号通路相关基因的表达调控 naïve CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞向 Th17 和 Treg 细胞分化,改善 Th17/Treg 比例,从而有助于机体的免疫功能恢复,进而减轻 EAU 大鼠的炎症表现,影响 EAU 的发展进程。本研究为临床应用龙胆泻肝汤治疗 EAU 提供了新的干预靶点和思路,但是龙胆泻肝汤调控 naïve CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞向 Th17 和 Treg 细胞分化的详细作用机制还需要进一步研究。

参考文献

[1] GE J. Ophthalmology[M]. Beijing, People's Medical Publishing House, 2005: 277.  
葛坚. 眼科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 277.  
[2] QIAN L, ZHOU YC, WU HJ, ZHUO Y, WANG YP, SI CY, et al. Notch signaling modulates the balance of regulatory T cells and T helper 17 cells in patients with chronic hepatitis C[J]. *DNA Cell Biol*, 2017, 36(4): 311-320.  
[3] LI C, SHENG A, JIA X, ZENG Z, ZHANG X, ZHAO W, et al.

Th17/Treg dysregulation in allergic asthmatic children is associated with elevated notch expression[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 137(2): 1.  
[4] BHUYAN ZA, ASANOMA M, IWATA A, ISHIFUNE C, MAEKAWA Y, SHIMADA M, et al. Abrogation of Rbpj attenuates experimental autoimmune uveoretinitis by inhibiting IL-22-producing CD4<sup>+</sup>T cells[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89266.  
[5] YANG H, ZHENG S, MAO Y, CHEN Z, ZHENG C, LI H, et al. Modulating of ocular inflammation with macrophage migration inhibitory factor is associated with Notch signaling in experimental autoimmune uveitis[J]. *Clin Exp Immunol*, 2016, 183(2): 280-293.  
[6] FENG M, ZHONG ZB, ZHOU XX. Nearly five years of clinical application of Longdan Xiegan Decoction[J]. *Asia Pac Tradit Med*, 2016, 12(16): 90-92.  
冯梅, 钟志兵, 周欣欣. 近五年龙胆泻肝汤临床应用研究概况[J]. *亚太传统医药*, 2016, 12(16): 90-92.  
[7] YANG D. To observe the curative effect of Longdanxiegan Decoction in the treatment of anterior uveitis[J]. *Med People*, 2014, (5): 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): 39.  
[8] NOACK M, MIOSECC P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases[J]. *Autoimmun Rev*, 2014, 13(6): 668-677.  
[9] IVANOVA EA, OREKHOV AN. T helper lymphocyte subsets and plasticity in autoimmunity and cancer: an overview[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015(7): 327470.  
[10] FORRESTER JV, KLASKA IP, YU T, KUFFOV AL. Uveitis in mouse and man[J]. *Int Rev Immunol*, 2013, 32(1): 76-96.  
[11] MOCHIZUKI M, SUGITA S, KAMOI K. Immunological homeostasis of the eye[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2013, 33(5): 10-27.  
[12] ZOU W, WU Z, XIANG X, SUN S, ZHANG J. The expression and significance of T helper cell subsets and regulatory T cells CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> in peripheral blood of patients with human leukocyte antigen B27-positive acute anterior uveitis[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2014, 252(4): 665-672.  
[13] ZHANG L, WAN F, SONG J, TANG K, ZHENG F, GUO J, et al. Imbalance between Th17 cells and regulatory T cells during monophasic experimental autoimmune uveitis[J]. *Inflammation*, 2016, 39(1): 113-122.  
[14] WANG Y, XING F, YE S, XIAO J, DI J, ZENG S, et al. Jagged-1 signaling suppresses the IL-6 and TGF- $\beta$  treatment-induced Th17 cell differentiation via the reduction of ROR $\gamma$ t/IL-17A/IL-17F/IL-23a/IL-12rb1[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8234.  
[15] JIAO Z, WANG W, HUA S, LIU M, WANG H, WANG X, et al. Blockade of Notch signaling ameliorates murine collagen-induced arthritis via suppressing Th1 and Th17 cell responses[J]. *Am J Pathol*, 2014, 184(4): 1085-1093.  
[16] YU S, LIU C, LI L, TIAN T, WANG M, HU Y, et al. Inactivation of Notch signaling reverses the Th17/Treg imbalance in cells from patients with immune thrombocytopenia[J]. *Lab Invest*, 2015, 95(2): 157-167.  
[17] QI J, YANG Y, HOU S, QIAO Y, WANG Q, YU H, et al. Increased Notch pathway activation in Behcet's disease[J]. *Rheumatology*, 2014, 53(5): 810-820.  
[18] BAI H, LIU F. Longdanxiegan decoction clinical observation of herpes zoster and effect on immune function[J]. *World J Tradit Chinese 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.  
[19] TANG K, GUO DD, ZHANG L, SI JK, DU YX, BI HS. Therapeutic effect of longdan xiegan decoction 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.  
[20] TANG K, GUO DD, LU XZ, SUN YY, LIU B, BI HS. 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.