

引文格式:周梦贤,殷学伟,郭励劼,邱岩,毕宏生,郭大东. 龙胆泻肝汤抑制 Notch 信号通路活化对实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠 Th1、Th2 细胞分化的影响[J]. 眼科新进展,2021,41(6):506-510. doi:10.13389/j.cnki.rao.2021.0105

【实验研究】

龙胆泻肝汤抑制 Notch 信号通路活化对实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠 Th1、Th2 细胞分化的影响[△]

周梦贤 殷学伟 郭励劼 邱岩 毕宏生 郭大东

作者简介:周梦贤(0000-0002-4343-869X),女,1997年3月出生,安徽合肥人,在读硕士研究生。主要研究方向:眼科疾病分子诊断及纳米生物技术在临床检验诊断中的应用。E-mail:zmx1048291446@163.com

通信作者:郭大东(ORCID:0000-0002-1712-0055),男,1968年12月出生,山东淄博人,教授,实验中心主任。主要研究方向:眼科疾病分子诊断及纳米生物技术在临床检验诊断中的应用。E-mail:dadongene@163.com

收稿日期:2021-02-20

修回日期:2021-04-10

本文编辑:盛丽娜

△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重点项目(编号:ZR2020KC024);山东省中医药科技发展计划(编号:2015-145)

作者单位:250014 山东省济南市,山东中医药大学[周梦贤(2020级硕士研究生),殷学伟(2020级博士研究生)];100069 北京市,首都医科大学(郭励劼);250002 山东省济南市,山东中医药大学第二附属医院(邱岩);250002 山东省济南市,山东中医药大学附属医院眼科(毕宏生);250002 山东省济南市,山东省中西医结合眼病防治重点实验室,山东省高校中西医结合眼病防治技术(强化)重点实验室,山东中医药大学眼科研究所(郭大东)

【摘要】 目的 探讨龙胆泻肝汤(LXD)对 Notch 信号通路活化的抑制作用及其对实验性自身免疫性葡萄膜炎(EAU)大鼠 Th1、Th2 细胞分化的影响。**方法** 将 30 只 Lewis 大鼠随机分为正常对照组、EAU 模型组和 LXD 干预组,其中 EAU 模型组、LXD 干预组大鼠均诱导 EAU,LXD 干预组大鼠造模后使用 LXD 每天灌胃处理,EAU 模型组和正常对照组大鼠给予等量生理盐水灌胃。干预后 12 d 分离三组大鼠的脾脏、淋巴结和眼组织,Q-PCR 检测 Rbpj 基因的表达,ELISA 检测 Rbpj、 γ 干扰素(IFN- γ)和白细胞介素-4(IL-4)蛋白的表达,流式细胞仪检测各组组织中 Th1、Th2 细胞的表达水平,分析 Th1/Th2 细胞比例的变化。**结果** 干预后 12 d,Q-PCR 检测发现,与正常对照组大鼠相比,Rbpj mRNA 在 EAU 模型组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织中均呈显著上调表达(均为 $P < 0.001$);与 EAU 模型组相比,LXD 干预组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织中 Rbpj mRNA 相对表达水平均显著降低(均为 $P < 0.01$)。ELISA 检测结果发现,EAU 模型组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织中 Rbpj 和 IFN- γ 蛋白表达水平均明显高于正常对照组,IL-4 蛋白表达水平均明显低于正常对照组(均为 $P < 0.05$);相比于 EAU 模型组,LXD 干预组大鼠脾脏、淋巴结以及眼组织中 Rbpj IFN- γ 蛋白表达水平均显著降低,IL-4 蛋白表达水平均显著升高(均为 $P < 0.05$)。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、淋巴结和眼组织中 Th1 细胞水平均明显升高,Th2 细胞水平均明显降低,Th1/Th2 细胞比例失衡(均为 $P < 0.05$);与 EAU 模型组相比,LXD 干预组大鼠各组织中 Th1 细胞水平均明显下降,Th2 细胞水平均明显升高,两者细胞比例逐渐恢复均衡(均为 $P < 0.01$)。**结论** LXD 可通过下调 EAU 大鼠 Notch 信号通路转录因子 Rbpj 的表达水平抑制 Notch 信号通路的活化,显著促进 EAU 大鼠中 Th1/Th2 细胞比例恢复平衡并改善免疫微环境,从而达到治疗葡萄膜炎的目的。

【关键词】 龙胆泻肝汤;实验性自身免疫性葡萄膜炎;Th1/Th2 细胞比例;干扰素- γ ;白细胞介素-4

【中图分类号】 R773

葡萄膜炎是一类临床常见、严重威胁患者视力的发生于虹膜、睫状体和脉络膜的炎症性眼病。据报道,全球有 5%~10% 的视力受损是由葡萄膜炎导致的,其中高达 35% 葡萄膜炎患者视功能严重受损甚至失明^[1]。有研究发现,Th1/Th2 细胞比例失衡与葡萄膜炎发病有关,其中 Th1 细胞是自身免疫性葡萄膜炎的主要致炎细胞群,Th2 细胞可分泌炎症保护类因子从而促进葡萄膜炎的恢复^[2-3]。Notch 信号通路可通过调控 Th1 和 Th2 细胞的分化影响两者的比例平衡,从而调节炎症反应,在自身免疫性疾病中发挥重要作用^[4-5]。

龙胆泻肝汤(LXD)是一种传统的中医汤药,对肝胆火炽型葡萄膜炎等免疫性眼病具有良好的治疗作用。LXD 可通过多种途径在实验性自身免疫性葡萄膜炎(EAU)治疗过程中发挥免疫调节作用。我们前期研究发现,LXD 通过抑制干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-17(IL-17)相

关炎症因子的表达促进 IL-10 的表达,发挥其抗炎作用^[6]。此外,LXD 还可显著降低 EAU 大鼠脾脏和淋巴结中 Notch1、Notch2、Notch4 基因和蛋白的表达水平,显著改善 Th17/Treg 细胞比例失衡,从而促进机体自身免疫炎症的恢复^[7-8]。但是 LXD 是否通过抑制 Notch 信号通路活化来调节 Th1/Th2 细胞分化,使两者比例达到平衡从而达到治疗葡萄膜炎的目的尚不清楚。Rbpj 作为 Notch 信号通路的一种重要的转录因子,在 Notch 信号通路的活化中发挥重要作用。本研究通过探讨 LXD 对 Notch 信号通路的转录调节因子 Rbpj 的调控作用,阐释 LXD 对 EAU 大鼠 Th1、Th2 细胞分化的影响,为临床治疗葡萄膜炎提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及处理 选用由北京维通利华实验动物技术有限公司提供的 6~8 周龄雌性 Lewis 大鼠

(160~180 g)30 只为实验对象。实验前动物首先进行为期 1 周的环境适应,并进行常规检查以排除眼部或全身疾病动物。实验动物在室温(25±1)℃、相对湿度为 50%±10%、12 h 光照和 12 h 黑暗交替循环条件下饲养。实验动物的处理原则严格遵守国家卫生研究院颁布的《实验动物护理和使用指南》。本实验经山东中医药大学眼科研究所伦理委员会批准。

1.2 主要试剂及仪器 LXD 配方颗粒(华润三九医药股份有限公司,深圳);FITC-CD4(博奥森生物技术有限公司,北京);PE-IFN-γ、PE-IL-4(eBioscience,美国);Ficoll 淋巴细胞分离液(Solarbio 公司,北京);RNA 组织/细胞快速提取试剂盒(思科捷公司,济南);cDNA 逆转录试剂盒、2×SYBR Green I 试剂盒(南京诺维赞公司,南京);BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天公司,上海);大鼠 ELISA(Rbpj、IFN-γ 和 IL-4)试剂盒(上海江莱生物技术有限公司,上海)。LightCycler 480 实时荧光定量 PCR(Q-PCR)仪(Roche 公司,美国);多功能酶标仪(Perkin-Elmer 公司,美国);荧光分光光度计(F3000,日立公司,日本);流式细胞仪(BD FACSVerse™,美国)。

1.3 实验动物分组及处理 用随机数字表法将大鼠分为正常对照组(10 只)、EAU 模型组(10 只)和 LXD 干预组(10 只),参照文献[9]方法建立 EAU 大鼠模型,即在 EAU 模型组和 LXD 干预组每只大鼠后肢足垫、两侧腹壁及躯干上皮下注射 200 μL 含有光感受器间维生素 A 类结合蛋白(IRBP)、结核分枝杆菌(TB)H37RA、完全弗氏佐剂(CFA)和无菌磷酸盐缓冲液(PBS)的乳糜液来诱导 EAU,正常对照组大鼠注射等量只含 TB 和 CFA 的乳糜液。LXD 干预组大鼠造模后每天给予 1000 mg·kg⁻¹LXD 灌胃处理(大鼠 LXD 使用剂量为临床等效剂量折算的 5 倍),EAU 模型组和正常对照组大鼠给予等量生理盐水灌胃,均为每天 1 次。各组大鼠不同处理条件干预后 12 d,使用 50 g·L⁻¹苯巴比妥溶液按 50 mg·kg⁻¹剂量腹腔注射处死大鼠,用于以下实验。

1.4 Q-PCR 检测各组大鼠不同组织中 Rbpj 基因表达 干预后 12 d,三组大鼠每组随机各取 3 只处死,无菌条件下分离脾脏、淋巴结和眼组织。按照 RNA 组织/细胞快速提取试剂盒说明书从组织中提取总 RNA,用 K5600 分光光度计检测 RNA 的纯度和浓度(A₂₆₀/A₂₈₀为 1.8~2.1)。将提取的总 RNA 用 cDNA 逆转录试剂盒反转录为 cDNA,然后进行 Q-PCR 检测(反应体系为 20 μL,每个基因设 3 个复孔),将 GAPDH 设为内参。引物序列分别为:GAPDH 上游引物为 5'-CACGGCAAGTTCAACGGCA-CAGT-3',下游引物为 5'-AGCGGAAGGGGCG-GAGATGAT-3',产物长度为 222 bp;Rbpj 上游引物为 5'-TGTCTT TGCCCCGGTCACTCCT-3',下游引物为 5'-TCGGCCTCTACATCCCCAAACCAC-3',产物长度为 138 bp。Q-PCR 反应条件设置为:95℃、5 min,

反应循环 1 次;95℃、20 s,57℃、25 s,60℃、25 s,循环 45 次。Q-PCR 检测结束后,按照 2^{-ΔΔC_t} 计算 Rbpj 的基因表达情况,并进行数据统计分析。实验重复 3 次。

1.5 ELISA 检测各组大鼠不同组织 Rbpj、IFN-γ 和 IL-4 蛋白表达水平 干预后 12 d,三组大鼠每组随机各取 3 只处死,分别收集各组大鼠的脾脏、淋巴结以及眼组织,在液氮中充分研磨至细粉状,然后加入 350 μL RIPA 裂解液溶解后电动匀浆 30 s,将样品置于冰上,超声波细胞粉碎机超声 20 min,8000 r·min⁻¹离心 10 min,收集上清液。BCA 法测定各组样品蛋白浓度,ELISA 试剂盒检测 Rbpj、IFN-γ 和 IL-4 蛋白的表达水平。实验重复 3 次。

1.6 流式细胞仪检测各组大鼠不同组织 Th1、Th2 水平 干预后 12 d,三组大鼠每组各取 4 只处死,将各组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织分别研磨后过滤,尼龙毛富集 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。加入 4 μL 细胞刺激混合剂(包含 cocktail 刺激液和 Golgistop 蛋白转运抑制剂),振荡器涡旋 10 s 充分混匀。置于 37℃、含体积分数 5%的 CO₂ 培养箱中避光孵育 5 h;孵育后用 FITC-CD4 行细胞表面染色,然后用破膜溶液对细胞固定破膜后分别用 PE-IL-4 和 PE-IFN-γ 进行细胞内染色,振荡器涡旋 10 s 充分混匀。染色结束后加入 400 μL PBS 重悬细胞,滤网过滤,流式细胞仪检测各组大鼠不同组织中 Th1、Th2 细胞表达水平,分析 Th1/Th2 细胞比例。实验重复 3 次。

1.7 统计学分析 用 GraphPad Prism 8、SPSS 21.0 统计软件进行数据分析,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:α=0.05。

2 结果

2.1 各组大鼠不同组织中 Rbpj mRNA 的相对表达水平 Q-PCR 检测结果显示,干预后 12 d,与正常对照组大鼠相比,EAU 模型组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织中 Rbpj mRNA 相对表达水平均显著升高,差异均有统计学意义(均为 P<0.001);与 EAU 模型组相比,LXD 干预组大鼠各组织中 Rbpj mRNA 相对表达水平均显著降低,差异均有统计学意义(均为 P<0.01)(见表 1)。

表 1 干预后 12 d 各组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织中 Rbpj mRNA 的相对表达水平

组别	Rbpj mRNA 相对表达水平		
	脾脏	淋巴结	眼组织
正常对照组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
EAU 模型组	3.08±0.18 ***	1.59±0.18 ***	3.12±0.36 ***
LXD 干预组	1.21±0.07 *** ^{##}	1.03±0.01 ^{###}	1.37±0.22 ^{####}

注:与正常对照组相比,*P<0.05,***P<0.001;与 EAU 模型组相比,^{##}P<0.01,^{###}P<0.001。

2.2 各组大鼠不同组织中 Rbpj、IFN- γ 和 IL-4 蛋白的表达水平 ELISA 检测结果显示,干预后 12 d,与正常对照组大鼠相比,EAU 模型组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织中 Rbpj 和 IFN- γ 蛋白的表达水平均显著升高,IL-4 蛋白的表达水平均显著降低(均为 $P < 0.05$);与 EAU 模型组相比,LXD 干预组大鼠各组织中 Rbpj 和 IFN- γ 蛋白表达水平均明显降低,IL-4 蛋白表达水平均明显升高(均为 $P < 0.05$)(见表 2)。

表 2 干预后 12 d 各组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织中 Rbpj、IFN- γ 和 IL-4 蛋白表达水平

蛋白	脾脏	淋巴结	眼组织
Rbpj/ng · L ⁻¹			
正常对照组	26.10 ± 0.79	33.27 ± 0.85	42.02 ± 1.08
EAU 模型组	78.72 ± 0.46 ***	75.24 ± 2.56 ***	80.36 ± 3.26 ***
LXD 干预组	53.54 ± 2.14 *** ###	38.81 ± 1.01 ** ###	49.61 ± 0.91 ** ###
IFN- γ /ng · L ⁻¹			
正常对照组	16.12 ± 1.95	26.02 ± 2.17	51.74 ± 1.31
EAU 模型组	42.37 ± 1.99 ***	66.72. ± 2.95 ***	84.57 ± 0.61 ***
LXD 干预组	22.37 ± 2.39 * ###	36.62 ± 2.85 * ###	62.43 ± 0.47 *** ###
IL-4/ng · L ⁻¹			
正常对照组	3.69 ± 0.18	3.24 ± 0.04	7.56 ± 0.44
EAU 模型组	2.71 ± 0.14 **	2.76 ± 0.27 **	6.26 ± 0.07 *
LXD 干预组	5.71 ± 0.71 * ###	5.05 ± 0.25 *** ###	13.22 ± 0.17 *** ###

注:同一蛋白表达水平中,与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;与 EAU 模型组比较,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$ 。

2.3 Th1、Th2 细胞的表达水平以及其比例变化 流式细胞仪检测结果显示,干预后 12 d,与正常对照组大鼠相比,EAU 模型组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织中 Th1 细胞水平均明显升高,Th2 细胞水平均明显下降,Th1/Th2 细胞比例均呈不平衡状态(均为 $P < 0.05$);相比于 EAU 模型组,LXD 干预组各组织中 Th1 细胞水平均明显降低,Th2 细胞水平均显著升高,Th1/Th2 比例逐渐恢复平衡(均为 $P < 0.01$)(见图 1-2,表 3)。

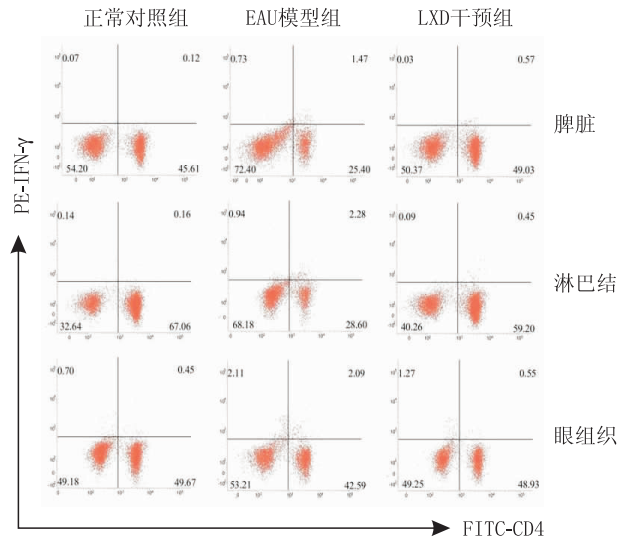


图 1 流式细胞仪检测干预后 12 d 各组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织中 Th1 细胞水平变化

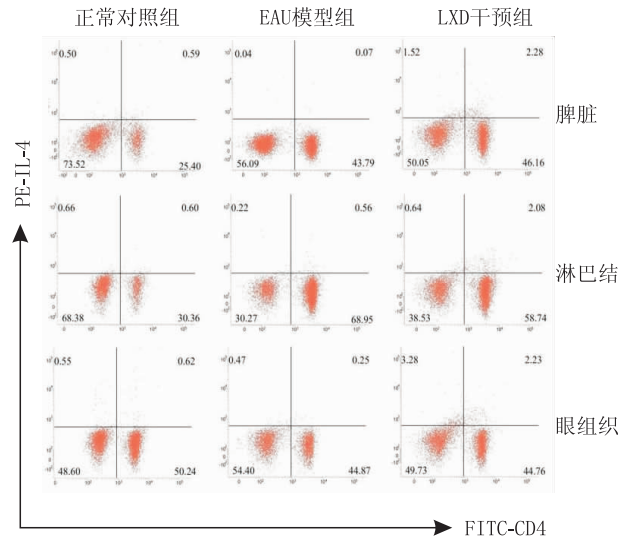


图 2 流式细胞仪检测干预后 12 d 各组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织中 Th2 细胞水平变化

表 3 干预后 12 d 各组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织中 Th1、Th2 细胞表达水平以及 Th1/Th2 细胞比例变化

组织	Th1 细胞水平/%	Th2 细胞水平/%	Th1/Th2 细胞比例变化
脾脏			
正常对照组	0.13 ± 0.12	0.64 ± 0.15	0.21 ± 0.01
EAU 模型组	1.48 ± 0.14 ***	0.17 ± 0.07 **	6.56 ± 0.94 *
LXD 干预组	0.56 ± 0.10 ###	2.12 ± 0.11 *** ###	0.26 ± 0.13 * ###
淋巴结			
正常对照组	0.19 ± 0.02	0.65 ± 0.03	0.30 ± 0.05
EAU 模型组	2.22 ± 0.04 ***	0.46 ± 0.07 *	4.92 ± 0.61 ***
LXD 干预组	0.53 ± 0.06 *** ###	2.26 ± 0.12 *** ###	0.25 ± 0.02 ##
眼组织			
正常对照组	0.36 ± 0.06	0.70 ± 0.06	0.63 ± 0.14
EAU 模型组	2.11 ± 0.21 ***	0.34 ± 0.06 **	5.84 ± 0.58 ***
LXD 干预组	0.55 ± 0.03 ###	2.16 ± 0.05 *** ###	0.27 ± 0.06 * ###

注:同一组织内,与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;与 EAU 模型组比较,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$ 。

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信号通路,可通过调控 naïve CD4⁺ T 细胞的分化水平影响 Th 细胞的比例平衡发挥作用^[10]。前期有研究已证实,EAU 大鼠 Th17/Treg 细胞比例失衡与葡萄膜炎病程发展密切相关^[11];Notch 信号通路的活化可调节 Th17 和 Treg 细胞分化,破坏 CD4⁺/CD8⁺ 和 Th17/Treg 平衡,加重 EAU 的发病程度,EAU 大鼠 CD4⁺/CD8⁺ 和 Th17/Treg 的动态变化与 Notch 信号的表达趋势及 EAU 病情发展趋势一致^[12]。另有研究表明,葡萄膜炎的发生发展与 Th1/Th2 细胞比例以及相关细胞因子表达失衡有关^[13-19]。在 EAU 的发生发展过程中,Th1 主要表现为促进疾病进展,而 Th2 则主要表现为对疾病的负

调控^[15]。Th1 细胞以分泌 IFN- γ 为主要特征,主要负责细胞免疫、诱导迟发型超敏反应,而 Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 和 IL-13,其中 IL-4 分泌最具有代表性,主要参与 IgG1 和 IgE 抗体产生。IFN- γ 和 IL-4 可以分别代表 Th1 和 Th2 细胞应答的水平^[16]。调整 Th1/Th2 细胞因子平衡网络是治疗自身免疫性疾病的一种新方法。现研究已证实,使用 IFN- γ 和 IL-4 作为靶点的基因治疗,可以显著抑制 EAU 的发生及严重程度^[17]。Notch 信号通路在多种自身免疫性疾病中可通过调控 Th1、Th2 细胞分化来影响机体生理状态^[18-19],但 Notch 通路是否通过调控 Th1、Th2 细胞的分化进而影响葡萄膜炎的发生发展尚不清楚。本研究结果表明,在 EAU 发生发展过程中,Rbpj 作为重要转录因子,可在 Notch 信号通路的活化中发挥重要作用。Notch 信号通路的活化在 Th1 和 Th2 细胞分化过程中起重要作用,与葡萄膜炎的发病进程密切相关。

LXD 对葡萄膜炎等免疫性眼病具有良好的治疗作用。有研究发现,龙胆泻肝胶囊可下调葡萄膜炎患者外周血中 TNF- α 、IFN- γ 、IL-23 的表达水平,促进机体免疫状态的改善^[20]。进一步研究发现,LXD 能有效降低 EAU 大鼠 CD4⁺/CD8⁺ 的比例,抑制脾脏、淋巴结和眼组织中 Notch 信号通路活化和 Th17 细胞分化,显著提高 IL-10 的表达水平,改善 Th17/Treg 细胞比例,从而调节 EAU 大鼠全身的免疫状态,减轻眼部炎症反应,保护眼部组织结构^[8,21-22]。

补体与多种自身免疫性疾病有关,在免疫稳态调节方面发挥重要作用。有研究证实,LXD 可通过降低 EAU 大鼠血清补体 C4 表达水平,提高 MBL2 表达水平,促进系统恢复平衡,加快炎症消退^[23]。临床和基础研究均证实,LXD 通过抑制葡萄膜炎大鼠 Notch 信号通路,可显著减少葡萄膜炎大鼠的炎症细胞浸润,降低相关炎症细胞因子的表达水平,调节全身补体系统,改善 Th17/Treg 细胞比例,恢复机体的免疫平衡,从而达到治疗葡萄膜炎的目的。本研究结果发现,相比于正常对照组,干预后 12 d 的 EAU 模型组大鼠脾脏、淋巴结和眼组织中 Rbpj 基因及蛋白表达水平均明显升高,Th1/Th2 细胞比例均显著升高;与 EAU 模型组相比,LXD 干预组大鼠各组织中 Rbpj 基因及蛋白表达水平均明显降低,Th1/Th2 细胞比例逐渐恢复均衡,提示 LXD 可通过抑制 Notch 信号通路的活化调节 Th1、Th2 细胞的分化来影响其比例平衡,从而发挥治疗葡萄膜炎的作用。

Notch 信号通路的活化可导致 EAU 大鼠 Th1/Th2 细胞比例的失衡。LXD 可通过下调 EAU 大鼠转录因子 Rbpj 的表达抑制 Notch 信号通路的活化,明显降低 Th1 细胞以及 IFN- γ 表达水平,提高 Th2 细胞以及 IL-4 表达水平,改善 EAU 大鼠 Th1/Th2 细胞比例,达到治疗葡萄膜炎的目的。本研究为临床应用 LXD 治疗葡萄膜炎提供了新的干预靶点和理

论依据,但其调控 Th1/Th2 细胞分化的详细机制还需进一步研究。

参考文献

- [1] KRISHNA U, AJANAKU D, DENNISTON A K, GKIKI T. Uveitis; a sight-threatening disease which can impact all systems [J]. *Postgrad Med J*, 2017, 93 (1106): 766-773.
- [2] 冯晓芬, 陈雪娇, 宫剑, 邢超, 意义. Th1/Th2 细胞及其细胞因子在葡萄膜炎患者外周血的表达及意义 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2016, 26 (19): 2828-2829, 2833.
FENG X F, CHEN X J, GONG J, XING C. Expression and significance of Th1/Th2 cells and their cytokines in peripheral blood of patients with uveitis [J]. *Chin J Health Inspect*, 2016, 26 (19): 2828-2829, 2833.
- [3] TIAN Q M, BI H S, CUI Y, WU J F, XIE X F, GUO J G, et al. Influence of Yanyankang Powder on Th1/Th2 in rats with experimental autoimmune uveitis [J]. *Chin J Integr Med*, 2016, 22 (3): 214-218.
- [4] LI Q F, ZHANG H, YÜ L, WU C, LUO X H, SUN H, et al. Down-regulation of Notch signaling pathway reverses the Th1/Th2 imbalance in tuberculosis patients [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 54: 24-32.
- [5] JIANG S, HAN S, CHEN J, LI X, CHE H. Inhibition effect of blunting Notch signaling on food allergy through improving Th1/Th2 balance in mice [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2017, 118: 94-102.
- [6] TANG K, GUO D, ZHANG L, GUO J, ZHENG F, SI J, et al. Immunomodulatory effects of Longdan Xiegan Tang on CD4⁺/CD8⁺ T cells and associated inflammatory cytokines in rats with experimental autoimmune uveitis [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14 (3): 2746-2754.
- [7] 孙园园, 郭大东, 陈美清, 李少玉, 刘滨, 唐凯, 等. mo-miR-30b-5p 在葡萄膜炎发病过程中对白细胞介素-10 和 Toll 样受体 4 表达的调控作用 [J]. *眼科新进展*, 2017, 37 (4): 330-334.
SUN Y Y, GUO D D, Chen M Q, LI S Y, LIU B, TANG K, et al. The regulatory role of mo-miR-30b-5p on the expression of interleukin-10 and Toll-like receptor 4 in the pathogenesis of uveitis [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2017, 37 (4): 330-334.
- [8] 殷学伟, 刘滨, 魏慧霞, 唐凯, 毕宏生, 郭大东. 龙胆泻肝汤抑制葡萄膜炎大鼠 Notch 信号通路活化的作用 [J]. *眼科新进展*, 2019, 39 (7): 615-619.
YIN X W, LIU B, WEI H X, TANG K, BI H S, GUO D D. Inhibition of Notch signaling pathway activation in rats with uveitis by Longdan Xiegan Decoction [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2019, 39 (7): 615-619.
- [9] TARAZI F I, SAHLI Z T, WOLNY M, MOUSA S A. Emerging therapies for Parkinson's disease: from bench to bedside [J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 144 (2): 123-133.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] YIN X W, LIU B, WEI H X, 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.
- [13] 王颖筱. 祛风活血丸对实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠血清 IL-4、IL-15、IFN- γ 表达的影响 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2019.
WANG H X. Effects of Expelling Wind and Invigorating Blood Pill on the expression of serum IL-4, IL-15 and IFN- γ in rats with experimental autoimmune uveitis [D]. Changsha: Hunan University of Traditional Chinese Medicine, 2019.
- [14] 赵建英, 黎海平, 郝小波, 杨毅, 郑凤鸣. 探讨运用穴位埋线对实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠外周血 IFN- γ mRNA/IL-4 mRNA 表达变化的研究 [J]. *中医眼耳鼻喉杂志*, 2019, 9 (2): 66-70.
ZHAO J Y, LI H P, HAO X B, YANG Y, ZHENG F M. Exploration of the changes of IFN- γ mRNA/IL-4 mRNA expression in peripheral blood of rats with experimental autoimmune

uveitis using acupoint embedding [J]. *J Chin Ophthalmol Otorhinolaryngol*, 2019, 9 (2): 66-70.

[15] 王燕平. Th1/Th2 极化: 实验性自身免疫性葡萄膜炎[J]. 上海免疫学杂志, 2001, 21 (6): 382-384.

WANG Y P. Th1/Th2 polarization: experimental autoimmune uveitis [J]. *Shanghai J Immunol*, 2001, 21 (6): 382-384.

[16] 郭桂梅, 郭履卿, 苏始新, 王晓川. Th1, Th2 免疫应答与小儿常见自身免疫病[J]. 复旦学报 (医学版), 2002, 29 (3): 197-199.

GUO G M, GUO L Z, SU Y X, WANG X C. Th1 and Th2 immune responses and common pediatric autoimmune diseases [J]. *Fudan J (Med Ed)*, 2002, 29 (3): 197-199.

[17] JV S, LICHUN T, BO L, WEI L, YANG Y, KJLSTRA A, et al. AAV2-Mediated subretinal gene transfer of mIL-27p28 attenuates experimental autoimmune uveoretinitis in mice [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (5): e37773.

[18] MATSUSHITA S, TAKAGI R, HASHIMOTO K, HIGASHI T. Qualitative evaluation of adjuvant activities and its application to Th2/17 diseases [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2011, 155 (Suppl 1): 2-5.

[19] YAMANE H, PAUL W. Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4 (+) T cells toward distinct T-helper cell subsets [J]. *Immunol Rev*, 2013, 252 (1): 12-23.

[20] 向圣锦, 王琴, 李艳, 郑美琴. 龙胆泻肝胶囊对 HLA-B27 相关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.

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

[21] YIN X W, QIU Y, LI Z H, GUO L J, WEI H X, LIU B, et al. Longdan xiegan decoction alleviates experimental autoimmune uveitis in rats by inhibiting notch signaling pathway activation and Th17 cell differentiation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 136: 111291.

[22] 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.

LIU B, RONG L Y, SUN Y Y, YIN X W, TANG K, BI H S, et al. Interventional effect of gentian diarrhea of liver soup on Notch signaling pathway in rats with uveitis [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2018, 38 (2): 106-110.

[23] 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.

WEI H X, YIN X W, WU S S, BI H S, GUO D D. Effects of Longdan Xiegan Decoction on the expression of complement C4 and MBL2 in rats with experimental autoimmune uveitis [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2020, 40 (2): 105-109.

Effects of Longdan Xiegan Decoction on Th1 and Th2 cell differentiation by inhibiting Notch pathway activation in experimental autoimmune uveitis rats

ZHOU Mengxian¹, YIN Xuewei¹, GUO Lijie², QIU Yan³, BI Hongsheng⁴, GUO Dadong⁵

1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong Province, China
2. Capital Medical University, Beijing 100069, China
3. The Second Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002, Shandong Province, China
4. Affiliated Eye Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002, Shandong Province, China
5. Shandong Provincial Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Therapy of Ocular Diseases, Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Eye Disease Prevention and Treatment Technology (Enhanced) in Universities of Shandong Province, 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 inhibition effect of Longdan Xiegan Decoction (LXD) on Notch signaling activation and Th1 and Th2 cell differentiation in experimental autoimmune uveitis (EAU) rats. **Methods** Totally 30 Lewis rats were randomly divided into normal control (NC) group, EAU model group and LXD intervention group. A model of uveitis was induced in rats of the EAU model group and LXD intervention group. The rats in the LXD intervention group were given LXD intragastrically every day after modeling, while the rats in EAU model group and the NC group were treated with the same volume of normal saline intragastrically. After 12 days of the intervention, the spleen, lymph nodes and eye tissues of the rats in the three groups were isolated. Furthermore, Q-PCR was used to detect the expression of Rbpj mRNA, while enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the protein expression of Rbpj, IFN- γ and IL-4. In addition, the levels of Th1 and Th2 cells in each tissue were detected by flow cytometry, and the proportional changes of Th1/Th2 cell were further analyzed. **Results** On day 12 after intervention, compared with the NC group, the result of Q-PCR showed that Rbpj mRNA expression was significantly upregulated in spleen, lymph node and eye tissues in the EAU model group (all $P < 0.001$); compared to the EAU model group, the relative expression levels of Rbpj mRNA in spleen, lymph nodes and eye tissues in LXD intervention group was significantly decreased (all $P < 0.01$). ELISA results revealed that compared to NC group, the expression levels of Rbpj and IFN- γ in spleen, lymph nodes and eye tissues in the EAU model group were significantly elevated, whereas the expression levels of IL-4 were significantly decreased (all $P < 0.05$). Compared with the EAU model group, the levels of Rbpj and IFN- γ proteins in spleen, lymph nodes and eye tissues in the LXD intervention group were significantly decreased, whereas the levels of IL-4 were significantly increased (all $P < 0.05$). The result of flow cytometry showed that compared with the NC group, the expression levels of Th1 in spleen, lymph node and eye tissues in the EAU model group were significantly increased, whereas the expression levels of Th2 were significantly decreased, and the ratio of Th1/Th2 showed at an unbalanced expression state (all $P < 0.05$); compared with the EAU model group, the Th1 cell levels decreased and the Th2 cell levels increased in the tissues of the LXD intervention group, and the proportion of Th1/Th2 gradually returned to the balance (all $P < 0.01$). **Conclusion** LXD can inhibit the activation of Notch signaling pathway by down-regulating the expression level of Rbpj, and significantly restore the balance of Th1/Th2 ratio and improve the immune microenvironment in EAU rats, thereby achieving the purpose of treating uveitis. **[Key words]** Longdan Xiegan Decoction; experimental autoimmune uveitis; ratio of Th1 to Th2; IFN- γ ; IL-4