

李煜,夏婷,康超艳,等.人参、甘草、五味子复合醋提物对老年小鼠急性炎性肝损伤保护作用的研究[J].食品工业科技,2022,43(4):366-372. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060059

LI Yu, XIA Ting, KANG Chaoyan, et al. Protective Effect of Medicine Vinegar Extract of *Panax ginseng*, *Glycyrrhiza* and *Schisandra chinensis* on Acute Liver Injury in Mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(4): 366-372. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060059

· 营养与保健 ·

人参、甘草、五味子复合醋提物对老年小鼠急性炎性肝损伤保护作用的研究

李煜¹,夏婷^{1,*},康超艳¹,田颖蕾¹,房彬¹,闫裕峰²,朗繁繁²,郑宇¹,王敏^{1,*}

(1.食品营养与安全国家重点实验室,天津市微生物代谢与发酵过程控制技术工程中心,天津科技大学
生物工程学院,天津 300457;

2.山西紫林醋业股份有限公司,山西太原 030400)

摘要:目的:本研究旨在通过脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)诱导肝损伤小鼠考察复合醋提物(MVE)对老年小鼠炎性肝损伤的保护效果。方法:将小鼠随机分为正常对照组、MVE组、LPS组、LPS+MVE组。通过苏木精-伊红染色评估肝组织病理情况和免疫组织化学染色判断髓过氧化物酶的表达变化。同时,检测肝组织中白介素-1 β 、白介素-17、CXC趋化因子配体1、CXC趋化因子配体17等生化因子水平。免疫印迹法测定肝脏中Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)和p-NF- κ B p65蛋白表达量变化。结果:复合醋提物能减少中性粒细胞及炎症细胞浸润,极显著降低LPS模型小鼠肝脏谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、活性氧(ROS)水平($P<0.01$),并降低促炎因子和中性粒细胞趋化因子水平($P<0.05$),降低炎症通路TLR4和p-NF- κ B p65的蛋白表达水平($P<0.001$)。结论:MVE能改善LPS诱导急性炎症小鼠的肝损伤,此外,MVE还能通过平衡促炎和抗炎因子水平变化、抑制TLR4-NF- κ B信号通路,最终达到发挥护肝作用效果。

关键词:醋制中药,脂多糖,肝损伤,炎症反应,TLR4-NF- κ B信号通路

中图分类号:TS201.4

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2022)04-0366-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060059



本文网刊:

Protective Effect of Medicine Vinegar Extract of *Panax ginseng*, *Glycyrrhiza* and *Schisandra chinensis* on Acute Liver Injury in Mice

LI Yu¹, XIA Ting^{1,*}, KANG Chaoyan¹, TIAN Yinglei¹, FANG Bin¹, YAN Yufeng², LANG Fanfan², ZHENG Yu¹, WANG Min^{1,*}

(1.State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Tianjin Engineering Center for Microbial Metabolism and Fermentation Process Control, College of Biotechnology, Tianjin University of

Science and Technology, Tianjin 300457, China;

2.Shanxi Zilin Vinegar Co., Ltd., Taiyuan 030400, China)

Abstract: Objective: Investigating the protective effect of MVE was the purpose of this study, which performed on LPS-induced liver injury in aged mice. Methods: The mice were randomized into the groups of normal control, MVE, LPS and LPS+MVE. The pathological changes of liver tissue and the expression of myeloperoxidase were observed by hematoxylin-eosin staining and immunohistochemical staining. The levels of IL-1 β , IL-17, CXCL1, CXCL17 and other factors in liver were measured. Western blotting was used to detect the expressions of TLR4 and NF- κ B p65 in liver tissue samples. Results: The MVE could effectively decline the infiltration of neutrophils and inflammatory cells, significantly decrease the levels of ALT, AST, ROS ($P<0.01$), pro-inflammatory cytokines and neutrophil chemokines ($P<0.05$) in the liver of LPS

收稿日期: 2021-06-08

基金项目: 天津科技大学新型冠状病毒防治科研攻关项目(20200225)。

作者简介: 李煜(1996-),女,硕士研究生,研究方向:发酵食品营养与功能研究,E-mail: liyu962366@163.com。

*通信作者: 夏婷(1979-),女,博士,副教授,研究方向:中药药理学研究,E-mail: xiating@tust.edu.cn。

王敏(1971-),女,博士,教授,研究方向:发酵食品营养与功能研究,E-mail: minw@tust.edu.cn。

model mice, and decrease protein expressions of TLR4 and NF- κ B p65 in inflammatory pathway ($P<0.001$). Conclusion: The MVE could improve the liver injury of mice with acute inflammation induced by LPS, and exert its hepatoprotective mechanism by regulating the balance of pro-inflammatory and anti-inflammatory factors and inhibiting TLR4-NF- κ B signal pathway.

Key words: medicine vinegar extract; lipopolysaccharide (LPS); liver injury; inflammatory reaction; TLR4-NF- κ B signal pathway

肝脏是机体最大的代谢器官,具有免疫功能。细菌、病毒入侵感染机体和药物、食物中毒等损伤因素对肝细胞的直接作用以及这些损伤因素引起的先天免疫反应释放的细胞因子、趋化因子、过氧化物等多种生物活性物质均能引起肝损伤^[1-2]。在人体衰老过程中,肝脏的生理功能也会随之下降,肝细胞的衰老使得肝脏体积缩小,对消化吸收入血物质的代谢能力和血液中毒素的清除能力削弱,营养代谢的降低和体内毒素的聚集是造成肝损伤的主要原因。严重的肝损伤伴发急性肝衰竭和严重并发症,威胁着老年群体的生命。脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)位于革兰阴氏菌细胞外壁上,能激发人体免疫应答和造成组织损伤,吸收后随血循环入肝进行清除解毒。在 LPS 诱导的肝损伤模型中, LPS 刺激库普弗细胞(Kupffer cells, KC)提高趋化因子和黏附分子的合成或释放,促进中性粒细胞(Polymorphonuclear neutrophil, PMN)、T 淋巴细胞及单核巨噬细胞聚集和附着在肝脏组织,分泌多种促炎细胞因子从而损伤肝脏组织^[3-4]。另有研究表明,活化的 KC 能产生白介素-10(interleukin 10, IL-10)等细胞因子,这些细胞因子对炎症反应具有比较强的抑制性,其通过抑止肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)等促炎因子对组织造成的炎症性损伤,进而发挥抗炎作用^[5]。因此,降低体内炎症反应对肝脏的保护作用极为重要。

食醋作为饮食中非常重要的调味酸性传统发酵食品,它含有丰富的多酚、黄酮、多糖等活性成分。传统医学认为食醋具有收敛止咳、理气、消肿、止血、润肺补阴、引药入肝以及解毒等功效^[6]。现代医学研究表明食醋能有效抵御机体氧化应激、调节机体的免疫功能、护肝及预防心血管疾病等作用^[7-8]。研究表明中药材人参、甘草和五味子中含有多种皂苷类、多糖及黄酮类活性成分,具有抗炎、抗氧化、增强免疫的药理学作用,同时还对人体的肝损伤有保护功能,其中甘草酸和木脂素具有极强的抗菌及抗炎活性。醋制中药能增加药物中有效成分的溶解度,改变药物质地便于煎煮,提高药物疗效,削弱药物毒性作用,醋制引药入肝是中华民族传统医学独有的医学理论,总结为醋味酸性微温,归肝经,具有活血之功效^[9]。本研究旨在正常老年小鼠和 LPS 诱导的老年小鼠炎症性肝损伤模型下,探究人参、甘草、五味子复合醋提取物(Medicine vinegar extract, MVE)对肝损伤的保护作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

中药材(人参、甘草、五味子) 北京同仁堂股份有限公司;食醋 山西紫林醋业股份有限公司;动物 ICR 小鼠(SPF 级)40 只,体重(45 \pm 3)g,雄性,实验动物合格证号为 SCXK(京)2016-0006,由北京维达尔河实验动物技术有限公司提供;谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂盒 南京建成生物有限公司;TNF- α 、IL-6、IL-10、白介素-4(interleukin 4, IL-4)、白介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、白介素-17(interleukin 17, IL-17)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、趋化因子配体 17(CXC chemokine ligand 17, CXCL17)、趋化因子配体 1(CXC chemokine ligand 1, CXCL1)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)试剂盒 上海酶联生物科技有限公司;Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)、NF- κ B、GAPDH 抗体 美国圣克鲁斯(Santa Cruze)生物技术有限公司。

1X2-1LLJ100 普通光学显微镜 日本 Olympus 有限公司;1500 全波长酶标仪 美国 Thermo 有限公司;Odyssey 红外激光成像 美国 LI-COR 生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 复合醋提物的制备 经预实验确定复合醋提

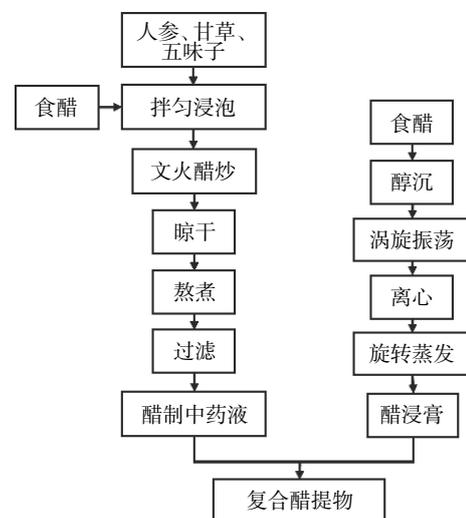


图 1 人参、甘草、五味子复合醋提取物制备工艺流程图

Fig.1 Flowchart of preparation of medicine vinegar extract of *Panax ginseng*, *Glycyrrhiza* and *Schisandra chinensis*

物的制备最佳工艺条件,具体为称取中药材(人参 5 g、甘草 5 g、五味子 20 g),加入 4.5 倍中药材总质量的食醋水溶液(体积浓度为 60%)拌匀浸泡过夜,文火醋炒至微干,再喷洒食醋水溶液、晾干、筛去碎屑备用。加入 500 mL 双蒸水熬煮后过滤得醋制中药液 5 mL; 10 mL 食醋与 30 mL 无水乙醇混匀,静置后离心(7000 r/min, 15 min)、涡旋振荡 20 min、超声 40 min、待混合均匀后置于 4 ℃ 再次离心(7000 r/min, 10 min),取上层溶液,随后在 50 ℃ 温度条件下使用旋转蒸发器进行蒸发浓缩,最后得到 4 mL 醋浸膏。取 1 mL 醋浸膏与 1.3 mL 醋制中药液混匀,得 MVE 溶液/膏约 2.3 g(含 750 mg 食醋提取物+生药 6 g),制备工艺流程见图 1。

1.2.2 动物实验分组 40 只 SPF 级雄性 ICR 老龄小鼠经过适应性喂养(给予充足饮食和 12 h 循环光照)7 d 后随机分入正常对照组、MVE 组(2.3 g/kg·bw)、LPS 组(5 mg/kg·bw)、MVE(2.3 g/kg·bw)+LPS(5 mg/kg·bw)组,每组 10 只。MVE 组和 MVE+LPS 组给予 MVE 连续口服灌胃 30 d(1 次/天),其余组灌胃等量生理盐水。LPS 组、MVE+LPS 组小鼠在 30 d 后末次给药 12 h 后进行腹腔注射 LPS(5 mg·kg⁻¹),5 h 后取小鼠肝脏组织,保存待测。

1.2.3 肝组织形态学检查 肝组织用多聚甲醛(4%)固定,24 h 后石蜡包埋,将肝组织样本切成厚度为 3 μm 的截面,附着于载玻片上。用苏木精-伊红染色法(Hematoxylin-eosin staining, HE)染色。将染色样本进行封片,使用光学显微镜观察对比各组肝组织病理学变化。采用免疫组织化学染色法(Immunohistochemistry, IHC)染色切片观察样本组织中髓过氧化物酶(Myeloperoxidase, MPO)的表达。

1.2.4 ALT 和 AST 检测 将肝脏样本与 PBS 缓冲液一起进行液氮研磨,4 ℃ 静置 20 min,4 ℃ 4500 r/min 离心 8 min 取上清液后按试剂盒说明书测定 ALT 和 AST 活力,在 510 nm 处检测分析各孔吸光度值。

1.2.5 肝组织 ROS 和细胞因子检测 等质量选取相同部位肝脏组织标本置于 PBS 缓冲液中,液氮研磨成匀浆,4 ℃ 静置 20 min,4 ℃ 4500 r/min 离心 8 min,使用 ELISA 试剂盒对各样本上清中 ROS 和 IL-1β、TNF-α、TGF-β、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17 及 CXCL1、CXCL17 表达水平测定并在 450 nm 处进行吸光度检测。

1.2.6 Western blot 检测 TLR4 和 p-NF-κB p65 的蛋白水平 取等质量小鼠肝脏组织加入等体积的组织细胞液裂解,液氮研磨成匀浆,4 ℃ 静置 20 min,离心取上清加入蛋白上样缓冲液,在 98 ℃ 条件下加热 5 min,随后-80 ℃ 保存。取等质量等体积样品,将聚丙烯酰胺凝胶电泳技术分离的蛋白转到 PVDF 膜上,然后用 7% 脱脂牛奶封闭,随后取出,与一抗 4 ℃

孵育过夜,洗涤后与二抗孵育。经过 TBST 缓冲液洗涤,奥德赛红外成像系统避光扫描检测蛋白表达。分析蛋白条带灰度值,计算各目的蛋白表达量。

1.3 数据处理

上述所有实验全部重复三次,通过 SPSS 统计软件处理,所有结果以平均值±标准差(X±SD)表示。使用 GraphPad Prism 5.03 制作图表进行 *t* 值检验。

2 结果与分析

2.1 MVE 对老年急性炎性肝损伤小鼠肝脏组织的影响

口服灌胃复合醋提取物期间,小鼠无死亡情况,MVE 组小鼠表现出精神状态好、被毛柔顺响亮,表明复合醋提取物对小鼠无明显毒副作用。LPS 组小鼠活动明显减少,精神萎靡伴有被毛凌乱暗淡,而 MVE+LPS 组小鼠这些症状较轻。此外,LPS 组小鼠肝脏略显苍白,给予复合醋提取物对这一现象具有有效缓解作用。使用光学显微镜对各组肝组织进行形态学观察如图 2 所示,发现 LPS 组小鼠的肝索模糊、肝细胞界限不清,肝细胞严重肿胀伴炎性浸润等;MVE+LPS 组较 LPS 组这些病理改变能有效缓解;并且相较于正常对照组,MVE 组小鼠的肝脏细胞的形态更好、细胞排列更为紧密,且界限更加清晰,细胞胞浆着色均匀,肝索结构更加整齐清晰,这可能与多酚、黄酮、皂苷、多糖、木脂素和甘草酸等活性成分的抗炎和肝保护作用有关,提示 MVE 具有改善小鼠因衰老所致肝细胞受损的功效。

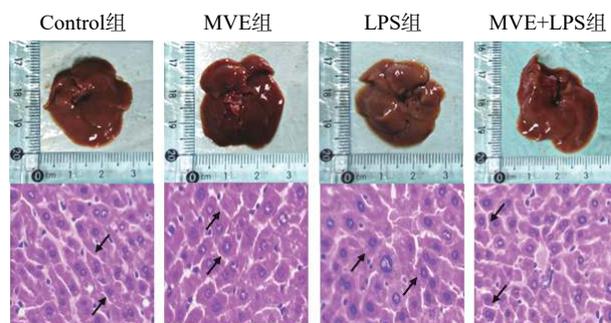


图 2 各组小鼠肝脏解剖图及其组织病理学变化(200×)
肝索为黑色箭头标记

Fig.2 Anatomical map and histopathological changes of mice liver (200×)

2.2 MVE 对老年急性炎性肝损伤小鼠肝脏肝功酶和 ROS 的影响

研究结果如表 1 所示,相对于与正常对照组,LPS 组小鼠肝脏样本中 ALT、AST 和 ROS 活性都极显著升高($P<0.01$);MVE 组小鼠肝组织样本中 ALT、AST 和 ROS 活性均降低($P<0.05$);MVE+LPS 组小鼠可显著对抗 LPS 诱导引起的 ALT、AST 和 ROS 活性增强($P<0.01$)。表明 MVE 能有效抑制肝脏 ROS 生成,发挥其保护肝脏的作用,这可能与保

表 1 各组小鼠肝脏组织 ALT、AST、ROS 的含量变化(n=10)
Table 1 Changes of ALT, AST and ROS contents in liver of mice in each group (n=10)

组别	ALT(U/L)	AST(U/L)	ROS(U/mg)
正常对照组	6.94±1.21	8.56±1.01	52.71±1.94
MVE组	2.07±0.26 ^{###}	5.81±0.51 [#]	46.74±2.11 [#]
LPS组	27.03±2.74 ^{###}	67.42±0.88 ^{###}	92.88±1.19 ^{###}
MVE+LPS组	12.77±0.49 ^{**}	19.08±2.64 ^{**}	70.34±1.92 ^{**}

注: 与正常对照组相比, [#] $P<0.05$, ^{###} $P<0.01$, ^{####} $P<0.001$; 与LPS组相比, ^{**} $P<0.01$ 。

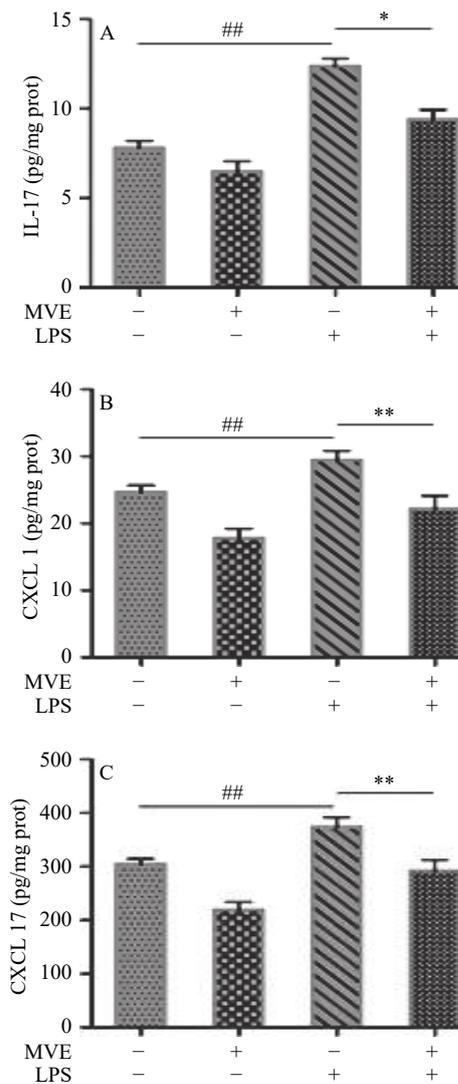


图 3 小鼠肝脏组织中 IL-17、CXCL1 和 CXCL17 的检测结果

Fig.3 Changes of IL-17, CXCL1 and CXCL17 contents in liver of mice in each group

注: 与正常对照组相比, [#] $P<0.05$, ^{###} $P<0.01$, ^{####} $P<0.001$; 与 LPS 组相比, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$, ^{***} $P<0.001$; 图 4-图 5 同。

护肝细胞免受氧化应激引起细胞死亡和减少 ROS 诱导 PMN 凋亡削弱炎症反应有关。

2.3 MVE 对老年急性炎症性肝损伤小鼠肝脏中趋化因子表达的影响

为了探究 MVE 对 PMN 调控作用, 检测了 PMN 趋化因子 IL-17、CXCL1 和 CXCL17 的含量。结果

如图 3 所示, LPS 组老年小鼠肝组织匀浆液中趋化 PMN 的细胞因子 IL-17、CXCL1 和 CXCL17 较正常对照组极显著升高 ($P<0.01$), 伴随 MVE 的摄入, MVE+LPS 组老年小鼠可显著对抗 LPS 诱导引起的 PMN 趋化因子表达升高 ($P<0.05$), 表明 MVE 能通过减缓 PMN 募集, 避免 PMN 受 ROS 等抗原物质刺激引发大量凋亡加剧炎症反应, 保护肝组织免受炎症损伤。

2.4 MVE 对老年急性炎症性肝损伤小鼠肝脏 MPO 表达的影响

过氧化物酶 (Myeloperoxidase, MPO) 是 PMN 激活和功能的标志, MPO 在灭活毒素的同时还参与调节免疫炎症反应。为了探究 MVE 对 MPO 调控作用, 在光学显微镜下观察 MPO (黄色染色) 在肝脏组织的浸润程度, 结果如图 4 所示, 由于小鼠衰老所致的肝脏细胞组织损伤诱导 PMN 活化, 因此, 可见正常对照组中老年小鼠肝组织内有 MPO 浸润, 伴随 MVE 的摄入, MVE 组老年小鼠可明显减少 MPO 在肝组织的浸润, 减弱 PMN 活化对肝细胞的损伤, 证实了 MVE 能有效改善小鼠因衰老所致的肝细胞受损。LPS 组老年小鼠肝组织中的 MPO 广泛大量浸润, 伴随 MVE 的摄入, MVE+LPS 组老年小鼠可明显改善 LPS 诱导引起的 MPO 在肝组织的浸润。表明 MVE 能通过降低 MPO 浸润肝组织减弱炎症反应保护肝损伤。

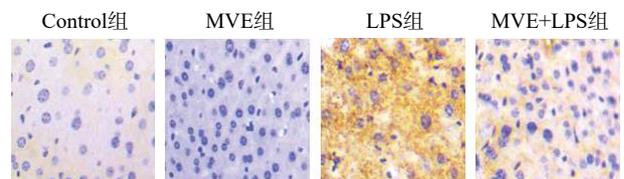


图 4 肝脏样本中 MPO 的免疫组织化学染色结果(200×)
Fig.4 Immunohistochemical staining of MPO in liver of mice in each group (200×)

2.5 MVE 对老年急性炎症性肝损伤小鼠肝脏促炎和抗炎细胞因子表达的影响

为了探究 MVE 对细胞因子的调控作用, 检测了 IL-1 β 等促炎细胞因子和 IL-10 等抗炎细胞因子的含量。如图 5 所示, LPS 组小鼠肝组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 较正常对照组均高度显著升高 ($P<0.001$), 而 IL-4、IL-10、TGF- β 含量也会显著升高 ($P<0.01$), 这可能是老年小鼠自身免疫功能受抗原激活后分泌

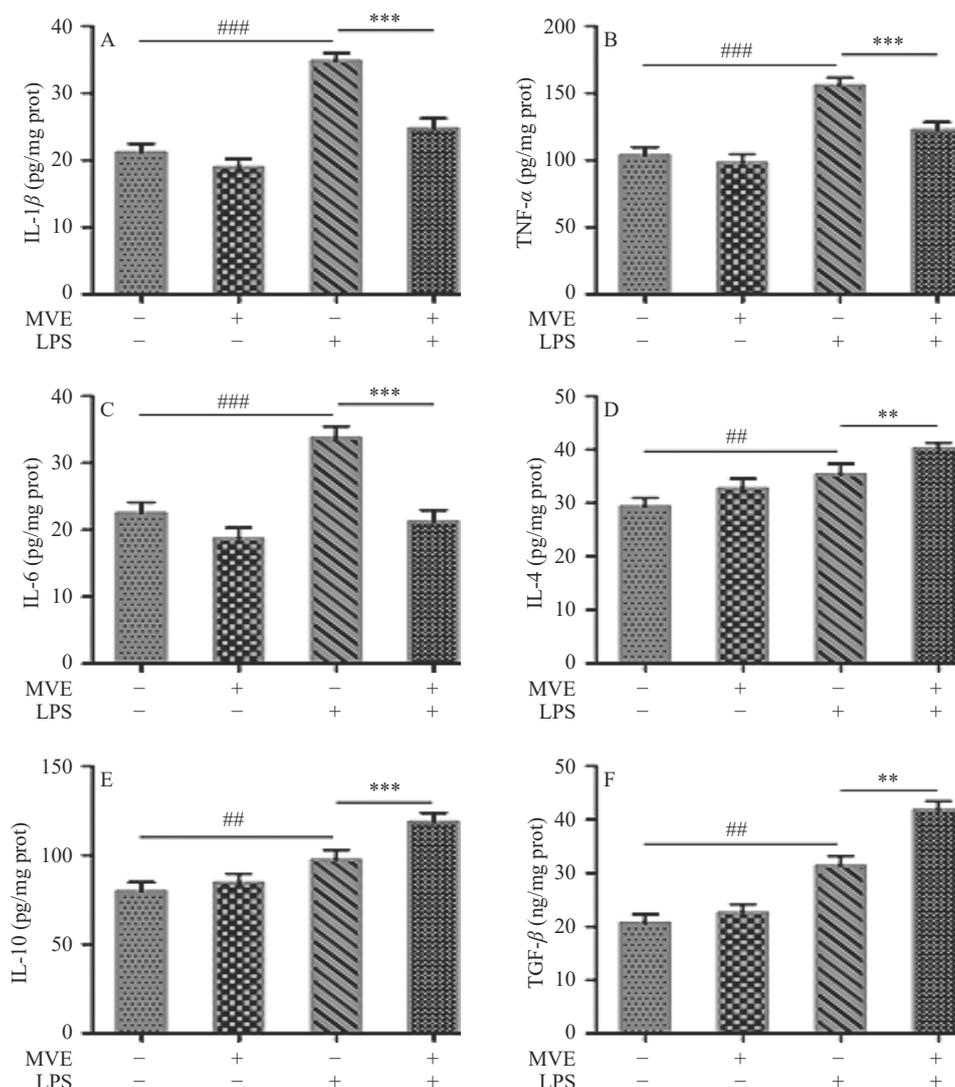


图5 各组小鼠肝脏组织中促炎和抗炎细胞因子的含量变化

Fig.5 Changes of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in liver tissue of mice in each group

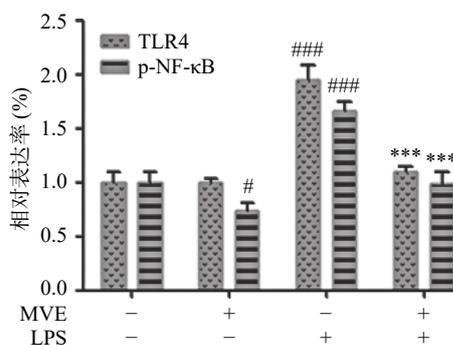
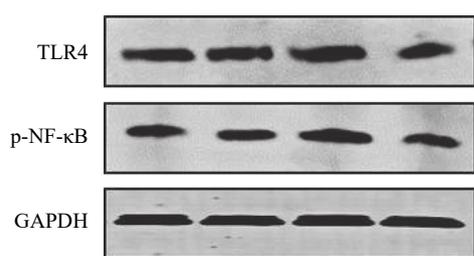


图6 MVE对各组小鼠肝脏组织蛋白TLR4和p-NF-κB p65水平的影响

Fig.6 Effects of MVE on the levels of liver tissue protein TLR4 and p-NF-κB p65 in mice of each group

的抗炎细胞因子。伴随MVE的摄入, MVE+LPS组小鼠可高度显著对抗LPS诱导引起的促炎细胞因子含量升高($P < 0.001$), 同时极显著增加LPS诱导引起的抗炎细胞因子分泌($P < 0.01$)。提示MVE能通过调节促炎和抗炎细胞因子保护肝损伤。

2.6 MVE对老年急性炎性肝损伤小鼠肝脏TLR4/NF-κB通路蛋白表达的影响

Western blot法检测结果如图6所示, 正常对照组相比, MVE组老年小鼠肝组织匀浆中p-NF-κB p65蛋白表达显著降低($P < 0.05$), 提示与MVE对衰老小鼠肝损伤的保护作用有关。LPS组老年小鼠肝组织匀浆中TLR4和p-NF-κB p65蛋白表达较正常对照组相比高度显著升高($P < 0.001$), 伴随MVE的摄入, MVE+LPS组老年小鼠肝组织匀浆中TLR4和p-NF-κB p65蛋白的表达含量较LPS组相比均被抑制($P < 0.001$)。这表明机体在遭受LPS刺激时, 摄入一定量的MVE能有效对抗LPS攻击所致TLR4/NF-κB炎症信号通路的激活, 减轻炎症反应, 达到保护肝损伤的目的。

3 讨论与结论

革兰氏阴性杆菌产生的内毒素 LPS 可通过诱导全身炎症反应损伤肝脏组织,随年龄递增,肝脏营养吸收速度变慢、代谢能力和清除毒素的能力逐渐减弱。本实验通过腹腔注射 LPS 制备老年小鼠急性炎症性肝损伤模型,观察 MVE 对细胞因子、中性粒细胞、肝脏形态结构、肝脏功能的影响,并初步探讨 MVE 的护肝作用机制。

肝脏作为人体中具有天然免疫功能的最大代谢和清除毒素的器官,促炎细胞因子和 ROS 的分泌增多会致肝损伤和肝功能减退^[10]。在 LPS 诱导的肝损伤模型中,LPS 刺激活化 KC 和 CD4⁺T 细胞均会引起 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等促炎细胞因子的分泌增多^[11]。由 Th1 产生的 IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 等促炎细胞因子,在体内介导细胞免疫应答的同时会引起组织损伤^[12-14],而由 Th2 细胞产生的 IL-4、IL-10、TGF- β 等抗炎细胞因子会促进体内促进抗体的产生、介导体液免疫应答的同时,促进肝组织修复再生^[12-13,15]。因此,平衡 Th1/Th2 细胞的比例有助于机体清除细菌、病毒等抗原物质及其感染的细胞,从而维持机体正常的免疫功能,保护肝损伤^[16-17],其平衡失调会引起病毒性肝炎和原发性胆汁性肝硬化等肝脏疾病的发生和发展^[18-20]。本实验结果显示,MVE 能够改善肝组织结构紊乱等病理改变,明显降低小鼠体内肝功酶的活性和促炎因子水平,提高了 IL-4、IL-10、TGF- β 等抗炎因子水平,对 LPS 诱导肝损伤发挥保护作用。

研究发现 Th17 主要分泌的 IL-17 能通过上调 CXCL1 和 CXCL17,促进 PMN 向炎症部位聚集,释放 MPO 灭活毒素,同时一定程度引起炎症反应,而当 PMN 受到高表达的 TNF- α 、细菌等抗原物质刺激时,聚集在细胞和颗粒膜上的 NADPH 氧化酶会被激活产生 ROS,诱导促进 PMN 凋亡,加剧炎症反应损伤肝脏组织^[21-22]。本实验结果显示,MVE 能够明显降低小鼠体内 ROS 的活性和 PMN 趋化因子含量,提高抗炎因子含量,改善了肝组织内 PMN 的聚集和凋亡,降低 MPO 在肝组织的浸润,有效抵御剧烈炎症反应所致的肝损伤。

TLR4 作为细胞膜上 LPS 的信号传递分子,核转录因子 NF- κ B 家族是 TLR4 的下游蛋白^[23],当细胞受到 LPS 等胞外信号刺激后,TLR4/NF- κ B 信号通路的激活会诱导 Th1、Th2、Th17 和 Treg 细胞产生多种细胞因子参与免疫炎症反应^[24-26]。同时 TLR4/NF- κ B 信号通路在内毒素血症、肝纤维化、非酒精性脂肪肝炎和乙型肝炎等肝损伤疾病中均有不同程度的激活^[27-29],有效抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路和调节相关免疫炎症介质平衡,对保护肝组织具有积极作用^[30-32]。本实验结果显示,LPS 诱导的老年小鼠肝损伤模型中 TLR4 和 p-NF- κ B 蛋白水平能够被 MVE 显著下调,并且 MVE 能够抑制炎症信号通路的传导,削弱炎症反应,从而发挥肝损伤保护

作用。

综上所述,MVE 在 LPS 诱导的急性炎症性肝损伤老年小鼠模型中表现出良好的保护作用,并且通过调节促炎和抗炎因子平衡及下调 TLR4/NF- κ B 信号通路来发挥肝保护作用机制。

此研究从免疫学和分子药理学的角度,揭示了食醋炮制的人参、甘草和五味子结合食醋提取物能有效将药引入肝脏,以此提高药物疗效,强化肝脏抵御炎症侵袭的能力,为进一步探究天然药物的炮制方式提供了理论依据,对强体护肝营养保健食品的研发提供了新思路。本文仅围绕小鼠肝脏抗炎免疫进行研究分析讨论,未进一步监测 MVE 是否影响小鼠脾脏和循环免疫的平衡关系。因此,今后需进一步探讨 MVE 对小鼠脾脏和循环免疫平衡的影响,并深入探究内在免疫和分子机制,为临床治疗中结合免疫疗法提供新途径。

参考文献

- [1] 赵国荣,陈研焄,何宜荣,等.基于“肝脾理论”探讨肠源性内毒素血症致继发性肝损伤[J].湖南中医药大学学报,2016,36(1):48-50. [ZHAO G R, CHEN Y Y, HE Y R, et al. To discuss the secondary liver injury induced by intestinal endotoxemia based on “the liver and spleen theory” [J]. Journal of Hunan University of Chinese Medicine, 2016, 36(1): 48-50.]
- [2] SHODA L K, BATTISTA C, SILER S Q, et al. Mechanistic modelling of drug-induced liver injury: Investigating the role of innate immune responses[J]. Gene Regulation and Systems Biology, 2017, 11(17): 1-22.
- [3] YAO Z, MATES J M, CHEPLOWITZ A M, et al. Blood-borne LPS is rapidly eliminated by liver sinusoidal endothelial cells via HDL[J]. Journal of Immunology, 2016, 197(6): 2390-2399.
- [4] ILYAS G, ZHAO E, LIU K, et al. Macrophage autophagy limits acute toxic liver injury in mice through down regulation of interleukin-1 β [J]. Journal of Hepatology, 2016, 64(1): 118-127.
- [5] ZHENG X F, HU X Y, BING M, et al. Interleukin-35 attenuates D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced liver injury via enhancing interleukin-10 production in kupffer cells[J]. Frontiers in Pharmacology, 2018, 24(9): 959-967.
- [6] 阳飞,张华山.食醋及其营养保健功能研究进展[J].中国调味品,2017,42(5):171-175. [YANG F, ZHANG H S. Research progress on nutrition and health care function of vinegar[J]. China Condiment, 2017, 42(5): 171-175.]
- [7] XIA T, ZHANG B, DUAN W H, et al. Nutrients and bioactive components from vinegar: A fermented and functional food[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 64(19): 103681.
- [8] HO C W, LAZIM A M, FAZRY S, et al. Varieties, production, composition and health benefits of vinegars: A review[J]. Food Chemistry, 2016, 221(16): 1621-1630.
- [9] 何紫涵,赵焄君.从“酸入肝”探讨醋制中药炮制理论[J].中国民族民间医药,2019,28(12):15-18. [HE Z H, ZHAO H J. Research on procession theory of vinegar processed traditional chinese herbs through sour entering into liver[J]. Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy, 2019, 28(12): 15-18.]
- [10] SLEVIN E, BAIOCCHI L, WU N, et al. Kupffer cells: inflammation pathways and Cell-Cell interactions in alcohol-associ-

- atedivedisease[J]. *American Journal of Pathology*, 2020, 190(11): 2185–2193.
- [11] 张爱芸, 马娟, 张旭, 等. 自身免疫性肝病患者血清 IL-17 与 IFN- γ 、TNF- α 及肝功能的相关性研究[J]. *宁夏医科大学学报*, 2018, 40(7): 60–64. [ZHANG A Y, MA J, ZHANG X, et al. Correlation between serum IL-17 and IFN- γ , TNF- α and liver function in patients autoimmune liver disease[J]. *Journal of Ningxia Medical University*, 2018, 40(7): 60–64.]
- [12] HIRAHARA K, NAKAYAMA T. CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm[J]. *International Immunology*, 2016, 28(4): 163–171.
- [13] YE H C L, TANUSEPUTERO S A, WU J M, et al. Intravenous arginine administration benefits CD4+ T-Cell homeostasis and attenuates liver inflammation in mice with polymicrobial sepsis[J]. *Nutrients*, 2020, 12(4): 1047–1063.
- [14] 吴建波. CHI3L1 调控 Th1 细胞分化保护急性肝损伤的机制研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2019. [WU J B. Role of CHI3L1 in acute liver injury induced by thioacetamide[D]. Nanjing: Nanjing Medical University, 2019.]
- [15] 梁超, 段卫星, 李卫强. INF α -2b 联合恩替卡韦对慢性乙型肝炎患者病毒载量、外周血中 Th1/Th2 型细胞因子与肝功能的改善效果[J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(21): 5210–5213. [LIANG C, DUAN W X, LI W Q. Effect on viral load, Th1/Th2 type cytokines and liver function of chronic hepatitis B patients treated with entecavir combined with IFN α -2b[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2018, 38(21): 5210–5213.]
- [16] 李娜, 张家祥. Th 细胞亚群失衡在免疫性肝损伤中的研究进展[J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(9): 1384–1387. [LI N, ZHANG J X. Research progress of imbalance of Th cell subsets in immune liver injury[J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2016, 51(9): 1384–1387.]
- [17] Behfarjam F, Hossein M, Nasser M S, et al. Role of Th1/Th2 cells and related cytokines in autoimmune hepatitis[J]. *Turkish Journal of Gastroenterology*, 2017, 28(2): 110–114.
- [18] 常凤霞, 郝娟, 朋毛措, 等. 慢性乙型肝炎患者 HBV DNA 与 Th1/Th2 相关性分析[J]. *海南医学院学报*, 2016, 22(15): 1649–1652. [CHANG F X, HAO J, PENG M C, et al. Relationship between hepatitis B virus DNA and Th1/Th2 in chronic hepatitis B patients[J]. *Journal of Hainan Medical University*, 2016, 22(15): 1649–1652.]
- [19] 陈辰, 刘一博, 张玮. Th1/Th2 与原发胆汁性胆管炎相关性的研究进展[J]. *肝脏*, 2016, 21(12): 1077–1080. [CHEN C, LIU Y B, ZHANG W. Research progress on the relationship between Th1/Th2 and primary biliary cholangitis[J]. *Chinese Hepatology*, 2016, 21(12): 1077–1080.]
- [20] 梅昭荷, 王灵台, 聂红明, 等. 从 Th1/Th2、Treg/Th17 之间的平衡研究轻度、中度慢性乙型肝炎患者 CD4+T 淋巴细胞的免疫失衡状态[J]. *肝脏*, 2017, 22(6): 513–516, 522. [MEI Z H, NIE H M, WANG R, et al. Balance among Th1, Th2, Th17 and Treg in mild to moderate chronic hepatitis B patients with immune imbalance of CD4+ T cells[J]. *Chinese Hepatology*, 2017, 22(6): 513–516, 522.]
- [21] LEE H C, LIAO C C, DAY Y J, et al. IL-17 deficiency attenuates acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice[J]. *Toxicology Letters*, 2018, 292(18): 20–30.
- [22] LIU K, WANG F S, XU R. Neutrophils in liver diseases: pathogenesis and therapeutic targets[J]. *Cellular and Molecular Immunology*, 2020, 18(1): 38–44.
- [23] WEI C B, TAO K, JIANG R, et al. Quercetin protects mouse liver against triptolide-induced hepatic injury by restoring Th17/Treg balance through Tim-3 and TLR4-MyD88-NF- κ B pathway[J]. *International Immunopharmacology*, 2017, 53(1): 73–82.
- [24] 王维钊, 向晓星. Treg/Th17、Th1/Th2 平衡在自身免疫性肝炎中的免疫学机制及诊疗新靶点[J]. *临床肝胆病杂志*, 2019, 35(8): 1874–1877. [WANG W L, XIANG X X. Immunological mechanism of Treg/Th17 and Th1/Th2 balance in autoimmune hepatitis and new targets for diagnosis and treatment[J]. *Journal of Clinical Hepatology*, 2019, 35(8): 1874–1877.]
- [25] ZHANG H, JIANG Z, ZHANG L. Dual effect of T helper cell 17 (Th17) and regulatory T cell (Treg) in liver pathological process: From occurrence to end stage of disease[J]. *International Immunopharmacology*, 2019, 69(1): 50–59.
- [26] SUGITHARINI V, SHAHANA P, PREMA A, et al. TLR2 and TLR4 co-activation utilizes distinct signaling pathways for the production of Th1/Th2/Th17 cytokines in neonatal immune cells[J]. *Cytokine*, 2016, 85(1): 191–200.
- [27] 朱水兰, 吴青华, 涂珺. 汉黄芩苷调控 NLRP3/SOCS3-TLR4-NF- κ B 炎症通路改善肝细胞胰岛素抵抗的研究[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(20): 202–208. [ZHU S L, WU Q H, TU J. Study on regulation of NLRP3/SOCS3-TLR4-NF- κ B inflammatory pathway by wogonoside to improve hepatic insulin resistance[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2019, 44(20): 202–208.]
- [28] 张斌, 王培劼, 丁静, 等. 清化瘀毒方对酒精性肝纤维化模型大鼠的 TLR4-MyD88-NF- κ B 信号通路影响[J]. *免疫学杂志*, 2018, 34(11): 38–42. [ZHANG B, WANG P J, DING J, et al. The impact of QHYD formula on TLR4-MyD88-NF- κ B signaling pathway in alcoholic liver fibrosis model rats[J]. *Immunological Journal*, 2018, 34(11): 38–42.]
- [29] 董志超, 高琦, 毛建娜. 白果内酯通过 TLR4/TAK1/NF- κ B 通路对非酒精性脂肪肝大鼠模型肝纤维化的调控作用[J]. *沈阳药科大学学报*, 2019, 36(8): 74–80. [DONG Z C, GAO Q, MAO J N. The regulatory effect bilobalide on hepatic fibrosis of nonalcoholic steatohepatitis rat via TLR4/TAK1/NF- κ B signaling pathway[J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, 2019, 36(8): 74–80.]
- [30] 吕鹏, 武永勇, 白明学, 等. 刺五加总皂苷对非酒精性脂肪性肝病大鼠 Treg/Th17 及 Th1/Th2 细胞失衡、相关蛋白因子的影响[J]. *中药药理学与临床*, 2019, 35(3): 66–70. [LV P, WU Y Y, BAI M X, et al. The effect acanthopanax senticosus saponins on Treg/Th17 cell imbalance, Th1/Th2 cell imbalance and related protein factor in NAFLD rats[J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2019, 35(3): 66–70.]
- [31] 刘雪, 王玉娇, 沈明花. 榆干离褶伞溶栓酶对脂多糖诱导的大鼠炎性肝损伤的保护作用[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(20): 299–303. [LIU X, WANG Y J, SHEN M H. Protective effects of fibrinolytic enzyme of *Lyophyllum ulmarium* on LPS-induced liver injury in rats[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(20): 299–303.]
- [32] 潘妍霓, 赵欣, 龙兴瑶, 等. 大叶苦丁茶多酚对四氯化碳致小鼠肝损伤的预防作用[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(9): 287–294. [PAN Y N, ZHAO X, LONG X Y, et al. Preventive effect of large-leaved kuding tea polyphenols on CCl₄-induced hepatic damage in mice[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(9): 287–294.]