

# 绞股蓝总皂苷对非酒精性脂肪肝大鼠 Treg/Th17 免疫功能的影响

阮丹, 雷婧(杭州市第三人民医院, 杭州 310000)

**摘要:** **目的** 研究绞股蓝总皂苷对非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)大鼠肝脏保护作用及免疫调节作用机制。**方法** 48 只 SD 大鼠随机分为正常对照组, 模型对照组, 多烯磷脂酰胆碱胶囊组(阳性对照组,  $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )及绞股蓝总皂苷高、中、低( $240, 120, 60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )剂量组, 除正常对照组外, 其余各组连续饲喂高脂饲料 10 周, 制备 NAFLD 模型; 模型成功后, 各组连续给药 8 周。实验期间, 分别于给药 0, 4, 8 周眼眶取血检测血清 AST、ALT; 末次给药后, 采用流式细胞技术检测外周血 Th17 和 Treg 细胞含量; 酶联免疫法检测血清 IL-17、IL-10 及 TNF- $\alpha$  含量。HE 染色检查肝组织病理变化和免疫组化法检查肝组织 IL-17 和 Foxp3 表达。**结果** 给药 4 周, 绞股蓝总皂苷高剂量显著降低大鼠血清 ALT、AST( $P<0.01$ ); 给药 8 周, 绞股蓝总皂苷各剂量均能显著降低血清 ALT、AST( $P<0.05, 0.01$ )。绞股蓝总皂苷高、中剂量能改善肝组织病变, 降低 TNF- $\alpha$  水平; 高剂量显著降低 IL-17、升高 IL-10 水平( $P<0.05, 0.01$ ), 降低淋巴细胞 IL-17 含量, 升高  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Treg}$  含量( $P<0.05$ ), 明显减少炎症因子 IL-17 的表达和增加 Foxp3 表达。**结论** 绞股蓝总皂苷能改善 NAFLD 大鼠肝脏病变, 其作用机制可能与调节肝脏 Treg/Th17 细胞平衡, 减少促炎症因子和增加抗炎因子产生相关。

**关键词:** 绞股蓝总皂苷; 非酒精性脂肪肝; Treg/Th17 细胞; 炎症因子

中图分类号: R965.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)12-1683-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.12.009

引用本文: 阮丹, 雷婧. 绞股蓝总皂苷对非酒精性脂肪肝大鼠 Treg/Th17 免疫功能的影响[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(12): 1683-1688.

## Beneficial Effect of Stevenleaf on the Imbalance Between Th17 and Treg in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Model Rats

RUAN Dan, LEI Jing(*The Third People's Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310000, China*)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the effect of stevenleaf on improving non-alcoholic fatty liver disease in rat model and clarify mechanism from the point of immune-regulation. **METHODS** Forty-eight of rats were divided into six groups: normal group, model group, Essentiale ( $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), high-dose ( $240 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), moderate-dose ( $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) and low-dose of stevenleaf ( $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) groups. Rats were given high fat food for continuous 10 weeks, then given correspond drugs for 8 weeks. The levels of serum AST and ALT were measured at 0, 4 and 8 weeks experimental session. The rats were anesthetized after administration 8 weeks. The peripheral blood lymphocytes and serum were separated to measure the contents of Th17 and Treg cells in peripheral blood by flow cytometry and the levels of IL-17, IL-10 and TNF- $\alpha$  in serum by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). HE staining was used to observe the pathological changes of liver tissue and immunohistochemistry to observe the positive expression of IL-17 and Foxp3 in liver tissue. **RESULTS** The  $240 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  of stevenleaf could reduce levels of serum ALT and AST after administration for 4 weeks ( $P<0.01$ ). stevenleaf  $240 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,  $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  and  $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  could reduce levels of serum ALT and AST after administration for 8 weeks ( $P<0.05, 0.01$ ). Stevenleaf  $240 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  and  $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  could improve liver damage and reduce the level of TNF- $\alpha$  ( $P<0.05$ ). Stevenleaf  $240 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  could reduce the content of IL-17 and increase IL-10 in serum ( $P<0.05, 0.01$ ), reduce content of Th17 cell ( $\text{CD4}^+\text{IL-17}^+$ ) and increase  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Treg}$  in peripheral blood lymphocytes ( $P<0.05$ ), also significantly reduced the expression of inflammatory factor IL-17 and increased Foxp3 expression. **CONCLUSION** Stevenleaf could protect liver tissue damages, its mechanism may be related to regulating Treg/Th17 cell balance, reducing pro-inflammatory factors and increasing anti-inflammatory factors.

**KEY WORDS:** stevenleaf; nonalcoholic fatty liver; Treg/Th17 cells; inflammatory factors

非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除酒精和其他明确的损肝因素所致的, 以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要

特征的临床病理综合征, 是脂肪肝主要类型。NAFLD 在我国患病率高达 15%<sup>[1]</sup>; 全球范围的患病率高达 12.9~46%<sup>[2]</sup>。NAFLD 的发生发展是一个

基金项目: 浙江省中西医结合学会科研项目(2014LYZD001)

作者简介: 阮丹, 女, 硕士 Tel: 15088660981 E-mail: 328287055@qq.com

多因素作用的复杂过程,除涉及脂质过氧化、线粒体功能障碍、炎症反应因子失衡、天然免疫等外,NAFLD发病过程还存在免疫功能失衡,表现为调节性T细胞(Treg)和辅助性T细胞17(Th17)数目和功能的异常<sup>[3-4]</sup>。

绞股蓝总皂苷是绞股蓝(*Gynostemma pentaphyllum*)主要有效成分群,含有80余种达玛烷型四环三萜类人参皂苷类成分。绞股蓝总皂苷具有降脂保肝、降血糖、降血压、增强免疫力等药理作用<sup>[5-6]</sup>。研究发现,绞股蓝总皂苷能够调节机体T淋巴细胞亚群失调<sup>[7]</sup>;抑制NAFLD肝病大鼠肝脏脂肪变<sup>[8]</sup>。然而绞股蓝总皂苷是否可通过免疫调节防治NAFLD及具体机制并不清楚。本实验采用高脂饲料诱导NAFLD大鼠模型,探讨绞股蓝总皂苷通过影响Treg/Th17细胞免疫功能,并从调节促/抗炎因子平衡途径研究其防治NAFLD的作用机制。

## 1 动物与试剂

### 1.1 动物及其饲料

48只清洁级SD大鼠,♂,体质量180~220 g,许可证号SCXK(浙)20080033,由浙江省医学科学院动物中心提供。高脂饲料含普通饲料75%、猪油12%、胆固醇2%、胆盐1%、蛋黄粉10%,购于南通特洛菲饲料科技有限公司,批号为TP28708U。

### 1.2 药物

绞股蓝总皂苷(南京泽朗医药科技有限公司,批号:ZL20160321RJ,含量:80%)。多烯磷脂酰胆碱胶囊(赛诺菲,批号:4JD036,规格:每粒228 mg)。

### 1.3 试剂

CD4-FITC(货号:11-0040-81)、CD25-PE(货号:12-0390-80)及IL-17-PE(货号:12-7177-81)流式试剂均购于eBioscience公司。白细胞介素10(IL-10,批号:20161030)、白细胞介素17(IL-17,批号:20161015)及肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ,批号:20160928)酶联免疫试剂盒购于上海恒远生物科技有限公司。IL-17(抗兔,货号:ab91649)和Foxp3(抗小鼠,货号:ab22510)购于abcam科技有限公司。丙氨酸氨基转移酶(ALT,批号:16092401)、天冬氨酸氨基转移酶(AST,批号:16092401)试剂盒均购于宁波美康生物科技股份有限公司。苏木素-伊红染液(H&E,南京建成科技有限公司,批号:

20160806)。

## 1.4 仪器

Powerwave340 酶标仪(美国Bio-TEK公司);自动脱水机(SAKURA Tissue-Tek VIP 5Jr);贝克曼流式细胞仪FC500((美国BeckmanCoulter公司);全自动生化仪(日本东芝);ZEISS 荧光倒置显微镜(德国Carl Zeiss公司)。

## 2 方法

### 2.1 造模、分组及给药干预

48只大鼠随机分为正常对照组、模型对照组、多烯磷脂酰胆碱胶囊组(阳性对照组,150 mg·kg<sup>-1</sup>),绞股蓝总皂苷高、中、低(240, 120, 60 mg·kg<sup>-1</sup>)剂量组,每组8只。除正常对照组外,其余组给予高脂饲料连续喂养10周制备NAFLD大鼠模型。模型成功后,连续给药8周,此时边造模边给药;正常对照组及模型对照组给予相应体积的蒸馏水,灌胃容积10 mL·kg<sup>-1</sup>,每天1次。实验期间每周称量大鼠体质量,并观察大鼠一般体征。

### 2.2 肝功能指标检测及肝组织病理学观察

给药期间,分别于给药第0, 4, 8周进行眼眶取血,37℃水浴2 h,3 500 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,分离血清,采用全自动生化仪检测血清肝功能AST、ALT水平。末次给药后,禁食不禁水12 h,10%水合氯醛麻醉大鼠,腹主动脉取血,解剖大鼠取肝脏,生理盐水洗净,称量脏器湿重。计算肝脏系数:肝脏系数(%)=肝湿重/禁食后体质量×100%。取肝左叶相同部分适量放到4%中性福尔马林中固定,再经脱水、石蜡包埋、切片(4  $\mu$ m)、展片、切片粘附、烤片等,采用HE染色,观察肝组织病理学改变。

肝脏病变评分:参考2010年版《非酒精脂肪肝病诊断指南》(修订版)中《美国国立卫生研究院非酒精性脂肪肝肝炎(NASH)临床研究网病理工作组指南》进行评分:①肝细胞气球样变(细胞肿大,胞浆残留少许),评分为0~2分三个等级:无,0分;少见,1分;多见,2分。②肝细胞脂肪变(肝细胞胞浆内出现界限清晰的脂滴空泡),评分为0~3分三个等级:<5%,0分;5%~33%,1分;34%~66%,2分;>66%,3分。③炎症病变(炎症细胞聚集),评分为0~3分四个等级:无,0分;1~2个病灶,1分;3~4个病灶,2分;>4个病灶或桥接(弥散性)或融合性坏死,3分。其中①~③三项病理改变的积分和为0~8分, $\geq 5$ 分时判定为肝炎。

2.3 酶联免疫法检测肝组织 Treg/Th17 相关炎症指标

肝脏称量后,取肝左叶 0.5 g 制备 10%生理盐水肝组织匀浆。采用酶联免疫法测定肝匀浆 TNF- $\alpha$ 、IL-17 及 IL-10 水平。

2.4 免疫组化法检测肝组织 Foxp3 和 IL-17 表达

制备好的石蜡切片,用于免疫组化实验。切片经二甲苯脱蜡-乙醇复水-枸橼酸钠缓冲液煮沸抗原修复-3%双氧水抗原阻断-正常山羊血清封闭 1 h, 4  $^{\circ}\text{C}$  对应一抗孵育过夜(Foxp3 和 IL-17 一抗或 PBS 代替一抗做阴性对照)-次日复温 30 min-二抗 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育-DAB 显色-苏木素染核-1%的盐酸酒精溶液分化-氨水返蓝-乙醇脱水-二甲苯透明-中性树胶封片。风干后在显微镜下观察 Foxp3、IL-17 蛋白表达,黄色至棕褐色表示阳性表达。用 Image Pro Plus 5.1 软件计算平均光密度值。

2.5 流式细胞仪检测法检测外周血 Treg、Th17 含量

1 mL 抗凝腹主动脉全血进行外周淋巴细胞 Treg/Th17 含量检测, Th17 细胞抗体标记为 FITC-抗 CD4 和 PE-抗 IL-17,  $\text{CD4}^+\text{IL-17}^+$  为 Th17 含量; Treg 细胞抗体标记为 FITC-抗 CD4 及 PE-抗 CD25,  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  Treg 细胞为 Treg 含量,按参考试剂说明书步骤处理完成后,上流式细胞仪进行检测。

2.6 统计学分析

计量资料数据结果均采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异比较采用单因素方差分析,方差齐性采用 LSD 检验;方差不齐采用 Dunnett T3 检验,  $P < 0.05$  有统计学意义。

3 结果

3.1 绞股蓝总皂苷对 NAFLD 大鼠体质量和肝脏系数的影响

给药 8 周(造模 18 周后),与模型对照组相比,绞股蓝总皂苷各剂量对大鼠体质量无明显影响;绞股蓝总皂苷高、中、低(240, 120, 60  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )剂量均能显著降低大鼠肝脏系数( $P < 0.01$ )。结果见表 1。

3.2 绞股蓝总皂苷对 NAFLD 大鼠肝功能的影响

高脂饲料造模 10 周后(给药前),与正常对照组相比,所有造模大鼠血清 AST 及 ALT 显著升高( $P < 0.01$ )。给药 4 周,与正常对照组相比,模型大鼠血清 ALT 和 AST 显著升高( $P < 0.05$ );与模型对照组相比,绞股蓝总皂苷高剂量(240  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )显著降低大鼠血清 ALT、AST( $P < 0.01$ ),中剂量

(120  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )显著降低大鼠血清 AST( $P < 0.05$ );给药 8 周,绞股蓝总皂苷高、中、低(240, 120, 60  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )剂量均能显著降低大鼠血清 ALT、AST( $P < 0.05$  或 0.01)。结果见图 1。

表 1 绞股蓝总皂苷对 NAFLD 大鼠体质量和肝脏系数的影响( $n=8$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Effect of stevenleaf on body weight and liver coefficient in NAFLD rats( $n=8$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | 剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ | 体质量/g            | 肝脏系数/%                        |
|---------|--------------------------------------|------------------|-------------------------------|
| 正常对照组   | —                                    | 483.5 $\pm$ 11.4 | 2.55 $\pm$ 0.28               |
| 模型对照组   | —                                    | 487.3 $\pm$ 14.8 | 5.30 $\pm$ 0.35 <sup>1)</sup> |
| 阳性对照组   | 150                                  | 488.3 $\pm$ 19.8 | 3.02 $\pm$ 0.27 <sup>2)</sup> |
| 绞股蓝总皂苷组 | 240                                  | 504.0 $\pm$ 37.0 | 3.58 $\pm$ 0.86 <sup>2)</sup> |
|         | 120                                  | 481.6 $\pm$ 26.2 | 4.03 $\pm$ 0.88 <sup>2)</sup> |
|         | 60                                   | 472.8 $\pm$ 24.0 | 4.44 $\pm$ 0.60 <sup>2)</sup> |

注:与正常对照组比较, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型对照组比较, <sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。  
Note: Compared with normal control group, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P < 0.01$ .

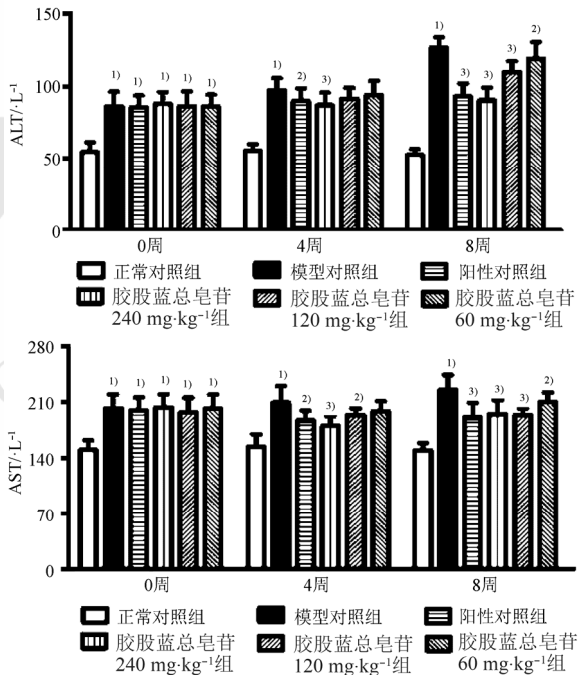


图 1 绞股蓝总皂苷对 NAFLD 大鼠血清 AST、ALT 的影响( $n=8$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

与正常对照组比较, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型对照组比较, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。

Fig. 1 Effect of stevenleaf on AST, ALT in serum of NAFLD rats( $n=8$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Compared with normal control group, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ .

3.3 绞股蓝总皂苷对 NAFLD 大鼠肝脏病理学的影响

正常对照组肝细胞以中央静脉为中心向周围呈放射状排列,肝细胞核大而圆,位于细胞中央,

肝细胞未见浊肿、脂肪变或坏死。与正常对照组相比,模型对照大鼠肝小叶消失,肝组织严重脂肪变,表现为大部分肝细胞空泡脂滴及小部分肝细胞的气球样变,并可见大量的炎症灶。与模型对照组相比,连续给药 8 周,绞股蓝总皂苷高、中、低(240, 120, 60  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )剂量能减少肝细胞脂肪变及炎症细胞浸润,其肝脏病变程度明显减轻。结果见图 2。

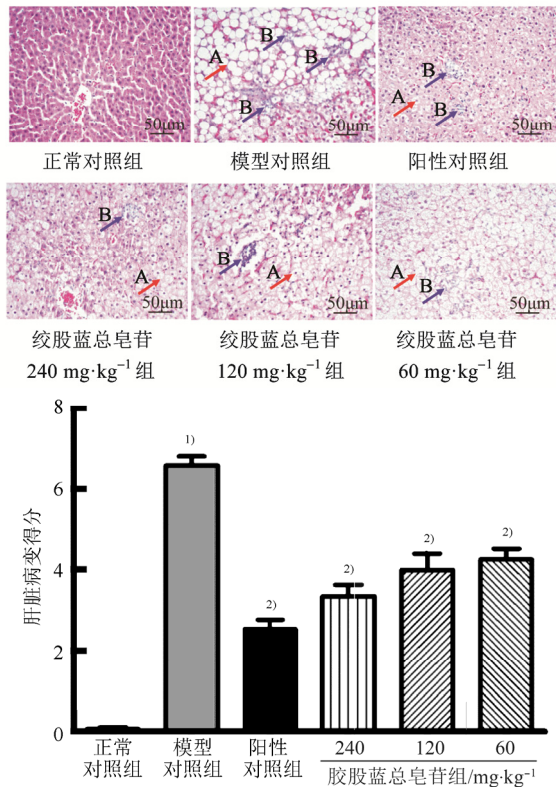


图 2 绞股蓝总皂苷对 NAFLD 大鼠肝组织病变的影响 (HE, 200 $\times$ )

箭头 A 表示代表性肝组织脂肪变或气球样变; 箭头 B 代表炎症灶; 与正常对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与模型对照组比较, <sup>2)</sup> $P<0.01$ 。

Fig. 2 Effect of stevia on pathological changes of hepatic tissues(HE, 200 $\times$ )

Arrow A meaned liver tissue damaged; arrow B meaned focal inflammation; compared with normal control group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P<0.01$ .

### 3.4 绞股蓝总皂苷对 NAFLD 大鼠 Treg/Th17 相关肝组织炎症指标的影响

与正常对照组相比,模型对照组的肝组织炎症指标 IL-17、TNF- $\alpha$ 、IL-10 水平显著升高( $P<0.01$ ); 连续给药 8 周,与模型对照组相比,绞股蓝总皂苷高剂量(240  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )显著降低肝组织中 IL-17、TNF- $\alpha$ , 升高 IL-10 水平( $P<0.05$  或 0.01); 中剂量(120  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )降低肝组织中 TNF- $\alpha$  水平; 各剂量均能显著降低 IL-17 水平( $P<0.05$ )。结果见表 2。

表 2 绞股蓝总皂苷对 NAFLD 大鼠 Treg/Th17 相关肝组织炎症指标的影响( $n=8$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

Tab. 2 Effect of stevia on Treg/Th17-related inflammation markers in liver tissue of NAFLD rats( $n=8$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

| 组别      | 剂量/<br>$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ | IL-17/<br>$\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ | TNF- $\alpha$ /<br>$\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ | IL-10/<br>$\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ |
|---------|---------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------|
| 正常对照组   | —                                     | 59.6 $\pm$ 9.6                          | 71.0 $\pm$ 11.3                                  | 50.6 $\pm$ 6.8                           |
| 模型对照组   | —                                     | 115.5 $\pm$ 6.0 <sup>1)</sup>           | 151.6 $\pm$ 10.8 <sup>1)</sup>                   | 69.0 $\pm$ 12.6 <sup>1)</sup>            |
| 阳性对照组   | 150                                   | 104.1 $\pm$ 7.6 <sup>2)</sup>           | 136.8 $\pm$ 11.0 <sup>3)</sup>                   | 80.5 $\pm$ 6.0 <sup>2)</sup>             |
| 绞股蓝总皂苷组 | 240                                   | 105.8 $\pm$ 9.8 <sup>2)</sup>           | 124.3 $\pm$ 6.3 <sup>3)</sup>                    | 95.8 $\pm$ 11.1 <sup>3)</sup>            |
|         | 120                                   | 103.8 $\pm$ 12.0 <sup>2)</sup>          | 136.8 $\pm$ 10.5 <sup>3)</sup>                   | 74.5 $\pm$ 12.5                          |
|         | 60                                    | 107.1 $\pm$ 9.9 <sup>2)</sup>           | 142.3 $\pm$ 13.7                                 | 68.0 $\pm$ 12.1                          |

注: 与正常对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与模型对照组比较, <sup>2)</sup> $P<0.05$ , <sup>3)</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with normal control group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ , <sup>3)</sup> $P<0.01$ .

### 3.5 绞股蓝总皂苷(240 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )对 NAFLD 大鼠肝组织 Foxp3 和 IL-17 表达的影响

与正常对照组相比,模型组的大鼠肝组织细胞质 IL-17 阳性表达显著增多, Foxp3 细胞核阳性表达显著减少; 给药 8 周,与模型对照组相比,绞股蓝总皂苷高剂量(240  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )能显著减少炎症因子 IL-17 的表达和增加核 Foxp3 表达。IL-17 主要在细胞质表达; Foxp3 主要在细胞核表达。结果见图 3, 箭头所指为代表性阳性表达。

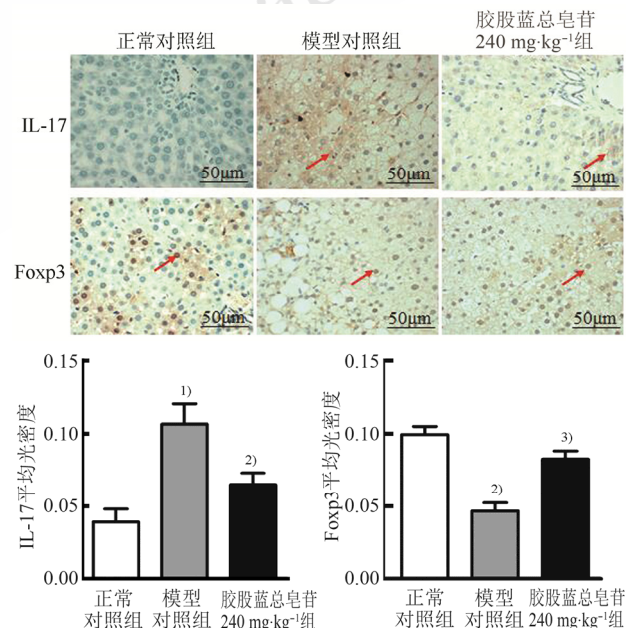


图 3 免疫组化法观察绞股蓝总皂苷对 NAFLD 大鼠肝组织 Foxp3 和 IL-17 蛋白表达的影响(400 $\times$ )

与正常对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与模型对照组比较, <sup>2)</sup> $P<0.05$ , <sup>3)</sup> $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effect of stevia on Foxp3 and IL-17 expression in liver tissue of NAFLD rats by immunohistochemistry Compared with normal control group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ , <sup>3)</sup> $P<0.01$ .

### 3.6 绞股蓝总皂苷(240 mg·kg<sup>-1</sup>)对 NAFLD 外周血 Treg 及 Th17 细胞含量的影响

与正常对照组相比,模型组外周血淋巴细胞 IL-17 含量显著升高( $P<0.01$ ), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 含量显著降低( $P<0.05$ );连续给药 8 周,与模型对照组相比,绞股蓝总皂苷高剂量(240 mg·kg<sup>-1</sup>)显著降低淋巴细胞 IL-17 含量,并升高 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 含量( $P<0.05$ )。结果见图 4。

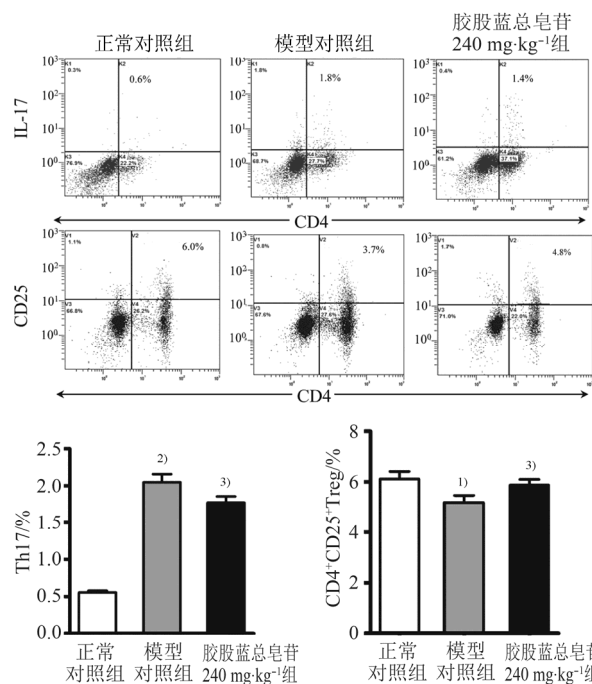


图 4 绞股蓝总皂苷对 NAFLD 大鼠的外周血淋巴细胞 Treg 及 Th17 细胞的影响

与正常对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; 与模型对照组比较, <sup>3)</sup> $P<0.05$ 。

Fig. 4 Effect of stevialeaf on Foxp3 and IL-17 in blood of NAFLD rats

Compared with normal control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>3)</sup> $P<0.05$ .

## 4 讨论

NAFLD 主要是由于甘油三酯(脂肪变性)在肝脏过度堆积造成的肝脏疾病,已成为全球性重大公共健康问题。随着肝脏代谢紊乱、肝脏脂肪变性加剧,NAFLD 可发展成肝纤维化、肝硬化、肝癌等。2010 年《中国非酒精性脂肪肝诊治指南修订版》推荐治疗 NAFLD 的药物包括多烯磷脂酰胆碱、水飞蓟素、维生素 E、甘草酸制剂、双环醇等。其中多烯磷脂酰胆碱胶囊可通过促进肝细胞膜的再生和稳定,减少肝脏脂质沉积,抑制脂质过氧化,抑制胶原合成等,对中毒性肝损伤和脂肪肝有较好的疗效,是临床保肝药的首选。研究表明多烯磷脂酰胆碱胶囊还可通过调节 NAFLD 小鼠

模型 Treg/Th17 细胞和相关的分泌因子平衡,抑制小鼠模型炎症反应,防止脂肪肝的发生发展<sup>[9]</sup>。因此本实验选择多烯磷脂酰胆碱胶囊为阳性药,研究绞股蓝总皂苷对 NAFLD 大鼠 Treg/Th17 免疫功能的影响。

NAFLD 发病机制广泛认可的是肝脏“二次打击”学说,胰岛素抵抗先造成肝脏第一次打击,氧化应激、免疫系统激活以炎症细胞因子等产生第二次打击<sup>[10]</sup>。越来越多研究表明 NAFLD 存在免疫微环境的改变,并与免疫功能及炎症细胞因子失衡密切相关<sup>[9, 11]</sup>。Treg 细胞和 Th17 细胞属于 CD4<sup>+</sup>淋巴细胞亚群。Th17 细胞主要分泌或诱导 IL-17、IL-6 与 TNF- $\alpha$  等促炎因子<sup>[12]</sup>,介导炎症反应,促进肝炎的发生发展。Treg 细胞是一类具有较强免疫抑制效应的 T 细胞亚群,主要分泌 IL-10、IL-4 和 TGF- $\beta$ 1 等因子,可抑制肝脏的免疫炎症过度损伤;叉头状转录因子 3 (Foxp3)是 Treg 细胞特异性转录活化因子<sup>[13]</sup>。研究表明脂肪肝小鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 IL-17 等表达显著升高, Foxp3 表达降低, Th17/Treg 免疫调节失衡<sup>[9]</sup>。

本实验通过连续喂食高脂饲料 10~18 周,成功复制 NAFLD,表现为肝损伤特异性标记物血清 ALT 和 AST 的显著升高和肝脏严重的脂肪及炎症变。采用流式细胞技术检测模型大鼠的外周血 Treg/Th17 细胞的酶联免疫法检测肝组织 Treg/Th17 相关炎症因子 IL-17、IL-10 和 TNF- $\alpha$ ,并结合免疫组化检测肝组织 IL-17 和 Foxp3 的表达。结果显示, Th17 细胞、IL-17 和 TNF- $\alpha$  水平显著升高, Treg 细胞和 Foxp3 水平显著减少,与已有报道一致。

已有研究表明,绞股蓝总皂苷能显著降低脂肪肝大鼠 TNF- $\alpha$  和 NF- $\kappa$ B 含量,减轻肝脏炎症<sup>[14-15]</sup>;表明绞股蓝总皂苷可能调节 Th17 免疫功能发挥抗肝炎作用。Treg 细胞与 Th17 细胞在机体相互拮抗,维持机体免疫炎症平衡;目前,绞股蓝总皂苷对 Treg、Th17 细胞功能的影响研究鲜见报道。本实验结果显示,绞股蓝总皂苷能显著降低肝组织 IL-17 表达,增加 Foxp3 表达;减少 Th17 细胞相关炎症因子 IL-17 和 TNF- $\alpha$  产生;增加 Treg 相关细胞因子 IL-10 含量;说明绞股蓝总皂苷能够调节 Treg/Th17 免疫功能失调,防止 NAFLD 大鼠肝脏病变的发生发展。

综上所述,绞股蓝总皂苷能有效防治 NAFLD,

其作用机制可能与调节肝脏 Treg/Th17 细胞平衡,减少促炎因子和增加抗炎因子产生,从而减少肝脏炎症反应,保护肝组织,值得进一步的研究开发。

## REFERENCES

- [1] FAN J G. Epidemiology of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease in China [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2013, 28(Suppl 1): 11-17.
- [2] TOSHIKUNI N, TSUTSUMI M, ARISAWA T. Clinical differences between alcoholic liver disease and nonalcoholic fatty liver disease [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(26): 8393-8406.
- [3] CAI X H, ZHU W H, LI W P. Effects of rapamycin on balance of regulatory T lymphocyte/T help cell 17 in nonalcoholic fatty liver of rats [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2017, 33(1): 36-39.
- [4] RAU M, SCHILLING A K, MEERTENS J, et al. Progression from nonalcoholic fatty liver to nonalcoholic steatohepatitis is marked by a higher frequency of Th17 cells in the liver and an increased Th17/resting regulatory T cell ratio in peripheral blood and in the liver [J]. J Immunol, 2015, 196(1): 97-105.
- [5] SHU B, LIU Z J, QIAN M Z. Effects of gypenosides on vascular smooth muscle cells phenotype in hyperlipidemic rats [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017 29(2): 217-223.
- [6] LI J Y, LI X F. Orthogonal test for optimization of extraction process of Gynostemma Pentaphylla soft gel [J]. Phram Today(今日药学), 2014, 24(2): 123-125.
- [7] JIA D, ZHAO J T. Effects of gypenosides on immune function of heat-stressed broilers [J]. J Shanxi Agric Univ(山西农业大学学报), 2007, 27(5): 12-14.
- [8] ZHANG X, LEI F F, LI F, et al. Effect of the degrees of fatty liver disease in rats with type 2 diabetes mellitus and nonalcoholic fatty liver disease was treated by gypenosides and ginkgo biloba extract mixture [J]. Chin J Liver Dis(中国肝脏病杂志), 2015, 7(1): 55-58.
- [9] HE B H, WU L Y, XIE W, et al. The imbalance of Th17/Treg cells is involved in the progression of nonalcoholic fatty liver disease in mice [J]. BMC Immunol, 2017, 18(33): 1-9.
- [10] LIU L B, ZHANG M G, FANG Q M, et al. Changes of GLP-1 and GIP in patients with non-alcoholic fatty liver disease after oral glucose [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2016, 33(3): 368-371.
- [11] GUO W, GAO M S, LI W, et al. Effects of metformin combined with enteric bifid-triple viable capsule on nonalcoholic fatty liver disease [J]. Chin J New Durgs(中国新药杂志), 2016, 25(4): 439-442.
- [12] XU J P, HE F, YANG M H, et al. Intervention effect of Shaoyao Gancan decoction on the imbalance of Treg/Th17 and their related cytokine in rats with asthma [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2016, 33(1): 19-23.
- [13] HOU X, SONG J, SU J, et al. CD4(+)Foxp3(+) Tregs protect against innate immune cell-mediated fulminant hepatitis in mice [J]. Mol Immunol, 2015, 63(2): 420-7.
- [14] PAN Y X, WAN Y T, ZHANG H, et al. Protection of gypenosides and relationship with TNF- $\alpha$  in alcoholic fatty liver of rats [J]. J Public Health Prev Med(公共卫生与预防医学), 2013, 24(4): 25-29.
- [15] CHENG D W. Protective effects of gynostemma total glucoside on alcoholic fatty liver in rat [J]. J Hubei Univ Nat(湖北民族学院学报), 2015, 32(1): 8-11.

收稿日期: 2017-05-10

(本文责编: 蔡珊珊)

## 《中国现代应用药理学》第七届编委会特约编委名单(按姓氏拼音排序)

|     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 蔡 萍 | 陈伯华 | 陈素红 | 陈 悦 | 程国华 | 范晓辉 | 方晴霞 |
| 韩 奇 | 何 昱 | 江 波 | 蒋国军 | 居 靖 | 匡 荣 | 梁 广 |
| 梁锦锋 | 林观样 | 刘金来 | 刘茂柏 | 楼 炜 | 陆国红 | 吕小琴 |
| 倪韶青 | 裴泽军 | 邵 华 | 沈志华 | 盛 荣 | 施 菁 | 石庆平 |
| 史天陆 | 寿 旦 | 苏为科 | 王 斌 | 王根宝 | 王 卓 | 吴光亮 |
| 吴耀东 | 徐圣秋 | 严 伟 | 原永芳 | 杨道钠 | 郁引飞 | 张剑萍 |
| 张水利 | 赵华军 | 赵永星 | 周 萍 | 朱建国 | 朱婉萍 | 朱余兵 |