

本文引用:曹梦醒,师哲,李勇.人参皂苷通过上调糖皮质激素受体表达对AIH小鼠肝脏的保护作用[J].湖南中医药大学学报,2023,43(2):203-210.

# 人参皂苷通过上调糖皮质激素受体表达对AIH小鼠肝脏的保护作用

曹梦醒,师哲,李勇\*

上海中医药大学附属市中医医院,上海 200071

**【摘要】目的** 研究人参皂苷通过调节糖皮质激素受体与骨髓源性免疫抑制细胞(myeloid-derived suppressor cell, MDSC)增殖改善自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)的机制。**方法** 小鼠分组为空白组、模型组、人参皂苷(AIH+GSS)组与地塞米松(AIH+DEX)组。使用S-100与佐剂构建AIH小鼠模型,以地塞米松作为阳性对照。通过流式细胞术检查外周血MDSC、调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)、辅助性T细胞17(T helper 17 cell, Th17)细胞比例,检测血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)活性,通过HE、Masson染色检查肝脏病理,分离外泌体并检测miRNA-223的表达情况,检查糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)、精氨酸酶1(arginase type 1, Arg-1)、一氧化氮合酶(nitric oxide synthases, iNOS)与肌细胞特异性增强因子2C(myocyte-specific enhancer factor 2C, MEF2C)等蛋白的表达情况。**结果** 模型组小鼠血清ALT、AST水平较空白组均显著升高( $P<0.001$ );与模型组相比,AIH+DEX组以及AIH+GSS组小鼠血清ALT、AST水平显著降低( $P<0.001$ )。HE、Masson染色结果显示,相比于模型组小鼠,AIH+DEX组与AIH+GSS组界面区炎细胞浸润明显减少,小叶形态较正常,胶原纤维增生较少。模型组小鼠MDSC、Treg细胞数量较健康对照组显著下降( $P<0.001$ ),Th17细胞数量显著上升( $P<0.01$ );AIH+DEX组与AIH+GSS组MDSC、Treg细胞数量高于模型组,Th17细胞数量下降( $P<0.001, P<0.01, P<0.05$ );模型组miRNA-233表达显著高于空白组( $P<0.001$ );AIH+GSS组与AIH+DEX组miRNA-223的表达水平均显著低于模型组( $P<0.001$ )。模型组MDSC功能蛋白Arg-1、iNOS、MEF2C以及GR表达水平较空白组显著降低( $P<0.001$ );AIH+DEX组和AIH+GSS组的蛋白表达水平较模型组明显上升( $P<0.001$ )。AIH+GSS组Arg-1、iNOS转录水平略低于AIH+DEX组( $P<0.01$ )。**结论** 与糖皮质激素类似,人参皂苷可通过上调糖皮质激素受体表达,抑制miRNA-223表达,促进AIH小鼠MDSCs增殖,调节Treg细胞与Th17细胞数量,降低血清ALT、AST活性,减轻AIH带来的肝细胞损伤。

**【关键词】** 人参皂苷;自身免疫性肝炎;骨髓源性免疫抑制细胞;糖皮质激素受体

**【中图分类号】**R285.5

**【文献标志码】**A

**【文章编号】**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.02.005

## Protective effects of ginsenosides on AIH mouse liver by upregulating glucocorticoid receptor expression

CAO Mengxing, SHI Zhe, LI Yong\*

Shanghai Municipal Hospital of Chinese Medicine, Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 200071, China

**【Abstract】Objective** To explore the mechanism of ginsenoside for improving autoimmune hepatitis by regulating glucocorticoid receptor and myeloid-derived suppressor cells (MDSC) proliferation. **Methods** Mice were divided into blank group, model group, ginsenoside (GSS) group, and dexamethasone (DEX) group. The autoimmune hepatitis (AIH) models were established with S-100 and adjuvant. Dexamethasone group was the positive control. The proportion of MDSC, regulatory T cell (Treg) and T helper 17 cell (Th17) in peripheral blood was examined by flow cytometry, and the activities of ALT and AST in serum were detected. Liver

**【收稿日期】**2022-07-12

**【基金项目】**国家自然科学基金项目(81873157,81573775)。

**【第一作者】**曹梦醒,女,硕士研究生,研究方向:消化系统疾病防治研究。

**【通信作者】**\*李勇,男,博士,教授,主任医师,博士研究生导师,E-mail:liyong@shutcm.edu.cn。

pathology was examined by HE and Masson, and exosomes were isolated and miRNA-223 expression was detected. The expression of glucocorticoid receptor (GR), arginase type 1 (Arg-1), nitric oxide synthases (iNOS) and myocyte-specific enhancer factor 2C (MEF2C) were examined. **Results** The serum ALT and AST levels in model group were significantly higher than those in blank group ( $P < 0.001$ ). Compared with model group, serum ALT and AST concentrations in DEX group and GSS group were significantly lower ( $P < 0.001$ ). Compared with the model group, inflammatory cell infiltration in the interface area of DEX group and GSS group was significantly reduced, lobule morphology was more normal, and collagen fiber proliferation was less. Compared with healthy control group, the number of MDSCs and Treg cells in model group was significantly lower, while the number of Th17 cells was significantly higher ( $P < 0.01$ ). The number of MDSCs and Treg cells in DEX group and GSS group was higher than that in model group, while the number of Th17 cells was lower ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ); miRNA-233 expression in model group was significantly higher than that in blank group ( $P < 0.001$ ). The expression level of miRNA-223 in GSS group and DEX group was significantly lower than that in model group ( $P < 0.001$ ). The expression levels of MDSCs functional proteins Arg-1, iNOS, MEF2C and glucocorticoid receptor GR in model group were significantly lower than those in blank group ( $P < 0.001$ ). But after intervention of DEX or GSS, the expression level of those was significantly higher ( $P < 0.001$ ). The transcription levels of Arg-1 and iNOS in GSS group were slightly lower than those in DEX group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Similar to glucocorticoid, ginsenoside can inhibit miRNA-223 expression by upregulating glucocorticoid receptor expression, promote MDSC proliferation in AIH, regulate the number of Treg cells and Th17 cells, reduce the activities of ALT and AST in serum, and alleviate hepatocyte injury caused by AIH.

[**Keywords**] ginsenoside; autoimmune hepatitis; myeloid-derived suppressor cells; glucocorticoid receptor

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)是一种自身免疫反应介导的进行性肝脏炎症,其诊断以谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、免疫球蛋白 IgG 以及自身抗体(ANA、SMA、抗 LKM1 和抗 SLA)水平升高为主<sup>[1]</sup>。AIH 常隐匿起病而无特异性症状,常表现为嗜睡、乏力、右上腹疼痛等,且近 30% 患者首诊时已存在肝硬化表现<sup>[2]</sup>。虽然 AIH 的发病机制尚不明确,但与药物接触、病毒性肝炎史以及遗传易感个体等因素高度相关<sup>[3]</sup>,是一种 T 细胞产生针对肝脏自身抗原的免疫反应<sup>[4]</sup>。临床一线用药以大剂量地塞米松和(或)联合硫唑嘌呤抑制 T 细胞免疫力为主,但这种疗法常因感染、消化性溃疡等严重不良反应而难以为继。近些年有使用利妥昔单抗或英夫利昔单抗等生物制剂治疗难治性 AIH 的报道,但仍存在感染、肝毒性等并发症而加大用药风险<sup>[5]</sup>。因此,如何选择治疗方案以提高免疫耐受性的同时减轻副作用将成为治疗 AIH 的关键。

miRNA-223 是最早发现的与骨髓系细胞发育密切相关的 miRNA 之一,其在骨髓细胞中高度表达,通过外泌体或细胞外囊泡转移的方式调节骨髓祖细胞分化,并调节免疫微环境<sup>[6-9]</sup>。miRNA-223 在粒细胞系的分化和成熟过程中增加,其高水平的表达又能进一步促进骨髓祖细胞系向粒细胞的分化和成熟<sup>[6,10-11]</sup>。此外,miRNA-223 对粒细胞祖细胞(即 MDSC)分化与活化具有抑制作用,对其敲除可促进

粒细胞祖细胞数量的扩增。

人参皂苷(ginsenoside, GSS)是人参最主要的活性成分,与糖皮质激素的化学结构以及生物学效应相似<sup>[12]</sup>。有大量研究证明,GSS 可通过 GR 途径抑制 T 细胞的免疫活性,显著减轻由 T 细胞过度活化引起的局部炎性浸润与组织损伤<sup>[13]</sup>。阻断 GR 后,由 GR 介导生效的途径不会完全削弱,证明在 GR 途径外还存在其他途径介导了 GSS 对免疫的抑制<sup>[14]</sup>。GSS 对糖皮质激素(glucocorticoids, GC)具有一定的增效减毒作用。在长期应用 GC 导致 GR 表达下降时,GSS 的应用除增强 GC 的免疫抑制能力外还一定程度逆转了 GC 引起的 GR 转录与翻译下调<sup>[15-18]</sup>。为进一步探究人参皂苷在 AIH 中是否有 GC 相似的免疫抑制效应,本文使用 S-100 诱导的 AIH 小鼠模型,观察 GSS 对 AIH 的调节作用,为 AIH 的治疗提供替代药物的新选择。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

C57BL/6 雄性小鼠购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号码:SCXK(沪)2017-0005。小鼠饲养于上海市中医医院动物房 SPF 级小鼠饲养室,饲养环境为恒温 24~27 °C,湿度 50%~80%,饮水与饲料经辐照、高压灭菌不限量供应。本动物实验已通过上海市中医医院实验中心动物实验伦理与福利委员会审核,伦理号:2021019。

## 1.2 药物与试剂

人参皂苷(上海源叶生物科技有限公司,批号:B30M11C114347);弗氏完全佐剂(美国Sigma-Aldrich公司,批号:MFC00131105);(强)RIPA裂解液(批号:20101ES60)、TRIzol(批号:19201ES60)、Universal Blue qPCR SYBR Green Master Mix(批号:11184ES03)、脱脂奶粉(批号:36120ES60)、Tween-20(批号:60305ES76)、PMSF(批号:20104ES03)、十二烷基硫酸钠(批号:20106ES76)均购自翌圣生物科技(上海)有限公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒(江苏碧云天生物有限公司,批号:P0012S);超敏ECL化学发光液(上海天能科技有限公司,批号:180-5001);HE试剂盒(生工生物工程(上海)有限公司,批号:E607318-0200);MEF2C(批号:5030S)、iNOS(批号:13120S)、 $\beta$ -Actin(13E5)(批号:4970S)均购自美国Cell Signaling Technology公司。

## 2 实验方法

### 2.1 动物造模、分组及干预方法

随机选取C57BL/6同源小鼠6只作为空白组;参照LOHSE等<sup>[19]</sup>描述的实验性AIH小鼠模型制备方法进行造模。造模方法如下:选取C57BL/6同源小鼠应用抗原S-100与弗氏佐剂完全研磨乳化后腹腔注射,0.2 mL/20 g,每周1次,第7天再次注射加强免疫炎症反应,第14天即造模完成。造模成功的模型小鼠随机分为模型组、人参皂苷(AIH+GSS)组与阳性对照地塞米松(AIH+DEX)组,每组6只。造模过程中空白组小鼠腹腔注射PBS,0.2 mL/20 g,每周1次,共2次。在第14天造模完成后,空白组、模型组予无菌蒸馏水灌胃200  $\mu$ L/20 g,AIH+GSS组予人参皂苷50 mg/kg等容量灌胃,AIH+DEX组予地塞米松1 mg/kg、200  $\mu$ L/20 g腹腔注射。每天1次,共14 d。

### 2.2 外泌体分离

摘取小鼠眼球取血,向血液中加入EDTA-2K抗凝,离心半径8.7 cm,3000 r/min 4  $^{\circ}$ C 15 min离心,收集上清液于液氮中冻存备用;将血浆用PBS以1:2进行稀释,以离心半径8.7 cm,2000 r/min 4  $^{\circ}$ C 10 min离心后取上清液至新离心管,并加入样本1/2体积的沉淀试剂,涡旋震荡混匀后4  $^{\circ}$ C 60 min孵育;孵育结束后以离心半径8.7 cm,10 000 r/min 15 min

离心,弃尽上清液;以预冷PBS清洗管壁及管底白色沉淀后,以原始血浆容量用PBS进行吹打复溶,富集的外泌体。

### 2.3 MDSC细胞、Treg细胞、Th17细胞染色

收集部分细胞至流式管中计数,调整至 $1 \times 10^6$ 个/管,加入PBS离心,弃上清液;加100  $\mu$ L PBS重悬,分别加入流式抗体CD11b、Gr-1、CD4和CD25,避光孵育;加入PBS 1 mL/管,离心弃上清液。检测MDSC细胞:取250  $\mu$ L PBS重悬细胞后进行流式检测。检测Treg细胞:加PBS重悬细胞,每管加入1 mL固定/破膜缓冲液,混匀后避光孵育,离心弃上清液。于100  $\mu$ L破膜液中重悬细胞,加入抗体Foxp3,避光孵育,离心弃上清液。取破膜液重悬细胞后进行流式检测。检测Th17细胞:以完全培养基重悬细胞,按说明书加入500 $\times$ eBioscience Cell Stimulation Cocktail,37  $^{\circ}$ C培养箱培养6 h;将细胞收集至流式管中,加入PBS 1 mL/管,离心弃上清;加PBS重悬,加入流式抗体IL-17A,避光孵育;加入PBS,离心弃上清,此步骤重复2次;加PBS重悬细胞后进行流式检测。

### 2.4 Western blot分析

使用RIPA裂解液提取肝脏组织蛋白后,BCA蛋白试剂盒检测蛋白含量。样品蛋白中加入适量5 $\times$ SDS loading buffer,在100  $^{\circ}$ C的金属浴锅加热5 min。使用SDS-PAGE凝胶进行电泳分离胶分离蛋白,并转移至0.45  $\mu$ m孔径的PVDF膜。条带浸没在封闭液中室温慢摇3 h,封闭完成后,使用TBST配制适合浓度的一抗,将目标条带浸没于一抗中,4  $^{\circ}$ C孵育过夜,用TBST漂洗3次。使用TBST配制适合浓度的HRP标记二抗,将目标条带浸于二抗中,室温慢摇孵育1 h。用TBST漂洗后,ECL显色液覆盖全膜。最后应用Bio-Rad ChemiDoc<sup>TM</sup> XRS+系统与Image Lab软件曝光。

### 2.5 染料法荧光定量PCR

提取肝脏组织总RNA,测各样本RNA浓度及纯度。在每个离心管中加入1  $\mu$ g RNA样本,5 $\times$ gDNA wiper Mix 3  $\mu$ L,RNase freeH<sub>2</sub>O补足至15  $\mu$ L,42  $^{\circ}$ C水浴加热2 min;在上述15  $\mu$ L体系中加入5  $\mu$ L的4 $\times$ Hifair<sup>®</sup> III SuperMix plus。反应条件:25  $^{\circ}$ C,5 min,55  $^{\circ}$ C,15 min,85  $^{\circ}$ C,5 min得到的cDNA-20  $^{\circ}$ C保存备用。在离心管中加入Universal Blue qPCR SYBR Green Master Mix 10  $\mu$ L,加正反引物各0.4  $\mu$ L(引物见

表 1 引物序列

名称	正向	反向	长度/bp
Arg-1	CATATCTGCCAAAGACATCCTG	GACATCAAAGCTCAGGTGAATC	322
iNOS	ACTCAGCCAAGCCCTCAGCTAC	TCCAATCTCTGCCTATCCGTCTCG	340
miRNA-233	GCGCGTGTCAAGTTTGTCAAAT	AGTGCAGGCTCCGAGGTATT	286
$\beta$ -actin	CGTTGACATCCGTAAGACC	AACAGTCCGCTAGAAGCAC	281

表 1), 加入 cDNA 模板 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足至 20  $\mu$ L, 混匀。按照说明书设置反应条件, 实施上机检测, 用相对表达量=2<sup>- $\Delta\Delta$</sup>  公式计算各个组的表达情况。

## 2.6 小鼠肝功能与肝组织病理学检测

使用 ALT/GPT 检测试剂盒检测小鼠血清 ALT 水平, AST/GOT 检测试剂盒检测 AST 水平。用 4% 的多聚甲醛将肝组织固定 24 h 后, 按照相应的步骤进行脱水至蜡并包埋, 切片 5  $\mu$ m, 制白片后烤干备用, 染色前将白片按相应顺序脱蜡至水使用。采用 HE 染色与 Masson 染色, 染色后使用显微镜观察小鼠肝组织的变化。

## 2.7 统计方法

流式数据使用 CytExpert 分析结果, PCR 结果使用相对定量法计算 Ct 值, 将结果导入 GraphPad Prism 8 绘制统计图, 并使用 ANOVA 进行多样本配对分析, 均采用双侧检验。Western blot 结果导入 ImageJ 软件测算灰度值并以 GraphPad Prism 8 统计分析绘图。在  $\alpha=0.05$  水准上, 当  $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 人参皂苷对 AIH 小鼠肝功能的影响

模型组小鼠血清 ALT、AST 水平较空白组均显著升高 ( $P<0.001$ ); AIH+DEX 组小鼠血清 ALT、AST 浓度较模型组显著降低 ( $P<0.001$ ), 与空白组无明显差异 ( $P>0.05$ ); AIH+GSS 组 ALT 与 AIH+DEX 组无明显差异 ( $P>0.05$ ), AST 显著低于模型组 ( $P<0.001$ ), 略高于 DEX 组 ( $P<0.01$ )。详见表 2。

在对小鼠肝脏进行 HE、Masson 染色检查肝脏损伤情况中发现, 对照组小鼠肝细胞与肝小叶形态正常, 界面区无炎细胞浸润, 无胶原纤维增生; 模型组肝界面区炎性细胞浸润严重, 肝细胞坏死严重, 小叶形态异常, 有明显胶原纤维增生; AIH+DEX 组与 AIH+GSS 组界面区炎细胞浸润明显减少, 小叶形态较正常, 胶原纤维增生较少。详见图 1。

表 2 人参皂苷对 AIH 小鼠转氨酶的影响 (U/L,  $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	转氨酶活力	
	ALT	AST
空白组	12.18 $\pm$ 0.64	23.76 $\pm$ 3.26
模型组	14.72 $\pm$ 0.50 <sup>△△</sup>	36.71 $\pm$ 1.04 <sup>△△△</sup>
AIH+DEX 组	12.22 $\pm$ 0.53 <sup>***</sup>	21.30 $\pm$ 1.29 <sup>***</sup>
AIH+GSS 组	12.30 $\pm$ 0.56 <sup>***</sup>	27.33 $\pm$ 3.22 <sup>***#</sup>
F 值	20.83	46.14
P 值	<0.0001	<0.0001

注: 与空白组比较, <sup>△△</sup> $P<0.001$ ; 与模型组比较, <sup>\*\*\*</sup> $P<0.001$ ; 与 AIH+DEX 组比较, <sup>#</sup> $P<0.01$ 。

### 3.2 人参皂苷对免疫微环境的调节功能

模型组小鼠 MDSC 细胞数量较空白组显著下降 ( $P<0.001$ ), Treg 细胞数量较空白组显著下降 ( $P<0.01$ ), Th17 细胞数量较空白组显著上升, 差异具有统计学意义 ( $P<0.001$ ); 经 AIH+DEX 干预后, MDSC、Treg 细胞数量高于模型组, Th17 细胞数量下降, 差异具有统计学意义 ( $P<0.01$ ); AIH+GSS 组 MDSC 细胞数量高于模型组 ( $P<0.001$ ), Treg 细胞数量高于模型组 ( $P<0.05$ ), Th17 细胞数量低于模型组 ( $P<0.05$ )。详见图 2。

### 3.3 人参皂苷对 miRNA-223 表达的影响

模型组 miRNA-223 表达显著高于空白组 ( $P<0.001$ ); AIH+GSS 组与 AIH+DEX 组 miRNA-223 的表达水平均显著低于模型组 ( $P<0.001$ ), 而两组间差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。详见表 3。

### 3.4 人参皂苷对 MDSC 相关蛋白及其对 GR 的影响

模型组 Arg-1、iNOS 转录水平较空白组显著降低 ( $P<0.001$ ); AIH+DEX 组与 AIH+GSS 组 Arg-1、iNOS 转录水平均显著高于模型组 ( $P<0.001$ ), 其中, AIH+GSS 组 Arg-1、iNOS 转录水平略高于 AIH+DEX 组 ( $P<0.01$ )。详见表 4。

模型组小鼠 iNOS、Arg-1、MEF2C 与 GR 蛋白表达水平均较空白组显著下降 ( $P<0.001$ ), 而 AIH+DEX 或 AIH+GSS 干预后表达水平均有明显上升 ( $P<0.001$ )。详见表 5 和图 3。

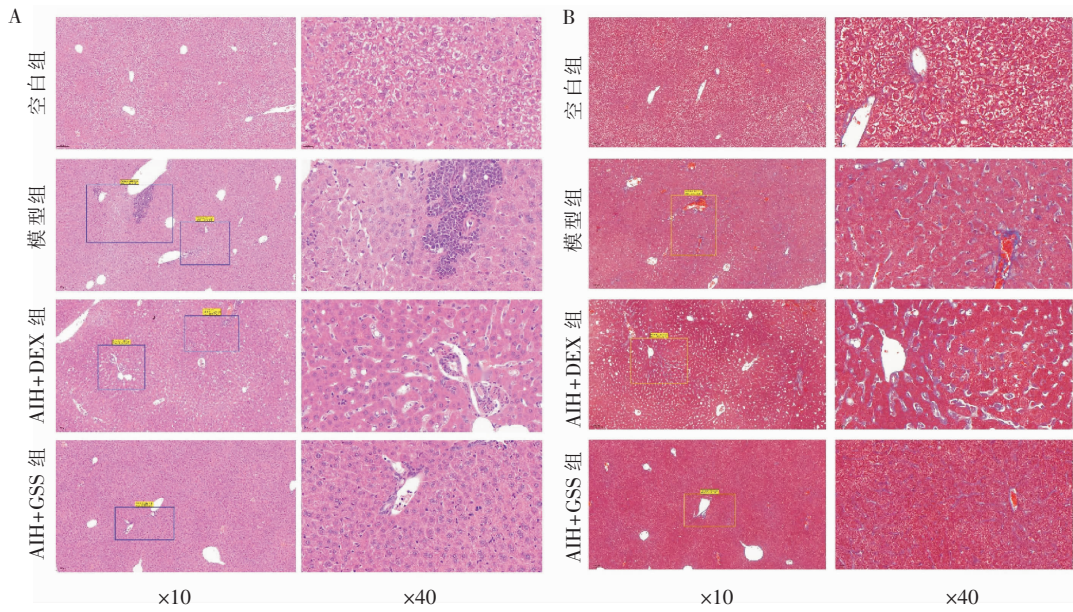


图1 人参皂苷对 AIH 小鼠肝脏病理的影响

注:方框标记处为较严重病变位置。A.HE 染色;B.Masson 染色。

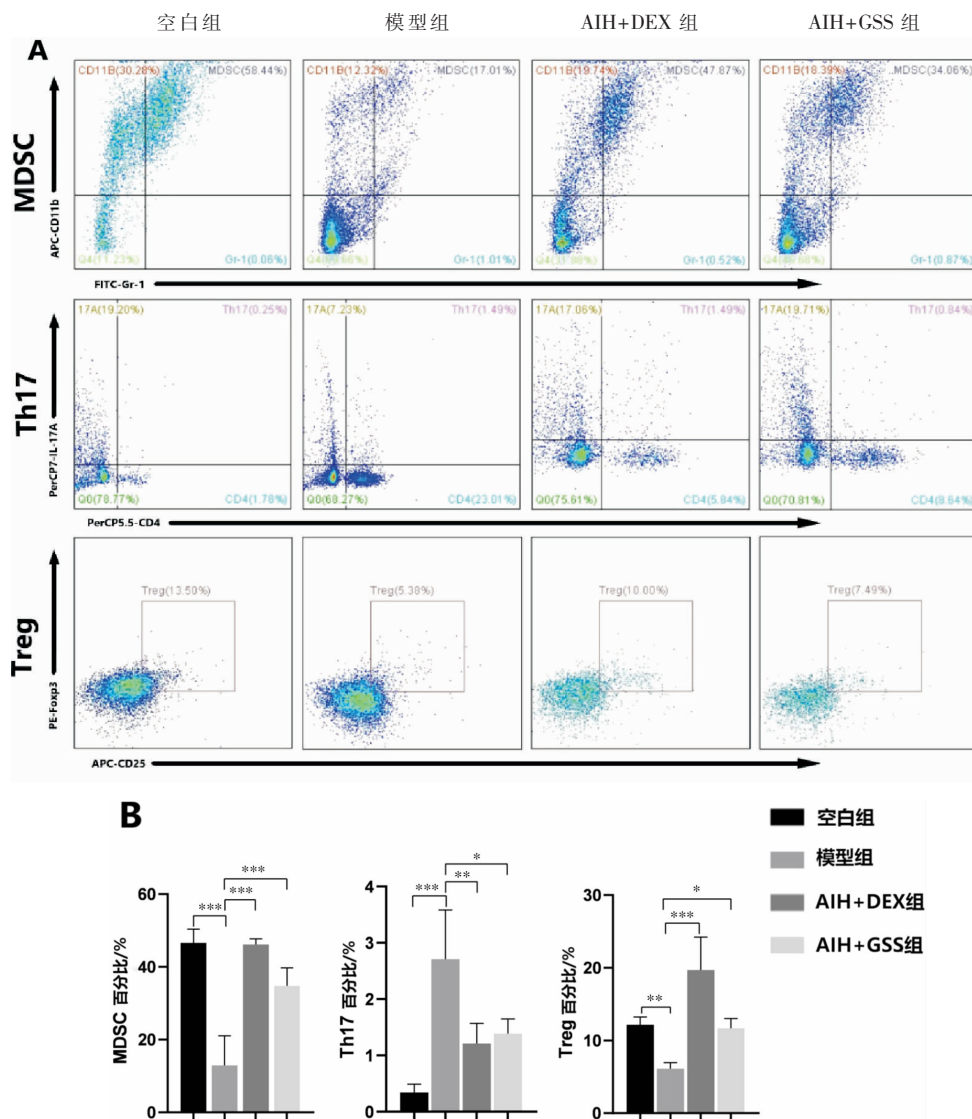


图2 人参皂苷对 AIH 小鼠免疫细胞的影响

注:A.流式细胞图;B.各组细胞数量统计图。\*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ 。

表 3 人参皂苷对 miRNA-223 水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	miRNA-223
空白组	1.01±0.01
模型组	2.08±0.33 <sup>△△△</sup>
AIH+DEX 组	0.67±0.04 <sup>***</sup>
AIH+GSS 组	0.74±0.05 <sup>***</sup>
F 值	88.66
P 值	<0.0001

注:与空白组比较,<sup>△△△</sup> $P<0.001$ ;与模型组比较,<sup>\*\*\*</sup> $P<0.001$ 。

表 4 人参皂苷对 MDSC 功能蛋白的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	Arg-1 mRNA	iNOS mRNA
空白组	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	0.44±0.04 <sup>△△△</sup>	0.40±0.13 <sup>△△△</sup>
AIH+DEX 组	1.53±0.10 <sup>***</sup>	1.30±0.25 <sup>***</sup>
AIH+GSS 组	2.25±0.38 <sup>***#</sup>	1.78±0.14 <sup>***#</sup>
F 值	90.5	80.04
P 值	<0.0001	<0.0001

注:与空白组比较,<sup>△△△</sup> $P<0.001$ ;与模型组比较,<sup>\*\*\*</sup> $P<0.001$ ;与 AIH+DEX 组比较,<sup>#</sup> $P<0.01$ 。

表 5 人参皂苷对相关蛋白表达的影响

(灰度值, $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	iNOS	GR	MEF2C	Arg-1
空白组	1.00±0.03	1.00±0.12	1.00±0.04	1.00±0.02
模型组	0.47±0.01 <sup>△△△</sup>	0.52±0.06 <sup>△△△</sup>	0.35±0.02 <sup>△△△</sup>	0.51±0.01 <sup>△△△</sup>
AIH+DEX 组	1.28±0.11 <sup>***</sup>	0.96±0.06 <sup>***</sup>	0.70±0.03 <sup>***</sup>	0.98±0.05 <sup>***</sup>
AIH+GSS 组	0.98±0.04 <sup>***</sup>	0.90±0.08 <sup>**</sup>	0.70±0.02 <sup>***</sup>	0.83±0.02 <sup>***</sup>
F 值	93.94	20.97	257.7	183.8
P 值	<0.0001	0.0004	<0.0001	<0.0001

注:与空白组比较,<sup>△△△</sup> $P<0.001$ ;与模型组比较,<sup>\*\*\*</sup> $P<0.001$ ,<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ 。

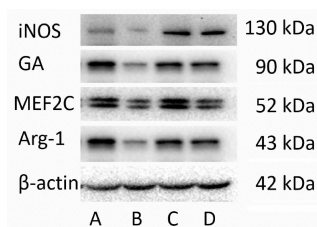


图 3 人参皂苷对相关蛋白表达的影响

注:A.空白组;B.模型组;C.AI H+DEX 组;D.AI H+GSS 组。

## 4 讨论

AIH 是一种自身免疫反应介导的界面型肝炎,因 Th17 为首的辅助性 T 细胞受到异常激活并不断损伤肝细胞所致。有大量研究证实,MDSC 细胞拥有对 T 细胞较强的抑制能力,可以很好地减轻因辅助性 T 细胞过度活化对机体的损伤,而与骨髓细胞

发育高度相关的 miRNA-223 对 MDSC 的增殖起决定性作用<sup>[6,10-11,26-27]</sup>。系统性自身免疫性疾病中抗原呈递细胞将自身抗原肽呈递并激活初始 CD4<sup>+</sup>T 辅助(Th0)细胞,Th0 细胞迅速活化为 Th1、Th2、Th17 细胞并大量释放促炎细胞因子并诱导了机体正常组织炎性损伤,这也是 AIH 的发病机制之一<sup>[20-21]</sup>。在此过程中,标记为 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>Treg 细胞的分化受损常被认为是自身免疫系统疾病发生的关键<sup>[22]</sup>。在 AIH 患者外周血中 Treg 细胞功能受损,Foxp3 表达明显降低<sup>[23]</sup>。MDSC 细胞拥有抑制 T 细胞增殖和诱导细胞毒性 T 淋巴细胞活性的能力<sup>[24-25]</sup>。并且 MDSC 细胞通过特异性高表达 Arg-1、iNOS 酶分别产生尿素、L-鸟氨酸和 NO 来抑制 T 细胞活性<sup>[26-27]</sup>。肌细胞增强因子 2 家族蛋白(myocyte enhancer factor-2, MEF2)作为控制基因表达与表观遗传修饰的转录因子,其家族亚型在不同组织中的表达水平表现出一定的异质性<sup>[28]</sup>。其中,MEF2C 亚型在骨髓细胞中特异性表达并广泛参与了骨髓祖细胞的增殖、分化与成熟,对免疫系统调节有至关重要的作用<sup>[6,28-29]</sup>。在一项对骨髓细胞分化及粒细胞功能调节的研究中发现,MEF2C 是潜在的对 MDSC 细胞分化增殖调控的靶点<sup>[6]</sup>。

在本课题组前期对临床 AIH 患者的证候研究中发现,患者求诊时常以脾虚生湿、湿郁化热之面色萎黄、乏力倦怠、舌苔黄厚腻有齿痕等表现为主,土壅木郁化热而又见胁肋闷痛不适等,又或发黄疸等症。AIH 的病因病机可归纳为先天禀赋不足,或劳伤脾胃,乃至脾胃运化失司,水谷生湿化热,蕴结成毒;中焦受气取汁,变化而赤,是谓血,脾虚令中焦气机失运,则气血生化不足,又肝体阴而用阳,若肝失阴血滋养则气不涵养而化火灼津,反伤于肝而成 AIH。其中,肝郁脾虚,气滞、湿热与邪毒令本病虚实夹杂,缠绵难愈。总结出本病之病位在肝,而根本在乎脾与肾,以脾肾虚为本,湿热瘀邪为标。因此,以人参为核心立方,辅以疏肝祛邪,养护中土,健运脾胃,以行散中焦湿阻,肝气无湿阻则与脾气升降运行,周身大气一转,正气充盛则邪气散而 AIH 得愈。

人参大补肺脾肾元气,能充养正气而祛邪外出,而人参皂苷是其中发挥补益元气最主要的药效成

分,目前已发现的皂苷类单体已多达30余种<sup>[30]</sup>。目前已有较多关于人参皂苷扶正祛邪的功效在免疫学方面的研究,如人参皂苷 Rg3 可呈剂量依赖性激活 IL-12 途径诱导树突状细胞的成熟与下调 CD4<sup>+</sup>T 细胞<sup>[31-32]</sup>,Rh2 可通过增强 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞活性并诱导 T 细胞向肿瘤细胞周围浸润<sup>[33]</sup>,Rg3 可通过激活巨噬细胞吞噬活性,激活 CD4<sup>+</sup>T 细胞活性,促进 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\beta$ 、IL-2 等细胞因子增强机体免疫功能<sup>[34-35]</sup>等。人参皂苷不同单体在不同的疾病中常可表现出不同的免疫调节能力<sup>[36]</sup>,总体而言这种对免疫双向调节的能力都可归纳为中医理论的扶正祛邪。正所谓“正气内存,邪不可干”,于宏观而言,人参对机体的调补之功,乃补气生津,安神益智;于微观言,这种补摄之能不再局限于传统的“补”,而在于“阴平阳秘,精神乃治”;免疫过强,则“阳强不能密,阴气乃绝”,人参有选择性地降低过高的免疫水平,提高过低的免疫水平,使机体免疫处于健康平和的状态,则阴阳平和,相互协调,其人气实而难生 AIH。

有研究表明,人参皂苷对机体的调节活性与 GC 相似,大多是通过 GR 实现的<sup>[37]</sup>,这或与人参皂苷拥有与 GC 相似的甾体样化学结构有关<sup>[38]</sup>。自身免疫性疾病患者临床一线用药以地塞米松、泼尼松龙等 GC 为主。有中医学者认为,糖皮质激素之于人体,有补火助阳之功,少用可“少火生气”,温煦脏腑,运行气血,补元阳而散阴寒;峻用、久用则“壮火食气”,煎灼津液,耗伤精髓<sup>[38-39]</sup>。长期 GC 用药除产生一系列严重不良反应外,还会降低 GR 表达与活性,最终导致 GC 耐受<sup>[40-41]</sup>。这也与 GC 的“少火生气,壮火食气”相似。但研究指出,人参皂苷可通过上调 GR 表达水平、增强 GR 与 GC 的结合活力、辅助 GR 对下游通路的激活效应等方式减轻由 GC 带来的不良反应,并对 GC 增效减毒<sup>[30]</sup>。但目前尚未有研究表明人参皂苷也通过激活 GR,对 AIH 有相同的免疫调节作用。因此,我们设立地塞米松为阳性对照,观察人参皂苷对 AIH 小鼠的影响。实验结果表明,人参皂苷可通过上调 GR 的表达,增强 Arg-1、iNOS 的转录与表达,促进 MDSC 与 Treg 的表达,抑制 Th17 细胞的数量,调整肝脏的免疫微环境。这种人参皂苷对免疫细胞的调节与糖皮质激素相似,均可调节小鼠免疫微环境,缓解 AIH 肝脏中 T 效应细胞带来的肝脏损伤。同时,在应用人参皂苷或地塞米松后 MEF2C 的表达量均有所提升。由此推测,人参皂苷对 MDSC

的激活作用或与其对 MEF2C 的激活有关。此外,在对外周血外泌体的 miRNA 检测中,本研究表明人参皂苷与地塞米松均对 miRNA-223 表现出良好的抑制作用。实验结果表明人参皂苷对 AIH 小鼠的保护作用或通过对 miRNA-223 的抑制与对 GR 与 MEF2C 的激活实现,据此实现对 MDSC 的扩增与对肝脏免疫微环境的调节。

虽然在我们的实验中人参皂苷对 AIH 中肝脏的保护作用略低于 AIH+DEX,且应用剂量远大于后者,但鉴于人参皂苷在一定剂量的应用尚未有严重不良反应报道,对比 GC 长期、大剂量应用带来的严重不良反应,人参皂苷或能成为 GC 之后新的替代选择。

## 参考文献

- [1] FLOREANI A, RESTREPO-JIMÉNEZ P, SECCHI M F, et al. Etiopathogenesis of autoimmune hepatitis[J]. *Journal of Autoimmunity*, 2018, 95: 133-143.
- [2] 中华医学会肝病学会,中华医学会消化病学分会,中华医学会感染病学分会.自身免疫性肝炎诊断和治疗共识(2015)[J].*胃肠病学*,2016,21(3):165-178.
- [3] KATSUMI T, UENO Y. Epidemiology and surveillance of autoimmune hepatitis in Asia[J]. *Liver International*, 2022, 42(9): 2015-2022.
- [4] MIELI-VERGANI G, VERGANI D, CZAJA A J, et al. Autoimmune hepatitis[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2018, 4: 18017.
- [5] DOYCHEVA I, WATT K D, GULAMHUSEIN A F. Autoimmune hepatitis: Current and future therapeutic options[J]. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 2019, 39(6): 1002-1013.
- [6] JOHNNIDIS J B, HARRIS M H, WHEELER R T, et al. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223[J]. *Nature*, 2008, 451(7182): 1125-1129.
- [7] EL GAZZAR M. microRNAs as potential regulators of myeloid-derived suppressor cell expansion[J]. *Innate Immunity*, 2014, 20(3): 227-238.
- [8] YUAN X Y, BERG N, LEE J W, et al. microRNA miR-223 as regulator of innate immunity[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2018, 104(3): 515-524.
- [9] CLEVERS H, et al. At the crossroads of inflammation and cancer[J]. *Cell*, 2004, 118(6): 671-674.
- [10] LU T X, LIM E J, BESSE J A, et al. miR-223 deficiency increases eosinophil progenitor proliferation [J]. *Journal of Immunology*, 2013, 190(4): 1576-1582.
- [11] CHEN C Z, LI L, LODISH H F, et al. microRNAs modulate

- hematopoietic lineage differentiation[J]. *Science*, 2004, 303(5654): 83-86.
- [12] 王海南. 人参皂苷药理研究进展[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2006, 11(11): 1201-1206.
- [13] 李群益, 陈莉, 张留弟, 等. 人参皂苷代谢产物 Compound K 抑制 TNF- $\alpha$  诱导的人支气管上皮细胞分泌 RANTES[J]. *第二军医大学学报*, 2015, 36(7): 722-726.
- [14] LEE J, LEE E, KIM D, et al. Studies on absorption, distribution and metabolism of ginseng in humans after oral administration[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 122(1): 143-148.
- [15] 李勇, 李毅平, 虞胜, 等. 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 诱导人肝 HL-7702 细胞糖皮质激素受体报告基因表达的作用[J]. *中草药*, 2006, 37(12): 1823-1826.
- [16] 封颖璐, 凌昌全, 程彬彬. 人参皂甙逆转糖皮质激素下调其受体的实验研究[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2008, 24(4): 425-427.
- [17] 曾小莉, 涂植光. 人参皂甙 Rh<sub>2</sub> 对人肝癌细胞 SMMC-7721 信号传导的影响[J]. *中华肝脏病杂志*, 2004(9): 58-59.
- [18] WU J Y, PAN Z F, CHENG M Y, et al. Ginsenoside Rg<sub>1</sub> facilitates neural differentiation of mouse embryonic stem cells via GR-dependent signaling pathway[J]. *Neurochemistry International*, 2013, 62(1): 92-102.
- [19] LOHSE A W, MANNS M, DIENES H P, et al. Experimental autoimmune hepatitis: Disease induction, time course and T-cell reactivity[J]. *Hepatology*, 1990, 11(1): 24-30.
- [20] SUCHER E, SUCHER R, GRADISTANAC T, et al. Autoimmune hepatitis-immunologically triggered liver pathogenesis-diagnostic and therapeutic strategies[J]. *Journal of Immunology Research*, 2019, 2019: 9437043.
- [21] LIBERAL R, et al. Pathogenesis of autoimmune hepatitis[J]. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2011, 25(6): 653-664.
- [22] MIYARA M, GOROCHOV G, EHRENSTEIN M, et al. Human FoxP3+ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases[J]. *Autoimmunity Reviews*, 2011, 10(12): 744-755.
- [23] LONGHI M S, HUSSAIN M J, MITRY R R, et al. Functional study of CD4+CD25+ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis[J]. *Journal of Immunology*, 2006, 176(7): 4484-4491.
- [24] RASHID O M, NAGAHASHI M, RAMACHANDRAN S, et al. Resection of the primary tumor improves survival in metastatic breast cancer by reducing overall tumor burden[J]. *Surgery*, 2013, 153(6): 771-778.
- [25] SALVADORI S, MARTINELLI G, ZIER K. Resection of solid tumors reverses T cell defects and restores protective immunity[J]. *Journal of Immunology*, 2000, 164(4): 2214-2220.
- [26] RODRIGUEZ P C, OCHOA A C. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: Mechanisms and therapeutic perspectives[J]. *Immunological Reviews*, 2008, 222: 180-191.
- [27] BRONTE V, ZANOVELLO P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5(8): 641-654.
- [28] DI GIORGIO E, HANCOCK W W, BRANCOLINI C. MEF2 and the tumorigenic process, hic sunt leones[J]. *Biochimica et Biophysica Acta Reviews on Cancer*, 2018, 1870(2): 261-273.
- [29] SCHÜLER A, SCHWIEGER M, ENGELMANN A, et al. The MADS transcription factor Mef2c is a pivotal modulator of myeloid cell fate[J]. *Blood*, 2008, 111(9): 4532-4541.
- [30] 师哲, 李勇. 人参皂苷对糖皮质激素受体途径调节作用研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(11): 162-165.
- [31] LEE Y J, SON Y M, GU M J, et al. Ginsenoside fractions regulate the action of monocytes and their differentiation into dendritic cells[J]. *Journal of Ginseng Research*, 2015, 39(1): 29-37.
- [32] SON K J, CHOI K R, LEE S J, et al. Immunogenic cell death induced by ginsenoside Rg<sub>3</sub>: Significance in dendritic cell-based anti-tumor immunotherapy[J]. *Immune Network*, 2016, 16(1): 75-84.
- [33] WANG M, YAN S J, ZHANG H T, et al. Ginsenoside Rh<sub>2</sub> enhances the antitumor immunological response of a melanoma mice model[J]. *Oncology Letters*, 2017, 13(2): 681-685.
- [34] 陈洪志, 罗花南, 权博源, 等. 人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 对鼻咽癌放疗患者 CD 80/86 表达及细胞免疫功能的影响[J]. *吉林中医药*, 2017, 37(12): 1211-1214.
- [35] 王曼, 黄念, 凌昌全. 人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 对肿瘤的免疫调节作用及其纳米给药体系研究进展[J]. *中草药*, 2019, 50(15): 3729-3734.
- [36] 王超楠, 赵大庆, 王隶书, 等. 人参及复方人参制剂免疫双向调节机制及应用研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2021, 32(1): 177-180.
- [37] WEBB G J, HIRSCHFELD G M. Using GWAS to identify genetic predisposition in hepatic autoimmunity[J]. *Journal of Autoimmunity*, 2016, 66: 25-39.
- [38] 陈鑫. 从阳气角度论糖皮质激素的作用[J]. *山东中医杂志*, 2019, 38(8): 732-734, 739.
- [39] 刘芬芬, 羊维, 黄琳, 等. 中医学对糖皮质激素主治功效的药性认识[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(4): 1268-1270.
- [40] 李勇, 李敏, 王喜, 等. 人参茎叶皂甙增强糖皮质激素受体转录激活效应的实验研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2004, 24(8): 710-713.
- [41] 张书印, 丁选胜, 方芸. 炎症性疾病中糖皮质激素抵抗机制的研究进展[J]. *药物评价研究*, 2017, 40(12): 1811-1815.