

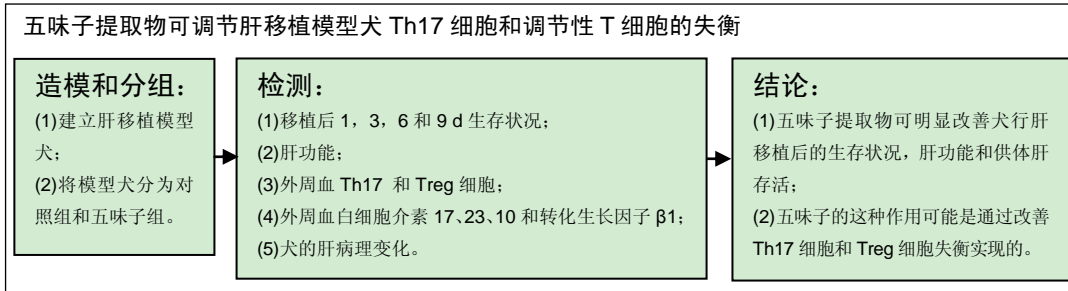
五味子提取物对肝移植模型犬Th17细胞和调节性T细胞失衡的调控

刘立业¹, 赵德芳², 高飞¹, 张彤², 董勤² (¹内蒙古医科大学, 内蒙古自治区呼和浩特市 010059; ²内蒙古医学院附属医院肝胆胰脾外科, 内蒙古自治区呼和浩特市 010059)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0297

ORCID: 0000-0003-1494-9121(刘立业)

文章快速阅读:



刘立业, 男, 1992 年生, 内蒙古自治区通辽市人, 蒙古族, 内蒙古医科大学硕士研究生, 主要从事肝胆肿瘤疾病诊治方面的研究。

通讯作者: 赵德芳, 博士, 副教授, 主任医师, 内蒙古医科大学附属医院肝胆胰脾外科, 内蒙古自治区呼和浩特市 010059。

中图分类号:R318

文献标识码:B

稿件接受: 2018-04-28



文题释义:

五味子: 木兰科植物五味子或华中五味子的干燥成熟果实, 五味子可改善肝功能、减轻肝细胞脂质, 防止肝纤维化的作用, 可用于慢性肝炎、迁延性肝炎等。近年研究认为五味子也可用于肝移植患者。

调节性 T 细胞: 是一类控制体内自身免疫反应性的 T 细胞亚群。调节性 T 细胞可分为天然产生的自然调节性 T 细胞和诱导产生的适应性调节性 T 细胞, 如 Th3、Tr1, 另外尚有 CD8 Treg、NKT 细胞等, 与自身免疫性疾病的发生关系密切, 其异常表达可导致自身免疫性疾病。调节性 T 细胞对于自身免疫性疾病的发生和发展都具有重要意义, 对其进行深入研究将有助于了解自身免疫性疾病的发病机制, 对疾病预后判断、进一步的治疗有着深远的意义。

摘要

背景: 五味子提取物的功效有很多, 但五味子提取物在肝移植后的免疫改变方面所起的作用研究甚少。

目的: 探讨五味子提取物对肝移植模型犬的 Th17 细胞和 Treg 细胞失衡的影响。

方法: 建立肝移植犬模型, 随后随机分成对照组 10 只和五味子组 10 只, 肝移植后对照组给予葡萄糖, 五味子组给予五味子水提取物。检测肝移植后 1, 3, 6 和 9 d 的存活率、肝功能、外周血 Th17 细胞和 Treg 细胞、外周血白细胞介素 17、23、10 和转化生长因子 $\beta 1$ 水平; 比较 2 组犬的肝病理变化。

结果与结论: ①与对照组比, 五味子组肝移植模型犬的生存期明显延长($P < 0.05$); ②肝移植后 3, 6 和 9 d 五味子组谷丙转氨酶、谷草转氨酶及总胆红素水平显著低于对照组($P < 0.05$); ③肝移植后 3, 6 及 9 d, 对照组的 Treg 显著降低, Th17 显著增高($P < 0.05$), 与对照组比, 五味子组的 Th17 增高不明显, Treg 无显著变化, 但有增高趋势; ④肝移植后 3, 6 及 9 d, 与对照组相比, 五味子组白细胞介素 17 和白细胞介素 23 水平显著降低, 白细胞介素 10 和转化生长因子 $\beta 1$ 水平显著升高($P < 0.05$); ⑤与对照组比较, 五味子组可降低炎症因子浸润, 改善肝的病变程度; ⑥结果提示, 五味子提取物可明显改善肝移植模型犬的生存状况, 肝功能和供体肝存活, 可能与改善 Th17 细胞和 Treg 细胞失衡有关。

关键词:

五味子提取物; 肝移植; Th17; Treg; 免疫排斥; 低温机械灌注; 炎症因子; 肝细胞坏死

主题词:

五味子属; 肝移植; 免疫; 细胞; 组织工程

基金资助:

内蒙古自治区自然科学基金项目(2017MS0824)

Schisandra extract regulates Th17 cells and regulatory T cell imbalance in dogs undergoing liver transplantation

Liu Li-ye¹, Zhao De-fang², Gao Fei¹, Zhang Tong², Dong Qin² (¹Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, Inner Mongolia Autonomous Region, China; ²Department of Hepatobiliary, Pancreatic and Splenic Surgery, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, Inner Mongolia Autonomous Region, China)

Abstract

BACKGROUND: Schisandra extract has various effects, but little is known about the role of Schisandrins extract in immune changes after liver transplantation.

OBJECTIVE: To investigate the effect of Schisandra extract on Th17/regulatory T cells (Treg) imbalance in dogs undergoing liver transplantation.

Liu Li-ye, Master candidate, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Corresponding author: Zhao De-fang, M.D., Associate professor, Chief physician, Department of Hepatobiliary, Pancreatic and Splenic Surgery, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, Inner Mongolia Autonomous Region, China

METHODS: The model dogs undergoing liver transplantation were established, and then divided into control and Schisandra groups ($n=10$ per group). The control group received glucose and the Schisandra group was given Schisandra extracts postoperatively. The survival rate, liver function, Th17 and Treg cells in peripheral blood, as well as levels of interleukin 17, interleukin 23, interleukin 10 and tumor growth factor $\beta 1$ in peripheral blood were determined at 1, 3, 6 and 9 days after liver transplantation. The pathological changes of canine liver were compared between groups.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with control group, the survival rate was significantly increased in the Schisandra group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the levels of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and total bilirubin in the Schisandra group were significantly lower than those in the control group at 3, 6 and 9 days after liver transplantation ($P < 0.05$). In the control group, the Treg cells were significantly decreased, and Th17 cells were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the control group, the Th17 and Treg cells in the Schisandra group showed no significant change, but tended to be increased. Compared with the control group, in the Schisandra group, the levels of interleukin 17 and interleukin 23 were significantly decreased, and levels of interleukin 10 and tumor growth factor $\beta 1$ were significantly increased ($P < 0.05$). The inflammatory factor infiltration and liver pathology were reduced in the Schisandra group compared with the control group. Our findings imply that Schisandra extracts can significantly improve living conditions, liver function and donor liver's activity in dogs undergoing liver transplantation, probably by improving the Th17/Treg cell imbalance.

Subject headings: Schisandra; Liver Transplantation; Immunity, Cellular; Tissue Engineering

Funding: the Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region, No. 2017MS0824

0 引言 Introduction

五味子是木兰科植物五味子或华中五味子的干燥成熟果实,越来越多的研究显示五味子具有改善肝功能、减轻肝细胞脂质过氧化损伤,从而防止肝纤维化的作用^[1]。五味子可以促进损伤肝细胞的修复、降低血清丙氨酸转氨酶活性,可长期用于慢性肝炎、迁延性肝炎等^[2-4]。大量研究显示,医院器官移植中心在临床实践中,给予肝移植患者免疫抑制剂的同时也给予五酯胶囊和护肝片等含有五味子的中成药,与单独给予免疫抑制剂组比,联合给药的患者受益较多^[5-8]。但五味子对肝移植后的免疫排斥和疗效是否也有积极意义,目前尚未有明确观点。肝移植早期失败的原因主要是急性排斥反应,是肝移植亟待解决的问题^[9]。

调节性T细胞(regulatory T cell, Treg),又名抑制性T细胞,具有免疫无能及免疫抑制特点,分为天然型(nTreg)和诱导型(iTreg) 2类。天然型由胸腺产生,具有抗原非特异性抑制特点,诱导型经外周经刺激诱导产生,具有特异性针对抗原产生抑制的特点。Treg一方面可特异性表达叉头翼状螺旋转录因子3并分泌白细胞介素10和转化生长因子 $\beta 1$,这两种细胞因子可直接杀伤或诱导 $CD4^+/CD8^+$ 效应T细胞凋亡,抑制 $CD4^+/CD8^+$ 效应T细胞增殖和活化;另一方面, Treg细胞膜相关分子CTAL-4可下调树突状细胞的 $CD80/CD86$ 共刺激分子表达,抑制树突状细胞成熟,诱导APC的强效抑制酶表达。另外Treg细胞可经膜间隙连接作用在效应靶细胞,产生免疫抑制腺苷,改变细胞外核苷酸/核苷通量和细胞内信号,扰乱效应靶细胞的代谢和信号传导,达到免疫抑制或抗炎作用。

Th17细胞和 $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Treg细胞是近些年功能上相互关联和拮抗的T细胞亚群,二者失衡可能参与肝移植后急性排斥导致移植肝功能丧失^[10-11]。Th17作为 $CD4^+$ T淋巴细胞亚群,其特异性转录因子视黄酸相关孤儿受体对Th17分化具有重要作用,可促进白细胞介素17、6和23等促炎因子,这些炎症因子均不同程度地参与了移植排斥^[12]。当前课题以肝移植模型犬为评估模型,探讨五味子提取物在肝移植后的免疫改变所起的作用,为肝移植临床应用五味子相关制剂提供参考。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 于2017年2月至9月在内蒙古医科大学完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 SPF级12月龄雄性犬50只,体质量10-12 kg,由内蒙古大学实验动物研究中心提供,生产批号:201602。清洁环境饲养,12 h/12 h昼夜,自由饮水。

1.3.2 五味子提取物的制备 五味子购于内蒙古中药材批发公司,经外观及显微鉴定为木兰科植物五味子的干燥成熟果实。取五味子500 g,粉碎,加入5 000 mL纯化水,煮沸40 min,5 000 r/min离心10 min,得上清,减压浓缩体积至50 mL,备用。

1.3.3 实验主要试剂及仪器 低温机械(-80 °C低温冰箱, Forma Scientific, 美国);一次性静脉营养液袋(上海曹杨医药用品厂);隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂);流式细胞仪(库尔特公司, 美国);ELISA试剂盒(上海仁捷生物科技有限公司);全自动生化分析仪(日立仪器(上海)有限公司)

1.4 方法

1.4.1 实验动物分组 将50只犬随机分为对照组和五味子组,每组25只,麻醉并取对照组犬肝,经低温机械灌注保存,移植至五味子组犬,五味子组犬肝取出经低温机械灌注保存,移植至对照组犬^[9]。

1.4.2 制备肝移植模型犬 移植前1 d麻醉犬,行B超,测得犬肝动脉、门静脉直径和流速,以 $\pi R^2 \times v$ (R =半径, v =流速)计算犬肝动脉和门静脉灌注量。移植前禁食12 h,禁水4 h。无菌条件下,犬全麻,建立中心静脉输液,动脉采血通道,气管插管与呼吸机控制。于腹正中切开,游离胆总管、门静脉和肝动脉,结扎右膈静脉、左膈静脉和左后膈静脉,行腹主动脉与门静脉插管经一次性静脉营养液袋灌注4 °C羟基柠檬酸肾保存液1.5 L,再给4 °C UW液(University of Wisconsin Solution)灌注1 L,总量约5 000 mL。经胆囊插管以4 °C 0.5 L羟基柠檬酸肾保存液灌注胆道,灌注时,肝表面和腹腔加冰屑使肝降温。灌注完毕,切供肝,称质量,隔水式电热恒温培养箱,4 °C 0.9%氯化钠注射液保存。2个组别的供体切取保存到移植至受体移植的时间 < 3.0 h。移植前,将肝供体采用1 L的Hextend灌注液经门静脉灌注洗肝内残留液。采用改良背驮式肝移植,不采用静脉转流,以胆总管-胆总管端端吻合或胆总管-空

肠吻合,不放T管,逐层缝合,保温。

1.4.3 给药 肝移植后当天,对照组灌胃给予12 g/kg 5%葡萄糖,五味子组给予12 g/kg五味子水提取物^[13]。连续10 d,灌胃均为插入胃管途径给予。

1.4.4 指标检测

总体状况: 观察肝移植后1, 3, 6和9 d的2组犬皮毛、活动、进食和精神状况。

肝功能: 分别在肝移植后1, 3, 6和9 d抽取2组犬外周静脉血, 3 000 r/min, 离心10 min, 得血清, 采用全自动生化分析仪检测谷丙转氨酶、谷草转氨酶及总胆红素水平。

外周血中Th17、Treg细胞: 分别在肝移植后1, 3, 6和9 d检测2组犬外周血Th17、Treg细胞, 利用Ficoll Hypaque密度梯度离心法分离外周血单个核细胞, 稀释分离的单个核细胞, 进行淋巴细胞的刺激培养, 标记FITC-anti-CD4单抗和PE-anti-IL-17单抗, 加入FITC-anti-CD4单抗, 流式细胞仪检测Th17; 对培养的单个核细胞表面染色APC-anti-CD4 mAb, FITC-anti-Rat CD25 mAb, 流式细胞仪检测Treg细胞, 所有结果均用CELLQuest分析。

外周血白细胞介素17、23和10及转化生长因子 β 1水平: 分别在肝移植后1, 3, 6和9 d抽取2组犬外周静脉血, 3 000 r/min离心10 min, 得血清, 严格按照试剂盒的要求, 采用双抗体ELISA法进行加样、加酶标抗体、加入底物显色液, 之后终止反应进行结果判定, 进而检测两组犬外周白细胞介素17、23和10, 转化生长因子 β 1水平。

肝病理组织学观察: 将2组犬给药10 d后全部安乐死处理, 分离肝脏, 在肝中叶切取2.0 cm \times 2.0 cm的肝组织, 经体积分数4%甲醛固定48 h, 石蜡切片, 苏木精-伊红染色, 镜下观察。给药期间2组死亡的犬也进行肝病理检查。

1.5 主要观察指标 ①肝移植后2组总体状况, 肝功能; ②外周血Th17、Treg细胞; ③外周血白细胞介素17、23和10以及转化生长因子 β 1水平; ④犬的肝病理情况。

1.6 统计学分析 采用SPSS 13.0软件进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间配对 t 检验, 计数资料采用卡方检验, 生存期比较采用Kaplan-Meier生存分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 手术情况 雄性犬共50只, 手术成功且存活的犬纳入研究, 2个组犬死亡共30只, 手术总成功率为40%。

2.2 肝移植后状况 对照组肝移植后出现皮毛粗糙、活动少、进食少和精神萎靡, 五味子组肝移植后犬的精神较好, 活动和进食较多。肝移植后第10天全部安乐死。对照组和五味子组肝移植后10 d的存活率分别为20%和60%, 与对照组比, 五味子的生存期明显延长($P < 0.05$), 见图1。

2.3 两组肝移植后肝功能的比较 两组肝移植后不同时间点谷丙转氨酶、谷草转氨酶及总胆红素水平均有不同程度的升高。肝移植后3, 6和9 d五味子组谷丙转氨酶、谷草转氨酶及总胆红素水平显著低于对照组($P < 0.05$), 见表1。

2.4 CD4⁺CD25⁺Treg⁺T细胞和Th17(CD4⁺IL-17⁺T细胞)占CD4⁺T细胞比例 两组肝移植后1 d的Treg和Th17细胞比例无显著差异($P > 0.05$), 肝移植后3, 6及9 d, 对照组的Treg显著降低($P < 0.05$), Th17显著增高($P < 0.05$), 与对照组比, 五味子组的Th17增高不明显, Treg没有显著变化($P > 0.05$), 但有增高趋势, 见表2。

2.5 两组肝移植后外周血外周血白细胞介素17、23、10, 转化生长因子 β 1的比较 肝移植后1 d, 2组白细胞介素17、23、10, 转化生长因子 β 1无显著差异($P > 0.05$)。肝移植后3, 6及9 d, 与对照组相比, 五味子组白细胞介素17和白细胞介素23水平显著降低, 白细胞介素10和转化生长因子 β 1水平显著升高($P < 0.05$), 见表3。

2.6 两组肝移植后肝病理变化 对照组10 d安乐死犬的肝细胞肿大, 淋巴细胞及嗜中性粒细胞浸润, 胞浆颗粒变性, 偶见肝细胞出血性坏死, 对照组肝移植后10 d内死亡犬大量肝细胞浑浊肿胀, 嗜酸性坏死, 片状坏死, 充血。五味子组肝移植后10 d安乐死犬的肝细胞略有肿大, 部分淋巴细胞及嗜中性粒细胞浸润, 少量胞浆颗粒变性; 五味子组肝移植后10 d内死亡犬肝细胞略有肿大, 淋巴细胞及嗜中性粒细胞浸润, 部分胞浆颗粒变性, 充血。见图2。

3 讨论 Discussion

Th17和Treg的作用相反相成, 生理状态下Th17和Treg保持平衡, 当该平衡被打破, 则引发恶性肿瘤、免疫性疾病和移植排斥等。当前课题结果也显示, 生存时间较短和肝功能降低的对照组, 随着时间延长, 与肝移植后1 d比, 肝移植后3, 6及9 d, Th17和Treg的差距越来越大, 与Th17相关的白细胞介素17和白细胞介素23显著增高, 与Treg相关的白细胞介素10和转化生长因子 β 1显著降低, 提示Th17和Treg的相对平衡被打破, 进一步提示检测Th17和Treg对于评估肝移植的肝功能与预后有一定的指导意义^[14-16]。

五味子性温、味酸, 具有敛肺滋肾、生津敛汗、涩精止泻和宁心安神的作用, 在中医理论指导下广泛用于久嗽虚喘、遗尿尿频、梦遗滑精、久泻不止、津伤口渴、自汗盗汗、内热消渴、短气脉虚和心悸失眠等症。近年来, 还发现五味子在肝疾病方面的作用, 临床已有多种中成药, 如护肝片、五味子丸、五酯胶囊和六味五灵片等, 以五味子为君/臣药应用在护肝和保肝领域^[17-18]。当前课题结果显示给予肝移植犬以五味子提取液, 可明显改善犬的生活状态, 提高肝功能, 降低犬肝病理的炎症因子浸润, 改善肝的病变程度, 降低Th17, 提高Treg。动物研究显示, 与肝移植后未排斥大鼠比, 急性排斥反应大鼠的白细胞介素17蛋白及mRNA水平在肝移植后24 h明显增高, 临床肾移植发生排斥的患者白细胞介素17水平也明显增高, 但非排斥的患者组织和尿液中均未检出白细胞介素17, 人肺移植术后急性排异发生时白细胞介素17水平也升高, 对于心脏同种异体移植的模型给予白细胞介素17拮抗剂可明显降低移植器官的炎症因子表达, 明显延长移植器官的存活时间^[19]。当前课题结果显示, 肝移植后给予五味子水提取物, 移植犬外周血的Th17水平明显降低, 白细胞介素10

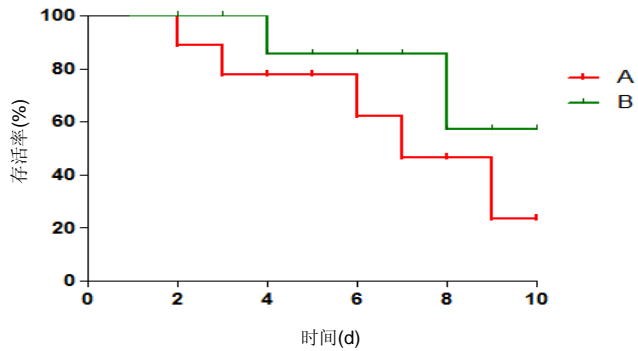


图1 两组肝移植模型犬的生存时间
Figure 1 Survival of the dogs undergoing liver transplantation in the two groups
图注: A 为对照组, 10 d 存活率为 20%; B 为五味子组, 10 d 的存活率为 60%。

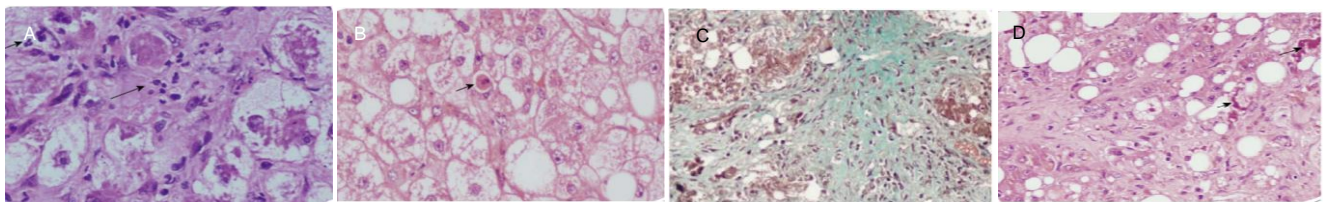


图2 两组肝病理变化(苏木精-伊红染色, x200)
Figure 2 Pathological changes of the liver in each group (hematoxylin-eosin staining, x200)
图注: 图中 A 为对照组安乐死犬, 肝细胞肿大, 淋巴细胞及嗜中性粒细胞浸润, 胞浆颗粒变性, 偶见肝细胞出血性坏死; B 为对照组 10 d 内死亡犬, 大量肝细胞浑浊肿胀, 嗜酸性坏死, 片状坏死, 充血; C 为五味子组安乐死犬, 肝细胞略有肿大, 部分淋巴细胞及嗜中性粒细胞浸润, 少量胞浆颗粒变性; D 为五味子组安 10 d 内死亡犬, 肝细胞略有肿大, 淋巴细胞及嗜中性粒细胞浸润, 部分胞浆颗粒变性, 充血。

表2 两组肝移植后不同时间点外周血 Th17 和 Treg 的比较 (x±s)
Table 2 Comparison of the Th17 and Treg cells in peripheral blood between two groups at different time points after liver transplantation

组别	n	时间(d)	Th17(%)	Treg(%)
对照组	10	1	2.3±0.5	3.8±0.7
	9	3	3.5±0.8	3.0±0.9
	6	6	4.9±0.9	2.5±0.7
	2	9	6.7±1.1	1.9±0.5
五味子组	10	1	2.4±0.6 ^a	3.0±0.7
	10	3	2.6±0.7 ^a	3.1±0.6
	9	6	2.9±0.7 ^a	3.3±0.5
	6	9	3.2±0.9 ^a	3.8±0.9

表注: 与对照组比, ^aP < 0.05.

水平显著增高, 肝移植犬的生存期显著提高, 可见五味子可改善并有助于平衡Th17和Treg, 有助于降低急性排斥反应发生, 有利于提高移植肝的存活率。关于五味子对于Th17和Treg的影响报道较少, 佟彤^[20]建立ConA自身免疫肝炎模型, 采用流式细胞术检测脾脏及肠系膜淋巴结中Treg和Th1两个T细胞亚群, 实时定量PCR检测脾脏细胞因子白细胞介素4、白细胞介素17的表达, 结果显示五味子提取物灌胃可显著提高ConA自身免疫肝炎模型脾脏Treg细胞比例, 同时还可降低脾脏白细胞介素17表达, 但相关机制尚不明确。Jin等^[21]研究发现五味子可明显降低免疫紊

表1 两组肝移植后不同时间点肝功能的比较 (x±s)
Table 1 Comparison of the liver function between two groups at different time points after liver transplantation

组别	n	时间(d)	谷丙转氨酶 (IU/L)	谷草转氨酶 (IU/L)	总胆红素水平 (IU/L)
对照组	10	1	25.4±4.5	32.5±5.9	0.8±0.3
	9	3	59.7±4.8	67.5±7.8	2.4±0.5
	6	6	134.1±15.2	157.9±24.5	4.6±0.8
	2	9	189.7±27.5	234.5±39.8	5.5±1.0
五味子组	10	1	27.1±6.1	31.5±8.2	0.9±0.3
	10	3	32.6±5.8 ^a	35.8±7.5 ^a	1.5±0.6 ^a
	9	6	39.7±6.9 ^a	43.6±8.4 ^a	2.1±0.7 ^a
	6	9	40.7±5.8 ^a	45.1±6.7 ^a	2.3±0.8 ^a

表注: 与对照组比, ^aP < 0.05.

表3 两组肝移植后不同时间点外周血白细胞介素 17、23、10, 转化生长因子β1 水平的比较 (x±s)

Table 3 Comparison of the levels of interleukin 17, interleukin 23, interleukin 10 and tumor growth factor β1 in peripheral blood between two groups at different time points after liver transplantation

组别	n	时间(d)	白细胞介素 17	白细胞介素 23	白细胞介素 10	转化生长因子 β1
对照组	10	1	35.4±7.2	28.7±6.9	79.8±10.5	124.5±32.4
	9	3	57.2±11.4	43.8±10.4	60.7±10.4	100.7±39.5
	6	6	82.6±10.8	62.4±13.4	57.1±16.0	57.6±18.4
	2	9	90.7±13.6	73.9±14.4	43.9±16.8	50.4±10.2
五味子组	10	1	36.7±9.0	29.4±7.3	80.4±11.3	127.5±45.7
	10	3	41.5±8.2 ^a	32.4±8.7 ^a	106.7±16.4 ^a	165.7±34.6 ^a
	9	6	46.7±9.0 ^a	34.6±9.8 ^a	157.9±24.7 ^a	199.4±36.0 ^a
	6	9	50.5±13.4 ^a	39.6±8.4 ^a	209.5±46.7 ^a	206.1±36.5 ^a

表注: 与对照组比, ^aP < 0.05.

乱的荨麻疹患者外周血白细胞介素10, 且可明显降低复发率。五味子改善Th17和Treg平衡的效应可能有几种可能的解释^[22-27]: ①五味子乙素是五味子的主要有效成分之一, Chen等^[28]采用刀豆素A体内外制备小鼠脾淋巴细胞炎症模型, 结果显示五味子乙素可显著抑制Th1和Th17相关细胞因子分泌, 可抑制CD4⁺T细胞向Th1和Th17细胞分化, 促进CD4⁺T细胞向Treg细胞分化, 机制研究显示五味子乙素可抑制Th1相关t-box转录因子、T-bet和Th17相关转录因子, 类视黄醇

相关孤儿受体 γ t(ROR γ t) 的转录, 增强Treg相关转录因子 Foxp3在CD4⁺T细胞中的Th细胞极化情况的转录; ②五味子提取物可显著降低自由基水平, 改善神经细胞的损伤。在睡眠剥夺动物试验中, 五味子可降低动物的丙二醛、NO, 使异常增高的超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶水平降至正常; ③五味子还具有明显的抑菌或杀菌作用。体外实验显示, 五味子水提取物对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、绿脓杆菌、贺氏菌、炭疽杆菌和蜡样芽胞杆菌有抑菌和杀菌作用; ④五味子作为传统中药护肝片的主要成分, 具有增加肝细胞内蛋白质合成和促进肝细胞修复的作用, 对于防治肝损害, 退黄调脂等方面具有确切疗效; ⑤五味子的生物利用度较高, 尤其适用于肝损伤。大鼠的五味子提取物的动力学结果显示, 正常大鼠灌胃后15 min, 4种木脂素的血药浓度明显增高, 6-8 h可达峰值。急性肝损伤大鼠给予同剂量的五味子提取物, 较正常大鼠, 4种成分的血药浓度明显增高, 达峰浓度明显增高, 提示五味子提取物在肝损伤大鼠的吸收增加, 代谢减慢, 可能与五味子降低肝脏CYP450同工酶活性有关。这一点可能解释短期内五味子提取物可明显提高肝移植犬的存活率的原因。当前实验中肝移植后1 d所有指标组内均无显著意义, 临床肝移植后发生超急性排斥时间为肝移植后两三天, 而肝功能敏感指标谷丙转氨酶及谷草转氨酶的半衰期约为47 h, 上述或可为2组术后3 d检出2组的相关指标差异提供参考。

综上所述, 五味子提取物可明显改善犬行肝移植后的生存状况, 肝功能和供体肝存活, 可能机制在于改善Th17细胞和Treg细胞失衡。但作为提取物, 作用靶点可能是多方面的, 而且当前实验纳入的犬例数较少, 大样本及深入的研究有待进行。

致谢: 感谢内蒙古大学实验动物研究中心在实验实施中提供的帮助。

作者贡献: 刘立业和赵德芳参与课题设计; 刘立业, 高飞, 张彤和董勤实施实验, 赵德芳, 张彤和董勤对实验方法及结果予以评估。

经费支持: 该文章接受了“内蒙古自治区自然科学基金项目(2017MS0824)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章中的干预手段应用了五味子, 但是所有作者声明没有接受相关的经费支持, 不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经内蒙古医科大学动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在戊巴比妥钠麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

知情同意问题: 参与实验的患病个体及其家属为自愿参加, 所有供者、受者均对试验过程完全知情同意, 在充分了解本治疗方案的前提下签署了“知情同意书”。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合本刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 本文统计学方法已经内蒙古医科大学生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] 李宜轩, 陈建光, 李凤, 等. 北五味子提取物对实验性肝纤维化大鼠肝损伤的保护作用[J]. 吉林大学学报(医学版), 2014, 40(2): 285-288.
- [2] 俞青. 北五味子不同提取物对小鼠脂质代谢的影响初探[D]. 北京中医药大学, 2013.
- [3] 刘宇灵, 付赛, 樊丽娟, 等. 南北五味子化学成分、药理作用等方面差异的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(12): 228-234.
- [4] 蒋艳. 华中五味子化学成分及生物活性的研究[D]. 中南民族大学, 2011.
- [5] 陈礼治, 张义, 焦正, 等. 五味子提取物制剂对他克莫司药动学的影响[J]. 世界临床药物, 2017, 38(5): 358-363.
- [6] 李丹. 护肝片对比格犬体内他克莫司药动学的影响及其四种有效成分同时测定[D]. 河北医科大学, 2017.
- [7] 王玮, 朱声辉, 郭闻渊, 等. LC-MS/MS测定肝移植患者体内他克莫司和五酯胶囊主要成分的方法学建立及应用[J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(7): 854-859.
- [8] 李冰. 五味子制剂对他克莫司血药浓度的影响及对肝损伤防护作用的研究[D]. 福建医科大学, 2013.
- [9] 赵德芳, 陈立坤. 单纯冷藏与低温机械灌注保存肝移植前后炎症因子和凋亡因子的变化[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(33): 5322-5326.
- [10] 王洋, 李心鑫, 曹经琳, 等. Th17细胞水平对乙型肝炎肝硬化原位肝移植术后并发症预测意义的研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2015, 23(8): 616-621.
- [11] Gao Y, Zhang M, Li J, et al. Circulating FoxP3+ regulatory t and interleukin17-producing Th17 cells actively influence HBV clearance in de novo hepatitis B virus infected patients after orthotopic liver transplantation. PLoS One. 2015 ;10(9):e0137881.
- [12] Zhou Y, Yang X, Zhang H, et al. The roles of T helper type 17/regulatory T cells in acute rejection after liver transplantation in rats. Transplantation. 2015 ;99(6):1126-1131.
- [13] 陈倩, 吴育晶, 程能能, 等. 五味子提取物对大鼠肝 CYP3A 酶的双重作用[J]. 药理学, 2010, 45 (9): 1194-1198.
- [14] Wang Y, Zhang M, Liu ZW, et al. The ratio of circulating regulatory T cells (Tregs)/Th17 cells is associated with acute allograft rejection in liver transplantation. PLoS One. 2014;9(11): e112135.
- [15] Xu L, Gong Y, Wang B, et al. Randomized trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cells transplantation for hepatitis B virus cirrhosis: regulation of Treg/Th17 cells. J Gastroenterol Hepatol. 2014; 29(8):1620-1628.
- [16] Giles DA, Moreno-Fernandez ME, Divanovic S. IL-17 axis driven inflammation in non-alcoholic fatty liver disease progression. Curr Drug Targets. 2015;16(12):1315-1323.
- [17] 蒋艳. 华中五味子化学成分及生物活性的研究[D]. 中南民族大学, 2011.
- [18] 秦小清. 五味子甲素逆转肿瘤多药耐药的效应及其机制研究[D]. 中国人民解放军军事医学科学院, 2011.
- [19] Li X, Sun J, Fan X, et al. Schisandrol B promotes liver regeneration after partial hepatectomy in mice. Eur J Pharmacol. 2018; 818 : 96-102.
- [20] 佟彤. 四种中药多糖及两种中药油脂的免疫调节作用[D]. 北京协和医学院, 2016.
- [21] Jin CY, Wang DL, Fang ZD. Effect of integrative Chinese and Western medicine in treating chronic urticaria and its impact on interleukin-10 and interleukin-8 in peripheral blood. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 2008; 28(4):358-360.
- [22] Jiang W, Wang X, Xu X, et al. Effect of Schisandra sphenanthera extract on the concentration of tacrolimus in the blood of liver transplant patients. Int J Clin Pharmacol Ther. 2010;48 (3): 224-229.
- [23] 王宝莲. 中药五味子成分的药代动力学及代谢研究[D]. 中国协和医科大学, 2009.
- [24] 张晓君, 王正昕, 郭闻渊, 等. 五酯胶囊在肝移植术后的临床应用[J]. 肝胆外科杂志, 2010, 8(02):100-102.
- [25] 裴彬. 五味子甲素对大鼠肝细胞色素P450 3A的抑制作用[D]. 第二军医大学, 2006.
- [26] 裴彬, 蔡雄, 缪晓辉, 等. 五味子甲素对大鼠肝细胞色素P4503A影响的研究[J]. 肝脏, 2006, 7 (04):261-263.
- [27] Li X, Fan X, Li D, et al. Schisandra sphenanthera extract facilitates liver regeneration after partial hepatectomy in mice. Drug Metab Dispos. 2016;44 (5): 647-652.
- [28] Chen Z, Guo M, Song G, et al. Schisandrin B inhibits Th1/Th17 differentiation and promotes regulatory T cell expansion in mouse lymphocytes .2016,35(6):257-264.