

白藜芦醇对刀豆素 A 诱导小鼠自身免疫性肝炎的保护作用*

孙 菁, 王世卉
(中国医科大学附属第一医院, 辽宁 沈阳 110001)

[摘 要] 目的: 探究白藜芦醇(Res)对刀豆素 A(ConA)诱导小鼠自身免疫性肝炎(AIH)的保护作用及机制。方法: C57BL/6 小鼠随机均分为对照组、AIH 组、AIH + 低剂量 Res 组和 AIH + 高剂量 Res 组, AIH + 低剂量 Res 组和 AIH + 高剂量 Res 组小鼠每天分别以 5 mg/(kg · d) 及 20 mg/(kg · d) Res 灌胃, 持续 5 d; 对照组小鼠以相同体积生理盐水灌胃, AIH 组小鼠不灌胃; 灌胃 3 d 后, AIH 组、AIH + Res 低剂量组及 AIH + Res 高剂量组经尾静脉单次注射 Con A 20 mg/kg 建立 AIH 模型; 建模 48 h 时处死各组小鼠, 收集肝脏组织, Real-time PCR 检测 *Foxp3*、*RORγt*、*Bax*、*Bcl-2*、*Caspase-3* 及 *Caspase-9* mRNA 相对表达水平, Western blot 检测 *Foxp3*、*RORγt*、*Bax*、*Bcl-2*、Cleaved *Caspase-3* 及 Cleaved *Caspase-9* 蛋白相对表达水平, 肝组织 HE 染色观察肝脏组织学变化、TUNEL 染色观察肝细胞凋亡情况; 同时收集外周血, 检测血清中 AST、ALT/GPT、IL-6、IL-10 与 IL-17A 水平。结果: 与对照组小鼠相比, AIH 组小鼠血清 AST、ALT/GPT、IL-6、IL-17A 水平, 肝组织中肝细胞凋亡水平、*Bax*、*Caspase-3*、*Caspase-9*、*RORγt* mRNA 表达水平、*Bax*、Cleaved *Caspase-3*、Cleaved *Caspase-9*、*RORγt* 蛋白显著上升, 血清 IL-10, 肝脏组织 *Bcl-2*、*Foxp3* mRNA 和蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.05$), HE 染色结果显示肝脏组织损伤程度与淋巴细胞浸润程度显著增加; 与 AIH 组小鼠相比, AIH + 高剂量 Res 组小鼠血清 AST、ALT/GPT、IL-6、IL-17A, 肝组织中肝细胞凋亡水平、*Bax*、*Caspase-3*、*Caspase-9*、*RORγt* mRNA 表达水平、*Bax*、Cleaved *Caspase-3*、Cleaved *Caspase-9*、*RORγt* 蛋白显著下降, 血清 IL-10、肝脏组织 *Bcl-2*、*Foxp3* mRNA 和蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), HE 染色结果显示肝脏组织损伤程度与淋巴细胞浸润程度显著减轻; AIH + 低剂量 Res 组小鼠上述指标介于 AIH 组及 AIH + Res 高剂量组之间。结论: Res 可能通过减少血清炎症因子的表达, 抑制 ConA 诱导的 AIH 小鼠肝脏细胞的凋亡, 而这种保护作用随 Res 剂量的增加而增强。

[关键词] 白藜芦醇; 刀豆素 A; 自身免疫性肝炎; 炎症因子; 凋亡
[中图分类号] R593.2; R965 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2018)07-0768-07
DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.07.006

Protective Effects of Resveratrol on Concanavalin-A-induced Autoimmune Hepatitis in Mice

SUN Jing, WANG Shihui
(The First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China)

[Abstract] Objective: To explore the protective effects and mechanisms of resveratrol on concanavalin-A induced mouse autoimmune hepatitis. Methods: C57BL/6 mice were randomly divided into 4 groups: the control group, AIH group, AIH + Res low dose group and AIH + Res high dose group. AIH + Res low dose group and AIH + Res high dose group were given intragastric administration of resveratrol at a dose of 5 mg/kg/d and 20 mg/kg/d daily respectively for 5 days. The control group were given intragastric administration with the same volume of saline daily for 5 days. The AIH group were not given intragastric administration. AIH group, AIH + Res low dose group and AIH + Res high dose

*[基金项目] 吴阶平医学基金会肝病医学部肝硬化门脉高压并发症科研项目(02016004)
网络出版时间:2018-07-18 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20180718.1502.014.html>

group received single injection with concanavalin-A at a dose of 20 mg/kg into the tail vein to establish the AIH model three days after intragastric administration. Each group was killed 48 hours after the establishment of AIH models to collect liver tissues and peripheral blood. Partial liver tissues were fixed in 4% paraformaldehyde for HE staining and TUNLE detection and partial livers were frozen in liquid nitrogen at - 80 ℃ for Real-time PCR detection and Western blot detection. Peripheral blood remained at room temperature for 2 h, centrifuged at 3 000 rpm/min for 15 min. Then serum was collected at -20 ℃ for AST, ALT/GPT and Elisa detection. **Results:** Compared with the control group, the serum levels of AST, ALT/GPT, IL-6 and IL-17A, apoptosis of liver tissue, mRNA expression levels of *Bax*, *Caspase-3*, *Caspase-9* and *RORγt* in liver tissues, protein expression levels of Bax, Cleaved Caspase-3, Cleaved Caspase-9 and RORγt in liver tissues in AIH group increased significantly. The serum level of IL-10, mRNA and protein expression levels of Bcl-2 and Foxp3 in liver tissues of AIH group significantly decreased, and their hematoxylin-eosin staining showed that the liver tissues were damaged and lymphocyte infiltration were significantly enhanced. Compared with AIH group, the apoptosis of liver tissues, mRNA expression levels of *Bax* and *RORγt* in liver tissues, protein expression level of Cleaved Caspase-3 of AIH + Res low dose group significantly decreased, and their protein expression level of Bcl-2 increased significantly, while the HE staining showed that the degree of hepatic tissue damage and lymphocyte infiltration in liver tissue were alleviated to a certain degree. Compared with AIH group, the serum levels of AST, ALT/GPT, IL-6 and IL-17A, apoptosis of liver tissue, mRNA expression levels of *Bax*, *Caspase-3*, *Caspase-9* and *RORγt* in liver tissues, protein expression levels of Bax, Cleaved Caspase-3, Cleaved Caspase-9 and RORγt in liver tissues of AIH + Res high dose group significantly decreased, and their serum level of IL-10, mRNA and protein expression levels of Bcl-2 and Foxp3 in liver tissues increased significantly, while hematoxylin-eosin staining showed that liver tissue damage and lymphocyte infiltration significantly reduced. Compared with the AIH + Res low dose group, the serum levels of AST, ALT/GPT, IL-6 and IL-17A, apoptosis of liver tissues, mRNA expression level of *Caspase-9*, protein expression level of Bax, Cleaved Caspase-3, Cleaved Caspase-9 and RORγt in liver tissues of AIH + Res high dose group significantly decreased, and their protein expression level of Foxp3, mRNA and protein expression level of Bcl-2 increased significantly, while HE staining showed that the extent of liver tissue injury and lymphocyte infiltration were significantly reduced. **Conclusion:** Resveratrol promotes the expression of blood inflammatory factors, inhibits the apoptosis of liver tissues, inhibits the differentiation of Treg cells, promotes the differentiation of Th17 cells, protects the liver tissues of conA-induced AIH mice. The protective effect of resveratrol on conA-induced AIH mice increases with increasing dose.

[**Key words**] resveratrol; concanavalin-A; autoimmune hepatitis; inflammatory factors; apoptosis

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH) 是由于机体的免疫系统攻击自身的肝组织所造成的以肝脏病理损害和肝功能异常为主要表现的肝病^[1],资料显示,AIH 与 T 淋巴细胞的增殖活化密切相关。文献报道,免疫异常,特别是调节性 T 细胞(Treg)与辅助性 T 细胞亚群 Th17 细胞之间平衡失调在 AIH 的发生发展中发挥着重要的作用^[2]。关于 AIH 的发病机制迄今未完全阐明,目前尚无特效治疗药物,以糖皮质激素和其他免疫抑制剂为 AIH 的主要治疗手段,仍存在预后不良、容易复发

等诸多问题^[3]。因此阐明 AIH 的发病机制,开发有效药物刻不容缓。白藜芦醇(Resveratrol, Res) 又名芪三酚,是植物在不利条件下产生的“植物补体”,存在于多种植物中^[4]。资料显示,Res 具有抗肿瘤、抗衰老、抗炎,保护神经系统、保护肝脏,调节雌激素及骨代谢等多种药理学作用^[5-7]。Res 是否可以通过 T 细胞相关转录因子信号保护刀豆素 A(concanavalin A, ConA) 诱导的小鼠自身免疫性肝炎鲜有报道。本研究通过观察肝脏组织病理学、细胞凋亡情况及 T 细胞相关转录因子信号、炎性

因子、血清转氨酶活性等指标的检测,观察 Res 对 ConA 诱导小鼠自身免疫性肝炎的保护作用,并分析相关作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

白藜芦醇购自上海阿拉丁生化科技有限公司,Concanavalin A 购自美国 Sigma-Aldrich 公司,Foxp3 一抗、ROR γ t 一抗、Bax 一抗、Bcl-2 一抗、cleaved caspase-3 一抗、cleaved caspase-9 一抗、 β -actin 一抗、tunel 检测试剂盒、谷草转氨酶(AST)检测试剂盒及谷丙转氨酶(ALT/GPT)检测试剂盒均购自沈阳万类生物科技有限公司,小鼠白介素 6(IL-6)、白介素 10(IL-10)及白介素 17A(IL-17A)ELISA 检测试剂盒购自杭州联科生物技术有限公司,TRI-pure、Super M-MLV 反转录酶、RNase inhibitor 及 2 \times Power Taq PCR MasterMix 均购自北京百泰克生物技术有限公司,SYBR Green 购自北京索莱宝科技有限公司,引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 实验动物

8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠购自辽宁长生生物技术有限公司,动物许可证号 SCXK(辽)2015-0001,体质量 20 ~ 25 g。饲养环境:12 h 光照、12 h 黑暗,(22 \pm 1) $^{\circ}$ C,湿度为 45% ~ 55%,自由摄食。按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。C57BL/6 小鼠于实验前适应性喂养 1 周,此期间内无精神不正常现象,无摄食不正常现象,无其它疾病发生。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠 AIH 模型建立与分组 将 C57BL/6 小鼠随机平均分为 4 组,分别为对照组、AIH 组、AIH + 低剂量 Res 组和 AIH + 高剂量 Res 组,每组 10 只。AIH + 低剂量 Res 组和 AIH + 高剂量 Res 组小鼠每天分别以 5 mg/(kg \cdot d)及 20 mg/(kg \cdot d)Res 进行灌胃,持续灌胃 5 d;对照组小鼠每天以等体积生理盐水进行灌胃,持续灌胃 5 天;AIH 组小鼠不进行灌胃处理。AIH 组、AIH + 低剂量 Res 组和 AIH + 高剂量 Res 组小鼠于灌胃处理 3 d 后,经尾静脉单次注射 20 mg/kg Con A 建立 AIH 模型,对照组小鼠不进行模型建立。各建模组小鼠于模型建立 48 h 处死,收集肝脏组织和外周血。部分肝组织于 4% 中性多聚甲醛固定、用于 HE 染色

与 TUNLE 检测,部分肝脏于液氮速冻后保存于 -80 $^{\circ}$ C、用于 Real-time PCR 检测与 Western blot 检测;外周血于室温条件下静置 2 h,3 000 r/min 离心 15 min,收集血清保存于 -20 $^{\circ}$ C,用于 AST、ALT/GPT 检测与 ELISA 实验。

1.3.2 Real-time PCR 检测 提取肝脏组织总 RNA,将其反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板,利用叉头状/翼状螺旋转录因子 3(transcription factor forkhead box protein 3, *Foxp3*)、维甲酸相关孤儿核受体 γ t(retinoic acid receptor-related orphan receptor γ t, *ROR γ t*)、B 淋巴细胞瘤 2 相关 X 蛋白(B-cell lymphoma-2 associated X Protein, *bax*)、B 淋巴细胞瘤 2(B-cell lymphoma-2, *bcl-2*)、含半胱氨酸的天冬氨酸水解酶 3(cysteiny l aspartate specific proteinase 3, *Caspase-3*)、含半胱氨酸的天冬氨酸水解酶 9(cysteiny l aspartate specific proteinase 9, *Caspase-9*) 特异性引物和染料分子 SYBR Green 进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 反应 5 min 灭活酶,94 $^{\circ}$ C 变性 10 s,60 $^{\circ}$ C 退火延伸 30 s,40 个循环,循环结束后进行熔解曲线分析,利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析所得 PCR 结果。PCR 引物序列见表 1。

表 1 Real-time PCR 引物序列
Tab.1 Primer sequence of Real-time PCR

引物	方向	寡核苷酸序列
<i>Foxp3</i>	正向	5'-AGATGTACCCACGTCTCACTT-3'
	反向	5'-CTCTCTTTTCATTTGGTATCCGC-3'
<i>RORγt</i>	正向	5'-AGCAGGAGCAATGGAAGTCG-3'
	反向	5'-TGAGAACCAAGGCGCTGTAG-3'
<i>Bax</i>	正向	5'-CCAGGATGCGTCCACCAAGAA-3'
	反向	5'-AGCAAAGTAGAAGAGGGCAACCAC-3'
<i>Bcl-2</i>	正向	5'-CTCTCGTCGCTACCGTCGTGACTTC-3'
	反向	5'-CACATGACCCACCGAACTCAAAGA-3'
<i>Caspase-3</i>	正向	5'-TCTGACTGGAAAGCCGAAAC-3'
	反向	5'-GACTGGATGAACCACGACCC-3'
<i>Caspase-9</i>	正向	5'-ACGACCTGACTGCCAAGAAA-3'
	反向	5'-AGCCGCTCCCGTTGAAGATA-3'
β -actin	正向	5'-CTGTGCCCATCTACGAGGGCTAT-3'
	反向	5'-TTTGATGTCACGCACGATTTC-3'

1.3.3 Western blot 检测 提取肝脏组织总蛋白,BCA 法定量蛋白,采用 11% 和 15% 分离胶、5% 浓缩胶进行电泳,湿法转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭,Foxp3、ROR γ t、Bax、Bcl-2、Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9 及 β -actin 的一抗分别按 1:500、1:1 000、1:500、1:500、1:500、1:500 及 1:1 000 的比例稀释,一抗孵育,4 $^{\circ}$ C 过夜,TBST 洗涤后用辣

根过氧化物 (HRP) 标记的二抗 (1:5 000) 于 37 ℃ 孵育 45 min, ECL 法检测。用凝胶图象处理系统 (Gel-Pro-Analyzer 软件) 分析目标条带的光密度值。

1.3.4 血清指标检测 取小鼠外周血, 于室温条件下静置 2 h, 3 000 r/min 离心 15 min, 收集血清, 按试剂盒说明测定血清中 AST、ALT (GPT)、IL-6、IL-10 及 IL-17A 水平。

1.3.5 肝脏组织 HE 染色 取小鼠肝脏组织经 4% 中性多聚甲醛固定, 酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片厚 5 μm, 进行 HE 染色, 酒精梯度脱水及二甲苯透明后显微镜下进行观察。

1.3.6 肝脏组织 TUNEL 检测 取小鼠肝脏组织经 4% 中性多聚甲醛固定, 酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片厚 5 μm 经 3% H₂O₂ 处理, TUNEL 反应液于 37 ℃ 避光孵育 60 min, PBS 洗涤后使用 Convert-POD 于 37 ℃ 避光孵育 30 min, PBS 再次洗涤, 于 DAB 显色、苏木素复染、酒精梯度脱水及二甲苯透明后显微镜下进行观察。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 21.0 统计软件进行实验数据的统计与分析, 实验数据来自 3 次独立平行实验, 以均

数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析对实验数据进行统计与分析, 并通过 Bonforroni 法进行校正。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Foxp3、RORγt、Bax、Bcl-2、Caspase-3 及 Caspase-9 mRNA 表达

与对照组小鼠相比, AIH 组小鼠肝脏组织 Foxp3 及 Bcl-2 mRNA 的相对表达量显著下降, RORγt、Bax、Caspase-3 及 Caspase-9 mRNA 的相对表达量显著上升 (P < 0.05)。与 AIH 组小鼠相比, AIH + 高剂量 Res 组小鼠肝脏组织 Foxp3 与 Bcl-2 mRNA 的相对表达量显著升高, RORγt、Bax、Caspase-3 及 Caspase-9 mRNA 的相对表达量显著降低 (P < 0.05); AIH + 低剂量 Res 组小鼠肝脏组织 RORγt 及 Bax mRNA 的相对表达量显著降低 (P < 0.05)。与 AIH + 低剂量 Res 组小鼠相比, AIH + 高剂量 Res 组小鼠肝脏组织 Bcl-2 mRNA 的相对表达量显著升高; Caspase-9 mRNA 的相对表达量显著降低 (P < 0.05)。见表 2。

表 2 4 组小鼠肝脏组织 Foxp3、RORγt、Bax、Bcl-2、Caspase-3 及 Caspase-9 mRNA 的相对表达
Tab.2 Relative mRNA level of Foxp3, RORγt, Bax, Bcl-2, Caspase-3, Caspase-9 in liver tissue

组别	肝组织 mRNA					
	Foxp3	RORγt	Bax	Bcl-2	Caspase-3	Caspase-9
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
AIH 组	0.40 ± 0.10 ⁽¹⁾	4.05 ± 1.12 ⁽¹⁾	2.99 ± 0.73 ⁽¹⁾	0.32 ± 0.07 ⁽¹⁾	3.97 ± 0.90 ⁽¹⁾	4.86 ± 1.23 ⁽¹⁾
AIH + 低剂量 Res 组	0.60 ± 0.17	2.04 ± 0.59 ⁽³⁾	2.09 ± 0.57 ⁽²⁾	0.49 ± 0.11	3.06 ± 0.83	4.10 ± 0.91
AIH + 高剂量 Res 组	0.81 ± 0.22 ⁽³⁾	1.48 ± 0.34 ⁽³⁾	1.53 ± 0.39 ⁽³⁾	0.89 ± 0.25 ⁽³⁾⁽⁵⁾	1.96 ± 0.57 ⁽³⁾	2.58 ± 0.60 ⁽³⁾⁽⁴⁾

⁽¹⁾ 与对照组相比, P < 0.01; 与 AIH 组相比, ⁽²⁾ P < 0.05, ⁽³⁾ P < 0.01; 与 AIH + 低剂量 Res 组相比, ⁽⁴⁾ P < 0.05, ⁽⁵⁾ P < 0.01

2.2 Foxp3、RORγt、Bax、Bcl-2、Cleaved Caspase-3 及 Cleaved Caspase-9 蛋白表达

与对照组小鼠相比, AIH 组小鼠肝脏组织 Foxp3 及 Bcl-2 蛋白的相对表达量显著下降, RORγt、Bax、Cleaved Caspase-3 及 Cleaved Caspase-9 蛋白的相对表达量显著上升 (P < 0.05)。与 AIH 组小鼠相比, AIH + 高剂量 Res 组小鼠肝脏组织 Foxp3 与 Bcl-2 蛋白的相对表达量显著升高, RORγt、Bax、Cleaved Caspase-3 及 Cleaved Caspase-9 蛋白的相对表达量显著降低 (P < 0.05); AIH + 低剂量 Res 组小鼠肝脏组织 Bcl-2 与 Bax 蛋白的相

对表达量显著降低 (P < 0.05)。与 AIH + 低剂量 Res 组小鼠相比, AIH + Res 高剂量组小鼠肝脏组织 Foxp3 及 Bcl-2 蛋白的相对表达量显著升高, RORγt、Bax、Cleaved Caspase-3 及 Cleaved Caspase-9 蛋白的相对表达量显著降低 (P < 0.05)。见表 3。

2.3 血清 AST、ALT/GPT、IL-6、IL-10 及 IL-17A

与对照组小鼠相比, AIH 组小鼠血清 AST、ALT/GPT、IL-6、IL-17A 显著增高, IL-10 含量显著下降 (P < 0.05)。与 AIH 组小鼠相比, AIH + 高剂量 Res 组小鼠血清 AST、ALT/GPT、IL-6、IL-17A 显著降低 (P < 0.05), IL-10 含量显著升高 (P <

0.05); AIH + 低剂量 Res 组小鼠血清各项指标均无明显变化。与 AIH + 低剂量 Res 组小鼠相比, AIH + 高剂量 Res 组小鼠血清 AST、ALT/GPT、IL-6、IL-17A 显著降低($P < 0.05$)。见表 4。

表 3 4 组小鼠肝脏组织中 Foxp3、ROR γ t、Bax、Bcl-2、Cleaved Caspase-3 及 Cleaved Caspase-9 蛋白的相对表达量
Tab.3 Relative protein level of Foxp3, ROR γ t, Bax, Bcl-2, Cleaved Caspase-3, Cleaved Caspase-9 in liver tissue

组别	肝脏组织蛋白					
	Foxp3	ROR γ t	Bax	Bcl-2	Cleaved Caspase-3	Cleaved Caspase-9
对照组	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
AIH 组	0.38 \pm 0.07 ⁽¹⁾	4.37 \pm 0.87 ⁽¹⁾	3.92 \pm 0.78 ⁽¹⁾	0.26 \pm 0.05 ⁽¹⁾	4.10 \pm 0.81 ⁽¹⁾	4.83 \pm 0.98 ⁽¹⁾
AIH + 低剂量 Res 组	0.53 \pm 0.11	3.59 \pm 0.72	3.21 \pm 0.71	0.50 \pm 0.11 ⁽³⁾	3.05 \pm 0.72 ⁽²⁾	3.82 \pm 0.82
AIH + 高剂量 Res 组	0.73 \pm 0.15 ⁽³⁾⁽⁴⁾	1.73 \pm 0.37 ⁽³⁾⁽⁵⁾	2.21 \pm 0.47 ⁽³⁾⁽⁴⁾	0.83 \pm 0.17 ⁽³⁾⁽⁵⁾	2.00 \pm 0.44 ⁽³⁾⁽⁴⁾	2.34 \pm 0.51 ⁽³⁾⁽⁵⁾

⁽¹⁾ 与对照组相比, $P < 0.01$; 与 AIH 组相比, ⁽²⁾ $P < 0.05$, ⁽³⁾ $P < 0.01$; 与 AIH + 低剂量 Res 组相比, ⁽⁴⁾ $P < 0.05$, ⁽⁵⁾ $P < 0.01$

表 4 4 组小鼠血清 AST、ALT、IL-6、IL-10 及 IL-17A 水平
Tab.4 Level of AST, ALT, IL-6, IL-10 and IL-17A in serum

组别	肝脏组织				
	AST(U/L)	ALT(U/L)	IL-6(ng/L)	IL-10(ng/L)	IL-17A(ng/L)
对照组	21.98 \pm 4.65	19.23 \pm 3.95	10.56 \pm 2.19	200.41 \pm 43.14	33.53 \pm 7.00
AIH 组	62.61 \pm 15.08 ⁽¹⁾	73.94 \pm 15.46 ⁽¹⁾	44.22 \pm 9.03 ⁽¹⁾	66.39 \pm 14.19 ⁽¹⁾	140.24 \pm 31.04 ⁽¹⁾
AIH + 低剂量 Res 组	52.09 \pm 11.32	60.71 \pm 15.00	34.23 \pm 7.72	106.31 \pm 26.65	107.46 \pm 22.13
AIH + 高剂量 Res 组	33.40 \pm 6.82 ⁽²⁾⁽³⁾	38.56 \pm 8.15 ⁽²⁾⁽³⁾	19.21 \pm 4.30 ⁽²⁾⁽⁴⁾	130.83 \pm 27.84 ⁽²⁾	71.59 \pm 14.30 ⁽²⁾⁽³⁾

与对照组相比, $P < 0.01$; 与 AIH 组相比, ⁽²⁾ $P < 0.01$; 与 AIH + 低剂量 Res 组相比, ⁽³⁾ $P < 0.05$, ⁽⁴⁾ $P < 0.01$

2.4 肝脏组织 HE 染色

对照组小鼠肝脏组织切片肝细胞 HE 染色未见异常,肝小叶结构正常,肝索排列整齐;AIH 组小鼠肝脏组织切片可见大量炎症细胞浸润,包绕血管呈现袖套状改变,有炎症出血坏死;与 AIH 组相比,AIH + 低剂量 Res 组及 AIH + 高剂量 Res 组小鼠肝脏组织切片肝细胞坏死程度明显减轻,炎症细胞浸润明显减少,炎症有明显的改善;AIH + 高剂量 Res 组与 AIH + 低剂量 Res 组相比,肝细胞坏死程度与炎症细胞浸润程度均具有一定程度的减少。见图 1。

2.5 肝脏组织 TUNEL 检测

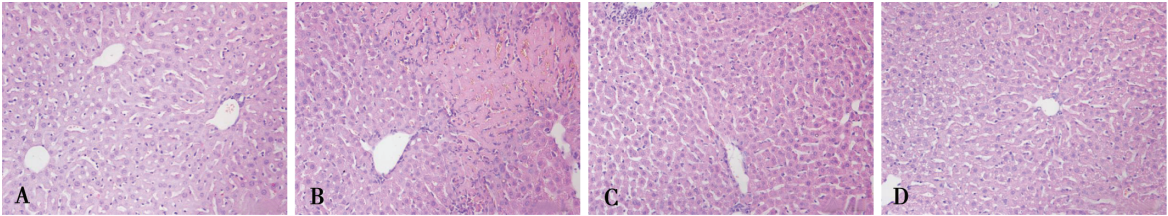
TUNEL 阳性染色定位于细胞核,凋亡细胞细胞核呈棕褐色,较小的棕褐色圆形小体为凋亡小体。对照组小鼠肝脏组织切片中未见到 TUNEL 阳性染色的肝细胞,AIH 组小鼠肝脏组织切片中可见大量的 TUNEL 染色阳性肝细胞;AIH + 低剂量 Res 组、AIH + 高剂量 Res 组与 AIH 组相比,TUNEL 阳性染色的肝细胞数量明显减少;AIH + Res 高剂量

组与 AIH + Res 低剂量组相比,TUNEL 阳性染色的肝细胞数量明显减少。见图 2。

3 讨论

AIH 是由自身免疫反应介导的慢性进行性肝脏炎症性疾病,其临床特征为不同程度的血清转氨酶升高、高 γ -球蛋白血症、自身抗体阳性,组织学特征为以淋巴细胞、浆细胞浸润为主的肝炎,严重病例可快速进展为肝硬化和肝衰竭^[8-9]。然而,由于 AIH 发病机制复杂,迄今为止仍无有效的治疗手段。

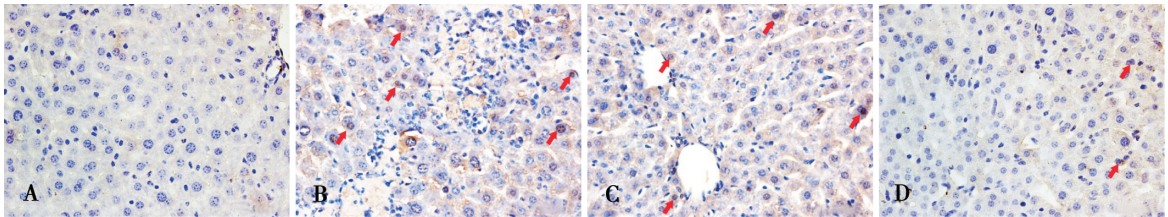
血清 ALT 与 AST 水平升高是肝脏损伤的重要标志^[10]。本研究中,AIH 小鼠血清 AST 与 ALT 含量显著上升,提示 AIH 小鼠存在肝脏损伤,当使用 Res 预处理后,AIH 小鼠血清 AST 与 ALT 含量显著下降,肝脏损伤得到显著改善,表明 Res 能够对 AIH 小鼠肝脏组织起到一定的保护作用。IL-6、IL-17A 与 IL-10 均是炎症反应密切相关的炎症因



注:A、B、C、D 分别为对照组、AIH 组、AIH + 低剂量 Res 组及 AIH + 高剂量 Res 组

图 1 4 组小鼠肝脏组织学观察(HE, ×200)

Fig. 1 Hematoxylin and eosin stain of liver tissue



注:A、B、C、D 分别为对照组、AIH 组、AIH + 低剂量 Res 组及 AIH + 高剂量 Res 组

图 2 4 组小鼠肝脏组织中肝细胞凋亡(TUNEL, ×400)

Fig. 2 Apoptosis of liver cell in liver tissue

子,其中,IL-6 与 IL-17A 为促炎性因子,IL-10 为抗炎性因子。本研究结果显示,与对照组小鼠相比,AIH 小鼠血清 IL-6、IL-17A 含量显著上升,IL-10 含量显著下降,表明 AIH 小鼠体内存在炎症反应,而经过 Res 预处理后,AIH 小鼠血清促炎性因子 IL-6 与 IL-17A 含量显著降低,抗炎性因子 IL-10 含量显著上升,表明 Res 能够抑制 AIH 造成的炎症反应。HE 染色结果同样显示,AIH 小鼠肝脏组织可见大量炎症细胞的浸润,而经 Res 预处理后,AIH 小鼠炎症细胞明显减少,炎症得到明显的改善,这与现有文献报道结果相一致^[11-12]。

Th17/Treg 细胞失衡与炎症性疾病的发生与发展密切相关,其中 Foxp3 被认为是 Treg 细胞的关键转录因子和特异性标志物,ROR γ t 是对 Th17 细胞分化起关键作用的转录激活因子,且 ROR γ t 的表达与 Th17 细胞分化成正相关,Th17 细胞能够通过分泌促炎性因子发挥其促炎症作用,在促炎症细胞因子存在的环境中,Foxp3 水平下降而 ROR γ t 表达水平升高,促进 Th17 细胞分化,导致 Th17/Treg 细胞失衡^[13]。研究表明,在健康人群血清中,Foxp3/ROR γ t 比例接近于 1,而 AIH 患者血清中 Foxp3/ROR γ t 比例显著下降,表明 Th17/Treg 细胞失衡可能与 AIH 的发生与发展密切相关^[13]。本研究显示,与正常小鼠相比,AIH 小鼠肝脏组织 Foxp3 mRNA 及蛋白的相对表达量显著下降,

ROR γ t mRNA 及蛋白的相对表达量显著上升,Foxp3/ROR γ t 比例显著下降,经过 Res 预处理后,AIH 小鼠肝脏组织 Foxp3 mRNA 及蛋白的相对表达量显著上升,ROR γ t mRNA 及蛋白的相对表达量显著下降,Foxp3/ROR γ t 比例接近 1,表明 Res 能够通过对 Th17/Treg 细胞的调节,抑制炎症反应的发生与发展,对 AIH 小鼠肝脏组织起到保护作用。

研究表明,肝脏组织出现坏死和凋亡现象是刀豆素 A(concanavalin-A, ConA) 诱导的肝损伤模型的主要特征之一^[12]。Bax、Cleaved Caspase-3、Caspase-3、Cleaved Caspase-9、Caspase-9、Bcl-2 均是与凋亡密切相关的因子,其中,Bax、Cleaved Caspase-3、Caspase-3、Cleaved Caspase-9 与 Caspase-9 属于促凋亡因子,Bcl-2 属于抗凋亡因子。本研究结果显示,与正常小鼠相比,AIH 小鼠肝脏组织 Bax、Cleaved Caspase-3、Caspase-3、Cleaved Caspase-9 与 Caspase-9 的相对表达量显著上升,Bcl-2 的相对表达量显著下降,表明 AIH 小鼠肝脏组织发生凋亡,经过 Res 预处理后,AIH 小鼠肝脏组织 Bax、Cleaved Caspase-3、Caspase-3、Cleaved Caspase-9 与 Caspase-9 的相对表达量显著下降,Bcl-2 的相对表达量显著上升,TUNEL 染色结果同样显示,AIH 小鼠肝脏组织中可见大量凋亡细胞,而经过 Res 预处理后,AIH 小鼠肝脏组织中凋亡细胞显著减少,表明 Res 能够显著改善 AIH 小鼠肝脏细胞凋亡现

象,这与 AIH 相关文献报道结果相一致^[14-16]。

综上所述,Res 能够通过调节 Th17/Treg 细胞平衡,抑制炎症反应,抑制肝脏组织凋亡,从而保护 ConA 诱导的 AIH 模型小鼠肝脏组织,且这种保护作用随 Res 剂量的增加而增强。

4 参考文献

- [1] SAHEBJAM F, VIERILING J M. Autoimmune hepatitis [J]. Front Med, 2015, 9(2):187-219.
- [2] LIBERAL R, GRANT C R, YUKSEL M, et al. Regulatory T-cell conditioning endows activated effector T cells with suppressor function in autoimmune hepatitis/autoimmune sclerosing cholangitis[J]. Hepatology, 2017, 66(5): 1570-1584.
- [3] LIBERAL R, DE BOER Y S, ANDRADE R J, et al. Expert clinical management of autoimmune hepatitis in the real world[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2017, 45(5): 723-732.
- [4] 刘顺,李赫宇,赵玲.白藜芦醇降尿酸、抗炎作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2016, 39(2): 304-307.
- [5] HUHNS S, BEYER F, ZHANG R, et al. Effects of resveratrol on memory performance, hippocampus connectivity and microstructure in older adults-A randomized controlled trial[J]. Neuroimage, 2018, 174(2): 177-190.
- [6] RAUF A, IMRAN M, BURR M S, et al. Resveratrol as an anti-cancer agent: A review[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2016, 21(1): 1-20.
- [7] ELGEBALY A, RADWAN I A, ABOELNAS M M, et al. Resveratrol supplementation in patients with non-alcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis [J]. J Gastrointest Liver Dis, 2017, 26(1): 59-67.
- [8] WANG Z, SHENG L, YANG Y, et al. The management of autoimmune hepatitis patients with decompensated cir-

rhosis:Real-world experience and a comprehensive review [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2017, 52(3): 424-435.

- [9] BRAHIM I, BRAHIM I, HAZIME R, et al. Autoimmune hepatitis: Immunological diagnosis [J]. Presse Med, 2017; 46(11): 1008-1019.
- [10] MCGILL MR. The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers[J]. EXCLI J, 2016, 15(6): 817-828.
- [11] WANG T, MEN R, HU M, et al. Protective effects of punica granatum (pomegranate) peel extract on concanavalin A-induced autoimmune hepatitis in mice[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 100: 213-220.
- [12] 夏玉敬,林春蕾,周莹群,等.白藜芦醇对小鼠 ConA 肝脏损伤的保护作用[J]. 世界临床药物, 2014, 35(5): 300-304.
- [13] MITRA S, ANAND S, DAS A, et al. A molecular marker of disease activity in autoimmune liver diseases with histopathological correlation; FoXp3/ROR γ t ratio [J]. APMIS, 2015, 123(11): 935-944.
- [14] WU L, WANG C, LI J, et al. Hepatoprotective effect of quercetin via TRAF6/JNK pathway in acute hepatitis [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 96: 1137-1146.
- [15] EI-BOGHADY N A, ABDELTAWAB N F, NOOH M M. Resveratrol and montelukast alleviate paraquat-induced hepatic injury in mice: Modulation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis[J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017: 9396425.
- [16] PEIYUAN H, ZHIPING H, CHENGJUN S, et al. Resveratrol ameliorates experimental alcoholic liver disease by modulating oxidative stress[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017: 4287890.

(2018-03-01 收稿,2018-06-21 修回)

中文编辑:周 凌;英文编辑:丁廷森