

凉血解毒化瘀方通过抑制cGAS-STING通路治疗小鼠慢加急性肝衰竭

唐巧^{1,2}, 周超¹, 柏兆方¹, 姚清^{1,2}, 陈思敏¹, 温心茹¹, 何召云¹, 张瑾¹, 李瑞生¹, 宫嫚^{1,2}

¹解放军总医院第五医学中心, 北京 100039; ²南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515

摘要:目的 基于cGAS-STING信号通路, 研究中药凉血解毒化瘀方(LXJDHYF)治疗小鼠慢加急性肝衰竭(ACLF)的可能作用机制。方法 30只C57BL/6小鼠随机分为空白组、模型组、凉血解毒化瘀方高剂量组、凉血解毒化瘀方低剂量组及cGAS-STING信号通路特异性抑制剂H151组, 6只/组。除空白组外, 其余各组采用CCl₄诱导形成肝硬化, 后予以脂多糖联合D-氨基半乳糖腹腔注射急性攻击形成ACLF小鼠模型。取小鼠肝组织进行HE以及TUNEL染色, 生化法测定血清ALT、AST及TBil水平以检测凉血解毒化瘀方对小鼠肝功能的影响。同时采用RT-qPCR测定凉血解毒化瘀方对小鼠骨髓巨噬细胞(BMDMs)β干扰素(IFN-β)、干扰素刺激基因15(ISG15)、白细胞介素6(IL-6)及肿瘤坏死因子-α(TNF-α)mRNA表达水平的影响; Western blotting分析凉血解毒化瘀方对BMDMs干扰素调节因子3(IRF3)及干扰素基因刺激因子(STING)蛋白磷酸化水平的影响; 结合RT-qPCR检测ACLF小鼠肝组织中上述mRNA表达水平, ELISA法检测ACLF小鼠血清IL-6及TNF-α水平以观察凉血解毒化瘀方对cGAS-STING信号通路的作用。结果 HE染色显示, 凉血解毒化瘀方组肝细胞坏死及炎症浸润程度与模型组相比较轻, TUNEL染色提示凉血解毒化瘀方组凋亡阳性细胞比例低于模型组($P<0.001$)。凉血解毒化瘀方组血清ALT、AST及TBil水平均低于模型组($P<0.001$)。RT-qPCR结果表明, 凉血解毒化瘀方能抑制BMDMs及小鼠肝组织IFN-β、ISG15、IL-6及TNF-α的mRNA表达($P<0.05$)。Western blotting结果显示, 随着凉血解毒化瘀方给药剂量增加, BMDMs细胞中IRF3及STING蛋白磷酸化水平降低($P<0.05$), 凉血解毒化瘀方组血清IL-6及TNF-α水平均低于模型组($P<0.05$)。结论 凉血解毒化瘀方能够改善ACLF小鼠肝功能, 降低小鼠血清促炎细胞因子水平, 其机制可能与抑制cGAS-STING通路过度激活有关。

关键词: 慢加急性肝衰竭; cGAS-STING信号通路; β干扰素; 干扰素刺激基因15; 凉血解毒化瘀方

Liangxue Jiedu Huayu Formula improves liver function of mice with acute-on-chronic liver failure by inhibiting excessive activation of the cGAS-STING signaling pathway

TANG Qiao^{1,2}, ZHOU Chao¹, BAI Zhaofang¹, YAO Qing^{1,2}, CHEN Simin¹, WEN Xinru¹, HE Zhaoyun¹, ZHANG Jin¹, LI Ruisheng¹, GONG Man^{1,2}

¹Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039, China; ²School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To explore the role of the cGAS-STING signaling pathway in the therapeutic mechanism of *Liangxue Jiedu Huayu* Formula (LXJDHYF) for acute-on-chronic liver failure (ACLF) in mice. **Methods** Thirty C57BL/6 mice were randomly divided into blank control group, model group, low- and high-dose LXJDHYF groups, and H151 (a specific cGAS-STING pathway inhibitor) group ($n=6$). In all but the control group, the mice were treated with CCl₄ to induce liver cirrhosis followed by intraperitoneal injections of lipopolysaccharide and D-amino galactose to establish mouse models of ACLF. After the treatments, the mouse livers were collected for HE and TUNEL staining, and serum levels of ALT, AST and TBil were determined. In bone marrow-derived macrophages (BMDMs) and liver tissues of ACLF mice, the expressions of cGAS-STING signaling pathway-related mRNAs including IFN-β, ISG15, IL-6 and TNF-α were determined with RT-qPCR, and the phosphorylation levels of IRF3 and STING proteins were investigated using Western blotting. **Results** Compared with the mice in the model group, the LXJDHYF-treated mice exhibited milder hepatocyte necrosis and inflammatory cell infiltration in the liver with significantly reduced hepatocyte apoptosis. LXJDHYF treatment also significantly lowered serum levels of ALT, AST, TBil, IL-6 and TNF-α in ACLF mice and effectively suppressed the expressions of cGAS-STING signaling pathway-related mRNA in both the BMDMs and the liver tissues and the phosphorylation of IRF3 and STING proteins in the BMDMs. **Conclusion** LXJDHYF can significantly improve liver function and attenuate inflammation in ACLF mice possibly by inhibiting excessive activation of the cGAS-STING signaling pathway.

Keywords: acute-on-chronic liver failure; cGAS-STING signaling pathway; interferon-β; interferon stimulating gene 15; *Liangxue Jiedu Huayu* Formula

收稿日期: 2024-06-24

基金项目: 十三五国家科技重大专项课题(2018ZX10725-506-002);

国家自然科学基金青年项目(82305067)

作者简介: 唐巧, 在读硕士研究生, 医师, E-mail: tangqiao9347@163.com;

周超, 博士, 主治医师, E-mail: 379317021@qq.com。唐巧、周超

共同为第一作者

Supported by Natural Science Foundation for the Youth (NSFY) of China (82305067).

通信作者: 宫嫚, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, E-mail:

gongman302@163.com

慢加急性肝衰竭(ACLF)是指在慢性肝病基础上, 由各种诱因引起以急性黄疸加深、凝血功能障碍为临床表现的一组症候群^[1]。ACLF患者病情危重, 短期病死率高, 常伴肝外多器官系统功能障碍甚至衰竭^[2]。中西医结合治疗ACLF具有一定的优势, 课题组前期研究对ACLF证候规律进行梳理, 提炼出湿热瘀黄、气虚瘀黄证两种核心证候, 并拟定了凉血解毒化瘀方

(LXJDHYF)用于治疗湿热瘀黄证^[3],前期开展的多项前瞻性多中心随机对照临床试验证明凉血解毒化瘀方在降低 ACLF 病死率及减少并发症方面具有确切疗效^[3-5]。但具体机制尚不清楚。环 GMP-AMP 合成酶(cGAS)是近年发现的一种存在于细胞质内的核酸感受器,与下游干扰素基因刺激因子(STING)组成的核酸识别系统对于维持宿主正常的免疫功能、防止免疫损伤具有重要作用^[6]。ACLF 发病机制与免疫损伤密切相关^[7],相关研究表明,抑制 cGAS/STING 信号通路能够改善肝损伤^[8,9],凉血解毒化瘀方的君药芍药的主要有效成分芍药苷能够靶向作用于 STING 介导的自噬与细胞凋亡^[10],目前研究大多基于单味中药或成分,尚缺乏复方制剂对 ACLF cGAS-STING 信号通路影响的研究,因此本研究拟基于 cGAS-STING 信号通路,研究凉血解毒化瘀方治疗 ACLF 小鼠的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及细胞 6~8周雄性 C57BL/6J 小鼠,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司。饲养于 SPF 环境中,小鼠可以自由采食及饮水,实验动物房有固定的 12 h:12 h 白天与黑夜循环交替。本实验中使用的骨髓来源巨噬细胞(BMDMs)分离自 8~10 周雄性 C57BL/6J 小鼠股骨骨髓,于 DMEM 培养基(含有 10% 胎牛血清及 1% 青霉素-链霉素双抗)中加入 50 ng/mL 小鼠巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF),置于 37 °C、5% CO₂、湿度 95% 的培养箱内进行培养。

1.1.2 主要实验仪器与试剂 二氧化碳培养箱(Thermo Fisher);酶标仪(BioTEK);电泳仪(Bio-rad);转印槽(Bio-Rad);细胞超净工作台(三莉科技有限公司);ArchimedX6 时间分辨定量 PCR 系统(鲲鹏基因);显微镜(olympus);多功能漩涡混合器(scientific industries)。

pIRF3 兔单克隆抗体(Genetex);TMEM173/STING 单克隆抗体(Proteintech);HSP90 单克隆抗体(Proteintech);DMEM 培养基(Macgene);Opti-mem 培养基(Gibco);脂多糖、D-氨基半乳糖(Sigma);H-151(陶术生化);RT supermix for qpcr(+gDNAwiper)、Taq pro universal SYBR qPCR master mix(诺唯赞);AST/GOT 检测试剂盒、ALT/GPT 检测试剂盒(南京建成生物)。

1.1.3 实验药物及剂量 凉血解毒化瘀方由赤芍 60 g、茵陈 30 g、栀子 9 g、白花蛇舌草 30 g、丹参 30 g、炒白术 30 g、茜草 30 g、豨莶草 30 g、白及 15 g 组成,单味颗粒剂均购自北京康仁堂药业有限公司,按照小鼠与人的等效剂量比值为 9:1 进行折算,换算出小鼠给药量为 13.1 g/kg(低剂量组)及 26.2 g/kg(高剂量组)。将颗粒

剂溶于蒸馏水中,配成 1.63 g/mL 药液备用。将 cGAS-STING 通路特异性抑制剂 H-151[每只小鼠给药量为 7.5 mg/(kg·d)]溶解于含 10% 的 Tween-80 的 PBS 溶液中,腹腔注射给药,1 次/d^[11]。凉血解毒化瘀方及 H-151 均于急性攻击前 1 周开始给药。本研究经中国人民解放军总医院第五医学中心实验动物伦理委员会批准(伦理批号:IAUCUC-2024-0003)。

1.2 实验方法

1.2.1 检测凉血解毒化瘀方对小鼠肝功能的影响

1.2.1.1 ACLF 小鼠模型构建 使用资源方方法进行动物实验的样本量计算^[12]。为避免造模过程中小鼠死亡引起的误差,将样本量定为 6 只/组。将 30 只 6~8 周雄性 C57BL/6J 小鼠按随机数字表法等分为对照组、模型组、凉血解毒化瘀方低剂量组、凉血解毒化瘀方高剂量组及 H-151 组,适应性饲养 1 周后,除对照组以外,其余各组均按 2 mL/kg 剂量灌胃给药 10% CCl₄ 溶液(CCl₄: 橄榄油=1:9)以诱导形成肝硬化,2 次/周,共持续 8 周,对照组给予等体积橄榄油灌胃,第 8 周末除对照组外其余各组予以脂多糖(50 μg/kg)联合 D-氨基半乳糖(400 mg/kg)腹腔注射以建立 ACLF 模型^[13]。

1.2.1.2 标本收集 脂多糖(50 μg/kg)联合 D-氨基半乳糖(400 mg/kg)腹腔注射 12 h 后处死小鼠,采集血液以及肝脏组织样本,血液样本 4 °C 静置 30 min 后,3500 r/min 离心 15 min,吸取血清并分装于 1.5 mL EP 管中,于 -80 °C 条件下储存,肝组织取出后部分于 4% 多聚甲醛中浸泡,部分于液氮中快速冷冻后置于 -80 °C 冰箱中保存用于后续实验。

1.2.1.3 小鼠肝脏 HE 及 TUNEL 染色 新鲜小鼠肝脏组织取出后于 4% 多聚甲醛中浸泡,固定 24 h 后取出组织进行石蜡包埋切片,经过石蜡切片脱蜡至水、高清恒染预处理液预处理、苏木素染色、伊红染色、脱水封片等步骤对肝组织切片进行 HE 染色;经过脱蜡至水、蛋白酶 K 修复、破膜、室温平衡、加入 TDT 酶、dUTP,buffer 孵育、DAPI 复染细胞核及封片等步骤对小鼠肝组织进行 TUNEL 染色。

1.2.1.4 生化检测试剂盒检测小鼠肝功能指标 使用南京建成谷丙转氨酶(ALT/GPT)试剂盒与谷草转氨酶(AST/GOT)试剂盒、中生北控生物 TBil 试剂盒检测小鼠血清 AST、ALT 及 TBil 水平。测定 AST 及 ALT 时首先加入提前预热至 37 °C 的基质液 20 μL 至测定孔及对照孔,再按照说明书先后加入待测样本及 2,4-二硝基苯胍液,37 °C 分别反应 30 min 及 20 min 后加入 0.4 mol/L 氢氧化钠溶液终止反应。最后酶标仪测定 A_{510nm} 值。测定 TBil 时首先在测定孔及空白孔分别加入 65 μL 待测样本及蒸馏水,按照说明书先后加入试剂 1 及试剂 2,均 37 °C 避光孵育 5 min 后分别测定加入试剂 1 及试剂 2 后

测定孔及空白孔 A_{450nm} 值。

1.2.2 检测凉血解毒化癥方对cGAS-STING信号通路的影响

1.2.2.1 细胞实验

1.2.2.1.1 BMDMs 细胞培养与接种 8~10 周雄性 C57BL/6J 小鼠脱颈处死后使用 75% 乙醇充分浸泡消毒后转移至超净工作台中无菌条件下分离小鼠腿骨, 分离股骨与胫骨, 后吸取提前 37°C 预热的 DMEM 完全培养基反复充分冲洗骨髓腔, 直至腿骨内无明显红色, 最后加入反复吹打混匀, 使细胞团均匀分散, 将细胞转移至细胞培养皿中, 置于 37 °C、5% CO₂、湿度 95% 的培养箱内进行培养。第 5 日即可得到成熟的 BMDMs 细胞。所得 BMDMs 细胞经 0.25% 胰酶消化后收集含细胞 DMEM 培养基, 离心得到细胞团沉淀, 弃上清, 加入 DMEM 培养基定容后显微镜下计数, 按照密度为 1.2×10⁶/mL 接种后置于培养箱内中过夜, 待细胞完全贴壁后用于后续实验。

1.2.2.1.2 BMDMs 细胞给药预处理 用于 Western blotting 实验的 BMDMs 细胞接种于 24 孔板中, 使用 opti-MEM 培养基溶解并稀释凉血解毒化癥方颗粒剂至相应浓度 (0.5、1、2 mg/mL) 用于给药, 另外设置不加入药物及刺激的空白孔及只加入刺激的刺激孔, 弃上清后给予相同体积 opti-MEM 培养基。给药后 1 h, 分别加入 cGAS-STING 信号通路激动剂干扰素刺激 DNA (ISD)、2,3-cGAMP、DMXAA 和 diABzi, 刺激 2 h 后, 收集细胞裂解液用于后续实验。用于 RT-qPCR 实验的 BMDMs 细胞以相同浓度接种于 12 孔板, 给药预处理 1 h 后给予刺激 4 h。

1.2.2.1.3 ATP 发光法检测细胞活性 凉血解毒化癥方给药浓度依次为 0、0.25、0.5、1、1.25、1.5、1.75、2、4 mg/mL, 加入上述不同浓度含凉血解毒化癥方完全培养基, 细胞培养箱中培养 12 h 后每孔取 50 μL 含药 DMEM 培养基加入新的白色 96 孔板中, 在避光条件下再在上述白色 96 孔板中每孔加入 50 μL ATP 溶液 (使含药 DMEM 培养基与 ATP 溶液比例为 1:1), 并使其充分混合, 静置 15 min 后使用系统选择程序测量荧光强度, 检测细胞活性。

1.2.2.1.4 RT-qPCR 加入 TRIzol 试剂裂解 BMDMs 细胞使用常规方法进行 RNA 提取, 采用 NanoDrop 2000 分光光度计测定其 260~280 nm 吸光度以得到样品 RNA 浓度与纯度后进行定量后逆转录以获取 cDNA, 使用 PCR 仪进行 RT-qPCR 反应检测, 目的基因相对表达量使用 2^{-ΔΔCt} 法进行计算, 使用 β-ACTIN 作为内参。引物由北京天一辉远生物科技有限公司合成 (表 1)。

1.2.2.1.5 Western blotting 采用 Western blotting 检测细胞裂解液中 IRF3 及 STING 蛋白的磷酸化水平, 使用

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequences for RT-qPCR

Gene		Sequence
β-ACTIN	P1	GGCTGTATTCCCCTCCATCG
	P2	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
IFN-β	P1	TCCGAGCAGA GATCTTCAGGAA
	P2	TGCAACCACCACTCATTCTGAG
TNF-α	P1	GGGCAGTTAGGCATGGGAT
	P2	TGAGCCTTT TAGGCTTCCAG
IL-6	P1	CACTTCA CAAGTCGGAGGCT
	P2	CTGCAAGTGCATCATCGTTGT
ISG15	P1	GGTGTCCGTGACTAACTCCAT
	P2	CTGTACCACTAG CATCACTGTG

HSP90 作为内参蛋白。根据本实验所需检测目的蛋白分子量, 采用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶进行蛋白电泳, 电泳结束后将凝胶上的蛋白转印至 PVDF 膜上, 转印参数设置为 100 V, 转印 90 min。转印完成后将 PVDF 膜置于 10% 封闭液中, 在摇床上室温封闭 30 min。pIRF3 及 TMEM173/STING 单克隆抗体均按照说明书 1:1000 比例进行稀释, pIRF3 单克隆抗体于 4 °C 冰箱中隔夜孵育, TMEM173/STING 单克隆抗体置于 4 °C 冰箱中孵育 2 h。HSP90 孵育条件为 4 °C 冰箱中孵育 30 min。二抗 (1:10 000) 室温摇床孵育 1 h。抗体孵育结束后将 PVDF 膜置于塑封膜中, 滴加配制好的 ECL 发光液于 PVDF 膜上涂匀, 压片避光反应, 曝光, 定影, 对相应蛋白表达进行分析。

1.2.2.2 动物实验

1.2.2.2.1 RT-qPCR 实验 取 100 mg 新鲜小鼠肝脏组织, 研磨前尽量剪碎, 加入 1 mL TRIzol 试剂, 使用高通量组织研磨仪快速充分匀浆 (6 m/s, 研磨 20 s, 静置 15 s, 研磨 2 个循环)。RNA 提取、体外反转录、qPCR 反应检测及数据分析步骤见 1.2.2.1.4 部分。

1.2.2.2.2 ELISA 法检测血清 TNF-α、IL-6 细胞因子 严格按照 ELISA 试剂盒中说明检测各组小鼠血清 TNF-α、IL-6 水平, 其中 TNF-α 试剂盒用于检测小鼠血清样本时血清样本无需稀释处理, 使用 IL-6 试剂盒检测小鼠血清样本时按 10 倍稀释后进行。

1.2.3 统计学方法 使用 SPSS25.0 软件进行数据分析, 符合正态分布的数据用均数±标准差表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验法。当 P<0.05 时, 差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 凉血解毒化癥方 对小鼠肝功能的影响

2.1.1 小鼠肝脏组织 HE 染色及 TUNEL 染色结果 HE 病理染色结果显示正常对照组可见清晰的肝小叶结构,

肝细胞排列结构规整。模型组小鼠肝细胞形态改变,核质染色异常,出现大块、亚大块坏死,肝小叶结构被破坏,大量炎性细胞浸润。凉血解毒化瘀方组及H-151组与模型组相比病理损伤较轻,细胞肿胀程度较轻,肝细

胞坏死面积与模型组相比均较小(图1A)。TUNEL染色中绿色荧光部分代表凋亡阳性细胞,凉血解毒化瘀方组凋亡阳性细胞比例低于模型组($P<0.001$,图1B)。

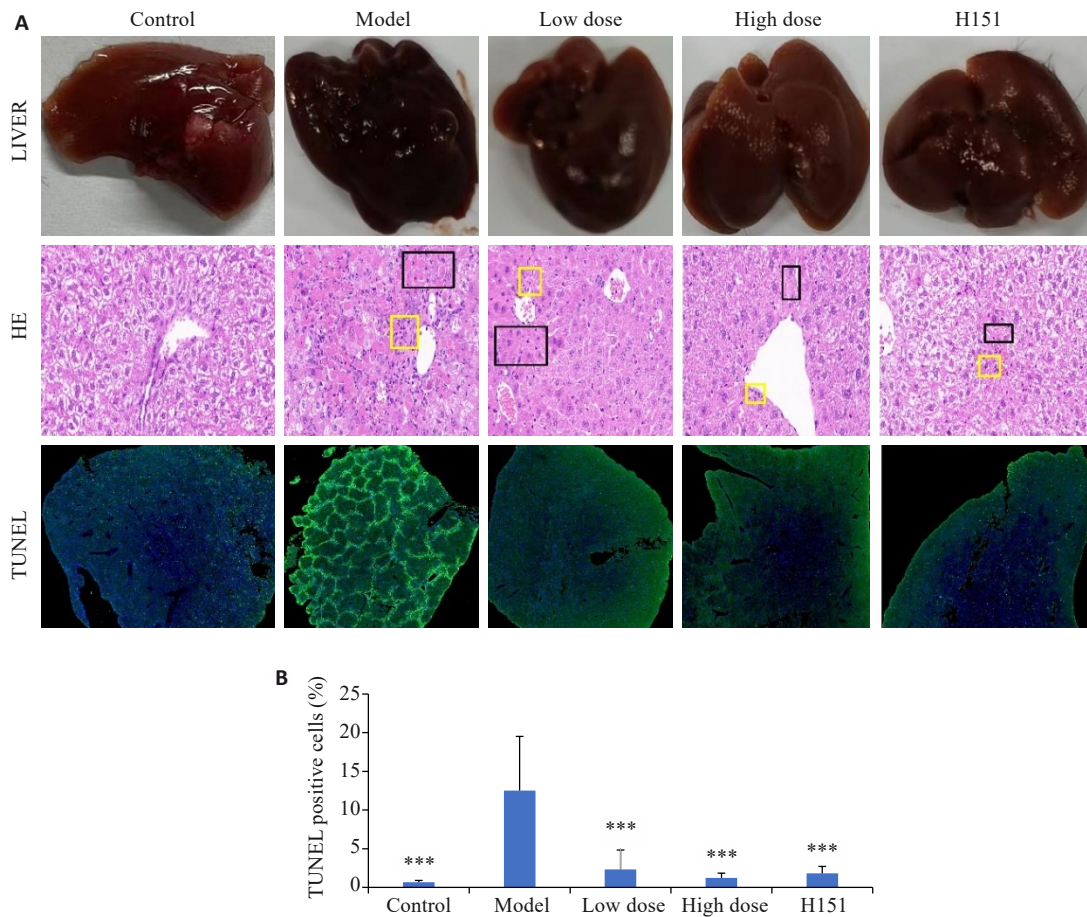


图1 各组肝脏病理图像和肝组织 HE 染色、TUNEL 染色的代表图和 TUNEL 凋亡阳性细胞数比例

Fig.1 HE staining (Original magnification: $\times 200$) and TUNEL staining ($\times 20$) for examining pathologies and hepatocyte apoptosis in mouse livers (A) and comparison of TUNEL-positive cell percentages among the groups (B). *** $P<0.001$ vs model group.

2.1.2 凉血解毒化瘀方对 ACLF 小鼠肝功能的影响 凉血解毒化瘀方高、低剂量组及 H-151 组小鼠 ALT、AST 及 TBil 水平低于模型组,模型组 ALT、AST 及 TBil 水平升高($P<0.001$,图2)。

2.2 凉血解毒化瘀方对 cGAS-STING 信号通路的影响

2.2.1 细胞实验

2.2.1.1 凉血解毒化瘀方对小鼠 BMDMs 细胞活性的影响 当凉血解毒化瘀方浓度低于 2 mg/mL 时无明显细胞毒性,但当给药浓度达到 4 mg/mL 时,则表现出细胞毒性,因此在后续相关细胞实验中将给药最高浓度设置为 2 mg/mL(图3)。

2.2.1.2 凉血解毒化瘀方对小鼠 BMDMs 细胞 cGAS-STING 信号通路相关 mRNA 表达的影响 不同浓度凉血解毒化瘀方对小鼠 BMDMs 细胞 cGAS-STING 信号

通路相关 mRNA 表达的影响,结果显示给药孔 IFN- β 、ISG15、TNF- α 及 IL-6 mRNA 表达水平降低($P<0.05$,图 4A~D)。采用不同种类的 STING 激动剂活化 cGAS-STING 信号通路,结果显示浓度为 1 mg/mL 的凉血解毒化瘀方可下调 IFN- β 、ISG15、TNF- α 及 IL-6 mRNA 的表达水平($P<0.05$,图 4E~H)。

2.2.1.3 凉血解毒化瘀方对小鼠 BMDMs 细胞 cGAS-STING 信号通路相关蛋白磷酸化水平的影响 Western blotting 结果表明,随着凉血解毒化瘀方给药剂量增加, BMDMs 细胞中 IRF3 及 STING 蛋白磷酸化水平降低($P<0.05$,图 5A~C)。浓度为 1 mg/mL 的凉血解毒化瘀方在不同激动剂活化 STING 通路时均能抑制 IRF3 蛋白以及 STING 蛋白的磷酸化($P<0.05$,图 5D~F)。

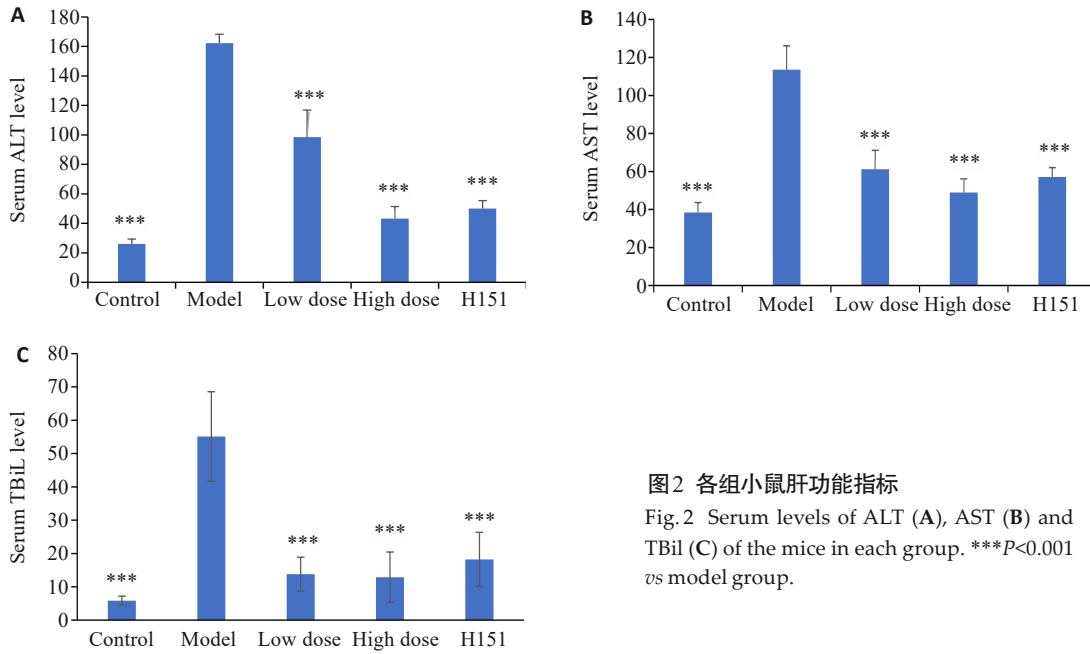


图2 各组小鼠肝功能指标

Fig.2 Serum levels of ALT (A), AST (B) and TBil (C) of the mice in each group. *** $P<0.001$ vs model group.

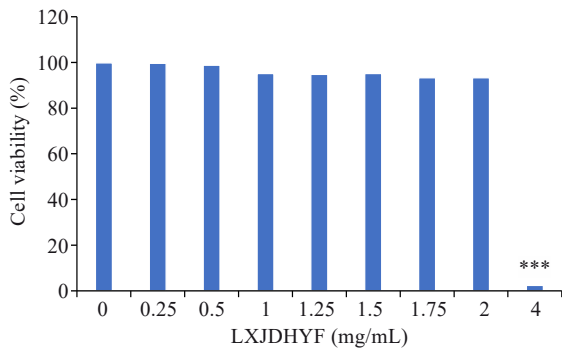


图3 ATP法测定不同浓度凉血解毒化癥方作用于BMDMs细胞中的毒性

Fig.3 ATP assay for evaluating cytotoxicity of different concentrations of LXJDHYF in BMDMs. *** $P<0.001$ vs 0 mg/mL.

2.2.2 动物实验

2.2.2.1 凉血解毒化癥方对 ACLF 小鼠 cGAS-STING 信号通路相关 mRNA 表达的影响 与模型组相比,凉血解毒化癥方低剂量组、高剂量组及 H151 组小鼠肝组织中 IFN- β 、ISG15、TNF- α 及 IL-6 mRNA 表达下调 ($P<0.001$,图6)。

2.2.2.1 凉血解毒化癥方对 ACLF 小鼠血清 IL-6、TNF- α 水平的影响 凉血解毒化癥方组小鼠 IL-6 及 TNF- α 水平平均低于模型组 ($P<0.05$,图7)。

3 讨论

中医认为 ACLF 核心病因病机为“热、毒、癥、湿、虚”。凉血解毒化癥方具有凉血活血、解毒化癥之功效,单味中药对于肝功能的保护作用在既往研究中均有报道。方中茵陈和赤芍共为君药。赤芍具有清热凉血,祛瘀止痛的功效。茵陈具有清利湿热之功效,被誉为黄疸

要药。茵陈水提物能够通过降低肝损伤小鼠血清 ALT 及 AST 水平,同时具有抗氧化及抗炎功能,能够降低炎症因子如 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的表达^[14]。本方取茜草、豨莶草、丹参、白花蛇舌草为臣药。茜草素能够缓解四氯化碳诱导的肝损伤^[15]。豨莶草具有抗炎作用,相关研究提示其能够抑制 NF- κ B 信号通路相关炎症因子如 IL-1 β 、IL-8、TNF- α 的表达^[16]。丹参用于本方主要取其凉血活血祛瘀之效,现代药理学研究发现其主要脂溶性活性成分丹参酮 II A 能够缓解刀豆蛋白 A 诱导形成的小鼠肝损伤,减少炎症因子 IL-2、IL-4、IFN- γ 及 TNF- α 的产生^[17]。栀子用于本方取其清热利湿、凉血解毒之效。相关研究发现栀子苷对大鼠体内负责胆汁酸稳态的酶和转运体具有调控作用,能够改善大鼠胆汁淤积及肝损伤情况^[18]。白花蛇舌草在抗炎、抗氧化及免疫调节方面均具有良好的效果^[19]。炒白术具有补气健脾的功效,在本方中为佐药,现代药理学发现其能够清除氧化自由基,保护小鼠肝功能^[20]。白及在本方中作为第二佐剂,其活性成分会促进血小板的变形、聚集和分泌,可能是其发挥止血功能的主要机制^[21]。本研究中凉血解毒化癥方组小鼠肝功能及 HE 染色结果同样证明其对 ACLF 小鼠肝损伤的保护作用,与既往研究相互印证。

cGAS 与 STING 组成的胞质核酸监控系统在肝损伤的机制中扮演了重要角色^[22,23]。STING 监测到细胞损伤释放的 DNA 后 IRF3 磷酸化,并易位到细胞核中从而启动下游 I 型干扰素及多种 ISGs 的转录表达^[24],使干扰素被释放,进入胞质,启动适应性免疫,还可激活 NF- κ B 信号通路,导致促炎细胞因子如 TNF- α 和 IL-6 的过度分泌^[25]。IFN- β 属于 I 型干扰素家族,相关研究指出,

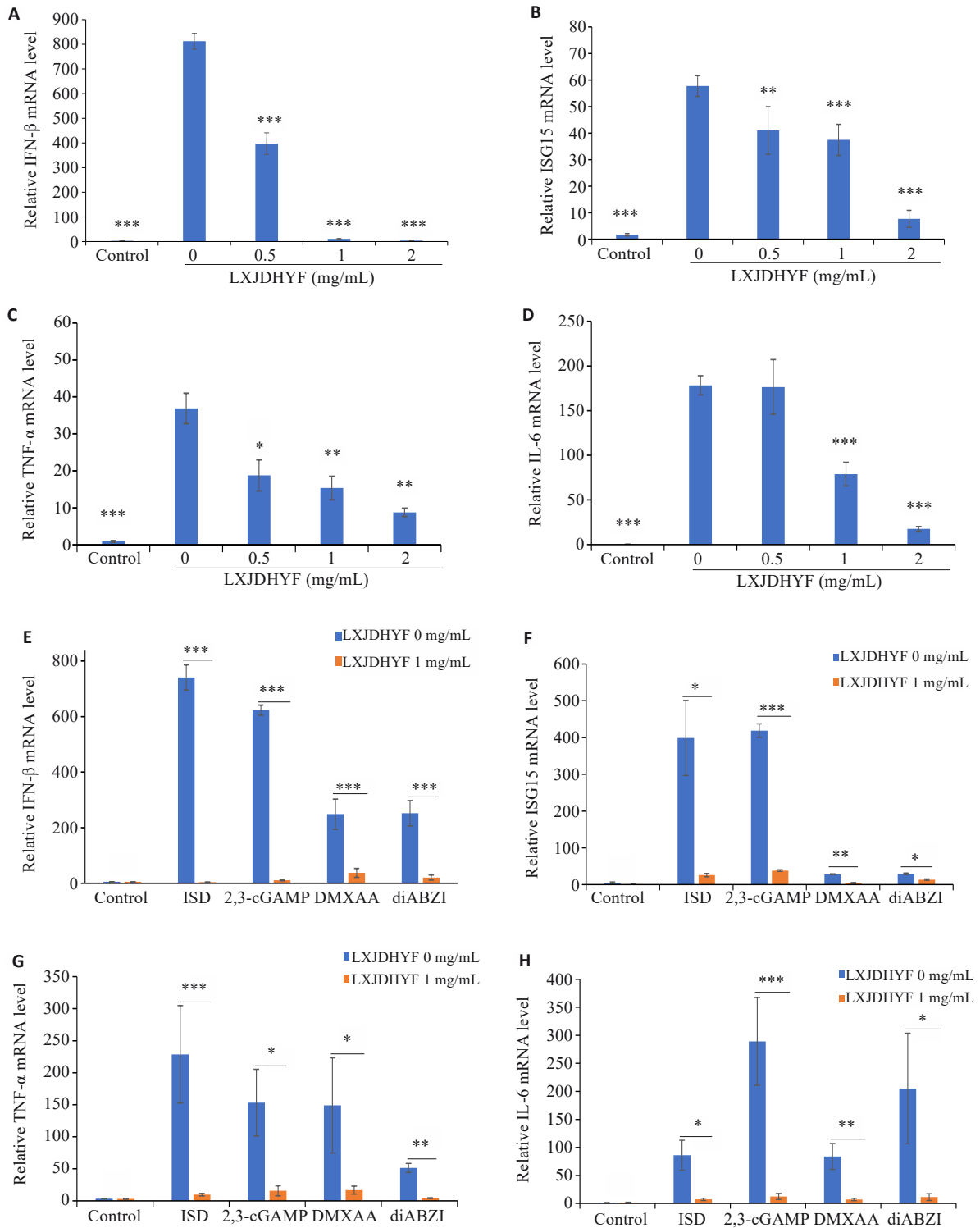


图4 不同浓度凉血解毒化瘀方在BMDMs中对ISD激活的cGAS-STING信号通路相关mRNA的表达(A-D)及其对不同激活剂激活STING通路对相关mRNA表达水平的影响(E-H)

Fig.4 Effects of different concentrations of LXJDHYF on expressions of IFN-β (A), ISG 15 (B), TNF-α (C) and IL-6 mRNAs (D) in BMDMs with ISD-induced cGAS-STING signaling pathway activation. E-H: Expressions of IFN-β (E), ISG 15 (F), TNF-α (G) and IL-6 mRNAs (H) in BMDMs pre-treated with LXJDHYF (1 mg/mL) prior to stimulation with different STING agonists. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs 0 mg/mL.

在病毒感染引发急性肝衰竭时,I型干扰素不仅具有直接抗病毒作用,还能与相应受体结合,调节骨髓细胞的免疫反应以及外周浸润单核细胞向Kupffer细胞的分

化^[26]。ISG15蛋白经I型干扰素诱导后表达,其与细胞底物结合形成的蛋白复合物显示出抗病毒和抗菌活性^[27,28],对于维持宿主固有免疫具有重要作用,以上因

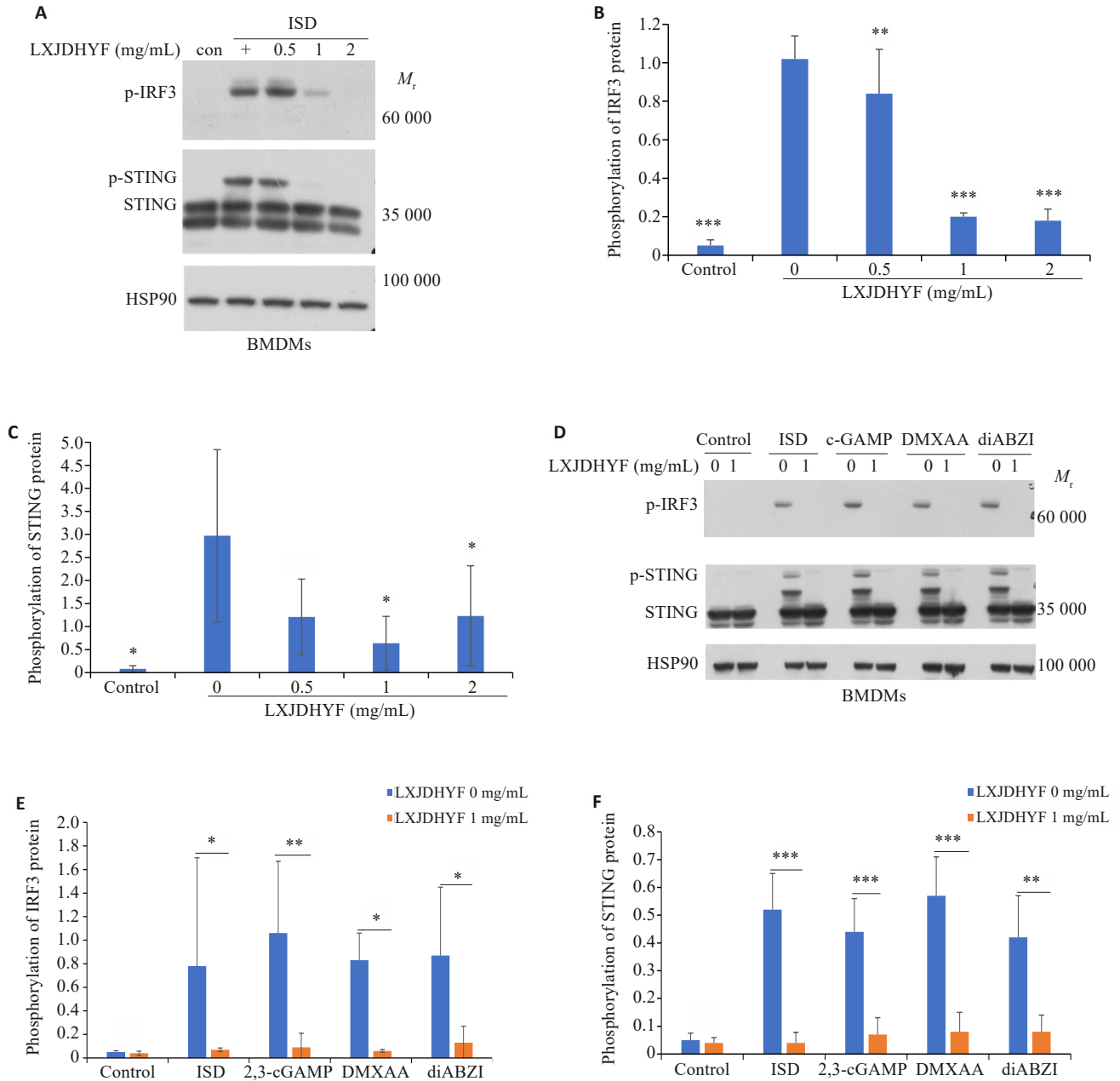


图5 不同浓度凉血解毒化瘀方在BMDMs中对ISD激活的cGAS-STING信号通路相关蛋白磷酸化水平的影响(A-C); 不同种类STING激活剂激活STING通路时凉血解毒化瘀方对相关蛋白磷酸化水平的影响(D-F)

Fig.5 Western blotting for detecting phosphorylation levels of STING and IRF3 proteins in BMDMs with ISD-induced cGAS-STING signaling pathway activation and treated with different concentrations of LXJDHYF (A-C). D-F: Phosphorylation levels of STING and IRF3 proteins in BMDMs pre-treated with LXJDHYF (1 mg/mL) and then stimulated with different STING agonists. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 0 mg/mL.

子均与cGAS-STING信号通路密切相关,本研究中Western blotting结果提示凉血解毒化瘀方能够降低IRF3及STING蛋白的磷酸化水平,RT-qPCR结果提示凉血解毒化瘀方在体内、外均能下调cGAS-STING信号通路相关IL-6、TNF- α 、IFN- β 以及ISG15 mRNA的表达,且能降低ACLF小鼠血清IL-6和TNF- α 水平,表明凉血解毒化瘀方在体内外均能抑制cGAS-STING信

号通路的激活。

综上所述,凉血解毒化瘀方可改善ACLF小鼠肝功能,减轻炎症反应,其作用机制可能与抑制cGAS-STING信号通路过度活化有关。本研究尚存在一些不足,虽然小鼠BMDMs细胞及动物实验证实了凉血解毒化瘀方对cGAS-STING通路的抑制作用,但尚缺乏临床样本的机制验证。

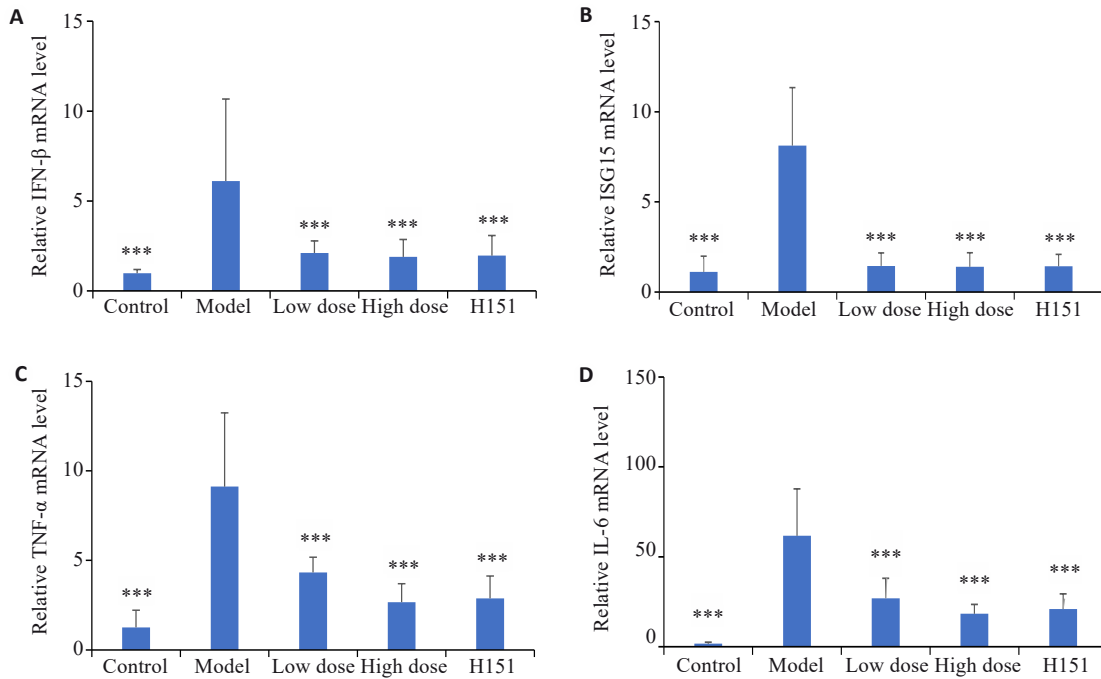


图6 各组小鼠cGAS-STING信号通路相关mRNA相对表达水平

Fig.6 Expressions of IFN-β (A), ISG15 (B), TNF-α (C) and IL-6 mRNAs (D) in the liver tissues of the mice in each group. ****P*<0.001 vs model group.

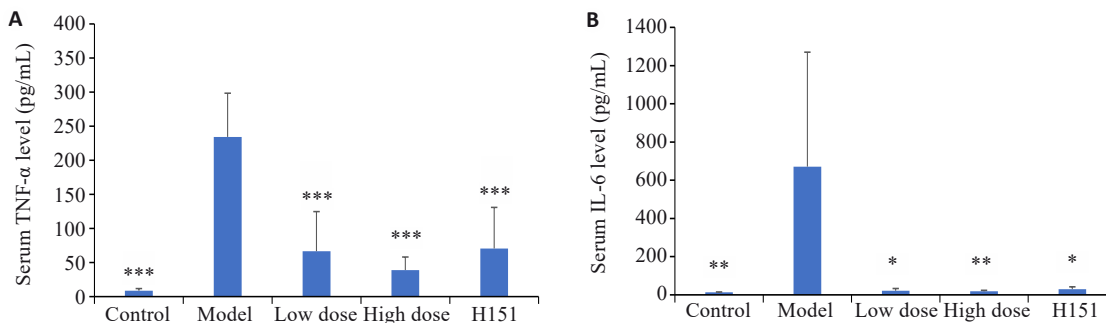


图7 各组小鼠血清炎症细胞因子水平

Fig.7 Serum levels of IL-6 (A) and TNF-α (B) of the mice in each group. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 vs model group.

参考文献:

[1] 中国中西医结合学会, 中华中医药学会, 中华医学会. 慢加急性肝衰竭中西医结合诊疗指南[J]. 临床肝胆病杂志, 2023, 39(7): 1547-52.

[2] European Association for the Study of the Liver Electronic address: eueasloffice@easloffice, European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines on acute-on-chronic liver failure[J]. J Hepatol, 2023, 79(2): 461-91.

[3] 周超, 宫嫚, 张宁, 等. 中西医结合治疗方案干预乙型肝炎病毒相关慢加急性肝衰竭的疗效分析[J]. 中西医结合肝病杂志, 2019, 29(3): 203-7.

[4] 殷光辉, 闻涛. 凉血解毒化瘀汤治疗乙肝相关性慢加急性肝衰竭临床研究[J]. 新中医, 2020, 52(17): 81-3.

[5] 刘慧敏, 王宪波, 侯艺鑫, 等. 解毒凉血方联合西药治疗乙型肝炎慢加急性肝衰竭患者64例临床观察[J]. 中医杂志, 2013, 54(21): 1829-33.

[6] Chen C, Xu PL. Cellular functions of cGAS-STING signaling[J]. Trends Cell Biol, 2023, 33(8): 630-48.

[7] 项晓刚, 尚大宝, 张金铭. 慢加急性肝衰竭的疾病定义及发病机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2023, 39(10): 2281-7.

[8] Li J, Lu YY, Lin G. Blocking cGAS/STING signaling protects against sepsis-associated acute liver injury[J]. Int Immunopharmacol, 2022, 113(Pt A): 109276.

[9] Yu T, Cheng HR, Li XL, et al. Design and synthesis of hederagenin derivatives modulating STING/NF-κB signaling for the relief of acute liver injury in septic mice[J]. Eur J Med Chem, 2023, 245(Pt 1): 114911.

[10] 龚莹洁. 芍药苷通过靶向STING介导的自噬和细胞凋亡保护糖尿病肝病损伤[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2023.

[11] Gong W, Lu LL, Zhou Y, et al. The novel STING antagonist H151 ameliorates cisplatin-induced acute kidney injury and mitochondrial dysfunction[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2021, 320(4): F608-16.

[12] Arifin WN, Zahiruddin WM. Sample size calculation in animal studies using resource equation approach[J]. Malays J Med Sci, 2017, 24(5): 101-5.

- [13] Engelmann C, Habtesion A, Hassan M, et al. Combination of G-CSF and a TLR4 inhibitor reduce inflammation and promote regeneration in a mouse model of ACLF[J]. *J Hepatol*, 2022, 77(5): 1325-38.
- [14] Park CY, Choi E, Yang HJ, et al. Efficacy of *Artemisia annua* L. extract for recovery of acute liver failure[J]. *Food Sci Nutr*, 2020, 8(7): 3738-49.
- [15] Rao GM, Rao CV, Pushpangadan P, et al. Hepatoprotective effects of rubiadin, a major constituent of *Rubia cordifolia* Linn[J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 103(3): 484-90.
- [16] Wang ZX, Fan XW, Xu YE, et al. Efficacy of Xixiancao (Herba Siegesbeckiae *Orientalis*) on interactions between nuclear factor kappa-B and inflammatory cytokines in inflammatory reactions of rat synovial cells induced by sodium urate[J]. *Chung I Tsa Chih Ying Wen Pan*, 2020, 40(5): 774-81.
- [17] Qin XY, Li T, Yan L, et al. Tanshinone IIA protects against immune-mediated liver injury through activation of T-cell subsets and regulation of cytokines[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2010, 32(1): 51-5.
- [18] Wang LL, Wu GX, Wu FH, et al. Geniposide attenuates ANIT-induced cholestasis through regulation of transporters and enzymes involved in bile acids homeostasis in rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 196: 178-85.
- [19] 黄 岚, 陈碧莲, 罗 镭. 白花蛇舌草的化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. *中国药事*, 2023, 37(12): 1451-60.
- [20] Han B, Gao Y, Wang YL, et al. Protective effect of a polysaccharide from *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae* on acute liver injury in mice[J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 87: 85-91.
- [21] Dong L, Liu XX, Wu SX, et al. *Rhizoma Bletillae* polysaccharide elicits hemostatic effects in platelet-rich plasma by activating adenosine diphosphate receptor signaling pathway[J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2020, 130: 110537.
- [22] Lei Z, Deng MH, Yi ZJ, et al. cGAS-mediated autophagy protects the liver from ischemia-reperfusion injury independently of STING[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2018, 314(6): G655-G667.
- [23] Dong KH, Sun YX, Gao XT, et al. Mixed micelles loaded with hesperidin protect against acetaminophen induced acute liver injury by inhibiting the mtDNA-cGAS-STING pathway[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2024, 233: 113656.
- [24] Reisländer T, Groelly FJ, Tarsounas M. DNA damage and cancer immunotherapy: a STING in the tale[J]. *Mol Cell*, 2020, 80(1): 21-8.
- [25] Gan Y, Li XY, Han SZ, et al. The cGAS/STING Pathway: a novel target for cancer therapy[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 795401.
- [26] Borst K, Frenz T, Spanier J, et al. Type I interferon receptor signaling delays Kupffer cell replenishment during acute fulminant viral hepatitis[J]. *J Hepatol*, 2018, 68(4): 682-90.
- [27] Mustachio LM, Lu Y, Kawakami M, et al. Evidence for the ISG15-specific deubiquitinase USP18 as an antineoplastic target[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(3): 587-92.
- [28] Lee MK, Kim YJ, Kim YE, et al. Transmembrane protein pUL50 of human cytomegalovirus inhibits ISGylation by downregulating UBE1L[J]. *J Virol*, 2018, 92(15): e00462-18.

(编辑: 经 媛)