

慢加亚急性肝衰竭大鼠肠源性内毒素血症时 Th17/Treg 表达变化的实验研究

谭年花¹, 陈斌²

(1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙, 410208;

2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙, 410007)

[摘要] 目的: 观察 Treg/Th17 细胞失衡及相关细胞因子在慢加亚急性肝衰竭肠源性内毒素血症(IETM)时的表达变化, 进而探讨 Treg/Th17 细胞对内毒素介导的炎症反应的调控作用。方法: 采用牛血清白蛋白致敏建立免疫性肝纤维化大鼠模型, 以腹腔注射 D-Gal + LPS 液(含 D-Gal 400mg/kg, LPS 100 μ g/kg)急性攻击建立肝衰竭 IETM 大鼠模型。流式细胞术检测不同时间点大鼠外周血中 Th17、Treg 细胞频数, ELISA 法测定不同时间节点大鼠结肠组织 IL-10、TNF- α 、IL-17A、IL-23、TGF- β 水平。结果: 与正常组比较, 模型组 Treg、Th17 细胞频数在各时间节点均升高($P < 0.05$), Treg、Th17 细胞与前一时间节点比较均有上升($P < 0.05$); 与正常组比较, 模型组结肠组织 Treg/Th17 型细胞因子 IL-17A、IL-23、TNF- α 、TGF- β 、IL-10 各时间节点表达均升高($P < 0.05$), 且各炎症因子与前一时间节点比较均有上升($P < 0.05$); 正常组大鼠 IL-10、TGF- β 等抑炎因子水平高于 IL-17A、IL-23、TNF- α 等促炎因子, 模型组 Th17 比例高于 Treg, 失衡向 Th17 方向偏移。结论: 肝衰竭 IETM 发生时 Treg/Th17 细胞失衡, 向 Th17 方向偏移, 相关抑炎、促炎因子均释放增加, 加剧 IETM 程度。

[关键词] 慢加亚急性肝衰竭; 肠源性内毒素血症; Treg 细胞; Th17 细胞; 实验研究

[中图分类号] R259.753 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2019.03.063

Change in the expression of T helper 17 cells/regulatory T cells at the time of intestinal endotoxemia in rats with subacute-on-chronic liver failure: An experimental study

TAN Nianhua¹, CHEN Bin²

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China;

2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To investigate T helper 17 cell (Th17)/regulatory T cell (Treg) imbalance and the change in related cytokines at the time of intestinal endotoxemia (IETM) in subacute-on-chronic liver failure, as well as the regulatory effect of Th17/Treg cells on endotoxin-mediated inflammation response. Methods: Bovine serum albumin sensitization was used to establish a rat model of immune liver fibrosis, and intraperitoneal injection of D-Gal + LPS solution (containing D-Gal 400mg/kg and LPS 100 μ g/kg) was used for acute attack to establish a rat model of IETM and liver failure. Flow cytometry was used to measure the frequencies of Th17 and Treg cells in peripheral blood at different time points, and ELISA was used to measure the levels of interleukin-10 (IL-10), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-17A (IL-17A), interleukin-23 (IL-23), and transforming growth factor- β (TGF- β) in colon tissue at different time points. Results: Compared with the normal group, the model group had significant increases in the frequencies of Th17 and Treg cells at each time point ($P < 0.05$), with significant increases from the former to the latter time point ($P < 0.05$). Compared with the normal group, the model group had significant increases in the levels of IL-17A, IL-23, TNF- α , TGF- β , and IL-10 in colon tissue at each time point ($P < 0.05$), with significant increases from the former to the latter time point ($P < 0.05$). In the normal group, the levels of the inflammatory cytokines IL-10 and TGF- β were higher than those of the proinflammatory factors IL-17A, IL-23, and TNF- α , while in the model group, the percentage of Th17 cells was higher

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81673959)

第一作者: 谭年花, 女, 2016 级硕士研究生, 研究方向: 中医药防治肝病

通讯作者: 陈斌, 男, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 中医药防治肝病, E-mail: chenbin0410@126.com

than that of Treg cells. Conclusion: Treg/Th17 imbalance is observed at the time of IETM in liver failure, and the percentage of Th17 cells is higher than that of Treg cells. There are significant increases in the release of related anti-inflammatory and proinflammatory factors, which causes the aggravation of IETM.

[Key words] subacute-on-chronic liver failure; intestinal endotoxemia; regulatory T cell; T helper 17 cell; experimental study

慢加亚急性肝衰竭 (acute-on-chronic liver failure, ACLF) 是在慢性肝病基础上出现的肝脏急性损害^[1-2], 其病情危重, 预后极差^[3], 可出现消化道出血、肝肾综合征等多种并发症^[4-5], 且中短期病死率高^[6-7], 是临床治疗难点。本病发病机制复杂, 机体在 ACLF 中晚期主要以遭受肠源性内毒素血症 (intestinal endotoxemia, IETM) 打击为主。大量动物实验和临床研究已经证实肝衰竭 IETM 的发生率可达 93.3%~100%, 是引起衰竭患者最终病情恶化和死亡的重要原因^[8]。动物实验表明新发现的 CD4⁺T 淋巴细胞亚群 Th17 细胞和 Treg 细胞与 IETM 有着密切复杂的关系, Th17/Treg 细胞平衡偏移方向在一定程度上影响着 IETM 的进展方向, Treg 表达 Foxp3, 通过接触抑制和释放抗炎因子 IL-10、TGF- β 、IL-35 等, 并通过多种途径抑制淋巴细胞反应, 主要发挥抗炎作用; Th17 表达 ROR- γ t, 主要分泌 IL-17A、IL-17F 及低水平的 IL-23、TNF- α 、IL-6 等, 诱发、加剧炎症反应, 发挥促炎的作用。

本研究通过牛血清白蛋白致敏法建立免疫性肝纤维化大鼠模型, 检测 Th17、Treg 细胞频数及其相关细胞因子水平, 观察 Treg/Th17 细胞失衡及相关细胞因子在肝衰竭 IETM 时的表达, 进而探讨 Treg/Th17 细胞对内毒素介导的炎症反应的调控作用。

1 实验材料

1.1 动物 健康雄性 SD 大鼠 40 只, 体质量 (140 $\pm$ 10) g, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号: SCXK (湘) 2016-0002。动物饲养于湖南中医药大学动物实验中心, 每 5 只一笼, 控制饲养温度在 24 $^{\circ}$ C~26 $^{\circ}$ C、相对湿度 55%~65%, 喂普通饲料, 饮蒸馏水。

1.2 主要试剂 牛血清白蛋白 (Solarbio 公司, 批号: 630G056/518H052); 弗氏不完全佐剂 (Sigma 公司, 批号: 1002453350); D-氨基半乳糖 (Solarbio 公司, 批号: 210E052); 脂多糖 (Solarbio 公司, 批号: 426H032); 水合氯醛 (上海展云化工有限公司, 批号: 170103); 氢氧化钠 (湖南汇虹试剂有限公司, 批号: 20170904); 细菌内毒素试剂盒 (湛江博康海洋生物, 批号: 17051004); IL-10 ELISA KIT (批号: 1710022)、TNF- α ELISA KIT (批号: 1710025)、IL-17A ELISA KIT (批号: 1710008)、IL-23 ELISA KIT (批号: 1710013)、TGF- β ELISA KIT (批号: 1710027) 均为上海晶天生物科技有限公司生产。

1.3 主要仪器 流式细胞仪 (美国 BD 公司); Centrifuge 5424 R 离心机 (德国 Eppendorf); DHP-9052 37 $^{\circ}$ C 恒温培养

箱 (上海齐欣); MLS-3781L-PC 高压灭菌锅 (日本 Panasonic); 微量移液枪 (美国 Rainin PiPet-Lite); RM2235 轮转石蜡切片机 (德国徕卡); 生物组织摊片机 (金迪 YD-A); 电热恒温培养箱 (上海一恒 DNP-9162)。

2 实验方法

2.1 动物分组与造模 所有大鼠置于室内适应性喂养 1 周后, 按随机数字表法分出 10 只作为正常组, 余 30 只采用牛血清白蛋白致敏法建立免疫性肝纤维化大鼠模型。具体方法: 取牛血清白蛋白乳化液 0.5 ml (含牛血清白蛋白 4 mg), 皮下多点注射致敏, 共 4 次, 分别间隔 14、10、10 d; 然后采用尾静脉注射牛血清白蛋白攻击, 每周 2 次, 牛血清白蛋白含量自 2 mg/次依次递加 0.5 mg/次, 至 4 mg/次后维持此剂量, 共 6 周; 然后以腹腔注射 D-Gal + LPS 液 (含 D-Gal 400 mg/kg, LPS 100 μ g/kg) 急性攻击建立肝衰竭 IETM 大鼠模型。共成模 24 只。

2.2 标本采集

2.2.1 动物麻醉 正常组在腹腔注射 0.9% 氯化钠注射液后 1 h 予 10% 水合氯醛 (0.4 ml/100 g) 进行腹腔注射麻醉。并采集标本, 模型组分别在腹腔急性攻击后 1、12、24 h 进行麻醉并采集标本。

2.2.2 腹主动脉血采集 待麻醉效果满意后, 以取血针抽取腹主动脉血 5 ml 装入肝素抗凝管中。

2.2.3 肠组织采集 打开腹腔, 剪取两段大鼠结肠组织 (各 1~1.5 cm), 除去粪便, 用无齿镊夹取肠组织置于 0.9% 氯化钠注射液中荡涤洗净血液及粪便残渣后分别置于 EP 管中, 其中一个加入适量 10% 中性甲醛溶液固定。

2.3 样本制备及指标检测

2.3.1 门静脉内毒素检测 取腹主动脉血液样本 1 ml, 加入体液处理剂 I 号试管内, 封闭试管口, 混匀 15 s, 离心 6 min (转速 3200 r/min), 制得 1.6 倍上清液, 取 1.6 倍上清液 0.4 ml, 加入体液处理剂 II 号试管内混匀 15 s, 置水浴箱加热 (温度 80 $^{\circ}$ C~85 $^{\circ}$ C) 6 min, 然后混匀 5 s 后离心 6 min (转速 4200 r/min), 制得 4 倍上清液, 取 0.3 ml 加入检查用水试管内混匀 15 s, 制得 8 倍液备用, 然后取出鲎试剂, 用 75% 乙醇消毒瓶壁后开启, 分别进行检查用水、供试品溶液、质控品溶液加样, 最后上机自动检测结果。

2.3.2 流式细胞术检测外周血 Treg 细胞、Th17 细胞频数

1) Th17 细胞检测。用肝素抗凝管取大鼠外周新鲜血 1~2 ml 后稀释, 用大鼠外周血淋巴细胞分离液按 1:1 比例分离单个核细胞, 取细胞层于另一个试管中, 加 5 ml 的 PBS, 以

400g 离心 5min,去上清,留 250μl,在管中加入 250μl 的 RPMI1640、1μl 的 Cell Stimulation Cocktail(plusprotein transport inhibitors)(500X),混匀后置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中 6h;细胞表面标记染色:向样品管中加入 10μl 的 CD4 抗体,室温避光孵育 20min,加 2ml 的 PBS 离心 5min(400r/min),去上清;重悬细胞最终体积在 100μl 以内,每管加入 100μl 的 IC Fixation buffer,混匀,避光孵育 40min,加 2ml 的 1XPermeabilization buffer 离心 5min(400r/min)去上清;破膜并胞内染色:每管加 100μl 的 1XPermeabilization buffer,加 IL-17A PE 抗体 5μl,混匀,室温避光孵育 40min;每管加 2ml 的 1XPermeabilization buffer 离心 5min(400r/min),留底大概 100μl 左右;每管加 300μl 的 PBS,涡旋,避光存放,上机检测。

2)Treg 细胞检测。取 100μl 全血的管中加入表面染色的抗体 CD4 FITC 和 CD25 PE,涡旋,混匀后室温避光 30min;每管加稀释好的溶血素 450μl,混匀,室温,避光,20min;每管加入 2ml 的 PBS 溶液混匀后离心 5min(300r/min),去上清;加入 1ml Foxp3 Fixation/Permeabilization,涡旋,混匀后室温避光 60min;每管加入 2ml 的 1X Permeabilization Buffer,涡旋,混匀后离心 5min(300r/min),去上清,底下留 100μl 的样品;每管加入 100μl 的 1X Permeabilization Buffer;每管加入荧光标记的 FOXP3 APC 抗体,涡旋,混匀后室温避光 30min;每管中加入 2ml 的 1X Permeabilization Buffer,涡旋,混匀后离心 5min(300r/min),去上清,留 0.1ml 的样品;每管中加入 2ml 的 1X Permeabilization Buffer,涡旋,混匀后离心 5min(300r/min),去上清,留 300μl 的样品,上机检测。

2.3.3 ELISA 法测定结肠组织 IL-10、TNF-α、IL-17A、IL-23、TGF-β 水平 准备试剂、样品及标准品,所需的板条数由标准品和待测样品的数量决定,每个标准品和空白孔加样:将 40μl 样本加入待测样品孔,然后加入 50μl 链酶

亲和素-HRP 和 10μl 相关抗体,盖上封板膜,轻轻振荡混匀,37℃ 温育 60min;配液:用蒸馏水 30 倍稀释,30 倍浓缩洗涤液后备用;洗涤:揭掉封板膜,弃液甩干,每孔加满洗涤液,静置 30s 后将洗涤液弃去,重复操作 5 次后拍干;显色:每孔先后加入显色剂 A 和 B 各 50μl,轻摇混匀,于 37℃ 条件下避光显色 10min;终止:每孔加 50μl 终止液终止反应;测定:在加终止液后 10min 以内用 450nm 波长测定各孔的 OD 值。

2.4 统计学方法 采用 PSPP 20.0 统计软件进行数据处理,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,满足正态性和方差齐性,多组间均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD 比较方法。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 腹主动脉血内毒素比较 与正常组比较,模型组内毒素水平在各时间节点均升高,差异有统计学意义。模型组 12h、24h 与 1h 比较,差异均有统计学意义。(见表 1)

表 1 各组大鼠门静脉血内毒素在不同时间节点的比较($\bar{x} \pm s$, EU/ml)

组别	只数	1h	12h	24h
正常组	10	0.421 ± 0.139	-	-
模型组	8	2.961 ± 0.759 ^a	4.683 ± 1.217 ^{ab}	5.677 ± 1.314 ^{ab}

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$;与本组前一时间节点比较,^b $P < 0.05$ 。

3.2 外周血 Treg、Th17 细胞频数及 Treg/Th17 比值变化 与正常组比较,模型组 Treg、Th17 细胞频数在各时间节点均升高,且与前一时间节点比较均有上升,差异均有统计学意义(见表 2、图 1、图 2)。与正常组比较,模型组 Treg/Th17 比值在各时间节点均显著降低,细胞失衡向 Th17 方向偏移。(见表 3)

表 2 各组大鼠外周血 Treg、Th17 表达率在不同时间节点的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	Treg			Th17		
		1h	12h	24h	1h	12h	24h
正常组	10	1.311 ± 0.35	-	-	0.601 ± 0.179	-	-
模型组	8	9.2 ± 1.401 ^a	13.2 ± 1.912 ^{ab}	17.0 ± 2.637 ^{ab}	13 ± 2.238 ^a	15.9 ± 1.801 ^{ab}	23.1 ± 1.761 ^{ab}

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$;与本组前一时间节点比较,^b $P < 0.05$ 。

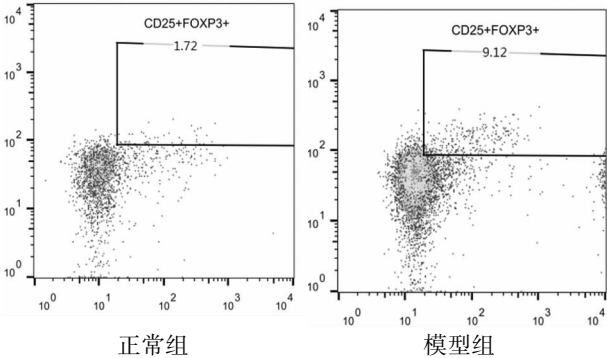


图 1 各组大鼠 Treg 细胞流式检测

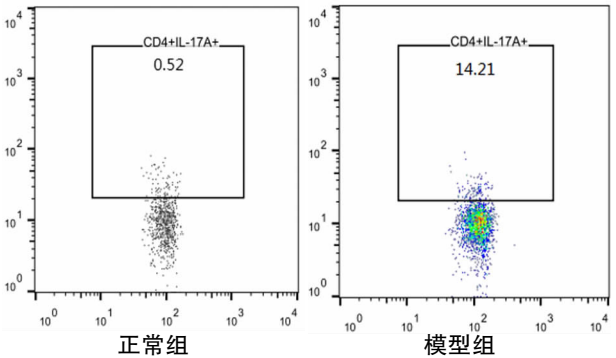


图 2 各组大鼠 Th17 细胞流式检测

表 3 各组大鼠外周血 Treg/Th17 比值
在不同时间节点的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	Treg/Th17		
		1h	12h	24h
正常组	10	2.46 ± 0.25	—	—
模型组	8	0.73 ± 0.41 ^a	0.73 ± 0.42 ^a	0.75 ± 0.29 ^a

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$ 。

表 4 各组大鼠结肠组织 Treg、Th17 细胞因子 IL-17A、IL-23、TNF- α 、TGF- β 、IL-10 表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	时间节点	Treg		Th17		
			TGF- β	IL-10	IL-17A	IL-23	TNF- α
正常组	10	1h	17.79 ± 3.418	31.01 ± 5.216	12.91 ± 2.958	13.84 ± 3.188	16.14 ± 6.69
		12h	—	—	—	—	—
		24h	—	—	—	—	—
模型组	8	1h	87.00 ± 11.88 ^a	129.3 ± 21.03 ^a	94.2 ± 8.979 ^a	61.74 ± 13.78 ^a	261.2 ± 54.2 ^a
		12h	128.7 ± 13.9 ^{ab}	189.1 ± 43.78 ^{ab}	157.3 ± 14.26 ^{ab}	189.8 ± 18.83 ^{ab}	352.8 ± 49.2 ^{ab}
		24h	212.4 ± 21.23 ^{ab}	241.2 ± 32.14 ^{ab}	261.2 ± 11.125 ^{ab}	331.4 ± 15.86 ^{ab}	537.1 ± 78.5 ^{ab}

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$;与本组前一时间节点比较,^b $P < 0.05$ 。

4 讨 论

4.1 肠源性内毒素血症与肝衰竭关系密切 近几年来,已有大量动物实验和临床研究证实 IETM 与肝衰竭存在密切关系。首先,内毒素损伤毛细胆管排泄谷胱甘肽和 HCO₃⁻,影响肝细胞胆汁酸及有机阴离子转运,使黄疸加重;内毒素降低 Kupffer 细胞吞噬纤维蛋白降解产物、纤溶酶原激活物的能力,使凝血机制受损,加重出血倾向;内毒素类脂 A 收缩动脉,进而降低肾小球滤过率和肌酐清除率;内毒素导致 Kupffer 细胞产生的 NO 扩张血管,减少有效循环血量,反馈性引起肾血管收缩及重吸收钠水增多,参与肝肾综合征的发生发展;内毒素引起循环中 NH₃ 增多,参与诱发肝性脑病,此外,因 TNF- α 增多,增加了血脑屏障的通透性,可引起脑细胞钙失调,加重肝性脑病。反过来,肝衰竭加剧了 IETM 程度,肝衰竭时,肠道菌群失调,肠道内毒素产生增多,成为 IETM 的直接来源;同时大量炎症介质引起肠道血管扩张、肠黏膜炎性水肿、充血、甚至糜烂,使肠道通透性增加,从而引起吸收入血的内毒素增多;再者,肝窦周细胞功能的衰竭也减弱了对内毒素的抵御和消除。以上原因皆能使 IETM 加重,进而可发展成脓毒症、感染性休克等。

4.2 Th17/Treg 细胞失衡与肠源性内毒素血症相互影响 Th17 细胞及 Treg 细胞均为辅助性 CD4⁺ T 淋巴细胞新亚群,近年来已经成为炎症反应调控研究的热点^[9],Th17/Treg 细胞之间分化相互抑制,功能反向调节,正常状况下二者保持动态平衡^[10],沈敏等^[11]通过临床研究证实肝衰竭时二者之间平衡被打破,且其比例的失衡与肝衰竭 IETM 的发生发展关系密切。目前已有研究证实 IETM 与 Th17/Treg 细胞平衡之间的相互作用有以下 3 种途径来实现:首先,内毒素的主要成分 LPS 通过 TLR4 信号途径促进脾组织和肠道黏膜组织等 Treg 细胞增殖分化的功能发挥,可约 10 倍左右增强 Treg 细胞的免疫抑制功能^[12],Treg 细胞通过向巨噬细胞趋

3.3 结肠组织 Treg/Th17 型细胞因子 IL-17A、IL-23、TNF- α 、TGF- β 、IL-10 表达的比较 与正常组比较,模型组各炎症因子各时间节点表达均升高,且与前一时间节点比较均有上升;正常组大鼠 IL-10、TGF- β 等抑炎因子水平高于 IL-17A、IL-23、TNF- α 等促炎因子,从模型组可以看出促炎因子升高幅度明显大于抑炎因子。(见表 4)

化作用下调 TNF 表达,进而减轻内毒素介导的亢进炎症反应,预防二次感染^[13]。而通过 LPS 激活 Kupffer 为核心的通道,释放大细胞因子如 TGF- β 、IL-6 等,可诱导 Th17 细胞分化并分泌前炎症细胞因子,或通过分泌的前炎症细胞因子诱导单核/巨噬细胞、内皮细胞产生 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等多种前炎症细胞因子/趋化因子,加剧炎症反应;其次,内毒素还通过直接诱导,增加 Foxp3、ROR γ t mRNA 的表达,导致 Treg/Th17 失衡,从而引起 HBV 感染慢性化^[14];最后,LPS 通过激活 TLR4-MyD88(髓系分化因子 88)-NF- κ B(核因子 nuclear factor kappa B)信号通路促进 Th17 分化及 TNF- α 、IL-1、IL-2、IL-6、IL-8 等促炎因子的释放,激发炎性瀑布反应,从而加重肝脏损害。目前,众多研究者认为在肝衰竭 IETM 中以第 1 条通路为主,但不管是以哪条通路为主,均随着病情进展,Th17/Treg 细胞的失衡,导致肝衰竭炎症反应程度加重,造成严重的肝脏损伤。在本研究中,急性攻击后,Th17/Treg 细胞及相关细胞因子均有上升,但以 Th17 细胞上升趋势更加明显。有体外实验研究结果同样表明,在肝衰竭发生后的肠道菌群紊乱和细菌移位等,可诱导结肠中 Treg/Th17 细胞增殖分化,促进相关炎症因子释放^[15]。

参考文献

[1] Thierry Gustot, Javier Fernandez, Elisabet Garcia, et al. Clinical Course of acute - on - chronic liver failure syndrome and effects on prognosis[J]. Hepatology, 2015, 62(1): 243 - 252.

[2] Cordoba J, Ventura - cots M, Simon - talero M, et al. Characteristics risk factors and mortality of cirrhotic patients hospitalized for hepatic encephalopathy with and without acute - on - chronic liver failure (ACLF)[J]. J Hepatol, 2014, 60(2): 275 - 281.

[3] 宁更献,李力,杜婧,等. 肝衰竭的研究进展[J]. 中国医药导报, 2015, 12(27): 42 - 46.

[4] 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组. 肝衰竭诊治指南(2012 年版)[J]. 实用肝脏病杂志, 2013, 16(3): 210 - 216.

正交试验优选复方莪术散的提取工艺及其颗粒制备工艺研究

王 平¹, 曹保利², 李隽华², 吕沅珊², 刘俊红², 李可同²

(1. 天津中医药大学, 天津, 300100; 2. 天津市南开医院, 天津, 300100)

[摘要] 目的: 优选复方莪术散颗粒的最佳提取与颗粒制备工艺, 为该复方的开发利用提供试验依据。方法: 采用正交试验法对复方莪术散进行提取, 以淫羊藿苷的含量和收率综合评价为指标, 通过 $L_9(3^4)$ 正交试验设计对醇的用量、提取的时间和提取次数进行考察, 优选复方莪术散的醇提取工艺, 再以浸膏为原料, 通过 $L_9(3^4)$ 正交试验设计考察稀释剂(可溶性淀粉)的比例及粘合剂(乙醇)的浓度和干燥温度, 制备复方莪术散颗粒。结果: 复方莪术散提取最佳工艺为 $A_2B_2C_1D_1$, 即处方药材加 60% 浓度的 10 倍剂量的乙醇, 提取 2 次, 每次 1.5 h 为最优。最佳制备工艺为 $A_3B_2C_2$, 即干浸膏: 淀粉的比例为 1: 2.5, 并以 90% 乙醇为湿润剂, 采用湿法制粒的方法, 干燥温度为 60℃, 所制得颗粒剂经检查符合相关要求。结论: 本试验所得复方莪术散颗粒剂的提取与制备工艺合理、可行, 为该复方的开发利用提供了试验依据。

[关键词] 复方莪术散; 提取工艺; 颗粒制备; 正交试验

[中图分类号] R284 **[文献标识码]** A DOI: 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2019.03.064

Optimization of extraction and granule preparation processes of compound Ezhu powder based on the orthogonal test

WANG Ping¹, CAO Baoli², LI Dihua², LYU Yuanshan², LIU Junhong², LI Ketong²

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300100, China;

2. Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China)

[Abstract] Objective: To investigate the optimization of extraction and granule preparation processes of compound Ezhu powder, and to provide an experimental basis for the development and utilization of this compound prescription. Methods: The orthogonal test was used for the extraction of compound Ezhu powder. With the content and yield of icariin as evaluation indices, the $L_9(3^4)$ orthogonal test was used to evaluate the amount of ethanol, extraction

第一作者: 王平, 女, 2016 级硕士研究生, 研究方向: 中西医结合临床(妇产科方向)

通讯作者: 曹保利, 男, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 子宫内膜异位症及不孕症的临床研究, E-mail: xiaomh66@sina.com

- [5] 黄湛镡, 高志良. 肝衰竭的三重打击及治疗策略[J]. 内科急危重症杂志, 2014, 20(3): 154-156.
- [6] You S, Rong Y, Zhu B, et al. Changing etiology of liver failure in 3, 916 patients from northern China: a 10-year survey[J]. Hepatol Int, 2013; 7(2): 714-720.
- [7] Zheng YB, Huang ZL, Wu ZB, et al. Dynamic changes of clinical features that predict the prognosis of acute-on-chronic hepatitis B liver failure: a retrospective cohort study[J]. Int J Med Sci, 2013, 10(12): 1658-1664.
- [8] 谢渭芬, 陈岳祥, 施斌, 等. 临床肝脏病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 234-242.
- [9] Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, et al. T cell subsets and their signature Cytokines in autoimmune and inflammatory disease[J]. Cytokine, 2015, 74(1): 5-17.
- [10] 周永华, 杨莹莹, 范小琳, 等. Th17/Treg 免疫失衡在血吸虫病肝纤维化中的作用[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2017, 35(1): 89-92.
- [11] 沈敏, 林明强, 冯奇桃, 等. HBV 相关慢加亚急性肝衰竭患者中 Th17 细胞、Treg 细胞的变化及其与肝功能和 HBV-DNA 载量间的研究[J]. 海南医学, 2016, 27(5): 692-696.
- [12] Inoue M, Shinohara M. Cutting edge: Role of osteopontin and integrin αv in T cell-mediated anti-inflammatory responses in endotoxemia[J]. J Immunol, 2015, 194(12): 5595-5598.
- [13] Okeke EB, Okwor I, Uzonna JE. Regulatory T cells restrain CD4⁺ T cells from causing unregulated immune activation and hypersensitivity to lipopolysaccharide challenge[J]. Immunol, 2014, 193(2): 655-662.
- [14] 李红, 曹姗姗, 赵亚楠, 等. 肠源性内毒素血症对慢性乙型肝炎患者调节性 T 淋巴细胞/辅助性 T 淋巴细胞 17 的影响[J]. 临床肝胆病杂志, 2016, 32(10): 1878-1882.
- [15] Ni S, Li S, Yang N, et al. Bacterial translocation aggravates cl-4 induced liver cirrhosis by regulating CD4⁺ T cells in rats[J]. Sci Rep, 2017(7): 40516.

(收稿日期: 2018-08-09)