

引用:胡琰,车虹,赵冰洁,肖利,刘培佳,易文静,刘松山.黄连汤加味对过敏性紫癜性肾炎小鼠Th17细胞和Tc17细胞活化的影响[J].中医导报,2025,31(8):24-30.

黄连汤加味对过敏性紫癜性肾炎小鼠 Th17细胞和Tc17细胞活化的影响*

胡 琰,车 虹,赵冰洁,肖 利,刘培佳,易文静,刘松山
(成都中医药大学附属医院,四川 成都 610032)

[摘要] 目的:探究黄连汤加味对过敏性紫癜性肾炎(HSPN)小鼠辅助性T细胞17(Th17)和细胞毒性T细胞17(Tc17)的影响。方法:选取40只昆明小鼠建立HSPN模型,并随机选取30只成功造模的小鼠,分为模型组[灌胃牛血清白蛋白(BSA)+尾静脉注射脂多糖(LPS)+皮下注射四氯化碳(CCl₄)]、黄连汤加味低剂量组(7.5 g/kg)、黄连汤加味中剂量组(15.0 g/kg)、黄连汤加味高剂量组(30.0 g/kg)、霉酚酸酯组(0.3 g/kg)。另选6只小鼠作为对照组,灌胃等量双蒸水,尾静脉和皮下注射等量生理盐水。全自动生化分析仪检测小鼠尿液24 h尿蛋白水平、尿红细胞个数、血清肌酐(Scr)、白蛋白(ALB)和总蛋白(TP)水平;苏木精-伊红(HE)染色和碘酸雪夫(PAS)染色检测小鼠肾脏组织病理学变化;免疫组织化学法检测小鼠肾脏组织免疫球蛋白A(IgA)和补体成分3抗体(C3)水平;酶联免疫吸附测定(ELISA)检测小鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素IL-6(IL-6)、白细胞介素-17(IL-17)和IgA水平;流式细胞术检测小鼠血液Th17和Tc17细胞比例。结果:对照组小鼠肾脏组织结构清晰,肾小球、肾小管形态正常,肾间质无充血及炎症细胞浸润;模型组小鼠肾小球体积增大,系膜区及毛细血管袢内细胞数量显著增多,肾小球肿大,系膜区增宽,系膜基质及细胞增生明显,PAS染色阳性表达面积百分率显著升高($P<0.01$),肾间质可见明显充血,伴大量炎症细胞浸润;黄连汤加味各剂量组及霉酚酸酯组小鼠肾间质充血及炎症细胞浸润程度显著减轻,肾小球内系膜细胞和内皮细胞增生程度较模型组明显改善,系膜区增生程度均显著减轻,PAS染色阳性表达面积百分率显著降低($P<0.05$)。模型组小鼠尿液24 h尿蛋白水平、尿红细胞个数,血清Scr水平,肾组织IgA和C3积分光密度(OD)值,血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-17、IgA水平,血液Th17细胞和Tc17细胞比例均高于对照组($P<0.05$),血清ALB和TP水平均低于对照组($P<0.01$)。黄连汤加味中、高剂量组和霉酚酸酯组小鼠24 h尿蛋白水平、尿红细胞个数,血清Scr水平,肾组织IgA OD,血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-17、IgA水平,血液Th17和Tc17细胞比例均低于模型组($P<0.05$),血清ALB和TP水平高于模型组($P<0.01$);黄连汤加味低剂量组小鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-17、IgA水平,血液Th17和Tc17细胞比例均低于模型组($P<0.05$),血清ALB水平高于模型组($P<0.05$)。黄连汤加味低、中剂量组小鼠尿液24 h尿蛋白水平、尿红细胞个数,血清Scr、TNF- α 、IL-6、IL-17、IgA水平,血液Th17和Tc17细胞比例高于霉酚酸酯组($P<0.05$);黄连汤加味低剂量组小鼠血清ALB和TP水平低于霉酚酸酯组($P<0.05$),肾组织IgA OD高于霉酚酸酯组($P<0.01$);黄连汤加味高剂量组小鼠肾组织IgA和C3 OD和血液Th17细胞比例低于霉酚酸酯组($P<0.05$),血液Tc17细胞比例高于霉酚酸酯组($P<0.05$)。结论:黄连汤加味可减轻HSPN小鼠肾脏损伤,减轻体内炎症反应,抑制免疫系统异常激活,其作用机制可能与抑制Th17细胞和Tc17细胞活化有关。

[关键词] 过敏性紫癜性肾炎;黄连汤加味;肾损伤;Th17细胞;Tc17细胞;小鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)08-0024-07

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.08.005

The Effect of Modified Huanglian Decoction (黄连汤加味) on the Activation of Th17 Cells and Tc 17 Cells in Mice with Henoch Schonlein Purpura Nephritis

HU Lian, CHE Hong, ZHAO Bingjie, XIAO Li, LIU Peijia, YI Wenjing, LIU Songshan
(Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu Sichuan 610032, China)

[Abstract] Objective: To explore the effect of modified Huanglian decoction on T helper cell 17 (Th17) and T cytotoxic cell 17 (Tc 17) in mice with henoch schonlein purpura nephritis (HSPN). Methods: Totally 40

*基金项目:四川省中医药管理局课题(2020JC0043)

通信作者:刘松山,男,主任医师,研究方向为血液疾病

Kunming mice were selected to establish a HSPN model. The 30 mice with successful modeling were randomly divided into model group [intragastric administration of bovine serum albumin (BSA) + tail vein injection of lipopolysaccharide (LPS) + subcutaneous injection of carbon tetrachloride (CCl₄)], modified Huanglian decoction low-dose group (7.5 g/kg), modified Huanglian decoction medium-dose groups (15.0 g/kg), modified Huanglian decoction high-dose group (30.0 g/kg), and mycophenolate mofetil group (0.3 g/kg), with 6 mice in each group. In addition, 6 mice were selected as the control group. The mice were given the same amount of double distilled water by gavage, tail vein and subcutaneous injection of the same amount of normal saline in control group. The 24-hour urine protein level, urine red blood cell count, serum creatinine (Scr), albumin (ALB) and total protein (TP) levels were detected by automatic biochemical analyzer. Hematoxylin-eosin (HE) and periodic acid-schiff stain (PAS) staining were used to detect the pathological changes of kidney tissue in mice. The levels of immunoglobulin A (IgA) and complement component 3 (C3) in renal tissue of mice were detected by immunohistochemistry. The serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-17 (IL-17) and IgA were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The proportion of Th17 and Tc17 cells in the blood of mice was detected by flow cytometry. Results: The renal tissue structure was clear in control group, with normal morphology of glomeruli and renal tubules, and there was no congestion or inflammatory cell infiltration in the renal interstitium. In the model group, the volume of glomeruli increased, and the number of cells in the mesangial area and capillary loops significantly increased. The glomeruli were swollen, and the mesangial area widened in model group. The mesangial matrix and cell proliferation were obvious, and the positive expression area percentage of PAS staining significantly increased in model group ($P < 0.01$). Obvious congestion and a large number of inflammatory cell infiltrations were observed in the renal interstitium in model group. In the modified Huanglian decoction groups at various doses and the mycophenolate mofetil group, the degree of congestion and inflammatory cell infiltration in the renal interstitium was significantly reduced, and the degree of mesangial cell and endothelial cell proliferation in glomeruli was significantly improved compared with the model group. The degree of mesangial area proliferation was significantly reduced, with a significant decrease in the positive expression area percentage of PAS staining in modified Huanglian decoction groups at various doses and the mycophenolate mofetil group ($P < 0.05$). The model group showed higher 24-hour urinary protein levels, urine red blood cell count, serum Scr levels, renal tissue IgA and C3 integrated optical density (IOD) values, serum TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, IgA levels, and proportions of Th17 and Tc17 cells than control group ($P < 0.05$), while lower serum ALB and TP levels than control group ($P < 0.01$). The modified Huanglian decoction medium-dose group, modified Huanglian decoction high-dose group and mycophenolate mofetil group showed lower 24-hour urinary protein levels, urine red blood cell count, serum Scr levels, renal tissue IgA IOD, serum TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, IgA levels, and proportions of Th17 and Tc17 cells than model group ($P < 0.05$), while higher serum ALB and TP levels than model group ($P < 0.01$). The modified Huanglian decoction low-dose group showed lower serum TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, IgA levels, and proportions of Th17 and Tc17 cells than model group ($P < 0.05$), while higher serum ALB levels than model group ($P < 0.05$). The modified Huanglian decoction low-dose group and modified Huanglian decoction medium-dose group showed higher 24-hour urinary protein levels, urine red blood cell count, serum Scr, TNF- α , IL-6, IL-17, IgA levels, and proportions of Th17 and Tc17 cells than mycophenolate mofetil group ($P < 0.05$). The modified Huanglian decoction low-dose group showed lower serum ALB and TP levels than mycophenolate mofetil group ($P < 0.05$), while higher renal tissue IgA IOD than mycophenolate mofetil group ($P < 0.01$). The modified Huanglian decoction high-dose group showed lower renal tissue IgA and C3 IOD values and proportion of Th17 cells than mycophenolate mofetil group ($P < 0.05$), while higher proportion of Tc17 cells than mycophenolate mofetil group ($P < 0.05$). Conclusions: Modified Huanglian decoction can alleviate kidney injury in HSPN mice, reduce systemic inflammatory responses, and suppress abnormal immune system activation. Its mechanism of action may be related to the inhibition of Th17 and Tc17 cell activation.

[Keywords] allergic purpura nephritis; modified Huanglian decoction; kidney injury; Th17 cells; Tc17 cells; mouse

过敏性紫癜性肾炎(henoch-schonlein purpura nephritis, HSPN)是儿童期最常见的由免疫球蛋白A(IgA)介导的全身性小血管炎,其临床特征包括可触及的紫癜性皮疹、关节炎、

腹痛和肾脏受累等^[1],也是儿童继发性肾炎的主要原因^[2]。HSPN以皮肤紫癜、血尿和(或)蛋白尿为主要临床表现。近些年,HSPN在我国的发病呈增加趋势,已成为严重危害儿童健康

的疾病之一^[3]。目前,HSPN治疗以抗凝药物、糖皮质激素及免疫抑制剂为主,一般预后良好,但易反复发作,部分患儿病程迁延,并可进展至终末期肾病,严重危害患儿生命健康^[4]。因此,寻找疗效更好、肾脏危害更少的治疗方法是近年来HSPN的研究热点。辅助性T细胞17(T helper cell 17,Th17)是T辅助细胞的一个亚群,在宿主防御和各种人类自身免疫和炎症疾病的发病机理中发挥重要作用,与多种自身免疫性疾病相关联。Th17细胞可分泌白细胞介素-17(IL-17),白细胞介素-17F(IL-17F)和白细胞介素-22(IL-22)等细胞因子,并通过广泛分布的IL-17和IL-22受体诱导大量组织反应,参与许多自身免疫性疾病^[5-6]。研究表明,IL-17是T细胞介导的自身免疫性疾病病理学中的关键致病细胞因子^[7],并与许多其他炎症性疾病的发病机理有关。IL-17途径是许多自身免疫性疾病和慢性炎症疾病的关键药物靶点^[8]。除Th17细胞外,与其相似但杀伤力和繁殖力较低的细胞毒性T淋巴(cytotoxic T lymphocyte,CD8⁺T)细胞也可产生IL-17,此群细胞通常称为细胞毒性T细胞17(cytotoxic T cell,Tc17)。

从中医角度来看,HSPN的临床表现可归属于“葡萄疫”“血证”“尿浊”等范畴^[9]。尿血及紫斑的发生是由于热邪郁于皮肤,与气血相搏,血行失常,溢于脉外而致,而水肿症状及反复发作、迁延难愈与肺脾肾三脏功能失调有关^[10]。中医药通过调节机体免疫在改善HSPN患儿相关症状及减轻西药副作用方面有独特的认识和优势。黄连汤来源于《伤寒杂病论》,由黄连、人参、干姜、桂枝、半夏、大枣、甘草组成,主治胸中有热、胃中有邪之寒热错杂证^[11],可根据患者的具体症状和体质,加入其他药材以增强或调整其疗效。黄连汤加味是在黄连汤基础上加入了白芍、川楝子、延胡索、三七。然而,黄连汤加味对HSPN的治疗作用及机制尚不明确。因此,本研究以IL-17为切入点,通过建立HSPN小鼠模型,观察黄连汤加味对HSPN小鼠的治疗作用及对肾脏组织的保护作用,阐述黄连汤加味通过Th17细胞和Tc17细胞调控HSPN的具体机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级昆明小鼠,体质量为20~22 g,购自成都达硕生物科技有限公司,动物生产许可证号:SCXK(川)2020-0030。动物质量合格证号:51203500033100。饲养环境为屏障系统,控制动物实验室温度在20~22℃,相对湿度为(55~75)%,明暗各12 h交替照明。实验期间,自由饮食饮水,定期更换饲料与饮用水。所有小鼠适应性喂养7 d后正式实验。本实验经华西医院实验动物伦理委员会批准后执行,批件编号:20230526002。

1.2 药物 黄连10 g,炮姜5 g,清半夏10 g,桂枝5 g,党参20 g,白芍20 g,川楝子10 g,延胡索15 g,大枣10枚,三七3 g,炙甘草15 g。由成都中医药大学附属医院中药房提供,鉴定人为成都中医药大学附属医院副主任中药师黄永亮。霉酚酸酯(阿斯利康制药有限公司,规格:20 mg/片,批号:1902063)。

1.3 试剂 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒均购自上海茁彩生物科技有限公司,包括:小鼠IL-1 β ELISA试剂盒(批号:ZC-37974)、小鼠IL-17 ELISA试剂盒(批号:ZC-37932)、小鼠IL-6 ELISA试剂盒(批号:ZC-37988)、小鼠TNF- α ELISA

试剂盒(批号:ZC-39024)和小鼠IgA ELISA试剂盒(批号:ZC-38494);IgA抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号:A0331),C3抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号:BS-2934R);PE anti-mouse(抗小鼠)IL-17A(批号:506903)、APC anti-mouse CD4抗体(批号:100412)和Brilliant Violet 510TM anti-mouse CD8a(批号:100752)均购自美国BioLegend公司;牛血清白蛋白(BSA,批号:V900933)、脂多糖(LPS,批号:L4391)和四氯化碳(CCl₄,批号:488488)均购自美国Sigma公司。

1.4 主要仪器 全自动生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司,型号:BS-240);光学显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司,型号:BA410);水平离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司,型号:L500);倒置生物显微镜(德国徕卡公司,型号:DMI1);切片仪(德国Leica恩斯特·徕茨公司,型号:RM2016);流式细胞仪[贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司,型号:cytoflex];二氧化碳培养箱(三洋电机国际贸易有限公司,型号:MCO-15AC);酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司,型号:spectra max PLUS 384]。

1.5 方法

1.5.1 动物分组 小鼠适应性饲养5 d后分为对照组($n=6$)和造模组($n=40$)。

1.5.2 模型制备 采用灌胃BSA+尾静脉注射LPS+皮下注射CCl₄的方法建立小鼠HSPN模型^[12]。10%免疫原性BSA用蒸馏水配制,灌胃4 mL/kg,隔天一次,连续8周;皮下注射蓖麻油0.3 mL+CCl₄ 0.1 mL,1次/周,连续9周。以0.9% NaCl溶液配制0.025% LPS,于第6、8、10、12周尾静脉注射0.2 mL。同时,从第9周开始至第12周末,每隔1天灌注25%干姜水10 mL/kg。对照组小鼠灌胃等量蒸馏水,皮下注射和尾静脉注射等量0.9%氯化钠溶液。12周后,小鼠出现血尿和蛋白尿,则说明造模成功。将出现血尿和蛋白尿的HSPN小鼠随机挑选30只,分为模型组、黄连汤加味低剂量组、黄连汤加味中剂量组、黄连汤加味高剂量组、霉酚酸酯组,每组6只。

1.5.3 给药方法 黄连汤加味第一煎加药材量10倍量水,煎煮0.5 h;第二煎加药材量8倍量水,煎煮0.5 h。合并2次煎液,浓缩至0.6 g/mL。取霉酚酸酯1片研磨成粉后加入333 μ L双蒸水中,制备成生药浓度60 mg/mL的水溶液。以上药液均置于4℃冰箱保存备用。模型制备成功后,按照“试验动物与人按表面积等效量换算比率”换算小鼠的等效剂量,从第13周开始,黄连汤加味低、中、高剂量组分别灌胃7.5、15.0、30.0 g/kg的黄连汤,霉酚酸酯组灌胃0.3 g/kg的霉酚酸酯,1次/d,0.1 mL/次,连续灌胃4周。对照组小鼠及模型组小鼠在第13周起,给予等量双蒸水灌胃。

1.5.4 取材 各组小鼠末次给药后,收集各组小鼠24 h尿液,同时分离血清。戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉小鼠后,将其颈椎脱臼处死。取小鼠肾组织,一部分采用4%多聚甲醛溶液固定,另一部分快速置于-80℃,保存备用。

1.6 观察指标

1.6.1 全自动生化仪分析肾功能 取各组小鼠24 h尿液,同时分离血清,采用全自动生化分析仪测定小鼠24 h尿蛋白、尿

红细胞数和血清中总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)和肌酐(Scr)的含量。

1.6.2 HE染色观察小鼠肾组织病变 取固定好的小鼠肾组织,制作石蜡切片并行HE染色,中性树胶封片,光学显微镜观察小鼠肾组织病理变化。

1.6.3 过碘酸雪夫(PAS)染色观察小鼠肾组织系膜细胞增殖和细胞浸润 取固定好的小鼠肾组织,制作石蜡切片并行PAS染色,光学显微镜观察小鼠肾组织系膜细胞增殖和细胞浸润情况。

1.6.4 免疫组化法检测小鼠肾组织IgA和补体C3沉积 取固定好的小鼠肾组织,制作石蜡切片。经脱蜡至水、抗原修复、阻断内源性过氧化物酶及血清封闭后,滴加IgA和C3一抗,4℃过夜,PBS冲洗3次后滴加二抗37℃孵育30 min,DAB(二氨基联苯胺)显色,苏木素复染细胞核,脱水,中性树胶封片。使用显微摄像系统对切片进行图像采集。

1.6.5 ELISA法检测血清中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-17、IgA 根据ELISA试剂盒说明书测定血清中的TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-17、IgA水平。使用全波长酶标仪在450 nm条件下检测吸光度。

1.6.6 流式细胞术检测血液中Th17和Tc17细胞的活化 将小鼠血液加入3倍体积的红细胞裂解液,室温裂解5 min,PBS洗涤两次,离心收集细胞沉淀备用。每管加500 μ L DMEM培养基重悬细胞,加入细胞激活混合液(Cell Activation Cocktail)(1 μ L),37℃孵育4 h,350 \times g离心5 min,弃上清液。100 μ L PBS重悬细胞,每管加入CD4和CD8,4℃避光孵育30 min,300 \times g离心5 min,弃上清液,PBS洗涤后300 \times g离心5 min,弃上清液,每管加入固定缓冲液(Fixation Buffer)500 μ L,室温孵育20 min,350 \times g离心5 min,弃上清液。每管加入250 μ L细胞内染色永久洗涤缓冲液(Intracellular Staining Perm Wash Buffer)洗涤两次,350 \times g离心5 min,100 μ L细胞内染色永久洗涤缓冲液重悬细胞,每管加入IL-17,4℃避光孵育30 min,350 \times g离心5 min,弃上清液,每管加入250 μ L细胞内染色永久洗涤缓冲液洗涤,350 \times g离心5 min,弃上清液,每管加入300 μ L细胞内染色永久洗涤缓冲液洗涤重悬细胞,上机检测分析。采用CytExpert软件分析流式结果。

1.7 统计学方法 采用SPSS 29.0统计分析软件进行数据分析。计量资料用“均数 \pm 标准差”($\bar{x}\pm s$)表示,多组间数据比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD- t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 黄连汤加味对HSPN小鼠肾功能的影响 模型组小鼠24 h尿蛋白水平、尿红细胞个数和血清Scr水平均高于对照组($P<0.05$),血清ALB和TP水平均低于对照组($P<0.01$);黄连汤加味中剂量组、黄连汤加味高剂量组和霉酚酸酯组小鼠24 h尿蛋白水平、尿红细胞个数、血清Scr水平均低于模型组($P<0.01$),血清ALB和TP水平均高于模型组($P<0.01$);黄连汤加味低剂量组和黄连汤加味中剂量组小鼠24 h尿蛋白水平、尿红细胞个数和血清Scr水平均高于霉酚酸酯组,黄连汤加味高剂量组小鼠尿红细胞个数高于霉酚酸酯组,黄连汤加味低剂量组血清ALB和TP水平均低于霉酚酸酯组($P<0.05$)。(见表1)

2.2 黄连汤加味对小鼠肾组织病理学变化的影响 HE染色结果显示,对照组小鼠肾组织结构清晰,肾小球、肾小管形态正常,肾间质无充血及炎症细胞浸润;模型组小鼠肾小球体积增大,系膜区及毛细血管袢内细胞数量显著增多(以系膜细胞和内皮细胞增生为主),肾小球肿大,肾间质可见明显充血且伴有炎症细胞浸润;黄连汤加味高、中剂量组和霉酚酸酯组小鼠肾间质充血及炎症细胞浸润程度显著减轻,肾小球内系膜细胞和内皮细胞增生程度较模型组明显改善;黄连汤加味低剂量组小鼠肾间质可见轻度充血,肾小球内细胞数量增多程度较模型组有所减轻。

PAS染色结果显示,与对照组比较,模型组小鼠肾组织系膜区增宽,系膜基质及细胞增生明显,PAS染色阳性表达面积百分率显著升高($P<0.01$);与模型组比较,黄连汤加味高、中、低剂量组和霉酚酸酯组小鼠系膜区增生程度均显著减轻,PAS染色阳性表达面积百分率显著降低($P<0.05$),其中黄连汤加味高剂量组系膜区PAS阳性面积最低,改善效果最为显著。(见图1、表2)

表2 各组小鼠肾脏组织 PAS 染色阳性表达面积百分率比较 ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	<i>n</i>	给药剂量(g/kg)	PAS染色阳性表达面积百分率
对照组	6		2.40 \pm 1.17
模型组	6		19.14 \pm 5.83 ^a
霉酚酸酯组	6	0.3	5.95 \pm 0.56 ^b
黄连汤加味低剂量组	6	7.5	12.14 \pm 0.14 ^{b,c}
黄连汤加味中剂量组	6	15.0	8.47 \pm 0.49 ^{b,c}
黄连汤加味高剂量组	6	30.0	4.23 \pm 1.08 ^{b,c}

注:与对照组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$;与霉酚酸酯组比较,^c $P<0.01$ 。

表1 各组小鼠肾功能指标水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	给药剂量(g/kg)	24 h尿蛋白/mg	尿红细胞计数/(个/ μ L)	TP/(g/L)	ALB/(g/L)	Scr/(g/L)
对照组	6		15.05 \pm 1.93	19.81 \pm 2.27	74.86 \pm 7.27	37.05 \pm 2.97	57.78 \pm 8.72
模型组	6		86.36 \pm 10.36 ^a	62.96 \pm 8.56 ^a	50.36 \pm 6.09 ^a	24.03 \pm 3.02 ^a	80.25 \pm 11.19 ^a
霉酚酸酯组	6	0.3	37.00 \pm 8.74 ^c	24.48 \pm 4.75 ^c	62.63 \pm 4.65 ^c	34.88 \pm 3.34 ^c	43.51 \pm 9.06 ^c
黄连汤加味低剂量组	6	7.5	79.66 \pm 6.22 ^e	56.75 \pm 8.25 ^e	54.66 \pm 4.91 ^d	28.91 \pm 5.39 ^{b,d}	74.26 \pm 8.85 ^e
黄连汤加味中剂量组	6	15.0	62.91 \pm 9.33 ^{c,e}	43.61 \pm 8.9 ^{c,e}	59.76 \pm 2.73 ^c	31.26 \pm 2.54 ^c	62.75 \pm 10.12 ^{b,e}
黄连汤加味高剂量组	6	30.0	40.65 \pm 10.36 ^c	32.81 \pm 7.6 ^{c,d}	64.8 \pm 2.13 ^c	35.86 \pm 5.44 ^c	46.46 \pm 9.47 ^c
<i>F</i>			64.452	35.742	17.712	9.328	1.981
<i>P</i>			0.000	0.000	0.000	0.000	0.110

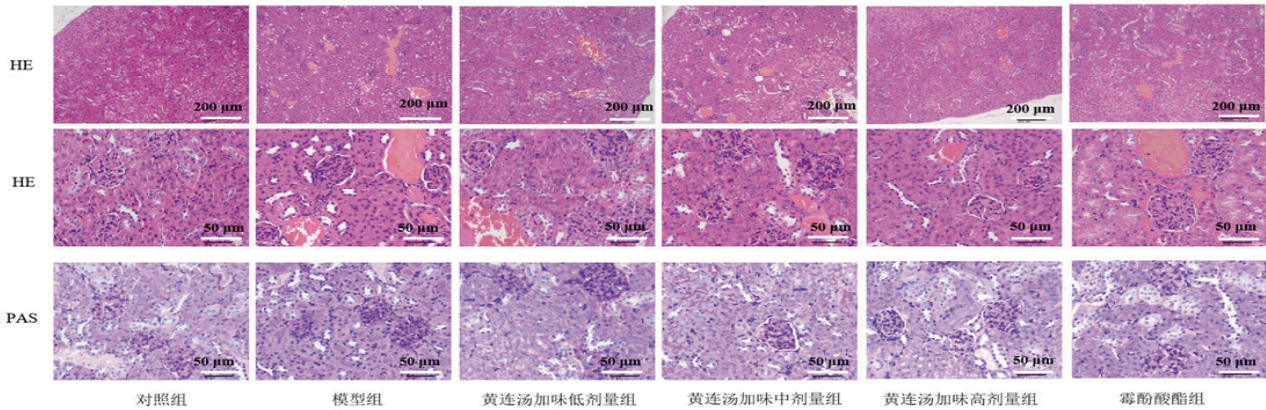
注:与对照组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$;与霉酚酸酯组比较,^d $P<0.05$,^e $P<0.01$ 。

2.3 黄连汤加味对小鼠肾组织IgA和C3沉积的影响 免疫组化结果显示,模型组小鼠肾组织IgA、C3积分光密度(OD)值均高于对照组($P<0.01$);黄连汤加味中剂量组、黄连汤加味高剂量组和霉酚酸酯组小鼠肾组织IgA的 OD值均低于模型组($P<0.05$);黄连汤加味高剂量组小鼠肾组织C3的OD值低于模型组($P<0.01$);黄连汤加味低剂量组小鼠肾组织IgA的OD值高于霉酚酸酯组,黄连汤加味高剂量组小鼠肾组织IgA和C3的OD值均低于霉酚酸酯组($P<0.05$)。(见图2、表3)

表 3 各组小鼠肾组织 IgA、C3 的 OD 值比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	给药剂量(g/kg)	OD值	
			IgA	C3
对照组	6		0.03±0.01 ^a	0.10±0.03
模型组	6		0.41±0.05 ^a	0.41±0.03 ^a
霉酚酸酯组	6	0.3	0.24±0.03 ^{ac}	0.30±0.03 ^{ac}
黄连汤加味低剂量组	6	7.5	0.40±0.08 ^{ad}	0.37±0.03 ^{abd}
黄连汤加味中剂量组	6	15.0	0.31±0.03 ^{aed}	0.35±0.02 ^{aed}
黄连汤加味高剂量组	6	30.0	0.11±0.02 ^{ed}	0.21±0.02 ^{aed}

注:与对照组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$;与霉酚酸酯组比较,^d $P<0.01$ 。



注:HE染色的放大倍数分别为100倍和400倍;PAS染色的放大倍数为400倍。

图 1 各组小鼠肾组织 HE 染色和 PAS 染色

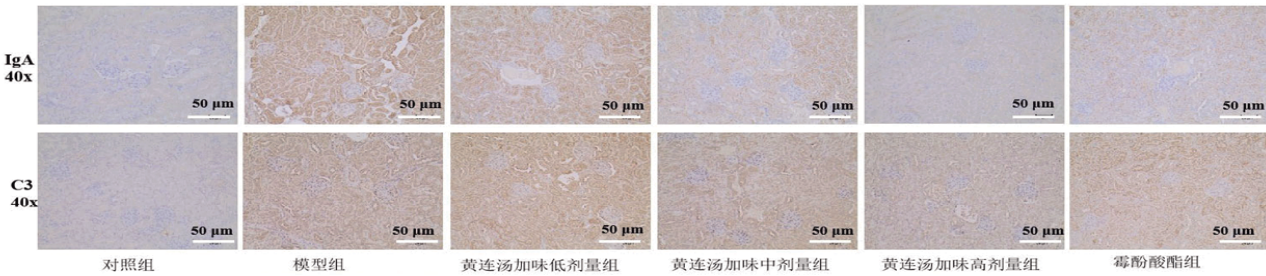


图 2 各组小鼠肾组织 IgA 和 C3 表达水平 (×400)

表 4 各组小鼠血清 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-17 和 IgA 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	给药剂量(g/kg)	TNF-α/(pg/mL)	IL-1β/(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)	IL-17/(pg/mL)	IgA/(mg/mL)
对照组	6		31.53±4.21	7.49±1.78	29.08±3.51	45.89±6.13	9.63±1.67
模型组	6		57.85±5.47 ^a	14.58±2.91 ^a	87.37±7.89 ^a	193.78±27.56 ^a	38.85±5.7 ^a
霉酚酸酯组	6	0.3	29.01±3.44 ^c	8.22±1.44 ^c	34.23±3.91 ^c	97.67±20.92 ^c	17.66±1.93 ^c
黄连汤加味低剂量组	6	7.5	51.12±6.01 ^{bd}	12.38±1.65 ^d	81.56±3.45 ^d	164.24±27.62 ^{bd}	32.73±6.01 ^{bd}
黄连汤加味中剂量组	6	15.0	45.21±6.03 ^{cd}	9.62±1.33 ^c	59.71±4.88 ^{cd}	156.63±18.69 ^{cd}	26.37±3.5 ^{cd}
黄连汤加味高剂量组	6	30.0	30.5±4.06 ^c	8.43±1.61 ^c	34.87±5.59 ^c	119.04±18.75 ^c	19.15±2.53 ^c

注:与对照组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$;与霉酚酸酯组比较,^d $P<0.01$ 。

表5 各组小鼠血液 Th17 和 Tc17 细胞比例比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	给药剂量/(g/kg)	Th17细胞	Tc17细胞
对照组	6		1.30±0.18	0.58±0.07
模型组	6		4.64±0.23 ^a	2.69±0.11 ^a
霉酚酸酯组	6	0.3	1.99±0.10 ^b	0.90±0.07 ^b
黄连汤加味低剂量组	6	7.5	3.25±0.06 ^{b,c}	1.78±0.03 ^{b,c}
黄连汤加味中剂量组	6	15.0	2.84±0.15 ^{b,c}	1.45±0.10 ^{b,c}
黄连汤加味高剂量组	6	30.0	1.66±0.07 ^{b,c}	1.14±0.07 ^{b,c}

注:与对照组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$;与霉酚酸酯组比较,^c $P<0.01$ 。

3 讨 论

HSPN是过敏性紫癜(henoch-schonlein purpura, HSP)所致的肾损害,其早期症状不明显,常表现为短暂且孤立的显微镜下血尿。HSPN进展迅速,很快即进展为肾病综合征、肾小球肾炎和肾功能不全,甚至发展为终末期肾病^[13]。中医学认为,本病得之于外邪侵袭、血热内扰、诸热下移、瘀血内阻、邪毒内盛和脏腑虚损等方面^[14]。此外,病久水亏肾燥,肾脏开阖不利,常兼夹它邪,或累及它脏,应以滋肾润燥、清热生津为主,针对兼夹证病因及病位,配合活血化瘀、补肝健脾、益气温阳等治法^[15]。《幼科金针》云“葡萄疫……乃不正之气使然,小儿稍有寒热,忽生青紫斑点,大小不一”。《证治汇补》云“热极沸腾发为斑,热则伤血,血热不散,里实表虚,出于皮肤而为斑”。《医宗金鉴》云“小儿水肿,皆因水停于脾、肺二经”。本团队在总结古籍基础上,结合多年临床经验,认为本病病机为“热”“瘀”“虚”,治疗时应注重疏风清热、活血解毒、补脾益肾。黄连汤是《伤寒杂论》中的经典方剂,主要用于胸膈郁热与脾胃虚寒并存的复杂病机,可治疗胃炎、消化性溃疡、恶性肿瘤和肾衰竭等^[16]。本研究在黄连汤的基础上加入白芍、川楝子、延胡索和三七,组成黄连汤加味。其中,黄连、干姜共为君药,寒热并用,恢复中焦之升降。桂枝、清半夏、党参和白芍为臣药,辛散温通,温中止痛,配合干姜加强温中散寒之功。川楝子、延胡索、三七为佐药,行气活血,化瘀止痛。甘草、大枣为使药,补中缓急,调和诸药。全方共奏清热温中、活血通络、补气摄血之效。

肾功能损伤的严重程度是HSPN预后的关键指标。本研究

采用BSA、LPS、CCL联合注射制作HSPN模型,探讨黄连汤加味对HSPN小鼠肾损伤的改善机制。结果表明,模型组小鼠肾小球体积增大,系膜区及毛细血管袢内细胞数量显著增多,并伴有炎性细胞浸润,24 h尿蛋白水平、尿红细胞数水平、血清Scr含量均显著升高,血清TP、ALB含量显著降低。经不同剂量黄连汤加味干预后,HSPN小鼠肾小球内系膜细胞和内皮细胞增生程度明显改善,24 h尿蛋白水平、尿红细胞数水平、血清Scr含量均显著降低,血清TP、ALB含量显著升高,提示黄连汤加味对HSPN小鼠肾功能损害具有保护作用,且效果呈剂量依赖性。

HSPN的发病机制与感染、遗传、环境和免疫紊乱等多种因素密切相关,国内外学者认为IgA介导的免疫异常是其主要发病机制^[17]。单纯的血清IgA升高并不能引起HSPN,但以IgA为主的免疫复合物在肾脏系膜区及内皮下沉积,能激活补体系统,导致IL-6、IL-8等炎症因子分泌,引发剧烈炎症,从而引起肾脏损伤^[18]。IgA在系膜区的沉积可逆,这为HSPN治疗提供了依据。本研究发现,模型组小鼠肾组织中IgA和补体C3IOD值显著增加,血清中炎症因子TNF- α 、IL-1 β 和IL-6水平亦显著增加。黄连汤加味干预后,小鼠肾组织中IgA和补体C3的IOD值,以及血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和IgA水平均显著降低,表明黄连汤加味可抑制HSPN小鼠免疫系统异常激活,减轻体内炎症反应,发挥免疫调节作用。

IL-17作为一种炎症细胞因子,在感染、肿瘤和自身免疫病等疾病发生早期发挥促炎和组织修复等作用^[19]。有研究^[20]发现,HSPN患者肾小球和肾小管中IL-17表达均显著增加,且IL-17表达与尿蛋白/肌酐比值显著相关。IL-17是Th17细胞和Tc17细胞的主要效应分子^[21]。而Th17在固有免疫应答、某些炎症反应以及自身免疫病中均发挥重要作用^[22]。在初始T细胞向Th17细胞分化过程中,IL-6首先启动Th17分化,之后Th17产生的IL-21自分泌效应扩大分化规模,而活化的Th17细胞又导致TNF- α 、IL-1 β 等产生增多,进而促进肾小球的炎症反应^[23-24]。Tc17细胞在功能上与Th17细胞类似,但杀伤力及增殖力相对较低,局部微环境中各种免疫炎症因子均有促进其增殖的作用^[25]。由此可知,Th17和Tc17是炎症反应的中心环节,是调控细胞因子的重要途径,参与炎症细胞因子的表达及炎

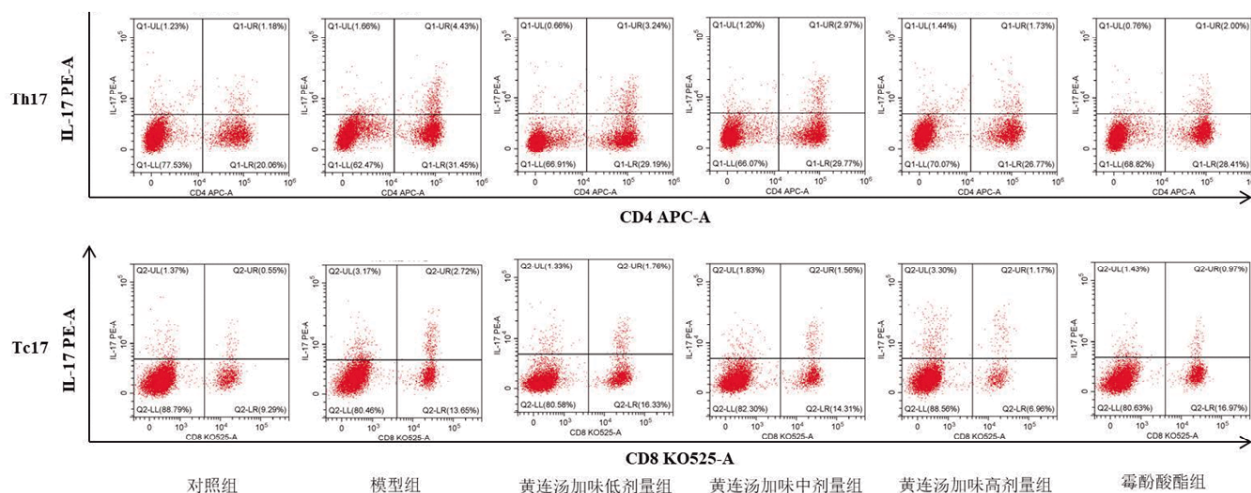


图3 各组小鼠血液 Th17 和 Tc17 细胞比例

症反应的延续和扩大。本研究发现,HSPN模型小鼠血清中IL-17水平显著上调,血液Th17和Tc17细胞比例显著上调。黄连汤加味干预后,小鼠血清IL-17水平及血液Th17和Tc17细胞比例均显著降低,表明黄连汤加味可抑制HSPN小鼠Th17和Tc17细胞活化,从而降低细胞因子IL-17的分泌。

综上所述,黄连汤加味可减轻HSPN小鼠炎症和肾组织病理损伤,缓解肾脏IgA和补体C3沉积,抑制炎症反应,调节免疫功能,其机制可能与抑制Th17和Tc17细胞活化,以及下调IL-17表达有关。

参考文献

- [1] 吴瑞,李伟霞,王晓艳,等.基于中、西医病症特点的过敏性紫癜动物模型分析[J].中药新药与临床药理,2023,34(3):386-390.
- [2] SESTAN M, JELUSIC M. Diagnostic and management strategies of IgA vasculitis nephritis/henoch-schönlein Purpura nephritis in pediatric patients: Current perspectives[J]. Pediatric Health Med Ther,2023,14:89-98.
- [3] PIRAM M, MALDINI C, BISCARDI S, et al. Incidence of IgA vasculitis in children estimated by four-source capture-recapture analysis: A population-based study[J]. Rheumatology (Oxford),2017,56(8):1358-1366.
- [4] OZEN S, MARKS S D, BROGAN P, et al. European consensus -based recommendations for diagnosis and treatment of immunoglobulin A vasculitis-the SHARE initiative[J]. Rheumatology (Oxford), 2019, 58 (9): 1607 - 1616.
- [5] AKHTER S, TASNIM F M, ISLAM M N, et al. Role of Th17 and IL-17 cytokines on inflammatory and auto-immune diseases[J]. Curr Pharm Des,2023,29(26):2078-2090.
- [6] GILLIET M, MODLIN R L. Immunobiology of IL-26[J]. J Invest Dermatol,2024,144(6):1217-1222.
- [7] Choi S H, Santin A, Myers J T, et al. Piezo1 restrains proinflammatory response but is essential in T-cell-mediated immunopathology[J]. J Leukoc Biol,2025,117(3):qiae242.
- [8] MILLS K H G. IL-17 and IL-17-producing cells in protection versus pathology[J]. Nat Rev Immunol,2023,23(1):38-54.
- [9] 袁振华,任献青,丁樱,等.儿童过敏性紫癜性肾炎从“伏毒损络”论治探微[J].中国中医基础医学杂志,2022,28(9):1524-1527.
- [10] 王龙,张霞,任献青,等.中医阶梯治疗方案治疗血尿和蛋白尿型儿童紫癜性肾炎的疗效观察[J].时珍国医国药,2020,31(5):1167-1169.
- [11] 程燕彬,杨宗保,王英杰,等.加味黄连汤对胃溃疡小鼠胃黏膜组织代谢响应机制研究[J].中华中医药杂志,2022,37(3):1336-1341.
- [12] 邱成英,邓颖云,卢磊,等.紫草素对紫癜性肾炎大鼠肾脏的保护作用[J].中国临床药理学杂志,2020,36(20):3250-3252,3256.
- [13] 刘畅,董恒,姚佳,等.腹型过敏性紫癜临床研究结局指标现状分析[J].中国循证心血管医学杂志,2023,15(1):26-30.
- [14] 王晖,宋立群.中医药治疗过敏性紫癜性肾炎的研究进展[J].中华中医药杂志,2023,38(3):1180-1184.
- [15] 于欣田,孙冬冬,胡红蕾,等.刁娟娟治疗阴盛火旺型紫癜性肾炎经验[J].中医导报,2022,28(6):128-129,140.
- [16] 王晓丽,彭梅梅,陈琪,等.基于UPLC-Q-TOF-MS/MS技术的经典名方黄连汤化学成分鉴定及网络药理学研究[J].中国中药杂志,2023,48(5):1249-1263.
- [17] REAMY B V, SERVEY J T, WILLIAMS P M. Henoch-schönlein Purpura (IgA vasculitis): Rapid evidence review[J]. Am Fam Physician,2020,102(4):229-233.
- [18] SUGINO H, SAWADA Y, NAKAMURA M. IgA vasculitis: Etiology, treatment, biomarkers and epigenetic changes[J]. Int J Mol Sci,2021,22(14):7538.
- [19] FU S Q, GUO Y J, SONG C L. Expression and significance of endothelial microparticles in children with Henoch-Schönlein Purpura[J]. Chin J Contemp Pediatr,2018,20(10):831-834.
- [20] GÜLHAN B, ORHAN D, KALE G, et al. Studying cytokines of T helper cells in the kidney disease of IgA vasculitis (Henoch - Schönlein Purpura)[J]. Pediatr Nephrol, 2015,30(8):1269-1277.
- [21] BUNTE K, BEIKLER T. Th17 cells and the IL-23/IL-17 axis in the pathogenesis of periodontitis and immune-mediated inflammatory diseases[J]. Int J Mol Sci,2019,20(14):3394.
- [22] PENG Y, DENG X, ZENG Q M, et al. Tc17 cells in autoimmune diseases[J]. Chin Med J (Engl),2022,135(18):2167-2177.
- [23] SHI Y J, WEI B, LI L J, et al. Th17 cells and inflammation in neurological disorders: Possible mechanisms of action[J]. Front Immunol,2022,13:932152.
- [24] BRUNO M, DAVIDSON L, KOENEN H J P M, et al. Immunological effects of anti-IL-17/12/23 therapy in patients with psoriasis complicated by Candida infections[J]. J Invest Dermatol,2022,142(11):2929-2939.e8.
- [25] LIU J, CHANG H W, HUANG Z M, et al. Single-cell RNA sequencing of psoriatic skin identifies pathogenic Tc17 cell subsets and reveals distinctions between CD8+ T cells in autoimmunity and cancer[J]. J Allergy Clin Immunol,2021,147(6):2370-2380.

(收稿日期:2024-11-27 编辑:刘国华)