

DOI 10.19656/j.cnki.1002-2406.20230701

实验研究

基于IL-23/IL-17轴探讨消脂化纤汤联合BM-MSCs移植对实验性NASH肝硬化小鼠的作用效应

杨芳丽¹, 王昕¹, 夏艳青¹, 韩金孝¹, 姚凝²✉

(1. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃中医药大学第一临床医学院, 甘肃 兰州 730000)

【摘要】目的:基于IL-23/IL-17轴探讨消脂化纤汤联合骨髓间充质干细胞(BM-MSCs)移植对实验性非酒精性脂肪性肝炎(NASH)肝硬化小鼠的作用。方法:56只健康SPF级C57BL/6小鼠随机选出8只用于骨髓间充质干细胞的分离与培养,8只小鼠作为空白对照组,其余40只小鼠采用蛋氨酸胆碱缺乏饮食(MCD)联合10%四氯化碳(CCl_4 :橄榄油=1:9)腹腔注射共8周制备实验性NASH肝硬化小鼠模型。造模成功后将其分为模型组、自然恢复组、中药干预组、BM-MSCs移植组和中药干预联合BM-MSCs移植组。BM-MSCs移植组经尾静脉注射BM-MSCs,中药干预组给予消脂化纤汤方灌胃,中药干预联合BM-MSCs移植组予以消脂化纤汤方灌胃联合尾静脉注射BM-MSCs。BM-MSCs移植在第9周进行,灌胃均为每日2次,连续4周,12周末处死小鼠并采集血液及标本。采用全自动生化分析仪检测血清生化指标(ALT、AST、ALB),ELISA法测定血清及肝组织炎症因子IL-23、IL-17水平,ELISA法测定血清及肝组织中肝细胞再生增强因子(ALR)表达,RT-qPCR法检测肝脏淋巴细胞中IL-17、IL-23 mRNA的表达。结果:小鼠一般状态观察,与空白对照组比较,模型组小鼠精神萎靡,活动减少,毛色暗,进食减少,体质量逐渐降低;各干预组较模型组均有不同程度改善;与空白对照组比较,模型组和自然恢复组小鼠血清ALT及AST活性、血清及肝组织炎症因子(IL-23、IL-17)水平、肝脏淋巴细胞中IL-17和IL-23 mRNA相对表达水平明显升高($P < 0.05$),血清及肝组织ALR水平、ALB含量降低($P < 0.05$);与模型组比较,中药干预组、BM-MSCs移植组、中药干预联合BM-MSCs移植组小鼠血清ALT及AST活性、血清及肝组织炎症因子(IL-23、IL-17)水平、肝脏淋巴细胞中IL-17和IL-23 mRNA相对表达水平明显降低($P < 0.01$),血清及肝组织ALR水平、ALB含量升高($P < 0.01$);与BM-MSCs移植组和中药干预组比较,中药干预联合BM-MSCs移植组改善最为明显($P < 0.05$)。结论:消脂化纤汤联合BM-MSCs移植对改善实验性NASH肝硬化小鼠肝脏功能、促进BM-MSCs移植转/分化及肝脏细胞再生具有良好效应,其机制可能与抑制机体IL-23/IL-17炎症轴过度激活,改善肝脏免疫微环境相关。

【关键词】消脂化纤汤;BM-MSCs;IL-23/IL-17轴;非酒精性脂肪性肝炎;肝硬化

【引用格式】

杨芳丽,王昕,夏艳青,等.基于IL-23/IL-17轴探讨消脂化纤汤联合BM-MSCs移植对实验性NASH肝硬化小鼠的作用效应[J].中医药信息,2023,40(7):1-6.

YANG F L, WANG X, XIA Y Q, et al. Effect of Xiaozhi Huaxian Decoction combined with BM-MSCs transplantation on experimental NASH cirrhosis mice based on IL-23/IL-17 axis[J]. Information on TCM, 2023, 40(7):1-6.

基金项目:国家自然科学基金项目(82160845);甘肃省自然科学基金项目(20JR5RA181);甘肃省兰州市城关区科技计划项目(2021-2-5);甘肃中医药大学科学研究与创新基金项目(KCZD2018-1)

第一作者简介:杨芳丽(1997-),女,硕士研究生,主要研究方向:中西医结合消化病研究。

✉**通信作者简介:**姚凝(1978-),女,副教授,主要研究方向:代谢相关脂肪性肝病基础与临床研究。

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)已经成为全球第一大肝脏疾病^[1-2]。据统计,全球NAFLD成人发病率约为25%^[3],我国成人非酒精性脂肪性肝炎(NASH)患者10年内肝硬化发生率高达15%~25%,是主要的致死性原因之一^[4]。目前,肝脏移植是唯一有效治疗终末期肝硬化的理想手段,然而由于肝移植所需肝源缺乏及一系列相关并发症、后续费用等原因,极大地限制了其应用,临床迫切需要寻找行之有效的策略进行临床替代治疗^[5]。

干细胞具有自我更新能力和多向分化潜能,能在特定条件下分化为不同类型的细胞^[6]。近年来,以干细胞移植为中心的再生医学发展飞速,已成为最具潜力的肝移植替代治疗手段^[7]。研究显示,BM-MSCs有助于减轻肝脏炎症性反应,改善凝血功能,刺激内源性肝祖细胞分化和增殖,促进肝脏组织修复等^[8]。消脂化纤汤是基于传统经方二陈汤和膈下逐瘀汤化裁而成,课题组前期研究显示,其可通过下调炎症细胞因子,明显改善NASH肝脏损伤;同时显著改善NASH肝硬化患者机体胰岛素抵抗状态,降低甘油三酯水平和肝硬化程度^[9]。

消脂化纤汤联合BM-MSCs移植,是否可以促进肝细胞再生,协同促进NASH肝硬化肝脏功能恢复,尚不明确。本研究采用MCD饮食联合CCl₄诱导小鼠NASH肝硬化模型,探讨消脂化纤汤联合BM-MSCs移植作用效应及可能机制,为临床肝硬化救治提供新的思路与策略。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级C57BL/6健康雄性小鼠(兰州大学实验动物中心),6~7周龄,体质量20~22g,动物生产许可证号:SCXK(甘)2018-0002。实验小鼠分笼饲养,饲养于室温(23±2)℃、相对湿度(50±5)%、12h光照/12h黑暗的环境中,定期更换饲料,适应性喂养1周,进行后续实验。

1.2 实验试剂

消脂化纤汤由甘肃中医药大学附属医院提供。IL-17、IL-23、ALR检测试剂盒(批号:2205M17、2205M29、2205M39,中国江苏菲亚生物科技有限公司);Trizol试剂(批号:343910,美国Invitrogen公司);逆转录试剂盒(批号:05252603)、荧光定量试剂盒(批号:05250410)(中国上海近岸科技有限公司);0.25%胰酶(含EDTA)溶液、L-DMEM培养基、胎牛血清(美国Gibco公司);分析纯四氯化碳(上海新中化学科技有限公司);橄榄油(广州甘达)。

1.3 实验仪器

超净工作台(美国Thermo公司);冰箱(中国海尔);电子天平(中国上海精密科学仪器有限公司);酶标仪(中国南京德铁实验设备有限公司);离心机(美国Allegra 64R);全自动生化分析仪(美国Beckman Coulter);全自动样品快速研磨仪(中国上海净信实业发展有限公司);Quantstudio 3实时定量PCR(美国ThermoFisher)。

2 方法

2.1 动物模型制备

MCD饲料喂养,自由饮水,共12周;第5周起腹腔注射CCl₄油剂溶液(50 μL/10 g, CCl₄:橄榄油=1:9),2次/周,连续注射4周。实验结束前禁食12h,取血液测量血生化等指标,取肝脏称重并进行相关蛋白分析^[10-11]。

2.2 BM-MSCs分离、培养

SPF级6~7周龄C57BL/6健康雄性小鼠,给予2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后处死,无菌条件下取出股骨以及胫骨,置于无菌PBS液去除附着组织;剪断骨端,用DMEM培养液反复冲洗股骨和胫骨髓腔至发白,收集冲洗下来的骨髓细胞悬液于无菌离心管,反复轻柔吹打为单个细胞;400×g离心10min,去除上清液;用DMEM培养液,调整细胞浓度为1×10⁶/mL,接种于25cm³塑料培养瓶,置于5%CO₂饱和湿度培养箱,37℃进行培养;3d后,弃除悬浮细胞,PBS洗涤1次,重新加入新鲜DMEM低糖完全培养液继续培养;2~3d全量换液一次;贴壁细胞接近80%~90%融合时,去除培养液,无菌PBS洗涤;用含0.02%EDTA的0.25%胰蛋白酶消化,调整细胞浓度,进行再次传代培养;重复上述操作,每日在相差倒置显微镜下观察细胞形态和贴壁情况;取第3代BM-MSCs培养细胞待移植^[12]。

2.3 实验分组及干预

2.3.1 实验分组

56只C57BL/6健康雄性小鼠,随机取8只小鼠为BM-MSCs采集组,进行BM-MSCs分离与培养;随机取8只小鼠为空白对照组,正常饮食,至第12周末;余40只小鼠进行模型制备,于第8周末随机取8只小鼠,麻醉后处死,作为模型组。剩余32只小鼠随机分为4组,分别为自然恢复组、中药干预组、BM-MSCs移植组、中药联合BM-MSCs移植组,每组8只,按照组别进行不同方式干预4周。

2.3.2 干预方式

2.3.2.1 自然恢复组

于第9周开始恢复正常饮食,并行尾静脉注射生

理盐水一次(0.2 mL),给予生理盐水灌胃,0.2 mL/次,2次/d,至第12周末。

2.3.2.2 中药干预组

于第9周行尾静脉注射生理盐水一次(0.2 mL),并开始给予消脂化纤汤灌胃,0.2 mL/次,2次/d,至第12周末。

2.3.2.3 BM-MSCs移植组

取第3代BM-MSCs培养细胞,于第9周行尾静脉注射一次(细胞浓度: $1 \times 10^5/0.2$ mL),并开始给予生理盐水灌胃,0.2 mL/次,2次/d,至第12周末。

2.3.2.4 中药干预联合BM-MSCs移植组

取第3代BM-MSCs培养细胞,于第9周行尾静脉注射一次($1 \times 10^5/0.2$ mL),并开始给予消脂化纤汤灌胃,0.2 mL/次,2次/d,至第12周末。

2.4 标本采集

于第12周末,小鼠禁食12 h,自由饮水,腹腔注射10%水合氯醛行全身麻醉。小鼠麻醉后,行眼眶静脉丛采血;血液静置1 h,3 000 r/min条件下离心10 min,制备血清。无菌低温条件下充分暴露小鼠肝脏,取肝右叶组织1 g,制备肝脏组织匀浆。余小鼠肝脏摘取后置于PBS冲洗,经过机械研磨后Percoll梯度离心制备淋巴细胞悬液。

2.5 观测指标及方法

2.5.1 小鼠一般状态

观察小鼠的日常精神活动状态、毛发光泽度、饮食和饮水情况、体质量变化等。

2.5.2 肝脏功能状态检测

采用比色分析法检测血清AST、ALT活性及ALB含量,严格按照试剂盒说明书操作。

2.5.3 炎性因子水平检测

采用ELISA法检测血清和肝组织IL-23及IL-17含量,严格按照试剂盒说明书操作。

2.5.4 肝脏细胞再生能力检测

采用ELISA法检测血清和肝组织ALR含量,严格按照试剂盒说明书操作。

2.5.5 PT-PCR法检测肝脏淋巴细胞中IL-17、IL-23 mRNA水平的表达

采用RT-qPCR法检测肝脏淋巴中IL-17、IL-23 mRNA相对表达水平,实验重复3次。采用Trizol试剂法提取各组小鼠肝脏淋巴细胞总RNA,逆转录为cDNA,以此为模板行PCR扩增,每个指标重复3次,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算所得数据,作为目的mRNA的相对表达水平。引物由北京博迈德生物科技有限公司合成。IL-17上游引物:CTGTGATGACTGTGACATTAGC,下

游引物:ACGGTTGAGGTAGTCTGAGG;IL-23上游引物:GCTGTGCCTAGGAGTAGC,下游引物:CACTGGATACGGGGCACATT。

2.6 统计学方法

数据分析采用SPSS 22.0统计学软件进行。实验数据用均数±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠一般状况

空白对照组小鼠精神状态与活动度良好,毛色有光泽,进食饮水正常。模型组造模过程中小鼠精神萎靡,活动减少,毛色暗,进食减少,体质量逐渐下降。经干预后,中药干预组、BM-MSCs移植组和中药干预联合BM-MSCs移植组小鼠精神状态、活动度、毛色及进食量与模型组比较均有不同程度的改善,自然恢复组与模型组比较无明显变化。

3.2 肝脏功能状态

与空白对照组比较,模型组与自然恢复组ALT与AST活性上升,ALB含量下降($P < 0.01$),模型组与自然恢复组间比较无统计学意义($P > 0.05$);各干预组血清ALT与AST活性较模型组与自然恢复组下降,血清ALB含量上升,有统计学意义($P < 0.01$);各干预组之间比较,中药干预联合BM-MSCs移植组血清ALT与AST活性下降、ALB含量上升最为显著($P < 0.05$),而中药干预组与BM-MSCs移植组间比较无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表1。

表1 各组小鼠肝脏功能变化情况比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	ALB/(g/L)
空白对照组	8	35.50 ± 2.64	91.75 ± 3.30	33.57 ± 0.99
模型组	8	85.75 ± 3.30*	169.50 ± 6.75*	20.17 ± 0.59*
自然恢复组	8	83.00 ± 2.82*	167.00 ± 5.59*	20.45 ± 0.97*
中药干预组	8	54.25 ± 4.57 [#]	124.00 ± 5.94 [#]	23.02 ± 0.41 [#]
BM-MSCs移植组	8	51.00 ± 3.16 [#]	140.50 ± 6.19 [#]	23.40 ± 0.64 [#]
中药干预联合BM-MSCs移植组	8	44.75 ± 3.77 ^{#Δ}	95.75 ± 5.56 ^{#Δ}	26.62 ± 0.51 ^{#Δ}

注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.01$;与中药干预组比较,^Δ $P < 0.05$ 。与BM-MSCs组比较,^Δ $P < 0.05$ 。

3.3 炎性因子水平

与空白对照组比较,模型组与自然恢复组血清及肝组织IL-23与IL-17水平均显著升高($P < 0.01$),但模型组与自然恢复组间比较均无统计学意义($P > 0.05$);各干预组血清及肝组织IL-23与IL-17水平较模型组与自然恢复组下降,有统计学意义($P < 0.05$);各干预组之间比较,中药干预联合BM-MSCs移植组血清及肝组织IL-23与IL-17水平下降最为

显著($P < 0.01$),而中药干预组与BM-MSCs移植组间比较无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表2和表3。

表2 各组小鼠血清炎症细胞因子变化情况比较($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	IL-23	IL-17
空白对照组	8	64.01 ± 1.03	121.34 ± 8.75
模型组	8	174.74 ± 2.11*	241.86 ± 4.09*
自然恢复组	8	171.03 ± 2.00*	236.73 ± 1.78*
中药干预组	8	139.38 ± 3.09#	175.82 ± 2.41#
BM-MSCs移植组	8	143.74 ± 3.78#	192.42 ± 3.51#
中药干预联合BM-MSCs移植组	8	118.90 ± 3.60 ^{#Δ}	153.43 ± 3.66 ^{#Δ}

注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.01$;与中药干预组比较,Δ $P < 0.05$;与BM-MSCs组比较,Δ $P < 0.05$ 。

表3 各组小鼠肝组织炎症细胞因子变化情况比较($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	IL-23	IL-17
空白对照组	8	45.58 ± 4.54	93.63 ± 12.06
模型组	8	79.90 ± 5.31*	214.62 ± 13.72*
自然恢复组	8	77.32 ± 4.65*	205.67 ± 10.48*
中药干预组	8	64.54 ± 5.52#	168.45 ± 9.54#
BM-MSCs移植组	8	68.33 ± 4.87#	178.99 ± 4.61#
中药干预联合BM-MSCs移植组	8	57.04 ± 5.08 ^{#Δ}	119.94 ± 9.88 ^{#Δ}

注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$;与中药干预组比较,Δ $P < 0.05$;与BM-MSCs组比较,Δ $P < 0.05$ 。

3.4 肝脏细胞再生能力

与空白对照组比较,模型组与自然恢复组血清和肝组织中ALR水平显著降低($P < 0.01$),但模型组与自然恢复组间比较无统计学意义($P > 0.05$);与模型组和自然恢复组对比,各干预组ALR水平升高($P < 0.05$);中药干预联合BM-MSCs移植组肝组织上述指标较其他干预组显著升高($P < 0.05$),而中药干预组与BM-MSCs移植组间比较无统计学意义($P > 0.05$)。见表4。

表4 各组小鼠肝脏细胞再生能力情况比较($\bar{x} \pm s$, ng/L)

组别	n	血清ALR	肝组织ALR
空白对照组	8	2 479.99 ± 44.22	2 517.50 ± 258.02
模型组	8	1 342.50 ± 27.58*	1 392.50 ± 205.32*
自然恢复组	8	1 385.35 ± 53.57*	1 464.71 ± 303.29*
中药干预组	8	1 863.93 ± 30.51#	2 187.14 ± 158.38#
BM-MSCs移植组	8	1 885.35 ± 24.99#	2 029.99 ± 299.11#
中药干预联合BM-MSCs移植组	8	2 360.35 ± 15.82 ^{#Δ}	2 813.93 ± 162.14 ^{#Δ}

注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$;与中药干预组比较,Δ $P < 0.05$;与BM-MSCs组比较,Δ $P < 0.05$ 。

3.5 IL-17、IL-23 mRNA的相对表达水平

与空白对照组比较,模型组与自然恢复组小鼠肝组织中IL-17、IL-23 mRNA相对表达水平增高,中药

干预组和BM-MSCs移植组较模型组明显降低($P < 0.05$),中药干预联合BM-MSCs移植组进一步降低($P < 0.01$)。见表5。

表5 各组小鼠IL-17、IL-23 mRNA的相对表达水平比较($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

组别	n	IL-23	IL-17
空白对照组	8	1.01 ± 0.21	1.00 ± 0.10
模型组	8	2.81 ± 0.12*	2.43 ± 0.17*
自然恢复组	8	2.80 ± 0.68*	2.41 ± 0.11*
中药干预组	8	1.81 ± 0.09#	1.62 ± 0.12#
BM-MSCs移植组	8	2.43 ± 0.20#	2.11 ± 0.10#
中药干预联合BM-MSCs移植组	8	1.52 ± 0.16 ^{#Δ}	1.39 ± 0.06 ^{#Δ}

注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.01$;与中药干预组比较,Δ $P < 0.05$;与BM-MSCs组比较,Δ $P < 0.05$ 。

4 讨论

NASH是NAFLD的炎症亚型,可发展为肝硬化、终末期肝病,甚至需要肝移植。据统计,大约40%的NASH患者会出现纤维化的进展,并在15年内发展为肝硬化的NASH患者达到了11%^[13]。BM-MSCs具有多向分化,自我更新等功能,在体内可通过分化为肝细胞、免疫调节、抗炎、抗纤维化、抗氧化应激和抗凋亡等途径促进肝损伤修复^[14]。由于微环境的影响,干细胞移植后的存活及增殖能力是影响其效果的重要因素。研究表明,中药可提高干细胞移植的存活及增殖能力,诱导其向肝细胞定向分化,改善移植后肝脏的病理微环境等参与干细胞移植治疗肝硬化^[15]。临床研究显示,消脂化纤汤在ANSH治疗方面具有良好的效果,可通过下调炎症细胞因子,明显改善NASH肝脏损伤^[7-8]。

本研究将消脂化纤汤与骨髓间充质干细胞相联合,探讨其对NASH肝硬化小鼠的作用效应。结果显示,模型组与自然恢复组比较无统计学意义,提示肝硬化小鼠模型具有稳定性。中药干预组、BM-MSCs移植组以及中药干预联合BM-MSCs移植组NASH相关肝硬化小鼠血清ALT及AST活性较模型组和模型自然恢复组明显降低,血清ALB含量明显升高,其中中药干预联合BM-MSCs移植组作用效应明显优于中药干预组及BM-MSCs移植组;与此同时,中药干预联合BM-MSCs移植组小鼠血清和肝组织ALR表达明显高于中药干预组及BM-MSCs移植组。提示消脂化纤汤联合BM-MSCs移植在促进肝损伤恢复、促进肝细胞再生、改善肝硬化状态方面表现出明显协同效应。

有研究表明,Th17细胞浸润在NASH进展中发挥了重要的作用^[16]。IL-23刺激活化肝脏浸润Th17细胞大量分泌IL-17。作为促肝纤维化炎症细胞因子,IL-

17可强烈诱导多种炎症介质产生与释放,共同促进肝纤维化甚至肝硬化进展^[17-20]。有效抑制IL-23/IL-17炎症轴对阻断肝纤维化即肝硬化进展具有重要意义。本研究显示,所有干预组小鼠血清及肝组织中IL-23及IL-17水平均较模型组明显降低,其中中药干预联合BM-MSCs移植组作用效应最强。研究结果显示,3个治疗组小鼠肝脏组织中的IL-17、IL-23 mRNA表达水平均较模型组降低,而中药干预联合BM-MSCs移植组显著低于中药干预组和BM-MSCs移植组。这提示消脂化纤汤联合BM-MSCs移植治疗可能通过抑制机体IL-23/IL-17炎症轴的过度激活,进而阻断肝硬化进程,促进肝细胞再生修复及肝脏功能恢复。

本研究采用消脂化纤汤联合骨髓间充质干细胞移植,揭示了对NASH肝硬化小鼠的治疗效应,并提示其通过抑制IL-23/IL-17炎症轴,促进肝细胞再生,及NASH肝硬化肝脏功能恢复,其协同效应可能与肝脏免疫微环境改善有关。

【参考文献】

[1] PAPPACHAN J M, BABU S, KRISHNAN B, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: a clinical update[J]. J Clin Transl Hepatol, 2017, 5(4):384-393.

[2] COTTER T G, RINELLA M. NAFLD 2020: the state of the disease[J]. Gastroenterology, 2020, 158(7):1851-1864.

[3] STEFAN N, CUSI K. A global view of the interplay between non-alcoholic fatty liver disease and diabetes[J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2022, 10(4):284-296.

[4] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组, 中国医师协会脂肪性肝病专家委员会. 非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018更新版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2018, 26(3):195-203.

[5] YOSHIJI H, NAGOSHI S, AKAHANE T, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for liver cirrhosis 2020[J]. Hepatol Res, 2021, 51(7):725-749.

[6] CAO Y, JI C, LU L. Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis/cirrhosis[J]. Ann Transl Med, 2020, 8(8):562.

[7] ZHANG Y, LI Y, ZHANG L, et al. Mesenchymal stem cells: potential application for the treatment of hepatic cirrhosis[J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1):59.

[8] WU X, JIANG J, GU Z, et al. Mesenchymal stromal cell therapies:

immunomodulatory properties and clinical progress[J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1):345.

[9] WANG X, YAO N. Effect of herb formula Xiao-Zhi-Hua-Xian-Tang against non-alcoholic steatohepatitis with advanced fibrosis - a preliminary clinical study[J]. Hepatology International, 2017, 11(S1):S939-S940.

[10] SCHOLTEN D, TREBICKA J, LIEDTKE C, et al. The carbon tetrachloride model in mice[J]. Lab Anim, 2015, 49(S1):4-11.

[11] KIRSCH R, CLARKSON V, SHEPHARD EG, et al. Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain and sex difference studies[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2003, 18(11):1272-1282.

[12] PHILIPPE T, DANIELE N, NADINE P, et al. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow[J]. Experimental Cell Research, 2004, 295(2):395-406.

[13] SHEKA AC, ADEYI O, Thompson J, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: a review[J]. JAMA, 2020, 323(12):1175-1183.

[14] HAMMERICH L, HEYMANN F, TACKE F. Role of IL-17 and Th17 cells in liver diseases[J]. Clin Dev Immunol, 2011, 2011:345803.

[15] WANG Z C, YANG S, HUANG J J, et al. Effect of rougan huaqian granules combined with human mesenchymal stem cell transplantation on liver fibrosis in cirrhosis rats[J]. Asian Pac J Trop Med, 2014, 7(7):576-581.

[16] CHACKELEVICIUS C M, GAMBARO S E, TIRIBELLI C, et al. Th17 involvement in nonalcoholic fatty liver disease progression to non-alcoholic steatohepatitis[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(41):9096-9103.

[17] ZANG M, LI Y, HE H, et al. IL-23 production of liver inflammatory macrophages to damaged hepatocytes promotes hepatocellular carcinoma development after chronic hepatitis B virus infection[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018, 1864(12):3759-3770.

[18] IWAKURA Y, ISHIGAME H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation[J]. J Clin Invest, 2006, 116(5):1218-1222.

[19] ANG Y, BIAN Z, ZHAO L, et al. Interleukin-17 exacerbates hepatic steatosis and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease[J]. Clin Exp Immunol, 2011, 166(2):281-290.

[20] LI J, CHENG L, JIA H, et al. IFN- γ facilitates liver fibrogenesis by CD161⁺ CD4⁺ T cells through a regenerative IL-23/IL-17 axis in chronic hepatitis B virus infection[J]. Clin Transl Immunology, 2021, 10(11):e1353.

(收稿日期:2022-10-31)

Effect of Xiaozhi Huaxian Decoction Combined with BM-MSCs Transplantation on Experimental NASH Cirrhosis Mice Based on IL-23/IL-17 Axis

YANG Fangli¹, WANG Xin¹, XIA Yanqing¹, HAN Jinxiao¹, YAO Ning^{2✉}

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. First School of Clinical Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

【Abstract】 Objective: To investigate the effect of Xiaozhi Huaxian Decoction combined with bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) transplantation on experimental cirrhosis mice with non-alcoholic

steatohepatitis (NASH) based on IL-23/IL-17 axis. Methods: 8 mice were randomly selected from a total of 56 healthy SPF C57BL/6 mice for BM-MSCs culture, another 8 mice were used as the blank control, and the rest 40 mice were established the NASH cirrhosis model by intraperitoneal injection of methionine choline deficiency diet (MCD) combined with 10% carbon tetrachloride (CCl_4 : olive oil = 1:9) for 8 weeks. The successful modeling mice were randomly divided into the model group, the natural recovery group, the Chinese medicinal intervention group, the BM-MSCs transplantation group, and the Chinese medicinal intervention combined with BM-MSCs transplantation group. The BM-MSCs transplantation group was injected with BM-MSCs through the tail vein, the Chinese medicinal intervention group was given Xiaozhi Huaxian Decoction by gavage, and the Chinese medicinal intervention combined with BM-MSCs transplantation group was given Xiaozhi Huaxian Decoction by gavage combined with tail vein transplantation of BM-MSCs. BM-MSCs transplantation was performed once at the 9th week, and gavage was performed twice a day from the 9th week for 4 consecutive weeks. The mice were sacrificed at the end of the 12th week, and blood and samples were collected. The serum biochemical indexes (ALT, AST, ALB) were detected by automatic biochemical analyzer. The levels of inflammatory factors of IL-23 and IL-17 in serum and liver tissues were measured by ELISA method. The expression of augments of liver regeneration (ALR) in serum and liver tissues was also measured by ELISA method. The mRNA expressions of IL-17 and IL-23 in liver lymphocytes were detected by RT-qPCR. Results: In terms of the general state of the mice, the mice in the model group gradually showed mental malaise, decreased activity, lackluster hair, decreased food intake and decreased body weight compared with those in the blank control group; after 4 weeks of medical interventions, the general state was improved in the mice. Compared with those in the blank group, the activities of serum ALT and AST, the levels of IL-23 and IL-17 in serum and liver tissues, as well as the mRNA expressions of IL-17 and IL-23 in liver lymphocytes were significantly increased ($P < 0.05$), and the levels of ALR and ALB in serum and liver tissues were decreased in the model group and in the natural recovery group ($P < 0.05$). Compared with those in the model group, the activities of serum ALT and AST, the levels of IL-23 and IL-17 in serum and liver tissues, as well as the mRNA expressions of IL-17 and IL-23 in liver lymphocytes were significantly decreased ($P < 0.01$), and the levels of ALR and ALB in serum and liver tissues were increased in the Chinese medicinal intervention group, the BM-MSCs transplantation group and the Chinese medicinal intervention combined with BM-MSCs group ($P < 0.01$). In terms of the improvements of the above indexes, they were more significant in the Chinese medicinal combined with BM-MSCs transplantation group than those in the BM-MSCs transplantation group and in the Chinese medicinal intervention group ($P < 0.05$). Conclusion: Xiaozhi Huaxian Decoction combined with BM-MSCs transplantation has a good effect on improving liver function, promoting BM-MSCs transplantation/differentiation and liver cell regeneration in mice with experimental NASH cirrhosis. The mechanism may be related to inhibiting excessive activation of IL-23/IL-17 inflammatory axis and improving liver immune microenvironment.

【Key words】 Xiaozhi Huaxian Decoction; BM-MSCs; IL-23/IL-17 axis; NASH; Cirrhosis