

DOI:10.16305/j.1007-1334.2025.2311028

基于“清温并用”理论赤芍-附子调控 HIF-1 α 介导糖酵解干预慢加急性肝衰竭大鼠免疫损伤的作用机制

张 彧¹, 田晓玲², 付 琴², 杜 珊³, 彭 杰³, 陈 斌³

1. 湖南中医药大学第一附属医院脾胃病科(湖南 长沙 410007); 2. 湖南中医药大学研究生院(湖南 长沙 410208);
3. 湖南中医药大学第一附属医院肝病科(湖南 长沙 410007)

【摘要】 目的 研究赤芍-附子是否通过调控缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)介导的糖酵解改善慢加急性肝衰竭(ACLF)中的免疫失衡。方法 采用牛血清白蛋白皮下及尾静脉注射联合腹腔注射 D-氨基半乳糖+脂多糖构建 ACLF 大鼠模型。实验设置空白对照(NC)组、模型(Vehicle)组、赤芍-附子(C50F15)组、2-脱氧-D-葡萄糖(2-DG)组。通过苏木精-伊红(HE)染色观察肝脏病理改变;电镜观察线粒体超微结构;酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、活性氧(ROS)表达水平;生物化学法检测糖酵解关键酶己糖激酶(HK)、丙酮酸激酶(PK)、乳酸脱氢酶(LDH)活性及相关代谢产物乳酸、丙酮酸、三磷酸腺苷(ATP)水平;免疫荧光染色检测 M1 巨噬细胞标志物诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、M2 巨噬细胞标志物精氨酸酶-1(Arg-1)表达水平;实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)和 Western blot 法分别检测 HIF-1 α mRNA 和蛋白表达水平。结果 与 NC 组相比,Vehicle 组大鼠肝脏呈现明显的免疫炎症损伤、线粒体受损和氧化应激。C50F15 组及 2-DG 组大鼠肝脏炎症反应和线粒体氧化应激改善,表现为病理评分、促炎性细胞因子(IL-1 β 、TNF- α 、ROS)表达水平降低。Vehicle 组大鼠肝脏糖酵解途径上调,表现为 HK、PK、LDH 活性增强,代谢产物乳酸、ATP 生成增多,iNOS 表达增加,Arg-1 表达减少。C50F15 组大鼠 PK、LDH 活性降低,乳酸、ATP 生成减少,并且糖酵解的关键调节因子 HIF-1 α mRNA 和蛋白表达水平下调。结论 赤芍-附子可能通过下调 HIF-1 α 表达抑制糖酵解途径而减轻 ACLF 肝脏免疫炎症损伤。这为赤芍-附子调控代谢途径干预 ACLF 免疫调节机制研究提供了新的见解。

【关键词】 肝衰竭;赤芍;附子;糖酵解;缺氧诱导因子-1 α ;炎症;中药研究

Mechanism of Paeoniae Radix Rubra and Aconiti Lateralis Radix Praeparata regulating HIF-1 α mediated glycolysis in treatment of immune damage in acute-on-chronic liver failure based on "application of both warming and clearing therapies"

ZHANG Yu¹, TIAN Xiaoling², FU Qin², DU Shan³, PENG Jie³, CHEN Bin³

1. Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. Graduate School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Department of Hepatology, First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

Abstract: Objective This study aims to investigate whether Paeoniae Radix Rubra and Aconiti Lateralis Radix Praeparata improve immune imbalance in acute-on-chronic liver failure (ACLF) by regulating hypoxia inducible factor-1 α mediated glycolysis. **Methods** The rat model of ACLF

was constructed by subcutaneous and tail vein injection of bovine serum albumin combined with intraperitoneal injection of D-galactosamine and lipopolysaccharide. The experimental settings included normal control (NC) group, model (Vehicle) group, Paeoniae Radix Rubra and Aconiti Lateralis Radix Praeparata (C50F15) group, and 2-deoxy-D-glucose (2-DG) group. Liver pathological changes were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining; mitochondrial ultrastructure was observed by electron microscopy; the expression levels of interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and reactive oxygen species (ROS) were

[基金项目] 湖南省自然科学基金面上项目(2020JJ4475);湖南省科技创新项目(2021SK51415);湖南中医药大学中医学国内一流建设学科项目(2018-03);湖南省研究生科研创新项目(CX20220771)

[作者简介] 张彧,女,博士,医师,主要从事中医药防治消化系统疾病工作

[通信作者] 陈斌,教授,博士研究生导师;E-mail: chenbin0410@126.com

detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); the activities of key enzymes in glycolysis including hexokinase (HK), pyruvate kinase (PK), lactate dehydrogenase (LDH) and related metabolites such as lactate, pyruvate and adenosine triphosphate (ATP) levels, were detected by biochemical methods; The expression levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in M1 macrophages and arginine-1 (Arg-1) in M2 macrophages were detected by immunofluorescent staining; the expression levels of *HIF-1 α* mRNA and protein were detected by real-time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blot, respectively. **Results** Compared with the NC group, the liver of the Vehicle group rats showed significant immune inflammatory damage, mitochondrial damage and oxidative stress. The liver inflammatory response and mitochondrial oxidative stress in rats in the C50F15 group and 2-DG group were improved, which was manifested by reduced pathological scores and expression levels of pro-inflammatory factors IL-1 β , TNF- α and ROS. The glycolytic pathway in the liver of the Vehicle group rats was upregulated, manifested by enhanced activities of HK, PK and LDH, increased production of metabolites lactic acid and ATP, increased expression of iNOS, and decreased expression of Arg-1. After intervention with *Paeoniae Radix Rubra* and *Aconiti Lateralis Radix Praeparata*, PK and LDH activities as well as lactate and ATP production were reduced, and the expression levels of *HIF-1 α* mRNA (a key regulatory factors of glycolysis) and the protein were downregulated. **Conclusions** *Paeoniae Radix Rubra* and *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* may alleviate liver immune inflammatory damage in ACLF by downregulating *HIF-1 α* expression and inhibiting glycolytic pathways. This provides new insights into the study of the immune regulatory mechanism of ACLF through *Paeoniae Radix Rubra* and *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* regulating the metabolic pathway.

Keywords: liver failure; *Paeoniae Radix Rubra*; *Aconiti Lateralis Radix Praeparata*; glycolysis; hypoxia inducible factor-1 α ; inflammation; traditional Chinese medicine research

慢加急性肝衰竭 (acute-on-chronic liver failure, ACLF) 是一种临床危重疾病,其特征是慢性肝病急性加重、肝和/或肝外器官衰竭和高短期死亡率^[1-2]。近年来,“内科综合治疗-人工肝-肝移植”的 ACLF 一体化治疗,使其疗效有所提高。但其强烈的系统性炎症反应和不受控制的免疫失衡,导致其在内科综合治疗下病死率仍高达 50%~90%^[3]。因此能否控制机体炎症反应,改善肝衰竭免疫失衡对于 ACLF 临床预后至关重要。已经有足够的证据表明,免疫细胞的代谢方式对于促炎和抗炎表型的控制至关重要。糖酵解是将葡萄糖转化为丙酮酸,并为细胞过程提供能量的重要代谢途径。有研究^[4]显示,高糖酵解上调了免疫/炎症通路及其相关基因的表达,同时增加了多种免疫/炎症细胞和巨噬细胞的富集。近年来越来越多的研究^[5]揭示了糖酵解代谢物与促炎表型之间关系的多种分子机制,包括信号传导事件、表观遗传重塑、转录后修饰和翻译后修饰。因此,通过调控糖酵解来减轻免疫炎症损伤,可能成为改善肝脏炎症、降低 ACLF 病死率的有前景的治疗策略。

肝衰竭依据其身目黄染的临床特征可归属于中医学“急黄”范畴。《诸病源候论·黄疸诸候·急黄候》中记载“脾胃有热,谷气郁蒸,因为热毒所加,故卒然发黄,心满气喘,命在顷刻,故云急黄也”。课题组根据长期临床观察、实践,提出肝衰竭(急黄)“阴阳黄”之证候名,并证实其实质为瘀、毒、虚(气虚、阳虚)所致虚实夹杂,治法关键在于“清温并用”,代表方温阳解毒化瘀方,临床疗效确切^[6-9]。赤芍与附子分别是温阳解毒化瘀方中代表“清法”和“温法”的核心药物,具有凉血化瘀解毒、温阳健脾之功。前期研究结果发现,温阳解毒化瘀方和“赤芍(50 g)-附子(15 g)^[10]”能通过调控巨噬

细胞极化^[11]、调节性 T 细胞(Treg)/辅助性 T 细胞 17(Th17)平衡^[12]、Toll 样受体 4(TLR4)表达^[13]等方面调控肝衰竭免疫失衡,减轻肝脏炎症反应,但其免疫调节的作用机制仍有待进一步研究。本研究拟从调控肝脏免疫代谢角度出发,结合前期研究,进一步深入探索赤芍-附子调控免疫炎症反应,减轻肝脏炎症损伤的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 42 只,体质量 120~140 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004。实验动物使用许可证号:SYXK(湘)2020-0010。实验动物饲养于湖南中医药大学第一附属医院动物实验中心。饲养环境:温度 22~26℃、相对湿度 50%~70%,自由摄食饮水。实验操作均遵循实验动物伦理委员会的相关规定,并通过湖南中医药大学第一附属医院伦理委员会审批(伦理批号:ZYFY20230410-01)。

1.1.2 药物与试剂 中药饮片购自湖南中医药大学第一附属医院中药房,药材经本单位药学部药师鉴定质量。称取赤芍 150 g、制附子 45 g 分别置于容器中予以 10 倍量的冷水浸泡 30 min。制附子先煎 30 min 后再加入赤芍同煎,武火沸腾后转文火,继续煎煮 1 h 后即可滤出药液;加入 8 倍量的水再煎煮 1 h,混合两次药液后过滤,加热浓缩药液至 145 mL(药液生药含量为 1 g/mL)。按人与大鼠体表面积关系换算出大鼠每日中药剂量,以大鼠与人的给药剂量系数 6.25 计算,得出赤芍-附子煎剂大鼠日用等效剂量为 5.85 g/(kg·d)。

靶向己糖激酶(HK)的糖酵解抑制剂 2-脱氧-D-葡

萄糖(2-DG)给药剂量为 400 mg/kg^[14],用氯化钠溶液(9 g/L)配制,腹腔注射使用。

脂多糖(批号:L2880)、弗氏不完全佐剂(批号:F5506),美国 Sigma 公司;D-氨基半乳糖(批号:K397164),美国 KKLmed 公司;2-DG(批号:GC17430),美国 Glpbio 公司;牛血清白蛋白 V(批号:AWB0157b),长沙艾碧维公司;miRNA 逆转录试剂盒(批号:0521751),苏州近岸蛋白公司;RNA 提取液(批号:15596018),美国 Thermo Fisher Scientific 公司; β -肌动蛋白(β -actin)小鼠单克隆抗体(批号:AF7018),江苏亲科生物公司;羊抗小鼠免疫球蛋白 G(IgG,批号:SY0100),武汉伊莱瑞特公司;缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)小鼠单克隆抗体(批号:RT1278),杭州华安生物公司;大鼠白细胞介素-1 β (IL-1 β)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号:ml002859)、大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA 试剂盒(批号:ml003057),上海酶联生物技术公司;HK 测试盒(批号:HK-1-Y)、丙酮酸激酶(PK)测试盒(批号:PK-1-Y)、乳酸脱氢酶(LDH)测试盒(批号:LDH-1-Y)、丙酮酸含量测试盒(批号:PA-2-Y)、乳酸含量测试盒(批号:LA-1-G)、三磷酸腺苷(ATP)含量测试盒(批号:ATP-2-Y),苏州科铭生物技术公司。

1.1.3 主要仪器 石蜡切片机(型号:HM355S),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;凝胶成像系统(型号:Gel Doc™ XR+),美国 Bio-Rad 公司;多功能酶标仪(型号:Cytation3),美国 BioTek 公司;微量离心机(型号:Sorvall™ Legend™ Micro 17R),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;透射电子显微镜(批号:HT7800),日本 Hitachi 公司。

1.2 动物分组、造模与干预 造模前,42 只大鼠按随机数字表法随机分出空白对照组(NC, $n=4$),其余 38 只大鼠构建 ACLF 模型^[11, 15-16]。先采用牛血清白蛋白乳白化液 0.5 mL(含牛血清白蛋白 4 mg)皮下多点注射致敏,共 4 次,具体注射时间分别为造模开始的第 1 天、第 14 天、第 24 天、第 34 天。第 35 天开始尾静脉注射牛血清白蛋白溶液,2 次/周,初始剂量为 2 mg/次,依次递加 0.5 mg/次,达 4 mg/次后维持此剂量,共注射 12 次,为期 6 周;在第 77 天将造模大鼠随机分为模型(Vehicle)组、赤芍-附子(C50F15)组和 2-DG 组后给药。C50F15 组予赤芍 50 g、附子 15 g 中药汤剂灌胃(5.85 g/kg, 10 mL/kg),2 次/d;2-DG 组予以 2-DG 溶液腹腔注射(400 mg/kg, 5 mL/kg),1 次/d,持续至急性攻击前,共 1 周。NC 组、Vehicle 组灌胃等量氯化钠溶液(9 g/L)。第 83 天末次给药结束后,腹腔注射 D-氨基半乳糖(400 mg/kg)+脂多糖(LPS, 100 μ g/kg)混合溶液 5 mL/kg 急性攻击。

1.3 取材方法 腹腔急性攻击 12 h 后取材。用戊巴比妥钠溶液(30 g/L)经腹腔注射麻醉(2 mL/kg)大鼠,固定

大鼠四肢暴露腹部,消毒并打开胸腹腔,用提前预冷的氯化钠溶液(9 g/L)行心脏灌注。钝锐结合完整取出肝脏,置于无菌培养皿上,用预冷的磷酸盐缓冲液冲洗肝脏表面血液,取肝脏明显病变处大小约 1 cm³的肝组织固定在多聚甲醛溶液(40 g/L)中,取大小约 1 mm³的肝组织固定在戊二醛磷酸缓冲液(25 g/L)中,其余肝组织转入-80℃冰箱保存。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 一般情况 观察记录大鼠外观、行为、精神状态、大小便、进食及存活情况等。

1.4.2 肝组织病理变化 采用苏木精-伊红(HE)染色观察肝组织病理变化。肝组织固定后包埋切片,烘烤脱蜡后苏木精染色,流水洗涤 1 h,转入伊红液染色 4 min 后,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察。肝组织病理评分参考《肝衰竭诊治指南(2018 年版)》^[17],ACLF 肝脏病理评分按肝组织坏死范围程度,进行相应病理评分:肝组织结构正常计“0 分”;肝细胞点状坏死计“1 分”;融合性坏死及桥接坏死计“2 分”;亚大块坏死(约占肝实质 1/2~2/3)计“3 分”;大块坏死(超过肝实质 2/3)计“4 分”。

1.4.3 肝组织中炎症因子表达水平 采用 ELISA 法检测肝组织中炎症因子表达水平。准确称取 0.1 g 肝组织转移到装有 0.9 mL 预冷磷酸盐缓冲液的玻璃匀浆器中,冰水浴条件下,机械匀浆,制备成 10% 的匀浆液,2 500~3 000 r/min,离心 10 min,取上清液进行测定。按照制造商的说明,使用 ELISA 试剂盒检测肝组织匀浆中 IL-1 β 、TNF- α 、活性氧(ROS)水平。

1.4.4 肝组织中糖酵解关键酶活性及代谢产物水平 根据试剂盒生产商说明书操作,使用生化试剂盒检测各组大鼠肝组织中糖酵解关键酶 HK、PK 及 LDH 活性,代谢产物丙酮酸、乳酸水平并计算乳酸/丙酮酸比值。

1.4.5 ATP 含量 称取 0.1 g 肝组织,加入 0.9 mL 蒸馏水,冰浴匀浆,100℃加热提取 5 min,8 500 r/min,4℃离心 15 min,取上清液待测。使用 ATP 检测试剂盒检测 ATP 含量,严格按照试剂盒说明书加入上清液、标准液和显色液,进行吸光度测定。按说明书中公式计算 ATP 含量。

1.4.6 透射电镜观察肝脏线粒体超微结构 将肝组织切成 1 mm³大小的组织块,迅速将样品放入戊二醛磷酸缓冲液(25 g/L)中固定 24 h,之后使用不同浓度梯度无水乙醇脱水各 15 min,再用体积分数为 90% 和 100% 丙酮各脱水 15 min,用纯丙酮/包埋液混合液处理过夜后在包埋板上包埋,室温下处理 3 h 后在烘箱内固化,通过超薄切片机切片 70 nm 左右,最后使用醋酸铀-枸橼酸铅(30 g/L)双染切片,使用 120 kV HT7800 透射电镜观察肝脏线粒体超微结构。

1.4.7 HIF-1 α 蛋白水平 采用 Western blot 法检测 HIF-1 α 蛋白水平。取大鼠肝组织提取蛋白样品,用蛋白质定量试剂盒测定蛋白浓度。每孔蛋白上样量为 10 μ L,电泳,聚偏二氟乙烯膜湿转,脱脂牛奶摇床封闭 1 h。含吐温-20 的 Tris 缓冲盐水洗净牛奶后,一抗(HIF-1 α 小鼠单克隆抗体,1:1 000)孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜,二抗(辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG,1:4 000)孵育 2 h;高灵敏化学发光显影液于凝胶成像系统中显影成像,ImageJ 软件分析图像。

1.4.8 HIF-1 α mRNA 水平 采用实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测 HIF-1 α mRNA 水平。以 TRIzol 法提取肝组织 RNA,检测 RNA 纯度。根据反转录 cDNA 试剂盒逆转录得到 cDNA,采用 SYBR Green 染料法在 RT-qPCR 仪上运用两步法进行扩增,预变性 95 $^{\circ}$ C,5 min;变性 95 $^{\circ}$ C,15 s;退火+延伸 58 $^{\circ}$ C,30 s;共 39 个循环;熔解曲线分析 65~95 $^{\circ}$ C。以 β -actin 为内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因 mRNA 相对表达量。根据目的基因序列,运用 Primer Premier 6.0 设计引物(表 1),所有引物均由生工生物工程(上海)有限公司合成。

表 1 引物序列

基因	引物序列	产物长度/bp
HIF-1 α	上游:5'-GCCACCACCACTGATGAATC-3'	131
	下游:5'-CCACTGTATGCTGATGCCTTAG-3'	
β -actin	上游:5'-AAGTGTGACGTTGACATCCG-3'	94
	下游:5'-TCTGCATCTCTCAGCAATG-3'	

注:HIF-1 α 为缺氧诱导因子-1 α 基因, β -actin 为 β -肌动蛋白基因。

1.5 统计学方法 采用 SPSS Statistics 21.0 软件对所有数据进行统计分析,以 GraphPad Prism 8.0 软件生成图片。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,满足正态性分布和方差齐性采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较采用 LSD 多重比较,满足正态性分布但不满足方差齐性采用 Games-Howell 检验,不满足正态性分布采用 K 个独立样本的非参数检验(Kruskal-Wallis Test)。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

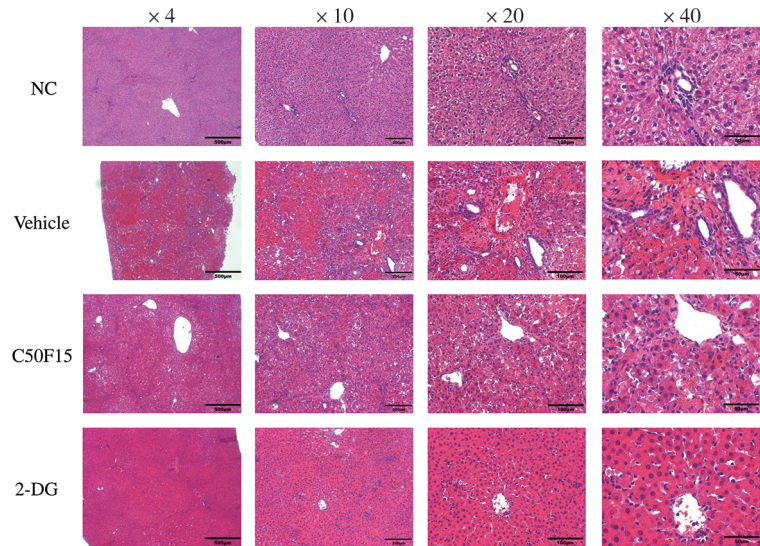
2.1 ACLF 大鼠造模期间一般情况及死亡情况 研究共纳入 42 只 SD 大鼠,NC 组 4 只,ACLF 造模大鼠 38 只。造模大鼠皮下注射免疫致敏阶段无死亡,尾静脉注射免疫攻击阶段死亡 11 只;给药前造模大鼠随机平均分配至 Vehicle 组、C50F15 组和 2-DG 组,药物干预期间 C50F15 组死亡 2 只,其余组无死亡。腹腔注射 D-氨基半乳糖+LPS 溶液急性攻击后大鼠出现精神萎靡、活动量减少、被毛杂乱无光泽,部分伴有肢体僵硬、扭曲等表现。急性攻击后至取材前 Vehicle 组死亡 3 只,2-DG

组死亡 2 只,其余组无死亡。最终分组情况及动物数量为 NC 组($n=4$)、Vehicle 组($n=6$)、C50F15 组($n=7$)和 2-DG 组($n=7$)。ACLF 大鼠模型总体死亡率为 47.37%(18/38)。LPS 溶液急性攻击后至取材期间,Vehicle 组大鼠死亡率 33.33%(3/9),2-DG 组大鼠死亡率 22.22%(2/9),C50F15 组大鼠死亡率 0%(0/7)。

2.2 肝组织病理变化情况 HE 染色观察肝组织病理,结果显示 NC 组大鼠肝脏结构完整,肝小叶结构清晰,肝细胞围绕中央静脉呈放射状排列、未见变形坏死,未见纤维增生,未见炎症细胞浸润。ACLF 模型大鼠肝脏正常结构破坏,呈大块坏死或亚大块坏死,和(或)融合性坏死、桥接坏死以及点状坏死,网状支架不塌陷或少量不完全性塌陷,坏死带肝细胞消失,大量炎症细胞浸润,肝窦扩张、充血、出血,周围可见圆形或三角形的汇管区;肝小叶结构紊乱,大量细胞外基质增生,残余肝细胞被纤维间隔包绕分割成大小不等的肝细胞岛。C50F15 组大鼠肝脏坏死区以融合性坏死和桥接坏死为主,坏死带大量炎症细胞浸润,部分肝小叶结构紊乱,肝窦结构可见,但肝细胞索排列紊乱,间有少量点状坏死和炎细胞浸润。2-DG 组大鼠肝脏坏死区以桥接坏死和点状坏死为主,坏死区残留肝细胞水肿,伴有炎症细胞浸润,肝小叶和肝窦结构基本正常,肝细胞索排列稍紊乱。见图 1。病理评分结果显示,与 NC 组相比,Vehicle 组大鼠肝脏病理评分均值为 3.17,差异有统计学意义($P<0.001$);与 Vehicle 组相比,C50F15 组及 2-DG 组大鼠病理评分均值降低,分别为 2.29、1.86,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

2.3 对肝组织中炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 水平的影响 ELISA 结果显示,与 NC 组相比,Vehicle 组大鼠肝组织中强效促炎性细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.001$)。予以赤芍-附子药对或 2-DG 干预后,IL-1 β 、TNF- α 水平明显降低,与 Vehicle 组相比差异有统计学意义($P<0.001$)。见表 3。结果提示,赤芍-附子可以通过降低强效促炎因子 IL-1 β 、TNF- α 水平,有效抑制 ACLF 模型大鼠的肝脏炎症。

2.4 对肝组织中糖酵解途径的影响 结果显示,与 NC 组相比,Vehicle 组大鼠肝组织中乳酸输出增加,乳酸/丙酮酸比值升高($P<0.001$),丙酮酸含量差异无统计学意义($P>0.05$),见表 4。乳酸/丙酮酸是细胞氧化还原状态的标志性指标^[18-19],乳酸/丙酮酸比值升高提示三羧酸循环(TCA)循环中丙酮酸有氧化障碍,丙酮酸还原成乳酸的酵解作用增强。此外,Vehicle 组中糖酵解关键酶 HK、PK、LDH 活性增强($P<0.05$, $P<0.001$)也支持这种代谢变化,见表 4。这些结果共同提示 ACLF 大鼠肝脏中糖酵解途径上调。当予以糖酵解抑制剂 2-DG(靶向抑制 HK)干预后,糖酵解的关键酶(HK、PK、



注:NC 为空白对照组,Vehicle 为模型组,C50F15 为赤芍-附子组,2-DG 为 2-脱氧-D-葡萄糖组。

图1 各组大鼠肝组织苏木精-伊红染色

表2 各组大鼠肝脏病理评分($\bar{x}\pm s$)

组别	n	病理评分/分
NC	4	0
Vehicle	6	3.17±0.31**
C50F15	7	2.29±0.29***
2-DG	7	1.86±0.34***

注:NC 为空白对照组,Vehicle 为模型组,C50F15 为赤芍-附子组,2-DG 为 2-脱氧-D-葡萄糖组。与 NC 比较,** $P<0.01$;与 Vehicle 比较,# $P<0.05$,### $P<0.01$ 。

LDH)活性降低,乳酸生成减少,乳酸/丙酮酸比值降低($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$),提示 2-DG 对糖酵解途径发挥较好的抑制作用。与 Vehicle 组相比,C50F15 组乳酸生成减少,乳酸/丙酮酸比值降低,PK、LDH 活性降低(P

表3 各组大鼠肝脏中炎症因子表达水平($\bar{x}\pm s$,ng·L⁻¹)

组别	n	IL-1β	TNF-α
NC	4	55.36±6.17	188.52±1.98
Vehicle	6	167.88±6.11**	432.00±11.11**
C50F15	7	122.54±3.50***	341.50±7.91***
2-DG	7	83.05±4.50***	218.50±10.11##

注:NC 为空白对照组,Vehicle 为模型组,C50F15 为赤芍-附子组,2-DG 为 2-脱氧-D-葡萄糖组。IL-1β 为白细胞介素-1β,TNF-α 为肿瘤坏死因子-α。与 NC 比较,** $P<0.01$;与 Vehicle 比较,## $P<0.01$ 。

<0.05, $P<0.001$),但 HK 活性不受影响($P>0.05$),见表 4。这提示赤芍-附子可能通过抑制 PK、LDH 活性,下调糖酵解途径,减少乳酸生成。

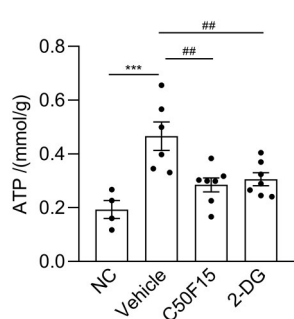
表4 各组大鼠肝脏中糖酵解关键酶活性及代谢产物水平($\bar{x}\pm s$,nmol·min⁻¹·mg⁻¹)

组别	n	乳酸/(mmol·g ⁻¹)	丙酮酸/(mg·g ⁻¹)	乳酸/丙酮酸	HK	PK	LDH
NC	4	0.991±0.144	0.571±0.075	1.885±0.412	6.592±0.962	155.451±10.847	0.504±0.098
Vehicle	6	2.938±0.209***	0.692±0.099	4.500±0.411***	18.662±1.646***	207.620±14.609*	0.804±0.067*
C50F15	7	2.433±0.151***	0.889±0.043	2.436±0.100***	17.366±1.491***	161.071±9.360#	0.587±0.059#
2-DG	7	1.236±0.099***	0.932±0.178	1.670±0.352***	13.075±1.032***	153.724±16.617#	0.521±0.077#

注:NC 为空白对照组,Vehicle 为模型组,C50F15 为赤芍-附子组,2-DG 为 2-脱氧-D-葡萄糖组。HK 为己糖激酶,PK 为丙酮酸激酶,LDH 为乳酸脱氢酶。与 NC 比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与 Vehicle 比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$,### $P<0.001$ 。

2.5 对肝组织中 ATP 含量的影响 与 NC 组相比,Vehicle 组大鼠肝组织中 ATP 含量明显升高,差异有统计学意义($P<0.001$)。Vehicle 组大鼠 ATP 能量输出增加与糖酵解增强结果一致,这提示 ACLF 模型大鼠肝脏处于高代谢状态,对能量物质需求较高,需要较多的 ATP 来维持细胞的代谢速率和复杂的生化反应。药物组分别予以赤芍-附子及 2-DG 干预后,肝脏 ATP 含量降低,与 Vehicle 组相比差异有统计学意义($P<0.01$),见图 2。这提示 2-DG 和赤芍-附子都可通过抑制糖酵解,减少 ATP 生成。

2.6 对肝脏中线粒体超微结构的影响 透射电镜观察大鼠肝组织细胞中线粒体超微结构显示,NC 组中线粒体形态正常,呈短棒状或圆球状,线粒体嵴及基质完整,排列有序。而 Vehicle 组中线粒体数量增加,肿胀,体积增大,形态异常,呈现出马蹄状,多数线粒体外膜不完整,嵴稀疏或模糊紊乱或溶解消失,基质疏松。而在赤芍-附子作用下,线粒体大小形态基本恢复正常,不规则形态基本消失,线粒体双层膜结构、嵴清晰可见,基质均匀,见图 3。细胞内 ROS 检测结果显示,与 NC 组相比,Vehicle 组 ROS 水平明显升高,差异有统计



注:NC为空白对照组($n=4$),Vehicle为模型组($n=6$),C50F15为赤芍-附子组($n=7$),2-DG为2-脱氧-D-葡萄糖组($n=7$)。ATP为三磷酸腺苷。与NC比较,*** $P<0.001$;与Vehicle比较,## $P<0.01$; $\bar{x}\pm s$ 。

图2 各组大鼠肝组织中ATP含量

学意义($P<0.001$);与Vehicle组相比,C50F15组和2-DG组ROS水平降低,差异有统计学意义($P<0.001$),见图4。以上结果表明,ACLF大鼠肝脏遭受氧化应激损伤,大量ROS生成,线粒体结构受损;但经赤芍-附子干预后,可有效减少ROS水平,改善恢复线粒体结构和功能,减轻肝组织细胞氧化应激损伤。

2.7 对肝组织中HIF-1 α 基因表达的影响 HIF-1 α 是糖酵解的关键调节因子,诱导糖酵解相关酶的表达。为了明确赤芍-附子对糖酵解的抑制作用是否具有HIF-1 α 依赖性,我们通过RT-qPCR检测各组大鼠肝组织中HIF-1 α mRNA表达。结果显示,与NC组相比,Vehicle组HIF-1 α mRNA的水平明显上升,差异有统计学意义($P<0.001$);与Vehicle组比较,赤芍-附子或2-DG干预后能有效下调HIF-1 α mRNA的表达,差异有统计学意义($P<0.001$)。见图5。

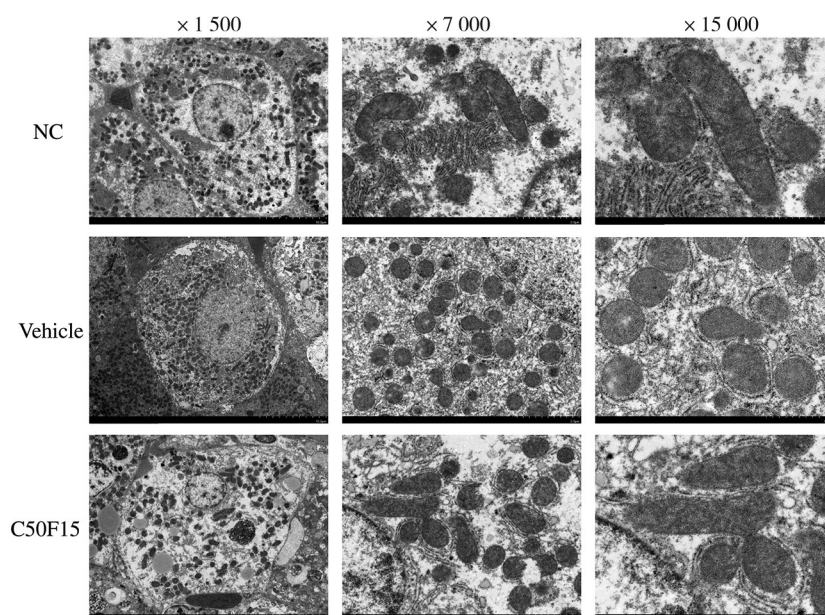
2.8 对肝组织中HIF-1 α 蛋白表达的影响 通过

Western blot法检测各组大鼠肝脏中HIF-1 α 蛋白表达情况。结果与NC组相比,Vehicle组HIF-1 α 蛋白表达量明显上升,差异有统计学意义($P<0.001$)。而予以赤芍-附子或2-DG干预后能有效下调HIF-1 α 蛋白的表达水平,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图6、图7。

3 讨论

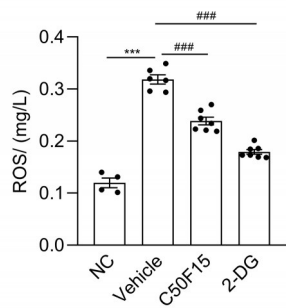
近10年来本课题组在中医药防治肝衰竭方面开展了大量开拓性工作,创新性提出了肝衰竭(急黄)中医证型“阳黄→阴阳黄→阴黄”渐进演变过程^[6,20-21]。这种证候演变过程与ACLF最初免疫广泛激活的免疫失调,系统性炎症反应的状态以及随后由免疫麻痹引起败血症的病理生理学演变机制相契合^[22]。最初的系统性炎症是由免疫细胞释放的细胞因子风暴引起的,与疾病进展密切相关,最终会导致肝内/肝外器官衰竭^[23]。因此,控制肝衰竭炎症反应的消退和减轻免疫炎症损伤至关重要。

ACLF的代谢特点是强烈的蛋白降解和氨基酸分解代谢以及通过糖酵解、磷酸戊糖和D-葡萄糖醛酸途径进行的线粒体外葡萄糖代谢^[24]。在肝硬化的早期阶段,氧化磷酸化水平降低,肝脏通过增加糖酵解通量产生的能量来维持线粒体功能和ATP生成^[25]。在晚期肝硬化和ACLF患者外周血中,糖酵解途径相关酶基因的表达也呈上升趋势^[26]。糖酵解对巨噬细胞的表型和功能具有调节作用。促炎的M1型巨噬细胞的典型代谢特征是糖酵解,而抗炎的M2型巨噬细胞的代谢特点是高水平的氧化磷酸化。有学者在急性肝衰竭患者和小鼠体内检测出糖酵解代谢增强,并伴有M1型巨噬细胞的激活,而下调糖酵解途径抑制M1型巨噬细胞活化可



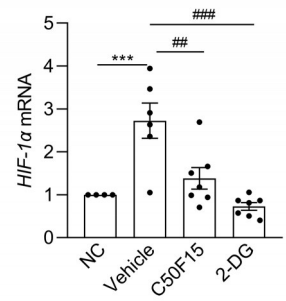
注:NC为空白对照组,Vehicle为模型组,C50F15为赤芍-附子组。

图3 各组大鼠肝组织线粒体透射电镜图(醋酸铀-枸橼酸铅双染色)



注:NC 为空白对照组($n=4$),Vehicle 为模型组($n=6$),C50F15 为赤芍-附子组($n=7$),2-DG 为 2-脱氧-D-葡萄糖组($n=7$)。ROS 为活性氧。与 NC 比较,*** $P<0.001$;与 Vehicle 比较,### $P<0.01$; $\bar{x}\pm s$ 。

图 4 各组大鼠肝组织中 ROS 水平



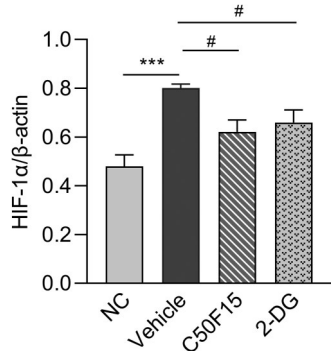
注:NC 为空白对照组($n=4$),Vehicle 为模型组($n=6$),C50F15 为赤芍-附子组($n=7$),2-DG 为 2-脱氧-D-葡萄糖组($n=7$),HIF-1 α 为缺氧诱导因子-1 α 。与 NC 比较,*** $P<0.001$;与 Vehicle 比较,### $P<0.01$,#### $P<0.01$; $\bar{x}\pm s$ 。

图 5 各组大鼠肝组织中 HIF-1 α mRNA 表达水平



注:NC 为空白对照组,Vehicle 为模型组,C50F15 为赤芍-附子组,2-DG 为 2-脱氧-D-葡萄糖组。HIF-1 α 为缺氧诱导因子-1 α , β -actin 为 β -肌动蛋白。

图 6 各组大鼠肝组织中 HIF-1 α 蛋白电泳条带图



注:NC 为空白对照组($n=4$),Vehicle 为模型组($n=6$),C50F15 为赤芍-附子组($n=7$),2-DG 为 2-脱氧-D-葡萄糖组($n=7$)。HIF-1 α 为缺氧诱导因子-1 α , β -actin 为 β -肌动蛋白。与 NC 比较,*** $P<0.001$;与 Vehicle 比较,## $P<0.05$; $\bar{x}\pm s$ 。

图 7 各组大鼠肝组织中 HIF-1 α 蛋白表达水平

以有效缓解急性肝衰竭^[27]。

本研究中肝脏病理结果显示,ACLF 大鼠肝脏表现出明显的慢性肝病和急性肝损伤病理特征:大量肝细胞坏死,弥漫性肝脏纤维化、假小叶形成伴随着大量免疫细胞浸润。值得注意的是,ACLF 免疫激活过程中具有大量能量消耗需求,需要重新分配营养物质来保证免疫功能持续激活^[28]。已经有足够多的研究结果显示,激活的免疫细胞主要通过糖酵解来产生能量,例如参与促炎症反应的 M1 型巨噬细胞^[27]、Th1^[29] 和 Th17 淋巴细胞^[30] 或活化的小胶质细胞^[31]。本研究结果显示,ACLF 大鼠糖酵解途径增强,表现为 HK、PK、LDH 活性增强和代谢产物乳酸、ATP 水平增加,乳酸与丙酮酸比值升高。这种免疫激活过程中的能量重新分配和代谢重编程的机制可以对 ACLF 大鼠肝脏中糖酵解增强和 ATP 能量输出增加做出解释。当转变细胞代谢方式时,免疫细胞可以从促炎转变为抗炎状态,从而终止炎症,修复组织损伤。例如抑制巨噬细胞糖酵解,可以减少炎症因子释放并促进 M2 型巨噬细胞极化^[32];在肝脏缺血再灌注中,抑制糖酵解可以调节 Th17/Treg 平衡,发挥抑制肝损伤的作用^[33]。激活糖酵解不仅会影响免疫细胞的表型,还可以参与炎症因子的表达。在患者来源的单核细胞和巨噬细胞中,增强糖酵解通量促进了二聚体形式的 M2 型 PK 发生核易位从而增加 IL-1 β 的产生^[34]。也有研究^[35] 显示,增强糖酵解有助于激活炎症小体并释放 TNF- α 。当予以赤芍-附子或糖酵解抑制剂 2-DG 干预后,药物组大鼠肝脏线粒体氧化应激和炎症反应减轻,伴随着糖酵解途径下调。

目前,越来越多的研究显示中药可以通过调节糖酵解途径来调整免疫细胞功能和炎症因子表达,从而减轻组织免疫炎症损伤。何瑞娟等^[36] 研究发现芍药苷具有改善 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢紊乱,抑制炎症反应及氧化应激的作用。知母总皂苷可以通过抑制磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/HIF-1 α 通路而下调糖酵解途径,从而减轻糖尿病性心肌病大鼠心肌损伤^[37]。王木源等^[38] 研究发现清肠温中方可能通过抑制糖酵解代谢,从而调控组织驻留记忆 CD4⁺ T 细胞免疫稳态。大承气汤可以调节 HIF-1 α 的表达、下调糖酵解、减轻炎症来改善急性肺损伤^[39]。HIF-1 α 是控制糖酵解基因表达的最佳转录因子之一^[40],通过影响糖酵解酶的表达调控糖酵解,包括葡萄糖转运蛋白、HK、PK、LDH^[41]。在本次实验研究中也观察到 ACLF 大鼠肝组织中 HIF-1 α 蛋白和 mRNA 表达水平升高,与糖酵解酶活性增加趋势一致。而赤芍-附子干预 ACLF 大鼠后,可以显著降低肝组织中 HIF-1 α 蛋白和 mRNA 表达水平和一系列糖酵解酶活性,减轻肝脏炎症和病理损伤。

综上,糖酵解是炎症反应的关键因素,通过影响免

疫细胞表型和炎症因子释放等途径控制炎症反应。本研究证实赤芍-附子可能是通过下调 HIF-1 α 表达,降低糖酵解酶(PK、LDH)活性并抑制糖酵解,减少炎症因子释放,减轻 ACLF 免疫炎症损伤。这一研究结果将为中医药防治肝衰竭提供新思路和科学依据,对于彰显中医药防治肝衰竭的特色优势具有重要意义。

参考文献:

- [1] BERNAL W, KARVELLAS C, SALIBA F, et al. Intensive care management of acute-on-chronic liver failure[J]. J Hepatol, 2021, 75 (Suppl 1): S163-S177.
- [2] BERNAL W, JALAN R, QUAGLIA A, et al. Acute-on-chronic liver failure[J]. Lancet, 2015, 386(10003): 1576-1587.
- [3] 李佳琪, 李君. 慢加急性肝衰竭:定义、诊断与发病机制[J]. 中华肝脏病杂志, 2022, 30(2): 121-126.
- [4] LI W, XU M, LI Y, et al. Comprehensive analysis of the association between tumor glycolysis and immune/inflammation function in breast cancer[J]. J Transl Med, 2020, 18(1): 92.
- [5] SOTO-HEREDERO G, GÓMEZ DE LAS HERAS M M, GABANDÉ-RODRÍGUEZ E, et al. Glycolysis - a key player in the inflammatory response[J]. FEBS J, 2020, 287(16): 3350-3369.
- [6] 桑培敏, 达呼巴雅尔, 王乐三, 等. 阳黄-阴黄-阴黄辨证论治联合西药治疗乙型肝炎相关慢加急性肝衰竭患者生存分析[J]. 中医杂志, 2019, 60(7): 582-586.
- [7] 宋征福, 彭杰, 陈斌, 等. 清温并用法对 HBV-ACLF 非阳黄证患者 Treg/Th17 型细胞因子表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33 (12): 5687-5691.
- [8] 谭年花, 陈斌, 彭杰, 等. 乙肝相关性慢加急性肝衰竭“阳黄-阴黄-阴黄”不同证候分型患者 Treg/Th17 的表达[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(2): 33-38.
- [9] 朱文芳, 孙克伟, 陈斌, 等. 温阳解毒化瘀方对 HBV 相关肝衰竭患者肠道菌群的影响[J]. 中西医结合肝病杂志, 2014, 24(4): 214-216.
- [10] 谭年花, 唐陈琴, 曹钰楠, 等. 基于“清温并用”理论的赤芍-附子不同配伍治疗慢加急性肝衰竭大鼠的疗效比较[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(8): 1821-1824.
- [11] 谭年花, 曹钰楠, 唐陈琴, 等. 基于巨噬细胞极化研究“赤芍-附子”治疗慢加急性肝衰竭的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(15): 35-41.
- [12] 陈斌, 黎运芳, 张涛, 等. 清温并用法对慢加急性肝衰竭大鼠肝组织 Treg/Th17 型细胞因子及转录因子的影响[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(9): 4618-4622.
- [13] 杜珊, 王杰, 陈斌, 等. 温阳解毒化瘀颗粒对肝衰竭 IETM 大鼠 TLR4 mRNA, TNF- α 及肝细胞凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(2): 26-32.
- [14] TSUCHIDA H, MOSTARI P, YAMADA K, et al. Paraventricular dynorphin a neurons mediate LH pulse suppression induced by hindbrain glucoprivation in female rats[J]. Endocrinology, 2020, 161 (11): bqaa161.
- [15] TAN N, JIAN G, PENG J, et al. Chishao - Fuzi herbal pair restore the macrophage M1/M2 balance in acute-on-chronic liver failure[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 328: 118010.
- [16] TANG D, WANG R Y, SUN K W, et al. Network pharmacology-based prediction of active compounds in the Wenyang Jiedu Huayu formula acting on acute-on-chronic liver failure with experimental support *in vitro* and *in vivo*[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 1003479.
- [17] 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组, 中华医学会肝病学会分会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊治指南(2018 年版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2019, 37(1): 1-9.
- [18] GALAZ A, CORTÉS-MOLINA F, ARCE-MOLINA R, et al. Imaging of the lactate/pyruvate ratio using a genetically encoded Förster resonance energy transfer indicator[J]. Anal Chem, 2020, 92(15): 10643-10650.
- [19] WIJNGAARD R, PERRAMÓN M, PARRA-ROBERT M, et al. Validation of a gas chromatography-mass spectrometry method for the measurement of the redox state metabolic ratios lactate/pyruvate and β -hydroxybutyrate/acetacetate in biological samples[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(9): 4752.
- [20] 陈斌, 孙克伟, 彭杰, 等. 基于阳黄-阴黄-阴黄辨证模式治疗慢性重型肝炎的临床观察[J]. 中国中医药科技, 2012, 19(1): 57-58.
- [21] 中国中西医结合学会. 慢加急性肝衰竭中西医结合诊疗专家共识[J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(9): 2045-2053.
- [22] SARIN S K, CHOUDHURY A. Acute-on-chronic liver failure: terminology, mechanisms and management[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2016, 13(3): 131-149.
- [23] SARIN S K, CHOUDHURY A. Management of acute-on-chronic liver failure: an algorithmic approach[J]. Hepatol Int, 2018, 12(5): 402-416.
- [24] MOREAU R, CLÀRIA J, AGUILAR F, et al. Blood metabolomics uncovers inflammation-associated mitochondrial dysfunction as a potential mechanism underlying ACLF[J]. J Hepatol, 2020, 72(4): 688-701.
- [25] NISHIKAWA T, BELLANCE N, DAMM A, et al. A switch in the source of ATP production and a loss in capacity to perform glycolysis are hallmarks of hepatocyte failure in advance liver disease[J]. J Hepatol, 2014, 60(6): 1203-1211.
- [26] ZHANG I W, CURTO A, LÓPEZ-VICARIO C, et al. Mitochondrial dysfunction governs immunometabolism in leukocytes of patients with acute-on-chronic liver failure[J]. J Hepatol, 2022, 76(1): 93-106.
- [27] WANG Y, LI X, CHEN Q, et al. Histone deacetylase 6 regulates the activation of M1 macrophages by the glycolytic pathway during acute liver failure[J]. J Inflamm Res, 2021, 14: 1473-1485.
- [28] ARROYO V, ANGELI P, MOREAU R, et al. The systemic inflammation hypothesis: Towards a new paradigm of acute decompensation and multiorgan failure in cirrhosis[J]. J Hepatol, 2021, 74(3): 670-685.
- [29] DE SALLES É M, RAEDER P L, ANGELI C B, et al. P2RX7 signaling drives the differentiation of Th1 cells through metabolic reprogramming for aerobic glycolysis[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1140426.
- [30] SUN L, FU J, ZHOU Y. Metabolism controls the balance of Th17/T-regulatory cells[J]. Front Immunol, 2017, 8: 1632.
- [31] CHENG J, ZHANG R, XU Z, et al. Early glycolytic reprogramming controls microglial inflammatory activation[J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1): 129.
- [32] YU W P, DING J L, LIU X L, et al. Titanium dioxide nanotubes

- promote M2 polarization by inhibiting macrophage glycolysis and ultimately accelerate endothelialization [J]. *Immune Inflamm Dis*, 2021, 9(3): 746-757.
- [33] JIANG A, DU P, LIU Y, et al. Metformin regulates the Th17/Treg balance by glycolysis with TIGAR in hepatic ischemia-reperfusion injury[J]. *J Pharmacol Sci*, 2021, 146(1): 40-48.
- [34] SHIRAI T, NAZAREWICZ R R, WALLIS B B, et al. The glycolytic enzyme PKM2 bridges metabolic and inflammatory dysfunction in coronary artery disease[J]. *J Exp Med*, 2016, 213(3): 337-354.
- [35] DU Y, ZHENG R, YIN H, et al. Mycobacterium tuberculosis Rv2653 protein promotes inflammation response by enhancing glycolysis [J]. *Jpn J Infect Dis*, 2023, 76(6): 343-350.
- [36] 何瑞娟, 白露, 谭攀攀, 等. 芍药苷通过调控 Akt/FoxO1 信号通路对 2 型糖尿病大鼠的保护作用[J]. *中成药*, 2023, 45(8): 2732-2736.
- [37] ZHONG L, LI J, YU J, et al. Anemarrhena asphodeloides Bunge total saponins ameliorate diabetic cardiomyopathy by modifying the PI3K/AKT/HIF-1 α pathway to restore glycolytic metabolism [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 319(Pt 3): 117250.
- [38] 王木源, 李军祥, 卢心毓, 等. 清肠温中方对溃疡性结肠炎小鼠组织驻留记忆 CD4⁺T 细胞的调控作用[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2023, 31(8): 583-588.
- [39] SHANG L, ZHANG M, LI J, et al. Dachengqi decoction alleviates acute lung injury by suppressing HIF-1 α -mediated glycolysis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 321: 117410.
- [40] TANIGUCHI K, KAGEYAMA S, MOYAMA C, et al. γ -Glutamylcyclotransferase, a novel regulator of HIF-1 α expression, triggers aerobic glycolysis [J]. *Cancer Gene Ther*, 2022, 29(1): 37-48.
- [41] LIANG S, DONG S, LIU W, et al. Accumulated ROS activates HIF-1 α -induced glycolysis and exerts a protective effect on sensory hair cells against noise-induced damage [J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 8: 806650.

编辑:季春来

收稿日期:2023-11-10

(上接第 63 页)

本研究结果显示,益气祛白颗粒联合毫火针治疗稳定期非节段性白癜风患者皮损改善总显效率及白斑复色率更高($P<0.05$)。治疗后,两组外周血 CXCL10 表达水平均较治疗前显著降低($P<0.05$),且试验组下降更为显著($P<0.05$),提示毫火针治疗可进一步下调皮肤局部 CXCL10 表达水平,对白癜风的治疗以及疗效的增强具有积极意义。然而,毫火针下调 CXCL10 表达的具体机制尚不清楚,需要进一步实验研究加以探索。通过 DLQI 评分发现,治疗后两组生活质量均得到提高($P<0.05$)。据统计,55% 的白癜风患者存在中到重度抑郁症状^[2]。治疗后,试验组 PHQ-9 评分较治疗前明显下降($P<0.05$),对照组 PHQ-9 评分下降,但无统计学意义($P>0.05$),提示联合治疗能够更显著改善患者的心理健康。

综上所述,益气祛白颗粒联合毫火针治疗稳定期非节段性白癜风,能够有效促进白斑复色,提升患者生活质量,并减轻其抑郁症状。这种治疗方法为白癜风的中医治疗开辟了新的思路。

参考文献:

- [1] OBENG-ASUMENG C, RODRIGUEZ-BOLANOS F, GOODERHAM M. Real-World experience of vitiligo patients: A retrospective chart review[J]. *J Cutan Med Surg*, 2024, 28(2): 134-135.
- [2] BIBEAU K, EZZEDINE K, HARRIS J E, et al. Mental health and psychosocial quality-of-life burden among patients with vitiligo: Findings from the global valiant study[J]. *JAMA Dermatol*, 2023, 159(10): 1124-1128.
- [3] 林志鑫, 吴艳华. 中医中药治疗白癜风用药经验分享[J]. *皮肤性病诊疗学杂志*, 2015, 22(6): 443-445.
- [4] AMER A, WU Y, LI C, et al. Burden of vitiligo on Chinese patients: An online survey[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2023, 136(19): 2365-2367.
- [5] 杨铨源, 施伟民. 益气祛白冲剂联合 308 nm 准分子激光控制白癜风扩散及对白斑复色的影响[J]. *医学综述*, 2016, 22(21): 4306-4308, 4315.
- [6] 中国中西医结合学会皮肤性病专业委员会特色疗法学组. 火针在皮肤科应用专家共识[J]. *中国中西医结合皮肤性病学杂志*, 2019, 18(6): 638-641.
- [7] WANG X X, WANG Q Q, WU J Q, et al. Increased expression of CXCR3 and its ligands in patients with vitiligo and CXCL10 as a potential clinical marker for vitiligo [J]. *Br J Dermatol*, 2016, 174(6): 1318-1326.
- [8] EL-DOMYATI M, EL-DIN W H, REZK A F, et al. Systemic CXCL10 is a predictive biomarker of vitiligo lesional skin infiltration, PUVA, NB-UVB and corticosteroid treatment response and outcome [J]. *Arch Dermatol Res*, 2022, 314(3): 275-284.
- [9] 中国中西医结合学会皮肤性病专业委员会色素病学组. 白癜风诊疗共识(2021 版)[J]. *中华皮肤科杂志*, 2021, 54(2): 105-109.
- [10] 中国中西医结合学会皮肤性病专业委员会色素病学组. 黄褐斑和白癜风的诊疗标准(2010 年版)[J]. *中华皮肤科杂志*, 2010, 43(6): 373.
- [11] SHARMA S, BHARDWAJ A, DWIVEDI P, et al. Apremilast add-on benefits over conventional drugs (ABCD) in unstable non-segmental vitiligo: A 12-week single-center randomized controlled trial [J]. *Cureus*, 2023, 15(4): e37180.
- [12] INOUE S, SUZUKI T, SANO S, et al. JAK inhibitors for the treatment of vitiligo[J]. *J Dermatol Sci*, 2024, 113(3): 86-92.
- [13] TAKEO M, LEE W, ITO M. Wound healing and skin regeneration[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2015, 5(1): a023267.
- [14] 杨莉莉, 吴华丽, 黄佩文, 等. 电火针治疗稳定期白癜风的临床运用体会[J]. *上海中医药杂志*, 2021, 55(5): 30-32, 45.

编辑:马丽亚

收稿日期:2024-05-21