

引用:王雅,石媛媛,钟航宇,张涛.基于TIM-3调控巨噬细胞极化探讨疏肝理脾汤干预代谢相关脂肪性肝炎大鼠作用机制[J].中医药导报,2026,32(4):23-29,66.

# 基于TIM-3调控巨噬细胞极化探讨疏肝理脾汤干预代谢相关脂肪性肝炎大鼠作用机制\*

王 雅<sup>1</sup>,石媛媛<sup>2</sup>,钟航宇<sup>3</sup>,张 涛<sup>1</sup>

(1.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007;

2.榆林市中医医院,陕西 榆林 719000;

3.长沙市第九医院,湖南 长沙 410007)

**[摘要]** 目的:基于T细胞免疫球蛋白黏蛋白-3(TIM-3)调控巨噬细胞极化的机制,从动物实验、细胞实验探讨疏肝理脾汤干预代谢相关脂肪性肝炎(MASH)大鼠的作用靶点及免疫学机制。方法:将30只雄性SD大鼠随机分为疏肝理脾汤组、模型组、空白组,每组10只,空白组予常规饲料,疏肝理脾汤组、模型组予蛋氨酸-胆碱缺乏饲料4周,构建MASH动物模型。造模成功后,3组均给予正常饮食,疏肝理脾汤组给予疏肝理脾汤[6.18 g/kg(按生药计)],其余2组给予等量生理盐水。干预4周后,Masson染色评估肝组织病理,蛋白质印迹(Western blotting)法、免疫组化法评估TIM-3表达。脂多糖(LPS)诱导RAW264.7巨噬细胞极化,分为对照组(20%空白血浆+1 μg/mL LPS共培养)、中药组(20%疏肝理脾汤含药血浆+1 μg/mL LPS共培养),另设一组不加血浆,只含CCK-8的培养基空白组。分别在干预12、24、48 h后,细胞计数试剂盒-8(CCK-8)检测法检测细胞活性,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测炎症因子,流式细胞术检测M1/M2表型标志物。结果:空白组大鼠肝组织的肝细胞结构正常,模型组、疏肝理脾汤组大鼠肝组织可见肝细胞脂肪变和气球样变,炎症细胞浸润。与空白组比较,模型组及疏肝理脾汤组大鼠肝组织TIM-3表达显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,疏肝理脾汤组肝组织TIM-3表达显著增强( $P<0.01$ )。与空白组比较,干预12、24、48 h对照组、中药组RAW264.7细胞活性显著增强( $P<0.01$ );与对照组比较,干预12、24、48 h中药组RAW264.7细胞活性显著增强( $P<0.01$ );干预12、24、48 h对照组、中药组进行组内两两比较,差异均有统计学意义( $P<0.01$ )。各组RAW264.7细胞上清液检测,干预12、48 h中药组TNF- $\alpha$ 、IL-6表达水平,CD80、CD86阳性比例均低于对照组( $P<0.01$ ),中药组IL-10、TGF- $\beta$ 表达水平,CD206、Arg-1阳性比例均高于对照组( $P<0.01$ );干预12、24、48 h对照组、中药组进行组内两两比较,随时间延长,IL-6及TNF- $\alpha$ 水平均持续升高( $P<0.01$ ),IL-10及TGF- $\beta$ 水平均持续降低( $P<0.01$ );干预48 h对照组、中药组CD80、CD86阳性比例均高于同组干预12 h( $P<0.01$ ),Arg-1、CD206阳性比例均低于同组干预12 h( $P<0.01$ )。结论:疏肝理脾汤能通过上调TIM-3蛋白表达,调控巨噬细胞M1/M2极化平衡,抑制促炎级联反应并增强抗炎修复功能,从而改善MASH病理进程。

**[关键词]** 代谢相关脂肪性肝炎;疏肝理脾汤;T细胞免疫球蛋白黏蛋白-3;巨噬细胞极化;炎症;大鼠

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2026)04-0023-07

**DOI:** 10.13862/j.cn43-1446/r.2026.04.005

## Mechanisms of Shugan Lipi Decoction (疏肝理脾汤) in Treating Rats with Metabolic Cassociated Steatohepatitis Based on TIM-3-Regulated Macrophage Polarization

WANG Ya<sup>1</sup>, SHI Yuanyuan<sup>2</sup>, ZHONG Hangyu<sup>3</sup>, ZHANG Tao<sup>1</sup>

(1.The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410007, China;

2.Yulin Chinese Medicine Hospital, Yulin Shaanxi 719000, China;

\*基金项目:湖南省自然科学基金项目(2022JJ30459);湖南省卫生健康委科研计划基金项目(B202303105937);湖南省中医药科学基金项目(2023080);湖南省2024年度重点研发计划项目(2024JK2129)

通信作者:张涛,男,主任医师,研究方向为中西医结合防治肝胆病

3.Changsha Ninth Hospital, Changsha Hunan 410007, China)

[Abstract] Objective: Based on the mechanism of immune regulatory protein Tim-3 regulating macrophage polarization, this study aims to explore the targets and immunological mechanisms of Shugan Lipi decoction intervention in metabolic associated steatohepatitis (MASH) rats through animal and cell experiments. Methods: Totally 30 male SD rats were randomly divided into Shugan Lipi decoction group, model group, and blank group, with 10 rats in each group. The blank group was given conventional feed, while the Shugan Lipi decoction group and model group were given methionine choline deficient feed for 4 weeks to construct a MASH animal model. After successful modeling, all three groups were given a normal diet. The Shugan Lipi decoction group was intervened with Shugan Lipi decoction [6.18 g/kg (calculated based on crude drug)], while the other two groups were intervened with an equal amount of physiological saline. After 4 weeks of intervention, Masson staining was used to evaluate liver tissue pathology. Western blotting and immunohistochemical were used to evaluated TIM-3 expression. LPS was used to induce polarization of RAW264.7 macrophages, and the RAW264.7 macrophages were divided into a control group (20% blank plasma+1 μg/mL LPS co culture) and a traditional Chinese medicine group (20% Shugan Lipi decoction drug containing plasma+1 μg/mL LPS co culture). Additionally, a blank group containing only CCK-8 in culture medium without plasma was established. After intervention for 12, 24, and 48 h, cell viability was detected by CCK-8 assay. Inflammatory factors were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and M1/M2 phenotype markers were detected by flow cytometry. Results: The blank group showed normal hepatocyte structure in rat liver tissue, while the model group and the Shugan Lipi decoction group exhibited hepatocyte steatosis, ballooning degeneration, and inflammatory cell infiltration. Compared with the blank group, the expression of TIM-3 in liver tissue of the model group and the Shugan Lipi decoction group was significantly reduced ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the expression of TIM-3 in liver tissue was significantly enhanced in the Shugan Lipi decoction group ( $P<0.01$ ). Compared with the blank group, the viability of RAW264.7 cells in the control group and the traditional Chinese medicine group was significantly enhanced at 12, 24, and 48 h of intervention ( $P<0.01$ ). Compared with the control group, the viability of RAW264.7 cells in the traditional Chinese medicine group was significantly enhanced at 12, 24, and 48 h of intervention ( $P<0.01$ ). In the control group and the traditional Chinese medicine group, pairwise intra-group comparisons were conducted at 12, 24, and 48 h, with significant enhancement in activity observed at all time points ( $P<0.01$ ). The supernatant of RAW264.7 cells in each group was detected, and the expression levels of TNF-α, IL-6, as well as the positive rates of CD80 and CD86 in the traditional Chinese medicine group were significantly decreased compared with the control group after intervention for 12 h and 48 h ( $P<0.01$ ). The expression levels of IL-10, TGF-β, as well as the positive rates of CD206 and Arg-1 in the traditional Chinese medicine group were significantly increased compared with the control group ( $P<0.01$ ). At 12, 24, and 48 h of intervention, pairwise comparisons within the control group and the traditional Chinese medicine group showed that over time, the levels of IL-6 and TNF-α continuously increased ( $P<0.01$ ), while the levels of IL-10 and TGF-β continuously decreased ( $P<0.01$ ). At 48 h of intervention, the positive rates of CD80 and CD86 in both the control group and the traditional Chinese medicine group were higher than those in the same group at 12 h ( $P<0.01$ ), whereas the positive rates of Arg-1 and CD206 were lower than those in the same group at 12 h ( $P<0.01$ ). Conclusion: Shugan Lipi decoction can improve the pathological process of MASH by up-regulating TIM-3 expression, regulating macrophage M1/M2 polarization balance, inhibiting pro-inflammatory cascade reactions, and enhancing anti-inflammatory repair function.

[Keywords] metabolic associated steatohepatitis; Shugan Lipi decoction; T-cell immunoglobulin mucin-3; macrophage polarization; inflammation; rat

代谢相关脂肪性肝病(metabolic associated fatty liver diseases, MAFLD)已成为我国第一大慢性肝病<sup>[1]</sup>,其进展型代谢相关脂肪性肝炎(metabolic associated steatohepatitis, MASH)以肝脏炎症、脂肪变性和纤维化为特征,是肝硬化和肝癌的重要危险因素。全球MAFLD患病率超25%,20%~30%进展为MASH,且发病率持续上升。现有的生活方式干预及法尼醇X受体(FXR)激动剂、维生素E等药物调控疗效有限,存在

靶点单一、副作用等问题,亟需探索多靶点新疗法<sup>[2]</sup>。

MASH属中医学“肝癖”“痰浊”范畴,病机以肝郁脾虚为本,痰瘀互结为标,临床主张“肝病实脾”以调和肝脾、祛痰化瘀。疏肝理脾汤由四逆散与四君子汤化裁而成,前期研究证实疏肝理脾汤可调节肠道菌群、改善肠屏障、抑制肝炎<sup>[3-5]</sup>,但其对肝脏免疫微环境,特别是巨噬细胞极化的调控机制尚不明晰。

免疫负调控分子T细胞免疫球蛋白黏蛋白-3(TIM-3)通过抑制促炎M1型、促进抗炎M2型巨噬细胞极化,调控炎症级联反应干预肝损伤,是潜在MASH新靶点<sup>[6]</sup>。然而,目前针对TIM-3的药物多为单抗或小分子抑制剂,天然复方中药的干预研究仍属空白。

基于“肝病实脾”理论和前期发现疏肝理脾汤的肠道-肝脏抗炎效应,本研究提出假说:疏肝理脾汤可能通过上调TIM-3表达,调控巨噬细胞M1/M2极化,重塑肝脏免疫微环境,从而改善MASH。本研究通过构建MASH大鼠模型和LPS诱导巨噬细胞模型,系统探究该方对TIM-3通路、炎症因子谱及巨噬细胞表型的作用,旨在阐明中药复方多靶点治疗MASH的免疫机制,并为“肝病实脾”理论提供新科学依据。

## 1 材 料

1.1 动物及细胞 30只8周龄SPF级雄性SD大鼠,体质量200~250 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,动物生产许可证号:SCXK(湘)2024-0009,动物质量合格证号:430727221102990415。实验动物饲养于湖南中医药大学第一附属医院中心实验室SPF级动物实验中心(动物使用许可证号:SYXF(湘)2020-0010)。正常温湿度(温度24~28℃,相对湿度60%~75%)环境下,保持每天12~14 h光照。自由摄食、饮水及运动。本研究经湖南中医药大学第一附属医院动物伦理委员会的批准(伦理批号:ZYFY20230725-05)。小鼠单核-巨噬细胞系RAW264.7(型号:CL-0190)由武汉普诺赛生命科技有限公司提供,选择1%双抗(青霉素、链霉素)和含10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养基作为细胞培养基。

1.2 药物及试剂 疏肝理脾汤(柴胡15 g,茯苓15 g,白芍15 g,白术10 g,党参10 g,砂仁5 g,当归10 g,炒枳实5 g,湘曲5 g,青皮5 g,甘草5 g)的中药饮片由湖南中医药大学第一附属医院提供,湖南中医药大学第一附属医院中心实验室副研究员龙红萍鉴定饮片为正品。疏肝理脾汤经药剂室制备,采用蒸馏水浸泡30 min,分别煎煮40 min及30 min后,混合二次煎煮药汁,水浴浓缩至2.0 g/mL(按生药计),4℃保存备用。

DMEM培养基(货号:AW-M003)、胰酶消化液(货号:AWC0238a)、FBS(货号:AWC0227a)、双抗(青霉素、链霉素)(货号:AWH0529a)、细胞计数试剂盒-8(CCK-8)(货号:AWC0114a)均购自长沙艾碧维生物科技有限公司;TIM-3抗体(货号:60355-1-Ig)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )(货号:KE10002)、白介素-6(IL-6)(货号:KE10007)、IL-10(货号:KE10008)、转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )(货号:KE10005)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;CD86(货号:12-0862-81)、CD80(货号:12-0801-81)、CD206(货号:12-2061-80)、精氨酸酶1(Arg-1)(货号:12-3697-80)均购自美国赛默飞世尔科技公司。

1.3 主要仪器 台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,型号:H1650R);全自动酶标洗板机(深圳市汇松科技发展有限公司,型号:PW-812);多功能酶标分析仪(深圳市汇松科技发展有限公司,型号:MB-5300);电热恒温培养箱(北京市永光明医疗仪器有限公司,型号:DHP-500);超净工作台(北京亚泰隆仪器技术有限公司,型号:YT-CJ-2NB);直热式二氧化碳培养箱(上海三腾仪器有限公司,型号:DH-160I);倒置生物显微镜(北京中显恒业仪器仪表有限公司,型

号:DSZ2000X);流式仪(美国Beckman公司,型号:A00-1-1102);低速离心机(上海知信实验仪器技术有限公司,型号:SL02)。

## 2 方 法

### 2.1 动物实验验证

2.1.1 动物模型制备、分组与给药 30只大鼠适应性喂养1周后,采用随机数字表法分为空白组、模型组、疏肝理脾汤组,每组各10只。本研究涉及非酒精性脂肪性肝炎模型缺乏公认有效的对照药物,且结合前期研究<sup>[7-9]</sup>,疏肝理脾汤高剂量组改善肝脏炎症效果较中、低剂量更佳,因此本研究未设置阳性对照药及剂量探索分析。其中模型组、疏肝理脾汤组大鼠给予蛋氨酸-胆碱缺乏(methionine and choline deficient, MCD)饮食4周,投食量为10 g/(100 g·d),饮水量为12 mL/100 g。MCD饮食诱导的MASH大鼠模型,能在短时间内重现人类脂肪性肝炎的核心病理特征,结合前期造模经验,本研究予相同方法造模。预实验结果提示,给予MCD饮食4周后,HE染色大鼠肝脏组织:模型组示脂肪变性累及 $\geq 5\%$ 的肝细胞,伴有肝细胞气球样变、小叶内炎症,与空白对照组有显著差异,提示造模成功<sup>[7]</sup>。造模成功后,疏肝理脾汤组大鼠予疏肝理脾汤(6.18 g/kg)灌胃<sup>[8]</sup>,模型组、空白组给予等体积生理盐水灌胃,连续干预4周。

2.1.2 肝组织组织病理学检测 HE染色:腹腔注射戊巴比妥钠(3.5 mL/kg)麻醉,麻醉成功后剪开腹腔,显露肝组织,取肝左叶里距离边缘0.5 cm处约0.5 cm $\times$ 0.5 cm $\times$ 0.5 cm大小的组织块,用4%多聚甲醛固定,置于-80℃冰箱保存。10%甲醛固定大鼠肝组织48 h后,脱水,石蜡包埋切成5  $\mu$ m厚片,放到烤箱60℃烘烤30 min,后依次苏木精染色、水洗、蓝化、伊红染色,脱水透明后封片。Masson染色:取材,石蜡切片同HE染色,后予Weigert铁苏木素染色液染色,酸性乙醇分化液分化,Masson蓝化液返蓝,丽春红品红染色液染色,苯胺蓝染色液中染色,弱酸工作液洗1 min。最后95%乙醇、无水乙醇分别脱水1次、3次,各5~10 s,二甲苯透明1~2 min,透明3次,最后中性树脂胶封固。在光学显微镜下观察大鼠肝组织病理变化,着色特征为细胞核、胶原纤维/蛋白呈蓝色,肌纤维、细胞质呈红色。依据肝细胞脂肪变、小叶内炎症程度、肝细胞气球样变病变范围和数量,评定非酒精性脂肪性肝病活动度评分(NAS):NAS评分 $< 3$ 分,可排除NASH或NASH缓解;NAS评分 $> 4$ 分,可诊断NASH;3分 $<$ NAS评分 $< 4$ 分,NASH可能。得分范围为0~8分。(见表1)

表1 NAS评分标准

项目	评分/分	评分标准
肝细胞脂肪变	0	$< 5\%$
	1	5%~33%
	2	34%~66%
小叶内炎症	3	$> 66\%$
	0	无
	1	$< 2$ 个
肝细胞气球样变	2	2~4个
	3	$> 4$ 个
	0	无
	1	少见
	2	多见

2.1.3 蛋白质印迹(Western blotting)法、免疫组化法检测肝组织TIM-3蛋白表达 TIM-3是调控巨噬细胞M1/M2表型极化的关键蛋白,蛋白质印迹法检测步骤为取出冻肝组织块,振荡,冰浴,吹打,4℃,以12 000×g离心10 min后收集总蛋白溶液。BCA法检测蛋白浓度。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后,转膜1 h,稀释一抗、二抗、发光液及缓冲液逐孔加入测定板,聚偏二氟乙烯(PVDF)膜的蛋白面朝上与ECLA和ECLB的混合试剂充分接触1~2 min,凝胶图像分析拍照,Alpha软件分析目标带光密度值。免疫组化法检测步骤为4%多聚甲醛浸泡肝组织后,烤片,脱蜡,无水乙醇I、II、III,各5 min,PBS缓冲液中洗涤,一抗、二抗孵育后充分洗涤,苏木素复染,分化、返蓝,中性树脂胶封片。采用ImageJ图像分析系统显微镜下对各组切片进行分析,观察大鼠肝组织TIM-3蛋白沉积情况。

2.2 细胞实验验证

2.2.1 含药血浆的制备 12只8周龄SD大鼠,随机分含药血浆组和空白组,每组6只。含药血浆组大鼠予疏肝理脾汤中药液(6.18 g/kg,10 mL/kg)灌胃,空白组大鼠予等体积生理盐水灌胃,连续灌胃7 d后,予戊巴比妥钠腹腔注射,麻醉大鼠,腹主动脉取血,4℃,以800×g离心15 min后取上清液,0.22 μm滤膜过滤除菌,-80℃冰箱备用。

2.2.2 细胞培养、LPS诱导RAW264.7细胞极化与分组 37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中放置1%双抗和10% FBS DMEM培养基培养RAW264.7细胞。镜下观察细胞生长情况,细胞生长至80%~90%时,轻轻吹打细胞,使贴壁细胞脱落,按1:3比例进行传代,取对数生长期细胞进行实验。

无菌环境下,配置1 μg/mL LPS母液,-20℃保存,使用时将母液稀释10 000倍并加入培养基配制成浓度为1 μg/mL含LPS培养基,加入至细胞培养皿中,诱导RAW264.7细胞向M1型巨噬细胞转化。

取生长状态良好细胞分6组:12 h对照组(20%空白血浆+1 μg/mL LPS干预12 h);24 h对照组(20%空白血浆+1 μg/mL LPS干预24 h);48 h对照组(20%空白血浆+1 μg/mL LPS干预48 h);12 h中药组(20%疏肝理脾汤含药血浆+1 μg/mL LPS干预12 h);24 h中药组(20%疏肝理脾汤含药血浆+1 μg/mL LPS干预24 h);48 h中药组(20%疏肝理脾汤含药血浆+1 μg/mL LPS干预48 h),另设一组空白组(不加血浆,只含CCK-8的培养基)。

2.2.3 不同体积分数含药血浆对RAW264.7细胞增殖的影响 取处于对数生长期细胞,用胰酶消化计数,以5×10<sup>5</sup>个细胞/孔密度接种于96孔板内,每孔100 μL。将其分为空白组(不加血浆,只含CCK-8的培养基)、对照组(细胞+20%空白血浆)、中药组(细胞+20%疏肝理脾汤含药血浆),各组均设3个复孔。完全培养基配置10% CCK-8溶液,培养贴壁后按照如上方法进行处理12、24、48 h后,每孔加入10 μL CCK-8溶液,去除含药培养基,每孔加入100 μL含有CCK-8的培养基。37℃、5% CO<sub>2</sub>继续孵育2 h后于汇松酶标仪分析450 nm处吸光度(OD)值,取均值做柱状图。

2.2.4 ELISA法检测细胞上清液中炎症因子水平 取RAW 264.7细胞上清液,依照试剂盒操作说明于12、24、48 h分别检

测中药组及对照组细胞上清液肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白介素-6(IL-6)、转化生长因子-β(TGF-β)、IL-10水平,取450 nm波长测量OD值。

2.2.5 流式法检测 RAW264.7 细胞中 CD86、CD206、CD80、Arg-1 阳性细胞百分比 LPS母液浓度为10 mg/mL稀释10 000倍配制成1 μg/mL工作浓度。细胞以350×g离心5 min,PBS清洗,弃上清液,150 μL 0.5% BSA-PBS重悬细胞,离心,弃上清液,重悬细胞沉淀后,加入相应CD86、CD80、CD206和Arg-1抗体,室温避光孵育30 min,同时设置阴性管和单染管,洗涤,以400×g离心5 min,弃上清液,150 μL 0.5% BSA-PBS重悬细胞于12、48 h上机流式细胞学分别检测中药组及对照组M1型巨噬细胞标志物CD86、CD80以及M2型巨噬细胞标志物CD206、Arg-1。

2.3 统计学方法 使用SPSS 26.0统计软件进行分析。计量资料用“均数±标准差”(x̄±s)表示,满足正态性与方差齐性的数据采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-t检验。P<0.05表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 动物实验验证结果

3.1.1 一般情况 空白组大鼠皮毛光泽,行为活泼,反应敏捷,大便量、色、质正常。造模成功后,模型组与空白组相比,皮毛色暗,光泽度差,食量下降,反应迟缓,行动缓慢,伴有争斗情况,体质量增加,大便质黏腻、色黄。药物干预后疏肝理脾汤组在食欲、行为、皮毛色泽,大便量、色、质等方面较模型组有明显好转。

3.1.2 疏肝理脾汤对大鼠肝组织病理学改变的影响 空白组大鼠肝组织:肝细胞结构正常,未见明显纤维化改变及肝细胞脂肪变性、气球样变。模型组大鼠肝组织:可见明显肝细胞脂肪变和气球样变,明显紊乱,小叶内可见混合性炎症细胞浸润及窦周纤维化,汇管区见桥接样纤维化链接。疏肝理脾汤组大鼠肝组织:可见部分肝细胞脂肪变和气球样变,结构紊乱,可见部分窦周纤维化。(见图1~2)

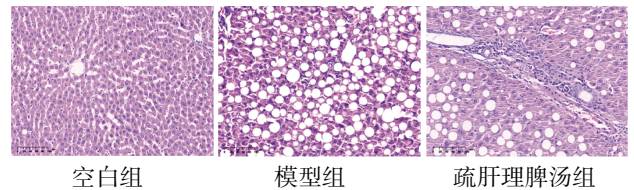


图1 各组大鼠肝组织病理变化 (HE染色,标尺=100μm,×200)

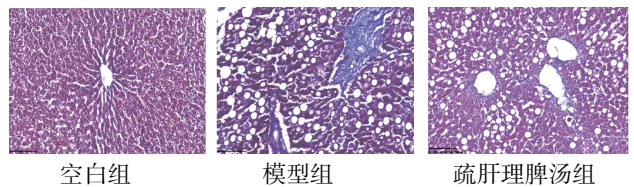


图2 各组大鼠肝纤维化情况 (Masson染色,标尺=100 μm,×200)

与空白组比较,模型组、疏肝理脾汤组大鼠肝脂肪变性、小叶内炎症、气球样变、NAS评分明显升高,差异均有统计学意义(P<0.01);与模型组比较,疏肝理脾汤组大鼠肝脂肪变性、气球样变、NAS评分明显降低,差异均有统计学意义(P<0.01)。(见表2)

表2 各组大鼠肝组织病理评分比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,分)

组别	n	肝脂肪变性	小叶内炎症	气球样变	NAS评分
空白组	10	0.00±0.00	0.41±0.55	0.41±0.55	0.81±1.10
模型组	10	2.81±0.45 <sup>a</sup>	1.20±0.45 <sup>a</sup>	1.21±0.45 <sup>a</sup>	5.22±0.45 <sup>a</sup>
疏肝理脾汤组	10	0.81±0.45 <sup>ab</sup>	1.01±0.00 <sup>a</sup>	0.81±0.45 <sup>ab</sup>	2.62±0.89 <sup>ab</sup>
F		38.879	10.712	9.529	57.995
P		0.000	0.000	0.001	0.000

注:与空白组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ 。

3.1.3 疏肝理脾汤对大鼠肝组织TIM-3蛋白表达的影响 模型组、疏肝理脾汤组大鼠肝组织TIM-3免疫组化、蛋白表达水平均明显低于空白组( $P<0.01$ );与模型组比较,疏肝理脾汤组大鼠肝组织TIM-3免疫组化、蛋白表达水平均显著升高( $P<0.01$ )。(见表3~4、图2~3)

表3 免疫组化法检测各组大鼠肝组织中TIM-3表达 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	TIM-3
空白组	10	19.80±7.64
模型组	10	8.82±0.84 <sup>a</sup>
疏肝理脾汤组	10	31.62±10.31 <sup>ab</sup>
F		11.986
P		0.001

注:与空白组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ 。

表4 各组大鼠肝组织TIM-3蛋白表达水平 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	TIM-3
空白组	10	1.03±0.06
模型组	10	0.24±0.06 <sup>a</sup>
疏肝理脾汤组	10	1.57±0.11 <sup>ab</sup>
F		474.018
P		0.000

注:与空白组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ 。

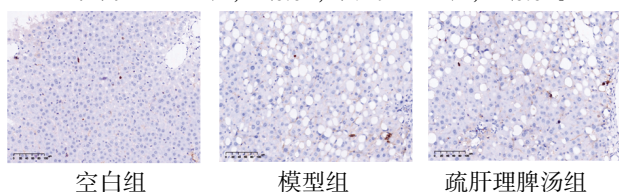


图3 各组大鼠肝组织TIM-3蛋白表达  
(免疫组化,标尺=100 μm,×200)

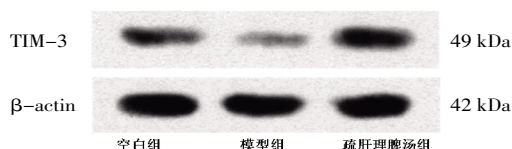


图4 各组大鼠肝组织中TIM-3蛋白条带图

## 3.2 细胞实验验证结果

3.2.1 含药血浆对RAW264.7细胞活性干预变化 除空白组外,其余各组RAW264.7细胞活性(OD值)随着干预时间延长均有不同程度的增加;干预12、24、48 h对照组、中药组进行组内两两比较,差异均有统计学意义( $P<0.01$ )。对于干预12、24、48 h各组细胞活性进行组间两两比较,结果显示:空白组RAW264.7细胞活性明显低于对照组、中药组,差异有统计学意义( $P<0.01$ );中药组RAW264.7细胞活性高于对照组,差异

有统计学意义( $P<0.01$ )。(见表5、图5)

表5 不同含药血浆浓度对RAW264.7细胞活性的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	12 h	24 h	48 h	F	P
空白组	3	0.215±0.014	0.233±0.015	0.231±0.018	1.443	0.288
对照组	3	1.158±0.029 <sup>a</sup>	1.355±0.018 <sup>ac</sup>	1.467±0.019 <sup>acd</sup>	127.605	0.000
中药组	3	1.183±0.023 <sup>ab</sup>	1.435±0.020 <sup>abc</sup>	1.701±0.009 <sup>abcd</sup>	379.542	0.000
F		1 024.624	1 334.231	3 235.806		
P		0.000	0.000	0.000		

注:与空白组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与对照组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与同组12 h比较,<sup>c</sup> $P<0.01$ ;与同组24 h比较,<sup>d</sup> $P<0.01$ 。

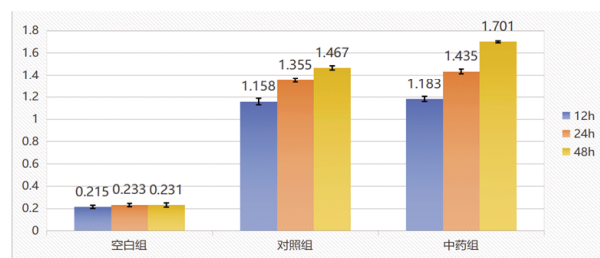


图5 不同含药血浆浓度对RAW264.7细胞活性的影响

3.2.2 含药血浆对RAW264.7细胞上清液IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 表达的影响 与空白组比较,对照组与中药组RAW264.7细胞在干预12 h后,促炎因子(IL-6、TNF- $\alpha$ )IL-10(抗炎/修复因子)表达均显著升高,而IGF- $\beta$ (抗炎/修复因子)表达显著降低( $P<0.01$ )。干预12、24、48 h后,中药组RAW264.7细胞TNF- $\alpha$ 、IL-6表达水平均低于对照组( $P<0.01$ ),IL-10、TGF- $\beta$ 表达水平均高于对照组( $P<0.01$ )。干预12、24、48 h对照组、中药组进行组内两两比较,差异均有统计学意义( $P<0.01$ ),提示随时间延长,对照组与中药组的IL-6及TNF- $\alpha$ 水平均持续升高,而IL-10及TGF- $\beta$ 水平均持续降低。(见表6)

表6 各组RAW264.7细胞上清液TNF- $\alpha$ 、IL-6、TGF- $\beta$ 、IL-10含量 ( $\bar{x}\pm s$ ,pg/mL)

指标	组别	n	12 h	24 h	48 h	F	P
IL-6	空白组	3	41.25±4.34				
	对照组	3	60.09±4.59	92.11±5.93 <sup>b</sup>	144.49±3.87 <sup>bc</sup>	93.642	0.000
	中药组	3	45.05±4.42 <sup>a</sup>	75.14±2.08 <sup>ab</sup>	120.94±8.23 <sup>abc</sup>	143.443	0.000
TGF- $\beta$	空白组	3	442.49±6.10				
	对照组	3	390.13±4.50	334.51±12.73 <sup>b</sup>	282.15±7.36 <sup>bc</sup>	105.971	0.000
	中药组	3	418.13±6.89 <sup>a</sup>	366.42±9.14 <sup>ab</sup>	306.31±6.23 <sup>abc</sup>	165.983	0.000
IL-10	空白组	3	28.72±3.30				
	对照组	3	35.09±1.17	20.86±1.65 <sup>b</sup>	12.74±1.29 <sup>bc</sup>	190.933	0.000
	中药组	3	42.80±1.47 <sup>a</sup>	26.54±0.94 <sup>ab</sup>	16.45±0.84 <sup>abc</sup>	424.204	0.000
TNF- $\alpha$	空白组	3	16.82±0.95				
	对照组	3	26.98±2.90	40.07±1.24 <sup>b</sup>	58.96±2.96 <sup>bc</sup>	57.482	0.000
	中药组	3	20.81±1.40 <sup>a</sup>	33.36±1.35 <sup>ab</sup>	48.80±2.43 <sup>abc</sup>	182.611	0.000

注:与同一时间点对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与同组12 h比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与同组24 h比较,<sup>c</sup> $P<0.01$ 。因空白组在12 h后无显著变化趋势,故未检测后续时间点数据。

3.2.3 含药血浆对RAW264.7细胞CD86、CD80、CD206、Arg-1表达的影响 干预48 h后,对照组、中药组RAW264.7细胞中CD80、CD86阳性比例均高于同组干预12 h( $P<0.01$ ),Arg-1,CD206阳

性比例均低于同组干预12h;干预12、48h后,中药组RAW264.7细胞中CD80、CD86阳性比例均低于对照组( $P<0.01$ ),CD206、Arg-1阳性比例均高于对照组( $P<0.01$ )。(见图6~9,表7)

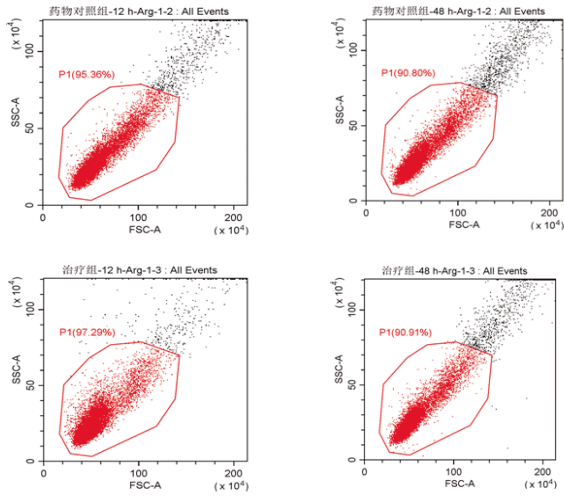


图6 对照组、中药组 M2 巨噬细胞标志物(Arg-1)12、48 h 流式图

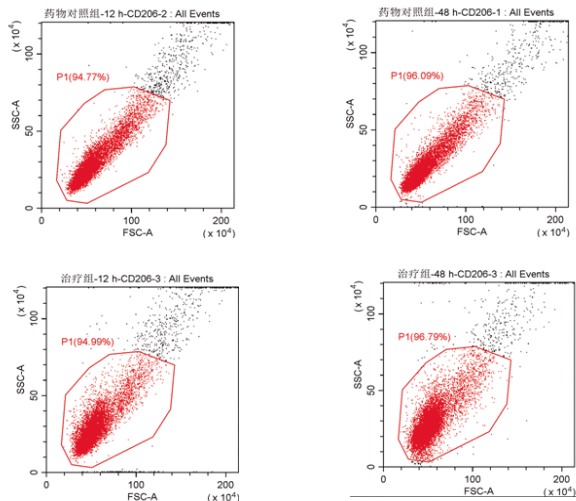


图7 对照组、中药组 M2 巨噬细胞标志物(CD206)12、48 h 流式图

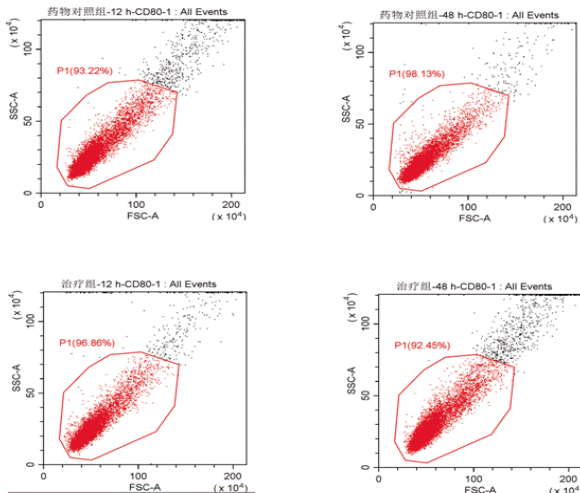


图8 对照组、中药组 M1 巨噬细胞标志物(CD80)12、48h 流式图

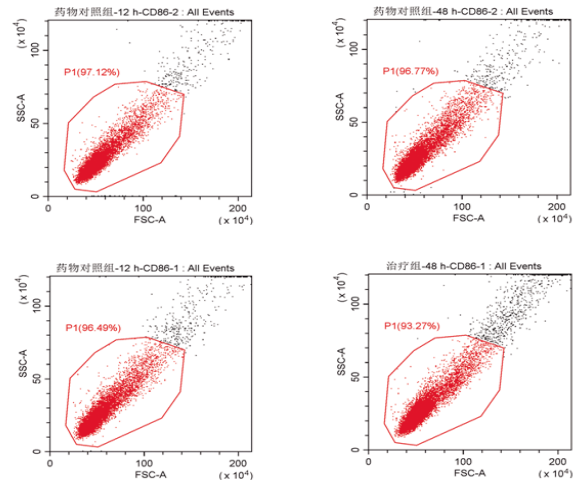


图9 对照组、中药组 M1 巨噬细胞标志物(CD86)12、48h 流式图

表7 流式检测 20%含药血浆干预巨噬细胞标志物结果 ( $\bar{x}\pm s$ )

指标	组别	n	12 h	48 h	t	P
CD80	对照组	3	80.50 ± 0.05	96.11 ± 0.12 <sup>a</sup>	207.981	0.000
	中药组	3	74.54 ± 0.32 <sup>b</sup>	86.48 ± 0.50 <sup>a,c</sup>	35.471	0.000
CD206	对照组	3	5.58 ± 0.07	1.67 ± 0.13 <sup>a</sup>	45.863	0.000
	中药组	3	9.29 ± 0.34 <sup>b</sup>	3.72 ± 0.12 <sup>a,c</sup>	26.762	0.000
CD86	对照组	3	83.31 ± 0.39	97.93 ± 0.20 <sup>a</sup>	57.781	0.000
	中药组	3	77.92 ± 0.45 <sup>b</sup>	87.61 ± 0.37 <sup>a,c</sup>	28.813	0.000
Arg1	对照组	3	6.77 ± 0.22	2.48 ± 0.47 <sup>a</sup>	14.322	0.000
	中药组	3	10.25 ± 0.23 <sup>b</sup>	4.11 ± 0.24 <sup>a,c</sup>	31.991	0.000

注:与同组干预12h后比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与12h对照组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与48h对照组比较,<sup>c</sup> $P<0.01$ 。

#### 4 讨论

MASH的发病涉及复杂的炎症网络,其中巨噬细胞极化失衡是驱动肝脏损伤的关键环节。本研究基于“肝病实脾”的中医治则及前期发现的疏肝理脾汤具有肠道-肝脏抗炎效应<sup>[9]</sup>,提出假说:疏肝理脾汤可能通过上调免疫调控分子TIM-3蛋白表达,重塑巨噬细胞M1/M2极化平衡,从而改善MASH。研究结果确证了这一假说,为“肝病实脾”理论防治MASH提供了关键的免疫学机制阐释。

4.1 疏肝理脾汤的中医理论基础与多组分协同作用 MASH属中医“肝癖”“痰浊”范畴,核心病机为肝郁脾虚、痰瘀互结<sup>[10-11]</sup>。“肝病实脾”理论源于《金匱要略》,其云“夫治未病者,见肝之病,知肝传脾,当先实脾,四季脾旺不受邪,即勿补之”,强调肝病易传脾,治疗需调补脾气以固本防传,并涵括疏肝、健脾、祛湿、化诸法,契合MASH病机<sup>[12]</sup>。疏肝理脾汤正是基于此理论,由四逆散与四君子汤化裁而成,具有疏肝健脾、行气利湿化痰之效。方中柴胡疏肝行气为君,茯苓健脾利湿,白芍养血柔肝为臣,柴胡与白芍为疏肝柔肝经典药对,一散一敛、一升一降相配,共奏调和肝脾之效;白术健脾燥湿,党参健脾益气,养血生津,砂仁温中化湿,脾消食为佐;当归补血活血,枳实、湘曲、青皮行气疏肝,甘草调和诸药,为使。该方体现了调和肝脾、标本兼治的原则。

现代药理研究证实疏肝理脾汤中单味药中的主要成分,

如柴胡皂苷、白芍总苷、白术内酯、茯苓多糖等具有显著的抗炎、免疫调节、保肝、调节脂代谢等活性<sup>[13-18]</sup>,为疏肝理脾汤的多靶点作用奠定了物质基础。同时,本团队前期研究验证MCD饮食联合慢性束缚应激刺激,成功构建MASH肝郁脾虚证大鼠模型,确定疏肝理脾汤治疗MASH大鼠最佳剂量为6.18 g/kg<sup>[19]</sup>。疏肝理脾汤能调节肠道菌群、改善肠屏障功能、减轻肝脏炎症和脂肪变性<sup>[3-5]</sup>,为本研究聚焦其肝脏免疫微环境调控机制提供了前期依据。

4.2 疏肝理脾汤通过TIM-3调控巨噬细胞极化改善MASH 因本研究为MCD饮食短期诱导的MASH大鼠模型,以重构人类核心病理特征为主要目的,因此肝纤维化特征各组间比较,无明显差异。动物实验结果显示,与模型组相比,疏肝理脾汤干预使肝组织TIM-3蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$ ),且此效应与脂肪变性、炎症评分的肝脏病理改善高度一致。这与临床观察到的MASH/NASH患者肝组织TIM-3蛋白表达降低且与炎症程度负相关的报道相符<sup>[20]</sup>。更为重要的是,本研究揭示了疏肝理脾汤上调TIM-3与其调控巨噬细胞极化之间的直接联系。(1)抑制促炎M1极化:疏肝理脾汤显著降低了M1型巨噬细胞标志物CD80和CD86的阳性比例( $P<0.05$ ),并有效抑制了关键促炎因子TNF- $\alpha$ 和IL-6的分泌( $P<0.01$ )。(2)促进抗炎修复M2极化:疏肝理脾汤显著提高了M2型巨噬细胞标志物CD206和Arg-1的阳性比例( $P<0.05$ ),并促进了抗炎因子IL-10和TGF- $\beta$ 的分泌( $P<0.01$ )。总之,上述巨噬细胞表型与功能的改变,与疏肝理脾汤诱导的TIM-3显著上调密切相关,提示TIM-3是疏肝理脾汤调控巨噬细胞极化、重塑肝脏免疫微环境的关键枢纽分子。

4.3 TIM-3通过抑制M1/促进M2极化通路,介导巨噬细胞极化的调控 TIM-3作为重要的免疫负调控分子,可通过多种途径影响巨噬细胞功能<sup>[20]</sup>。(1)直接抑制M1极化:TIM-3信号可直接抑制TLR4/NF- $\kappa$ B等促炎通路活性<sup>[21]</sup>。本研究观察到的CD80/CD86下调及TNF- $\alpha$ /IL-6减少与此机制吻合。(2)促进M2极化:TIM-3与其配体Galectin-9结合后可激活下游信号如PI3K/Akt/mTOR通路,驱动巨噬细胞向M2型转化,促进组织修复<sup>[22]</sup>。本研究观察到的CD206/Arg-1上调及IL-10/TGF- $\beta$ 升高支持这一机制。近期研究还发现TIM-3可通过调控巨噬细胞代谢重编程促进M2极化<sup>[23]</sup>,这为疏肝理脾汤的多靶点协同作用提供了新的解释视角。

此外,细胞实验发现疏肝理脾汤含药血浆干预48 h后能显著增强LPS刺激下巨噬细胞的活性,提示疏肝理脾汤可能通过维持巨噬细胞在炎症环境下的存活与功能,减轻其对肝细胞的毒性损伤。这一发现与M2型巨噬细胞或其分泌体具有促进肝细胞再生能力的报道<sup>[24]</sup>形成互补,进一步阐释了疏肝理脾汤保护肝实质细胞的潜在机制。

综上所述,疏肝理脾汤能够显著上调MASH模型肝组织的TIM-3蛋白表达。上调TIM-3可有效调控巨噬细胞极化平衡,降低CD80/CD86、TNF- $\alpha$ /IL-6表达,抑制促炎M1型极化,升高CD206/Arg-1、IL-10/TGF- $\beta$ ,促进抗炎修复M2型极化,最终改善肝脏炎症和病理损伤。这一发现揭示了经典中药复方疏肝理脾汤通过TIM-3通路调控巨噬细胞极化这一关键免疫学机

制改善MASH,不仅从免疫稳态调控角度,为“肝病实脾”理论防治MASH提供了现代科学依据,而且诠释了“实脾”在调节肝脏免疫微环境中的重要作用。

#### 参考文献

- [1] 范建高,徐小元,南月敏,等.代谢相关(非酒精性)脂肪性肝病防治指南(2024年版)[J].实用肝脏病杂志,2024,27(4):494-510.
- [2] 金倩,杨菁,范建高.非酒精性脂肪性肝病的流行现状[J].肝脏,2021,26(1):87-88.
- [3] 代静.疏肝理脾方对非酒精性脂肪性肝炎大鼠肠道菌群的影响研究[D].长沙:湖南中医药大学,2019.
- [4] 王雅,刘玉娟,代静,等.基于LPS/TLR4通路研究疏肝理脾汤治疗NASH大鼠的作用机制[J].中西医结合肝病杂志,2019,29(2):167-170,178.
- [5] 刘玉娟.疏肝理脾方对非酒精性脂肪性肝炎大鼠肠黏膜通透性的影响[D].长沙:湖南中医药大学,2019.
- [6] DIXON K O, TABAKA M, SCHRAMM M A, et al. TIM-3 restrains anti-tumour immunity by regulating inflammasome activation[J]. Nature,2021,595(7865):101-106.
- [7] 江澄.疏肝理脾方对MCD饮食诱发的NASH大鼠肠道及肝脏病理结构的影响[D].长沙:湖南中医药大学,2020.
- [8] 王雅,代静,刘先姜,等.疏肝理脾汤对非酒精性脂肪性肝炎大鼠肠道菌群多样性和丰富度的影响[J].中医药导报,2021,27(10):10-15.
- [9] 湛宁生,方立成,肖凤庭,等.疏肝理脾片治疗慢性肝炎临床观察[J].湖南中医学院学报,1989,9(2):71-72.
- [10] 张德旭,蔡晓钧,李鹏,等.基于“土壅木郁”探讨非酒精性脂肪性肝病的论治[J].湖南中医药大学学报,2023,43(10):1896-1901.
- [11] 彭田甜,尹抗抗,黎鹏程.从伏邪理论探讨非酒精性脂肪性肝病的“多次打击”病机[J].湖南中医药大学学报,2024,44(6):1074-1078.
- [12] 周怡驰,胡世平,晏军,等.基于肠-肝轴与肝病实脾理论探讨脂肪肝的发病与治疗思路[J].新中医,2021,53(14):186-189.
- [13] 王海强,周千瑶,李冰琪,等.柴胡化学成分及药理作用研究进展[J].吉林中医药,2024,44(1):96-100.
- [14] 彭博,郑佳雯,邱榕,等.柴胡皂苷A促进SD大鼠肛旁创面模型创伤愈合的作用机制[J].中医药导报,2023,29(11):62-65,93.
- [15] 沈子芯,牟春燕,周雪儿,等.白芍及其化学成分的药理作用研究进展[J].江苏中医药,2024,56(8):76-79.
- [16] 左军,张金龙,胡晓阳.白术化学成分及现代药理作用研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2021,23(10):6-9.
- [17] 杨颖,魏梦昕,伍耀业,等.白术多糖提取分离、化学组成和药理作用的研究进展[J].中草药,2021,52(2):578-584.

(下转第66页)

- [50] PRASAD K. Involvement of AGE and its receptors in the pathogenesis of hypertension in elderly people and its treatment[J]. *Int J Angiol*,2022,31(4):213-221.
- [51] ULLAH K, WU R X. Hypoxia-inducible factor regulates endothelial metabolism in cardiovascular disease [J]. *Front Physiol*, 2021,12:670653.
- [52] RODRIGUES-DIEZ R R, TEJERA-MUÑOZ A, OREJUDO M, et al. Interleukin-17A: Potential mediator and therapeutic target in hypertension[J]. *Nefrología Engl Ed*, 2021,41(3):244-257.
- [53] 侯燕琳,刘亚琪,徐源慧,等.大鼠高血压病理模型的制备及意义[J].*心血管病防治知识*,2023,13(10):53-56.
- [54] VIRDIS A, TADDEI S. Endothelial dysfunction in resistance arteries of hypertensive humans: Old and new conspirators[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*,2016,67(6):451-457.
- [55] TAN P S, KILLINGER S, HORIUCHI J, et al. Baroreceptor reflex modulation by circulating angiotensin II is mediated by AT1 receptors in the nucleus tractus solitarius[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007,293(6):R2267-R2278.
- [56] TRAN N, GARCIA T, ANIQA M, et al. Endothelial nitric oxide synthase (ENOS) and the cardiovascular system: In physiology and in disease states[J]. *Am J Biomed Sci Res*,2022,15(2):153-177.
- [57] GAO L, YAO R, LIU Y Z, et al. Isorhamnetin protects against cardiac hypertrophy through blocking PI3K-AKT pathway[J]. *Mol Cell Biochem*,2017,429(1-2):167-177.
- [58] HAN X, ZHU Q Q, LI Z, et al. 4-Hydroxychalcone attenuates AngII-induced cardiac remodeling and dysfunction via regulating PI3K/AKT pathway[J]. *Hypertens Res*,2025,48(3):1054-1067.
- [59] JIANG Y F, CHEN L, CHAO Z J, et al. Ferroptosis related genes in ischemic and idiopathic cardiomyopathy: Screening for potential pharmacological targets [J]. *Front Cell Dev Biol*,2022,10:817819.
- [60] LIU Q, LUO Q M, ZHONG B, et al. Salidroside attenuates myocardial remodeling in DOCA-salt-induced mice by inhibiting the endothelin 1 and PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signaling pathways [J]. *Eur J Pharmacol*,2024,962:176236.
- [61] ZHANG JX, SHEN YY, YANG J R, et al. Inhibition of PI3K/AKT signaling pathway by sesamin and vitamin E improves left ventricular fibrosis in spontaneously hypertensive rats[J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*,2020,25(11):1214-1222.
- [62] 张东东,谷青芸,尤清欣,等.室旁核硫化氢对高盐诱导高血压模型大鼠PI3K/Akt通路及血压的影响[J].*中国组织工程研究*,2023,27(26):4168-4174.
- [63] XU Y, HU T, DING H Z, et al. miR-485-5p alleviates obstructive sleep apnea syndrome with hypertension by inhibiting PI3K/AKT signaling pathway via downregulating HIF3A expression[J]. *Schlaf Atmung*,2023,27(1):109-119.
- [64] GAO H L, YU X J, FENG Y Q, et al. Luteolin attenuates hypertension via inhibiting NF- $\kappa$ B-mediated inflammation and PI3K/Akt signaling pathway in the hypothalamic paraventricular nucleus[J]. *Nutrients*,2023,15(3):502.

(收稿日期:2025-05-07 编辑:刘国华)

(上接第29页)

- [18] 邓桃妹,彭代银,俞年军,等.茯苓化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J].*中草药*,2020,51(10):2703-2717.
- [19] 王雅,刘玉娟,代静,等.基于LPS/TLR4通路研究疏肝理脾汤治疗NASH大鼠的作用机制[J].*中西医结合肝病杂志*,2019,29(2):167-170,178.
- [20] 周晓棠.Tim-3参与调节NASH进展过程中肝脏巨噬细胞的动态演变[D].杭州:浙江大学,2018.
- [21] 白小洋,张旭,海龙,等.巨噬细胞极化在肝纤维化中的调控作用机制[J].*临床肝胆病杂志*,2024,40(3):611-615.
- [22] 石媛媛,王雅,郭丹,等.疏肝理脾汤对非酒精性脂肪性肝炎大鼠肠道菌群的影响[J].*中国临床药理学杂志*,2024,40(17):2533-2537.
- [23] 孟瑶.Tim-3/Galectin-9调控腹腔巨噬细胞极化的作用及机制研究[D].大连:大连医科大学,2023.
- [24] 张璐.携带siRIPK3的M2巨噬细胞衍生的外泌体可减轻Con A诱导的免疫性肝炎[D].天津:天津医科大学,2021.

(收稿日期:2025-07-08 编辑:刘国华)