



中国免疫学杂志
Chinese Journal of Immunology
ISSN 1000-484X, CN 22-1126/R

《中国免疫学杂志》网络首发论文

题目: IL-23/STAT3/TH17 轴在重症急性胰腺炎的作用机制及清解化攻方的干预作用
作者: 冯敏超, 罗芳, 秦百君, 唐曦平, 李凯, 陈国忠
网络首发日期: 2023-09-11
引用格式: 冯敏超, 罗芳, 秦百君, 唐曦平, 李凯, 陈国忠. IL-23/STAT3/TH17 轴在重症急性胰腺炎的作用机制及清解化攻方的干预作用[J/OL]. 中国免疫学杂志, <https://link.cnki.net/urlid/22.1126.R.20230908.1128.002>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

IL-23/STAT3/TH17 轴在重症急性胰腺炎的作用机制及清解化攻方的干预作用^①

冯敏超^②，罗芳^②，秦百君^③，唐曦平^④，李凯，陈国忠
(广西中医药大学第一附属医院，南宁 530001)

中图分类号：R285.5 文献标识码：A

[摘要] **目的：**研究 IL-23/STAT3/TH17 轴在重症急性胰腺炎 (SAP) 的作用机制及清解化攻方的干预作用。**方法：**采用逆胰胆管注射牛磺胆酸钠建立重症急性胰腺炎大鼠模型，分别设置空白组、模型组、不同剂量清解化攻方给药组和阳性对照组，通过 HE 染色观察胰腺组织病理，ELISA 检测血清脂肪酶、 α -淀粉酶、炎症指标，结合 RT-qPCR、IHC、Western blot 和 IF 技术，阐明清解化攻方保护重症急性胰腺炎大鼠胰腺组织的作用机制。**结果：**清解化攻方各剂量组均可显著降低 SAP 模型大鼠血清中淀粉酶、脂肪酶、IL-1 β 、IL-6、IL-17、IL-23、TNF- α 、TGF- β 的含量，且中剂量组效果最优 ($P < 0.05$)；IHC 和 RT-qPCR 的结果显示，清解化攻方中、高剂量组可显著降低该模型胰腺组织中 IL-23、STAT3、IL-17 蛋白和 mRNA 的表达量 ($P < 0.05$)；另外，Western blot 结果表明，清解化攻方中剂量组明显降低 SAP 大鼠 IL-23、STAT3、p-STAT3、IL-17 蛋白的表达 ($P < 0.05$)；IF 检测显示，SAP 大鼠 TH17 细胞的分化受到清解化攻方各剂量组的抑制，中剂量抑制效果最显著 ($P < 0.05$)。**结论：**清解化攻方调控 IL-23/STAT3

①本文为国家自然科学基金项目 (82160890)；广西壮族自治区医疗卫生适宜技术开发与推广应用项目(S2019021)；广西自然科学基金面上项目 (2020GXNSFAA297062)；广西中医药大学研究生教育创新计划项目(YCSW2023383)。

②同时就职于广西中医药防治医学分子生物重点实验室，南宁 530001。

③重庆市中医院，重庆 400011。

④广西医科大学附属肿瘤医院，南宁 530001。

作者简介：冯敏超，男，硕士，主要从事中医药防治脾胃病研究，E-mail:13422512305@163.com。

通信作者及指导教师：陈国忠，男，博士，主任医师，博士生导师，主要从事中医药防治脾胃病研究，E-mail: cheninj@163.com。

信号通路的活化，从而抑制 TH17 细胞分化，发挥保护胰腺组织作用。

[关键词] 清解化攻方；IL-23/STAT3 信号通路；TH17 细胞分化；重症急性胰腺炎；免疫

Mechanism of IL-23/STAT3/TH17 axis in severe acute pancreatitis and the intervention effect of Qingjie Huagong decoction

FENG Minchao, LUO Fang, QIN Baijun, TANG Xiping, LI Kai, CHEN Guozhong
(*The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001*)

[Abstract] Objective: To investigate the mechanism of IL-23/STAT3/TH17 axis in severe acute pancreatitis (SAP) and the interventional effect of the Qingjie Huagong decoction (QJHGD). Methods: A rat model of SAP was established by injecting sodium taurocholate into the retrograde pancreatic duct. The blank, model, different doses of QJHGD administration and positive group were set up respectively. HE staining was used to observe the pathology of pancreatic tissue. ELISA detects serum lipase, α -amylase and inflammatory markers. By combining RT-qPCR, IHC, Western blot, and IF techniques, we elucidated the mechanism of QJHGD in protecting pancreatic tissue in SAP rats. Results: All the dose groups of QJHGD significantly reduced the levels of amylase, lipase, IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-23, TNF- α and TGF- β in the serum of SAP model rats, and the effect was best in the medium dose group ($P<0.05$); The results of IHC and RT-qPCR revealed that the medium- and high-dose groups of QJHGD significantly reduced the expression of IL-23, STAT3, IL-17 protein and mRNA in the pancreatic tissue of this model ($P<0.05$); Moreover, the Western blot results demonstrated that the expression of IL-23, STAT3, p-STAT3, and IL-17 proteins in SAP rats was significantly decreased in the medium-dose group of QJHGD ($P<0.05$); The IF assay indicated that TH17 cell differentiation in SAP rats was inhibited by all dose groups of QJHGD, with the most significant inhibition effect in the middle

dose ($P<0.05$). Conclusion: QJHGD regulates the activation of IL-23/STAT3/TH17 axis, thereby inhibiting TH17 cell differentiation and exerting a protective effect on pancreatic tissue.

[Keywords] Qingjie Huagong decoction; IL-23/STAT3 signaling pathway; TH17 cell differentiation; severe acute pancreatitis; immunity

重症急性胰腺炎(Severe acute pancreatitis, SAP)是临床常见的急腹症之一,可引起全身炎症激烈反应,多器官衰竭,病死率达 30%^[1]。目前尚没有特异性治疗 SAP 的方法,因此急需寻找新的补充替代疗法。近年来研究表明 IL-23/STAT3 信号通路是激活 TH17 细胞分化的途径之一,而 Th17 细胞及其分泌的因子诱导的炎症反应和免疫调节等过程在 SAP 发展过程中有重要作用^[2]。

中医治疗 SAP 已有数千年的历史,《中国急性胰腺炎诊治指南》(2021 年版本)明确指出中医药可以有效改善胰腺的病理状态。清解化攻方是我院临床治疗 SAP 的协定方,获得了国家发明专利(ZL201811021893.2)。另外,我们之前的研究已经确定了清解化攻方的主要生物活性化合物^[3]。临床中初步观察到在西医治疗上加用清解化攻方能更有效地缓解 SAP 患者的临床症状,降低患者血清中白细胞计数、C 反应蛋白、TNF- α 、IL-6、淀粉酶、脂肪酶的表达水平^[4-5]。前期实验研究已证实清解化攻方能抑制细胞凋亡和炎症反应,有效地改善胰腺损伤,降低坏死程度,减少并发症的发生^[6-8]。因此本研究拟进一步探索清解化攻方治疗 SAP 的作用机制,观察其对 SAP 模型大鼠 IL-23/STAT3/TH17 轴的影响,为 SAP 的治疗提供新的思路和策略。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂

牛磺胆酸钠(美国 Sigma 公司, S0900000); 注射用乌司他丁(广东天普生化药业公司, 032005103); 苏木精和伊红(H&E)染色试剂盒(solarbio 公司, G1120); 逆转录试剂盒(北京全式金生物技术股份有限公司, AE301-02); RIPA 裂解液(碧云天公司, P0013); 通用第二步法试剂盒、DAB 显色试剂盒(中杉金桥公司, 批号: PV-9000, ZLI-9018); 大鼠脂肪酶、 α -淀粉酶、IL-17、IL-23、TNF- α 和 TGF- β ELISA 试剂盒(CUSABIO 公司, 批号: CSB-E13784r,

EL001689RA, CSB-E07451r, CSB-E08462r, CSB-E11987r, CSB-E04727r); IL-1 β 、IL-6 ELISA 试剂盒 (Abcam 公司, 批号: ab255730, ab234570); IL-23 抗体 (Proteintech 公司, 27163-1-AP); STAT3 抗体, IL-17 抗体, GAPDH 内参 (Abcam 公司, 批号: ab109085, ab79056, ab8245); 引物 (Ribobio 公司, 广东)。

1.1.2 实验动物

36 只 SD 雄性大鼠购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司(体重 200 \pm 20g, SPF 级), 饲养于广西中医药大学一附院实验室(许可证号: SYXK(桂)2019-0001)。室内适应性喂养 7 天后进行实验(24~26 $^{\circ}$ C, 12 h 光照昼夜循环)。本研究经广西中医药大学实验动物伦理委员会批准,(伦理号: DW20220310-020)。

1.1.3 药材

清解化攻方由柴胡、黄芩、厚朴、丹参、大黄、枳实、甘草组成(批号: 17010267, 16182144, 16060431, 16060117, 16060431, 16080375, 17010163), 购自广西仙竹中药科技有限公司, 经广西中医药大学中药鉴定技术中心田慧教授鉴定为正品。

1.2 实验方法

1.2.1 清解化攻方的制备

清解化攻方(QJHGD): 柴胡 12 克, 黄芩 10 克, 厚朴 8 克, 丹参 9 克, 大黄 6 克, 枳实 10 克, 甘草 5 克。加入 600 毫升蒸馏水浸泡 30min, 大火煮沸后再小火煮沸 30min, 滤出药液, 保留药渣; 加入 300mL 蒸馏水, 再次煎煮 0.5h; 将两次煎煮的药液混合, 过滤后用旋转蒸发器浓缩, 制备 1 g/mL 的原药溶液(100%浓度)。

1.2.2 分组与处理

按随机数字表法, 将大鼠分为正常组、模型组、中药低、中、高剂量组和阳性对照组(每组 6 只)。SAP 模型建立参考文献方法^[9]。根据大鼠和人类体表面积的计算, 中药低、中、高剂量组分别用 4.5g/kg、9g/kg、18g/kg 的清解化攻方灌胃 7 天。阳性对照组腹腔注射乌司他丁(5U/kg)。其余组用等量生理盐水处理。药物干预后, 通过吸入 3% 的异氟醚进行麻醉。在无菌条件下, 收集血液, 分离并储存在-20 $^{\circ}$ C。取出胰腺组织, 用 4% 多聚甲醛固定或在-80 $^{\circ}$ C 下

冷冻保存。

1.2.3 病理学检测

胰腺组织包埋、切片（5 μ m 厚），用二甲苯和无水乙醇脱蜡，根据试剂制造商说明，使用 H&E 试剂盒染色。在光学显微镜下观察胰腺组织的病理变化。

1.2.4 qPCR 法分析 IL-23、STAT3、IL-17 mRNA 表达

根据制造商的说明，使用 TRIzol 试剂提取大鼠胰腺组织总 RNA，逆转录试剂盒生成 cDNA。反应条件如下：95 $^{\circ}$ C 预变性 5min，95 $^{\circ}$ C 变性 40 个循环 15s，60 $^{\circ}$ C 退火延伸 34s。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对基因表达水平（根据 GAPDH 作为参考基因）。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

| Gene name | Primer sequence (5' to 3') | Product length/bp |
|-----------|----------------------------|-------------------|
| IL-23 | F1: ATCTTCAAAGGGGAGCCTGC | 151bp |
| | R1: GCTGCCACTGCTGACTAGAA | |
| STAT3 | F1: TAGGTGAGGTGGGACAGAGT | 150 bp |
| | R1: AGGTGGCTTTGAGTCACTGA | |
| IL-17 | F1: CCGTACCAGCTGATCAGGAC | 142 bp |
| | R1: GGCGTTTGGACACACTGAAC | |
| GAPDH | F1: TCTCTGCTCCTCCCTGTTCT | 104 bp |
| | R1: TACGGCCAAATCCGTTTCA | |

1.2.5 IHC 检测 IL-23、STAT3、IL-17 蛋白表达

胰腺组织切片、脱蜡、高压修复，10%牛血清白蛋白封闭 30min，加入 IL-23（1：100）、STAT3（1：100）、IL-17（1：100）一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，山羊抗小鼠/兔 IgG 孵育 20min，DAB 显色，PBS 溶液洗涤 3 次后，用苏木精复染，封片。ImageJ Toolbox 软件对阳性结果进行半定量分析^[10]。

1.2.6 ELISA 法检测淀粉酶、脂肪酶、IL-1 β 、IL-6、IL-17、IL-23、TNF- α 、TGF- β 水平

并根据制造商的说明，使用酶标仪在 450nm 处测量淀粉酶、脂肪酶、IL-1 β 、IL-6、IL-17、IL-23、TNF- α 、TGF- β 的 OD 值，绘制样品标准曲线并换算浓度。

1.2.7 Western blot 法检测 IL-23、p-STAT3、STAT3、IL-17 蛋白表达

RIPA 缓冲液提取胰腺组织总蛋白，BCA 试剂盒测蛋白浓度，随后分离蛋

白质并转移到聚偏氟乙烯膜上，5%的脱脂牛奶溶液中浸泡 1 小时，4℃孵育 IL-23、STAT3、IL-17 一抗过夜，二抗室温孵育 1 h，采用 ECL 试剂盒对蛋白质条带进行可视化，用 Image J 分析各条带的灰度值。

1.2.8 IF 法检测 TH17 细胞的表达

胰腺组织切片、脱蜡、水化，CD4 和 IL-17 (1: 100) 一抗孵育 (4℃，过夜)。室温下与荧光标记二抗在黑暗中孵育 1h，进行 DAPI 染色。荧光显微镜对切片进行成像。

1.3 统计学处理

所有统计分析均采用 Graph Pad Prism Version 9.0 软件处理，数据以 $\bar{X} \pm S$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA)， $P < 0.05$ 被认为有统计学差异。

2 结果

2.1 清解化攻方对 SAP 大鼠胰腺组织病理的影响

如图 1 所示，空白组大鼠胰腺组织紧密、完整，腺泡细胞排列有序；SAP 模型组大鼠胰腺组织结构弥漫性破坏、胰腺小叶间隔局灶性扩张、腺泡萎缩、严重的炎症细胞浸润；阳性对照组与清解化攻方各剂量组处理后上述情况均有不同程度改善，大鼠胰腺组织结构较完整，炎症细胞浸润、胰腺水肿、出血灶减少。

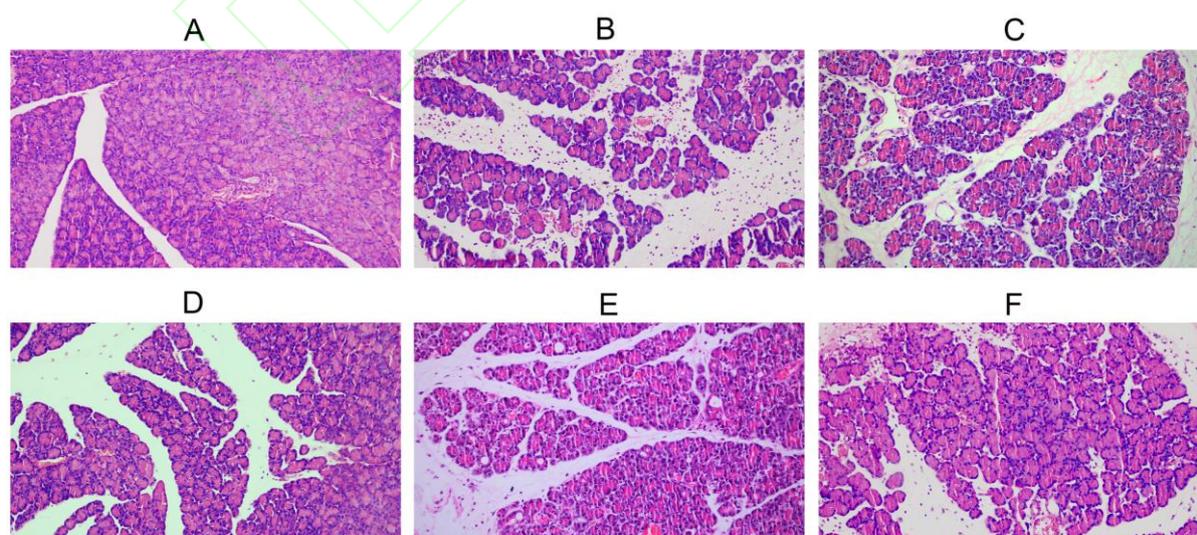


图 1 各组大鼠胰腺组织病理 HE 染色结果 (200×)

Fig.1 HE staining results of pathological sections of pancreas of rats in each

group (200×)

Note: A. Blank group; B. Model group; C. QJHGD low-dose group; D. QJHGD medium-dose group; E. QJHGD high-dose group; F. Positive group.

2.2 清解化攻方对 SAP 大鼠淀粉酶、脂肪酶、IL-1β、IL-6、IL-17、IL-23、TNF-α、TGF-β 的影响

据图 2、表 2 可知，SAP 模型组大鼠血清中淀粉酶、脂肪酶、IL-1β、IL-6、IL-17、IL-23、TNF-α、TGF-β 的含量均有显著提升；乌司他丁组可显著降低淀粉酶、脂肪酶、IL-1β、IL-6、IL-17、IL-23、TNF-α、TGF-β 的含量；清解化攻方各剂量组均可降低淀粉酶、脂肪酶、IL-1β、IL-6、IL-17、IL-23、TNF-α、TGF-β 的含量，其中中剂量组的降低效果最明显；另外，与阳性对照组相比，清解化攻方中剂量组抑制淀粉酶、脂肪酶、IL-1β、IL-6、TNF-α 表达的能力较强，有显著性差异。

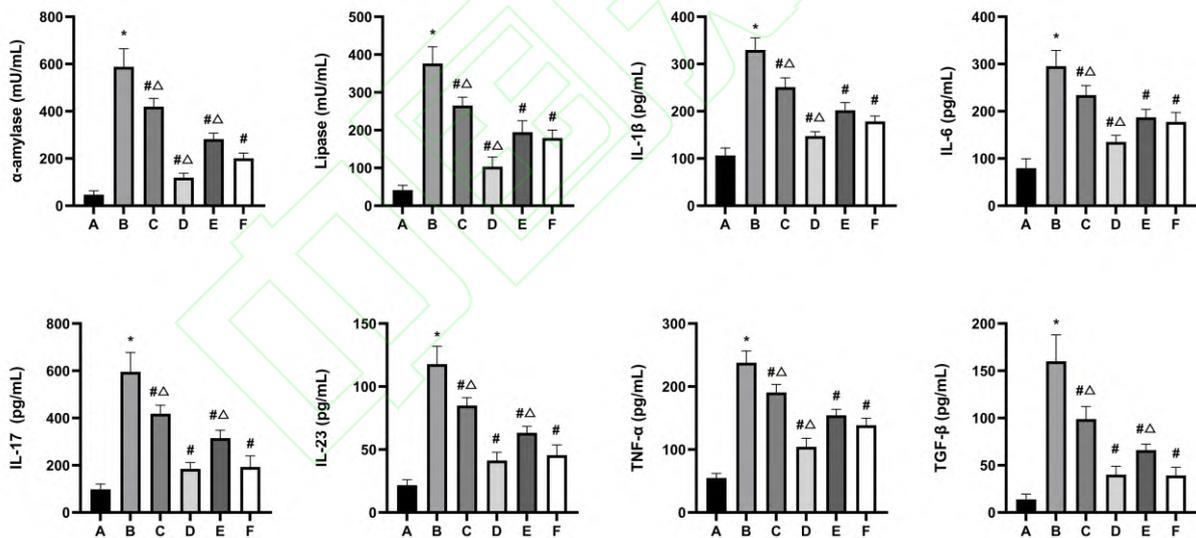


图 2 清解化攻方对 SAP 大鼠 α-淀粉酶、脂肪酶、IL-1β、IL-6、IL-17、IL-23、TNF-α、TGF-β 的影响

Fig.2 Effects of QJHGD on α-amylase, lipase, IL-1β, IL-6, IL-17, IL-23, TNF-α and TGF-β in SAP rats

Note: A. Blank group; B. Model group; C. QJHGD low-dose group; D. QJHGD medium-dose group; E. QJHGD high-dose group; F. Positive group; *. $P < 0.05$ vs blank group; #. $P < 0.05$ vs model group; Δ. $P < 0.05$ vs positive group.

表 2 大鼠血清脂肪酶、α-淀粉酶、炎症指标检测结果

Tab. 2 Results of serum lipase, alpha-amylase and inflammatory indexes in

rats

| Groups | α -amylase | lipase | IL-1 β | IL-6 | IL-17 | IL-23 | TNF- α | TGF- β | TGF- β |
|-------------------|---|---|---|---|---|---------------------------------------|--|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Blank | 46.92 \pm 15.78 | 41.41 \pm 12.71 | 106.41 \pm 15.74 | 79.38 \pm 20.26 | 98.08 \pm 22.3 | 21.73 \pm 4.38 | 54.8 \pm 7.37 | 13.93 \pm 5.63 | 13.93 \pm 5.63 |
| | 588.58 \pm 76.09 ¹⁾ | 376.31 \pm 44.15 ¹⁾ | 329.69 \pm 25.87 ¹⁾ | 295.58 \pm 33.42 ¹⁾ | 595.70 \pm 82.20 ¹⁾ | 117.87 \pm 14.21 ¹⁾ | 237.84 \pm 18.71 ¹⁾ | 160.03 \pm 28.02 ¹⁾ | 160.03 \pm 28.02 ¹⁾ |
| Model | 419.72 \pm 34.73 ²⁾⁴⁾ | 265.35 \pm 22.06 ²⁾⁴⁾ | 251.29 \pm 19.66 ²⁾⁴⁾ | 234.14 \pm 20.49 ²⁾⁴⁾ | 418.11 \pm 36.15 ²⁾⁴⁾ | 84.98 \pm 6.25 ²⁾⁴⁾ | 190.67 \pm 12.65 ²⁾⁴⁾ | 98.84 \pm 13.34 ²⁾⁴⁾ | 98.84 \pm 13.34 ²⁾⁴⁾ |
| QJHGD-low-dose | 119.10 \pm 18.45 ²⁾³⁾ | 103.63 \pm 25.2 ²⁾³⁾ | 147.53 \pm 9.4 ²⁾³⁾ | 135.22 \pm 14.1 ²⁾³⁾ | 185.25 \pm 26.4 ²⁾³⁾ | 41.26 \pm 6.57 ²⁾³⁾ | 104.40 \pm 13.50 ²⁾³⁾ | 40.03 \pm 8.88 ²⁾³⁾ | 40.03 \pm 8.88 ²⁾³⁾ |
| QJHGD-medium-dose | 282.65 \pm 25.21 ²⁾³⁾⁴⁾ | 194.73 \pm 29.92 ²⁾³⁾⁴⁾ | 202.19 \pm 16.39 ²⁾³⁾⁴⁾ | 187.24 \pm 17.01 ²⁾³⁾⁴⁾ | 315.03 \pm 33.62 ²⁾³⁾⁴⁾ | 63.37 \pm 5.10 ²⁾³⁾⁴⁾ | 154.29 \pm 9.63 ²⁾³⁾⁴⁾ | 66.13 \pm 6.34 ²⁾³⁾⁴⁾ | 66.13 \pm 6.34 ²⁾³⁾⁴⁾ |
| QJHGD-high-dose | 200.72 \pm 22.60 ²⁾⁴⁾ | 179.46 \pm 20.67 ²⁾⁴⁾ | 178.40 \pm 11.59 ²⁾⁴⁾ | 177.53 \pm 20 ²⁾⁴⁾ | 193.00 \pm 46.99 ²⁾ | 45.60 \pm 8.04 ²⁾ | 138.51 \pm 11.08 ²⁾⁴⁾ | 39.28 \pm 8.6 ²⁾ | 39.28 \pm 8.6 ²⁾ |
| Positive | | | | | | | | | |

Note: Compared with blank group,1) P <0.05; compared with model group,2) P <0.05; compared with QJHGD low-dose group,3) P <0.05; compared with QJHGD medium-dose group,4) P <0.05; compared with positive group,5) P <0.05.

2.3 清解化攻方对 SAP 大鼠胰腺组织 IL-23、STAT3、IL-17 mRNA 的影响

据图 3 结果，SAP 模型大鼠胰腺组织 IL-23、STAT3、IL-17 mRNA 表达量明显升高，表明 IL-23/STAT3 通路得到激活，导致 IL-17 转录释放；经过乌司他丁处理后，大鼠胰腺组织 IL-23、STAT3、IL-17 mRNA 表达量受到显著抑制；清解化攻方各剂量组明显降低 IL-23、STAT3、IL-17 mRNA 表达量，中剂量组效果最佳，但与阳性对照组对比，无统计学意义。

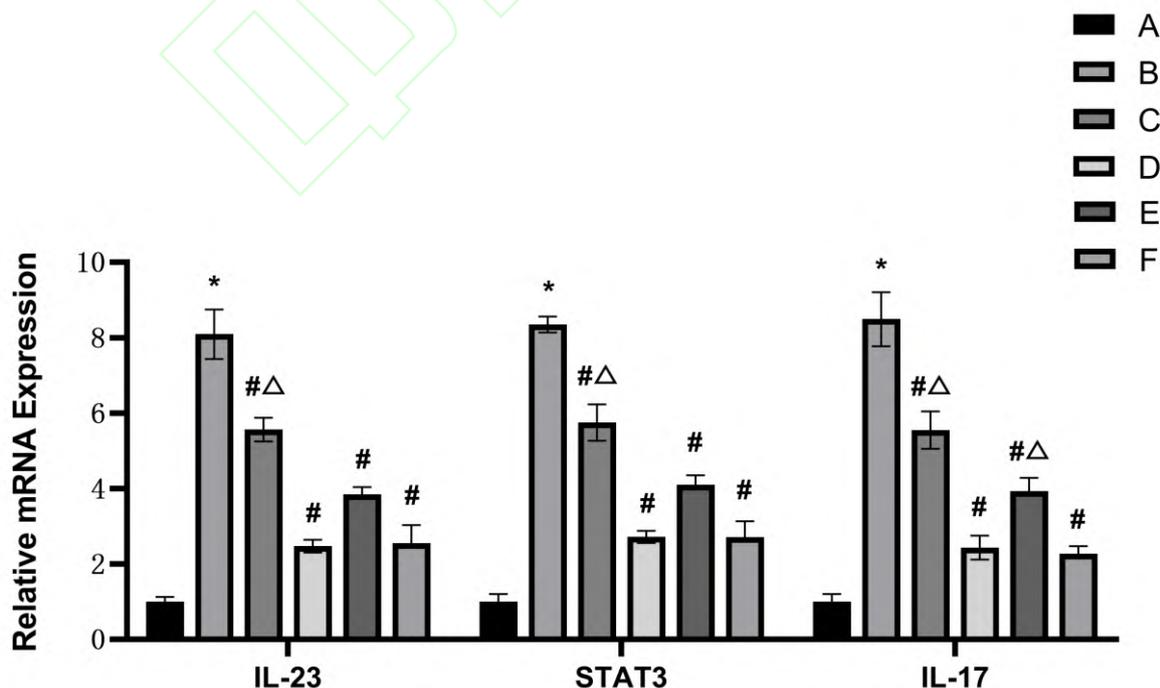


图3 清解化攻方对 SAP 大鼠胰腺组织 IL-23、STAT3、IL-17 mRNA 的影响
Fig.3 Effects of QJHGD on IL-23, STAT3 and IL-17 mRNA in pancreatic tissue of SAP rats

Note: A. Blank group; B. Model group; C. QJHGD low-dose group; D. QJHGD medium-dose group; E. QJHGD high-dose group; F. Positive group; *. $P < 0.05$ vs blank group; #. $P < 0.05$ vs model group; Δ . $P < 0.05$ vs positive group.

2.4 清解化攻方对 SAP 大鼠胰腺组织 IL-23、STAT3、p-STAT3、IL-17 蛋白的影响

图 4 可见，IHC 检测结果表明，SAP 大鼠胰腺组织 IL-23、STAT3、IL-17 蛋白表达水平明显升高；清解化攻方各剂量组和阳性对照组均一定程度缓解了 IL-23、STAT3、IL-17 蛋白表达水平的升高，但中剂量组与阳性对照组无明显差异。

Western blot 结果表明，SAP 大鼠胰腺组织 IL-23、STAT3、p-STAT3、p-STAT3/STAT3、IL-17 蛋白表达水平显著提升，提示 IL-23/STAT3 通路异常激活；乌司他丁组可显著降低 IL-23、STAT3、p-STAT3、p-STAT3/STAT3、IL-17 的高表达；清解化攻方各剂量组可降低 IL-23、STAT3、p-STAT3、p-STAT3/STAT3 蛋白的表达，中剂量效果最明显；清解化攻方抑制 IL-17 蛋白的表达似乎呈一定的浓度依赖性。

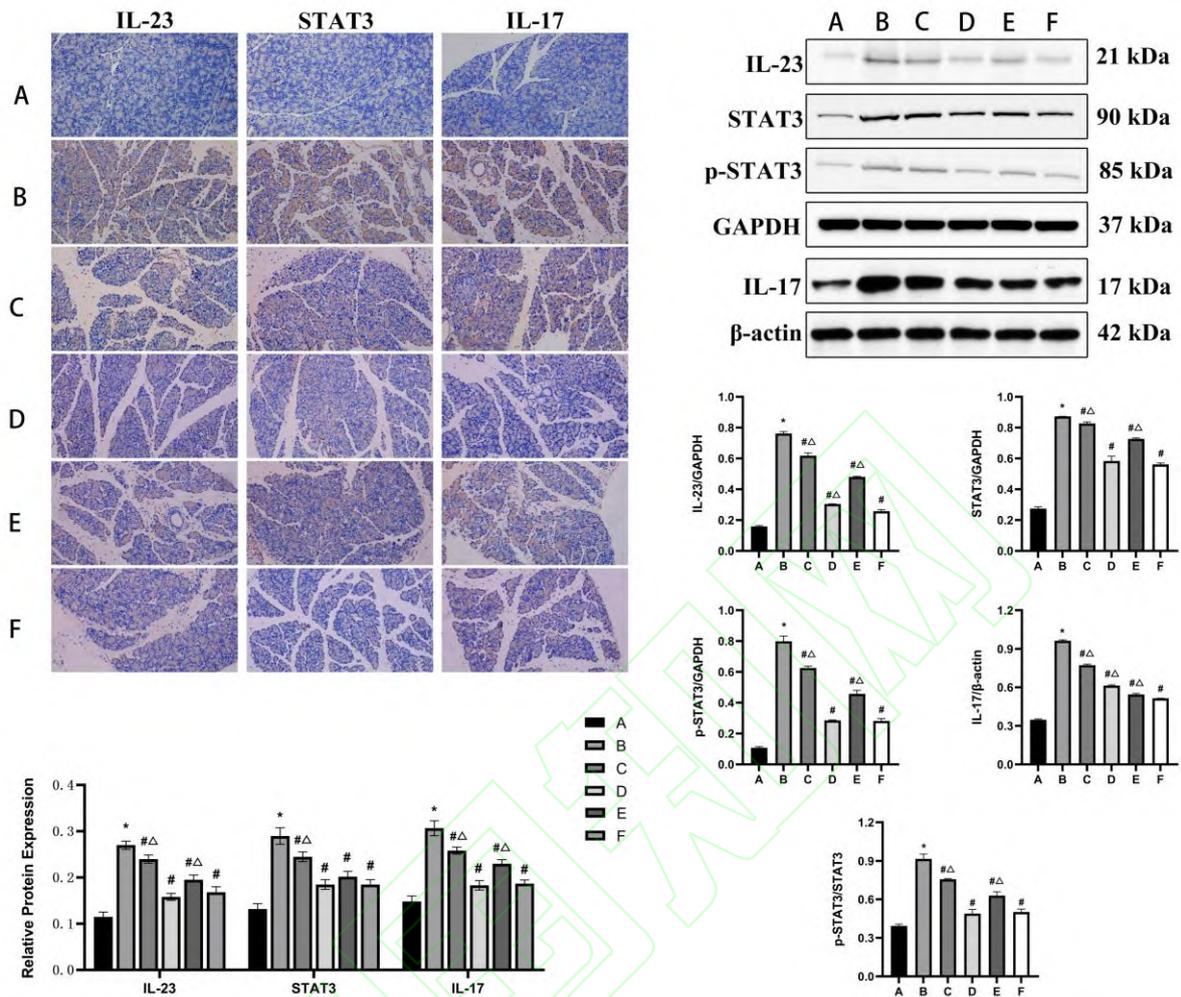


图 4 清解化攻方对 SAP 大鼠胰腺组织 IL-23、STAT3、p-STAT3、IL-17 蛋白的影响 (IHC, 200×)

Fig.4 Effects of QJHGD on IL-23, STAT3, p-STAT3 and IL-17 proteins in the pancreatic tissue of SAP rats (IHC, 200×)

Note: A. Blank group; B. Model group; C. QJHGD low-dose group; D. QJHGD medium-dose group; E. QJHGD high-dose group; F. Positive group; *. $P < 0.05$ vs blank group; #. $P < 0.05$ vs model group; Δ . $P < 0.05$ vs positive group.

2.5 清解化攻方对 SAP 大鼠胰腺组织 TH17 细胞的影响

利用 IF 检测 TH17 细胞表面标志物 CD4⁺、IL-17，结果如图 5 所示，SAP 大鼠胰腺组织 TH17 细胞数量显著增多；阳性对照组和清解化攻方各剂量组显著减少了 TH17 细胞表达，且中剂量组呈现良好的抑制效果；结合上述检测结果和文献报道^[11-13]，提示激活 IL-23/STAT3 通路能诱导 TH17 细胞分化，释放炎症因子而引起免疫炎症反应，而清解化攻方能抑制其引起的免疫炎症反应。

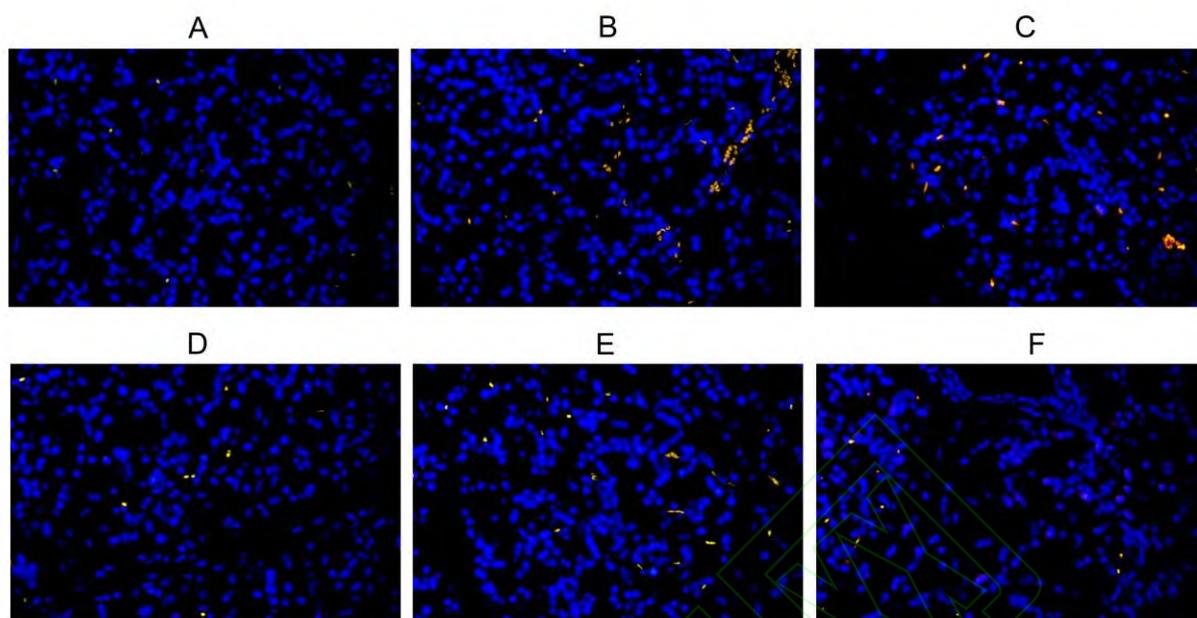


图 5 清解化攻方对 SAP 大鼠胰腺组织 TH17 细胞的影响 (IF, 400×)
 Fig.5 Effects of QJHGD on TH17 cells in the pancreatic tissue of SAP rats
 (IF, 400×)

Note: A. Blank group; B. Model group; C. QJHGD low-dose group; D. QJHGD medium-dose group; E. QJHGD high-dose group; F. Positive group

3 讨论

中医认为随着 SAP 病情发展，病位逐渐由卫、气分深入营分，热、瘀、痰毒互结，营气疏达失畅，脏腑功能失调，无力驱邪外出。因此，气、营分是 SAP 进展的重要病理阶段，是邪气内传的中间地带，是发展及预后的关键转折点。基于此，陈教授临证时根据“湿、热、瘀、毒”病理基础，以“清热解毒化湿，活血化瘀攻下”为主，以“顾护正气，疏通气机”为要创立清解化攻方，清除湿滞、瘀血、毒浊等病理产物，阻止病情恶化，促使机体脱离危急状态进而好转，全方奏调通营卫，透热转气之功效。本研究结果显示，清解化攻方明显改善 SAP 胰腺组织的病理情况，再一次证实了其对胰腺组织的保护作用。

SAP 的发病机制包括免疫失衡，炎症介质刺激、氧化应激、细胞自噬等^[14]。TGF- β 是调节 T 细胞发育、分化和死亡等的关键转化生长因子，与 IL-6 联合诱导幼稚 T 细胞分化成 TH17 细胞，参与免疫调节反应^[15]。Th17 细胞作为中性粒细胞募集和激活的协调者，可以分泌大量的 IL-17，介导巨噬细胞释放 TNF- α 聚集炎症部位，加重炎症反应，造成免疫-炎症失衡^[16]。另外，IL-17 能

与 IL-1 β 、IL-6 等细胞因子协同作用，以增加各种炎症介质的产生，诱发炎症级联反应^[17]。但 Th17 细胞分化严重依赖于 IL-23/STAT3 信号轴传导，持续的 IL-23 信号激活 STAT3 并驱动 Th17 细胞扩增和维持持续的炎症反应^[18]。重要的是，研究表明 IL-23 或 STAT3 的缺失都能显著抑制 TH17 细胞发育和积累，减少 IL-17 的分泌^[19]。

ASTRY B 等发现在 SAP 期间，IL-17、IL-23 等与急性胰腺炎的严重程度正相关，IL-23/IL-17 的高表达可能与后期局部和全身并发症的发展有关^[18]。陶静等在 60 例重症胰腺炎患者中证实了 IL-6、IL-17、IL-23、TGF- β 1、Th17 分泌量明显上升^[20]。刘蔚等研究表明柴黄清胰活血颗粒能通过抑制 TH17 细胞、IL-17 分泌量改善 SAP 患者的症状^[21]。另外，吴丽等研究表明大黄附子汤通过降低胰腺组织 STAT3、p-STAT3 蛋白表达，减少 TNF- α 、IL-6 的分泌，发挥改善 SAP 大鼠胰腺组织的出血、坏死的作用^[22]。因此，IL-23/STAT3/TH17 轴与 SAP 胰腺组织损伤的发生、发展密切相关。

本研究中，IL-23/STAT3 通路在 SAP 大鼠模型中异常活化，一系列细胞因子（如 IL-1 β 、IL-6、IL-17、IL-23、TNF- α 、TGF- β 等）释放入血，诱导、稳定、扩增 TH17 细胞的分化过程，推动 SAP 发展。经清解化攻方干预后，IL-1 β 、IL-6、IL-17、IL-23、TNF- α 、TGF- β 表达含量均减少，同时 IL-23、STAT3、p-STAT3、IL-17mRNA 和蛋白表达水平明显受到抑制，并且 TH17 细胞数量明显减少，说明清解化攻方能抑制 TH17 细胞分化途径，减轻免疫炎症反应，改善 SAP。遗憾的是，本研究尚未直接对 IL-23、STAT3 与 IL-17 进行共定位，以此更能证明 IL-23/STAT3/IL-17 通路的作用，有待日后深入研究。

乌司他丁作为尿胰蛋白酶抑制剂，指南建议在标准治疗的基础上早期应用乌司他丁治疗重症急性胰腺炎，其能调控炎症反应，改善胰腺微循环，减少急性胰腺炎的并发症^[23]。但真实世界证据显示，在大多数情况下，临床大剂量使用乌司他丁易引起患者胃肠道反应，偶见白细胞减少症、肝功能障碍、过敏反应^[24]。本研究清解化攻方中剂量组显著下调 IL-23、STAT3、IL-17 的 mRNA 与蛋白表达水平，与乌司他丁组对比无统计学意义，这预示清解化攻方中剂量组与乌司他丁组作用效果类似，可能通过抑制 IL-23、STAT3、IL-17 的 mRNA 与蛋白表达保护大鼠胰腺组织，可作为治疗 SAP 的补充替代药物之一。

目前临床上我们只初步观察了在西医治疗上加用清解化攻方能更有效地缓解 SAP 患者的临床症状，改善血清中炎症因子指标，降低并发症发生率^[4-5,25]，而清解化攻方联合乌司他丁治疗 SAP 的效果否比单用中药或单用乌司他丁的作用更加显著，有待课题组进一步研究完善，发挥中医药重大协同作用。

综上所述，清解化攻方通过抑制 IL-23/STAT3/TH17 轴调控 TH17 细胞分化，减轻 SAP 大鼠的免疫炎症反应，发挥保护胰腺组织作用。本研究结果为清解化攻方治疗 SAP 提供了新靶点，也为未来研究清解化攻方在调控免疫-炎症平衡途径治疗 SAP 打下基础。

参 考 文 献

- [1] Trikudanathan G, Wolbrink DRJ, van Santvoort HC, Mallery S, Freeman M, Besselink MG. Current Concepts in Severe Acute and Necrotizing Pancreatitis: An Evidence-Based Approach. *Gastroenterology*. May 2019;156(7):1994-2007 e3. doi:10.1053/j.gastro.2019.01.269
- [2] Nadeem A, Al-Harbi NO, Ansari MA, et al. Psoriatic inflammation enhances allergic airway inflammation through IL-23/STAT3 signaling in a murine model. *Biochemical Pharmacology*. Jan 15 2017;124:69-82. doi:10.1016/j.bcp.2016.10.012
- [3] Qin B-J, Feng M-C, Zhang C, et al. Integrating serum pharmacochemistry, network pharmacology and metabolomics analysis to explore the possible mechanism of Qingjiehuagong decoction in the treatment of acute pancreatitis. *Traditional Medicine Research*. 2023/09/01/2023;8:49-54. doi:https://doi.org/10.53388/TMR20230330002
- [4] 杨成宁, 刘礼剑, 刘锟荣, et al. 清解化攻方辅助治疗瘀毒互结型高脂血症性急性胰腺炎的临床观察. *广西医学*. 2021;43(24):2928-2932.
- [5] 彭鸿. 清解化攻方治疗湿热毒瘀型中重症急性胰腺炎早期的临床观察. 硕士. 广西中医药大学; 2019.
- [6] 杨昕, 秦百君, 唐曦平, et al. 清解化攻方调控 HMGB1/TLR9/NF- κ B 信号通路对重症急性胰腺炎大鼠肠黏膜屏障保护作用的研究. *时珍国医国药*. 2022;33(10):2346-2349.
- [7] 秦百君, 杨昕, 唐曦平, et al. 基于转录组高通量测序探讨清解化攻方抑制重症急性胰腺炎大鼠炎症反应的机制. *中华中医药杂志*. 2022;37(5):2941-2946.
- [8] 秦百君, 唐曦平, 杨昕, et al. 基于 TLR4/NF- κ B/MyD88 通路探讨清解化攻方抑制雨蛙素诱导重症急性胰腺炎模型大鼠炎症反应的生信分析及实验验证. *中国药理学通报*. 2022;38(6):935-944.
- [9] 张明钧, 姚玮艳, 乔敏敏, 诸琦, 袁耀宗. 肠壁穿刺逆行胰胆管注射牛黄胆酸钠重症急性胰腺炎造模. *上海交通大学学报(医学版)*. 2006;(5):488-490.
- [10] 李枫. 图像分析中光密度参数物理意义的正确理解和使用. *解剖学杂志*. 2009;32(2):271-274.
- [11] Hou Y, Zhu L, Tian H, et al. IL-23-induced macrophage polarization and its pathological roles in mice with imiquimod-induced psoriasis. *Protein Cell*. Dec 2018;9(12):1027-1038. doi:10.1007/s13238-018-0505-z

-
- [12] Bai XY, Liu P, Chai YW, et al. Artesunate attenuates 2, 4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis by down-regulating Th17 cell responses in BALB/c mice. *Eur J Pharmacol*. May 5 2020;874:173020. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173020
- [13] Zhou L, Littman DR. Transcriptional regulatory networks in Th17 cell differentiation. *Curr Opin Immunol*. Apr 2009;21(2):146-52. doi:10.1016/j.coi.2009.03.001
- [14] Gukovskaya AS, Gukovsky I, Algul H, Habtezion A. Autophagy, Inflammation, and Immune Dysfunction in the Pathogenesis of Pancreatitis. *Gastroenterology*. Nov 2017;153(5):1212-1226. doi:10.1053/j.gastro.2017.08.071
- [15] Chen WJ. TGF-beta Regulation of T Cells. *Annual Review of Immunology*. 2023;41:483-512. doi:10.1146/annurev-immunol-101921-045939
- [16] Rendon JL, Choudhry MA. Th17 cells: critical mediators of host responses to burn injury and sepsis. *J Leukoc Biol*. Sep 2012;92(3):529-38. doi:10.1189/jlb.0212083
- [17] Kuwabara T, Ishikawa F, Kondo M, Kakiuchi T. The Role of IL-17 and Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:3908061. doi:10.1155/2017/3908061
- [18] Astry B, Venkatesha SH, Moudgil KD. Involvement of the IL-23/IL-17 axis and the Th17/Treg balance in the pathogenesis and control of autoimmune arthritis. *Cytokine*. Jul 2015;74(1):54-61. doi:10.1016/j.cyto.2014.11.020
- [19] Blanco DB, Chapman NM, Raynor JL, et al. PTEN directs developmental and metabolic signaling for innate-like T cell fate and tissue homeostasis. *Nat Cell Biol*. Nov 2022;24(11):1642-1654. doi:10.1038/s41556-022-01011-w
- [20] 陶静, 颜碧清, 殷颖杰, 黄钦, 方晶晶, 史超路. 重症急性胰腺炎并发感染患者 Th17 变化研究. *中华医院感染学杂志*. 2019;29(13):2004-2007.
- [21] 刘蔚, 王天刚, 祝虹霞, et al. 柴黄清胰活血颗粒对重症急性胰腺炎患者辅助性 T 细胞 17 及其相关因子的调节作用. *中医临床研究*. 2020;12(29):56-59.
- [22] 侯圣林, 战丽彬, 朱博冉, 路晓光. 基于中药整合药理学平台探究大黄附子汤治疗重症急性胰腺炎的物质基础与作用机制. *世界科学技术-中医药现代化*. 2018;20(8):1411-1416.
- [23] 《乌司他丁用于临床常见急危重症的专家共识》专家组, 牛泽群, 宏欣, et al. 乌司他丁用于临床常见急危重症的专家共识. *中国全科医学*. 2023;26(26):3207-3219.
- [24] Li J, Li M, Li L, et al. Real-world safety of ulinastatin: a post-marketing surveillance of 11,252 patients in China. *BMC Pharmacol Toxicol*. Jul 16 2022;23(1):51. doi:10.1186/s40360-022-00585-3
- [25] 彭鸿, 陈国忠, 方丽娇, 贾中华, 彭飞燕, 吴瑕. 清解化攻法合并高强度综合治疗在重症急性胰腺炎早期的作用. *辽宁中医杂志*. 2019;46(5):991-994. doi:10.13192/j.issn.1000-1719.2019.05.032