DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20250609.002
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20250609.1644.004

# 基于FXR/LKB1/NF-κB信号通路介导的树突状细胞成熟分化探讨芪参汤抑制肝纤维化的机制研究

杨柳欣[1],高婷婷[2]✉,王炳予[2],袁星星[1,2]✉
(1.黑龙江中医药大学,黑龙江 哈尔滨 150040;2.黑龙江省中医药科学院,黑龙江 哈尔滨 150006)

[摘要] **目的**:探讨芪参汤对FXR/LKB1/NF-κB信号通路介导的树突状细胞成熟分化的影响,阐明其抑制肝星状细胞活化治疗肝纤维化的分子机制。**方法**:分离小鼠骨髓源性树突状细胞,采用脂多糖诱导构建成熟分化模型,并分别给予ω-鼠胆酸或芪参汤含药血清处理。通过流式细胞术检测各组树突状细胞CD40、CD80和MHC-II的表达水平,Western blot和RT-qPCR检测FXR/LKB1/NF-κB信号通路相关分子的表达。在此基础上,通过树突状细胞-初始$CD4^+$T细胞与初始$CD4^+$T细胞-肝星状细胞(JS1)共培养,采用流式细胞术检测分别检测各组初始$CD4^+$T细胞Treg分化和JS1细胞凋亡水平、酶联免疫吸附试验检测初始$CD4^+$T细胞上清中IL-10和TGF-β的含量、CCK8法及Western blot检测检测JS1细胞增殖活性和α-SMA蛋白的表达。**结果**:与模型组相比,药物干预显著抑制了树突状细胞CD40、CD80和MHC-II的表达,上调了树突状细胞中FXR和LKB1蛋白和mRNA的表达,降低了p-P65/total-P65的比值,增加了细胞质中P65蛋白的表达,抑制了细胞核中P65蛋白的分布,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。此外,细胞共培养结果表明,与模型组相比,ω-MCA、芪参汤和芪参汤联合ω-MCA组$CD4^+$T细胞Treg的百分比、IL-10和TGF-β的含量显著增加,JS1细胞凋亡水平显著增加,细胞活性和α-SMA蛋白的表达显著降低,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。**结论**:芪参汤通过抑制FXR/LKB1/NF-κB通路的激活,抑制树突状细胞的成熟分化,从而抑制肝星状细胞活化,达到治疗肝纤维化的目的。

[关键词] 芪参汤;肝纤维化;树突状细胞;初始$CD4^+$T细胞;肝星状细胞
[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 2097-5953(2025)14-1077-09

## Qishen decoction inhibits liver fibrosis by regulating FXR/LKB1/NF-κB signaling pathway mediated dendritic cell maturation

YANG Liuxin[1], GAO Tingting[2]✉, WANG Bingyu[2], YUAN Xingxing[1,2]✉
(1. *Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin* 150040, *China*; 2. *Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Harbin* 150006, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by the Excellent Youth Project of Heilongjiang Provincial Natural Science Foundation* (*YQ2022H015*)

[*Author*]: *YANG Liuxin, E-mail: yangliuxin2024@126.com*.
[*Correspondence to*]: *GAO Tingting, E-mail: gaotingting2024@126.com*; *YUAN Xingxing, Ph.D., Associate Chief Physician, E-mail: yuanxingxing@hljucm.edu.cn.*

*Received*: 2025-02-19 *Revised*: 2025-05-26 *JHMU*, 2025;31(14):1077-1085

**View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.**

[Abstract] **Objective**: This study aims to investigate the effects of Qishen decoction on the FXR/LKB1/NF-κB signaling pathway-mediated maturation and differentiation of dendritic cells and to elucidate its molecular mechanism in inhibiting the activation of hepatic stellate cells for the treatment of liver fibrosis. **Methods**: Mouse bone marrow-derived dendritic cells were isolated, and a maturation model was constructed using lipopolysaccharide. The cells were treated with either ω-muricholic acid (ω-MCA)

[基金项目] 黑龙江省自然科学基金优秀青年项目(YQ2022H015)
[作者简介] 杨柳欣,E-mail:yangliuxin2024@126.com。
[通讯作者] 高婷婷,E-mail:gaotingting2024@126.com;袁星星,博士,副主任医师,E-mail:yuanxingxing@hljucm.edu.cn。
[收稿日期] 2025-02-19 [修回日期] 2025-05-26 网络出版时间:2025-06-10 11:16:52

or Qishen decoction -containing serum. Flow cytometry was employed to detect the expression levels of CD40, CD80, and MHC-II on dendritic cells. Western blot and RT-qPCR were used to analyze the expression of FXR/LKB1/NF-κB signaling pathway related molecules. Furthermore, co-culture experiments were conducted between dendritic cells and naive $CD4^+$ T cells, as well as between naive $CD4^+$ T cells and hepatic stellate cells (JS1). Flow cytometry was used to assess the differentiation of naive $CD4^+$ T cells into regulatory T cells (Tregs) and the apoptosis of JS1 cells. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) were performed to measure the levels of interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor-β (TGF-β) in the supernatants of naive $CD4^+$ T cells. CCK-8 assays and Western blot were used to evaluate the proliferation activity and α-smooth muscle actin (α-SMA) protein expression of JS1 cells. **Results**: Compared to the model group, drug intervention significantly inhibited the expression of CD40, CD80, and MHC-II, upregulated the expression of FXR and LKB1 proteins and mRNA, reduced the ratio of phosphorylated P65 to total P65, increased the expression of P65 protein in the cytoplasm, and inhibited the distribution of P65 protein in the nucleus in dendritic cells, with all differences being statistically significant ($P<0.01$). Additionally, the co-culture results showed that compared to the model group, the percentage of Tregs, IL-10, and TGF-β levels in the ω-MCA, Qishen, and Qishen decoction combined with ω-MCA groups were significantly increased, while the apoptosis of JS1 cells, cell viability, and α-SMA protein expression were significantly reduced, with all differences being statistically significant ($P<0.01$). **Conclusion**: Qishen decoction inhibits the activation of the FXR/LKB1/NF-κB signaling pathway, thereby suppressing the maturation of dendritic cells, which in turn inhibits the activation of hepatic stellate cells and ameliorates liver fibrosis. This study provides new insights and potential therapeutic strategies for the treatment of liver fibrosis.

[**Key words**] Qishen decoction; Liver fibrosis; Dendritic cells; Naive $CD4^+$ T cells; Hepatic stellate cells

慢性肝病是全球公共卫生的重大挑战，每年导致超过200万人死亡，给社会和经济带来沉重的负担[1]。肝纤维化作为慢性肝病进展的核心病理过程，其特征是细胞外基质的异常沉积，最终破坏肝脏的正常结构和功能[2]。多种病因可引发肝纤维化，包括病毒性肝炎、酒精性肝病、非酒精性脂肪性肝炎以及自身免疫性肝病等。肝纤维化具有可逆性，如未进行有效治疗，可最终发展至肝硬化、肝衰竭甚至肝细胞癌等终末期肝病[3]。病理学上，各种因素导致的肝细胞损伤和免疫细胞的浸润可进一步激活肝星状细胞并分化肌成纤维细胞，并大量分泌胶原纤维，促进纤维瘢痕的形成[4]。因此，有效抑制肝星状细胞的激活已成为逆转肝纤维化的关键治疗策略。

T细胞是一类起源于骨髓的适应性免疫细胞，T细胞通过T细胞受体识别抗原肽-MHC复合物，参与调控肝纤维化进程[5]。其中，调节性T细胞（Regulatory T cell，Treg）作为$CD4^+$T细胞的重要亚群，通过表达特征性转录因子叉头框蛋白P3，在维持免疫耐受和抑制过度炎症反应中发挥关键作用[6]。

芪参汤为临床治疗肝纤维化的经验方，在非酒精性脂肪性肝纤维化治疗领域展现出独特优势[7-9]。方中黄芪补气升阳，西洋参益气养阴，二者共为君药。丹参活血凉血，三七化瘀止血，二者协同改善肝络瘀滞，共为臣药。泽泻与荷叶清热利湿，女贞子与墨旱莲滋补肝肾，养阴清热，山楂与绞股蓝消食化瘀，共为佐药。甘草为使，调和诸药。全方共凑益气养阴为主，兼以活血化瘀、清热利湿、滋补肝肾的功效。课题组前期研究发现，芪参汤可上调肝脏Treg细胞的水平改善肝纤维化进程，提示Treg细胞的免疫调节功能可能是芪参汤抗纤维化作用的重要机制[10]。值得注意的是，树突状细胞作为连接先天免疫与适应性免疫的核心枢纽，在抗原呈递过程中通过调控T细胞亚群分化，已被证实可参与肝星状细胞活化这一纤维化关键环节[11]。基于此，本研究基于“树突状细胞-T细胞”轴介导的肝星状细胞的活化，从而阐明芪参汤通过抑制树突状细胞成熟改善肝纤维化的分子机制，为芪参汤为临床应用提供更坚实的科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞

本研究中所用小鼠肝星状细胞株JS1由武汉佰仟度生物科技有限公司提供。细胞接种于含1%青霉素-链霉素与10%胎牛血清的RPMI-1640完全培养基中，并置于含5%$CO_2$的37 ℃恒温恒湿细胞培养箱进行常规培养。每48 h更换1次培养基，当细胞处于对数生长期，开展后续实验。

### 1.2 药物

芪参汤，组成包括生黄芪15 g、西洋参10 g、丹参10 g、三七5 g、泽泻10 g、荷叶10 g、女贞子8 g、墨旱莲8 g、净山楂10 g、绞股蓝5 g和甘草3 g，购自黑龙江省中医医院。药物以5倍量水浸泡后，煎煮2次，过滤后合并药液，浓缩至每1 mL含生药1 g的浓缩液备用。ω-鼠胆酸（ω-muricholic acid，ω-MCA）购于北京索莱宝科技有限公司（货号为SM4830）。

ω-MCA使用前溶解于二甲基亚砜中配制成高浓度母液，再稀释至100 μmol/L用于细胞实验。

### 1.3 试剂

戊巴比妥钠盐和脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）均购自美国Sigma-Aldrich公司（货号为P3761和L5293）。小鼠初始$CD4^+$T细胞分选试剂盒购自德国Miltenyi公司（货号为130-104-453）。RPMI-1640培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司（货号为PM150110）。胎牛血清、细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒、LKB1和Histone H3抗体均购自上海碧云天生物技术有限公司（货号分别为C0235、P0028、AF7389和AH433）。小鼠白细胞介素4（interleukin-4，IL-4）和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（granulocyte-macrophage colony stimulating factor，GM-CSF）均购于美国MCE公司（货号分别为HY-P70653和HY-P7016）。小鼠CD11c分选磁珠购自苏州欣协生物科技有限公司（货号为92-01-0264）。红细胞裂解液、超纯总RNA提取试剂盒和cDNA合成试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司（货号分别为HR8172、ALH011和JN0004）。FITC-CD4、FITC-CD44和PE-CD62L抗体均购自英国Abcam公司（货号分别为ab269349、ab218749和ab25569）。Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒与BCA蛋白浓度测定试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司（货号分别为E-CK-A211和E-BC-K318-M）。FXR、APC-Foxp3与PE-CD25抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司（货号分别为25055-1-AP、65089和65137）。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自北京索莱宝科技有限公司（货号为SE134）。小鼠IL-10和转化生长因子β（Transforming growth factor β，TGF-β）均购自上海酶联生物科技有限公司（货号分别为ml037873和ml057830）。NF-κB p65与p-p65（Ser536）抗体均购自美国CST公司（货号分别为8242和3033。α-SMA和β-actin抗体购自武汉爱博泰克生物科技有限公司（货号分别为A17910和AC026）。SYBR Green qPCR试剂盒购自德国Qiagen公司（货号为208054）。

### 1.4 含药血清制备

C57BL/6J小鼠购自赛业生物科技有限公司（实验动物生产许可证号：SCXK（冀）2021-003）。实验动物饲养于符合国家标准的SPF级环境中，确保无特定病原体感染。饲养环境：湿度：40%～60%，温度：（24±1）℃，12 h明暗交替，并保持良好通风。小鼠采用无菌、无尘的玉米芯垫料，每周更换2次，以维持笼内清洁。

小鼠适应期喂养1 w后随机分为空白血清组和芪参汤含药血清组，每组20只。芪参汤含药血清组小鼠以芪参汤浓缩液（18.8 g/kg）进行灌胃，空白血清组小鼠给予等体积的蒸馏水，每日1次，连续7 d。末次灌胃后禁食12 h（不禁水），采用1%戊巴比妥钠（40 mg/kg）腹腔注射麻醉，腹主动脉取血。室温下静置30 min后3 000 r/min离心10 min取上层血清。经56 ℃水浴加热30 min灭活，0.22 μm微孔膜过滤，－70 ℃超低温冰箱保存备用。本研究经黑龙江省中医药科学院动物伦理委员会审批（编号：SY3R-2022035）。

### 1.5 初始$CD4^+$ T细胞分离

参照文献[12]中方法分离小鼠初始$CD4^+$T细胞，具体如下：小鼠腹腔注射麻醉后分离脾脏，将剪碎的小鼠脾脏组织置于200目细胞筛网上，用RPMI-1640培养基进行研磨。收集细胞悬液，去除红细胞后用RPMI-1640培养基洗涤重悬，调整浓度至$1\times10^7$个/mL。参照试剂盒说明进行初始T细胞分选，最终获得$CD4^+CD44^-CD62L^+$的$CD4^+$T细胞亚群。经流式细胞仪鉴定后用于后续研究。

### 1.6 树突状细胞分离

参照文献[13]中方法分离小鼠树突状细胞，具体如下：小鼠腹腔注射麻醉后分离胫骨与股骨，用RPMI-1640培养基冲洗骨髓腔并收集骨髓细胞。去除红细胞后清洗获得单个核细胞，并重悬于含10%胎牛血清的培养基中，调整浓度至$1\times10^8$个/mL。随后接种于6孔板，加入10 ng/mL IL-4和GM-CSF进行诱导分化。隔日换液，培养6 d后，磁珠分选$CD11c^+$细胞，流式细胞仪鉴定后用于后续研究。

### 1.7 细胞分组与药物干预

以$1\times10^6$个/孔将小鼠树突状细胞接种于24孔板，分为5组：空白组、模型组、ω-MCA组、芪参汤组和芪参汤＋ω-MCA组，每组设3个复孔。除空白组外，余下各组采用LPS诱导构建树突状细胞成熟模型[14]。具体分组及处理如下：（1）空白组：900 μL RPMI-1640培养基＋100 μL空白血清；（2）模型组：900 μL RPMI-1640培养基＋100 μL空白血清＋100 ng/mL LPS；（3）ω-MCA组：900 μL RPMI-1640培养基＋100 μL空白血清＋100 ng/mL LPS＋100 μmol/L ω-MCA；（4）芪参汤组：900 μL RPMI-1640培养基＋100 ng/mL LPS＋100 μL芪参汤含药血清；（5）芪参汤＋ω-MCA组：900 μL RPMI-1640培养基＋100 μL芪参汤含药血清＋100

ng/mL LPS＋100 μmol/L ω-MCA。细胞培养箱中孵育24 h后收集细胞。

### 1.8　树突状细胞与CD4$^+$T细胞共培养

将"1.5"中分离的小鼠初始CD4$^+$T细胞与1.7中树突状细胞分别以1×10$^6$/孔和5×10$^4$/孔接种于24孔板，细胞培养箱中孵育48 h后收获CD4$^+$T细胞用于后续检测。

### 1.9　肝星状细胞与CD4$^+$T细胞共培养

将JS1细胞接种于Transwell小室的下室，加入500 μL RPMI-1640培养基。小鼠初始CD4$^+$T细胞与树突状细胞按照20∶1的比例混合接种于上室，细胞培养箱中孵育48 h后收获JS1细胞用于后续检测。

### 1.10　指标检测

**1.10.1　流式细胞术**　（1）CD40、CD80和MHC-Ⅱ检测：取"1.7"中树突状细胞，4 ℃ 1 200 r/min离心5 min弃上清。取1×10$^6$个细胞以FACS重悬，分别加入1 μg小鼠FITC-CD40/PE-CD80/APC-MHC-Ⅱ抗体，4 ℃避光孵育30 min，洗涤，离心弃上清。重悬后上流式细胞仪检测。

（2）Treg检测：取"1.8"中CD4$^+$T细胞用FACS重悬，加入FITC-CD4/PE-CD25抗体，4 ℃避光孵育30 min。离心弃上清。加入固定液后室温孵育15 min，随后加入透化液室温孵育15 min。加入APC-Foxp3抗体，4 ℃避光孵育30 min。重悬后上流式细胞仪检测。

（3）细胞凋亡检测：取"1.9"中JS1细胞，PBS洗涤后，4 ℃ 1 200 r/min离心5 min弃上清。分别加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI，轻轻混匀，室温避光孵育15 min。上流式细胞仪检测。

**1.10.2　蛋白印迹法**　取"1.7"中树突状细胞和1.9中JS1细胞，4 ℃ 1 200 r/min离心5 min，加入RIPA裂解液于冰上裂解，12 000 r/min离心5 min提取总蛋白。此外，采用试剂盒分离树突状细胞细胞质和细胞核蛋白。采用BCA试剂盒测定蛋白浓度，SDS-PAGE电泳，转膜。洗涤后加入5%脱脂牛奶室温封闭1 h。分别加入FXR、LKB1、p-p65、p65、α-SMA、β-actin和Histone H3一抗，4 ℃孵育过夜。次日，TBST洗涤后加入HRP二抗，室温继续孵育1 h。TBST洗涤，ECL显影。分别以β-acti与Histone H3作为细胞质与细胞核内参蛋白，通过ImageJ软件分析蛋白条带灰度值，计算各组蛋白的相对表达水平。

**1.10.3　酶联免疫吸附试验**　取"1.8"中CD4$^+$T细胞，1 200 r/min离心5 min取上清。采用酶标仪检测IL-10和TGF-β的含量，实验步骤严格参照试剂盒说明书进行。

**1.10.4　逆转录定量聚合酶链反应**　取"1.7"中树突状细胞，PBS洗涤后，采用TRIzol法提取总RNA。逆转录合成cDNA。配置反应体系，分别加入*FXR*、*LKB1*、*P65*及*GAPDH*引物。引物信息如下：*FXR*：Forward Primer：5′-ATGCTGCAGACCTACGAGCAG-3′，Reverse Primer：5′-TGGAGTCCTCGGTGCTTTCT-3′，产物长度：150 bp；*LKB1*：Forward Primer：5′-GCTGAGCTGGTGCTGGTCTTB-3′，Reverse Primer：5′-TCCTCTCGGTCTCGGTCTCT-3′，产物长度：130 bp；*P65*：Forward Primer：5′-CTGCTGCTGCTGCTGCTGCT-3′，Reverse Primer：5′-GTGCTGCTGCTGCTGCTGCT-3′，产物长度：140 bp；*GAPDH*：Forward Primer：5′-GCTGAGCTGGTGCTGGTCTT-3′，Reverse Primer：5′-TCCTCTCGGTCTCGGTCTCT-3′，产物长度：120 bp。加入SYBR Green One-Step试剂盒进行PCR反应。设置反应程序：预变性95 ℃ 30 s，循环40次（95 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s），熔解曲线分析。使用*GAPDH*作为内参基因，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算*FXR*、*LKB1*和*P65* mRNA相对表达量。

### 1.11　统计学处理

数据采用SPSS 27.0统计软件进行分析。多组间比较采用单因素方差分析（ANOVA），组间比较采用Tukey′s HSD检验。$P<0.05$为差异具有统计学意义。

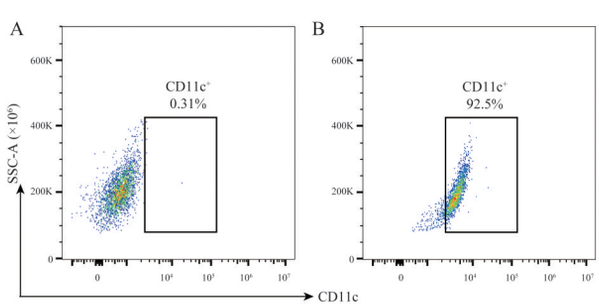
## 2　结果

### 2.1　树突状细胞的分离鉴定

流式细胞术显示树突状细胞（CD11c$^+$细胞亚群）的纯度＞90%。见图1。

### 2.2　初始CD4$^+$ T细胞的分离鉴定

采用磁珠分选，以CD4$^+$CD44$^-$CD62L$^+$作为初始CD4$^+$T细胞特异性标记分子。流式细胞结果显




A：未染色对照；B：CD11c$^+$细胞比率

**图1　树突状细胞的分离和鉴定**

**Fig 1　Isolation and characterization of dendritic cells**

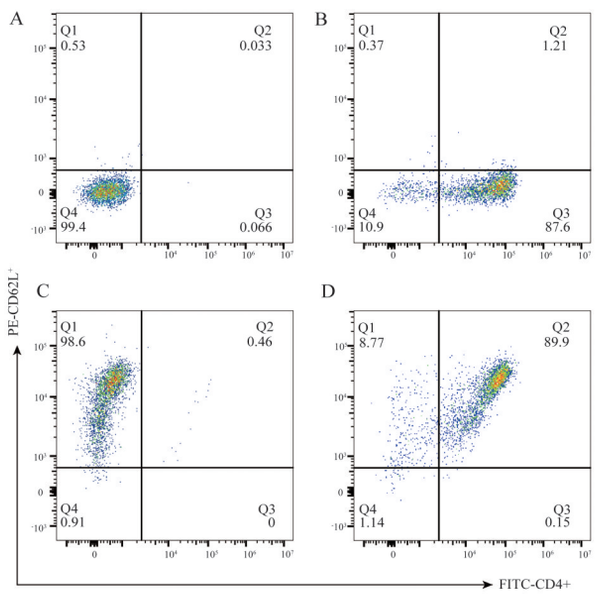
示，分离得到的$CD4^+CD62L^+$细胞亚群纯度接近90%。见图2。

### 2.3 芪参汤对树突状细胞表型的影响

如图3所示，与空白组相比，模型组CD40、CD80和MHC-Ⅱ阳性细胞的百分比明显增加，差异均具有统计学意义（$P<0.01$）。与模型组相比，ω-MCA、芪参汤含药血清和芪参汤含药血清联合ω-MCA干预均能显著抑制树突状细胞CD40、CD80和MHC-Ⅱ的表达，差异均具有统计学意义（$P<0.01$）。其中芪参汤含药血清联合ω-MCA对CD40、CD80和MHC-Ⅱ的抑制作用最佳。见图3。

### 2.4 芪参汤对树突状细胞FXR/LKB1/NF-κB信号通路的影响

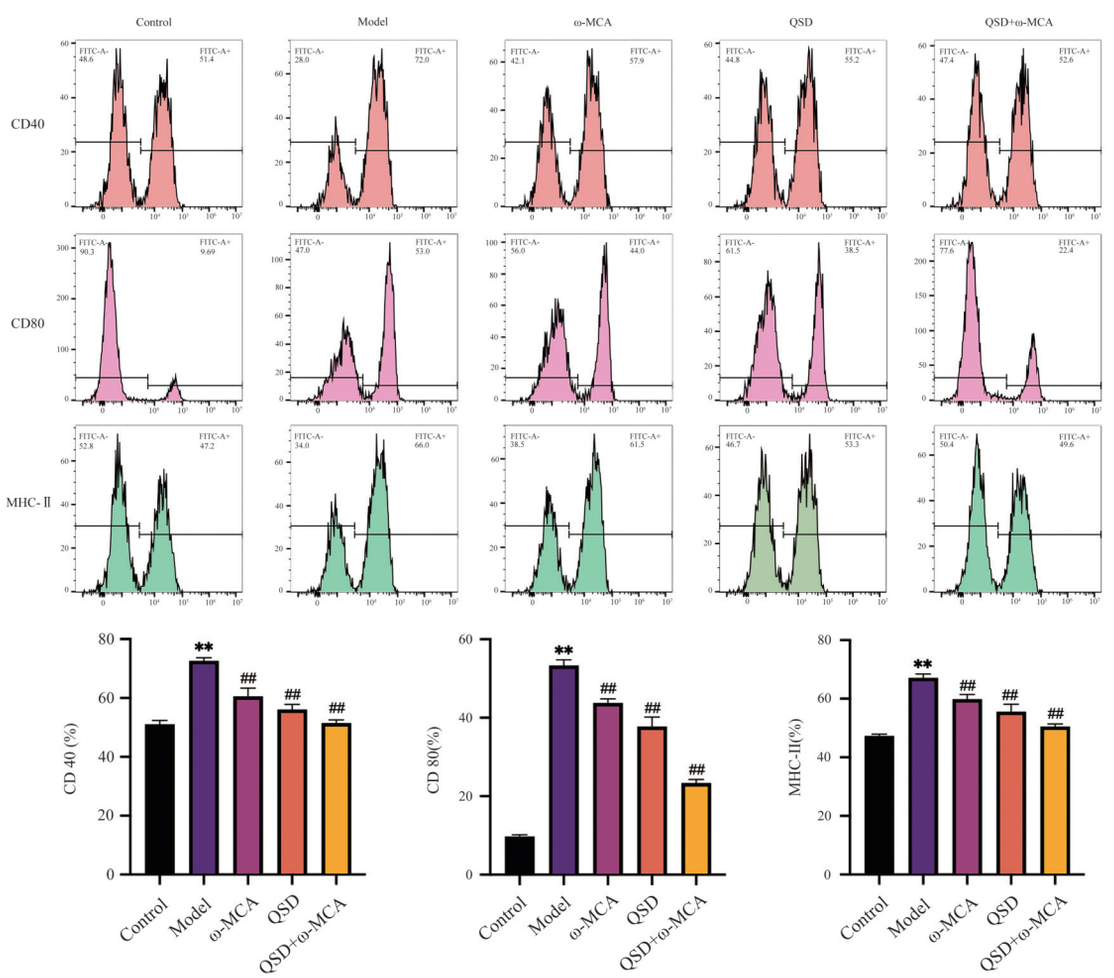
Western blot结果显示，与空白组相比，模型组细胞中FXR和LKB1蛋白的表达显著降低，p-P65/total-P65的比值显著增加，差异均具有统计学意义（$P<0.01$）。与模型组相比，ω-MCA、芪参汤含药血清和芪参汤含药血清联合ω-MCA均能显著上调树




A：未染色对照；B：$CD4^+$单标对照；C：$CD62L^+$单标对照；D：$CD4^+CD62L^+$细胞比率

**图2 初始$CD4^+$ T细胞的分离和鉴定**

**Fig 2 Isolation and characterization of naive CD4+ T cells**



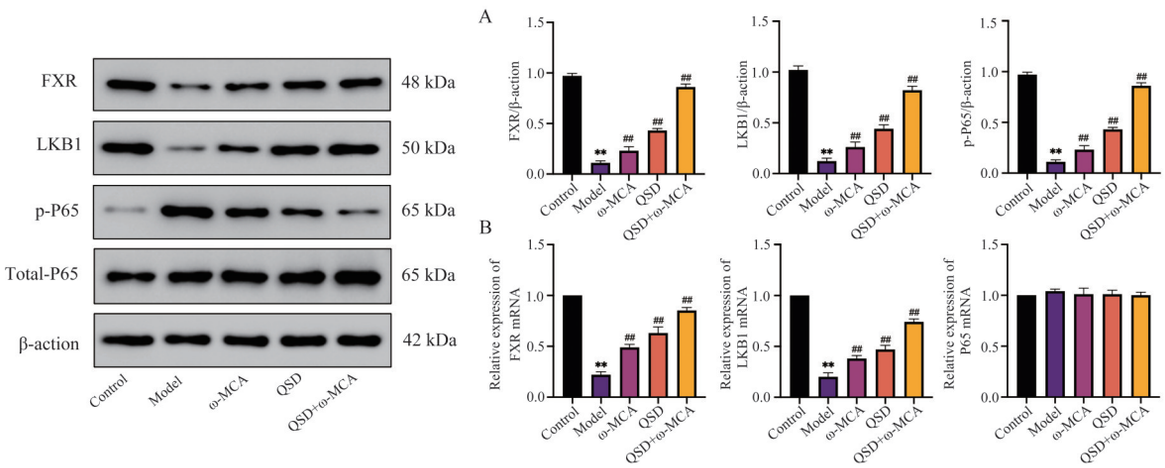

与空白组比较，$^{**}P<0.01$；与模型组比较，$^{\#\#}P<0.01$

**图3 芪参汤对树突状细胞CD40、CD80和MHC-Ⅱ表达的影响**

**Fig 3 Effects of Qishen decoction on CD40, CD80, and MHC-Ⅱ expression in dendritic cells**

突状细胞中*FXR*和*LKB1*蛋白的表达，降低p-P65/total-P65的比值，差异均具有统计学意义（$P<0.01$）。见图4A。

此外，与空白组相比，LPS能够显著下调树突状细胞FXR和LKB1 mRNA的表达，差异均具有统计学意义（$P<0.01$）。与模型组相比，ω-MCA、芪参汤含药血清和芪参汤含药血清联合ω-MCA均能显著上调树突状细胞中*FXR*和*LKB1* mRNA的表达，差异均具有统计学意义（$P<0.01$）。而各组间P65 mRNA的表达无明显变化，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。见图4B。



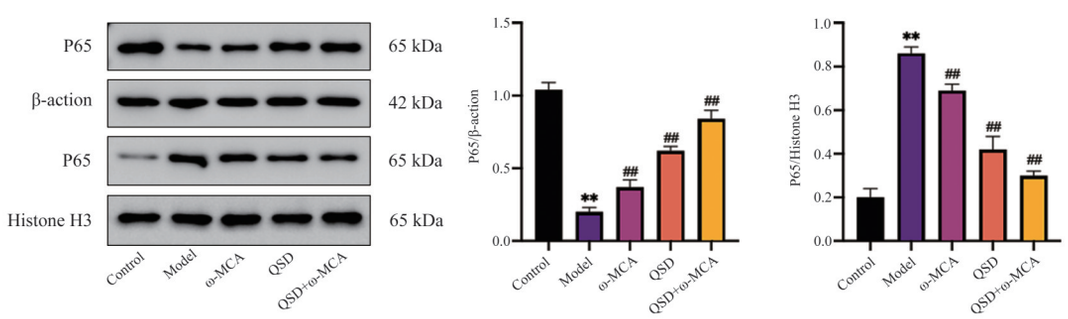

与空白组比较，$^{**}P<0.01$；与模型组比较，$^{\#\#}P<0.01$

A：Western blot检测FXR/LKB1/NF-κB信号通路中相关蛋白的表达；B：RT-qPCR检测FXR/LKB1/NF-κB信号通路中相关蛋白的表达

**图4　芪参汤对树突状细胞FXR/LKB1/NF-κB信号通路的影响**

**Fig 4 Effects of Qishen decoction on the FXR/LKB1/NF-κB signaling pathway in dendritic cells**

### 2.5　芪参汤对树突状细胞P65蛋白细胞分布的影响




与空白组比较，$^{**}P<0.01$；与模型组比较，$^{\#\#}P<0.01$

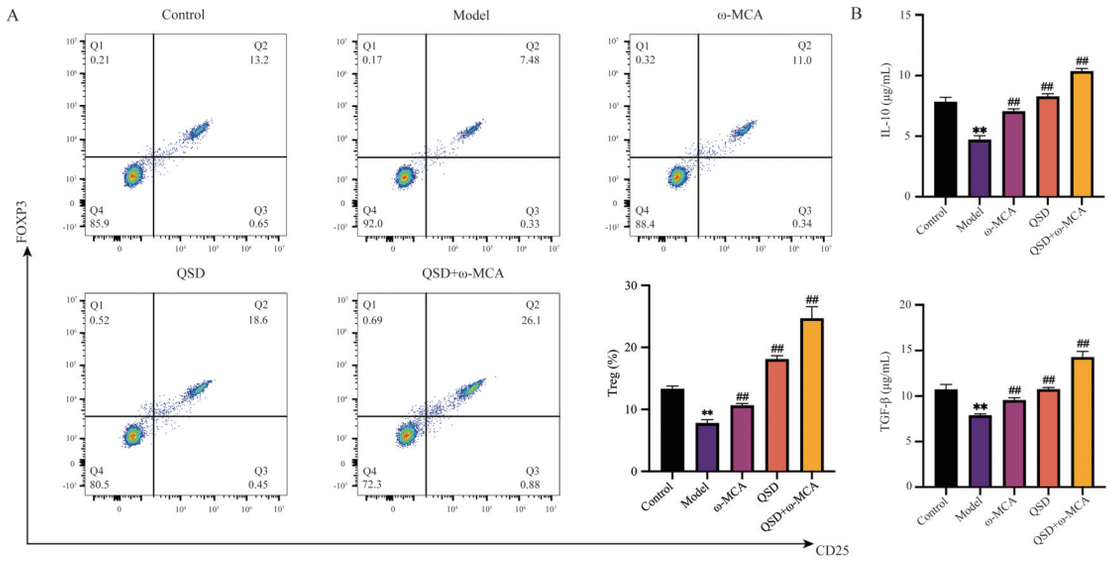
**图5　芪参汤对树突状细胞P65蛋白细胞分布的影响**

**Fig 5　Effects of Qishen decoction on subcellular localization of P65 protein in dendritic cells**

与空白组相比，LPS能够显著降低细胞质中P65蛋白的表达，增加细胞核中P65蛋白的分布，差异均具有统计学意义（$P<0.01$）。与模型组相比，ω-MCA、芪参汤含药血清和芪参汤含药血清联合ω-MCA均能显著增加细胞质中P65蛋白的表达，抑制细胞核中P65蛋白的，差异均具有统计学意义（$P<0.01$）。见图5。

### 2.6　芪参汤对$CD4^+$T分化的影响

如图6A所示，与空白组相比，模型组Treg的百分比显著降低，差异具有统计学意义（$P<0.01$）。与模型组相比，ω-MCA、芪参汤含药血清和芪参汤含药血清联合ω-MCA处理的树突状细胞能够显著增加Treg的百分比，差异均具有统计学意义（$P<0.01$）。此外，ELISA结果显示，与空白组相比，LPS处理的树突状细胞能够显著抑制T细胞中IL-10和TGF-β的分泌，差异均具有统计学意义（$P<0.01$）。与模型组相比，ω-MCA、芪参汤含药血清和芪参汤含药血清联合ω-MCA处理能够显著增加IL-10和




与空白组比较，$^{**}P<0.01$；与模型组比较，$^{\#\#}P<0.01$

A：流式细胞术检测CD25+Foxp3+T细胞的百分比；B：ELISA检测T细胞中IL-10和TGF-β的含量

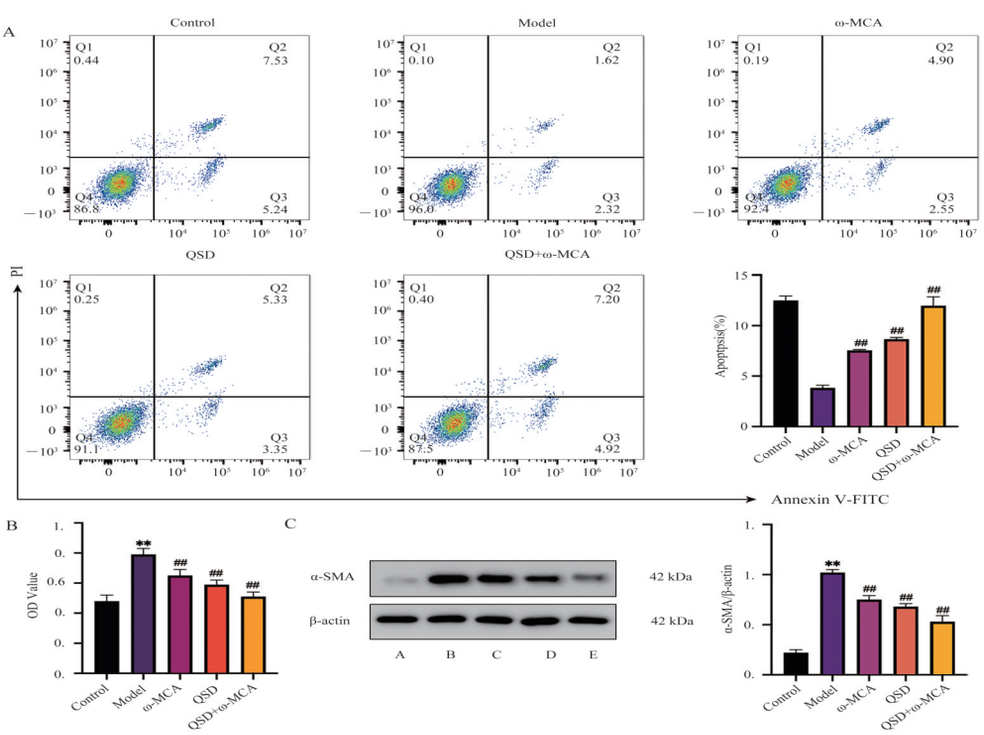
**图6　芪参汤对$CD4^+$T细胞分化的影响**

**Fig 6 Effects of Qishen decoction on $CD4^+$ T cell differentiation**

TGF-β的含量，差异均具有统计学意义（$P<0.01$）。见图6B。

### 2.7　芪参汤对肝星状细胞活化的影响

T细胞与JS1共培养结果表明：与空白组相比，模型组JS1细胞凋亡水平显著降低，细胞活性和α-SMA蛋白的表达显著增加，差异均具有统计学意义（$P<0.01$）。与模型组相比，ω-MCA、芪参汤含药血清和芪参汤含药血清联合ω-MCA组JS1细胞凋亡显著增加，细胞活性和α-SMA蛋白的表达显著降低，差异均具有统计学意义（$P<0.01$）。见图7。




与空白组比较，$^{**}P<0.01$；与模型组比较，$^{\#\#}P<0.01$

A：流式细胞术检测JS1细胞凋亡水平；B：CCK8法检测JS1细胞增殖活性；C：Western blot检测JS1细胞中α-SMA蛋白的表达

**图7　芪参汤对肝星状细胞纤维化表型的影响**

**Fig 7　Effects of Qishen decoction on fibrotic phenotype of hepatic stellate cells**

## 3 讨论

肝星状细胞是肝脏中的一类重要的非实质细胞，位于肝窦周间隙（Disse腔），约占肝脏细胞总数的5%～15%。在静息状态下，肝星状细胞呈现典型的星状形态，胞体伸出多个树突状突出，包绕肝窦内皮细胞。肝星状细胞富含维生素A脂滴，是体内维生素A的主要储存细胞，参与维生素A的代谢、细胞外基质稳态的维持及肝窦微循环的调节[15]。α-SMA是肝星状细胞活化的关键标志，活化的肝星状细胞丧失维生素A的储存能力，获得增殖、迁移和细胞外基质分泌能力，成为肝纤维化的主要效应细胞。因此，抑制肝星状细胞的活化是抗肝纤维化治疗的中心环节。本研究结果显示，模型组肝星状细胞凋亡水平显著降低，细胞增殖水平和α-SMA蛋白的表达显著增加，提示肝星状细胞活化加剧[16]。与前期的研究结果一致，ω-MCA可显著抑制肝星状细胞的增殖，下调α-SMA蛋白的表达，促进其凋亡[17]。本研究表明，芪参汤对肝星状细胞活化的抑制作用优于单独使用ω-MCA，且两者联合使用作用效果最佳，提示靶向ω-MCA相关代谢通路是芪参汤抗纤维化的重要机制之一，也为开发基于代谢调控的联合疗法提供了新方向。

T细胞是适应性免疫系统的核心组成部分，起源于骨髓造血干细胞。初始$CD4^+$T细胞低表达黏附分子CD44和高表达CD62L，在抗原提呈细胞的共刺激分子的作用下可分化为多种效应T细胞亚群（如Th1、Th2、Th17、Tfh等）和Treg[18]。Th17/Treg平衡已被证实在肝纤维化中发挥重要作用，其中Treg是免疫抑制的关键细胞，通过分泌IL-10和TGF-β直接或间接抑制肝星状细胞的激活[19-21]。IL-10是一种抗炎细胞因子，通过结合肝星状细胞表面的IL-10R并激活JAK1/TYK2-STAT3信号，抑制细胞外基质的合成与α-SMA的表达[22]。此外，IL-10还可通过上调Bax/Bcl-2比例，促进活化的肝星状细胞的凋亡[23]。尽管TGF-β作为致纤维化因子，能够通过细胞膜上TGF-βRⅡ激活Smad2/3通路促进肝星状细胞活化。然而，TGF-β作为免疫抑制因子，还可抑制Th1/Th17等促炎性T细胞的分化且促进Treg的分化[24]。本研究结果显示，芪参汤能够促进初始$CD4^+$T细胞向Treg的分化，这与课题组前期的动物实验研究结果一致。此外，芪参汤能够促进初始$CD4^+$T细胞IL-10和TGF-β的分泌，发挥抑制炎症和抗肝纤维化的作用。

树突状细胞是免疫系统的重要组成部分，作为专业抗原提呈细胞，通过捕获、处理和呈递抗原给T细胞，启动特异性免疫应答[25]。CD40属于肿瘤坏死因子受体超家族的一员，是树突状细胞表面的一个跨膜蛋白。树突状细胞表面CD40与T细胞表面的CD40L相互作用，促使未成熟的树突状细胞向成熟的树突状细胞转变，增强其抗原呈递能力[26]。CD80是树突状细胞表面的另一个关键共刺激分子，通过与T细胞表面的CD28结合，促进T细胞的激活与分化[27]。MHC-Ⅱ的主要功能是将内源性抗原的肽段呈递给$CD4^+$T细胞，通过与T细胞受体结合，参与Treg和效应T细胞的分化[28]。FXR作为一种核受体，参与脂质代谢和炎症反应的调控。此外，研究表明FXR可通过LKB1调控树突状细胞的成熟分化[29,30]。LKB1是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，通过磷酸化AMPK上的苏氨酸残基，从而抑制NF-κB的激活[31]。NF-κB p65亚基的磷酸化激活，进而进入细胞核，识别并结合到靶基因启动子区域的κB序列，从而调控树突状细胞的分化[32]。本研究结果表明，芪参汤能够抑制树突状细胞CD40、CD80和MHC-Ⅱ的表达，从而抑制其成熟分化。机制上，芪参汤显著上调树突状细胞中FXR和LKB1的表达，抑制P65蛋白的磷酸化水平，从而抑制P65蛋白的细胞核易位，达到抑制树突状细胞成熟分化的作用。

综上所述，本研究揭示芪参汤通过靶向抑制肝星状细胞活化，下调α-SMA，抑制增殖，促进凋亡，与ω-MCA协同调控肝纤维化的进展。机制上，芪参汤通过抑制FXR/LKB1/NF-κB通路的激活抑制树突状细胞的成熟分化，促进$CD4^+$ T细胞向Treg分化，进而抑制肝星状细胞活化。

作者贡献度说明：

袁星星：设计；杨柳欣和高婷婷：完成实验；王炳予：指标检测，袁星星：设计实验，数据统计，撰写论文。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

## 参考文献

1 Devarbhavi H, Asrani SK, Arab JP, et al. Global burden of liver disease: 2023 update[J]. J Hepatol, 2023, 79(2):516-537.

2 Zhang Y, Wu Y, Shen W, et al. Crosstalk between NK cells and hepatic stellate cells in liver fibrosis (Review)[J]. Mol Med Rep, 2022, 25(6):208.

3 Qiu Z, Yuan X, Wang X, et al. Crosstalk between $m^6A$

modification and non-coding RNAs in HCC[J]. Cell Signal, 2024, 117:111076.

4 Wei Y, Bingyu W, Lei Y, et al. The antifibrotic role of natural killer cells in liver fibrosis[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2022, 247(14):1235-1243.

5 Zhang M, Zhang S. T cells in fibrosis and fibrotic diseases[J]. Front Immunol, 2020, 11:1142.

6 Zhou Y, Zhang H, Yao Y, et al. $CD4^+$ T cell activation and inflammation in NASH-related fibrosis[J]. Front Immunol, 2022, 13:967410.

7 袁星星,杨柳欣,高佳炜,等.芪参汤治疗痰瘀互结型非酒精性脂肪性肝炎的临床疗效观察[J].现代中药研究与实践,2024,38(2):60-63.
Yuan XX, Yang LX, Gao JW, et al. Clinical efficacy of Qishen decoction in treating nonalcoholic steatohepatitis with phlegm-stasis syndrome[J]. Mod Chin Med Res Pract, 2024, 38(2): 60-63.

8 袁维,王炳予,杨磊,等.芪参汤治疗非酒精性脂肪性肝炎的临床疗效观察及对肠道菌群的影响[J].中国中西医结合消化杂志,2021,29(6):383-391.
Yuan W, Wang BY, Yang L, et al. Clinical efficacy of Qishen decoction in nonalcoholic steatohepatitis and its impact on gut microbiota[J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig, 2021, 29(6):383-391.

9 王炳予,张雅丽,杨磊,等.基于16S rRNA技术探讨芪参汤治疗非酒精性脂肪性肝纤维化的作用机制[J].海南医学院学报,2020,26(01):18-24,29.
Wang BY, Zhang YL, Yang L, et al. Mechanism of Qishen decoction in treating nonalcoholic hepatic fibrosis based on 16S rRNA sequencing[J]. J Hainan Med Univ, 2020, 26(1):18-24,29.

10 袁维,王炳予,杨磊,等.芪参汤对肝纤维化大鼠肝组织辅助性T细胞17/调节性T细胞平衡的影响[J].中国中医药信息杂志,2021,28(8):66-72.
Yuan W, Wang BY, Yang L, et al. Qishen decoction regulates Th17/Treg balance in liver tissues of rats with hepatic fibrosis[J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2021, 28(8):66-72.

11 Wang B, Yang L, Yuan X, et al. Roles and therapeutic targeting of dendritic cells in liver fibrosis[J]. J Drug Target, 2024, 32(6):647-654.

12 Wang W, Ai X. Primary culture of immature, naïve mouse $CD4^+$ T cells[J]. STAR Protoc, 2021, 2(3):100756.

13 王卓,李娴静,冷雪娇.小鼠髓源性树突状细胞分离培养及鉴定[J].药学研究, 2023, 42(2): 89-94.
Wang Z, Li XJ, Leng XJ. Isolation, culture, and identification of murine bone marrow-derived dendritic cells[J]. J Pharm Res, 2023, 42(2):89-94.

14 Monaci S, Aldinucci C, Rossi D, et al. Hypoxia shapes autophagy in LPS-activated dendritic cells[J]. Front Immunol, 2020, 11:573646.

15 Mak KM, Wu C, Cheng CP. Lipid droplets, the holy grail of hepatic stellate cells: In health and hepatic fibrosis[J]. Anat Rec (Hoboken), 2023, 306(5): 983-1010.

16 De Smet V, Eysackers N, Merens V, et al. Initiation of hepatic stellate cell activation extends into chronic liver disease[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(12):1110.

17 杨柳欣,高婷婷,王炳予,等.基于树突状细胞成熟分化探讨ω-鼠胆酸抑制肝纤维化的机制研究[J].海南医科大学学报,2025,31(11):808-815.
Yang LX, Gao TT, Wang BY, et al. Mechanistic study on ω-muricholic acid inhibiting hepatic fibrosis *via* dendritic cell maturation[J]. J Hainan Med Univ, 2025, 31(11):808-815..

18 Almeida L, Dhillon-LaBrooy A, Carriche G, et al. $CD4^+$ T-cell differentiation and function: Unifying glycolysis, fatty acid oxidation, polyamines NAD mitochondria[J]. J Allergy Clin Immunol, 2021, 148(1):16-32.

19 Zhang M, Zhang S. T cells in fibrosis and fibrotic diseases[J]. Front Immunol, 2020, 11:1142.

20 Zhou Y, Zhang H, Yao Y, et al. $CD4^+$ T cell activation and inflammation in NASH-related fibrosis[J]. Front Immunol, 2022, 13:967410.

21 Han C, Qian X, Pei H, et al. Double-negative T cells promote liver fibrosis progression by regulating Treg/Th17[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2024, 38(12): e70028.

22 Hackstein CP, Spitzer J, Symeonidis K, et al. Interferon-induced IL-10 drives systemic T-cell dysfunction during chronic liver injury[J]. J Hepatol, 2023, 79(1):150-166.

23 Chen Y, Huang Y, Huang R, et al. Interleukin-10 gene intervention ameliorates liver fibrosis by enhancing the immune function of natural killer cells in liver tissue[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 127:111341.

24 Chen W. TGF-β regulation of T cells[J]. Annu Rev Immunol, 2023, 41:483-512.

25 董美玲,罗赵雅靖,吴仪,等.基于RNA-seq技术分析活性氧对未成熟树突状细胞迁移能力的促进作用[J].基因组学与应用生物学,2024,43(Z2):1859-1871.
Dong ML, Luo ZYJ, Wu Y, et al. RNA-seq analysis reveals ROS promotes migration of immature dendritic cells by enhancing oxidative stress[J]. Genomics Appl Biol, 2024, 43(Z2): 1859-1871.

(下转第1093页)