

益气解毒复方含药血清对胸腺增生型重症肌无力 mTEC和Treg细胞增殖的影响

陈森林¹, 况时祥^{2*}, 刘建飞¹, 赵芝兰², 郑雄¹, 邹进¹, 刘爽³

(1. 贵州中医药大学, 贵阳 550025;

2. 贵州中医药大学第二附属医院, 贵阳 550003;

3. 首都医科大学, 北京 100069)

[摘要] 目的:探讨益气解毒复方含药血清对胸腺增生型重症肌无力(MG)患者胸腺髓质上皮细胞(mTEC)和调节性T细胞(Treg)增殖的影响。方法:采用血清药理学方法,将35只SD大鼠适应性喂养1周后随机分为益气解毒复方低、中、高剂量组,空白组,强的松组,每组7只。大鼠连续灌胃1周,制备上述各组含药血清。利用细胞增殖与活性检测(CCK-8)法观察不同浓度益气解毒复方含药血清对mTEC和Treg细胞增殖的作用,并通过共同培养方式观察mTEC及益气解毒复方含药血清对Treg细胞增殖的作用。结果:胸腺细胞经培育,使用mTEC特征性标记剂豆凝集素I(UEAI)做流式检测阳性率均值为92.54%。采用磁珠分选Treg细胞,多次磁珠分选后的Treg细胞纯度高达92%,mTEC和Treg细胞均呈较高阳性率表达,细胞为mTEC和Treg细胞,细胞纯度符合后续实验的要求。益气解毒复方含药血清体积分数2.5%~15%时,对mTEC和Treg细胞均有抑制作用,益气解毒复方含药血清浓度 $\geq 20\%$ 时对细胞的增殖有促进作用,且随作用的时间延长,含药血清对细胞的增殖的促进作用越为明显。培养48h后的结果显示,与空白组比较,强的松组和益气解毒复方低剂量组差异无统计学意义,中、高剂量组细胞增殖抑制率显著降低($P < 0.01$)。与mTEC共同培养的Treg细胞,与空白组比较,强的松组、益气解毒复方低剂量组Treg细胞增殖抑制率差异无统计学意义,中、高剂量组细胞增殖抑制率显著降低($P < 0.01$)。结论:益气解毒复方含药血清能够影响胸腺增生型MG患者mTEC和Treg细胞的增殖,独立培养MG患者的Treg细胞相比,与mTEC共同培养的MG患者Treg细胞增殖具有促进作用,提示mTEC能够调控Treg细胞的增殖,且这种作用在予以益气解毒复方含药血清干预之后更为明显,说明益气解毒复方对Treg细胞的干预,可以通过对mTEC的治疗作用产生,这可能是益气解毒复方治疗MG的作用机制之一。

[关键词] 益气解毒复方; 重症肌无力; 含药血清; 胸腺髓质上皮细胞; 调节性T细胞; 增殖

[中图分类号] R22;R242;R285.5;R2-031;R746.1;R255.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)04-0068-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220396

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211203.0941.002.html>

[网络出版日期] 2021-12-06 7:27

Effect of Yiqi Jiedu Prescription-containing Serum on Proliferation of mTEC and Regulatory T Cells in Myasthenia Gravis Patients with Thymus Hyperplasia

CHEN Sen-lin¹, KUANG Shi-xiang^{2*}, LIU Jian-fei¹, ZHAO Zhi-lan²,
ZHENG Xiong¹, ZOU Jin¹, LIU Shuang³

(1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guiyang 550025, China;

2. The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of TCM, Guiyang 550003, China;

3. Capital Medical University, Beijing 100069, China)

[收稿日期] 20210418(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81760815);贵州省科技厅项目(黔科合平台人才[2018]5605);贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔科合KY[2017]174);贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(QZYY-2015-055)

[第一作者] 陈森林,在读硕士,从事神经免疫疾病的基础与临床研究,E-mail:869062327@qq.com

[通信作者] *况时祥,主任医师,教授,博士生导师,从事神经免疫疾病的基础与临床研究,Tel:0851-85555396,E-mail:kuangshixiang2009@163.com

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Yiqi Jiedu prescription-containing serum on the proliferation of medullary thymic epithelial cells (mTEC) and regulatory T (Treg) cells in myasthenia gravis (MG) patients with thymus hyperplasia. **Method:** According to serological methods, 35 SD rats were adaptively fed for one week and randomized into the low-, medium-, and high-dose Yiqi Jiedu prescription groups, control group, and prednisone group, with seven rats in each group, which were then gavaged with the corresponding drugs for one week for preparing the drug-containing serum. The effect of Yiqi Jiedu prescription-containing serum at different concentrations on the proliferation of mTEC and Treg cells were determined by cell counting kit-8 (CCK-8) assay. Besides, the effect of mTEC and Yiqi Jiedu prescription-containing serum on Treg cell proliferation were observed through co-culture. **Result:** Thymocytes were cultured for a period of time. Their mean positive rate revealed by flow cytometry using mTEC characteristic marker Ulex europaeus agglutinin I (UEAI) was 92.54%. Treg cells were sorted by magnetic beads. The purity of Treg cells after repeated magnetic bead sorting was as high as 92%. mTEC and Treg cells showed high positive expression rates, and their cell purity met the requirements of subsequent experiments. When the concentration of Yiqi Jiedu prescription-containing serum was 2.5%-15%, it exhibited an inhibitory effect against mTEC and Treg cells. When the concentration was equal to or greater than 20%, it promoted cell proliferation, which was further enhanced with the extension of action time. The results after 48 h of culture showed that compared with the control group, prednisone and low-dose Yiqi Jiedu prescription had no significant effect on the proliferation of these two kinds of cells, but the medium- and high-dose Yiqi Jiedu prescription remarkably reduced their proliferation inhibition rate ($P<0.01$). After co-culture with mTEC, the control group was not significantly different from the prednisone group and the low-dose Yiqi Jiedu prescription-containing serum group in the proliferation of Treg cells, while the medium- and high-dose Yiqi Jiedu prescription-containing serum groups significantly lowered the proliferation inhibition rate ($P<0.01$). **Conclusion:** Yiqi Jiedu prescription-containing serum affects the proliferation of mTEC and Treg cells in MG patients with thymus hyperplasia. Compared with the solely cultured Treg cells isolated from MG patients, the Treg cells co-cultured with mTEC exhibit enhanced proliferation in MG patients, suggesting that mTEC can regulate the proliferation of Treg cells. This effect becomes more obvious after the intervention with Yiqi Jiedu prescription-containing serum, indicating that intervention effect of Yiqi Jiedu prescription on Treg cells can be produced during its treatment of mTEC, which may be one of the mechanisms of Yiqi Jiedu prescription-containing serum in alleviating MG.

[Keywords] Yiqi Jiedu prescription-containing serum; myasthenia gravis (MG); drug-containing serum; medullary thymic epithelial cells(mTEC); regulatory T (Treg) cells; proliferation

重症肌无力(MG)是一种主要由乙酰胆碱受体(AChR)抗体介导、细胞免疫依赖、补体参与,累及神经-肌肉接头突触后膜,引起传递功能障碍的获得性自身免疫性疾病^[1]。临床主要表现为肌肉的无力,包括眼肌、四肢肌、咀嚼肌、延髓肌、呼吸肌等。MG在我国的发病率约为0.68/10万,女性发病率略高,70~74岁年龄组人群发病率最高(1.89/10万)^[2]。MG病情易复发,严重者可累及呼吸肌而危及生命,住院死亡率为14.69%,主要死亡原因包括呼吸衰竭、肺部感染等^[2]。对于该疾病的治疗,目前主流治疗手段包括胸腺切除、静脉注射大剂量免疫球蛋白及糖皮质激素、血浆置换及免疫抑制剂联合应用等,虽有疗效,但无法有效防止疾病复发和进展。

近年来,中医药防治MG日益受到重视,中医学中并无“重症肌无力”的病名,根据其临床症状表现,多将其归为“痿病”范畴。益气解毒复方是贵州中医药大学第二附属医院神经内科况时祥教授自拟的经验方,前期临床观察显示,益气解毒复方治疗MG I, II型患者,愈显率及总有效率均优于甲泼尼龙对照组,调节MG患者T淋巴细胞亚群比例水平,有效预防病情复发^[3]。同时,动物实验研究表明,益气解毒复方对实验性自身免疫性重症肌无力(EAMG)大鼠血清及胸腺中趋化因子13(CXCL13),白细胞介素-21(IL-21)表达有抑制作用^[4]。这些研究揭示了益气解毒复方对MG的治疗作用及可能的机制,但其确切机制需要去进一步深入探究。本研究采

用血清药理学方法,观察益气解毒复方对胸腺增生型MG患者胸腺髓质上皮细胞(mTEC)和调节性T细胞(Treg)细胞增殖的影响,初步探讨益气解毒复方防治MG的作用机制。

1 材料

1.1 胸腺标本 采自MG患者胸腺,用于胸腺细胞原代培养。来源于贵州中医药大学第二附属医院心胸外科行胸腺切除术的MG患者,共收集到的MG胸腺切除术后胸腺组织1例,常规传代培养。MG患者胸腺摘除是目前临床治疗疾病的主要方法,胸腺标本是在开胸手术时,因治疗性切除的胸腺组织,均属医疗废弃物,取材符合医学伦理。

1.2 动物 本研究所用动物为35只SPF级6~8周龄的健康SD大鼠,雌性,体质量220~250 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司[合格证号SCXK-(京)2016-0006],用于含药血清的制备,检疫合格后送至贵州中医药大学动物实验中心。适应性喂养1周后开始实验,实验动物使用“3R”原则给予人道关怀,无菌手术在贵州中医药大学动物实验研究中心进行。本实验动物实验方法、目的、处置手段符合人类的道德伦理标准和国际惯例,实验动物福利伦理审查标准按照国家最新标准《实验动物福利伦理审查指南》执行,严格按照必要性原则、保护原则、福利原则、伦理原则、利益平衡性原则、公正性原则、合法性原则及符合国情原则进行。充分保证了从业人员和公共环境的安全。

1.3 药品与试剂 益气解毒复方(黄芪75 g,党参20 g,葛根20 g,生地黄25 g,淡附片20 g,土茯苓30 g,淫羊藿20 g,巴戟天20 g,玄参25 g等组成)由贵州中医药大学第二附属医院中药房提供(黄芪,批号210321;党参,批号210415;葛根,批号210322;生地黄,批号20210506;淡附片,批号2101015;土茯苓,批号20210301;淫羊藿,批号210506;巴戟天,批号210506;玄参,批号XG200023002),贵州中医药大学第二附属医院药学部屈相玲主任药师鉴定为正品,符合2020年版《中华人民共和国药典》标准。中药饮片交由国药集团同济堂(贵州)制药有限公司生产按比例配制,提供中药配方颗粒。

醋酸泼尼松片(浙江仙琚制药有限公司,国药准字HH33021207,5 mg/片);磷酸盐缓冲液(PBS,美国Hyclone公司,批号SH30256);青霉素-链霉素溶液(上海励瑞生物科技有限公司,批号SV30010);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(日本Dojindo Laboratories公司,批号20200720);0.25%

胰蛋白酶溶液[含乙二胺四乙酸(EDTA)](美国Boster Biological Technology公司,批号PYG0015);0.1%焦碳酸二乙酯(DEPC)水(深圳子科生物科技有限公司,批号ZK-L2007);胎牛血清(FBS,美国ExCell Biology公司,批号FSS500);荆豆凝集素I(UEAI)抗体(北京Vectorlabs公司,批号AL-1063);PE anti-mouse CD80 抗体(中国Elabscience Biotechnology公司,批号E-AB-F0992UD);CD25 MicroBeads(德国Miltenyi Biotec,批号130-092-983*1 EA);CD4抗体(北京百奥莱博科技有限公司,批号GH0583);CD25抗体(北京百奥莱博科技有限公司,批号GH0564)。

1.4 仪器 T175 Flasks型细胞培养瓶(美国赛默飞世尔科技公司);SW-CJ-2FD型超净工作台(苏州安泰空气技术公司);IX53型生物倒置显微镜(日本Olympus公司);MELX-800型酶标仪(美国Bio-Tek公司);GNP-980型二氧化碳恒温培养箱(上海精密仪器仪表公司);guava easyCyte型流式细胞仪(默克化工技术有限公司);ST16R型高速冷冻离心机(美国Thermo Sorvall公司);THZ-312型台式恒温振荡器(上海精宏实验设备有限公司);JT10001型电子天平(上海精密天平厂);Midi型MACS分选器,130-042-901型MS分选柱(德国Miltenyi Biotec公司);FACS Calibur型流式细胞仪(美国Becton-Dickinson公司)。

2 方法

2.1 mTEC培养和Treg细胞分选 mTEC培养,取贵州中医药大学第二附属医院心胸外科行胸腺切除术的MG患者胸腺,常规传代培养。将胸腺切除术后所获得的胸腺组织,立即置于PBS缓冲液、青-链霉素的离心管中,4℃条件下转移至实验室,在超菌工作台中,按组织培养法对胸腺进行处理。胸腺细胞经过一段时间的培育,通过换液和细胞传代逐步清除悬浮细胞。取生长良好的mTEC细胞加入PBS缓冲液500 μL混合均匀,1 000 r·min⁻¹,离心5 min(离心半径15 cm,下同),小心吸弃上清液,收集沉淀的细胞;加入PBS缓冲液100 μL重悬细胞,加入PE anti-mouse CD80 抗体2.5 μL,UEAI 2.5 μL,37℃避光孵育30 min;加入PBS缓冲液400 μL,利用细胞不同的寿命和贴壁时间,可获取高纯度的mTEC细胞,用流式细胞仪检测mTEC细胞表型,使用mTEC细胞特征性标记UEAI分别做3次流式检测其阳性率,最后取3次阳性表达率的均值。

Treg细胞分选, Treg细胞分选采用免疫磁珠法(MACS)分选, 取抗凝MG患者静脉血30 mL, 每管加入等量0.1% DEPC水、红细胞裂解液, 混匀; $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 离心5 min, 去上清液, 加入适量PBS缓冲液重新悬浮细胞; 重复上述步骤3次; 末次离心, 移液器吸去细胞上清液, 加入适量淋巴细胞分离液约1.5 mL, $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 离心5 min后, 小心吸取白膜层细胞, 注入新的15 mL离心管中, 加入适量PBS缓冲液约10 mL混合均匀, $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 离心3 min后, 得到人外周血单个核细胞(PBMC)并计数; 加入标记抗体CD25-PE并混匀, 避光孵育, 加入CD25 MicroBeads 10 μL 并混匀, 继续避光孵育, 上MACS分选仪; 将MS分选柱置于合适的MACS磁选器的磁场中, 缓冲液500 μL 冲洗磁柱; 将细胞悬液通过磁柱, 收集通过的细胞, 包括未标记的细胞; 取3 \times 缓冲液500 μL 冲洗磁柱, 收集未标记的细胞和上述步骤中细胞悬液; 从分离器中取出磁柱, 将其置于合适的收集管中; 移液器持吸头吸缓冲液1 mL冲洗磁柱; 用力将活塞推入磁柱内, 将带磁性标记的细胞冲洗出来; 为了提高CD4⁺CD25⁺T细胞的纯度, 洗脱的部分必须在第2个MS柱上富集。使用磁柱重复步骤上述步骤中描述的磁珠分选过程。

2.2 含药血清的制备 将SD大鼠随机平均分为空白组, 醋酸泼尼松组, 益气解毒复方低、中、高剂量组, 每组7只。空白组予以等体积药物的生理盐水, 益气解毒复方各给药组(低、中、高)分别给予12.35, 24.7, 49.4 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的益气解毒复方, 醋酸泼尼松组按人与动物体表面积折算等效比值表, 予以5.4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的醋酸泼尼松, 上述各组按各自所需药物连续灌胃给药1周, 每天2次, 末次给药后2 h腹主动脉收集血浆, 分离血清, 56 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅灭活30 min, 微孔过滤除菌, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 备用。

2.3 CCK-8法检测益气解毒复方含药血清作用时间、浓度 将mTEC, Treg细胞分别配置成密度为 6×10^4 个/mL的细胞悬液, 用不完全培养基稀释血清至所需的浓度, 益气解毒复方组, 按浓度分别设置40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 2.5%共9个剂量。每孔加入对应浓度的含药血清培养基200 μL , 并设置10%的空白组。实验组加入上述分组中相对应的浓度的含药血清, 放入37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱培养24, 48, 72 h, 向96孔板加入CCK-8溶液染色10 μL , 在培养箱继续培养2 h, 摇床10 min轻轻混匀, 450 nm测定吸光度A, 计算抑制率, 抑制率=($A_{\text{对照组}}-A_{\text{实验组}}$)/ $A_{\text{对照组}}\times 100\%$ 。

2.4 益气解毒复方含药血清对mTEC, Treg细胞增殖的影响 将mTEC, Treg细胞分别配置成密度为 6×10^4 个/mL的细胞悬液, 用不完全培养基稀释血清至所需的浓度, 益气解毒复方组按浓度分别设置高剂量组(40%), 中剂量组(30%)和低剂量组(20%)共3个组, 强的松含药血清组(10%)。每孔加入相应剂量的含药培养基200 μL , 同时设立空白组, 空白组为10%的空白血清。实验组加入上述分组中不同剂量含药血清, 放入37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱培养48 h, 向96孔板加入CCK-8溶液染色, 450 nm测定A, 并计算组别抑制率, 计算公式步骤同2.3项。

2.5 mTEC及益气解毒复方含药血清对Treg细胞增殖的影响 选取分选后的Treg细胞, 调整细胞密度为 5×10^4 个/mL, 移液器持吸头细胞接种于12孔Transwell上室中。选取生长良好的mTEC消化后计数, 调整细胞密度为 5×10^4 个/L, 移液器持吸头将细胞接种于12孔Transwell上室中。将细胞置于37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱孵育24 h, 用不完全培养基稀释血清至所需的密度, 益气解毒复方组按剂量分别设置高剂量组(40%), 中剂量组(30%)和低剂量组(20%)共3个组, 强的松含药血清组(10%)。每孔上、下室分别加入相应的含药培养基100, 600 μL , 并设立空白组, 空白组加入10%的空白血清。实验组加入上述分组中不同剂量含药血清, 放入37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱继续培养48 h后加入CCK-8溶液进行染色, 450 nm测定A, 并计算组别抑制率, 计算公式步骤同2.3项。

2.6 统计学方法 采用SPSS 19.0软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间数据比较采用单因素方差分析, 组间比较采用最小显著性差异法(LSD)检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 mTEC鉴定结果 研究结果显示, mTEC标志性蛋白UEAI呈较高阳性率表达, 说明细胞为胸腺髓上皮细胞, 细胞纯度符合后续实验的要求, 见表1。

表1 mTEC UEAI的阳性表达率

Table 1 Expression rate of UEAI in mTEC

组别	表达率/%
UEAI-1	93.29
UEAI-2	93.02
UEAI-3	91.32

3.2 Treg细胞分选结果 研究结果显示, 分选后接种于培养中的细胞, 放入37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱孵育24 h, 可见细胞呈圆形, 悬浮生长。多次磁珠分选后

的Treg细胞纯度高达92%,呈较高阳性率表达,说明细胞为Treg细胞,细胞纯度符合后续实验的要求。见图1。

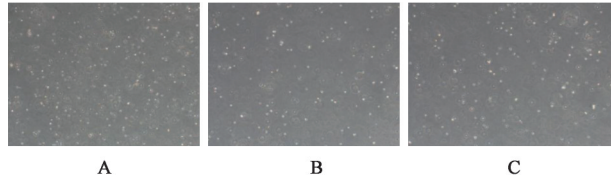


图1 分选后Treg细胞(倒置显微镜,×10)

Fig. 1 Sorted Treg cells (inverted microscope, ×10)

3.3 益气解毒复方含药血清不同作用时间、浓度对mTEC, Treg细胞增殖的影响 研究结果显示,与空白组比较,不同浓度的益气解毒复方含药血清对mTEC的增殖作用存在一定的差异,与空白组比较,2.5%~15%益气解毒复方含药血清对细胞的增

殖有抑制作用,20%及以上浓度的含药血清对细胞有促增殖作用,且不同的时间都显示出类似的分布,提示在后续的实验中,益气解毒复方含药血清必须在此浓度以上方能促进mTEC细胞的增殖。与20%益气解毒复方组比较,24 h的结果显示,35%和40%益气解毒复方组mTEC细胞增殖抑制率明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);48 h的结果显示,30%,35%,40%益气解毒复方组抑制率明显减低($P<0.05$, $P<0.01$);72 h检测的结果与48 h的结果相同。与30%益气解毒复方组比较,24 h的结果显示各组的差异均无统计学意义;48 h的结果显示20%益气解毒复方组抑制率明显升高($P<0.05$),其他各组别差异无统计学意义;72 h的结果显示20%和40%益气解毒复方组抑制率明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 益气解毒复方不同浓度、时间对mTEC细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of different drug concentration and time of Yiqi Jiedu prescription on mTEC cell proliferation ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	体积分数/%	mTEC细胞增殖抑制率/%		
		24 h	48 h	72 h
空白		0.00±1.73	0.00±3.76	0.00±1.00
益气解毒复方	2.5	12.70±3.58	16.65±1.90	21.65±2.01
	5	11.70±1.88	16.17±3.61	17.30±0.99
	10	7.37±2.91	10.08±2.91	9.65±2.19
	15	2.66±3.48	2.88±1.80	4.21±2.12
	20	-1.85±2.69	-2.65±2.30	-6.38±4.99
	25	-7.49±2.09	-9.63±2.73	-16.56±0.87 ¹⁾
	30	-11.61±16.12	-16.60±4.68 ¹⁾	-22.11±5.18 ¹⁾
	35	-15.07±8.01 ¹⁾	-19.18±7.60 ¹⁾	-25.62±7.08 ^{2,3)}
40	-20.19±13.87 ²⁾	-26.18±15.57 ^{2,3)}	-33.64±10.32 ^{2,3,4)}	

注:与20%益气解毒复方组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与25%益气解毒复方组比较³⁾ $P<0.05$;与30%益气解毒复方组比较⁴⁾ $P<0.05$;与35%益气解毒复方组比较⁵⁾ $P<0.05$ (表3同)。

与空白组比较,不同浓度的益气解毒复方含药血清对Treg细胞的增殖存在一定的差异,其中2.5%~15%的益气解毒复方含药血清对Treg细胞的增殖有抑制作用,浓度高的含药血清可促进Treg细胞的增殖。结合益气解毒复方含药血清对mTEC增殖的作用,满足后续实验的要求,含药血清的浓度必须 $\geq 20\%$ 。基于20%组比较益气解毒复方含药血清对Treg细胞的增殖作用,研究结果显示,与20%益气解毒复方组比较,所有浓度组各时间段Treg细胞增殖抑制率均明显降低($P<0.05$),40%益气解毒复方组48,72 h的Treg细胞增殖抑制率均显著降低($P<0.01$)。其余各组间不同浓度、不同时间段比较差异均无统计学意义。

3.4 mTEC及益气解毒复方干预对Treg细胞增殖的影响 研究结果显示,与空白组比较,益气解毒复方中、高剂量组mTEC增殖抑制率显著降低($P<0.01$),强的松组、益气解毒复方低剂量组差异无统计学意义。与强的松组比较,益气解毒复方中、高剂量组mTEC增殖抑制率显著降低($P<0.01$)。与益气解毒复方低剂量组比较,益气解毒复方中、高剂量组mTEC增殖抑制率显著降低($P<0.01$)。提示强的松和益气解毒复方低剂量对mTEC的增殖作用不明显,而较高剂量的益气解毒复方可促进细胞的增殖。见表4。

Treg细胞独立培养研究结果显示,与空白组比较,益气解毒复方中、高剂量组Treg细胞增殖抑

表3 益气解毒复方不同药物浓度、时间对Treg细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of different drug concentration and time of Yiqi Jiedu prescription on Treg cell proliferation ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	Treg细胞增殖抑制率/%		
		24 h	48 h	72 h
空白		0.00±0.017	0.00±0.038	0.00±0.010
益气解毒复方	2.5	12.70±0.036	16.65±0.019	21.65±0.020
	5	11.70±0.019	16.17±0.036	17.30±0.010
	10	7.37±0.029	10.08±0.029	9.65±0.022
	15	2.66±0.035	2.88±0.018	4.21±0.021
	20	-1.85±0.027	-2.65±0.023	-6.38±0.048
	25	-7.49±0.021 ²⁾	-9.63±0.027 ²⁾	-16.56±0.009 ²⁾
	30	-11.61±0.161 ²⁾	-16.65±0.047 ²⁾	-22.11±0.052 ²⁾
	35	-15.07±0.080 ²⁾	-19.18±0.076 ²⁾	-25.62±0.071 ²⁾
	40	-20.19±0.139 ¹⁾	-26.18±0.200 ²⁾	-33.64±0.103 ²⁾

表4 益气解毒复方对mTEC细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Yiqi Jiedu prescription on mTEC cell proliferation ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	mTEC细胞增殖抑制率/%
空白		0.00±3.80
强的松	10	5.03±6.32
益气解毒复方	20	-3.23±2.87
	30	-19.91±4.71 ^{1,2,3)}
	40	-26.84±11.41 ^{1,2,3)}

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与强的松组比较²⁾ $P<0.01$;与益气解毒复方低剂量组比较³⁾ $P<0.01$ 。

制率显著降低($P<0.01$),强的松组、益气解毒复方低剂量组Treg细胞增殖抑制率差异无统计学意义。与强的松组和益气解毒复方低剂量组比较,益气解毒复方中、高剂量组Treg细胞增殖抑制率显著降低($P<0.01$)。与益气解毒复方中剂量比较,高剂量组Treg细胞增殖抑制率显著降低($P<0.01$)。

mTEC与Treg细胞共同培养研究结果显示,不同的培养方式对Treg细胞的增殖的影响存在一定的差异,mTEC与Treg细胞共同培养时,与空白组比较,强的松组、益气解毒复方低剂量组Treg细胞增殖抑制率差异无统计学意义,益气解毒复方中、高剂量组Treg细胞增殖抑制率显著降低($P<0.01$)。与相同用药剂量的Treg独立培养组别比较,益气解毒复方中、高剂量组mTEC+Treg共同培养的Treg细胞增殖抑制率显著降低($P<0.01$),提示较高浓度益气解毒复方干预后的mTEC可促进Treg细胞的增殖。见表5。

表5 益气解毒复方对Treg细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Yiqi Jiedu prescription on Treg cell proliferation ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	Treg细胞增殖抑制率/%	
		Treg独立培养	mTEC+Treg共同培养
空白		0.00±0.01	0.00±0.40
强的松	10	-0.57±3.38	-1.53±1.08
益气解毒复方	20	1.28±4.02	1.20±2.54
	30	-18.33±4.32 ^{1,2,3)}	-24.18±2.42 ^{1,2,3,5)}
	40	-26.14±4.17 ^{1,2,3,4)}	-34.21±4.11 ^{1,2,3,4,6)}

注:与相同培养方式空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与相同培养方式强的松组比较²⁾ $P<0.01$;与相同培养方式低剂量组比较³⁾ $P<0.01$;与相同培养方式中剂量组比较⁴⁾ $P<0.01$;与Treg细胞独立培养的益气解毒复方相同体积分数组比较⁵⁾ $P<0.05$,⁶⁾ $P<0.01$ 。

4 讨论

MG是神经内科一种比较罕见的获得性自身免疫性疾病,其发病由自身反应性抗体所介导,抗体引发补体系统的激活、细胞膜攻击复合物的沉积、突触后肌肉细胞膜的损害、功能性的乙酰胆碱受体(AChR)数量减少和神经肌肉信号传导的阻断^[5],从而引起骨骼肌的波动性疲劳,但引发MG免疫反应异常的免疫学机制,至今仍在不断探索中。就目前而言,胸腺作为中枢耐受建立和T细胞发育成熟的场所,而在血清AChR抗体阳性的MG患者中,多数患者伴有胸腺结构或功能性的异常。有学者认为胸腺是MG发病的启动部位,研究发现,有约80%的MG患者伴有胸腺异常,包括胸腺增生、胸腺瘤。其中表现为胸腺瘤的MG患者约占15%,胸腺滤泡性增生约为65%^[6-7],而增生性胸腺几乎囊括了

AChR 免疫反应的所有组成部分——自身抗原、自身反应性T细胞和自身抗体产生性B细胞^[8-9], MOSER等^[10]研究发现胸腺的结构和循环淋巴细胞的数量在MG的发病过程中起着重要的作用,决定着疾病的严重程度。因此,胸腺的异常被认为与MG有着极为密切的关联。在针对MG的治疗手段中,胸腺切除术被认为是一种有效的方法,然而,尽管这种治疗在短期内能够有效缓解MG的发病,获得免疫记忆的免疫细胞通过体内的循环、播散,仍然能够在机体中持续引发相应的免疫应答^[11],这也是患者在术后不得不接受治疗,并存在愈而复发的可能性的原因,这提示扭转MG免疫紊乱可能是治疗MG的根本途径。胸腺切除术尽管是一种有效的治疗手段,但并非是最为合理的选择。继续深入了解胸腺的异常与免疫应答紊乱之间的关系,仍然是探究MG发病和治疗最有价值的议题之一,这也是本实验开展的初衷所在。

本次实验的胸腺来源,取自伴胸腺增生的MG患者,一方面与MG伴发胸腺增生的群体更多,标本获取的难度更小有关,但另一方面,正如以往的研究所示,增生性胸腺囊括了自身抗原、自身反应性T细胞、自身抗体产生性B细胞等几乎所有AChR免疫反应的组件^[8-9],在对MG发病机制认识并不完全的情况下,为了解MG免疫紊乱无疑提供了更为完整的探索基础。目前的研究表明,T细胞发育和成熟主要受两种不同的胸腺上皮细胞的影响,即胸腺皮质上皮细胞(cTEC)和mTEC^[12]。具体而言,cTEC细胞可诱导祖淋巴细胞对T细胞命运的承诺,并通过Notch配体的表达控制其随后的扩增和成熟^[13]。同时,cTEC还介导了胸腺细胞的双阳性选择,而mTEC则在T细胞随后的发育阶段起到关键的作用,包括自身反应T细胞的阴性选择和(或)胸腺来源的Treg(tTreg)细胞的产生^[14]。胸腺是Treg细胞的两大来源之一,其中,胸腺中的大部分叉头状/翼状螺旋转录因子P3(FoxP3)⁺细胞都位于胸腺髓质^[15]。BALANDINA等^[16]的研究发现MG患者胸腺细胞FoxP3⁺的表达减少与Treg细胞功能的受损相关。这些研究显示了MG胸腺的异常,可能部分地源于mTEC细胞的数量或功能缺损,从而引起Treg细胞的数量和功能表达不足有关,并因此引发MG的发病。因此,在本次实验中,课题组选择了mTEC作为了解MG患者胸腺异常的切入点,其意义在于mTEC在T细胞阴性选择和tTreg细胞产生过程中的重要作用^[14],与自身免疫性疾病之间的密

切联系。

中医学认为认为MG的发病在于脏腑亏损,脏腑功能紊乱,血气津液疏布失常,致使肌肉筋骨失养,导致肢体废痿不得用,治疗重在于补益脏腑、调理生理机能,用药以补益、升提之品为主。况时祥教授根据多年的MG诊治经验,提出本病的发生不仅在于脏腑的虚损,还在于邪毒因虚内生和胸腺的受损,其中,胸腺在本病中起着至关重要的作用。他认为胸腺为奇恒之腑,具有调节营气、卫气等诸气的生理作用和易虚、易损、易结等病理特点^[17]。MG患者脏腑虚损,虚毒内生,累及胸腺,致使胸腺结构的破坏和功能的失调,因之所产生的痰湿瘀毒,又进一步损伤脏腑、肌肉。因此,提出从胸腺论治MG的学术主张,即在补益脏腑的基础上,结合解毒、散结、愈损为主要治疗原则,以实现扶正祛邪、缓解甚至治愈胸腺病变,从而达到对本病治疗之目的。血清药理学是指给动物灌服一定时间的中药或中药复方,然后采集动物血液,分离血清,将含药血清代替中药复方或粗提物进行体外药理实验研究的一种半体内实验方法。用血清药理学方法进行体外实验,比传统方法更符合中药在体内代谢的实际情况,从而为中药药理学实验提供了新思路和新方法,能够更准确、更科学地阐明中药复方的药效及作用机制^[18]。本研究以中医理论为基础,采用益气温阳,解毒除湿,兼活血散结为大法,确立了经黄芪、党参、紫河车、地黄、淡附片、土茯苓、淫羊藿、巴戟天、玄参等中药为主的益气解毒复方。本研究通过血清药理学实验研究表明,益气解毒复方明显的影响胸腺增生型MG患者mTEC和Treg细胞增殖,且对这种增殖的影响作用呈现出时间、浓度依赖性,其治疗MG的作用机制有进一步研究的意义。

综上,通过本实验,观察益气解毒复方含药血清对mTEC和Treg细胞的增殖和功能表达的干预,并通过共同培养了解mTEC对Treg细胞的影响,初步发现益气解毒复方对mTEC和Treg细胞的增殖有直接的干预作用。这种在共同培养的Treg细胞中表现增强,提示mTEC能促进Treg细胞的增殖并增强其免疫抑制功能。结合课题组前期的研究成果,发现益气解毒复方能够有效缓解MG病情,得益于药物对胸腺的治疗作用,促进MG患者Treg细胞的免疫抑制功能的恢复,从而实现对患者免疫功能的调节。今后将进一步加强其机制研究,以期为临床应用益气解毒复方治疗MG提供更有力的理论依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 中华医学会神经病学分会神经免疫学组,中国免疫学会神经免疫学分会. 中国重症肌无力诊断和治疗指南2020[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2021,1(28):1-12.
- [2] CHEN J, TIAN D C, ZHANG C, et al. Incidence, mortality, and economic burden of myasthenia gravis in China: a nationwide population-based study [J]. *Lancet Reg Health West Pac*, 2020, doi: 10.1016/j.lanwpc.2020.100063.
- [3] 李艳,况时祥,何前松,等. 扶阳解毒丸对I、II型重症肌无力患者免疫功能的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2016,43(7):1395-1398.
- [4] 邓锴,况时祥,何前松. 益气解毒复方对实验性自身免疫性重症肌无力大鼠CXCL13、IL-21的影响[J]. 辽宁中医杂志,2018,45(7):1546-1549.
- [5] GILHUS N E, TZARTOS S, EVOLI A, et al. Myasthenia gravis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1):30.
- [6] CHEN P, WANG Y P, MOU D L, et al. Pathological findings in myasthenia gravis patients with thymic hyperplasia and thymoma [J]. *Pathol Oncol Res*, 2018,24(1):67-74.
- [7] MARX A , PFISTER F, SCHALKE B, et al. The different roles of the thymus in the pathogenesis of the various myasthenia gravis subtypes [J]. *Autoimmun Rev*,2013,12(9):875-884.
- [8] GRADOLATTO A, NAZZAL D , TRUFFAULT F, et al. Both Treg cells and Tconv cells are defective in the myasthenia gravis thymus: roles of IL-17 and TNF- α [J]. *J Autoimmun*,2014,52:53-63.
- [9] BERRIH-AKNIN S,PANSE R L. Myasthenia gravis: a comprehensive review of immune dysregulation and etiological mechanisms [J]. *J Autoimmun*, 2014, 52: 90-100.
- [10] MOSER B, BEKOS C, ZIMPRICH F, et al. The receptor for advanced glycation end products and its ligands in patients with myasthenia gravis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 420 (1) : 96-101.
- [11] HAGMANN M. Memory T cells don't need practice [J]. *Science*,1999,286:1267-1268.
- [12] RODEWALD H R. Thymus organogenesis [J]. *Annu Rev Immunol*,2008,26(1):355-388.
- [13] ANDERSON G, TAKAHAMA Y. Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection [J]. *Trends Immunol*,2012,33(6): 256-263.
- [14] SWEE L K, ROLINK A, KLEIN L, et al. Selection of FoxP3⁺ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire⁺ medullary thymic epithelial cells [J]. *Nat Immunol*,2007,8(4):351-358.
- [15] FONTENOT J D, DOOLEY J L, FARR A G, et al. Developmental regulation of FoxP3 expression during ontogeny [J]. *J Exp Med*,2005,202(7):901-906.
- [16] BALANDINA A, LÉCART S, DARTEVELLE P, et al. Functional defect of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis [J]. *Blood*,2005,105(2):735-741.
- [17] 况时祥,何前松,况耀黎. 从胸腺论治重症肌无力 [J]. 贵阳中医学院学报,2017,39(5):1-4.
- [18] 国锦,高燕,赵渤年. 中药复方血清药理学研究方法进展 [J]. 中华中医药杂志,2017,32(4):1656-1658.

[责任编辑 王鑫]