

# 基于Th17/Treg细胞平衡探讨抗纤益心方对自身免疫损伤小鼠免疫调节的作用机制

李巧稚<sup>1</sup>, 刘媛淑<sup>1</sup>, 王振涛<sup>2\*</sup>, 吴鸿<sup>1</sup>, 刘舜禹<sup>3</sup>

(1. 河南中医药大学, 郑州 450046; 2. 新密市中医院, 河南新密 452370;

3. 河南省中医院, 郑州 450002)

**[摘要]** 目的:探讨抗纤益心方干预自身免疫损伤小鼠免疫调节的作用机制,及其与辅助性T细胞17(Th17)/调节性T细胞(Treg)细胞平衡的关系。方法:将60只SPF级BALB/c健康8周龄雄性小鼠按1:5的比例随机分为正常组和造模组,在第0,7,28天于造模组小鼠腹股沟、腋下、背部多处皮下注射猪心肌肌球蛋白乳化液0.2 mL(含猪心肌肌球蛋白0.1 mg)以制备心肌免疫损伤小鼠模型。将造模成功的小鼠随机分为模型组,抗纤益心方组(KYP),缬沙坦组(Valsartan),抗纤益心方组给予抗纤益心方20.4 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃,缬沙坦组给予缬沙坦12 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃,正常组和模型组给予同计算量的生理盐水灌胃,连续灌胃4周后取材,苏木素-伊红(HE)染色、马松(Masson)染色检测心肌组织中病理损伤情况,酶联免疫吸附法检测小鼠血清中B型钠尿肽(BNP),抗心肌抗体,白细胞介素-17(IL-17)和白细胞介素-10(IL-10)的表达,流式细胞术检测脾脏Th17, Treg细胞的表达水平,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠心肌组织B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax), Bcl-2蛋白表达,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测小鼠脾脏转录因子维A酸相关孤独受体 $\gamma$ t(ROR $\gamma$ t),叉头框蛋白P3(FoxP3)mRNA表达。结果:与正常组比较,模型组小鼠心肌病理损伤增加,血清BNP,抗心肌抗体,IL-17升高,IL-10降低( $P<0.05$ ),脾脏Th17细胞表达水平升高, Treg细胞的表达水平降低( $P<0.05$ ),心肌组织Bax蛋白表达升高, Bcl-2蛋白表达降低( $P<0.05$ ), Bax/Bcl-2值升高,脾脏ROR $\gamma$ t mRNA表达升高, FoxP3 mRNA表达降低, ROR $\gamma$ t/FoxP3升高( $P<0.05$ );与模型组比较,抗纤益心方组及缬沙坦组心肌病理损伤减轻,血清BNP,抗心肌抗体,IL-17降低,IL-10升高( $P<0.05$ ),脾脏Th17细胞表达水平降低, Treg细胞的表达水平升高( $P<0.05$ ),心肌组织Bax蛋白表达降低, Bcl-2蛋白表达升高( $P<0.05$ ), Bax/Bcl-2降低,脾脏ROR $\gamma$ t mRNA表达降低, FoxP3 mRNA表达升高, ROR $\gamma$ t/FoxP3值降低( $P<0.05$ )。结论:抗纤益心方可能通过调节Th17/Treg细胞平衡改善心肌免疫损伤。

**[关键词]** 抗纤益心方; 心肌损伤; 自身免疫; 辅助性T细胞17(Th17)/调节性T细胞(Treg)细胞

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5; R289; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)04-0026-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220206

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211125.1005.001.html>

**[网络出版日期]** 2021-11-25 19:35

## Immunomodulatory Mechanism of Kangxian Yixin Prescriptions on Autoimmune Injury Mice Based on Th17/Treg Cell Balance

LI Qiao-zhi<sup>1</sup>, LIU Yuan-shu<sup>1</sup>, WANG Zhen-tao<sup>2\*</sup>, WU Hong<sup>1</sup>, LIU Shun-yu<sup>3</sup>

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;

2. Xinmi Hospital of Traditional Chinese Medicine (TCM), Xinmi 452370, China;

3. Henan Province Hospital of TCM, Zhengzhou 450002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the immunomodulatory mechanism of Kangxian Yixin prescription (KYP) on autoimmune injury mice and its relationship with the T helper 17 (Th17)/regulatory T

**[收稿日期]** 20210925(001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81573920);河南省中医药科学研究重大专项(2018ZYD11)

**[第一作者]** 李巧稚,在读博士,从事中医药防治心血管疾病研究, E-mail: 15136413038@139.com

**[通信作者]** \*王振涛,博士,主任医师,从事中医药防治心血管疾病研究, Tel: 0371-60908742, E-mail: 13803817796@139.com

cell (Treg) balance. **Method:** Sixty healthy 8-week-old male BALBc mice were randomly divided into a normal group and an experimental group at a ratio of 1:5. On the 0<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup>, and 28<sup>th</sup> days, 0.2 mL of porcine cardiac myosin emulsion (containing 0.1 mg of porcine cardiac myosin) was subcutaneously injected into the groin, armpit, and back of the mice in the experimental group to induce an animal model of myocardial immune injury. Mice with myocardial immune injury were randomly divided into a model group (Model), a KYP group (20.4 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, ig), and a valsartan group (12 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, ig). Mice in the control group and the model group received the same amount of normal saline by gavage. After four weeks of intervention, the heart tissues were collected. Hematoxylin-eosin (HE) staining and Masson staining were used to detect pathological damage in heart tissues. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the expression of type B-type natriuretic peptide (BNP), anti-cardiac antibody, interleukin-17 (IL-17), and interleukin-10 (IL-10) in the serum of mice, and the expression levels of Th17 cells and Tregs in the spleen were detected by flow cytometry. The protein expression of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2-associated X (Bax) in heart tissues was detected by Western blot, and the mRNA expression of retinoid-related orphan receptor gamma t (RORγt) and forkhead box P3 (FoxP3) in the spleen was detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** Compared with the control group, the model group showed worsened pathological damage in heart tissues, elevated serum levels of BNP, anti-myocardial antibody, and IL-17, decreased serum expression of IL-10 ( $P<0.05$ ), increased expression of Th17 cells and reduced expression of Tregs in spleen tissues ( $P<0.05$ ), increased protein expression of Bax, diminished Bcl-2 protein expression, elevated Bax/Bcl-2 ratio, up-regulated mRNA expression of RORγt, dwindled mRNA expression of FoxP3, and elevated ratio of RORγt/FoxP3 ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, the KYP group and the valsartan group displayed relieved pathological damage in heart tissues, decreased serum expression of BNP, anti-myocardial antibody, and IL-17, increased serum expression of IL-10 ( $P<0.05$ ), reduced expression of Th17 cells and increased Tregs in spleen tissues ( $P<0.05$ ), dwindled protein expression of Bax and elevated protein expression of Bcl-2 in heart tissues ( $P<0.05$ ), diminished Bax/Bcl-2 ratio, reduced mRNA expression of RORγt, up-regulated FoxP3, and down-regulated ratio of RORγt/FoxP3 ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** KYP may improve myocardial immune damage by regulating the Th17/Treg cell balance.

**[Keywords]** Kangxian Yixin prescription; myocardial injury; autoimmunity; T helper 17 (Th17)/regulatory T cell (Treg) cells

自身免疫异常参与多种心血管疾病的发生与发展<sup>[1]</sup>。多种因素可致心肌细胞损伤,引起心脏自身抗原的暴露和表位扩散,致多种免疫细胞的募集与激活,抗心肌抗体的产生及炎症级联反应,进而导致心脏结构与功能的改变,乃至造成扩张型心肌病(DCM)的发生<sup>[2]</sup>。研究表明,辅助性T细胞17(Th17)和调节性T细胞(Treg)细胞是免疫反应的重要参与者<sup>[3]</sup>,多种自身免疫相关疾病与Th17/Treg细胞失衡相关,这为疾病研究提供了新的思路及靶点<sup>[4]</sup>。

抗纤益心方是王振涛教授治疗DCM的自拟方,由黄芪、红参、白术、麦冬、丹参、益母草、升麻、泽兰、茯苓9味药物组成。现代药理研究发现,红参、黄芪、茯苓、白术等中药可通过多种靶点和途径调节免疫以增强机体免疫功能<sup>[5-7]</sup>。前期研究发现,

抗纤益心方具有改善心功能、抑制心肌损伤的作用<sup>[8-11]</sup>,但具体机制有待进一步研究。本课题使用猪心肌凝蛋白干预建立的心肌免疫损伤小鼠模型为研究对象,综合运用分子生物学相关技术,探讨抗纤益心方对Th17/Treg细胞及细胞因子的调控作用及对心肌损伤的保护作用,进一步明确抗纤益心方改善心肌免疫损伤的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级BALBc健康8周龄雄性小鼠60只,体质量(22.5±12.5)g,购于济南朋悦实验动物繁育有限公司,合格证号SCXK(鲁)2019-0003。小鼠均饲养于河南省中医院中心实验室实验动物中心,所有实验动物饲养及其他实验操作均符合相关管理要求准则及实验动物伦理学要求。饲养条件为SPF级动物实验室,室温20~24℃,湿度45%~60%,

设置12 h/12 h明暗交替光源,1周后开始实验,动物实验符合河南中医药大学动物伦理批准(批准文号P2-HNSZY-2019-047)。

**1.2 药物** 抗纤益心配方颗粒(红参12 g,黄芪30 g,丹参15 g,泽兰15 g,益母草15 g,茯苓15 g,白术15 g,升麻9 g,麦冬12 g)每剂颗粒剂17.2 g,每1 g颗粒相当于生药8 g。配制时取10剂溶于300 mL生理盐水中充分搅拌均匀,微波炉煮沸2次使药物完全溶解即为中药原液,质量浓度为 $0.57\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,保存于4℃备用,每次使用前充分震荡混匀,每3 d重新配制1次。颗粒剂购自河南省中医院中药房,由四川新绿药业科技发展有限公司生产,批号0115139366,药物质量保证采用GMP认证(证书编号SC20150037)。缬沙坦分散片(鲁南贝特制药有限公司,批号36200603)。

**1.3 试剂** 猪心肌肌凝蛋白,弗式完全佐剂(美国Sigma公司,批号分别为M0531, F5881);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒,马松(Masson)染色试剂盒,小鼠脾脏淋巴细胞分离液,磷酸盐缓冲液(PBS)(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为G1120, G1340, P8860, 2038149);1640培养基(以色列BI公司,批号01-100-1ACS);离子霉素、莫能霉素、佛波酯(杭州联科生物科技有限公司,批号分别为CS001, CS004, CS003);FITC标记的CD4抗体,APC标记的CD25抗体,PE标记的白细胞介素-17A(IL-17A)抗体,PE标记的叉头框蛋白P3(FoxP3)抗体(美国eBioscience公司,批号分别为11-0041-82, 17-0251-81, 12-7177-81, 12-5773-80);B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2), Bcl-2相关X蛋白(Bax),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为26593-1-AP, 50599-2-2g, 60004-1-2g);辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠二抗(武汉塞维尔生物科技有限公司,批号GB23204);小鼠IL-10, IL-17酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(江苏酶免生物有限公司,批号分别为MM-0176M1, MM-0170M1)。

**1.4 仪器** T18型高速分散机(德国IKA有限公司);3-18K型超高速离心机(美国Sigma公司);Counstar细胞计数仪(上海泽煜有限公司);DHP-781型恒温培养箱,51119000 FC型酶标仪(美国Thermo Scientific公司);FACS-JAZZ型流式细胞仪(美国BD公司);ZHWHY-200H型恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司);OD-2000<sup>+</sup>型微量核酸蛋白测定仪(中国One Drop公司);

RPN03055型基因扩增仪,PowerPac™ HV Power Supply型电泳系统及小型蛋白垂直电泳槽,Universal Hood II型化学发光凝胶成像仪及成像系统,185-2148型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Bio-Rad公司)。

## 2 方法

**2.1 模型制备及分组** 采用随机数字表法将BALBc小鼠分为正常组10只、造模组50只。按照参考文献[8]方法,将质量浓度为 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的猪心肌肌球蛋白用PBS稀释成 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,分别取等体积的 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 猪心肌肌球蛋白溶液和弗式完全佐剂(含有结合分枝杆菌, $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )于离心管中,使用高速分散机使其完全乳化(滴入冰水中立即散开为不完全乳化,不散开为完全乳化),使其最终质量浓度为 $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在第0, 7, 28天于造模组小鼠腹股沟、腋下、背部多处皮下注射乳化液0.2 mL(含猪心肌肌球蛋白0.1 mg)。造模6周后行心脏超声心动图测量左室收缩末期内径(LVESD),左室舒张末期内径(LVEDD),左室射血分数(LVEF),造模成功标准<sup>[12]</sup>为与正常组大鼠比较LVESD及LVEDD显著增加,LVEF显著降低( $P<0.05$ ),并伴有左室壁运动弥漫性减弱。造模期间各组小鼠均无死亡,超声心动图检测前常规麻醉时正常组小鼠死亡1只。造模组小鼠共造模成功36只,超声心动图结果见表1,与正常组比较,造模组LVEDD, LVESD增大( $P<0.05$ ), LVEF降低( $P<0.05$ )。

表1 心肌肌球蛋白对BALBc小鼠LVEDD, LVESD, LVEF的影响( $\bar{x}\pm s$ )

Table 1 Effect of cardiac myosin on LVEDD, LVESD and LVEF in BALBc mice ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	剂量/mg	LVEDD/mm	LVESD/mm	LVEF/%
正常	9		2.93±0.15	1.38±0.15	89.25±3.77
造模	36	0.1	3.11±0.24 <sup>1)</sup>	1.95±0.19 <sup>1)</sup>	75.10±5.15 <sup>1)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ 。

将造模成功小鼠按照随机数字表法分为模型组,抗纤益心方组,缬沙坦组,每组12只。根据《药理实验方法学》提供的计算方法,小鼠的用药剂量为人体等效量的9倍计算。将中药配方颗粒溶于适量生理盐水,并根据前期研究,抗纤益心方组给予抗纤益心方 $20.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃<sup>[13]</sup>,缬沙坦组给予缬沙坦 $12\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃。正常组和模型组给予同计算量的生理盐水灌胃,连续灌胃4周后取材。

**2.2 HE染色及Masson染色观察心肌组织兵力变化** 取部分小鼠心肌组织固定于4%多聚甲醛溶液

中48 h,常规进行脱水、包埋、切片、脱洗及HE染色和Masson染色、封片过夜,分别取5个视野用显微镜观察拍照。

**2.3 ELISA检测血清IL-17,IL-10含量** 严格按照试剂盒要求操作,对各检测样本匀浆,4℃条件下3 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min(离心半径6 cm,下同)后取上清液进行检测。在各检测孔中加入标准品或样品100 μL,震荡、孵育后,弃去孔内液体,加入生物素化抗体工作液100 μL,孵育、洗涤,加入酶结合物工作液100 μL,孵育、洗涤,再加入底物溶液90 μL,孵育,最后加入50 μL的终止液,立即在450 nm波长处测量吸光度A。

**2.4 流式细胞术检测脾脏Th17/Treg细胞表达** 无菌条件下摘取脾脏,制备细胞悬液。分离淋巴细胞,加入10%胎牛血清的1640培养基将细胞重悬备用。调整细胞浓度使每孔细胞密度为1×10<sup>6</sup>个/mL,依次分别加入PBS重悬细胞,FITC标记的CD4抗体孵育,Fixation/Permeabilization工作液固定破膜,PE标记的IL-17抗体或FoxP3抗体染色,Flow Cytometry Staining Buffer重悬细胞以上机检测。

**2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测心肌组织Bcl-2和Bax蛋白表达** 按照RIPA-PMSF 100:1的比例配置蛋白样品裂解液,取部分小鼠心肌组织进行裂解,将混悬液置于冰上裂解1 h,低温高速离心机预冷至4℃,12 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min,取上清,依据BCA试剂盒说明书配置BCA工作液,制作蛋白标准曲线并进行定量曲线拟合,进行蛋白定量,加入相应剂量的5×Loading buffer及裂解液,振荡离心,100℃金属浴煮沸蛋白使其变性,上样,于10% SDS-PAGE电泳液200 V,20 min后转100 V,1 h电泳分离蛋白样品,240 mA转膜2 h,5%脱脂奶粉封闭1 h,放入相应的一抗稀释液孵育置于摇床上4℃过夜,具体稀释比例如下,Bax,Bcl-2抗体(1:2 000),GAPDH抗体(1:4 000)。将膜在TBST中洗涤5次,每次5 min。后将膜置于特异性的鼠二抗(1:4 000)中,室温下在摇床孵育1.5 h。随后将膜在TBST中洗涤5次,每次5 min。按照ECL超敏发光液A-B 1:1的比例配置显影液,按照分子量大小设定曝光时间及曝光次数,使用凝胶图像系统检测分析各蛋白条带灰度值,各组以GAPDH为内参,计算各组蛋白条带的灰度值比值,各蛋白比值以正常组为基准统计分析。

**2.6 Real-time PCR检测心肌组织FoxP3,转录因子维A酸相关孤独受体γt(RORγt) mRNA表达** 取

部分小鼠心肌组织置于Buffer Rlysis-AG中匀浆裂解,根据试剂盒提取总RNA,运用超微量核酸蛋白测定仪检测RNA纯度(吸光度A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>比值在1.8~2.1为细胞RNA纯度较高)并定量,根据反转录试剂盒进行去除DNA反应,运用DNA Engine Peltier Thermal Cycler进行反转录反应,设定条件为37℃,15 min,85℃,5 s,4℃冷却后取出为合成的cDNA,设置预变性温度95℃,30 s,PCR反应95℃,5 s,60℃,34 s,50个循环,以cDNA为模板,扩增目的基因。观察PCR产物的溶解曲线是否符合标准。引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,采用2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法得出各组mRNA表达水平。引物序列见表2。

表2 引物序列

Table 2 Primer sequence

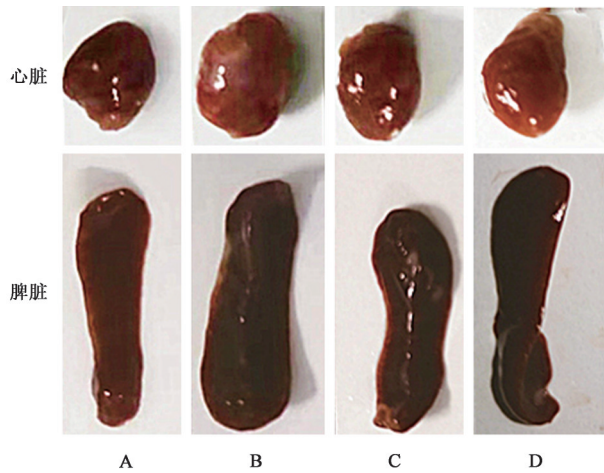
引物	序列(5'-3')	长度/bp
FoxP3	上游 CTTAGAGAAGACAGACCCATGCTG	225
	下游 AGCCCCCTGGTCCCTAGAAGT	
RORγt	上游 CTATGATGCGAGCCAACT	150
	下游 CGGTAGGTCTTCACACTG	
GAPDH	上游 TGACCTCAACTACATGGTCTACA	256
	下游 CTTCCATTCTCGGCCTTG	

**2.7 统计学分析** 采用SPSS 21.0对数据进行分析,采用GraphPad Prism 6.0软件进行统计作图,所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,服从正态分布的计量资料两个样本均数间比较采用独立样本t检验,多样本均数间比较采用One-way ANOVA检验,组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD)检验与SNK检验;不符合正态分布则采用非参数检验,组间比较采用Mann-Whitney U秩和检验,组内比较采用Wilcoxon秩和检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对各组小鼠心脏、脾脏形态的影响** 与正常组比较,模型组小鼠心脏表面欠光滑,出现白色点状病变,脾脏体积明显增大。与模型组比较,抗纤益心方组、缬沙坦组小鼠心脏表面光滑,白色点状病变减少,脾脏明显变小。见图1。

**3.2 对各组小鼠心肌组织病理变化的影响** 与正常组比较,模型组小鼠心肌细胞明显肿大、变性坏死,心肌间质炎性细胞浸润明显,胶原蛋白增多沉积,心肌纤维化明显。抗纤益心方组及缬沙坦组小鼠心肌细胞水肿及变性坏死明显减轻,心肌间质炎



A. 正常组; B. 模型组; C. 抗纤益心方组; D. 缬沙坦组

图1 抗纤益心方对各组小鼠心脏及脾脏的影响

Fig. 1 Effect of Kangxian Yixin prescription on heart and spleen of mice in each group

性细胞浸润减少, 间质胶原蛋白减少。见图2及表3。

表3 抗纤益心方对各组小鼠心肌组织胶原容积分数的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 3 Effect of Kangxian Yixin prescription on collagen volume fraction in myocardial tissue of mice in each group ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	胶原容积分数/%
正常		1.64±0.11
模型		30.39±0.61 <sup>1)</sup>
抗纤益心方	20.4	3.93±0.08 <sup>2)</sup>
缬沙坦	0.012	3.45±0.21 <sup>2)</sup>

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>P<0.05; 与模型组比较<sup>2)</sup>P<0.05(表4~8同)。

3.3 对各组小鼠血清B型钠尿肽(BNP), 抗心肌抗体表达的影响 与正常组比较, 模型组小鼠血清

BNP, 抗心肌抗体表达量明显升高(P<0.05); 与模型组比较, 抗纤益心方组及缬沙坦组小鼠血清抗心肌抗体, BNP表达量明显降低(P<0.05)。见表4。

表4 抗纤益心方对各组小鼠血清BNP, 抗心肌抗体的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 4 Effect of Kangxian Yixin prescription on serum BNP and anti-myocardial antibody of mice in each group ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	BNP/ng·L <sup>-1</sup>	抗心肌抗体/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
正常		352.08±14.63	6.68±0.17
模型		462.73±12.86 <sup>1)</sup>	9.47±0.38 <sup>1)</sup>
抗纤益心方	20.4	385.77±19.90 <sup>2)</sup>	8.14±0.25 <sup>2)</sup>
缬沙坦	0.012	389.45±15.88 <sup>2)</sup>	8.41±0.24 <sup>2)</sup>

3.4 对各组小鼠血清IL-17, IL-10表达的影响 与正常组比较, 模型组小鼠血清IL-17表达明显升高, IL-10表达明显降低(P<0.05); 与模型组比较, 抗纤益心方组及缬沙坦组小鼠血清IL-17明显降低, IL-10表达水平明显升高(P<0.05)。见表5。

表5 抗纤益心方对各组小鼠血清IL-17, IL-10表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 5 Effect of Kangxian Yixin prescription on expression of IL-17 and IL-10 in serum of mice in each group ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IL-17	IL-10
正常		40.18±2.64	113.93±2.86
模型		62.77±5.51 <sup>1)</sup>	73.53±3.55 <sup>1)</sup>
抗纤益心方	20.4	42.50±3.63 <sup>2)</sup>	111.54±5.64 <sup>2)</sup>
缬沙坦	0.012	43.48±2.37 <sup>2)</sup>	99.96±3.48 <sup>2)</sup>

3.5 对各组小鼠脾脏Th17/Treg细胞表达的影响 与正常组比较, 模型组小鼠脾脏中Th17细胞表达

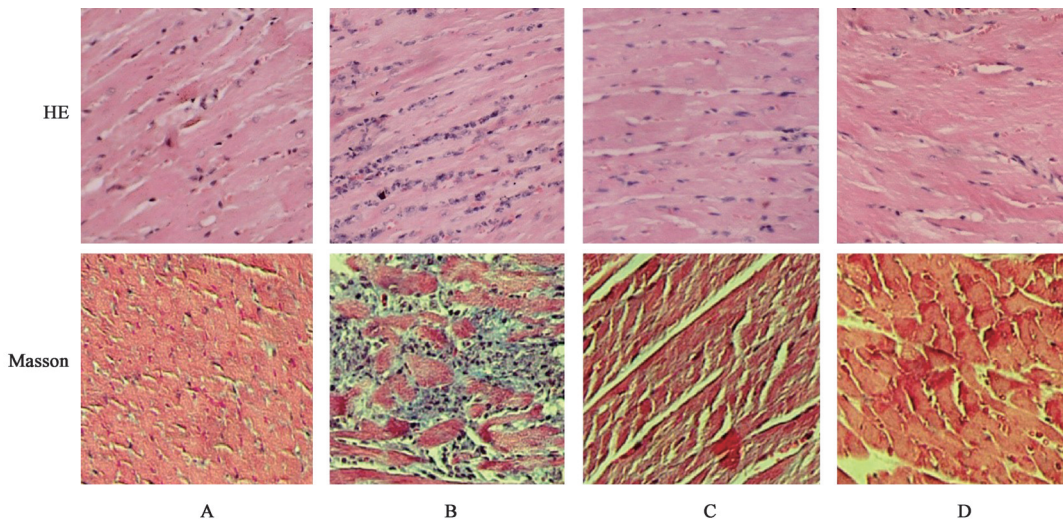


图2 抗纤益心方对各组小鼠心肌组织病理形态的影响( $\times 200$ )

Fig. 2 Effect of Kangxian Yixin prescription on myocardial pathological morphology of mice in each group( $\times 200$ )

量明显升高, Treg 细胞表达量明显降低, Th17/Treg 明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 抗纤益心方组及缙沙坦组小鼠脾脏 Th17 细胞表达量明显降低, Treg 细胞表达量明显升高, Th17/Treg 明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表 6。

表 6 抗纤益心方对各组小鼠 Th17, Treg 细胞表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 6 Effect of Kangxian Yixin prescription on expression of Th17 and Treg cells of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Th17/%	Treg/%	Th17/Treg
正常		0.68±0.09	8.77±0.49	0.08±0.01
模型		2.47±0.23 <sup>1)</sup>	4.53±0.12 <sup>1)</sup>	0.54±0.04 <sup>1)</sup>
抗纤益心方	20.4	1.05±0.10 <sup>2)</sup>	8.39±0.34 <sup>2)</sup>	0.12±0.01 <sup>2)</sup>
缙沙坦	0.012	1.58±0.42 <sup>2)</sup>	7.10±1.26 <sup>2)</sup>	0.25±0.06 <sup>2)</sup>

### 3.6 对各组小鼠心肌组织 Bax/Bcl-2 表达的影响

与正常组比较, 模型组小鼠心肌组织 Bax/Bcl-2 明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 抗纤益心方组及缙沙坦组小鼠心肌组织 Bax/Bcl-2 明显降低 ( $P < 0.05$ )。见图 3, 表 7。

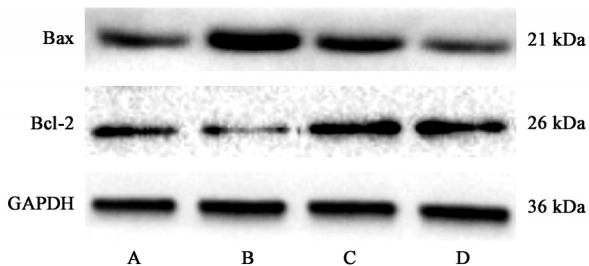


图 3 各组小鼠心肌组织 Bax, Bcl-2 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of Bax and Bcl-2 protein expression in myocardial tissue of mice in each group

表 7 抗纤益心方对各组小鼠心肌组织 Bax, Bcl-2 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 7 Effect of Kangxianyixin prescription on Bax and Bcl-2 protein expression in myocardial tissue of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Bax/GAPDH	Bcl-2/GAPDH	Bax/Bcl-2
正常		1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型		1.65±0.39 <sup>1)</sup>	0.53±0.00 <sup>1)</sup>	3.09±0.72 <sup>1)</sup>
抗纤益心方	20.4	1.07±0.36 <sup>2)</sup>	1.60±0.47 <sup>2)</sup>	0.67±0.13 <sup>2)</sup>
缙沙坦	0.012	0.84±0.10 <sup>2)</sup>	1.13±0.05 <sup>2)</sup>	0.74±0.11 <sup>2)</sup>

### 3.7 对各组小鼠脾脏 ROR $\gamma$ t, FoxP3 mRNA 表达的影响

与正常组比较, 模型组小鼠脾脏 ROR $\gamma$ t mRNA 表达升高, FoxP3 mRNA 表达降低, ROR $\gamma$ t/FoxP3 mRNA 升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 抗纤益

心方组小鼠脾脏 ROR $\gamma$ t mRNA 表达明显降低, FoxP3 mRNA 表达升高, ROR $\gamma$ t/FoxP3 mRNA 明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表 8。

表 8 抗纤益心方对各组小鼠脾脏 ROR $\gamma$ t, FoxP3 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 8 Effect of Kangxian Yixin prescription on mRNA expression of ROR $\gamma$ t and FoxP3 in spleen of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	ROR $\gamma$ t	FoxP3	ROR $\gamma$ t/FoxP3
模型		1.69±0.33 <sup>1)</sup>	0.65±0.10 <sup>1)</sup>	2.66±0.58 <sup>1)</sup>
抗纤益心方	20.4	1.07±0.18 <sup>2)</sup>	1.15±0.01 <sup>2)</sup>	0.93±0.16 <sup>2)</sup>
缙沙坦	0.012	0.22±0.19 <sup>2)</sup>	0.82±0.07 <sup>2)</sup>	0.87±0.16 <sup>2)</sup>

注: 设正常组各指标的 mRNA 相对表达量为 1。

## 4 讨论

自身免疫异常是促进心肌炎向 DCM 发展的重要原因之一<sup>[14]</sup>。研究发现原始 T 淋巴细胞是 DCM 患者心肌组织主要存在的淋巴细胞之一, 可在刺激因子作用下分化成 Th1, Th2, Th17, Treg 等细胞亚群, 参与心肌免疫损伤<sup>[15-16]</sup>。而 Th17 细胞与 Treg 细胞在功能及分化上相互拮抗, 共同维持机体免疫功能的相对稳定<sup>[16-17]</sup>。其中 Th17 细胞具有促炎作用, 可通过编码 IL-17A 的基因的表达致心肌细胞凋亡<sup>[18-19]</sup>, 亦可导致免疫细胞的募集和激活而致心肌损伤, 并参与抗心肌抗体的产生, 其分化受转录因子 ROR $\gamma$ t 的影响<sup>[20]</sup>。Treg 细胞的免疫调节作用在保护心肌自身耐受性、减轻心肌损害方面发挥着关键作用, 通过释放重要的免疫抑制细胞因子 IL-10 来维持自身耐受和宿主免疫防御, 抑制其他淋巴细胞的功能来抑制免疫反应和组织破坏, 其分化受标志性转录调控因子 FoxP3 的影响<sup>[21-23]</sup>。由于 ROR $\gamma$ t 与 FoxP3 分别是 Treg 细胞和 Th17 细胞表达的谱系决定转录因子<sup>[3]</sup>, 其转录和转录后调节均会影响 Treg/Th17 细胞的平衡, 受多种转录后修饰调节, 包括泛素化、乙酰化、磷酸化等。Treg/Th17 细胞失衡促进心肌免疫损伤的发生<sup>[24]</sup>。目前, 一些靶向 ROR $\gamma$ t, STAT3, FoxP3, 从而调控 Th17/Treg 细胞比率的靶向药物正在研究开发, 地高辛作为一种 ROR $\gamma$ t 抑制剂<sup>[25]</sup>, 研究表明可通过抑制 Th17 的分化改善自身免疫性关节炎。

抗纤益心方为治疗气虚血瘀型 DCM 的有效方, 以“益气升陷、活血化瘀”为配伍原则, 在张锡纯升陷汤的基础上化裁而来, 方中重用黄芪, 取其“直补宗气, 益气升陷”功效。脾胃为气血生化之源, 方中红参大补元气、益肺补脾, 升麻引脾胃之气上升,

与黄芪同用益气升陷之力更著,茯苓、白术健运脾胃,利水渗湿,泽兰、益母草活血化瘀利水,丹参养血补心、活血祛瘀。麦冬清心除烦、养阴润肺。全方共达益气升陷、活血利水之功,临床研究表明可明显改善患者心功能<sup>[26-28]</sup>,前期基础研究发现其可通过抑制心肌纤维化、心肌细胞凋亡、抑制内质网应激、改善心肌线粒体代谢等途径减轻心肌损伤,抑制心室重构,改善DCM大鼠心功能<sup>[29-33]</sup>,此外,现代药理学研究发现,抗纤益心方中的红参、黄芪、茯苓、白术等中药可通过多种靶点和途径调节机体免疫<sup>[5,34]</sup>。抗纤益心方中君药黄芪具有双向调节作用,一方面,黄芪多糖脂质体能够促进IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4和IL-10的分泌,从而促进T淋巴细胞增殖,启动免疫作用,同时增加血清SOD及CAT的活性,降低MDA含量,从而表现出抗氧化作用,提高黄芪多糖药效<sup>[35]</sup>。另一方面,黄芪糖蛋白抑制小鼠IL-2分泌,阻止脾脏T淋巴细胞进入S期,从而抑制了T细胞增殖,起到免疫抑制作用<sup>[36]</sup>;黄芪皂苷能够在不引起小鼠巨噬细胞毒性的前提下抑制由脂多糖诱导的炎症反应<sup>[37]</sup>;芪参益气滴丸有效改善自身免疫性心肌炎大鼠心肌纤维化<sup>[38]</sup>。人参皂苷通过上调FoxP3表达并增加TGF- $\beta_1$ , IL-10和IL-35的产生诱导Treg分化,从而抑制免疫损伤<sup>[39]</sup>。前期研究表明,抗纤益心方治疗DCM的作用机制中,君药发挥主要作用,臣药增强并补充了君药的作用<sup>[11]</sup>。基于此,抗纤益心方具有调节免疫,抑制心肌免疫损伤的作用。

本研究发现心肌免疫损伤小鼠心肌损伤与细胞凋亡共存,抗纤益心方能够降低心肌免疫损伤小鼠血清BNP,抑制心肌细胞变性坏死,同时降低Bax/Bcl-2的表达,抑制心肌细胞凋亡。给予抗纤益心方治疗后,心肌免疫损伤小鼠的心肌组织间炎性细胞浸润减少,心肌纤维化减轻,抗纤益心方可明显改善心肌免疫损伤小鼠心肌组织的病理改变,与前期研究结果一致<sup>[13,30]</sup>。此外,抗纤益心方可降低心肌免疫损伤小鼠血清中抗心肌抗体的表达,再次提示抗纤益心方具有调节免疫作用。对各组小鼠血清IL-17, IL-10等炎症因子检测发现,抗纤益心方可以降低心肌免疫损伤小鼠血清促炎因子IL-17的表达、升高抗炎因子IL-10的表达,进一步分析发现,抗纤益心方抑制心肌免疫损伤大鼠心脏组织ROR $\gamma$ t基因表达水平,升高FoxP3基因表达水平,同时促进Treg细胞表达,减少Th17细胞表达。因此认为抗纤益心方能够有效抑制心肌免疫损伤,可能

与调控炎症因子的表达,调控Th17/Treg细胞平衡,从而抑制炎症与凋亡的进展,抑制心肌免疫损伤有关,为后续进一步探讨抗纤益心方治疗自身免疫相关的扩张型心肌病的机制研究提供依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] CARRILLO-SALINAS F J, NGWENYAMA N, ANASTASIOU M, et al. Heart inflammation: immune cell roles and roads to the heart[J]. *Am J Pathol*, 2019, 189(8):1482-1494.
- [2] VERDONSCHOT J A J, MERLO M, DOMINGUEZ F, et al. Phenotypic clustering of dilated cardiomyopathy patients highlights important pathophysiological differences[J]. *Eur Heart J*, 2021, 42(2):162-174.
- [3] LEE G R. The Balance of Th17 versus Treg cells in autoimmunity[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): 730.
- [4] ZHANG W, LIU X, ZHU Y, et al. Transcriptional and posttranslational regulation of Th17/Treg balance in health and disease[J]. *Eur J Immunol*, 2021, 51(9): 2137-2150.
- [5] PARK Y J, CHO M, CHOI G, et al. A critical regulation of Th17 cell responses and autoimmune neuro-inflammation by ginsenoside Rg<sub>3</sub> [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(1):122.
- [6] YANG L, HAN X, YUAN J, et al. Early astragaloside IV administration attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by suppressing the maturation and function of dendritic cells[J]. *Life Sci*, 2020, 249:117448.
- [7] 黎胜,施梅姐,萧焕明,等. 自身免疫性肝炎中医医案诊治规律数据挖掘[J]. *中医杂志*, 2017, 58(14): 1237-1240.
- [8] 柴松波,王振涛,张淑娟,等. 抗纤益心方对扩张型心肌病大鼠内质网应激CHOP通路的影响[J]. *中药药理与临床*, 2019, 35(2):128-134.
- [9] 王振涛,董丽莎,边汝涛,等. 抗纤益心方通过调控SERCA2a蛋白抑制扩张型心肌病大鼠心肌细胞凋亡的机制研究[J]. *中药药理与临床*, 2020, 36(1): 173-177.
- [10] 郭宗耀,王振涛. 基于蛋白质组学探讨抗纤益心方治疗扩张型心肌病的作用机制[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(11):5734-5738.
- [11] 郭宗耀,王振涛. 基于网络药理学探讨黄芪治疗扩张型心肌病的机制研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2020, 40(12):1464-1470.
- [12] 邢清敏,陆曙,周永华,等. 生脉散对DCM大鼠的干

- 预作用及对TLR-4/NF- $\kappa$ B炎症信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(2): 128-134.
- [13] 刘舜禹, 李巧稚, 芮浩森, 等. 抗纤益心方对扩张型心肌病模型大鼠心肌纤维化相关因子及心肌组织 $\beta$ -catenin/PPAR $\gamma$ 信号通路的影响[J]. 中医杂志, 2021, 62(3): 259-265.
- [14] KADHI A, MOHAMMED F, NEMER G. The genetic pathways underlying immunotherapy in dilated cardiomyopathy [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 613295.
- [15] VDOVENKO D, ERIKSSON U. Regulatory role of CD4<sup>+</sup> T cells in myocarditis [J]. *J Immunol Res*, 2018, doi:10.1155/2018/4396351.
- [16] YAN L, HU F, YAN X, et al. Inhibition of microRNA-155 ameliorates experimental autoimmune myocarditis by modulating Th17/Treg immune response [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2016, 94(9): 1063-1079.
- [17] LI B, ZHOU W, TANG X, et al. Response gene to complement-32 promotes the imbalance of Treg/Th17 in patients with dilated cardiomyopathy [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(4): 1515-1525.
- [18] YASUDA K, TAKEUCHI Y, HIROTA K. The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases [J]. *Semin Immunopathol*, 2019, 41(3): 283-297.
- [19] WU B, WAN Y. Molecular control of pathogenic Th17 cells in autoimmune diseases [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 80: 106187.
- [20] CAPONE A, VOLPE E. Transcriptional regulators of T helper 17 cell differentiation in health and autoimmune diseases [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 348.
- [21] OHKURA N, SAKAGUCHI S. Transcriptional and epigenetic basis of Treg cell development and function: its genetic anomalies or variations in autoimmune diseases [J]. *Cell Res*, 2020, 30(6): 465-474.
- [22] HAN Y, LAI J, TAO J, et al. Sustaining circulating regulatory T cell subset contributes to the therapeutic effect of paroxetine on mice with diabetic cardiomyopathy [J]. *Circ J*, 2020, 84(9): 1587-1598.
- [23] SHI H, CHI H. Metabolic control of Treg cell stability, plasticity, and tissue-specific heterogeneity [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2716.
- [24] ILATOVSKAYA D V, HALADE G V, DELEON-PENNELL K Y. Adaptive immunity-driven inflammation and cardiovascular disease [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2019, 317(6): H1254-H1257.
- [25] LEE J, BAEK S, LEE J, et al. Digoxin ameliorates autoimmune arthritis via suppression of Th17 differentiation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 26(1): 103-111.
- [26] 曾垂义, 王振涛, 陈磊. 抗纤益心方治疗扩张型心肌病患者疗效观察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(23): 321-323.
- [27] 曾垂义, 王振涛, 陈磊. 抗纤益心方对扩张型心肌病患者心脏超声指标的影响 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(1): 109-111.
- [28] 王振涛, 刘舜禹, 柴松波, 等. 抗纤益心方治疗扩张型心肌病的队列研究 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31(2): 378-380.
- [29] 王振涛, 任雪萍, 吴鸿, 等. 抗纤益心方干预线粒体通透性转换孔抑制心肌细胞凋亡的机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(18): 42-48.
- [30] 王振涛, 闫京京, 吴鸿, 等. 抗纤益心方对去甲肾上腺素诱导H9c2心肌细胞凋亡及凋亡相关因子表达的影响 [J]. 中医杂志, 2019, 60(21): 1866-1869.
- [31] 常红波, 王振涛, 黑炫鼎, 等. 抗纤益心方对扩张型心肌病大鼠心肌能量代谢和解偶联蛋白2的影响 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37(3): 166-170.
- [32] 常红波, 王振涛, 刘舜禹, 等. 抗纤益心方通过AMPK/mTOR通路改善扩张型心肌病大鼠心功能的作用机制 [J]. 北京中医药大学学报, 2021, 44(1): 54-59.
- [33] 王振涛, 常红波, 郭宗耀, 等. 基于扩张型心肌病大鼠模型研究内质网应激介导细胞凋亡和相关信号转导通路的时相性变化 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(4): 1705-1708.
- [34] 岳超颖, 吴彝, 周君, 等. 红参多糖体外抗氧化的研究 [J]. 实验室科学, 2019, 22(1): 49-52, 6.
- [35] ZHANG W, ZHANG M, CHENG A, et al. Immunomodulatory and antioxidant effects of Astragalus polysaccharide liposome in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2020, 100: 126-136.
- [36] 杨向竹, 赵俊云, 薛慧清, 等. 黄芪糖蛋白对小鼠脾淋巴细胞的体外作用 [J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(23): 1811-1813.
- [37] WANG Y, REN T, ZHENG L, et al. Astragalus saponins inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in mouse macrophages [J]. *Am J Chin Med*, 2016, 44(3): 579-593.
- [38] 吕仕超, 吴美芳, 李萌, 等. 芪参益气滴丸对自身免疫性心肌炎大鼠心肌胶原代谢的影响 [C]//第九届全国免疫学学术大会论文集. [出版者不详], 2014: 722-723.
- [39] KIM J, BYEON H, IM K, et al. Effects of ginsenosides on regulatory T cell differentiation [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2018, 27(1): 227-232.

[责任编辑 周冰冰]