

陈修保,徐飞,尹曦,等. 当归多糖对再生障碍性贫血小鼠骨髓 Th17/Treg 细胞平衡及相关炎症因子蛋白表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(8): 1-9.

Chen XB, Xu F, Yin X, et al. Effect of *Angelica* polysaccharides on Th17/T-regulatory cell balance and expression of related inflammatory factor proteins in bone marrow of mice with aplastic anemia [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(8): 1-9.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.08.001

当归多糖对再生障碍性贫血小鼠骨髓 Th17/Treg 细胞平衡及相关炎症因子蛋白表达的影响

陈修保^{1,2}, 徐飞^{1,2}, 尹曦², 陈维达², 崔兴^{1,3}, 刘秀娟^{1,2*}, 陈泽涛^{1,2*}

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250014;

3. 山东中医药大学第二附属医院, 济南 250001)

【摘要】 目的 探究当归多糖 (*Angelica* polysaccharide, APS) 对再生障碍性贫血 (aplastic anemia, AA) 小鼠骨髓 Th17/Treg 细胞平衡及相关炎症因子蛋白表达的影响。方法 50 只雄性 BALB/c 小鼠随机分为正常组、模型组、环孢素 A 组、APS 低、高剂量组, 利用射线照射联合异源淋巴细胞输注的方法制备再生障碍性贫血小鼠模型。建模后灌胃给药 28 d, 观察小鼠一般情况、体重变化、脾指数, 检测外周血基本血液学参数变化, HE 染色评价小鼠骨髓组织病理变化; ELSIA 法检测骨髓 TGF- β 1、IL-10、IL-17A、IL-6 等蛋白表达水平; FCM 检测骨髓 Th17、Treg 细胞比例及 Th17/Treg 细胞平衡变化。结果 与正常组相比, 模型组小鼠活动笨拙, 精神萎靡, 眼睑唇色耳廓颜色苍白, 进食饮水量减少; 体重及脾指数均明显下降; 外周血红细胞、白细胞、血小板计数及血红蛋白浓度均明显降低; 骨髓组织结构紊乱, 造血组织增生度明显减低; IL-17A、IL-6 蛋白表达明显上调, TGF- β 1、IL-10 蛋白表达明显下调; 骨髓 Th17 细胞比例明显增高, Treg 细胞比例明显降低, Th17/Treg 细胞比值显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, APS 低、高剂量组一般状况均改善, 进食量及饮水量增加, 体重、脾指数明显升高, 外周血红细胞、白细胞、血小板计数及血红蛋白浓度明显升高 ($P < 0.05$), 骨髓组织结构改善, 造血组织增生度升高 ($P < 0.05$); IL-17A、IL-6 蛋白表达明显下调, TGF- β 1、IL-10 蛋白表达明显上调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 骨髓 Th17 细胞比例明显降低, Treg 细胞比例明显升高, Th17/Treg 细胞比值显著下降 ($P < 0.01$)。结论 当归多糖能改善 AA 小鼠骨髓造血功能, 其机制可能是通过调节 Th17/Treg 细胞平衡来实现。

【关键词】 当归多糖; Th17/Treg; 炎症因子; 再生障碍性贫血; 当归补血汤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 08-0001-09

Effect of *Angelica* polysaccharides on Th17/T-regulatory cell balance and expression of related inflammatory factor proteins in bone marrow of mice with aplastic anemia

CHEN Xiubao^{1,2}, XU Fei^{1,2}, YIN Xi², CHEN Weida², CUI Xing^{1,3}, LIU Xiujuan^{1,2*}, CHEN Zetao^{1,2*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China.

2. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014.

3. the Second Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250001)

【基金项目】 国家自然科学基金 (82305142); 山东省自然科学基金 (ZR2020MH354)。

【作者简介】 陈修保 (1987—), 男, 博士研究生, 主治医师, 研究方向: 肿瘤血液及老年病研究。E-mail: chen_xiubao@163.com

【通信作者】 陈泽涛 (1961—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 肿瘤血液及老年病研究。E-mail: zetaochen2004@163.com

刘秀娟 (1987—), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 心血管、代谢疾病研究。E-mail: juan.081@163.com * 共同通信作者

[Abstract] Objective To investigate the effect of *Angelica* polysaccharides on the balance of Th17/T-regulatory (Treg) cells and the expression of related inflammatory factor proteins in the bone marrow of mice with aplastic anemia. **Methods** 50 male BALB/c mice were randomly divided into a normal group, model group, cyclosporine A (CsA) group, and angelica polysaccharide low-(APS-L) and high-dose(APS-H) groups. A mouse model of aplastic anemia was prepared by combining irradiation with allogeneic lymphocyte infusion. After modeling, the mice were orally administered with corresponding drugs for 28 days. The general condition, weight changes, and spleen index of the mice were observed. Blood samples were taken to test for changes in basic hematological parameters of peripheral blood, and hematoxylin and eosin staining was used to evaluate the pathological changes in mouse bone marrow tissue. An ELISA method was applied to detect bone marrow TGF- β 1. The expression levels of proteins such as IL-10, IL-17A, and IL-6 were analyzed, and flow cytometry was used in detecting the bone marrow Th17/Treg cell ratio. **Results** Compared with the normal group, the model group mice showed clumsiness during activity; lethargy; pale eyelids, lips, and ears; and reduced food and water intake. Both body weight and spleen index were significantly decreased. Peripheral red blood cell, white blood cell, and platelet counts and hemoglobin concentration were significantly reduced. A disordered bone marrow tissue structure and significantly reduced proliferation of hematopoietic tissue were seen. The expression of IL-17A and IL-6 proteins was significantly upregulated, and the expression of TGF- β 1 and IL-10 protein was significantly downregulated. The proportion of Th17 cells in bone marrow significantly increased, the proportion of Treg cells significantly decreased, and the ratio of Th17/Treg cells significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the general condition of the APS-L and APS-H groups improved, showing an increase in food and water intake; a significant increase in body weight and spleen index; a significant increase in peripheral red blood cells, white blood cells, platelets, and hemoglobin concentration ($P < 0.05$); an improvement in bone marrow tissue structure; and an increase in hematopoietic tissue proliferation ($P < 0.05$). The expression of IL-17A and IL-6 proteins was significantly downregulated. The expression of TGF- β 1 and IL-10 protein was significantly upregulated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The proportion of Th17 cells in bone marrow significantly decreased, the proportion of Treg cells significantly increased, and the ratio of Th17/Treg cells significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusions** *Angelica* polysaccharides can improve bone marrow hematopoietic function in aplastic anemia mice, and its mechanism of action may include the regulation of Th17/Treg cell balance.

[Keywords] *Angelica* polysaccharide; Th17/Treg; inflammatory factors; aplastic anemia; Danggui Buxue Tang
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

再生障碍性贫血,简称再障,是一种免疫功能异常引起的常见血液系统疾病,以骨髓造血功能衰竭为主要病理特征,临床主要表现为贫血、感染、出血等一系列症状。近些年本病发病率逐年升高,给患者生活质量造成了极大的影响,严重威胁着人们的身心健康。在机体细胞免疫系统中,T淋巴细胞发挥极其重要的作用,分泌产生诸多炎症因子,而且不同种类的T细胞分泌不同类别的炎症因子,发挥不同的免疫功能,形成机体内复杂的细胞因子相互作用网络系统^[1]。研究表明,再障患者的骨髓组织中存在TGF- β 1、IL-17A、IFN- γ 、TNF- α 等多种炎症因子水平紊乱,其发病与T淋巴细胞免疫功能异常密切相关^[2]。根据作用功能的不同,T淋巴细胞可分成效应T细胞、抑制性T细胞等许多不同亚群,辅助性T淋巴细胞(Th)、调节性T淋巴细胞(Treg)是其中数量较少的一部分,其作用却不可忽视。Th17/Treg细胞平衡与机体免疫应答及炎症反应等诸多生理病理过程关系密切,在再障疾病过程

中发挥着显著的作用^[3]。

中医药治疗再障历史悠久,治疗方法众多,中医特色突出,临床疗效显著,且有少见不良反应发生、患者依从性更好、治疗费用经济等诸多优势。当归补血汤是中医补气养血的经典名方,在再障的治疗中占有重要地位,而且临床疗效确切^[4]。课题组前期的研究为当归补血汤治疗再障的提供了基础药理作用的证据支持^[5],但对于其如何发挥治疗作用及确切有效成分仍需进一步探究。当归多糖(*Angelica* polysaccharides, APS)作为当归补血汤中当归的重要活性成分,具有调节免疫功能、保护血管内皮、抗氧化、缓解炎症、抗凋亡、控制肿瘤发展、抗应激等多重药理作用。实验研究表明当归提取物^[6]可通过调节Th17/Treg平衡,提高TGF- β /IL-17比值从而改善哮喘阴虚证小鼠肺组织炎症浸润情况。系统评价研究发现当归是通过干预Th17/Treg平衡治疗免疫介导的炎症性疾病的关键药物^[7]。

本研究旨在通过免疫介导的方法建立小鼠再障模型,观察 APS 对小鼠外周血基本血液学参数、骨髓组织病理变化影响;通过 ELSIA 法检测骨髓 TGF- β 1、IL-10、IL-17A、IL-6 等蛋白表达水平;FCM 检测骨髓 Th17、Treg 细胞比例及 Th17/Treg 细胞平衡变化。探讨 APS 治疗再障的可能作用机制,为其治疗再障提供理论基础和药理学依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

8 只 SPF 级雄性 DBA/2 健康小鼠,8 周龄,体重 18~20 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0006];50 只 SPF 级雄性 BALB/c 健康小鼠,8 周龄,体重 18~22 g,购自济南朋悦实验动物繁殖有限公司[SCXK(鲁)2022-0006]。小鼠饲养于山东中医药大学附属医院动物实验中心[SYXK(鲁)2023-0031],温度控制在 20~25℃,相对湿度 45%~50%。本实验研究通过山东中医药大学附属医院动物伦理委员会伦理审查(AWE2019053),本实验全过程遵守动物实验 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

当归多糖(100 mg, HPLC \geq 95%, 货号 TDT006),购自上海融禾医药科技发展有限公司;环孢素 A 软胶囊(25 mg, 国药准字 H10960122),购自杭州中美华东制药有限公司;小鼠白介素 17A、小鼠白介素 6、小鼠转化生长因子 β 1、小鼠白介素 10 酶联免疫吸附测定试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号 E-EL-M0047c、E-EL-M0044c、E-EL-0162c、E-EL-M0046c);FITC 抗小鼠 CD4 抗体、APC 抗小鼠 CD25 抗体、PE 抗小鼠 FOXP3 抗体、PE 抗小鼠 IL-17 抗体(美国 BioLegend 公司,货号 100509、102012、126404、506904);小鼠淋巴细胞分离液试剂盒(北京 Solarbio 公司,货号 P6040);固定破膜试剂盒(美国 BD 公司,货号 554714)。

HEMAVET 950FS 动物血细胞分析仪购自北京冠远科技有限公司;CX41 光学显微镜购自日本 OLYMPUS 公司;Multiskan SkyHigh 多功能酶标仪购自美国 Thermo Fisher 公司;BD FACS VerseTM 流式细胞仪购自美国 BD 公司;F3000 荧光光谱仪购自日本 HITACHI 公司;LAT-Q9GM 小鼠尾静脉注射显像仪购自北京莱艾特科技发展有限公司;MICROMAX RF 高速低温离心机购自美国 Thermo

Fisher 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型建立及分组给药

采用⁶⁰Co- γ 射线照射联合异源 DBA/2 小鼠淋巴细胞输注的方法^[8]建立再障动物模型。①异源淋巴细胞单细胞悬液制备:DBA/2 小鼠 8 只,75%乙醇消毒,处死后摘取胸腺、颈部、腋窝等处淋巴结,收集淋巴结组织,迅速剪碎,PBS 溶液冲洗,轻轻研磨至微细,200 目细胞筛网过滤,PBS 溶液重悬,调整成浓度为 $5 \times 10^9/L$ 的淋巴细胞单细胞悬液,冷藏备用。②⁶⁰Co- γ 射线辐照:50 只雄性 BALB/c 小鼠随机分为正常组、模型组、环孢素 A 组、APS 低(100 mg/kg)、高(200 mg/kg)剂量组。各组小鼠经⁶⁰Co- γ 射线(剂量 3.5 Gy)全身一次性均匀照射;正常组采用铅砖屏蔽照射。③异源淋巴细胞输注:BALB/c 小鼠照射后,经尾静脉注射输入淋巴细胞 PBS 悬液 0.2 mL;正常组小鼠经尾静脉注射等体积 PBS 溶液。模型建立次日开始治疗干预:APS 低(100 mg/kg)、高(200 mg/kg)剂量组每天灌胃当归多糖生理盐水溶液,剂量分别为 100 mg/kg、200 mg/kg;环孢素 A 组每天灌胃环孢素 A 生理盐水溶液,剂量为 25 mg/kg;正常组、模型组每天灌胃等体积生理盐水溶液;灌胃体积均为 10 mL/kg,每天 1 次,连续 28 d。治疗结束,禁食不禁水,次日取材。

1.3.2 一般状况、脾指数

观察小鼠精神状态、活动变化,唇色、耳廓、眼睑等颜色变化,饮水进食量及死亡情况。称量小鼠体重,每 3 d 1 次;实验结束称量小鼠体重,处死小鼠后剥离脾,称重,测算脾指数(脾指数 = 脾重量/mg/(小鼠体重/g \times 10))。

1.3.3 外周血基本血液参数

小鼠采血后迅速经血细胞分析仪检测外周血红细胞、白细胞、血小板计数及血红蛋白浓度等外周血基本血液参数。

1.3.4 股骨组织病理学检测

分离小鼠股骨,4%多聚甲醛固定液固定 48 h,脱钙脱水,石蜡包埋,4 μ m 切片,HE 染色,显微镜下观察骨髓组织病理变化,计算骨髓造血组织增生度(造血组织增生度 = 造血组织面积/(造血组织面积 + 非造血组织面积) \times 100%)。

1.3.5 骨髓 TGF- β 1、IL-10、IL-17A、IL-6 蛋白表达

取小鼠骨髓置入研钵中,倒入液氮并研磨,加入 RIPA 裂解液,电动匀浆,置入超声波细胞粉碎

机,冰上超声 20 min;移入离心机,10 000 r/min,4 °C 离心,10 min。各组样本经荧光光谱仪检测蛋白浓度。按照 TGF- β 1、IL-10、IL-17A、IL-6 等 ELISA 检测试剂盒说明书检测流程,分别测定各组样本中相应蛋白表达水平。

1.3.6 骨髓 Th17、Treg 细胞比例及 Th17/Treg 细胞平衡变化

取小鼠骨髓置于 200 目细胞筛网中,轻轻研磨,PBS 缓冲液反复冲洗,分别收集冲洗液至离心管中,4 °C 离心,去上清。细胞沉淀经 PBS 缓冲液重悬,加入红细胞裂解液裂解红细胞,再次 4 °C 离心,去上清,所得细胞沉淀再经 PBS 缓冲液重悬,调整细胞浓度至 1×10^7 /mL,得到单细胞悬液。取单细胞悬液 100 μ L 置于流式管中,5% CO₂ 37 °C 细胞培养箱,培养 4 h。根据流式抗体试剂盒说明书,加入抗体,4 °C 避光,孵育 40 min,离心,固定破膜;4 °C 避光孵育,30 min;按照检测流程,再依次加入相应抗体,4 °C,避光孵育 40 min。各标本经 PBS 溶液洗涤,流式染色缓冲液重悬细胞。标本上机检测 Th17 和

Treg 细胞比例,分析 Th17/Treg 细胞平衡变化情况。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 24.0 统计软件,计量数据以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计学差异比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况、脾指数比较

正常组小鼠活动灵活,毛发亮泽;模型组小鼠动作笨拙,活动减少,精神萎靡,毛发蓬乱、缺乏光泽,眼睑、唇色、耳廓颜色苍白,进食饮水量减少。与模型组相比,环孢素 A 组、APS 低、高剂量组小鼠精神状态、毛发蓬乱及光泽度均好转,活动量增加,进食量饮水量均改善,耳廓、眼睑、唇色转红润,以 APS 高剂量组效果改善最好。实验过程中各组小鼠均无死亡。

如图 1 和表 1 所示,与正常组相比,造模后除正常组外各组小鼠体重均有不同程度的下降,模型组

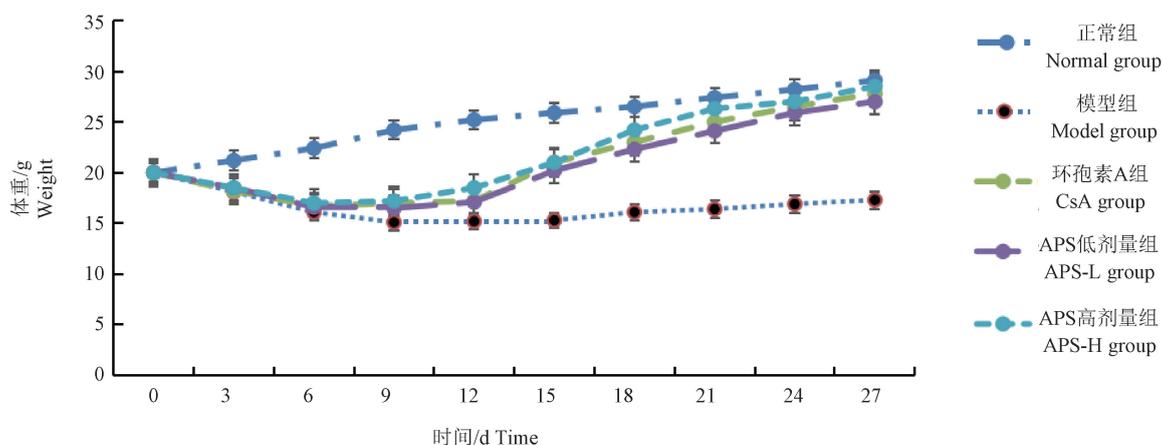


图 1 当归多糖对再障小鼠体重变化的影响($n=10$)

Figure 1 Effect of APS on weight in AA mice

表 1 当归多糖对再障小鼠体重、脾指数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of APS on weight and spleen index in AA mice

组别 Groups	体重/g Weight	脾指数/(mg/g) Spleen index
正常组 Normal group	29.12 \pm 2.51	3.80 \pm 0.46
模型组 Model group	17.23 \pm 2.03 [#]	2.14 \pm 0.31 [#]
环孢素 A 组 CsA group	27.64 \pm 2.37 [*]	3.25 \pm 0.29 [*]
APS 低剂量组 APS-L group	26.39 \pm 2.60 [*]	3.22 \pm 0.31 [*]
APS 高剂量组 APS-H group	28.68 \pm 2.52 [*]	3.65 \pm 0.36 [*]

注:与正常组相比,[#] $P < 0.05$;与模型组相比,^{*} $P < 0.05$ 。

Note. Compared with normal group, [#] $P < 0.05$. Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$.

体重下降最明显;APS 低剂量组小鼠体重数值于第 12 天开始上升,高剂量组、环孢素 A 组于第 9 天开始上升;与模型组相比,实验结束环孢素 A 组、APS 低、高剂量组小鼠体重、脾指数均有明显升高($P < 0.05$)。

2.2 各组小鼠外周血基本血液参数的比较

模型组外周血红细胞、白细胞、血小板计数及血红蛋白浓度与正常组相比,均明显降低($P < 0.05$)。与模型组相比,环孢素 A 组、APS 低、高剂量组外周血红细胞、白细胞、血小板计数及血红蛋

白浓度均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 2。

2.3 各组小鼠骨髓组织病理学的比较

正常组小鼠骨髓组织结构完整、细胞排列均

匀,未见异常变化,造血细胞数量丰富;模型组小鼠骨髓组织结构破坏、细胞排列紊乱,可见有核细胞数量明显减少,骨髓造血组织增生度明显减低 ($P < 0.05$)。与模型组相比,APS 低剂量组紊乱的造血

表 2 当归多糖对再障小鼠外周血基本血液参数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of APS on basic blood parameters of peripheral blood in AA mice

组别 Groups	红细胞/ $(\times 10^{12}/L)$ Red blood cell	白细胞/ $(\times 10^9/L)$ White blood cell	血小板/ $(\times 10^9/L)$ Platelet	血红蛋白/ (g/L) Hemoglobin
正常组 Normal group	10.03±0.84	6.31±0.54	1750±105	165.2±13.2
模型组 Model group	3.16±0.37 [#]	2.15±0.32 [#]	912±87 [#]	91.3±9.4 [#]
环孢素 A 组 CsA group	6.94±0.49 [*]	4.98±0.51 [*]	1473±101 [*]	130.6±12.0 [*]
APS 低剂量组 APS-L group	6.38±0.71 [*]	4.92±0.53 [*]	1435±99 [*]	122.5±11.9 [*]
APS 高剂量组 APS-H group	8.66±0.75 ^{**}	5.47±0.55 ^{**}	1629±112 ^{**}	138.6±12.7 [*]

注:与正常组相比, [#] $P < 0.05$;与模型组相比, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

Note. Compared with normal group, [#] $P < 0.05$. Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

组织结构可见修复,视野空白区域面积缩小,骨髓造血组织增生度较前改善;环孢素 A 组、APS 高剂量组骨髓组织结构修复明显紧密,造血细胞数量明显丰富,测算骨髓造血组织增生度明显升高 ($P < 0.05$)。见表 3,图 2。

2.4 各组小鼠骨髓 TGF-β1、IL-10、IL-17A 和 IL-6 蛋白表达水平的比较

如表 4 所示,与正常组相比,模型组小鼠骨髓中 IL-17A、IL-6 蛋白的表达明显上调, TGF-β1、IL-10 蛋白的表达明显下调 ($P < 0.05$);与模型组相比,环孢素 A 组、APS 低、高剂量组 IL-17A、IL-6 蛋白的表达明显下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), TGF-β1、IL-10 蛋

表 3 当归多糖对再障小鼠骨髓造血组织增生度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of APS on hyperplasia of bone marrow hematopoietic tissue in AA mice

组别 Groups	骨髓造血组织增生度/% Proliferation degree of medullary hematopoiesis
正常组 Normal group	90.23±6.17
模型组 Model group	41.48±5.02 [#]
环孢素 A 组 CsA group	71.70±6.49 [*]
APS 低剂量组 APS-L group	68.59±6.96 [*]
APS 高剂量组 APS-H group	77.40±7.05 [*]

注:与正常组相比, [#] $P < 0.05$;与模型组相比, ^{*} $P < 0.05$ 。

Note. Compared with normal group, [#] $P < 0.05$. Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$.

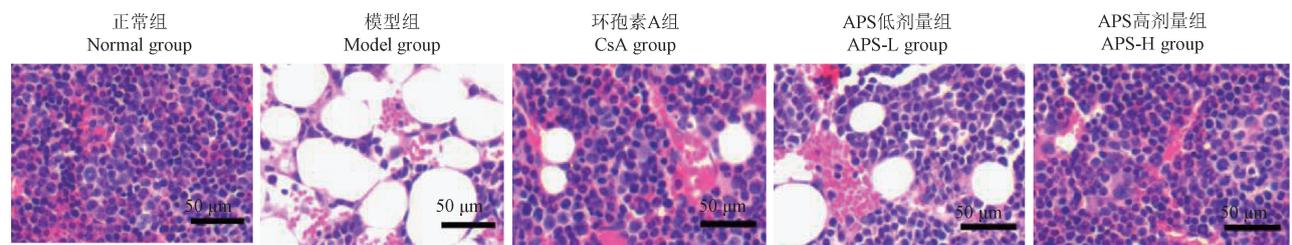


图 2 当归多糖对再障小鼠骨髓组织病理的影响

Figure 2 Effect of APS on bone marrow tissue pathology in AA mice

表 4 当归多糖对再障小鼠 TGF-β1、IL-10、IL-17A 和 IL-6 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of APS on protein expression of TGF-β1, IL-10, IL-17A and IL-6 in AA mice

组别 Groups	TGF-β1/ (pg/mL)	IL-10/ (pg/mL)	IL-17A/ (pg/mL)	IL-6/ (pg/mL)
正常组 Normal group	8.31±0.92	75.68±6.33	35.71±2.72	110.35±9.47
模型组 Model group	3.52±0.37 [#]	47.82±5.61 [#]	94.28±8.62 [#]	190.29±18.38 [#]
环孢素 A 组 CsA group	7.28±0.61 [*]	68.39±6.03 [*]	42.50±3.79 [*]	141.17±13.92 [*]
APS 低剂量组 APS-L group	7.15±0.69 [*]	70.52±6.84 [*]	46.92±4.27 [*]	136.14±12.75 [*]
APS 高剂量组 APS-H group	7.84±0.75 ^{**}	76.37±6.69 [*]	39.40±2.93 ^{**}	125.08±11.69 [*]

注:与正常组相比, [#] $P < 0.05$;与模型组相比, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

Note. Compared with normal group, [#] $P < 0.05$. Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

白的表达明显上调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.5 各组小鼠骨髓 Th17、Treg 细胞比例及 Th17/Treg 细胞平衡的比较

FCM 检测显示,与正常组相比,模型组小鼠骨髓中 Th17 细胞比例明显增高 ($P < 0.05$),Treg 细胞比例明显降低 ($P < 0.05$),Th17/Treg 细胞比值显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比,环孢素 A 组、APS 低、高剂量组骨髓中 Th17 细胞比例明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),Treg 细胞比例明显增高 ($P < 0.05$),Th17/Treg 细胞比值显著下降 ($P < 0.01$)。见表 5,图 3。

表 5 当归多糖对再障小鼠骨髓 Th17、Treg 细胞比例及 Th17/Treg 细胞平衡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of APS on ratio of Th17 and Treg, Th17/Treg in AA mice

组别 Groups	Th17/%	Treg/%	Th17/Treg
正常组 Normal group	13.05±1.37	9.16±0.91	1.85±0.23
模型组 Model group	23.12±3.09 [#]	4.22±0.39 [#]	6.76±0.52 ^{##}
环孢素 A 组 CsA group	17.54±2.11 [*]	7.37±0.48 [*]	2.35±0.25 ^{**}
APS 低剂量组 APS-L group	18.08±1.90 [*]	6.35±0.62 [*]	2.85±0.26 ^{**}
APS 高剂量组 APS-H group	15.53±1.84 ^{**}	8.14±0.71 [*]	1.91±0.24 ^{**}

注:与正常组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

Note. Compared with normal group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$. Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

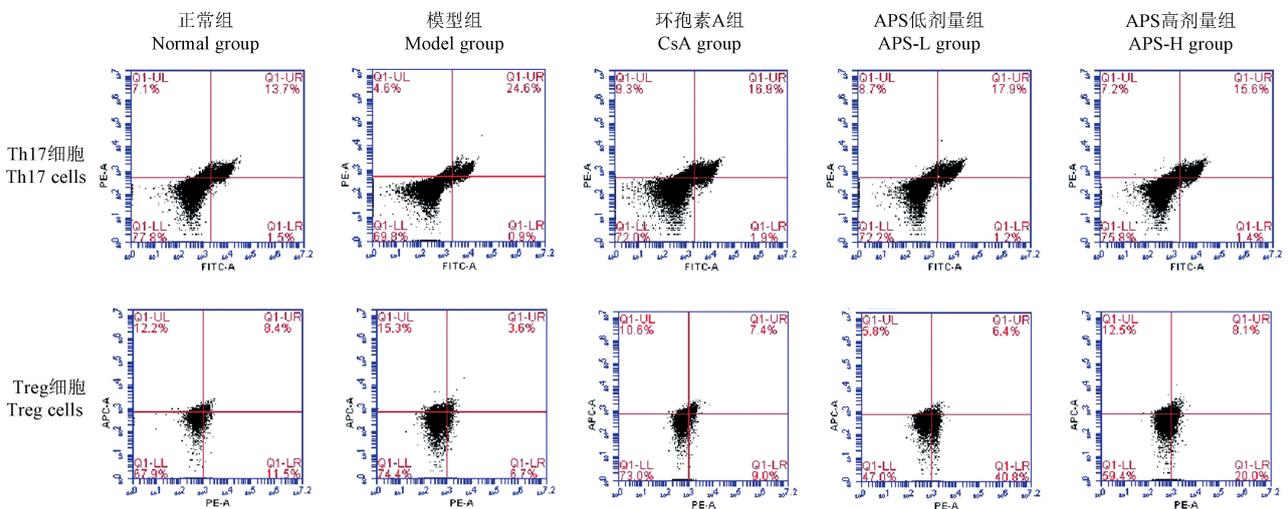


图 3 当归多糖对再障小鼠骨髓 Th17 和 Treg 细胞比例的影响

Figure 3 Effect of APS on ratio of Th17 and Treg cells in bone marrow in AA mice

3 讨论

再生障碍性贫血是一种临床常见的血液系统疾病,以骨髓造血功能衰竭为主要特征,主要表现为全血细胞减少、贫血、感染、出血等一系列症状。本病病程长,病情容易反复,增加了临床治疗难度,严重影响患者生活质量。对症支持治疗、激素治疗、免疫抑制剂、造血干细胞移植等是本病的主要治疗措施,然而临床治疗疗效欠佳,而且治疗费用较高^[9]。再障属于中医学“髓劳”“虚劳”“血癆”等疾病范畴,中医基本病机在于脾肾亏虚、气血不足^[10]。当归补血汤是中医补气养血的经典名方,功可“补气健脾,养血活血”,能够改善骨髓造血功能、纠正贫血状态、调节机体免疫功能紊乱^[11-12]。当归有“补血圣药”之称,是当归补血汤的关键组成药物,具有补血活血、养阴润燥、调经止痛、润肠通便

的功效,用于治疗血虚诸证、心悸、眩晕、虚寒腹痛、月经不调、风寒湿痹等疾病。当归多糖是当归主要活性成分之一,具有改善造血功能、调节免疫功能、抗氧化应激、抑制肿瘤、抑制炎症反应、镇痛、保护肝肾功能等多重药理作用^[13],作为天然植物当归的有效提取物,其具有安全性高、毒副作用小等诸多优点^[14]。研究发现当归多糖可升高免疫抑制小鼠免疫球蛋白 IgG、IgM 水平以及 T 细胞亚群水平,增强体液免疫和细胞免疫功能^[15-16]。Nai 等^[17]及 Mu 等^[18]的研究证实当归多糖可促进 T 细胞、B 细胞及自然杀伤细胞增殖,促进一氧化氮和肿瘤坏死因子 α 的产生,调节免疫系统功能。当归多糖可通过提高 HIF-2 α 蛋白的表达,减少核因子 κ B 和 GATA2 以及促炎细胞因子的表达,增加 CKD 大鼠骨髓源性单核细胞 Bcl-2/Bax 比例,刺激促红细胞生成素生成而纠正大鼠造血功能衰竭^[19-20]。当归多糖可促

进 T 细胞增殖,增强外周血细胞 CD4⁺ 细胞百分比和 CD4⁺/CD8⁺ 比率,改善白血病毒小鼠病毒感染引起的胸腺/体重指数降低,调节 Th1 和 Th2 相关细胞因子表达^[21]。当归多糖还通过激活参与非特异性免疫的自然杀伤细胞、巨噬细胞,影响辅助性 T 细胞相关细胞因子的表达,促进脾细胞、巨噬细胞和 T 细胞的增殖,发挥免疫调节作用^[22]。李芮等^[23] 利用网络药理学方法,预测和筛选到当归多糖是治疗再障的关键成分之一,通过韦恩图对药物、疾病靶点进行映射,并构建靶点蛋白作用网络,分析发现当归多糖可能作用于 VEGFA、TNF、IL-6、AKT1 等靶点,调控 JAK-STAT、TNF、HIF-1 等通路发挥治疗再生障碍性贫血作用。

Treg 细胞和 Th17 细胞是 T 淋巴细胞的重要亚群,是细胞免疫主要参与者,他们均能分泌多种细胞因子,参与机体免疫应答的多个过程,具有非常广泛的作用。Treg 细胞具有免疫抑制作用的特性,能够特异性的分泌 TGF- β 、IL-10、IL-35、IL-4 等多种细胞因子,从而调节效应 T 细胞的增殖与活化,有效减缓病理性免疫应答,降低炎症性损伤^[24-25]。Th17 细胞具有介导炎症反应的作用特性,可以选择性分泌 IL-17A、IL-22、IL-17F 等多种效应细胞因子,从而介导中性粒细胞动员、招募和活化,对机体炎症反应具有明显的促进作用。IL-17 与相应受体结合后,可刺激靶细胞释放 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等促炎细胞因子,加剧炎症反应^[26]。Treg 细胞、Th17 细胞参与多种自身免疫性疾病、移植排斥反应、慢性炎症性疾病的发生发展,通过调节机体免疫平衡,影响着免疫性疾病预后和转归。Th17 细胞和 Treg 细胞相互制约、相互联系,呈现动态制约和协调平衡状态,并通过这种相互作用保持机体正常免疫功能。Th17 细胞与 Treg 细胞的增殖受多种因素的影响,其中 TGF- β 发挥重要的调节作用。TGF- β 可抑制初始 CD4⁺T 淋巴细胞向 Th17 细胞转化的过程,被抑制的 T 淋巴细胞会有更多的机会分化为 Treg 细胞;当机体受某些刺激影响后,可作用于调节效应细胞,促使调节效应细胞分泌 IL-6 等细胞因子,这些细胞因子具有拮抗 TGF- β 的作用,从而减轻 TGF- β 的分化抑制作用,促使更多的初始 CD4⁺T 淋巴细胞分化为 Th17 细胞。

研究发现再障骨髓造血微环境存在 TGF- β 、IL-17、IL-10、IL-6、IFN- γ 、TNF- α 等多种炎性因子水平

紊乱,其发病机制与 T 淋巴细胞免疫功能异常密切相关。Th17 细胞和 Treg 细胞是再障造血细胞免疫功能破坏的主要 T 细胞亚群^[27-28]。Th17/Treg 细胞平衡失调,可通过异常调节和释放相应的细胞因子,破坏骨髓造血前体细胞,刺激免疫反应,损伤造血干细胞,引起骨髓造血功能损伤,影响机体造血机能^[29]。

本实验通过免疫介导的方法建立再障小鼠模型。研究发现模型组小鼠活动笨拙,精神萎靡,毛发蓬乱缺乏光泽,眼睑唇色耳廓颜色苍白,进食饮水量减少;体重及脾指数均明显下降;外周血红细胞、白细胞、血小板计数及血红蛋白浓度均明显降低;骨髓组织结构紊乱,造血组织增生度明显减低;骨髓 IL-17A、IL-6 蛋白表达明显上调,TGF- β 1、IL-10 蛋白表达明显下调;骨髓 Th17 细胞比例明显增高,Treg 细胞比例明显降低,Th17/Treg 细胞比值显著升高($P < 0.01$)。当归多糖干预后,再障小鼠精神状态、毛发蓬乱及光泽度均好转,活动量增加,进食量饮水量均改善,眼睑唇色耳廓颜色转红润,以 APS 高剂量组效果改善最好,体重、脾指数均明显升高($P < 0.05$),APS 高剂量组体重改善更早;APS 低、高剂量组外周血外周血红细胞、白细胞、血小板计数及血红蛋白浓度均明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);APS 低剂量组紊乱的造血组织结构可见修复,骨髓造血组织增生度较前改善;APS 高剂量组骨髓组织结构修复明显,造血组织增生度明显升高($P < 0.05$);APS 低、高剂量组 IL-17A、IL-6 蛋白的表达明显下调,TGF- β 1、IL-10 蛋白的表达明显上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);骨髓 Th17 细胞比例明显降低,Treg 细胞比例明显增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),Th17/Treg 细胞比值显著下降($P < 0.01$)。

综上所述,当归多糖能改善再障模型小鼠骨髓造血功能,降低骨髓 IL-17A、IL-6 蛋白表达水平,提高 TGF- β 1、IL-10 蛋白表达,其机制可能是通过调节 Th17/Treg 细胞平衡来实现。本研究为当归多糖治疗再障提供理论依据,丰富了经典名方当归补血汤治疗再障研究证据。

参考文献:

- [1] 杨晓梅,杨维,卢小玲. T 细胞肿瘤免疫治疗的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2018, 46(3): 72-76.
YANG X M, YANG W, LU X L. Advances in T cells

- immunotherapy on tumors [J]. *Prog Microbiol Immunol*, 2018, 46(3): 72-76.
- [2] 王文儒, 杜宇, 许勇钢, 等. 骨髓增生异常综合征与再生障碍性贫血的临床特征及淋巴亚群比较 [J]. *临床血液学杂志*, 2022, 35(10): 710-716.
WANG W R, DU Y, XU Y G, et al. Comparison of clinical features and T lymphocyte subsets between myelodysplastic syndrome and aplastic anemia [J]. *J Clin Hematol*, 2022, 35(10): 710-716.
- [3] KORDASTI S, COSTANTINI B, SEIDL T, et al. Deep phenotyping of Tregs identifies an immune signature for idiopathic aplastic anemia and predicts response to treatment [J]. *Blood*, 2016, 128(9): 1193-1205.
- [4] 冯璟, 于远望. 当归补血汤对辐射损伤小鼠的防护作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(10): 55-58.
FENG J, YU Y W. The protective effect of Danggui Buxue Decoction on radiation injury in mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2015, 25(10): 55-58.
- [5] 杨飞霞, 王玉, 夏鹏飞, 等. 当归补血汤化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(11): 2677-2685.
YANG F X, WANG Y, XIA P F, et al. Review of chemical constituents, pharmacological effects and clinical applications of Danggui Buxue Decoction and prediction and analysis of its Q-markers [J]. *China J Chin Mater Med*, 2021, 46(11): 2677-2685.
- [6] 马婷婷, 冯兴中, 王学艳. 当归对阴虚哮喘 Balb/c 小鼠 Th1/Th2 及 Th17/Treg 的影响及机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(4): 758-762.
MA T T, FENG X Z, WANG X Y. Effects and mechanism of *Angelicae Sinensis Radix* on Th1/Th2 and Th17/Treg in mice with asthma and Yin deficiency syndrome [J]. *China J Chin Mater Med*, 2017, 42(4): 758-762.
- [7] XU Y Y, WANG D M, LIANG H S, et al. The role of Th17/Treg axis in the traditional Chinese medicine intervention on immune-mediated inflammatory diseases: a systematic review [J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(3): 535-558.
- [8] DENG P, LI X, WEI Y, et al. The herbal decoction modified Danggui Buxue Tang attenuates immune-mediated bone marrow failure by regulating the differentiation of T lymphocytes in an immune-induced aplastic anemia mouse model [J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0180417.
- [9] 中华医学会血液学分会红细胞疾病(贫血)学组. 再生障碍性贫血诊断与治疗中国指南(2022年版) [J]. *中华血液学杂志*, 2022, 43(11): 881-888.
Red Blood Cell Diseases (Anemia) Group, Hematology Branch, Chinese Medical Association. Guidelines for the diagnosis and management of aplastic anemia in China (2022) [J]. *Chin J Hematol*, 2022, 43(11): 881-888.
- [10] 何丹迪, 王金环, 雍彦礼, 等. 中医治疗再生障碍性贫血的研究概况与发展 [J]. *中国数字医学*, 2022, 17(1): 89-94.
HE D D, WANG J H, YONG Y L, et al. Research overview and development of aplastic anemia treated by traditional Chinese medicine [J]. *China Digit Med*, 2022, 17(1): 89-94.
- [11] 陈维达, 徐龙晋, 张静, 等. 当归补血汤对再障小鼠骨髓造血及线粒体自噬的实验研究 [J]. *中药药理与临床*, 2019, 35(1): 14-18.
CHEN W D, XU L J, ZHANG J, et al. Experimental study of Dangguibuxue Decoction on bone marrow hematopoiesis and mitophagy in aplastic anemia mice [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2019, 35(1): 14-18.
- [12] 王婷, 刘志勇, 罗黎明, 等. 当归生姜羊肉汤对脾肾阳虚型 IBS-D 大鼠中医证候的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(12): 37-48.
WANG T, LIU Z Y, LUO L M, et al. Effects of decoction of *Angelica sinensis*, *Zingiberis Rhizoma Recens*, and mutton on traditional Chinese medicine symptoms of IBS-D female rats with spleen-kidney Yang deficiency [J]. *Chin J Comp Med*, 2022, 32(12): 37-48.
- [13] 马艳春, 吴文轩, 胡建辉, 等. 当归的化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中医药学报*, 2022, 50(1): 111-114.
MA Y C, WU W X, HU J H, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Angelica sinensis* [J]. *Acta Chin Med Pharmacol*, 2022, 50(1): 111-114.
- [14] 任伟钰, 郑宜馨, 张月梅, 等. 当归多糖药理作用的研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(10): 2484-2487.
REN W Y, ZHENG Y J, ZHANG Y M, et al. Research progress on pharmacological effects of angelica polysaccharide [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2020, 31(10): 2484-2487.
- [15] 丁学兰, 赵信科, 邱勇玉, 等. 当归多糖对环磷酰胺致骨髓抑制小鼠外周血细胞、免疫功能的影响 [J]. *卫生职业教育*, 2016, 34(16): 153-155.
DING X L, ZHAO X K, QIU Y Y, et al. Effects of angelica polysaccharide on peripheral blood cells and immune function in mice with bone marrow suppression induced by cyclophosphamide [J]. *Health Vocat Educ*, 2016, 34(16): 153-155.
- [16] 杨铁虹, 贾敏, 梅其炳. 当归多糖对细胞免疫功能的增进作用 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, 21(6): 782-783, 788.
YANG T H, JIA M, MEI Q B. Effects of *Angelica sinensis* polysaccharide on cell-mediated immunity [J]. *J Cell Mol Immunol*, 2005, 21(6): 782-783, 788.
- [17] NAI J, ZHANG C, SHAO H, et al. Extraction, structure, pharmacological activities and drug carrier applications of *Angelica sinensis* polysaccharide [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 183: 2337-2353.
- [18] MU X, ZHANG Y, LI J, et al. *Angelica sinensis* polysaccharide prevents hematopoietic stem cells senescence in D-galactose-induced aging mouse model [J]. *Stem Cells Int*, 2017,

- 2017; 3508907.
- [19] WANG K, WU J, XU J, et al. Correction of *Anemia* in chronic kidney disease with *Angelica sinensis* polysaccharide via restoring EPO production and improving iron availability [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 803.
- [20] LIU C, LI J, MENG F Y, et al. Polysaccharides from the root of *Angelica sinensis* promotes hematopoiesis and thrombopoiesis through the PI3K/AKT pathway [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2010, 10: 79.
- [21] YANG T, JIA M, ZHOU S, et al. Antivirus and immune enhancement activities of sulfated polysaccharide from *Angelica sinensis* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2012, 50(3): 768-772.
- [22] YANG T, JIA M, MENG J, et al. Immunomodulatory activity of polysaccharide isolated from *Angelica sinensis* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2006, 39(4/5): 179-184.
- [23] 李芮, 刘健, 靳楠, 等. 基于网络药理学探讨当归补血汤治疗再生障碍性贫血作用机制 [J]. *陕西中医*, 2022, 43(3): 384-389.
- LI R, LIU J, JIN N, et al. Discussion on the mechanism of Danggui Buxue Decoction in treating aplastic *Anemia* based on network pharmacology [J]. *Shaanxi J Tradit Chin Med*, 2022, 43(3): 384-389.
- [24] SHI Q Z, YU H M, CHEN H M, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells regulate Treg/Th17 balance in aplastic anemia by transferring miR-23a-3p [J]. *Clin Exp Med*, 2021, 21(3): 429-437.
- [25] 肖秋萍, 钟友宝, 喻松仁, 等. 脾虚湿蕴证溃疡性结肠炎模型构建及 T 淋巴细胞变化的研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(10): 1241-1249.
- XIAO Q P, ZHONG Y B, YU S R, et al. Model of ulcerative colitis with spleen deficiency and dampness syndrome, and changes in T lymphocytes [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(10): 1241-1249.
- [26] ZHANG J, LIU T, DUAN Y, et al. Single-cell analysis highlights a population of Th17-polarized CD4⁺ naive T cells showing IL6/JAK3/STAT3 activation in pediatric severe aplastic anemia [J]. *J Autoimmun*, 2023, 136: 103026.
- [27] YIN X, LIU B, WEI H, et al. Activation of the Notch signaling pathway disturbs the CD4⁺/CD8⁺, Th17/Treg balance in rats with experimental autoimmune uveitis [J]. *Inflamm Res*, 2019, 68(9): 761-774.
- [28] 殷学伟, 周梦贤, 崔艳艳, 等. 龙胆泻肝汤对葡萄膜炎大鼠 Th17/Treg 动态免疫平衡的调控作用 [J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(5): 1098-1102.
- YIN X W, ZHOU M X, CUI Y Y, et al. The regulatory effect of Longdan Xiegan Tang on the dynamic immune balance of Th17/Treg in rats with uveitis [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2022, 33(5): 1098-1102.
- [29] LIU C, SUN Y, SHAO Z. Current concepts of the pathogenesis of aplastic *Anemia* [J]. *Curr Pharm Des*, 2019, 25(3): 236-241.

[收稿日期]2024-01-30