

· 基础研究 ·

再生复血汤对再生障碍性贫血小鼠外周血 CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ 调节性 T 细胞及 Foxp3 mRNA 的影响

王 跃 聂 甜 江劲波 赵早云 黄 蓉 杨 舟 郝敬全

摘要 **目的** 探讨再生复血汤对再生障碍性贫血(AA)小鼠外周血 CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ 调节性 T 细胞(Treg)及核转录因子 Foxp3 mRNA 的影响。**方法** 将 72 只小鼠随机分成空白组,模型组,阳性对照组,再生复血汤高、中、低剂量组,每组 12 只。除空白组外,其余各组小鼠予⁶⁰Co-γ 联合腹腔注射环磷酰胺和氯霉素建立 AA 小鼠模型。造模第 7 天再生复血汤高、中、低剂量组分别给予再生复血汤 10、5、2.5 g/(kg·d)灌胃,模型组和空白组予等体积的生理盐水灌胃,阳性对照组予环孢素 3 mg/(kg·d)灌胃,各组均干预 30 天。检测小鼠外周血白细胞数(WBC)、网织红细胞数(Ret)、血红蛋白数(Hb)及血小板数(PLT)、骨髓有核细胞数(粒系比例、红系比例、巨核细胞数,淋巴细胞比例)、Treg 比例和单个核细胞 Foxp3 mRNA 表达量。**结果** 与空白组比较,模型组外周血 WBC、Ret、Hb、PLT、骨髓粒系比例、红系比例、巨核细胞数、Treg 比例、Foxp3 mRNA 表达量降低,淋巴细胞比例升高(均 $P < 0.05$)。与模型组比较,各干预组小鼠外周血 WBC、Ret、Hb、PLT、骨髓粒系比例、红系比例、巨核细胞数、Treg 比例、Foxp3 mRNA 表达量升高,淋巴细胞比例下降(均 $P < 0.05$)。与再生复血汤低剂量组比较,再生复血汤中、高剂量组和阳性对照组外周血 WBC、Ret、Hb、PLT、骨髓粒系比例、红系比例、巨核细胞数、Treg 比例、Foxp3 mRNA 表达量升高,淋巴细胞比例下降(均 $P < 0.05$),且再生复血汤高剂量组优于再生复血汤中剂量组和阳性对照组(均 $P < 0.05$)。**结论** 再生复血汤能通过促使 AA 小鼠外周血单个核细胞 Foxp3 mRNA 表达,使得 Treg 比例升高,诱导 AA 小鼠恢复自身免疫耐受,并且呈现剂量依赖性。

关键词 再生复血汤;再生障碍性贫血;调节性 T 细胞;Foxp3

Effect of Zaisheng Fuxue Decoction on CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ Regulatory T Cells and Transcription Factor Foxp3 mRNA in the Peripheral Blood of Aplastic Anemia Mice WANG Yue, NIE Tian, JIANG Jin-bo, ZHAO Zao-yun, HUANG Rong, YANG Zhou, and HAO Jing-quan Hematology Department, First Affiliated Hospital, Hunan University of TCM, Changsha (410007)

ABSTRACT **Objective** To explore the effect of Zaisheng Fuxue Decoction on CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ regulatory T cell (Treg) and Foxp3 mRNA in the peripheral blood of aplastic anemia(AA) mice. **Methods** Seventy-two mice were randomly divided into the blank group, the model group, the positive control group and Zaisheng Fuxue Decoction (low dose, middle dose, and high dose) groups, 12 in each group. In addition to the blank group, mice of the other groups were treated with ⁶⁰Co-γ combined with intraperitoneal injection of cyclophosphamide and chloramphenicol to establish AA mouse model. At the seventh day of modeling, the high doses, middle dose and low dose of Zaisheng Fuxue Decoction groups of AA mice were intragastric administrated with the decoction at the dose of 10, 5 and 2.5 g/(kg·d), separately; the model group and the blank group were given an equal volume of saline, and the positive control group was treated with cyclosporine of 3 mg/(kg·d). All groups were treated for 30 days. The

基金项目:湖南省科技厅一般项目(No. 2013SK3102)

作者单位:湖南中医药大学第一附属医院血液科(长沙 410007)

通讯作者:聂甜, Tel:13755088946, E-mail: 568098977@qq.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20171020.364

white blood cell (WBC) count, reticulociti (Ret), hemoglobin counts (Hb), platelet count (PLT), nucleated cells in bone marrow (the portion of granule count, the portion of red cells, megakaryocytes, the portion of lymphocytes) were measured. The proportion of Treg and the mRNA expression of Foxp3 in the peripheral blood mononuclear cells of each group were detected. Results Compared with the blank group, the WBC count, Ret, Hb and PLT level, the portion of bone marrow granule, red cells and megakaryocytes, the proportion of Treg cells, the mRNA expression of Foxp3 of the peripheral blood in the model group decreased significantly, and the portion of lymphocytes increased significantly ($P < 0.05$). Compared with low dose Zaisheng Fuxue Decoction group, the WBC count, Ret, Hb and PLT level increased, the portion of bone marrow granule, red cells and megakaryocytes, the portion of Treg and the mRNA expression of Foxp3 increased, the portion of lymphocytes decreased ($P < 0.05$), and the therapeutic response of the high dose Zaisheng Fuxue Decoction group was better than that of the middle dose group and the positive control group ($P < 0.05$). Conclusion Zaisheng Fuxue Decoction can promote the mRNA expression of Foxp3 of peripheral blood mononuclear cells in AA mice, increase the proportion of Treg, induce AA mice to restore self-immunization tolerance with the tendency of dose-dependent pattern.

KEYWORDS Zaisheng Fuxue Decoction; aplastic anemia; Treg cell; Foxp3

再生障碍性贫血 (aplastic anemia, AA) 是多种因素导致骨髓造血干(祖)细胞数量减少和功能缺陷,引起骨髓造血衰竭性疾病。免疫异常致使自身反应性 T 细胞,如 $CD8^+$ 细胞毒性 T 细胞、 $CD4^+$ Th1 细胞、Th17 细胞,攻击骨髓造血干(祖)细胞,从而使其数量减少^[1]。 $CD4^+$ $CD25^+$ $CD127^-$ 调节性 T 细胞 (Treg) 是一类具有免疫抑制作用的 T 细胞亚群。研究表明,AA 患者外周循环中 Treg 数量和 Foxp3 表达量减少,它们难以通过正常的免疫抑制功能减少自身反应性 T 淋巴细胞对自身骨髓造血干(祖)细胞的破坏,从而使骨髓造血衰竭^[2,3]。

中医学认为,肾为先天之本,主骨生髓,主藏精,精血同源,精血互生,血的生成依赖于肾精化生,国内专家认为“肾虚”为再障的基本病机。肾虚日久必成瘀,肾虚化生元气不足,无力推动血行,以致气血运行不畅而成肾虚血瘀之证。基于 AA “肾虚血瘀”,依据调元益本汤化裁组方再生复血汤,前期研究证明再生复血汤用于治疗 80 例慢性 AA 患者的治疗总有效率为 77.5%,治疗后患者血红蛋白 (Hb) 量、中性粒细胞及血小板 (PLT) 数均得到提升^[4]。但是,该方的药效机制不清晰,其能否通过促使 Treg 比例上升,使 AA 患者恢复骨髓造血的机制仍未得到阐述。因此,本实验用再生复血汤干预 AA 小鼠模型,通过检测各组小鼠外周血 Treg 比例,外周血单个核细胞 Foxp3 mRNA 表达,探讨再生复血汤的效应机制。

材料与方法

1 动物 Balb/c 小鼠 72 只,SPF 级,雌雄各半,体重 18~22 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公

司,动物许可证号:SCXK(湘)2011-0003。实验在湖南中医药大学医学实验动物中心进行,设施许可证号为 SYXK(湘)2013-0005。普通饲料喂养,饮用无菌蒸馏水,室温 25℃(实验动物饲养、处理参照湖南中医药大学实验动物伦理法)。

2 主要试剂仪器 抗小鼠 CD4-FITC 单克隆抗体(美国 BD 公司,生产批号:16105091);抗小鼠 CD25-APC 单克隆抗体(美国 BD 公司,生产批号:13738381);抗小鼠 CD127-PE 单克隆抗体(美国 BD 公司,生产批号:15491771);异丙醇(上海生工生物有限公司,生产批号:65661);鼠外周血淋巴分离液(上海研卉生物科技有限公司,生产批号:LTS1971-3);DEPC 水(上海生工生物股份有限公司,生产批号:DB0251);Trizol 试剂(美国 Life Technologies,生产批号:10386234);SYBR Green qPCR Mix(美国 Gene Copoeia,生产批号:AOPR-2130);反转录试剂盒(美国 Gene Copoeia,生产批号:AORT-0450);0.01 mol/L pH 7.3 磷酸盐缓冲液(PBS,购自武汉博士德生物公司,生成批号:08D15B29)。BD Aria 2 型流式细胞仪,美国 BD 公司;StepOne Real-Time PCR System 定量 PCR 仪,美国 Life Technologies。

3 药物 再生复血汤药物组成为:紫河车 20 g 黄芪 30 g 升麻 10 g 陈皮 10 g 虎杖 10 g 太子参 10 g 丹参 30 g 石韦 10 g 甘草 3 g。汤药由湖南中医药大学第一附属医院制剂室用韩国东华 DHJ-102 煎药机制备。所有药物均先用冷水浸泡 30 min,再将压力排出,打开盖子,将药物放入,煎煮 40 min。真空包装,150 mL/袋,每剂两袋。拆开包装

后倒入蒸发皿中浓缩,其高、中、低剂量的药液分别浓缩成(原药材量)1.28、0.64、0.32 g/mL。

4 动物分组及干预方法 将 72 只 Balb/c 小鼠按随机数字表法分成空白组,模型组,阳性对照组,再生复血汤高、中、低剂量组,每组 12 只。除空白组外,其余各组均参照参考文献[5]采用腹腔注射环磷酰胺、氯霉素及 Co- γ 放射建立再障小鼠模型。小鼠一次全身照射 3.0 Gy⁶⁰Co- γ (剂量率 1.35 Gy/min,距离 170 cm)3 天,照射后第 4、5、6 天腹腔注射环磷酰胺 50 mg/(kg·d),氯霉素 62.5 mg/(kg·d)。AA 小鼠于造模第 7 天开始灌胃给药(按常用实验动物和人的体表面积比值表折算成小鼠等效灌胃剂量),再生复血汤高、中、低剂量组每次灌胃量分别为 10.5、2.5 g/(kg·d),2.5g/(kg·d)相当于 60 kg 成人每日临床用量的等效剂量,每天 1 次。模型组和空白组给予等体积的生理盐水灌胃,每天 1 次。阳性对照组予环孢素按 3 mg/(kg·d)灌胃,各组均灌胃 30 天。

5 检测指标与方法

5.1 标本采集 小鼠均采用摘眼球法获得外周血各 1 mL,EDTA 抗凝。

5.2 各组小鼠外周血白细胞数(WBC)、网织红细胞数(Ret)、Hb 及 PLT 的检测 XT-4000i 全自动血细胞计数仪检测外周血 WBC、Ret、Hb 及 PLT。

5.3 各组小鼠骨髓有核细胞数的检测 显微镜低倍镜下(10×10)计数骨髓粒系比例、红系比例、巨核细胞数、淋巴细胞比例。

5.4 流式细胞术(FCM)检测外周血 CD4⁺CD25⁺CD127⁻调节性 T 细胞(Treg)比例 每个标本用一支流式管。实验管中吸入 50 μ L EDTA 抗凝血,分别加入 2 μ L 抗小鼠 CD4 抗体、1 μ L 抗小鼠 CD127 抗体、2 μ L 抗小鼠 CD25 抗体。混匀、避光、室温孵育 15 min。加溶血素 500 μ L,混匀、避光、室温孵育 4 min。加 0.01 mol/L pH 7.3 的 PBS 2 mL,400×g 离心 5 min,去上清。加 0.01 mol/L pH 7.3 的 PBS 300 μ L 上机待检。开机后 Flow-Check 校准光路,CaliBRITE3 荧光校准微球和 BD FACSDiva 自动软件检查仪器灵敏度。设定 PMT 电压和荧光补偿,以 CD4/SSC 设门,确定 CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg,应用 BD FACSDiva 软件数据分析结果,计数阳性细胞百分率。

5.5 荧光免疫聚合酶链反应(RT-PCR)检测外周血单个核细胞 Foxp3 mRNA 的表达 (1)设计引

物:在 NCBI 数据库中查找 Foxp3 和 β -actin 基因序列,Primer Premier5.0 软件设计 Real-time PCR 引物。目的基因 Foxp3 引物:上游(5' to 3')F:TACT-TCAGAAACCCACCCCGC,下游(5' to 3')F:GTC-CACACTGCTCCCTTCTC,314 bp。内参基因 β -Actin 引物:上游(5' to 3')F:CCACCATGTACCAGGCATT,下游(5' to 3')F:CGGACTCATCGTACTCCTGC,1 126 bp。(2)提取外周血淋巴细胞:在无菌离心管内,加新鲜抗凝血 1 mL,与注射用生理盐水 1:1 混匀,小心加于 2 mL 的细胞分离液上;400×g 离心,20 min,离心管细胞分 4 层,吸取第 2 层。(3)提取总 RNA:加入 1 mL Trizol 试剂,匀浆后加入 RNAfree 的 1.5 mL EP 管中,混匀后静置 5 min;加 0.2 mL 氯仿,室温静置 5 min;吸取上层水相加等体积异丙醇,混匀静置 10 min;4℃,12 000×g 离心 10 min,弃上清,加 1 mL 冰预冷的 75%乙醇振荡沉淀。(4)逆转录:以所合成的 cDNA 进行扩增,反应体系:2X All-in-One qPCR Mix 10 μ L,上下游引物各 2 μ L;反应条件:PCR 扩增标准程序,94℃预变性 10 min;再按下列程序循环 45 次,即 95℃变性 10 s,65℃退火 20 s,72℃延伸 15 s。实验数据分析:结果采用 2^{- Δ Ct}法,计算目的基因 mRNA 转录水平的差异。 $-\Delta Ct = \text{目的基因的 } \Delta Ct - \text{内参基因的 } \Delta Ct$ 。

6 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件分析数据。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有资料进行正态性和方差齐性检验。符合正态性和方差齐性,多组比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠 WBC、Ret、Hb 及 PLT 比较(表 1) 与空白组比较,模型组外周血 WBC、Ret、Hb、PLT 水平均降低($P < 0.05$)。与模型组比较,各给药组外周血 WBC、Ret、Hb、PLT 水平均升高($P < 0.05$)。与再生复血汤低剂量组比较,再生复血汤中、高剂量组和阳性对照组外周血 WBC、Ret、Hb、PLT 水平均升高($P < 0.05$),且再生复血汤高剂量组高于再生复血汤中剂量组和阳性对照组($P < 0.05$)。

2 各组小鼠骨髓有核细胞变化比较(表 2) 与空白组比较,模型组骨髓粒系比例、红系比例、巨核细胞数降低,淋巴细胞比例升高($P < 0.05$)。与模型组比较,各给药组骨髓粒系比例、红系比例、巨核细胞数

表 1 各组小鼠 WBC、Ret、Hb 及 PLT 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	WBC($10^9/L$)	Ret(%)	Hb(g/L)	PLT($10^9/L$)
空白	12	8.00 $\pm$ 0.31	4.45 $\pm$ 0.18	155.93 $\pm$ 7.88	572.76 $\pm$ 86.58
模型	12	2.40 $\pm$ 0.67 *	1.14 $\pm$ 0.26 *	105.03 $\pm$ 7.95 *	90.34 $\pm$ 20.06 *
阳性对照	12	4.27 $\pm$ 0.79 $\Delta\Delta$	2.90 $\pm$ 0.59 $\Delta\Delta$	130.92 $\pm$ 7.91 $\Delta\Delta$	360.83 $\pm$ 21.87 $\Delta\Delta$
再生复血汤低剂量	12	3.06 $\pm$ 0.98 Δ	2.19 $\pm$ 0.65 Δ	122.13 $\pm$ 7.82 Δ	300.61 $\pm$ 23.48 Δ
中剂量	12	4.32 $\pm$ 0.85 $\Delta\Delta$	2.94 $\pm$ 0.50 $\Delta\Delta$	130.86 $\pm$ 7.75 $\Delta\Delta$	360.49 $\pm$ 26.69 $\Delta\Delta$
高剂量	12	5.20 $\pm$ 0.77 $\Delta\Delta\bigcirc\bullet$	3.27 $\pm$ 0.57 $\Delta\Delta\bigcirc\bullet$	135.00 $\pm$ 7.47 $\Delta\Delta\bigcirc\bullet$	390.39 $\pm$ 22.18 $\Delta\Delta\bigcirc\bullet$

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$;与再生复血汤低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$;与再生复血汤中剂量组比较, $\bigcirc P < 0.05$;与阳性对照组比较, $\bullet P < 0.05$;下表同

表 2 各组小鼠骨髓有核细胞变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	粒系比例(%)	红系比例(%)	淋巴细胞比例(%)	巨核细胞数(个)
空白	12	58.29 $\pm$ 0.99	19.96 $\pm$ 1.65	22.26 $\pm$ 1.55	31.40 $\pm$ 0.54
模型	12	20.49 $\pm$ 1.69 *	7.75 $\pm$ 0.72 *	65.45 $\pm$ 1.12 *	3.40 $\pm$ 0.79 *
阳性对照	12	36.75 $\pm$ 1.87 $\Delta\Delta$	14.36 $\pm$ 1.11 $\Delta\Delta$	50.79 $\pm$ 0.94 $\Delta\Delta$	20.92 $\pm$ 1.38 $\Delta\Delta$
再生复血汤低剂量	12	29.08 $\pm$ 0.57 Δ	12.41 $\pm$ 1.72 Δ	55.39 $\pm$ 1.19 Δ	15.16 $\pm$ 1.38 Δ
中剂量	12	35.34 $\pm$ 1.35 $\Delta\Delta$	13.91 $\pm$ 0.73 $\Delta\Delta$	52.44 $\pm$ 0.89 $\Delta\Delta$	19.11 $\pm$ 1.84 $\Delta\Delta$
高剂量	12	40.12 $\pm$ 1.69 $\Delta\Delta\bigcirc\bullet$	15.58 $\pm$ 1.77 $\Delta\Delta\bigcirc\bullet$	47.55 $\pm$ 1.33 $\Delta\Delta\bigcirc\bullet$	21.65 $\pm$ 1.37 $\Delta\Delta\bigcirc\bullet$

均升高,淋巴细胞比例均下降($P < 0.05$)。与再生复血汤低剂量组比较,再生复血汤中、高剂量组和阳性对照组骨髓粒系比例、红系比例、巨核细胞数均升高,淋巴细胞比例均下降($P < 0.05$),且再生复血汤高剂量组优于再生复血汤中剂量组和阳性对照组($P < 0.05$)。

3 各组小鼠外周血 CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg 比例和单个核细胞 Foxp3 mRNA 水平比较(表 3,图 1) 与空白组比较,模型组外周血 Treg 比例和单个核细胞 Foxp3 mRNA 水平降低($P < 0.05$)。与模型组比较,各给药组外周血 Treg 比例和单个核细胞 Foxp3 mRNA 水平均升高($P < 0.05$)。与再生复血汤低剂量组比较,再生复血汤中、高剂量组和阳性对照组外周血 Treg 比例和单个核细胞 Foxp3 mRNA 水平均升高($P < 0.05$),且再生复血汤高剂量组高于再生复血汤中剂量组和阳性对照组($P < 0.05$)。

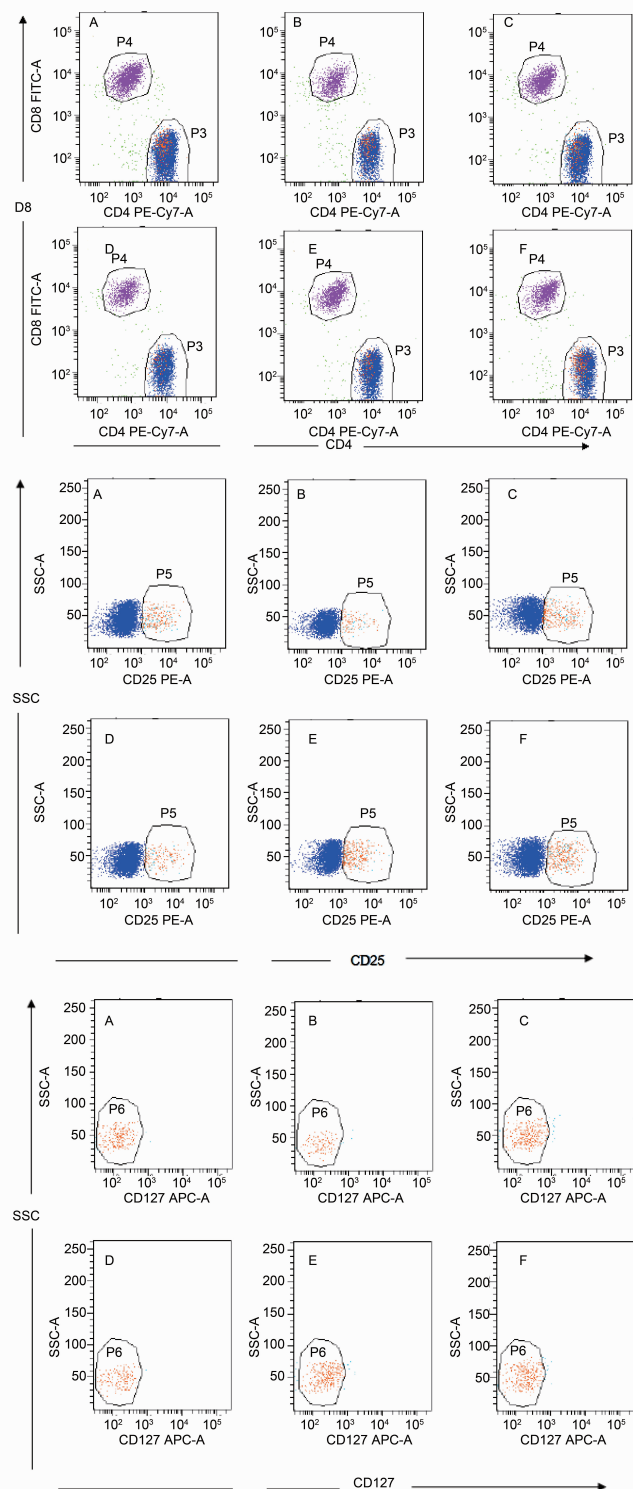
表 3 各组小鼠外周血 CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg 比例和单个核细胞 Foxp3 mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ Treg 比例(%)	Foxp3 mRNA (E-3)
空白	12	6.16 $\pm$ 1.01	1.70 $\pm$ 0.19
模型	12	2.81 $\pm$ 0.44 *	0.23 $\pm$ 0.43 *
阳性对照	12	4.62 $\pm$ 0.45 $\Delta\Delta$	0.62 $\pm$ 0.17 $\Delta\Delta$
再生复血汤低剂量	12	3.67 $\pm$ 0.35 Δ	0.47 $\pm$ 0.23 Δ
中剂量	12	4.58 $\pm$ 0.39 $\Delta\Delta$	0.69 $\pm$ 0.21 $\Delta\Delta$
高剂量	12	5.12 $\pm$ 0.34 $\Delta\Delta\bigcirc\bullet$	0.85 $\pm$ 0.61 $\Delta\Delta\bigcirc\bullet$

讨 论

AA 是一种免疫介导骨髓造血功能衰竭症,主要表现为骨髓有核细胞增生低下、全血细胞减少^[6]。目前,细胞免疫功能异常是 AA 造血干细胞免疫性损伤方面研究的热点。CD8⁺细胞毒性 T 细胞、CD4⁺Th1 细胞和 Th17 细胞是 AA 造血细胞免疫性破坏的主要 T 细胞群,前两者可通过释放相应细胞因子破坏骨髓造血前体细胞,而 Th17 细胞则可激发免疫反应损伤造血干细胞^[7]。中医药是治疗 AA 的重要方法,临床发现“肾虚、血瘀”是 AA 的主要病理因素,本课题组依据 AA“肾虚、血瘀”病机形成再生复血汤。本方以紫河车为君,血肉有情之品以达补肾填精;太子参、黄芪滋养后天补气生血,共为臣药;丹参活血化瘀,石韦凉血止血,虎杖清热散瘀,陈皮理气和中,升麻则清热与升阳并举,甘草调和诸药,合为佐使^[8]。

AA 表现为全血细胞减少。本研究发现再生复血汤治疗后 AA 小鼠外周血 WBC、Ret、Hb 及 PLT 数增高,骨髓粒系比例、红系比例、巨核细胞数升高、淋巴细胞比例降低,且呈剂量依赖性,这表明再生复血汤能改善 AA 小鼠骨髓造血衰竭,提升 AA 小鼠外周血血细胞数量。另研究证实,再障骨髓造血衰竭的免疫机制主要归结于免疫耐受失衡引起造血干细胞损伤,而 CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg 具有免疫抑制功能,是维持外周免疫耐受的重要 T 细胞亚群。Tregs 细胞特征性表达膜分子 CD4、CD25 及核转录因子 Foxp3,低表



注:A 为空白组;B 为模型组;C 为阳性组;D 为再生复血汤低剂量组;E 为再生复血汤中剂量组;F 为再生复血汤高剂量组

图 1 Tregs 细胞流式细胞图

达或无表达 CD127。自身免疫功能正常情况下,该细胞可以通过释放抑制性细胞因子 IL-10、TGF- β 抑制 CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞、CD4⁺ Th1 细胞和 Th17 细胞对骨髓造血的损伤作用。研究表明,AA 患者外周血

Tregs 细胞比例较健康人降低,以至于难以维持自身免疫耐受^[9]。⁶⁰Co- γ 联合环磷酰胺和氯霉素是 AA 常用的造模方法^[10]。本实验发现,Balb/c 小鼠经该方法造模后外周血 Tregs 比例降低,这说明物理联合化学法造模能使得 AA 小鼠自身免疫耐受缺失。经再生复血汤干预 4 周后,其低、中、高剂量组均能使 AA 小鼠外周血 Tregs 细胞比例上升,且呈现剂量依赖性。这提示再生复血汤能通过促进 Tregs 比例上升,使其发挥免疫抑制功能,减少免疫抑制造血的病理作用,从而使 AA 小鼠恢复自身免疫耐受平衡。究其原因,再生复血汤含有紫河车、黄芪、太子参,药理证实这些补益类中药不仅能促进造血干(祖)细胞增殖,加速骨髓造血,而且还能通过激活免疫活性细胞和抑制免疫效应细胞来调节免疫^[11-13]。再生复血汤与左归丸均是 AA 肾虚证治疗的同类方药,刘洋等^[14]证实低剂量和中剂量的左归丸可以上调 Balb/c 小鼠外周组织 Tregs 细胞比例,呈现剂量依赖性。其说明补肾法(再生复血汤、左归丸)可以通过 Tregs 细胞达到某种免疫调控作用。

Foxp3 是一种叉头/翼状螺旋转录因子家族中的一员,它是 Tregs 细胞标志性分子,调控着 Tregs 细胞免疫生物学功能。人和鼠的 Foxp3 基因均位于 X 染色体,其蛋白分子包含锌指结构、亮氨酸拉链基序和 DNA 结合区。Foxp3 决定了 Tregs 细胞的发育和功能表达,研究表明,Foxp3 突变鼠体内不存在 Tregs 细胞^[15]。本实验发现,AA 小鼠 Tregs 细胞比例下降的同时 Foxp3 mRNA 表达水平也降低,这进一步说明 Foxp3 主要表达在 Tregs 细胞。经再生复血汤干预 4 周后,其低、中、高剂量组均能使 AA 小鼠外周血单个核细胞 Foxp3 mRNA 表达水平升高,且呈现剂量依赖性。这提示再生复血汤能通过促使 Foxp3 mRNA 转录诱使 Tregs 细胞增殖,从而引起 Tregs 比例上升,改善 AA 小鼠细胞免疫紊乱状态。但是,再生复血汤通过 Foxp3 基因调控 AA 小鼠 Tregs 细胞增殖的上游机制仍不明确,这是本课题组下一步实验的未来方向。

Solomou EE 等^[9]证实循环中 Tregs 细胞数量减少的患者同时存在活化 T 细胞核因子(NFAT1 或 NFAT2)低水平状态,这能更好解释 AA 患者 Tregs 细胞 Foxp3 表达减少的原因。研究表明,在 Foxp3 启动子上存在 NFAT 结合位点,NFAT 可以通过脱磷酸化进入 Tregs 细胞核内启动 Foxp3 转录,从而调控免疫^[16]。因此,本课题组可进一步围绕 NFAT 信号对 Foxp3 的调控作用,深入研究再生复血汤的免疫调节机制。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Gargiulo L, Zaimoku Y, Scappini B, et al. Glycosylphosphatidylinositol-specific T cells, IFN- γ -producing T cells, and pathogenesis of idiopathic aplastic anemia[J]. Blood, 2017, 129(3): 388-392.
- [2] 葛丽, 申徐良. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞在再生障碍性贫血患者中的临床意义[J]. 白血病·淋巴瘤, 2016, 25(7): 438-441.
- [3] 周晨晨, 胡琦, 侯文沛. CD4⁺CD25⁺调节性T细胞缺陷与再生障碍性贫血的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2015, 24(20): 2269-2270, 2271.
- [4] 江劲波, 袁通春, 赵复锦, 等. 再生复血汤治疗慢性再生障碍性贫血 80 例临床观察[J]. 湖南中医药大学学报, 2008, 28(3): 51-53.
- [5] 刘啸, 祝彼得, 徐浩, 等. 再生障碍性贫血小鼠造模方法的实验研究[J]. 甘肃中医学院学报, 2004, 21(4): 17-20.
- [6] Bacigalupo A. How I treat acquired aplastic anemia[J]. Blood, 2017, 129(11): 1428-1436.
- [7] Tatsuya I, Hiroyuki M, Takamasa K, et al. Evidence that T cells specific for non-hematopoietic cells trigger the development of acquired aplastic anemia[J]. Blood, 2015, 126(12): 1168-1172.
- [8] 刘璇, 王跃, 江劲波. 江劲波应用再生复血汤治疗再生障碍性贫血经验[J]. 山西中医, 2012, 28(2): 4-5.
- [9] Solomou EE, Rezvani K, Mielke S, et al. Deficient CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T regulatory cells in acquired aplastic anemia[J]. Blood, 2007, 110(5): 1603-1606.
- [10] 孙婷婷, 徐文瑞, 祝晓玲. 再生障碍性贫血动物模型研究概况[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(2): 190-192.
- [11] 吕鹏月, 李定格, 石俊英, 等. 中药紫河车与猪、牛、羊胎盘补血作用的药理实验研究[J]. 山东医药工业, 2002, 21(5): 51-52.
- [12] 吴发宝, 陈希元. 黄芪药理作用研究[J]. 中药材, 2004, 27(3): 232-234.
- [13] 汪剑飞. 太子参药理研究新进展[J]. 实用药物与临床, 2013, 16(4): 333-334.
- [14] 刘洋, 姚成芳, 王丽, 等. 左归丸对小鼠 CD4⁺CD25⁺调节性T细胞的影响[J]. 山东中医药大学学报, 2007, 31(1): 56-60.
- [15] In JW, Lee N, Roh EY, et al. Association of aplastic anemia and FoxP3 gene polymorphisms in Koreans[J]. Hematology, 2017, 22(3): 149-154.
- [16] Lim HW, Broxmeyer HE, Kim CH. Regulation of trafficking receptor expression in human forkhead box P3⁺ regulatory T cells[J]. J Immunol, 2006, 177(2): 840-851.

(收稿: 2015-09-12 在线: 2017-12-29)

责任编辑: 白霞

《中国中西医结合杂志》获 2016 年“百种杰出学术期刊”荣誉称号

中国科技信息研究所(简称中信所)2017 年 10 月 31 日公布了最新的中国科技论文统计结果。《中国中西医结合杂志》再次获得 2016 年“百种杰出学术期刊”荣誉称号。自 2002 年中信所评选此荣誉称号以来,共计十五次评选中,我刊第十四次获得此荣誉称号。同时,我刊继续获评为“中国科技核心期刊”及“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5 000)”项目来源期刊。