

复方扶芳藤合剂对免疫抑制小鼠 Th1/Th2 细胞水平的调节作用

李开奇, 吴展帅, 刘 显, 彭丽珊, 陈 果, 李建明, 伍月榕, 肖 健*

广西中医药大学 广西高发传染病中西医结合转化医学重点实验室, 广西 南宁 530200

摘要: 目的 考察复方扶芳藤合剂(CFM)对免疫抑制小鼠 Th1/Th2 细胞水平的调节作用及机制。方法 将 SPF 级 Balb/c 小鼠随机分为对照组, 单给 CFM 低、中、高剂量(3.75、7.50、15.00 g·kg⁻¹)组, 模型组, CFM 低、中、高剂量(3.75、7.50、15.00 g·kg⁻¹)组, 模型组和 CFM 低、中、高剂量组连续 3 d ip 80 mg·kg⁻¹ 的环磷酰胺(CTX)建立免疫抑制模型, 对照组和 CFM 单给药组不造模, 仅 ip 等体积 0.9% 氯化钠溶液。造模结束后, 每天 ig 给药 1 次, 连续给药 10 d, 对照组和模型组 ig 等体积 0.9% 氯化钠溶液。末次给药 24 h 后取材, 流式细胞术检测小鼠外周血 Th1、Th2 细胞水平及其表面活化(CD38、CD69)和耗竭[CD95、程序性死亡受体 1(PD-1)]分子的表达水平, 脾脏 CD3⁺CD4⁺T 细胞中 γ 干扰素(IFN- γ)、白细胞介素(IL)-2、IL-10 细胞因子水平。结果 与对照组比较, 模型组外周血 Th1/Th2 细胞向 Th1 型偏移, Th1 细胞上 CD38、CD95、PD-1 的表达显著升高($P < 0.001$), Th2 细胞上 CD38、PD-1 的表达显著升高($P < 0.05$ 、 0.001), 脾脏 CD3⁺CD4⁺T 细胞中 IFN- γ 的表达显著升高($P < 0.001$); 与模型组比较, CFM 3.75 g·kg⁻¹ 组外周血 Th1/Th2 趋于平衡稳态, Th1 细胞中 CD38、PD-1 的表达、Th2 细胞 CD38、PD-1 的表达均显著下降($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 小鼠脾脏 CD3⁺CD4⁺T 细胞中 IFN- γ 和 IL-2 表达均显著下降($P < 0.05$), IL-10 的表达显著上升($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。单给 CFM 并不改变正常小鼠的 Th1/Th2 平衡及功能。结论 CFM 改善免疫抑制小鼠外周血 Th1/Th2 细胞向 Th1 型偏移, 对免疫抑制小鼠外周血 Th1、Th2 细胞的活化、耗竭具有正向调节作用, 促进 Th2 细胞分泌 IL-10, 抑制 Th1 细胞分泌 IFN- γ 、IL-2。

关键词: 复方扶芳藤合剂; 免疫抑制; Th1/Th2; 免疫活化; 免疫耗竭; γ 干扰素; 白细胞介素-2; 白细胞介素-10

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)11-2517-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.11.007

Effect of Compound Fufangteng Mixture on Th1/Th2 cell level in immunosuppressed mice

LI Kaiqi, WU Zhanshuai, LIU Xian, PENG Lishan, CHEN Guo, LI Jianming, WU Yuerong, XIAO Jian

Key Laboratory of Translational Medicine of Integrated Traditional and Western Medicine for Highly Prevalent Infectious Diseases, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200, China

Abstract: **Objective** To investigate the regulatory effect of Compound Fufangteng Mixture (CMF) on Th1/Th2 cell level in immunosuppressed mice. **Methods** Balb/c mice were randomly divided into control group, single CFM low, medium, and high dose (3.75, 7.50, 15.00 g·kg⁻¹) groups, model group, CFM low, medium, and high dose groups, model group, and CFM low, medium, and high dose groups that were ip with 80 mg·kg⁻¹ of CTX for three consecutive days to establish an immunosuppressive model. The control group and CFM single-dose group were not subjected to modeling and were ip with an equal volume of 0.9% sodium chloride solution. After modeling was completed, the mice were ig given the drug once daily for 10 consecutive days. The control group and model group were ig given an equal volume of 0.9% sodium chloride solution. After the last drug administration, the mice were sacrificed and the peripheral blood Th1/Th2 cell levels, the surface activation (CD38, CD69) and exhaustion [CD95, programmed death receptor 1 (PD-1)] molecule expression levels, and the levels of cytokines interferon gamma (IFN- γ), interleukin (IL)-2, and IL-10 in the spleen CD3⁺CD4⁺T cells were detected by flow cytometry. **Results** Compared with the control group, the Th1/Th2 cells in the peripheral blood of the model group shifted towards the Th1 type. The expressions of CD38, CD95, and PD-1 on Th1 cells were significantly increased ($P < 0.001$), and the expressions of CD38 and PD-1 on Th2 cells were significantly

收稿日期: 2024-08-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81860780); 广西自然科学基金资助项目(2020GXNSFAA297162)

第一作者: 李开奇, 男, 在读硕士研究生, 研究方向为中医药防治疾病的现代科学基础研究。E-mail: 757266169@qq.com

*通信作者: 肖 健, 男, 教授, 研究方向为中医药免疫调节。E-mail: 78782133@qq.com

increased ($P < 0.05, 0.001$). The expression of IFN- γ in the spleen CD3⁺CD4⁺ T cells was significantly increased ($P < 0.001$). Compared with the model group, the Th1/Th2 in the peripheral blood of the CFM 3.75 g·kg⁻¹ group tended to be in a balanced and stable state. The expressions of CD38 and PD-1 on Th1 cells and the expressions of CD38 and PD-1 on Th2 cells were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). The expressions of IFN- γ and IL-2 in the spleen CD3⁺CD4⁺ T cells of mice were significantly decreased ($P < 0.05$), and the expression of IL-10 was significantly increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). The single administration of CFM did not change the Th1/Th2 balance and function of normal mice. **Conclusion** CFM improves the shift of Th1/Th2 cells in the peripheral blood of immunosuppressed mice towards the Th1 type. It has a positive regulatory effect on the activation and exhaustion of Th1 and Th2 cells in the peripheral blood of immunosuppressed mice, promotes the secretion of IL-10 by Th2 cells, and inhibits the secretion of IFN- γ and IL-2 by Th1 cells.

Key words: Compound Fufangteng Mixture; Th1/Th2; immunosuppression; immune activation; immune exhaustion; interferon- γ ; interleukin-2; interleukin-10

免疫系统具有识别和清除外来抗原以及体内突变细胞,维持机体内环境稳定的功能。免疫功能低下或异常,会增加罹患疾病的机率。通常机体在正常情况下 Th1/Th2 细胞处于相对平衡状态。当 Th1/Th2 细胞之间的平衡被打破,可能导致多种疾病发生,如人类免疫缺陷病毒阳性(HIV⁺)患者体内 Th1/Th2 向 Th2 偏移的状态下,会增加念珠菌在口腔内的定殖;对恶性肿瘤患者进行电离辐射治疗过程中, Th1 细胞占据主导地位状态下, Th1 型细胞 γ 干扰素(IFN- γ)、白细胞介素(IL)-2等促炎细胞因子过度释放会增加肺部、肠道以及脑部的放射性损伤。

中医理论认为,正气可以抵御和驱逐外邪的侵袭,恢复人体的调节能力,保持脏腑功能的协调。疾病的发生发展及转变过程由机体内的邪正盛衰决定着。《素问·刺法论》:“正气存内,邪不可干”。《瘟疫论》曰:“本气充实,邪不能入”。当正气充足时,可以驱走内外致病因素,维持人体健康。当正气不足时,就会导致各种疾病的发生。扶正祛邪是中医治病的基本原则,与现代的免疫观念不谋而合。复方扶芳藤合剂(CFM)是以扶芳藤、红参、黄芪为主要组成的一种独特而有优势的中成药,具有益气养血、健脾养心的功效,主治气血亏虚、心脾两虚、神疲乏力、胸闷、气短懒言等虚劳症状。因 CFM 具有提高机体免疫功能、抗氧化、抗衰老的功能^[1-2],在临床上常用于治疗免疫功能低下相关疾病,但对其具体的免疫调节机制仍知之甚少。

既往研究表明,CFM可提高白细胞在肿瘤化疗中的恢复速率,促进溶血素生成,增强巨噬细胞吞噬活性,提高淋巴细胞转化率^[3]。本课题组前期研究^[4]发现,CFM对免疫抑制小鼠自然杀伤(NK)细胞 CD2、CD69、CD95、PD-1 的表达具有调节作用。Th1、Th2 既参与细胞免疫,也参与体液免疫,是适应

性免疫应答的重要组成部分。探究 CFM 对 Th1、Th2 的调节作用,可为 CFM 的临床应用提供实验依据,为研发针对免疫功能损害的免疫调节剂夯实基础。本研究采用环磷酰胺(CTX)制备免疫抑制模型^[5-6],分别观察 CFM 对机体在正常状态和免疫抑制状态下 Th1、Th2 及相关细胞因子的调节作用。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 40 只,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,实验动物生产许可证号 SCXK(京)2019-0010,6~8 周龄,体质量(20±2)g,检疫合格 NO.110324230100502216。小鼠饲养于 SPF 级动物实验室,正常养殖温度为(22±2)°C,平均相对湿度为(55±5)%,光/暗更替时间为 12 h,可自由饮水和摄食,动物实验获得广西中医药大学 IACUC 动物伦理使用批准(编号 DW20211228-568)。

1.2 药品及主要试剂

CFM(广西中医药大学附属百年乐药厂,批号 20210709);注射用环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 2B519A,规格每瓶 0.2 g);小鼠外周血、脾脏淋巴细胞分离液试剂盒(Solarbio 公司);磷酸盐缓冲液(PBS, Hyclon 公司);抗体:Alexa Fluor[®] 700 抗小鼠 CD3、APC/Fire™ 750 抗小鼠 CD4、Brilliant Violet 605™ 抗小鼠 IFN- γ 、Brilliant Violet 421™ 抗小鼠 IL-2、PE 抗小鼠 IL-4、Brilliant Violet 421™ 抗小鼠 CD194(CCR4)、Brilliant Violet 650™ 抗小鼠 CD69、APC 抗小鼠 CD95(Fas)(Biolegend 公司),BV650 大鼠抗小鼠 IL-10、BB700 Rat 抗小鼠 CD38(BD 公司),CD183(CXCR3) Monoclonal Antibody(CXCR3-173) SuPer Bright™ 600(Thermo 公司),大鼠抗小鼠 CD279: AF488(Bio-Rad 公司)。

1.3 主要仪器

CytoFLEX S 流式细胞仪 (BeckMen Coulter 公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药

SPF 级 Balb/c 小鼠 40 只, 适应性喂养 1 周后, 随机分为: 对照组, 单给 CFM 低、中、高剂量 (3.75 、 7.50 、 $15.00 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组, 模型组, CFM 低、中、高剂量 (3.75 、 7.50 、 $15.00 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组, 模型组和 CFM 低、中、高剂量组连续 3 d ip $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 CTX 建立免疫抑制模型^[7], 对照组和 CFM 单给药组不造模, 仅 ip 等体积 0.9% 氯化钠溶液。造模结束后, 每天 ig 给药 1 次, 连续给药 10 d, 对照组和模型组 ig 等体积 0.9% 氯化钠溶液。

2.2 单核细胞悬液的制备与检测

给药结束后, 将小鼠麻醉 (3% 异氟烷气体麻醉 5 min), 称质量, 眼球采血, 滴至肝素钠采血管中。取脾脏, 称质量, 计算脾脏指数。

用 0.9% 氯化钠溶液清洗脾脏, 放入有少量全血及组织稀释液或磷酸盐缓冲液 (PBS) 的培养皿中, 用滤网研磨成悬液 (冰上操作)。用淋巴细胞分离液分离小鼠外周血和脾脏单核细胞。根据细胞计数的结果, 配制成 3×10^4 个 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的细胞悬液。取配制好的脾脏细胞悬液各 $50 \mu\text{L}$ 加入适量 PMA/Ionomycin、BFA/Monensin Mixture 混匀, 37°C 孵育 6 h, 每隔 2 小时取出震荡。加入适量相应荧光素标记的抗体: CD3、CD4, 4°C 下避光孵育 30 min, 冷 PBS 洗 2 次。加入适量流式固定破膜剂, 4°C 下避光

孵育 15 min 后, 用 PBS 洗去, 按说明书加入适量抗体: IFN- γ 、IL-2、IL-10 避光孵育 25 min 后, 用 PBS 洗去。

外周血单个核细胞悬液各 $50 \mu\text{L}$ 加入相应荧光素标记的抗体: CD3、CD4、CXCR3、CCR4、CD38、CD69、CD95、程序性死亡受体 1 (PD-1), 20 min 后, 用 PBS 洗去未结合抗体, 上机检测各指标表达情况。

2.3 统计分析

所有数据均采用 GraphPad Prism 9.0 软件系统完成解析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。满足正态分布的数据, 2 组数据之间采用 t 检验, 多组数据之间采用 Ordinary one way ANOVA 检验; 不满足正态分布条件的数据间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验。

3 结果

3.1 CFM 对小鼠外周血 Th1 (CD3⁺CD4⁺CXCR3⁺)、Th2 (CD3⁺CD4⁺CCR4⁺) 细胞比例的影响

3.1.1 CFM 对小鼠外周血 Th1 (CD3⁺CD4⁺CXCR3⁺) 细胞比例的影响 模型组和 CFM 15.00 、 $7.50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 Th1 细胞比例显著高于对照组 ($P < 0.001$); 而 CFM $3.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 Th1 细胞比例明显低于模型组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。结果见图 1、表 1。

3.1.2 CFM 对小鼠外周血 Th2 (CD3⁺CD4⁺CCR4⁺) 细胞比例的影响 模型组和 CFM 3.75 、 $7.50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组外周血 Th2 细胞比例明显高于对照组 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 而 CFM $15.00 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 Th2 细胞比例与对照组比较没有差异; 与模型组比较, CFM $3.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$

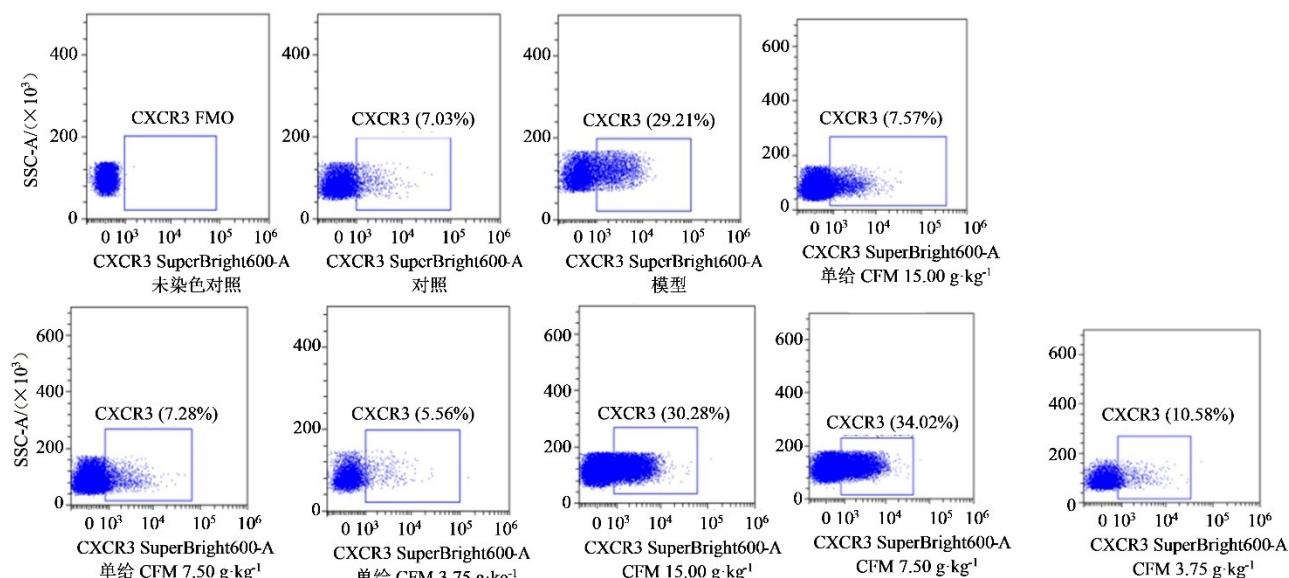


图 1 各组小鼠外周血 Th1 细胞比例

Fig. 1 Percentage of Th1 cells in peripheral blood of mice in each group

表1 外周血 Th1、Th2 细胞比例 ($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 1 Percentage of Th1 and Th2 cells in peripheral blood ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Th1/%	Th2/%
对照	—	11.06±5.40	1.16±0.29
单给 CFM	15.00	8.96±0.93	1.52±0.79
	7.50	7.06±2.72	0.84±0.36
	3.75	8.01±3.58	1.04±0.41
模型	—	29.84±9.68***	3.36±1.15**
CFM	15.00	30.82±7.85***	2.26±0.21
	7.50	32.43±5.78***	3.03±1.33*
	3.75	10.67±1.40###	3.95±1.51***

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group.

组外周血 Th2 细胞比例呈升高趋势。结果见图2、表1。

结果表明,造模后 Th1/Th2 平衡向 Th1 型偏移, 3.75 g·kg⁻¹ CFM 恢复 Th1/Th2 平衡效果最佳, 选择 3.75 g·kg⁻¹ 进行后续实验。

3.2 CFM 对小鼠外周血 Th1、Th2 细胞活化、耗竭指标的影响

3.2.1 CFM 对小鼠外周血 Th1 (CD3⁺CD4⁺CXCR3⁺) 细胞活化、耗竭指标表达的影响 模型组小鼠外周血 Th1 细胞上 CD38、CD95、PD-1 的表达显著高于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.001$); 与模型组比较, CFM 组 CD38、PD-1 的表达显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。结果见表2。

3.2.2 CFM 对小鼠外周血 Th2 (CD3⁺CD4⁺CCR4⁺) 细胞活化、耗竭指标表达的影响 模型组小鼠外周血 Th2 细胞上 CD38、PD-1 的表达高于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.001); CFM 组外周血 Th2 细胞上 CD38、PD-1 表达显著低于模型组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见表3。

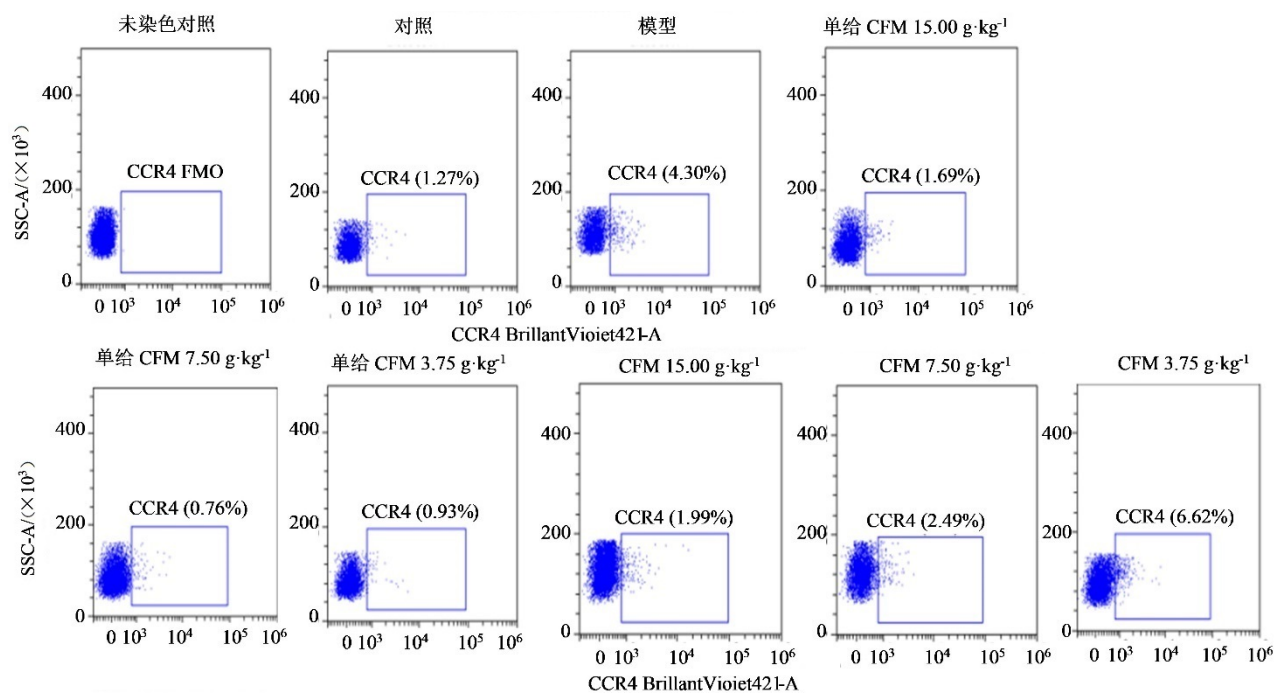


图2 各组小鼠外周血 Th2 细胞比例

Fig. 2 Percentage of Th2 cells in peripheral blood of mice in each group

表2 各组小鼠外周血 Th1 细胞亚群表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 2 Expression of Th1 cell subsets in peripheral blood of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	CD38 ⁺ /%	CD95 ⁺ /%	PD-1 ⁺ /%
对照	—	52.08±9.95	45.04±7.12	30.08±4.42
模型	—	85.92±4.05***	69.03±6.43***	58.77±7.88***
单给 CFM	3.75	53.36±8.20	58.05±8.46	31.70±5.35
CFM	3.75	65.03±2.74##	70.92±6.26	37.61±2.18###

与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

表3 各组小鼠外周血Th2细胞亚群表达情况($\bar{x}\pm s, n=5$)
Table 3 Expression of Th2 cell subsets in peripheral blood of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	CD38 ⁺ /%	PD-1 ⁺ /%
对照	—	55.32±7.04	18.86±5.18
模型	—	68.03±6.12*	43.95±5.30***
单给CFM	3.75	52.99±4.12	20.24±3.25
CFM	3.75	60.33±4.60 [#]	29.51±5.32 ^{##}

与对照组比较: * $P<0.05$ *** $P<0.001$; 与模型组比较: $^{\#}P<0.05$ $^{##}P<0.01$ 。

* $P<0.05$ *** $P<0.001$ vs control group; $^{\#}P<0.05$ $^{##}P<0.01$ vs model group.

3.3 CFM对小鼠脾脏CD3⁺CD4⁺T细胞中IFN- γ 、IL-2、IL-10细胞因子分泌的影响

3.3.1 CFM对小鼠脾脏中CD3⁺CD4⁺T细胞中

IFN- γ 分泌的影响 模型组脾脏CD3⁺CD4⁺T细胞中IFN- γ 的表达显著高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.001$);CFM组脾脏CD3⁺CD4⁺T细胞中IFN- γ 的表达较模型组显著降低($P<0.001$)。结果见图3、表4。

3.3.2 CFM对小鼠脾脏中CD3⁺CD4⁺T细胞中IL-2分泌的影响 模型组脾脏CD3⁺CD4⁺T细胞中IL-2的表达与对照组相比略有升高趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$);CFM组脾脏CD3⁺CD4⁺T细胞中IL-2的表达与模型组相比明显下降,差异具有统计学意义($P<0.05$)。结果见图3、表4。

3.3.3 CFM对小鼠脾脏CD3⁺CD4⁺T细胞中IL-10分泌的影响 小鼠脾脏CD3⁺CD4⁺T细胞中IL-10的表达在对照组、模型组之间的差异无统计学意义

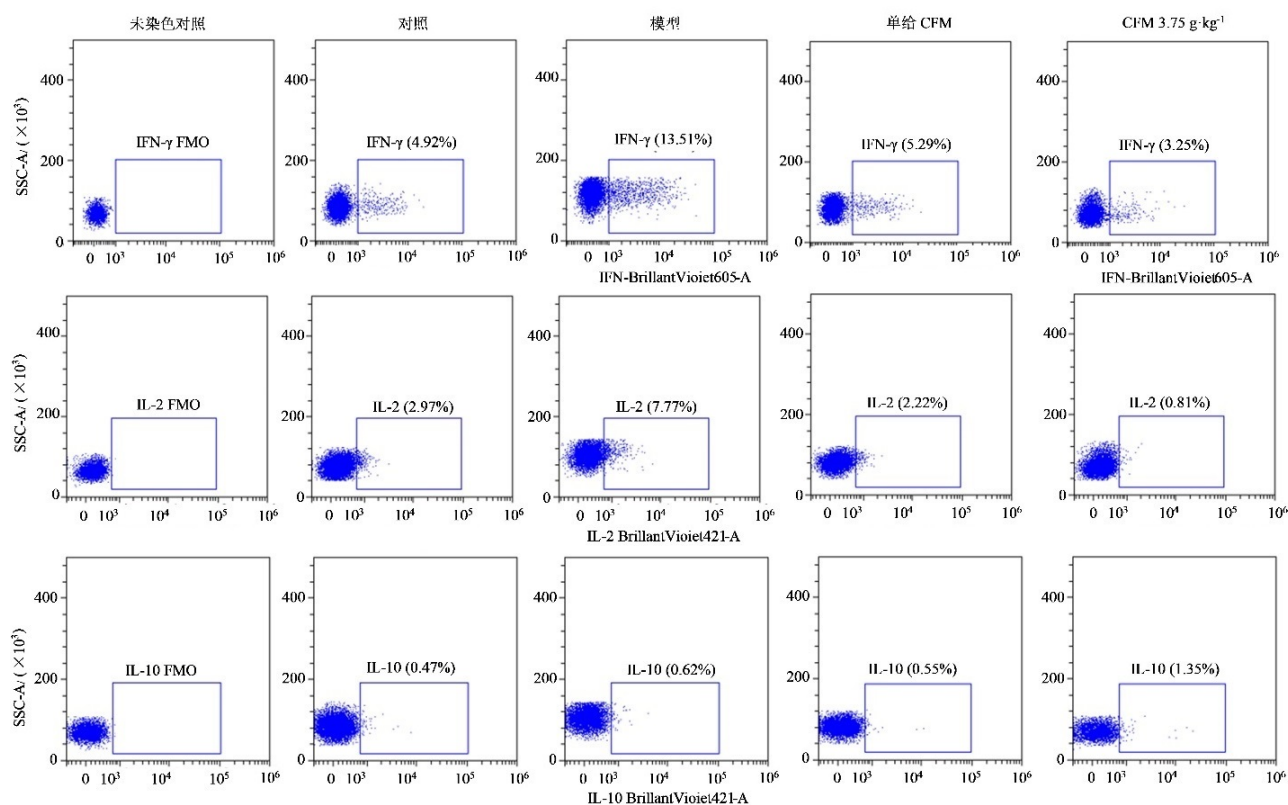


图3 小鼠脾脏中CD3⁺CD4⁺T细胞中IFN- γ 、IL-2、IL-10细胞因子表达

Fig. 3 Expression of IFN - γ , IL-2, IL-10 cytokines in CD3+CD4+T cells of mouse spleen

表4 小鼠脾脏中CD3⁺CD4⁺T细胞中IFN- γ 、IL-2、IL-10细胞因子表达($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IFN- γ ⁺ /%	IL-2 ⁺ /%	IL-10 ⁺ /%
对照	—	5.326±0.567	3.555±2.096	0.538±0.028
模型	—	15.740±0.391***	5.867±1.125	0.666±0.155
单给CFM	3.75	5.898±0.749	3.090±1.568	0.576±0.121
CFM	3.75	5.040±1.178 ^{###}	0.806±0.141 [#]	1.118±0.082 ^{##}

与对照组比较: *** $P<0.001$; 与模型组比较: $^{\#}P<0.05$ $^{##}P<0.01$ $^{###}P<0.001$ 。

*** $P<0.001$ vs control group; $^{\#}P<0.05$ $^{##}P<0.01$ $^{###}P<0.001$ vs model group.

义($P>0.05$);CFM组小鼠脾脏CD3⁺CD4⁺T细胞中IL-10的表达高于模型组,差异具有统计学意义($P<0.01$)。结果见图3、表4。

4 讨论

CFM中红参大补元气、复脉固脱^[8];黄芪补气升阳、固表止汗、托毒排脓^[9];扶芳藤作为广西道地药材具有补气止血、健肾强骨、安胎的功效^[10];三者共用发挥其补气养血之功效。从现代药理学研究看,方中中药含有多种免疫调节有效成分:扶芳藤的主要成分为三萜类、木质素、黄酮类、糖醇类,对免疫系统的调控作用可能与黄酮类以及多糖类成分有关^[11]。肖艳芬等^[12]发现,扶芳藤提取物能显著提高小鼠巨噬细胞吞噬率和淋巴细胞转化率。黄芪的主要成分为黄芪多糖(APS)、黄酮类、皂苷类等。黄芪总黄酮可有效治疗小鼠多发性硬化症,抑制Th17和Th1细胞比例^[13]。黄芪皂苷能上调T淋巴细胞表面标志CD44、CD25表达^[14]。人参含有的主要化学成分有皂苷、多糖类等。人参皂苷Rh₁可通过调节Th1/Th2细胞因子平衡来减轻小鼠模型中卵清蛋白诱导的哮喘^[15],Chen等^[16]发现人参皂苷H滴丸与CTX联合可通过调节Th1/Th2平衡抑制非小细胞肺癌术后复发。由三者共同制备而成的CFM的免疫调节作用也有相关报道,扶芳藤合剂含药血清能有效促进大鼠骨髓间充质干细胞增殖并上调Notch信号通路,进而启动细胞增殖、分化等程序^[17]。CFM能够提高HIV/艾滋病(AIDS)患者被破坏的CD4⁺T淋巴细胞水平^[18]。项目组前期研究表明,CFM能下调外周血NK细胞CD95、PD-1表达水平,上调CD11b⁺单核细胞CD69表达水平^[4,19]。

Th1/Th2平衡主要通过检测特定细胞因子或通过评估T细胞上的趋化因子受体来评估^[20]。趋化因子及其受体是免疫防御重要参与者,引导和控制白细胞的迁移、激活、分化和存活^[21]。CXCR3在效应T细胞向炎症和肿瘤部位迁移过程中起到重要作用,主要表达于活化的Th1细胞^[22];CCR4主要表达于Th2细胞^[23]。本研究结果表明,给予CTX后,Th1(CD3⁺CD4⁺CXCR3⁺)细胞显著增多,Th2(CD3⁺CD4⁺CCR4⁺)细胞变化不明显,导致了Th1/Th2向Th1偏移,通过给予CFM干预可显著纠正这一偏移现象,上述研究仅反映了CFM影响Th1、Th2细胞表达频率这一现象,要进一步探索CFM对Th细胞的调节机制,有必要对其免疫状态及功能进行检测。因低剂量的CFM恢复Th1/Th2平衡效果最佳,因此后续研究均采用低剂量进行实

验分析。

在抗原的持续刺激下,T细胞动态地从活化状态转化为耗竭状态。CD38是一种II型跨膜糖蛋白,出现于细胞活化早期,影响免疫细胞的活化、增殖^[24];CD69是膜结合的II型C-凝集素受体,淋巴细胞活化在其诱导细胞表面受体间结合^[25]。PD-1是B7:CD28超家族的成员,与PD-L1/PD-L2结合后启动细胞程序性死亡^[26];CD95是肿瘤坏死因子超家族的细胞表面受体,与其配体CD95L结合介导细胞凋亡以维持免疫稳态^[27]。研究结果显示,模型组小鼠外周血Th1细胞上CD38、CD95、PD-1表达上调,Th2细胞上CD38、PD-1表达上调,CFM组CD38、PD-1表达较模型组显著下调,提示CTX会导致Th1、Th2细胞处于高度活化耗竭状态,而CFM能逆转这一现象,其调节机制可能是通过PD-1/PD-L1而非CD95/CD95L信号通路实现的。

根据CD4⁺T细胞克隆产生细胞因子类别及其功能的不同,可将其分为不同亚群,Th1和Th2是其中的2种主要亚群^[28]。Th1分泌IL-2、IFN- γ 促炎细胞因子,Th2细胞分泌的IL-10可抑制Th1细胞克隆和IL-2、IFN- γ 的合成。研究结果显示,模型组CD4⁺T细胞IFN- γ 的表达升高而IL-2、IL-10的表达水平未发生差异性改变,而CFM组CD4⁺T细胞IFN- γ 的表达处于正常水平。该结果表明CFM可恢复CTX导致的IFN- γ 异常升高。CFM组IL-10表达显著高于模型组,提示在Th1/Th2漂移的情况下,CFM可能通过促进Th2分泌IL-10抑制Th1细胞克隆,从而恢复比值平衡。值得注意的是,CFM组Th1、Th2及其活化耗竭水平,细胞因子表达水平与对照组之间均无统计学差异,提示CFM并不改变正常机体的Th1/Th2平衡及功能。

CTX是临床常用化疗药物,但存在免疫抑制等不良反应。本研究发现CFM可调节CTX引起的小鼠外周血Th1/Th2细胞向Th1型偏移,其调节机制可能是通过下调Th1、Th2细胞PD-1表达,下调细胞因子IFN- γ ,上调IL-10实现的。研究结果可为CFM合并化疗药物发挥“减毒增敏”作用提供实验依据,扩大CFM的临床应用范围。值得注意的是,CFM并不改变正常机体的Th1/Th2平衡及功能,因此CFM具有开发为一种安全有效的免疫调节剂的潜力。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 何天富,陈洪涛,陈晓艺,等. 壮药复方扶芳藤合剂技术提升及再评价研究进展[J]. 中国当代医药, 2021, 28

- (18): 30-35.
He T F, Chen H T, Chen X Y, et al. Research progress on technology upgrading and reevaluation of Zhuang medicine Compound Fufangteng Mixture [J]. China Mod Med, 2021, 28(18): 30-35.
- [2] 梁镭伊, 刘显, 肖健. 复方扶芳藤合剂的方式分析与研究进展 [J]. 大众科技, 2020, 22(8): 56-60.
Liang R Y, Liu X, Xiao J. Compatibility analysis and research progress on compound Fufangteng mixture [J]. Pop Sci Technol, 2020, 22(8): 56-60.
- [3] 温奇龙, 张明, 银喆, 等. 扶芳藤的研究进展 [J]. 广西中医药大学学报, 2019, 22(3): 66-70.
Wen Q L, Zhang M, Yin Z, et al. Research advances in fortune *Euonymus* [J]. J Guangxi Univ Chin Med, 2019, 22(3): 66-70.
- [4] 李建明, 彭丽珊, 刘显, 等. 复方扶芳藤合剂对免疫抑制小鼠NK细胞的调节作用研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2023, 5(5): 1-18.
Li J M, Peng L S, Liu X, et al. Study on the regulatory effect of compound Fufangteng mixture on NK cells in immunosuppressed mice [J]. J Shenyang Pharm Univ, 2023, 5(5): 1-18.
- [5] Idle J R, Beyoğlu D. Ifosfamide - History, efficacy, toxicity and encephalopathy [J]. Pharmacol Ther, 2023, 243: 108366.
- [6] Lőrinczy D. Cyclophosphamide treatment evoked side effects on skeletal muscle monitored by DSC [J]. J Therm Anal Calorim, 2020, 142(5): 1897-1901.
- [7] 徐敬娅, 马欣雨, 赵佳鹤, 等. 人参、附子药对配伍及其温阳功效研究概况 [J]. 河北中医, 2022, 44(7): 1224-1228.
Xu J Y, Ma X Y, Zhao J H, et al. Overview of the research on the compatibility and warming effect of ginseng and aconite herbs [J]. Hebei J Tradit Chin Med, 2022, 44(7): 1224-1228.
- [8] Zhang Z, Mwizerwa Muhindo E, Wang S, et al. Structural characteristics and immunostimulatory activity of sea cucumber tendon polysaccharides in cyclophosphamide-induced Balb/c mice [J]. Food Funct, 2022, 13(16): 8627-8642.
- [9] 申艳, 王可彬, 杜雅薇, 等. 论黄芪主痈疽久败疮 [J]. 吉林中医药, 2022, 42(11): 1329-1336.
Shen Y, Wang K B, Du Y W, et al. Discussion on the effect of milkvetch root on ulcers and chronic sores [J]. Jilin J Chin Med, 2022, 42(11): 1329-1336.
- [10] 史明, 张文捷, 李健, 等. 壮药扶芳藤提取物调控骨代谢的体外实验研究 [J]. 西部中医药, 2021, 34(4): 14-16.
Shi M, Zhang W J, Li J, et al. *In-vitro* experimental study on Zhuang medicine Fufangteng extract regulating bone metabolism [J]. West J Tradit Chin Med, 2021, 34(4): 14-16.
- [11] 王林海, 卢健棋, 刘琛怡, 等. 扶芳藤化学成分、药理作用及临床应用 [J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(11): 2361-2364.
Wang L H, Lu J Q, Liu C Y, et al. Chemical composition, pharmacological fuction and clinical application of *Euonymus fortunei* [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2018, 45(11): 2361-2364.
- [12] 肖艳芬, 黄燕, 王琳, 等. 扶芳藤提取物对小鼠免疫功能的影响研究 [J]. 现代医药卫生, 2012, 28(12): 1768-1769, 1771.
Xiao Y F, Huang Y, Wang L, et al. Study on impact of *Euonymus fortunei* extract on immune functions in mice [J]. J Mod Med Health, 2012, 28(12): 1768-1769, 1771.
- [13] Han X Y, Xu N, Yuan J F, et al. Total flavonoids of *Astragalus* inhibit activated CD4⁺ T cells and regulate differentiation of Th17/Th1/treg cells in experimental autoimmune encephalomyelitis mice by JAK/STAT and NF-κB signaling pathways [J]. Am J Chin Med, 2023, 51(5): 1233-1248.
- [14] 赵榕慧, 顾瑛媛, 张霞, 等. 黄芪皂苷II调控CD45分子介导CD4⁺T细胞活化效应的研究 [J]. 国际中医中药杂志, 2019, 41(5): 481-486.
Zhao R H, Gu Y Y, Zhang X, et al. Study on ASI II triggered CD4⁺T cells activation through regulating CD45 molecular [J]. Int J Tradit Chin Med, 2019, 41(5): 481-486.
- [15] Li Q, Zhai C M, Wang G D, et al. Ginsenoside Rh1 attenuates ovalbumin-induced asthma by regulating Th1/Th2 cytokines balance [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2021, 85(8): 1809-1817.
- [16] Chen F F, Li X X, Wang J Y, et al. Combination of Ginsenoside H dripping pills and cyclophosphamide improve paraneoplastic syndrome and inhibit postoperative recurrence via the reversion of Th1/Th2 shift [J]. Biomed Pharm, 2018, 108: 865-875.
- [17] 吴玲玲, 陈继冰, 蒋鹏, 等. 复方扶芳藤合剂含药血清促进骨髓间充质干细胞增殖的作用机制 [J]. 器官移植, 2022, 13(3): 363-370.
Wu L L, Chen J B, Jiang P, et al. Mechanism of compound Fufangteng mixture-containing serum in promoting proliferation of bone marrow mesenchymal stem cell [J]. Organ Transplant, 2022, 13(3): 363-370.
- [18] 张夏, 罗伟生, 唐宏亮, 等. 复方扶芳藤合剂联合HAART治疗HIV/AIDS气虚血瘀证临床研究 [J]. 河南中医, 2019, 39(11): 1729-1732.
Zhang X, Luo W S, Tang H L, et al. Clinical study on the

- treatment of HIV/AIDS qi deficiency and blood stasis syndrome with compound Fufangteng mixture in combination with HAART [J]. *Henan Tradit Chin Med*, 2019, 39(11): 1729-1732.
- [19] 丁健, 陈果, 李建明, 等. 复方扶芳藤合剂影响免疫抑制小鼠 CD11b⁺单核细胞 CD69 的表达 [J]. *海南医学院学报*, 2023, 29(23): 1774-1779.
- Ding J, Chen G, Li J M, et al. Compound Fufangteng mixture affects the expression of CD69 on CD11b⁺ monocytes in immunosuppressed mice [J]. *J Hainan Med Univ*, 2023, 29(23): 1774-1779.
- [20] Watanabe S, Yamada Y, Murakami H. Expression of Th1/Th2 cell-related chemokine receptors on CD4⁺ lymphocytes under physiological conditions [J]. *Int J Lab Hematol*, 2020, 42(1): 68-76.
- [21] Liu H, Yang Z J, Lu W P, et al. Chemokines and chemokine receptors: A new strategy for breast cancer therapy [J]. *Cancer Med*, 2020, 9(11): 3786-3799.
- [22] Yu S, Shen J, Lao S, et al. Distinct functions of CXCR3⁺ and CCR4⁺CD4⁺ T-cells accumulated in human tuberculosis pleural fluid [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2018, 22(12): 1514-1522.
- [23] Bogacka J, Pawlik K, Ciapała K, et al. CC chemokine receptor 4 (CCR4) as a possible new target for therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(24): 15638.
- [24] Li Y L, Yang R, Chen L M, et al. CD38 as an immunomodulator in cancer [J]. *Future Oncol*, 2020, 16(34): 2853-2861.
- [25] Gorabi A M, Hajighasemi S, Kiaie N, et al. The pivotal role of CD69 in autoimmunity [J]. *J Autoimmun*, 2020, 111: 102453.
- [26] Cicala C M, Musacchio L, Scambia G, et al. Dostarlimab: From preclinical investigation to drug approval and future directions [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2023, 19(1): 2178220.
- [27] Wang H, Wang Q, Yang C M, et al. *Bacteroides acidifaciens* in the gut plays a protective role against CD95-mediated liver injury [J]. *Gut Microbes*, 2022, 14(1): 2027853.
- [28] Butcher M J, Zhu J F. Recent advances in understanding the Th1/Th2 effector choice [J]. *Fac Rev*, 2021, 10: 30.

[责任编辑 兰新新]