

基于 Hippo 信号通路探讨芪参益气滴丸调控 Th17/Treg 平衡改善心肌缺血再灌注损伤的研究

宋 惠^{1,4}, 杨斐斐^{1,4}, 唐伟智^{1,4}, 秦伟彬², 何贵新^{3*}, 张清伟^{2*}, 刘凌云¹, 朱子一¹, 欧阳彬¹

1. 广西中医药大学 第一临床医学院, 广西 南宁 530001

2. 广西中医药大学第一附属医院, 广西 南宁 530022

3. 广西中医药大学附属国际壮医医院, 广西 南宁 530001

4. 广西中医药防治医学分子生物重点实验室, 广西 南宁 530001

摘 要: **目的** 探索芪参益气滴丸(QSYQ)通过 MST/Hippo 信号通路对小鼠心肌缺血再灌注损伤(MIRI)后炎症反应的影响。**方法** 将 60 只 C57BL/6J 小鼠按随机数字表法分为 6 组:假手术组、模型组、XMU-MP-1(选择性抑制 Hippo 信号通路中的 MST 靶点, 1mg·kg⁻¹)组和 QSYQ 低、中、高剂量(5.85、11.70、23.40 g·kg⁻¹)组, 每组 15 只。造模前 QSYQ 组小鼠 ig 予以 QSYQ(用蒸馏水配制成混悬液)4 周, 20 mL·kg⁻¹, 每天给药 1 次, XMU-MP-1 组腹腔内注射 XMU-MP-1, 每隔 1 d 给药 1 次, 连续给药 4 周, 假手术组和模型组 ig 给予等量 0.9%氯化钠溶液。除假手术组外, 采用左冠状动脉前降支结扎术制备小鼠 MIRI 模型, 缺血 30 min 复灌 2 h 后取材。利用 TTC 染色评估心肌梗死面积百分比, HE 染色观察心脏组织病理改变, TUNEL 染色评估心肌细胞凋亡情况, ELISA 试剂盒检测血清炎症因子白细胞介素(IL)-6、IL-17A、肿瘤坏死因子(TNF)-α 水平; Western blotting 法检测各组中 p-MST、p-YAP、p-Tafazzin 蛋白(TAZ)、TEA 域转录因子 1 (TEAD1)的蛋白表达量; 流式细胞术检测外周血中 Th17、Treg 和 Th17/Treg 细胞比例。**结果** 与模型组比较, QSYQ 组及 XMU-MP-1 组小鼠心肌梗死面积百分比均显著减小($P<0.05$ 、 0.01); 心肌细胞结构损伤减轻, 炎症细胞浸润减少, 细胞凋亡数量减少; 促炎因子 IL-6、IL-17A、TNF-α 水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01); 心脏组织 p-MST、p-YAP、p-TAZ 蛋白表达显著降低, TEAD1 蛋白表达显著升高($P<0.05$ 、 0.01); 外周血中 Th17 细胞比例降低, Th17/Treg 动态平衡得到恢复($P<0.05$ 、 0.01)。**结论** QSYQ 可能通过抑制 MST/Hippo 信号通路, 发挥对 MIRI 的保护作用。

关键词: 芪参益气滴丸; 心肌缺血再灌注损伤; 炎症; Th17; Treg; MST; Hippo

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)07-1744-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.07.004

Investigation of regulation of Th17/Treg balance by Qishen Yiqi Dropping Pills to improve myocardial ischemia-reperfusion injury based on Hippo signaling pathway

SONG Hui^{1,4}, YANG Feifei^{1,4}, TANG Weizhi^{1,4}, QIN Weibin², HE Guixin³, ZHANG Qingwei², LIU Lingyun¹, ZHU Ziyi¹, OUYANG Bin¹

1. The First Clinical Medical College of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001, China

2. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530022, China

3. International Zhuang Medical Hospital Affiliated to Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001, China

4. Guangxi Key Laboratory of Molecular Biology of Preventive Medicine of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001, China

Abstract: Objective To explore the effects of Qishen Yiqi Dropping Pills on myocardial ischemia/reperfusion injury in mice through MST/Hippo signalling pathway. **Methods** Sixty C57BL/6J mice were randomly divided into six groups according to the random

收稿日期: 2024-12-11

基金项目: 国家中医药传承创新中心项目(2023019-11); 广西自然科学基金会重点项目(2020GXNSFDA297020); 国家自然科学基金项目(81960861); 研究生教育创新计划项目(YCBXJ2023033)

作者简介: 宋 惠(1995—), 女, 博士研究生, 研究方向为中西医结合防治心血管疾病。E-mail: song_hui0205@163.com

***通信作者:** 何贵新(1973—), 男, 博士, 博士生导师, 研究方向为中西医结合防治心血管疾病。E-mail: he_guixin@163.com

张清伟(1969—), 男, 主任医师, 研究方向为中医防治心血管疾病。E-mail: zqw1969n@163.com

number table method: sham operation group, model group, XMU-MP-1 group (selectively inhibiting the MST target in the Hippo signaling pathway, $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), and low-, medium-, and high-dose QSYQ groups (5.85 , 11.70 , and $23.40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), with 15 mice in each group. Four weeks before modeling, mice in the QSYQ groups were intragastrically administered QSYQ (prepared as a suspension with distilled water) at $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ once daily. Mice in the XMU-MP-1 group were intraperitoneally injected with XMU-MP-1 every other day for four weeks. Mice in the sham operation group and model group were ig administered the same volume of 0.9% sodium chloride solution. Except for the sham operation group, the mouse model of myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) was established by ligating the left anterior descending coronary artery. After 30 min of ischemia and 2 h of reperfusion, the samples were collected. TTC staining was used to assess the myocardial infarction rate, HE staining to observe the pathological changes in cardiac tissue, TUNEL staining to evaluate myocardial cell apoptosis, and ELISA kits to detect the levels of serum inflammatory factors interleukin (IL)-6, IL-17A, and tumor necrosis factor (TNF)- α . Western blotting was used to detect the protein expression levels of p-MST, p-YAP, p-Tafazzin (TAZ), and TEA domain transcription factor 1 (TEAD1) in each group. Flow cytometry was used to detect the proportions of Th17, Treg, and Th17/Treg cells in peripheral blood. **Results** Compared with the model group, the myocardial infarction rate in the QSYQ and XMU-MP-1 groups was significantly reduced ($P < 0.05$, 0.01); Myocardial cell structural damage was alleviated, inflammatory cell infiltration was reduced, and the number of apoptotic cells decreased; the levels of pro-inflammatory factors IL-6, IL-17A, and TNF- α were significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01); The protein expression of p-MST, p-YAP, and p-TAZ in cardiac tissue was significantly decreased, and the protein expression of TEAD1 was significantly increased ($P < 0.05$, 0.01); The proportion of Th17 cells in peripheral blood was decreased, and the dynamic balance of Th17/Treg was restored ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** QSYQ may exert a protective effect on MIRI by inhibiting the MST/Hippo signaling pathway.

Key words: Qishen Yiqi Dropping Pills; myocardial ischemia/reperfusion injury; inflammatory; Th17; Treg; MST; Hippo

急性心肌梗死是心血管病科的急危重症, 最早的再灌注治疗能够有效挽救濒危心肌, 同时不可避免的会带来心肌缺血再灌注损伤 (MIRI), MIRI 的病理过程包括产生过多的自由基、线粒体肿胀并激活促凋亡的级联反应和自噬功能障碍等^[1]。研究显示免疫系统的激活及由此引起的炎症反应也是造成 MIRI 损伤的重要原因^[2], 贯穿 MIRI 发生发展的全过程。因此, 如何从抑制炎症反应的角度缓解或逆转 MIRI 一直都是心血管研究的热点, 对于进一步挽救梗死心肌, 改善患者预后, 有着重大的意义。

芪参益气滴丸 (QSYQ) 是国内治疗心肌梗死和心力衰竭气虚血瘀证的常用中药复方制剂^[3-5], 本课题组前期已经证实 QSYQ 可以通过激活磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号和 ATP 敏感的钾 (KATP) 通道开放^[6]、改善心肌钙稳态^[7]等方式, 减轻氧化应激损伤, 减少心肌细胞凋亡, 从而改善 MIRI 后的心功能。研究显示, MIRI 和 Hippo 信号通路的激活有着密切联系, 因此, 本实验采用小鼠冠状动脉结扎松解法建立 MIRI 模型, 基于 Hippo 信号通路研究 QSYQ 对 MIRI 的保护作用, 以期为 QSYQ 治疗 MIRI 的临床应用提供更多的科学依据。

1 材料

1.1 动物

成年雄性 C57BL/6J 小鼠, 体质量 (22 ± 2) g,

购自湖南斯莱克实验动物有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (湘) 2019-0004, 饲养于广西中医药大学科学实验中心的 SPF 级动物实验室内, 实验动物使用许可证号 SYXK (桂) 2019-0001, 环境温度维持在 $20 \sim 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 湿度维持在 (50 ± 10)%; 每日光暗交替各 12 h, 自由进食饮水。本研究由广西中医药大学实验动物伦理委员会审核通过, 动物实验方案设计合理, 实验方法和目的符合人类的道德伦理标准和国际惯例, 批准编号 DW20240507-111。

1.2 药物与主要试剂

QSYQ (规格: 每袋 0.5 g, 产品批号 210101, 天津天士力制药股份有限公司); XMU-MP-1 (货号 S84336, 上海源叶生物科技有限公司); TUNEL 试剂盒 (绿光) (货号 C1086, 上海碧云天生物技术有限公司); TEA 域转录因子 1 (TEAD1)、p-YAP 抗体 (货号 AB133533、AB76252, 英国 ABCAM 生物公司); p-Tafazzin 蛋白 (TAZ)、p-MST、GAPDH 抗体 (货号 AF4315、AF2367、AF7021, 美国 Affinity 生物公司); 白细胞介素-17A (IL-17A)、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 试剂盒 (货号 BSEM-041、BSEM-006、BSEM-004, 安徽 Biosharp 生物技术有限公司); 小鼠 Th17 染色试剂盒、小鼠调节性 T 细胞染色试剂盒 (货号 KTH217、KTR201, 杭州联科生物技术有限公司)。

1.3 仪器

TB-3000B 单通道小动物人工呼吸机(原阳县振华教学仪器有限公司); ECG-303B 数字心电图机(广州市三锐电子科技有限公司), ELX800 酶标仪(Biotek 公司); SW.TFG-15 生物安全柜(广州瑞智净化设备有限公司); BX43 荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司); TL-650Y 超声波细胞破碎仪(江苏天翎仪器有限公司); CytoFLEX S 流式细胞仪(BeckMen Coulter 公司)。

2 方法

2.1 分组与给药

将小鼠按随机数字表法分为 6 组: 假手术组、模型组、XMU-MP-1(选择性抑制 Hippo 信号通路中的 MST 靶点, $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组和 QSYQ 低、中、高剂量(5.85 、 11.70 、 $23.40\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组, 每组 15 只。造模前 QSYQ 组小鼠 ig 予以 QSYQ(用蒸馏水配制成混悬液) 4 周, $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, 每天给药 1 次, XMU-MP-1 组腹腔内注射 XMU-MP-1, 每隔 1 d 给药 1 次, 连续给药 4 周。假手术组和模型组 ig 给予等量 0.9% 氯化钠溶液, 每天 1 次。

2.2 MIRI 模型建立及取材方案

采用左冠状动脉前降支结扎术制备小鼠 MIRI 模型^[8], ip 0.3% 戊巴比妥钠麻醉小鼠, 开胸充分暴露心脏后, 在左心耳下源 $1\sim 2\text{ mm}$ 处以 6-0 丝线进针并打一个活结, 肉眼可见结扎线至心尖部位的心肌变苍白, 心电图见 ST 段抬高, 说明结扎成功。缺血 30 min 后拉开活结线头进行复灌 2 h, 假手术组只穿线不打结。在本实验过程中小鼠存活率约为 86.67% 。复灌 2 h 后取材时, 予以小鼠 ip 戊巴比妥钠安乐死后, 通过摘除眼球收集血液样本, 取出心脏并分离出心室组织。

2.3 TTC 染色观察心肌梗死面积

每组随机取 3 只小鼠心脏组织, 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中速冻 15 min, 按横截面方向将心脏切成片状, 每片厚度 1 mm 。将切好的心脏片放入 2% TTC 溶液中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光条件下孵育 15 min, 为使染色均匀, 需每隔 $3\sim 5\text{ min}$ 翻动 1 次。 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后, 按横截面方向排列, 进行拍照, 使用 Image J 软件对心肌梗死面积进行量化, 计算心肌梗死面积百分比。

心肌梗死面积百分比 = 梗死面积/总面积

2.4 苏木精-伊红(HE)染色观察心脏组织病理改变

取大鼠心脏心尖部位组织, 置于 4% 多聚甲醛

中固定 48 h, 梯度脱水后使用石蜡包埋切片, 脱蜡复水, 苏木素染液染色 3 min, 自来水冲洗, 返蓝, 伊红染液染色 5 min, 冲洗, 中性树胶封片, 光学显微镜观察, 选取目标区域进行拍照、分析。

2.5 TUNEL 染色评估心肌细胞凋亡情况

石蜡包埋切片, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烤片约 4.5 h, 二甲苯脱蜡 2 次, 梯度乙醇水化; 用 Proteinase K 工作液 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理组织 20 min, 使用 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 3 次, 每次 5 min; 将 $50\text{ }\mu\text{L}$ TdT 与 $450\text{ }\mu\text{L}$ 荧光素标记的 dUTP 液混匀制备 TUNEL 反应混合液, 在每个组织上加 $50\text{ }\mu\text{L}$ TUNEL 反应混合液, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 湿盒中避光反应 1 h; PBS 漂洗 3 次, 滴加 $100\text{ }\mu\text{L}$ DAPI 染色液于样本上, 室温避光条件下, 孵育 20 min; 漂洗 3 次后, 用水溶性封片剂封片。在荧光显微镜下, 用 488 nm 绿色波长观察并拍照, 凋亡细胞核呈现绿色荧光, DAPI 染色细胞核呈现蓝色荧光。

2.6 ELISA 试剂盒检测血清 IL-1 β 、IL-17A、TNF- α 水平

通过眼球摘除采血, 将血液收集至 1.5 mL 离心管中, 室温下静置 2 h。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $3000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下离心 15 min, 吸取上层血清并分装, 按试剂盒说明书检测血清中 IL-1 β 、IL-17A、TNF- α 水平。

2.7 Western blotting 法检测各组中 p-MST、p-YAP、p-TAZ、TEAD1 的蛋白表达量

小鼠心脏组织剪碎, 提取组织中总蛋白。将制备好的蛋白样品加至凝胶孔中, 80 V 稳压状态进行电泳。电泳结束后, 将凝胶上分离到的蛋白条带通过转移电泳方式转印至 PVDF 膜上, 牛奶封闭 1 h, 一抗反应过夜。将反应膜放入二抗孵育 1 h, 洗膜 3 次后, 进行化学发光反应。经扫描仪扫描后, 用 Image J 软件分析灰度值。

2.8 流式细胞术检测外周血中 Th17 和 Treg 细胞比例

将等体积的淋巴细胞分离液缓慢加入小鼠全血中, 在室温下 $300\times g$ 离心 10 min 获取小鼠外周淋巴细胞悬液。按照试剂盒说明书加入刺激和抑制剂培养 7 h, 分别加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ CD4 和 CD25 荧光抗体, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 用 Fix/Perm 试剂透化后加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ CD3、IL-17 和 FoxP3 荧光抗体, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光条件下孵育 30 min, 将细胞重悬后, 通过流式细胞仪检测。CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ IL-17 $^{+}$ 细胞代表 Th17 细胞, 而 CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$ 细胞代表 Treg 细胞。

2.9 统计学分析

使用 SPSS 25.0 统计软件对数据进行分析，定量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 来表示，多组间比较采用 one-way ANOVA 方差分析，两两比较采用 LSD-*t* 检验。

3 结果

3.1 QSYQ 对心肌梗死面积百分比的影响

如图 1、表 1 所示，与假手术组比较，模型组小鼠心肌梗死面积百分比显著增大 ($P<0.01$)；与模型组比较，QSYQ 各剂量组和 XMU-MP-1 组小鼠心肌梗死面积百分比均显著减小 ($P<0.05$ 、 0.01)；与 XMU-MP-1 组比较，高剂量组小鼠心肌梗死体积减小更为明显 ($P<0.01$)。

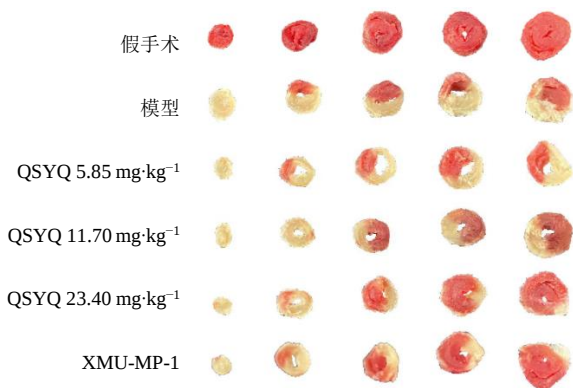


图 1 各组小鼠心脏 TTC 染色

Fig. 1 TTC staining of mouse hearts in each group

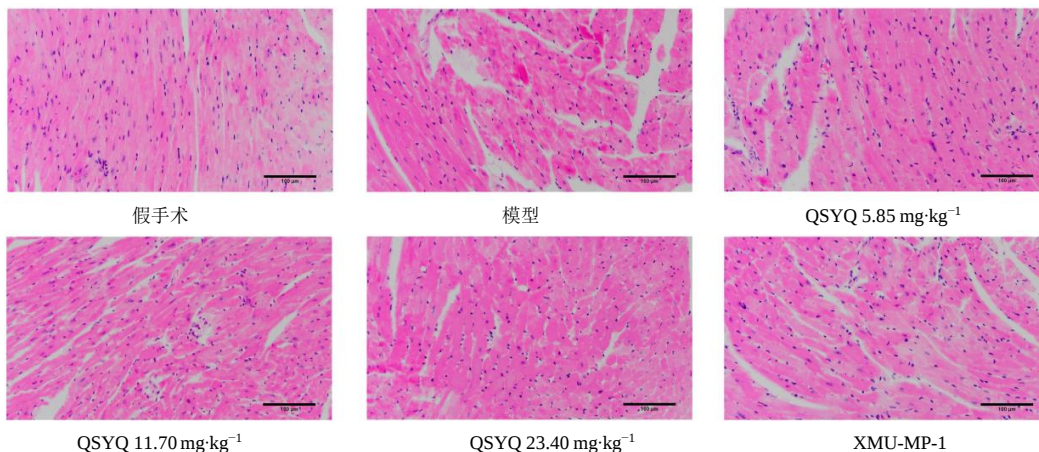


图 2 各组心肌组织病理改变 (HE 染色, $\times 200$)

Fig. 2 Histopathologic changes in myocardial tissue of each group (HE stain, $\times 200$)

肌细胞凋亡明显增多；与模型组相比，QSYQ 各剂量及 XMU-MP-1 组小鼠心肌细胞凋亡明显减少，且 XMU-MP-1 组心肌细胞凋亡数量最少。

3.4 QSYQ 对 MIRI 小鼠血清 IL-6、IL-17A、TNF- α 水平的影响

如表 2 所示，与假手术组比较，模型组小鼠血

表 1 各组小鼠心肌梗死面积比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Comparison of cardiac infarction area among groups of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	心肌梗死面积百分比/%
假手术	—	0.29±0.07
模型	—	64.34±0.65**
XMU-MP-1	0.001	40.60±3.56##
QSYQ	5.85	53.87±1.26#△△
	11.70	44.65±3.81##
	23.40	23.68±3.58###△△

与假手术组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$;
与 XMU-MP-1 组比较: △△ $P<0.01$ 。

** $P<0.01$ vs sham-operated group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs model group; △△ $P<0.01$ vs XMU-MP-1 group.

3.2 QSYQ 对 MIRI 小鼠心脏组织病理改变的影响

如图 2 所示，与假手术组相比，模型组小鼠心肌组织损伤增加，结构异常，心肌细胞排列紊乱，细胞间质水肿增加，炎症细胞浸润；与模型组相比，QSYQ 各剂量组和 XMU-MP-1 组小鼠心肌细胞结构损伤减轻，炎症细胞浸润减少，且随给药浓度的升高，心肌结构损伤的改善越明显；其中 QSYQ 高剂量组和 XMU-MP-1 组炎症细胞浸润明显减少，改善效果最为明显。

3.3 QSYQ 对 MIRI 小鼠心肌细胞凋亡的影响

如图 3 所示，与假手术组相比，模型组小鼠心

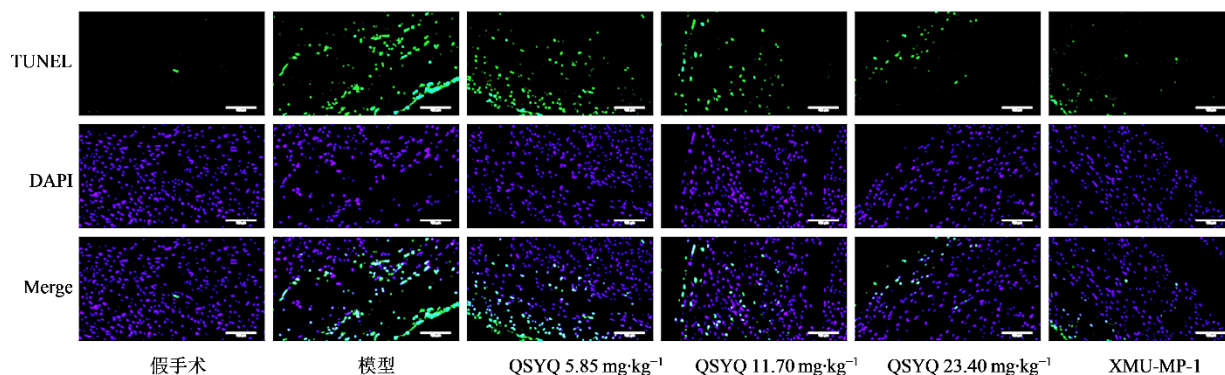


图 3 各组心肌凋亡情况 (Tunel 染色, $\times 200$)

Fig. 3 Myocardial apoptosis in each group (Tunel stain, $\times 200$)

表 2 各组血清中炎症因子 IL-6、IL-17A 和 TNF- α 的含量变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Changes in levels of inflammatory factors IL-6, IL-17A and TNF- α in serum of each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	IL-17A/(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)
假手术	—	34.37 $\pm$ 5.98	45.36 $\pm$ 5.84	75.14 $\pm$ 4.25
模型	—	73.05 $\pm$ 4.24**	105.60 $\pm$ 9.36**	121.80 $\pm$ 7.27**
XMU-MP-1	0.001	45.75 $\pm$ 4.89 ^{##}	45.06 $\pm$ 8.19 ^{##}	90.01 $\pm$ 6.74 ^{##}
QSYQ	5.85	64.57 $\pm$ 3.59 ^{$\Delta\Delta$}	80.61 $\pm$ 3.12 [#]	109.50 $\pm$ 7.69 ^{$\Delta\Delta$}
	11.70	56.29 $\pm$ 5.09 ^{##}	71.96 $\pm$ 5.72 ^{##}	98.59 $\pm$ 5.22 ^{#Δ}
	23.40	45.15 $\pm$ 1.60 ^{##}	57.94 $\pm$ 6.05 ^{##}	82.90 $\pm$ 6.54 ^{##}

与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与 XMU-MP-1 组比较: ^{Δ} $P < 0.05$ ^{$\Delta\Delta$} $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs sham-operated group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group; ^{Δ} $P < 0.05$ ^{$\Delta\Delta$} $P < 0.01$ vs XMU-MP-1 group.

意义。

3.5 QSYQ 对 MIRI 小鼠心脏组织 p-MST、p-YAP、p-TAZ、TEAD1 蛋白表达量的影响

如图 4、表 3 所示,与假手术组比较,模型组小鼠心脏组织 p-MST、p-YAP、p-TAZ 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$), TEAD1 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较, QSYQ 各剂量组及 XMU-MP-1 组小鼠心脏组织 p-MST、p-TAZ 蛋白表达降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), QSYQ 中、高剂量组及 XMU-MP-1 组 p-YAP 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), QSYQ 中、高剂量组及 XMU-MP-1 组 TEAD1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01);与 XMU-MP-1 组比较, QSYQ 高剂量组小鼠 p-MST、p-YAP、p-TAZ、TEAD1 蛋白表达差异无统计学意义。

3.6 QSYQ 对 MIRI 小鼠外周血中 Th17 和 Treg 细胞比例的影响

如图 5、6 及表 4 所示,与假手术组比较,模型组小鼠外周血中 Th17 细胞占比和 Th17/Treg 比

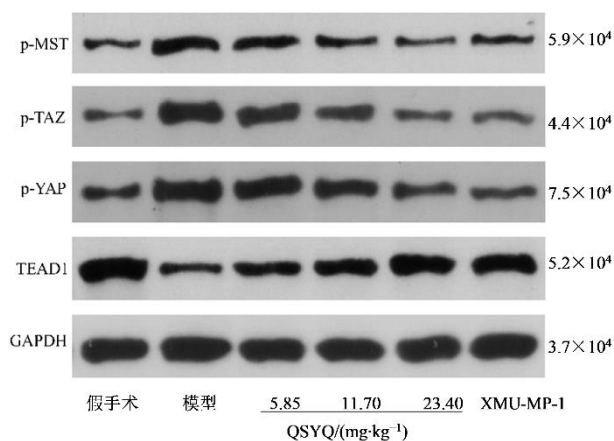


图 4 各组心肌细胞 p-MST、p-YAP、p-TAZ、TEAD1 蛋白电泳图

Fig. 4 Electrophoresis of p-MST, p-YAP, p-TAZ, and TEAD1 proteins in cardiomyocytes of various groups

值显著升高 ($P < 0.01$), Treg 细胞占比降低,但差异无统计学意义;与模型组比较, QSYQ 中、高剂量组及 XMU-MP-1 组小鼠 Th17 细胞占比显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01),高剂量组 Treg 细胞占比显著升高

表 3 各组心肌细胞 p-MST、p-YAP、p-TAZ、TEAD1 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 3 Comparison of relative expression of p-MST, p-YAP, p-TAZ, and TEAD1 proteins in cardiomyocytes of each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	p-MST/GAPDH	p-TAZ/GAPDH	p-YAP/GAPDH	TEAD1/GAPDH
假手术	—	0.09±0.02	0.15±0.06	0.17±0.06	1.12±0.15
模型	—	0.67±0.06**	1.30±0.07**	1.13±0.23**	0.15±0.10**
XMU-MP-1	0.001	0.15±0.04##	0.26±0.10##	0.20±0.06##	0.90±0.15##
QSYQ	5.85	0.54±0.03 ^{#△△}	0.94±0.14 ^{#△△}	0.82±0.20 ^{△△}	0.34±0.12 ^{△△}
	11.70	0.26±0.04##	0.69±0.18##	0.61±0.15 ^{#△△}	0.56±0.12 [#]
	23.40	0.11±0.04##	0.31±0.11##	0.22±0.04##	0.91±0.11##

与假手术组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$; 与 XMU-MP-1 组比较: △△ $P<0.01$ 。

** $P<0.01$ vs sham-operated group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs model group; △△ $P<0.01$ vs XMU-MP-1 group.

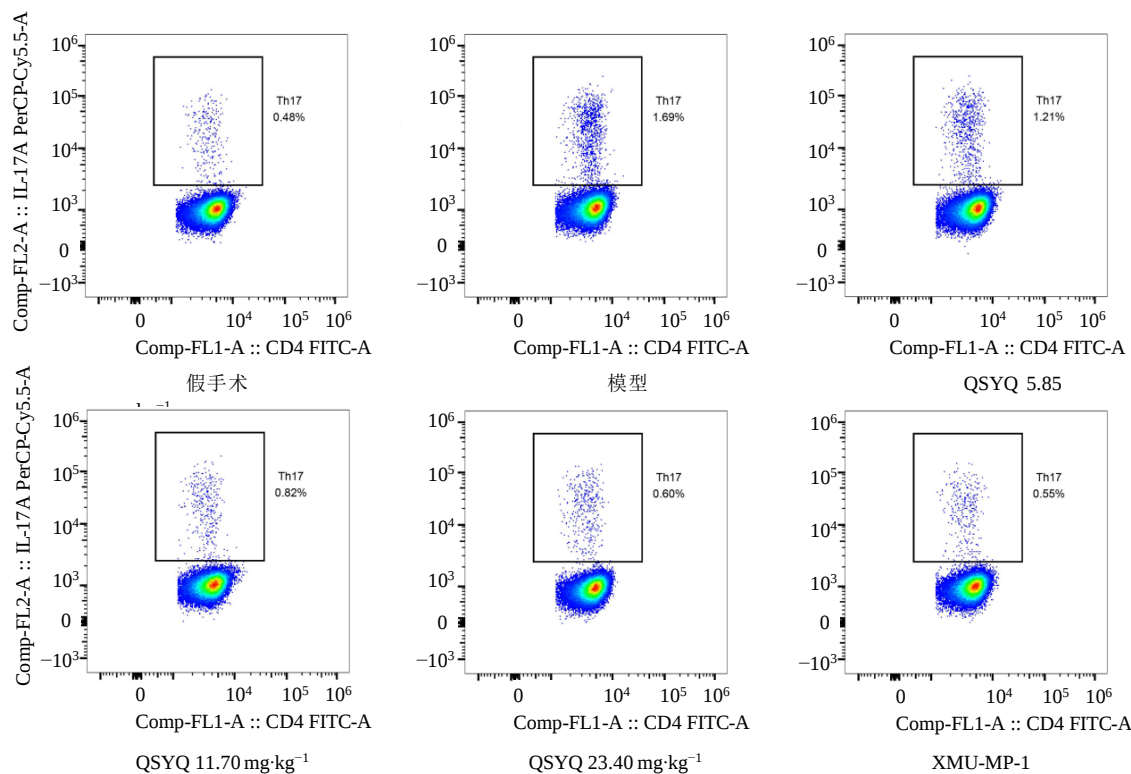


图 5 各组小鼠 Th17 细胞比例

Fig. 5 Proportion of Th17 cells in mice in each group

($P<0.05$), 低、中、高剂量组及 XMU-MP-1 组的 Th17/Treg 值显著降低 ($P<0.05$ 、0.01); 与 XMU-MP-1 组比较, 中、高剂量组 Th17 细胞占比、Treg 细胞占比及 Th17/Treg 值差异均无统计学意义。

4 讨论

经皮冠状动脉介入治疗和溶栓治疗后, 尽管血流快速恢复, 但氧化应激、炎症和细胞凋亡等机制带来的 MIRI 可能加重心肌损伤, 是心肌梗死治疗中必须要面对的难题。中医认为 MIRI 属于“胸痹心痛”范畴, 研究显示胸痹心痛患者中气虚血瘀证占 35.40%以上^[9], 应当予以益气活血治疗。QSYQ

是国内治疗心肌梗死和心力衰竭的常用中药复方制剂, 其主要组成为黄芪、丹参、三七和降香, 以黄芪为君, 培补元气, 助气血运行, 气行则血行, 血行则络通瘀化; 以丹参为臣, 活血调血, 同时还能养心血、安神定志, 与黄芪合用, 增强活血化瘀之功; 以三七为佐, 散瘀止痛; 以降香油为使, 行气散瘀止痛, 使补而不滞; 诸药合用, 标本兼顾, 共奏益气通脉、活血止痛之效。研究显示 QSYQ 能够抑制纤维化、抗凋亡、促血管生成、改善能量代谢和抗血小板等, 对冠心病、冠状动脉血运重建术后、高血压合并心脏病、糖尿病合并心脏病等心血

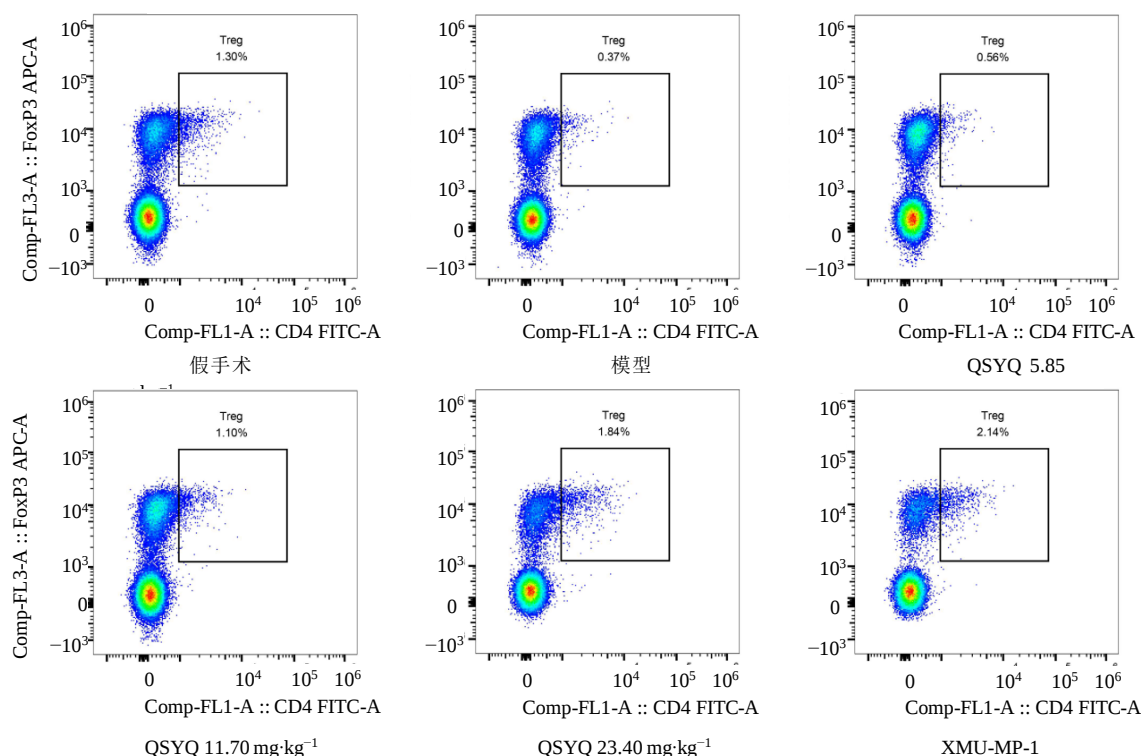


图 6 各组小鼠 Treg 细胞比例

Fig. 6 Proportion of Treg cells in each group of mice

表 4 各组小鼠外周血中 Th17 和 Treg 细胞比例比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 4 Comparison of proportions of Th17 and Treg cells in peripheral blood of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Th17/%	Treg/%	Th17/Treg
假手术	—	0.42 ± 0.06	1.30 ± 0.03	0.32 ± 0.05
模型	—	2.34 ± 1.19**	0.49 ± 0.10	4.72 ± 1.75**
XMU-MP-1	0.001	0.55 ± 0.03 ^{##}	2.09 ± 0.29	0.27 ± 0.04 ^{##}
QSYQ	5.85	1.20 ± 0.34	0.65 ± 0.08	1.90 ± 0.76 ^{#△}
	11.70	0.76 ± 0.07 [#]	0.88 ± 0.19	0.89 ± 0.13 ^{##}
	23.40	0.62 ± 0.07 [#]	2.73 ± 1.56 [#]	0.28 ± 0.13 ^{##}

与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与 XMU-MP-1 组比较: [△] $P < 0.05$ 。

** $P < 0.01$ vs sham-operated group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs XMU-MP-1 group.

管疾病显示出良好的应用前景^[10]。但中药复方具有多成分、多靶点、多通路的特点,本复方的潜在分子机制尚未完全阐述。

现代病理生理研究显示,免疫系统在 MIRI 发生发展的全过程中都发挥着至关重要的作用^[11]。心肌梗死发生后,外周血和心肌组织中的 IL-17 水平都会显著升高^[12-13],IL-17 是由 Th17 细胞分泌的促炎因子,能够直接作用于内皮细胞和巨噬细胞介导炎症细胞浸润,形成局部炎症微环境,造成心肌细胞损伤^[14];同时调节趋化因子的表达,引导中性粒细胞和巨噬细胞向心肌损伤部位迁移,放大炎症反应^[15];此外还能激活相关的炎症信号通路,促

进心肌细胞凋亡^[16]。当血流快速恢复后,炎症反应可能会导致氧化应激和细胞凋亡,从而加剧心肌损伤^[17]。而 Treg 细胞是主要炎症抑制因子,其分泌抑制性炎症因子为 IL-10 和转化生长因子- β (TGF- β),它们能够有效抑制巨噬细胞和淋巴细胞介导的炎症反应,从而有效减少促炎因子的分泌,减少心肌细胞损伤^[18-19];同时通过抑制促炎细胞的活化浸润来减轻心脏受到的炎症损害^[20]。从细胞分化过程到免疫功能上来看,Th17 细胞和 Treg 细胞都是相互制约的,具有适当的比例,维持两者间比例的平衡对调控炎症反应和防控自身免疫疾病方面都具有重要作用。而调控 MIRI 后两者之间的比

例的失衡,对于改善再灌注损伤后梗死区域的炎症微环境^[21],减轻 MIRI 局部的炎症反应和心肌凋亡都有着重大的意义。本研究通过动物实验发现 QSYQ 及 XMU-MP-1 均可以降低 MIRI 后外周血中炎症标志物 IL-6、IL-17A 和 TNF- α 水平,恢复 MIRI 后免疫系统紊乱导致的 Th17/Treg 失衡,从而发挥减少心肌细胞凋亡、缩小心肌梗死面积的作用,但具体机制尚未明确。

据研究显示, MIRI 和 Hippo 信号通路有着密切联系, Hippo 信号通路是调节细胞组织生长、发育、增殖、分化和凋亡等的^[22]重要通路。Nakamura 等^[23]发现在 MIRI 过程中 MST 被激活,活化的 MST 可以通过激活下游的激酶级联反应,从而加重细胞凋亡。XMU-MP-1 属于一种新型的苯磺酰胺抑制剂^[24],能够选择性抑制 MST 靶点。本研究结果提示, QSYQ 和 XMU-MP-1 可以明显降低再灌注损伤心肌细胞中 p-MST、p-YAP、p-TAZ 蛋白的表达,而 TEAD1 蛋白表达量增加,同时 MIRI 后的免疫炎症反应减轻,心肌细胞凋亡数量减少。这证明 QSYQ 能够对 MIRI 起到保护作用,与 MST/Hippo 通路的抑制有密切关系。此前也有研究显示 Hippo 信号通路在心血管疾病中发挥重要作用^[25],牡荆素通过下调 Hippo 信号通路中 p-MST 及 p-YAP 蛋白表达水平,从而减少心梗模型中心肌细胞的凋亡^[26]。同时 ip XMU-MP-1 可以显著改善大鼠心脏骤停后的心脏功能障碍^[27],增强心脏收缩功能,减轻由压力负荷诱导心肌细胞凋亡和心脏功能不全,缓解心肌纤维化进程^[24]。

本实验证实 QSYQ 可能通过抑制 MST/Hippo 信号通路调节 Th17/Treg 免疫平衡,改善炎症微环境,对 MIRI 发挥保护作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Xu X, Li S N, Wang T, et al. Mitigation of myocardial ischemia/reperfusion-induced chronic heart failure via Shexiang Baixin Pill-mediated regulation of the S1PR1 signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155390.
- [2] Wallert M, Ziegler M, Wang X W, et al. α -Tocopherol preserves cardiac function by reducing oxidative stress and inflammation in ischemia/reperfusion injury [J]. *Redox Biol*, 2019, 26: 101292.
- [3] 王肖龙, 毛威, 杨天伦, 等. 芪参益气滴丸临床应用专家共识 [J]. *药物评价研究*, 2025, 48(6): 1386-1402.
- [4] 唐媛媛, 王磊, 鲁大胜. 芪参益气滴丸联合非洛地平治疗冠心病心绞痛的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2024, 39(5): 1216-1220.
- [5] 刘鑫, 刘甜甜, 姚魁武, 等. 芪参益气滴丸调控 Sirt1 与 eNOS 互作促进糖尿病心肌缺血损伤修复再生 [J]. *中草药*, 2023, 54(14): 4564-4572.
- [6] 何贵新, 冯雨菲, 秦伟彬, 等. 芪参益气滴丸含药血清对缺氧/复氧 H9C2 心肌细胞 KATP 通道开放及 PI3K/AKT 信号通路影响的效应研究 [J]. *海南医学院学报*, 2022, 28(6): 412-419.
- [7] 詹玲君, 秦伟彬, 何贵新, 等. 基于 mitoKATP/PI3K/mTOR 探讨芪参益气滴丸影响 H9C2 心肌细胞损伤后钙稳态及炎症环境的机制 [J]. *时珍国医国药*, 2023, 34(9): 2087-2090.
- [8] Bai Q J, Li Y, Song K P, et al. Knockdown of XIST up-regulates 263294miR-340-5p to relieve myocardial ischaemia-reperfusion injury via inhibiting cyclin D1 [J]. *ESC Heart Fail*, 2022, 9(2): 1050-1060.
- [9] 骆始华, 李易, 赵丽娟, 等. 冠心病介入术后 6 个月中医证型分布情况及相关因素分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(11): 194-199.
- [10] 马莉, 刘志超, 高晟玮, 等. 芪参益气滴丸治疗心血管

Wang X L, MAO W, Yang T L, et al. Effects of Qishen Yiqi Dripping Pills-containing serum on KATP channel opening and PI3K/AKT signaling pathway in hypoxic/reoxygenated H9C2 cardiocytes [J]. *Drug Eval Res*, 2025, 48(6): 1386-1402.

Tang Y Y, Wang L, Lu D S, et al. Clinical study on Qishen Yiqi Dropping Pills combined with felodipine in treatment of heart disease and angina pectoris [J]. *Drugs Clin*, 2024, 39(5): 1216-1220.

Liu X, Liu T T, Yao K W et al. Qishen Yiqi Droplet promotes repair and regeneration of diabetes myocardial ischemia injury by regulating interaction of Sirt1 and eNOS [J]. *J Hainan Med Univ*, 2022, 28(6): 412-419.

He G X, Feng Y F, Qin W B, et al. Effects of Qishen Yiqi Dripping Pills-containing serum on KATP channel opening and PI3K/AKT signaling pathway in hypoxic/reoxygenated H9C2 cardiocytes [J]. *J Hainan Med Univ*, 2022, 28(6): 412-419.

Zhan L J, Qin W B, He G X, et al. Based on mitoKATP/PI3K/mTOR, the mechanism of Qishen Yiqi Dropping Pills on calcium homeostasis and inflammatory environment after H9C2 myocardial cell injury was discussed [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2023, 34(9): 2087-2090.

Bai Q J, Li Y, Song K P, et al. Knockdown of XIST up-regulates 263294miR-340-5p to relieve myocardial ischaemia-reperfusion injury via inhibiting cyclin D1 [J]. *ESC Heart Fail*, 2022, 9(2): 1050-1060.

骆始华, 李易, 赵丽娟, 等. 冠心病介入术后 6 个月中医证型分布情况及相关因素分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(11): 194-199.

Luo S H, Li Y, Zhao L J, et al. Distribution of traditional Chinese medicine syndromes and relevant factors in 6 months after percutaneous coronary intervention [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2020, 26(11): 194-199.

马莉, 刘志超, 高晟玮, 等. 芪参益气滴丸治疗心血管

- 疾病药理作用与临床应用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(4): 780-787.
- Ma L, Liu Z C, Gao S W, et al. Research progress of pharmacological action and clinical application of Qiushen Yiqi Dropping Pill in treating cardiovascular diseases [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(4): 780-787.
- [11] Francisco J, Del Re D P. Inflammation in myocardial ischemia/reperfusion injury: Underlying mechanisms and therapeutic potential [J]. Antioxidants (Basel), 2023, 12(11): 1944.
- [12] 宫玉霞, 孙伟, 张德龙. STEMI 患者循环血 Th17 细胞及相关炎症因子与冠状动脉病变程度及短期预后的相关性 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2022, 14(2): 202-206.
- Gong Y X, Sun W, Zhang D L. Correlation of circulating Th17 cells and associated inflammatory factors with extent of coronary artery disease and short-term outcome in patients with STEMI [J]. Chin J Evid Based Cardiovasc Med, 2022, 14(2): 202-206.
- [13] 刘畅, 张波, 舒龙. 急性 ST 段抬高型心肌梗死患者 Th17 细胞的转录组分析 [J]. 免疫学杂志, 2021, 37(11): 980-987, 994.
- Liu C, Zhang B, Shu L. Transcriptome analysis of Th17 cells in ST-elevation myocardial infarction [J]. Immunol J, 2021, 37(11): 980-987, 994.
- [14] Zhang R Y K, Cochran B J, Thomas S R, et al. Impact of reperfusion on temporal immune cell dynamics after myocardial infarction [J]. J Am Heart Assoc, 2023, 12(4): e027600.
- [15] 胡孟芬, 宓宝斌. IL-17 在心肌缺血再灌注损伤中的研究进展 [J]. 中国医药科学, 2021, 11(21): 57-60, 86.
- Hu M F, Mi B B. Study advances on IL-17 in myocardial ischemia reperfusion injury [J]. China Med Pharm, 2021, 11(21): 57-60, 86.
- [16] 郭梅, 罗波, 阮丹, 等. 心肌缺血再灌注损伤中白介素-17A 诱发心肌细胞凋亡的作用机制 [J]. 免疫学杂志, 2019, 35(10): 846-852.
- Guo M, Luo B, Ruan D, et al. Effects of IL-17A on cardiac myocytes apoptosis induced by myocardial ischemia-reperfusion injury in mice [J]. Immunol J, 2019, 35(10): 846-852.
- [17] 李嫚, 王振军, 刘洁云, 等. 丹参酮II_A磺酸钠注射液对心肌缺血再灌注大鼠心功能和免疫反应的调节作用 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2019, 37(4): 397-402.
- Li M, Wang Z J, Liu J Y, et al. Regulatory effect of sodium tanshinone II_A sulfonate on cardiac function and immune response in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Chin J Clin Anat, 2019, 37(4): 397-402.
- [18] 李佳玉, 辛延国, 李卫萍, 等. 调节性 T 细胞在急性心肌梗死中的调控机制及研究进展 [J]. 中国心血管杂志, 2023, 28(4): 403-406.
- Li J Y, Xin Y G, Li W P, et al. Advances in research on the regulatory mechanism of regulatory T cells in acute myocardial infarction [J]. Chin J Cardiovasc Med, 2023, 28(4): 403-406.
- [19] 范骏, 陶蓉. 炎症免疫应答在心肌梗死后心脏重构中的作用 [J]. 上海交通大学学报(医学版), 2017, 37(6): 831-835, 830.
- Fan Q, Tao R. Inflammatory response in cardiac remodeling after myocardial infarction [J]. J Shanghai Jiao Tong Univ Med Sci, 2017, 37(6): 831-835, 830.
- [20] Hofmann U, Frantz S. Role of lymphocytes in myocardial injury, healing, and remodeling after myocardial infarction [J]. Circ Res, 2015, 116(2): 354-367.
- [21] Santos-Zas I, Lemarié J, Zlatanova I, et al. Cytotoxic CD8⁺ T cells promote granzyme B-dependent adverse post-ischemic cardiac remodeling [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 1483.
- [22] Clark K L, George J W, Przygodzka E, et al. Hippo signaling in the ovary: Emerging roles in development, fertility, and disease [J]. Endocr Rev, 2022, 43(6): 1074-1096.
- [23] Nakamura M, Zhai P Y, Del Re D P, et al. Mst1-mediated phosphorylation of Bcl-xL is required for myocardial reperfusion injury [J]. JCI Insight, 2016, 1(5): e86217.
- [24] Triastuti E, Nugroho A B, Zi M, et al. Pharmacological inhibition of Hippo pathway, with the novel kinase inhibitor XMU-MP-1, protects the heart against adverse effects during pressure overload [J]. Br J Pharmacol, 2019, 176(20): 3956-3971.
- [25] 柴奥懋, 杨晶晶, 廖海含, 等. Hippo 信号通路在心肌梗死中的作用及其研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(2): 175-179.
- Chai A M, Yang J J, Liao H H, et al. The roles of Hippo signaling pathway in myocardial infarction and its research progress [J]. Chin J Arterioscler, 2022, 30(2): 175-179.
- [26] Ashokkumar R, Jamuna S, Sakeena Sadullah M S, et al. Vitexin protects isoproterenol induced post myocardial injury by modulating hippo signaling and ER stress responses [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 496(2): 731-737.
- [27] 关雪昊, 孙凡, 何宇玲, 等. XMU-MP-1 预处理改善心脏骤停后大鼠心肌功能障碍 [J/OL]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2024, 16(5): 67-74.
- Guan X H, Sun F, He Y L, et al. XMU-MP-1 pretreatment improves myocardial dysfunction in rats after cardiac arrest [J/OL]. Chin J Front Med Sci Electron Version, 2024, 16(5): 67-74.