

• 药理与临床 •

养阴方对 HSP65 攻击下 ApoE^{-/-}小鼠 Th17、Treg 细胞失衡的作用研究

邱润泽^{1,2}, 周李煜^{1,2}, 马元婧^{1,2}, 马玉清¹, 袁冬平^{1,2*}, 龙 军^{1,2*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 考察在热休克蛋白(HSP)65攻击下养阴方对载脂蛋白E敲除(ApoE^{-/-})小鼠动脉粥样硬化(AS)的病变及辅助性T细胞17(Th17)、调节性T细胞(Treg)的影响及可能机制。方法 将ApoE^{-/-}小鼠分别饲喂普通和高脂饲料,并分别sc无菌PBS或HSP65,以辛伐他汀为阳性药,研究养阴方对AS模型小鼠血脂、斑块、Th17细胞与Treg细胞比例(Th17/Treg)及相关炎症指标的影响。给药方式皆为ig给药,并以等体积生理盐水做对照。采用酯酶法检测血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白(LDL)及高密度脂蛋白(HDL)水平;油红O染色法测定主动脉斑块面积;流式细胞术测定抗凝血中IL-17A⁺CD4⁺Th17及Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺Treg细胞数量;ELISA法测定血清白细胞介素-6(IL-6)、IL-17、IL-2、转化生长因子-β(TGF-β)、IL-10水平;实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法测定脾脏中Stat3、Stat5a、Foxp3和主动脉中Stat3、Stat5a mRNA表达;Western blotting法测定脾脏中磷酸化STAT3(pSTAT3)、磷酸化STAT5(pSTAT5)、FOXP3和主动脉中pSTAT3蛋白表达。结果 养阴方使小鼠血清TC、TG、LDL水平显著降低(P<0.01),HDL显著升高(P<0.05);主动脉斑块面积明显减小(P<0.01);外周血IL-17A⁺CD4⁺Th17细胞显著减少(P<0.05),Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺Treg显著增加(P<0.05),Th17/Treg值大幅下降(P<0.01);血清IL-6水平显著下降(P<0.05),IL-2(P<0.01)、TGF-β(P<0.05)、IL-10(P<0.05)水平显著升高;脾脏pSTAT3蛋白水平下降(P<0.01),pSTAT5(P<0.01)和FOXP3(P<0.05)蛋白水平上升;主动脉Stat3 mRNA(P<0.01)和pSTAT3蛋白(P<0.05)水平下降。结论 养阴方能够改善HSP65攻击下ApoE^{-/-}小鼠的高脂血症及AS,同时调节外周血中Th17/Treg的平衡和炎症因子的分泌从而改善炎症。养阴方对Th17、Treg的效应可能与减弱的IL-6/pSTAT3和增强的IL-2/pSTAT5信号有关。

关键词: 养阴方;热休克蛋白65;动脉粥样硬化;载脂蛋白E;辅助性T细胞17;调节性T细胞

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)05-1122-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.05.015

Effects of Yangyin Recipe on imbalance of Th17 and Treg cells in ApoE^{-/-} mice under HSP65 attack

QIU Run-ze^{1,2}, ZHOU Li-yu^{1,2}, MA Yuan-jing^{1,2}, MA Yu-qing¹, YUAN Dong-ping^{1,2}, LONG Jun^{1,2}

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To investigate the effects of Yangyin Recipe on atherosclerosis (AS) lesions, helper T cells 17 (Th17), and regulatory T cells (Treg) in apolipoprotein E knockout (ApoE^{-/-}) mice under the heat shock protein (HSP) 65 attack, and explore the potential mechanisms. **Methods** ApoE^{-/-} mice were fed with normal and high-fat diets respectively, and injected with sterile PBS or HSP65. Simvastatin was used as the positive drug to study the effects of Yangyin Recipe on blood lipids, plaques, Th17/Treg cells and related inflammation indicators in AS model mice. Drugs were all intragastric administrated with equal volume of normal saline as a control. Serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) were detected by esterase method; The area of aortic plaque was determined by oil red O staining; The amounts of IL-17A⁺CD4⁺ Th17 and Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ Treg cells in anticoagulated blood were determined by flow cytometry; Serum IL-6, IL-17, IL-2, TGF-β, and IL-10

收稿日期: 2018-08-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81573929); 国家自然科学基金资助项目(81373232); 江苏省自然科学基金资助项目(BK2012458)

作者简介: 邱润泽(1993—), 男, 硕士研究生, 研究方向为药理学。Tel: 18851823583 E-mail: watato@liblu.me

*通信作者 袁冬平, 硕士生导师, 主要从事心血管药理学研究。E-mail: annieyuan99@163.com

龙 军, 硕士生导师, 主要从事免疫药理毒理学研究。E-mail: long_ydp@aliyun.com

were determined by ELISA; mRNA expression of Stat3, Stat5a, Foxp3 in spleens and Stat3, Stat5a in aortas were detected by qPCR; Protein expression of phosphorylated STAT3 (pSTAT3), phosphorylated STAT5 (pSTAT5), FOXP3 in spleen, and pSTAT3 in aortas were determined by Western blotting. **Results** Under the influence of Yangyin Recipe, serum TC, TG, LDL levels decreased ($P < 0.01$), and HDL increased ($P < 0.05$); Aortic plaque area decreased remarkably ($P < 0.01$); IL-17A⁺CD4⁺Th17 cells in peripheral blood decreased ($P < 0.05$), Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ Treg increased ($P < 0.05$), and Th17/Treg ratio decreased drastically ($P < 0.01$); Serum IL-6 decreased ($P < 0.05$), IL-2 ($P < 0.01$), TGF- β and IL-10 ($P < 0.05$) increased; Protein levels of pSTAT3 in spleens decreased ($P < 0.01$), but pSTAT5 ($P < 0.01$) and FOXP3 ($P < 0.05$) increased; Aortic Stat3 mRNA ($P < 0.01$) and pSTAT3 ($P < 0.05$) protein decreased. **Conclusion** Yangyin Recipe can improve hyperlipidemia and AS in ApoE^{-/-} mice during HSP65 attack, and regulate the balance of Th17/Treg in peripheral blood and the secretion of inflammatory factors to improve inflammation, which may be related to attenuate IL-6/pSTAT3 and enhance IL-2/pSTAT5 signaling.

Key words: Yangyin Recipe; HSP65; atherosclerosis; ApoE; helper T cells 17; regulatory T cells

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一类由血脂血症诱发、以脂质沉积血管壁为特征的慢性炎症性疾病^[1-2], 是心脑血管意外的重要发病基础^[3]。AS 引起的管腔狭窄导致冠心病、心肌梗死和急性卒中^[4-5], 而动脉夹层及动脉瘤的形成和破裂是循环系统障碍甚至死亡的重要诱因^[6]。在 AS 环境下, 调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 与辅助性 T 细胞 17 (helper T cell 17, Th17) 两大 CD4⁺T 细胞亚群的分化显著影响炎症和疾病的进展^[7-8]。免疫抑制性细胞^[9]CD4⁺CD25⁺Treg 表达特征性转录因子 Foxp3 (Forkhead Box P3), 能够分泌转化生长因子- β (TGF- β)、白细胞介素-10 (IL-10) 等抑制性细胞因子阻碍 T 细胞活化、分化^[10-12]。相反, 特异性表达 ROR γ t (RAR-related orphan receptor gamma) 的 CD4⁺IL-17A⁺Th17 细胞为强力的炎性细胞, 通过分泌 IL-17 等炎性因子介导炎症的形成和进展^[13]。因此, 对血脂与炎症的双重控制在 AS 的干预中具有重大意义。临床常用调脂药如他汀类治疗 AS, 其中辛伐他汀具有强大的抗炎功效, 对 AS 具有显著疗效^[14-15]。

基于江苏省名老中医唐蜀华教授的理论, 内伤杂病易内生热毒, 而阴虚为内热之因, 热进而蕴毒, 损伤脉络。现有多项研究证明瘀热与炎症^[16-17]及心血管疾病^[18]的相关性, 因此本课题组提出“阴虚瘀热蕴毒”是 AS 的关键病机。其中阴虚是病因之首, 也为炎症因子产生的基本条件^[19]。何首乌 *Polygoni Multiflora Radix* 通肝补肾, 黄精 *Polygonati Rhizoma* 滋脾肾之阴, 养阴方由 2 药配伍而成。本实验以辛伐他汀为阳性对照, 考察热休克蛋白 (HSP) 65 抗原攻击下养阴方对高脂饮食的载脂蛋白 E 敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠 Th17、Treg 细胞平衡的影响及潜在机制, 研究现代医学中养阴治法对 AS 炎症的干预作用。

1 材料

1.1 仪器

Revco ULT 超低温冰箱 (美国 Thermo Fisher 公司); 5417R 冷冻高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); Infinite M200PRO 酶标仪 (瑞士 TECAN 公司); FACSCalibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司); NanoDrop One 微量紫外-可见光分光光度计 (美国 Thermo Fisher 公司); Veriti 96-Well Thermal Cycler 梯度逆转录 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); 7500 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); EPS 300 双稳定时电泳仪 (中国天能公司); GelDoc XR+ 全自动凝胶成像仪 (美国 Bio-rad 公司)。

1.2 药物与试剂

辛伐他汀片 (天方药业有限公司, 批号 160409174, 磨成粉后溶于蒸馏水); 制何首乌 (批号 1605049)、酒黄精颗粒 (批号 1702149) 均购于江阴天江药业有限公司 (溶于蒸馏水); 总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、低密度脂蛋白 (LDL)、高密度脂蛋白 (HDL) 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 油红 O 粉末 (北京索莱宝科技有限公司); IL-6 (MBE10288)、IL-17 (MBE10413)、IL-2 (MBE10294)、TGF- β (MBE10097)、IL-10 (MBE10477) 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (南京迈博生物科技有限公司); 淋巴细胞分离液 (天津灏洋生物科技有限公司); 细胞固定缓冲液、破膜缓冲液 (BD 公司); 佛波酯 (Sigma 公司); FITC Rat Anti-Mouse CD4 (553046)、Alexa Fluor 647 Rat Anti-Mouse IL-17A (560224)、APC Rat Anti-Mouse CD25 (561049)、PE Rat Anti-Mouse Foxp3 (563101) 流式抗体 (BD 公司); TRIzol 试剂 (Ambion 公司); 逆转录试剂盒 (Abmion 公司); MasterMix-LR qRT-PCR 染料法试剂盒

(Abmion 公司); RIPA 裂解液 (江苏凯基生物技术股份有限公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(碧云天生物技术公司); 兔抗 STAT 3 phospho Y705 抗体、兔抗 FOXP3 抗体 (Abcam 公司); 兔抗 STAT5 phospho Tyr694 抗体 (Cell Signaling Technology 公司); 兔抗 β -actin 抗体 (Abways 公司); 山羊抗兔 IgG HRP (Biosharp 公司); 超敏化学发光 HRP 底物 (Merck Millipore 公司)。

1.3 动物

ApoE^{-/-}小鼠, 42~55 d, 体质量 18~22 g, 雄性, C57BL/6J 背景, SPF 级, 合格证号 11400700229437, 动物许可证号 SCXK (京) 2016-0011, 由北京维通利华实验动物技术有限公司购自美国 Jackson 实验室, 饲养于南京中医药大学实验动物中心的 SPF 级屏障环境。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

小鼠适应环境 1 周后, 称体质量后随机分组, 分别为对照组、高脂饮食组、高脂饮食合并 HSP65 组、辛伐他汀组和养阴方组。对照组小鼠喂食普通饲料 (南京青龙山动物养殖场), 其余各组小鼠均喂食高脂饲料 (含 1.25%胆固醇和 20%猪油, 委托南京青龙山动物养殖场加工) 20 周。于第 1、4、7 周, 高脂饮食合并 HSP65 组、辛伐他汀组和养阴方组小鼠 sc 结核分枝杆菌 pET28a 来源、与 HSP60 高度同源的 HSP65 [mHSP65, 0.01 mg/只, 溶于无菌磷酸盐缓冲液 (PBS)] 激发自身反应性 T 细胞应答及血管内皮应激以加重 AS 炎症^[20-21], 其余组小鼠 sc 等体积无菌 PBS。ig 给药与高脂饮食同时进行, 药物皆采用临床等效量 (辛伐他汀 3.3 mg/kg; 养阴方 3.3 g/kg, 何首乌与黄精生药质量比 1:1); 对照组、高脂饮食组及高脂饮食合并 HSP65 组 ig 给予等体积生理盐水。在第 21 周禁食过夜后, 眼眶收集血清样品用于血脂及 ELISA 分析, 新鲜抗凝血样品用于流式细胞术分析。收集主动脉、心脏、脾脏、肝脏和胸腺脏器样本, 冻存于超低温冰箱或浸泡在 4%多聚甲醛 (PFA) 中用于后续分析。

2.2 血脂分析

使用生化试剂盒 (比色法) 通过酶标仪检测血清样本中 TC、TG、LDL 及 HDL 水平, 操作按试剂盒说明书进行。

2.3 主动脉斑块面积测定

将主动脉从主动脉弓至左右髂总动脉分支分

离, 将多余组织在解剖镜下进一步精密剥离, 并在 4%多聚甲醛中固定 12 h。生理盐水洗涤后滴加油红 O 染色。拍摄前将主动脉在 75%乙醇中漂洗以将正常组织分化成乳白色, 再次生理盐水洗涤。通过 MapInfo 7.0 (美国, www.mapinfo.com) 软件测量主动脉斑块的面积, 并计算斑块占血管总面积的比值。

2.4 外周血流式细胞术检测

新鲜外周血样本用终质量浓度为 1 mg/mL 的肝素抗凝, 随后的样品处理和流式细胞术检测委托江苏凯基生物技术股份有限公司进行。外周血通过淋巴细胞分离液获取总淋巴细胞后, 用固定缓冲液固定。上机检测前, 用 PBS 洗涤样品, 并用破膜缓冲液处理样本。用于检测 IL-17A⁺CD4⁺ Th17 细胞的样本加用佛波酯处理。样品洗涤后, 用流式抗体孵育, 洗涤后重悬于 PBS 中, 上机检测。

2.5 ELISA 法测定血清中细胞因子水平

通过 ELISA 试剂盒测定血清中 IL-6、IL-17、IL-2、TGF- β 和 IL-10 的水平。操作按试剂盒说明书进行, 并通过酶标仪测定。

2.6 qRT-PCR 法检测脾脏和主动脉中相关基因 mRNA 表达水平

使用 TRIzol 试剂从脾或主动脉中提取总 RNA。逆转录成模板 DNA 前, RNA 通过微量紫外分光光度计将脾脏 RNA 定量为 100 ng/ μ L, 主动脉定量为 40 ng/ μ L。qRT-PCR 操作及反应条件按试剂盒说明书进行, 其中引物委托上海生工生物工程有限公司合成。数据通过 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法 (内参 GAPDH) 进行分析。

2.7 Western blotting 法检测脾脏和主动脉中相关蛋白表达水平

脾脏或主动脉通过 RIPA 强裂解液提取, 通过 BCA 法测定蛋白质量浓度后, 加入上样缓冲液在 100 °C 金属浴中变性 10 min。蛋白样品以 30 μ g 加入 10% SDS-PAGE 凝胶中。电泳结束后, 将蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜上。抗体孵育前, 使用溶于 TBST (含 0.1%聚山梨酯 20 的三乙醇胺缓冲盐溶液) 的脱脂奶粉封闭。封闭结束后, 根据蛋白质的相对分子质量值裁膜, 并在稀释于 5%牛血清白蛋白溶液的一抗和含 HRP 的二抗中孵育。孵育结束后膜用 TBST 漂洗, 滴加适量化学发光 HRP 底物后在全自动凝胶成像仪中获取条带图像, 并用 Image Lab (Bio-rad 公司) 4.0.1 软件分析。

2.8 统计学处理

数据采用 SPSS 17.0 软件进行双侧 *t* 检验或 Two-way ANOVA 分析, GraphPad Prism 5.02 软件制图, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 养阴方对 ApoE^{-/-}小鼠血脂水平的影响

与对照组相比, 20 周的高脂饮食使 ApoE^{-/-}小鼠血清中的 TC ($P < 0.01$)、TG ($P < 0.05$) 和 LDL ($P < 0.01$) 水平显著升高, HDL 水平显著降低 ($P < 0.05$), 显示机体处于高脂血症状态。合并 HSP65 未能进一步加重高脂血症小鼠血脂的失调, 但与对照组比较, 高脂饮食合并 HSP65 组小鼠 TG 水平升高更为显著 ($P < 0.01$)。而与高脂饮食合并 HSP65

组相比, 养阴方与辛伐他汀均都能显著降低 TC ($P < 0.01$)、TG ($P < 0.01$) 和 LDL ($P < 0.01$) 水平, 恢复 HDL 水平 ($P < 0.05$)。结果表明, 养阴方能够一定程度改善 ApoE^{-/-}小鼠的血脂紊乱状态, 且效应与阳性药辛伐他汀相当。结果见表 1。

3.2 养阴方对 ApoE^{-/-}小鼠主动脉斑块形成的影响

油红 O 染色后, 高脂饮食组小鼠比对照组形成了明显的斑块 ($P < 0.001$), 而 HSP65 的注射进一步增加了高脂小鼠的斑块面积 ($P < 0.05$)。与高脂饮食合并 HSP65 组相比, 养阴方显著抑制了斑块的进展 ($P < 0.01$), 且效果比辛伐他汀更为显著 ($P < 0.05$)。结果显示养阴方能够一定程度控制抗原攻击下高脂血症小鼠 AS 的进展。结果见图 1。

表 1 养阴方对 ApoE^{-/-}小鼠血脂水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of Yangyin Recipe on serum lipids in ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	LDL/(mmol·L ⁻¹)	HDL/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	20.75 ± 2.04	1.79 ± 0.21	2.30 ± 0.16	2.08 ± 0.60
高脂饮食	—	44.23 ± 6.52**	4.33 ± 1.17*	5.58 ± 0.74**	0.92 ± 0.50*
高脂饮食合并 HSP65	—	44.23 ± 5.96**	4.62 ± 0.81**	5.78 ± 0.89**	0.61 ± 0.52*
辛伐他汀	0.003 3	22.17 ± 5.04##	1.81 ± 0.38##	2.32 ± 0.76##	1.52 ± 0.11#
养阴方	3.3	22.43 ± 7.83##	1.78 ± 0.91##	2.72 ± 1.04##	1.91 ± 0.39#

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与高脂饮食合并 HSP65 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$, 下同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs contrl group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs high-fat diets + HSP65 group, same as below

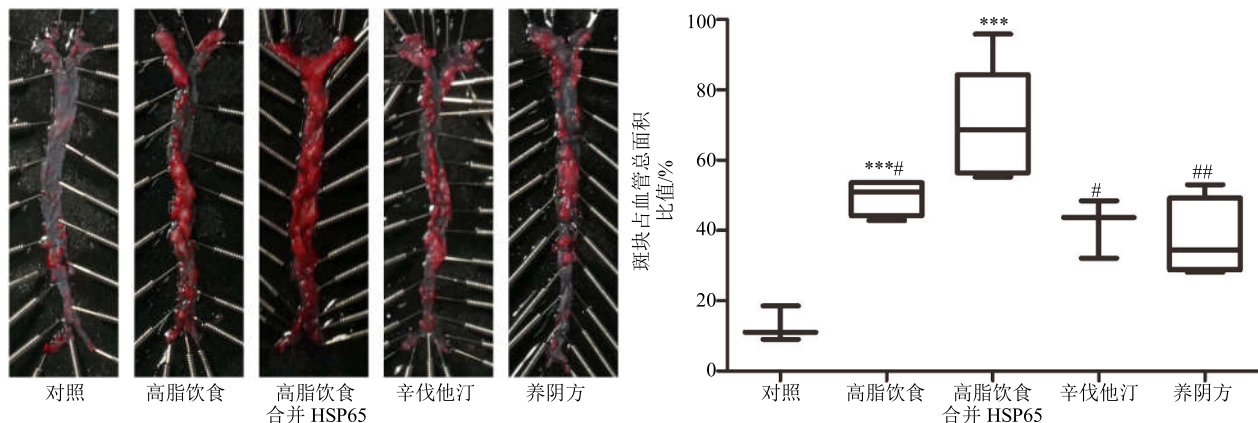


图 1 养阴方对 ApoE^{-/-}小鼠主动脉斑块面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 1 Effects of Yangyin Recipe on aortic plaque area in ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.3 养阴方对 ApoE^{-/-}小鼠外周血中 Th17 及 Treg 细胞水平的影响

流式细胞术结果显示, 高脂饮食使 ApoE^{-/-}小鼠外周血中 IL-17A⁺CD4⁺ Th17 细胞水平比对照组显著上升 ($P < 0.01$), 而进一步注射 HSP65 极显著地增加了 Th17 细胞的水平 ($P < 0.001$), 并且与高

脂饮食组比较差异显著 ($P < 0.001$)。而与高脂饮食合并 HSP65 组相比, 养阴方组 ($P < 0.05$) 与辛伐他汀组 ($P < 0.01$) 的 Th17 细胞水平显著下降。高脂饮食未能改变外周血中 Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ Treg 细胞的水平, 但在 HSP65 的作用下 Treg 细胞水平比对照组显著上升 ($P < 0.05$)。与高脂饮食合并 HSP65 组比较,

养阴方能进一步增加 Treg 细胞的数量 ($P < 0.05$)。

与对照组相比, 高脂饮食组小鼠外周血 Th17 与 Treg 细胞比例 (Th17/Treg) 显著上升 ($P < 0.05$), 而高脂饮食合并 HSP65 组的 Th17/Treg 升高更加明显 ($P < 0.01$), 且与高脂饮食组相比差异显著 ($P <$

0.05)。与高脂饮食合并 HSP65 组相比, 养阴方与辛伐他汀均能显著降低 Th17/Treg ($P < 0.01$)。结果表明, 养阴方能够一定程度上逆转抗原攻击下 AS 小鼠 IL-17A⁺CD4⁺ Th17 与 Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ Treg 细胞比例的失调。结果见图 2。

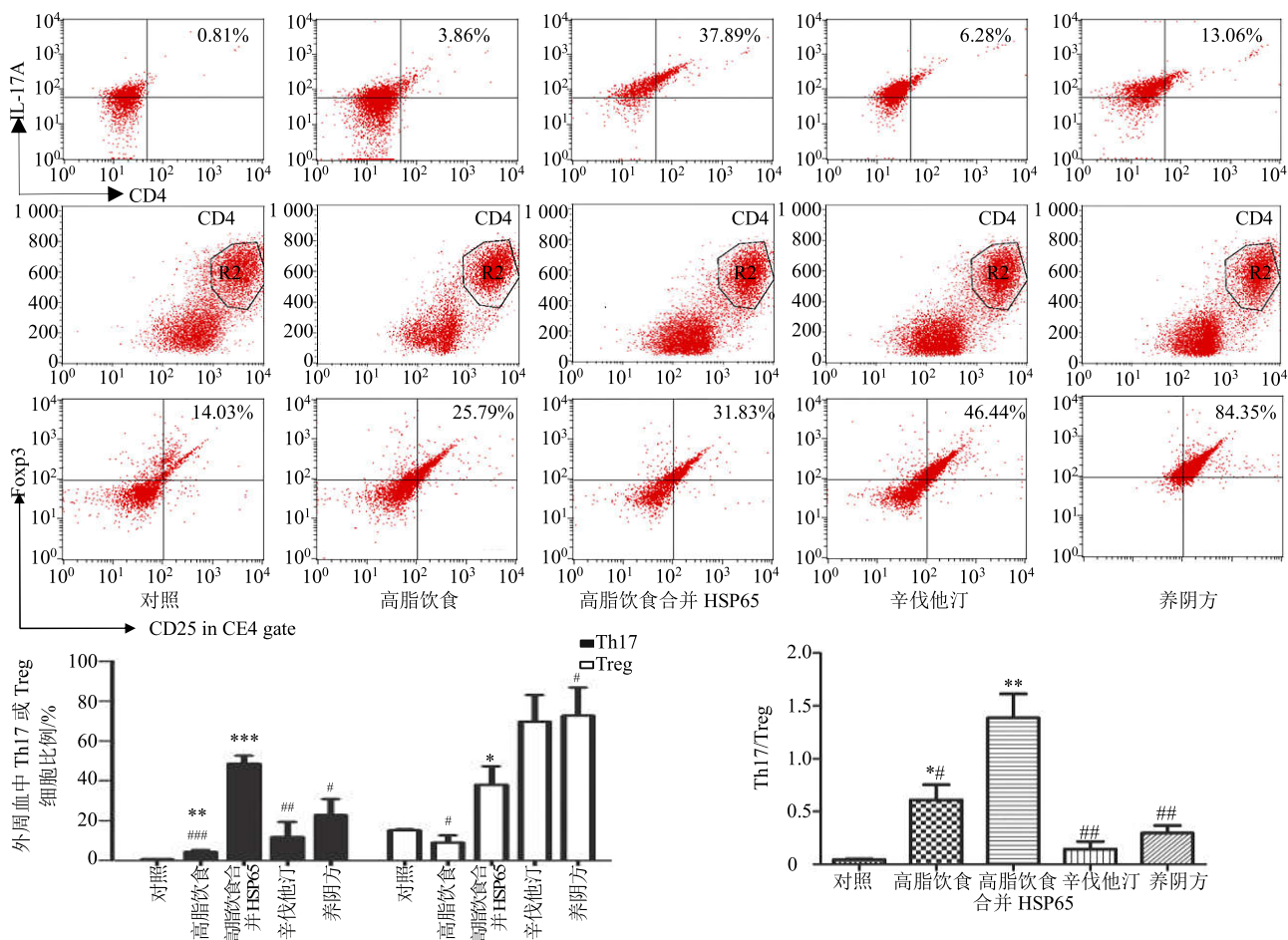


图 2 养阴方对 ApoE^{-/-}小鼠外周血中 IL-17A⁺CD4⁺ Th17、Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ Treg 细胞水平及两细胞比例的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Effects of Yangyin Recipe on levels and ratio of IL-17A⁺CD4⁺ Th17 and Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ Treg cells in peripheral blood of ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.4 养阴方对 ApoE^{-/-}小鼠血清中 Th17 及 Treg 相关细胞因子水平的影响

经 ELISA 法测定, 与对照组相比, 高脂饮食组小鼠血清中 IL-6 水平极显著升高 ($P < 0.001$), 而注射 HSP65 未能进一步改变 IL-6 水平。与对照组相比, 单纯高脂饮食未能改变 IL-2 及 TGF- β 水平, 而高脂饮食合并 HSP65 组的 IL-2 及 TGF- β 水平显著下降 ($P < 0.05, 0.01$), 且 TGF- β 水平显著低于高脂饮食组 ($P < 0.001$)。与对照组比较, 高脂饮食组与高脂饮食合并 HSP65 组的 IL-17 与 IL-10 水平

均未改变。

与高脂饮食合并 HSP65 组相比, 养阴方组小鼠血清 IL-6 水平显著下降 ($P < 0.05$), IL-2、TGF- β 与 IL-10 水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), 但养阴方未能影响 IL-17 水平。IL-6、IL-17、IL-2、TGF- β 及 IL-10 的水平在辛伐他汀组未观察到明显改变。结果表明, 养阴方能够抑制抗原攻击下 ApoE^{-/-}小鼠 Th17 分化诱导因子 IL-6 的分泌, 促进 Treg 诱导因子 IL-2 以及免疫抑制因子 TGF- β 及 IL-10 的产生。结果见图 3。

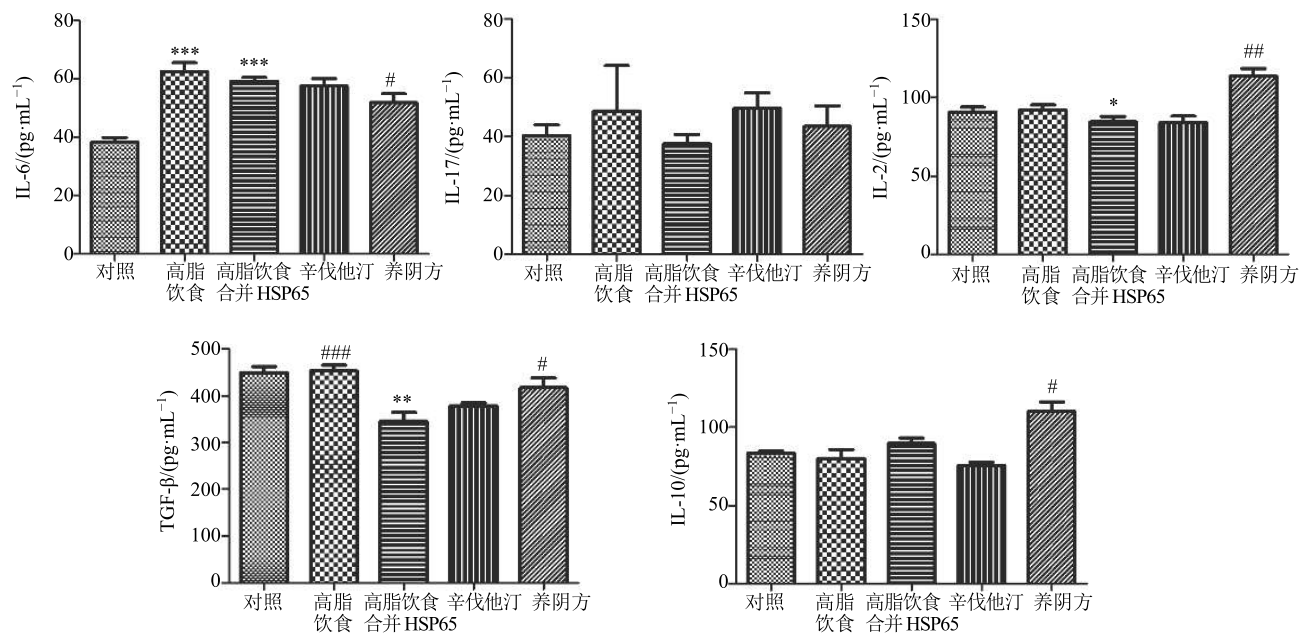


图 3 养阴方对 ApoE^{-/-}小鼠血清中 IL-6、IL-17、IL-2、TGF-β 及 IL-10 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effects of Yangyin Recipe on serum IL-6, IL-17, IL-2, TGF-β, and IL-10 levels in serum of ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.5 养阴方对 ApoE^{-/-}小鼠脾脏中 STAT3、STAT5 及 FOXP3 表达及磷酸化水平的影响

qRT-PCR 结果显示,高脂饮食合并 HSP65 组小鼠脾脏的 Stat5a mRNA 水平显著低于对照组 ($P < 0.01$) 和高脂饮食组 ($P < 0.05$)。高脂饮食组 Stat5a mRNA 有明显下降趋势,但差异不显著 ($P > 0.05$)。而与对照组相比,Stat3 mRNA 水平不受高脂饮食或 HSP65 影响。高脂饮食合并 HSP65 组的 Foxp3 mRNA 也显著低于对照组 ($P < 0.05$)。与高脂饮食合并 HSP65 组相比,养阴方组的 Stat3、Stat5a 及 Foxp3 在转录水平上没有明显变化,而辛伐他汀组 Stat5a 及 Foxp3 水平上升 ($P < 0.05$)。

经过 Western blotting 分析,高脂饮食组脾脏 STAT3 蛋白的磷酸化 (pSTAT3) 水平显著高于对照组 ($P < 0.05$),而 HSP65 的注射进一步增加了 pSTAT3 水平 ($P < 0.01$),且其相对表达量显著高于高脂饮食组 ($P < 0.05$)。而 STAT5 磷酸化 (pSTAT5) 水平及 FOXP3 蛋白表达水平未受高脂饮食或 HSP65 影响。与高脂饮食合并 HSP65 组相比,养阴方组 pSTAT3 蛋白水平显著下降 ($P < 0.01$),pSTAT5 及 FOXP3 蛋白水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$),而辛伐他汀仅能显著影响 FOXP3 的表达 ($P < 0.05$)。结果表明,养阴方能够调节抗原攻击下 AS 小鼠脾脏 STAT3 及 STAT5 的磷酸化水平,促进 FOXP3 的

表达。结果见图 4。

3.6 养阴方对 ApoE^{-/-}小鼠主动脉中 STAT3、STAT5 表达及磷酸化水平的影响

从小鼠主动脉的 qRT-PCR 结果可看出,与对照组相比,高脂饮食合并 HSP65 组 Stat3 mRNA 水平显著升高 ($P < 0.01$),而该水平的改变在高脂饮食组未观测到。Stat5a 的 mRNA 水平在高脂饮食或高脂饮食合并 HSP 组均未发生明显改变。养阴方组与辛伐他汀组的 Stat3 转录水平比起高脂饮食合并 HSP65 组显著降低 ($P < 0.05, 0.01$),而 Stat5a mRNA 的水平未发现显著变化。

在蛋白水平,高脂饮食组 pSTAT3 水平显著高于对照组 ($P < 0.05$)。进一步注射 HSP65 使差异更加明显 ($P < 0.01$)。与高脂饮食合并 HSP65 组相比,养阴方组的 pSTAT3 水平显著降低 ($P < 0.05$),而在辛伐他汀组未出现明显改变。STAT5 的磷酸化水平在各组均未观察到明显差异。结果表明,养阴方能一定程度上抑制抗原攻击下 AS 小鼠主动脉 STAT3 的磷酸化。结果见图 5。

4 讨论

1999 年, Ross 等^[22]在损伤应答学说的基础上首次提出 AS 本质上是一种炎症性疾病,为脂源性学说等早期理论进行补充。近年来,在人或动物体内检测到的 HSP60 等自身抗原被认为是 AS 的高危

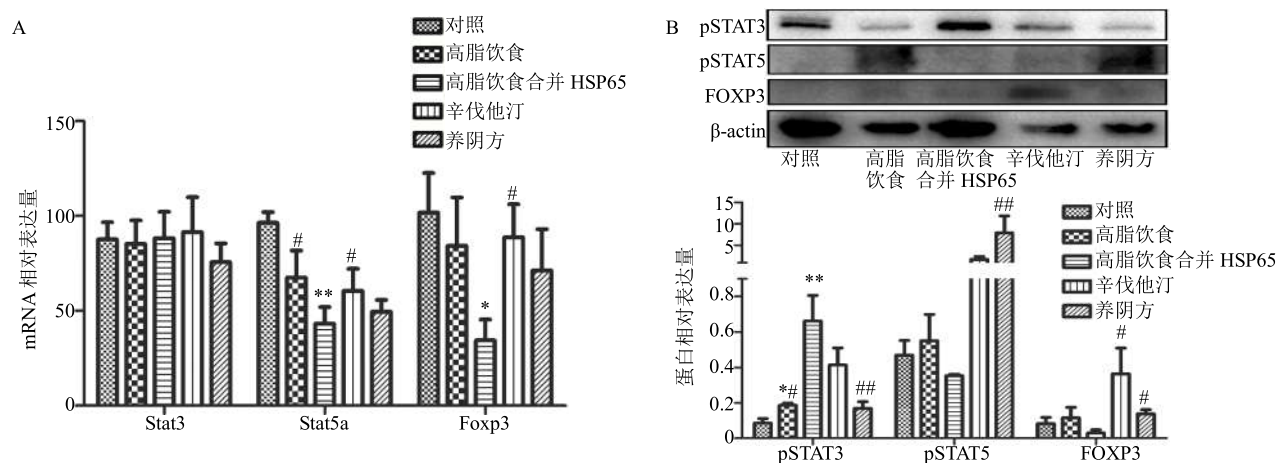


图 4 养阴方对 ApoE^{-/-}小鼠脾脏中 Stat3、Stat5a、Foxp3 mRNA 水平 (A) 及 pSTAT3、pSTAT5、FOXP3 蛋白水平 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Effects of Yangyin Recipe on Stat3, Stat5a, Foxp3 mRNA levels (A) and pSTAT3, pSTAT5, FOXP3 protein levels (B) in spleens of ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

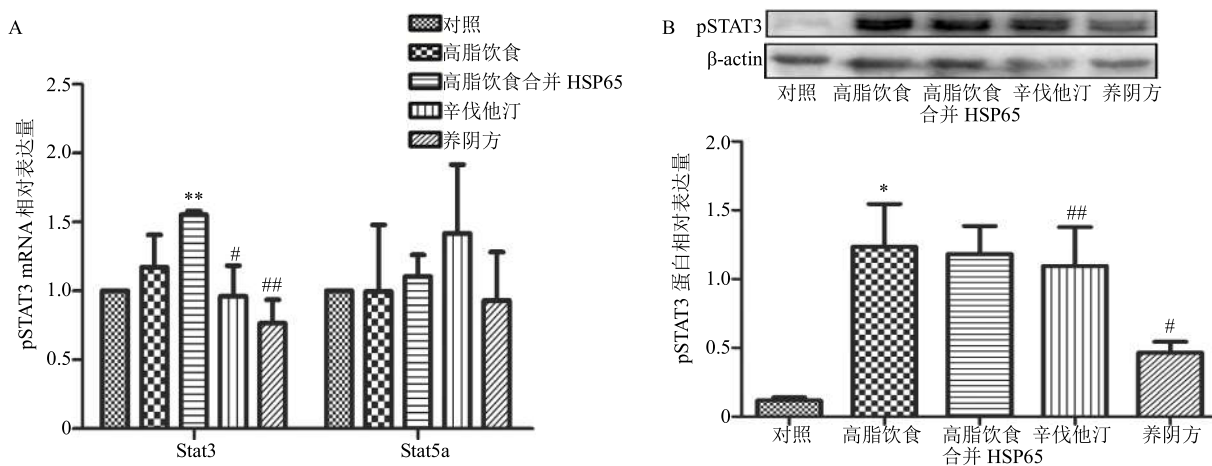


图 5 养阴方对 ApoE^{-/-}小鼠主动脉中 Stat3、Stat5a mRNA 水平 (A) 及蛋白磷酸化水平 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of Yangyin Recipe on Stat3, Stat5a mRNA levels and protein phosphorylation levels in aortas of ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

因素^[23], 能诱导机体产生自身抗体, 激发自身反应性 T 细胞应答^[24]和血管内皮应激^[25], 加重血管炎症和斑块进展。在课题组的前期研究中, 使用 DNA^[26]或蛋白疫苗^[27]通过黏膜免疫诱导机体产生对 HSP65 的耐受, 成功减轻了 AS。本实验使用的 mHSP65 与人源的 HSP60 高度同源, 通过 3 次 sc 模拟 HSP60 诱发的免疫反应以加重 ApoE^{-/-}小鼠的炎症。实验中发现, HSP65 促进了 Th17 细胞的分化, 使 Th17/Treg 比例失衡, 同时阻碍了免疫抑制因子 TGF-β 的产生。这些现象与 AS 病变的加重有一定程度的关联。

炎症因子在传统医学中被解释为热毒^[19], 而国外已有研究发现局部炎症会导致冠心病病人斑块温度升高^[28], 为 AS 与热毒理论的相关性提供了直接依据。由于阴虚为热毒之本, 笔者认为滋阴是从源头治疗 AS 的必要手段。国内外研究表明, 何首乌、黄精及其有效成分具有调脂^[29-30]、抗炎^[31]和改善 AS^[32]的效应。实验结果表明, 养阴方有显著的血脂调节作用, 抑制了 HSP65 攻击下斑块的形成, 同时使 Th17/Treg 下降, 抗炎因子 TGF-β 及 IL-10 水平升高, 从血脂和炎症角度同时控制 AS 的发生发展。

研究表明, 在 IL-6 的作用下 CD4⁺ T 细胞核内

STAT3 信号磷酸化,促使 T 细胞向 Th17 细胞分化^[33],产生炎症应答和组织损伤效应;而 IL-2/pSTAT5 信号则诱导 Treg 细胞的分化^[34]。同时还有数据显示,IL-2 信号能促进 Treg 细胞标志性转录因子 Foxp3 的表达^[35]。在本实验中,养阴方能一定程度上逆转 ApoE^{-/-}小鼠血清中 IL-6 水平和脾脏、主动脉中 STAT3 磷酸化水平的升高。这可能与养阴方对 Th17 的调控效应相关。另一方面,养阴方组升高的血清 IL-2 水平及脾脏 STAT5 磷酸化水平和 FOXP3 蛋白表达水平也与外周血 Treg 细胞数量的变化相似。而这些变化在辛伐他汀组并不明显。以上结果表明,养阴方对 Th17、Treg 细胞分化的调控作用可能通过 IL-6/pSTAT3 与 IL-2/pSTAT5 信号实现,而辛伐他汀这些效应未被发现。

此外,由于脂质代谢异常为 AS 的病变基础,高脂血症是高危病发因素。本实验中使用的 ApoE^{-/-}小鼠作为 AS 的常用模型动物,经过高脂饮食形成了严重的高脂血症。养阴方能显著逆转 TC、TG 和 LDL 水平的增加,恢复 HDL 的水平,显示了强大的调脂效应。但在第 10 周的血脂测量中,无论是养阴方还是调脂药辛伐他汀都未呈现显著的调血脂效应,提示了高脂血症长期治疗的重要性。

综上所述,养阴方在本实验中显著改善 ApoE^{-/-}小鼠的 AS 病变,其效应可能与其调节血脂及通过调控 Th17/Treg 平衡干预炎症相关。实验结果一定程度上说明了养阴治法除内伤杂病之热毒的有效性。由于 STAT 家族受 JAK (Janus kinase)、SOCS (suppressor of cytokine signaling) 等多种因子调控^[36],后续实验需研究其他信号对 IL-6/pSTAT3 与 IL-2/pSTAT5 通路的影响,进一步完善养阴方对 Th17 及 Treg 分化调控的机制研究。

参考文献

[1] Taleb S, Tedgui A, Mallat Z. IL-17 and Th17 cells in atherosclerosis: Subtle and Contextual roles [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(2): 258-264.
 [2] Melzer S, Ankri R, Fixler D, et al. Nanoparticle uptake by macrophages in vulnerable plaques for atherosclerosis diagnosis [J]. *J Biophot*, 2015, 8(11/12): 871-883.
 [3] Rizza S, Copetti M, Cardellini M, et al. A score including ADAM17 substrates correlates to recurring cardiovascular event in subjects with atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2015, 239(2): 459-464.
 [4] 田树平, 李春平, 宋翔, 等. 高血压患者前降支心肌桥与桥前段>50%狭窄的冠状动脉性心脏病发病相关

性分析 [J]. *中华医学杂志*, 2014, 94(21): 1601-1604.
 [5] Horie N, Tateishi Y, Morikawa M, et al. Acute stroke with major intracranial vessel occlusion: Characteristics of cardioembolism and atherosclerosis-related in situ stenosis/occlusion [J]. *J Clin Neurosci*, 2016, 32: 24-29.
 [6] Kim J B, Kim K, Lindsay M E. Risk of rupture or dissection in descending thoracic aortic aneurysm [J]. *Circulation*, 2015, 132(17): 1620-1629.
 [7] Potekhina A V, Pylaeva E, Provatorov S, et al. Treg/Th17 balance in stable CAD patients with different stages of coronary atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2015, 238(1): 17-21.
 [8] Zhu M, Mo H, Li D, et al. Th17/Treg imbalance induced by increased incidence of atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) [J]. *Clin Rheumatol*, 2013, 32(7): 1045-1052.
 [9] Walecki M, Eisel F, Klug J, et al. Androgen receptor modulates Foxp3 expression in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T-cells [J]. *Mol Biol Cell*, 2015, 26(15): 2845-2857.
 [10] Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3⁺ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9⁺ IL-10⁺ Foxp3⁻ effector T cells [J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(12): 1347-1355.
 [11] Bommireddy R, Ormsby I, Yin M, et al. TGF beta 1 inhibits Ca²⁺-calcineurin-mediated activation in thymocytes [J]. *J Immunol*, 2003, 170(7): 3645-3652.
 [12] Li M O, Wan Y Y, Flavell R A. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1-and Th17-cell differentiation [J]. *Immunity*, 2007, 26(5): 579-591.
 [13] Ramesh R, Kozhaya L, McKeivitt K, et al. Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express P-glycoprotein and are refractory to glucocorticoids [J]. *J Exp Med*, 2014, 211(1): 89-104.
 [14] Yin M, Liu Q, Yu L, et al. Downregulations of CD36 and Calpain-1, inflammation, and atherosclerosis by Simvastatin in apolipoprotein E knockout mice [J]. *J Vasc Res*, 2017, 54(3): 123-130.
 [15] Liu M, Yu Y, Jiang H, et al. Simvastatin suppresses vascular inflammation and atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice by downregulating the HMGB1-RAGE axis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(6): 830-836.
 [16] 瞿文云, 吴敏. 糖尿病“瘀热致消”与炎症因子 [J]. *河南中医*, 2014, 34(9): 1654-1656.
 [17] 张宏宁. 自拟骨八方对股骨干骨折瘀热证及炎症介质影响的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2010.
 [18] 王昀. 凉血通瘀方对中风急性期瘀热阻窍证的热象

- 炎症相关指标的研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2010.
- [19] 孙云霞. 论热毒理论与动脉粥样硬化的相关性 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(5): 52-54.
- [20] Grundtman C, Kreutmayer S B, Almanzar G, *et al.* Heat shock protein 60 and immune inflammatory responses in atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(5): 960-968.
- [21] Grundtman C, Wick G. The autoimmune concept of atherosclerosis [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2011, 22(5): 327-334.
- [22] Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2): 115-126.
- [23] Shah P K, Chyu K Y, Dimayuga P C, *et al.* Vaccine for atherosclerosis [J]. *Am Coll Cardiol*, 2014, 64(25): 2779-2791.
- [24] Grundtman C, Kreutmayer S B, Almanzar G, *et al.* Heat shock protein 60 and immune inflammatory responses in atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(5): 960-968.
- [25] Grundtman C, Wick G. The autoimmune concept of atherosclerosis [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2011, 22(5): 327-334.
- [26] Jun L, Jie L, Dongping Y, *et al.* Effects of nasal immunization of multi-target preventive vaccines on atherosclerosis [J]. *Vaccine*, 2012, 30(6): 1029-1037.
- [27] Xiong Q, Li J, Jin L. Nasal immunization with heat shock protein 65 attenuates atherosclerosis and reduces serum lipids in cholesterol-fed wild-type rabbits probably through different mechanisms [J]. *Immunol Lett*, 2009, 125(1): 40-45.
- [28] Stefanadis C, Diamantopoulos L, Vlachopoulos C, *et al.* Thermal heterogeneity within human atherosclerotic coronary arteries detected *in vivo*. A new method of detection by application of a special thermography catheter [J]. *Circulation*, 1999, 99(15): 1965-1971.
- [29] 赖陈岑, 王和生, 赵建雄, 等. 制首乌提取物对兔动脉粥样硬化模型中 ABCA1 表达的影响 [J]. 中药药理与临床, 2015, 31(6): 87-89.
- [30] 何慧明, 刘宇. 黄精降脂方降血脂及抗动脉粥样硬化的实验研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2005, 32(2): 168-169.
- [31] 张萍, 刘丹, 李友元. 黄精多糖对动脉粥样硬化家兔血清 IL-6 及 CRP 的影响 [J]. 医学临床研究, 2006, 23(7): 1100-1101.
- [32] Yao W, Huang C, Sun Q, *et al.* Tetrahydroxystilbene glucoside protects against oxidized LDL-induced endothelial dysfunction via regulating vimentin cytoskeleton and its colocalization with ICAM-1 and VCAM-1 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(5): 1442-1454.
- [33] Wang Y, Xing F, Ye S, *et al.* Jagged-1 signaling suppresses the IL-6 and TGF- β treatment-induced Th17 cell differentiation via the reduction of ROR γ t/IL-17A/IL-17F/IL-23a/IL-12rb1 [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8234.
- [34] Huss D J, Mehta D S, Sharma A, *et al.* *In vivo* maintenance of human regulatory T cells during CD25 blockade [J]. *J Immunol*, 2015, 194(1): 84-92.
- [35] Bailey-Bucktrout S L, Martinez-Llordella M, Zhou X, *et al.* Self-antigen-driven activation induces instability of regulatory T cells during an inflammatory autoimmune response [J]. *Immunity*, 2013, 39(5): 949-962.
- [36] Jang Y N, Baik E J. JAK-STAT pathway and myogenic differentiation [J]. *JAKSTAT*, 2013, 2(2): e23282.