

production via p38/JNK-c-fos signaling inhibits cell apoptosis in 3D floating culture clumps of mesenchymal stem cell/extracellular matrix complexes[J]. *Biophys Res Commun*, 2020, 530(2): 448-454.

- [16] 王 焯, 范小雪, 屈丽媛, 等. 清湿化痰法对子宫腺肌病小鼠 Ras 基因和 COX2-PGE2-P450arom 正反馈环调控机制变化的研究[J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(9): 2094-2096.
- [17] Park J Y, Pillinger M H, Abramson S B. Abramson prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases[J]. *Clin Immunol*, 2006, 119(3): 229-240.
- [18] 吴红彦, 王虎平. 以肝脾论治老年性痴呆及逍遥散对老年痴

呆模型小鼠学习记忆能力、中枢胆碱能神经元活性的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(5): 190-192.

- [19] 吴红彦, 王虎平, 王彩霞. 黑逍遥散对老年性痴呆的防治作用及其机制研究[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(4): 912-913.
- [20] 李海龙, 王虎平, 刘建鸿, 等. 黑逍遥散对 A $\beta_{25-35}$  诱导 AD 大鼠模型脑组织和血清 SOD, GSH-Px 及 MDA 的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(21): 186-189.
- [21] 马春林, 吴红彦, 兰美华, 等. 黑逍遥散干预 APP/PS1 双转基因小鼠海马区 A $\beta$  降解相关基因和蛋白表达效应的研究[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(3): 115-118.

## 清热化痰方调控 Th17 对小鼠心肌缺血再灌注损伤的影响

林文勇<sup>1,2</sup>, 施雪斐<sup>1</sup>, 张春伶<sup>1</sup>, 王栋元<sup>1,2</sup>, 牛振超<sup>1,2</sup>, 芦瑞霞<sup>1,2</sup>, 王 丹<sup>1,2</sup>, 阮小芬<sup>1,2</sup>, 王肖龙<sup>1,2\*</sup>

(1. 上海中医药大学附属曙光医院国家中医心血管病临床医学研究中心分中心, 上海 201203; 2. 上海中医药大学附属曙光医院心血管病研究所, 上海 201203)

**摘要:** 目的 探索清热化痰方通过调控 T 辅助细胞 17 (Th17) 对小鼠心肌缺血再灌注损伤 (I/R) 的影响。方法 45 只小鼠随机分为假手术组、模型组和清热化痰方低、中、高剂量组 (13、26、52 g/kg), 各组小鼠灌胃给予不同剂量清热化痰方或蒸馏水 7 d, 通过左冠状动脉结扎 30 min 再灌注 24 h 建立心肌缺血再灌注损伤模型。术后 24 h 采用心脏超声检测心功能, HE 染色观察心脏组织病理改变, TTC 染色观察心肌梗死面积, 试剂盒检测血清乳酸脱氢酶 (LDH)、白介素 17 (IL-17) 和白介素 6 (IL-6) 水平, Western blot 和 RT-qPCR 法检测心脏组织中 ROR $\gamma$ t mRNA 和蛋白表达, 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, 清热化痰方组小鼠心功能提高, 梗死面积减少, Th17 细胞比例降低, 促炎因子 IL-17 和 IL-6 水平降低, Th17/Treg 动态平衡得到恢复 ( $P < 0.05$ )。结论 清热化痰方可通过调节 Th17 恢复 Th17/Treg 稳态, 从而减轻心肌缺血再灌注损伤。

**关键词:** 清热化痰方; 心肌缺血再灌注损伤; Th17 细胞

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2024)02-0595-06

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.02.040

急性心肌梗死仍然是世界范围内发病和死亡的主要原因<sup>[1-2]</sup>, 早期再灌注是目前拯救心肌梗死患者危险心肌的最有效策略。然而, 早期心肌再灌注却矛盾地诱发了心肌缺血再灌注 (ischemia-reperfusion, I/R) 的损伤<sup>[3]</sup>。I/R 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<sup>[4]</sup>。一系列的病理改变最终导致了心肌细胞凋亡的增加和梗死面积的扩大, 加重心肌梗死患者的临床症状和不良预后<sup>[5]</sup>。因此, 确定新的干预目标和辅助治疗策略以限制 I/R 损伤是非常必要的。

清热化痰方是曙光医院心内科王肖龙教授根据临床经验总结, 发现急性心肌梗死患者以舌质红者居多, 伴随炎症因子水平增高, 因此提出急性心肌梗死“热痰同治”, 在《金匱要略》“三黄汤”的基础上加味组成“清热化痰方”。前期临床研究结果表明, 清热化痰方可以调控免疫微环境, 对心肌梗死后心脏损伤起保护作用, T 辅助细胞 17 (T helper cell 17, Th17) 可能是其抗心肌 I/R 损伤的潜在靶点<sup>[6-8]</sup>, 但其作用机制尚不明确。因此, 本实验拟采用小鼠冠状动脉结扎松解法建立心肌缺血再灌注损伤模型,

**收稿日期:** 2023-05-12

**基金项目:** 国家自然科学基金面上项目 (81573647, 82074222); 上海市中医临床重点实验室 (14DZ2273200); 上海市科委引导类项目 (19401934300); 上海市卫健委中医药事业发展三年行动计划 (ZY [2018-2020] -CCCX-2003-07); 上海市临床重点专科项目 (shslczdk05301); 上海中医药大学附属曙光医院四明青年基金 (SGKJ-202005)

**作者简介:** 林文勇 (1990—), 男, 博士生, 研究方向为中西医结合防治心血管病。Tel: 13761065579, E-mail: 345507472@qq.com

\* **通信作者:** 王肖龙 (1965—), 男, 主任医师, 博士生导师, 研究方向为中西医结合防治心血管病。E-mail: wxlqy0214@163.com

研究清热化痰方抗心肌缺血再灌注损伤的作用, 以期为清热化痰方治疗心肌 I/R 损伤的临床应用提供科学依据。

## 1 材料

1.1 动物 无特定病原体的雄性 C57BL/6 小鼠, 8 周龄, 体质量 20~25 g, 购自浙江维通利华实验动物技术有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (浙) 2019-0001], 饲养于上海中医药大学动物实验中心屏障系统内 [实验动物使用许可证号 SYXK (沪) 2020-0009], 环境温度 (25±2)℃, 相对湿度 (50±10)%, 自由饮食, 12 h/12 h 光照/黑暗循环。实验过程中所有操作均符合实验动物伦理委员会规定 (伦理号 PZSHUTCM210913015)。

1.2 药物与试剂 清热化痰方由黄连 6 g、黄芩 10 g、制大黄 9 g、牡丹皮 12 g、陈皮 18 g、茯苓 30 g、甘草 12 g、丹参 30 g、葛根 30 g 组成, 该颗粒剂购自江阴天江药业有限公司 (批号 2106309), 根据临床用量进行小鼠等效给药剂量换算, 取适量蒸馏水将清热化痰方配制成低、中、高剂量。戊巴比妥钠 (批号 P3761, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 2%, 3, 5 三苯基氯化四氮唑染液 (2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)、苏木素伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染液 (批号 20210721、T8170, 北京索莱宝科技有限公司); 乳酸脱氢酶 (lactic dehydrogenase, LDH) 试剂盒 (批号 20210722, 南京建成生物工程研究所); 白介素-17 (interleukin-17, IL-17)、白介素-6 (IL-6) 试剂盒 (批号 EK217/2-96、EK206/3-96, 杭州联科生物技术有限公司); RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、蛋白上样缓冲液、ECL 化学发光试剂 (批号 ST505、P0012S、P0012A、P0015、P0018S, 上海碧云天生物技术有限公司); 蛋白 Marker (批号 26616, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ROR $\gamma$ t、GAPDH 一抗、HRP-山羊二抗 (批号 GB112204、GB12001、GB23303, 武汉赛维尔生物科技有限公司); SYBR RT-qPCR Master Mix、RNA 抽取试剂盒 (批号 Q341-02、7E552A1, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司); GoScript™ Reverse Transcription (批号 0000389033, 美国 Promega 公司); Percoll 细胞分离液 (批号 10243024, 美国 GE 公司); BB515-CD4、BV650-CD25、AF647-IL-17、PE-FoxP3 荧光抗体 (批号 564419、563719、560437、560046, 美国 BD 公司)。

1.3 仪器 Vivid I 便携式心脏超声仪 (美国 GE 公司); Synergy H1 酶标仪 (美国 BioTek 公司); 5430R 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); ECG-101G 动物用心电图仪 (邦健深圳邦健生物医疗设备股份有限公司); TM-2V45-B9L 体视解剖显微镜 (上海丙林电子科技有限公司); 双通道小动物呼吸机 (北京众实迪创科技发展有限公司); 高通量研磨仪 (上海净信实业发展有限公司); 6100 化学发光成像仪 (上海勤翔科学仪器有限公司); 电泳仪和湿转仪 (美国 Bio-Rad 公司); StepOne Plus 荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); DxFLEX 流式细胞仪 (美国

Beckman 公司)。

## 2 方法

2.1 分组与给药 将 45 只小鼠按随机数字表分为假手术组、模型组和清热化痰方低、中、高剂量组, 每组 9 只。造模前 7 d, 清热化痰方低、中、高剂量组灌胃给予 13、26、52 g/kg 清热化痰方, 假手术组和模型组灌胃给予等体积蒸馏水, 每天 1 次, 连续 7 d。末次灌胃 30 min 后, 模型组和清热化痰方各剂量组小鼠进行心肌缺血再灌注损伤模型建立, 假手术组小鼠仅开胸不结扎冠状动脉。

2.2 心肌缺血再灌注损伤模型建立 称定各组小鼠体质量, 腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠溶液 (15 mL/1 kg) 麻醉, 气管插管成功后仰卧固定在操作台上, 连接小动物呼吸机 (频率 110 bpm, 潮气量 1 mL, 吸呼比 1:1) 和肢体导联心电图仪。脱去前胸毛发, 在左侧胸骨旁第三肋间逐层打开胸腔并暴露心脏, 在体式解剖显微镜下观察左冠状动脉, 于左心耳下缘 1 mm 处以 10-0 缝合线自左冠状动脉下方穿过并取 PE-10 细管置于绳结中结扎, 以心电图 ST 段抬高和心脏前壁至心尖组织广泛发白作为结扎成功的标志。心肌缺血 30 min 后取出 PE-10 细管进行复灌, 以心电图 ST 段回落和发白组织复红作为再灌注成功的标志。逐层关闭胸腔, 脱机, 将小鼠置于 25℃ 环境中复苏。

2.3 心脏超声评估小鼠心功能 麻醉并固定小鼠于操作台上, 待呼吸、心率平稳后, 使用 M 型超声于胸骨旁短轴切面测量收缩末期和舒张末期左室内径, 由超声系统自动计算出左室射血分数及左室短轴缩短率。

2.4 HE 染色观察心脏组织病理损伤 每组随机选取 3 只小鼠, 灌流后取心脏组织, 滤纸吸去心脏表面水分, 于 4% 多聚甲醛中固定 48 h 后进行梯度脱水, 石蜡包埋切片, 脱蜡覆水, 苏木精染色 5 min, 流水冲洗, 返蓝, 伊红染色 1 min, 冲洗, 中性树胶封片, 于显微镜下观察心脏组织病理损伤。

2.5 TTC 染色检测心肌梗死面积 每组随机选取 3 只小鼠, 灌流后取心脏组织, 滤纸吸去心脏表面水分, 放入 -20℃ 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。将切片放入 2% TTC 溶液中, 于 37℃ 水浴锅内避光染色 20 min, 每 5 min 翻动 1 次使染色均匀。将切片用 4% 多聚甲醛固定 24 h 后拍照, 非梗死区域呈红色, 梗死区域呈白色。通过 Image J 软件计算梗死面积。

2.6 试剂盒法检测血清 LDH 活性和 IL-17、IL-6 水平 小鼠心肌缺血再灌注 24 h 后, 眼球取血, 血液室温静置 2 h, 4℃、3 000 r/min 离心 15 min, 按试剂盒说明书检测血清 LDH 活性和 IL-17、IL-6 水平。

2.7 RT-qPCR 法检测心脏组织 ROR $\gamma$ t mRNA 表达 取适量小鼠心脏组织, 按照试剂盒说明书提取总 RNA 并逆转录为 cDNA, 进行实时荧光定量 PCR 反应, 条件为 95℃ 预变性 30 s, 95℃ 变性 10 s, 60℃ 退火延伸 30 s, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> 法计算 ROR $\gamma$ t mRNA 相对表达量。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司设计并合成, 序列见表 1。

表1 引物序列

基因	正向引物	反向引物
ROR $\gamma$ t	5'-GCAAGATCTGTGGGACAAGTC-3'	5'-ACATTACACTGCTGGCTGCG-3'
GAPDH	5'-CCTCGTCCCGTAGACAAATG-3'	5'-TGAGGTCAATGAAGGGCTCGT-3'

2.8 Western blot 法检测心脏组织 ROR $\gamma$ t 蛋白表达 取适量小鼠心脏组织,加入适量裂解液进行匀浆,4℃、12 000 r/min 离心 30 min,取上清液,按 BCA 试剂盒说明书检测各样品蛋白质浓度并调整样品浓度。SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质,湿转法将蛋白转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,5%脱脂牛奶封闭1 h,与一抗(1:1 000)在4℃下孵育过夜,次日与二抗(1:5 000)在室温下孵育1 h,用 ECL 化学发光试剂显影蛋白质电泳条带,拍照并通过 Image J 软件进行条带灰度值分析。以目的条带灰度值与内参条带灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

2.9 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  $\mu$ L CD4 和 CD25 荧光抗体,4℃避光孵育 30 min,用 Fix/Perm 试剂透化后加入 5  $\mu$ L IL-17 和 FoxP3 荧光抗体,4℃避光孵育 30 min,将

细胞重悬并通过流式细胞仪检测。CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>细胞代表 Th17 细胞,而 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>细胞代表 Treg 细胞。

2.10 统计学分析 通过 SPSS 17.0 软件进行处理,计量资料以( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,方差齐采用 LSD 方法检验;方差不齐采用 Dunnett's T3 法检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

3.1 清热化痰方对 I/R 损伤小鼠心功能的影响 如表 2 所示,与假手术组比较,模型组小鼠左室射血分数和左室短轴缩短率降低( $P<0.05$ ),左室收缩末内径和舒张末内径无明显变化( $P>0.05$ );与模型组比较,清热化痰方中剂量组左室射血分数和左室短轴缩短率升高( $P<0.05$ ),左室收缩末内径和舒张末内径无明显变化( $P>0.05$ ),清热化痰方低、高剂量组左室射血分数和左室短轴缩短率均有提升,但均无统计学差异( $P>0.05$ )。结果表明,清热化痰方中剂量组对于 I/R 损伤具有保护作用。

表2 各组小鼠心功能比较( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	左室收缩末内径/mm	左室舒张末内径/mm	左室射血分数/%	左室短轴缩短率/%
假手术组	2.40 $\pm$ 0.04	3.75 $\pm$ 0.09	72.00 $\pm$ 3.46	36.33 $\pm$ 2.88
模型组	2.19 $\pm$ 0.94	2.62 $\pm$ 1.11	40.67 $\pm$ 3.05*	16.33 $\pm$ 1.52*
清热化痰方低剂量组	2.88 $\pm$ 0.36	3.59 $\pm$ 0.37	47.33 $\pm$ 5.03	20.00 $\pm$ 3.00
清热化痰方中剂量组	2.62 $\pm$ 0.28	3.36 $\pm$ 0.39	51.33 $\pm$ 2.88#	22.00 $\pm$ 1.73#
清热化痰方高剂量组	2.62 $\pm$ 0.85	3.22 $\pm$ 1.11	44.33 $\pm$ 3.78	18.33 $\pm$ 2.08

注:与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

3.2 清热化痰方对 I/R 损伤小鼠心脏组织病理改变的影响 如图 1 所示,假手术组小鼠心肌组织的结构正常,心肌排列整齐有序,细胞间隙分明,肌膜完整;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,炎性细胞浸润;清热化痰方各剂量组小鼠心肌细胞结构异常,病理改变减轻。

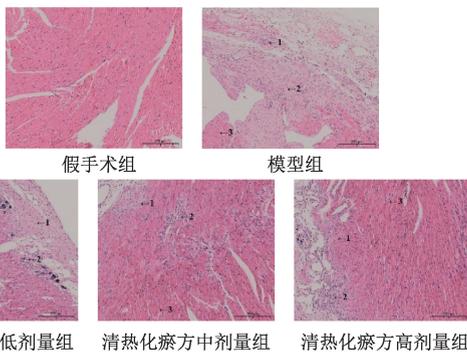


图1 各组小鼠心脏组织病理形态(HE,  $\times 200$ )

3.3 清热化痰方对 I/R 损伤小鼠心肌梗死面积的影响 如图 2、表 3 所示,与假手术组比较,模型组小鼠心肌梗死面积增大( $P<0.05$ );与模型组比较,清热化痰方各剂量组

小鼠心肌梗死面积均减小( $P<0.05$ );与清热化痰方中剂量组比较,清热化痰方高剂量组心肌梗死面积增大( $P<0.05$ )。结果表明,清热化痰方可以缩小小鼠心肌梗死面积。

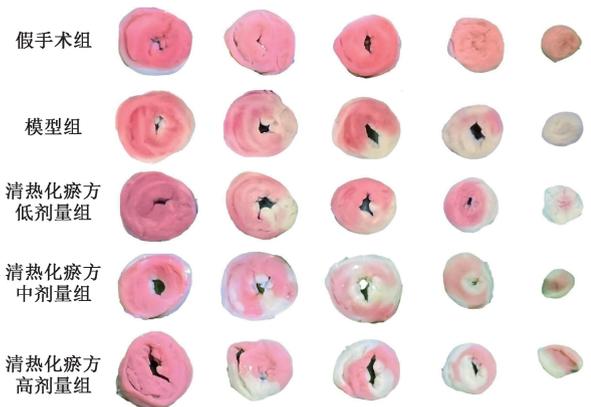


图2 各组小鼠心脏组织 TTC 染色

3.4 清热化痰方对 I/R 损伤小鼠血清 LDH 活性和 IL-17、IL-6 水平的影响 如表 4 所示,与假手术组比较,模型组小鼠血清 LDH 活性升高( $P<0.05$ );与模型组比较,清热化痰方各剂量组小鼠血清 LDH 活性均降低( $P<0.05$ ),提

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

组别	梗死面积/%
假手术组	2.00±1.08
模型组	36.60±2.98*
清热化痰方低剂量组	25.07±1.72 <sup>#</sup>
清热化痰方中剂量组	21.13±2.31 <sup>#</sup>
清热化痰方高剂量组	29.23±1.61 <sup>#&amp;</sup>

注:与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与清热化痰方中剂量组比较,<sup>&</sup> $P<0.05$ 。

表4 各组小鼠血清LDH活性和IL-17、IL-6水平比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

组别	LDH/(U·L <sup>-1</sup> )	IL-17/(pg·mL <sup>-1</sup> )	IL-6/(pg·mL <sup>-1</sup> )
假手术组	501.77±103.33	0.59±0.13	28.54±9.76
模型组	1475.43±178.28*	1.26±0.36*	93.37±16.24*
清热化痰方低剂量组	982.20±124.94 <sup>#</sup>	0.85±0.12 <sup>#</sup>	52.21±11.32 <sup>#Δ</sup>
清热化痰方中剂量组	891.61±136.58 <sup>#</sup>	0.74±0.05 <sup>#</sup>	47.66±9.37 <sup>#Δ</sup>
清热化痰方高剂量组	936.35±73.20 <sup>#</sup>	0.76±0.15 <sup>#</sup>	81.37±11.14 <sup>#</sup>

注:与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与清热化痰方高剂量组比较,<sup>Δ</sup> $P<0.05$ 。

表5 各组小鼠心脏组织RORγt mRNA表达比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

组别	RORγt mRNA 表达
假手术组	1.02±0.28
模型组	1.34±0.19
清热化痰方低剂量组	0.44±0.14 <sup>#</sup>
清热化痰方中剂量组	0.51±0.32 <sup>#</sup>
清热化痰方高剂量组	0.46±0.06 <sup>#</sup>

注:与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ 。

3.6 清热化痰方对I/R损伤小鼠心脏组织RORγt蛋白表达的影响 如图3、表6所示,与假手术组比较,模型组小鼠心脏组织RORγt蛋白表达升高( $P<0.05$ );与模型组比较,清热化痰方各剂量组小鼠心脏组织RORγt蛋白表达降低( $P<0.05$ );与清热化痰方高剂量组比较,清热化痰方低、中剂量组小鼠心脏组织RORγt蛋白表达降低( $P<0.05$ )。

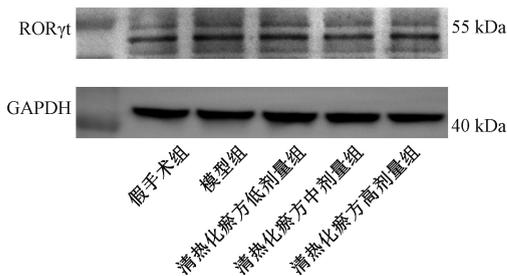


图3 各组小鼠心脏组织RORγt蛋白条带图

表6 各组小鼠心脏组织RORγt蛋白表达比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

组别	RORγt 蛋白表达
假手术组	0.24±0.002
模型组	0.31±0.003*
清热化痰方低剂量组	0.24±0.002 <sup>#Δ</sup>
清热化痰方中剂量组	0.24±0.008 <sup>#Δ</sup>
清热化痰方高剂量组	0.32±0.005 <sup>#</sup>

注:与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与清热化痰方高剂量组比较,<sup>Δ</sup> $P<0.05$ 。

示清热化痰方可以减少细胞的损伤和LDH释放。与假手术组比较,模型组小鼠血清IL-17、IL-6水平升高( $P<0.05$ );与模型组比较,清热化痰方各剂量组小鼠血清IL-17、IL-6水平均降低( $P<0.05$ );与清热化痰方高剂量组比较,清热化痰方低、中剂量组小鼠血清IL-6水平降低( $P<0.05$ )。3.5 清热化痰方对I/R损伤小鼠心脏组织RORγt mRNA表达的影响 如表5所示,与假手术组比较,模型组小鼠心脏组织RORγt mRNA表达升高,但差异无统计学意义( $P>0.05$ );与模型组比较,清热化痰方各剂量组小鼠心脏组织RORγt mRNA表达降低( $P<0.05$ )。

3.7 清热化痰方对I/R损伤小鼠外周血中Th17、Treg细胞比例和Th17/Treg平衡的影响 如图4~5、表7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比值升高( $P<0.05$ ),Treg细胞占比降低,但无统计学意义( $P>0.05$ );与模型组比较,清热化痰方低剂量组小鼠Th17细胞占比降低( $P<0.05$ ),高剂量组Treg细胞占比升高( $P<0.05$ ),低、中剂量组Th17/Treg比值降低( $P<0.05$ )。结果表明,清热化痰方可能通过恢复Th17和Treg细胞的平衡对心肌I/R损伤起修复作用。

表7 各组小鼠外周血中Th17、Treg细胞比例和Th17/Treg比值比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

组别	Th17/%	Treg/%	Th17/Treg
假手术组	4.66±1.73	5.06±2.31	0.96±0.18
模型组	12.76±4.44*	3.90±1.37	3.26±0.15*
清热化痰方低剂量组	5.58±0.15 <sup>#</sup>	4.64±1.28	1.25±0.28 <sup>#</sup>
清热化痰方中剂量组	10.60±0.43	5.75±0.48	1.84±0.08 <sup>#</sup>
清热化痰方高剂量组	15.20±1.47	6.68±0.20 <sup>#</sup>	2.27±0.27

注:与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ 。

#### 4 讨论

心肌I/R损伤是在开展介入治疗之后才被提出并逐渐受到关注,因此古代并无此病。随着研究不断深入,I/R与热毒学的关系越来越受到重视<sup>[9]</sup>。《金匱要略心典》曰:“毒者,邪气蕴结不解之谓。”邪聚则日久成毒,毒聚则日久成疾,体现了外邪致病的变化规律。而热邪蕴结成毒者,虽然临床上表现出热瘀并重,但实则热重于瘀。杨超等<sup>[10]</sup>从血液成分和流变分析了“热毒血瘀”的表征,发现缺血、缺氧、血瘀和变性的根本原因在于炎症反应。

清热化痰方由9味中药组成,该方中君药黄连和黄芩清热泻火;臣药大黄清热解毒、活血化瘀,牡丹皮清热活血;佐药陈皮健脾化痰,诸药合用,共奏清热解毒、活血化瘀之效。现代药理学研究表明,黄芩具有减轻心肌缺血

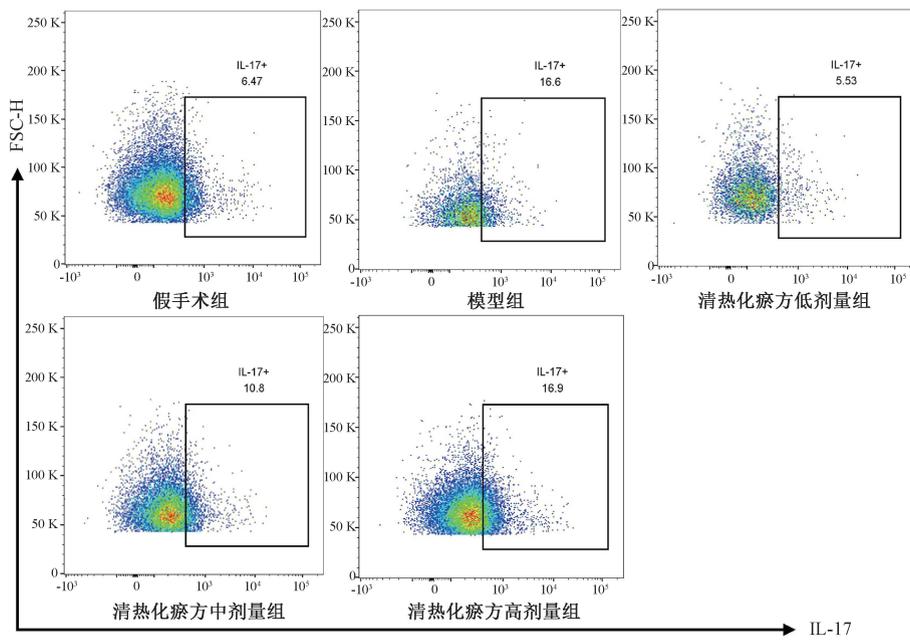


图4 各组小鼠外周血中 Th17 细胞比例

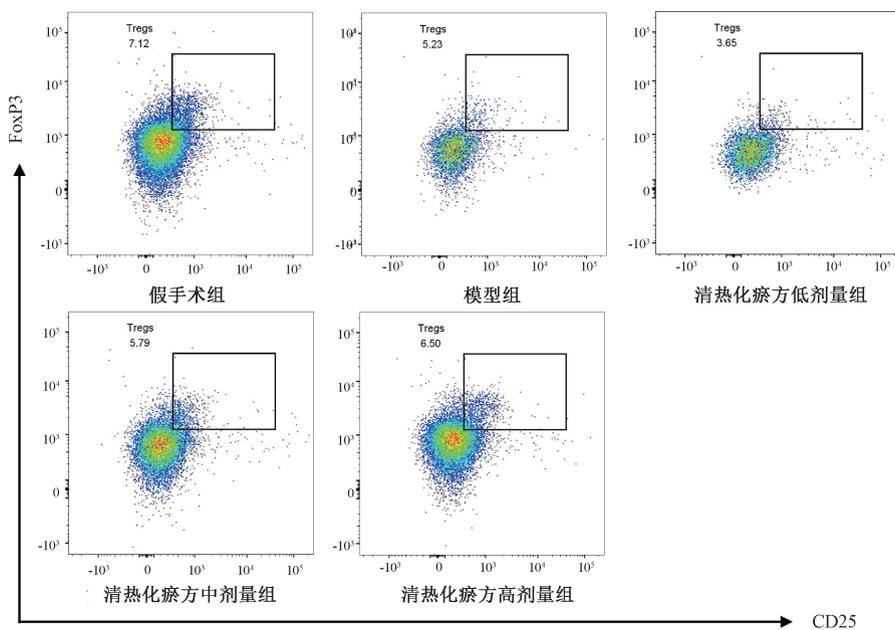


图5 各组小鼠外周血中 Treg 细胞比例

再灌注损伤的作用，还能抗炎、抗氧化、抑制心肌纤维化及抑制平滑肌细胞的增殖<sup>[11]</sup>；黄芩中的有效成分黄芩素被证实具有抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 PAI-1 等炎症因子及 NF- $\kappa$ B 信号通路的表达，减少心肌细胞损伤的作用<sup>[12-14]</sup>。黄连素可以通过下调 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平，增加血液中 NO 水平保护冠心病大鼠血管内皮细胞<sup>[15]</sup>。清热化痰方治疗心肌 I/R 损伤具有较好的应用前景。

本研究发现，清热化痰方可以提高小鼠左心功能，缩小心肌梗死面积，降低外周血中损伤标志物 LDH 活性和炎症因子 IL-6、IL-17 水平，恢复 Th17/Treg 平衡，提示清热化痰方对小鼠心肌缺血再灌注损伤有保护作用。在生理条件下，T 细胞亚群之间维持着相对动态平衡，这种自稳态

在疾病的发生发展中起重要作用<sup>[16]</sup>，T 细胞缺失的小鼠疾病模型已经证明了 T 细胞在缺血<sup>[17]</sup>和心肌梗死<sup>[18-19]</sup>中的关键作用。Th17 细胞是第 3 个被发现并被描述的 T 辅助细胞亚群，以分泌 IL-17 为主的促炎细胞，关键性地参与到炎症反应中<sup>[20]</sup>。Th17 的分化离不开 IL-6，IL-6 可直接作用于 T 细胞，通过信号转导 gp130 的酪氨酸残基诱导 STAT3 激活。STAT3 可以诱导 Th17 细胞特异性转录因子 ROR $\gamma$ t 的表达，促进 Th17 细胞的分化<sup>[21]</sup>。Th17 分泌的炎症因子 IL-17 能促进急性心肌梗死后的炎症反应，引起心肌肥大和心室重构<sup>[22]</sup>。与 Th17 细胞促炎相对应的，Treg 细胞是另一群起炎症抑制作用并维持机体免疫稳态的重要 T 细胞亚群，越来越多的研究表明 Treg 细胞在 I/R 损伤后的心脏修复中发

挥重要作用<sup>[23]</sup>。因此,识别和开发一种激活 Treg 细胞增殖或抑制 Th17 细胞分化的选择性免疫调节剂或将成为抗 I/R 损伤的潜在治疗策略。本研究发现,清热化痰方可恢复 Th17/Treg 平衡。

综上所述,清热化痰方对于心肌 I/R 损伤的保护作用可能与调节 Th17 细胞及 Th17/Treg 免疫平衡有关,更确切的调控机制还有待进一步研究。

#### 参考文献:

[ 1 ] Pu J, Mintz G S, Biro S, *et al.* Insights into echo-attenuated plaques, echolucent plaques, and plaques with spotty calcification: novel findings from comparisons among intravascular ultrasound, near-infrared spectroscopy, and pathological histology in 2 294 human coronary artery segments [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63(21): 2220-2233.

[ 2 ] Tao L, Shen S, Fu S, *et al.* Traditional Chinese medication Qiliqiangxin attenuates cardiac remodeling after acute myocardial infarction in mice[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8374.

[ 3 ] Lee D, Bae S, Hong D, *et al.* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-responsive molecularly engineered polymer nanoparticles as ischemia/reperfusion-targeted nanotherapeutic agents[J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 2233.

[ 4 ] Yao T, Ying X, Zhao Y, *et al.* Vitamin D receptor activation protects against myocardial reperfusion injury through inhibition of apoptosis and modulation of autophagy [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 22(8): 633-650.

[ 5 ] He Q, Pu J, Yuan A, *et al.* Activation of liver-X-receptor  $\alpha$  but not liver-X-receptor  $\beta$  protects against myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Circ Heart Fail*, 2014, 7(6): 1032-1041.

[ 6 ] 施雪斐,王肖龙,陈铁军,等. 清热化痰方对热毒血瘀型急性 ST 段抬高型心肌梗死病人急诊 PCI 术后左室重构的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2022, 20(1): 19-23.

[ 7 ] 施雪斐,王肖龙,李益萍,等. 清热化痰方对急性 ST 段抬高型心肌梗死热毒血瘀证病人 T 淋巴细胞亚群的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(21): 3530-3534.

[ 8 ] 郑宇昕,李益萍,朱修乐,等. 清热化痰方干预对急性冠脉综合征 PCI 术后患者炎症反应的影响 [J]. 中国中医急症, 2020, 29(1): 65-67.

[ 9 ] 彭 锐,吴 伟,葛 昕. 从炎症因子角度谈冠心病热毒病机 [J]. 世界中西医结合杂志, 2010, 5(8): 732-735.

[ 10 ] 杨 超,周 岩,孙晓红,等. 具有中医“热毒血瘀证”表征的大鼠血液成分和流变学变化 [J]. 中国比较医学杂志,

2007, 17(10): 607-612.

[ 11 ] 柏 哲,祝海毅,何德英,等. 黄芩有效成分治疗冠心病的实验研究进展 [J]. 中国中医急症, 2019, 28(5): 927-929.

[ 12 ] Khan S, Zhang D, Zhang Y, *et al.* Wogonin attenuates diabetic cardiomyopathy through its anti-inflammatory and anti-oxidative properties [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 428: 101-108.

[ 13 ] Kim D H, Hossain M A, Kang Y J, *et al.* Baicalein, an active component of *Scutellaria baicalensis* Georgi, induces apoptosis in human colon cancer cells and prevents AOM/DSS-induced colon cancer in mice [J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(5): 1652-1658.

[ 14 ] Lee Y M, Cheng P Y, Chen S Y, *et al.* Wogonin suppresses arrhythmias, inflammatory responses, and apoptosis induced by myocardial ischemia/reperfusion in rats [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2011, 58(2): 133-142.

[ 15 ] 曹雪明,朱 娜. 黄连素对冠心病大鼠心肌细胞凋亡的影响及其机制研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(22): 3504-3507.

[ 16 ] Lu Y, Xia N, Cheng X. Regulatory T cells in chronic heart failure [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 732794.

[ 17 ] Stabile E, Burnett M S, Watkins C, *et al.* Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice [J]. *Circulation*, 2003, 108(2): 205-210.

[ 18 ] Borg N, Alter C, Gördlt N, *et al.* CD73 on T cells orchestrates cardiac wound healing after myocardial infarction by purinergic metabolic reprogramming [J]. *Circulation*, 2017, 136(3): 297-313.

[ 19 ] Protti A, Mongue-Din H, Mylonas K J, *et al.* Bone marrow transplantation modulates tissue macrophage phenotype and enhances cardiac recovery after subsequent acute myocardial infarction [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 90: 120-128.

[ 20 ] Korn T, Bettelli E, Oukka M, *et al.* IL-17 and Th17 cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 485-517.

[ 21 ] Nishihara M, Ogura H, Ueda N, *et al.* IL-6-gp130-STAT3 in T cells directs the development of IL-17<sup>+</sup> Th with a minimum effect on that of Treg in the steady state [J]. *Int Immunol*, 2007, 19(6): 695-702.

[ 22 ] Feng W, Li W, Liu W, *et al.* IL-17 induces myocardial fibrosis and enhances RANKL/OPG and MMP/TIMP signaling in isoproterenol-induced heart failure [J]. *Exp Mol Pathol*, 2009, 87(3): 212-218.

[ 23 ] Mandatori S, Pacella I, Marzolla V, *et al.* Altered Tregs differentiation and impaired autophagy correlate to atherosclerotic disease [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 350.