片仔癀对急性应激小鼠髓系和淋巴系免疫细胞的作用研究

覃日凤[1,2,3,4], 叶春红[1,2,3,4], 栗原博[1,2,3,4], 欧阳淑桦[1,2,3,4], 李　坤[1,2,3,4],
李怡芳[1,2,3,4,5*], 何蓉蓉[1,2,3,4*]

(1. 暨南大学, 广东省疾病易感性及中医药研发工程技术研究中心, 广东 广州 510632;　2. 暨南大学, 广州市疾病易感性与中医药防治重点实验室, 广东 广州 510632;　3. 暨南大学, 广东省粤港澳高校联合实验室, 广东 广州 510632;　4. 暨南大学, 中药及天然药物研究所, 广东 广州 510632;　5. 暨南大学附属江门中医院, 广东 江门 529000)

摘要: 利用急性应激小鼠模型系统研究和探讨片仔癀 (Pien Tze Huang, PTH) 对急性应激小鼠髓系和淋巴系免疫功能细胞的调节作用。将C57BL/6J小鼠随机分为空白对照组、急性拘束应激组, 急性拘束应激+片仔癀高低剂量组。除空白对照组外, 其余各组小鼠于实验前连续7天灌胃给药, 并于第7天给药后进行拘束应激, 应激18 h后继续给药2天后处死小鼠, 测定脾脏和胸腺重量并计算脏器指数, 采用流式细胞术检测小鼠脾脏和外周血中髓系和淋巴系免疫细胞的数目、百分比, 测定小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬能力。结果显示, 急性拘束应激能够让小鼠外周血和脾脏中髓系细胞 (嗜酸性粒细胞、巨噬细胞) 的百分比升高, 同时使小鼠外周血和脾脏中淋巴系免疫细胞 ($CD3^+CD4^+$ T细胞、$CD3^+CD8^+$ T细胞、自然杀伤T细胞、B细胞) 的百分比降低, 且小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能下降。经片仔癀处理后, 急性拘束应激小鼠外周血和脾脏中髓系细胞 (嗜酸性粒细胞) 的百分比降低, 淋巴系免疫细胞 ($CD3^+CD4^+$ T细胞、$CD3^+CD8^+$ T细胞、自然杀伤T细胞、B细胞) 的百分比升高, 同时腹腔巨噬细胞的吞噬功能有所改善。本文研究证实片仔癀能够缓解急性应激导致的免疫紊乱, 为其在防治情志应激相关疾病中的临床应用提供了实验依据。本实验获得暨南大学动物伦理委员会的批准 (批准号: IACUC-20240220-14)。

关键词: 片仔癀; 急性应激; 免疫调节; T淋巴细胞, 髓系细胞; 巨噬细胞

中图分类号: R967　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0513-4870(2025)07-2227-10

The effects of Pien Tze Huang on myeloid and lymphoid immune cells in mice subjected to acute stress

QIN Ri-feng[1,2,3,4], YE Chun-hong[1,2,3,4], KURIHARA Hiroshi[1,2,3,4], OUYANG Shu-hua[1,2,3,4],
LI Kun[1,2,3,4], LI Yi-fang[1,2,3,4,5*], HE Rong-rong[1,2,3,4*]

(*1. Guangdong Engineering Research Center of Traditional Chinese Medicine and Disease Susceptibility, Jinan University, Guangzhou 510632, China;　2. Guangzhou Key Laboratory of Disease Susceptibility and TCM Prevention and Treatment, Jinan University, Guangzhou 510632, China;　3. Joint Laboratory of Guangdong, Hong Kong and Macao Universities, Guangdong Province, Jinan University, Guangzhou 510632, China;　4. Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, Jinan University, Guangzhou 510632, China;　5. Jiangmen Hospital of Traditional Chinese Medicine affiliated to Jinan University, Jiangmnen 529000, China*)

Abstract: This study employed an acute stress mouse model to systematically explore the regulatory effects of Pien Tze Huang (PTH) on myeloid and lymphoid immune cells in acutely stressed mice. C57BL/6J mice were randomly divided into a control group, an acute restraint stress group, and high dose and low dose Pien Tze Huang

收稿日期: 2025-03-26;　修回日期: 2025-05-12.
基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金 (2023B1515040016); 国家自然科学基金创新群体项目 (82321004); 中国博士后科学基金 (2024M761173).
*通讯作者 E-mail: liyifang706@jnu.edu.cn; rongronghe@jnu.edu.cn
DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0332

groups with acute restraint stress. Except for the control group, mice in the other groups were administered drugs by gavage for 7 consecutive days before the experiment. On the 7th day, after drug administration, restraint stress was applied for 18 h, followed by an additional 2 days of drug administration. Mice were then sacrificed to measure the weights of the spleen and thymus and calculate organ indices. Flow cytometry was used to detect the numbers and proportion of myeloid and lymphoid immune cells in the spleen and peripheral blood of mice. The phagocytic capacity of peritoneal macrophages in mice was also measured. The results show that acute restraint stress increased the proportion of myeloid cells (eosinophils, macrophages) in peripheral blood and the spleen of mice, while decreasing the proportion of lymphoid immune cells ($CD3^+CD4^+$ T cells, $CD3^+CD8^+$ T cells, natural killer T cells, B cells). It also reduced the phagocytic function of peritoneal macrophages in mice. After treatment with PTH, the proportion of myeloid cells (eosinophils) in peripheral blood and the spleen of stressed mice decreased, while the proportion of lymphoid immune cells ($CD3^+CD4^+$ T cells, $CD3^+CD8^+$ T cells, natural killer T cells, B cells) increased. Additionally, the phagocytic function of peritoneal macrophages improved. This study shows that PTH can alleviate immune disorders caused by acute stress, providing experimental evidence for its use in treating psychosocial stress-related diseases. This experiment was approved by the Animal Ethics Committee of Jinan University (Approval No.: IACUC-20240220-14).

Key words: Pien Tze Huang; acute stress; immune regulation; T lymphocyte, myeloid cell; macrophage

免疫系统是维持机体稳态和抵御病原体入侵的核心防线, 其功能受遗传、环境及心理生理状态等多因素调控。关于情志应激和免疫系统的关系, 中医理论认为情志应激过度会直接损伤脏腑功能, 进而影响气血运行, 导致机体阴阳失衡。这种失衡可进一步影响免疫系统的功能, 具体表现为心脾两虚, 导致气血生化不足[1]。已有研究表明, 拘束应激模型能够有效模拟人类情志致病的过程, 因此基于该模型研究中药对情志致病的干预作用具有重要的科学意义和实践价值[2]。急性拘束应激 (acute restraint stress, ARS) 作为经典实验模型, 可通过限制动物活动模拟人类应激状态, 其对免疫功能的影响在不同时间阶段表现出复杂性。本课题组前期研究发现, 急性拘束应激 18 h 后, 小鼠脾脏指数和包括自然杀伤 T 细胞 (natural killer T cell, NKT) 在内的脾淋巴细胞数量显著降低, NK 细胞活性也受到显著抑制[3], 此外, 在急性拘束应激 12 h 后恢复 2 天, 小鼠的 $CD4^+/CD8^+$ T 细胞比率明显增加[4], 进一步研究发现, 急性拘束应激 18 h 后恢复至第 3 天, 小鼠脾脏和胸腺细胞数量以及 NK 细胞活性仍受到显著抑制, 脾脏免疫功能明显受损[5]。此外, 急性应激还可导致外周血中 $CD4^+/CD8^+$ T 细胞比例失衡及单核细胞比例升高, 加剧感染和炎症性疾病风险[6]。

中医药在免疫调节领域具有独特优势, 中医药强调“扶正祛邪”, 中医药通过疏肝解郁、调和气血、扶正固本等方法, 可有效缓解情志应激对免疫系统的负面影响, 恢复机体免疫平衡。近年来, 许多中药复方和单体成分被证明具有抗炎、抗氧化和免疫调节等多种生物活性[7,8]。片仔癀 (Pien Tze Huang, PTH) 作为国家一级中药保护品种, 由麝香、牛黄、蛇胆、三七等药材组成, 具有清热解毒、凉血化瘀的功效, 广泛应用于多种疾病的治疗。现代药理学研究表明, 片仔癀可通过多靶点调控免疫反应: 其成分牛磺酸能抑制 NF-κB 通路, 减轻炎症损伤[9]; 麝香酮调控 PI3K/Akt 信号通路抑制心肌缺血损伤[10]。此外, 片仔癀在 T 细胞介导的抗肿瘤免疫中具有新的免疫调节功能; 在体外 $CD4^+$ T 细胞中表现出显著的增强 T 细胞活化及干扰素 γ、肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 2 的产生能力; 片仔癀还通过肿瘤浸润 $CD8^+$ T 细胞显著抑制 T 细胞耗竭并促进细胞因子的产生[11]。这些结果与本课题组前期研究相呼应: 在情志应激诱导的流感病毒易感模型中, 片仔癀通过抑制肺组织 NLRP3/GSDMD 信号通路, 降低炎症因子 (TNF-α、IL-1β、IL-6) 水平, 同时减少氧化应激标志物 (MDA、4-HNE) 的积累, 从而降低对情志应激诱导的流感病毒易感性[12]。然而, 现有研究多聚焦于慢性炎症模型, 片仔癀对应激状态下的免疫调节效应尚未被系统阐明。

本研究旨在通过建立急性拘束应激小鼠模型, 揭示片仔癀对小鼠脾脏和胸腺等免疫器官形态、脾脏和外周血髓系和淋巴系免疫细胞亚群分布及免疫细胞功能的影响, 探讨片仔癀对情志应激小鼠免疫功能的调节作用, 以期为片仔癀的临床应用提供科学依据。本研究不仅有助于深入理解片仔癀的免疫调节效应, 还为开发基于中医药的应激干预策略提供理论支持。

材料与方法

动物 6 周龄的 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 购自珠海百试通生物科技有限公司, 实验动物许可证编号: SCXK(粤) 2020-0051, 温度 22 ± 2 ℃, 湿度 50% ± 5%,

12 h明暗交替环境, 标准饲料和水喂养。小鼠适应性喂养1周后进行实验。动物福利和实验过程均遵循暨南大学动物伦理委员会的规定 (批准号: IACUC-20240220-14)。

试剂 片仔癀 (漳州片仔癀药业股份有限公司, 批号: 2205082); 红细胞裂解液 (天根生化科技有限公司, 货号: RT122-02); DMEM (货号: 11995500BT)、RPMI 1640 (货号: C11875500B)、胎牛血清 (货号: 10091148), 美国Gibco公司; FluoSpheres羧基修饰微球 (美国Thermo Fisher Scientific公司, 货号: F8827); 青霉素–链霉素溶液 (上海碧云天生物技术有限公司, 货号: C0222); anti-mouse CD3、anti-mouse CD4、anti-mouse CD8、anti-mouse γδ TCR、anti-mouse CD19、anti-mouse NK1.1、anti-mouse CD11b、anti-mouse CD11c、anti-mouse F4/80、anti-mouse Ly6g、anti-mouse Siglec-F、anti-mouse MHC-Ⅱ (美国eBioscience公司, 货号分别为: 17-0032-82、17-0041-81、11-0081-82、16-5811-85、17-0193-82、17-5941-82、17-0112-81、17-0114-81、17-4801-80、11-5931-82、14-1702-82、11-5321-82)。

仪器 高维多色光谱流式细胞仪 (无锡厦泰生物科技有限公司, 型号: NL-CLC); 流式细胞仪 (美国贝克曼库尔特公司, 型号: CytoFLEX S); 高速冷冻离心机 (型号: D-16C)、精密pH调节计 (型号: 2018C132-11), Satorius公司; 细胞培养箱 (新加坡ESCO公司, 型号: CLM-171B-8-NF); 倒置显微镜 (日本Olympus公司IX51, 型号: IX51); 制冰机 (宁波新芝生物科技公司, 型号: XB-150)。

急性拘束应激模型的建立 本研究中使用的应激模型为急性拘束应激模型, 即将小鼠拘束于自制的通风良好的50 mL尖底聚丙烯塑料离心管, 给予一次性拘束18 h (15:00～9:00), 拘束期间小鼠不能进食饮水。

分组与给药 小鼠适应性喂养一周后, 将小鼠随机分为空白对照组 (control)、急性拘束应激组 (ARS)、急性拘束应激+片仔癀低剂量组 (ARS+PTH-L)、急性拘束应激+片仔癀高剂量组 (ARS+PTH-H), 每组10只。《中国药典》片仔癀推荐用量为每次0.6 g, 每日2～3次, 日服最高药量是1.8 g, 若成人体重按70 kg算, 则成人剂量为0.025 7 $g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$。依据人与小鼠体表面积换算系数计算出片仔癀小鼠等效剂量为0.234 $g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$。片仔癀低剂量组 (PTH-L) 给药剂量为0.117 $g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$, 相当于临床等效剂量的0.5倍, 片仔癀高剂量组 (PTH-H) 给药剂量为0.234 $g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$, 相当于临床等效剂量。在进行急性拘束应激前各组小鼠提前给予相应药物或纯水进行干预, 连续灌胃7天。除空白对照组外其他各组在第7天给药后放置在自制的通风良好的50 mL尖底聚丙烯塑料离心管中进行一次18 h (15:00～9:00) 急性拘束应激, 拘束期间所有老鼠禁食禁水, 急性拘束应激18 h后恢复2天期间也进行给药, 给药期间每天测量小鼠体重, 在进行急性拘束应激18 h后恢复2天后处死小鼠。

小鼠脾脏和胸腺指数的计算 采用脊椎脱臼法处死小鼠, 于冰上摘取脾脏和胸腺, 拍照并称取组织重量, 脾脏和胸腺指数计算公式为: 脏器指数=脏器重量 (g) /小鼠体重 (g) ×100%。

全血裂红法提取小鼠外周血淋巴细胞 将小鼠用异氟烷麻醉后去眼球取血, 约7～8滴到含有10 μL肝素钠 (浓度1 $mg\cdot mL^{-1}$) 的2 mL EP管中, 加入红细胞裂解液1 mL, 上下颠倒混匀, 常温放置10 min, 离心5 000 $r\cdot min^{-1}$, 5 min; 弃上清, 重复上述步骤两次, 确保裂红彻底, 加入2% FBS的PBS 1 mL, 重悬细胞, 然后离心5 000 $r\cdot min^{-1}$, 5 min; 弃上清, 用100 μL含10% FBS的培养基重悬细胞, 加入需要孵育的抗体混匀, 避光, 4 ℃, 20 min; 孵育结束, 加入1 mL 10% FBS的PBS洗涤, 离心, 5 000 $r\cdot min^{-1}$, 5 min弃上清, 100 μL 1× PBS重悬。

小鼠脾脏淋巴细胞提取方法 采用脊椎脱臼法处死小鼠, 于冰上摘取脾脏, 将小鼠整颗脾脏用两片载玻片的磨砂区域研磨, 研磨期间加入适量RPMI 1640培养基冲洗, 并收集组织混悬液。用70 μm细胞筛过滤组织悬液, 制成单细胞悬液。将单细胞悬液1 400 $r\cdot min^{-1}$ 4 ℃离心10 min, 弃上清。加入2 mL红细胞裂解液, 用移液枪轻轻吹打混匀, 置于室温裂解5 min。裂解完成后, 加入8 mL RPMI 1640培养基终止裂解, 并用70 μm细胞筛过滤细胞, 去除细胞团块。然后1 400 $r\cdot min^{-1}$ 4 ℃离心10 min, 弃上清, 再加入4 mL新鲜RPMI 1640培养基重悬, 重复该操作2次, 清洗样品。用800 μL 1× PBS重悬细胞。

流式检测小鼠脾脏和外周血中各类淋巴系免疫细胞的百分比 将上述小鼠外周血和脾脏单细胞悬液样品分别吸取20 μL于96孔板中, 将anti-mouse CD3抗体、anti-mouse CD4抗体、anti-mouse CD8抗体、anti-mouse γδ TCR抗体、anti-mouse CD19抗体、anti-mouse NK1.1抗体等体积混合并用PBS稀释200倍, 混合均匀后向每个样品孔中加200 μL上述抗体, 用移液枪轻轻吹匀后, 置于4 ℃避光孵育15 min。孵育完成后, 向每管中加入500 μL PBS以终止并清洗细胞, 然后1 400 $r\cdot min^{-1}$ 4 ℃离心10 min, 弃上清。加入200 μL PBS重悬细胞, 用高维多色光谱流式细胞仪进行检测。使用FlowJo软件处理分析流式数据, 在数据分析过程中, 首先通过前向散射光 (FSC) 与侧向散射光 (SSC) 散点图排除细胞碎片和杂质, 在圈出白细胞的基础上,

通过CD3、CD4、CD8、γδTCR和NK1.1等标记物的荧光信号, 分别圈门分析各T细胞亚群和NK细胞。并分别计算脾脏淋巴系免疫细胞亚群占总脾脏免疫细胞的百分比、外周血淋巴系免疫细胞亚群占总外周血免疫细胞的百分比。

流式检测小鼠脾脏和外周血中各类髓系免疫细胞的百分比 将上述小鼠外周血和脾脏单细胞悬液样品分别吸取20 μL于96孔板中, 将anti-mouse CD11b抗体、anti-mouse CD11c抗体、anti-mouse F4/80抗体、anti-mouse Ly6g抗体、anti-mouse Siglec-F抗体、anti-mouse MHC-Ⅱ抗体等体积混合并用PBS稀释200倍, 混合均匀后向每个样品孔中加200 μL上述抗体, 用移液枪轻轻吹匀后, 置于4 ℃避光孵育15 min。孵育完成后, 向每管中加入500 μL PBS以终止并清洗细胞, 然后1 400 r·min^{-1} 4 ℃离心10 min, 弃上清。加入200 μL PBS重悬细胞, 用高维多色光谱流式细胞仪进行检测。使用FlowJo软件处理分析流式数据, 在数据分析过程中, 首先通过FSC与SSC散点图排除细胞碎片和杂质, 圈出白细胞群体。随后, 根据细胞表面标志物的荧光信号, 进一步圈门分析各髓系细胞亚群。通过CD11c与MHC-II双阳性标记树突状细胞(DC细胞), 通过CD11b与Ly6G双阳性标记中性粒细胞, 通过CD11c阴性与Siglec-F阳性标记嗜酸性粒细胞, 通过F4/80与CD11b双阳性标记巨噬细胞, 并分别计算脾脏髓系免疫细胞亚群占总脾脏免疫细胞的百分比、外周血髓系免疫细胞亚群占总外周血免疫细胞的百分比。

流式检测小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬能力 采用脊椎脱臼法处死小鼠, 将小鼠浸泡于75%的乙醇中消毒。消毒完成后, 向小鼠腹腔内注射5 mL无菌PBS, 充分按摩小鼠腹部, 以提取尽可能多的细胞。左手持镊子提起小鼠腹部皮肤, 右手持剪刀在小鼠下腹部小心剪开一个小口, 用移液枪吸取小鼠腹腔灌洗液, 吸取过程中尽量避开腹腔内脏器。用0.45 μm的细胞滤网过滤除去组织碎片。收集的腹腔灌洗液1 000 r·min^{-1}离心5 min, 弃上清, 将下层细胞沉淀用含有10% FBS的DMEM重悬, 置于6孔板中培养6 h后换液, 贴壁且长有触角的细胞即为小鼠原代腹腔巨噬细胞。取15 μL荧光微球混悬液加入15 mL 1% BSA溶液中, 吹打混匀后, 置于37 ℃包被40 min, 然后超声10 min使微球在BSA中均匀分布。去除6孔板中原来的培养基, 每孔加入400 μL DMEM和400 μL荧光微球混悬液, 使荧光微球的终密度为每毫升2×10^{6}个。37 ℃共孵育45 min, 使巨噬细胞吞噬荧光微球。吞噬结束后, 用PBS将未被吞噬的荧光微球充分洗去。用细胞刮收集剩余细胞, 1 000 r·min^{-1}离心5 min, 弃去上清并加入200 μL PBS重悬细胞。用流式细胞仪进行分析。

统计学分析 实验数据采用GraphPad Prism8.0进行统计分析, 数据以$\bar{x} \pm$ SEM表示。组间比较应用单因素方差分析(one-way ANOVA)。$P < 0.05$说明差异具有统计学意义。

结果

1 片仔癀对急性拘束应激小鼠免疫器官形态和指数的影响

本研究首先利用课题组前期构建的急性拘束应激后恢复两天免疫力最低的小鼠模型[13], 评价片仔癀对该模型小鼠免疫器官形态和指数的影响, 具体的造模及给药流程见图1A。在急性拘束应激期间, 各组小鼠体重均降低, 在急性拘束应激后恢复期间, 各组小鼠体重均升高(图1B)。与空白对照组相比, 急性拘束应激组小鼠脾脏和胸腺明显变小(图1C), 脾脏和胸腺实重和指数均明显降低。与急性拘束应激组相比, 高剂量片仔癀有增加脾脏重量和脾脏指数的趋势, 但无显著性差异(图1D、E), 对胸腺重量及胸腺指数无明显影响(图1F、G)。

2 片仔癀对急性拘束应激小鼠外周血髓系免疫细胞亚群的影响

为了进一步探索片仔癀对急性拘束应激小鼠外周血中髓系免疫细胞亚群的影响, 本研究使用流式细胞仪检测分析了小鼠外周血髓系免疫细胞亚群的分布。结果如图2所示, 与空白对照组相比, 急性拘束应激组小鼠外周血中DC细胞、中性粒细胞的百分比无显著差异, 而嗜酸性粒细胞和巨噬细胞的百分比明显增加。与急性拘束应激组相比, 低、高剂量片仔癀可以明显降低急性拘束应激小鼠外周血中嗜酸性粒细胞和巨噬细胞的百分比。上述结果表明, 片仔癀给药可以缓解急性拘束应激引起的外周血中嗜酸性粒细胞和巨噬细胞的变化。

3 片仔癀对急性拘束应激小鼠外周血淋巴系免疫细胞T细胞亚群和NK细胞的影响

为了进一步探索片仔癀对急性拘束应激小鼠外周血淋巴系免疫细胞T细胞亚群和NK细胞的影响, 本研究使用流式细胞仪检测分析了小鼠外周血T细胞亚群和NK细胞的分布。结果如图3所示, 与空白对照组相比, 急性拘束应激组小鼠外周血中$CD3^+CD4^+$ T细胞、$CD3^+CD8^+$ T细胞、$CD3^+gdT^+$ γδT细胞、$CD3^+NK1.1^+$ NKT细胞、$CD3^-NK1.1^+$ NK细胞的百分比均明显降低。而与急性拘束应激组相比, 低、高剂量片仔癀可提高$CD3^+CD4^+$ T细胞、$CD3^+CD8^+$ T细胞、$CD3^+gdT^+$ γδT细胞、$CD3^+NK1.1^+$ NKT细胞、$CD3^-NK1.1^+$ NK细胞的

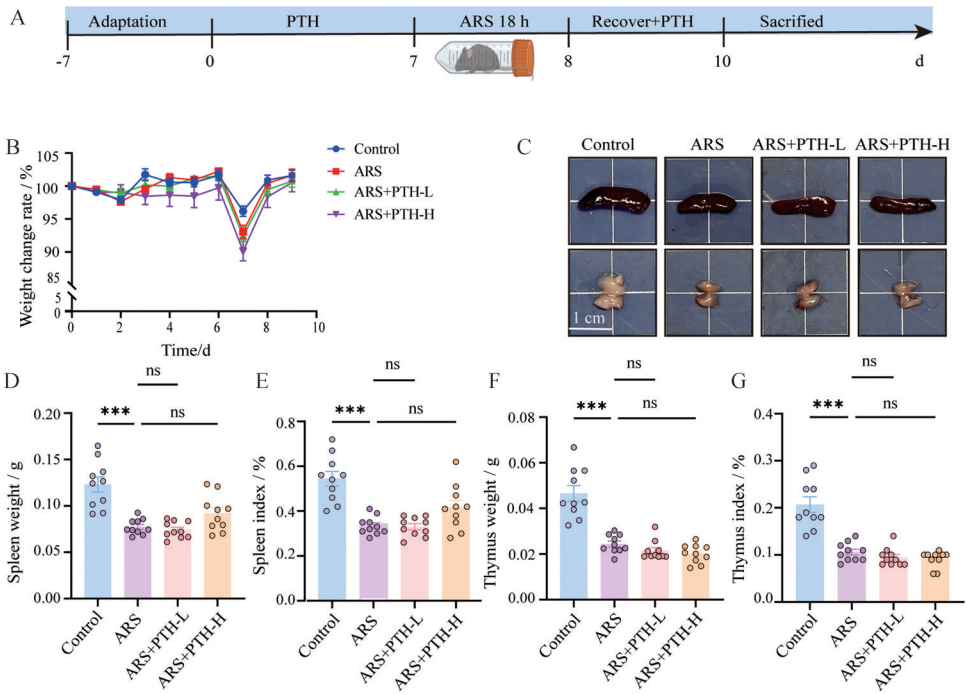


Figure 1 The effect of Pien Tze Huang (PTH) on spleen and thymus morphology and index in acute restraint stress (ARS) mice. A: Schema of experimental procedure; B: Rate of change in body weight of mice; C: Morphology of the spleen and thymus in mice. Scale bar = 1 cm; D: Spleen weight of mice; E: Spleen index of mice; F: Thymus weight of mice; G: Thymus index of mice. PTH-L: Pien Tze Huang low dosage 0.117 g·kg^{-1}·d^{-1}; PTH-H: Pien Tze Huang high dosage 0.234 g·kg^{-1}·d^{-1}. n = 10, $\bar{x}$ ± SEM. $^{***}P < 0.001$. ns: Not significant

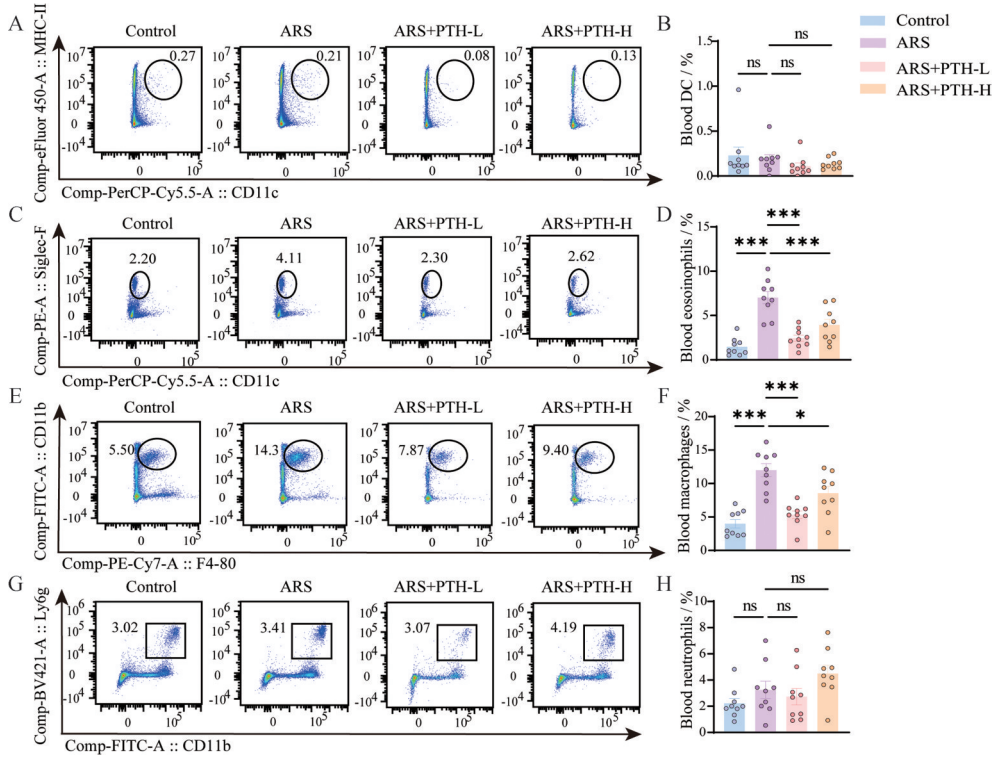


Figure 2 The effect of PTH on the myeloid immunocytes subsets in peripheral blood of ARS mice. A, B: Representative map (A) and percentage (B) of CD11c^{+}MHC-II^{+} dendritic cells (DCs) in the blood of mice; C, D: Representative map (C) and percentage (D) of CD11c^{-}Siglec-F^{+} eosinophils in the blood of mice; E, F: Representative map (E) and percentage (F) of F4-80^{+}CD11b^{+} macrophages in the blood of mice; G, H: Representative map (G) and percentage (H) of CD11b^{+}Ly6g^{+} neutrophils cells in the blood of mice. n = 9, $\bar{x}$ ± SEM. $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$

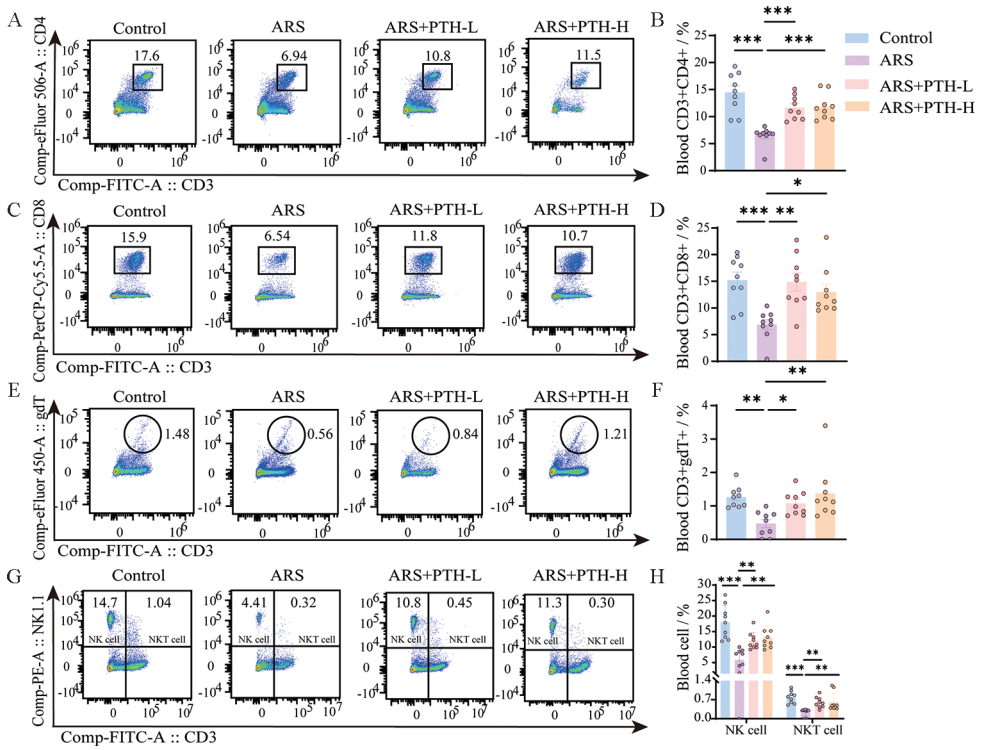


Figure 3 The effect of PTH on the T lymphocyte subsets and natural killer (NK) cells in peripheral blood of ARS mice. A, B: Representative map (A) and percentage (B) of $CD3^+CD4^+$ T cells in the blood of mice; C, D: Representative map (C) and percentage (D) of $CD3^+CD8^+$ T cells in the blood of mice; E, F: Representative map (E) and percentage (F) of $CD3^+gdT^+$ γδT cells in the blood of mice; G, H: Representative map (G) and percentage (H) of $CD3^-NK1.1^+$ NK cells and $CD3^+NK1.1^+$ NKT cells in the blood of mice. $n = 9$, $\bar{x} \pm$ SEM. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$

百分比。上述结果表明, 片仔癀给药可以对急性拘束应激小鼠外周血淋巴系免疫细胞T细胞亚群和NK细胞产生调节作用。

4 片仔癀对急性拘束应激小鼠脾脏髓系免疫细胞亚群的影响

为了进一步探索片仔癀对急性拘束应激小鼠脾脏髓系免疫细胞亚群的影响, 本研究使用流式细胞仪检测了小鼠脾脏髓系免疫细胞亚群的分布。实验结果如图4所示, 与空白对照组相比, 急性拘束应激组小鼠嗜酸性粒细胞和巨噬细胞的百分比明显增加; 而脾脏中树突状细胞和中性粒细胞的百分比无显著差异; 与急性拘束应激组相比, 低、高剂量片仔癀均能够降低嗜酸性粒细胞的百分比, 但对巨噬细胞百分比的升高无显著改善作用。以上结果表明, 片仔癀能够缓解急性拘束应激引起的脾脏嗜酸性粒细胞的紊乱。

5 片仔癀对急性拘束应激小鼠脾脏淋巴系免疫细胞T细胞亚群和NK细胞的影响

为了探究片仔癀对急性拘束应激小鼠脾脏淋巴系免疫细胞T细胞亚群和NK细胞的影响, 本研究使用流式细胞仪检测了小鼠脾脏淋巴系免疫细胞T细胞亚群和NK细胞的分布。结果如图5所示, 与空白对照组相比, 急性拘束应激组小鼠脾脏中$CD3^+CD4^+$ T细胞、$CD3^+CD8^+$ T细胞、$CD3^+NK1.1^+$ NKT细胞和$CD3^-NK1.1^+$ NK细胞的百分比明显降低; 而$CD3^+gdT^+$ γδT细胞的百分比无显著差异。与急性拘束应激组相比, 低剂量片仔癀可以提高$CD3^+CD8^+$ T细胞、$CD3^+NK1.1^+$ NKT细胞和$CD3^-NK1.1^+$ NK细胞的百分比; 高剂量片仔癀可以提高$CD3^+CD4^+$ T细胞、$CD3^+CD8^+$ T细胞、$CD3^+NK1.1^+$ NKT细胞和$CD3^-NK1.1^+$ NK细胞的百分比。上述结果表明, 片仔癀能缓解拘束应激引起的脾脏淋巴系免疫细胞$CD3^+CD4^+$ T细胞、$CD3^+CD8^+$ T细胞、$CD3^+NK1.1^+$ NKT细胞和NK细胞的紊乱。

6 片仔癀对应激小鼠脾脏和外周血B细胞的影响

为明确片仔癀对急性拘束应激小鼠B细胞的影响, 本研究通过流式细胞术定量分析了B细胞在外周血和脾脏的分布。结果如图6所示, 与空白对照组相比, 急性拘束应激组小鼠外周血和脾脏B细胞的百分比明显下降; 与急性拘束应激组相比, 低、高剂量片仔癀可升高外周血和脾脏B细胞的百分比, 表明片仔癀能有效拮抗急性拘束应激对B细胞系统的抑制作用。

7 片仔癀对应激小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力的影响

为探究片仔癀给药对急性拘束应激小鼠腹腔巨噬

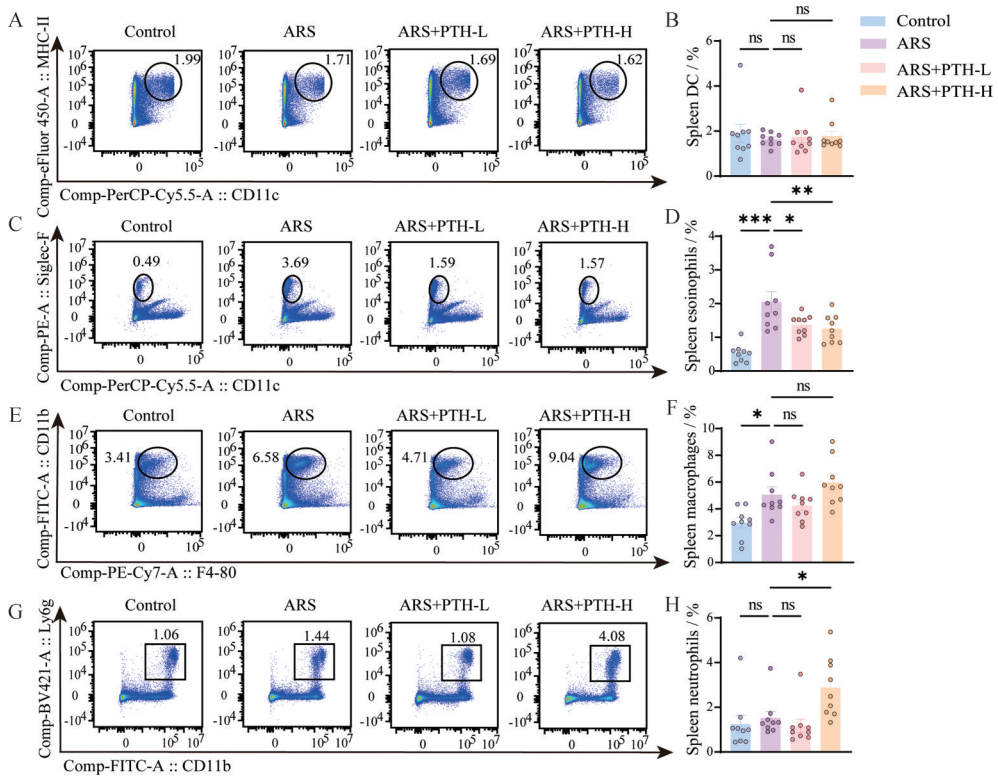


Figure 4 The effect of PTH on myeloid lymphocyte subsets in the spleen of ARS mice. A, B: Representative map (A) and percentage (B) of $CD11c^{+}MHC\text{-}II^{+}$ DCs in the spleen of mice; C, D: Representative map (C) and percentage (D) of $CD11c^{-}Siglec\text{-}F^{+}$ eosinophils in the spleen of mice; E, F: Representative map (E) and percentage (F) of $F4\text{-}80^{+}CD11b^{+}$ macrophages in spleen of mice; G, H: Representative map (G) and percentage (H) of $CD11b^{+}Ly6g^{+}$ neutrophils cells in the spleen of mice. $n = 9$, $\bar{x} \pm$ SEM. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$

细胞吞噬功能的影响, 本研究分析了吞噬荧光微球的巨噬细胞百分比。结果如图7所示: 与空白对照组相比, 急性拘束应激组小鼠腹腔巨噬细胞吞噬荧光微球的百分比明显降低; 而低、高剂量片仔癀均能够提高巨噬细胞吞噬荧光微球的百分比, 表明片仔癀给药可显著改善急性拘束应激小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能。

讨论

情志应激对免疫系统的复杂调控已成为现代医学与中医学共同关注的焦点。从现代医学研究视角看, 情志应激可导致小鼠免疫器官的重量、功能以及免疫细胞活性发生显著变化。如情志应激可激活下丘脑-垂体-肾上腺 (HPA) 轴, 释放糖皮质激素等应激激素, 抑制免疫细胞功能, 降低T细胞、B细胞和NK细胞的活性[14]。本课题组前期研究发现, 持续的情志应激会导致机体进入“疾病易感态”, 显著增加对多种疾病的易感性[15]。情志应激诱导的“火热内生”状态会增加帕金森病[16]、乳腺癌[17]、流感[18]等疾病的发病风险。进一步研究发现情志应激还会导致免疫细胞功能的改变, 如应激激素皮质酮可通过抑制巨噬细胞的“吃我”信号受体LRP1的表达, 增加“不吃我”信号受体SIRPα的表达, 从而削弱巨噬细胞的吞噬功能[19]。中医情志应激理论认为, 情志与人体健康密切相关, 不良情志可导致气机失调、脏腑功能紊乱, 进而影响免疫功能。中医理论认为肝郁气滞是情志应激的常见病机, 通过疏肝解郁、清热解毒等方法可以调节情志, 改善免疫功能。本课题组前期研究发现, 片仔癀可缓解由情志应激诱导的肝损伤[20]。此外, 片仔癀在情志应激诱导的流感病毒易感性模型中也表现出显著的疗效[12]。这为中药在情志相关疾病中的应用提供了新的思路。然而, 片仔癀对情志应激状态下免疫调节的具体效应尚未得到系统阐明。因此, 本研究通过构建急性拘束应激诱导的免疫紊乱小鼠模型, 揭示了片仔癀对髓系和淋巴系免疫系统的调节作用。

和前人研究结果一致, 本研究发现急性拘束应激对小鼠的免疫系统产生了显著的负面影响。在免疫器官形态及指数方面, 急性拘束应激导致免疫器官显著萎缩。尽管片仔癀干预未能显著改善脾脏和胸腺的萎缩现象, 但片仔癀可能通过其他途径发挥免疫调节作用, 而非直接作用于免疫器官的形态。在髓系免疫细胞亚群方面, 急性拘束应激能够增加小鼠外周血和脾脏嗜酸性粒细胞和巨噬细胞占总免疫细胞的百分比。

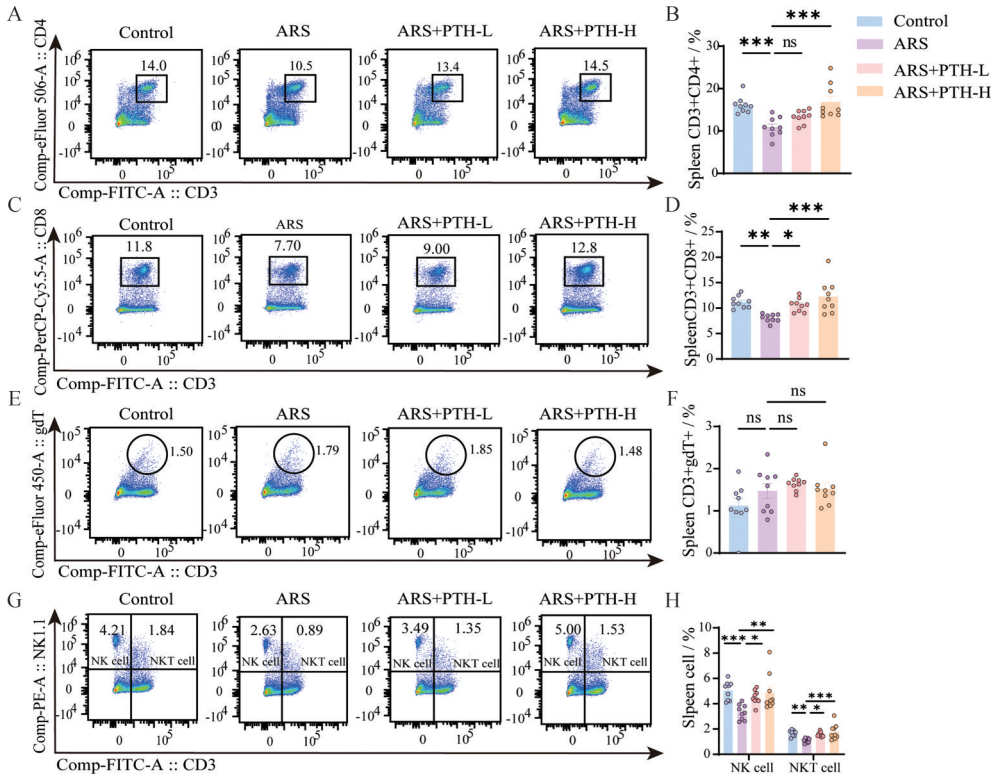


Figure 5 The effect of PTH on T lymphocyte subsets and NK cells in the spleen of ARS mice. A, B: Representative map (A) and percentage (B) of $CD3^+CD4^+$ T cells in the spleen of mice; C, D: Representative map (C) and percentage (D) of $CD3^+CD8^+$ T cells in the spleen of mice; E, F: Representative map (E) and percentage (F) of $CD3^+gdT^+$ γδT cells in the spleen of mice; G, H: Representative map (G) and percentage (H) of $CD3^-NK1.1^+$ NK cells and $CD3^+NK1.1^+$ NKT cells in the spleen of mice. $n = 9$, $\bar{x} \pm$ SEM. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$

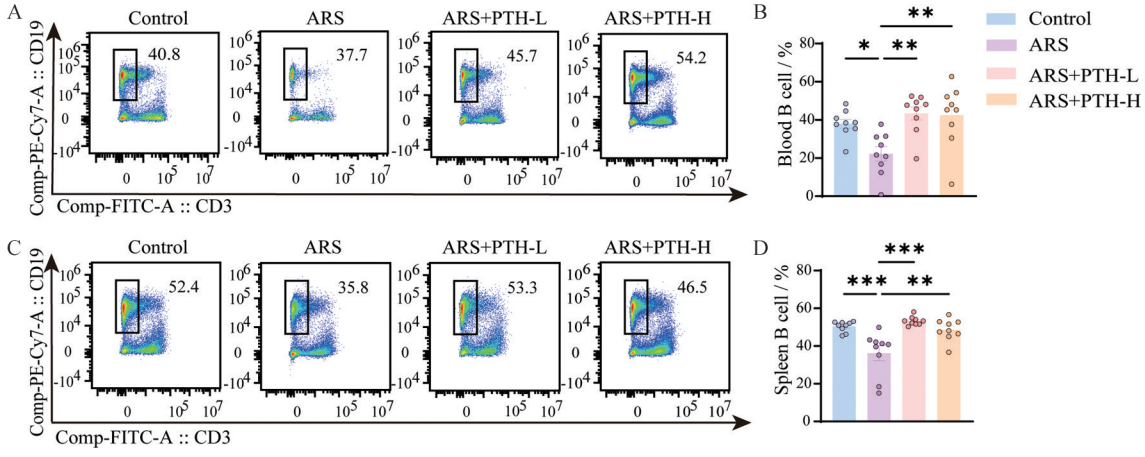


Figure 6 The effect of PTH on B cells in the spleen and peripheral blood of ARS mice. A, B: Representative map (A) and percentage (B) of $CD3^-CD19^+$ B cells in the blood of mice; C, D: Representative map (C) and percentage (D) of $CD3^-CD19^+$ B cells in the spleen of mice. $n = 9$, $\bar{x} \pm$ SEM. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$

片仔癀可以降低急性拘束应激小鼠外周血嗜酸性粒细胞和巨噬细胞占总免疫细胞的百分比。此外, 片仔癀通过上调巨噬细胞吞噬功能, 进一步证实片仔癀通过调节髓系细胞分布和功能改善先天免疫应答的潜力。在淋巴系免疫细胞亚群方面, 急性拘束应激降低了小鼠外周血和脾脏中 $CD3^+CD4^+$ T细胞、$CD3^+CD8^+$ T细胞、NKT细胞和B细胞占总免疫细胞的百分比。这种变化可能与应激引起的神经内分泌反应有关, 如皮质酮水平升高会影响免疫细胞的分布和功能[21]。片仔癀明显提高外周血和脾脏中淋巴系免疫细胞亚群 ($CD3^+CD4^+$ T、$CD3^+CD8^+$ T、B细胞、NKT细胞) 占总免疫细胞的百分比。这表明片仔癀可能通过调节淋巴系

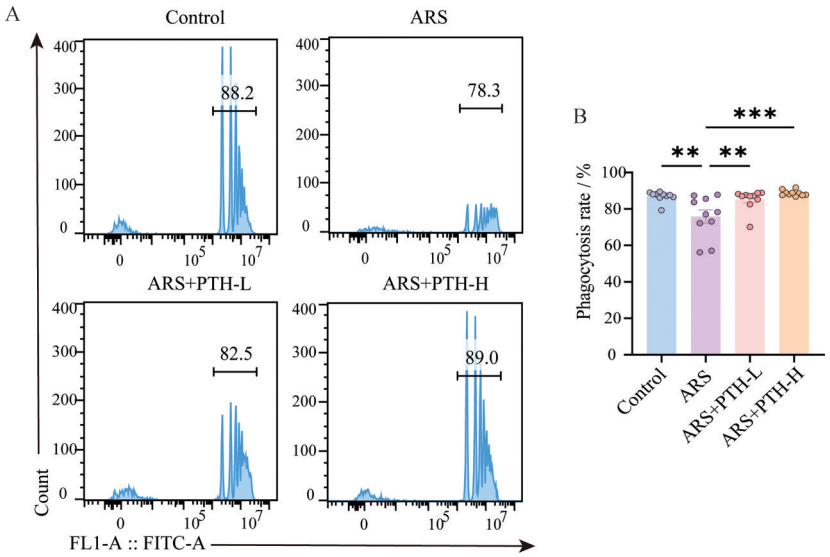


Figure 7 The effect of PTH on the phagocytic ability of peritoneal macrophages in ARS mice. Mouse peritoneal macrophages were incubated with fluorescent microspheres for 45 min from mice that were not subjected to or received ARS and were pretreated with a low and high dose of PTH. Phagocytosis was assessed by flow cytometry. $n = 10$, $\bar{x} \pm$ SEM. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$

免疫细胞的分布发挥免疫调节作用, 从而缓解急性拘束应激对免疫系统的负面影响。片仔癀通过调节髓系免疫细胞分布和功能及增强淋巴系免疫细胞的分布, 有效缓解应激诱导的免疫抑制, 这与临床中片仔癀用于治疗肝炎[22]、结肠炎[23]等免疫相关疾病的疗效相呼应。在临床治疗中, 片仔癀对情志相关疾病 (如焦虑、抑郁) 和免疫相关疾病 (如自身免疫性疾病) 的潜在应用价值值得关注, 其免疫调节作用可能为治疗这些疾病提供新的思路。

结合本研究数据, 片仔癀的免疫调节作用可能与其调控免疫细胞亚群的分布密切相关, 但其具体作用机制仍需进一步探讨。有研究表明, 片仔癀中的三七皂苷可能通过激活 IL-2 信号轴促进 T 细胞增殖重建适应性免疫应答基础[24]; 而牛黄成分通过抑制 HIF-1α 表达减轻炎症细胞浸润和脂质过氧化, 协同重塑免疫微环境[25]; 麝香酮通过抑制 GR 核转位打破应激–糖皮质激素–免疫抑制的恶性循环, 逆转应激诱导的髓系细胞异常扩增, 重塑免疫平衡[26]; 牛磺酸可通过 TLR4/MyD88 通路促进 B 细胞成熟和抗体分泌[27]。这些成分通过多靶点协同作用, 展现出片仔癀独特的免疫调节优势。此外, 片仔黄通过调节肠道菌群和记忆调节 T 细胞缓解伴刀豆球蛋白 A 诱导的自身免疫性肝炎[28]。这为阐释片仔癀“扶正祛邪”的传统功效提供了现代免疫学依据, 提示其在应激相关免疫紊乱疾病中的干预潜力。

综上所述, 本研究表明片仔癀能够通过调节免疫细胞亚群分布、增强巨噬细胞吞噬功能改善急性拘束应激小鼠的免疫功能紊乱。然而, 本研究也存在一些局限性。首先, 实验仅观察了片仔癀对急性应激雄性小鼠中外周血、脾脏中免疫细胞、小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响, 对于小鼠淋巴结中免疫细胞的影响以及对雌性小鼠免疫细胞的影响尚不清楚。其次, 分子机制研究不足, 需进一步通过转录组学或信号通路抑制剂明确关键靶点; 此外, 未检测细胞因子水平变化, 难以全面解析免疫调控网络。未来研究可进一步解析其活性成分的时空药效动力学特征, 为精准化应用提供理论支撑。

作者贡献: 何蓉蓉、李怡芳、栗原博负责实验设计、论文修改和提供研究经费; 欧阳淑桦参与实验方案的设计和指导; 覃日凤、叶春红负责实验操作、数据分析统计和论文撰写; 李坤参与论文修改。

利益冲突: 所有作者声明无任何利益冲突。

References

[1] Wang Q. Individualized medicine, health medicine, and constitutional theory in Chinese medicine [J]. Front Med, 2012, 6: 1-7.

[2] He RR, Yao XC, Li YB. Research status and application of restrained stress animal models [J]. Chin J Exp Formulae (中国实验方剂学杂志), 2008, 11: 80-83.

[3] Li YF, He RR, Tsoi B, et al. Anti-stress effects of carnosine on restraint-evoked immunocompromise in mice through spleen lymphocyte number maintenance [J]. PLoS One, 2012, 7: e33190.

[4] He RR, Yao XS, Li HY, et al. The anti-stress effects of *Sarcandra glabra* extract on restraint-evoked immunocompromise [J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32: 247-252.

[5] He RR, Wang M, Wang CZ, et al. Protective effect of apple polyphenols against stress-provoked influenza viral infection in

restraint mice [J]. J Agric Food Chem, 2011, 59: 3730-3737.

[6] Poller WC, Downey J, Mooslechner AA, et al. Brain motor and fear circuits regulate leukocytes during acute stress [J]. Nature, 2022, 607: 578-584.

[7] Shao Y, Sun Y, Li D, et al. *Chrysanthemum indicum* L.: a comprehensive review of its botany, phytochemistry and pharmacology [J]. Am J Chin Med, 2020, 48: 871-897.

[8] Xue H, Li P, Bian J, et al. Extraction, purification, structure, modification, and biological activity of traditional Chinese medicine polysaccharides: a review [J]. Front Nutr, 2022, 9: 1005181.

[9] Xiao LX, Qi L, Zhang X L, et al. Liver injury in septic mice were suppressed by a camptothecin-bile acid conjugate *via* inhibiting NF-κB signaling pathway [J]. Life Sci, 2020, 257: 118130.

[10] Zhu LL, Cao GY, Jia LY, et al. Muscone suppresses myocardial ischemia damage by regulating PI3K/Akt signaling pathway [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2022, 1868: 166539.

[11] Fu Y, Liu C, Wang J, et al. Immunomodulatory function of Pien Tze Huang in T cell-mediated anti-tumor activity against B16-F10, MC38 and Hep1-6 tumor models [J]. Chin J Integr Med, 2024, 30: 348-358.

[12] Wang R, Chen XX, Huang RT, et al. Study on the effect of Pianzi Huang on the susceptibility induced by internal heat of emotions to influenza virus [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2024, 40: 1565-1572.

[13] Duan WJ, Liu FL, He RR, et al. Autophagy is involved in the effects of resveratrol on prevention of splenocyte apoptosis caused by oxidative stress in restrained mice [J]. Mole Nutr Food Res, 2013, 57: 1145-1157.

[14] Li SB, Borniger JC, Yamaguchi H, et al. Hypothalamic circuitry underlying stress-induced insomnia and peripheral immunosuppression [J]. Sci Adv, 2020, 6: eabc2590.

[15] Pan MH, Zhu SR, Duan WJ, et al. "Shanghuo" increases disease susceptibility: modern significance of an old TCM theory [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 250: 112491.

[16] Lin XM, Pan MH, Sun J, et al. Membrane phospholipid peroxidation promotes loss of dopaminergic neurons in psychological stress-induced Parkinson's disease susceptibility [J]. Aging Cell, 2023, 22: e13970.

[17] Luo X, Li DD, Li ZC, et al. Mitigating phospholipid peroxidation of macrophages in stress-induced tumor microenvironment by natural ALOX15/PEBP1 complex inhibitors [J]. Phytomedicine, 2024, 128: 155475.

[18] Luo Z, Liu LF, Jiang YN, et al. Novel insights into stress-induced susceptibility to influenza: corticosterone impacts interferon-β responses by Mfn2-mediated ubiquitin degradation of MAVS [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5: 202.

[19] Wu Y, Luo X, Zhou Q, et al. The disbalance of LRP1 and SIRPα by psychological stress dampens the clearance of tumor cells by macrophages [J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12: 197-209.

[20] Zhou QQ, Wu YP, Liu P, et al. Regulation of hepatocyte phospholipid peroxidation signaling by a Chinese patent medicine against psychological stress-induced liver injury [J]. Phytomedicine, 2024, 129: 155613.

[21] Ali N, Strahler J, Nater UM. The effects of chronic fatigue and chronic stress on alterations in immune cell responses to acute psychosocial stress [J]. Brain Behav Immun, 2025, 123: 707-716.

[22] Zhao R, Zhang Q, Liu W, et al. Pien Tze Huang attenuated acetaminophen-induced liver injury by autophagy mediated-NLRP3 inflammasome inhibition [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 311: 116285.

[23] Liu L, Chen Y, Liu S, et al. Therapeutic potential of Pien Tze Huang in colitis-associated colorectal cancer: mechanistic insights from a mouse model [J]. Cancer Cell Int, 2024, 24: 250.

[24] Hu Y, Mao A, Tan Y, et al. Role of 5 saponins in secretion of cytokines by PRRSV-induced endothelial cells [J]. Drug Res, 2016, 66: 357-362.

[25] Bai L, Chen HT, Liu L. Study on the effects of *in vitro* cultivated bile acids on the expression of hypoxia-inducible factor-1α and its antioxidant effects in rats with acute lung injury [J]. Shanxi Med J (山西医药杂志), 2014, 43: 1775-1777.

[26] Lv S, Lei Z, Yan G, et al. Chemical compositions and pharmacological activities of natural musk (Moschus) and artificial musk: a review [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 284: 114799.

[27] Lin CJ, Chiu CC, Chen YC, et al. Taurine attenuates hepatic inflammation in chronic alcohol-fed rats through inhibition of TLR4/MyD88 signaling [J]. J Med Food, 2015, 18: 1291-1298.

[28] Zeng X, Liu MH, Xiong Y, et al. Pien Tze Huang alleviates concanavalin A-induced autoimmune hepatitis by regulating intestinal microbiota and memory regulatory T cells [J]. World J Gastroenterol, 2023, 29: 5988.