DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.04.008

当归补血汤对再生障碍性贫血小鼠Th17/Treg细胞平衡的影响

陈修保[1,2],徐飞[1,2],尹曦[2],陈维达[2],刘秀娟[1,2],崔兴[1],陈泽涛[1,2]
(1.山东中医药大学第一临床医学院,山东 济南 250355;2.山东中医药大学附属医院,山东 济南 250014)

摘要:目的 观察当归补血汤对再生障碍性贫血小鼠骨髓造血功能的影响,探讨辅助性T淋巴细胞17/调节性T淋巴细胞(T helper lymphocytel 17/T regulatory lymphocyte,Th17/Treg)细胞平衡及相关炎性因子在其中的作用。方法 利用射线照射联合异源小鼠淋巴细胞输注的方法制备再生障碍性贫血小鼠模型。建模成功后随机分为模型对照组、芪归1∶1组、芪归3∶1组、芪归5∶1组,设正常对照组,各组灌胃相应药物,1次/d,干预28 d。观察小鼠一般情况、体质量、脾脏指数、外周血基本血液学参数变化,苏木精-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色观察骨髓组织病理情况变化;酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)法检测白细胞介素-17A(interleukin-17A,IL-17A)、白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)、转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1,TGF-β1)、白细胞介素-10(interleukin-10,IL-10)等炎性因子蛋白表达水平;流式细胞术检测当归补血汤对小鼠骨髓Th17、Treg细胞比例及Th17/Treg细胞平衡的影响。结果 当归补血汤治疗组小鼠药物干预后,一般症状均改善,进食量及饮水量增加,体质量、脾脏指数均明显升高,外周血红细胞、白细胞、血小板计数及血红蛋白浓度明显升高($P<0.05$),骨髓造血功能改善,造血组织增生度升高($P<0.05$);IL-17A、IL-6蛋白表达明显下调,TGF-β1、IL-10蛋白表达明显上调($P<0.05$或$P<0.01$);骨髓Th17细胞比例明显降低,Treg细胞比例明显升高,Th17/Treg细胞比值显著下降($P<0.05$或$P<0.01$),其中芪归5∶1组效果最佳。结论 当归补血汤可改善再生障碍性贫血小鼠骨髓造血功能,其作用机制可能与其调控Th17、Treg细胞比例,干预Th17/Treg细胞平衡,调节IL-17A、IL-6、TGF-β1、IL-10等炎性因子水平有关。

关键词:当归补血汤;Th17/Treg;炎性因子;再生障碍性贫血;经典名方
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)04-0041-07

Effect of Danggui Buxue Decoction(当归补血汤) on Balance of Th17/Treg Cells in Mice with Aplastic Anemia

CHEN Xiubao[1,2],XU Fei[1,2],YIN Xi[2],CHEN Weida[2],LIU Xiujuan[1,2],CUI Xing[1],CHEN Zetao[1,2]
(1. First Clinical Medical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine,Jinan 250355,Shandong,China;
2. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine,Jinan 250014,Shandong,China)

Abstract:*Objective* To observe the effect of Danggui Buxue Decoction(当归补血汤) on bone marrow hematopoietic function in mice with aplastic anemia(AA),and explore the balance of Th17/Treg cells and the role of related inflammatory factors. *Method* A mouse model of AA was prepared by combining radiation irradiation with allogeneic mouse lymphocyte infusion. After successful modeling,the participants were randomly divided into a model control group,Huangqi(Astragali Radix)-Danggui(Angelicae Sinensis Radix) 1∶1 group,Huangqi(Astragali Radix)-Danggui(Angelicae Sinensis Radix) 3∶1 group and Huangqi(Astragali Radix)-Danggui(Angelicae Sinensis Radix) 5∶1 group. A normal control group was set up,and each group was given the corresponding drugs by gavage once a day for 28 days. The general condition,body weight,spleen index and basic hematological parameters of peripheral blood in mice were observed,and the pathological changes of bone marrow tissue were observed through HE staining. ELSIA method was used to detect the expression levels of inflammatory factor proteins such as interleukin-17A(IL-17A),interleukin-6(IL-6),transforming growth factor-β1(TGF-β1) and interleukin-10(IL-10). Flow cytometry was used to detect the effects of Danggui Buxue Decoction on the proportion of Th17 and Treg cells and the balance of Th17/Treg cells in mouse bone marrow. *Result* After the intervention of Danggui Buxue Decoction,in the Danggui Buxue Decoction treatment groups,the general symptoms of the mice improved,the food and water intake increased,the body weight and spleen index significantly increased,the peripheral blood red blood cell,white blood cell,platelet count and hemoglobin concentration significantly elevated($P<0.05$),the bone marrow hematopoietic function improved,and the hematopoietic tissue proliferation

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(82305142);山东省自然科学基金项目(ZR2020MH354,ZR2017LH073)
作者简介:陈修保(1987-),男,山东日照人,主治医师,博士在读,研究方向:中西医结合肿瘤血液病及老年病。
通讯作者:陈泽涛(1961-),男,山东济南人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:中西医结合肿瘤血液病及老年病。E-mail:zetaochen2007@126.com。

increased($P<0.05$). The protein expressions of IL-17A and IL-6 were significantly down-regulated, while the protein expressions of TGF-β1 and IL-10 were significantly up-regulated($P<0.05$ or $P<0.01$). The proportion of Th17 cells in bone marrow decreased significantly, while the proportion of Treg cells increased significantly. The Th17/Treg cell ratio decreased significantly($P<0.05$ or $P<0.01$), with the Huangqi(Astragali Radix)-Danggui(Angelicae Sinensis Radix) 5∶1 group showing the best effect. *Conclusion* Danggui Buxue Decoction can improve the bone marrow hematopoietic function in mice with AA, and its mechanism of action may be related to regulating the ratios of Th17 and Treg cells, intervening the balance of Th17/Treg cells, and regulating the inflammatory factor levels such as IL-17A, IL-6, TGF-β1 and IL-10.

Keywords: Danggui Buxue Decoction(当归补血汤); Th17/Treg; inflammatory factors; aplastic anemia; classic formula

再生障碍性贫血(aplastic anemia, AA)是一种临床常见的自身免疫性血液系统疾病,以骨髓造血功能衰竭为主要特征。免疫系统中T淋巴细胞是产生各种炎性因子的关键,不同亚群T淋巴细胞分泌不同的炎性因子,从而形成机体复杂的细胞因子作用网络[1-2]。再生障碍性贫血发病与T淋巴细胞免疫功能异常密切相关,并存在白细胞介素-17A(interleukin-17A, IL-17A)、转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)、干扰素γ(interferon γ, IFN-γ)等多种炎性因子水平紊乱[3]。辅助性T淋巴细胞17/调节性T淋巴细胞(T helper lymphocytel 17/T regulatory lymphocyte, Th17/Treg)细胞平衡与免疫应答、炎症反应等关系密切,在再生障碍性贫血疾病过程中发挥重要作用[4-5]。再生障碍性贫血属于中医学"血痨""虚劳""髓痨"等疾病范畴,主要病机在于脾肾亏虚、气血不足。中医药治疗再生障碍性贫血疗效显著,且有不良反应轻、治疗费用低等诸多优势。当归补血汤出自李东垣《内外伤辨惑论》,该方原著主治血虚发热,经近800年的实践应用,被历代医家奉为补气生血的经典名方[6]。课题组前期研究发现当归补血汤在再生障碍性贫血治疗中疗效确切,能够调节机体免疫功能,促进骨髓造血干细胞增殖,改善骨髓造血微环境[7]。基于前期研究,我们猜测当归补血汤改善再生障碍性贫血骨髓造血功能可能与Th17/Treg细胞平衡有关。本研究通过射线照射联合异源小鼠淋巴细胞输注的方法建立小鼠再生障碍性贫血动物模型,观察当归补血汤对再生障碍性贫血小鼠骨髓造血功能的影响,探讨Th17/Treg细胞平衡及相关炎性因子的可能作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级BALB/c小鼠60只,雄性,8周龄,体质量18~22 g,购自济南朋悦实验动物繁殖有限公司,生产合格证号:SCXK(鲁)20190003。SPF级DBA/2小鼠12只,雄性,8周龄,体质量18~20 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,生产合格证号:SCXK(京)2021-0006。动物饲养于山东中医药大学附属医院SPF级动物实验中心,自由进食进水,湿度40%~55%,温度20~24 ℃。本实验通过山东中医药大学附属医院实验动物伦理委员会伦理审查,批件号:AWE2019053。

1.2 实验药品及试剂

酒当归(批号2207020342)、蜜炙黄芪(批号2206050202),均购自亳州市沪谯药业有限公司。按照蜜炙黄芪与酒当归质量1∶1、3∶1、5∶1比例分别制备当归补血汤芪归不同比例组方中药液:称取中药饮片,用6倍量的蒸馏水浸泡2 h,加热至沸腾后再煎煮30 min,过滤。用3倍量的蒸馏水继续煎煮滤渣20 min,再过滤。2次滤液混合后浓缩成制备浓度为1.8 g/mL[8]。小鼠IL-6、IL-17A、TGF-β1、IL-10酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)测定试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号分别为:E-EL-M0044c、E-EL-M0047c、E-EL-0162c、E-EL-M0046c);FITC抗小鼠CD4抗体、APC抗小鼠CD25抗体、PE抗小鼠FOXP3抗体、PE抗小鼠IL-17抗体(美国BioLegend公司,货号分别为100509、102012、126404、506904);小鼠淋巴细胞分离液试剂盒(北京Solarbio公司,货号:P6040);固定破膜试剂盒(美国BD公司,货号:554714)。

1.3 主要仪器及设备

动物血细胞分析仪(HEMAVET 950FS,北京冠远科技有限公司);光学显微镜(CX41,日本OLYMPUS公司);多功能酶标仪(Multiskan SkyHigh,美国Thermo Fisher公司);流式细胞仪(BD FACS VerseTM,美国BD公司);荧光分光光度计(F3000,日本HITACHI公司);小鼠尾静脉注射显像仪(LAT-Q9GM,北京莱艾特科技发展有限公司);高速低温离心机(MICROMAX RF,Thermo IEC,美国);超声波细胞粉碎机(JY96-IIN,宁波新芝生物科技股份有限公司)。

2 方法

2.1 实验分组

动物适应性饲养1周,无死亡情况,BALB/c小鼠随机分为5组:正常对照组、模型对照组、芪归1∶1组、芪归3∶1组、芪归5∶1组。每组12只。

2.2 AA小鼠模型制备

采用射线照射联合异源淋巴细胞输注的方法[9]建立再生障碍性贫血模型。DBA/2小鼠经颈椎脱臼法处死,75%酒精消毒,无菌操作台摘取胸腺、颈部、腋窝及腹股沟等处淋巴结,混合、剪碎,加少量磷酸盐缓冲(PBS)溶液,轻轻研磨,200目筛网过滤,制成单细胞悬液,计数并调整细胞浓度为5×10^9/L,鉴定细胞活性达95%以上。BALB/c小鼠经$^{60}Co-\gamma$射线,剂量3.5 Gy(100 cGy/min),全身一次性均匀辐照;正常对照组小鼠采用铅砖屏蔽照射。照射后4 h内,经尾静脉注射输入淋巴细胞PBS悬液0.2 mL(含淋巴细胞数1×10^6个);正常对照组铅砖屏蔽照射后,经尾静脉注射输入PBS溶液0.2 mL。

2.3 干预方案

动物造模成功后次日开始给予治疗干预。给药组分别予当归补血汤不同比例组方的中药液灌胃治疗,芪归1∶1组、芪归3∶1组、芪归5∶1组给药剂量分别按照3、6、9 g/kg给药,给药体积为0.1 mL/10 g体质量;正常对照组、模型对照组给予等体积生理盐水灌胃。给药1次/d,连续给药28 d。末次给药后次日取材。

2.4 观察及检测指标

2.4.1 观察各组小鼠一般情况、体质量、脾脏指数 实验干预

开始后，观察各组小鼠毛发、精神状态、活动量变化，唇色、耳廓、眼睑等颜色变化，饮水量、进食量及死亡情况。监测药物干预期间模型小鼠体质量变化情况，每 3 d 称量一次；实验结束称量小鼠体质量、测算脾脏指数[脾脏指数 = 脾脏质量(mg)/小鼠体质量(g) ×10]。

2.4.2 检测各组小鼠外周血基本血液参数变化 小鼠摘眼球取血，分别置于抗凝管，静置 30 min，使用动物血细胞分析仪检测模型小鼠外周血红细胞、白细胞、血小板计数及血红蛋白浓度。

2.4.3 HE 染色观察各组小鼠股骨组织病理变化 分离股骨，4% 多聚甲醛固定，脱钙，脱水，浸蜡，包埋，切片，烘箱烤片。苏木精 - 伊红(hematoxylin - eosin，HE)染色，显微镜观察骨髓组织病理变化。计算骨髓造血组织增生度[造血组织增生度 = 造血组织面积/(造血组织面积 + 非造血组织面积) ×100%]。

2.4.4 ELISA 检测各组小鼠 TGF - β1、IL - 10、IL - 17A、IL - 6 蛋白表达水平 取小鼠骨髓置于液氮中，迅速研磨，加入 RIPA 裂解液，电动匀浆 60 s，超声波细胞粉碎机中进行冰上超声，持续 20 min；离心机中，4 ℃，10 000 r/min，离心 8 min。采用荧光分光光度计检测各组样本蛋白的浓度，按照 ELISA 试剂盒说明书检测流程，分别测定各组样本 TGF - β1、IL - 10、IL - 17A、IL - 6 蛋白表达水平。

2.4.5 流式细胞术检测各组小鼠骨髓 Th17、Treg 细胞比例及 Th17/Treg 细胞平衡变化 取小鼠骨髓置于 200 目筛网中研磨，PBS 缓冲液冲洗筛网，收集至离心管，离心后去上清。PBS 缓冲液重悬，红细胞裂解液裂解红细胞，离心，去上清，PBS 缓冲液重悬后得到单细胞悬液。调整细胞浓度至 1×10^7/mL，取 100 μL 于流式管中，5% CO_2 的 37 ℃细胞培养箱，培养 4 h。根据试剂盒说明书，加入抗体，4 ℃避光孵育 30 min，离心，去上清，固定破膜，加入破膜剂混匀，4 ℃避光孵育 30 min；依次加入相应流式抗体，4 ℃，避光孵育 45 min。PBS 溶液洗涤，400 μL 流式染色缓冲液重悬细胞。上机检测 Th17、Treg 细胞比例及分析 Th17/Treg 细胞平衡变化。

2.5 统计学方法

实验数据均采用 SPSS 24.0 统计分析数据，计量资料以“均数 ± 标准差”($\bar{x} \pm s$)表示，统计学差异比较采用单因素方差分析，两组间比较采用 t 检验进行分析统计，$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠一般情况、体质量、脾脏指数的变化

正常对照组小鼠活动灵活，毛发光亮，动作灵敏；模型对照组小鼠活动笨拙、懒动，精神萎靡，抱团聚集，毛发蓬乱、暗淡，缺乏光泽，眼睑、唇色、耳廓颜色苍白，进食量、饮水量减少。与模型对照组比较，当归补血汤各给药组小鼠活动量增多，进食量、饮水量均增加，毛发蓬乱及光泽度均好转，耳廓、眼睑、唇色渐转红润，其中以芪归 5∶1 组效果改善最明显，芪归 3∶1 组优于芪归 1∶1 组。至治疗结束，各组小鼠均无死亡。造模后小鼠体质量均有下降；模型对照组体质量下降最明显，实验期间持续低水平，脾脏指数明显下降($P < 0.05$)；芪归 1∶1 组体质量数值于第 9 天开始上升，芪归 5∶1 组、芪归 3∶1 组于第 6 天开始上升；与模型对照组比较，当归补血汤各给药组小鼠体质量、脾脏指数均有明显升高($P < 0.05$)，芪归 5∶1 组效果最佳。见插页Ⅷ图 1、表 1。

表 1 各组小鼠体质量、脾脏指数情况($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体质量/g	脾脏指数/(mg/g)
正常对照组	12	28.78 ± 2.52	3.75 ± 0.36
模型对照组	12	16.05 ± 2.07 *	2.19 ± 0.24 *
芪归 1∶1 组	12	24.89 ± 2.31 △	2.89 ± 0.26 △
芪归 3∶1 组	12	27.40 ± 2.53 △	3.17 ± 0.29 △
芪归 5∶1 组	12	28.24 ± 2.50 △	3.55 ± 0.37 △

注：* 与正常对照组比较，$P < 0.05$；△ 与模型对照组比较，$P < 0.05$。

3.2 各组小鼠外周血基本血液参数变化

与正常对照组比较，模型对照组外周血红细胞、白细胞、血小板计数及血红蛋白浓度均明显降低，差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型对照组比较，当归补血汤各治疗组外周血红细胞、白细胞、血小板计数及血红蛋白浓度明显升高，差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或$P < 0.01$)。见表 2。

表 2 各组小鼠外周血基本血液参数情况($\bar{x} \pm s$)

组别	n	红细胞/($\times 10^{12}$/L)	白细胞/($\times 10^9$/L)	血小板/($\times 10^9$/L)	血红蛋白/(g/L)
正常对照组	12	10.15 ± 0.85	6.02 ± 0.53	1655 ± 114	160.7 ± 12.4
模型对照组	12	3.29 ± 0.34 *	2.67 ± 0.31 *	952 ± 89 *	90.5 ± 9.7 *
芪归 1∶1 组	12	5.73 ± 0.42 △	4.86 ± 0.49 △	1197 ± 103 △	110.6 ± 12.1 △
芪归 3∶1 组	12	6.19 ± 0.65 △	4.95 ± 0.52 * *	1382 ± 112 △	121.0 ± 11.7 △
芪归 5∶1 组	12	8.32 ± 0.72 * *	5.60 ± 0.54 * *	1491 ± 123 * *	135.2 ± 12.6 △

注：* 与正常对照组比较，$P < 0.05$；△ 与模型对照组比较，$P < 0.05$；* * 与模型对照组比较，$P < 0.01$。

3.3 HE 染色法观察各组小鼠股骨组织病理变化

正常对照组骨髓组织结构完整，细胞排列均匀，造血细胞数量丰富，细胞增生活跃；模型对照组骨髓组织结构紊乱，有核细胞数量明显减少，可见大量脂肪细胞，骨髓造血组织增生度明显减低($P < 0.05$)。与模型对照组比较，当归补血汤芪归1∶1 组、3∶1 组可见造血组织结构修复，空白区域减少，骨髓造血组织增生度改善($P < 0.05$)；当归补血汤芪归 5∶1 组骨髓组织结构紧密，造血细胞数量明显丰富，脂肪细胞显著减少，骨髓造血组织增生度明显升高($P < 0.01$)。见表 3、插页Ⅷ图 2。

表 3 各组小鼠骨髓造血组织增生度情况($\bar{x} \pm s$)

组别	n	骨髓造血组织增生度/(%)
正常对照组	12	87.19 ± 6.02
模型对照组	12	45.03 ± 4.86 *
芪归 1∶1 组	12	65.44 ± 5.15 △
芪归 3∶1 组	12	70.87 ± 6.53 △
芪归 5∶1 组	12	76.61 ± 6.98 * *

注：* 与正常对照组比较，$P < 0.05$；△ 与模型对照组比较，$P < 0.05$；* * 与模型对照组比较，$P < 0.01$。

3.4 ELISA 检测各组小鼠 TGF - β1、IL - 10、IL - 17A、IL - 6 蛋白表达水平

与正常对照组比较，模型对照组 IL - 17A、IL - 6 蛋白表达明显上调，TGF - β1、IL - 10 蛋白表达明显下调($P < 0.05$)；与模型对照组比较，当归补血汤治疗组 IL - 17A、IL - 6 蛋白表达明显下调($P < 0.05$ 或$P < 0.01$)，TGF - β1、IL - 10 蛋白表达明显上调($P < 0.05$ 或$P < 0.01$)。见表 4。

3.5 流式细胞术检测各组小鼠骨髓 Th17、Treg 细胞比例及 Th17/Treg 细胞平衡变化

流式细胞术检测结果显示，与正常对照组比较，模型对照

组 Th17 细胞比例明显增高，Treg 细胞比例明显降低，Th17/Treg 细胞比值明显升高（$P<0.05$），差异有统计学意义。与模型对照组比较，当归补血汤治疗组 Th17 细胞比例明显降低（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），Treg 细胞比例明显增高（$P<0.05$），芪归3∶1、5∶1 组 Th17/Treg 细胞比值显著下降（$P<0.01$），差异均有统计学意义。见表 5、插页Ⅸ图 3－图 4。

表 4 各组小鼠骨髓 IL－17A、IL－6、TGF－β1、IL－10 蛋白表达水平（$\bar{x}\pm s$） 单位：pg/mL

组别	n	TGF－β1	IL－10	IL－17A	IL－6
正常对照组	12	8.21±0.91	70.03±6.54	32.50±2.65	105.12±9.50
模型对照组	12	4.03±0.38*	42.37±5.05*	70.18±8.30*	184.31±16.30*
芪归1∶1组	12	6.36±0.55△	55.46±6.12△	60.34±5.66△	150.46±13.85△
芪归3∶1组	12	7.24±0.63**	61.13±6.31△	53.92±4.14**	129.34±11.78△
芪归5∶1组	12	7.47±0.69**	64.30±6.53△	41.74±3.28**	115.17±10.39△

注：*与正常对照组比较，$P<0.05$；△与模型对照组比较，$P<0.05$；**与模型对照组比较，$P<0.01$。

表 5 各组小鼠骨髓 Th17、Treg 细胞比例及 Th17/Treg 细胞平衡的变化情况（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	Th17/（%）	Treg/（%）	Th17/Treg
正常对照组	12	13.05±1.37	9.16±0.91	1.85±0.23
模型对照组	12	23.12±3.09*	4.22±0.39*	6.76±0.52*
芪归1∶1组	12	19.54±2.11△	5.97±0.48△	3.29±0.25△
芪归3∶1组	12	18.68±1.90**	7.35±0.62△	3.02±0.24**
芪归5∶1组	12	15.23±1.84**	8.24±0.71△	2.41±0.16**

注：*与正常对照组比较，$P<0.05$；△与模型对照组比较，$P<0.05$；**与模型对照组比较，$P<0.01$。

4 讨论

再生障碍性贫血是一种免疫功能异常的骨髓造血功能衰竭疾病，主要表现为骨髓有核细胞增殖减低、全血细胞减少，出现贫血、感染、出血等症状。本病病程长，病情容易反复，且发病率有逐年升高趋势，临床治疗难度较大，严重影响患者生活质量。对症治疗、免疫抑制剂、造血干细胞移植等是本病的主要治疗方法，但临床疗效欠佳、治疗费用较高等问题限制了本病的治疗发展[10]。再生障碍性贫血属于中医学“髓劳”“虚劳”“血痨”等疾病范畴，临床常表现为面色萎黄或苍白、神疲乏力、懒言气短、心悸、纳呆、肌肤甲错、舌淡红或黯红、脉沉细无力等，基本病机在于脾肾亏虚、气血不足，虚与瘀贯穿疾病的发生和发展[11]。

当归补血汤是中医学补气生血的经典名方，出自金元四大家之一李东垣的《内外伤辨惑论》，目前收录于国家中医药管理局公布的《古代经典名方目录（第一批）》。当归补血汤有 800 余年的应用史，组方由黄芪与当归 2 味药构成：黄芪，味甘，气微温，归肺、脾经，能补气升阳、生津养血、固表止汗、行滞通痹、利水消肿、托毒排脓、敛疮生肌，大补脾肺之气，以资生血之源；当归，味甘辛，性温质润，归肝、心、脾经，功可补血活血、调经止痛、润肠通便，配合黄芪益血和营，使气生血旺。方中黄芪用量数倍于当归，意在补气以生血，气可行血、摄血，血又能养气、载气；二者配伍，益气生血，亦有益气活血、益气摄血、益气养血之效，为补气生血养血的经典方[12－13]。研究发现其有纠正贫血症状、促进血细胞的分化与成熟、改善骨髓造血功能、调节机体免疫功能紊乱、保护肾功能、抗纤维化、抗肿瘤、抗氧化等多种药理学作用[14－15]。当归补血汤可通过槲皮素、芒柄花素、β－谷甾醇等多种有效成分，调节 ESR1、MAPK1、RELA、AKT1 等核心靶点，干预 PI3K－AKT 等相关信号通路改善化疗所致骨髓抑制[16]。李芮等[17]研究证实，当归补血汤能够通过免疫调节、促进骨髓造血系统重建以及对传导通路的调节，改善造血微环境、促进红细胞生成、增加血管新生等多途径调节造血功能。当归补血汤汤剂还可促进骨髓造血干细胞或祖细胞增殖，促进外周血细胞和骨髓有核细胞数量的恢复，从而促进造血功能的恢复[18]。ZHANG W L 等[19]发现，当归补血汤可刺激造血祖细胞红系爆发型集落形成、巨噬细胞集落形成增殖，增加骨髓有核细胞数，对免疫介导再生障碍性贫血模型小鼠有良好的治疗效果。黄芪和当归配伍可不同程度地提高血中血清造血生长因子，促进骨髓造血干细胞和祖细胞向血细胞的增殖分化，促进外周血象的恢复[20]。许卓等[21]研究证实，当归补血汤能够提高层粘连蛋白以及纤维连接蛋白表达水平，刺激血干/祖细胞繁殖以及分化，改善小鼠体内造血干/祖细胞的黏附以及归巢，使造血干/祖细胞的繁殖速度进一步加快，改善造血功能。陈威等[22]发现当归补血汤增加外周全血细胞的产生，对免疫系统可能具有双向调节的作用，能够纠正机体免疫紊乱，提高免疫耐受，促进造血。当归补血汤治疗贫血疾病的有效性和科学性经受了几百年的临床证实和实践检验，值得临床深入研究探索。

作为细胞免疫主要参与者，Treg 细胞和 Th17 细胞能分泌多种细胞因子，参与机体免疫应答和免疫耐受的调控。Treg 细胞具有免疫抑制作用，分泌 TGF－β、IL－10、IL－35、IL－4 等细胞因子，抑制和调节效应 T 细胞的增殖与活化，能有效减缓病理性免疫应答，降低炎症性损伤[23－24]。Treg 细胞参与多种自身免疫性疾病、移植排斥反应，具有免疫抑制和维持机体免疫平衡的作用。Th17 细胞具有介导炎症反应的作用，选择性分泌 IL－17A、IL－22、IL－17F 等多种效应细胞因子，介导中性粒细胞动员、招募和活化，促进炎症反应的发生。IL－17 与受体结合后，可刺激靶细胞释放 TNF－α、IL－6、IL－1β 等促炎因子，加剧炎症反应[25－26]。Th17 细胞参与多种自身免疫性疾病、慢性炎症性疾病的发生发展。Th17 细胞和 Treg 细胞在生理状态下，相互联系、相互制约，呈现动态平衡，以保持机体正常免疫功能。在 TGF－β 主导作用下，初始 CD_4^+ T 淋巴细胞分化为 Th17 细胞过程受到抑制，Treg 细胞分化得到增强；当机体免疫受外界刺激时，能调节效应细胞分泌大量 IL－6，拮抗 TGF－β 作用，诱导初始 CD_4^+ T 淋巴细胞分化为 Th17 细胞，而 Treg 细胞分化得到抑制[27－28]。再生障碍性贫血患者免疫功能异常与 T 淋巴细胞亚群异常增殖密切相关，骨髓造血微环境中存在 IL－17、TGF－β、IL－10、IL－6、IFN－γ、TNF－α 等多种细胞因子水平紊乱。Th17 细胞和 Treg 细胞是再生障碍性贫血造血细胞免疫功能破坏的主要 T 细胞群[29－30]，Th17 细胞过度活化，IL－17 等炎性因子分泌增多，抑制了 Treg 细胞的活化，Th17/Treg 细胞平衡失调，抑制机体自身免疫反应的能力下降，并通过异常调节和释放相应的细胞因子，破坏骨髓造血前体细胞，刺激免疫反应，损伤造血干细胞，影响机体造血功能[31]。

本实验通过免疫介导的方法建立再生障碍性贫血小鼠模型。研究发现，模型对照组小鼠精神萎靡，活动笨拙，毛发蓬乱暗淡，眼睑、唇色、耳廓颜色苍白，进食量、饮水量减少；体质量、脾脏指数明显下降；外周血红细胞、白细胞、血小板计数及血红蛋白浓度均明显降低；骨髓组织结构紊乱，骨髓造血组织增生度明显减低，这与临床 AA 患者高度类似；模型组 IL－17A、

IL－6 蛋白表达明显上调，TGF－β1、IL－10 蛋白表达明显下调；Th17 细胞比例明显增高，Treg 细胞比例明显降低，Th17/Treg 细胞比值明显升高，提示 Th17/Treg 平衡紊乱是再生障碍性贫血发生机制之一。当归补血汤芪归不同比例组方干预后，小鼠一般症状均改善，进食量及饮水量增加，体质量、脾脏指数均明显升高，外周血红细胞、白细胞、血小板计数及血红蛋白浓度明显升高（$P<0.05$），骨髓造血功能改善，造血组织增生度升高（$P<0.05$）；IL－17A、IL－6 蛋白表达明显下调，TGF－β1、IL－10 蛋白表达明显上调（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）；流式细胞术检测显示，Th17 细胞比例明显降低，Treg 细胞比例明显升高，Th17/Treg 细胞比值显著下降（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），其中当归补血汤芪归 5∶1 组效果最佳。

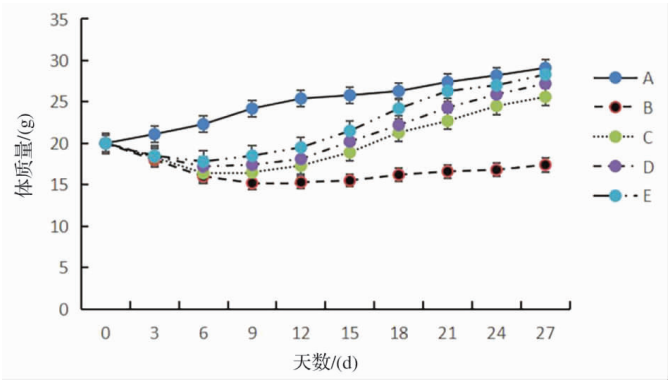
综上所述，当归补血汤能改善再生障碍性贫血小鼠骨髓造血功能，降低 IL－17A、IL－6 蛋白表达水平，提高 TGF－β1、IL－10 蛋白表达，其机制可能是通过升高 Treg 细胞比例、抑制 Th17 细胞的分化，调节 Th17/Treg 细胞平衡来实现。

参考文献

[1] 杨晓梅，杨维. T 细胞肿瘤免疫治疗的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展，2018，46(3)：72－76.
[2] 陈慧，马洁，邢天禹，等. 重型再生障碍性贫血患儿免疫抑制治疗疗效及 T 细胞亚群变化的临床分析[J]. 国际输血及血液学杂志，2022，45(3)：229－237.
[3] 王文儒，杜宇，许勇钢，等. 骨髓增生异常综合征与再生障碍性贫血的临床体征及淋巴亚群比较[J]. 临床血液学杂志，2022，35(10)：710－716.
[4] KORDASTI S，COSTANTINI B，SEIDL T，et al. Deep phenotyping of Tregs identifies an immune signature for idiopathic aplastic anemia and predicts response to treatment[J]. Blood，2016，128(9)：1193－1205.
[5] LIU Z，CHEN L，XIONG D，et al. Salidroside affects the Th17/Treg cell balance in aplastic anemia via the STAT3/HIF－1α/RORγt pathway[J]. Redox Rep，2023，28(1)：2225868.
[6] 李心蕾，张雪艳，赵涵，等. 经典名方当归补血汤的古代文献分析与考证[J]. 中国实验方剂学杂志，2023，29(12)：38－45.
[7] 杨飞霞，王玉，夏鹏飞，等. 当归补血汤化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中国中药杂志，2021，46(11)：2677－2685.
[8] 谢晓林，李娟，张德柱，等. 经典名方当归补血汤物质基准的质量标准研究[J]. 世界中医药，2023，18(11)：1541－1546.
[9] DENG P Y，LI X，WEI Y，et al. The herbal decoction modified Danggui Buxue Tang attenuates immune－mediated bone marrow failure by regulating the differentiation of T lymphocytes in an immune－induced aplastic anemia mouse model[J]. PLoS One，2017，12(7)：e0180417.
[10] 再生障碍性贫血诊断与治疗中国指南(2022 年版)[J]. 中华血液学杂志，2022，43(11)：881－888.
[11] 何丹迪，王金环，雍彦礼，等. 中医治疗再生障碍性贫血的研究概况与发展[J]. 中国数字医学，2022，17(1)：89－94.
[12] 刘玲素，王树庆. 当归补血汤治疗肿瘤相关性贫血(脾肾两虚型)的临床研究及安全评价[J]. 中华中医药学刊，2024，42(1)：96－99.
[13] 李畅，范荣，李东波，等. 当归补血汤促进大鼠骨质疏松性骨折愈合及调节 Wnt/β－catenin 通路作用研究[J]. 吉林中医药，2022，42(9)：1069－1075.
[14] 陈维达，徐龙晋，张静，等. 当归补血汤对再障小鼠骨髓造血及线粒体自噬的实验研究[J]. 中药药理与临床，2019，35(1)：14－18.
[15] 孔惠敏，苏伟青，叶红，等. 当归补血汤及其主要成分对骨髓抑制小鼠的抗造血细胞凋亡的研究[J]. 中国实验血液学杂志，2022，30(6)：1679－1687.
[16] 王萌萌，杨宇飞，何斌. 基于网络药理学和分子对接探讨当归补血汤改善化疗所致骨髓抑制的作用机制[J]. 国际中医中药杂志，2023，45(3)：330－337.
[17] 李芮，刘健，靳楠，等. 基于网络药理学探讨当归补血汤治疗再生障碍性贫血作用机制[J]. 陕西中医，2022，43(3)：384－389.
[18] 杨志文，何靖，刘增慧，等. 基于网络药理学探究“黄芪－当归”治疗慢性再生障碍性贫血的作用机制[J]. 中国中医基础医学杂志，2021，27(2)：253－259.
[19] ZHANG W L，CHOI R C，ZHAN J Y，et al. Can Hedysari *Radix* replace Astragali *Radix* in Danggui Buxue Tang，a Chinese herbal decoction for woman aliment?[J]. Phytomedicine，2013，20(12)：1076－1081.
[20] 黄小平，李菲，陈凌波，等. 黄芪和当归配伍对环磷酰胺所致骨髓造血功能抑制小鼠造血功能的影响[J]. 中草药，2017，48(1)：121－128.
[21] 许卓，初杰，崔运浩. 当归补血汤煎剂对骨髓抑制小鼠 EPO、TPO、GM－CSF 表达的影响研究[J]. 中华中医药学刊，2021，39(6)：229－231.
[22] 陈威，徐希科，吕燕慧，等. 当归补血汤化学成分及其促造血功能研究进展[J]. 海军军医大学学报，2023，44(5)：609－615.
[23] SHI Q Z，YU H M，CHEN H M，et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells regulate Treg/Th17 balance in aplastic anemia by transferring miR－23a－3p[J]. Clin Exp Med，2021，21(3)：429－437.
[24] 张勇龙，逯子衡，林晓云，等. 基于 Th17/Treg 平衡轴探讨中医药治疗慢性荨麻疹的作用及机制研究[J]. 世界科学技术－中医药现代化，2023，25(6)：2159－2167.
[25] ZHANG J，LIU T，DUAN Y，et al. Single－cell analysis highlights a population of Th17－polarized CD4$^+$ naïve T cells showing IL6/JAK3/STAT3 activation in pediatric severe aplastic anemia[J]. J Autoimmun，2023，136：103026.
[26] 司秀影，赵宝珠，李鹤然，等. 中医药调控哮喘 Th17/Treg 细胞失衡的研究进展[J]. 中华中医药学刊，2022，40(7)：98－102.
[27] 顾炜，于佳家，何雨聪. 痤疮合剂对家兔耳痤疮模型 Th1/Th2 和 Th17/Treg 平衡调节机制的实验研究[J]. 中华中医药学刊，2023，41(9)：218－222，288－290.
[28] 张黎莉，卢金金. 贫血患者外周血 Th17/Treg 细胞亚群及相关细胞因子水平[J]. 华南预防医学，2021，47(12)：1568－1571.
[29] YIN X W，LIU B，WEI H X，et al. Activation of the Notch signaling pathway disturbs the CD4$^+$/CD8$^+$，Th17/Treg balance in rats with experimental autoimmune uveitis[J]. Inflamm Res，2019，68(9)：761－774.
[30] 殷学伟，周梦贤，崔艳艳，等. 龙胆泻肝汤对葡萄膜炎大鼠 Th17/Treg 动态免疫平衡的调控作用[J]. 时珍国医国药，2022，33(5)：1098－1102.
[31] LIU C，SUN Y，SHAO Z. Current concepts of the pathogenesis of aplastic *Anemia*[J]. Curr Pharm Des，2019，25(3)：236－241.

当归补血汤对再生障碍性贫血小鼠 Th17/Treg 细胞平衡的影响

（正文见 41－45 页）



注：A. 正常对照组；B. 模型对照组；C. 芪归 1∶1 组；D. 芪归 3∶1 组；E. 芪归 5∶1 组。

图 1　各组小鼠体质量变化

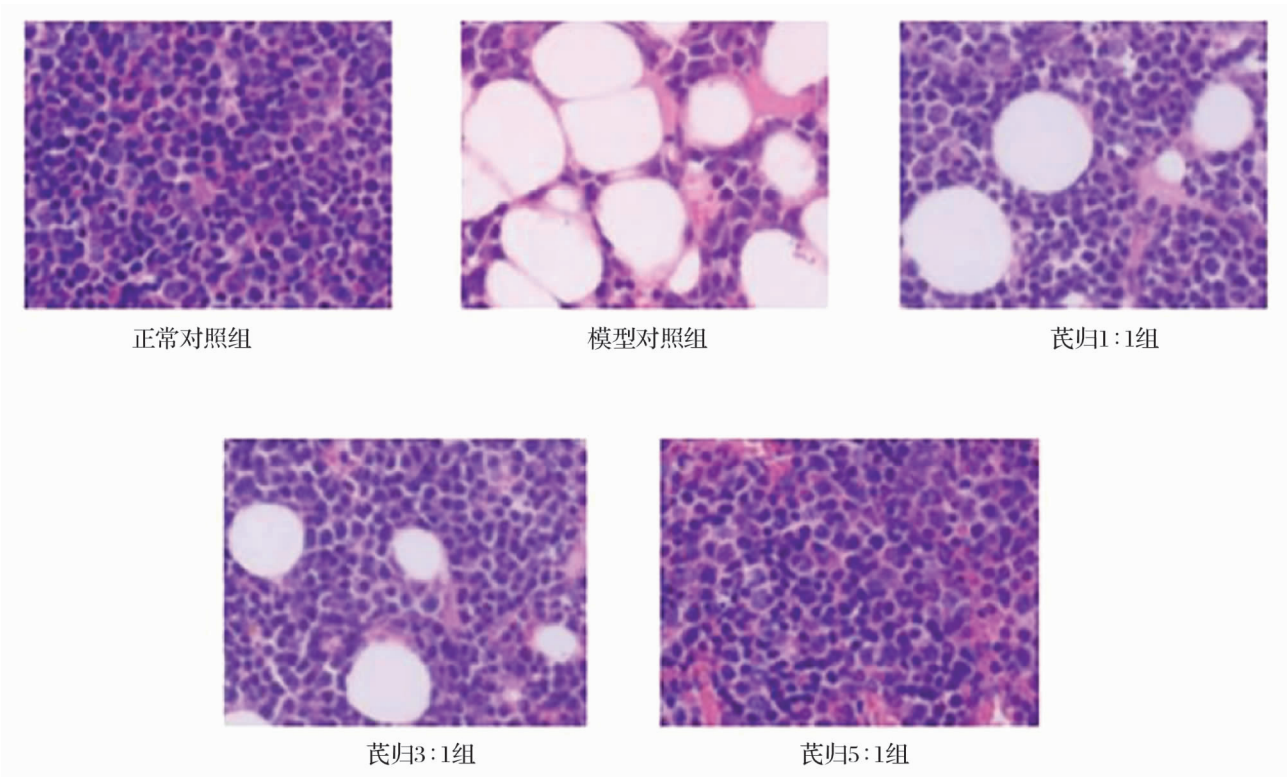


图 2　各组小鼠骨髓组织病理变化情况（HE 染色，×400）

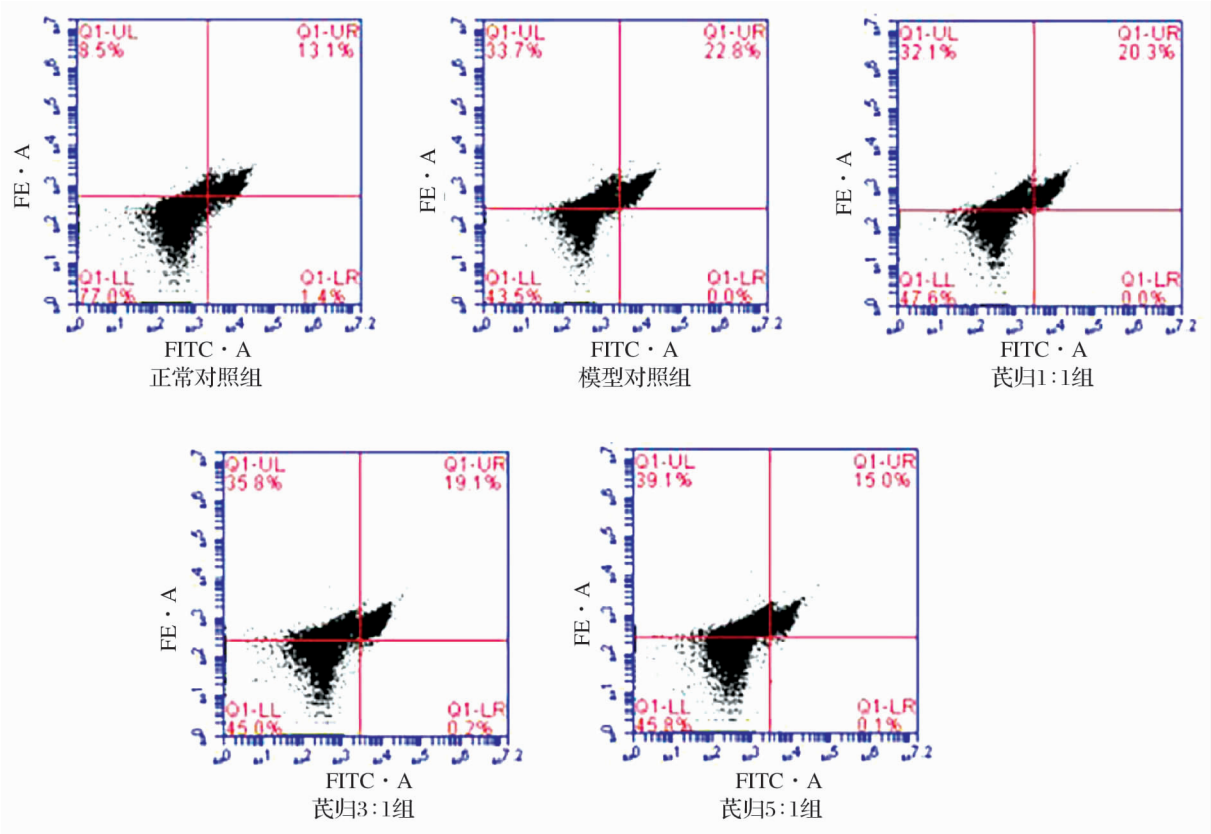


图 3 各组小鼠骨髓 Th17 细胞比例水平

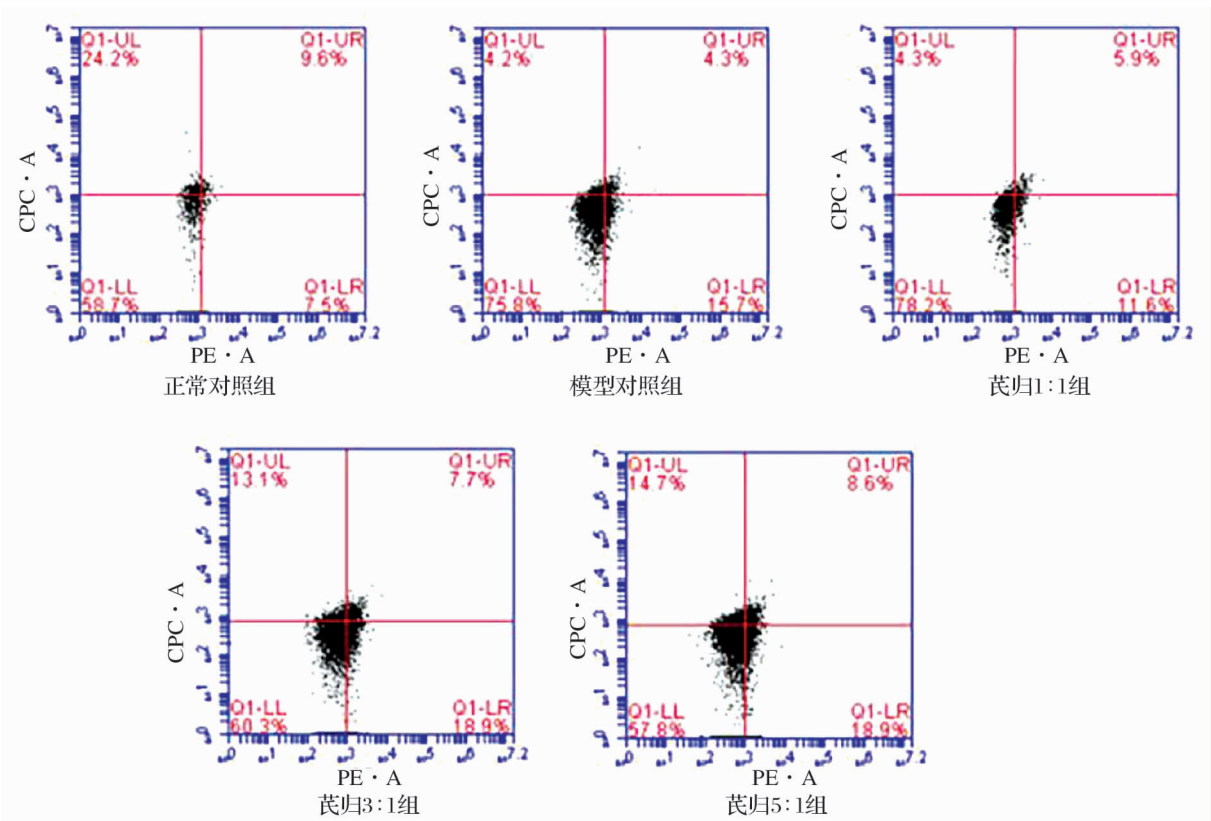


图 4 各组小鼠骨髓 Treg 细胞比例水平