

黄芩素对 EAM 模型小鼠心肌组织纤维化的影响

王甜甜 王爽 李玲

(青岛大学基础医学院, 山东 青岛 266071)

[摘要] **目的** 探讨黄芩素对自身免疫性心肌炎(experimental autoimmune myocarditis, EAM)模型小鼠心肌组织纤维化的影响及其机制。**方法** 将 20 只 BalB/C 小鼠随机分为空白组、EAM 组、黄芩素组、地塞米松组, 每组 5 只。在饲养至第 0、7 天时, 除空白组小鼠外余均皮下注射 200 μ L 完全弗氏佐剂与 α -MyHC 肽混合乳剂, 饲养至第 8 天时开始对 EAM 组、黄芩素组及地塞米松组小鼠分别给予羧甲基纤维素钠、黄芩素、地塞米松灌胃, 给药至第 21 天时行超声心动图检测各组小鼠左心室射血分数(LVEF)、缩短分数(LVFS)、舒张末期内径(LVIDd)及收缩末期内径(LVIDs)。第 21 天时将各组小鼠脱颈处死后取心脏组织进行 HE 染色和 Masson 染色; 采用流式细胞术检测各组小鼠脾细胞中 Th17/Treg 细胞比例; 采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)和免疫印迹法检测各组小鼠心脏组织中的胶原 I (Collagen I)、基质金属蛋白酶-1(MMP-1)、白细胞介素 17A(IL-17A)、Treg 转录因子(FOXP3)及白细胞介素 10(IL-10)的 mRNA 及蛋白表达水平。**结果** 超声心动图显示, 黄芩素组小鼠 LVEF、LVFS 显著高于 EAM 组($F=51.55, 35.38, q=8.08, 5.97, P<0.05$), LVIDd、LVIDs 显著低于 EAM 组($F=4.64, 17.72, q=2.88, 4.77, P<0.05$)。HE 及 Masson 染色结果显示, 黄芩素组及地塞米松组小鼠心脏组织炎症细胞的浸润和胶原纤维的沉积较 EAM 组有所改善。流式细胞术检测结果显示, 黄芩素组及地塞米松组小鼠脾细胞中 Th17/Treg 细胞比例显著低于 EAM 组($F=6.80, q=3.60, 3.06, P<0.05$)。RT-qPCR 结果显示, 黄芩素组小鼠心脏组织中 Collagen I、IL-17A mRNA 水平显著低于 EAM 组($F=112.40, 77.49, q=14.57, 8.27, P<0.05$), MMP-1、FOXP3、IL-10 mRNA 水平显著高于 EAM 组($F=19.05\sim 144.60, q=5.37\sim 11.21, P<0.05$)。免疫印迹法检测结果显示, 黄芩素组小鼠心脏组织中 Collagen I、IL-17A 蛋白表达显著低于 EAM 组($F=13.70, 13.97, q=4.72, 5.64, P<0.05$), MMP-1、FOXP3、IL-10 蛋白表达显著高于 EAM 组($F=6.77\sim 17.21, q=3.32\sim 6.14, P<0.05$)。**结论** 黄芩素通过调控脾脏中 Th17/Treg 平衡减轻 EAM 小鼠心肌损伤, 进而减轻心肌组织纤维化进程。

[关键词] 心肌炎; 自身免疫疾病; 纤维化; 黄芩素; Th17 细胞; T 淋巴细胞, 调节性; 基因表达调控; 小鼠

[中图分类号] R542.21; R593.2

[文献标志码] A

Effect of baicalein on fibrosis of myocardial tissue in EAM model mice WANG Tiantian, WANG Shuang,

LI Ling (School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the effect of baicalein on myocardial fibrosis in experimental autoimmune myocarditis (EAM) mice and its mechanism. **Methods** Twenty BalB/C mice were divided into blank group, EAM group, baicalein group, and dexamethasone group, with 5 mice in each group. On days 0 and 7, all the mice except those in the blank group were subcutaneously injected with 200 μ L of complete Freund's adjuvant and α -MyHC peptide emulsion. Starting from day 8, the mice in the EAM group, baicalein group, and dexamethasone group were intragastrically administered sodium carboxymethyl cellulose, baicalein, and dexamethasone, respectively. Echocardiography was performed on day 21 of administration to determine left ventricular ejection fraction (LVEF), shortening fraction (LVFS), left ventricular end-diastolic internal diameter (LVIDd), and left ventricular end-systolic internal diameter (LVIDs) in mice across all groups. On day 21, the mice from all groups were euthanized by cervical dislocation and their heart tissues were collected for HE staining and Masson staining. Flow cytometry was used to detect the proportion of Th17/Treg cells among the splenocytes. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blot were used to analyze the mRNA and protein expression of Collagen I, matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), interleukin 17A (IL-17A), Treg transcription factor (FOXP3), and IL-10 in the cardiac tissue of mice. **Results** Echocardiographic results showed that the LVEF and LVFS of mice in baicalein group were significantly higher than those in the EAM group ($F=51.55, 35.38, q=8.08, 5.97, P<0.05$), while LVIDd and LVIDs were significantly lower than the EAM group ($F=4.64, 17.72, q=2.88, 4.77, P<0.05$). HE and Masson staining showed that infiltration of inflammatory cells and deposition of collagen fibers in the cardiac tissue of mice were significantly mitigated in the baicalein and dexamethasone groups as compared with the EAM group. Flow cytometry showed that the proportion of Th17/Treg cells was significantly higher in the EAM group than in the baicalein and dexamethasone groups ($F=54.75, q=3.60, 3.06, P<0.05$). RT-qPCR showed that the mRNA levels of Collagen I and IL-17A in the heart tissue of mice were significantly lower in the baicalein group than in the EAM

[收稿日期] 2023-11-27; **[修订日期]** 2024-02-12

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(82001754)

[通讯作者] 李玲, Email: lilng743@126.com

group ($F=112.40, 77.49, q=14.57, 8.27, P<0.05$), while the mRNA levels of *MMP-1*, *FOXP3*, and *IL-10* were significantly higher in the baicalein group than in the EAM group ($F=19.05-144.60, q=5.37-11.21, P<0.05$). Western blot showed that the expression of Collagen I and IL-17A was significantly lower in the heart tissue of mice in the baicalein group than that in the EAM group ($F=13.70, 13.97, q=4.72, 5.64, P<0.05$), while the expression of *MMP-1*, *FOXP3*, and *IL-10* was significantly higher in the baicalein group than in the EAM group ($F=6.77-17.21, q=3.32-6.14, P<0.05$). **Conclusion** Baicalein alleviates myocardial damage in EAM mice by regulating the balance between Th17/Treg in the spleen, thereby reducing the progression of myocardial tissue fibrosis.

[KEY WORDS] Myocarditis; Autoimmune diseases; Fibrosis; Baicalein; Th17 cells; T-lymphocytes, regulatory; Gene expression regulation; Mice

心肌炎是指以心肌局限性或弥漫性炎症病变为主要表现的疾病^[1]。在心肌炎发病期间,炎症细胞的持续浸润可引起心肌损伤^[2],炎症后期会导致心肌纤维化。目前国内外对于心肌纤维化的治疗以减轻心肌组织炎症损伤为主,以求减少心肌组织纤维化。Th17 和 Treg 是 CD4⁺ T 细胞的两个亚群,其中 Th17 细胞主要起促炎作用,Treg 细胞与抑炎反应相关^[3]。Th17 通过分泌白细胞介素 17(IL-17)促进炎症反应,而 Treg 则通过分泌白细胞介素 10(IL-10)抑制炎症反应。在心力衰竭患者的外周血中,Th17 细胞的比例增加,Treg 细胞的比例减少,Th17/Treg 细胞的比例失衡从而加重了心肌纤维化^[4]。黄芩素是传统中药黄芩的主要生物活性物质,具有抗炎、抗纤维化等多种药理作用和生物活性^[5-6]。研究发现,黄芩素可以通过调控 Th17/Treg 的平衡缓解结肠炎的进展^[7],并通过调控 TGF- β 1 和 p-Smad2/3 的表达减轻肺纤维化^[8-9]。目前关于黄芩素抑制心脏组织纤维化的研究较少,本研究通过构建自身免疫性心肌炎(experimental autoimmune myocarditis, EAM)小鼠模型,并使用黄芩素对小鼠进行治疗,以探讨黄芩素对 EAM 模型小鼠心肌组织纤维化的影响及其机制。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

完全弗氏佐剂(CFA)购买于上海 Sigma 公司, α -MyHC 肽购自生工生物工程(上海)股份有限公司,黄芩素购自大连美仑生物技术有限公司,地塞米松、苏木精伊红(HE)染色试剂盒、山羊抗兔 IgG 以及山羊抗鼠 IgG 购买于上海碧云天生物技术有限公司,Masson 染色试剂盒(G1346)购买于北京索莱宝生物科技有限公司,蛋白转运抑制剂 BFA、鼠抗 CD4、鼠抗 CD3、鼠抗 CD25、鼠抗 Treg 转录因子(FOXP3)、鼠抗 IL-17A 购自美国 Biologend 公司,兔抗 I 型胶原 α 1 抗体购自美国 Cell Signaling 公司,兔抗基质金属蛋白酶-1(MMP-1)、IL-10 抗体购

自北京 Bioass 公司,兔抗 FOXP3 抗体购自成都正能生物技术有限公司,GAPDH KC-5G5 购自上海 Aksoomics 公司,PAGE 快速凝胶试剂盒购自上海雅酶生物技术有限公司,MolPure[®] 细胞/组织总 RNA 提取试剂盒及逆转录试剂盒、 $2 \times q3SYBR$ qPCR Master Mix 试剂盒及 ECL 化学发光超敏显色试剂盒购自上海翌圣生物技术有限公司,BalB/C 小鼠购自北京斯贝福生物技术有限公司。

1.2 EAM 小鼠模型构建及分组

将雄性 6~8 周龄的 BalB/C 小鼠(体质量 18~20 g)随机分为空白组、EAM 组、黄芩素组、地塞米松组,每组 5 只,饲养在青岛大学 SPF 级别鼠房,保持恒温恒湿环境,12 h/12 h 昼夜光照。饲养至第 0、7 天时,除空白组小鼠,余均将 CFA 和 α -MyHC 肽混合乳剂 200 μ L 于腹股沟及腋窝处皮下注射。饲养至第 8 天开始,EAM 组小鼠给予 0.5% 羧甲基纤维素钠 0.1 mL 灌胃,黄芩素组小鼠给予 0.5% 羧甲基纤维素钠+黄芩素 150 mg/kg 共 0.1 mL 灌胃,地塞米松组小鼠给予 0.5% 羧甲基纤维素钠+地塞米松 0.5 mg/kg 共 0.1 mL 灌胃,持续给药至第 21 天。

1.3 超声心动图检测各组小鼠心功能指标

第 21 天麻醉小鼠使其镇静,使用小动物超声成像系统(VINNO6LAB)对小鼠进行经胸超声心动图检查。通过胸骨旁短轴和长轴视图获得二维和 M 型超声心动图图像,测量小鼠左心室舒张末期内径(LVIDd)和左心室收缩末期内径(LVIDs),并计算左心室射血分数(LVEF)和缩短分数(LVFS)。

1.4 各组小鼠心肌组织 HE 及 Masson 染色

进行超声心动图检测后将所有小鼠脱颈处死,取心脏部分固定脱水、透明、浸蜡包埋、切片并烘干后,按照 HE 及 Masson 染色试剂盒说明书要求的步骤进行染色,封片后在正置显微镜下拍照。

1.5 流式细胞术检测各组小鼠脾细胞中 Th17/Treg 细胞比例

将各组小鼠脱颈处死后取出脾脏,无菌条件下

研磨制成单细胞悬液,细胞按 1×10^6 个/孔接种到 96 孔板中,每孔加入 $0.2 \mu\text{g}$ $\alpha\text{-MyHC}$ 肽、 $0.12 \mu\text{g}$ BFA 及 $100 \mu\text{L}$ 含体积分数 0.10 胎牛血清的 RP-MI-1640 培养基,于 37°C 含体积分数 0.05 二氧化碳的培养箱中培养 11 h,随后 $1\ 000 \text{ r/min}$ 离心 5 min,弃上清液。进行 Th17 染色,鼠抗 CD4、鼠抗 CD3 胞外染色共 30 min,再次以 $1\ 000 \text{ r/min}$ 离心 5 min 后,弃上清液。使用 4% 多聚甲醛固定细胞,0.2% Triton X-100 破膜,然后鼠抗 IL-17A 胞内染色 30 min。进行 Treg 染色,鼠抗 CD4、鼠抗 CD3 以及鼠抗 CD25 胞外染色共 30 min,胞外染色结束以后,以 $1\ 000 \text{ r/min}$ 离心 5 min,弃上清液。以 4% 多聚甲醛固定细胞,0.2% Triton X-100 破膜,然后鼠抗 FOXP3 胞内染色 1 h。染色结束以后使用 200 目铜网过滤收集细胞,使用 Beckman CytoFLEX 进行上样检测,最后再采用 FlowJo V10 软件进行数据分析。

1.6 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)技术检测各组小鼠的心脏组织中胶原 I(Collagen I)、MMP-1、IL-17A、FOXP3 及 IL-10 的 mRNA 表达水平

使用 MolPure[®] 细胞/组织总 RNA 提取试剂盒及逆转录试剂盒提取各组小鼠心脏组织的总 RNA 并且转录成 cDNA,根据说明书使用 $2 \times \text{q3SYBR}$ qPCR Master Mix 试剂盒进行 RT-qPCR 检测,以 GAPDH 为内参,数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法。引物序列见表 1。

表 1 引物名称及其序列

引物名称	引物序列	引物长度(bp)
Collagen I	F:5'-CGCCATCAAGGTCTACTGC-3'	19
	R:5'-GAATCCATCGGTCATGCTCT-3'	20
MMP-1	F:5'-TGTITGCAGAGCACTACTTG-3'	20
	R:5'-CAGTCACCTCTAAGCCAAAG-3'	20
FOXP3	F:5'-CACCTATGCCACCCTTATCCG-3'	23
	R:5'-CATGCGAGTAAACCAATGGTAGA-3'	19
IL-10	F:5'-GCCAAGCCTGTGCTGAGATGATCC-3'	19
	R:5'-TTCACATGCGCCTTGATGTCTGG-3'	21
IL-17A	F:5'-ACTACCTCAACCGTTCCACG-3'	20
	R:5'-TTCCTCCGATTGACACAG-3'	20
GAPDH	F:5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'	21
	R:5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'	23

1.7 免疫印迹法检测各组小鼠心脏组织中 Collagen I、MMP-1、IL-17A、FOXP3、IL-10 蛋白相对表达量

用电子秤分别称取各组小鼠心脏组织 20 mg,组织剪剪碎后加入 $200 \mu\text{L}$ RIPA 裂解液、蛋白酶抑

制剂及磷酸酶抑制剂的混合物,在研磨管中进行研磨,结束后静置 5 min,将液体吸出至新的 1.5 mL EP 管中,以 $11\ 832 \text{ r/min}$ 离心 5 min,取上清液。加入蛋白上样缓冲液,沸水煮 10 min,得到蛋白样品。用 15.0% 或 12.5% 的 SDA-PAGE 将蛋白质电转移到 PVDF 膜上,在室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,用 TBST 洗 3 次,将膜分别与一抗 Collagen I (1:1 000)、MMP-1(1:1 000)、IL-17A(1:500)、FOXP3(1:1 000)、IL-10(1:1 000)、GAPDH(1:10 000)在 4°C 下孵育过夜,用 TBST 洗 3 次后与二级 HRP 偶联抗体(1:1 000)在室温下孵育 2 h,使用 ECL 化学发光超敏显色试剂盒配制显色液,将条带置于 VILBER 显影仪进行曝光拍照并分析条带的灰度值,结果取 3 次重复实验的均值。

1.8 统计分析

采用 GraphPad Prism 8.0.1 软件对数据进行统计学分析,符合正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Dunnett *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 黄芩素对 EAM 小鼠心功能的影响

超声心动图结果显示,空白组、黄芩素组及地塞米松组的 LVEF、LVFS 均显著高于 EAM 组 ($F = 51.55, 35.38, q = 5.96 \sim 11.00, P < 0.05$);空白组及黄芩素组的 LVIDd、LVIDs 明显低于 EAM 组 ($F = 4.64, 17.72, q = 2.88 \sim 6.30, P < 0.05$),地塞米松组的 LVIDs 明显低于 EAM 组 ($F = 17.72, q = 6.27, P < 0.05$),但 LVIDd 与 EAM 组无明显差异 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 各组小鼠心功能相关指标比较 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

组别	LVEF (%)	LVFS (%)	LVIDd (d/mm)	LVIDs (d/mm)
空白组	90.15 ± 2.98	55.18 ± 5.12	2.64 ± 0.81	1.33 ± 0.41
EAM 组	63.23 ± 4.73	29.46 ± 3.16	3.88 ± 0.36	2.71 ± 0.37
黄芩素组	82.98 ± 4.67	45.93 ± 5.12	2.84 ± 0.45	1.67 ± 0.32
地塞米松组	88.72 ± 6.22	52.81 ± 3.70	2.98 ± 0.54	1.34 ± 0.27

2.2 黄芩素对 EAM 小鼠心肌组织炎症反应和纤维化的影响

HE 及 Masson 染色结果显示,空白组小鼠心肌组织中无炎症细胞浸润及胶原纤维沉积,EAM 组小鼠心肌组织有大量炎症细胞浸润及胶原纤维沉积,黄芩素组和地塞米松组心肌组织中炎症细胞浸润及胶原纤维沉积较 EAM 组明显减少(图 1)。

2.3 黄芩素对 EAM 小鼠脾细胞中 Th17/Treg 细胞比例的影响

流式细胞术检测结果显示,空白组、EAM 组、黄芩素组、地塞米松组小鼠脾细胞中 Th17/Treg 细胞比例分别为 $(0.29 \pm 0.10)\%$ 、 $(0.30 \pm 0.07)\%$ 、 $(0.16 \pm 0.03)\%$ 、 $(0.08 \pm 0.04)\%$ 。黄芩素组、地塞米松组小鼠脾细胞 Th17/Treg 比例明显低于 EAM 组 ($F=6.80, q=3.60, 3.06, P<0.05$)。见图 2。

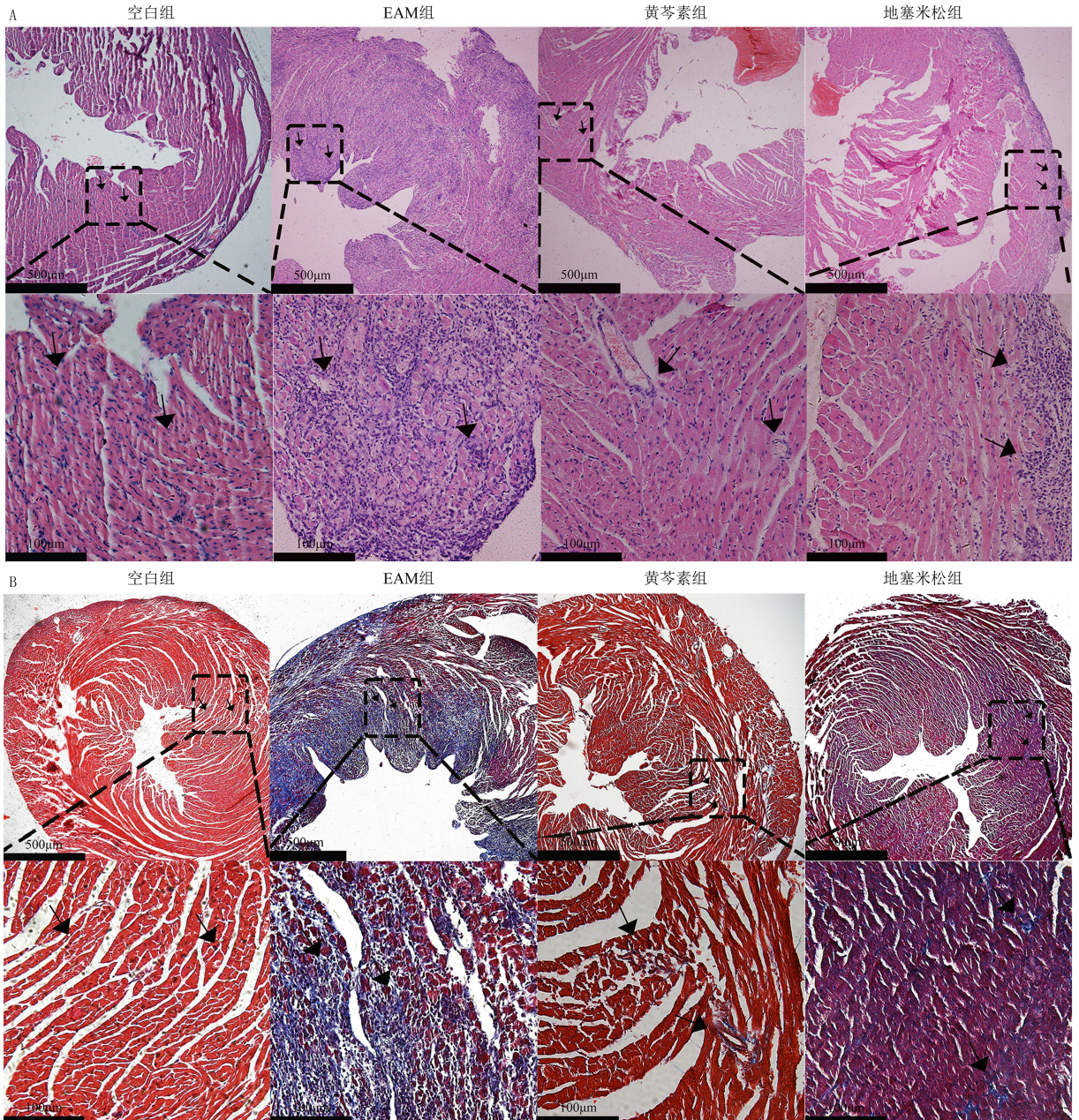
2.4 黄芩素对 EAM 小鼠心脏组织中 Collagen I、MMP-1、IL-17A、FOXP3、IL-10 mRNA 水平影响

RT-qPCR 检测结果显示,空白组、黄芩素组、地

塞米松组小鼠心脏组织中 *Collagen I*、*IL-17A* 水平明显低于 EAM 组 ($F=112.40, 77.49, q=8.27 \sim 15.91, P<0.05$);黄芩素组 *MMP-1*、*FOXP3*、*IL-10* 水平明显高于 EAM 组 ($F=19.05 \sim 144.60, q=5.37 \sim 11.21, P<0.05$);地塞米松组 *FOXP3*、*IL-10* 水平也明显高于 EAM 组 ($F=19.05, 144.60, q=4.36, 10.32, P<0.05$),*MMP-1* 水平与 EAM 组无明显差异 ($P>0.05$)。见表 3。

2.5 黄芩素对 EAM 小鼠心脏组织中 Collagen I、MMP-1、IL-17A、FOXP3、IL-10 蛋白表达水平影响

免疫印迹法检测结果显示,空白组、黄芩素组、



A: HE 染色, B: Masson 染色; 上排放大倍数 40 倍, 左下角 bar 值代表 500 µm; 下排为上排黑色框区域局部放大 200 倍, 左下角 bar 值代表 100 µm; 黑色箭头所指为炎症细胞及胶原纤维

图 1 各组小鼠心脏组织石蜡切片 HE 及 Masson 染色结果

地塞米松组小鼠心脏组织中 Collagen I、IL-17A 蛋白表达水平显著性低于 EAM 组 ($F = 13.70, 13.97, q = 4.61 \sim 5.95, P < 0.05$); 黄芩素组 MMP-1、IL-10、FOXP3 蛋白表达水平明显高于 EAM 组 ($F =$

$6.77 \sim 17.21, q = 3.32 \sim 6.14, P < 0.05$); 地塞米松组小鼠心脏组织中 FOXP3、MMP-1、IL-10 蛋白水平与 EAM 组比较无明显统计学差异 ($P > 0.05$)。见表 4、图 3。

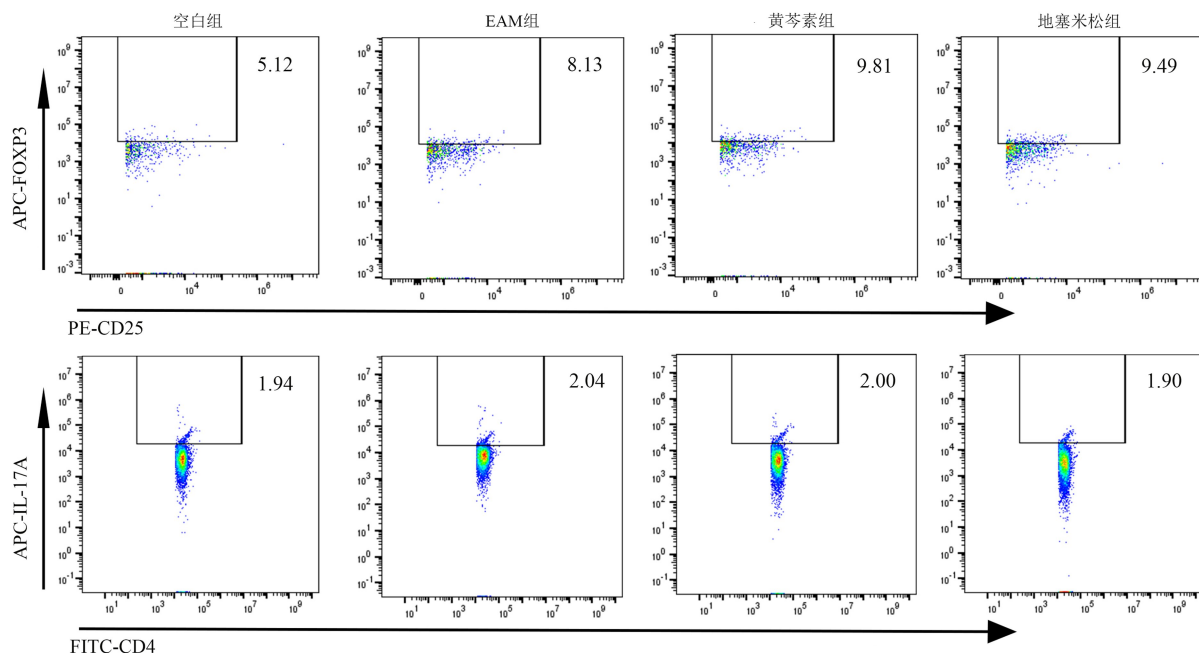


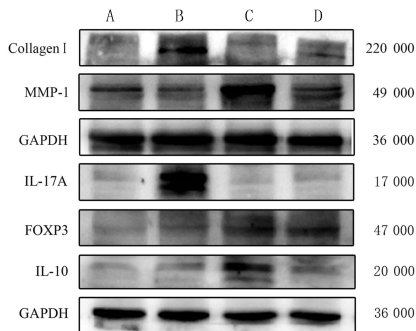
图 2 流式细胞术检测各组小鼠脾细胞 Th17/Treg 细胞比例

表 3 各组小鼠心脏组织中 Collagen I、MMP-1、IL-17A、FOXP3、IL-10 mRNA 水平比较 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

组别	Collagen I	MMP-1	IL-17A	FOXP3	IL-10
空白组	1.03 ± 0.30	1.03 ± 0.08	1.04 ± 0.38	1.01 ± 0.13	1.00 ± 0.10
EAM 组	6.79 ± 0.62	0.24 ± 0.02	51.90 ± 9.66	1.56 ± 0.26	0.06 ± 0.01
黄芩素组	1.52 ± 0.13	0.57 ± 0.11	21.68 ± 2.10	5.20 ± 1.00	0.57 ± 0.03
地塞米松组	1.62 ± 0.75	0.12 ± 0.02	6.91 ± 2.97	4.51 ± 1.29	0.53 ± 0.08

表 4 各组小鼠心脏组织中 Collagen I、MMP-1、IL-17A、FOXP3、IL-10 蛋白水平比较 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

组别	Collagen I	MMP-1	IL-17A	FOXP3	IL-10
空白组	0.39 ± 0.05	0.53 ± 0.08	0.29 ± 0.06	0.48 ± 0.05	0.59 ± 0.12
EAM 组	0.58 ± 0.01	0.47 ± 0.04	0.73 ± 0.16	0.51 ± 0.02	0.64 ± 0.19
黄芩素组	0.43 ± 0.03	0.87 ± 0.13	0.25 ± 0.07	0.68 ± 0.09	1.20 ± 0.16
地塞米松组	0.43 ± 0.05	0.63 ± 0.03	0.31 ± 0.09	0.49 ± 0.05	0.93 ± 0.13



A、B、C、D 分别为空白组、EAM 组、黄芩素组、地塞米松组

图 3 各组小鼠的心脏组织中 Collagen I、MMP-1、IL-17A、FOXP3 及 IL-10 蛋白表达水平

3 讨 论

心肌纤维化的特征是心肌中成纤维细胞募集介导的细胞外基质蛋白进行性积累, 心肌纤维化主要发生在心力衰竭后期^[10-12]。有研究认为炎症细胞通过分泌细胞因子和趋化因子形成炎症微环境, 激活成纤维细胞, 导致心肌纤维化的形成^[13]。既往研究表明, 黄芩素可通过调控 Th17/Treg 细胞比例减轻结肠炎临床症状^[7], 还可抑制不同原因导致的肺纤维化和肾纤维化进展^[14-15], 而黄芩素是否可以抑制 EAM 小鼠心肌组织纤维化研究较少。心肌纤维化

与心功能障碍紧密相关,判断心功能障碍的指标包括 LVEF、LVFS、LVId、LVIDs 等,LVEF、LVFS 降低以及 LVId、LVIDs 升高均表明左心室收缩功能的减弱。WANG 等^[16]通过采用超声心动图检测 EAM 小鼠上述指标,证明巴西多芬可以减轻 EAM 引发的小鼠心功能障碍。本实验中,EAM 组小鼠的 LVEF 以及 LVFS 明显低于黄芩素组,LVIDd、LVIDs 则明显高于黄芩素组,表明黄芩素可以明显减轻 EAM 小鼠心功能障碍。HE 及 Masson 染色结果显示,黄芩素组及地塞米松组小鼠心肌组织炎症细胞浸润和胶原纤维沉积较 EAM 组明显减少,从组织学上体现了黄芩素对 EAM 小鼠心肌组织纤维化的缓解作用。在心肌纤维化小鼠中,心肌成纤维细胞过度激活后分泌较多胶原蛋白,以 Collagen I 为主,而具有胶原蛋白降解功能的 MMP 活性下降,引起胶原降解减慢,导致心肌细胞中大量胶原纤维沉积,从而导致心肌细胞发生纤维化。本研究中 RT-qPCR 及免疫印迹结果显示,EAM 小鼠心脏组织中 *Collagen I* 表达水平较高,而黄芩素及地塞米松干预后 *Collagen I* 的表达明显下降,EAM 小鼠心脏组织中 *MMP-1* 的 mRNA 及蛋白表达较低,而黄芩素干预后其表达明显上调,地塞米松干预后 *MMP-1* 的 mRNA 及蛋白表达与 EAM 组则无明显差异。因此,黄芩素干预可以降低 EAM 小鼠心脏组织中 *Collagen I* 的表达,增加 *MMP-1* 的表达,进而减少 EAM 小鼠心肌组织纤维化。

炎症细胞的浸润与心肌纤维化发生有着密不可分的关系。EAM 小鼠心肌组织中炎症细胞的浸润主要和 CD4⁺ T 细胞有关^[17]。Th17 与 Treg 细胞之间平衡紊乱发生在多种疾病中,如 Th17/Treg 比值在类风湿性关节炎、牛皮癣、多发性硬化症和自身免疫性结肠炎患者中显著升高^[18-20]。为探讨黄芩素干预后 EAM 小鼠心肌纤维化减轻机制,本研究于小鼠饲养后第 21 天检测各组小鼠脾细胞中 Th17/Treg 细胞比例,结果显示黄芩素组及地塞米松组小鼠脾细胞中 Th17/Treg 细胞比例相较于 EAM 组明显降低。RT-qPCR 和免疫印迹实验结果则显示,黄芩素组小鼠心脏组织中 *IL-17A* mRNA 及蛋白水平较 EAM 组明显下调,*FOXP3*、*IL-10* mRNA 及蛋白水平明显上调。有研究发现 *IL-17A* 和 *IL-17RC* 在小鼠心肌成纤维细胞中呈高表达,进一步研究还发现 *IL-17* 可以诱导心肌纤维化^[21],而体内和体外实验都显示 Treg 产生的 *IL-10* 显著抑制了心肌成纤维细胞的胶原合成,Treg 细胞已被证明可

通过产生免疫抑制细胞因子 *IL-10* 从而介导免疫反应^[22-24]。因此黄芩素干预后 EAM 小鼠心脏组织中促纤维化因子 *IL-17A* 水平明显下调,抗纤维化因子 *IL-10* 水平明显上调,说明黄芩素抑制了心肌成纤维细胞激活,减轻了心肌组织纤维化。

综上所述,黄芩素干预可通过调控 Th17/Treg 细胞比例的平衡减轻 EAM 小鼠的心肌纤维化,本研究结果为延缓 EAM 患者心肌纤维化进程提供了治疗新思路。

伦理批准和动物权利声明:本研究涉及的所有动物实验均已通过青岛大学医学部伦理委员会审核批准(文件号 QDU-AEC-2023-417)。所有实验过程均遵照《实验动物管理守则》的条例进行。

作者声明:王甜甜、王爽参与了研究设计;王甜甜、李玲参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] FELDMAN A M, MCNAMARA D. Myocarditis[J]. N Engl J Med, 2000,343(19):1388-1398.
- [2] KODAMA M, ZHANG S, HANAWA H, et al. Immunohistochemical characterization of infiltrating mononuclear cells in the rat heart with experimental autoimmune giant cell myocarditis[J]. Clin Exp Immunol, 1992,90(2):330-335.
- [3] WAN Z K, ZHOU Z F, LIU Y, et al. Regulatory T cells and T helper 17 cells in viral infection[J]. Scand J Immunol, 2020, 91(5):e12873.
- [4] LU M, QIN X L, YAO J G, et al. Th17/Treg imbalance modulates rat myocardial fibrosis and heart failure by regulating LOX expression[J]. Acta Physiol, 2020,230(3):e13537.
- [5] ZHAO Q, CHEN X Y, MARTIN C. Scutellaria baicalensis, the golden herb from the garden of Chinese medicinal plants [J]. Sci Bull, 2016,61(18):1391-1398.
- [6] LU X H, WU K F, JIANG S M, et al. Therapeutic mechanism of baicalin in peritoneal dialysis-associated peritoneal fibrosis based on network pharmacology and experimental validation[J]. Front Pharmacol, 2023,14:1153503.
- [7] LIU C, LI Y Y, CHEN Y P, et al. Baicalin restores the balance of Th17/Treg cells via aryl hydrocarbon receptor to attenuate colitis[J]. Mediators Inflamm, 2020,2020:5918587.
- [8] SUN X H, CUI X J, CHEN X H, et al. Baicalin alleviated TGF β 1-induced type I collagen production in lung fibroblasts via downregulation of connective tissue growth factor [J]. Biomedicine Pharmacother, 2020,131:110744.
- [9] GAO Y, LU J, ZHANG Y, et al. Baicalin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats through inhibition of miR-21[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2013,26(6):649-654.
- [10] ZEISBERG E M, TARNAVSKI O, ZEISBERG M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis[J]. Nat Med, 2007,13(8):952-961. (下转第 107 页)

tectic solvents[J]. Int J Pharm, 2023,644:123298.

[12] HAGHBAKHS R, DUARTE A R C, RAEISSI S. Viscosity investigations on the binary systems of (1 ChCl; 2 ethylene glycol) DES and methanol or ethanol[J]. Molecules, 2021,26(18):5513.

[13] LE N T, HOANG N T, VAN V T T, et al. Extraction of curcumin from turmeric residue (*Curcuma longa* L.) using deep eutectic solvents and surfactant solvents[J]. Anal Methods, 2022,14(8):850-858.

[14] ZHANG S Z, DUAN Y, TENG C C, et al. Fast and selective degradation of biomass for xylose, glucose and lignin under mild conditions[J]. Molecules, 2023,28(8):3306.

[15] WILHELMUS K R. The Draize eye test[J]. Surv Ophthalmol, 2001,45(6):493-515.

[16] WEI C, MA L, XIANG D M, et al. Enhanced autophagy alleviated corneal allograft rejection via inhibiting NLRP3 inflammasome activity[J]. Am J Transplant, 2022, 22(5):1362-1371.

[17] PAN Q, XU Q G, BOYLAN N J, et al. Corticosteroid-loaded biodegradable nanoparticles for prevention of corneal allograft rejection in rats[J]. J Control Release, 2015,201:32-40.

[18] BERGUA F, DELSO I, MUÑOZ-EMBID J, et al. Structure and properties of two glucose-based deep eutectic systems[J]. Food Chem, 2021,336:127717.

[19] GUAJARDO N, DOMÍNGUEZ DE MARÍA P, CANALES R. Integrating biocatalysis with viscous deep eutectic solvents in lab-on-A-chip microreactors[J]. ChemSusChem, 2022,15(9):e202102674.

[20] BAHADORI L, CHAKRABARTI M H, MANAN N S, et al. The effect of temperature on kinetics and diffusion coefficients of metallocene derivatives in polyol-based deep eutectic solvents[J]. PLoS One, 2015,10(12):e0144235.

[21] DOLDOLOVA K, BENER M, LALIKO LU M, et al. Optimization and modeling of microwave-assisted extraction of curcumin and antioxidant compounds from turmeric by using natural deep eutectic solvents[J]. Food Chem, 2021, 353:129337.

[22] KONG D H, KIM Y K, KIM M R, et al. Emerging roles of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in immunological disorders and cancer[J]. Int J Mol Sci, 2018,19(4):1057.

(本文编辑 耿波 厉建强)

(上接第 100 页)

[11] ASSOMULL R G, PRASAD S K, LYNE J, et al. Cardiovascular magnetic resonance, fibrosis, and prognosis in dilated cardiomyopathy[J]. J Am Coll Cardiol, 2006,48(10):1977-1985.

[12] LANG C, SAUTER M, SZALAY G, et al. Connective tissue growth factor: A crucial cytokine-mediating cardiac fibrosis in ongoing enterovirus myocarditis[J]. J Mol Med, 2008,86(1):49-60.

[13] BARCENA M L, JEUTHE S, NIEHUES M H, et al. Sex-specific differences of the inflammatory state in experimental autoimmune myocarditis [J]. Front Immunol, 2021, 12:686384.

[14] YUANJ H, MAY, YUANL H, et al. Baicalein attenuates bleomycin-induced lung fibroblast senescence and lung fibrosis through restoration of Sirt3 expression[J]. Pharm Biol, 2023, 61(1):288-297.

[15] WANG W, ZHOU P H, XU C G, et al. Baicalein ameliorates renal interstitial fibrosis by inducing myofibroblast apoptosis *in vivo* and *in vitro*[J]. BJU Int, 2016,118(1):145-152.

[16] WANG J, LIU T S, CHEN X W, et al. Bazedoxifene regulates Th17 immune response to ameliorate experimental autoimmune myocarditis via inhibition of STAT3 activation[J]. FrontPharmacol, 2020,11:613160.

[17] SUN P, WANG N X, ZHAO P, et al. Circulating exosomes control CD4⁺ T cell immunometabolic functions via the transfer of miR-142 as a novel mediator in myocarditis[J]. Mol T-

her, 2020,28(12):2605-2620.

[18] BETTELLI E, KORN T, OUKKA M, et al. Induction and effector functions of T(H)₁₇ cells [J]. Nature, 2008, 453(7198):1051-1057.

[19] CHABAUD M, DURAND J M, BUCHS N, et al. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium [J]. Arthritis Rheum, 1999,42(5):963-970.

[20] LOCK C, HERMANS G, PEDOTTI R, et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis[J]. Nat Med, 2002,8(5):500-508.

[21] LIU Y F, ZHU H T, SU Z L, et al. IL-17 contributes to cardiac fibrosis following experimental autoimmune myocarditis by a PKCβ/Erk1/2/NF-κB-dependent signaling pathway[J]. Int Immunol, 2012,24(10):605-612.

[22] ASSEMAN C, MAUZE S, LEACH M W, et al. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation[J]. J Exp Med, 1999,190(7):995-1004.

[23] RUBTSOV Y P, RASMUSSEN J P, CHI E Y, et al. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces[J]. Immunity, 2008,28(4):546-558.

[24] CAO Y X, XU W, XIONGS D. Adoptive transfer of regulatory T cells protects against Cocksackievirus B3-induced cardiac fibrosis[J]. PLoS One, 2013,8(9):e74955.

(本文编辑 范睿心 厉建强)