

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.24.013

健脾补肾益气方对实验性自身免疫性重症肌无力模型小鼠脾脏 Th/Treg 免疫轴及肌群神经肌肉接头 AChR 的影响

张杰^{1,2}, 王家慧^{1,2}, 刘韩彬^{1,2}, 刘如歌^{1,2}, 卫佳豪^{1,2}, 柳雪影^{1,2}, 杨俊红^{1,2}, 高峰³

1. 河南中医药大学第一附属医院, 河南省郑州市金水区人民路 19 号, 450000; 2. 河南中医药大学第一临床医学院; 3. 郑州大学河南医药科学研究院

[摘要] **目的** 从辅助性 T 细胞 (Th)/调节性 T 细胞 (Treg) 免疫轴角度探讨健脾补肾益气方治疗重症肌无力的可能作用机制。**方法** 将 104 只雌性 C57BL/6J 小鼠随机分为空白对照组 (12 只) 与模型组 (92 只)。模型组小鼠皮下注射鼠源性乙酰胆碱受体 (AChR)- α 亚基 97-116 肽段、磷酸缓冲液 (PBS)、弗氏完全佐剂 (CFA) 混合而成的免疫乳剂制备实验性自身免疫性重症肌无力 (EAMG) 小鼠模型。将造模成功的 65 只小鼠随机分为模型对照组, 健脾补肾益气方低、中、高剂量组, 强的松组, 每组 13 只。健脾补肾益气方低、中、高剂量组给药剂量分别为 7.46、14.92、29.84 g $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹, 强的松组给予强的松片 9.10 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹, 空白对照组和模型对照组给予 0.9% 氯化钠溶液 0.30 ml。各组每日灌胃 1 次, 连续灌胃 5 周。干预前后记录各组小鼠体重及 Lennon 评分, 采用拉力计测定小鼠抓握力。干预后计算小鼠脾脏和胸腺指数, HE 染色观察胸腺、淋巴结组织形态, 流式细胞术检测脾脏细胞混悬液中辅助性 T 细胞 1 (Th1)、辅助性 T 细胞 2 (Th2)、辅助性 T 细胞 17 (Th17)、调节性 T 细胞 (Treg)、滤泡辅助性 T 细胞 (Tfh) 百分比, 免疫荧光法检测小鼠肌群神经肌肉接头 (NMJ) 上的 AChR 形态, ELISA 法检测血清乙酰胆碱受体抗体 (AChR-Ab)、白细胞介素 6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平。**结果** 与模型对照组比较, 强的松组小鼠体重、Lennon 评分、胸腺指数、脾脏指数、淋巴结生发中心个数、Treg 百分比、血清 AChR-Ab 及 TNF- α 均降低, 抓握力、胸腺皮质髓质面积比、眼肌 AChR 面积比及 IL-6 水平均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 健脾补肾益气方各剂量组淋巴结生发中心个数及 Th17、Tfh 百分比均降低, 抓握力及多肌群的 AChR 面积比升高, 中、高剂量组 Th1 百分比及 AChR-Ab、TNF- α 水平降低, 高剂量组 Lennon 评分、IL-6 水平降低, 胸腺皮质髓质面积比、Treg 百分比升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与强的松组比较, 健脾补肾益气方各剂量组体重、胸腺指数均升高, Th2、Th17、Tfh 百分比及 IL-6 均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 低、中剂量组 Lennon 评分、淋巴结生发中心个数升高, 中、高剂量组 Treg 百分比升高而 Th1 百分比降低, 各剂量组对不同肌群 AChR 面积比有升高作用 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 健脾补肾益气方可通过调控 Th/Treg 免疫轴重塑免疫微环境, 增加肌群 AChR 表达, 从而改善 EAMG 小鼠肌无力症状。

[关键词] 重症肌无力; 健脾补肾益气方; 辅助性 T 细胞; 调节性 T 细胞; 乙酰胆碱受体; 免疫微环境

重症肌无力 (myasthenia gravis, MG) 是由抗

体介导累及神经肌肉接头 (neuromuscular junction, NMJ) 的自身免疫性疾病^[1], 在我国其发病率及重症化病死率呈持续上升趋势^[2]。现有胆碱酯酶抑制剂和免疫疗法虽能缓解症状^[3], 但存在感染风险增加和药物耐受性下降等临床局限性。在 MG 的免疫发病机制中, CD4⁺T 淋巴细胞亚群辅助性 T 细胞

基金项目: 国家重大疑难疾病中西医临床协作项目 (ZDYN-2024-A-157); 河南省重点研发与推广专项 (232102311196); 河南中医药大学“双一流”创建工程中医学科项目 (HSRP-DFCTCM-2023-1-27); 河南省卫生健康委员会国家中医药传承创新中心联合共建科研专项 (2024ZXZX1033)

✉ 通讯作者: 13838119371@163.com

(Th) 的功能紊乱与调节性 T 细胞 (Treg) 的失能扮演着核心角色^[4-5], 二者深度参与 NMJ 处高亲和力的致病性乙酰胆碱受体抗体 (acetylcholine receptor antibody, AChR-Ab) 的形成和炎症反应发生, Th/Treg 免疫轴平衡的破坏是驱动 AChR-Ab 等自身抗体产生、补体激活及最终导致 NMJ 功能结构破坏的关键环节^[6], 提示靶向调控 CD4⁺T 细胞亚群分化、重塑免疫炎症微环境是干预 MG 的重要切入点。

中医学将 MG 归属于“痿证”“睑废”等范畴, 其核心病机责之于脾肾亏虚, 尤以脾虚气陷、肾精不足、元气亏虚为关键, 因此治疗强调补益脾肾、升阳举陷、填精益髓以恢复正气^[7-8]。健脾补肾益气方是第四批全国老中医药专家学术经验继承工作指导老师李发枝的临床经验方, 该方由补中益气汤与龟鹿二仙胶化裁而成, 具有健脾补肾、填精益髓功效。前期临床研究^[9-10]发现, 该方能减轻脾肾亏虚型 MG 患者临床症状, 且可降低 AChR-Ab 水平、改善 NMJ 功能。本研究基于 Th/Treg 免疫轴探究健脾补肾益气方治疗 MG 的可能作用机制, 旨在为其临床应用提供实验支撑。本实验方案通过河南省医药科学研究院动物实验中心伦理委员会批准, 伦理审查编号: 2024-YYY-024。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 C57BL/6J 雌性小鼠 104 只, 5~6 周龄, 体质量 (15±2) g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (京) 2019-0008。饲养于河南省医药科学研究院动物实验中心, 实验动物使用许可证号: SYXK (豫) 2021-0017。饲养中心 12 h 光照/12 h 黑暗循环交替, 温度 (24±1) °C, 湿度 45%~60%, 适应性喂养 1 周。

1.2 药物

健脾补肾益气方组成: 黄芪 30 g, 党参 15 g, 当归 10 g, 升麻 10 g, 北柴胡 10 g, 龟甲胶 10 g, 鹿角胶 20 g, 炙甘草 10 g。黄芪、党参、当归、升麻、北柴胡、炙甘草货号分别为 231000371、21102831、21092822、21080431、21101182、230705k2, 购自神威药业集团有限公司; 龟甲胶、鹿角胶货号分别为 20110505、20070403, 购自龟鹿药业集团有限公司。所有药物饮片加入适量纯净水煎煮出 200 ml 的水煎液, 浓缩至 75 ml, 浓度为 1.53 g/ml。强的

松片 (5 mg/片) 由天津力生制药股份有限公司提供, 批号: LA23527。

1.3 主要试剂及仪器

鼠源性乙酰胆碱受体 (AChR) - α 亚基 97-116 肽段 (R97-116, 货号: 663154-30-1, 多肽序列: DGDFAIKFTKVLDDYTGHI), 上海淘普生物科技有限公司; 弗氏完全佐剂 (CFA 公司, 货号: GC207003)、4% 多聚甲醛/通用性组织固定液 (货号: G1101)、RPMI 1640 培养基 (货号: G4536), 武汉赛维尔生物科技有限公司; 红细胞裂解液 (货号: 2307003JH), 北京索莱宝科技有限公司; FITC 荧光-抗小鼠-CD4 流式抗体 (货号: 100406)、APC 荧光-抗小鼠-CD25 流式抗体 (货号: 162106)、APC 荧光-抗小鼠-白细胞介素 4 (IL-4) 流式抗体 (货号: 504106)、PE/Cyanine7 荧光-抗小鼠干扰素 γ (IFN- γ) 流式抗体 (货号: 505826)、PE 荧光-抗白介素 17A (IL-17A) 流式抗体 (货号: 506904)、PE/Cyanine7 荧光-抗程序性死亡受体 1 (PD-1) 流式抗体 (货号: 109110)、PerCP/Cyanine5.5 荧光-抗趋化因子 5 (CXCR5) 流式抗体 (货号: 145508)、细胞活性标记染料 (货号: 423106), 安诺伦 (北京) 生物科技有限公司; PE 荧光-抗叉头框蛋白 P3 (FOXP3) 流式抗体 (货号: 12-5773-82)、细胞因子刺激剂 (货号: 00-4975)、固定破膜缓冲液 (货号: 00-55523), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 白细胞介素 6 (IL-6) ELISA 试剂盒 (货号: E-EL-M0044)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) ELISA 试剂盒 (货号: E-EL-M3063), 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; α -银环蛇毒素 (α -BTX, 货号: 00006), 北京博晟思远生物科技有限公司。

SH II -10 拉力计 (南京苏测计量仪器有限公司); MP150 电生理记录仪 (美国 BioPac 公司); Q2048R 高速台式离心机 (大龙兴创实验仪器股份有限公司); FACS Aria III 流式细胞仪 (美国 BD 公司); A-5082 酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); TS100 荧光显微镜 (日本 Nikon 公司)。

1.4 分组、造模及干预方法

将 104 只小鼠采用随机数字表法分为空白对照组 (12 只) 和模型组 (92 只)。模型组小鼠根据文献^[11-12]方法复制实验性自身免疫性重症肌无力 (experimental autoimmune myasthenia gravis, EAMG) 小鼠模型, 将 R97-116、PBS、CFA 按照体积 1:2:2 比例制备成免疫乳剂, 第 1 天分别于小鼠

双侧肩背部两点、双侧足垫两点各皮下注射 50 μ l, 每只 200 μ l。空白对照组小鼠相应位置皮下注射等量不含 R97-116 的 PBS 和 CFA。分别在注射第 31 天、第 61 天进行第 2 次、第 3 次免疫, 方法同前。根据 Lennon 评分^[11]、低频重复神经电刺激 (RNS)^[13] 评估模型。EAMG 模型复制成功标准^[11-13]: 1) Lennon 评分 ≥ 1 分; 2) RNS 的衰减率 (D) $\geq 10\%$, $D = (\text{第 1 波幅} - \text{第 5 波幅}) \div \text{第 1 波幅} \times 100\%$ 。最终模型组成模 65 只, 成模率为 70.7%。

将 65 只成模 EAMG 小鼠按照随机数字表法分为模型对照组, 强的松组, 健脾补肾益气方低、中、高剂量组, 每组 13 只。注射第 75 天开始干预, 根据人与小鼠用药量换算方法^[14], 健脾补肾益气方低、中、高剂量给药剂量分别为 7.46、14.92、29.84 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃, 其中中剂量为临床等效剂量。强的松组给予强的松片 9.10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃。空白对照组和模型组每天灌胃 0.9% 氯化钠溶液 0.30 ml。各组每日灌胃 1 次, 连续灌胃 5 周。

1.5 取材

注射第 112 天, 各组小鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 0.1 ml 麻醉, 眶静脉取血 0.8 ml, 室温静置 1 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3000 r/min 离心 10 min (离心半径 10.8 cm), 取上清于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。小鼠处死后用 75% 乙醇浸泡 5 min, 超净台剥离脾脏、称重、PBS 清洗、研磨、过 70 μm 细胞筛后置于 15 ml 灭菌离心管, 加入 2 ml 红细胞裂解液裂解 10 min, PBS 清洗后重悬成 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 的脾脏细胞悬液备用。剥离小鼠胸腺、淋巴结, 浸入 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 用于后续 HE 染色。剥离小鼠眼肌、咀嚼肌、胸锁乳突肌、三角肌、肋间肌、膈肌、胫前肌, 置于冰上备用。

1.6 观察指标及检测方法

1.6.1 体质量及 Lennon 评分^[11] 记录各组小鼠干预前后体质量及 Lennon 评分。Lennon 评分标准: 0 分, 肌力正常; 1 分, 运动减少, 运动后肌力下降、弓背; 2 分, 运动前即出现肌力下降及运动减少、弓背、震颤、声音嘶哑, 运动后更加明显; 3 分, 明显肌无力, 体质量减轻, 濒死; 4 分, 死亡。症状介于两个分值之间者, 分别计为 0.5、1.5、2.5、3.5 分。

1.6.2 抓握力 采用拉力计测定小鼠干预前后的抓握力。抓住小鼠尾部, 让其四爪紧抓金属笼横栏, 倒悬拖行 50 格使其疲劳, 立即放置在拉力计上, 沿拉力计网格长轴匀速水平缓慢拖拉小鼠, 记

录小鼠疲劳状态下四肢水平方向拉力值。

1.6.3 免疫器官指数 PBS 清洗脾脏和胸腺后去除残液, 置于无菌平皿中分别称重并记录, 脾脏指数 (mg/g) = 脾脏质量 (mg) $\div$ 小鼠体质量 (g), 胸腺指数 (mg/g) = 胸腺质量 (mg) $\div$ 小鼠体质量 (g)。

1.6.4 HE 染色观察胸腺、淋巴结组织形态 将小鼠胸腺、淋巴结置于 EP 管中, 4% 多聚甲醛固定 24 h 后, 采用随机数字表法选取 3 只小鼠的胸腺和淋巴结进行脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、贴片、烤片、脱蜡、HE 染色、脱水透明、封片, 荧光显微镜下观察胸腺、淋巴结形态, 并采用 Image J 1.54f 计算胸腺皮质髓质面积比和淋巴结生发中心个数。

1.6.5 流式细胞术检测脾脏细胞混悬液中 Th/Treg 轴相关因子百分比 管 1 取 0.1 ml 的脾脏细胞悬液, 加入细胞因子刺激剂, CO_2 培养箱中培养 4~6 h, 分别进行 CD4、细胞活性标记染料, 固定破膜, IL-4、IL-17、IFN- γ 染色后, 染色缓冲液重悬上机。管 2 取 0.1 ml 脾脏细胞悬液, 分别进行 CD4、CD25、PD-1、CXCR5 细胞活性标记染料, 固定破膜, FOXP3 染色后, 染色缓冲液重悬上机, 检测辅助性 T 细胞 1 (Th1)、辅助性 T 细胞 2 (Th2)、辅助性 T 细胞 17 (Th17)、调节性 T 细胞 (Treg)、滤泡辅助性 T 细胞 (Tfh) 百分比。采用随机数字表法, 空白对照组选取 6 只、其他各组选取 7 只小鼠进行检测。

1.6.6 免疫荧光法检测小鼠肌群 NMJ 上的 AChR 形态 采用随机数字表法每组选取 3 只小鼠眼肌、咀嚼肌、胸锁乳突肌、三角肌、肋间肌、膈肌、胫前肌, 剥离肌丝、4% 多聚甲醛固定、0.5% 曲拉通 X-100 通透、5% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭、 α -BTX (1:1000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 荧光显微镜下观察 AChR 形态, 并使用 Image J 1.54f 计算 AChR 面积比。

1.6.7 ELISA 法检测血清 AChR-Ab、IL-6 和 TNF- α 含量 严格按 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 制作标准曲线, 按照空白对照孔吸光度 (OD) 值计算含量。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 23.0 和 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD 检验或 Tamhane's T° 检验; 不符合正态分布的计量资料以中位数 (上下四分位

数) [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示, 组间比较采用非参数检验中的 Kruskal-Wallis 检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠干预前后体质量、抓握力和 Lennon 评分比较

表 1 示, 干预前, 与空白对照组比较, 模型对照组小鼠体质量差异无统计学意义 ($P>0.05$), 抓握力降低、Lennon 评分升高 ($P<0.01$)。干预后, 与空白对照组比较, 模型对照组小鼠体质量差异无统计学意义 ($P>0.05$), 抓握力降低、Lennon 评分升高 ($P<0.01$); 与模型对照组比较, 强的松组小鼠体质量降低, 强的松组和健脾补肾益气方低、中、高剂量组小鼠抓握力升高, 强的松组和健脾补肾益气方高剂量组小鼠 lennon 评分降低 ($P<0.01$); 与强的松组比较, 健脾补肾益气方低、中、高剂量组体质量升高, 健脾补肾益气方低、中剂量组抓握力降低, Lennon 评分升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.2 各组小鼠免疫器官指数比较

表 2 示, 与空白对照组比较, 模型对照组小鼠胸腺指数差异无统计学意义 ($P>0.05$), 脾脏指数升高 ($P<0.05$)。与模型对照组比较, 强的松组胸腺指数、脾脏指数降低 ($P<0.01$), 健脾补肾益气方低、中、高剂量组胸腺指数差异无统计学意义 ($P>0.05$), 健脾补肾益气方低、中剂量组脾脏指数降低 ($P<0.05$)。与强的松组比较, 健脾补肾益气方低、中、高剂量组胸腺指数升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 脾脏指数比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 2 各组小鼠免疫器官指数比较

Table 2 Comparison of immune organ index in each group of mice (mg/g, $\bar{x}\pm s$)			
组别	鼠数	胸腺指数	脾脏指数
空白对照组	12	2.23±0.29	3.63±0.33
模型对照组	13	2.35±0.38	5.03±1.35 ^{a)}
强的松组	13	1.41±0.46 ^{b)}	3.16±0.71 ^{b)}
健脾补肾益气方低剂量组	13	2.21±0.39 ^{d)}	3.49±0.66 ^{c)}
健脾补肾益气方中剂量组	13	2.06±0.61 ^{d)}	3.56±0.54 ^{c)}
健脾补肾益气方高剂量组	13	2.37±0.38 ^{d)}	3.76±0.48

注: a) 与空白对照组比较, $P<0.05$; b) 与模型对照组比较, $P<0.01$; c) 与模型对照组比较, $P<0.05$; d) 与强的松组比较, $P<0.01$ 。

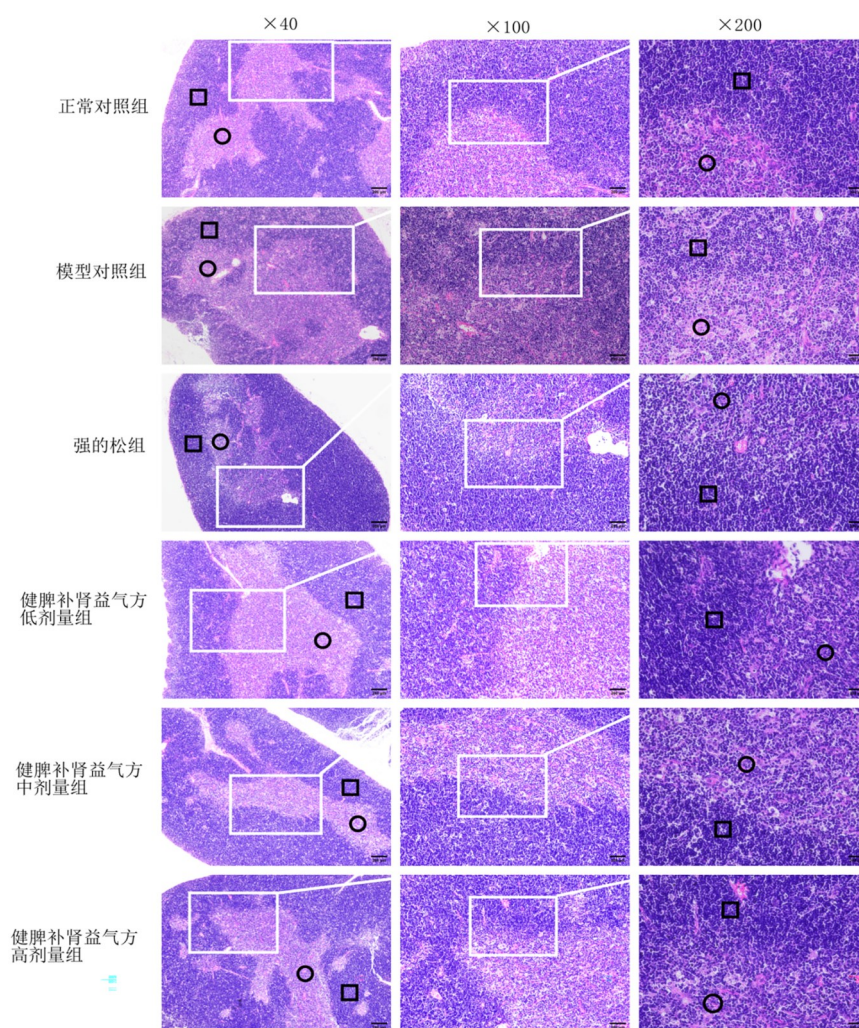
2.3 各组小鼠胸腺、淋巴结组织形态比较

图 1 示, 空白对照组小鼠胸腺皮质、髓质分界清晰, 细胞排列整齐; 与空白对照组比较, 模型对照组小鼠皮质、髓质分界不清, 细胞排列稀疏; 与模型对照组比较, 健脾补肾益气方低、中、高剂量组及强的松组小鼠胸腺皮质、髓质分界相对清晰, 细胞排列整齐紧密。图 2 示, 空白对照组小鼠淋巴结细胞结构完整, 排列有序, 皮质区可见初级淋巴滤泡, 未见次级淋巴滤泡及生发中心形成。与空白对照组比较, 模型对照组小鼠淋巴结细胞结构紊乱, 初级淋巴滤泡增生, 可见次级淋巴滤泡及生发中心形成。与模型对照组比较, 强的松组和健脾补肾益气方低、中、高剂量组小鼠淋巴结少见淋巴滤泡增生。表 3 示, 与空白对照组比较, 模型对照组小鼠胸腺皮质髓质面积比降低, 淋巴结生发中心个数增多 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型对照组比较, 强的松组和健脾补肾益气方高剂量组小鼠皮质髓质面积比升高, 强的松组和健脾补肾益气方低、中、高剂量组淋巴结生发中心个数减少 ($P<0.01$); 与强的松组比较, 健脾补肾益气方低、中

表 1 各组小鼠干预前后体质量、抓握力和 Lennon 评分比较

Table1 Comparison of knee joint Collins scores among rats in each group [($\bar{x}\pm s$) / $M(P_{25}, P_{75})$]							
组别	鼠数	体质量/mg		抓握力/N		Lennon 评分/分	
		干预前	干预后	干预前	干预后	干预前	干预后
空白对照组	12	22.41±0.89	23.17±1.10	153.91±9.92	158.08±7.70	0(0,0)	0(0,0)
模型对照组	13	22.40±0.97	22.68±1.11	112.46±11.18 ^{a)}	115.38±11.41 ^{a)}	1.0(1.0,1.5) ^{a)}	1.0(1.0,1.5) ^{a)}
强的松组	13	22.66±0.95	21.48±1.26 ^{b)}	112.62±9.53	140.38±10.40 ^{b)}	1.0(1.0,1.5)	0.5(0.2,0.5) ^{b)}
健脾补肾益气方低剂量组	13	22.49±0.42	22.85±0.54 ^{d)}	116.92±9.77	131.77±7.94 ^{b)c)}	1.0(1.0,1.2)	0.5(0.5,1.0) ^{c)}
健脾补肾益气方中剂量组	13	22.10±0.55	22.38±0.73 ^{c)}	113.85±11.94	132.85±8.15 ^{b)c)}	1.0(1.0,1.5)	0.5(0.5,1.0) ^{c)}
健脾补肾益气方高剂量组	13	22.88±1.12	23.18±1.03 ^{d)}	112.84±9.15	136.62±6.29 ^{b)}	1.0(1.0,1.5)	0.5(0.5,0.5) ^{b)}

注: a) 与空白对照组同时时间点比较, $P<0.01$; b) 与模型对照组同时时间点比较, $P<0.01$; c) 与强的松组同时时间点比较, $P<0.05$; d) 与强的松组同时时间点比较, $P<0.01$ 。



注：□为胸腺皮质区，○为胸腺髓质区。

图1 各组小鼠胸腺组织形态比较 (HE 染色)

Figure 1 Comparison of histopathological morphology of thymus tissue among different groups of mice (HE staining)

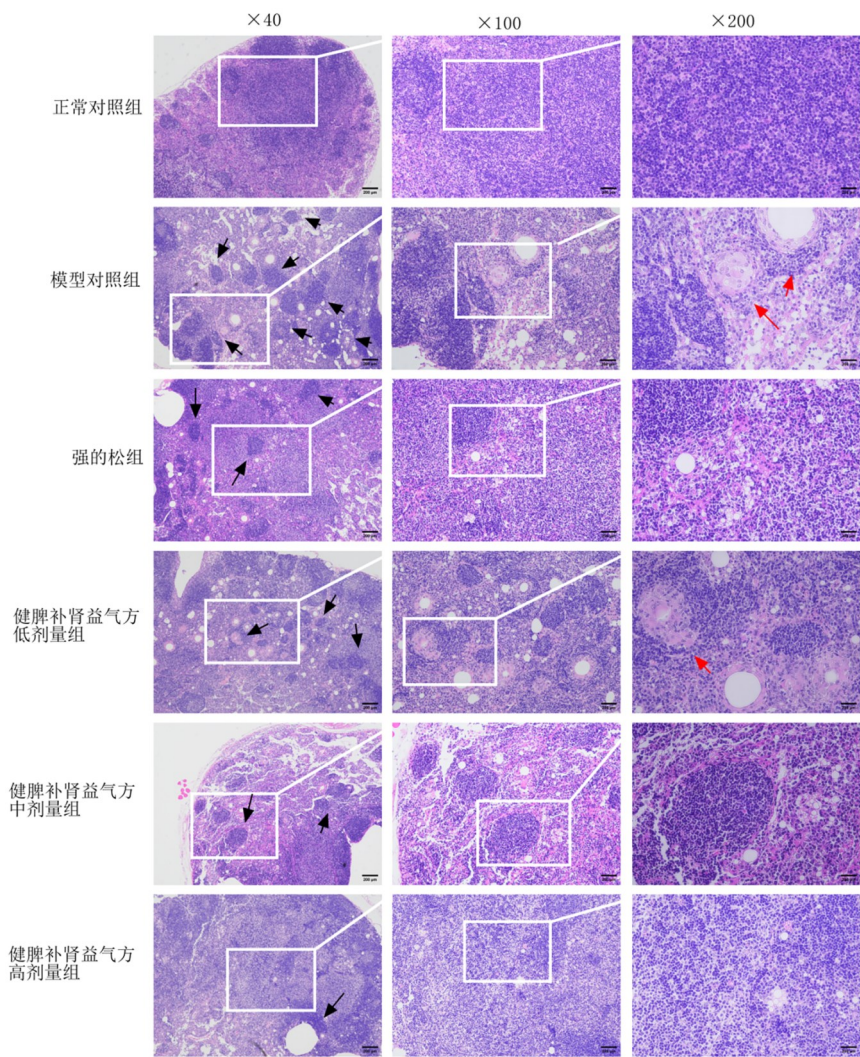
剂量组小鼠淋巴结生发中心个数升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

2.4 各组小鼠脾脏细胞混悬液中 Th1、Th2、Th17、Treg、Tfh 百分比比较

表4示，与空白对照组比较，模型对照组小鼠脾脏 Th1、Th2、Th17、Tfh 百分比升高，Treg 百分比降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型对照组比较，健脾补肾益气方中、高剂量组 Th1 百分比降低，Treg 百分比升高；健脾补肾益气方低、中、高剂量组 Th17、Tfh 百分比降低；强的松组 Treg 百分比降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与强的松组比较，健脾补肾益气方低、中、高剂量组 Th2、Th17、Tfh 百分比降低；健脾补肾益气方中、高剂量组 Th1 百分比降低，Treg 百分比升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.5 各组小鼠肌群 NMJ 上的 AChR 形态比较

图3示，空白对照组小鼠各肌群 NMJ 上的 AChR 形态完整，呈椒盐卷饼状结构；与空白对照组比较，模型对照组小鼠眼肌、胸锁乳突肌、三角肌、胫前肌形态破碎、褶皱结构丧失，咀嚼肌、肋间肌、膈肌形态结构碎片化；与模型对照组比较，各干预组 AChR 形态碎片化均有不同程度改善。表5示，与空白对照组比较，模型对照组眼肌、胸锁乳突肌、三角肌、胫前肌 AChR 面积比降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型对照组比较，强的松组、健脾补肾益气方中剂量组眼肌 AChR 面积比升高；健脾补肾益气方低剂量组三角肌、胫前肌 AChR 面积比升高；健脾补肾益气方高剂量组眼肌、胸锁乳突肌、三角肌、胫前肌 AChR 面积比升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与强的松组比较，健脾补肾益气方低剂量组眼肌、咀嚼肌 AChR 面积比升高；健



注：黑色箭头所指为淋巴滤泡，红色箭头所指为生发中心。

图2 各组小鼠淋巴结组织形态比较（HE染色）

Figure 2 Comparison of histopathological morphology of lymph node tissues among different groups of mice (HE staining)

表3 各组小鼠胸腺皮质髓质面积比、淋巴结生发中心个数比较
Table 3 Comparison of thymic cortical medulla area ratio and number of lymph node germinal centers in each group of mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	胸腺皮质髓质面积比	淋巴结生发中心个数/个
空白对照组	3	3.62±0.18	0.00±0.00
模型对照组	3	1.74±0.11 ^{a)}	26.67±4.51 ^{b)}
强的松组	3	4.62±1.41 ^{c)}	9.33±2.52 ^{c)}
健脾补肾益气方低剂量组	3	2.81±1.03	14.67±2.08 ^{c)} e)
健脾补肾益气方中剂量组	3	3.34±1.07	12.00±2.65 ^{c)} d)
健脾补肾益气方高剂量组	3	4.60±1.55 ^{c)}	10.67±2.08 ^{c)}

注：a) 与空白对照组比较， $P<0.05$ ；b) 与空白对照组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型对照组比较， $P<0.01$ ；d) 与强的松组比较， $P<0.05$ ；e) 与强的松组比较， $P<0.01$ 。

脾补肾益气方中剂量组咀嚼肌AChR面积比升高；健脾补肾益气方高剂量组胸锁乳突肌、胫前肌AChR面积比升高（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）。

2.6 各组小鼠血清AChR-Ab、IL-6、TNF- α 水平比较

表6示，与空白对照组比较，模型对照组小鼠血清AChR-Ab、IL-6、TNF- α 水平升高（ $P<0.01$ ）。与模型对照组比较，强的松组及健脾补肾益气方中、高剂量组小鼠血清AChR-Ab水平降低；强的松组IL-6水平升高、健脾补肾益气方高剂量组IL-6水平降低。强的松组及健脾补肾益气方中、高剂量组TNF- α 水平降低（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）。与强的松组比较，健脾补肾益气方低剂量组AChR-Ab水平升高；健脾补肾益气方低、中、高剂量组IL-6水平降低（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）。

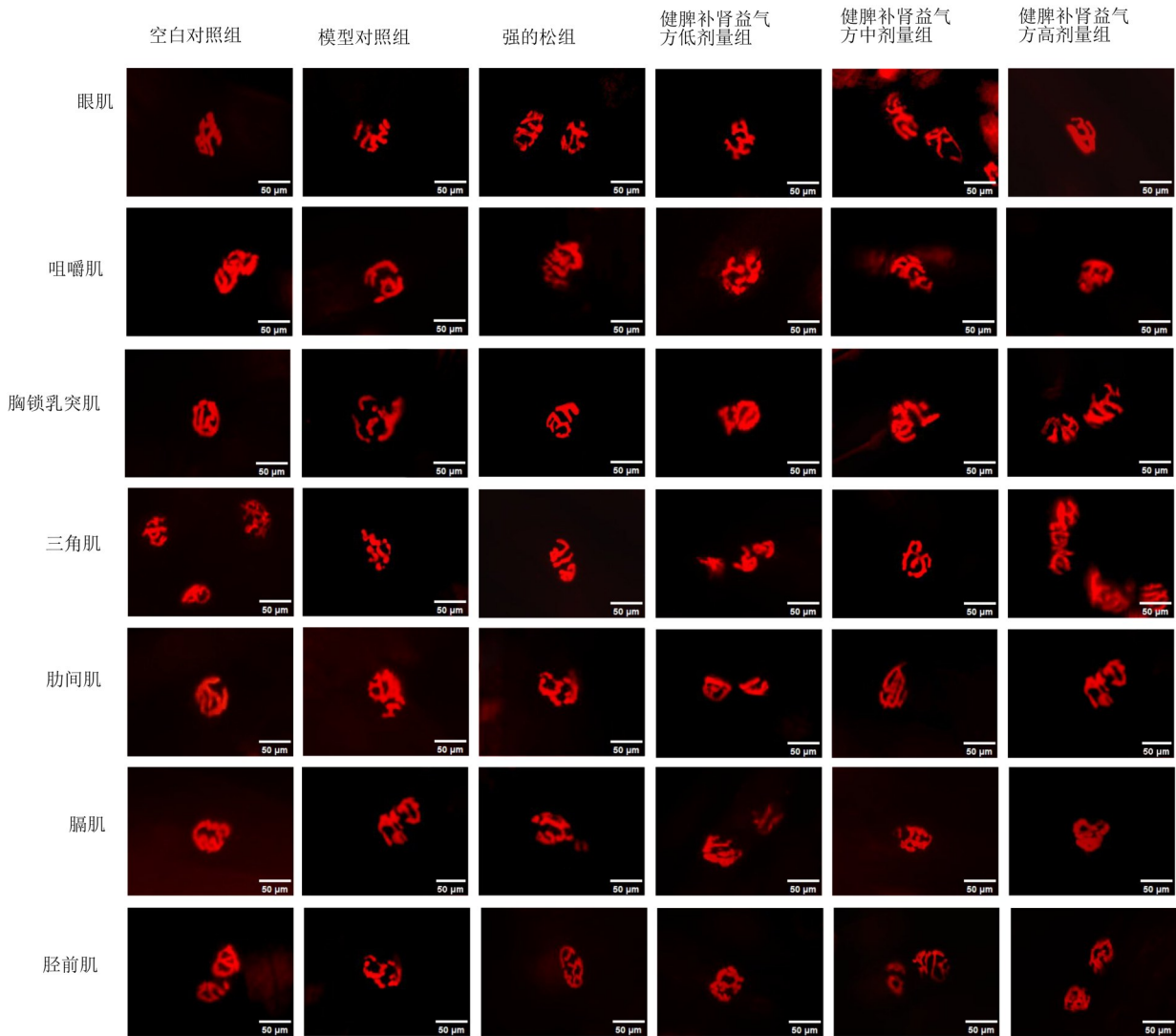
表 4 各组小鼠脾脏细胞混悬液中Th1、Th2、Th17、Treg、Tfh细胞百分比比较

Table 4 Comparison of the percentages of Th1, Th2, Th17, Treg, and Tfh cells in spleen cell suspensions among different groups of mice (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Th1	Th2	Th17	Treg	Tfh
空白对照组	6	0.05±0.04	0.03±0.02	0.11±0.06	16.42±2.59	9.45±3.29
模型对照组	7	3.43±1.11 ^{a)}	0.62±0.22 ^{a)}	1.64±0.65 ^{b)}	7.99±3.06 ^{a)}	18.27±4.21 ^{a)}
强的松组	7	1.84±0.26	0.84±0.47	1.03±0.71	5.02±1.58 ^{c)}	16.53±2.84
健脾补肾益气方低剂量组	7	1.69±0.90	0.26±0.17 ^{f)}	0.53±0.32 ^{d)} ^{e)}	10.36±2.11 ^{f)}	12.56±2.79 ^{d)} ^{e)}
健脾补肾益气方中剂量组	7	1.42±0.59 ^{c)} ^{e)}	0.41±0.16 ^{f)}	0.45±0.18 ^{d)} ^{f)}	14.97±1.21 ^{d)} ^{f)}	13.04±5.49 ^{c)} ^{e)}
健脾补肾益气方高剂量组	7	1.23±0.62 ^{c)} ^{f)}	0.37±0.14 ^{f)}	0.34±0.22 ^{d)} ^{f)}	13.50±2.47 ^{d)} ^{f)}	7.97±3.06 ^{d)} ^{f)}

注：Th1，辅助性T细胞1；Th2，辅助性T细胞2；Th17，辅助性T细胞17；Treg，调节性T细胞；Tfh，滤泡辅助性T细胞。

a) 与空白对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与空白对照组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型对照组比较， $P<0.05$ ；d) 与模型对照组比较， $P<0.01$ ；e) 与强的松组比较， $P<0.05$ ；f) 与强的松组比较， $P<0.01$ 。



注：NMJ，神经肌肉接头；AChR，乙酰胆碱受体。

图 3 各组小鼠肌群 NMJ 上的 AChR 形态比较（免疫荧光染色，×100）

Figure 3 Comparison of AChR morphology at the neuromuscular junctions of muscle groups among different groups of mice (immunofluorescence staining, ×100)

表 5 各组小鼠肌群 NMJ 上的 AChR 面积比较

Table 5 Comparison of the AChR area at the neuromuscular junction in each group of mice's muscle groups (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	眼肌	咀嚼肌	胸锁乳突肌	三角肌	肋间肌	膈肌	胫前肌
空白对照组	3	3.83±0.28	4.28±0.29	3.83±0.44	4.48±0.77	3.79±0.17	3.79±0.22	4.06±0.26
模型对照组	3	2.09±0.21 ^{b)}	2.55±0.45	2.58±0.38 ^{a)}	2.15±0.31 ^{b)}	3.23±0.12	3.56±0.27	2.38±0.34 ^{b)}
强的松组	3	3.33±0.49 ^{e)}	3.67±0.55	2.83±0.54	3.49±0.38	3.52±0.55	3.60±0.16	2.95±0.49
健脾补肾益气方低剂量组	3	2.76±0.39 ^{e)}	2.65±0.37 ^{f)}	3.23±0.37	3.77±0.24 ^{d)}	3.22±0.45	3.74±0.69	3.51±0.86 ^{d)}
健脾补肾益气方中剂量组	3	3.32±0.60 ^{e)}	3.15±0.39 ^{e)}	3.26±0.54	3.12±0.50	3.47±0.20	3.59±0.33	3.18±0.48
健脾补肾益气方高剂量组	3	3.26±0.40 ^{e)}	3.34±0.23	3.60±0.71 ^{d)} ^{e)}	4.54±1.67 ^{e)}	3.63±0.19	3.75±0.36	3.75±0.54 ^{e)} ^{e)}

注：NMJ，神经肌肉接头；AChR，乙酰胆碱受体。
a) 与空白对照组比较， $P<0.05$ ；b) 与空白对照组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型对照组比较， $P<0.01$ ；d) 与模型对照组比较， $P<0.05$ ；
e) 与强的松组比较， $P<0.05$ ；f) 与强的松组比较， $P<0.01$ 。

表 6 各组小鼠血清 AChR-Ab、IL-6、TNF-α 水平比较

Table 6 Comparison of serum levels of AChR-Ab, IL-6, and TNF-α among different groups of mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	AChR-Ab/P·N ⁻¹	IL-6/pg·ml ⁻¹	TNF-α/pg·ml ⁻¹
空白对照组	12	1.00±0.13	110.66±30.75	25.84±9.71
模型对照组	13	3.34±0.53 ^{a)}	343.87±81.97 ^{a)}	124.15±36.14 ^{a)}
强的松组	13	2.27±0.58 ^{b)}	487.21±124.96 ^{c)}	78.76±22.35 ^{c)}
健脾补肾益气方低剂量组	13	2.71±0.76 ^{d)}	319.22±93.01 ^{e)}	88.85±23.19
健脾补肾益气方中剂量组	13	2.50±0.52 ^{b)}	300.76±66.97 ^{e)}	80.34±19.51 ^{c)}
健脾补肾益气方高剂量组	13	2.25±0.56 ^{b)}	242.54±43.93 ^{c)} ^{e)}	80.84±26.36 ^{e)}

注：AChR-Ab，乙酰胆碱受体抗体；IL-6，白细胞介素 6；TNF-α，肿瘤坏死因子 α。
a) 与空白对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型对照组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型对照组比较， $P<0.05$ ；d) 与强的松组比较， $P<0.05$ ；
e) 与强的松组比较， $P<0.01$ 。

3 讨论

临床上 MG 患者主要分为眼肌型重症肌无力（oMG）和全身型重症肌无力（gMG）两大类，其中 oMG 主要表现为上眼睑下垂，复视等，部分患者可进展为 gMG，出现任意骨骼肌无力，该病具有晨轻暮重、休息后缓解的特点^[1]。MG 的发病多与脾肾有关。脾主肌肉、主四肢，为后天之本、气血生化之源，脾气脾阳充盛，可正常运化水谷精微以滋养脏腑。肾藏精、主骨生髓，乃先天之本，为五脏之根，肾精充足则筋骨、肌肉强健。痿证常因脾虚致气血生化不足，久病及肾，肾精虚衰，气阴耗伤、元阳受损，渐成重症肌无力危象^[15-16]。基于治病求本原则，扶正固本、补脾强肌、补肾益髓成为 MG 中医治疗的基本法则^[17-18]。健脾补肾益气方中君以黄芪重在健脾益气、升举清阳而固脱；臣以龟甲胶、鹿角胶滋肾填精、温补肾阳、健壮筋骨；佐以党参、当归，党参善补中焦之气以充养全身，当归长于滋养营血以调和经脉，又佐入少许升麻、北柴胡以升提阳气，与君药协同增效；使以炙甘草补益脾气、调和诸药。诸药合用，其奏健脾补肾、填精益髓功效。

本研究以 EAMG 小鼠为研究对象，通过设置健脾补肾益气方低、中、高剂量组及强的松组，从行为学、免疫功能、NMJ 结构等多维度开展研究，验证了该方改善 EAMG 的效应，明确了不同剂量与强的松的疗效差异及独特优势，为临床应用提供实验依据。行为学指标中抓握力和 Lennon 评分是评估 EAMG 小鼠肌无力症状的核心标准，而体质量变化则直观反映药物安全性。研究结果显示，强的松组虽能显著提升小鼠抓握力、降低 Lennon 评分，但体质量降低明显，这与糖皮质激素干扰代谢、抑制机体营养吸收的副作用密切相关^[19]。与之相比，健脾补肾益气方低、中、高剂量组均呈现体质量良性升高，规避了强的松类糖皮质激素常见的体质量下降不良反应，安全性优势显著。疗效方面，该方呈剂量梯度特征，低、中剂量组抓握力提升及 Lennon 评分降低幅度不及强的松组；高剂量组 Lennon 评分与强的松组无显著差异，说明抓握力提升效果趋近强的松，兼具疗效与安全性，契合临床对疗效与耐受度的双重需求。

胸腺与脾脏为核心免疫器官，其指数及结构状态直接反映免疫稳态，亦是 MG 中枢与外周免疫异常的关键靶点。强的松组干预后胸腺指数显著降

低,结合胸腺组织切片结果,系糖皮质激素诱导胸腺细胞凋亡、抑制增殖导致胸腺萎缩,虽能抑制异常免疫反应,但破坏了胸腺中枢免疫耐受建立功能^[20]。健脾补肾益气方各剂量组均未出现胸腺指数下降,且能改善胸腺皮质与髓质分界不清的病理状态,其中高剂量组对胸腺皮质髓质面积比的升高效果与强的松组相当,实现了胸腺结构异常纠正与生理功能保留的统一,为其区别于强的松的重要特征。脾脏功能调节方面,强的松组抑制作用较强,该方低、中剂量组可显著降低异常升高的脾脏指数,高剂量组维持脾脏指数稳定,这种非典型剂量-效应关系体现了中药双向调节的特点,低、中剂量通过抑制脾脏异常免疫细胞增殖减轻免疫负荷,高剂量则触发机体代偿机制维持免疫平衡。淋巴结病理改善上,强的松组与健脾补肾益气方各剂量组均能抑制淋巴滤泡增生,但该方低、中剂量组淋巴结生发中心个数仍高于强的松组,仅高剂量组与强的松组无显著差异,提示高剂量对中枢耐受与外周免疫应答的调控能力达强的松水平,低、中剂量在抑制外周免疫过度活化方面稍弱于强的松。

CD4⁺T 细胞亚群失衡是 EAMG 发病核心机制, Th1、Th17 等促炎细胞与 Treg 细胞比例失衡及 Tfh 细胞异常活化,直接推动 B 细胞产生大量 AChR-Ab^[4]。研究结果显示,强的松组未提高 Treg 细胞比例,反而使其进一步降低,存在长期使用导致免疫功能紊乱的潜在风险。对比发现,健脾补肾益气方各剂量组重塑免疫微环境能力更优,且中、高剂量效应显著,低剂量组可降低 Th17、Tfh 细胞比例,中、高剂量组在此基础上,还能显著降低 Th1 细胞比例并升高 Treg 细胞比例。与强的松组相比,该方所有剂量组均能降低 Th2、Th17、Tfh 细胞比例,中、高剂量组对 Th1 的抑制和 Treg 的提升作用尤为突出。这表明该方并非单纯抑制免疫细胞活性,而是通过重塑 CD4⁺T 细胞亚群平衡逆转免疫偏移,中、高剂量调节作用更全面,可从源头抑制 Tfh 介导的生发中心形成和 B 细胞活化,其机制较强的松单纯免疫抑制更适用于 MG 这类免疫紊乱性疾病。

NMJ 的 AChR 结构完整度是维持神经肌肉传导的关键^[1],血清 AChR-Ab、IL-6、TNF- α 异常升高可直接损伤 NMJ 结构。AChR 修复方面,强的松组仅提升眼肌 AChR 面积比,而健脾补肾益气方各剂量组展现多肌群靶向修复能力,且与强的松组相比,低剂量组在眼肌、咀嚼肌,中剂量组在咀嚼肌,高剂量组在胸锁乳突肌、胫前肌的 AChR 面积

比提升更显著,体现该方对不同部位 NMJ 修复的剂量特异性优势。炎症因子与抗体调控上,强的松组虽能降低 AChR-Ab 和 TNF- α 水平,但导致促炎因子 IL-6 升高,可能加重局部炎症损伤;健脾补肾益气方高剂量组可同步降低 AChR-Ab、IL-6 和 TNF- α 水平,中剂量组有效降低 AChR-Ab 和 TNF- α ,仅低剂量组 AChR-Ab 水平高于强的松组。可见该方高剂量炎症调控全面性优于强的松,中剂量次之,低剂量虽抗体抑制作用稍弱,但规避了强的松升高 IL-6 的弊端。

综上所述,健脾补肾益气方通过多途径、多靶点发挥治疗作用:一方面可调节 Th/Treg 免疫轴平衡,抑制 Tfh 细胞与 B 细胞交互及抗体生成,降低炎症因子水平;另一方面可直接修复 NMJ 结构,改善肌肉收缩功能。健脾补肾益气汤与强的松相比在症状改善、免疫调节及安全性方面表现出较优的综合效应,提示其作为临床潜在应用剂型的参考价值。本研究虽从多角度揭示了该方的治疗机制,但仍存在一定局限,如未深入探讨药物具体活性成分及其体内代谢过程,信号通路研究尚不系统。未来可结合网络药理学、蛋白组学等技术进一步解析其分子靶点,并开展长期临床随访研究,为推动中药新药研发提供更充分依据。

参考文献

- [1] GILHUS NE, TZARTOS S, EVOLI A, et al. Myasthenia gravis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5: 30. doi: 10.1038/s41572-019-0079-y.
- [2] CHEN JS, TIAN DC, ZHANGC, et al. Incidence, mortality, and economic burden of myasthenia gravis in China: a nationwide population-based study [J]. Lancet Reg Health West Pac, 2020, 5: 100063. doi:10.1016/j.lanwpc.2020.100063.
- [3] 常婷. 中国重症肌无力诊断和治疗指南(2020 版) [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2021, 28(1): 1-12.
- [4] KAMINSKI HJ, SIKORSKI P, CORONEL SI, et al. Myasthenia gravis: the future is here [J]. J Clin Invest, 2024, 134(12): e179742.
- [5] UZAWA A, KUWABARA S, SUZUKI S, et al. Roles of cytokines and T cells in the pathogenesis of myasthenia gravis [J]. Clin Exp Immunol, 2021, 203(3): 366-374.
- [6] ZHANG GX, XIAO BG, BAKHIET M, et al. Both CD4⁺ and CD8⁺ T cells are essential to induce experimental autoimmune myasthenia gravis [J]. J Exp Med, 1996, 184(2): 349-356.
- [7] 盛昭园, 沈洁, 董云, 等. 重症肌无力中西医结合全程管

- 理模式专家共识[J]. 上海中医药杂志, 2024, 58(S1): 55-61.
- [8] 吕志国, 王健, 徐鹏, 等. 基于专家共识法的重症肌无力中医证候筛选研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2017, 19(1): 1-6.
- [9] 周亚博. 龟鹿胶联合督灸治疗脾肾两虚型重症肌无力临床疗效观察[D]. 郑州: 河南中医药大学, 2022.
- [10] 吴新新. 龟鹿胶治疗脾肾两虚型重症肌无力患者的临床评价研究[D]. 郑州: 河南中医药大学, 2023.
- [11] THEISSEN L, SCHROETER CB, HUNTEMANN N, et al. Recombinant acetylcholine receptor immunization induces a robust model of experimental autoimmune myasthenia gravis in mice[J]. Cells, 2024, 13(6): 508.
- [12] YOU A, LIPPENS LS, FAYET OM, et al. Development of a refined experimental mouse model of myasthenia gravis with anti-acetylcholine receptor antibodies [J]. Front Immunol, 2025, 16: 1521382. doi:10.3389/fimmu.2025.1521382.
- [13] TUZUN E, BERRIH-AKNIN S, BRENNER T, et al. Guidelines for standard preclinical experiments in the mouse model of myasthenia gravis induced by acetylcholine receptor immunization[J]. Exp Neurol, 2015, 270: 11-17. doi:10.1016/j.expneurol.2015.02.009.
- [14] 熊远珍. 实验动物与人用药量的新换算[J]. 江西医学院学报, 1997, 37(4): 41.
- [15] 路芳梅, 许玉珉, 徐红彩, 等. 马云枝宗“因脏腑之性而治”论治重症肌无力经验介绍[J]. 新中医, 2023, 55(4): 208-212.
- [16] 甘竞颐, 谢道俊, 方名胜, 等. 谢道俊教授治疗眼肌型重症肌无力临证经验[J]. 中国医药科学, 2023, 13(1): 95-98.
- [17] 徐鹏, 张艺缤, 吕志国, 等. 基于数据挖掘的中医药治疗重症肌无力用药规律分析[J]. 北京中医药大学学报, 2018, 41(12): 1041-1046, 1051.
- [18] 石昆, 孟宪志, 李苗苗. 基于数据挖掘技术的重症肌无力中医诊疗规律研究进展[J]. 老年医学研究, 2025, 6(5): 15-18.
- [19] FRANCO L M. Shedding light onto the immunometabolic effects of glucocorticoids [J]. Nature reviews Rheumatology, 2024, 20(9): 529-530.
- [20] STREHL C, EHLERS L, GABER T, et al. Glucocorticoids-all-rounders tackling the versatile players of the immune system [J]. Front Immunol, 2019, 10: 1744. doi: 10.3389/fimmu.2019.01744.

Effects of *Jianpi Bushen Yiqi Decoction* (健脾补肾益气方) on Splenic Th/Treg Immune Axis and the Neuromuscular Junction AChR in Muscle Groups in Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis Model Mice

ZHANG Jie^{1,2}, WANG Jiahui^{1,2}, LIU Hanbin^{1,2}, LIU Ruge^{1,2}, WEI Jiahao^{1,2}, LIU Xueying^{1,2}, YANG Junhong¹, GAO Feng³

1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, 450000; 2. The First Clinical Medical College of Henan University of Chinese Medicine; 3. Hennan Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University

ABSTRACT Objective To explore the potential mechanism of *Jianpi Bushen Yiqi Formula* (健脾补肾益气方, JBYF) for myasthenia gravis (MG) from the perspective of the helper T cell (Th)/regulatory T cell (Treg) immune axis. **Methods** A total of 104 female C57BL/6J mice were divided into a blank control group (n=12) and a model group (n=92). Mice in the model group were subcutaneously injected with an immune emulsion composed of mouse-derived acetylcholine receptor (AChR)- α subunit 97-116 peptide segment, phosphate-buffered saline (PBS), and complete Freund's adjuvant (CFA) to establish the experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG) mouse model. A total of 65 successfully modeled mice were further randomly divided into 5 groups (13 mice per group), model control group, low-, medium-, and high-dose JBYF groups, and prednisone group. The low-, medium-, and high-dose JBYF groups were given 7.46, 14.92, and 29.84 g·kg⁻¹·d⁻¹ JBYF, respectively; the prednisone group was given prednisone tablets of 9.10 mg·kg⁻¹·d⁻¹; the blank control group and the model control group were given 0.30 ml of 0.9% sodium chloride solution. All groups received intragastric administration once a day for 5 consecutive weeks. Before and after intervention, the body weight and Lennon score of mice in each group were recorded, and a dynamometer was used to measure the grip strength of mice. After intervention, the spleen and thymus indices were calculated; HE staining was used to observe the histological morphology of the thymus and lymph nodes; flow cytometry was employed to detect the percentages of Th1, Th2, Th17, Treg, and follicular helper T cell (Tfh) in the splenic cell suspension; immunofluorescence was used to observe the morphology of AChR at the neuromuscular junctions (NMJ) of mouse muscle groups; ELISA was used to detect the serum levels of acetylcholine receptor antibody

(AChR-Ab), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor- α (TNF- α). **Results** Compared with the model control group, the prednisone group showed decreases in body weight, Lennon score, thymus index, spleen index, number of lymph node germinal centers, Treg percentage, serum AChR-Ab level, and TNF- α level, as well as increases in grip strength, thymic cortex-medulla area ratio, ocular muscle AChR area ratio, and IL-6 level ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); in all dose groups of JBYF, the number of lymph node germinal centers and the percentages of Th17 and Tfh decreased, while grip strength and AChR area ratio of multiple muscle groups increased; in the medium- and high-dose JBYF group showed decreases in Lennon score and IL-6 level, and increases in thymic cortex-medulla area ratio and Treg percentage ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the prednisone group, all dose groups of JBYF exhibited increases in body weight and thymus index, and decreases in the percentages of Th2, Th17, Tfh, and IL-6 level ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the low- and medium-dose groups of JBYF showed increases in Lennon score and the number of lymph node germinal centers; the medium- and high-dose groups of JBYF had an increase in Treg percentage and a decrease in Th1 percentage; all dose groups of JBYF exerted an elevating effect on the AChR area ratio of different muscle groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** JBYF can reshape the immune microenvironment by regulating the Th/Treg immune axis and increase the expression of AChR in muscle groups, thereby improving the myasthenic symptoms of EAMG mice.

Keywords myasthenia gravis; *Jianpi Bushen Yiqi Decoction* (健脾补肾益气方); helper T cells; regulatory T cells; acetylcholine receptor; immune microenvironment

(收稿日期: 2025-07-04; 修回日期: 2025-08-10)

[编辑: 侯建春]

(上接第 2577 页)

***Zipi Zengye Formula* (滋脾增液方) for the Treatment of Functional Constipation with Deficiency of Both *Qi* and *Yin*: A Randomised Controlled**

JIN Xingtao, LU Hong, QU Yin, FANG Chenyang, YANG Min, CAO Weiwei, TANG Huili, YU Lingjie, ZHANG Junyang, ZHENG De

Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200021

ABSTRACT **Objective** To evaluate the therapeutic effects and safety of *Zipi Zengye Formula* (滋脾增液方, ZZF) on functional constipation with deficiency of both *qi* and *yin*. **Methods** A total of 74 patients with functional constipation and deficiency of *qi* and *yin* syndrome were randomly divided into a treatment group and a control group, with 37 cases in each group. The treatment group received ZZF granules orally, 60 g per dose, twice a day, while the control group received lactulose oral solution, 15 ml per dose, twice a day. The treatment course for both groups was 4 weeks. Changes in the total constipation symptom score, traditional Chinese medicine (TCM) syndrome score before treatment and on day 7, 14, 21, and 28 of treatment, as well as the Gastrointestinal Quality of Life Index (GIQLI) score before and on day 7 and 28 were observed; the clinical efficacy and safety outcomes of the two groups were compared. **Results** The total clinical effective rate in the treatment group (94.59%, 35/37) was significantly higher than that in the control group (75.68%, 28/37, $P < 0.05$). The total constipation symptom scores and TCM syndrome scores of both groups decreased on day 7, 14, 21, and 28 of treatment ($P < 0.05$). On day 21 and 28, the treatment group had significantly lower total constipation symptom score than the control group ($P < 0.01$). TCM syndrome scores on day 14, 21 and 28 in the treatment group were lower than those in the control group ($P < 0.01$). After treatment, the GIQLI scores in both groups on day 7 and 28 increased, with higher scores in the treatment group than in the control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** ZZF demonstrates significant clinical benefits for *qi-yin* deficiency functional constipation by alleviating constipation symptoms, and can improve TCM syndrome, enhance quality of life with safety.

Keywords functional constipation; deficiency of *qi* and *yin*; *Zipi Zengye Formula* (滋脾增液方); traditional Chinese medicine syndrome; quality of life; randomized controlled trial

(收稿日期: 2025-06-14; 修回日期: 2025-09-30)

[编辑: 叶晨]