

二妙散对大鼠骨髓来源的巨噬细胞M1/M2极化的影响

何莲花, 覃清霞, 王晗, 何文成, 王庆文*
(北京大学 深圳医院, 广东 深圳 518036)

[摘要] 目的:探索二妙散(EMS)对脂多糖(LPS)+干扰素(IFN)- γ 诱导大鼠骨髓来源巨噬细胞(Macrophage)M1极化及白细胞介素(IL)-4+IL-13诱导M2极化的影响。方法:体外提取大鼠骨髓来源的单核细胞,加巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF),诱导成巨噬细胞(F4/80标记),加入LPS+IFN- γ ,诱导其向M1型巨噬细胞极化;加入IL-4和IL-13,诱导其向M2型巨噬细胞极化;加入不同浓度二妙散(0.2, 0.4, 0.8 g·L⁻¹)作用后,采用免疫荧光分别检测M1(CD68及iNOS标记)及M2(CD206及Arginase标记)表型,检测二妙散对大鼠骨髓来源的巨噬细胞M1/M2极化的影响。结果:与空白组比较,LPS+IFN- γ 能显著增加M1的极化($P<0.01$),IL-4+IL-13能显著增加M2的极化($P<0.01$);与LPS+IFN- γ /IL-4+IL-13组比较,二妙散(0.2, 0.4, 0.8 g·L⁻¹)作用24 h对LPS+IFN- γ 诱导的M1极化具有明显抑制作用($P<0.05$),对IL-4+IL-13诱导的M2极化没有明显影响。结论:二妙散可抑制LPS+IFN- γ 诱导的M1极化,而对IL-4+IL-13诱导的M2极化没有影响。

[关键词] 二妙散; 类风湿关节炎; 骨髓来源; 巨噬细胞; M1/M2极化

[中图分类号] R2-0;R289;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)11-0071-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200937

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200119.1437.001.html>

[网络出版日期] 2020-1-19 14:54

Effect of Ermiaosan on M1/M2 Polarization of Bone Marrow Derived-macrophages

HE Lian-hua, QIN Qing-xia, WANG Han, HE Wen-cheng, WANG Qing-wen*
(Shenzhen Hospital, Peking University, Shenzhen 518036, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Ermiaosan (EMS) on the polarization of M1 by lipopolysaccharide(LPS)+interferon(IFN)- γ and M2 induced by interleukin(IL)-4+IL-13 in rat bone marrow-derived macrophages. **Method:** Macrophages from rat bone marrow were extracted *in vitro*, stimulated by macrophage colony stimulating factor(M-CSF), induced to macrophages (marked by F4/80), stimulated by LPS+IFN- γ and induced to polarize to M1, while stimulated by IL-4+IL-13 and induced to polarize to M2. After adding different concentrations of EMS (0.2, 0.4, 0.8 g·L⁻¹), the phenotypes of M1 and M2 were detected by immunofluorescence, and the effect of EMS on M1 (marked by CD68 and iNOS)/M2 (marked by CD206 and Arginase) polarization of macrophages from rat bone marrow was detected. **Result:** Compared with control group, LPS + IFN- γ could increase the polarization of M1 ($P<0.01$), while IL-4+IL-13 could increase the polarization of M2 ($P<0.01$); compared with LPS+IFN- γ /IL-4+IL-13 group, EMS (0.2, 0.4, 0.8 g·L⁻¹) could inhibit the polarization of M1 induced by LPS+IFN- γ for 24 hours ($P<0.05$), but had no significant effect on polarization of M2 induced by IL-4+IL-13. **Conclusion:** EMS can inhibit M1 polarization induced by LPS+IFN- γ , but has no effect on M2 polarization induced by IL-4+IL-13.

[Key words] Ermiaosan; rheumatoid arthritis; bone marrow derived; macrophages; M1/M2 polarization

[收稿日期] 20191109(016)

[基金项目] 深圳市科技计划项目(JCYJ20170307112009204);广东省中医药局科研项目(20183011)

[第一作者] 何莲花,博士,助理研究员,从事中药抗类风湿关节炎相关研究,E-mail:helianhua126@126.com

[通信作者] *王庆文,博士,主任医师,硕士生导师,从事风湿免疫病临床工作,E-mail:wqw_sw@163.com

类风湿性关节炎(RA)是一种以慢性滑膜炎并侵蚀软骨,最终导致骨与关节破坏为特征的自身免疫性疾病,因病变呈持续、反复发作过程,致残率高,是临床难治的疾病^[1-2]。RA的早期病变以滑膜炎为主,主要表现为滑膜组织中的大量单核巨噬细胞和淋巴细胞的浸润,分泌大量的炎症细胞因子诱导滑膜组织中血管增生形成血管翳,进而侵蚀软骨和破坏骨组织,最终导致关节畸形和功能丧失^[3]。滑膜炎作为RA发病的始动环节,其发生机制目前尚未完全明确,但滑膜巨噬细胞在其中的作用已被大量的研究所证实^[4-7]。研究发现,活化的滑膜巨噬细胞释放出大量的肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素(IL)-1 β ,IL-6,IL-23等,一方面可促发滑膜炎,另一方面又可作为联络其他淋巴细胞如T辅助细胞(Th)1,Th17及成纤维细胞的纽带或是刺激因子,进一步促进其他炎症因子的产生,进而诱导血管翳的生成和骨关节的破坏等一系列病理反应^[8-10]。此外,滑膜巨噬细胞贯穿于整个关节滑膜层的分布位置也更有利于其发挥介导滑膜炎的作用^[11]。值得关注的是,研究还发现滑膜细胞是目前反映RA疾病严重程度和治疗疗效反应的最可靠生物标记物^[12-13],HARINGMAN等^[14]发现RA患者的滑膜巨噬细胞数量,不仅能反映出关节破坏的程度,还可进行预测RA关节破坏的进展。可见滑膜巨噬细胞在RA滑膜炎疾病过程中具有中心作用,同时还可以作为治疗RA的一个理想靶点。巨噬细胞在不同刺激因素作用下呈现出巨噬细胞极化的现象,即呈现出M1型和M2型巨噬细胞,在RA的疾病发生发展中,处于动态平衡的M1/M2型巨噬细胞会被多种因素打破,引起M1型促炎巨噬细胞增多,加剧炎症反应^[15]。因此,有效干预巨噬细胞向M1型转化,恢复M1/M2的动态平衡,有利于促进炎症的消退。

RA是一类常见免疫系统炎症性疾病,属于中医学“痹证”范畴。中医学治疗RA的经验丰富,中药治疗RA因其疗效好、毒副作用小而备受关注。二妙散原名苍术散,最早见于原代危亦林所著《世医得效方》,金元时期朱丹溪的《丹溪心法》首次将其改名为二妙散,其由苍术和黄柏组成,其具有清热祛湿的作用,用于湿热下注证。《丹溪心法》言:“治筋骨疼痛因湿热者。有气加气药,血虚者加补药,痛甚者加生姜汁,热辣服之。”研究发现,二妙散中的两味组方-黄柏与苍术按不同比例的配伍进行水煎后,主要药效成分含量会有不同差异,同时于干

预RA动物模型的结果显示,黄柏与苍术按1:1配伍时对促炎细胞因子的抑制作用最好^[16-17]。临床和实验研究均显示二妙散具有明确抑制关节炎症的作用,可明显抑制佐剂诱导型关节炎(AA),胶原诱导型关节炎(CIA)模型大鼠的关节肿胀及一系列炎症因子的分泌以达到免疫抑制和抗RA的作用^[16-18],但具体调控机制尚未明确。本研究针对RA重要病理关节,采用骨髓来源的巨噬细胞(BMDM),观察二妙散对BMDM中M1/M2极化的影响。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD大鼠3只,雄性,体质量130~150 g,购自广东省医学实验动物中心,合格证号SCXK(粤)2018-0002。物饲养于深圳北京大学香港科技大学医学中心实验动物中心,采用日光灯照明,空调控温,实验操作符合深圳北京大学香港科技大学医学中心实验动物福利伦理审查委员会标准。

1.2 试剂 二妙散由黄柏和苍术2味中药组成,均购自北京同仁堂,批号分别为73980901,180515009;RPMI 1640培养基(美国Hyclone公司,批号SH30809.01B);噻唑蓝(MTT),脂多糖(LPS)(美国Sigma公司,批号分别为M5655,L2880);磷酸盐缓冲液(PBS)粉末(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号ZLI-9062);胎牛血清(美国Gibco公司,批号16000-044);二甲基亚砜(DMSO,美国Amresco公司,批号67-68-5);防荧光淬灭封片剂(美国SouthernBiotech公司,批号为0100-01);DAPI(美国AAT Bioquest公司,批号1750);重组大鼠IL-4,重组大鼠IL-13,重组大鼠干扰素(IFN)- γ 及重组大鼠巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)(美国PeproTech公司,批号分别为400-04,400-16,400-20,400-28);F4/80抗体,一氧化氮合酶(iNOS)抗体,精氨酸酶(Arginase)抗体及兔抗免疫球蛋白(Ig)G(英国Abcam公司,批号分别为ab100790,ab15323,ab91279,ab150077);CD68及CD206抗体(美国Santa Cruz公司,批号分别为sc-70761,sc-58986);Cy3 Goat Anti-Rabbit IgG(美国ABclonal公司,批号AS007)。

1.3 仪器 TDZ5-WS型低速台式离心机(湖南湘鑫仪器仪表有限公司);XDS-1B型倒置显微镜(重庆光电仪器有限公司);DMI8型倒置荧光显微镜(德国Leika公司);BX50型正置荧光显微镜(日本Olympus公司);SLK-R3000-S型摇床(美国Scilogex公司);MK3型全自动酶标仪及371型二氧化碳培

养箱(美国 Thermo Fisher 公司)。

2 方法

2.1 BMDM 细胞的提取和培养 参考文献 [19-20] 方法, 选取 SPF 级 130~150 g SD 雄性大鼠, 采用脊髓脱臼法处死大鼠, 在 75% 乙醇中浸泡 5 min, 用剪刀从腹部中线剪开, 并斜向下剪开腿部皮肤, 分离双腿, 剔除腿部肌肉组织及其他软组织, 并去掉腓骨, 分离暴露出完整的股骨及胫骨; 浸入 75% 乙醇中 5 min, 预冷无菌 PBS 3 min; 在关节处剪断腿骨; 用 2 mL 注射器吸取无血清的 1640 培养基, 将针头刺入骨髓腔, 反复冲洗骨髓至骨髓变白, 将骨髓冲洗液加入到 50 mL 离心管中, $1\ 000\ r \cdot \min^{-1}$ (离心半径为 12 cm) 离心 5 min; 将离心得到的骨髓细胞用 10 mL 含 M-CSF ($10\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 和含 10% 血清的 1640 培养基重悬, 然后分装到 2 个细胞培养瓶中, 置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 5% CO_2 的培养箱中培养 3 d; 弃上清, 换含 M-CSF ($10\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 和含 10% 血清的 1640 培养基 5 mL 继续培养 4 d。

选取上述原代提取 BMDM 分别采用 LPS $10\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + IFN- γ $20\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行刺激并诱导其向 M1 极化, IL-4 $20\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + IL-13 $20\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行刺激诱导其向 M2 极化。

2.2 二妙散溶液的制备 二妙散由黄柏 15 g, 苍术 15 g 组成, 均购自北京同仁堂药店, 常规方法煎煮, 浓缩成 $1\ \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的母液, 经 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤灭菌, $-20\ ^\circ\text{C}$ 保存备用。

2.3 MTT 比色法检测 BMDM 的增殖活性 取对数生长期的 BMDM, 按 5×10^4 个/mL 的细胞密度, $180\ \mu\text{L}$ /孔接种于 96 孔板, 每组设 4 复孔, 培养过夜, 加或不加浓度为 $10\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 M-CSF, 1 h 后加入二妙散 0.2, 0.4, 0.8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 并设置空白组和空白加二妙散 $0.8\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组, 于 $37\ ^\circ\text{C}$ 5% CO_2 100% 湿度的培养箱内继续培养 24 h, 每孔加入 MTT $20\ \mu\text{L}$, 培养 4 h, 弃上清, 加入 DMSO, 每孔 $150\ \mu\text{L}$, 于 492 nm 测定吸光度 A。

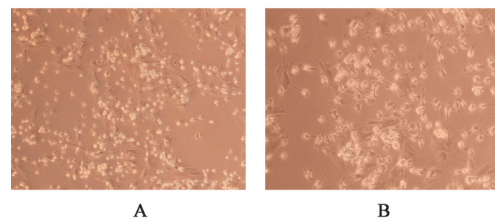
2.4 免疫荧光检测 M1/M2 巨噬细胞极化情况 根据文献报道^[21]并稍作修改进行实验: 取对数生长期的 BMDM, 分别采用 LPS $10\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + IFN- γ $20\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行刺激诱导成 M1, IL-4 $20\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + IL-13 $20\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行刺激诱导 M2; 1 h 后加入二妙散 0.2, 0.4, 0.8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 24 h 后, 弃上清, 95% 乙醇固定 10 min, 滴加适当稀释的 F4/80 (1:100 稀释) $4\ ^\circ\text{C}$ 过夜; PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 滴加适量荧光二抗 (1:400), 室温孵育 2 h, 注意避光。再分别滴加适当稀释的 iNOS

(标记 M1, 1:100)/CD68 (标记 M1, 1:50)/Arginase (标记 M2, $5\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)/CD206 (标记 M2, 1:50), $4\ ^\circ\text{C}$ 过夜; PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 滴加适量荧光二抗 (1:400), 室温孵育 2 h, 注意避光。DAPI 室温孵育 10 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 用免疫荧光防淬灭 (不含 DAPI) 封片; 滴加封片剂于组织中, 5 min 后盖上盖玻片, 盖盖玻片时注意将气泡挤出。正置光学显微镜观察细胞, 每孔随机选取 6~10 个视野拍照并计数。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 16.0 软件进行分析, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

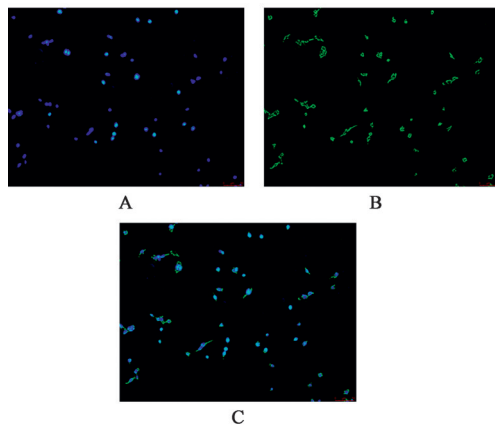
3.1 BMDM 细胞的形态 对原代培养的 BMDM 进行贴壁培养, 细胞传代培养, 实验各间断均在倒置显微镜下观察细胞形态。骨髓来源的单核细胞在 M-CSF 的作用下, 分化为 BMDM, 细胞形态为梭型、圆形或卵圆形“煎蛋样”, 见图 1。免疫荧光检测巨噬细胞的纯度, 大鼠巨噬细胞特异性标志物 F4/80 表达阳性细胞比例达到 99%, 见图 2。



A. $\times 100$; B. $\times 200$

图1 BMDM 的细胞形态(倒置显微镜, $\times 200$)

Fig. 1 Cell morphology of BMDM (inverted microscope, $\times 200$)



A. DAPI; B. F4/80; C. Merge

图2 F4/80⁺巨噬细胞(免疫荧光, $\times 200$)

Fig. 2 F4/80⁺ macrophage (IF, $\times 200$)

3.2 二妙散对 M-CSF 诱导 BMDM 增殖活性的影响 MTT 比色法检测结果如表 1 显示, 与空白组比

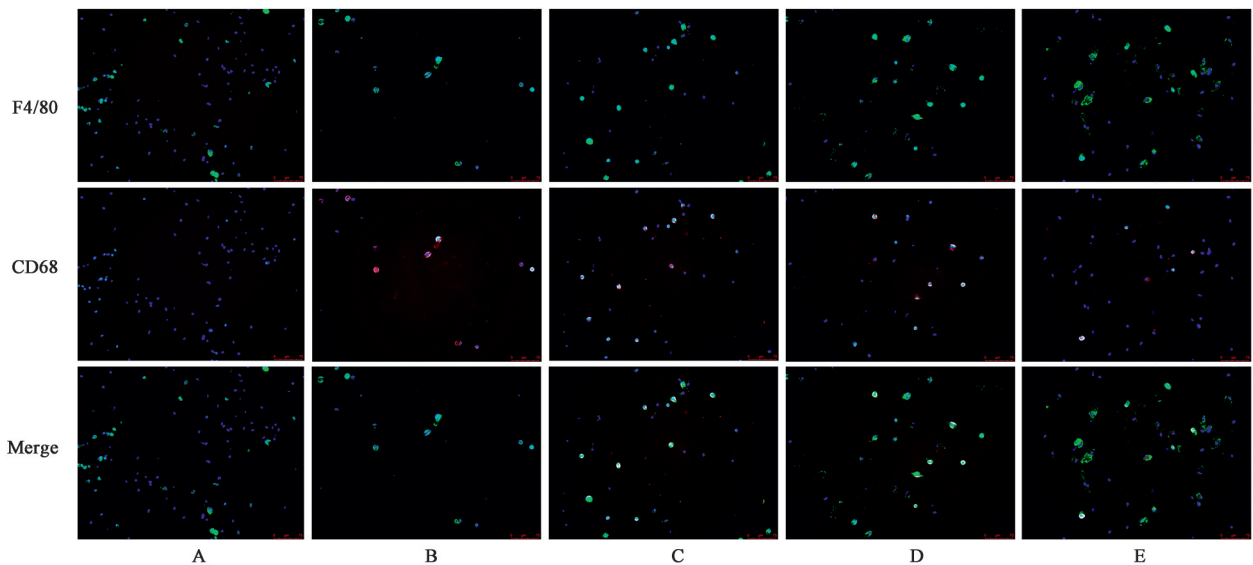
较及与M-CSF组比较,二妙散0.2,0.4,0.8 g·L⁻¹作用24 h对BMDM的增殖活性无明显差异。可见二妙散对BMDM无细胞毒性。

表1 二妙散对M-CSF诱导BMDM增殖活性的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)
Table 1 Effect of EMS on proliferation of BMDM cell induced by M-CSF($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	A
空白	-	1.049±0.167
空白+二妙散	8×10 ⁵	1.002±0.133
M-CSF	10	1.046±0.163
M-CSF+二妙散	10+2×10 ⁵	1.019±0.150
	10+4×10 ⁵	1.077±0.084
	10+8×10 ⁵	1.083±0.151

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与M-CSF组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ 。

3.3 二妙散对LPS+IFN- γ /IL-4+IL-13诱导M1/M2极化的影响 LPS和IFN- γ 诱导的M1型巨噬细胞极化与未分化的M0型巨噬细胞比较,M1型巨噬细胞用其相关的标志蛋白CD68及iNOS标记(均为红色),M0型未分化巨噬细胞用F4/80标记(绿色);IL-4和IL-13诱导的M2型巨噬细胞极化与未分化的M0型巨噬细胞比较,M1型巨噬细胞用其相关的标志蛋白CD206及Arginase标记(均为红色),M0型未分化巨噬细胞用F4/80标记(绿色);与空白组比较,LPS+IFN- γ /IL-4+IL-13组M0型(F4/80⁺)巨噬细胞数目明显增多($P<0.01$);与LPS+IFN- γ 组比较,二妙散0.2,0.4,0.8 g·L⁻¹组M1型(CD68⁺及iNOS⁺)细胞数目减少($P<0.01$),与IL-4+IL-13组比较,M2型(CD206⁺及Arginase⁺)细胞数目无明显变化,提示二妙散显著抑制LPS+IFN- γ 诱导的M1极化,而对IL-4+IL-13诱导的M2没有影响。见图3~6和表2,3。



A. 空白组;B. LPS+IFN- γ 组;C~E. LPS+IFN- γ +二妙散0.2,0.4,0.8 g·L⁻¹组(图4同)

图3 二妙散对LPS+IFN- γ 诱导CD68⁺M1极化的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 3 Effect of EMS on polarization of CD68⁺M1 by LPS+IFN- γ (IF, ×200)

4 讨论

RA是一种难治性自身免疫性疾病,以慢性滑膜炎增生,血管翳形成,并侵蚀软骨,最终导致骨与关节破坏为特征。RA的发病率较高,世界约为0.5%~1%,而我国约0.32%~0.36%。RA好发于25~50岁的青壮年,5~10年的致残率可高达60%,严重危害人类健康和生存质量,也给社会和家庭带来严重的负担^[22]。然而RA的发病机制很复杂至今仍未完全阐明,也无理想的治疗药物。目前的治疗药物中,TNF- α 拮抗剂价格昂贵、需要注射给药,长期应用有诱发癌症的风险,传统的免疫抑制剂,如甲

氨喋呤,由于副作用大,导致患者耐受程度差。在2015年的美国风湿学会(ACR)公布的RA治疗最新策略中,就着重强调在RA确诊的早期应用具有改善病情抗风湿药的重要性。因此,寻找高效、低毒、经济的能真正控制滑膜炎、阻止软骨和骨破坏的“控制疾病的抗风湿治疗”方法已成为RA研究领域的热点和难点。RA的早期病变以滑膜炎为主,主要表现为滑膜组织中的大量单核巨噬细胞和淋巴细胞的浸润,分泌大量的炎症细胞因子(如IL-1, TNF- α 等)诱导滑膜组织中血管增生形成血管翳,进而侵蚀软骨和破坏骨组织,最终导致关

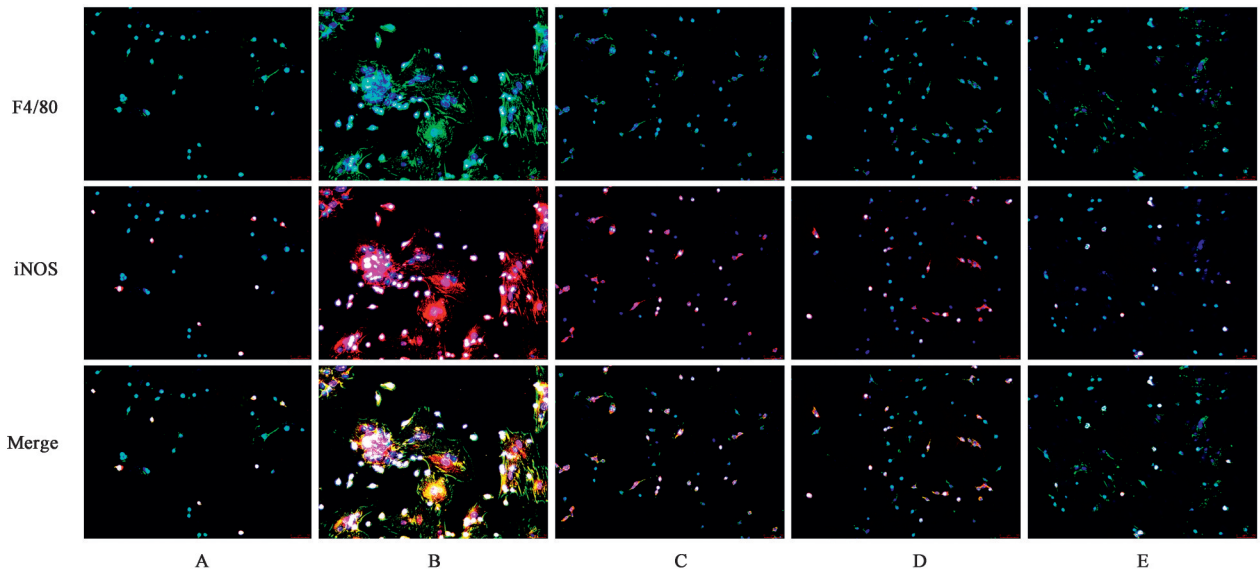
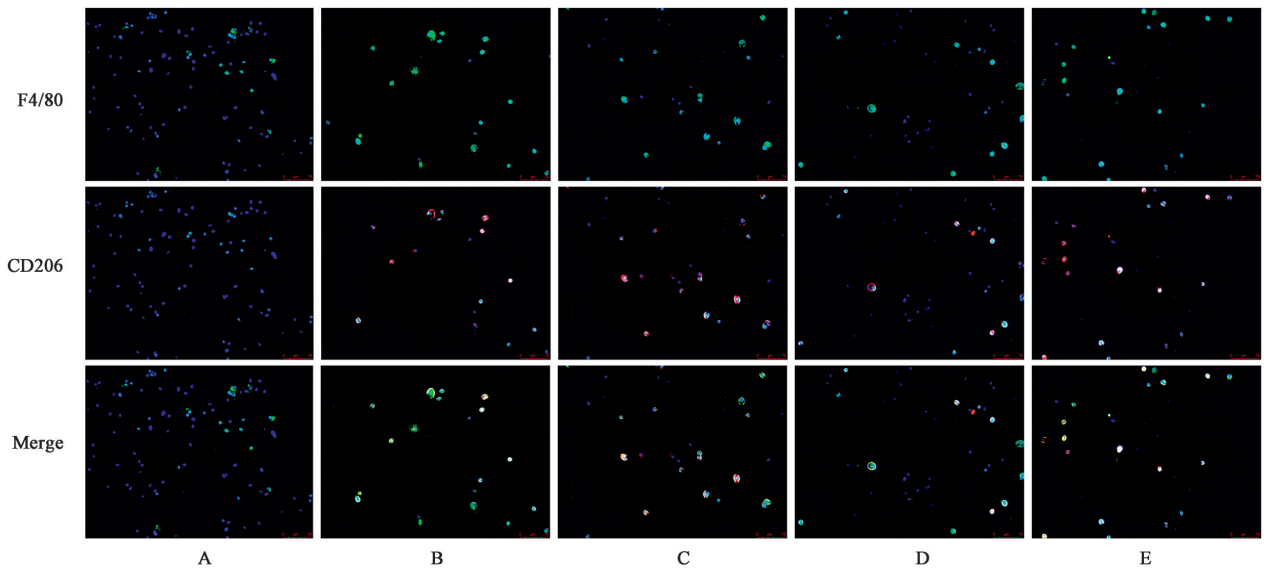


图4 二妙散对LPS+IFN- γ 诱导iNOS⁺M1极化的影响(免疫荧光, $\times 200$)

Fig. 4 Effect of EMS on polarization of iNOS⁺M1 by LPS+IFN- γ (IF, $\times 200$)



A. 空白组; B. IL-4+IL-13组; C~E. IL-4+IL-13+二妙散0.2, 0.4, 0.8 $g \cdot L^{-1}$ 组(图6同)

图5 二妙散对IL-4+IL-13诱导M2极化的影响(免疫荧光, $\times 200$)

Fig. 5 Effect of EMS on polarization of M2 by IL-4+IL-13(IF, $\times 200$)

节畸形和功能丧失^[3]。其中滑膜病变是RA发病机制的关键环节,也是临床治疗的主要靶向。因此,在RA疾病的早期,抑制滑膜炎的发展是治疗RA的关键。虽然RA致病机制还不明确,但已有大量的研究表明,单核细胞/巨噬细胞、中性粒细胞等参与了RA的发生和发展,单核细胞/巨噬细胞可通过分泌大量的炎症细胞因子来维持RA患者的炎症环境以及招募大量的免疫细胞迁移至关节炎,导致关节不可逆的损伤^[23]。巨噬细胞是一类具有异质性、可塑性的免疫细胞^[24],是机体固有免疫系统的重要组成部分之一,具有吞噬、抗原提呈和分泌多种细胞因子的功能,在炎症、防御、修复、代谢等生理过程中

发挥重要作用,同时也是机体维持自身稳定的关键因素,巨噬细胞的这些功能和作用参与RA的致病过程。

RA滑膜巨噬细胞在多种细胞因子和免疫复合物的刺激下可极化为经典活化巨噬细胞(M1型巨噬细胞)和替代性活化巨噬细胞(M2型巨噬细胞),两者极化功能几乎相互拮抗,这两种亚型分别表示促炎和抗炎的两种极端情况;同样的,RA滑膜微环境成分可改变巨噬细胞极化^[25]。巨噬细胞在RA的病理生理学中起着关键作用,且滑膜巨噬细胞浸润与RA患者疾病活动度及治疗效果呈正相关,因此,

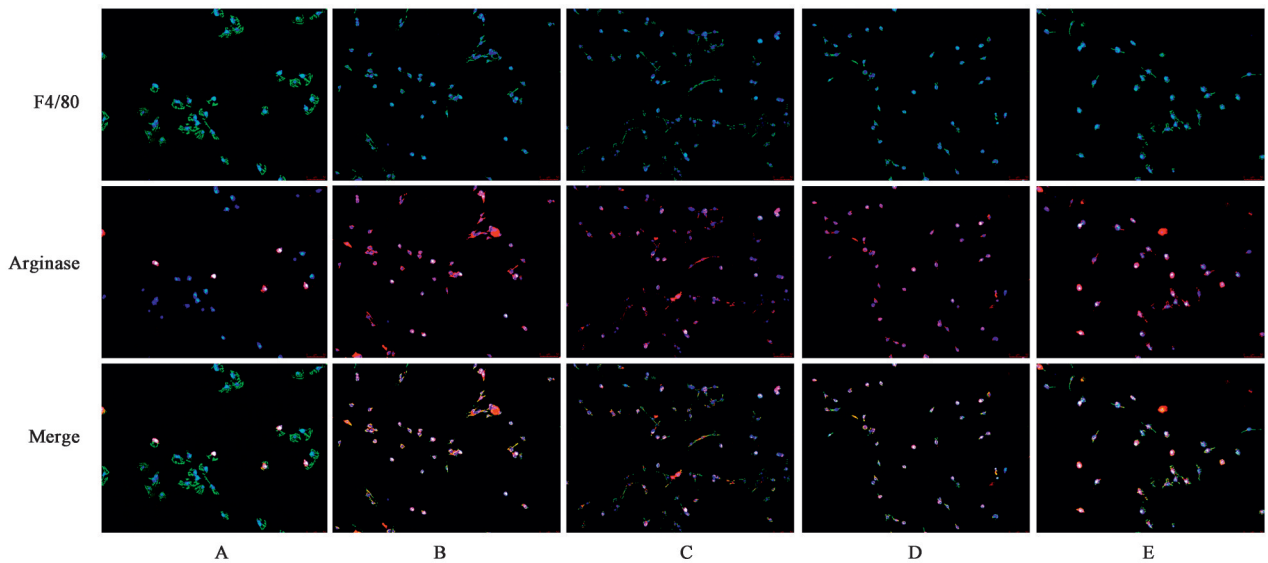


图6 二妙散对IL-4+IL-13诱导Arginase⁺M2极化的影响(荧光显微镜,×200)

Fig. 6 Effect of EMS on polarization of Arginase⁺M2 by IL-4+IL-13(fluorescent microscope,×200)

表2 二妙散对LPS+IFN-γ诱导M1极化的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 2 Effect of EMS on polarization of M1 by LPS+IFN-γ ($\bar{x} \pm s, n=4$) %

组别	质量浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	M1(CD68 ⁺) /M0	M1(iNOS ⁺) /M0
空白	-	41.263±2.541	52.811±3.212
LPS+IFN-γ	10+20	98.135±1.203 ²⁾	97.119±2.885 ²⁾
LPS+IFN-γ+二妙散	10+20+2×10 ⁵	86.346±3.486 ³⁾	87.814±3.568 ³⁾
	10+20+4×10 ⁵	79.348±4.128 ³⁾	85.020±3.883 ³⁾
	10+20+8×10 ⁵	65.368±1.256 ⁴⁾	74.085±2.564 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与LPS+IFN-γ组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ 。

表3 二妙散对IL-4+IL-13诱导M2极化的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 3 Effect of EMS on polarization of M2 by IL-4+IL-13 ($\bar{x} \pm s, n=4$) %

组别	质量浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	M2(CD206 ⁺) /M0	M2(Arginase ⁺) /M0
空白	-	34.127±3.486	55.669±5.824
IL-4+IL-13	20+20	97.026±2.482 ²⁾	98.081±1.933 ²⁾
IL-4+IL-13+二妙散	20+20+2×10 ⁵	97.364±0.476	94.566±0.941
	20+20+4×10 ⁵	98.647±1.056	95.530±3.509
	20+20+8×10 ⁵	97.486±1.185	97.442±1.829

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与IL-4+IL-13组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ 。

巨噬细胞可以作为RA疾病活动和药物传递的重要靶点^[25]。巨噬细胞的极化是一个多因子相互作用的复杂过程,受到胞内多种信号分子及其通路的调

控。休眠状态的巨噬细胞可在IFN-γ, LPS的刺激下诱导极化为M1型巨噬细胞,分泌大量促炎因子,包括IL-1, IL-6, TNF-α, iNOS等,同时能产生趋化因子,如单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1),通过趋化性吸引Th1细胞,促进强烈的Th1免疫反应;巨噬细胞在IL-4或IL-13的诱导下极化为M2a,巨噬细胞可大量释放血管内皮细胞生长因子(VEGF),精氨酸酶-1(Arg-1),血小板源生长因子(PDGF),转化生长因子-β(TGF-β)和IL-10等细胞因子;M2型巨噬细胞在血管生成、抗炎因子分泌以及促进组织修复和伤口愈合方面起到重要作用^[26]。因此,本实验从体外提取大鼠骨髓来源的单核细胞,加M-CSF进行刺激,诱导成巨噬细胞,加入LPS+IFN-γ进行刺激,诱导其向M1型巨噬细胞极化;加入IL-4+IL-13进行刺激,诱导其向M2型巨噬细胞极化。

RA属于中医学“痹证”范畴,而二妙散为治痹良方。二妙散方中以黄柏为君,取其寒以胜热,苦以燥湿,且善祛下焦之湿热。湿自脾来,故臣以苍术燥湿健脾,使湿邪去而不再生。两药相合,清流洁源,标本兼顾,使湿热得除,诸证自解。本实验结果表明二妙散可抑制LPS+IFN-γ诱导的M1极化,而对IL-4+IL-13诱导的M2极化没有影响。

综上,二妙散可抑制LPS+IFN-γ诱导的M1型巨噬细胞的极化,从而发挥抑制RA滑膜炎增生作用,相关机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] BURKE B, GINNOUDIS A, CORKE K P, et al. Hypoxia-induced gene expression in human macrophages; implications for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy [J]. *Am J Pathol*, 2003, 163(4): 1233-1243.
- [2] VIATTE S, PLANT D, RAYCHAUDHURI S. Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2013, 9(3): 141-153.
- [3] MCINNES I B, SCHETT G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(23): 2205-2219.
- [4] ALVARO-GRACIA J M, ZVAIFLER N J, FIRESTEIN GS. Cytokines in chronic inflammatory arthritis. V. Mutual antagonism between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on HLA-DR expression, proliferation, collagenase production, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes [J]. *J Clin Invest*, 1990, 86(6): 1790-1798.
- [5] ATHANASOU N A, QUINN J, HERYET A, et al. The immunohistology of synovial lining cells in normal and inflamed synovium [J]. *J Pathol*, 1988, 155(2): 133-142.
- [6] BONDESON J, BLOM A B, WAINWRIGHT S, et al. The role of synovial macrophages and macrophage-produced mediators in driving inflammatory and destructive responses in osteoarthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(3): 647-657.
- [7] DANNING C L, ILLEI G G, HITCHON C, et al. Macrophage-derived cytokine and nuclear factor kappaB p65 expression in synovial membrane and skin of patients with psoriatic arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(6): 1244-1256.
- [8] BRENNAN F M, MCINNES I B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(11): 3537-3545.
- [9] FELDMANN M, BRENNAN F M, MAINI R N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis [J]. *Annu Rev Immunol*, 1996, 14: 397-440.
- [10] KISHIMOTO T. Interleukin-6: from basic science to medicine-40 years in immunology [J]. *Annu Rev Immunol*, 2005, 23: 1-21.
- [11] CHOY E H, PANAYI G S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis [J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(12): 907-916.
- [12] BRESNIHAN B, GERLAG D M, ROONEY T, et al. Synovial macrophages as a biomarker of response to therapeutic intervention in rheumatoid arthritis: standardization and consistency across centers [J]. *J Rheumatol*, 2007, 34(3): 620-622.
- [13] MULHERIN D, FITZGERALD O, BRESNIHAN B. Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 1996, 39(1): 115-124.
- [14] HARINGMAN J J, GERLAGE D M, ZWINDERMAN A H, et al. Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64(6): 834-838.
- [15] 李雪, 罗清. 巨噬细胞极化在类风湿关节炎中的作用 [J]. *生命科学*. 2018, 30(3): 261-266.
- [16] 考希良, 董嘉琪. 二妙散不同配伍对大鼠佐剂性关节炎的抗炎效应 [J]. *中医药学报*, 2013, 41(3): 111-113.
- [17] 王勇. 二妙散对类风湿关节炎大鼠抗炎免疫效果研究 [J]. *中国民族民间医药*, 2010, 19(18): 24.
- [18] 刘喆, 考希良. 二妙散不同配伍比例干预 Wistar 大鼠佐剂性关节炎的实验研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2013, 31(7): 1601-1603.
- [19] 任凯夕, 赵诣林, 金超, 等. 小鼠骨髓来源巨噬细胞体外培养及极化相关实验方法的建立 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2013, 29(3): 310-313.
- [20] YING W, CHEUKU P S, BAZER F W, et al. Investigation of macrophage polarization using bone marrow derived macrophages [J]. *J Vis Exp*, 2013, (76): 50323.
- [21] 陈曦, 刘哲, 邓茂林, 等. 同种属来源一抗在免疫荧光双标记染色中的可行性 [J]. *四川解剖学杂志*, 2015, 23(1): 13-15, 19.
- [22] BANKHEAD C, SILMAN A, BARRETT B, et al. Incidence of rheumatoid arthritis is not related to indicators of socioeconomic deprivation [J]. *J Rheumatol*, 1996, 23(12): 2039-2042.
- [23] 黄自坤, 李雪, 罗清. 类风湿关节炎单核巨噬细胞极化表型分析及临床意义 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(4): 605-609.
- [24] MOSSER D M, EDWARDS J P. Exploring the full spectrum of macrophage activation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(12): 958-969.
- [25] CHANDRUPATLA D M S H, MOLTHOFF C F M, LAMMERTSMA A A, et al. The folate receptor β as a macrophage-mediated imaging and therapeutic target in rheumatoid arthritis [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2019, 9(1): 366-378.
- [26] 阮静瑶, 陈必成, 张喜乐. 巨噬细胞 M1/M2 极化的信号通路研究进展 [J]. *免疫学杂志*, 2015, 31(10): 911-917.

[责任编辑 孙丛丛]