

# 益气养阴逐瘀方对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞炎症模型体外抗炎活性的影响

唐蕾, 吴坚, 于顾然, 储继红, 严士海, 王海丹, 戴国梁, 韩旭\*  
(南京中医药大学附属医院, 南京 210029)

**[摘要]** 目的:研究益气养阴逐瘀方对脂多糖(LPS)诱导的小鼠单核巨噬细胞系 RAW 264.7 细胞炎症模型相关细胞因子表达及经典活化(M1)/选择性活化(M2)炎症表型转化的影响。方法:运用噻唑蓝(MTT)比色法检测不同给药浓度的益气养阴逐瘀方对 RAW 264.7 细胞增殖情况的影响;利用 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞,构建体外炎症模型,采用格里斯试剂法(Griess)检测细胞上清液中一氧化氮(NO)的分泌量;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测细胞上清中 M1/M2 型相关炎症因子肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),白细胞介素-6(IL-6),白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ),一氧化氮合酶(iNOS),白细胞介素-10(IL-10),转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ ),精氨酸-1(Arg-1)的表达量;实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测 M1 型巨噬细胞标志基因 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , iNOS 和 M2 型巨噬细胞标志基因 IL-10, TGF- $\beta$ , Arg-1 mRNA 的表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞内相关蛋白 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , iNOS 的表达。结果:MTT 比色法显示,与空白组比较,益气养阴逐瘀方 2.0 g·L<sup>-1</sup> 及以下时对细胞增殖无明显影响。Griess 法显示,与空白组相比,LPS 组 NO 释放量显著上调( $P < 0.01$ );与 LPS 组相比,各给药组 NO 释放量均显著下调( $P < 0.01$ )。ELISA 显示,与空白组相比,LPS 组 M1/M2 型巨噬细胞相关炎症因子表达均显著上调( $P < 0.01$ );与 LPS 组相比,益气养阴逐瘀方各给药组可明显下调 M1 型巨噬细胞促炎症因子表达( $P < 0.01$ ),对 M2 型巨噬细胞抗炎因子无影响。Real-time PCR 显示,与空白组相比,LPS 组 M1/M2 型巨噬细胞相关 mRNA 表达显著上调( $P < 0.01$ );与 LPS 组相比,益气养阴逐瘀方各给药组可明显下调 M1 型巨噬细胞促炎症因子基因表达( $P < 0.05, P < 0.01$ ),对 M2 型 mRNA 表达无影响。Western blot 显示,与空白组比较,LPS 组 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , iNOS 蛋白的表达显著上调( $P < 0.01$ );与 LPS 组相比,益气养阴逐瘀方各给药组 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , iNOS 蛋白的表达均下调,且于 2.0 g·L<sup>-1</sup> 下调最显著( $P < 0.01$ )。结论:益气养阴逐瘀方可以有效抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞炎症。其诱导已经分化的促炎亚型 M1 型巨噬细胞向抗炎亚型 M2 型巨噬细胞转化不明显,其抗炎机制可能与通过抑制巨噬细胞向 M1 亚型方向极化从而发挥免疫调节作用,以减少 NO, TNF- $\alpha$ , IL-6 等相关炎症因子分泌相关。

**[关键词]** 动脉粥样硬化(AS); 益气养阴逐瘀方; 巨噬细胞; 经典活化(M1); 选择性活化(M2); 脂多糖; 瓜蒌薤白白酒汤; 当归补血汤

**[中图分类号]** R289; R289.5; R364.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)01-0141-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190129

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181015.1716.003.html>

**[网络出版时间]** 2018-10-19 8:46

## Effect of Yiqi Yangyin Zhuyu Recipe in Anti-inflammation Activities *in Vitro* on LPS-induced RAW 264.7 Cells

TANG Lei, WU Jian, YU Gu-ran, CHU Ji-hong, YAN Shi-hai, WANG Hai-dan, DAI Guo-liang, HAN Xu\*  
(Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Yiqi Yangyin Zhuyu recipe on expressions of inflammatory factor and transformation of classically activated macrophages (M1)/alternatively activated

**[收稿日期]** 20180731(005)

**[基金项目]** 江苏省自然科学基金项目(BK20181505);江苏省卫计委科研课题(MS201506)

**[第一作者]** 唐蕾,在读硕士,从事中医内科学老年病研究, E-mail:245986178@qq.com

**[通信作者]** \*韩旭,博士,主任医师,从事中医内科学老年病研究, E-mail:13057504158@126.com

macrophages (M2) inflammatory phenotype in lipopolysaccharide (LPS) -induced RAW 264.7 cells. **Method:** Methyl-thiazdyl-tetrazolium (MTT) reduction assay was used to detect the effect of different concentrations of Yiqi Yangyin Zhuyu recipe on the proliferation of the cells. The release of nitric oxide was detected by the Griess method. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the release of M1/M2 inflammatory cytokines in cell supernatant. The expressions of the pro-inflammatory factor genes of M1-macrophages and the anti-inflammatory factor genes of M2-macrophages were detected by Real-time PCR. The protein expression levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL) -6, IL-1, nitric oxide synthase (iNOS) were detected by Western blot. **Result:** Results of MTT showed that Yiqi Yangyin Zhuyu recipe with the concentration of  $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  and below had no effect on the cell proliferation. Results of Griess indicated that compared with blank group, the release of nitric oxide of LPS-induced group was increased ( $P < 0.01$ ); compared with LPS-induced group, Yiqi Yangyin Zhuyu recipe group could reduce the release of NO ( $P < 0.01$ ). Results of ELISA showed that compared with blank group, the release of M1/M2 inflammatory cytokines of LPS-induced group were both up-regulated ( $P < 0.01$ ); compared with LPS-induced group, the secretion of M1-macrophages inflammatory cytokines was down-regulated in Yiqi Yangyin Zhuyu recipe group ( $P < 0.01$ ), but with no change in M2-macrophages. Results of Real-time PCR indicated that compared with blank group, the expressions of M1/M2 were both increased ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ); compared with LPS-induced group, the expression levels of M1-macrophages were down-regulated in traditional Chinese medicine group ( $P < 0.01$ ); anti-inflammatory factor genes of M2-macrophages had no significant change. Results of Western blot showed that compared with blank group, expression levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , iNOS were up-regulated ( $P < 0.01$ ); compared with LPS-induced group, the expressions of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , iNOS were down-regulated in Yiqi Yangyin Zhuyu recipe group, especially at the concentration at  $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Yiqi Yangyin Zhuyu recipe could effectively inhibit the inflammatory reaction induced by LPS. The anti-inflammatory mechanism of Yiqi Yangyin Zhuyu recipe may be related to inhibition of macrophages to M1 phenotype polarization, so as to play the role of regulating immune and reducing the release of inflammatory cytokines, like NO, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ .

**[Key words]** atherosclerosis (AS); Yiqi Yangyin Zhuyu recipe; macrophage; classically activated macrophages (M1); alternatively activated macrophages (M2); lipopolysaccharide (LPS); Gualou Xiebai Baijiu Tang; Danggui Buxue Tang

动脉粥样硬化(AS)是一种由斑块引起管腔狭窄继而引发动脉供血不足的慢性疾病,是心脑血管疾病共同的病理基础<sup>[1]</sup>。我国老年人口比例逐年攀升,研究显示我国居民 AS 发病率年平均增长率为 6.37%,60 岁及以上居民心脑血管疾病新发病例占累计新发病例总数的 83.5%<sup>[2]</sup>,严重影响患者的生活质量。目前他汀类成为 AS 治疗的主流药物,但其机制尚未完全阐明,且长期服用存在肝损伤等不良反应,这在一定程度上限制了他汀类药物的临床应用。随着科技进步和多学科交叉渗透,中医药治疗 AS 愈来愈深入人心。中草药化学成分多样性和生物活性的广泛性,奠定了多环节、多靶点治疗 AS 的基础,稳定性好,不良反应轻。因此寻找安全有效的治疗方剂,对于 AS 的临床治疗具有重要的指导意义。

益气养阴逐瘀方是全国名老中医李七一教授的

经验方,由瓜蒌薤白白酒汤合当归补血汤化裁而来,瓜蒌薤白白酒汤出自《金匮要略》,通阳散结,祛痰宽胸;当归补血汤出自李东垣所著《内外伤辨惑论》,补气生血,活血化瘀,两方合用,取之荡涤胸中痰浊瘀滞之意,学其治法,而不拘泥亘古。本方临床运用 30 余年,随证加减,疗效颇丰,但其作用机制尚不明确。AS 病因复杂,发病机制不清,先后出现自噬凋亡学说、脂质浸润学说、内皮损伤学说、氧化应激学说、炎症反应学说等<sup>[3-9]</sup>。研究表明,AS 早期血管内皮细胞在氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)刺激下表达多种黏附因子,驱动血液中的淋巴细胞和单核细胞向内皮损伤处迁移、黏附、积聚,在单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)刺激下,活化成巨噬细胞,诱导长期的血管局部炎症<sup>[10]</sup>,分泌大量炎症因子及生长因子,加速血管内皮细胞凋亡,诱导血管重促进斑块破裂、出血<sup>[11-12]</sup>。姜红菊等<sup>[13]</sup>发现宁心解毒汤可以

通过抑制肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ , 白细胞介素-6(IL-6)等炎症因子表达, 保护血管内皮, 发挥抗 AS 作用。刘桂林等<sup>[14]</sup>报道三七总皂苷(PNS)可以提高人脐静脉内皮细胞(HUVECs)活性, 减轻 ox-LDL 分泌, 降低免疫炎症因子及血管细胞黏附分子表达, 防止 AS。由此可见, 血管壁的慢性炎症反应成为 AS 发生发展过程中的核心因素, 巨噬细胞是参与免疫应答的主要免疫细胞。本研究团队前期临床研究<sup>[15-16]</sup>发现, 益气养阴逐瘀方可明显减轻冠心病患者心绞痛症状, 提高患者生活质量。在此基础上, 本研究团队进一步开展了该方对冠状 AS 血管内皮功能障碍及调控信号失衡的研究<sup>[17-18]</sup>, 发现黄精、当归、瓜蒌皮、三七、甘松 5 种药物配伍组合具有调节血脂作用, 并且可显著降低 AS 血管壁炎症因子表达, 从而发挥保护血管功能的作用。基于此, 本实验采用脂多糖(LPS)诱导小鼠单核巨噬细胞(RAW 264.7)构建体外炎症模型, 观察益气养阴逐瘀方对 M1/M2 表型巨噬细胞相关炎症因子表达及 M1/M2 炎症表型转化的影响, 从而评价益气养阴逐瘀方的体外抗炎活性, 探讨其抗炎机制, 以期 AS 的临床治疗提供新的思路和治疗选择。

## 1 材料

**1.1 细胞** 小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7 细胞株(购自凯基生物有限公司, 编号 KG240)。

**1.2 药材与试剂** 益气养阴逐瘀方由黄精 30 g, 瓜蒌皮 12 g, 当归 10 g, 甘松 10 g, 三七 5 g 组成, 复方草药均取自江苏省中医院, 经江苏省中医院主管药师朱敏鉴定, 均符合 2015 年版《中国药典》的药物标准。全方加 10 倍水, 浸泡 30 min, 武火煮沸, 继文火煎煮 30 min 后筛网分离药液, 二煎取药渣加 8 倍水, 煎法同前, 2 次药液合并浓缩至浸膏状(含生药 3.5 g·mL<sup>-1</sup>), 灭菌常温备用。精密称取浸膏, 加水稀释成 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 g·L<sup>-1</sup> 样品溶液, 0.22  $\mu$ m 的滤膜过滤, 4  $^{\circ}$ C 保存备用。DMEM 高糖培养基, 胎牛血清(FBS), PBS 缓冲液(美国 Gibco 公司, 批号分别为 11965118, 10099141, 10010023); Lipopolysaccharides, 噻唑蓝(MTT)(美国 Sigma 公司, 批号分别为 M5655, I2880); 一氧化氮(NO)检测试剂盒(碧云天生物公司, 批号 S0021); TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, Arg-1, TGF- $\beta$  酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(联科生物公司, 批号分别为 70-EK2821/2, 70-EK2062/2, 70-EK201B2/2, 70-EK2102/2, 70-EK2042/2, 70-EK2812/2); trizol TMR eagent RNA 提取剂(美国 Invitrogen 公司, 批号 15596026);

HiScript II Q RT SuperMix for Qpcr, AceQ Universal SYBR qPCR Master Mix(美国 Vazyme 公司, 批号分别为 Q511-02/03, R223-01); 兔抗鼠  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin), TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , 一氧化氮合酶(iNOS)二抗(美国 Cell Signaling 公司, 批号分别为 8457S, 11948S, 12912S, 12426S, 13120S)。

**1.3 仪器** Thermo311 型 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(日本 Sanyo 公司); 1300A2 型生物安全柜(美国 Thermo 公司); IX51 型倒置显微镜(日本 Oiympus 公司); ELx800 型全自动酶标仪(美国 Bio TeK 公司); Fresco21 型冷冻高速离心机(德国 Eppendorf 公司); DS-11 型紫外分光光度计(美国 ABI 公司); 7900HT 型荧光定量 PCR 仪, 2720 型 PCR 扩增仪(美国 Applied Biosystems 公司); Mini-Trans Cell 型电泳槽, PowerPac Basic 型电泳仪, MP-4 型转膜仪(美国 Bio-Rad 公司); CHEMIDOC XRS + 型凝胶成像仪(日本 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7 细胞株用内含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基于 37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养, 细胞呈对数生长, 每 24 h 更换培养基, 细胞生长至 60% ~ 70% 传代。待细胞传至 3 代, 状态稳定后, 用于实验。

**2.2 MTT 比色法检测 RAW 264.7 细胞增殖** 本课题组前期预实验发现, 益气养阴逐瘀方作用于 RAW 264.7 细胞株的半抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为 3.44 g·L<sup>-1</sup>, 因此设置益气养阴逐瘀方质量浓度为 8.0, 4.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.25 g·L<sup>-1</sup>。取处于对数生长期的 RAW 264.7 细胞株, 以 6  $\times$  10<sup>3</sup> 个/mL 的密度接种于 96 孔板中, 培养箱中孵育 24 h。次日, 弃上清, 分别加入终质量浓度为 8.0, 4.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.25 g·L<sup>-1</sup> 的益气养阴逐瘀方 200  $\mu$ L, 空白组加入等体积的完全培养基, 每组设 4 个复孔。继续培养 24 h 后, 每孔分别加入终质量浓度 5 g·L<sup>-1</sup> 的 MTT 溶液 20  $\mu$ L 以及完全培养基 100  $\mu$ L, 培养 4 h 后弃上清液, 每孔加入二甲基亚砜(DMSO) 150  $\mu$ L, 避光低速震荡 10 min, 待底部结晶充分溶解后于酶标仪 490 nm 处测定记录吸光度 A, 重复 3 次。按细胞抑制率 = (1 - A<sub>检验孔</sub>/A<sub>空白孔</sub>)  $\times$  100%, 计算细胞抑制率。

**2.3 RAW 264.7 细胞株分泌 NO, 炎症因子及相关基因表达水平的检测**

**2.3.1 细胞分组及干预** 细胞分为 6 组, 分别为空白组, LPS 炎症模型组、益气养阴逐瘀方组(2.0, 1.0, 0.5, 0.25 g·L<sup>-1</sup>)。取对数生长期的 RAW

264.7 细胞株,以  $2 \times 10^6$  个/mL 的密度接种于 6 孔板上,培养箱中孵育 24 h 后给药。空白组加入完全培养基,LPS 组加入终质量浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ [19] 的 LPS,给药组分别加入终质量浓度为 2.0,1.0,0.5,0.25  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的益气养阴逐瘀方和  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  LPS,使每组的总体积为 3 mL,并放入细胞培养箱中继续培养 24 h。

**2.3.2** 格里斯试剂(Griess)法检测细胞上清液中 NO 含量 收集细胞上清液,严格按照 NO 检测试剂盒说明书进行测定:用完全培养基作为稀释液稀释原始浓度为  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的标准品溶液  $\text{NaNO}_2$ 。按  $150 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ ,在 96 孔板中加入各浓度的对照品溶液及样品  $50 \mu\text{L}$ ,Griess Reagent I 液及 II 液各  $50 \mu\text{L}$ ,于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  培养箱中孵育 10 min。振荡器上震荡 5 min 后于酶标仪 540 nm 处测定记录各孔 A。

**2.3.3** 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测 M1/M2 型相关炎症因子的表达 收集细胞上清液,严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行测定,包被液稀释抗原,封板膜封板后于室温孵育 1.5 h。每孔加入  $100 \mu\text{L}$  终止液,充分混匀,待颜色由蓝色变为黄色,于酶

标仪 450 nm 和 570 nm 处进行双波长检测。校准  $A = A_{450 \text{ nm}} - A_{570 \text{ nm}}$ ,绘制标准曲线并计算各因子的含量。

**2.3.4** 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)法检测 M1/M2 型分化标志物 mRNA 的表达 按照 trizol 试剂说明书步骤,提取各组细胞总 RNA,于紫外分光光度计检测所提 RNA 浓度及纯度,确保  $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$  在 1.8 ~ 2.0 为合格。按照逆转录试剂盒说明,将 RNA 为模版逆转录成 cDNA,反应条件为  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ,15 min; $85 \text{ }^\circ\text{C}$ ,5 s。以 cDNA 为模版扩增目的基因,反应体系总体积为  $20 \mu\text{L}$ (上游引物  $0.4 \mu\text{L}$ ,下游引物  $0.4 \mu\text{L}$ ,cDNA  $1 \mu\text{L}$ ,无酶水  $18.2 \mu\text{L}$ );预变性  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ ,30 s,循环 1 次;扩增过程  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ ,10 s; $60 \text{ }^\circ\text{C}$ ,30 s,循环 40 次;融解曲线分析  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  15 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$  60 s, $95 \text{ }^\circ\text{C}$  15 s,循环 1 次。引物由 Invitrogen 公司合成,核苷酸序列及引物长度见表 1。采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法对结果进行数据分析,计算  $\Delta C_t = C_{t \text{ 目的基因}} - C_{t \text{ 内参基因}}$ ;  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ 给药组}} - \Delta C_{t \text{ 对照组}}$ ;各 mRNA 的相对表达量  $= 2^{-\Delta\Delta C_t}$ ,其中空白组的数值设为 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	上游序列(5'-3')	下游序列(5'-3')
$\beta$ -actin	GCTACAGCTTCACCACCACAG	GGTCTTTACGGATGTCAACGTC
TNF- $\alpha$	AGTCCGGGCAGGTCTACTTT	TTGGACCCTGAGCCATAATC
IL-6	GAGCCACCAAGAACGATAG	TTTCCACGATTTCCACAGAGA
IL-1 $\beta$	CCTGGGAAACAACAGTGCTC	GGTTTCTTTGTGACCCTGAGC
iNOS	TGGACCAGTATAAGGCAAGCA	GCGCAGAACTGAGGGTACAT
IL-10	CAGCCGGGAAGACAATAACT	TCATTTCGGATAAGGCTTGG
Arg-1	GCAGAGGTCCAGAAGAATGG	GGAGAAAGGACACAGGTTGC
TGF- $\beta$	GTGGAAATCAACGGGATCAG	CGCACACAGCAGTCTCTCTC

注:引物长度均为 20 bp。

**2.4** RAW 264.7 细胞株分泌的炎症因子相关蛋白表达的检测

**2.4.1** 细胞分组及干预 细胞分为 5 组,分别为空白组、LPS 炎症模型组、益气养阴逐瘀方低浓度、中浓度及高浓度组,取对数生长周期的 RAW 264.7 细胞株,以  $8 \times 10^6$  个/mL 的密度接种于 10 cm 培养皿,培养箱培养 24 h 后给药。空白组加入完全培养基 8 mL,LPS 组加入终质量浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  LPS,益气养阴逐瘀方组分别加入终质量浓度为 2.0,1.0,0.5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的益气养阴逐瘀方及  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  LPS,每组总体积 8 mL,继续于细胞培养箱中培养 24 h。

**2.4.2** 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测炎症因

子相关蛋白的表达 弃上清液,每皿加 RIPA 裂解液  $300 \mu\text{L}$ ,提取总蛋白,充分匀浆,离心 20 min ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ),收集上清,BCA 法检测总蛋白浓度。经聚丙烯酰胺凝胶分离后,湿转法转至  $0.45 \mu\text{m}$  PVDF 膜。5% 脱脂牛奶封闭 1 h,一抗(1:1 000)  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育过夜,次日二抗(1:3 000)室温摇床孵育 1 h,TBST 漂洗 5 min,4 次,后用 ECL 液进行发光及条带分析。

**2.5** 统计学方法 Western blot 采用 Image J 软件分析,ELISA 及 Real-time PCR 数据采用 SPSS 21.0 软件分析;数据显示为  $\bar{x} \pm s$ ,满足正态分布和方差

齐性的多组之间均数比较采用单因素方差分析,进一步两两比较用 LSD 法;方差不齐者采用 Dunnett's T3 检验。 $P < 0.05$  表示有统计学差异。

### 3 结果

**3.1 对 RAW 264.7 细胞增殖的影响** 与空白组相比,质量浓度为  $4.0, 8.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的药液对 RAW 264.7 细胞具有明显的抑制作用;质量浓度  $< 2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的药液对 RAW 264.7 细胞活性未见明显影响。因此选用  $0.25, 0.5, 1.0, 2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  用于后续实验。见表 2。

表 2 益气养阴逐瘀方对 RAW 264.7 细胞增殖 A 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of Yiqi Yangyin Zhuyu recipe on proliferation of RAW 264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	12 h	24 h
空白	-	$0.98 \pm 0.06$	$0.98 \pm 0.03$
益气养阴逐瘀方	0.25	$0.98 \pm 0.18$	$0.97 \pm 0.14$
	0.5	$0.96 \pm 0.13$	$0.96 \pm 0.11$
	1.0	$0.96 \pm 0.07$	$0.94 \pm 0.16$
	2.0	$0.92 \pm 0.06$	$0.89 \pm 0.06$
	4.0	$0.63 \pm 0.11$	$0.56 \pm 0.11$
	8.0	$0.46 \pm 0.15$	$0.49 \pm 0.12$

**3.2 对 LPS 诱导下 RAW 264.7 细胞分泌 NO 的影响** 与空白组相比,LPS 干预后的 RAW 264.7 细胞分泌的 NO 明显升高 ( $P < 0.01$ );与 LPS 组相比,质量浓度在  $0.25 \sim 2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的益气养阴逐瘀方均可以显著降低 NO 的释放量 ( $P < 0.01$ ),且浓度越高,NO 的释放量越低。见表 3。

表 3 益气养阴逐瘀方对 LPS 诱导下 RAW 264.7 细胞分泌 NO 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of Yiqi Yangyin Zhuyu recipe on production of NO in LPS-induced RAW 264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	-	$1.83 \pm 0.77$
LPS	0.001	$43.77 \pm 1.61^{1)}$
益气养阴逐瘀方	0.25	$32.82 \pm 0.74^{2)}$
	0.5	$11.23 \pm 0.26^{2)}$
	1.0	$2.60 \pm 0.11^{2)}$
	2.0	$1.72 \pm 0.10^{2)}$

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与 LPS 组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ (表 4,8 同)。

**3.3 对 LPS 诱导下 RAW 264.7 细胞分泌 TNF- $\alpha$ ,**

IL-6, IL-1 $\beta$  的影响

与空白组相比,LPS 干预后 RAW 264.7 细胞分泌的 M1/M2 型巨噬细胞相关炎症因子均上调 ( $P < 0.01$ );与 LPS 组相比,各浓度给药组可明显抑制 M1 型促炎症因子 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  的分泌 ( $P < 0.01$ ),对 M2 型抗炎因子 Arg-1, TGF- $\beta$  的表达未见影响。见表 4,5。

表 4 益气养阴逐瘀方对 LPS 诱导下 RAW 264.7 细胞分泌 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of Yiqi Yangyin Zhuyu recipe on production of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  in LPS-induced RAW 264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-1 $\beta$
空白	-	$23.86 \pm 0.06$	$16.880 \pm 0.74$	$2.17 \pm 0.02$
LPS	0.001	$3\ 206.81 \pm 17.96^{1)}$	$83.136 \pm 0.25^{1)}$	$162.12 \pm 0.81^{1)}$
益气养阴逐瘀方	0.25	$3\ 292.00 \pm 14.05$	$91.827 \pm 0.78$	$140.89 \pm 0.55^{2)}$
	0.5	$2\ 526.13 \pm 15.09^{2)}$	$69.863 \pm 0.33^{2)}$	$123.66 \pm 0.17^{2)}$
	1.0	$1\ 538.63 \pm 8.52^{2)}$	$69.660 \pm 1.01^{2)}$	$114.14 \pm 0.08^{2)}$
	2.0	$1\ 039.34 \pm 9.26^{2)}$	$46.146 \pm 0.28^{2)}$	$105.01 \pm 0.24^{2)}$

表 5 益气养阴逐瘀方对 LPS 诱导下 RAW 264.7 细胞分泌 TGF- $\beta$ , Arg-1, IL-10 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of Yiqi Yangyin Zhuyu recipe on production of TGF- $\beta$ , Arg-1, IL-10 in LPS-induced RAW 264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	TGF- $\beta$	Arg-1	IL-10
空白	-	$27.23 \pm 0.10$	$8.80 \pm 0.26$	$100.83 \pm 3.39$
LPS	0.001	$44.11 \pm 1.07^{1)}$	$14.14 \pm 0.80^{1)}$	$140.21 \pm 3.29^{1)}$
益气养阴逐瘀方	0.25	$43.56 \pm 1.22$	$13.79 \pm 1.30$	$139.62 \pm 3.13$
	0.5	$44.45 \pm 0.78$	$13.26 \pm 1.17$	$135.97 \pm 3.57$
	1.0	$44.04 \pm 0.95$	$13.11 \pm 0.87$	$135.44 \pm 1.17^{2)}$
	2.0	$43.49 \pm 0.86$	$13.05 \pm 0.17^{2)}$	$134.11 \pm 1.85^{3)}$

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与 LPS 组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ (表 6,7 同)。

**3.4 对 LPS 诱导下 RAW 264.7 细胞标志物 mRNA 表达水平的影响** 与空白组相比,LPS 干预后的 RAW 264.7 细胞分泌的 M1/M2 型巨噬细胞分化标志物基因表达均上调 ( $P < 0.01$ );与 LPS 组相比,各浓度给药组均可明显抑制 M1 型标志物 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , iNOS mRNA 的表达,且给药浓度越大,相关炎症因子表达量越低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),对 M2 型标志物 IL-10, Arg-1, TGF- $\beta$  mRNA 表达未见明显变化。见表 6,7。

表 6 益气养阴逐瘀方对 LPS 诱导下 RAW 264.7 细胞 M1 表型标志物 mRNA 表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 6 Effect of Yiqi Yangyin Zhuyu recipe on mRNA expression of M1-correlated genes in LPS-induced RAW 264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-1 $\beta$	iNOS
空白	-	1.00	1.00	1.00	1.00
LPS	0.001	15.03 $\pm$ 3.60 <sup>1)</sup>	75.58 $\pm$ 3.74 <sup>1)</sup>	66.58 $\pm$ 1.32 <sup>1)</sup>	177.29 $\pm$ 14.62 <sup>1)</sup>
益气养阴逐瘀方	0.25	11.96 $\pm$ 1.85 <sup>3)</sup>	53.82 $\pm$ 2.85 <sup>2)</sup>	59.87 $\pm$ 2.12 <sup>3)</sup>	169.48 $\pm$ 7.64 <sup>3)</sup>
	0.5	7.06 $\pm$ 0.61 <sup>3)</sup>	28.38 $\pm$ 1.78 <sup>2)</sup>	37.47 $\pm$ 1.10 <sup>2)</sup>	108.80 $\pm$ 1.30 <sup>2)</sup>
	1.0	6.69 $\pm$ 0.17 <sup>3)</sup>	27.86 $\pm$ 2.01 <sup>2)</sup>	21.42 $\pm$ 0.59 <sup>2)</sup>	58.74 $\pm$ 7.99 <sup>2)</sup>
	2.0	4.59 $\pm$ 0.57 <sup>2)</sup>	22.30 $\pm$ 0.11 <sup>2)</sup>	5.56 $\pm$ 0.14 <sup>2)</sup>	13.23 $\pm$ 0.45 <sup>2)</sup>

表 7 益气养阴逐瘀方对 LPS 诱导下 RAW 264.7 细胞 M2 表型标志物 mRNA 表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

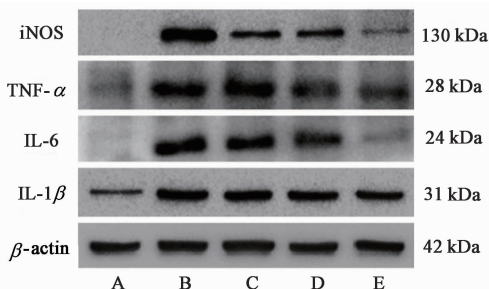
Table 7 Effect of Yiqi Yangyin Zhuyu recipe on mRNA expression of M2-correlated genes in LPS-induced RAW 264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	IL-10	Arg-1	TGF- $\beta$
空白	-	1.00	1.00	1.00
LPS	0.001	35.30 $\pm$ 1.75 <sup>1)</sup>	17.99 $\pm$ 2.86 <sup>1)</sup>	2.63 $\pm$ 0.25 <sup>1)</sup>
益气养阴逐瘀方	0.25	33.23 $\pm$ 2.70	18.14 $\pm$ 2.74	2.58 $\pm$ 0.13
	0.5	32.23 $\pm$ 5.23	17.28 $\pm$ 2.47	2.59 $\pm$ 0.85
	1.0	27.37 $\pm$ 3.68	17.55 $\pm$ 1.37	2.52 $\pm$ 0.15
	2.0	17.95 $\pm$ 1.34 <sup>2)</sup>	10.75 $\pm$ 3.13 <sup>3)</sup>	1.92 $\pm$ 0.25 <sup>3)</sup>

表 8 益气养阴逐瘀方对 LPS 诱导下 RAW 264.7 细胞 iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 8 Effect of Yiqi Yangyin Zhuyu recipe on protein expression of iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  in LPS-induced RAW 264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	iNOS/ $\beta$ -action	TNF- $\alpha$ / $\beta$ -action	IL-6/ $\beta$ -action	IL-1 $\beta$ / $\beta$ -action
空白	-	0.008 $\pm$ 0.001	0.024 $\pm$ 0.003	0.007 $\pm$ 0.003	0.057 $\pm$ 0.002
LPS	0.001	0.564 $\pm$ 0.029 <sup>1)</sup>	1.618 $\pm$ 0.105 <sup>1)</sup>	1.582 $\pm$ 0.031 <sup>1)</sup>	0.798 $\pm$ 0.029 <sup>1)</sup>
益气养阴逐瘀方	0.5	0.192 $\pm$ 0.048 <sup>2)</sup>	1.636 $\pm$ 0.118	1.231 $\pm$ 0.011 <sup>2)</sup>	0.586 $\pm$ 0.024 <sup>2)</sup>
	1.0	0.181 $\pm$ 0.003 <sup>2)</sup>	0.516 $\pm$ 0.077 <sup>2)</sup>	0.586 $\pm$ 0.054 <sup>2)</sup>	0.517 $\pm$ 0.078 <sup>2)</sup>
	2.0	0.074 $\pm$ 0.008 <sup>2)</sup>	0.297 $\pm$ 0.001 <sup>2)</sup>	0.493 $\pm$ 0.062 <sup>2)</sup>	0.415 $\pm$ 0.041 <sup>2)</sup>



A. 空白组; B. LPS 组; C. 益气养阴逐瘀方低浓度组; D. 益气养阴逐瘀方中浓度组; E. 益气养阴逐瘀方高浓度组

图 1 LPS 诱导下 RAW 264.7 细胞 iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  protein in LPS-induced RAW 264.7 cells

3.5 对 LPS 诱导下 RAW 264.7 细胞 iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  蛋白表达的影响 与空白组相比, LPS 炎症模型组 iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  蛋白的表达明显升高 ( $P < 0.01$ ); 与 LPS 相比, 各浓度益气养阴逐瘀方均可下调 iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  蛋白的表达量 ( $P < 0.01$ ), 且以高浓度组 ( $2.0 g \cdot L^{-1}$ ) 下调最为明显。见表 8, 图 1。

#### 4 讨论

中医尚无 AS 的病名, 主要包含在“心悸”“胸痹”“中风”等疾病中, 李七一教授认为 AS 的基本病机当属正气亏损、痰瘀内阻, 拟“益气养阴、活血化瘀”为治疗大法, 全方由黄精、当归、三七、瓜蒌皮、

甘松 5 味药物组成。方中黄精补脾益气、润心肺, 久服轻身延年不饥, 是为君药, 谨守“治病求本”之意, 李七一以黄精易黄芪, 补气之时加强精血滋生, 药性平和, 较黄芪更优于肝肾亏虚合并三高的老年患者。当归养血活血, 补而不滞, 佐黄精顾护人体之本, 合甘松宣泄胸中郁滞。瓜蒌皮清热化痰, 宽胸散结, 李七一以甘松易薤白, 取其理气止痛之外加强抗心律不齐之效, 三七易黄酒, 加强活血通脉之功, 忽略酒精易过敏、挥发的弊端, 三药合用, 活血通脉, 化痰散结, 以去“窠囊”。综观全方, 攻补兼施, 标本兼顾, 补而不滞, 攻而不亏, 以切 AS 要害。

巨噬细胞是机体抵抗外源性病原体侵袭的首道

防线,能快速识别病原体,引起免疫-炎症反应来清除病原体,维持机体稳态<sup>[20]</sup>。高度可塑性及功能多样性,使巨噬细胞在不同环境刺激下,可极化成不同表型及功能状态的细胞,目前以经典活化型巨噬细胞(M1型巨噬细胞)和替代活化型巨噬细胞(M2型巨噬细胞)被广泛认知。Swirski等<sup>[19]</sup>发现LPS, $\gamma$ -干扰素(INF- $\gamma$ ),粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)等微生物产物可诱导巨噬细胞向M1表型极化,具有更强的杀菌力及吞噬力,加剧炎症反应及组织损伤程度;Gordon等<sup>[21]</sup>发现白细胞介素-4(IL-4),TGF- $\beta$ 及相关免疫复合物可刺激巨噬细胞向M2表型极化,下调免疫应答,抑制炎症反应,促进组织损伤修复。两种极化贯穿AS的发生发展,Dill等<sup>[22]</sup>发现AS早期,单核细胞在巨噬细胞集落刺激因子(MCSF)作用下,向血管内浸润并分化为以M2型为主的巨噬细胞,促进血管重塑及周围组织修复。随着炎症进展,M1型巨噬细胞逐渐增多并占据主导地位,诱导活性氧的产生,促进NO的分泌,加速TNF- $\alpha$ ,IL-6,IL-1 $\beta$ 等炎症因子释放。Woollard等<sup>[23]</sup>报道AS晚期患者血浆中驱动诱发的Th2型细胞因子,分泌IL-4,IL-13等细胞因子激活M2型巨噬细胞,促进纤维帽形成,可提高斑块的稳定性。故为进一步探讨益气养阴逐瘀汤在治疗AS过程中发挥的抗炎活性及机制,本实验采用LPS诱导RAW 264.7细胞构建体外炎症模型,运用ELISA,Real-time PCR,Western bolt等方法观察该方干预后M1/M2型巨噬细胞相关炎症因子的表达量。研究发现不同药物浓度的益气养阴逐瘀方可明显下调M1型巨噬细胞促炎症因子TNF- $\alpha$ ,IL-6,IL-1 $\beta$ 表达量,表明益气养阴逐瘀方具有良好的体外抗炎活性;其对M2型巨噬细胞抗炎症因子IL-10,Arg-1,TGF- $\beta$ 无影响,表明益气养阴逐瘀方通过促进M1表型巨噬细胞向M2表型转化的方式发挥抗炎作用效果不明显,ELISA和Real-time PCR结果均得到证实。Western blot结果显示,LPS诱导炎症模型后,促炎症因子TNF- $\alpha$ ,IL-6,IL-1 $\beta$ ,iNOS表达明显上调,与文献报道吻合。经益气养阴逐瘀方干预后,4个目的基因蛋白条带均显示递减趋势,进一步证实益气养阴逐瘀方能明显下调M1型巨噬细胞促炎症因子的蛋白表达量,有效抑制炎症反应,减少损伤。

综上所述,益气养阴逐瘀方可以有效抑制LPS诱导的RAW 264.7细胞炎症,明显抑制M1型巨噬细胞促炎症因子的分泌,发挥良好的抗炎作用。其诱导已经分化的促炎亚型M1型巨噬细胞向抗炎亚

型M2型巨噬细胞转化不明显,其抗炎机制可能与通过抑制巨噬细胞向M1亚型方向极化从而发挥免疫调节作用,以减少NO,TNF- $\alpha$ ,IL-6等相关促炎症因子分泌有关。具体的抗炎信号通路以及更深入的抗炎机制是今后重点研究方向。

#### [参考文献]

- [1] Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis[J]. *Annu Rev Immunol*, 2008,27(1):165-197.
- [2] 王冬菊. 心脑血管疾病流行概况及主要影响因素[J]. *预防医学论坛*, 2016,12(1):71-75.
- [3] YE L X, YU J, LIANG Y X, et al. Beclin 1 knockdown retards re-endothelialization and exacerbates neointimal formation via a crosstalk between autophagy and apoptosis[J]. *Atherosclerosis*, 2014,237(1):146-154.
- [4] YU Y, GUO S, FENG Y, et al. Phospholipid transfer protein deficiency decreases the content of SIP in HDL via the loss of its transfer capability[J]. *Lipids*, 2014,49(2):183-190.
- [5] ZHANG T, ZHANG X, YU W, et al. Effects of chemokine-like factor 1 on vascular smooth muscle cell migration and proliferation in vascular inflammation[J]. *Atherosclerosis*, 2013,226(1):49-57.
- [6] Cheang W S, TIAN X Y, Wong W T, et al. Metformin protects endothelial function in diet-induced obese mice by inhibition of endoplasmic reticulum stress through 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase-peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  pathway[J]. *Arterioscl Throm Vas*, 2014,34(4):830-836.
- [7] LIU X, ZHAO G, YAN Y, et al. Ginkgolide B reduces atherogenesis and vascular inflammation in ApoE<sup>-/-</sup> mice[J]. *PLoS One*, 2012,7(5):36237.
- [8] 任建勋,李磊,林成仁,等. 痰瘀同治方对小型猪冠状动脉粥样硬化炎症反应的影响[J]. *中国中药杂志*, 2014,39(2):285-290.
- [9] 李明明,黄芳,韩林涛,等. 瓜蒌薤白白酒汤对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013,19(16):188-192.
- [10] Legein B, Temmerman L, Biessen E A, et al. Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013,70(20):3847-3869.
- [11] JU Y L, MIN H K, Choi D, et al. Profiling of phospholipids in lipoproteins by multiplexed hollow fiber flow field-flow fractionation and nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2010,1217(10):1660-1666.

- [12] WU D, LIU J, PANG X, et al. Palmitic acid exerts pro-inflammatory effects on vascular smooth muscle cells by inducing the expression of C-reactive protein, inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- $\alpha$  [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(6):1706-1712.
- [13] 姜红菊, 李润智, 杜修文, 等. 宁心解毒汤、血塞通、瑞舒伐他汀对 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠炎症因子和 As 斑块的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(12):1214-1218.
- [14] 刘桂林, 窦迎春, 刘粉叶, 等. 三七总皂苷对 ox-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞 CD40, VCAM-1 表达的影响 [J]. *山东大学学报: 医学版*, 2010, 48(10):14-19.
- [15] 王令淳, 李七一. 益气养阴活血化痰法治疗冠心病心绞痛 160 例临床观察 [J]. *山西医药杂志*, 2013, 42(7):733-735.
- [16] 刘福明, 李七一, 刘健, 等. 益气养阴活血化痰法对冠心病患者抵抗素及 IL-1、TNF- $\alpha$ 、Hs-CRP 的影响 [J]. *吉林中医药*, 2016, 36(12):1214-1216.
- [17] 张洪斌, 李七一. 益气养阴活血化痰法治疗冠心病心绞痛对冠状动脉内皮功能的影响及其临床研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2008, 26(12):2646-2647.
- [18] 严士海, 李七一. 冠心平对 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠动脉粥样硬化氧化与抗氧化指标的影响 [J]. *中成药*, 2014, 36(6):1285-1287.
- [19] Swirski F K, Nahrendorf M. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure [J]. *Science*, 2013, 339(6116):161-166.
- [20] Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity [J]. *Nat Immunol*, 2004, 5(10):971-974.
- [21] Gordon S, Martinez F O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions [J]. *Immunity*, 2010, 32(5):593-604.
- [22] Dill B D, Gierlinski M, Härtlova A, et al. Quantitative proteome analysis of temporally resolved phagosomes following uptake via key phagocytic receptors [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2015, 14(5):1334-1349.
- [23] Woollard K J, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2010, 7(2):77-86.

[责任编辑 孙丛丛]