

四逆散对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞极化的影响

范慧婕^{1,2}, 谭章斌¹, 梁红峰², 刘彬³, 赵晓山¹, 周迎春^{1*}

(1. 南方医科大学中医药学院, 广州 510515; 2. 阳江市人民医院, 广东 阳江 529500;
3. 广州医科大学附属第二医院, 广州 510260)

[摘要] **目的:**探讨四逆散(Sinisan, SNS)对脂多糖(LPS)诱导的 RAW264.7 巨噬细胞极化的调控作用。**方法:** RAW264.7 分为 5 组,分别为空白组,模型组,SNS 低、中、高质量浓度组(10,20,40 mg·L⁻¹);以 LPS(100 μg·L⁻¹)刺激的 RAW264.7 细胞为体外模型,使用不同质量浓度的 SNS 提前干预细胞,噻唑蓝(MTT)比色法检测不同质量浓度 SNS 对 RAW264.7 细胞增殖的影响;光学显微镜下观察各组细胞分化程度;酶联免疫吸附测定(ELISA)检测细胞培养基上清中 M1 极化因子肿瘤坏死因子-α(TNF-α),白细胞介素-6(IL-6),白细胞介素-1β(IL-1β)以及 M2 极化因子白细胞介素-10(IL-10)的含量;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 RAW264.7 细胞 M1 极化因子 TNF-α,IL-6 以及 M2 极化因子 IL-10,精氨酸酶-1(Arg-1)的 mRNA 水平。**结果:**与空白组比较,模型组促进细胞增殖($P < 0.05$),刺激 M1 极化因子 TNF-α,IL-6,IL-1β 的释放和上调 TNF-α,IL-6 的 mRNA 含量($P < 0.01$),减少 M2 极化因子 IL-10 释放和 IL-10,Arg-1 的 mRNA 水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与空白组比较,SNS 对 RAW264.7 细胞的活性没有影响。与模型组比较,SNS 可抑制 LPS 诱导的细胞增殖($P < 0.05$),减少 LPS 刺激的细胞分化,减少 M1 极化因子 TNF-α,IL-6,IL-1β 的释放和 TNF-α,IL-6 的 mRNA 含量($P < 0.05$, $P < 0.01$),并增加 M2 极化因子 IL-10 释放和 IL-10,Arg-1 的 mRNA 水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**SNS 可抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症,其机制可能与调控巨噬细胞 M1/M2 表型极化平衡相关。

[关键词] 四逆散; 脂多糖(LPS); RAW264.7 细胞; 巨噬细胞极化; 炎症

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)13-0009-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191301

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190319.1140.008.html>

[网络出版时间] 2019-03-20 13:46

Effect of Sinisan on Macrophage Polarization of RAW264.7 Cells Induced by Lipopolysaccharide

FAN Hui-jie^{1,2}, TAN Zhang-bin¹, LIANG Hong-feng², LIU Bin³, ZHAO Xiao-shan¹, ZHOU Ying-chun^{1*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

2. Yangjiang People's Hospital, Yangjiang 529500, China;

3. The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the regulatory effect of Sinisan (SNS) on the polarization of RAW264.7 macrophages induced by lipopolysaccharide (LPS). **Method:** RAW264.7 cells stimulated by LPS were used as the *in vitro* model. The cells were intervened with the different concentrations of SNS in advance. The effects of different concentrations of SNS on the proliferation of RAW264.7 cells were detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetry. The degree of cell differentiation was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. The contents of M1 polarization factors tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1β (IL-1β) and M2 polarization factors interleukin-10 (IL-10) in cell culture supernatant

[收稿日期] 20181126(011)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81673805)

[第一作者] 范慧婕,博士,从事中医药防治心血管病的药理学研究,Tel: 020-61641675, E-mail:15521107492@163.com

[通信作者] *周迎春,博士,教授,主任医师,从事中医药防治心血管病的药理学研究,Tel: 020-61641675, E-mail:zhychun@126.com

were detected by ELISA method, mRNA levels of M1 polarization factors TNF- α , IL-6 and M2 polarization factors IL-10, arginase-1 (Arg-1) were detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) method. **Result:** SNS had no effect on the cell viability of RAW264. 7 cells, inhibited LPS-induced cell proliferation, decreased LPS-stimulated cell differentiation, down-regulated M1 polarizing factors TNF- α , IL-6, IL-1 β release and TNF- α , IL-6 mRNA levels, and increased the release of IL-10 and mRNA levels of IL-10 and Arg-1. **Conclusion:** SNS inhibits the inflammation of RAW264. 7 cells induced by LPS, and its mechanism may be related to the regulation of polarization balance of M1/M2 macrophages.

[**Key words**] Sinisan; lipopolysaccharide (LPS); RAW264. 7; polarization of macrophage; inflammation

随着现代生活和工作方式的改变,人类疾病谱亦发生着不断的变化,心血管疾病的发生率逐年上涨^[1]。心血管急性事件一直是心血管疾病防治的重点与难点,动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是其重要的病理生理基础,在心血管急性事件中起着至关重要的作用。

AS 是一种由血管内皮损伤,脂质沉积和氧化应激引起的炎症性疾病,其进行性发展最终引起斑块破裂和血栓,从而导致心血管急性事件的发生^[2]。抑制 AS 的发展对于防治冠心病具有重要意义,指南推荐针对冠心病的药物包括他汀类药物,抗血小板制剂, β 受体阻滞剂,肾素-血管紧张素-醛固酮系统阻滞剂等。然而,尽管联合使用多种药物,冠心病的发病率和死亡率仍逐年升高,城市人口冠心病死亡率已从 2005 年的 42.1/10 万上升至 2015 年的 110.91/10 万,农村冠心病死亡率已从 2005 年的 22.2/10 万上升至 2015 年的 110.67/10 万^[3]。因此,加强 AS 有效药物的探索,对心血管疾病的早期防治,延缓病情进展具有重要意义。

在 AS(心肌梗塞和中风的根本原因)的发生发展中,巨噬细胞具有双重调控功能,与脂质调节,代谢以及血管壁慢性炎症反应相关^[4]。巨噬细胞是一种异质细胞群,在 AS 的发病过程中,斑块中的巨噬细胞可以在促炎(M1)与抗炎(M2)表型之间切换^[5]。M1 型巨噬细胞主要分泌肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α),白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6),白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β), II 型一氧化氮合酶(nitric oxide synthase 2, NOS2)等细胞因子, M2 型巨噬细胞主要分泌精氨酸酶-1(arginine-1, Arg-1),白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)等细胞因子^[6-7],寻找巨噬细胞向 M2 极化的激动剂,或向 M1 极化的抑制剂是如今研究 AS 药物的一个热点。中医药是中华民族的巨大宝库,可作为 AS 创新药物开发的丰富和重要来源。

四逆散(Sinisan, SNS)出自张仲景的《伤寒论》,由北柴胡、白芍、枳实、炙甘草等比组成。作为一个中医经典名方, SNS 具有多种药理活性,研究得最为广泛的是抗炎作用。既往研究表明, SNS 具有缓解肠易激综合征,预防急性胃黏膜病变,减缓肝损伤,治疗溃疡性结肠炎,改善大鼠内脏高敏感状态,缓解特应性皮炎等抗炎和调节免疫的功效^[8-12]。本课题组在前期研究中发现, SNS 对二硝基氯苯诱导的特应性皮炎小鼠有明显的抗炎和免疫调节效果^[8],但其对 AS 的炎症调节作用尚未有文献报道。结合上述文献调研“巨噬细胞参与的炎症反应在 AS 发生发展进程中起到至关重要的作用”和 SNS 的抗炎作用,笔者有必要进一步探讨 SNS 能否通过调节巨噬细胞保护 AS。本课题组以脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激小鼠单核巨噬细胞 RAW264. 7 细胞为体外 AS 炎症模型,观察 SNS 对 LPS 诱导的细胞增殖、分化的作用,及其对巨噬细胞 M1/M2 表型相关炎症因子表达与释放的影响,进一步评价 SNS 的体外抗 AS 炎症功效,初步探讨其对巨噬细胞极化的调节作用,为 AS 临床治疗提供一个新的治疗方法和思路。

1 材料

1.1 细胞 实验所用的小鼠单核巨噬细胞株(RAW264. 7 细胞)购自中国科学院上海细胞库。

1.2 药材与试剂 SNS 中的北柴胡、白芍、枳实、炙甘草为 1:1:1:1 的比例构成,产自广州致信药业股份有限公司,批号分别为 171201, 171123, 171109, 171203, 药材均由南方医科大学周迎春教授鉴定,其质量符合 2015 年版《中国药典》的规定。LPS(上海源叶生物科技有限公司,批号 20170910);胎牛血清(FBS),高糖 DMEM,青链霉素溶液,0.25% 含有 EDTA 的胰酶(美国 Gibco 公司,批号分别为 10437028, 10569044, 10378016, 25300054),噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司,批号 M2128);IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-10 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(瑞

博奥生物科技有限公司,批号分别为 102617, 091117, 020218, 011518); trizol RNA 分离试剂, cDNA 合成试剂盒(美国 Thermo 公司,批号分别为 10296010, K1621); RNA 提取液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号 G3013); 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)引物由武汉赛维尔生物科技有限公司设计合成; Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox) (美国 Roche 公司,批号 4913914001)。

1.3 仪器 BB15 型 CO₂ 细胞培养箱(德国 Heraeus 公司); SW-CJ-1FD 型细胞超净工作台(中国苏净集团安泰公司); 151000905 型酶标仪, Nano Drop 2000 型微量分光光度计(美国 Thermo 公司); Eclipse Ti-S 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司); Stepone plus 型 Real-time PCR 仪(美国 Applied Biosystems 生物系统公司)。

2 方法

2.1 RAW264.7 细胞的培养 用完全培养基(含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基)在 37 °C 5% CO₂ 的培养箱中培养 RAW264.7 细胞,使细胞呈对数增长,每日更换培养基,待细胞生长到 80% 左右即可传代。

2.2 SNS 的准备 称取北柴胡 10 g, 白芍 10 g, 枳实 10 g, 炙甘草 10 g, 煎煮前先加纯净水没过药面大概 2 cm, 浸泡 30 min, 接着用武火加热煮沸后换文火继续煎煮 30 min 左右。使用同样方法煎煮, 重复 2 次, 将 3 次的汤剂混合, 加热浓缩至 100 mL, 得到 SNS 母液质量浓度 400 g·L⁻¹。使用 0.45 μmol·L⁻¹ 的过滤器过滤, 随后分装放于 -20 °C 保存。

2.3 MTT 比色法检测 SNS 对细胞存活率的影响 取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 按照细胞传代的步骤, 按照每孔 100 μL (密度为 5 × 10⁴ 个/mL) 接种到 96 孔板, 每组 5 个复孔。除空白组外, 设置不同的 SNS 质量浓度组 (5, 10, 20, 40, 80, 100, 200, 400 mg·L⁻¹), 培养 48 h, 期间换液 1 次。随后, 加入 MTT 母液(终质量浓度为 0.5 g·L⁻¹), 避光培养 4 h 后去除上清液, 加入 100 μL/孔的 DMSO, 摇床上避光摇晃 10 min。在酶标仪 490 nm 波长处检测各孔的吸光度 A。细胞存活率计算公式为细胞存活率 = 各质量浓度给药组的平均 A/空白组的平均 A × 100%。

2.4 MTT 比色法检测 SNS 对 LPS 诱导的细胞增殖作用 按照 2.3 项的种板步骤, 将 RAW264.7 细胞种到 96 孔板, 实验分为空白组, 模型组(LPS 组),

SNS 不同质量浓度组 (5, 10, 20, 40, 80, 100, 200, 400 mg·L⁻¹), 每组 5 个复孔。空白组用普通的完全培养基培养; LPS 组加入终质量浓度为 100 μg·L⁻¹ 的 LPS 培养 24 h; SNS 各质量浓度组使用含有 5, 10, 20, 40, 80, 100, 200, 400 mg·L⁻¹ 的 SNS 完全培养基培养 24 h, 再加入终质量浓度为 100 μg·L⁻¹ 的 LPS 培养 24 h。各孔中加入 MTT 母液(终质量浓度为 0.5 g·L⁻¹), 检测方法同 2.3 项。细胞存活率 = 各浓度给药组的平均 A/空白组的平均 A × 100%。

2.5 光镜下观察 SNS 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分化的影响 按照 2.3 项的种板步骤, 将 RAW264.7 细胞按照每孔 500 μL 的量接种到 24 孔板中, 每个组设定 4 个复孔。空白组用普通的全培养基; LPS 组加入终质量浓度为 100 μg·L⁻¹ 的 LPS 培养 24 h; SNS 低、中、高质量浓度组先使用含有 10, 20, 40 mg·L⁻¹ 的 SNS (根据 2.4 项的 MTT 结果筛选出来) 完全培养基培养 24 h, 再加入终质量浓度为 100 μg·L⁻¹ 的 LPS 培养 24 h。最后在倒置光学显微镜下观察和比较各组细胞形态学变化。

2.6 ELISA 检测 M1/M1 表型细胞因子的释放水平 按照 2.5 项的步骤将细胞接种到 24 孔板中, 分组和给药(给药浓度根据 2.4 项的 MTT 结果筛选出来) 同 2.5 项。最后留取各组培养上清, 根据 ELISA 试剂盒说明书的操作方法检测 TNF-α, IL-6, Arg-1, IL-10 细胞因子的释放水平。

2.7 Real-time PCR 法检测 M1/M2 表型细胞因子的表达水平 按照 2.5 项的步骤将细胞接种到 6 cm 的培养皿中, 分别为空白组, 模型组(LPS), SNS 低、中、高质量浓度组。空白组予以完全培养基培养。SNS 组分别予以终质量浓度为 10, 20, 40 mg·L⁻¹ 的 SNS (给药浓度根据 2.4 项的 MTT 结果筛选出来) 完全培养基培养 12 h 后, 加入含有终质量浓度为 100 μg·L⁻¹ 的 LPS, 继续培养 12 h。LPS 组予以含有 LPS 终质量浓度为 100 μg·L⁻¹ 的全培养基培养 12 h。弃掉各组培养基, 加入冷 PBS, 清洗细胞 2 次, 加入 trizol 1 mL 吹打细胞使其脱落, 收集 trizol 放入 1.5 mL 离心管, -80 °C 保存。进行总 RNA 提取, 逆转录(反应条件为 30 °C 10 min, 42 °C 30 min, 99 °C 5 min, 4 °C 5 min), Real-time PCR 扩增(反应条件为预变性为 95 °C 10 min; 扩增循环为 95 °C 15 s, 再降温到 60 °C, 60 s, 此升降温共循环 40 次; 溶解曲线分析为 95 °C, 升温速度为每 15 s 升温 0.3 °C)。根据最后得出的荧光曲线, C_t 值分析各目的基因在不同处理细胞中的相对比值。引物序列见表 1,

β -肌动蛋白(β -actin)作为内标基因。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 的相对表达。

表 1 PCR 各引物序列

Table 1 Primer sequences for PCR

名称	序列(5'-3')	长度 /bp
IL-6	上游 CCCCAATTTCCAATGCTCTCC	141
	下游 CGCACTAGGTTTGCCGAGTA	
TNF- α	上游 TGGAAGTGGCAGAAGAGGCAC	205
	下游 AGGCTCTGGGCCATAGAACTGA	
Arg-1	上游 ATCAAGACTCCCTGACAACCA	225
	下游 TTCCATCACCTTGCCAATCC	
IL-10	上游 GCGCTGTCATCGATTTCTCC	141
	下游 CATGGCCTTGTAGACACCTTGG	
β -actin	上游 GTGACGTTGACATCCGTAAGA	287
	下游 GTAACAGTCCGCCTAGAAGCAC	

2.8 统计学分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 21.0 软件使用 One-way ANOVA 的统计学方法对实验数据进行统计,用 Graphpad Prism 5.0 作图, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度 SNS 对细胞活力的影响 与空白组比较, SNS 在 5, 10, 20, 40, 80, 100, 200, 400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, SNS 干预 RAW264.7 细胞 48 h, 细胞活力无明显变化, 提示 SNS 并不影响 RAW264.7 细胞的存活率。见表 2。

表 2 SNS 对 RAW264.7 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of SNS on RAW264.7 cell viability ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	存活率/%
空白	-	103.5 \pm 11.58
SNS	5	108.8 \pm 8.00
	10	112.2 \pm 6.61
	20	109.4 \pm 9.11
	40	109.4 \pm 7.94
	80	108.3 \pm 3.79
	100	104.6 \pm 12.07
	200	103.4 \pm 1.55
	400	105.4 \pm 3.74

3.2 SNS 对 LPS 诱导细胞增殖的影响 与空白组比较, LPS 显著诱导 RAW264.7 细胞增殖 ($P < 0.01$)。与 LPS 组比较, 不同质量浓度 SNS (10, 20,

40, 80, 100, 200, 400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 给药 48 h, 可抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞增殖 ($P < 0.05$)。该抑制作用在 SNS 质量浓度为 5 ~ 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 呈现出浓度依赖性。见表 3。

表 3 SNS 对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

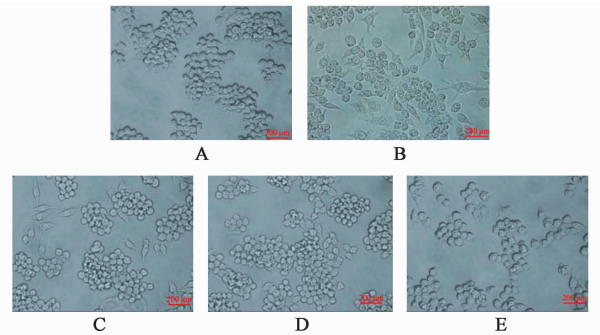
Table 3 Effect of SNS on RAW264.7 cell proliferation induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	存活率/%
空白	-	103.2 \pm 4.84
LPS	-	128.6 \pm 6.00 ²⁾
SNS	5	116.5 \pm 8.43 ³⁾
	10	113.2 \pm 5.91 ³⁾
	20	108.9 \pm 5.26 ³⁾
	40	104.9 \pm 3.08 ³⁾
	80	106.6 \pm 2.62 ³⁾
	100	106.7 \pm 3.20 ³⁾
	200	107.1 \pm 2.49 ³⁾
	400	106.0 \pm 4.69 ³⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 LPS 组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3 ~ 5 同)。

3.3 SNS 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞分化的影响

LPS 干预 24 h 促进 RAW264.7 细胞分化, 光镜下细胞伪足增加, 细胞形态从空白组亮晶晶的圆形变为 LPS 组有触角的 polygonal、星形或者梭形。同时, 提前用不同质量浓度 SNS (10, 20, 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 干预的 RAW264.7 细胞长角和分化状态好转, 细胞多形性的比例降低。见图 1。



A. 空白组; B. LPS 组; C. LPS + SNS 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; D. LPS + SNS 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; E. LPS + SNS 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

图 1 SNS 对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞形态的影响 (倒置显微镜, $\times 400$)

Fig.1 Effect of SNS on RAW264.7 cell morphology induced by LPS (inverted microscope, $\times 400$)

3.4 SNS 对 RAW264.7 细胞相关细胞因子的释放水平的影响 与空白组比较, LPS 干预可诱导 IL-6,

TNF- α , IL-1 β 含量显著增加 ($P < 0.01$), 而在 SNS 预处理 RAW264.7 细胞 24 h 后, 在 LPS 作用下, 与 LPS 组比较, 可明显下调 M1 巨噬细胞表型分泌的促炎因子 TNF- α , IL-1 β , IL-6 水平, 上调 M2 巨噬细胞表型分泌的抗炎因子 IL-10 水平 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 4。

3.5 SNS 对 RAW264.7 细胞 IL-6, TNF- α , IL-10 和

Arg-1 mRNA 水平的影响 与空白组比较, LPS 组 IL-6, TNF- α mRNA 水平显著升高, Arg-1 mRNA 显著降低 ($P < 0.01$); SNS 在预处理 RAW264.7 细胞 12 h 后, 与 LPS 组比较, 可明显下调 M1 巨噬细胞表型分泌的促炎因子 IL-6, TNF- α 的 mRNA 水平, 上调 M2 巨噬细胞表型分泌的抗炎因子的 IL-10, Arg-1 的 mRNA 水平 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 5。

表 4 SNS 对 RAW264.7 细胞上清 IL- α , IL-1 β , IL-6 和 TNF- α 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of SNS on level of IL- α , IL-1 β , IL-6 and TNF- α in supernatant of cell culture medium of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

ng · L⁻¹

组别	质量浓度/mg · L ⁻¹	IL-6	TNF- α	IL-1 β	IL-10
空白	-	5.19 ± 5.81	10.62 ± 7.45	4.61 ± 2.93	29.43 ± 5.87
LPS	-	226.43 ± 11.62 ²⁾	1 121.01 ± 89.10 ²⁾	221.81 ± 26.47 ²⁾	45.93 ± 10.56 ²⁾
SNS	10	182.76 ± 18.86 ⁴⁾	891.53 ± 64.66 ⁴⁾	173.82 ± 20.27 ⁴⁾	73.00 ± 3.85 ³⁾
	20	133.32 ± 8.83 ⁴⁾	705.53 ± 110.70 ⁴⁾	139.43 ± 9.02 ⁴⁾	104.10 ± 15.95 ⁴⁾
	40	93.46 ± 20.93 ⁴⁾	614.04 ± 37.62 ⁴⁾	83.14 ± 18.31 ⁴⁾	124.40 ± 6.30 ⁴⁾

表 5 SNS 对 RAW264.7 细胞 IL-6, TNF- α , IL-10 和 Arg-1 mRNA 相对水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of SNS on IL-6, TNF- α , IL-10 and Arg-1 mRNA levels in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/mg · L ⁻¹	IL-6	TNF- α	IL-10	Arg-1
空白	-	1.03 ± 0.14	1.08 ± 0.15	1.73 ± 0.24	1.04 ± 0.12
LPS	-	105.00 ± 16.8 ²⁾	7.49 ± 0.91 ²⁾	1.74 ± 0.39	0.56 ± 0.11 ¹⁾
SNS	10	55.33 ± 8.82 ⁴⁾	5.51 ± 0.53 ⁴⁾	2.90 ± 0.30 ³⁾	1.54 ± 0.26 ³⁾
	20	36.53 ± 3.98 ⁴⁾	4.68 ± 0.59 ⁴⁾	3.82 ± 0.34 ⁴⁾	2.22 ± 0.30 ⁴⁾
	40	32.08 ± 2.38 ⁴⁾	4.08 ± 0.45 ⁴⁾	5.27 ± 0.68 ⁴⁾	3.83 ± 0.72 ⁴⁾

4 讨论

AS 进一步进展可发生急性心肌梗塞或脑血管意外, 是导致人类死亡和残疾的主要原因之一, 故对其进行早期干预具有积极意义^[13]。目前普遍认为单核巨噬细胞是 AS 发展过程中炎症反应的中心参与者, 其参与到 AS 病变开始, AS 斑块扩大和坏死, 及斑块破裂的全过程中^[14]。在 AS 早期, 巨噬细胞可通过触发自身的凋亡, 降低损伤的巨噬细胞数量来减少局部斑块形成; 然而在 AS 晚期阶段, 凋亡巨噬细胞的吞噬作用受损, 导致继发性坏死和大量的促炎因子释放, 促使局部 AS 斑块坏死^[15]。巨噬细胞在 AS 表现出表型的异质性和可塑性, 多种刺激, 包括细胞因子、趋化因子和修饰脂蛋白, 皆可动态调节巨噬细胞的表型。一般来说, M1 表型的巨噬细胞可促进 AS 发生, 而 M2 表型的巨噬细胞可抑制局部 AS 斑块的进展^[16]。这两种亚型可以在一定条件下相互转化, 共同调控 AS 的进程。故寻找靶向调节 AS 中 M1/M2 亚型平衡的药物是 AS 治疗

的新方向。

如前言提及, SNS 具有多种药理学活性, 其对多种炎症相关性疾病具有良好的调控功能。SNS 由北柴胡、白芍、枳实、炙甘草 4 味中药组成。北柴胡味苦辛, 入肝胆经, 疏肝解郁; 白芍味酸苦, 入肝脾经, 养肝敛阴, 调和营卫; 枳实味苦辛, 入脾经, 行气疏肝; 炙甘草甘平, 入心脾经, 补脾益气。既往研究表明北柴胡中的主要活性成分三萜皂苷对炎性渗出、炎症介质释放、白细胞游走等皆有保护作用^[17]; 枳实中的总黄酮、橙皮苷具有抗炎、抗氧化等作用^[18]; 白芍中白芍总苷可抑制巨噬细胞的 iNOS 表达抑制炎症反应^[19]; 甘草酸苷可下调多种炎症因子水平, 减轻细胞损伤和凋亡^[20]。本研究从巨噬细胞极化的角度出发探讨 SNS 的炎症调节作用。笔者使用 LPS 作为炎症诱导剂诱导 RAW264.7 细胞产生一系列炎症反应。LPS 干预 RAW264.7 细胞 24 h 后, 细胞增殖明显, 说明炎症免疫反应受到了激活, 但 SNS 可浓度依赖性地抑制 LPS 诱导的细胞增殖。此外,

LPS 干预组的 RAW264.7 细胞形态发生改变,表现为细胞触角增多,多形性改变等,这提示 LPS 可诱导巨噬细胞分化。但与其比较,SNS 处理组的细胞多形性改变减少,表明 SNS 可浓度依赖性抑制 LPS 诱导的细胞分化。数据表明 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 LPS 刺激 RAW264.7 细胞 24 h 后,细胞可分泌大量的 IL-6, TNF- α , IL-1 β 炎症细胞因子。IL-6, TNF- α , IL-1 β 细胞因子主要是 M1 表型巨噬细胞的标记分子,本研究结果提示 SNS 可浓度依赖性抑制 LPS 诱导的 M1 表型炎症因子的释放,说明其对巨噬细胞向 M1 表型极化有抑制作用。M2 型巨噬细胞可分泌 IL-10 和 Arg-1 等细胞因子,下调炎症反应和免疫应答。笔者的结果提示, SNS 可浓度依赖性地上调 IL-10 的释放水平,增加 IL-10 和 Arg-1 的 mRNA 含量,表现为促进巨噬细胞向 M2 表型极化的抗炎作用。

综上所述,AS 的发生发展与巨噬细胞 M1/M2 表型极化不平衡有关,而笔者的实验结果提示 SNS 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 M1 表型极化具有显著抑制作用,对 M2 表型极化则具有促进作用,提示调节巨噬细胞的 M1/M2 亚型平衡可能是 SNS 保护 AS 的一个药理机制, SNS 可能通过该作用起到减少 AS 斑块浸润,进一步抑制 AS 的发生发展,有必要在动物上对其作用进行更深入的研究。此外, SNS 具体作用于哪些信号通路值得进一步深入探讨。

[参考文献]

[1] 胡斌,匡海学,辛运杰,等. 大蒜降血脂作用及机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(8):181-186.

[2] Zuzarte P, Duong A, Figueira M L, et al. Current therapeutic approaches for targeting inflammation in depression and cardiovascular disease[J]. *Curr Drug Metab*, 2018,19(8):674-687.

[3] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等. 《中国心血管病报告 2017》概要[J]. 中国循环杂志,2018,33(1):1-8.

[4] de Gaetano M, Crean D, Barry M, et al. M1-and M2-type macrophage responses are predictive of adverse outcomes in human atherosclerosis[J]. *Front Immunol*, 2016, doi: 10.3389/fimmu.2016.00275.

[5] Moore K J, Sheedy F J, Fisher E A. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance[J]. *Nat Rev Immunol*,2013,13(10):709-721.

[6] Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease[J]. *J Cell Physiol*,2018,233(9):6425-6440.

[7] Sica A, Erreni M, Allavena P, et al. Macrophage

polarization in pathology[J]. *Cell Mol Life Sci*,2015,72(21):4111-4126.

[8] FAN H J, XIE Z P, LU Z W, et al. Anti-inflammatory and immune response regulation of Si-Ni-San in 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin dysfunction[J]. *J Ethnopharmacol*,2018,222:1-10.

[9] JIANG J, ZHOU C, XU Q. Alleviating effects of si-ni-san, a traditional Chinese prescription, on experimental liver injury and its mechanisms[J]. *Biol Pharm Bull*, 2003,26(8):1089-1094.

[10] Ohta Y, Kobayashi T, Hayashi T, et al. Preventive effect of Shigyaku-san on progression of acute gastric mucosal lesions induced by compound 48/80, a mast cell degranulator, in rats[J]. *Phytother Res*,2006,20(4):256-262.

[11] Tanaka M, Satou T, Koike K. Anxiolytic-like effect of Shigyakusan extract with low side effects in mice[J]. *J Nat Med*,2013,67(4):862-866.

[12] 张婧娴,芮俊乾,陈逸凡,等. 四逆散有效成分对内脏高敏感大鼠 5-HT 信号通路的多靶点协同调控[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(16):115-123.

[13] Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010[J]. *Lancet*, 2012,380(9859):2095-2128.

[14] YANG S, LI J, CHEN Y, et al. MicroRNA-216a promotes M1 macrophages polarization and atherosclerosis progression by activating telomerase via the Smad3/NF-kappaB pathway[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, doi: 10.1016/j.bbdis.2018.06.016.

[15] WEI Y, ZHU M, Schober A. Macrophage MicroRNAs as therapeutic targets for atherosclerosis, metabolic syndrome, and cancer[J]. *Int J Mol Sci*,2018, doi: 10.3390/ijms19061756.

[16] Peled M, Fisher E A. Dynamic aspects of macrophage polarization during atherosclerosis progression and regression[J]. *Front Immunol*,2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00579.

[17] 陈亚双,孙世伟. 柴胡的化学成分及药理作用研究进展[J]. 黑龙江医药,2014,27(3):630-633.

[18] 张霄潇,李正勇,马玉玲,等. 中药枳实的研究进展[J]. 中国中药杂志,2015,40(2):185-190.

[19] 吴修红,胡妮娜,李宝龙,等. 赤芍与白芍脐中穴给药的药理作用比较研究[J]. 针灸临床杂志,2014,30(5):54-56.

[20] 王颖,韩秀萍. 甘草酸苷作用机制的研究进展[J]. 实用药物与临床,2018,21(1):109-113.

[责任编辑 周冰冰]