

黄连解毒汤调控单核、巨噬细胞及泡沫细胞分化的实验研究

李 彤¹ 韩俊燕¹ 王蓓蓓¹ 陈 冰² 李玉梅² 于志静²
薛 欣² 张剑平¹ 王宪波¹ 曾 辉¹ 马雅奎²

摘要 **目的** 观察黄连解毒汤体内调控载脂蛋白 E 基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠外周血单核细胞亚型分化,黄连解毒汤含药血清体外调控巨噬细胞和泡沫细胞亚型分化的作用。**方法** 将 15 只 ApoE^{-/-} 小鼠随机分为 ApoE^{-/-} 普食组、ApoE^{-/-} 高脂组及 ApoE^{-/-} 高脂加中药治疗组,每组 5 只,分别给予普食及高脂饮食 4 周。5 只 C57BL/6 野生型小鼠作为野生普食对照组, ApoE^{-/-} 高脂加中药组给予黄连解毒汤 5 g/(kg·d)灌胃,其他组给予等量纯净水灌胃。4 周后流式细胞仪检测外周血单核细胞亚型。另选 30 只 SD 大鼠给予黄连解毒汤 5 g/(kg·d)灌胃,每 12 h 1 次,共 5 次,制备黄连解毒汤含药血清。采用 5% 黄连解毒汤含药血清对体外原代骨髓衍生的巨噬细胞(bone marrow-derived macrophage, BMDM)和泡沫细胞分化进行干预,流式细胞仪检测巨噬细胞和泡沫细胞表面受体 CD206 表达(CD206⁺ M2 型)比例;实时定量 PCR 检测巨噬细胞和泡沫细胞 M1 型因子 Nos2 和 M2 型因子 Arg1 的表达。**结果** ApoE^{-/-} 小鼠高脂饮食喂养 4 周后,外周血炎症型单核细胞(Ly6C^{high})比例增高;黄连解毒汤干预可显著降低炎症型单核细胞比例($P < 0.05$)。与对照血清比较,5% 黄连解毒汤含药血清可显著增加 CD206⁺ M2 型 BMDM 的比例($P = 0.034$)。实时定量 PCR 结果显示,含药血清可上调巨噬细胞 M2 亚型基因 Arg1 的表达水平($P < 0.05$),抑制巨噬细胞 M1 亚型基因 Nos2 的表达水平($P = 0.017$)。在 ox-LDL 促进 M2 型泡沫细胞分化的基础上,黄连解毒汤含药血清可进一步提高 CD206⁺ M2 型泡沫细胞比例及 Arg1 的表达($P < 0.01$)。黄连解毒汤含药血清抑制 Th1 因子作用下的 M2 型泡沫细胞向 M1 型逆转,显著提高 Arg1 表达水平,降低 Nos2 表达水平($P < 0.01$)。**结论** 黄连解毒汤能降低高脂导致的 ApoE^{-/-} 小鼠外周血炎症性单核细胞亚群比例;黄连解毒汤含药血清体外促进 M2 型巨噬、泡沫细胞分化。黄连解毒汤可能通过调节单核、巨噬、泡沫细胞的功能性分化,从而减缓、抑制高脂血症引发的 AS 的发生、发展。

关键词 黄连解毒汤;高脂血症/动脉粥样硬化;单核细胞;巨噬细胞;分化

Huanglian Jiedu Decoction Regulated and Controlled Differentiation of Monocytes, Macrophages, and Foam Cells: an Experimental Study LI Tong¹, HAN Jun-yan¹, WANG Bei-bei¹, CHEN Bing², LI Yu-mei², YU Zhi-jing², XUE Xin², ZHANG Jian-ping¹, WANG Xian-bo¹, ZENG Hui¹, and MA Ya-luan² 1 Institute of Infectious Disease, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing (100011), China; 2 Department of Molecular Cell Biology, Institute of Basic Theory on Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100700), China

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Huanglian Jiedu Decoction (HLJDD) in *in vivo* regulating differentiation of monocytes in an apolipoprotein E knockout (ApoE^{-/-}) mouse model, and to observe the effect of HLJDD-containing serum in *in vitro* regulating differentiation of macrophages and foam cells. **Methods** Fifteen apoE^{-/-} mice were randomly divided into the common diet group, the hyperlipidemia group, and the hyperlipidemia + HLJDD treatment group, 5 in each group. Mice in the common diet group were fed with a chow diet. Mice in the hyperlipidemia group were fed with high cholesterol wild

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81072938);北京市自然科学基金资助项目(No.7102119)

作者单位:1.首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所(北京 100011);2.中国中医科学院中医基础理论研究所分子生物学实验室(北京 100700)

通讯作者:马雅奎, Tel: 010-64014411 转 2505, E-mail: yaluanma@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.09.1096

diet (WD). Those in the hyperlipidemia + HLJDD treatment group were fed with high cholesterol WD supplemented with HLJDD. All mice were fed for 4 weeks. Five C57BL/6 wild types were recruited as the wild common diet control group. HLJDD was administered to mice in the hyperlipidemia + HLJDD treatment group by gastrogavage at the daily dose of 5 g/kg. Equal volume of purified water was given by gastrogavage to mice in the rest 3 groups. Four weeks later, subtypes of monocytes in the peripheral blood were detected by FACS. HLJDD administered to another 30 SD rats by gastrogavage at the daily dose of 5 g/kg, once for every 12 h for 5 times in total, thereby preparing 5% HLJDD containing serum to intervene the differentiation of *in vitro* primary bone marrow-derived macrophage (BMDM) and foam cells. The M2 subtype surface receptor CD206 of macrophages and foam cells were detected by FACS. The expression of Nos2 and Arg1 genes were assayed by Real-time PCR. Results The ratio of inflammatory subset of monocytes (Ly6C^{high}) increased in the peripheral blood after ApoE^{-/-} mice were fed with high fat diet for 4 weeks. HLJDD significantly decreased the ratio of inflammatory subset of monocytes ($P < 0.05$). Compared with the vehicle serum, 5% HLJDD containing serum significantly increased differentiation of CD206⁺ M2 BMDM ($P = 0.034$). Results of real-time quantitative PCR showed that the expression level of Arg1 mRNA could be up-regulated by HLJDD containing serum ($P < 0.05$), and that of Nos2 mRNA down-regulated ($P = 0.017$). ox-LDL induced the differentiation of M2 subtype foam cells from BMDM, and HLJDD containing serum could further elevate the ratio of CD206⁺ M2 foam cells and increase the Arg1 mRNA expression level (both $P < 0.01$). HLJDD containing serum could inhibit the inversion of M2 subtype of foam cells to M1 subtype induced by Th1 factors, significantly elevate the Arg1 mRNA expression level, and decrease the Nos2 mRNA expression level (all $P < 0.01$). Conclusions HLJDD could lower hyperlipidemia induced inflammatory monocyte subtype ratios in the peripheral blood of ApoE^{-/-} mice. HLJDD containing serum promoted *in vitro* differentiation of M2 macrophages and foam cells. HLJDD attenuated and inhibited the occurrence and development of atherosclerosis induced by hyperlipidemia possibly through regulating the functional differentiation of monocytes, macrophages, and foam cells.

KEYWORDS Huanglian Jiedu Decoction; hypercholesterolemia/atherosclerosis; monocyte; macrophage; differentiation

高脂血症/动脉粥样硬化 (hypercholesterolemia/atherosclerosis, AS) 是一种慢性炎症性疾病^[1,2]。单核-巨噬细胞在高血脂引发的 AS 发病过程中起重要作用^[1]。外周血单核细胞在 AS 形成过程中首先被激活,启动天然免疫应答,并进入损伤的血管壁组织中,分化为巨噬细胞,巨噬细胞吞噬脂质,成为泡沫细胞。但单核细胞和巨噬细胞都不是功能均一的群体。单核细胞分为炎症型和定居型 2 个亚群,而巨噬细胞根据激活方式和免疫功能可分化成经典活化型 (classically activated macrophages, M1 型) 和替代活化型 (alternatively activated macrophages, M2 型),在 AS 形成过程中发挥促炎或抗炎的作用^[3,4]。在前期研究中,笔者证实黄连解毒汤干预可减轻高脂饲养的载脂蛋白 E 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠全身炎症反应和血管局部炎症反应,同时增强全身抗炎反应^[5]。本研究在此基础上通过单核-巨噬-泡沫细胞发育的 3 个层次,探讨黄连

解毒汤对于小鼠单核细胞、巨噬细胞和泡沫细胞功能性分化的影响。

材料与方法

1 动物 所有实验用鼠均购于北京大学实验动物中心,动物许可证号:SCXK(京)2011-0012,并饲养于 SPF 条件下。12 周龄的雌性 C57BL/6 野生型小鼠 (5 只),12 周龄雌性 ApoE^{-/-} 小鼠 (15 只),饲养于 SPF 条件下,体重 (20 ± 2) g。雄性 SD 大鼠,30 只,8~12 周龄,体重 (300 ± 50) g。

2 药物、试剂与仪器 黄连解毒汤由黄连、黄芩、黄柏、栀子按 3:2:2:3 比例组成,其药材均购于北京同仁堂药店,按常规方法煎煮取汁,浓缩成相当于黄连解毒汤生药 0.5 g/mL。抗小鼠 CD11b-PerCPy5.5、Gr1-APC、Ly6C-FITC、F4/80-PE 和 CD206-FITC 抗体购于美国 BD Pharmingen 公司;重组小鼠的细胞因子巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony-

stimulating factor, M-CSF)、IFN- γ 和 LPS 购于美国 Peprprotect 公司;油红 O 购于美国 Sigma 公司;RNA 提取试剂盒购于德国 Qiagen 公司;实时荧光定量 PCR 探针 GAPDH、Nos2 和 Arg1 购自美国 Life Technology 公司;逆转录试剂盒和实时荧光定量 PCR 试剂盒购于美国 ABI 公司。FACS Callibur 流式细胞仪为美国 BD 公司产品,实时荧光定量 PCR 仪为美国 ABI 公司产品。

3 体内实验

3.1 动物分组、造模及给药 将 15 只 ApoE^{-/-}小鼠采用配对比较法随机分为 ApoE^{-/-}普食组、ApoE^{-/-}高脂组和高脂加黄连解毒汤组,每组 5 只,分别给予普食和高脂饮食 4 周。高脂饲料含 78.85% 基础饲料,0.15% 胆固醇,21% 脂肪。选 5 只 C57BL/6 野生型小鼠为野生普食对照组;ApoE^{-/-}高脂加黄连解毒汤组同时给予黄连解毒汤 5 g/(kg·d)(相当于临床等效剂量的 10 倍)灌胃,其他组给予等量纯净水灌胃。所有实验独立重复 3 次。

3.2 外周血单核细胞亚群检测 4 周后,异戊烷吸入麻醉下,摘眼球收集 EDTA 抗凝血,外周血加入红细胞裂解液,裂解红细胞后应用抗小鼠 CD11b-PercpCy5.5、Gr1-APC 和 Ly6C-FITC 直接法标记抗体染色,FACS Callibur 流式细胞仪检测外周血单核细胞亚群比例。

4 体外实验

4.1 黄连解毒汤含药血清的制备 30 只 SD 大鼠给予黄连解毒汤 5 g/(kg·d)(相当于临床等效剂量的 10 倍)灌胃,每 12 h 1 次,共 5 次。末次给药后 1 h,无菌取血制备含药血清^[5]。经 56℃ 30 min 灭活,冻存管分装,-20℃ 冰箱保存备用。使用时用 DMEM 培养液稀释成所需浓度。

4.2 巨噬细胞和泡沫细胞的培养及鉴定^[6] 将 6~8 周龄的雄性 C57BL/6 野生型小鼠麻醉后处死。钝性分离股骨和胫骨,用含 2% FBS 的 PBS 冲洗骨髓,制备单细胞悬液。离心收集骨髓细胞,并转移至含 10 ng/mL M-CSF 的培养液中,7 天后即为骨髓衍生的巨噬细胞(bone marrow-derived macrophage, BM-DM)。收集 BMDM,加抗小鼠 F4/80-PE 和 CD11b-Percp-cy5.5 直接法标记抗体染色,FACS Callibur 流式细胞仪检测 F4/80⁺CD11b⁺巨噬细胞比例,F4/80⁺CD11b⁺细胞已达 95% 以上,即巨噬细胞纯度达到培养要求。培养 7 天的 BMDM,加入 50 μ g/mL ox-LDL 继续培养 1 天,得到泡沫细胞。收集泡沫细胞进行油红 O

染色,油镜下观察并鉴定泡沫细胞。

4.3 巨噬细胞和泡沫细胞亚群检测 采用 M-CSF 诱导分化骨髓细胞。为研究黄连解毒汤含药血清对单核细胞向巨噬细胞分化的影响,分离小鼠原代骨髓造血细胞,分别加入对照血清和 5% 黄连解毒汤含药血清诱导分化 7 天成为 BMDM。收集细胞,加抗小鼠 F4/80-PE、CD11b-Percp-cy5.5、CD206-FITC 直接法标记抗体染色,采用 FACS Callibur 流式细胞仪检测细胞表型(F4/80⁺CD11b⁺CD206⁻和 F4/80⁺CD11b⁺CD206⁺)及其比例;裂解细胞,Trizol 法提取总 RNA,逆转录成 cDNA,分别使用 Nos2、Arg1 和 GAPDH 探针进行荧光实时定量 PCR(探针法)检测 M1 型标志基因 Nos2 和 M2 型细胞标志基因 Arg1 的表达。使用 ABI SDS 7500 软件分析结果。分化成熟巨噬细胞及泡沫细胞中分别加入 50 μ g/mL ox-LDL 刺激细胞向 M2 型分化;加入 ox-LDL 的同时加入 Th1 因子(10 ng/mL LPS 和 10 ng/mL IFN- γ)刺激逆转细胞 M2 型分化;大鼠对照血清和 5% 黄连解毒汤含药血清,培养 24 h。收集细胞,处理同上。

5 统计学方法 应用 SPSS 13.0 统计学软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,组间比较采用 SNK 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠外周血单核细胞亚群比例比较(表 1) 饲养 4 周后,无论普食还是高脂喂养,ApoE^{-/-}小鼠外周血 Ly6C^{high} 炎症型单核细胞比例均高于野生型小鼠($P < 0.05$, $P < 0.01$),提示高血脂刺激增加炎症型单核细胞。黄连解毒汤干预高脂喂养的 ApoE^{-/-}小鼠 4 周后,外周血 Ly6C^{high} 单核细胞亚型比例明显低于 ApoE^{-/-}高脂组($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠外周单核细胞亚群比例比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	Ly6C ^{high}	Ly6C ^{low}
野生普食对照	5	12.61 $\pm$ 1.96	87.63 $\pm$ 1.96
ApoE ^{-/-} 普食	5	26.73 $\pm$ 7.02 *	73.27 $\pm$ 7.02 *
ApoE ^{-/-} 高脂	5	36.28 $\pm$ 5.62 **	63.72 $\pm$ 5.62 **
ApoE ^{-/-} 高脂加黄连解毒汤	5	25.27 $\pm$ 5.68 * Δ	74.73 $\pm$ 5.68 * Δ

注:与野生普食组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 ApoE^{-/-}高脂组比较, $\Delta P < 0.05$

2 BMDM 鉴定(图 1) 骨髓来源的单核细胞在 M-CSF 作用 7 天分化成巨噬细胞(图 1A、1B),且 F4/80⁺CD11b⁺巨噬细胞纯度达到 95% 以上(图 1C),提示加入 M-CSF 刺激,骨髓细胞培养 7 天即可分化为成

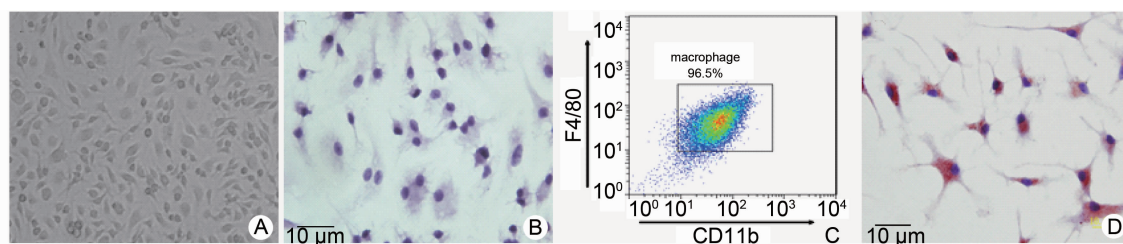
熟的 BMDM。BMDM 加入 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 ox-LDL, 培养 24 h, 经油红 O 染色鉴定为泡沫细胞(图 1D)。

3 两组血清诱导分化的 BMDM CD206⁺M2 型巨噬细胞比例及 Arg1、Nos2 基因表达水平比较(图 2) 骨髓来源的单核细胞分别加入对照血清和 5% 黄连解毒汤含药血清诱导分化 7 天。流式细胞仪检测结果表明, 与对照血清比较, 含药血清显著增加 CD206⁺M2 型 BMDM 的比例($P = 0.034$)。实时定量 PCR 检测结果表明, 含药血清上调巨噬细胞 M2 亚型基因 Arg1 的表达水平($P < 0.05$), 抑制巨噬细胞 M1 亚型基因 Nos2 的表达水平($P = 0.017$)。

4 黄连解毒汤含药血清干预 ox-LDL 诱导形成的泡沫细胞表型及 Arg1、Nos2 表达水平比较(图 3) BMDM 加入 50 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 培养 24 h, BMDM 吞噬 ox-LDL 形成泡沫细胞。ox-LDL 诱导的 CD206⁺ 泡沫细胞比例显著增多($P < 0.01$), 但泡沫细胞内 Arg1 表达显著降低($P < 0.01$), 提示 ox-LDL 诱导的泡沫细胞 M2 型细胞特征进一步增强。在 ox-LDL 诱导形成泡沫细胞过程中, 加入黄连解毒汤含药血清进行干预, 可显著增加 CD206⁺ 泡沫细胞比例及 Arg1 表达水平($P < 0.01$), 提示黄连解毒汤进一步促进 BMDM 向 M2 型泡沫细胞分化。加入 ox-LDL 的同时加入 Th1 因子(10 ng/mL LPS 和 10 ng/mL IFN- γ)

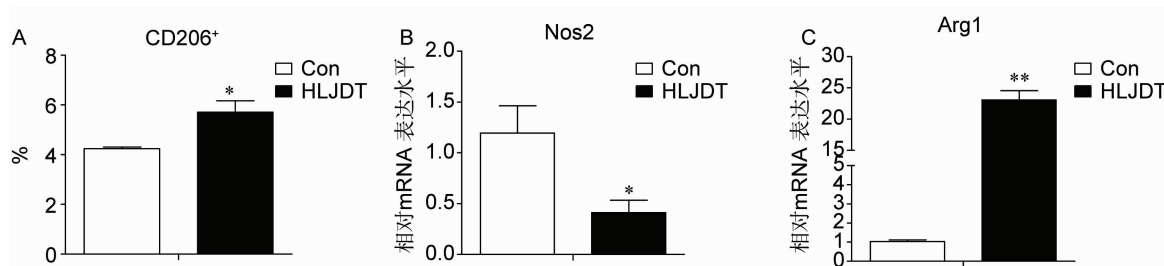
刺激逆转细胞 M2 型分化, 结果表明, 与单加 ox-LDL 相比, LPS 和 IFN- γ 并不显著影响 CD206⁺ 泡沫细胞比例及 Arg1 的表达水平, 但 Nos2 表达明显增多($P < 0.01$); 加入黄连解毒汤含药血清干预后, CD206⁺ 泡沫细胞比例增多, Arg1 的表达增加(均 $P < 0.01$), Nos2 的表达降低($P < 0.01$), 提示 Th1 因子 LPS 和 IFN- γ 不改变泡沫细胞表型, 但可促进 M1 型因子 Nos2 的表达; 黄连解毒汤含药血清不仅抑制 LPS 和 IFN- γ 诱导的 Nos2 的表达, 且上调 CD206⁺ 泡沫细胞比例和 M2 型分子 Arg1 的表达。

5 黄连解毒汤含药血清对泡沫细胞后续分化的影响(图 4) 采用 50 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 作用 24 h, 诱导 BMDM 形成泡沫细胞后, 更换培养液, 加入 50 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL, 对照血清及 5% 含药血清继续培养 24 h。结果发现, 分化成熟泡沫细胞, 继续加入 ox-LDL, CD206⁺ 泡沫细胞比例仍增加($P < 0.01$), 但 Arg1 表达降低($P < 0.01$), Nos2 的表达增加($P < 0.01$), 提示随着 ox-LDL 的进一步作用, 表达 M2 型因子逐渐转向表达 M1 型因子。含药血清干预后 CD206⁺ 泡沫细胞比例进一步增加, 同时 Arg1 的表达增加($P = 0.0071, 0.0041$), Nos2 的表达降低($P < 0.01$), 提示黄连解毒汤含药血清干预促进成熟泡沫细胞继续向 M2 型分化。



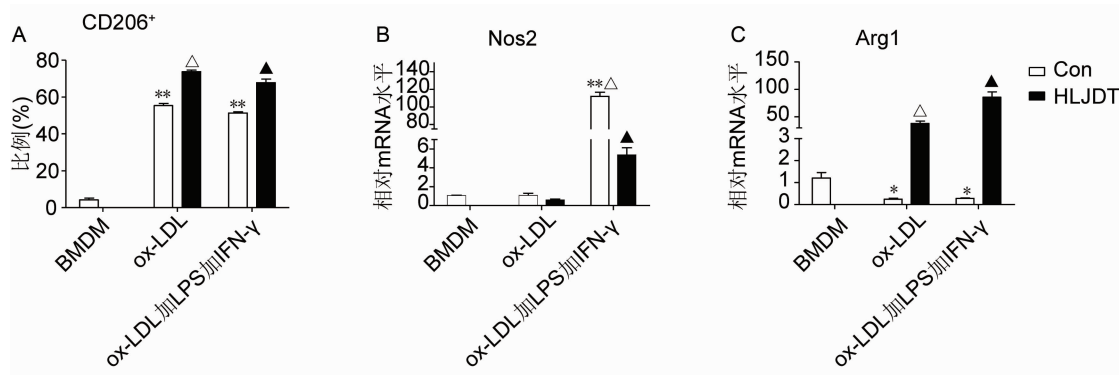
注: A 为倒置显微镜下观察 10 ng/mL 巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)作用 7 天后的巨噬细胞(200 $\times$); B 为巨噬细胞(苏木素单染, $\times 1\,000$); C 为流式细胞仪鉴定培养 7 天后的巨噬细胞纯度; D 为吞噬 50 ng/mL ox-LDL 24 h 形成的泡沫细胞(油红 O 染色, $\times 1\,000$)

图 1 骨髓来源的巨噬细胞和泡沫细胞的鉴定



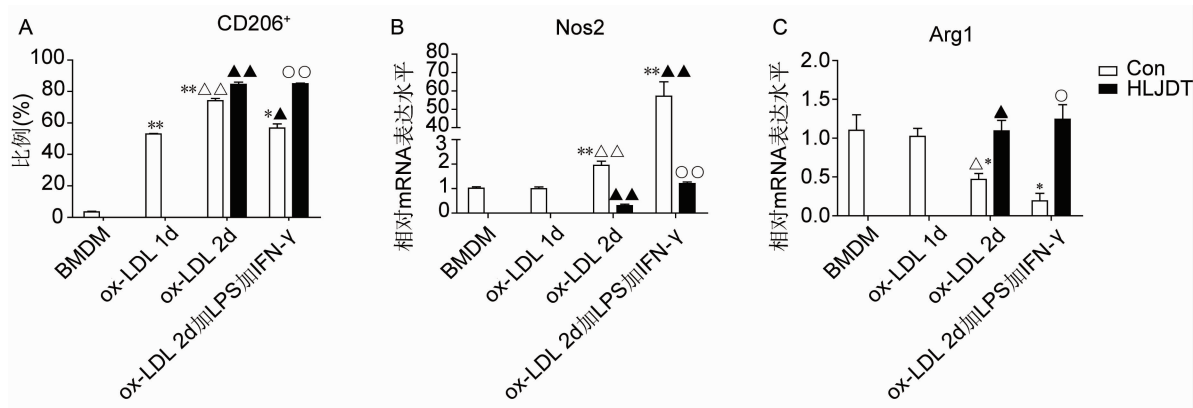
注: 骨髓细胞分别加入大鼠对照血清及 5% 黄连解毒汤含药血清的 M-CSF 培养液, 培养 7 天。A 为流式细胞仪检测 BMDM CD206⁺ 泡沫细胞比例; B、C 为实时定量 PCR 检测 Nos 及 Arg1 的表达水平; Con 为对照血清, HLJDT 为 5% 黄连解毒汤含药血清, 图 3.4 同; 与对照血清比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n \geq 3$)

图 2 两组血清诱导分化的 BMDM CD206⁺M2 型巨噬细胞比例及 Arg1、Nos2 基因表达水平比较



注: BMDM 分别加入 50 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL (ox-LDL), 50 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 及 10 ng/mL LPS 和 10 ng/mL IFN- γ (ox-LDL 加 LPS 加 IFN- γ), 对照血清及 5% 含药血清共培养 24 h; A 为流式细胞仪检测 BMDM CD206⁺ 泡沫细胞比例; B、C 为实时定量 PCR 检测 Nos2 和 Arg1 的表达水平; 与对照血清比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与单加 ox-LDL 的对照血清比较, $\Delta P < 0.01$; 与同时加 ox-LDL 和 LPS 及 IFN- γ 的对照血清比较, $\blacktriangle P < 0.01$ ($n \geq 3$)

图3 黄连解毒汤含药血清干预 ox-LDL 诱导形成的泡沫细胞类型及 Arg1、Nos2 表达水平比较



注: BMDM 加入 50 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 24 h (ox-LDL 1d) 分化成泡沫细胞, 换液后分别加入 50 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL (ox-LDL 48 h), 50 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 及 Th1 因子 10 ng/mL LPS 和 10 ng/mL IFN- γ (ox-LDL 48 h 加 LPS 加 IFN- γ), 对照血清及 5% 含药血清继续共培养 24 h; A 为流式细胞仪检测 BMDM CD206⁺ 泡沫细胞比例; B、C 为实时定量 PCR 检测 Nos2 和 Arg1 的表达水平; 与对照血清比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与单加 ox-LDL 24 h 的对照血清比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与单加 ox-LDL 48 h 的对照血清比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$; 与同时加 ox-LDL 48 h 和 Th1 因子 LPS 和 IFN- γ 24 h 对照血清比较, $\circ P < 0.05$, $\circ\circ P < 0.01$ ($n \geq 3$)

图4 黄连解毒汤含药血清对成熟泡沫细胞后续分化的长期影响

在上述培养体系中加入 Th1 因子 LPS 和 IFN- γ 作用 24 h, 发现 CD206⁺ 泡沫细胞比例显著降低 ($P < 0.01$), Nos2 的表达显著增多 ($P < 0.01$)。同时加入含药血清干预后, CD206⁺ 泡沫细胞比例和 Arg1 的表达显著增加 ($P < 0.01$), Nos2 的表达显著降低 ($P < 0.01$), 提示 LPS 和 IFN- γ 能抑制成熟泡沫细胞进一步向 M2 型分化; 黄连解毒汤含药血清干预能逆转这种变化。

讨 论

单核-巨噬细胞通过促进炎症和脂质沉积在 AS 发生、发展过程中发挥极其重要的作用。单核细胞和

巨噬细胞, 根据表面标志、激活方式和免疫功能可分化 2 个亚群^[3, 4]。单核细胞分为炎症型和定居型两群; 巨噬细胞分为经典活化型 (M1 型) 和替代活化型 (M2 型) 两类。正常生理状态下, 单核-巨噬细胞的分化过程为炎症型单核细胞 (Ly6C^{high}) → 定居型单核细胞 (Ly6C^{low}) → 组织巨噬细胞。在 AS 的发生、发展过程中, 单核-巨噬细胞不仅数目增多, 其分化途径也发生改变^[7, 8]。正常动脉组织中巨噬细胞极为少见, 而 AS 斑块存在大量巨噬细胞^[9], 并且直接来源于炎症型单核细胞^[10, 11]。本研究采用 ApoE^{-/-} 小鼠, 辅以高脂饮食, 在 4 周内观察到外周血炎症型单核细胞比例显著增多, 这与高血脂在骨髓造血早期影响单核系统造

血的报道一致^[12]。

单核细胞在 M-CSF 作用下,增殖、分化成巨噬细胞,维持 AS 斑块内巨噬细胞存活需要 M-CSF^[13]。在 AS 发生、发展过程中,巨噬细胞依据 AS 进展病变状况极化成 M1 或 M2 型,如不稳定斑块组织中主要以 M1 型巨噬细胞为主^[14],而稳定斑块组织中 M2 型巨噬细胞比例增多^[15]。巨噬细胞吞噬 ox-LDL 成为泡沫细胞,M2 型巨噬细胞较 M1 型更容易吞噬 ox-LDL^[16]。吞噬 ox-LDL 促进 M2 型巨噬细胞分泌炎症因子 MCP-1^[17],并导致 M2 型巨噬细胞及泡沫细胞的凋亡^[16]。研究表明,ox-LDL 刺激 24 h,促使巨噬细胞向 M2 型分化。但随着 ox-LDL 刺激时间延长,M2 型巨噬细胞逐渐向 M1 型转变,并且在 LPS 和 IFN- γ 模拟的炎症环境条件下,巨噬细胞的 M1 型转变更为显著。可见长期的 ox-LDL 和炎症刺激,诱导泡沫细胞的免疫平衡由 M2 逐渐向 M1 倾斜。在本研究检测中,CD206 和 Arg1 变化不显著,而 Nos2 上升是这一过程的重要表现之一。

在体实验观察到肥胖或 AS 斑块形成过程中,斑块内巨噬细胞以 M1 型为主^[9,14,18]。笔者认为这可能是由于长期的 ox-LDL 刺激,加上大量的炎症因子导致的炎症环境,改变了单核细胞成熟的正常微环境,不仅使单核细胞的分化倾向于炎症型,而且炎症型单核细胞直接进入组织分化为 M1 型巨噬细胞^[19,20]。也有文献报道,ox-LDL 的脂毒性可促进 M2 型巨噬细胞凋亡,致使 M1 型巨噬细胞比例增多^[21,22]。不断积累的结果,最终导致斑块内巨噬细胞分化逐渐转向 M1 型。

黄连解毒汤近年来老药新用,作为预防和治疗 AS 应用于临床^[23-25]。笔者发现,黄连解毒汤干预可在多个阶段影响单核-巨噬细胞的免疫极性。首先,黄连解毒汤在体内可显著降低 Ly6C^{high} 炎症型单核细胞比例,可能进一步降低 AS 斑块内巨噬细胞的来源;其次,在单核细胞向巨噬细胞、巨噬细胞向泡沫细胞分化两个阶段,黄连解毒汤含药血清可促进巨噬细胞向 M2 型分化,这有可能有利于 AS 斑块的稳定;另外,黄连解毒汤含药血清可抑制 Th1 因子诱导的 M1 型炎症反应,提示当 AS 斑块有炎症因素刺激时,黄连解毒汤含药血清可能通过减轻 M1 型炎症反应,抑制不稳定斑块的发生。

研究发现,黄连解毒汤含药血清的作用靶点非常广泛,贯穿单核-巨噬细胞发育过程的始终,这与黄连解毒汤经典的抗炎作用相符。同时,前期体内研究发现,黄连解毒汤对于 ApoE^{-/-} 小鼠全身性炎症反应和

血管局部反应均有一定的抑制作用。但在体内黄连解毒汤抑制 M1 型炎症反应的作用更为显著。笔者推测这可能与体内长期高脂刺激,M1 型反应更为显著有关。

综上所述,黄连解毒汤体内、体外均可调节单核-巨噬细胞的功能分化,在减缓、抑制高脂血症引发的 AS 发生、发展的过程中可能发挥重要的治疗作用。

参 考 文 献

- [1] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease [J]. N Engl J Med, 2005, 352(16): 1685-1695.
- [2] 马雅奎,秦明照,曾辉. 感染与动脉粥样硬化[J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2009, 3(1): 86-91.
- [3] Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity [J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(12): 953-964.
- [4] 马雅奎, 蔺洁, 秦明照, 等. 单核-巨噬细胞亚型与动脉粥样硬化[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2010, 4(5): 658-660.
- [5] 马雅奎, 王蓓蓓, 韩俊燕, 等. 黄连解毒汤对高脂饮食 apoE^{-/-} 小鼠全身和主动脉血管局部免疫反应影响的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(11): 1551-1556.
- [6] Waldo SW, Li Y, Buono C, et al. Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques [J]. Am J Pathol, 2008, 172(4): 1112-1126.
- [7] Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis [J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27: 165-197.
- [8] Woollard KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions [J]. Nat Rev Cardiol, 2010, 7(2): 77-86.
- [9] Waldo SW, Li Y, Buono C, et al. Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques [J]. Am J Pathol, 2008, 172(4): 1112-1126.
- [10] An G, Wang H, Tang R, et al. P-selectin glycoprotein ligand-1 is highly expressed on Ly-6Chi monocytes and a major determinant for Ly-6Chi monocyte recruitment to sites of atherosclerosis in mice [J]. Circulation, 2008, 117(25): 3227-3237.
- [11] Swirski FK, Libby P, Aikawa E, et al. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata [J]. J Clin Invest, 2007, 117(1):

- 195 – 205.
- [12] Murphy AJ, Akhtari M, Tolani S, et al. ApoE regulates hematopoietic stem cell proliferation, monocytosis, and monocyte accumulation in atherosclerotic lesions in mice [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(10): 4138 – 4149.
- [13] Takahashi K, Takeya M, Sakashita N. Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals [J]. *Med Electron Microsc*, 2002, 35(4): 179 – 203.
- [14] Mosig S, Rennert K, Krause S, et al. Different functions of monocyte subsets in familial hypercholesterolemia: potential function of CD14⁺ CD16⁺ monocytes in detoxification of oxidized LDL [J]. *FASEB J*, 2009, 23(3): 866 – 874.
- [15] Bouhlef MA, Derudas B, Rigamonti E, et al. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties [J]. *Cell Metab*, 2007, 6(2): 137 – 143.
- [16] Oh J, Riek AE, Weng S, et al. Endoplasmic reticulum stress controls M2 macrophage differentiation and foam cell formation [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(15): 11629 – 11641.
- [17] van Tits LJ, Stienstra R, van Lent PL, et al. Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated M2 macrophages: a crucial role for Krüppel-like factor 2 [J]. *Atherosclerosis*, 2011, 214(2): 345 – 359.
- [17] Holvoet P, Lee D, Steffes M, et al. Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and incidence of the metabolic syndrome [J]. *JAMA*, 2008, 299(19): 2287 – 2293.
- [19] Sunderkötter C, Nikolic T, Dillon MJ, et al. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response [J]. *J Immunol*, 2004, 172(7): 4410 – 4417.
- [20] Geissmann F, Manz MG, Jung S, et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells [J]. *Science*, 2010, 327(5966): 656 – 661.
- [21] Isa SA, Ruffino JS, Ahluwalia M, et al. M2 macrophages exhibit higher sensitivity to oxLDL-induced lipotoxicity than other monocyte/macrophage subtypes [J]. *Lipids Health Dis*, 2011, 10(229): 1 – 12.
- [22] Prieur X, Mok CY, Velagapudi VR, et al. Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice [J]. *Diabetes*, 2011, 60(3): 797 – 809.
- [23] Cho KH, Kang HS, Jung WS, et al. Efficacy and safety of Chunghyul-dan (Qingwei Dan) in patients with hypercholesterolemia [J]. *Am J Chin Med*, 2005, 33(2): 241 – 248.
- [24] Sekiya N, Kainuma M, Hikiami H, et al. Oren-gedoku-to and Keishi-bukuryo-gan-ryo inhibit the progression of atherosclerosis in diet-induced hypercholesterolemic rabbits [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(2): 294 – 298.
- [25] Sekiya N, Kogure T, Kita T, et al. Reduction of plasma triglyceride level and enhancement of plasma albumin concentration by Oren-gedoku-to administration [J]. *Phytomedicine*, 2002, 9(5): 455 – 460.

(收稿:2013-05-06 修回:2014-06-15)

欢 迎 投 稿 欢 迎 订 阅