

· 基础研究 ·

黄连解毒汤含药血清调控中性粒细胞功能的实验研究

孙慧娟¹ 朱鏐雯^{2,3} 李蕊^{2,3} 曾辉^{2,3} 马雅奎¹

摘要 目的 观察黄连解毒汤含药血清对体外调控中性粒细胞功能的影响。方法 20 只 SD 大鼠每天给予黄连解毒汤 5 g/kg 灌胃,每 12 小时 1 次,共 5 次,制备黄连解毒汤含药血清。采用流式细胞仪分选 C57 BL/6 小鼠骨髓和外周血中性粒细胞,给予不同剂量的黄连解毒汤含药血清和脂多糖(LPS)刺激 3 h,采用实时荧光定量 PCR 检测中性粒细胞炎症细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-1 β 、IL-6 及 IL-12b 表达,确定 10% 黄连解毒汤含药血清为最佳剂量。将 10% 黄连解毒汤含药血清用于干预活化的中性粒细胞功能:(1) 中性粒细胞给予佛波醇 12-十四酸酯 13-乙酸酯(PMA)刺激 5 min,流式细胞仪检测骨髓中性粒细胞产生活性氧(ROS)情况;(2) 中性粒细胞给予 LPS 刺激 3 h,采用 PicoGreen dsDNA 定量检测试剂盒检测培养上清游离 DNA(cf-DNA)的含量;(3) 免疫荧光法检测中性粒细胞形成的中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)情况;(4) 中性粒细胞给予趋化因子 CXCL2、CXCL10、CCL3 诱导 3 h,流式细胞仪检测趋化的中性粒细胞数量;(5) 中性粒细胞给予 LPS 刺激 20 h,流式细胞仪检测外周血中性粒细胞凋亡情况。结果 PMA 刺激中性粒细胞使 ROS 显著增多($P < 0.05$);LPS 刺激 3 h,中性粒细胞产生的 cf-DNA 含量增多,NETs 形成增加,CXCL2、CXCL10、CCL3 使中性粒细胞趋化增多($P < 0.05$, $P < 0.01$);LPS 刺激 20 h 后,外周血中性粒细胞凋亡减少($P < 0.05$);10% 黄连解毒汤含药血清可减少 ROS 产生,降低 cf-DNA 含量和 NETs 形成,减少中性粒细胞趋化,促进中性粒细胞凋亡($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 黄连解毒汤可调节中性粒细胞功能。

关键词 黄连解毒汤;炎症因子;中性粒细胞

Effect of Huanglian Jiedu Decoction Containing Serum on the Function of Neutrophils SUN Huijuan¹, ZHU Liu-luan^{2,3}, LI Rui^{2,3}, ZENG Hui^{2,3}, and MA Ya-luan¹ 1 Institute of Basic Theory, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100700); 2 Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing (100015); 3 Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing (100015)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Huanglian Jiedu Decoction (HLJDD) containing serum on neutrophil function *in vitro*. **Methods** Totally 20 SD rats were administered with HLJDD (5 g/kg) by gastrogavage once every 12 h for a total of 5 times to prepare HLJDD containing serum. The neutrophils of bone marrow and peripheral blood of C57BL/6 mice were sorted by flow cytometry. The neutrophils were stimulated with different doses of HLJDD containing serum and lipopolysaccharide (LPS) for 3 h. Real-time PCR was used to detect the expressions of TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-12 of neutrophils, and the optimal dose of HLJDD containing serum (10%) was obtained. 10% HLJDD containing serum was used to intervene the function of activated neutrophils. (1) After stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) for 5 min, reactive oxygen species (ROS) of bone marrow granulocytes were detected by flow cytometry. (2) After stimulated with LPS for 3 h, cf-DNA content in the culture supernatant was detected by PicoGreen dsDNA method. (3) The formation of neutrophil extracellular traps (NETs) of granulocytes was

基金项目: 中国中医科学院自主选题研究项目(No. YZ-1702; No. YZ-1814)

作者单位: 1. 中国中医科学院中医基础理论研究所(北京 100700); 2. 首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所(北京 100015); 3. 新发突发传染病研究北京市重点实验室(北京 100015)

通讯作者: 马雅奎, 010-64089027, E-mail: yaluanma@163.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20200717. 315

detected by immunofluorescence. (4) After induced with chemokines CXCL2, CXCL10, and CCL3 for 3 h, the numbers of chemotactic neutrophils were detected by flow cytometry. (5) After stimulated with LPS for 20 h, the apoptosis of peripheral blood neutrophils was detected by flow cytometry. **Results** PMA stimulated neutrophils to significantly increase ROS production ($P < 0.05$). After stimulation by LPS for 3 h, the production of cf-DNA in neutrophils and the formation of NETs were increased. CXCL2, CXCL10 and CCL3 increased neutrophils chemotaxis ($P < 0.05$, $P < 0.01$). After stimulation by LPS for 20 h, the apoptosis of peripheral blood neutrophils was decreased ($P < 0.05$). And 10% HLJDD containing serum reduced ROS production, decreased cf-DNA content and NETs formation, reduced the chemotaxis, and promoted apoptosis of neutrophils ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** HLJDD regulated the function of neutrophils.

KEYWORDS Huanglian Jiedu Decoction; inflammatory factor; neutrophil

高脂血症 (hyperlipidemia, HP)/动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 不仅是代谢性疾病,同时也是慢性系统性炎症疾病^[1]。既往研究证实多种免疫细胞,特别是单核—巨噬细胞,参与了 HP 引发的炎症反应^[2]。

近期,中性粒细胞在 AS 的炎性病变中的作用,受到了高度重视^[2]。中性粒细胞是固有免疫中参与炎症反应的重要效应细胞,占人体外周血白细胞 40%~75%^[3]。中性粒细胞可黏附于血管内皮,通过呼吸爆发引发氧化应激,导致内皮功能障碍和血管炎症^[4];还可通过分泌炎症细胞因子,募集和激活单核细胞等免疫细胞,放大炎症反应^[2,3]。有研究发现,中性粒细胞胞外诱捕网 (neutrophil extracellular traps, NETs) 可激活浆细胞样树突状细胞 (plasmacytoid dendritic cells, pDCs) 分泌干扰素 α (interferon- α , IFN- α), 增加斑块破裂的风险^[5]。

黄连解毒汤 (Huanglian Jiedu Decotion, HLJDD) 作为清热解毒的经典代表方,在预防和治疗 AS 上发挥了重要作用^[6-8]。本课题组在前期研究中,发现 HLJDD 可减轻 ApoE^{-/-} 小鼠全身和血管局部炎症反应^[7],降低炎症型单核细胞的比例,提高 M2 型巨噬细胞比例^[8]。而且,HLJDD 可以降低 ApoE^{-/-} 小鼠外周血中性粒细胞与淋巴细胞比值 (neutrophil to lymphocyte ratio, NLR) 和血浆 NETs 水平^[9],提示 HLJDD 可能通过影响中性粒细胞降低高脂引发的免疫损伤。本实验旨在体外研究 HLJDD 含药血清对中性粒细胞功能的影响。

材料与方法

1 动物 6~8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 20 只,体重 (20 \pm 2)g,动物合格证号:1100111911050036。雄性 SD 大鼠 40 只,8~12 周龄,体重 (300 \pm 50)g,动物合格证号:1100111911013039。均购于北京大学实验动物

中心,动物许可证号:SCXK(京)2017-0018,并饲养于 SPF 条件下,通过中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物福利伦理审查委员会审批(No. 2018-071)。

2 药物 HLJDD 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(使用的药物批号:黄连 20140208、黄芩 20140111、黄柏 109213101、栀子 13121901),按常规方法煎煮取汁,浓缩成相当于 HLJDD 生药 0.5 g/mL。

3 主要试剂及仪器 抗小鼠抗体 CD11b-Per-cp-Cy5.5、CD48-APC、Annexin V-FITC 购于美国 Invitrogen 公司(批号分别为 45-0112-82、17-0481-82、11-8005-74);Gr1-PE、7AAD-Per-cp-Cy5.5 购于美国 BD Pharmingen 公司(批号分别为 553128、51-68981E);兔抗小鼠组蛋白 3 (anti-Histone H3, Hit3)、抗小鼠髓过氧化物酶 (anti-myeloperoxidase, Anti-MPO Biotin)、Alexa Fluor 488 标记的山羊抗兔荧光二抗、Alexa Fluor 555 标记的山羊抗大鼠荧光二抗,购自 Abcam 公司(批号分别为 ab5103、ab90811、ab150077、ab150078);重组小鼠中性粒细胞趋化因子 CXCL2、CXCL10、CCL3 购于美国 PeproTech 公司(批号分别为 250-15、250-16、250-09);细胞凋亡诱导剂 Fas Ligand (Fas L) 购于美国 Enzo 公司(批号:ALX-850-014-K102);抑制蛋白瓜氨酸化的 PAD4 抑制剂、NADPH 氧化酶抑制剂 DPI 购于 Selleck 公司(批号分别为 S8141、S8639);荧光 ROS 探针 DCFH-DA、LPS 购于 Sigma 公司(批号分别为 D-6883、L4319);PMA 购于美国 Invitrogen 公司(批号:00-4975-93);实时荧光定量 PCR 探针甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12b 均由美国 Life Technology 公司合成(批号分别为 Mm99999915_g1、Mm00443260_g1、Mm00434228_m1、Mm00446190_m1、Mm00434174

_m1);RNA 提取试剂盒购于 GeneMark 公司(批号:TR01-150);逆转录试剂盒购于 TaKaRa 公司(批号:RR037A);实时荧光定量 PCR 试剂盒购于 ABI 公司(批号:4369016);流式细胞仪(BD LSR Fortessa、BD FACS Calibur、BD FACS Canto II)购于美国 BD 公司;7500 实时荧光定量 PCR 仪购于美国 ABI 公司。

4 方法

4.1 HLJDD 含药血清的制备 40 只 SD 大鼠随机分为 2 组:对照组和 HLJDD 组,每组各 20 只。对照组大鼠每天给予等量去离子水,HLJDD 组大鼠每天给予 HLJDD 5 g/kg(相当于临床等效剂量)灌胃,每 12 小时 1 次,共 5 次^[10]。末次给药后 1 h,无菌取血制备含药血清。经 56 °C 30 min 灭活,过滤,冻存管分装,-20 °C 冰箱保存备用。使用时用 RPMI 1640 培养液稀释成所需浓度。

4.2 骨髓和外周血中性粒细胞制备和纯度测定

6~8 周龄的雄性 C57BL/6 小鼠,每次 2 只,异氟烷吸入麻醉下摘眼球取血、处死小鼠分离股骨和胫骨,用含 2% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)冲洗骨髓,制备单细胞悬液。用抗小鼠 CD48-APC 标记粒细胞,4 °C 避光,孵育 20 min。采用抗小鼠 CD48 抗体染色,流式细胞仪分选得到骨髓和外周血 CD48⁻的粒细胞,经流式细胞仪鉴定,粒细胞纯度 $\geq 95\%$ 。

4.3 HLJDD 含药血清剂量确定 骨髓来源的中性粒细胞分为对照、LPS 刺激、LPS 加 5%、10% 和 20% 的 HLJDD 含药血清 5 组。中性粒细胞分别在含有对照血清和 5%、10%、20% HLJDD 含药血清的培养基中孵育 1 h,加入 100 ng/mL LPS 刺激 3 h。收集细胞,裂解细胞,TRIzol 法提取总 RNA,逆转录成 cDNA,实时荧光定量 PCR(探针法)检测粒细胞肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-1 β 、IL-6、IL-12b 的表达,使用 ABI SDS 7500 软件分析结果。

4.4 HLJDD 含药血清对中性粒细胞产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)的影响 骨髓单细胞悬液分为对照、PMA 刺激、PMA 加 DPI 和 PMA 加 10% 的 HLJDD 含药血清 4 组。骨髓单细胞悬液分别在含有对照血清、DPI、10% HLJDD 含药血清的培养基中孵育 1 h,加入 0.08 μ mol/L 佛波醇 12-十四酸酯 13-乙酸酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)和 8 pg/mL DCFH-DA,孵育 5 min,用 2% 的多聚甲醛固定 10 min,收集细胞,用抗小鼠 CD11b-PerCP-cy5.5、CD48-APC 和 Gr-1-PE 抗体标记细胞,流式细胞仪测定荧光 ROS 探针 DCFH-DA

氧化后 DCF 的平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)即中性粒细胞的 ROS 水平。

4.5 HLJDD 含药血清对中性粒细胞生成游离 DNA(cell free-DNA, cf-DNA)和 NETs 的影响 分别将骨髓和外周血来源的中性粒细胞分为对照、LPS 刺激、LPS 加 PAD4 抑制剂和 LPS 加 10% 的 HLJDD 含药血清 4 组。骨髓和外周血中性粒细胞分别在含有对照血清、PAD4 抑制剂、10% HLJDD 含药血清的培养基中孵育 1 h,加入 100 ng/mL LPS 刺激 3 h:(1) PicoGreen dsDNA 定量检测试剂盒检测骨髓中性粒细胞培养上清中 cf-DNA 的含量;(2)按照 Brinkmann V 等^[11]的方法,用抗小鼠瓜氨酸化组蛋白 Hit3、抗小鼠髓过氧化物酶 MPO 和 DAPI 染色,免疫荧光法检测外周血中性粒细胞形成 NETs 的水平。

4.6 HLJDD 含药血清对中性粒细胞趋化的影响 骨髓单细胞悬液分为对照、CXCL2/CXCL10/CCL3 刺激(趋化因子组)和 CXCL2/CXCL10/CCL3 加 10% HLJDD 含药血清(趋化因子+10% HLJDD)组。骨髓单细胞悬液预先分别在含有对照血清和 10% HLJDD 含药血清的培养基中孵育 1 h,接种于 Transwell 小室,并将 Transwell 小室分别置于含有 100 ng/mL CXCL2、CXCL10、CCL3 培养基的 24 孔板中孵育 3 h,收集趋化至 24 孔板的细胞,用抗小鼠 CD11b-PerCP-cy5.5、CD48-APC 和 Gr-1-PE 抗体标记细胞,流式细胞仪检测的中性粒细胞比例,结合显微镜下细胞计数,得到趋化至下室的中性粒细胞数。

4.7 HLJDD 含药血清对中性细胞凋亡的影响

外周血单细胞悬液分为对照、LPS 刺激、LPS 加 FasL 和 LPS 加 10% HLJDD 含药血清 4 组。外周血单细胞悬液分别预先在含有对照血清、FasL、10% HLJDD 含药血清的培养基中孵育 1 h,100 ng/mL LPS 刺激 20 h,用抗小鼠 CD45-APC-cy7、CD11b-BV510、Gr-1-PE、CD48-PE-cy7、7AAD-percp-cy5.5 和 Annexin V-FITC 抗体标记细胞,流式细胞仪测定凋亡的中性粒细胞。

5 统计学方法 应用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计分析,实验重复 3 次。研究中呈正态分布的数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较,采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

结 果

1 各组中性粒细胞 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 IL-12b 表达比较(表 1) 与对照组比较,LPS 刺激 3 h,中性粒

表 1 各组中性粒细胞 TNF-α、IL-1β、IL-6 及 IL-12b 表达比较 (倍, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | TNF-α | IL-1β | IL-6 | IL-12b |
|---------------|---|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 对照 | 3 | 1.00±0.05 | 1.00±0.11 | 1.00±0.08 | 1.00±0.10 |
| LPS | 3 | 4.04±0.28* | 4.21±0.33* | 9.99±1.03* | 4.19±0.48* |
| LPS+5% HLJDD | 3 | 3.34±0.13 [△] | 3.42±0.38 | 6.61±0.84 [△] | 2.79±0.64 [△] |
| LPS+10% HLJDD | 3 | 2.80±0.09 ^{△△} | 3.30±0.39 [△] | 5.95±0.67 ^{△△} | 2.66±0.47 [△] |
| LPS+20% HLJDD | 3 | 3.95±0.28 | 4.09±0.46 | 9.10±0.35 | 5.50±0.52 [△] |

注:与对照组比较, * $P < 0.01$; 与 LPS 刺激组比较, [△] $P < 0.05$; ^{△△} $P < 0.01$ 。

细胞表达炎性细胞因子 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-12b 显著升高 ($P < 0.01$); 与 LPS 组比较, 5%、10% HLJDD 含药血清干预后 TNF-α、IL-6、IL-12b 显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 10% HLJDD 含药血清干预后 IL-1β 表达降低 ($P < 0.05$), 20% HLJDD 含药血清 IL-12b 表达升高 ($P < 0.05$)。

从 LPS 刺激 3 h 结果来看, 10% HLJDD 含药血清为干预最佳剂量, 作为后续实验使用剂量。

2 各组中性粒细胞产生 ROS 水平比较 (表 2)

与对照组比较, PMA 刺激 5 min 后, 中性粒细胞产生的 ROS 显著增多 ($P < 0.05$), NADPH 氧化酶抑制剂 DPI 和 10% HLJDD 含药血清干预后, 中性粒细胞产生的 ROS 均显著减少 ($P < 0.05$)。

表 2 各组中性粒细胞产生 ROS 水平比较 (MFI, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | ROS |
|----------------|---|--------------------------------|
| 对照 | 3 | 8 684.00±849.49 |
| PMA | 3 | 15 528.50±1875.95* |
| PMA+ DPI | 3 | 9 169.67±817.12 [△] |
| PMA+ 10% HLJDD | 3 | 10 612.00±1231.05 [△] |

注:与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 PMA 刺激组比较, [△] $P < 0.05$

3 各组中性粒细胞培养上清 cf-DNA 含量比较 (表 3)

与对照组比较, LPS 刺激 3 h 后, 骨髓中性粒细胞培养上清中 cf-DNA 含量显著增多 ($P < 0.01$), 抑制蛋白瓜氨酸化的 PAD4 抑制剂和 10% HLJDD 含药血清干预后, 中性粒细胞培养上清中 cf-DNA 含量显著降低 ($P < 0.01$)。

表 3 各组中性粒细胞培养上清 cf-DNA 含量比较 (ng/mL, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | cf-DNA |
|---------------|---|--------------------------|
| 对照 | 3 | 113.45±8.40 |
| LPS | 3 | 170.43±16.91* |
| LPS+PAD4 | 3 | 121.80±6.34 [△] |
| LPS+10% HLJDD | 3 | 112.42±5.04 [△] |

注:与对照组比较, * $P < 0.01$; 与 LPS 刺激组比较, [△] $P < 0.01$

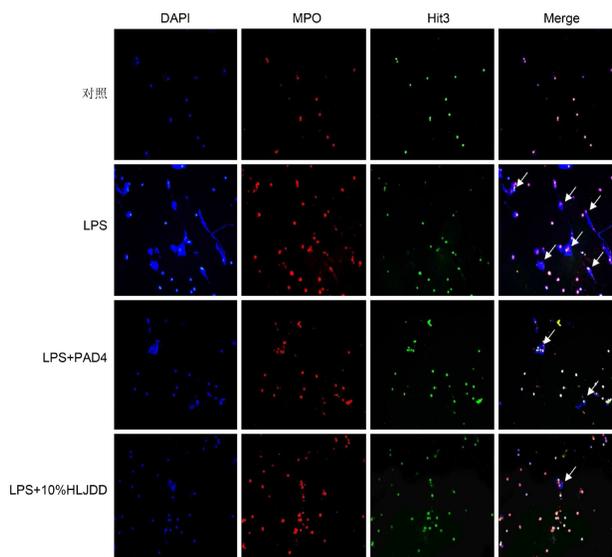
4 10% HLJDD 含药血清对外周血中性粒细胞

形成 NETs 的影响 (图 1) 免疫荧光检测结果显示: LPS 刺激 3 h 后, 外周血中性粒细胞形成的 NETs 显

著增多, PAD4 抑制剂和 10% HLJDD 含药血清能显著抑制中性粒细胞形成 NETs。

5 各组趋化的中性粒细胞数目比较影响 (表 4)

CXCL2、CXCL10 及 CCL3 均能促使中性粒细胞从 Transwell 小室趋化到 24 孔板中 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 10% HLJDD 含药血清减少中性粒细胞的趋化 ($P < 0.01$)。



注:蓝色代表细胞核,红色代表 MPO,绿色代表 Hit3,白色箭头表示形成的 NETs; n 为 3

图 1 10% HLJDD 含药血清对外周血中性粒细胞形成 NETs 的影响 (× 200)

6 10% HLJDD 含药血清对中性粒细胞凋亡的影响 (图 2)

LPS 刺激 20 h 后, 外周血凋亡的中性粒细胞比例显著减少 ($P < 0.05$), 细胞凋亡诱导剂 Fas L 和 10% HLJDD 含药血清干预后, 外周血凋亡的中性粒细胞比例显著增多 ($P < 0.05$)。

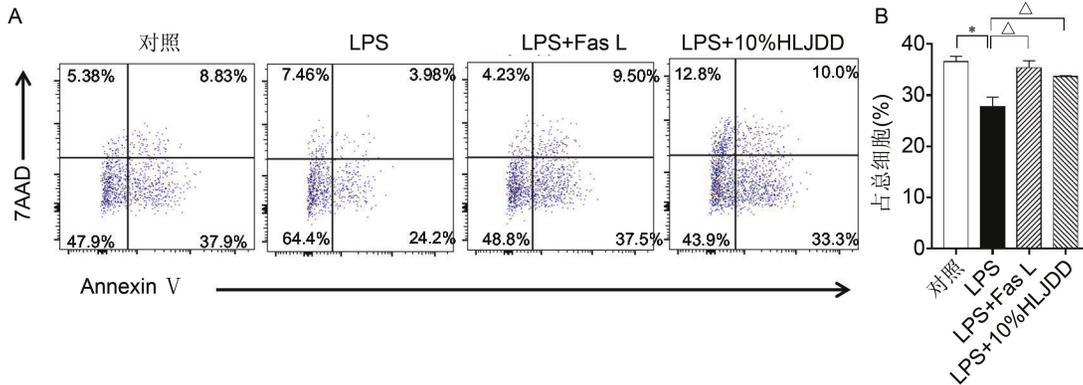
讨论

HP 引发 AS 形成过程中, 不仅单核—巨噬细胞, 其他多种免疫细胞在数量和功能也都发生变化^[2, 12]。例如: 高脂饮食导致 ApoE^{-/-} 小鼠外周血中性粒细胞比例显著升高, NETs 大量生成^[9]。本课题组前期研究发现: HLJDD 可以降低 ApoE^{-/-} 小鼠外周血 NLR 和血浆 NETs 水平^[9], 提示 HLJDD 可能通过影响中性粒细胞降低

表 4 各组趋化的中性粒细胞数目比较 (×10⁴, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | CXCL2 | CXCL10 | CCL3 |
|----------------|---|------------------------|------------------------|------------------------|
| 对照 | 3 | 0.10±0.10 | 0.03±0.00 | 0.02±0.01 |
| 趋化因子 | 3 | 0.70±0.14** | 0.11±0.00** | 0.05±0.01* |
| 趋化因子+10% HLJDD | 3 | 0.27±0.04 [△] | 0.03±0.01 [△] | 0.01±0.00 [△] |

注:与对照组比较,* P<0.05,** P<0.01;与趋化因子组比较,[△] P<0.01



注:A 为流式细胞仪检测的凋亡中性粒细胞比例,横坐标 Annexin V 染色凋亡的中性粒细胞,纵坐标 7AAD 染色死亡的中性粒细胞,B 为各组凋亡中性粒细胞的占比结果;与对照组比较,* P<0.05;与 LPS 组比较,[△] P<0.05; n 为 3

图 2 10%HLJDD 含药血清对中性粒细胞凋亡的影响

高脂引发的免疫损伤。本实验证实,HLJDD 含药血清不仅可抑制 LPS 或 PMA 刺激中性粒细胞活化产生炎症因子、ROS 和 NETs,而且抑制中性粒细胞趋化,促进中性粒细胞的凋亡。

有文献报道炎症细胞因子和 ROS 可促进 ox-LDL 的产生,基质金属蛋白酶的活性增强,导致泡沫细胞形成和胶原降解增加,从而在 AS 早期加速斑块形成,AS 后期促进斑块破裂^[13]。在本实验中,HLJDD 含药血清直接抑制了中性粒细胞的多种炎症功能,包括抑制 IL-1 β 、IL-6、IL-12b、TNF- α 等炎症细胞因子的合成以及 ROS 的产生。这提示 HLJDD 可降低炎症因子、氧化活性和呼吸爆发产生的细胞毒性。更为重要的是,与体内实验一致,HLJDD 含药血清抑制活化的中性粒细胞形成和释放 NETs,而 NETs 可以促进 AS 病变的发展^[14],临床上冠心病患者血浆 NETs 的含量可以用于预测冠心病的严重程度,以及冠心病患者并发症的发生率和病死率相关性^[15]。因此,HLJDD 抑制了中性粒细胞多种与活化相关的功能。在急性感染性炎症中,中性粒细胞具有吞噬、杀菌功能^[3],而 AS 斑块中,中性粒细胞不是主要的吞噬细胞,因此,在本研究中未加以检测。

在 HP/AS 中,中性粒细胞从骨髓迁出至外周血增多,随后迁移至斑块组织^[16,17]。并且,在炎症状态下中性粒细胞存活时间延长^[4]。笔者发现,HLJDD 含药血清除了抑制中性粒细胞炎症反应功能,还促进中性粒细胞凋亡,这可能直接减少机体内中性粒细胞数

目。同时,HLJDD 含药血清还抑制中性粒细胞趋化功能,因此,HLJDD 可能减少中性粒细胞从骨髓迁出、进而减少中性粒细胞迁移至血管。而这两个因素,也可以解释体内实验中,高脂饮食饲喂的 ApoE^{-/-}小鼠外周血 NLR 降低的现象。

综上所述,本研究发现 HLJDD 干预可以多靶点抑制中性粒细胞的活化,进一步加深了对 HLJDD 抗 AS 作用机制的理解。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Gisterå AX, Ketelhuth DFJ. Lipid-driven immunometabolic responses in atherosclerosis [J]. Curr Opin Lipidol, 2018, 29(5): 375-380.
- [2] Chistiakov DA, Grechko AV, Myasoedova VA, et al. The role of monocytosis and neutrophilia in atherosclerosis [J]. Cell Mol Med, 2018, 22(3): 1366-1382.
- [3] Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation [J]. Nat Rev Immuno, 2013, 13(3): 159-175.
- [4] Chistiakov DA, Bobryshev YV, Orekhov AN. Neutrophil's weapons in atherosclerosis [J]. Exp Mol Pathol, 2015, 99(3): 663-671.
- [5] Döring Y, Manthey HD, Drechsler M, et al. Autoantigenic protein-DNA complexes stimulate plasmacytoid dendritic cells to promote atherosclerosis [J]. J Intern Med, 2018, 263(1): 10-21.

- sis[J]. *Circulation*, 2012, 125(13): 1673-1683.
- [6] 王稳平. 基础治疗结合黄连解毒汤对冠心病病人颈总动脉粥样硬化斑块和炎症因子的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2017, 15(24): 3151-3153.
- [7] 马雅鑫, 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.
- [8] 李彤, 韩俊燕, 王蓓蓓, 等. 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[J]. *中国中西医结合杂志*, 2014, 34(9): 1096-1102.
- [9] 孙慧娟, 朱鏐姿, 张玥, 等. 黄连解毒汤调控 apoE^{-/-}小鼠粒细胞释放中性粒细胞捕捉网的研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2019, 25(8): 1052-1055.
- [10] 赵保胜, 刘洪斌, 马悦颖, 等. 黄连解毒汤含药血清对 Toll 样受体 3, 4 型及其下游信号转导通路的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2007, 13(5): 15-20.
- [11] Brinkmann V, Laube B, Abu Abed U, et al. Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them [J]. *J Vis Exp*, 2010, 24(36): 1724-1736.
- [12] Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Immune-inflammatory responses in atherosclerosis: role of an adaptive immunity mainly driven by T and B cells [J]. *Immunobiology*, 2016, 221(9): 1014-1033.
- [13] Malle E, Marsche G, Arnhold J, et al. Modification of low-density lipoprotein by myeloperoxidase-derived oxidants and reagent hypochlorous acid [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1761(4): 392-415.
- [14] Sørensen OE, Borregaard N. Neutrophil extracellular traps—the dark side of neutrophils [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(5): 1612-1620.
- [15] Borissoff JI, Joosen IA, Versteylen MO, et al. Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state [J]. *Arterioscl Throm Vasc*, 2013, 33(8): 2032-2040.
- [16] Drechsler M, Megens RT, Van ZM, et al. Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2010, 122(18): 1837-1845.
- [17] Chistiakov DA, Bobryshev YV, Orekhov AN. Neutrophil's weapons in atherosclerosis [J]. *Exp Mol Pathol*, 2015, 99(3): 663-671.

(收稿: 2020-02-03 在线: 2020-08-31)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶

欢迎订阅 2021 年 *Chinese Journal of Integrative Medicine*

Chinese Journal of Integrative Medicine 《中国结合医学杂志》是由中国中西医结合学会、中国中医科学院主办的国际性学术期刊, 旨在促进结合医学及替代医学的国际交流, 及时发表结合医学或替代医学领域的最新进展、趋势以及临床实践、科学研究、教育、保健方面经验和成果的科学论文。1995 年创刊, 由中国科学院院士陈可冀担任主编。设有述评、专题笔谈、论著、临床经验、病例报道、综述、药物相互作用、法规指南、学术探讨、思路与方法、跨学科知识、会议纪要、书评、读者来信等栏目。本刊被多种国际知名检索系统收录, 如: Science Citation Index Expanded (SCI-E)、Index Medicus/Medline、Chemical Abstracts (CA)、Abstract Journal (AJ)、CAB Abstracts、CAB International、Excerpta Medica (EMBASE)、Expanded Academic、Global Health、Google Scholar、Index Copernicus (IC)、Online Computer Library Center (OCLC)、SCOPUS 等。本刊于 2007 年被 SCI-E 收录, 2020 年 6 月底科睿唯安公布 2019 年本刊 SCI 影响因子为 1.545。2010 年 10 月 1 日与汤森路透集团签约, 正式采用 ScholarOne Manuscripts 在线投审稿系统。

Chinese Journal of Integrative Medicine 为大 16 开本, 铜版纸印刷, 彩色插图, 2011 年改为月刊, 80 页, 国内定价, 60.00 元/期, 全年定价: 720.00 元。国际标准刊号: ISSN 1672-0415, 国内统一刊号: CN 11-4928/R, 国内邮发代号: 82-825, 海外发行由 Springer 公司代理。国内订户在各地邮局均可订阅, 也可直接汇款至本社邮购。

地址: 北京市海淀区西苑操场 1 号, 中国中西医结合杂志社, 邮政编码: 100091; 电话: 010-62886827, 62876547, 62876548; 传真: 010-62876547-815; E-mail: cjm_en@cjm.cn; 网址: http://www.cjm.cn。