

参附黄方对斑马鱼炎症、巨噬细胞吞噬功能的影响

徐霄龙^{1,2}, 郭玉红^{1,2}, 赵京霞^{1,2}, 刘清泉^{1,2*}

1. 首都医科大学附属北京中医医院, 北京市东城区美术馆后街 23 号, 100010; 2. 北京市中医研究所

摘要 目的 探讨参附黄方对斑马鱼炎症、巨噬细胞吞噬功能的作用及其机制。方法 以转基因中性粒细胞荧光斑马鱼、野生型 AB 品系斑马鱼为实验对象, 分别建立斑马鱼炎症模型和巨噬细胞吞噬模型。采用死亡率和心血管毒性评价筛选参附黄方的药用浓度; 采用中性粒细胞计数评价参附黄方对斑马鱼炎症模型的作用, 并以吲哚美辛为对照; 检测斑马鱼白细胞介素 10 (IL-10)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、重组人精氨酸酶 1 (ARG1)、白细胞介素 1 β (IL-1 β) mRNA 表达评价参附黄方对斑马鱼吞噬细胞吞噬功能的影响。结果 参附黄方对斑马鱼的最大安全浓度为 10 mg/ml, 本研究选择参附黄低、中和高剂量浓度分别为 1.1、3.3 和 10 mg/ml。在炎症模型中, 模型对照组斑马鱼炎症部位中性粒细胞个数高于正常对照组 ($P < 0.01$); 与模型对照组比较, 吲哚美辛组和参附黄中、高剂量组斑马鱼炎症部位中性粒细胞个数降低 ($P < 0.01$); 参附黄中剂量组炎症消退作用最强为 44.1%。在巨噬细胞吞噬模型中, 与正常对照组比较, 参附黄中、高剂量组 TNF- α 、IL-10 mRNA 表达升高, 参附黄高剂量组 IL-1 β mRNA 表达升高、ARG1 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 参附黄方具有很好的免疫激活作用, 其机制可能与降低中性粒细胞数量和调节巨噬细胞分型有关。

关键词 参附黄方; 脓毒症; 炎症; 免疫功能; 斑马鱼; 巨噬细胞; 中性粒细胞

自 1991 年美国危重病医学会和美国胸科医师协会首次提出脓毒症定义以来, 脓毒症指南已经历了三次更新, 体现了领域内对该疾病认识的深入, 但目前脓毒症患者病死率仍然在 30% 左右, 而脓毒症休克患者的病死率更是高达 60% ~ 80%, 严重影响患者的生活质量^[1-2]。因此, 探索脓毒症病理生理机制并开展相关药物和临床治疗方案的研究目前仍是危重症领域研究的重点^[3-4]。既往研究^[5]认为, 脓毒症的发生主要是由于机体过度激活的免疫系统和炎症反应造成组织、器官的不可逆损害, 然而单纯抗炎治疗并不能显著提高脓毒症患者的生存率, 提示脓毒症具有复杂的病理生理机制和演变过程。脓毒症后期多种细胞因子释放导致免疫抑制, 增加机体受到二次感染的风险, 给脓毒症的治疗带来巨大困难^[6]。参附黄方由人参、附子和大黄组成, 是在扶正解毒通络治则下形成的中药方

剂, 可补气通阳, 有利于抗邪外出, 防止内生毒邪造成进一步损害^[7-8]。本研究以斑马鱼为实验对象, 构建脂多糖 (LPS) 炎症模型和巨噬细胞吞噬模型, 从中性粒细胞数量和巨噬细胞激活的角度探讨参附黄方对炎症和免疫细胞功能的影响及可能作用机制, 为在脓毒症中的临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

斑马鱼购于杭州环特生物有限公司, 实验动物许可证: SYXK (浙) 2012-0171。转基因中性粒细胞荧光斑马鱼, 年龄为受精后 3 天 (3dpf)。野生型 AB 品系斑马鱼, 年龄为 2dpf。养殖水温 (27 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, pH 6.5 ~ 7.5, 光周期 14L: 10D。选择状态良好、大小基本相近 [体长 (3.5 ± 0.1) cm, 体重 (0.28 ± 0.01) g] 的斑马鱼进行实验, 实验前斑马鱼更换至干净无饲料的鱼缸中。

1.2 药物

参附黄方组成: 人参 30 g, 炮附片 60 g, 大黄 30 g。加入 500 ml 纯水, 浸泡 30 min。100 $^{\circ}\text{C}$ 煎煮 30 min 后双层纱布过滤收取滤液。原药再加水

基金项目: 国家自然科学基金 (81673934, 81973608); 北京市自然科学基金 (7192083); 中医感染性疾病基础研究北京市重点实验室 (B20320)

* 通讯作者: liuqingquan2003@126.com, (010) 52176965

500 ml, 继续煎煮 30 min 后二次收取滤液。合并两次提取液后浓缩至 120 ml, 制成 1 g/ml 药液待用。中药人参、炮附片和大黄购自首都医科大学附属北京中医医院。

1.3 主要试剂及仪器

吡啶美辛 (批号 13931)、花生四烯酸 (批号 A1831030), 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; LPS (批号 017M4112V)、阿司匹林 (批号 MKCD0957), 购自 Sigma 上海公司; 异丙肾上腺素盐酸盐 (批号 VNVFK-ES), 购自日本 TCI 公司; Fast Quant RT 试剂盒 (With gDNase) 试剂盒 (货号 KR106), 购自北京 TIANGEN 公司; Trizol (货号 1382739), 购自美国 Invitrogen 公司。

解剖显微镜 (SZX7 型, Olympus 公司); 精密电子天平 (CP214 型, OHAUS 公司); 显微注射仪 (IM-300 型, Narishige 公司); 拉针仪 (PC-10 型, Narishige 公司); 电动聚焦连续变倍荧光显微镜 (AZ100 型, Nikon 公司); 高速离心机 (Frescol17 型)、微量分光光度计 (Nanodrop 2000 型), Thermo Scientific 公司; 微孔板迷你离心机 (BE-6100 型, 其林贝尔公司); 普通 PCR 扩增仪 (T100 型)、荧光定量 PCR 仪 (CFX Connect 型), Bio-Rad 公司。

1.4 参附黄方用药浓度筛选

采用随机数字表法选取 210 尾 3dpf 转基因中性粒细胞荧光斑马鱼于六孔板中, 每孔 (实验组) 均处理 30 尾斑马鱼, 分别水溶给予参附黄方浓度为 2.5、5.0、10.0、20.0 和 40.0 mg/ml, 同时设置正常对照组 (即养鱼用水处理斑马鱼) 和模型对照组, 每孔容量为 3 ml, 置于 28℃ 培养箱中培养。参附黄方处理 1 h 后用 100 ng/尾 LPS 建立转基因中性粒细胞荧光斑马鱼炎症模型^[9-10], 模型成功标准: 模型对照组卵黄囊内中性粒数量显著增多, 与正常对照组有显著性差异。2 h 后统计各实验组的斑马鱼死亡数量; 同时在显微镜下对斑马鱼的心房率和心室率分别进行计数, 评价有无心动过缓/心动过速、心律不齐 (房室传导阻滞); 观察有无心包水肿、血流速度变化、血栓形成、出血等现象与心血管毒性情况, 确定参附黄方对斑马鱼的试验用药浓度, 用药最大浓度即不会对实验动物产生副作用的最大浓度。

1.5 参附黄方对斑马鱼炎症模型中性粒细胞的调节

采用随机数字表法选取 180 尾 3dpf 转基因中性粒细胞荧光斑马鱼于六孔板中, 每孔均处理 30

尾斑马鱼, 设参附黄高、中、低剂量组及吡啶美辛组、正常对照组和模型对照组, 每孔容量为 3 ml。参附黄高、中、低剂量组和吡啶美辛组分别给予筛选浓度参附黄水溶液、浓度为 60 μmol/L 的吡啶美辛溶液, 置于 28℃ 培养箱中培养 1 h 后, 用 100 ng/尾 LPS 建立转基因中性粒细胞荧光斑马鱼炎症模型^[9-10]。参附黄方与 LPS 共同处理 2 h 后, 每组采用随机数字表法取 10 尾斑马鱼在荧光显微镜下观察、拍照并统计斑马鱼炎症部位中性粒细胞数; 用尼康 NIS-Elements D 3.10 高级图像处理软件进行图像分析, 计算斑马鱼炎症部位中性粒细胞数目。抗炎作用计算公式如下:

$$\text{炎症消退作用}(\%) = \frac{N(\text{模型对照组}) - N(\text{供试品组})}{N(\text{模型对照组})} \times 100\%$$

1.6 参附黄方对斑马鱼巨噬细胞模型的影响

采用随机数字表法选取 450 尾受精后 3 天野生型 AB 品系斑马鱼于六孔板中, 每孔均处理 30 尾, 设参附黄高、中、低剂量组及正常对照组和模型对照组。参附黄高、中、低剂量组和模型对照组斑马鱼静脉注射给予墨汁 2 ml/尾, 建立斑马鱼巨噬细胞吞噬功能激活模型^[11]。造模后参附黄高、中、低剂量组分别给予筛选浓度的参附黄溶液, 每孔容量为 3 ml, 平行 3 次实验。处理斑马鱼 48 h 后, 使用 Trizol 法提取斑马鱼总 RNA 后, 利用微量分光光度计对总 RNA 浓度和纯度进行测定。取 2 μg 斑马鱼样品总 RNA, 按照 cDNA 第一链合成试剂盒说明书操作, 合成 20 μl cDNA 置于 -20℃ 保存。用 β-actin 作为基因表达的内参, 计算白细胞介素 10 (IL-10)、肿瘤坏死因子 α (TNF-α)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、重组人精氨酸酶 1 (ARG1)、白细胞介素 1β (IL-1β) mRNA 相对表达量。引物合成由北京擎科新业生物技术有限公司完成, IL-10: 上游 TTCAGGAAGCTCAAGCGGGAT, 下游 AAGAGCAAATCAAGCTCCCCC, 引物长度 145 bp; TNF-α: 上游 ATCTTCAAAGTCGGGTG-TATG, 下游 TGTGCCCAGTCTGTCTCC, 引物长度 544 bp; iNOS: 上游 CCTCCTCATGTACCT-GAATCTCG, 下游 GCTCCTTGCTTTAGTATGTCCG, 引物长度 134 bp; ARG1: 上游 TGGAATAATAG-GCGCTCCGTTC, 下游 TCCTTCACCACACAACCTT-GC, 引物长度 124 bp; IL-1β: 上游 GTCACACT-GAGAGCCGGAAG, 下游 GCAGGCCAGGTACAGGT-TAC, 引物长度 135 bp; β-actin: 上游 TCGAGCAG-GAGATGGGAACC, 下游 CTCGTGGATACCG-

CAAGATTC, 引物长度 727 bp。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 15.0 统计软件进行统计学分析, 计量资料符合正态分布用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用方差分析结合 Dunnett's T 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 参附黄有效浓度选择结果

表 1 示, 正常对照组和模型对照组斑马鱼无死亡, 参附黄方在 2.5 ~ 10 mg/ml 浓度下, 亦未引起斑马鱼死亡, 也未见其他明显的毒性表型。参附黄方在 20 mg/ml 浓度下, 引起斑马鱼心血管毒性及部分斑马鱼死亡; 参附黄方在 40 mg/ml 浓度下, 引起 100% 斑马鱼的死亡, 故确定参附黄方对 LPS 诱导的炎症斑马鱼的最大安全浓度为 10 mg/ml。故本实验浓度设置低、中和高剂量浓度分别为 1.1、3.3 和 10 mg/ml。

表 1 不同浓度参附黄方对炎症模型斑马鱼死亡的影响

组别	浓度 (mg/ml)	总数 (尾)	死亡数 (尾)	死亡率 (%)
正常对照组	—	30	0	0
模型对照组	—	30	0	0
吡喹啉美辛组	2.5	30	0	0
参附黄组	5.0	30	0	0
	10.0	30	0	0
	20.0	30	17	56.7
	40.0	30	30	100

2.2 各组斑马鱼炎症部位中性粒细胞个数比较

表 2 示, 模型对照组斑马鱼炎症部位中性粒细胞个数高于正常对照组 ($P < 0.01$); 与模型对照组比较, 吡喹啉美辛组和参附黄中、高剂量组斑马鱼炎症部位中性粒细胞个数降低 ($P < 0.01$), 而参附黄低剂量组斑马鱼炎症部位中性粒细胞个数差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与参附黄低剂量组比较, 参附黄中、高剂量组中性粒细胞个数明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。参附黄中剂量组炎症消退作用最

强为 44.1%, 其次为参附黄高剂量组 (41.1%) $>$ 吡喹啉美辛组 (31.7%) $>$ 参附黄低剂量组 (12.4%)。

表 2 各组斑马鱼中性粒细胞个数比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	斑马鱼数量	中性粒细胞个数
正常对照组	10	3.1 $\pm$ 0.5
模型对照组	10	20.2 $\pm$ 1.6*
吡喹啉美辛组	10	13.8 $\pm$ 1.3 Δ
参附黄低剂量组	10	17.7 $\pm$ 1.2
参附黄中剂量组	10	11.3 $\pm$ 1.2 $\Delta\Delta$
参附黄高剂量组	10	11.9 $\pm$ 1.5 $\Delta\Delta$

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型对照组比较, $\Delta P < 0.01$; 与参附黄低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.3 各组斑马鱼 TNF- α 、iNOS、IL-1 β 、IL-10、ARG-1 mRNA 表达比较

表 3 示, 正常对照组、模型对照组和参附黄低剂量组斑马鱼 TNF- α 、iNOS、IL-1 β 、IL-10、ARG-1 mRNA 表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与模型对照组比较, 参附黄中、高剂量组 TNF- α 、IL-10 mRNA 表达升高, 参附黄高剂量组 IL-1 β mRNA 表达升高, ARG-1 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 参附黄高剂量组 TNF- α mRNA 表达高于参附黄低、中剂量组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 各组 iNOS mRNA 表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

脓毒症是一种由感染引起的机体生理、病理和生化异常综合征, 可诱发脓毒性休克及多器官功能衰竭综合征^[12]。尽管目前已有较好的诊疗技术及监护措施, 但因病情发展迅速, 使得其发病率和病死率仍居高不下, 是全球医学界面临的重要疑难问题^[13]。有学者通过开展大样本临床流行病学调查后得出, 在北京每 10 万人中罹患脓毒症、严重脓毒症和脓毒性休克的人数分别为 461 例、68 例和 52 例^[14]。虽然脓毒症早期过度炎症反应是导致宿主脏器损伤的关键, 但大量抗炎药物在进入临床试

表 3 各组斑马鱼 TNF- α 、iNOS、IL-1 β 、IL-10、ARG-1 mRNA 表达比较 (/ β -actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	斑马鱼数量	TNF- α	iNOS	ARG-1	IL-10	IL-1 β
正常对照组	10	0.86 $\pm$ 0.17	0.87 $\pm$ 0.05	1.19 $\pm$ 0.10	1.09 $\pm$ 0.27	0.88 $\pm$ 0.06
模型对照组	10	1.01 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.02	1.01 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.03	1.01 $\pm$ 0.09
参附黄低剂量组	10	1.72 $\pm$ 0.26 $\Delta\Delta$	2.00 $\pm$ 0.27	1.07 $\pm$ 0.12	1.46 $\pm$ 0.14	2.96 $\pm$ 0.65
参附黄中剂量组	10	3.65 $\pm$ 1.06* Δ	2.31 $\pm$ 0.46	1.04 $\pm$ 0.06	1.96 $\pm$ 0.37*	4.53 $\pm$ 1.59
参附黄高剂量组	10	6.86 $\pm$ 0.85**	2.47 $\pm$ 0.68	0.68 $\pm$ 0.05*	2.49 $\pm$ 0.04**	5.02 $\pm$ 1.09*

注: TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; iNOS, 诱导型一氧化氮合酶; ARG-1, 重组人精氨酸酶 1; IL-10, 白细胞介素 10; IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; 与模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与参附黄高剂量组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

验后差强人意的效果提示脓毒症是一个复杂疾病。鉴于此,脓毒症指南 3.0 的发布取消了过去版本中对全身炎症反应综合征的定义^[15]。近年来,越来越多的研究^[16-17]表明,脓毒症后期免疫抑制状态的产生是导致患者死亡的主要因素。因此,如何提高后期患者机体的免疫功能,降低二次感染带来的风险,是治疗脓毒症药物研发的新方向。

中医学治疗感染性疾病有着悠久的历史和丰富的经验。我们围绕脓毒症中医药治疗做了大量的临床、基础及文献研究工作,提出了对脓毒症中医病因病机的认识^[18]:外来之毒与内生毒邪互结是主要病因;正虚毒损、络脉闭阻是基本病机,扶正解毒通络是其主要治则。在脓毒症“扶正解毒通络”治则的指导下,本团队在临床上治疗脓毒症多采用人参、附子、大黄组方,扶正与解毒通络并重。大黄味厚入血分,有解毒化瘀、通经活络之功;人参配伍附子急固欲散之气,补充经脉气血,扶助正气,防其暴脱。因寒温适宜才利于络脉运行的通畅,组方也顾及到药性的寒温,以辛热之附子配伍苦寒之大黄。综观通络之法,最关键在于通阳,附子辛散,可温通经脉;大黄推陈致新,祛除络中的败瘀凝痰,可使阳气畅达。三药攻补兼施、寒温并用,扶正解毒通络为要正是本方的特色所在。本研究结果发现,在 20 mg/ml 剂量下斑马鱼开始出现心血管毒性损伤,同时死亡率增加,最终确定参附黄最大安全浓度为 10 mg/ml。

巨噬细胞在天然免疫过程中扮演重要的角色。在不同的环境条件(如微生物产物、坏死细胞、激活的淋巴细胞等)和特定的病理条件下,巨噬细胞可以通过极化分型发挥不同的生物学作用,近年来对巨噬细胞分型的研究逐渐增加^[19-20]。M1 型巨噬细胞参与炎症反应并通过分泌炎症因子一氧化氮、氧自由基等,提高对病原微生物的杀伤。M2 型巨噬细胞则是发挥抗炎作用并具备组织修复、参与血管生成和成纤维化等功能的一类巨噬细胞^[21]。本研究结果发现,参附黄方高剂量可显著提高 M1 型巨噬细胞的标志分子 TNF- α 和 IL-1 β 的表达,提示其可诱导 M1 型巨噬细胞的激活,提高机体对病原微生物的识别和杀伤能力,这对于脓毒症后期患者的生存有重要意义。中性粒细胞作为外周血中比例最高的细胞,同样在天然免疫中发挥重要作用^[22-24]。最新研究^[25]表明,在脓毒症患者中中性粒细胞的功能会发生巨大的改变,甚至成为介导免

疫抑制的关键。有学者^[23,26]发现,中性粒细胞可通过共刺激分子和非共刺激分子依赖性途径抑制 T 细胞功能,接触性抑制干扰素 γ 分泌能力和 T 细胞增殖,负向调控获得性免疫系统,降低机体对病原微生物的清除能力。本研究发现,参附黄方中、高剂量可显著抑制 LPS 诱导的斑马鱼中性粒细胞过度增生,且中、高剂量对中性粒细胞数量减少的作用不弱于吲哚美辛。该结果提示,参附黄方可通过降低中性粒细胞的数量,减少其对机体 T 淋巴细胞增殖和干扰素生成的负向调节,进而增加机体抵抗病原微生物的能力,并且中剂量参附黄方对炎症的调节作用最好。

综上,参附黄方可有效提高巨噬细胞免疫功能,降低中性粒细胞对免疫系统的潜在抑制作用,整体提高机体的免疫状态。对于脓毒症后期处于免疫抑制阶段的患者来说,参附黄方增强免疫能力的功效对于良好的预后具有重要意义。

参考文献

- [1] SHANKAR-HARI M, PHILLIPS GS, LEVY ML, et al. Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3) [J]. JAMA, 2016, 315(8): 775-787.
- [2] MARTIN GS. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2012, 10(6): 701-706.
- [3] 姚咏明, 张艳敏. 脓毒症发病机制最新认识 [J]. 医学研究生学报, 2017, 30(7): 678-683.
- [4] NAPOLITANO LM. Sepsis 2018: definitions and guideline changes [J]. Surg Infect (Larchmt), 2018, 19(2): 117-125.
- [5] RIZZO AN, DUDEK SM. Endothelial glycocalyx repair: building a wall to protect the lung during sepsis [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2017, 56(6): 687-688.
- [6] GUISSSET O, DILHUYDY MS, THIEBAUT R, et al. Decrease in circulating dendritic cells predicts fatal outcome in septic shock [J]. Intensive Care Med, 2007, 33(1): 148-152.
- [7] 刘清泉, 王蕾, 朱雪琦, 等. 参附黄注射液对脓毒症大鼠肾脏的保护作用和机制研究 [C] // 中华中医药学会急诊分会. 中华中医药学会第六届急诊学术年会论文集. 雅安: 中华中医药学会急诊分会, 2006: 59-62.
- [8] 王蕾, 朱雪琦, 刘清泉, 等. 参附黄注射液对大鼠脓毒症器官功能和死亡率的影响 [J]. 中国中医药信息杂志,

- 2006, 13(8): 23–24.
- [9] 周俊怡, 周严严, 边宝林, 等. LPS 诱导斑马鱼炎症实热模型构建及脂质生物标志物筛选研究 [J]. 浙江中医药大学学报, 2018, 42(10): 782–789.
- [10] KO EY, HEO SJ, CHO SH, et al. 3-Bromo-5-(ethoxymethyl)-4,2-benzenediol inhibits LPS-induced pro-inflammatory responses by preventing ROS production and down-regulating NF- κ B in vitro and in a zebrafish model [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 67: 98–105. doi: 10.1016/j.intimp.2018.11.021.
- [11] 杨胜杰, 钟少达, 崔玉梅, 等. 核桃肽免疫调节作用的研究 [J]. 北方药学, 2019, 16(7): 129–131.
- [12] ANGUS DC, VAN DER POLL T. Severe sepsis and septic shock [J]. N Engl J Med, 2013, 369(21): 2063.
- [13] RHODES A, EVANS LE, ALHAZZANI W, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016 [J]. Intensive Care Med, 2017, 43(3): 304–377.
- [14] ZHOU J, TIAN H, DU X, et al. Population-based epidemiology of sepsis in a subdistrict of Beijing [J]. Crit Care Med, 2017, 45(7): 1168–1176.
- [15] MARSHALL JC. Sepsis definitions: a work in progress [J]. Crit Care Clin, 2018, 34(1): 1–14.
- [16] VENET F, MONNERET G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression [J]. Nat Rev Nephrol, 2018, 14(2): 121–137.
- [17] HOTCHKISS RS, MONNERET G, PAYEN D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy [J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(12): 862–874.
- [18] 刘清泉. 对脓毒症中医病机特点及治法的认识 [J]. 北京中医, 2007, 26(4): 198–200.
- [19] ROUGEOT J, TORRACA V, ZAKRZEWSKA A, et al. Corrigendum: RNAseq profiling of leukocyte populations in zebrafish larvae reveals a cxcl11 chemokine gene as a marker of macrophage polarization during mycobacterial infection [J]. Front Immunol, 2019, 10: 2720. doi: 10.3389/fimmu.2019.02720.
- [20] BINESH A, DEVARAJ SN, DEVARAJ H. Expression of chemokines in macrophage polarization and downregulation of NF κ B in aorta allow macrophage polarization by diosgenin in atherosclerosis [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2020, 34(2): e22422.
- [21] IZQUIERDO E, CUEVAS VD, FERNANDEZ-ARROYO S, et al. Reshaping of human macrophage polarization through modulation of glucose catabolic pathways [J]. J Immunol, 2015, 195(5): 2442–2451.
- [22] HAMPTON MB, KETTLE AJ, WINTERBOURN CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing [J]. Blood, 1998, 92(9): 3007–3017.
- [23] PILLAY J, KAMP VM, VAN HOFFEN E, et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1 [J]. J Clin Invest, 2012, 122(1): 327–336.
- [24] DARCY CJ, MINIGO G, PIERA KA, et al. Neutrophils with myeloid derived suppressor function deplete arginine and constrain T cell function in septic shock patients [J]. Crit Care, 2014, 18(4): R163.
- [25] 王嘉锋, 邓小明. 脓毒症中性粒细胞功能障碍 [J]. 实用休克杂志(中英文), 2019, 3(2): 70–73.
- [26] DE KLEIJN S, LANGEREIS JD, LEENTJENS J, et al. IFN- γ -stimulated neutrophils suppress lymphocyte proliferation through expression of PD-L1 [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e72249.

Effects of *Shenfuhuang Fomula* (参附黄方) on Inflammation and Phagocytic Function of Macrophages in Zebrafish

XU Xiaolong^{1,2}, GUO Yuhong^{1,2}, ZHAO Jingxia^{1,2}, LIU Qingquan^{1,2}

1. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing, 100010; 2. Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the effects of *Shenfuhuang Fomula* (参附黄方) on inflammation and phagocytosis of macrophages in zebrafish and its mechanism. **Methods** Transgenic neutrophil fluorescent zebrafish and wild-type AB strain zebrafish were used as experimental subjects to establish a zebrafish inflammation model and a macrophage phagocytosis model, respectively. Mortality and cardiovascular toxicity were applied to screen the medicinal concentration of *Shenfuhuang Fomula*; neutrophil count was used to evaluate the effect of *Shenfuhuang Fomula* on zebrafish inflammation model, and indomethacin was set as a control; zebrafish white blood cells interleukin 10 (IL-10), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), inducible nitric oxide synthase (iNOS), recombinant human arginase 1 (ARG1), interleukin 1 β (IL-1 β) mRNA expression were detected to evaluate the effect of *Shenfuhuang Fomula* on

the phagocytic function of zebrafish phagocytes. **Results** The maximum safe concentration of *Shenfu Huang Fomula* for zebrafish was 10 mg/ml. In this study, the low, medium and high dose concentrations of *Shenfu Huang Fomula* were 1.1, 3.3 and 10 mg/ml, respectively. In the inflammation model, the number of neutrophils in the inflammation site of the model control group was higher than that of the normal control group ($P < 0.01$); compared with the model control group, in the indomethacin group and in the *Shenfu Huang Fomula* middle and high dose groups, the number of neutrophils in the inflammation site of zebrafish decreased ($P < 0.01$); the inflammation subsided in the *Shenfu Huang Fomula* medium dose group was 44.1%. In the macrophage phagocytic model, compared with the normal control group, the expression of TNF- α and IL-10 mRNA in the *Shenfu Huang Fomula* medium and high dose groups increased, and the expression of IL-1 β mRNA in the *Shenfu Huang Fomula* high dose group increased, and the expression of ARG1 mRNA decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Shenfu Huang Fomula* has a good immune activation effect, and its mechanism may be related to reducing the number of neutrophils and regulating the typing of macrophages.

Keywords *Shenfu Huang Fomula* (参附黄方); sepsis; inflammation; immune function; zebrafish; macrophages; neutrophils

(收稿日期: 2020-05-05; 修回日期: 2020-06-18)

编辑: 邓 媛

珍贵文献 临床科研必备《中医杂志》光盘合订本

《中医杂志》光盘检索系统收录了 1951 年 ~ 2013 年出版发行的《中医杂志》所有期刊(繁体字已转为简体字)。您可借助计算机阅读收录的任意一篇文章, 而且可对光盘进行任意词或多组合条件检索, 检索结果可以打印或下载保存。您可以在几秒钟内就能检索到某种疾病、某种疗法或某种药的相关文章, 本光盘可按自然年、期排序, 方便阅读与保存。1951 年 ~ 1986 年光盘还收录了扫描的原文版面图像。

邮购地址: 北京东直门内南小街 16 号中医杂志社, 邮政编码: 100700

电话: (010) 64035632 联系人: 杨秋雷(请在汇款单附言栏写明购买者的电话)

1951 年 ~ 1986 年光盘合订本每套(4 张光盘) 480 元

1987 年 ~ 1994 年光盘合订本每套(1 张光盘) 260 元

1995 年 ~ 2004 年光盘合订本每套(1 张光盘) 280 元

2005 年 ~ 2013 年光盘合订本每套(1 张光盘) 300 元



欢迎关注《中医杂志》公众号

科技精品光盘全文检索管理系统 3.5-《中医杂志》(1987-1994)

系统工具 B 检索结果 S 检索设置 D 桌面设置 H 帮助

