

717 解毒合剂调控巨噬细胞表型转化改善蝮蛇毒致局部组织损伤的作用及机制^Δ

熊文昕^{1*}, 罗健彪¹, 谢永胜², 刘 熙¹, 顾佳婕¹, 王万春², 董德刚^{1#}(1. 江西中医药大学中医学院, 南昌 330004; 2. 江西中医药大学附属医院中医外科, 南昌 330006)

中图分类号 R264;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)19-2529-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.19.08



摘要 **目的** 探讨717解毒合剂调控巨噬细胞表型转化改善蝮蛇毒诱导局部组织损伤的作用及可能机制。**方法** 通过灌胃大鼠生理盐水、尾静脉注射抗蝮蛇毒血清(0.6 mL/只)以及灌胃0.495、0.99、1.98 g/kg(以生药量计)717解毒合剂,制备大鼠空白/含药血清。将经佛波醇12-十四酸酯13-乙酸酯诱导分化的人白血病单核细胞源M0型巨噬细胞分为正常对照组、模型组、阳性对照组和717解毒合剂低、中、高浓度含药血清组。除正常对照组外,其余各组均加入10 μg/mL蝮蛇毒工作液和10%的空白/含药血清。培养结束后,观察各组细胞超微结构变化,检测细胞中M1、M2型巨噬细胞比例,检测巨噬细胞表型转化相关标志物和缺氧诱导因子1α(HIF-1α)的mRNA及蛋白表达。**结果** 与正常对照组比较,模型组细胞出现线粒体肿胀、嵴断裂及细胞质空泡化等超微结构损伤;细胞中M1型巨噬细胞比例及相关表型转化标志物[诱导型一氧化氮合酶、肿瘤坏死因子α、白细胞介素6(IL-6)、IL-1β]和HIF-1α的mRNA及蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$),M2型巨噬细胞比例及相关表型转化标志物(精氨酸酶1、IL-10、甘露糖受体C1及几丁质酶-3样蛋白1)的mRNA及蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$);与模型组比较,717解毒合剂高浓度含药血清组细胞超微结构损伤明显改善,上述指标均显著逆转($P<0.05$)。**结论** 717解毒合剂可通过调控M1、M2型巨噬细胞表型转化平衡、修复细胞超微结构损伤发挥抗炎及组织修复作用,其机制可能与抑制HIF-1α通路的过度激活相关。

关键词 717解毒合剂;蝮蛇毒;巨噬细胞;局部组织损伤;炎症;HIF-1α通路

Effect and mechanism of 717 Jiedu decoction on *Gloydius brevicaudus* venom-induced local tissue injury by regulating macrophage phenotype transformation

XIONG Wenxin¹, LUO Jianbiao¹, XIE Yongsheng², LIU Xi¹, GU Jiajie¹, WANG Wanchun², DONG Degang¹
(1. School of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;
2. Dept. of Traditional Chinese Surgery, Affiliated Hospital of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the effect and potential mechanism of 717 Jiedu decoction in ameliorating local tissue injury induced by *Gloydius brevicaudus* venom via regulating macrophage phenotype transformation. **METHODS** Rat blank-serum and drug-containing serum were prepared by intragastric administration of normal saline, tail-vein injection of anti-*G. brevicaudus* venom serum (0.6 mL per rat), and intragastric administration of 717 Jiedu decoction at doses of 0.495, 0.99 and 1.98 g/kg (calculated as crude drug). M0-type macrophages derived from human leukemia monocytic THP-1 cells induced and differentiated by PMA were divided into normal control group, model group, positive control group, and low-, medium- and high-concentration 717 Jiedu decoction drug-containing serum groups. Except for the normal control group, all other groups were treated with 10 μg/mL *G. brevicaudus* venom working solution and 10% blank or drug-containing serum. After the cultivation period, the cellular ultrastructural changes in each group were observed; the proportions of M1- and M2-type macrophages, as well as the mRNA and protein expression of macrophage phenotype transformation and hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) were detected. **RESULTS**

Δ 基金项目 国家自然科学基金地区科学基金项目(No.82260937, No.81960874);江西省自然科学基金重点项目(No.20202ACB206010);江西中医药大学首批校级科技创新团队资助项目(No.CXTD22009);江西中医药大学附属医院资助优势病种项目(No.25YSBZ13)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:中西医结合基础。E-mail: 1973243879@qq.com

通信作者 副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药药理与毒理。E-mail:andydau@126.com

Compared with the normal control group, cells in the model group presented ultrastructural injuries including mitochondrial swelling, cristae rupture and cytoplasmic vacuolization. The proportion of M1-type macrophages and the mRNA and protein expression levels of related phenotype transformation markers [inducible nitric oxide synthase, tumor necrosis factor-α, interleukin-6 (IL-6), IL-1β] and HIF-1α were significantly

increased ($P<0.05$), whereas the proportion of M2-type macrophages and the mRNA and protein expression levels of related phenotype transformation markers (arginase-1, IL-10, mannose receptor C type 1 and chitinase-3-like protein 1) were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, cellular ultrastructural injuries were obviously alleviated, and the above-mentioned indexes were significantly reversed in the high-concentration 717 Jiedu decoction drug-containing serum group ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** 717 Jiedu decoction can exert anti-inflammatory and tissue-repairing effects by regulating the balance of M1-, M2-type macrophages phenotype transformation and repairing cellular ultrastructural damage. Its mechanism may be related to inhibiting the excessive activation of the HIF-1 α pathway.

KEYWORDS 717 Jiedu decoction; *Gloydius brevicaudus* venom; macrophage; local tissue injury; inflammation; HIF-1 α pathway

毒蛇咬伤中毒被WHO列入A类被忽视的热带疾病名录^[1]。据统计,全球每年约有550万起蛇咬伤事件,约10万人因毒蛇咬伤中毒死亡,超40万人因蛇毒局部损伤导致残疾、毁容^[2]。蝮蛇 *Gloydius brevicaudus* 又名土蛇、大公蛇,因色泽似土而得名,为我国剧毒蛇中分布最广的一种。蝮蛇毒为混合毒素,中毒后表现为进行性水肿、出血、肌坏死及创面迁延不愈,易导致患者后期瘢痕挛缩、肢体功能障碍。虽然抗蝮蛇毒血清能有效降低中毒患者死亡率,但对蛇毒所致的局部组织损伤作用有限^[3]。因此,探索针对蝮蛇咬伤中毒所致局部组织损伤的有效治疗策略,是当前毒蛇咬伤中毒救治领域亟待解决的问题。

近年来,学界围绕蛇毒诱导的组织损伤与修复已开展诸多研究,涉及毒素筛选与鉴定、局部组织对毒素的应激反应等,但蛇毒诱导局部组织损伤的确切机制尚未完全明确^[4]。研究表明,蝮蛇毒所致局部组织损伤的病理机制不仅涉及毒素组分对血管内皮细胞、肌细胞的直接毒性,还与固有免疫系统激活介导的继发性炎症级联反应密切相关^[5]。巨噬细胞是机体固有免疫系统的重要组成部分,在炎症反应、组织修复及免疫稳态调节中发挥关键作用^[6]。巨噬细胞表型转化可能参与蝮蛇毒介导的炎症因子持续释放及组织损伤^[7]。因此,调控M1、M2型巨噬细胞表型转化平衡,恢复其炎症调控与组织修复功能,是干预蝮蛇毒诱导局部组织损伤的重要靶点。另有研究指出,蛇毒可诱导局部组织缺氧和高碳酸血症等继发性病理改变^[8]。而缺氧诱导因子1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)作为细胞应答缺氧应激的核心转录因子,广泛参与炎症反应、组织修复等病理生理过程,也是巨噬细胞表型转化的关键调控因子^[9-10]。这提示HIF-1 α 通路可能在蝮蛇毒诱导的巨噬细胞表型转化失衡与组织损伤中发挥重要调控作用,是连接缺氧微环境、巨噬细胞表型转化与组织损伤的关键枢纽。

717解毒合剂由重楼、半边莲、金银花等13味中药组成,具有清热解毒、凉血散瘀、祛风通络的功效,为江西中医药大学附属医院院内制剂。在临床上,该制剂

已广泛用于蝮蛇咬伤中毒及其引发的局部组织损伤的治疗,能有效缓解肿胀、疼痛,促进组织修复^[11]。然而,其是否通过调控巨噬细胞表型转化发挥抗炎作用,进而改善局部组织损伤,以及该作用是否与调控HIF-1 α 通路相关,尚不明确。鉴于此,本研究拟建立蝮蛇咬伤中毒细胞模型,探讨717解毒合剂含药血清对该模型下巨噬细胞表型转化及HIF-1 α 通路的影响,为阐明该复方改善蝮蛇毒所致局部组织损伤的作用及可能机制提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有:MF53型倒置荧光显微镜(广州市明美光电技术有限公司),RaiseCyte2L6C型流式细胞分析仪(青岛瑞斯凯尔生物科技股份有限公司),NP80型紫外分光光度计(德国Implen GmbH公司),WD-2102B型全自动酶标仪、UPS600型电泳仪(上海雅酶生物医药科技有限公司),TC-EA型普通聚合酶链式反应(PCR)扩增仪(杭州博日科技股份有限公司),CFX Connect™型实时荧光PCR仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司],SuPerMax 3100型多功能酶标仪(上海闪谱生物科技有限公司),JEM-1400型透射电子显微镜(日本JEOL公司)。

1.2 主要药品与试剂

717解毒合剂(批号040843,规格20 g/袋)购自广东一方制药有限公司;抗蝮蛇毒血清[批号20210404,规格6 000 U(10 mL)/瓶]购自上海赛伦生物技术有限公司;蝮蛇毒冻干粉(批号20150927,纯度>98%)购自龙海市榜山春林养蛇厂;注射用盐酸替来他明盐酸唑拉西泮(货号BN 9KM3,规格为替来他明125 mg+唑拉西泮125 mg)购自法国Virbac公司;RPMI-1640培养基(货号G4535-500ML)购自武汉塞维尔生物科技有限公司;藻红蛋白标记的抗人CD86抗体、异硫氰酸荧光素标记的抗人CD206抗体、多甲藻叶绿素蛋白复合物标记的抗人CD11b抗体(货号分别为E-AB-F1012D、E-AB-F1161C、E-AB-F1081J)均购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司;

佛波醇 12-十四酸酯 13-乙酸酯(PMA, 货号 HY-18739) 购自美国 MCE 公司; 兔源甘露糖受体 C1(mannose receptor C type 1, MRC1)、几丁质酶-3 样蛋白 1(chitinase-3-like protein 1, CHI3L1)、白细胞介素 10(interleukin-10, IL-10) 抗体(货号分别为 DF4149、DF7223、DF6894) 均购自江苏亲科生物研究中心有限公司; 鼠源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)二抗、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗以及兔源诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、IL-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、精氨酸酶 1(arginase-1, Arg-1)、HIF-1 α 一抗(货号分别为 60004-1-Ig、SA00002-1、SA00002-21、8985、26048-1、30953、29652、DF6657、66730-1-Ig) 均购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 动物

30 只 SPF 级雄性 SD 大鼠(体重 180~220 g) 购自江西中医药大学实验动物科技中心, 生产许可证号为 SCXK(赣)2023-0001。饲养条件如下: 温度 20~26 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 40%~70%, 明 12 h/暗 12 h 循环。实验期间动物自由进食和饮水。本研究中动物实验方案获江西中医药大学实验动物伦理委员会批准, 批准号为 JZLLSC20240551。

1.4 细胞

人白血病单核细胞株 THP-1(货号 iCell-h213) 购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司。

2 方法

2.1 717 解毒合剂含药血清制备

将 SD 大鼠按体重随机分为空白对照组、抗蝮蛇毒血清组(阳性对照)和 717 解毒合剂低、中、高剂量组, 每组 6 只。空白对照组灌胃等体积生理盐水; 抗蝮蛇毒血清组按 0.6 mL/只尾静脉注射抗蝮蛇毒血清(将抗蝮蛇毒血清以生理盐水稀释 8 倍)^[12]; 717 解毒合剂低、中、高剂量组分别按 0.495、0.99、1.98 g/kg 灌胃相应药液[临用前用纯水配制成 1 g/mL(按生药量计)的混悬液, 分别相当于临床等效剂量的 3、6、12 倍]。每日给药/生理盐水 1 次, 连续 7 d。

末次给药/生理盐水后 1 h, 大鼠腹腔注射 50 mg/kg 注射用盐酸替来他明盐酸唑拉西洋麻醉后进行腹主动脉采血, 以 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 即得含药血清和空白血清。血清以 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴灭活 30 min, 经 0.22 μm 滤膜过滤除菌后, 收集滤液并置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存, 备用。

2.2 THP-1 细胞培养与诱导分化

将 THP-1 细胞接种于 RPMI-1640 培养基中, 并置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱中悬浮培养, 待细胞培养至良好状态(呈悬浮、透亮状态)时, 采用倒置荧光显微镜观察细胞形态; 同时, 取细胞悬液进行铺板, 然后加入 PMA, 使 PMA 终浓度为 150 nmol/L, 以诱导 THP-1 细胞分化成 M0 型巨噬细胞^[13]。培养 24 h 后, 弃去含 PMA 的培养基, 更换新鲜培养基静息培养 24 h, 待细胞完全贴壁后用倒置荧光显微镜观察, 细胞形态呈不规则形即为分化完成。

2.3 细胞分组、造模与给药

取“2.1”项下空白/含药血清, 常规解冻后过滤除菌, 将各血清的浓度均调整为 10%。将“2.2”项下 M0 型巨噬细胞接种于 6 孔板中, 每孔 $2 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5$ 个细胞。将细胞分为正常对照组(Control 组)、模型组(Model 组)、阳性对照组(positive control 组, 后文简称“PC 组”; 10% 抗蝮蛇毒血清)和 717 解毒合剂低、中、高浓度含药血清组(分别记为 717JD-L、717JD-M、717JD-H 组), 每组设 3 个复孔。除 Control 组外, 其余各组细胞均加入 10 $\mu\text{g/mL}$ 蝮蛇毒工作液(以无菌无酶水为溶剂制备, 浓度根据前期预实验结果确定)作用 48 h, 以诱导蝮蛇咬伤中毒细胞模型; 然后加入 10% 的空白/含药血清, 48 h 后收集细胞用于后续相关实验。

2.4 细胞中 M1、M2 型巨噬细胞比例检测

取“2.3”项下各组细胞, 以 $300 \times g$ 离心 5 min(下同), 收集细胞沉淀; 用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗并重悬, 取含 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞的悬液, 离心弃上清, 收集细胞沉淀; 用 PBS 洗涤并重悬细胞后再次离心, 收集细胞沉淀。用 100 μL PBS 重悬细胞, 每组分别加入荧光素标记的 CD86、CD206、CD11b 抗体各 5 μL , 轻柔涡旋混匀后, 室温避光孵育 15~20 min。孵育完毕后, 离心弃上清, 收集细胞沉淀; 用 PBS 洗涤细胞 1 次, 加入 500 μL PBS 重悬细胞, 然后立即上机检测。

2.5 细胞超微结构观察

取“2.3”项下各组细胞, 离心收集细胞沉淀, 使用 2.5% 戊二醛进行前固定; PBS 漂洗后, 使用 1% 锇酸进行后固定。细胞经梯度乙醇脱水、包埋后制备超薄切片, 采用醋酸铀和柠檬酸铅双染色, 然后使用透射电子显微镜观察细胞超微结构变化。

2.6 细胞中巨噬细胞表型转化相关标志物及 HIF-1 α mRNA 表达检测

采用实时荧光定量 PCR 法检测。取“2.3”项下各组细胞, 采用 Trizol 法提取细胞中总 RNA, 检测其浓度和纯度后, 将 RNA 反转录为 cDNA, 并以 cDNA 为模板进

行PCR扩增。扩增体系(20 μ L)为:2 $\times$ ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μ L,cDNA模板1 μ L,正、反向引物各0.4 μ L,无菌无酶水8.2 μ L。扩增条件为:95 $^{\circ}$ C预变性10 min;95 $^{\circ}$ C变性10 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,共40个循环。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各目的基因mRNA的相对表达量。引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司设计并合成,引物序列及扩增产物大小见表1。

表1 引物序列及扩增产物大小

基因名称	引物序列(5'-3')	产物大小/bp
iNOS	正向:GCTCTACACCTCAATGTGACC 反向:CTGCCGAGATTGAGCCTCATG	136
TNF- α	正向:CACGCTCTTCTGCCTGCT 反向:GCTTGTCACTCGGGGTTC	128
IL-6	正向:AGACAGCACTCACTCTTCAG 反向:TCTGCCAGTGCCTCTTTGCTG	132
IL-1 β	正向:TCTTTTCCCCTTCCTTAAAC 反向:GAGAGACTCCTTAGCACCTA	234
Arg-1	正向:ATCATCTGGGTGGATGCTCACAC 反向:GAGAACTCTGGCACATCGGGAA	131
IL-10	正向:TCTCCGAGATGCTTCAGCAGA 反向:TCAGACAAGCTTGGCAACCCA	126
MRC1	正向:AGCCAACACCACTCTCAAGAR 反向:CAAAACGCTCGCGCAATTGTCCA	121
CHI3L1	正向:CCACAGTCCATAGAATCTCGG 反向:TGCCTGTCTTCAGGTACTGCA	118
HIF-1 α	正向:GACATCGCGGGACCGATTTC 反向:CGCCGAGATCTGGTGCAT	112
GAPDH	正向:AAGGTCATCCCTGAGCTGAA 反向:TGACAAAGTGGTCGTTGAGG	271

2.7 细胞中巨噬细胞表型转化相关标志物和HIF-1 α 蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.3”项下各组细胞,使用RIPA裂解液提取细胞中总蛋白,测定总蛋白浓度。蛋白经变性、电泳(浓缩胶电压为60 V、电泳时间为0.5 h,分离胶电压为80 V、电泳时间为2 h)、转膜(电流300 mA、转膜时间1 h)、封闭等操作后,加入相应一抗(iNOS、IL-1 β 、HIF-1 α 的稀释比例均为1:2 000,IL-6的稀释比例为1:800,TNF- α 、Arg-1、IL-10、MRC1、CHI3L1的稀释比例均为1:1 000,GAPDH的稀释比例为1:5 000),4 $^{\circ}$ C下孵育过夜;洗膜后,加入相应二抗(稀释比例均为1:10 000),室温下孵育1.5 h。采用ECL化学发光法对蛋白条带进行显影,通过ImageJ软件分析条带灰度值,以目的蛋白与内参蛋白(GAPDH)条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平。

2.8 统计学方法

采用SPSS 25.0软件进行数据分析。计量资料符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组间比较采用单因素方差分析,方差齐时组间两两比较采用LSD- t 检验,方差不齐时组间两两比较采用Dunnett's T_3 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 PMA诱导THP-1细胞分化的考察结果

THP-1细胞正常状态下呈悬浮生长,细胞形态呈圆形,细胞折光性良好。经PMA诱导24 h后,细胞由悬浮状态逐渐转变为贴壁生长状态,细胞体积明显增大,形态由圆形转为不规则形,可见伪足伸展,呈典型的M0型巨噬细胞样形态。结果见图1。

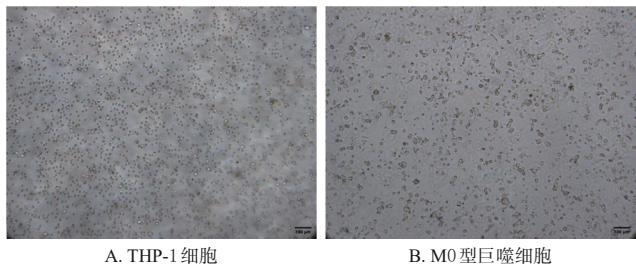


图1 THP-1细胞经PMA诱导前后的形态学变化观察结果(标尺:100 μ m)

3.2 细胞中M1、M2型巨噬细胞比例检测结果

与Control组相比,Model组细胞中CD11b $^{+}$ CD86 $^{+}$ M1型巨噬细胞比例显著升高($P<0.05$),CD11b $^{+}$ CD206 $^{+}$ M2型巨噬细胞比例显著降低($P<0.05$);与Model组相比,各药物组细胞中CD11b $^{+}$ CD86 $^{+}$ M1型巨噬细胞比例均显著降低($P<0.05$),CD11b $^{+}$ CD206 $^{+}$ M2型巨噬细胞比例均显著升高($P<0.05$)。结果见图2、图3、表2。

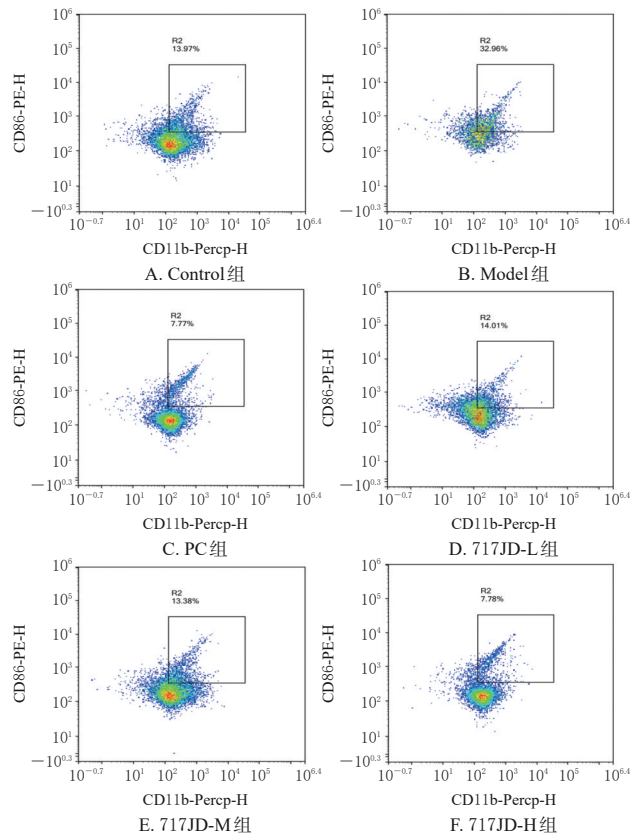


图2 各组细胞中M1型巨噬细胞比例检测的流式细胞图

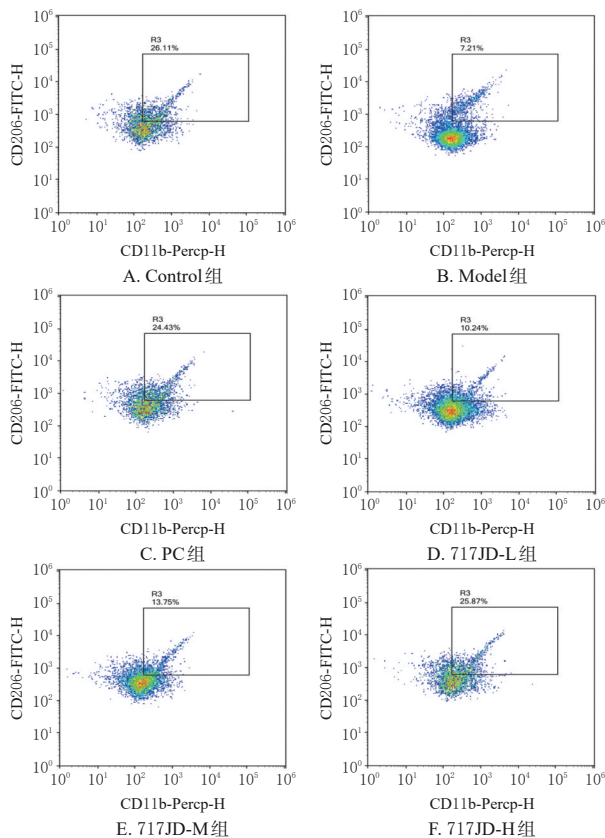


图3 各组细胞中M2型巨噬细胞比例检测的流式细胞图

表2 各组细胞中M1、M2型巨噬细胞比例比较($\bar{x} \pm s$, $n=3$, %)

组别	CD11b ⁺ CD86 ⁺ M1型巨噬细胞比例	CD11b ⁺ CD206 ⁺ M2型巨噬细胞比例
Control组	14.42 ± 1.08	26.00 ± 0.14
Model组	30.87 ± 1.82 ^a	7.31 ± 0.29 ^a
PC组	7.83 ± 0.17 ^b	25.49 ± 0.92 ^b
717JD-L组	14.33 ± 0.80 ^b	10.40 ± 0.20 ^b
717JD-M组	13.00 ± 0.46 ^b	13.91 ± 0.37 ^b
717JD-H组	8.05 ± 0.24 ^b	25.66 ± 1.10 ^b
F	237.666	570.244
P	<0.001	<0.001

a: 与Control组相比, $P < 0.05$; b: 与Model组相比, $P < 0.05$ 。

3.3 细胞超微结构观察结果

Control组细胞形态规则,细胞膜完整、光滑,线粒体结构清晰,细胞核规整。Model组细胞膜破裂,线粒体广泛肿胀,嵴断裂,细胞质内可见明显的空泡样变性,且部分细胞呈现坏死样改变。与Model组相比,PC组细胞膜基本完整,线粒体损伤明显减轻,细胞核形态有所改善,但仍可见轻度嵴紊乱;717JD-L组细胞形态有轻度改善,线粒体损伤未见明显减轻,空泡样变性及自噬泡仍较多;717JD-M组细胞形态明显恢复,线粒体肿胀显著改善,嵴较清晰,细胞核形态规整;717JD-H组细胞的细胞器结构基本接近正常,线粒体形态较规整,空泡样变性少见,细胞核形态正常。结果见图4。

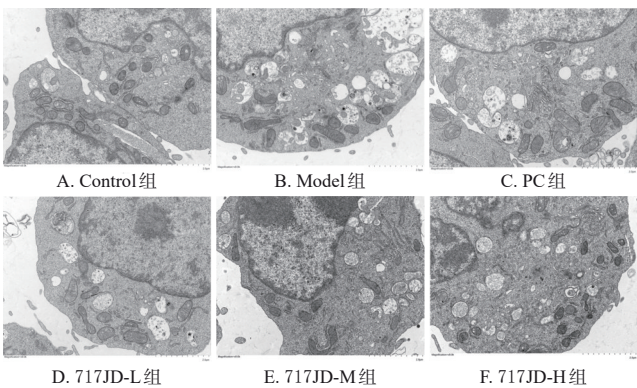


图4 各组细胞的超微结构观察结果(标尺:2 μm)

3.4 细胞中巨噬细胞表型转化相关标志物的mRNA及蛋白表达检测结果

与Control组相比,Model组细胞中M1型巨噬细胞标志物(iNOS、IL-1 β 、IL-6、TNF- α)的mRNA及蛋白表达均显著上调($P < 0.05$),M2型巨噬细胞标志物(Arg-1、IL-10、MRC1、CHI3L1)的mRNA及蛋白表达均显著下调($P < 0.05$)。与Model组相比,各药物组细胞中上述M1型巨噬细胞标志物的mRNA及蛋白表达均显著下调($P < 0.05$),多数M2型巨噬细胞标志物的mRNA及蛋白表达显著上调($P < 0.05$)。结果见表3、表4、图5。

表3 各组细胞中M1型巨噬细胞表型转化标志物的mRNA及蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	iNOS		IL-1 β		IL-6		TNF- α	
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
Control组	1.01 ± 0.15	0.19 ± 0.05	1.00 ± 0.09	0.15 ± 0.05	1.01 ± 0.13	0.17 ± 0.04	1.01 ± 0.13	0.18 ± 0.02
Model组	4.85 ± 0.77 ^a	1.76 ± 0.06 ^a	5.77 ± 0.50 ^a	1.83 ± 0.10 ^a	5.67 ± 0.85 ^a	1.85 ± 0.05 ^a	3.21 ± 0.28 ^a	1.86 ± 0.05 ^a
PC组	1.33 ± 0.26 ^b	0.53 ± 0.05 ^b	1.52 ± 0.13 ^b	0.46 ± 0.03 ^b	1.82 ± 0.35 ^b	0.51 ± 0.06 ^b	1.22 ± 0.12 ^b	0.55 ± 0.03 ^b
717JD-L组	3.58 ± 0.50 ^a	1.42 ± 0.11 ^b	3.45 ± 0.38 ^a	1.47 ± 0.13 ^b	3.26 ± 0.21 ^b	1.51 ± 0.06 ^b	2.33 ± 0.39 ^b	1.50 ± 0.07 ^b
717JD-M组	2.86 ± 0.55 ^a	1.09 ± 0.09 ^b	3.19 ± 0.40 ^a	1.08 ± 0.12 ^b	2.08 ± 0.30 ^b	1.18 ± 0.08 ^b	1.71 ± 0.32 ^b	1.20 ± 0.07 ^b
717JD-H组	2.38 ± 0.35 ^a	0.79 ± 0.08 ^b	1.90 ± 0.12 ^b	0.74 ± 0.06 ^b	1.91 ± 0.23 ^b	0.90 ± 0.05 ^b	1.41 ± 0.23 ^b	0.86 ± 0.05 ^b
F	80.707	163.837	270.157	144.703	140.611	333.089	87.167	438.211
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

a: 与Control组相比, $P < 0.05$; b: 与Model组相比, $P < 0.05$ 。

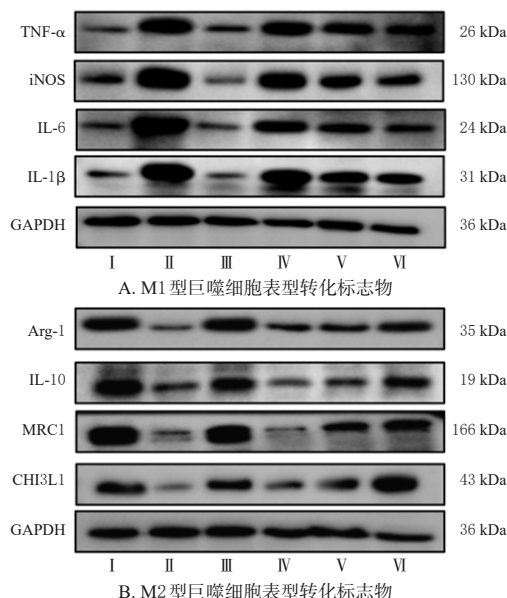
表4 各组细胞中M2型巨噬细胞表型转化标志物的mRNA及蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	Arg-1		IL-10		MRC1		CHI3L1	
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
Control组	1.01 ± 0.09	1.24 ± 0.04	1.02 ± 0.14	1.20 ± 0.03	1.01 ± 0.10	1.73 ± 0.12	1.01 ± 0.10	0.99 ± 0.09
Model组	0.16 ± 0.04 ^a	0.45 ± 0.09 ^a	0.18 ± 0.04 ^a	0.58 ± 0.09 ^a	0.22 ± 0.04 ^a	0.46 ± 0.04 ^a	0.30 ± 0.05 ^a	0.50 ± 0.11 ^a
PC组	0.72 ± 0.14 ^b	1.26 ± 0.14 ^b	0.67 ± 0.12 ^b	1.18 ± 0.08 ^b	0.80 ± 0.19 ^b	1.74 ± 0.04 ^b	0.86 ± 0.09 ^b	0.92 ± 0.06 ^b
717JD-L组	0.35 ± 0.04 ^b	0.48 ± 0.03	0.24 ± 0.04	0.63 ± 0.05	0.29 ± 0.05	0.47 ± 0.04	0.39 ± 0.06	0.45 ± 0.03
717JD-M组	0.48 ± 0.12 ^b	0.69 ± 0.09 ^b	0.36 ± 0.13 ^b	0.76 ± 0.05 ^b	0.45 ± 0.05 ^b	0.63 ± 0.12	0.53 ± 0.06 ^b	0.69 ± 0.03
717JD-H组	0.62 ± 0.11 ^b	0.93 ± 0.05 ^b	0.53 ± 0.04 ^b	0.95 ± 0.07 ^b	0.54 ± 0.05 ^b	0.84 ± 0.03 ^b	0.69 ± 0.06 ^b	0.79 ± 0.10 ^b
F	78.435	54.915	94.155	50.608	91.291	197.226	135.793	23.419
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

a: 与Control组相比, $P < 0.05$; b: 与Model组相比, $P < 0.05$ 。

3.5 细胞中HIF-1 α 的mRNA及蛋白表达检测结果

与Control组相比,Model组细胞中HIF-1 α 的mRNA及蛋白表达均显著上调($P < 0.05$)。与Model组相比,各药物组细胞中HIF-1 α 的mRNA及蛋白表达均显著下调($P < 0.05$)。结果见表5、图6。



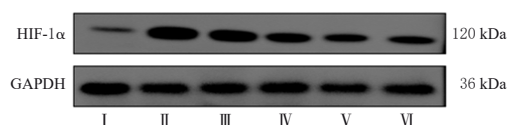
I : Control组; II : Model组; III : PC组; IV : 717JD-L组; V : 717JD-M组; VI : 717JD-H组。

图5 各组细胞中巨噬细胞表型转化相关标志物蛋白表达的电泳图

表5 各组细胞中HIF-1α的mRNA及蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	HIF-1α mRNA	HIF-1α 蛋白
Control组	0.32 ± 0.06	0.24 ± 0.03
Model组	1.20 ± 0.13 ^a	0.97 ± 0.04 ^a
PC组	1.02 ± 0.03 ^b	0.76 ± 0.04 ^b
717JD-L组	0.83 ± 0.01 ^b	0.63 ± 0.03 ^b
717JD-M组	0.56 ± 0.01 ^b	0.48 ± 0.02 ^b
717JD-H组	0.58 ± 0.07 ^b	0.52 ± 0.05 ^b
F	70.934	164.388
P	<0.001	<0.001

a: 与Control组相比, $P < 0.05$; b: 与Model组相比, $P < 0.05$ 。



I : Control组; II : Model组; III : PC组; IV : 717JD-L组; V : 717JD-M组; VI : 717JD-H组。

图6 各组细胞中HIF-1α蛋白表达的电泳图

4 讨论

蝮蛇毒是一种复杂的生物活性混合物,主要包括磷脂酶A2、蛇毒金属蛋白酶、C型凝集素及少量神经毒素等^[14]。蝮蛇毒所致的局部组织损伤,不仅源于毒素对肌细胞和血管内皮细胞的直接毒性作用,还与巨噬细胞介导的继发性炎症放大效应密切相关^[15-16]。本研究采用PMA诱导THP-1细胞分化为M0型巨噬细胞,显微镜观察结果显示,诱导后细胞由悬浮生长转为贴壁生长,体积增大、形态不规则,符合M0型巨噬细胞的典型形态学特征。随后,本研究以蝮蛇毒刺激建立蝮蛇咬伤中毒细

胞模型。结果显示,蝮蛇毒刺激后可诱导M0型巨噬细胞向促炎M1型极化,同时造成线粒体肿胀、嵴断裂、细胞质空泡化等典型超微结构损伤;该病理效应可较好地模拟蝮蛇咬伤局部巨噬细胞的炎症激活与细胞损伤状态。717解毒合剂干预后,巨噬细胞的形态得到改善,线粒体嵴较清晰,细胞核形态规整,表明717解毒合剂可改善蝮蛇毒导致的巨噬细胞超微结构损伤,并减轻线粒体结构破坏。

M1型巨噬细胞表型转化标志物iNOS能催化一氧化氮生成、介导氧化应激损伤^[17];TNF-α、IL-6、IL-1β是核心促炎因子^[18]。M2型巨噬细胞表型转化标志物Arg-1能竞争iNOS底物,进而拮抗促炎效应^[19];IL-10为经典抗炎因子,MRC1具备内吞清除功能并参与抗炎反馈调控,CHI3L1则参与组织重塑与修复过程^[20-21]。本研究结果显示,Model组细胞中M1型巨噬细胞比例及相关表型转化标志物iNOS、TNF-α、IL-6、IL-1β的mRNA及蛋白表达均显著升高/上调,M2型巨噬细胞比例及相关表型转化标志物Arg-1、IL-10、MRC1、CHI3L1的mRNA及蛋白表达均显著降低/下调。这提示蝮蛇毒诱导后巨噬细胞表型调控失衡,局部炎症产生。717解毒合剂干预后,上述指标明显改善,表明717解毒合剂能够有效逆转巨噬细胞表型转化失衡,促进巨噬细胞从促炎M1型向抗炎修复M2型转化,从而发挥抗炎作用。

HIF-1α是调控巨噬细胞表型转化的重要因子,但其过度激活可上调己糖激酶2、丙酮酸激酶M2型等糖酵解关键酶,驱动代谢从氧化磷酸化转向糖酵解重编程,促进巨噬细胞向M1型转化;同时,其还可以靶向下调烷基化修复同源蛋白7的表达来触发线粒体损伤^[22]。本研究结果显示,与Control组比较,Model组细胞中HIF-1α的mRNA及蛋白表达均显著上调;717解毒合剂干预后,细胞中HIF-1α的mRNA及蛋白表达均显著下调,提示717解毒合剂可能通过抑制HIF-1α的过度激活,从而抑制M1型巨噬细胞表型转化并修复线粒体损伤。

综上所述,717解毒合剂可通过调控巨噬细胞表型转化、修复线粒体超微结构损伤发挥抗炎及组织修复作用,其机制可能与抑制HIF-1α通路过度激活相关。本研究存在一定局限性,如THP-1来源的巨噬细胞与原代单核细胞来源的巨噬细胞存在差异、HIF-1α通路的上下游调控关系尚未明确等,后续需通过单核细胞来源的巨噬细胞模型、动物实验及临床研究进一步验证,并结合药代动力学研究及基因敲除、通路阻断实验等深入阐明717解毒合剂的作用机制。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lancet T. Snake-bite envenoming: a priority neglected tropical disease[J]. Lancet, 2017, 390(10089):2.
- [2] Afroz A, Siddiquea B N, Chowdhury H A, et al. Snakebite envenoming: a systematic review and meta-analysis of global morbidity and mortality[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2024, 18(4):e0012080.
- [3] Luo J, Guo M K, Xie K, et al. Metabolomic analysis of *Agkistrodon haly* venom poisoning mouse treatment by Jidesheng snake pill based on GC-MS[J]. Front Pharmacol, 2024, 15:1419609.
- [4] Gutiérrez J M, Rucavado A, Escalante T, et al. Unresolved issues in the understanding of the pathogenesis of local tissue damage induced by snake venoms[J]. Toxicon, 2018, 148:123-131.
- [5] Wang Y H, Du X, Hao M L, et al. Dose-response association between admission neutrophil-to-lymphocyte ratio and clinical severity in *Gloydius brevicaudus* envenomation [J]. Front Immunol, 2026, 17:1799662.
- [6] Murray P J, Wynn T A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets[J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(11):723-737.
- [7] 刘志国, 曹阳, 赵雅, 等. 炎症因子和递质在蛇咬伤患者中的研究进展[J]. 临床急诊杂志, 2017, 18(10):798-800.
- [8] Bickler P E, Abouyannis M, Bhalla A, et al. Neuromuscular weakness and paralysis produced by snakebite envenoming: mechanisms and proposed standards for clinical assessment[J]. Toxins, 2023, 15(1):49.
- [9] Liu G X, Li D J, Wei Z, et al. HIF-1 α -centered metabolic reprogramming in osteoarthritis: cell type-specific effects and intercellular crosstalk among chondrocytes, BMSCs, and macrophages[J]. Front Immunol, 2026, 17:1915008.
- [10] Qiu B Q, Yuan P L, Du X J, et al. Hypoxia inducible factor-1 α is an important regulator of macrophage biology[J]. Heliyon, 2023, 9(6):e17167.
- [11] 邱雪辉, 万乐, 吴卓航, 等. 717 解毒合剂联合九味消肿拔毒散治疗蝮蛇咬伤临床疗效观察[J]. 时珍国医国药, 2024, 35(7):1676-1679.
- [12] 杨悦, 顾佳婕, 李玉梅, 等. 717 解毒合剂调控 VEGF/ERK 通路对蝮蛇咬伤大鼠局部组织损伤的修复作用[J]. 中国现代应用药学, 2026, 43(7):1081-1090.
- [13] Genin M, Clement F, Fattaccioli A, et al. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide[J]. BMC Cancer, 2015, 15:577.
- [14] Lertwanakarn T, Reyes A, Salazar E, et al. The effect of purified opharin isolated from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*) in modulating macrophage inflammatory responses and vascular integrity[J]. Toxins, 2024, 16(12):550.
- [15] Ibiapina H N S, Costa A G, Sachett J A G, et al. An immunological stairway to severe tissue complication assembly in *Bothrops atrox* snakebites[J]. Front Immunol, 2019, 10:1882.
- [16] Teixeira C, Fernandes C M, Leiguez E, et al. Inflammation induced by platelet-activating viperid snake venoms: perspectives on thromboinflammation[J]. Front Immunol, 2019, 10:2082.
- [17] Weidinger A, Müllebnner A, Paier-Pourani J, et al. Vicious inducible nitric oxide synthase-mitochondrial reactive oxygen species cycle accelerates inflammatory response and causes liver injury in rats[J]. Antioxid Redox Signal, 2015, 22(7):572-586.
- [18] Ma B, Li Z, Xu H, et al. Targeting phenol-soluble modulins α 3-driven M1 macrophage polarization and necroptosis mitigates MRSA infection in mice[J]. Nat Commun, 2026, 17:4497.
- [19] Pourcet B, Pineda-Torra I. Transcriptional regulation of macrophage arginase 1 expression and its role in atherosclerosis[J]. Trends Cardiovasc Med, 2013, 23(5):143-152.
- [20] Upmanyu K, Upadhyay S, Gabr M T. Redefining CHI3L1: therapeutic opportunities at the crossroads of immune suppression and disease progression[J]. Med Res Rev, 2026, 46(6):1897-1921.
- [21] Wollman J, Wanniarachchi K, Pradhan B, et al. Mannose receptor (MRC1) mediates uptake of dextran by bone marrow-derived macrophages[J]. Mol Biol Cell, 2024, 35(12):ar153.
- [22] Wang H, Zhao Y C, Xu L, et al. HIF-1 α mediates mitochondrial damage by down-regulating ALKBH7 expression to promote the aberrant activation of FLS in rheumatoid arthritis[J]. Acta Pharmacol Sin, 2025, 46(8):2225-2236.

(收稿日期:2026-05-06 修回日期:2026-09-20)
(本文责编:林 静)