DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.03.010

山楂提取物通过 NETs 影响 T 细胞调控血脂异常的作用机制研究

周碧聪[1],杨莺[2]
(1.辽宁中医药大学,辽宁 沈阳 110847;2.辽宁中医药大学附属医院,辽宁 沈阳 110032)

摘要:目的 探讨山楂提取物通过中性粒细胞胞外诱捕网(Neutrophil Extracellular Traps,NETs)影响血脂异常小鼠T细胞的分化并调控血脂水平的作用机制研究。方法 50只雄性6周龄C57BL/6J小鼠适应性饲养1周后,10只予以普通饲料喂养,40只予以60%高脂饲料喂养建立高脂小鼠模型,造模4周后,将高脂小鼠随机分为高脂饮食组(High Fat Diet,HFD)、HFD+山楂提取物组、HFD+NETs抑制剂载体溶剂组、HFD+NETs抑制剂GSK484组。HFD+山楂提取物组小鼠山楂提取物灌胃,5.2 g/(kg·d),HFD+NETs抑制剂GSK484组腹腔注射GSK484,4 mg/(kg·d),HFD+NETs抑制剂载体溶剂组腹腔注射等量载体溶剂,对照组和HFD组同时间口服等量蒸馏水。给药4周后,生化分析仪检测血清总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇含量;酶联免疫吸附测定技术检测血清干扰素-γ(Interferon-gamma,IFN-γ)、白细胞介素-4(Interleukin-4,IL-4)、白细胞介素-10(Interleukin-10,IL-10)、白细胞介素-17A(Interleukin-17A,IL-17A)、白细胞介素-21(Interleukin-21,IL-21)含量;免疫荧光双染法检测中性粒细胞髓过氧化物酶(Myeloperoxidase,MPO)和瓜氨酸化的组蛋白(Citrullinated histone H3,CitH3)表达分析NETs形成,蛋白免疫印迹法检测外周血单个核细胞T-box转录因子21(T-box Transcription Factor 21,TBx21)、Gata结合蛋白3(GATA-Binding Protein 3,Gata-3)、维甲酸相关孤核受体γt(Retinoic Acid-Related Orphan Nuclear Receptor Gamma γt,RORγt)、叉头样转录因子3(Forkhead Box Protein P3,Foxp3)、B细胞淋巴瘤6(B-cell lymphoma 6,Bcl-6)蛋白表达。结果 相较于正常对照组,高脂饮食小鼠体质量显著增加,HFD组小鼠TC、TG、LDL-C水平显著升高,HDL-C水平显著降低,IFN-γ、IL-17A、IL-21显著升高,IL-4和IL-10显著降低,MPO、CitH3表达水平显著升高,外周血蛋白Tbx21、RORγt表达量显著增加,Gata3、Foxp3、Bcl-6表达量显著减少。与HDF组相比,HFD+山楂提取物组和HFD+NETs抑制剂GSK484组小鼠体重显著降低,TC、TG、LDL-C水平显著降低,HDL-C显著升高,IFN-γ、IL-17A、IL-21均显著降低,IL-4显著增加,而IL-10相较于HFD组,在HFD+山楂提取物组中表达显著增加,在HFD+NETs抑制剂GSK484组中无显著差异性。与HFD组相比,HFD+山楂提取物组和HFD+NETs抑制剂GSK484组MPO、CitH3表达水平均显著减少,Tbx21、RORγt蛋白表达量均显著降低,Gata3蛋白表达量均显著增加,而Bcl-6和Foxp3在HFD+山楂提取物组中表达显著增高,在HFD+NETs抑制剂GSK484组中显著降低。结论 山楂提取物通过降低血脂异常小鼠的NETs水平从而有效改善血脂异常的作用机制可能与调控Tbx21、RORγt、Gata3因子,影响Th1/Th2、Th17/Treg分化有关。

关键词:山楂提取物;血脂异常;炎症免疫调节;NETs;T细胞分化
中图分类号:R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-7717(2026)03-0055-08

Mechanism of Shanzha(Hawthorn) Extract in Regulating Dyslipidemia by Affecting T Cells Through NETs

ZHOU Bicong[1],YANG Ying[2]
(1.Liaoning University of Traditional Chinese Medicine,Shenyang 110847,Liaoning,China;
2.Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine,Shenyang 110032,Liaoning,China)

Abstract:*Objective* To investigate the mechanism of Shanzha(Hawthorn) extract affecting T cell differentiation and regulating blood lipid level in dyslipidemic mice through neutrophil extracellular trap(NETs). *Methods* Fifty male 6-week-old C57BL/6 J mice were acclimatized for 1 week,10 mice were fed with normal chow and 40 mice were fed with 60% high-fat chow to establish a high-fat mouse model. 4 weeks after modeling,the high-fat mice were randomly divided into a high-fat

基金项目:国家自然科学基金项目(81603605);辽宁省科学技术应用基础研究计划项目(2023JH2/101300057)
作者简介:周碧聪(1997-),女,甘肃临夏人,硕士在读,研究方向:中西医结合防治心血管疾病。
通讯作者:杨莺(1976-),女,辽宁沈阳人,主任医师,博士研究生导师,博士,研究方向:中西医结合防治心血管疾病。E-mail:yy20170225@sina.com。

diet(HFD) group, a HFD + Shanzha(Hawthorn) extract group, and a HFD + NETs inhibitor carrier solvent group, HFD + NETs inhibitor GSK484 group. The mice in the HFD + Hawthorn extract group were treated with Shanzha(Hawthorn) extract by gavage [5.2 g/(kg · d)]. The mice in the HFD + NETs inhibitor GSK484 group were intraperitoneally injected with GSK484[4 mg/(kg · d)]. The mice in the HFD + NETs inhibitor carrier solvent group were intraperitoneally injected with an equal amount of carrier solvent, and the mice in the control group and the HFD group were injected with an equal amount of distilled water at the same time. The equal amount of the distilled water was administered orally. After 4 weeks of drug administration, the levels of serum total cholesterol, triglyceride, high - density lipoprotein cholesterol and low - density lipoprotein cholesterol were measured by biochemical analyzer. The levels of serum interferon - γ(IFN - γ), interleukin - 4(IL - 4), interleukin - 10(IL - 10), interleukin - 17A(IL - 17A) and interleukin - 21(IL - 21) were measured by enzyme - linked immunosorbent assay(ELISA). The immunofluorescence double staining was used for the expressions of neutrophil myeloperoxidase(MPO) and citrullinated histone(CitH3) to analyze the formation of NETs, and Western blotting was used for the protein expressions of peripheral blood mononuclear cell T - box transcription factor 21(TBx21), Gata - binding protein 3(Gata - 3), retinoic acid - related orphan nuclear receptor γt(RORγt), forkhead - like transcription factor 3(Foxp3) and B - cell lymphoma 6(Bcl - 6). *Results* Compared with those in the normal control group, the high - fat diet mice showed significant increase in body weights, significant increase in the levels of TC, TG and LDL - C, significant decrease in HDL - C levels, significant increase in the levels of IFN - γ, IL - 17A and IL - 21, and significant decrease in the levels of IL - 4 and IL - 10, significant increase in the expression levels of MPO and CitH3, and significant increase in the expression levels of protein expressions of Tbx21 and RORγt in the peripheral blood, and significant decrease in the levels of Gata3, Foxp3 and Bcl - 6. Compared with those in the HDF group, the mice in the HFD + Shanzha(Hawthorn) extract group and the HFD + NETs inhibitor GSK484 group had significantly lower body weights, significantly lower levels of TC, TG and LDL - C, significantly higher levels of HDL - C, significantly lower levels of IFN - γ, whereas IL - 10 was significantly increased in the HFD + Shanzha(Hawthorn) extract group compared to that in the HFD group, and there was no significant difference in the HFD + NETs inhibitor GSK484 group. Compared to those in the HFD group, in the HFD + Shanzha(Hawthorn) extract and HFD + NETs inhibitor GSK484 groups, the expression levels of MPO and CitH3 dropped significantly. The protein expressions of Tbx21 and RORγt decreased notably, while the Gata3 protein expression increased. Bcl - 6 and Foxp3 in the HFD + Shanzha(Hawthorn) extract group increased significantly, but in the HFD + NETs inhibitor GSK484 group, Foxp3 showed no significant change. *Conclusions* The mechanism of action of Shanzha(Hawthorn) extract may be related to the regulation of factors such as Tbx21, RORγt and Gata3, which affect Th1/Th2 and Th17/Treg differentiation, by decreasing the level of NETs in dyslipidemic mice and thus effectively ameliorating dyslipidemia.

Keywords: Shanzha(Hawthorn) extract; dyslipidemia; inflammatory immunomodulation; NETs; T cell differentiation

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是以脂质沉积和免疫细胞浸润为主要的动脉血管壁慢性炎症性病理变化[1]。研究发现,中性粒细胞释放的颗粒蛋白和NETs在脂质代谢、炎症、内皮细胞损伤等方面发挥重要作用,促进AS的发生发展[2]。NETs是中性粒细胞在细菌、真菌、病毒和寄生虫等刺激下释放到细胞外并由DNA、组蛋白、颗粒蛋白和胞浆蛋白等组成的网状纤维结构,其形成和释放过程为NETosis[3],是一种不同于直接吞噬病原的免疫防御机制[4]。血脂异常往往诱导NETs的产生,在NETs形成和清除不平衡的情况下,过量的NETs不仅会直接造成组织损伤,还会招募促炎细胞或蛋白质,放大免疫炎症反应,从而推动相关疾病的进展[5]。因此,阻断NETosis或降解NETs可能有助于改善血脂异常并预防AS。

中药山楂在调节血脂方面具有独特的潜力,包括促进胆固醇代谢、改善血液流动性、降低血液中的低密度脂蛋白水平、扩张血管、增强心脏功能等[6]。课题组前期研究表明[7-8],山楂提取物可以通过调控Tbx21、Gata3、CD36、PPARγ因子,进而影响T细胞亚群的分化过程,减轻脂质沉积从而有效地防治血脂异常。本实验以SPF级小鼠为研究对象,建立高脂饮食小鼠模型,进一步探究山楂提取物改善血脂异常的机制是否与其抑制NETs进而调控T细胞及其转录因子有关,从免疫炎症角度为中药防治血脂异常及动脉粥样硬化提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验共采用50只体质量(20 ± 2)g的C57BL/6J雄性小鼠(6周龄,SPF级)。小鼠均由辽宁长生生物技术股份有限公司供应,许可证编号:SCXK(辽)2020 - 0001。饲养与实验均在辽宁中医药大学SPF级动物房。经1周适应性饲养后,随机分组并构建模型。本研究获得辽宁中医药大学实验动物伦理委员会批准(编号:21000062024181)。

1.2 药物

山楂提取物(制备方法:称取1000 g山楂药材,10倍量水,煎煮2次,每次1 h。合并滤液,浓缩至1000 mL定容,得山楂提取物组供试液(每1 mL含原药材1 g,放置4 ℃冰箱保存。使用前,加蒸馏水配制成高剂量山楂提取物,按生药量计),由辽宁中医药大学附属医院制剂室提供(安徽省普仁中药饮片有限公司,生产批号:2212022);GSK484(中国麦克林公司,批号:G881625)。

1.3 试剂

TC试剂盒(中国万类生物公司,WLA132);TG、HDL - C、LDL - C试剂盒(南京建成公司,货号:A110、A112 - 2、A113);Mouse IFN - γ ELISA Kit、Mouse IL - 4 ELISA Kit、Mouse IL - 10

ELISA Kit、Mouse IL－17A ELISA Kit、Mouse IL－21 ELISA Kit（中国联科公司，货号：EK280、EK204、EK210、EK217、EK221）；MPO、Hit3Cit、山羊抗大鼠 IgG（CY3）、山羊抗兔 IgG（FITC）（Abcam 公司，货号：Ab300650、Ab281584、ab6953、ab6717）；多聚甲醛（中国国药公司，货号 80096618）；tritonX－100（中国 Beyotime 公司，货号 ST795）；BSA 粉末（中国生工生物公司，货号 A602440－0050）；DAPI（中国阿拉丁公司，货号 D106471－5 mg）；抗荧光淬灭剂（中国 Solarbio 公司，货号 S2100）；全蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS－PAGE 凝胶快速制备试剂盒（中国 wanleibio 公司，货号：WLA019、WLA004、WLA013）；Western 洗涤液、SDS－PAGE 电泳液、SDS－PAGE 蛋白上样缓冲液、ECL 发光液、WB 封闭液、WB 一抗二抗稀释液（中国 wanleibio 公司，货号：WLA025、WLA026、WLA005、WLA006、WLA066、WLA068）；Tbx21 antibody、Gata3 antibody、RORγt antibody、Foxp3 antibody、Bcl－6 antibody、羊抗兔 IgG－HRP、内参抗体 β－actin（均购自中国 wanleibio 公司，货号：WL03236、WL05009、WL05118、WL00721、WL03134、WLA023、WL01372）；PVDF 膜（美国 Millipore 公司，货号 IPVH00010）。

1.4 仪器

超纯水系统（中国香港 Heal Force 公司，型号：NW10LVF）、－70 ℃超低温冰箱（安徽中科美菱公司，型号：DWHL－668）；微量移液器（苏州 BIOHIT 公司，型号：Proline）；酶标仪（美国 BIOTEK 公司，型号：ELX－800）；显微镜及拍照系统（日本 OLYMPUS 公司，型号：BX53、DP73）；紫外可见分光光度计（上海佑科公司，型号：UV752N）、水平摇床、电泳仪、转移槽、双垂直蛋白电泳仪（北京六一公司，型号：WD－9405B、DYY－7C、DYCZ－40D、DYCZ－24DN）；超速冷冻离心机（长沙湖南湘仪公司，型号：H－2050R）、电热恒温培养箱（天津泰斯特公司，型号：DH36001B）。

1.5 方法

1.5.1 动物分组、造模及给药 雄性6周龄 C57BL/6 J 小鼠适应性饲养1周后，随机分为5组，每组10只即正常对照组、HFD 组、HFD＋山楂提取物组、HFD＋NETs 抑制剂 GSK484 组、HFD＋NETs 抑制剂载体溶剂组。正常对照组给予普通饲料正常饲养8周，HFD 小鼠给予60%脂肪供能高脂饲料喂养8周。山楂提取物处理小鼠在高脂饲养4周后，口服 5.2 g/kg（高剂量）山楂提取物，每日1次，其他组口服等量蒸馏水。NETs 抑制剂处理小鼠在高脂饲养4周后，腹腔注射 GSK484（4 mg/kg），每天1次，NETs 抑制剂载体溶剂组同时间腹腔注射等量载体溶剂（DMSO in PBS）。

1.5.2 取材方法 实验第九周后取材，末次给药后禁食24 h，小鼠处死前称重，用3%浓度异氟烷诱导麻醉，2%异氟烷维持麻醉后腹主动脉采血，室温放置30 min，4 ℃、2000 r/min 离心10 min，取上清，分装后置于－80 ℃冰箱中备用。

1.5.3 小鼠血清血脂水平检测 取出置于－80 ℃冰箱保存的血清样品，放入4 ℃冰箱逐渐溶解，根据相应脂质试剂盒要求，使用全自动生化分析仪检测小鼠血清中 TC、TG、LDL－C、HDL－C 含量。

1.5.4 ELISA 检测血清炎症因子表达 采用酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒测小鼠血清中 IFN－γ、IL－4、IL－10、IL－17A、IL－21 含量。

1.5.5 免疫荧光双染检测中性粒细胞 MPO 和 CitH3 蛋白表达 采用免疫荧光双染法，利用特异性抗体标记 NETs 的主要蛋白成分 Cith3 和 MPO 对样本进行固定和 TritonX－100 透膜处理，加入特异性一抗孵育，清洗后再加入荧光标记的二抗孵育，加 DAPI 复染细胞核，在载玻片滴抗荧光淬灭剂，将爬片倒扣封片，荧光显微镜下观察、拍照。使用 Iamge J 软件测定各组图片中荧光强度数值，定量分析。

1.5.6 Western Blot 法检测外周血单个核细胞蛋白表达 将样品与含 PMSF 的裂解液按质量和体积比例混合后在冰上静置5 min，放入低温冷冻离心机，在 12 000 r/min、4 ℃的条件下离心10 min，取上清为蛋白质抽提物。采用 BCA 法测蛋白浓度，先制备标准曲线与待测蛋白液。预热酶标仪，设570 nm 波长读记酶标板数值，据标准蛋白浓度与吸光值绘曲线，用回归方程计算样本蛋白浓度后乘稀释倍数得出结果。组装电泳装置，制备聚丙烯酰胺凝胶和蛋白上样液，进行电泳。之后将蛋白转印至 PVDF 膜，转印结束后对膜进行封闭（5%脱脂牛奶）2 h。TBST 洗膜，一抗孵育4 ℃摇床过夜。次日，洗膜3次，每次5 min。室温二抗孵育2 h。孵育结束后，在 TBST 溶液中，摇床振荡清洗5 min，如此重复3次。显影，扫描胶片，数据使用 Image J 分析。

1.6 数据统计与分析

运用 SPSS 26.0 统计软件分析数据，以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间用单因素方差分析，组内用独立样本 t 检验，以 $P<0.05$ 及不同标注符号表示差异有统计学意义。使用 GraphPadPrism 10.4 绘制图片。

2 结果

2.1 山楂提取物和 NETs 抑制剂对血脂异常小鼠体质量的影响

不同组小鼠的初始体质量没有显著差异，经过8周干预后，与正常对照组相比，HFD 组小鼠体质量显著增加（$P<0.01$）；与 HFD 组相比，HFD＋山楂提取物组与 HFD＋NETs 抑制剂 GSK484 组体质量显著降低（$P<0.01$）。见插页Ⅻ图1。

2.2 山楂提取物和 NETs 抑制剂对血脂异常小鼠血脂的影响

与正常对照组相比，HFD 组与 HFD＋NETs 抑制剂载体溶剂组的 TC、TG、LDL－C 显著升高（$P<0.01$），HDL－C 显著降低（$P<0.01$）；与 HFD 组相比，HFD＋山楂提取物组和 HFD＋NETs 抑制剂 GSK484 组的 TC、TG、LDL－C 显著降低（$P<0.01$），HDL－C 显著增加（$P<0.05$）；HFD＋山楂提取物组与 HFD＋NETs 抑制剂 GSK484 组相比，TC、TG、LDL－C、HDL－C 差异无统计学意义（$P>0.05$）。见插页Ⅻ图2。

2.3 山楂提取物和 NETs 抑制剂对血脂异常小鼠血清炎症因子的影响

与正常对照组相比，HFD 组的 IFN－γ、IL－17A、IL－21 显著增加（$P<0.01$），IL－4、IL－10 显著下降（$P<0.01$），HFD＋山楂提取物组的 IFN－γ 增高（$P<0.05$），HFD＋NETs 抑制剂 GSK484 组和 HFD＋山楂组的 IL－10 显著下调（$P<0.01$，$P<0.05$）；与 HFD 组相比，HFD＋山楂组和 HFD＋NETs 抑制剂 GSK484 组的 IFN－γ、IL－17A、IL－21 显著下调（$P<0.01$），IL－4 显著上调（$P<0.01$），而 IL－10 相较于 HFD 组，与 HFD＋NETs 抑制剂 GSK484 组中差异无统计学意义，在 HFD＋山楂提取物组中显著增加（$P<0.01$）。见插页Ⅻ图3。

2.4 山楂提取物和NETs抑制剂对血脂异常小鼠NETs的影响

与正常组相比，HFD组、HFD + 山楂提取物组、HFD + NETs抑制剂载体溶剂组均荧光增强，区域变大（$P<0.01$）；与HFD相比，HFD + 山楂提取物组和HFD + NETs抑制剂GSK484组荧光区域变小（$P<0.01$）；与HFD + 山楂提取物组相比，HFD + NETs抑制剂GSK484组荧光区域显著变小（$P<0.01$）。见插页XX图4、插页XX图5。

2.5 山楂提取物和NETs抑制剂对血脂异常小鼠外周血单个核细胞蛋白表达的影响

与正常对照组相比，HFD组Tbx21、RORγt表达量显著增加（$P<0.01$），Gata3、Foxp3、Bcl－6表达量显著减少（$P<0.01$）；与HFD相比，HFD + 山楂提取物组小鼠血清中Tbx21、RORγt表达量显著减少（$P<0.01$），Gata3、Foxp3、Bcl－6表达量显著增加（$P<0.01$）；HFD组与HFD + NETs抑制剂GSK484组相比，HFD + NETs抑制剂GSK484组小鼠血清中Tbx21、RORγt、Foxp3、Bcl－6表达量显著减少（$P<0.01$），Gata3表达量显著增加（$P<0.01$）。见插页XX图6。

3 讨论

血脂异常与心血管疾病风险的增加密切相关。近年来，我国成人血脂异常患病率一直维持在较高水平[9]。目前，西医主要通过他汀类等调脂药物来管理血脂，但长期使用他汀类药物可能会引起肌肉疼痛、肝功能异常、糖耐量降低等一系列不良反应，有研究报道，在停止使用调脂药物以后，血脂将出现反弹以及甚至具有一定的肌肉毒性[10]。寻找安全有效天然治疗剂尤为重要。

中医典籍中无“血脂异常”一词，但根据其病机可归属于“膏脂”“痰湿”范畴[11]。如《医学衷中参西录》“膏脂者，水谷之精微，虽为人体所必需，然过则为病。”指出膏脂是人体正常精微物质，但代谢失常则成病理产物；《灵枢·卫气失常》“人有脂，有膏，有肉……膏者，多气而皮纵缓，故能纵腹垂腴。”强调膏脂异常与人体气机有关；叶天士《临证指南医案》“膏脂凝涩，脉络瘀阻，发为胸痹。”提出膏脂黏滞可阻滞脉络、形成血瘀导致胸痹，为后世认识血脂异常相关疾病奠定了理论基础。中医学认为血脂异常属“本虚标实”之证，由个人体质、年老体虚、饮食不节、情志内伤等诸多因素导致气血津液代谢失常及脏腑功能失司使水谷精微化为痰湿脂浊，脏腑功能失调与脾失健运最为密切[12]，邪实侵犯使脾胃功能受损，膏脂输布障碍，发展成脂浊。山楂始载于《本草纲目》，为蔷薇科植物山里红的干燥成熟果实，又名映山红果、山里红、山查等，分布较广，其味酸、甘，性微温，归脾、胃、肝经，具有消食健胃、行气散瘀、化浊降脂等功效[13]，临床用于动脉粥样硬化、高脂血症、冠心病、高血压病、心力衰竭等的治疗[14]。目前为止，已从山楂中分离鉴定出多种有效成分，如黄酮类、有机酸类、三萜类、多糖等几十种化合物[15－17]，山楂降脂的作用机制与改善内皮功能[18]，改善氧化应激[19]、抗炎、抑制胆固醇合成和加速胆固醇代谢[20]、激活腺苷酸活化蛋白激酶（AMPK）信号通路[21]、调节肠道菌群[22]等相关，其中降脂作用最丰富的是黄酮类化合物及其衍生物[23]。木犀草素、表儿茶素作为山楂提取物中的主要黄酮类化合物还可抑制NETs的形成[24]。

血脂异常改变血管稳态，触发免疫炎症反应，募集T细胞和单核细胞黏附到血管内皮细胞上，并促进单核细胞迁移进入内膜，分化为巨噬细胞，继而巨噬细胞吞噬脂类物质形成巨噬泡沫细胞，并分泌促炎因子。炎症反应使中性粒细胞产生NETs，MPO和CitH3是NETs形成的最特异、客观和定量的标志物[25]，NETs参与调控T细胞分化介导的免疫反应[26]。辅助性T细胞（Th1、Th2、Th17）和调节性T细胞（Treg）通过分泌多种促炎细胞因子和抗炎细胞因子在AS中调节免疫应答。Th1是斑块中最主要的T细胞亚群[27]，Th1细胞分泌多种促炎细胞因子，如IFN－γ通过调节参与胆固醇代谢的关键基因，促进泡沫细胞的形成，加速AS进程[28]。IL－4可借助信号转导途径，诱导Th2转录因子Gata－3的表达，影响Th2分化进程。有研究发现，促进Th1/Th2平衡向Th2细胞的转移可缓解AS[29]。Th17和Treg细胞间的不平衡也与AS的发生发展密切相关，Treg细胞可以预防AS，而Th17细胞的作用尚存在争议[30]，Treg可分泌IL－10和转化生长因子β（transforming growth fac tor－β，TGF－β）抑制炎症反应防止AS斑块形成，Foxp3为其转录因子。IL－17是Th17细胞分泌的特征性细胞因子，RORγt为其特征性转录因子，有研究表明，IL－17在免疫细胞、内皮细胞和基质细胞中诱导IL－6及相关刺激因子和趋化因子的分泌，从而促进AS的进展[31]，但BRAUNER等的研究则表明，IL－17能稳定动脉粥样斑块，降低心肌梗死的风险[32]。Tfh和Tfr是影响免疫稳态的重要分子机制，与AS密切相关[33]，Tfh细胞分泌IL－21，具有促炎促AS作用，Bcl－6为其转录因子。Tfr分泌IL－10与TGF－β，抑制Tfh和B细胞，减少抗体分泌。但Tfr细胞对AS的影响机制尚不明确。Th1/Th2、Th17/Treg、Tfh/Tfr的免疫炎症平衡在AS防治中至关重要。本实验探究山楂提取物能否抑制NETs使T细胞分化恢复相对平衡的状态及其机制。

本研究显示，HFD组小鼠的体质量和血清TC、TG、LDL－C水平明显升高，HDL－C显著降低；血清促炎因子IFN－γ、IL－17A、IL－21显著升高，抗炎因子IL－4和IL－10显著降低；MPO、Cit－H3含量明显升高，NETs水平显著增加；外周血蛋白Tbx21、RORγt表达量显著增加，Gata3、Foxp3、Bcl－6表达量显著减少。表明血脂异常情况下，小鼠血清血脂水平TC、TG、LDL－C及HDL－C均发生改变，NETs的形成显著性增强，Th1/Th2、Th17/Treg、Tfh/Tfr细胞炎症因子与转录因子失衡。

血脂异常小鼠经山楂提取物和NETs抑制剂GSK484干预后，两组小鼠体质量显著降低，TC、TG、LDL－C水平显著降低，HDL－C显著增高，表明山楂提取物和NETs抑制剂GSK484均可改善血脂；HFD + 山楂提取物组和HFD + NETs抑制剂GSK484组中IFN－γ、IL－17A、IL－21水平均较HFD组显著降低，IL－4较HFD组显著升高，IL－10在HFD + 山楂提取物组中较HFD组显著升高，但在HFD + NETs抑制剂GSK484组中无显著差异性，表明山楂提取物对IFN－γ、IL－17A、IL－21的升高与对IL－4降低的作用与NETs抑制相关，对IL－10的调控可能与其他途径相关；HFD + 山楂提取物组和HFD + NETs抑制剂GSK484组MPO、Cit－H3含量及NETs水平显著降低，Tbx21、RORγt蛋白表达量均显著降低，Gata3蛋白表达量均显著增加，表明山楂提取物能抑制NETs生成，且通过调节转录因子Tbx21、RORγt、Gata3影响TH1、TH2、Th17分化从而

改善血脂异常的机制与 NETs 抑制剂趋于一致。而 Bcl－6 和 Foxp3 在 HFD＋山楂提取物组中显著增高，在 HFD＋NETs 抑制剂 GSK484 组中显著降低，表明山楂提取物同时升高 Bcl－6 和 Foxp3，可能与其促进 Tfh 向 Tfr 转化，从而抑制过度体液免疫并增强调节功能有关；而 NETs 抑制剂 GSK484 可能单纯抑制 Tfh 和 Treg 活性，导致 Bcl－6 与 Foxp3 同步降低，表明山楂提取物的免疫调节作用更具多维性，可能通过重塑滤泡微环境实现更全面的炎症控制。

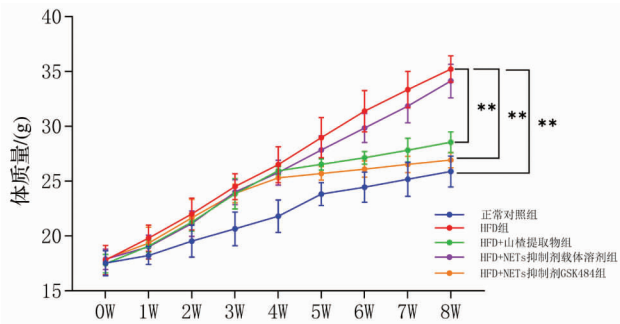
综上，山楂提取物能够通过抑制 NETs，调控 Tbx21、RORγt、Gata3 因子，影响 Th1/Th2、Th17/Treg 分化进程从而有效改善血脂水平。本研究从免疫炎症角度出发，为探究血脂异常的发病机制提供新方向，为降脂中药山楂的研发提供新的实验依据。

参考文献

[1] POLLER W C, NAHRENDORF M, SWIRSKI F K. Hematopoiesis and cardiovascular disease[J]. Circ Res, 2020, 126(8): 1061－1085.
[2] 赵庭瑞，王隐，邹瑶，等. 中性粒细胞在动脉粥样硬化中的研究进展[J]. 中国免疫学杂志，2025，41(1)：241－245.
[3] IBRAHIM N, EILENBERG W, NEUMAYER C, et al. Neutrophil extracellular traps in cardiovascular and aortic disease: a narrative review on molecular mechanisms and therapeutic targeting[J]. Int J Mol Sci，2024，25(7)：3983.
[4] 党春萍，张百红. 中性粒细胞胞外诱捕网在消化道癌症中的研究进展[J]. 国际老年医学杂志，2024，45(1)：100－103.
[5] CHEN F, LIU Y, SHI Y, et al. The emerging role of neutrophilic extracellular traps in intestinal disease[J]. Gut Pathog, 2022, 14(1)：27.
[6] LU M, ZHANG L, PAN J, et al. Advances in the study of the vascular protective effects and molecular mechanisms of hawthorn (Crataegus anamesa Sarg.) extracts in cardiovascular diseases[J]. Food Funct，2023，14(13)：5870－5890.
[7] 黄昊枭，杨莺，刘宁. 山楂提取物基于调控 TBX21、GATA－3 因子对血脂异常小鼠 Th1、Th2 细胞亚群的影响[J]. 中华中医药学刊，2024，42(12)：40－46.
[8] 付裕. 山楂调控高脂小鼠 Treg、Th17、Tfh 细胞防治血脂异常的作用机制研究[D]. 沈阳：辽宁中医药大学，2024.
[9] 王增武，刘静，李建军，等. 中国血脂管理指南(2023 年)[J]. 中国循环杂志，2023，38(3)：237－271.
[10] 丁宗君. 他汀类药物治疗慢性肝病的临床应用及不良反应研究进展[J]. 中国药物滥用防治杂志，2022，28(3)：273－277.
[11] 陈丝，杨关林，王群，等. 基于“异病同治”探讨“从脾论治”高脂血症及动脉粥样硬化共同理论基础及临床应用[J]. 中华中医药学刊，2018，36(9)：2200－2202.
[12] 崔馨月，王群，宋囡，等. 基于“脾失健运－膏脂转输障碍”探讨 HDL 蛋白修饰影响动脉粥样硬化发生发展的理论研究[J]. 中国中医基础医学杂志，2023，29(9)：1492－1495.
[13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2020：33.
[14] 拓文娟，刘永琦，修明慧，等. 山楂及其有效成分治疗代谢综合征的研究[J]. 中国中医基础医学杂志，2022，28(5)：831－838.
[15] 封若雨，朱新宇，张苗苗. 近五年山楂药理作用研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志，2019，25(5)：715－718.
[16] 钟丽霞，江震宇，汪嘉妮，等. 山楂多糖提取工艺优化及其降血糖、降血脂活性[J]. 食品工业科技，2019，40(13)：119－124，147.
[17] LI C R, HOU X H, XU Y Y, et al. Manual annotation combined with untargeted metabolomics for chemical characterization and discrimination of two major crataegus species based on liquid chromatography quadrupole time－of－flight mass spectrometry[J]. J Chromatogr A，2020，1612：460628.
[18] 李苗，王丽丽，常冰梅. 血管内皮细胞功能损伤机制的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志，2019，27(8)：730－736.
[19] 陈薇伊，徐兴军，刘佳人，等. 山楂叶总黄酮对链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠体内抗氧化酶活性及相关基因表达的影响[J]. 天然产物研究与开发，2023，35(8)：1314－1321.
[20] 胡慧明，官扬，翁家俊，等. 山楂叶黄酮对高脂血症小鼠的调脂保肝作用及其对肝组织 HMGCR、LDLR 表达的影响[J]. 中国现代应用药学，2020，37(21)：2599－2604.
[21] 宓伟，于敏，李宁，等. 基于 AMPK/SREBP－1c 分子通路的山楂原花青素调控脂质代谢机制[J]. 食品科学，2023，44(15)：129－136.
[22] 姚新月. 山楂干预肠道菌群对动脉粥样硬化脂质代谢异常的影响研究[D]. 沈阳：辽宁中医药大学，2020.
[23] 李春峰，赵子璇，刘桂艳. 山楂主要成分提取分离及检测分析研究进展[J]. 中成药，2022，44(9)：2929－2934.
[24] YANG S C, CHEN P J, CHANG S H, et al. Luteolin attenuates neutrophilic oxidative stress and inflammatory arthritis by inhibiting Raf1 activity[J]. Biochem Pharmacol，2018，154：384－396.
[25] FANG X, MA L, WANG Y, et al. Neutrophil extracellular traps accelerate vascular smooth muscle cell proliferation via Akt/CDKN1b/TK1 accompanying with the occurrence of hypertension[J]. J Hypertens，2022，40(10)：2045－2057.
[26] WILSON A S, RANDALL K L, PETTITT J A, et al. Neutrophil extracellular traps and their histones promote Th17 cell differentiation directly via TLR2[J]. Nature Communications，2022，13(1)：528.
[27] HINKLEY H, COUNTS D A, VON C E, et al. T cells in atherosclerosis: key players in the pathogenesis of vascular disease[J]. Cells，2023，12(17)：2152.
[28] DIMITROGLOU Y, AGGELI C, THEOFILIS P, et al. Novel anti－inflammatory therapies in coronary artery disease and acute coronary syndromes[J]. Life，2023，13(8)：1669.
[29] YANG Y, LIU Y Y, CHEN X, et al. 5－Aminolevulinic acid－mediated sonodynamic therapy alleviates atherosclerosis via enhancing efferocytosis and facilitating a shift in the th1/th2 balance toward Th2 polarization[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2018, 47(1)：83－96.
[30] 张静，李荣利，相明飞，等. 调节性 T 细胞在动脉粥样硬化中的作用[J]. 国际心血管病杂志，2024，51(6)：337－341.
[31] WANG Y, LI W M, ZHAO T R, et al. Interleukin－17－producing CD4＋T cells promote inflammatory response and foster disease progression in hyperlipidemic patients and atherosclerotic mice[J]. Frontiers in Cardiovascular Medicine，2021，8：667768.
[32] BRAUNER S, JIANG X T, THORLACIUS G E, et al. Augmented Th17 differentiation in Trim21 deficiency promotes a stable phenotype of atherosclerotic plaques with high collagen content[J]. Cardiovascular research，2018，114(1)：158－167.
[33] BAPTISTA D, MACH F, BRANDT K J. Follicular regulatory T cell in atherosclerosis[J]. Journal of leukocyte biology，2018，104(5)：925－930.

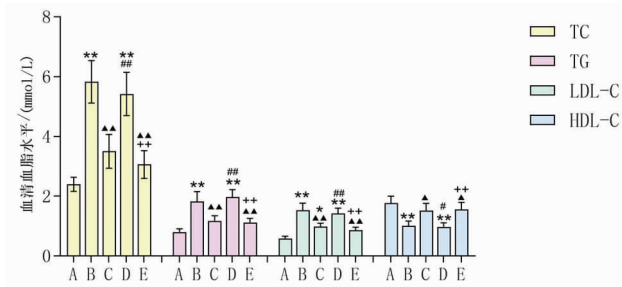
山楂提取物通过 NETs 影响 T 细胞调控血脂异常的作用机制研究

（正文见 55－59 页）



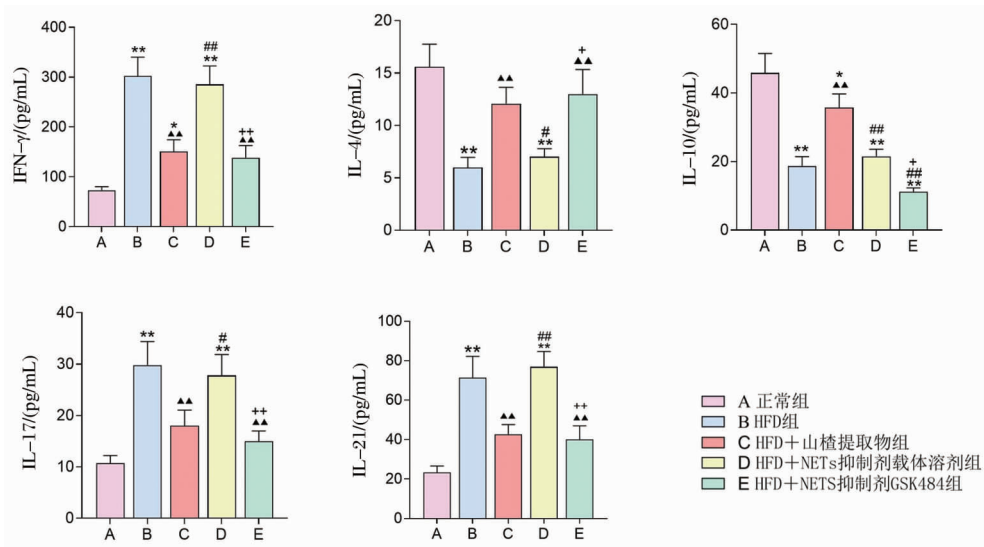
注：＊＊$P<0.01$。

图 1　山楂提取物和 NETs 抑制剂对血脂异常小鼠体质量的影响



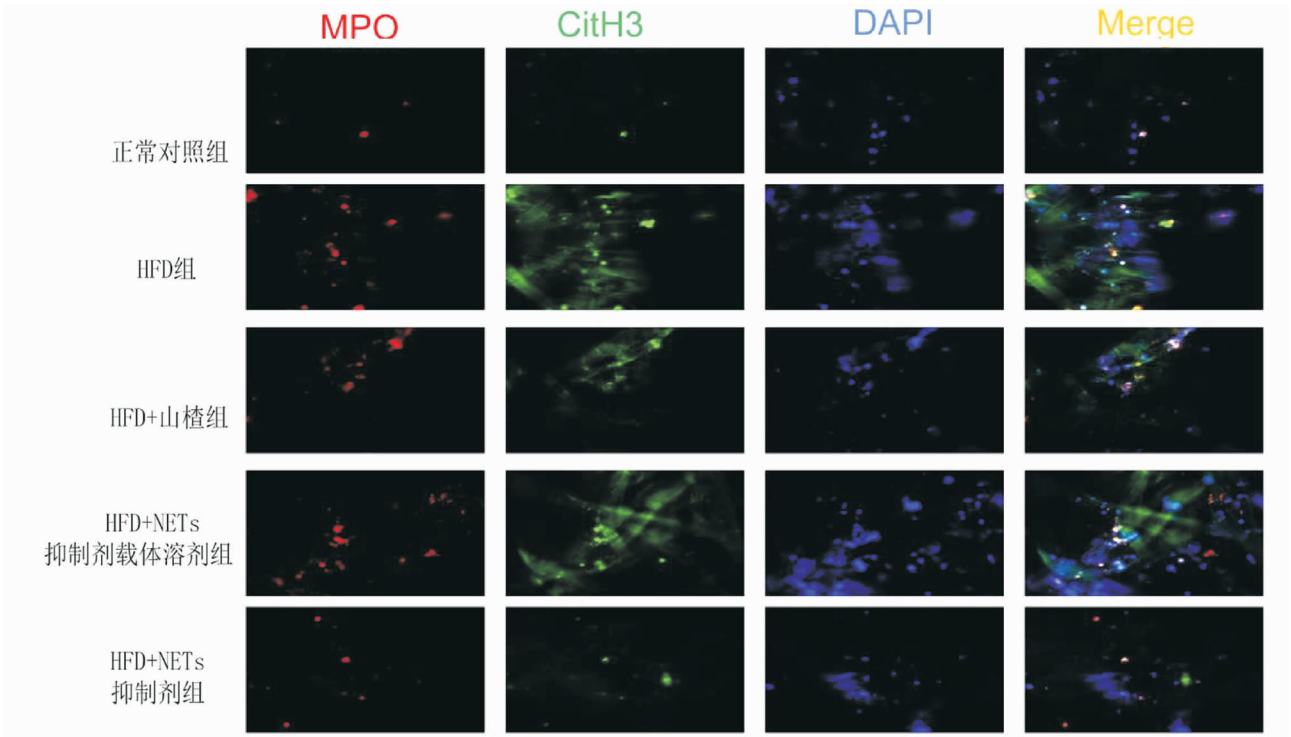
注：A：正常对照组；B：HFD 组；C：HFD + 山楂提取物组；D：HFD + NETs 抑制剂载体溶剂组；E：HFD + NETs 抑制剂 GSK484 组。＊与正常对照组比较，$P<0.05$；＊＊与正常对照组比较，$P<0.01$；▲与 HFD 组比较，$P<0.05$；▲▲与 HFD 组比较，$P<0.01$；#与 HFD + 山楂提取物组比较，$P<0.05$；##与 HFD + 山楂提取物组比较，$P<0.01$；+ 与 HFD + NETs 抑制剂载体溶剂组比较，$P<0.05$；+ + 与 HFD + NETs 抑制剂载体溶剂组比较，$P<0.01$。

图 2　山楂提取物和 NETs 抑制剂对血脂异常小鼠血脂水平的影响



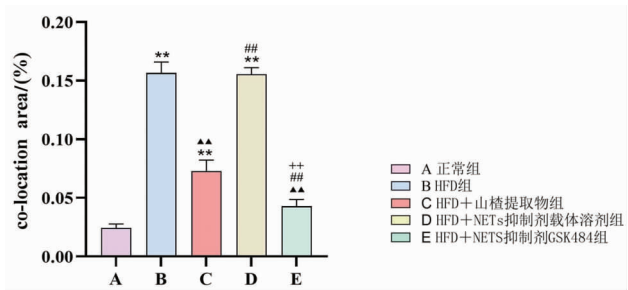
注：＊与正常对照组比较，$P<0.05$；＊＊与正常对照组比较，$P<0.01$；▲与 HFD 组比较，$P<0.05$；▲▲与 HFD 组比较，$P<0.01$；#与 HFD + 山楂提取物组比较，$P<0.05$；##与 HFD + 山楂提取物组比较，$P<0.01$；+ 与 HFD + NETs 抑制剂载体溶剂组比较，$P<0.05$；+ + 与 HFD + NETs 抑制剂载体溶剂组比较，$P<0.01$。

图 3　山楂提取物和 NETs 抑制剂对血脂异常小鼠血清炎症因子的影响



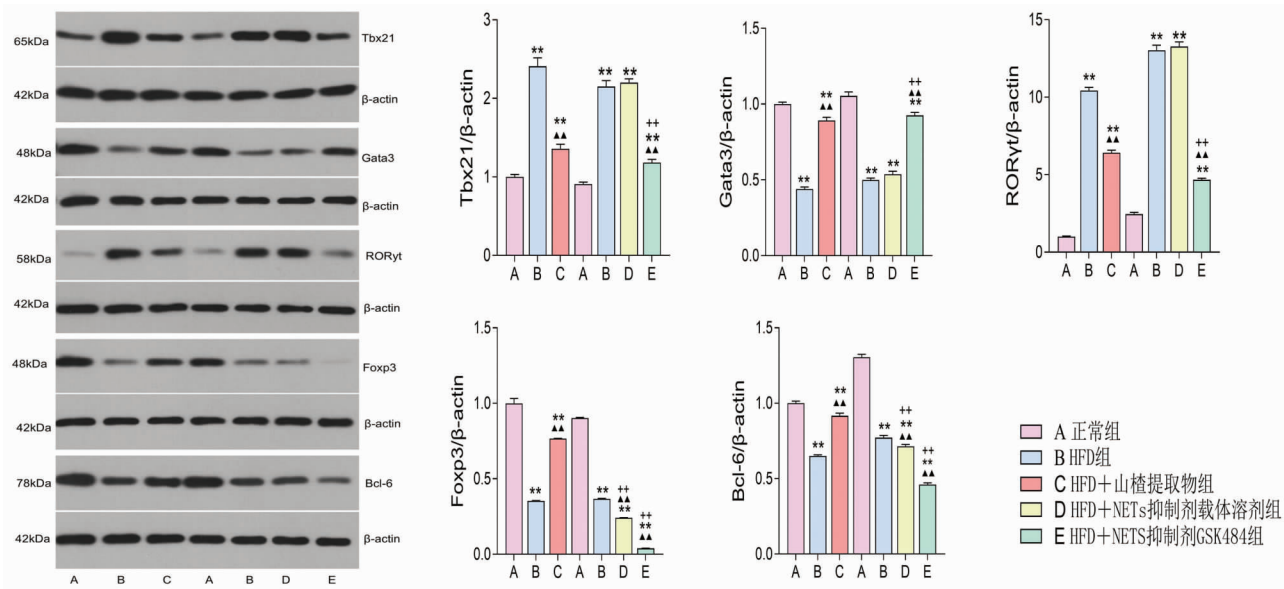
注：红色：抗 MPO 染色；绿色：抗 CitH3 染色；蓝色：DAPI 染细胞核；Merge：DAPI、CitH3 及 MPO 染色叠加图片。

图 4　免疫荧光双染检测山楂提取物和 NETs 抑制剂对血脂异常小鼠 NETs 的影响



注：＊与正常对照组比较，$P<0.05$；＊＊与正常对照组比较，$P<0.01$；▲与 HFD 组比较，$P<0.05$；▲▲与 HFD 组比较，$P<0.01$；#与 HFD＋山楂提取物组比较，$P<0.05$；##与 HFD＋山楂提取物组比较，$P<0.01$；＋与 HFD＋NETs 抑制剂载体溶剂组比较，$P<0.05$；＋＋与 HFD＋NETs 抑制剂载体溶剂组比较，$P<0.01$。

图 5　免疫荧光双染法检测各组小鼠 CitH3 与 MPO 共定位 NETs 情况



注：＊与正常对照组比较，$P<0.05$；＊＊与正常对照组比较，$P<0.01$；▲与 HFD 组比较，$P<0.05$；▲▲与 HFD 组比较，$P<0.01$；#与 HFD + 山楂提取物组比较，$P<0.05$；##与 HFD + 山楂提取物组比较，$P<0.01$；+ 与 HFD + NETs 抑制剂载体溶剂组比较，$P<0.05$；+ + 与 HFD + NETs 抑制剂载体溶剂组比较，$P<0.01$。

图 6 山楂提取物和 NETs 抑制剂对血脂异常小鼠外周血单个核细胞 Tbx21、Gata3、RORγt、Foxp3、Bcl－6 蛋白表达的影响

桑辛素对新型冠状病毒 RNA 聚合酶抑制作用的实验研究及相关类似物活性预测

（正文见 67－69 页）

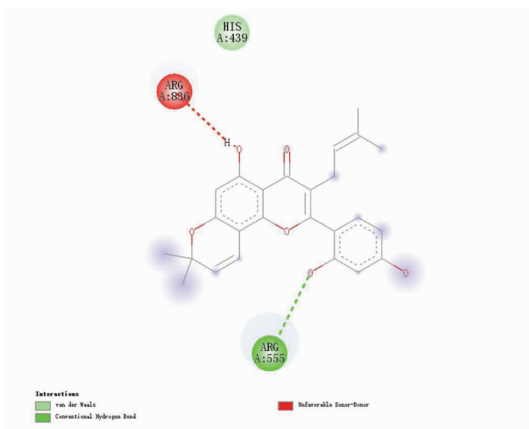


图 2A 桑辛素与 RdRp 活性位点的相互作用

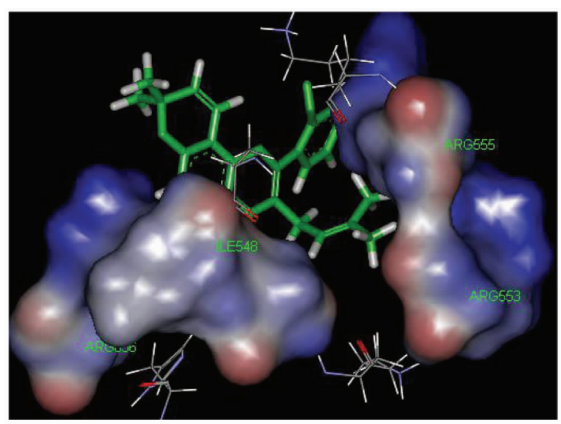


图 2B 桑辛素与 RdRp 活性位点的相互作用