

基于微流控芯片快速高分辨率检测亚群识别 RAW 264.7 免疫耐受细胞和筛选药物的新方法

刘亚萌*, 王淼淼

天津中医药大学, 天津 301617

刘亚萌, 王淼淼. 基于微流控芯片快速高分辨率检测亚群识别 RAW 264.7 免疫耐受细胞和筛选药物的新方法[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 4149-4156.

LIU Yameng, WANG Miaomiao. A DC-iDEP-based fast and high-resolution method for detection of LPS tolerance of RAW264.7 macrophages and screening of therapeutic agents[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 4149-4156.

摘要: 脓毒症是重症医学中一种常见且致死率高的疾病, 是早期过度炎症转变为长期免疫抑制的过程, 在先天免疫细胞中表现为细胞应激性降低, 即脂多糖耐受性。现有大多数检测细胞脂多糖耐受的方法, 无法准确识别少量存在的亚群细胞, 且面对复杂的细胞体系鉴定能力有限, 亟待开发一种快速、无标记的检测免疫耐受细胞状态的方法。本文应用微流控直流介电泳芯片通过生物物理性质对炎症细胞、免疫耐受细胞状态进行区分性的表征, 并尝试通过改变细胞生物物理性质筛选逆转免疫耐受的药物。结果表明, 三种细胞的生物物理特征值分别为 4.28×10^8 、 3.13×10^8 和 4.25×10^8 V/m², 即所建立的方法可用于区分 LPS 耐受细胞。本芯片有望应用于医学诊断和药物筛选。

关键词: 免疫耐受; 微流控; 直流介电泳; 药物筛选

A DC-iDEP-based fast and high-resolution method for detection of LPS tolerance of RAW264.7 macrophages and screening of therapeutic agents

LIU Yameng*, WANG Miaomiao

Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Sepsis is a leading life-threatening problem in intensive care medicine. The recent studies have given insights into the transition from inflammation to long-term

资助项目: 天津市应用基础研究多元投入基金(21JCQNJC01180)

This work was supported by Tianjin Applied Basic Research Multiple Investment Fund (21JCQNJC01180).

*Corresponding author. E-mail: yameng1990@126.com

Received: 2024-03-07; Accepted: 2024-08-01; Published online: 2024-08-02

immunosuppression in sepsis. This condition might cause physiological changes that comprise the lipopolysaccharide (LPS) tolerance. Most studies about the LPS tolerance focus on the reduced ability of macrophages to secrete pro-inflammatory cytokines. Although this method has identified various molecular changes, it remains ambiguous since changes in the whole cell population are measured as an average and markers are required for cell recognition. A fast and label-free method is in demand to detect cell tolerance and screen therapeutic agents that might reverse the process. In this study, direct current insulator-based dielectrophoresis (DC-iDEP) was used to characterize the biophysical properties (EKMr) of inflamed cells, LPS-tolerant cells, and cells treated with therapeutic agents. The results showed that the EKMr of these cells was 4.28×10^8 , 3.13×10^8 , and 4.25×10^8 V/m², respectively, suggesting that the established method was useful in distinguishing LPS-tolerant cells. The device holds the promise to be applied in medical diagnosis and medicine screening.

Keywords: immune tolerance; microfluidics; direct current insulator-based dielectrophoresis (DC-iDEP); medicine screening

脓毒症具有高发病率、高死亡率和治疗耗时长等特征,涉及复杂的炎症与细胞反应。简单来说,脓毒症因细胞耐受产生细胞因子风暴,引发器官衰竭并导致死亡^[1-2]。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)已被广泛用作细胞耐受实验模型:再次接触脂多糖(LPS)后,免疫细胞会表现出一种被称为 LPS 耐受的免疫抑制状态,其特征是促炎细胞因子的产生减少^[3]。在体内,长时间暴露于 LPS 会诱发内毒素耐受。在此过程中, LPS 信号、表观遗传标记、继发感染和染色质重塑等因素,都会影响细胞记忆和 LPS 耐受^[2]。

由于脓毒症患者症状的高度可变性和非特异性,使得脓毒症的诊断及对其严重程度的评估变得困难^[4]。大多数研究基于促炎细胞因子的分泌能力的降低来诊断脓毒症,例如, TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6^[5]。虽然这种常用方法已经可以识别各种相关分子的变化,但只能模糊地给出整个细胞群的整体或平均信息。而在疾病早期,少量存在的 LPS 耐受亚群细胞无法被检测到。即使在此过程中已鉴定出各种信号分

子,也尚未建立反映耐受严重程度的标准信号^[6]。该方法不能针对特定亚群找到药物并以更高效率治疗免疫耐受。流式细胞术和基因组学等方法比较准确,但需要标记或损坏细胞,无法进行进一步表征信息采集^[7-8]。脓毒症的早期诊断和严重程度预测至关重要,对指导药物治疗具有重大意义(图 1)。

微流控直流介电泳(direct current insulator-based dielectrophoresis, DC-iDEP)芯片已应用于哺乳动物细胞、细菌、病毒、蛋白质、细胞器、纳米粒子等的识别和表征(图 2)^[9-11]。前期的研究工作表明,它在免疫细胞炎症、细胞吞噬活性、神经干祖细胞分化药物检测方面有广泛应用^[12-14]。基于当前技术的局限性,本研究引入了 DC-iDEP 来开发一种快速、无标记、高分辨率的方法来检测 LPS 诱导的巨噬细胞耐受性。结果表明,经首次 LPS 和再次 LPS (耐受)处理的巨噬细胞生物物理表征值(ratio of EK to DEP mobilities, EKMr),与细胞大小、表面 zeta 电位、细胞导电率有关)表现出显著性差异,分别为 4.28×10^8 V/m² 和 3.13×10^8 V/m²。用青蒿琥酯处理

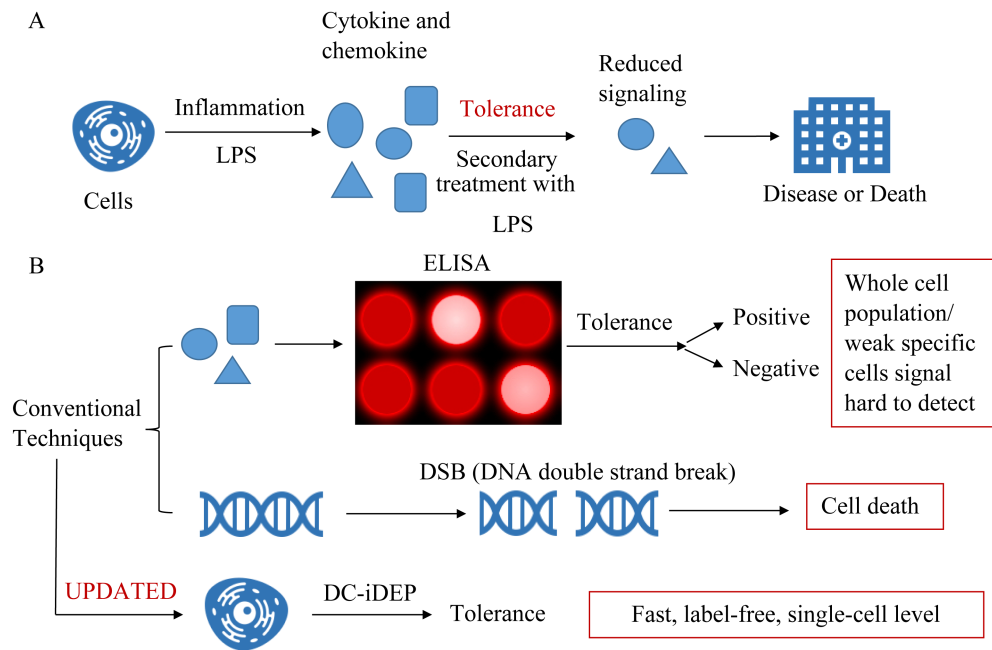


图 1 免疫耐受过程示意图(A)及本研究中微流控直流介电泳的检测优势(B)^[5-8]

Figure 1 Flow of the detection technique (A) and advantages comparison with existing methods (B)^[5-8].

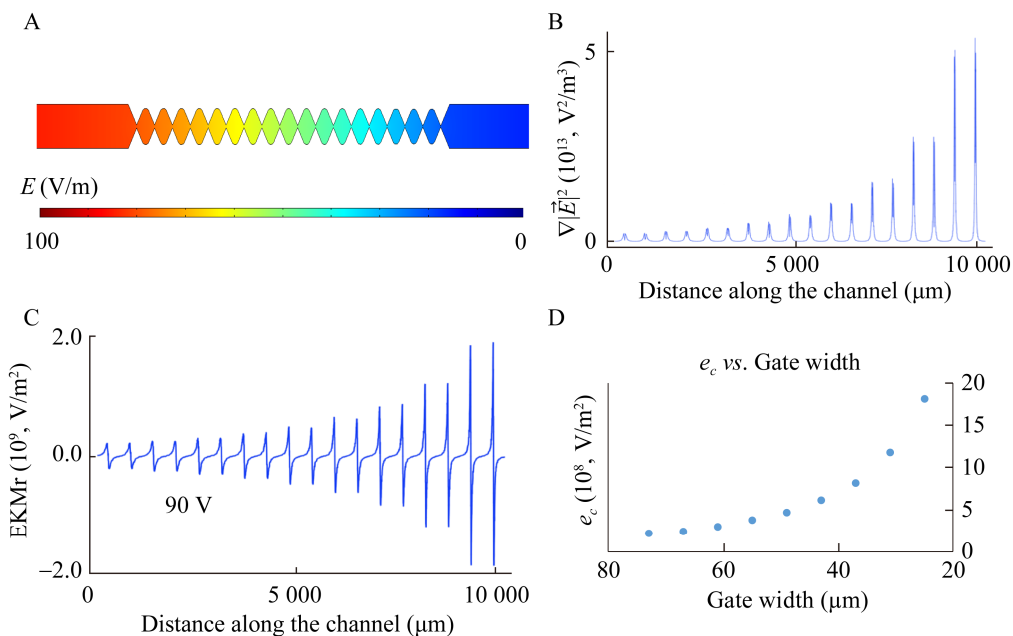


图 2 微流控直流介电泳芯片电场和生物物理性质表征模拟示意图 A: 通道电场模拟.B: 通道中 $\nabla|\vec{E}|^2$ 模拟.C: e_c 通道模拟.D: 不同通道宽度处 e_c 值

Figure 2 Design of the device and effects simulation of E and e_c from the first gate to the last gate. A: Simulation of E along the channel. B: Simulation of $\nabla|\vec{E}|^2$ along the channel. C: Simulation of e_c along the channel. D: e_c value at different width of gates.

耐受细胞后, 耐受细胞逆转为正常状态, 细胞样本的生物物理特性从 $3.13 \times 10^8 \text{ V/m}^2$ 增加到 $4.25 \times 10^8 \text{ V/m}^2$, 与 LPS 直接处理的炎症细胞极其相似。本研究提供了一种快速、无需标记的细胞耐受检测方法, 在精准药物治疗中具有一定应用潜力。

1 材料与方法

1.1 细胞及试剂

小鼠 RAW 264.7 (小鼠单核巨噬细胞白血病细胞) 和细胞培养试剂盒购买自普诺塞 (CL-0190)。本研究所用细胞为 11-23 次传代, 细胞培养液由达尔伯克(氏)改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified eagle's medium, DMEM)、10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 1% 双抗 (penicillin-streptomycin solution, P/S) 组成。细胞培养达到 80% 密度时, 将细胞用刮刀收集到离心管中, 细胞悬液以 $1\,200 \text{ r/min}$ 离心 5 min , 用于进一步传代和测试。对于细胞激活样品, 按已发表研究工作中建立好的模型进行给药处理: 用 100 ng/mL LPS (购自麦克林试剂) 处理细胞获得炎症细胞; 5 ng/mL 的 LPS 处理细胞 2、3、4 h 使得细胞耐受, 再用 100 ng/mL LPS 处理细胞获得耐受细胞样品; $20 \text{ }\mu\text{g/mL}$ 青蒿琥酯处理 5 ng/mL LPS 耐受细胞, 再用 100 ng/mL LPS 处理耐受细胞获得青蒿琥酯给药的细胞样品^[15]。

1.2 微流控测试方法

微流控芯片采用软刻蚀法进行合成。入样口到出样口长度为 2.0 cm , 通道区域宽度约为 $1\,000 \text{ }\mu\text{m}$, 高约为 $20 \text{ }\mu\text{m}$ 。按 SYLGARD 184 材料(道康宁)说明书将固化剂与聚二甲基硅氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 按比例混合, 附在硅晶片模板上, $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 固化 1 h 。获得的 PDMS 膜与玻璃载片通过等离子体亲水处理, 合成微

流控通道进行进一步测试。

微流控测试中, 用由 8.5% (质量体积比) 蔗糖、0.3% (质量体积比) 葡萄糖和 0.75% (体积比) RPMI-1640 培养基(购自 Basel Media)组成的溶液洗涤细胞 2 次, 最后配成浓度约为 $10^5/\text{mL}$ 的细胞溶液, 引入微流控装置。在芯片两侧加直流电压约为 90 V 。细胞图像和采集数据由 Leica 显微镜($4\times$ 或 $10\times$ 物镜)记录。

1.3 细胞生物物理性质模拟

用 COMSOL 软件模拟细胞在微流控芯片中的生物物理性质模拟(图 2)。EKMr 由 COMSOL 模拟通道电场和电场梯度而得到, 每个亚群的 EKMr 表征值取细胞捕获处与前一个隔栏处 $\frac{\nabla|\bar{E}|^2}{E^2} \cdot \bar{E}$ 的平均值(详见 2.1 实验原理)。模拟范围是从第一个隔栏最左侧至最后一个隔栏最右侧的中轴线。电场 \bar{E} 如图 2A 所示, 动电迁移率(μ_{EK})与介电泳迁移率(μ_{DEP})之比 EKMr 的模拟如图 2C 所示。图 2D 展示了不同隔栏通道最窄处模拟的生物物理性质 EKMr 的大小。其特点为随着通道宽度的减小, 强度逐渐增强, 根据生物物理性质表征不同细胞。

2 结果与分析

2.1 检测装置设计

该检测装置及设计详见文献[12]。简单来说, 通道由成对的三角形隔栏组成, 样品从入口流向出口, 通道宽度为 $1\,000\text{--}25 \text{ }\mu\text{m}$ (图 3)。它在通道中的不同位置产生不同的电场和梯度电场。当细胞的生物物理特性($\mu_{\text{EK}}/\mu_{\text{DEP}}$)大于或等于相应隔栏处的电场分布时, 细胞被捕获。该特性与电导率、zeta 电位和单个细胞的大小有关^[16]。 $e_c(\frac{\nabla|\bar{E}|^2}{E^2} \cdot \bar{E})$ 模拟是从第一个隔栏到最后一个隔栏, EKMr 值表征为 2.2×10^8 到

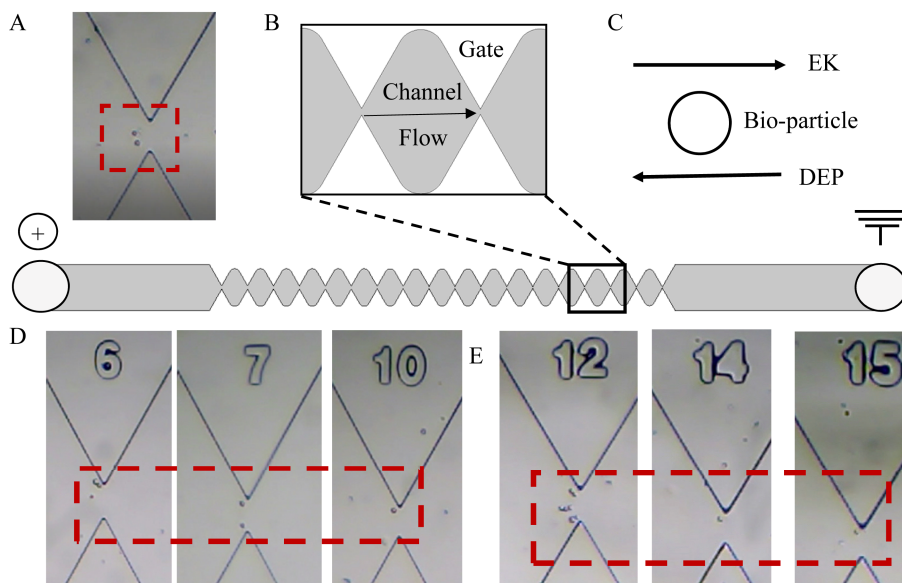


图3 微流控芯片设计及细胞受力示意图 A: 微流控直流介电泳芯片捕获及示意图. B: 细胞流动方向. C: 细胞受力示意图. D: 炎症细胞捕获示意图. E: 耐受细胞捕获示意图. 图中 EK 为动电力, DEP 为介电泳力

Figure 3 Design of the device and effects in the channel. A: Capture of a cell in the channel. B: Cell flow in the channel. C: Forces exerted on a cell. Bottom: The channel inlet and outlet connected to the direct current supply. D: Capture of inflamed cells. E: Capture of tolerant cells. EK represents electrokinetic force and DEP is dielectrophoretic force.

$18.2 \times 10^8 \text{ V/m}^2$ (图 2)。当细胞 $\text{EKMr} \leq e_c$ 时, 单细胞被捕获, 以此现象表征细胞生物物理性质。在 90 V 下, 每个亚群表征的范围都基于它通过的最后一个隔栏和它被捕获的隔栏的 e_c 平均值^[17]。图 2A 和 2B 显示了通道中电场和 $\nabla |E|^2$ 的分布。图 2C 描述了沿通道中心线的 e_c 来进行模拟。它在隔栏前显示正最大值, 在隔栏后显示负最大值, 细胞受到负介电泳力。 e_c 和隔栏宽度之间的关系如图 2 所示。随着从第一个隔栏到最后一个隔栏的最大宽度减小, 相应的捕获 EKMr 值增加。

2.2 炎症、耐受、逆转耐受样品的表征

将炎症、耐受和青蒿琥酯治疗耐受状态的细胞样品分别引入微流控装置中进行表征。用 LPS 处理后, 巨噬细胞表现出炎症症状, 即释放更多趋化因子和细胞因子(TNF- α 、

IL-6)。LPS 处理样品的生物物理特性计算值为 2.2×10^8 至 $18.2 \times 10^8 \text{ V/m}^2$, 细胞整体被分为 9 个区间, 在单细胞水平上具有亚群分辨率(图 4)。细胞强度计算出的加权平均 EKMr 为 $4.28 \times 10^8 \text{ V/m}^2$ 。细胞耐受形成后(5 ng/mL), 用相同浓度的 LPS (100 ng/mL)再次处理, 细胞样本获得的 EKMr 值为 $3.13 \times 10^8 \text{ V/m}^2$, 该值明显小于炎症细胞。细胞耐受过程改变了 2 种样品中巨噬细胞的生物物理性质。有趣的是, 用青蒿琥酯治疗后, 用同样量 LPS 处理, 可以将耐受性逆转至与相对正常的炎症细胞类似, 群体特征因子增加到 $4.25 \times 10^8 \text{ V/m}^2$, 与炎症细胞生物物理性质变化趋势一致。同样, 对不同时长(2、3、4 h) 5 ng/mL LPS 给药的细胞样品进行了探索。结果表明, 随着耐受程度增强, EKMr 整体加权平均值减弱(图 4C)。因此, DC-iDEP 有潜力应

用于检测细胞耐受状态并评价药物是否可用于逆转耐受性。

从亚群角度上看, 将 TNF- α 和 IL-6 等常规检测信号与 EKMr 亚群进行比较及分析, 可以反映细胞随耐受程度改变的趋势(图 5)。本研究将 LPS 处理的耐受细胞和青蒿琥酯处理的耐受细胞之间的生物物理性质与传统方法采用的

细胞因子信号进行了比较^[15]。正常细胞和耐受细胞的生物物理分布可以根据强度差异分为两组亚群。小于 3.8×10^8 V/m² (前 4 个区间) 的耐受细胞亚群比 LPS 处理的细胞信号强度更大, 分别为 77.9% 和 59.0%。在这个界限区间之外, 大于 3.8×10^8 V/m² 且小于 18.2×10^8 V/m² 的 LPS 处理细胞的另一个亚群的细胞信号强度

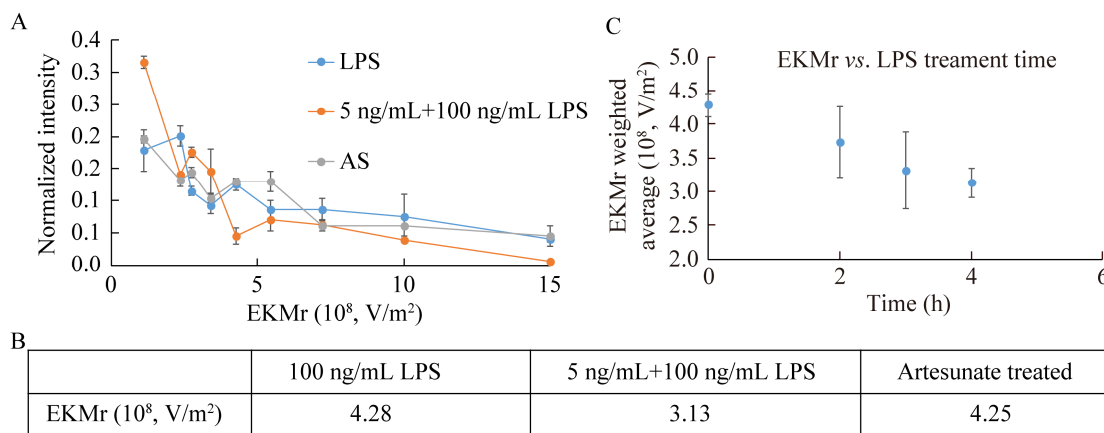


图 4 微流控中细胞生物物理性质表征 A: 炎症细胞、免疫耐受细胞、青蒿琥酯处理过的样品生物物理性质表征. B: 整体分布对比图. C: EKMr 随耐受细胞给药时间和程度变化趋势

Figure 4 Biophysical behaviors of cells in microfluidic devices. A: Biophysical property distributions of inflamed, tolerant, artesunate treated cells. B: comparisons of LPS treated cells, LPS tolerance cells, artesunate treated reverse tolerance cells. C: The weighted average EKMr changes with the treatment time of 5 ng/mL LPS.

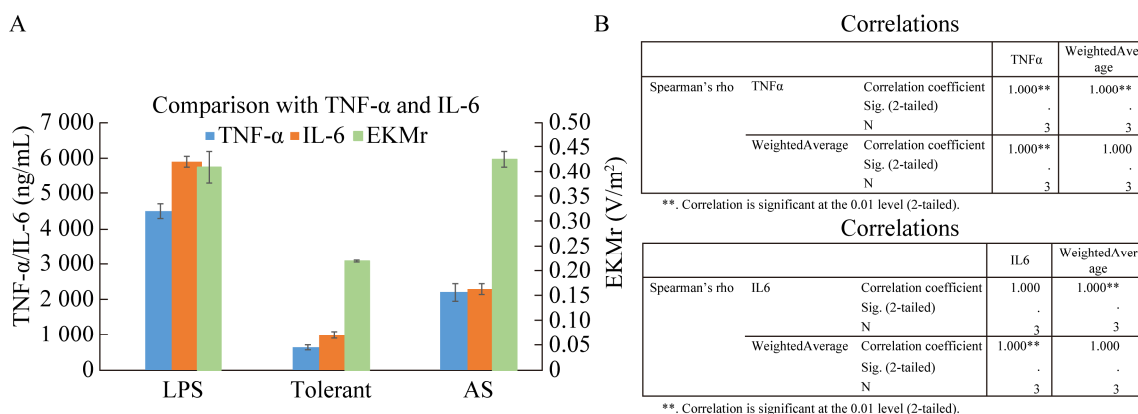


图 5 微流控芯片检测亚群信号与传统方法信号对比与验证^[15]. A: 亚群信号与细胞因子强度趋势对比. 蓝色和橘色为化学因子信号, 绿色为生物物理性质信号. B: Spearman's correlation 相关性分析验证

Figure 5 Comparison of traditional tolerance measurements and DC-iDEP detected EKMr of subpopulations^[15]. A: Blue and orange bars are cytokines/chemokines while green bars are EKMr values detected. B: Spearman's correlation analysis for method authentication.

低于耐受细胞。将 TNF- α 和 IL-6 水平的强度变化与细胞在 3.8×10^8 V/m² 和 18.2×10^8 V/m² 之间的强度进行了对比,炎症细胞、耐受细胞在该区间强度与细胞因子显示出的趋势相一致,表现出细胞信号强度降低。而青蒿琥酯处理过的样品强度介于两者之间,具有恢复作用,与微流控芯片检测结果一致,表明 EKMr 可以反映 LPS 诱导的细胞耐受状态并有望应用于抗耐受药物的快速分辨。

3 讨论

现有许多研究是围绕逆转脂多糖诱导的耐受性的药物进行的,以探究脓毒症的潜在治疗方法。例如,白藜芦醇被发现可用于治疗脓毒症,因为它对具有 TNF-mRNA 表达的人单核细胞 THP-1 有逆转作用^[18];熊果酸和泊莫酸可用于调节 LPS 2 次模拟后的过度免疫激活和广泛免疫抑制^[19];还有研究发现卡介苗细胞裂解物可以逆转 LPS 诱导的耐受过程等等^[20]。这些工作初步探索了可以逆转的免疫耐受的药物,对脓毒症的治疗有着重要推进作用。

LPS 耐受过程中的生物物理变化阐明了为何炎症巨噬细胞、LPS 耐受巨噬细胞和药物处理的耐受细胞样品(图 5)可以用 DC-iDEP 方式进行细胞状态识别和区分。之前的研究结果表明 LPS 诱导的耐受巨噬细胞中绝大多数的基因表达被消除,单个基因的耐受诱导程度不同,一小部分基因在 LPS 耐受过程中不起作用^[6]。相关文献也深入讨论了青蒿琥酯给药前后细胞因子的信号强度变化,测量了包括 TNF- α 、IL-6 等细胞因子在内的生化指标水平,也详细阐明了相关药物的药理学作用^[15]。青蒿琥酯逆转机制是通过 ULK1 调节的自噬作用干预 CaMKII-IP3R-CaMKK β 通路,青蒿琥酯引起耐受状态下 p-AMPK α , p-mTOR, GAPDH, LC3-I

和 LC3-II 等蛋白的改变,从而逆转耐受^[17]。由于这些蛋白在耐受过程中的改变,进而影响细胞导电率、zeta 电位等生物物理性质,使得微流控直流介电泳检测耐受状态成为可能。

首次 LPS (5 ng/mL)处理后细胞因子水平下降,青蒿琥酯处理后水平恢复,引起了炎症细胞、耐受细胞、药物处理后的耐受细胞生物物理性质的不同。将 DC-iDEP 亚群细胞强度与传统细胞因子水平做了 Spearman 关系分析,结果表明两者有高度一致性。因此,DC-iDEP 可应用生物物理性质检测逆转 LPS 耐受细胞状态和过程,并有潜力应用于相关药物的开发。

实验结果表明细胞的生物物理特征在不同的免疫耐受状态下有所不同,至于是否能够完全应用于临床诊断或筛选能够逆转耐受药物,仍需要进一步严谨考量。未来相关工作可以考虑集中在:(1) 是否同样适用于人源巨噬细胞,是否能够完全应用于临床诊断和用药指导。(2) 基于临床样本及给药,分析临床异质性与亚群信号之间的联系,利用如 ROC 曲线分析等方法对比该诊断和其他方法诊断耐受和筛选药物的特异性和灵敏度。(3) 细胞在哪些其他状态下会否出现类似耐受变化及如何应用检测信号(如包括细胞强度和生物物理性质特征等亚群信息)建立非耐受状态排除方法。这些工作将为药物筛选和精准给药方面提供广阔的应用前景。

4 结论

本研究探索了一种检测 LPS 诱导耐受细胞状态的方法,可以应用于逆转耐受药物的检测和药效评估。与流式细胞术相比,它无需标记;现有其他技术相比,具有更高的分辨率,可以识别细胞亚群。细胞的表征基于单细胞水平,LPS 处理的巨噬细胞表现出 4.28×10^8 V/m²

的生物物理特性。LPS 二次处理巨噬细胞群体值降至 3.13×10^8 V/m²。通过可逆转耐受性的药物的处理, 整个细胞样品又增加到 4.25×10^8 V/m²。结果表明, DC-iDEP 设备可能用于检测 LPS 诱导的细胞耐受性, 并有望发展成为未来可能的脓毒症的诊断方法。

REFERENCES

- [1] SEELEY JJ, GHOSH S. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2017, 101(1): 107-119.
- [2] PRESCOTT HC, ANGUS DC. Enhancing recovery from sepsis: a review[J]. *JAMA*, 2018, 319(1): 62-75.
- [3] ZHOU M, AZIZ M, DENNING NL, YEN HT, MA GF, WANG P. Extracellular CIRP induces macrophage endotoxin tolerance through IL-6R-mediated STAT3 activation[J]. *JCI Insight*, 2020, 5(5): e133715.
- [4] VAN DER POLL T, SHANKAR-HARI M, WIERSINGA WJ. The immunology of sepsis[J]. *Immunity*, 2021, 54(11): 2450-2464.
- [5] PIERRAKOS C, VINCENT JL. Sepsis biomarkers: a review[J]. *Critical Care*, 2010, 14(1): R15.
- [6] MAGES J, DIETRICH H, LANG R. A genome-wide analysis of LPS tolerance in macrophages[J]. *Immunobiology*, 2008, 212(9/10): 723-737.
- [7] ZHOU Y, ZHANG Y, JOHNSON A, VENABLE A, GRISWOLD J, PAPPAS D. Combined CD25, CD64, and CD69 biomarker panel for flow cytometry diagnosis of sepsis[J]. *Talanta*, 2019, 191: 216-221.
- [8] LANGSTON PK, NAMBU A, JUNG J, SHIBATA M, AKSOYLAR HI, LEI JH, XU PN, DOAN MT, JIANG H, MacARTHUR MR, GAO X, KONG Y, CHOUGHANI ET, LOCASALE JW, SNYDER NW, HORNG T. Glycerol phosphate shuttle enzyme GPD2 regulates macrophage inflammatory responses[J]. *Nature Immunology*, 2019, 20(9): 1186-1195.
- [9] KIM D, SONKER M, ROS A. Dielectrophoresis: from molecular to micrometer-scale analytes[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(1): 277-295.
- [10] LIU YM, HAYES MA. Orders-of-magnitude larger force demonstrated for dielectrophoresis of proteins enabling high-resolution separations based on new mechanisms[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(3): 1352-1359.
- [11] ORTIZ R, KOH D, KIM DH, RABBANI MT, VELASQUEZ CA, SONKER M, ARRIAGA EA, ROS A. Continuous organelle separation in an insulator-based dielectrophoretic device[J]. *Electrophoresis*, 2022, 43(12): 1283-1296.
- [12] LIU YM, WANG MM, LIU RJ, QIU F. Label-free microfluidic device reveals single cell phagocytic activity and screens plant medicine rapidly[J]. *Lab on a Chip*, 2023, 23(3): 553-559.
- [13] WANG MM, WANG MX, LI W, LIU YM, QIU F. Single-cell detection of DMSO promoted HL-60 differentiation toward granulocyte based on DC-iDEP for medicine screening[J]. *Biotechnology Journal*, 2023, 18(12): e2300073.
- [14] LIU YM. Detection of LPS-induced macrophage activation with single-cell resolution through DC insulator-based electrokinetic devices[J]. *Electrophoresis*, 2023, 44(11/12): 978-987.
- [15] LIU X, WU JQ, WANG N, XIA L, FAN SJ, LU YL, CHEN XL, SHANG SL, YANG YJ, HUANG QY, CHEN Q, ZHOU H, ZHENG J. Artesunate reverses LPS tolerance by promoting ULK1-mediated autophagy through interference with the CaMKII-IP3R-CaMKK β pathway[J]. *International Immunopharmacology*, 2020, 87: 106863.
- [16] CROWTHER CV, HAYES MA. Refinement of insulator-based dielectrophoresis[J]. *The Analyst*, 2017, 142(9): 1608-1618.
- [17] LIU YM, JIANG AL, KIM E, RO C, ADAMS T, FLANAGAN LA, TAYLOR TJ, HAYES MA. Identification of neural stem and progenitor cell subpopulations using DC insulator-based dielectrophoresis[J]. *The Analyst*, 2019, 144(13): 4066-4072.
- [18] 李文革, 陈小萍. 白藜芦醇对细菌脂多糖耐受的 THP-1 细胞 TNF- α 启动子区的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(5): 686-692.
LI WG, CHEN XP. Effect of resveratrol on TNF- α promoter region in THP-1 cells tolerant to bacterial lipopolysaccharide[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2016, 25(5): 686-692 (in Chinese).
- [19] 李玲, 谭洋, 汪涛, 张熙, 肖锦仁, 李志忠, 裴刚. 熊果酸和坡膜酸通过上调乌头酸脱羧酶 1 表达促进巨噬细胞内毒素耐受作用的研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2022, 42(11): 1837-1842.
LI L, TAN Y, WANG T, ZHANG X, XIAO JR, LI ZZ, PEI G. Promoting effects of ursolic acid and pomolic acid in endotoxin tolerance of macrophages by up-regulating the expression of aconitate decarboxylase 1[J]. *Journal of Hunan University of Chinese Medicine*, 2022, 42(11): 1837-1842 (in Chinese).
- [20] 李茹. 卡介苗菌体裂解液逆转巨噬细胞 RAW 264.7 内毒素耐受及机制初探[D]. 大连: 大连医科大学硕士学位论文, 2022.
LI R. Reversal of endotoxin tolerance of macrophages RAW 264.7 by BCG cell lysate and its mechanism[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian Medical University, 2022 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)