

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)14-0057-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.14.014



依达拉奉对小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 RAW264.7 炎症反应的抑制作用*

李建芬, 刘嘉欣, 黄凤蕊, 罗球珠

(广州中医药大学第一附属医院·广东省中医临床研究院, 广东 广州 510405)

摘要:目的 探讨依达拉奉(EDA)对小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 RAW264.7 炎症反应的抑制作用。方法 以脂多糖诱导 RAW264.7 细胞, 复制炎症细胞模型。采用 CCK-8 法检测 EDA 的细胞毒性作用。实验分为空白组(等体积培养基)、模型组(等体积培养基)、给药组(40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EDA)。采用 Griess 法检测细胞中一氧化氮(NO)水平, 采用酶联免疫吸附(ELISA)法测定细胞中前列腺素 E_2 (PGE_2)、白细胞介素 1β (IL- 1β)、白细胞介素 18 (IL-18)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、活性氧(ROS)水平; 采用实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)法测定细胞中 IL- 1β 和 IL-18 mRNA 表达水平; 采用 Western blot 法检测细胞中 JAK2/信号转导和转录激活因子 3 (STAT3) 通路相关蛋白 JAK2, p-JAK2, STAT3, p-STAT3, IL- 1β , IL-18 的蛋白表达水平。结果 与 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 比较, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EDA 处理下细胞存活率无显著变化 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 给药组细胞中 NO, PGE_2 , IL- 1β , IL-18, TNF- α , ROS 水平均显著降低 ($P < 0.05$); IL- 1β 与 IL-18 mRNA 及蛋白表达水平和 p-JAK2/JAK2 与 p-STAT3/STAT3 均显著降低 ($P < 0.05$)。结论 EDA 可能通过抑制 JAK2/STAT3 通路的激活而抑制 RAW264.7 细胞的炎症反应。

关键词: 依达拉奉; 炎症反应; 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 RAW264.7; JAK2/STAT3 信号通路; 作用机制

Inhibitory Effect of Edaravone on the Inflammatory Reactions of Mouse Leukemic Monocyte Macrophage RAW264.7 Cells

LI Jianfen, LIU Jiaxin, HUANG Fengrui, LUO Qiuzhu

(The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine · Guangdong Clinical Research Academy of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China 510405)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of edaravone (EDA) on the inflammatory reactions of mouse leukemic monocyte macrophage RAW264.7 cells. **Methods** RAW264.7 cells were induced by lipopolysaccharide to replicate the inflammatory cell model. The CCK-8 method was used to detect the cytotoxic effect of EDA. The RAW264.7 cells were divided into the blank group (equal volume of medium), model group (equal volume of medium), and drug group (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EDA). The Griess method was used to detect the nitric oxide (NO) level in cells, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

*基金项目: 广东省中医药局科研项目[20221152]。

第一作者: 李建芬, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为医院药学和临床药学, (电子信箱)623586946@qq.com。

- ameliorates LPS-induced airway inflammation and mucus secretion through the extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2016, 775(1): 138-148.
- [8] 万思慧, 张文静, 陈礼治, 等. 氨溴索防治术后肺部并发症的疗效及安全性的直接和间接比较[J]. 世界临床药物, 2015, 36(3): 161-168.
- [9] REN YC, WANG L, HE HB, et al. Pulmonary selectivity and local pharmacokinetics of ambroxol hydrochloride dry powder inhalation in rat[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009, 98(5): 1797-1803.
- [10] 平丽, 洪雅雯, 朱狄峰. 酒石酸阿福特罗大鼠肺内药理学研究[J]. 中国药学杂志, 2022, 55(17): 1456-1459.
- [11] 袁艳丽, 张书玉, 刘成, 等. 测定盐酸氨溴索口服液中丙二醇和甘油的含量[J]. 化工管理, 2019, 12(1): 124-125.
- [12] 王小亮, 杨静, 梁亚伟, 等. 基于近红外分析技术快速测定盐酸氨溴索口服液的含量[J]. 药品评价, 2022, 19(7): 403-406.
- [13] LEE HJ, JOUNG SK, KIM YG, et al. Bioequivalence assessment of ambroxol tablet after a single oral dose administration to healthy male volunteers[J]. Pharmacol Res, 2004, 49(1): 93-98.
- [14] 杨远荣, 张隽, 王文琼, 等. 高效液相色谱法测定人血浆中氨溴索含量[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(10): 1460-1461.
- [15] 程天贵. 盐酸氨溴索含片的研制及质量控制[J]. 中南药学, 2009, 7(3): 208-211.
- [16] 付长华, 郎明洋. HPLC法同时测定罗红霉素氨溴索胶囊中罗红霉素和盐酸氨溴索的含量[J]. 浙江化工, 2019, 50(9): 44-47.
- [17] 李长喜, 徐世希, 邹永华, 等. 氨溴特罗颗粒剂中氨溴索的生物等效性评价[J]. 中南药学, 2010, 8(3): 190-193.
- (收稿日期: 2023-12-13; 修回日期: 2024-02-19)

was used to detect the prostaglandin E₂ (PGE₂) and interleukin - 1β (IL - 1β), interleukin - 18 (IL - 18), tumor necrosis factor - α (TNF - α) and reactive oxygen species (ROS) levels. The real - time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to detect the expression levels of IL - 1β and IL - 18 mRNA in cells. The Western blot was used to detect the expression levels of JAK2 / signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway - related proteins including JAK2, p - JAK2, STAT3, p - STAT3, IL - 1β and IL - 18. **Results** Compared with that at 0 μg / mL, there was no significant change in survival rate of cells at 20, 40, 80, 160 μg / mL EDA ($P < 0.05$). Compared with those in the model group, the NO, PGE₂, IL - 1β, IL - 18, TNF - α and ROS levels in the drug group were significantly lower ($P < 0.05$); the expression levels of IL - 1β, IL - 18 mRNA and proteins, p - JAK2 / JAK2 and p - STAT3 / STAT3 in the drug group were significantly lower ($P < 0.05$). **Conclusion** EDA may inhibit the inflammatory reactions of RAW264.7 cells by inhibiting the activation of the JAK2 / STAT3 pathway.

Key words: edaravone; inflammatory reaction; mouse leukemic monocyte macrophage RAW264.7 cells; JAK2 / STAT3 signaling pathway; mechanism

固有免疫系统是机体抗菌的第一道屏障,其中巨噬细胞吞噬能力强,分布最广泛,在炎症反应中的作用十分重要^[1-2]。巨噬细胞受到刺激活化,会增加炎症反应相关因子如前列腺素 E₂(PGE₂)、一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子 - α(TNF - α)、白细胞介素 1β(IL - 1β)等的分泌,进而刺激机体活性氧(ROS)的大量产生,可造成机体多组织器官的氧化应激损伤^[3]。JAK2 / STAT3 信号通路是介导炎性介质传递的重要信号通路^[4],其激活后会影响到 TNF - α、白细胞介素 16(IL - 16)等促炎细胞因子的表达,故靶向 JAK2 / STAT3 信号通路可能是炎症反应潜在的治疗方向。依达拉奉(EDA)为强效自由基清除剂,可通过抑制脂质过氧化反应,改善 ROS 诱导的炎性氧化应激^[5],但目前关于 EDA 的研究多集中于脑卒中方面,缺乏 EDA 抗炎性反应的研究^[6-7]。故本研究中拟通过 EDA 干预小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 RAW264.7 炎性模型,探讨其可能的作用机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与细胞

仪器:SW - CJ 型超净工作台(苏州净化仪器厂); AE2000 型倒置相差显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司); CCL - 170T - 8 型三气培养箱(新加坡 Esco 公司); GeneSpeed 416 型低速离心机(美国 Genentech 公司); GelDoc Go 凝胶成像系统(美国 Bio - Rad 公司)。

试剂:EDA 原料药(青岛捷世康生物科技有限公司,批号为 22071294,含量 > 98%);磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2,批号为 8211536),胰酶(批号为 2198156),胎牛血清(FBS,批号为 8226132),DMEM 高糖培养基(批号为 8224611),均购自美国 Gibco 公司;脂多糖(LPS,美国 Sigma 公司,批号为 2198156);JAK2、p - JAK2、信号转导和转录激活因子 - 3(STAT3)、p - STAT3、IL - 1β、IL - 18 抗体(批号分别为 20230515, 20230411, 20230619, 20230331, 2023120516, 2023140814, 澳大利亚 Affinity Biosciences 公司); IL - 1β 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒、IL - 18 ELI-

SA 试剂盒、ROS ELISA 试剂盒、PGE₂ ELISA 试剂盒、TNF - α ELISA 试剂盒(批号分别为 B231574, B236981, B231181, B231681, B232417, 上海酶联生物科技有限公司)。

细胞:RAW264.7 细胞(武汉普诺赛生物科技有限公司,批号为 20221127)。

1.2 细胞培养

取细胞悬液,转至离心管中,1 000 r / min 离心 5 min,弃上清液,用含 1 mL 10% FBS 的完全培养基重悬细胞,移至培养皿中,置 37 °C、5% CO₂ 恒温箱中培养。

1.3 细胞毒性检测

采用 CCK - 8 法。取对数生长期的细胞,按 9×10^4 个 / mL 接种至 96 孔板,培养 24 h,以 20, 40, 80, 160 μg / mL EDA 继续培养 48 h。弃培养基,以 PBS 洗涤 2 次。随后每孔加入 110 μL 含 10% CCK - 8 的完全培养基,在 37 °C、5% CO₂ 恒温箱中培养 2 h。采用酶标仪在 450 nm 波长处检测细胞的吸光度(A)。平行操作 5 次。

1.4 细胞炎性因子水平检测

取 1.2 项下细胞,按 9×10^4 个 / mL 接种至 60 mm 培养皿中,待细胞生长至 80% 时加入 1 μg / mL 的 LPS,培养 24 h,即得炎性细胞模型。随机分为空白组(等体积培养基)、模型组(等体积培养基)、给药组(40 μg / mL EDA),各组予相应处理,继续培养 24 h 后,采用 Griess 法检测 NO 水平,采用 ELISA 法检测 PGE₂, IL - 1β, IL - 18, TNF - α, ROS 水平,严格按试剂盒说明书操作。

1.5 mRNA 表达水平检测

采用实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)法。取 1.4 项下各组细胞适量,参照 Trizol 说明书提取细胞总 RNA,检测 RNA 的纯度和浓度。将 RNA 逆转录为 cDNA,以 cDNA 为模板进行扩增。引物序列见表 1。反应条件:95 °C 预变性 1 min; 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 30 s, 45 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 IL - 1β 和 IL - 18 的 mRNA 相对表达量。

表1 引物序列
Tab.1 Sequences of primers

基因	序列
IL-1 β	F: 5' - CAGAAGTACCTGAGCTCGCC R: 5' - CATGGCCACAACAACCTGACG
IL-18	F: 5' - ACAAGGAATGTTCTTGGCCTTT R: 5' - CTTTCATCTTCTCTCGGCAGTTTC
β -actin	F: 5' - AGGGAAATCGTGCCTGACAT R: 5' - GAACCGCTCATTGCCGATAG

1.6 蛋白表达水平检测

采用Western blot法。取1.4项下各组细胞适量,提取蛋白,采用BCA法检测蛋白浓度,加入上样缓冲液,95℃水浴变性10 min,冷却至室温,进行10%聚丙烯酰胺凝胶电泳,每孔上样20 μ g,转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。用5%牛血清白蛋白溶液封闭2 h,加入JAK2, p-JAK2, STAT3, p-STAT3, IL-1 β , IL-18一抗(1:1 000, V/V)4℃孵育过夜,用TBST洗膜3次,用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(1:3 000, V/V)室温孵育1 h,用TBST洗膜3次,在暗室将ECL发光底物工作液加至PVDF膜上,孵育2 min,曝光显影,用Image J图像分析软件分析蛋白条带,计算蛋白表达水平。

1.7 统计学处理

采用SPSS 19.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行t检验。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞毒性

细胞的存活情况见图1。不同质量浓度EDA下细胞

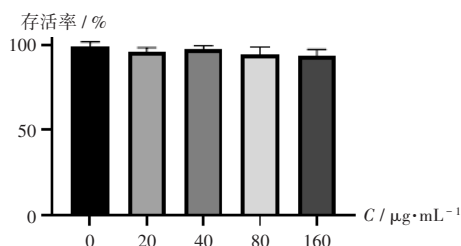


图1 不同质量浓度EDA下RAW264.7细胞的存活情况

Fig.1 Survival of RAW264.7 cells at different mass concentrations of EDA

表2 各组细胞炎症因子水平比较($\bar{X} \pm s, n = 3$)

Tab.2 Comparison of inflammatory factor levels in each group ($\bar{X} \pm s, n = 3$)

组别	剂量(μ g/mL)	NO(μ mol/L)	PGE ₂ (ng/mL)	IL-1 β (pg/mL)	IL-18(pg/mL)	TNF- α (ng/mL)	ROS(U/mL)
空白组	0	1.12 \pm 0.13	65.12 \pm 3.12	3.30 \pm 1.14	1.87 \pm 0.51	12.28 \pm 0.39	38.54 \pm 8.55
模型组	0	24.18 \pm 0.74*	122.31 \pm 5.612*	11.31 \pm 1.56*	8.91 \pm 0.92*	255.16 \pm 6.88*	199.76 \pm 13.16*
给药组	40	6.91 \pm 0.11#	81.59 \pm 3.66#	8.15 \pm 0.17#	6.72 \pm 0.64#	76.42 \pm 3.71#	76.19 \pm 15.63#

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$ 。表3、表4同。

Note: Compared with those in the blank group, * $P < 0.05$. Compared with those in the model group, # $P < 0.05$ (for Tab. 2 - 4).

存活率的差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明EDA质量浓度在20~160 μ g/mL的范围内细胞毒性较小,且质量浓度为40 μ g/mL时细胞存活率较高,故后续实验选择40 μ g/mL的EDA进行。

2.2 细胞炎症因子水平

与模型组比较,给药组细胞中NO, PGE₂, IL-1 β , IL-18, TNF- α , ROS水平均显著降低($P < 0.05$)。详见表2。

2.3 IL-1 β 和IL-18 mRNA表达水平

与模型组比较,给药组细胞中IL-1 β 和IL-18 mRNA表达水平均显著降低($P < 0.05$)。详见表3。

2.4 蛋白表达水平

与模型组比较,给药组细胞中p-JAK2/JAK2, p-STAT3/STAT3, IL-1 β , IL-18蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$)。详见图2及表4。

3 讨论

免疫系统在预防抵抗病原菌感染中发挥了重要作用[8]。在炎症发生部位,NO作用于血管平滑肌细胞,使血管舒张,通透性增高,以利于炎性介质和致痛物质聚

表3 各组细胞IL-1 β 和IL-18 mRNA表达水平比较($\bar{X} \pm s, n = 3$)

Tab.3 Comparison of expression levels of IL-1 β and IL-18 mRNA in each group ($\bar{X} \pm s, n = 3$)

组别	剂量(μ g/mL)	IL-1 β	IL-18
空白组	0	1.07 \pm 0.09	0.68 \pm 0.04
模型组	0	1.47 \pm 0.16*	0.95 \pm 0.07*
给药组	40	1.24 \pm 0.11#	0.79 \pm 0.08#

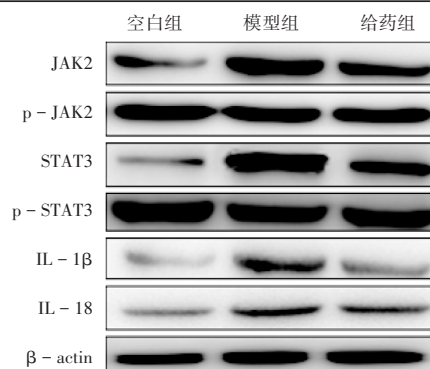


图2 蛋白电泳图

Fig.2 Protein electropherograms

表4 各组细胞JAK2/STAT3通路相关蛋白表达水平比较
($\bar{X} \pm s, n = 3$)

Tab. 4 Comparison of expression levels of JAK2 / STAT3 pathway - related proteins in each group ($\bar{X} \pm s, n = 3$)

组别	剂量($\mu\text{g}/\text{mL}$)	p-JAK2/JAK2	p-STAT3/STAT3	IL-1 β	IL-18
空白组	0	0.53 \pm 0.04	0.52 \pm 0.05	0.41 \pm 0.03	1.13 \pm 0.13
模型组	0	1.14 \pm 0.07 ^a	1.02 \pm 0.11 ^a	0.78 \pm 0.09 ^a	1.66 \pm 0.27 ^a
给药组	40	0.71 \pm 0.06 ^b	0.74 \pm 0.08 ^b	0.61 \pm 0.05 ^b	1.41 \pm 0.21 ^b

集,在炎症反应中增加单核细胞向炎症部位的渗入。同时,NO会活化或抑制相关(促炎或抗炎)细胞因子,进一步促进炎症反应^[9]。ROS作为重要的细胞内信号分子,调节生理活动,以及血管反应性、神经元功能等生理活动;然而,过量的ROS会对DNA、脂质和蛋白质等细胞大分子造成损伤,甚至导致细胞死亡。而炎症刺激可促进小胶质细胞分泌产生ROS和NO,并进一步促进细胞内信号级联,进而导致促炎细胞因子表达增加^[10]。本研究结果显示,给药组细胞中NO及ROS表达水平均显著低于模型组,表明EDA可明显降低NO和ROS水平。

巨噬细胞及其分泌的各种细胞因子和小分子炎症介质对于免疫功能的发挥有重要作用^[11-12]。巨噬细胞有多种病原相关分子模式(PAMP)受体,能特异性地识别出病原菌,当病原体入侵机体时,巨噬细胞能识别病原菌的PAMP受体,分泌IL-1 β ,IL-18,TNF- α 等细胞因子,激活免疫反应^[13]。本研究结果显示,给药组细胞中PGE₂,IL-1 β ,IL-18,TNF- α 表达水平均显著降低,表明EDA有明显的抗炎作用。

JAK2/STAT3信号通路在细胞炎症反应过程中的作用极大^[14]。有研究表明,被激活的JAK2/STAT3信号通路会增强趋化因子、黏附因子的转录,同时也会促进IL-18和TNF- α 的表达,继而进一步激活JAK2/STAT3通路,加重炎症反应^[15-16]。本研究结果显示,给药组细胞中IL-1 β ,IL-18的mRNA及蛋白表达水平,p-JAK2/JAK2,p-STAT3/STAT3均显著低于模型组,提示EDA对由LPS诱导的RAW264.7细胞模型的炎症损伤有良好抑制作用,机制可能为其有效抑制了炎症因子IL-1 β 和IL-18的高表达和JAK2/STAT3通路的激活。

综上所述,EDA有明显的抗炎作用,可能通过抑制JAK2/STAT3信号通路来抑制RAW264.7细胞的炎症反应。

参考文献

[1] 候丹,黄帅阳,吕明圣,等. 桑梅止咳颗粒对咳嗽变异性哮喘大鼠气道炎症反应的作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(2):62-66.
[2] 胡学洋,黄鹏,吴陈亮. 鱼腥草素钠对脂多糖诱导单核巨

噬细胞RAW264.7炎症反应的抑制作用[J]. 中国药业,2023,32(20):82-85.

[3] 康冠楠,侯莉莉,党萍,等. 阿魏酸钠对肺结核模型大鼠JNK/P38MAPK信号通路的调节作用及巨噬细胞凋亡的抑制作用研究[J]. 中国药业,2021,30(11):31-36.
[4] 王杰,刘健,文建庭,等. 雷公藤甲素抑制类风湿关节炎患者的成纤维样滑膜细胞的炎症和迁移:基于circRNA 0003353/JAK2/STAT3信号通路[J]. 南方医科大学学报,2022,42(3):367-374.
[5] 刘德浪,顾勇,刘卫花. 依达拉奉佐治急性脑梗死并脑微出血对患者神经功能及氧化应激指标的影响[J]. 中国药业,2020,29(14):44-46.
[6] 刘芳,温乙托,官海莲,等. 灯盏花素联合依达拉奉治疗脑卒中后脑细胞损伤临床评价[J]. 中国药业,2020,29(19):78-80.
[7] 郑礼平,王玉婷,倪罗番,等. 兼具抗氧化和 γ -氨基丁酸增强活性的多功能抗脑卒中化合物[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2022,42(5):644-649.
[8] 刘子祚,赵世博,任景云,等. 天然 β -葡聚糖的结构特征及其免疫增强作用研究进展[J]. 免疫学杂志,2022,38(11):1007-1012.
[9] 朱宇琪,于英华,潘伟,等. 免疫反应基因1/衣康酸在调控巨噬细胞炎症中的研究进展[J]. 中国免疫学杂志,2021,37(21):2592-2596.
[10] 单云,朱晓琳,唐蕾,等. 巨噬细胞相关组织纤维化中细胞外囊泡的作用机制研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2022,38(5):466-471.
[11] ZHAO S, SHANG AQ, GUO MC, et al. The advances in the regulation of immune microenvironment by *Candida albicans* and macrophage cross-talk[J]. Front Microbiol, 2022, 13: 1029966.
[12] 王卓,闫曙光,惠毅,等. 麻黄-大黄药对抑制肺泡巨噬细胞M1极化防治急性肺损伤的作用机制[J]. 中国药理学通报,2022,38(9):1421-1429.
[13] 袁林,梁晓晓,罗颖,等. 竹节参皂苷IVa抑制THP-1源性巨噬细胞泡沫化的研究[J]. 中国临床药理学杂志,2022,38(10):1051-1054.
[14] SHAN Y, WANG L, SUN J, et al. Exercise preconditioning attenuates cerebral ischemia-induced neuronal apoptosis, Th17/Treg imbalance, and inflammation in rats by inhibiting the JAK2/STAT3 pathway[J]. Brain Behav, 2023, 13(6): e3030.
[15] SHAO L, YAN Y, WANG N, et al. Betulonic acid regulates oviduct epithelial cell inflammation through the TLR4, MAPK, and JAK/STAT signalling pathways[J]. Reprod Fertil Dev, 2023, 35(8):480-491.
[16] 周玉玲,罗真春,刘坤,等. 炎症性肠病合并自身免疫疾病临床特征及药物治疗[J]. 中国药业,2019,28(15):38-40.

(收稿日期:2023-06-05;修回日期:2023-12-28)