

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.14.002

脂氧素对巨噬细胞 RAW264.7 的抗炎实验研究*

谢大泽¹, 黄利兴^{2,3}, 刘东升², 朱俊⁴, 谢勇², 周南进^{1,4△}

(1. 江西省医学科学研究所, 南昌 330006; 2. 南昌大学第一附属医院消化内科, 南昌 330046; 3. 赣南医学院第一附属医院消化内科, 江西赣州 341000; 4. 南昌大学免疫与生物治疗研究所, 南昌 330006)

[摘要] **目的** 研究脂氧素(LX)A4 和叔丁氧羰基-苯丙氨酸-亮氨酸-苯丙氨酸-亮氨酸-苯丙氨酸(BOC-2)对 LPS 作用巨噬细胞 RAW264.7 存活的影响。**方法** 取对数生长期的巨噬细胞 RAW264.7 为研究载体, 实验用不同浓度的脂多糖(LPS)在不同时间点处理细胞, 观察 LX A4 和 BOC-2 对 LPS 作用巨噬细胞 RAW264.7 后的存活率。CCK-8 法观察 LPS 对各组巨噬细胞 RAW264.7 的不良反应, Western blot 法检测 LX A4 和 BOC-2 对 LPS 处理后巨噬细胞 RAW264.7 的 Toll 样受体 4(TLR4)和 pNF-κB p65 蛋白水平, 酶联免疫吸附(ELISA)法检测 LX A4 和 BOC-2 对 LPS 处理后巨噬细胞 RAW264.7 培养上清液中白细胞介素 6(IL-6)水平。**结果** 在 1 000 ng/mL 浓度 LPS 组, 作用时间 6 h, 巨噬细胞 RAW264.7 内 TLR4 蛋白水平和 pNF-κB p65 蛋白水平显著高于其余各组($P < 0.05$)。在 LPS 作用下, LX A4 组细胞存活率显著高于对照组($P < 0.05$); BOC-2 组在 LPS 作用后巨噬细胞 RAW264.7 的存活率显著低于无 LPS 作用($P < 0.05$)。在 LPS 作用下, LX A4 组 pNF-κB p65 蛋白水平低于对照组及 BOC-2 组($P < 0.05$), BOC-2 组 pNF-κB p65 蛋白水平高于其余各组($P < 0.05$)。在 LPS 作用下, LX A4 组 IL-6 的水平低于对照组及 BOC-2 组($P < 0.05$)。**结论** LX A4 能够抑制 LPS 对巨噬细胞 RAW264.7 的作用及 TLR4/NF-κB 信号通路的激活, 有助减轻炎症反应。

[关键词] 脂多糖类; 脂氧素类; 脂氧素 A4; RAW264.7; 核转录因子

[中图分类号] R573.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)14-1876-03

The preliminary study of LX A4 on the LPS-induced RAW264.7 cell line*

Xie Daze¹, Huang Lixing^{2,3}, Liu Dongsheng², Zhu Jun⁴, Xie Yong², Zhou Nanjin^{1,4△}

(1. Department of Gastroenterology, Jiangxi Academy of Medical Sciences, Nanchang, Jiangxi 330046, China; 2. Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330046, China; 3. Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Ganzhou, Jiangxi 341000, China; 4. Institute of Immunomodulation and Immunotherapy, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[Abstract] **Objective** To examine the effect of lipoxins (LX) A4 and its antagonist (BOC-2) on the survival rate of RAW264.7 macrophage. **Methods** RAW264.7 were treated with different concentrations of LPS, and the cells were collected after 2, 4, 6 h respectively, then we observed the effect of LX A4 and BOC-2 on the survival rate of those cells. Cytotoxicity were detected by CCK-8 method. The expression of TLR4 and pNF-κB p65 in RAW264.7 were detected by Western blot. The expression of IL-6 in cell supernatant was measured by ELISA. **Results** The protein expression of TLR4 and pNF-κB p65 treated with LPS for 6 h in 1 000 ng/mL of LPS group were higher than those of other groups ($P < 0.05$). In the present of LPS, the survival rate of macrophage in the LX A4 group was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). Meanwhile, in the BOC-2 group, the survival rate of macrophage stimulated with LPS was significantly lower than the that of corresponding non-LPS group ($P < 0.05$). Stimulated with LPS, the protein expression of pNF-κB p65 in the LX A4 group was significantly lower than those of the control group and the BOC-2 group ($P < 0.05$), and the protein expression of pNF-κB p65 in the BOC-2 group was significantly higher than those of other groups ($P < 0.05$). In the present of LPS, the concentration of IL-6 in the LX A4 group was significantly lower than those of the control group and the BOC-2 group ($P < 0.05$). **Conclusion** LX A4 could inhibit the cytotoxicity of LPS and the activation of TLR4/NF-κB signaling pathway, then reduce the inflammation.

[Key words] lipopolysaccharides; lipoxins; lipoxin A4; RAW264.7; nuclear factor kappa

脂氧素(lipoxin, LX)是继前列腺素之后的又一重要花生四烯酸代谢产物, 在炎症疾病的组织中广泛表达, LX A4 最具抗炎作用, 其主要通过抑制核转录因子 Kappa B(NF-κB)的活性及促炎因子的释放发挥抗炎作用^[1]。LX 除了抑制促炎细胞因子外, 也可促进抗炎因子如白细胞介素(IL-4)、白细胞介

素 10(IL-10)等的产生^[2], 这种协调作用能产生强效的抗炎效应。叔丁氧羰基-苯丙氨酸-亮氨酸-苯丙氨酸-亮氨酸-苯丙氨酸(BOC-2)是脂氧素受体的拮抗剂, 与 LX 竞争性结合于脂氧素受体, 从而阻碍 LX 与其受体的结合, 对 LX 与其受体的结合起拮抗性作用。本文以巨噬细胞 RAW264.7 为研究载体,

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81160056); 江西省教育厅项目(2012, 2014)。 作者简介: 谢大泽(1962—), 副主任技师, 本科, 主要从事免疫学研究。△ 通讯作者, E-mail: jxznj@163.com。

研究 LX A4 和 BOC-2 对脂多糖(LPS)作用巨噬细胞的存活、信号通路及细胞因子分泌的影响,旨在为 LX A4 抗炎作用及机制提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 巨噬细胞 RAW264.7,由南昌大学第一附属医院消化研究所保存;DMEM 购于 HyClone 公司;LX A4 购于 Cayman 公司;BOC-2 购于 US Biological 公司;LPS 购于 Sigm-al 公司;二甲基亚砷(DMSO)购于北京索莱宝有限公司;CCK-8 购于上海贝博生物有限公司;Toll 样受体 4(TLR4)抗体购于 Abcam 公司;pNF-κB p65 抗体购于 Santacruz 公司;细胞因子信号转导抑制因子 2(SOCS2)抗体购于 Abcam 公司;酶联免疫试剂(ELISA)试剂盒购于上海点亮生物科技有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 巨噬细胞 RAW264.7 用 10%胎牛血清的 DMEM 培养。将 10 μL 细胞悬液加入细胞计数板内,静置后显微镜下计数。细胞密度(/mL) = (4 个方格内细胞总数/4) × 稀释倍数 × 10⁴。

1.2.2 实验分组 (1)LPS 作用巨噬细胞 RAW264.7 实验分为 4 组。①实验 1 组:用 10 ng/mL LPS 处理巨噬细胞 RAW264.7;②实验 2 组:用 100 ng/mL LPS 处理巨噬细胞 RAW264.7;③实验 3 组:用 1 000 ng/mL LPS 处理巨噬细胞 RAW264.7;④实验 4 组:用 10 000 ng/mL LPS 处理巨噬细胞 RAW264.7。并设立对照组:无任何药物处理巨噬细胞 RAW264.7。分别在 LPS 作用 2、4、6 h 后提取细胞蛋白。(2) LX A4 和 BOC-2 对 LPS 作用巨噬细胞 RAW264.7 存活的影响。①对照组:不加任何药物处理巨噬细胞 RAW264.7;②LX A4 组:用 300 nmol/L LX A4 处理巨噬细胞;③BOC-2 组:用 10 μmol/L BOC-2 处理 RAW264.7 细胞。

1.2.3 CCK-8 法检测巨噬细胞 RAW264.7 毒性 取生长良好的对数期巨噬细胞 RAW264.7,按 5 × 10⁴/孔接种于 96 孔板,待细胞贴壁后,吸弃培养液,按上述实验分组分别加入含有 LX A4 和 BOC-2 的培养液预处理 15 min;同时设定空白孔,每组设 5 个复孔。按要求加 LPS 作用,每孔 200 μL,培养 6 h 后,加入 CCK-8 溶液 10 μL,继续培养 2 h。按 CCK-8 试剂盒说明书操作。

1.2.4 ELISA 法检测 IL-6 水平 采用多因子蛋白生物标志物检测系统检测各组细胞培养上清液中 IL-6 水平,根据多因子分析试剂盒说明书进行操作。

1.2.5 Western blot 法检测 TLR4、pNF-κB p65 蛋白水平 根据巨噬细胞 RAW264.7 计数结果,将 3 组实验按 1 × 10⁶/孔细胞接种于 6 孔细胞培养板中,摇匀后置 37 ℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。实验选取对数生长期细胞,Western blot 检测各组巨噬细胞 RAW264.7 内 TLR4、pNF-κB p65 蛋白水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件处理数据,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 ONE-WAY ANOVA 进行显著性检验,多组比较采用 LSD 检验,组间比较采用 t 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 LPS 对巨噬细胞 RAW264.7 内 TLR4 蛋白水平的影响 不同浓度 LPS 作用巨噬细胞 2 h 后,实验 1 组、实验 2 组和实验 3 组 TLR4 蛋白水平显著低于对照组($P < 0.05$);作用 4

h,实验 3 组显著高于其余各组($P < 0.05$);作用 6 h,在一定浓度范围内巨噬细胞 RAW264.7 内 TLR4 蛋白水平随 LPS 浓度增加而增加,其中实验 3 组显著高于其余各组($P < 0.05$)。同一浓度 LPS 作用巨噬细胞 RAW264.7 不同时间,实验 3 组的 TLR4 蛋白水平在 4、6 h 显著高于 2 h($P < 0.05$),同时 6 h 显著高于 4 h($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组巨噬细胞不同时间点 RAW264.7TLR4 蛋白水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	2 h	4 h	6 h
对照组	0.56 ± 0.06	0.65 ± 0.01	0.59 ± 0.05
实验 1 组	0.43 ± 0.03 ^a	0.60 ± 0.06 ^e	0.54 ± 0.06 ^a
实验 2 组	0.40 ± 0.04 ^a	0.53 ± 0.13	0.74 ± 0.07 ^{abef}
实验 3 组	0.41 ± 0.04 ^a	0.83 ± 0.07 ^{abcde}	1.04 ± 0.06 ^{abcdef}
实验 4 组	0.48 ± 0.06	0.62 ± 0.09	0.45 ± 0.07 ^{ac}

^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与实验 1 组比较;^c: $P < 0.05$,与实验 2 组比较;^d: $P < 0.05$,与实验 4 组比较;^e: $P < 0.05$,与同组 2 h 比较;^f: $P < 0.05$,与同组 4 h 比较。

2.2 LPS 对巨噬细胞 RAW264.7 内 pNF-κB p65 蛋白水平的影响 不同浓度 LPS 作用巨噬细胞 RAW264.7 2 h,实验 3 组 pNF-κB p65 蛋白水平显著高于其余各组($P < 0.05$);作用 4 h,实验 3 组 pNF-κB p65 蛋白水平显著高于其余各组($P < 0.05$);作用 6 h,在一定浓度范围内,巨噬细胞 RAW264.7 内 pNF-κB p65 蛋白水平随 LPS 浓度增加而增加,其中实验 3 组显著高于其余各组($P < 0.05$)。同一浓度 LPS 作用巨噬细胞 RAW264.7 不同时间,实验 2 组、实验 3 组的 pNF-κB p65 蛋白水平在 6 h 显著高于 2 h($P < 0.05$),见表 2。

表 2 各组巨噬细胞不同时间点 RAW264.7pNF-κB p65 蛋白水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	2 h	4 h	6 h
对照组	0.48 ± 0.01 ^a	0.51 ± 0.01 ^a	0.50 ± 0.01 ^a
实验 1 组	0.48 ± 0.04 ^a	0.63 ± 0.09 ^a	0.53 ± 0.03 ^a
实验 2 组	0.51 ± 0.04 ^a	0.61 ± 0.11 ^a	0.70 ± 0.02 ^{ab}
实验 3 组	0.64 ± 0.04	0.79 ± 0.09	0.93 ± 0.15 ^b
实验 4 组	0.52 ± 0.06 ^a	0.58 ± 0.07 ^a	0.63 ± 0.03 ^a

^a: $P < 0.05$,与实验 3 组比较;^b: $P < 0.05$,与同组 2 h 比较。

2.3 LX A4 和 BOC-2 对 LPS 作用巨噬细胞 RAW264.7 存活的影响 在无 LPS 作用下,LX A4 组对巨噬细胞 RAW264.7 的存活率无影响($P > 0.05$);在 LPS 作用下,LX A4 组(108.76 ± 5.66)的巨噬细胞 RAW264.7 存活率显著高于对照组(84.40 ± 4.46)及 BOC-2 组(83.10 ± 7.69),差异有统计学意义($P < 0.05$)。而同时在对照组及 BOC-2 组,LPS 作用后巨噬细胞 RAW264.7 的存活率显著低于无 LPS 作用后的存活率($P < 0.05$)。

2.4 LX A4 和 BOC-2 对 LPS 作用巨噬细胞 RAW264.7 TLR4 蛋白水平的影响 无论有无 LPS 作用,巨噬细胞 RAW264.7 的蛋白水平在各组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。而在 LPS 作用下,巨噬细胞 RAW264.7 的 TLR4 蛋白水平显著高于相对应的无 LPS 作用的蛋白水平($P < 0.05$),见表 3。

表 3 LX A4 对 TLR4 蛋白水平的影响

组别	无 LPS	有 LPS
对照组	0.61±0.13	1.06±0.06 ^a
LX A4 组	0.63±0.04	1.15±0.07 ^a
BOC-2 组	0.77±0.07	1.71±0.09 ^a

^a: $P < 0.05$, 与无 LPS 比较。

2.5 LX A4 和 BOC-2 对 LPS 作用巨噬细胞 RAW264.7 内 pNF- κ B p65 蛋白水平的影响 在无 LPS 作用下, 各组巨噬细胞 RAW264.7 内的 pNF- κ B p65 蛋白水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在 LPS 作用下, LX A4 组 (0.64 ± 0.08) pNF- κ B p65 蛋白水平低于对照组 (0.86 ± 0.06) 及 BOC-2 组 (1.07 ± 0.16), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); BOC-2 组 pNF- κ B p65 蛋白水平高于其余各组 ($P < 0.05$), 同时对照组及 BOC-2 组高于相对应的无 LPS 组 ($P < 0.05$); 而 LX A4 组, 无论有无 LPS 作用, pNF- κ B p65 蛋白水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.6 LX A4 和 BOC-2 对 LPS 作用巨噬细胞 RAW264.7 分泌 IL-6 水平的影响 在无 LPS 作用下, 各组巨噬细胞 RAW264.7 培养上清液中 IL-6 的水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 在 LPS 作用下, LX A4 组 (78.20 ± 11.06) IL-6 的水平低于对照组 (154.56 ± 47.70) 及 BOC-2 组 (148.03 ± 29.65), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 无论有无 LX A4 和 BOC-2 处理, LPS 作用巨噬细胞 RAW264.7 培养上清液中 IL-6 的水平显著高于相应的无 LPS 作用的 IL-6 水平 ($P < 0.05$)。

3 讨 论

LX 是重要的内源性抗炎介质, 对多种炎性细胞和炎性反应起负性调节, 具有广泛的抗炎及促炎症消退作用, 在发挥抗炎活性时通过不同方式调控多种炎症信号通路, 被誉为是中性粒细胞介导的组织损伤的“停止信号”或“刹车信号”^[3]。

TLRs 蛋白家族是一组能够识别病原微生物及内源性组织损伤信号的高度保守的跨膜蛋白家族。在组织受损或炎症浸润状态下, TLRs 与病原体相关分子模式 (PAMPs) 结合后启动一系列胞内级联信号通路的活化, 从而调控固有免疫与获得性免疫, 以及组织细胞的损伤与修复。TLR4/NF- κ B 信号通路是联系机体固有免疫与获得性免疫的桥梁, 在调节肠道炎症、防御病原体入侵及维持肠腔内环境稳态中起重要作用^[4]。

LPS 是 TLR4 的天然配体, 在髓样分化蛋白 2 (MD-2) 及 CD14 分子的参与下, LPS 与 TLR4 结合后能够通过髓样分化因子 (MyD88) 依赖和 MyD88 非依赖途径激活下游信号通路, 其中 MyD88 依赖途径进一步募集并活化下游的肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF6), 活化的 TRAF6 经由 MAPK 信号通路及 NF- κ B 信号通路, 最终引起一系列的免疫和炎症反应^[5]。正常肠黏膜 TLR4 蛋白低表达, 而黏膜固有层巨噬细胞不表达 CD14 分子, 在炎症性肠病 (IBD) 中 TLR4 及 CD14 的表达上调, 并伴有炎症细胞因子的分泌增加^[6], 提示 TLR4 信号通路的异常激活在 IBD 的发生、发展中起重要作用。

王艳艳等^[7]应用内化抑制剂构建内化障碍的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 模型, 发现 LPS-TLR4 复合物内化与 LPS 介导巨噬细胞活化密切相关, 内化障碍条件下, 由 LPS 介导的细胞活化表现为对 IL-6 的释放受到显著抑制, 而对肿瘤坏死因子 α

(TNF- α) 的释放则抑制不显著。本研究发现, 相同浓度 LPS 作用巨噬细胞 RAW264.7 不同时间, 细胞内 pNF- κ B p65 蛋白水平呈时间依赖性, 且在 6 h 时作用最为明显; 提示巨噬细胞 RAW264.7 对外界适宜的刺激需要一定的反应时间, 激活 NF- κ B 信号通路后需要经过一系列的胞内级联反应, 最终才引起炎症反应。本研究发现, 在无 LPS 作用下, LX A4 对 pNF- κ B 蛋白水平无影响, 提示在生理情况下不起作用有关; 在 LPS 作用下, LX A4 作用的同时, 与对照组相比, pNF- κ B p65 蛋白水平下降。Mcberry 等^[8]发现, LX 的作用机制是通过上调 SOCS-2 的表达、加速 TRAF6 的降解, 进而抑制 NF- κ B 信号通路的激活, 防止炎症扩散。研究表明, LX A4 能够减轻 LPS 所致巨噬细胞 RAW264.7 培养上清液中 IL-6 的水平。由此可见, 抗炎因子与 LX A4 之间的正反馈作用, 对炎症的发展和转归起着作用。

综上所述, LX A4 能够抑制巨噬细胞 RAW264.7 中 NF- κ B 的激活, 有减轻炎症反应的作用, 因此有望成为炎症肠病 (IBD) 治疗的新的契机。本实验还有需进一步完善, 为 LX A4 及 LX 在 IBD 中的作用机制提供更为强有力的证据。

参考文献

- [1] Romano M. Lipoxin and aspirin-triggered lipoxins[J]. Sci World J, 2010, 10(1): 1048-1064.
- [2] Zhou XL, Yang QS, Ni SZ, et al. Protective effects of lipoxin a4 in testis injury following testicular torsion and detorsion in rats[J]. Mediators Inflamm, 2014; 898056.
- [3] 周游, 蒋兴亮. 脂氧素调控炎症信号通路的研究进展[J]. 中华临床医师杂志, 2015, 9(6): 989-993.
- [4] Garcia-Rodriguez S, Arias-Santiago S, Perandres-Lopez RA, et al. Increased gene expression of toll-like receptor 4 on peripheral blood mononuclear cells in patients with psoriasis[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2013, 27(2): 242-250.
- [5] Yu ZH, Huang F, Xu N, et al. Expression of toll-like receptor 4, CD14, and NF-kappaB in Chinese patients with ulcerative colitis[J]. J Immunoassay Immunochem, 2011, 32(1): 47-56.
- [6] Campos N, Magro F, Castro AR, et al. Macrophages from IBD patients exhibit defective tumour necrosis factor-alpha secretion but otherwise normal or augmented pro-inflammatory responses to infection [J]. Immunobiology, 2011, 216(8): 961-970.
- [7] 王艳艳, 郑江. LPS-TLR4 复合物内化障碍与 LPS 介导巨噬细胞活化的实验研究[J]. 重庆医学, 2011, 40(23): 2291-2293.
- [8] Mcberry C, Gonzalez RM, Shryock N, et al. SOCS2-induced proteasome-dependent TRAF6 degradation: a common anti-inflammatory pathway for control of innate immune responses [J]. PLoS One, 2012, 7(6): e38384.

(收稿日期: 2015-11-15 修回日期: 2015-12-28)