

脂氧素 A₄ 对脂多糖诱导巨噬细胞氧化损伤的影响

周晓燕^{1,2} 徐方云¹ 蔡震宇¹ 王红梅¹ 祝子瑞¹ 吴萍² 叶笃筠^{2*}¹南昌大学医学院病理生理系, 南昌 330006; ²华中科技大学同济医学院病理生理系, 武汉 430030

摘要 为了研究脂氧素(LXs)是否具备拮抗脂多糖(LPS)诱导巨噬细胞氧化损伤的作用, 本文分别通过MTT法观察脂氧素 A₄ (LXA₄)对LPS损伤巨噬细胞活力的影响; 流式细胞术检测活性氧(ROS)生成水平; 试剂盒检测细胞内丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)的生成量及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的酶活性变化。结果表明 LXA₄可以提高LPS处理巨噬细胞的活力; 减少ROS、NO、MDA的生成量; 抑制iNOS的活性而增强SOD、GSH-Px、CAT抗氧化酶的活性。由此可见, LXA₄可以通过抑制ROS及NO产生的同时增强抗氧化酶的活性而拮抗LPS所致的巨噬细胞氧化损伤。

关键词 脂氧素; 脂多糖; 活性氧; 氧化损伤

脂氧素(lipoxins, LXs)是炎症反应的重要“刹车信号”, 对多种炎症细胞的功能和炎症相关基因的表达具有广泛调节作用^[1,2]。而LXs对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)引起的细胞氧化损伤有何作用未见报道。本研究通过观察脂氧素 A₄ (lipoxin A₄, LXA₄)对LPS诱导巨噬细胞活性氧(ROS)、膜脂质过氧化产物丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)的生成量及超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)等酶活性的影响, 探讨LXs对LPS诱导的巨噬细胞氧化损伤是否具备保护作用。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

RPMI1640培养基为Gibco公司产品, 胎牛血清购自三利公司, LPS (*Escherichia coli* serotype 0111: B4)购自Sigma公司, DCFH-DA为Molecular Probes (OR, USA)公司产品, LXA₄购自Cayman公司, MDA、SOD、GSH-Px、CAT、NO和iNOS检测试剂盒均为南京建成公司产品。

1.2 细胞培养与分组

小鼠巨噬细胞株RAW264.7(购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所)用RPMI1640培养液培养在培养板中, 培养液中加入10%胎牛血清、100 U/ml青霉素和100 U/ml链霉素, 细胞培养在37℃、5%CO₂培养箱中, 实验前用无血清培养基培养24h。

1.3 MTT法检测细胞活性

各组细胞处理24h后, 每孔按培养液的10%加入MTT(终浓度为0.5g/L), 37℃继续培养4h, 仔细吸出上清液, 加入与培养液等体积的DMSO, 振荡10min, 使结晶充分溶解, 酶标仪490nm波长处测定吸光度A₄₉₀。

1.4 流式细胞仪检测 ROS

不同剂量LXA₄(0.1~10nmol/L)预先处理巨噬细胞6h, 然后加入10mg/L LPS共同作用30min。PBS洗涤细胞后各孔加入1ml 10μmol/L DCFH-DA探针, 混匀, 37℃避光温育20min, PBS洗涤细胞3次以去除多余的未结合的探针, 流式细胞仪检测荧光强度。ROS的水平与荧光强度成正比, 以荧光强弱反应ROS的量。

1.5 MDA、SOD、GSH-Px、CAT、NO和 iNOS 测定

按南京建成生物工程研究所试剂盒方法操作。

1.6 统计学分析

采用SPSS13.0软件进行数据处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 差异显著性检验采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 LXA₄和LPS对巨噬细胞活性的影响

MTT结果显示(图1), 10mg/L LPS处理组细胞的活性与对照组相比明显下降, 提示大剂量LPS对巨噬细胞具有细胞毒性; 而LXA₄能够呈剂量依赖性地

收稿日期: 2008-09-22 接受日期: 2009-03-09

国家自然科学基金资助项目(No.30570726和No.30772154)

*通讯作者。Tel: 027-83690562, E-mail: yedy@mails.tjmu.edu.cn

改善 LPS 对巨噬细胞的损伤。

2.2 LXA_4 抑制 LPS 诱导巨噬细胞生成 ROS

流式细胞仪检测发现(图 2), LPS 诱导 ROS 大量生成, 约增加 6.5 倍; 而 LXA_4 则可以呈剂量依赖性地抑制 LPS 诱导巨噬细胞生成 ROS。

2.3 LXA_4 抑制 LPS 诱导巨噬细胞 MDA、NO 生成及 iNOS 活性

从图 3 可以看出: 与对照组相比, LPS 处理组 MDA 和 NO 的生成量明显增加, iNOS 活性增强; 而 LXA_4 呈剂量依赖性地抑制 LPS 诱导 NO、MDA 生成, 并且减弱 iNOS 活性。

2.4 LXA_4 增强 LPS 处理巨噬细胞内抗氧化酶的活性

从图 4 可知, LPS 处理组巨噬细胞内抗氧化酶活

性均比正常细胞低; 而 LXA_4 呈剂量依赖性地增强 SOD、GSH-Px、CAT 三种抗氧化酶的活性。

3 讨论

有效地促进炎症及时消退比直接抑制炎症发生、发展更有利于机体。因为, 从某种意义上讲, 炎症本身也是一种对机体有利的防御性反应。巨噬细胞及

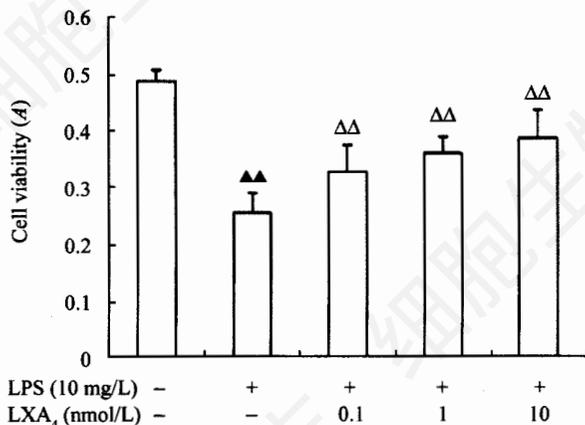


Fig.1 Effects of LXA_4 and LPS on cell viability of macrophages $\bar{x} \pm s$, $n=6$. ^{▲▲} $P<0.01$ vs control group, ^{△△} $P<0.01$ vs LPS group.

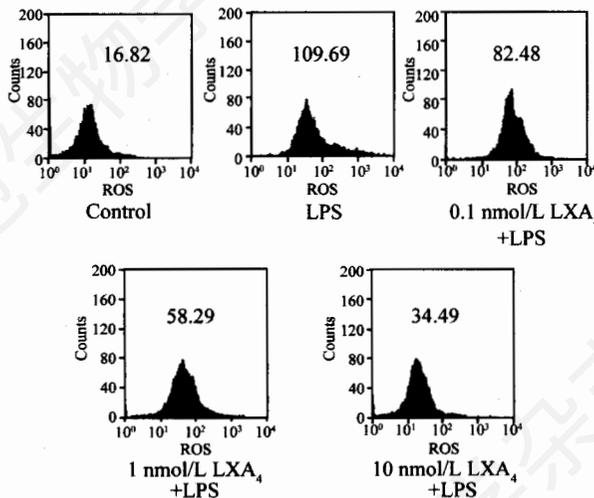


Fig.2 LXA_4 inhibited LPS-induced ROS production RAW264.7 cells were treated with LXA_4 for 6 h and then LPS for 30 min.

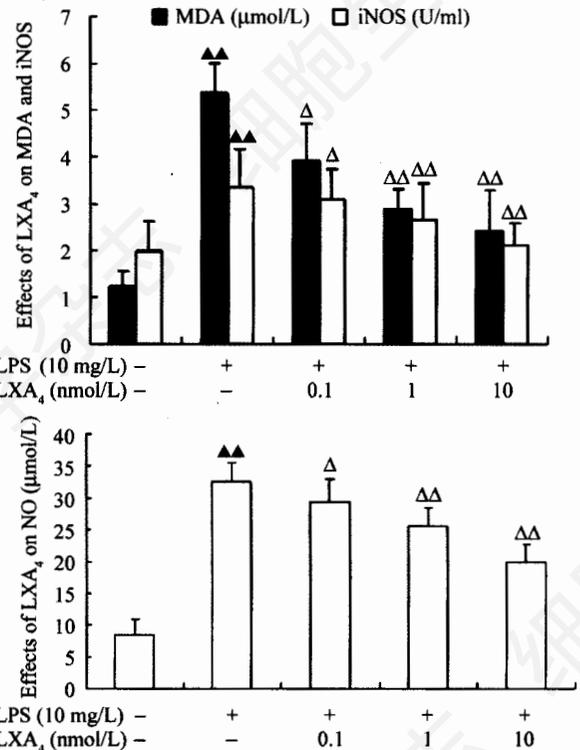


Fig.3 Effects of LXA_4 on MDA, NO, and iNOS in RAW264.7 cells $\bar{x} \pm s$, $n=6$. ^{▲▲} $P<0.01$ vs control group, [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$ vs LPS group.

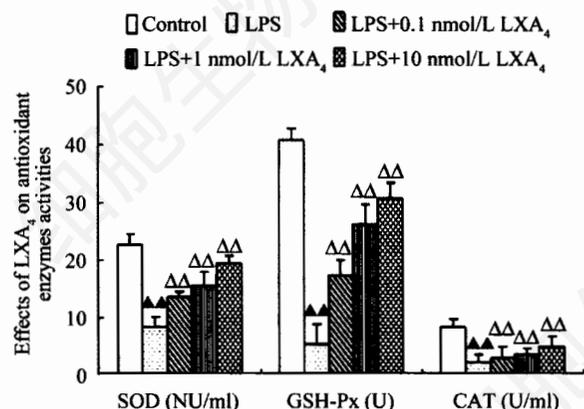


Fig.4 Effects of LXA_4 on the activities of antioxidant enzymes in RAW264.7 cells $\bar{x} \pm s$, $n=6$. ^{▲▲} $P<0.01$ vs control group, ^{△△} $P<0.01$ vs LPS group.

时清除凋亡中性粒细胞是炎症消退的重要环节^[3,4]。因此,维持巨噬细胞的正常功能对炎症及时消退而言至关重要。LPS引起的巨噬细胞氧化损伤必然严重妨碍炎症及时消退,那么重要的促炎症消退介质LXA₄是否能够拮抗LPS引起的巨噬细胞氧化损伤呢?未见相关报道。为此,本文分别观察了LXA₄对巨噬细胞氧化和抗氧化能力的影响。

ROS不仅能够通过脂质过氧化反应形成脂质过氧化物攻击膜脂、膜蛋白而直接损伤细胞^[5],还能够通过增强转录因子NF- κ B的活性促进其他炎症介质生成而损伤细胞和组织^[6]。iNOS在生理情况下不表达,但LPS可以诱导iNOS表达。由iNOS催化合成的NO迅速大量释放使局部NO剧增。过量的NO可与周围的超氧阴离子(O₂⁻)反应生成更强的氧化剂即亚硝基阴离子而介导氧化损伤。为此,我们首先研究了LXA₄对LPS诱导巨噬细胞生成ROS和NO及iNOS酶活性的影响。结果发现LXA₄能够明显抑制LPS诱导巨噬细胞生成ROS(图2)、释放NO(图3),并且还可以减弱iNOS酶活性(图3)。机体产生的ROS攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸形成脂质过氧化物MDA损伤组织细胞,同时MDA含量间接反映组织中ROS含量变化^[7],常用来反映组织脂质过氧化损伤程度。为此,我们进一步观察了LXA₄对MDA的影响,结果表明LXA₄也可以抑制LPS诱导MDA生成(图3)。上述所有结果提示LXA₄可以通过削弱氧化能力而拮抗LPS引起的巨噬细胞氧化损伤。

为了更全面地证实LXA₄能够拮抗氧化损伤,本文还观察了LXA₄的抗氧化能力,观察指标包括CAT、SOD和GSH-Px。①羟自由基(\cdot OH)是化学性质最活泼的ROS,它几乎与细胞内各类有机物都能反应,并且速度常数非常高,因此它的破坏性极强。但 \cdot OH可以被CAT分解,在一定条件下CAT还可以直接分解其底物H₂O₂而保护细胞的正常生理。②SOD催化歧化反应,清除引发自由基连锁反应的起始因素即超氧阴离子。③GSH-Px催化还原型谷胱甘

肽(GSH)对过氧化物的还原反应,在细胞内清除过氧化物代谢产物,阻断脂质过氧化链锁反应,从而保护细胞膜结构和功能完整。本研究结果表明LPS明显减弱巨噬细胞内SOD、GSH-Px、CAT这三种抗氧化酶的活性,而LXA₄能够呈剂量依赖性地拮抗LPS此抑制效应(图4)。

综上所述,本研究发现LXA₄可以拮抗LPS所致巨噬细胞氧化损伤,主要通过抑制氧化能力的同时增强抗氧化能力而实现。Mitchell等^[8]报道,LXA₄促进巨噬细胞清除凋亡中性粒细胞,但其内在机制尚存在争论。本研究提示,LXA₄拮抗LPS所致的巨噬细胞氧化损伤可能是其重要机制之一。

参考文献(References)

- [1] 张力,万敬员,叶笃筠. 脂氧素与炎症消退, *生命的化学*, 2004, 24(1): 61-63
- [2] Chiang N, Arita M, Serhan CN. Anti-inflammatory circuitry: lipoxin, aspirin-triggered lipoxins and their receptor ALX, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2005, 73(3-4): 163-177
- [3] Heasman SJ, Giles KM, Ward C, et al. Glucocorticoid-mediated regulation of granulocyte apoptosis and macrophage phagocytosis of apoptotic cells: implications for the resolution of inflammation, *J Endocrinol*, 2003, 178(1): 29-36
- [4] Haslett C. Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation, *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 160(5 Pt 2): S5-S11
- [5] Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and *in vivo* monitoring of ROS, *Circulation*, 2003, 108 (16): 1912-1916
- [6] Vulcano M, Meiss RP, Isturiz MA. Deferoxamine reduces tissue injury and lethality in LPS-treated mice, *Int J Immunopharmacol*, 2000, 22(8): 635-644
- [7] Kinnula VL, Everitt JI, Whorton AR, et al. Hydrogen peroxide production by alveolar type II cells, alveolar macrophages and endothelial cells, *Am J Physiol*, 1991, 261(2 pt1): L84-L91
- [8] Mitchell S, Thomas G, Harvey K, et al. Lipoxins, aspirin-triggered epi-lipoxins, lipoxin stable analogues, and the resolution of inflammation: stimulation of macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils *in vivo*, *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(10): 2497-2507

Effects of Lipoxin A₄ on Lipopolysaccharide-induced Oxidative Damage in Macrophage

Xiao-Yan Zhou^{1,2}, Fang-Yun Xu¹, Zhen-Yu Cai¹, Hong-Mei Wang¹, Zi-Rui Zhu¹, Ping Wu², Du-Yun Ye^{2*}

(¹Department of Pathophysiology, Medical College of Nanchang University, Nanchang 330006, China; ²Department of Pathophysiology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract To study the effects of lipoxin A₄ (LXA₄) on oxidative damage of macrophages exposed to lipopolysaccharide (LPS), the cells were exposure to LPS and different concentrations of LXA₄. Then, the cell activity was analyzed by MTT assays; reactive oxygen species (ROS) were quantified through flow cytometry (FCM); the levels of nitric oxide (NO) and malondialdehyde (MDA), besides the activities of SOD, GSH-Px, CAT, and iNOS were all detected through assay kits. In this study, the data indicated LXA₄ was able to increase the survival activity of LPS-treated macrophages; decrease the levels of ROS, NO and MDA; inhibit the activity of iNOS; promote the activity of SOD, GSH-Px, and CAT. It seemed that LXA₄ could antagonize LPS-induced oxidative damage through decrease the production of ROS and NO but also increase the activity of antioxidative enzymes.

Key words lipoxin; lipopolysaccharide; reactive oxygen species; oxidative damage

Received: September 22, 2008 Accepted: March 9, 2009

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30570726 and No.30772154)

*Corresponding author. Tel: 86-27-83690562, E-mail: yedy@mail.tjmu.edu.cn