

2-环戊氨基-5,8-二甲氧基-1,4-萘醌抑制LPS诱导的RAW264.7细胞内ROS水平与NO的分泌

刘磊^{1#} 申贵男^{1#} 冯丽¹ 韩英浩¹ 罗英花² 金颖华³ 金成浩¹ 崔玉东¹ 孙虎男^{1*}
(¹黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 大庆 163319; ²黑龙江八一农垦大学动物科学技术学院, 大庆 163319;
³黑龙江八一农垦大学图书馆, 大庆 163319)

摘要 炎症反应过程中有效控制巨噬细胞一氧化氮(nitric oxide, NO)的过度分泌和细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平, 对抑制LPS诱导的巨噬细胞过度活化和巨噬细胞介导的急性炎症反应具有重要的临床意义。该研究检测了以5,8-二甲氧基-1,4-萘醌(5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone, DMNQ)为中间体, 通过有机合成反应获得的6种新萘醌类衍生物对LPS诱导的RAW264.7细胞NO分泌和细胞内ROS水平的抑制效果及其机理。结果显示, 在6种新合成的化合物中, 2-环戊氨基-5,8-二甲氧基-1,4-萘醌具有明显抑制RAW264.7细胞NO分泌和细胞内ROS水平的效果, 同时不影响细胞的吞噬能力。另外, 通过对细胞信号传导通路的分析发现, #6化合物能够有效地抑制ROS依赖性的ERK和JNK磷酸化水平, 最终发挥降低LPS诱导的RAW264.7细胞NO分泌和iNOS蛋白质表达的作用。

关键词 萘醌类衍生物; 一氧化氮; 活性氧; 炎症

2-Cyclopentylamino-5,8-Dimethoxy-1,4-Naphthoquinone Inhibited the LPS Induced ROS and NO Production in RAW264.7 Cells

Liu Lei^{1#}, Shen Guinan^{1#}, Feng Li¹, Han Yinghao¹, Luo Yinghua², Jin Yinghua³, Jin Chenghao¹,
Cui Yudong¹, Sun Hunan^{1*}

(¹College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;
²College of Animal Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;
³Heilongjiang Bayi Agricultural University Library, Daqing 163319, China)

Abstract In inflammation processes, controlling the macrophage nitric oxide (NO) production and cellular reactive oxygen species (ROS) levels are the essential tools for inhibiting the LPS induced macrophage hyper-activation and macrophage mediated acute inflammation responses. In the present study, we examined the inhibitory effect of 5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone (DMNQ) derivatives on LPS induced NO production and cellular ROS level in RAW264.7 macrophage cells. The results showed that among the six compounds, 2-Cyclopentylamino-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone significantly inhibited NO production and cellular ROS level in RAW264.7 cells,

收稿日期: 2014-11-10 接受日期: 2015-01-09

黑龙江省教育厅科研基金(批准号: 1251H010)和国家教育部留学回国人员科研启动基金(第46批)资助的课题

#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0459-6819299, E-mail: sunmkbb@qq.com

Received: November 10, 2014 Accepted: January 9, 2015

This work was supported by the Scientific Research Foundation of Heilongjiang Provincial Education Department of China (Grant No.1251H010) and the Ministry of Education Scientific Research Foundation for Returned Overseas Students (46th)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-459-6819299, E-mail: sunmkbb@qq.com

网络出版时间: 2015-03-30 15:24

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150330.1524.004.html>

though it did not affect the cell phagocytosis. Furthermore, the signaling pathway studies showed that #6 compound significantly down-regulated the ROS dependent activation of ERK and JNK signaling pathway through inhibiting their phosphorylations, to decrease the NO production and inducible nitric oxide synthase (iNOS) protein expression.

Keywords naphthoquinone derivatives; nitric oxide (NO); reactive oxygen species (ROS); inflammation

当有机体受到外界刺激,如病原菌感染、病毒的侵染及内、外毒素等致病因子刺激时,被激活的巨噬细胞会产生过量的一氧化氮(nitric oxide, NO),可引起组织损伤^[1-3]并且诱导炎症反应的发生,这些过量产生的NO在机体免疫反应的发生、发展过程中发挥重要的调控作用^[4-5]。NO是可扩散的小分子,具有引起血管舒张、神经传递和炎症反应等重要的生物学功能,它是由精氨酸在一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)的作用下产生的,参与宿主的防御反应,调节前列腺素及其他炎症分子的合成等过程^[6]。如果不能及时有效地控制巨噬细胞NO的过度分泌,将诱发机体免疫细胞的过度活化,最终导致败血性休克甚至死亡。因此,有效地抑制NO的过量分泌是控制炎症反应的重要措施之一。巨噬细胞在脊椎动物的免疫调控过程中起着重要的作用,包括吞噬病原体等大颗粒抗原异物,作为抗原呈递细胞将抗原肽-MHC2类分子提呈给CD4⁺ T细胞,诱导T细胞的活化与成熟,并且参与自身免疫性疾病、抗感染和炎症性疾病等多种疾病的病理过程^[7]。由此可见,控制巨噬细胞的过度活化与NO的过度分泌对治疗和预防巨噬细胞介导的急性炎症反应具有重要的临床意义。本研究利用LPS与巨噬细胞表面的LPS结合蛋白(LBP)/CD14/toll-like receptor-4(TLR-4)^[8]相互结合的特点,用LPS诱导巨噬细胞的活化,引起NO的过度释放、诱导型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的过量表达及细胞内ROS(reactive oxygen species)水平的升高^[9-10]等作为检测对象,试图筛选出能够有效抑制LPS诱导的巨噬细胞NO过量分泌和细胞内ROS水平的化合物,为临床上治疗由巨噬细胞介导的炎症反应提供新的理论依据。

萘醌类化合物是紫草的主要成分之一,近年来随着对紫草的深入研究,萘醌类药物在诸多疾病中的治疗与预防作用受到广泛关注。萘醌类化合物具有抗菌、抗肿瘤、抗疟疾、退热等效应^[11-14]。近年来,在淋巴细胞和巨噬细胞中紫草素及其衍生物的抗炎作用陆续被揭开,例如,白丹花素能够抑制淋巴细胞

因子的释放^[15],紫草素衍生物能够抑制人乳腺上皮细胞的Cox2及前列腺素E等炎症相关基因的表达^[16],同时也能够抑制LPS诱导的巨噬细胞iNOS表达及NO的分泌^[17-18]等。这些研究指出,发挥抗炎效果的紫草素衍生物均为萘醌类化合物,充分说明萘醌类化合物在抗炎治疗中的重要调控作用。本研究重点检验了以5,8-二甲氧基-1,4-萘醌(5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone, DMNQ)为中间体,通过经典的迈克尔加成反应合成的6种新萘醌类衍生物对LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞NO分泌和细胞内ROS水平的影响,旨在找出一种能够有效抑制LPS诱导的NO分泌及细胞内ROS的新型萘醌类化合物,为治疗由巨噬细胞引起的炎症反应提供依据。

研究结果显示,在6种萘醌类衍生物中,2-环戊氨基-5,8-二甲氧基-1,4-萘醌(#6)具有明显抑制LPS诱导的RAW264.7细胞NO分泌和iNOS蛋白表达及细胞内ROS水平的效果,而不影响细胞的吞噬能力,并且有效地抑制了ERK和JNK的磷酸化水平。我们的研究结果和发现为临床上治疗由巨噬细胞引起的炎症反应提供了新的理论依据和候选化合物。

1 材料与方法

1.1 材料

脂多糖(LPS, *Escherichia coli* serotype 0111:B4),购自Sigma Aldrich公司。RAW264.7小鼠巨噬细胞系来自本实验室细胞库。

1.2 试剂及仪器

DMEM/高糖培养基(Hyclone公司);胎牛血清(Gibco公司);抗P-JNK、JNK、P-ERK、ERK、P-P38、P38、 α -tubulin单克隆抗体(Santa Cruz公司);Alexa488、CM-H2 DCFDA(Invitrogen公司);6孔细胞培养板(Costar公司);流式细胞仪(BD公司);蛋白免疫印迹系统(Amersham Bioscience公司);多功能酶标仪(TECAN公司)。

1.3 化合物合成

为了获得DMNQ衍生物,以1,5-二羟基萘(图1A)为起始物质,在碱性条件下利用硫酸二甲酯进行

甲基化反应得到1,5-二甲氧基萘(图1B), 利用N-溴代丁二酰亚胺在1,5-二甲氧基萘的4,8位进行溴化反应, 获得4,8-二溴-1,5-二甲氧基萘(图1C), 然后利用甲醇钠和碘化钾在二甲基甲酰胺和甲醇混合物中加热回流30 h, 获得1,4,5,8-四甲氧基萘(图1D)。得到的1,4,5,8-四甲氧基萘再通过硝酸铈铵、乙腈和氯仿混合液的氧化作用, 获得最为主要的中间体5,8-二甲氧基-1,4-萘醌(DMNQ)(图1E)。最后以DMNQ为底物, 利用典型的迈克尔加成反应得到6种DMNQ衍生物(#1~#6)。

1.4 细胞培养

RAW264.7细胞培养于DMEM培养基中, 内含10%灭活的新生胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)及100 U/mL青霉素/链霉素(P/S), 置于37 °C、5% CO₂及饱和湿度的培养箱中培养。

1.5 MTT检测细胞死亡率

取对数生长期的RAW264.7细胞, 以 2.5×10^4 /mL接种于96孔细胞培养板中, 培养6 h后, 加入不同浓度的#6化合物(0, 15, 30, 50 μ mol/L), 处理24 h。每孔加入10 μ L的MTT(5 mg/mL), 继续培养4 h。弃去培养液后每孔加入150 μ L DMSO溶液, 吹打混匀, 用酶标仪于450 nm波长处测吸光度值。每组实验均重复3次。

1.6 吞噬作用(phagocytosis)和活性氧(ROS)的检测

我们用流式细胞仪分析了RAW264.7细胞吞噬作用和细胞内ROS水平。(1)细胞吞噬作用检测: RAW264.7巨噬细胞用LPS或LPS和#6化合物共同处理24 h后收集细胞, 加入超声波破碎的Alexa488-FITC 10 μ mol/L, 在37 °C条件下孵育15 min。用PBS反复冲洗3次之后, 随即用流式细胞仪分析10 000个细胞的吞噬能力。(2)细胞内ROS水平检测: 收集上述处理细胞, 重悬于PBS中, 加入10 mmol/L的CM-H2DCFDA(Invitrogen公司), 在37 °C细胞培养箱中孵化10 min, 利用流式细胞仪从10 000个细胞中进行分析。每组实验均重复3次。

1.7 蛋白质印迹法分析

将处理后的细胞回收, 加入蛋白质裂解液裂解, 充分混匀, 在12 000 r/min、4 °C条件下离心30 min, 回收上清(即蛋白质)。25 μ g总蛋白在12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶上进行凝胶电泳, 并转移到硝酸纤维素膜(美国Millipore公司), 封闭, 用抗iNOS、ERK、P-ERK、P38、P-P38、JNK、

P-JNK和 α -tubulin一抗(1:2 000), 在4 °C下孵育过夜。弃去一抗, 用TBST(含15 mmol/L NaCl、0.2% Tween-20和10 mmol/L Tris-HCl)洗涤5次, 每次5 min, 与HRP标记的鼠或兔二抗(1:5 000)孵育2 h, 洗膜、ECL底物作用、成像及结果分析。每组实验均重复3次。

1.8 统计学分析

采用SPSS 13.0软件进行统计分析。多组均值比较采用 t 检验进行分析, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 萘醌类衍生物的鉴定

为了验证获得的6种DMNQ衍生物的准确性, 我们先后对6种化合物进行了NMR和Mass鉴定, TMS为内标; 质谱由PE SCIX API 2000 MS/MS质谱分析仪测定。数据如下:

#1: 2-Vinylamino-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone: Yield: 55.2%, ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.34 (d, $J=9.6$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J=9.6$ Hz, 1H), 5.91~5.82 (m, 2H), 5.62 (s, 1H), 5.30~5.22 (m, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), m/z 273.9 (M+H)⁺;

#2: 2-i-Propylamino-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone: Yield: 46.5%, ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.34 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 5.72 (BR, 1H), 5.61 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.57~3.52 (m, 1H), 1.25 (d, $J=6.4$ Hz, 3H), 1.22 (d, $J=6.4$ Hz, 3H), m/z 276.2 (M+H)⁺;

#3: 2-Cylopropylamino-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone: Yield: 44.5%, ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.34 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 5.72 (BR, 1H), 5.61 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 2.44~2.43 (m, 1H), 0.57~0.62 (m, 2H), 0.82~0.87 (m, 2H), m/z 274.8 (M+H)⁺;

#4: 2-i-Butylamino-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone: Yield: 40.5%, ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.34 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 5.72 (BR, 1H), 5.61 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 2.61 (d, $J=6.4$ Hz, 2H), 1.64~1.67 (m, 2H), 0.92 (d, $J=6.4$ Hz, 3H), 0.89 (d, $J=6.4$ Hz, 3H), m/z 290.3 (M+H)⁺;

#5: 2-(1-Methylpropylamino)-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone: Yield: 43.3%, ¹H-NMR (CDCl₃, 400

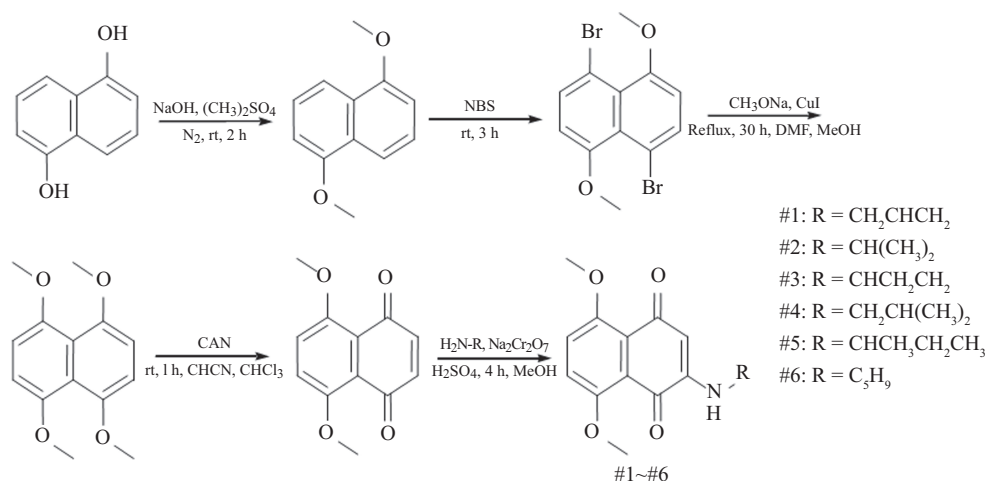


图1 萘醌类衍生物的合成路线

Fig.1 Schemes for naphthoquinone derivatives synthesis

表1 6种化合物的名称

Table 1 The chemical name for six compounds

残基 R	编号 No.	名称 Name
Propene	#1	2-Vinylamino-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone
<i>i</i> -propyl	#2	2- <i>i</i> -Propylamino-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone
Cyclopropyl	#3	2-Cyclopropylamino-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone
<i>i</i> -Butyl-	#4	2- <i>i</i> -Butylamino-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone
1-methylpropyl-	#5	2-(1-Methylpropylamino)-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone
Cyclopentyl-	#6	2-Cyclopentylamino-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone

MHz): δ 7.34 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 5.72 (BR, 1H), 5.61 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.34~3.40 (m 1H), 1.56~1.62 (m, 2H), 1.21 (d, $J=6.4$ Hz, 3H), 0.93~0.96 (m, 2H), m/z 290.3 (M+H)⁺;

#6: 2-Cyclopentylamino-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone: Yield: 46.1%, ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.34 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 5.72 (BR, 1H), 5.61 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.35~3.39 (m 1H), 1.55~1.63 (m, 4H), 0.91~0.96 (m, 2H), 1.21~1.27 (m, 2H), m/z 290.3 (M+H)⁺.

以上分析数据显示, 通过迈克尔加成反应获得的6种化合物均属于萘醌类衍生物, 并且其化学结构和分子量符合预先的合成设计, 保证了化合物的准确性。#1~#6化合物结构与名称如表1所示。

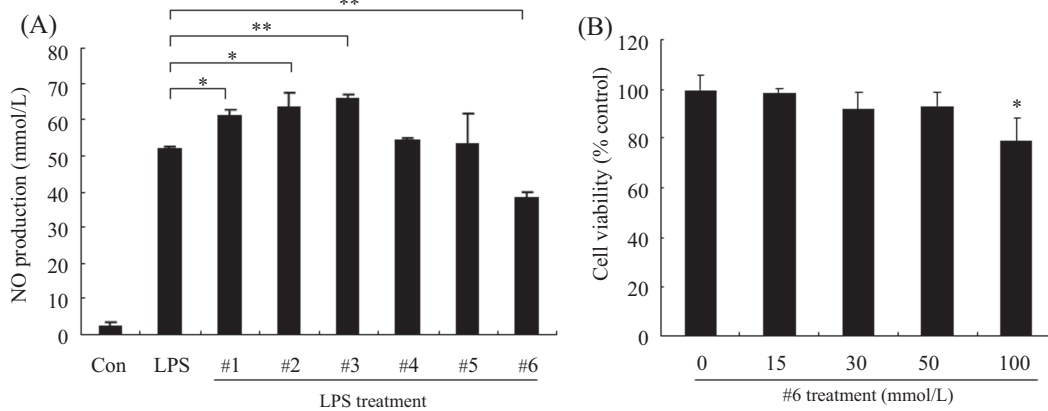
2.2 2-环戊氨基-5,8-二甲氧基-1,4-萘醌(#6)对LPS诱导RAW264.7细胞NO分泌的抑制作用

为了检测DMNQ衍生物对LPS诱导RAW264.7细胞分泌NO的抑制效果, 以30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的6种萘醌类化合物(#1、#2、#3、#4、#5、#6)预处理

RAW264.7细胞30 min后, 加入LPS(1 $\mu\text{g/mL}$)处理24 h, 用Griess试剂对细胞培养液中NO的含量进行检测(图2A)。结果显示, #6化合物具有显著地抑制LPS诱导RAW264.7细胞分泌NO的作用, #1、#2、#3化合物反而促进了NO的分泌, #4、#5化合物没有明显抑制效果。我们之后对#6化合物的细胞毒性进行了检测。RAW264.7细胞单独用不同浓度的#6化合物(0, 15, 30, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$)处理24 h(图2B), 用MTT方法检测#6化合物对细胞的毒性作用。结果显示, 在15, 30, 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下#6化合物并没有对RAW264.7细胞产生毒性作用, 而当处理浓度达到100 $\mu\text{mol/L}$ 时, #6化合物对RAW264.7细胞产生了一定的毒副作用。结果证明, 在合成的一系列DMNQ衍生物之中, #6化合物能够有效地抑制由LPS诱导RAW264.7细胞的NO分泌, 并且在0~50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内并不影响细胞的活力。

2.3 #6化合物抑制LPS诱导的巨噬细胞NO分泌表现为浓度和时间依赖性

用不同浓度的#6化合物(0, 15, 30, 50 $\mu\text{mol/L}$)

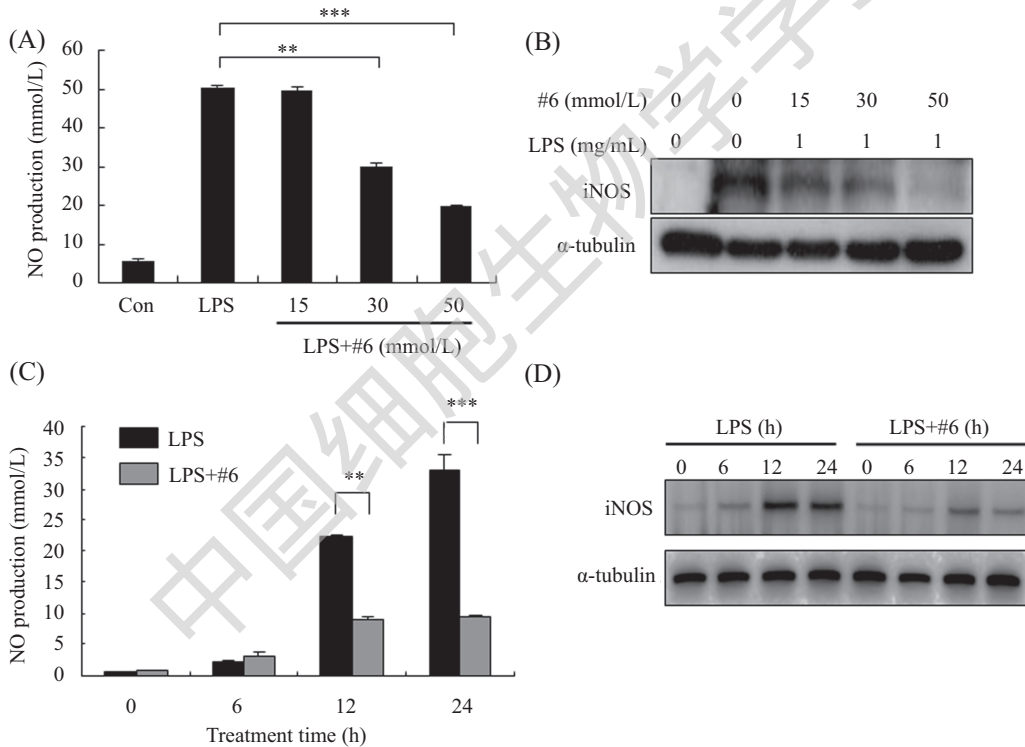


A: RAW264.7细胞NO的分泌检测。* P <0.05, ** P <0.01; B: RAW264.7细胞的活力检测。* P <0.05, 与未处理组(0 mmol/L)比较。

A: determination of NO production on RAW264.7 cells. * P <0.05, ** P <0.01; B: determination of cell viability by MTT assay. * P <0.05 compared with control (0 mmol/L) group.

图2 DMNQ衍生物对LPS诱导的RAW264.7细胞NO分泌与细胞活力的影响

Fig.2 Effect of DMNQ derivatives on LPS induced RAW264.7 cell NO production and cell viability



A、C: 检测RAW264.7细胞NO的分泌。** P <0.01, *** P <0.001; B、D: 检测RAW264.7细胞内iNOS蛋白质的表达。

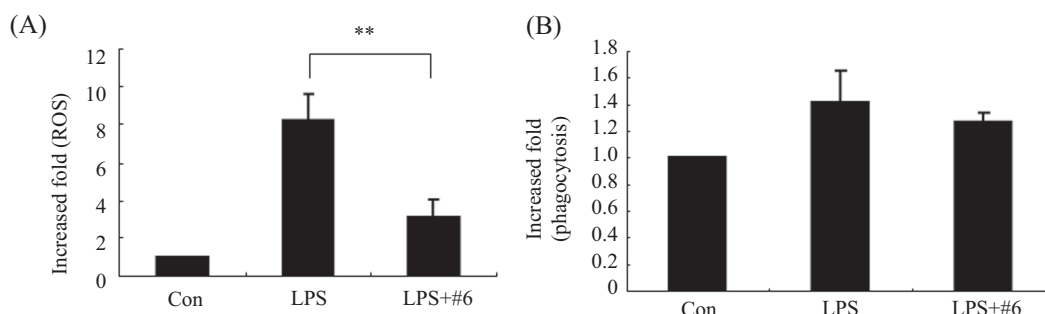
A,C: determination of NO production in RAW264.7 cells. ** P <0.01, *** P <0.001; B,D: expression of iNOS protein levels in RAW264.7 cells.

图3 #6化合物浓度、时间依赖性抑制LPS诱导的RAW264.7细胞的NO产生及iNOS蛋白的表达

Fig.3 #6 compound dose- and time-dependently inhibited the LPS induced RAW264.7 cell NO production and iNOS protein expression

预处理RAW264.7细胞30 min, 加入LPS处理24 h, 并检测细胞培养液中NO的含量和细胞内iNOS蛋白的表达量。如图3A和图3B所示, 随着#6化合物浓度的增加, LPS诱导的RAW264.7细胞NO的分泌也随之下降, 同时细胞内iNOS蛋白的表达也伴随着#6化合物浓度的增高而明显下降。之后, RAW264.7细

胞用#6化合物(50 μ mol/L)和LPS处理不同时间段(0, 6, 12, 24 h), 检测培养液中NO的含量及细胞内iNOS蛋白的表达。结果显示, #6化合物抑制LPS诱导的RAW264.7细胞NO的产生呈现时间依赖性, 同时抑制iNOS蛋白质的表达(图3C和图3D)。由此可见, #6化合物抑制LPS诱导RAW264.7细胞NO的分泌具有

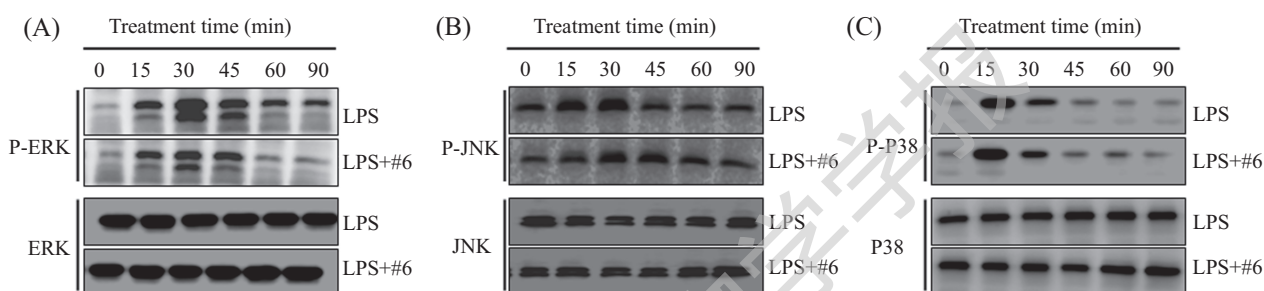


A: RAW264.7细胞内产生ROS的水平; B: RAW264.7细胞吞噬作用检测。** $P < 0.01$ 。

A: determination of cellular ROS levels in RAW264.7 cells; B: determination of phagocytosis in RAW264.7 cells. ** $P < 0.01$.

图4 #6化合物对LPS诱导的RAW264.7细胞ROS与吞噬作用的影响

Fig.4 Effect of #6 compound on LPS induced RAW264.7 cell ROS levels and phagocytosis



A: RAW264.7细胞内ERK信号通路的变化; B: JNK信号通路的变化; C: P38信号通路的变化。

A: determination of ERK signaling pathway in RAW264.7 cells; B: determination of JNK signaling pathway; C: determination of P38 signaling pathway.

图5 #6化合物对LPS诱导的RAW264.7细胞MAPKs信号通路的影响

Fig.5 Effect of #6 compound on LPS induced RAW264.7 cell MAPKs signaling pathway

浓度和时间依赖性, 并且这种抑制作用是通过抑制细胞内iNOS蛋白质的表达来完成的。

2.4 #6化合物对RAW264.7细胞内ROS水平和吞噬作用的影响

ROS已被证明是LPS诱导巨噬细胞中的重要信号因子, 在炎症反应中, 激活的巨噬细胞会产生大量的ROS, 激活各种信号通路诱导巨噬细胞的过度活化^[19-20]。为了检测#6化合物对LPS诱导的RAW264.7细胞内ROS水平的影响, 用#6化合物预处理RAW264.7细胞30 min, 再处理LPS 24 h, 处理过的细胞用CM-H₂DCFDA标记细胞内的ROS, 通过流式细胞仪检测细胞内ROS水平的变化(图4A), 再将获得的峰值利用winMDI 9.0软件进行定量分析。结果显示, #6化合物显著抑制了LPS诱导的RAW264.7细胞内ROS水平的升高(图4B)。吞噬作用是巨噬细胞防卫机体和清除废物的重要功能, 因此, 我们对#6化合物是否影响巨噬细胞吞噬作用进行了检测。结果显示, 与明显抑制细胞内ROS水平的实验结果相反, #6化合物的处理并没有影响LPS诱导的RAW264.7细胞的吞噬作用(图4B)。以上结果证明, #6化合物

具有一定的清除细胞内活性氧的作用, 而不影响细胞的吞噬能力。

2.5 #6化合物对RAW264.7细胞MAPKs信号通路的影响

巨噬细胞的NO分泌受到ROS依赖性的MAPKs(mitogen-activated protein kinases)信号通路的调控^[21-23]。为了检验#6化合物对LPS诱导的RAW264.7细胞MAPKs信号通路的影响, 用#6化合物和LPS处理RAW264.7细胞不同时间段(0, 15, 30, 45, 60, 90 min), 检测MAPKs信号通路相关蛋白磷酸化的程度。结果显示, #6化合物有效抑制了LPS诱导的RAW264.7细胞ERK和JNK的磷酸化水平, 而对P38并没有影响(图5)。结果说明, #6化合物抑制LPS诱导的RAW264.7细胞NO的分泌是通过抑制细胞内ERK和JNK信号通路来完成的。

3 讨论

巨噬细胞是先天性免疫细胞, 参与炎症反应的初始阶段, 同时调控多种细胞免疫应答^[24]。NO是细胞内一种重要的信号分子和促炎症介质, 在自身免

疫疾病发生过程中, 浸润到薄壁组织的巨噬细胞分泌的NO与超氧分子反应形成高活性的过氧硝酸盐, 引起细胞及组织的损伤^[25-27]。因此, 有效地抑制NO的过量分泌是控制炎症反应的重要措施之一。我们的研究结果显示, 6种萘醌类衍生物中, #6化合物具有明显抑制LPS诱导的RAW264.7细胞NO分泌和iNOS蛋白表达的作用(图2和图3), 说明我们所获得的新化合物与其他萘醌类化合物一样, 具有一定的抗炎效果。

#6化合物对LPS诱导的RAW264.7细胞内活性氧水平的抑制效果(图4B)显示, 合成的新萘醌类化合物不仅对LPS诱导的RAW264.7细胞NO分泌有抑制效果, 同时也可作为ROS的清除剂, 这一发现与以往的萘醌类药物的抗炎效果有所不同。对#6化合物清除ROS作用的发现为进一步了解其作用机理提供了坚实的理论依据。另外, 实验数据表明, #6化合物对LPS处理的RAW264.7巨噬细胞的吞噬能力并没有影响(图4A), 由此可见, #6化合物的抗炎效果具有一定的针对性, 具有高效、低细胞毒性等特点。ROS是细胞内主要的化学活性分子, 过量的ROS具有细胞毒性^[28], 可引起DNA损害、增强脂质过氧化、破坏氨基酸氧化反应及引起细胞凋亡等^[29-30]。因此, 清除细胞内的活性氧是保护细胞重要措施之一。在已有的报道中, 紫草素衍生物具有明显的抗炎作用^[17,31-33], 但是对ROS清除作用并没有得到证实。而在本研究中, #6化合物具有明显的抑制NO分泌的作用, 还可以有效降低细胞内ROS的水平, 同时不影响细胞的吞噬能力。因此我们认为, 新合成的2-环戊氨基-5,8-二甲氧基-1,4-萘醌可以作为有效的巨噬细胞活性氧清除剂和炎症抑制剂的候选药物, 在日后的研究中可以被广泛地使用。

MAPKs是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族, 在各种炎症因子的表达和分泌过程中起着重要的调控作用, 特别是在TLR4诱导的免疫细胞的激活过程中, 能够ROS依赖性地发生磷酸化^[34-37]。ROS通过激活MAPKs信号通路引起多种细胞的生理变化, 如谷胱甘肽可通过激活ROS依赖性的ERK信号通路, 诱导神经小胶质细胞的凋亡^[38], 同时引起氧化应激激活MAPKs和caspase-1信号通路^[39], 可诱导人体恶性睾丸细胞MEK1/2和ERK1/2的磷酸化, 调控P53诱导的细胞凋亡^[40]。有报道称, 紫草素衍生物通过抑制MAPK/NF- κ B信号通路降低LPS诱导的RAW264.7

细胞NO的分泌^[17], 这与我们研究中发现的#6化合物通过降低细胞内的ROS水平, 进而选择性地抑制ERK和JNK的磷酸化, 最终抑制NO的分泌结果是一致的。

综上所述, 新合成的2-环戊氨基-5,8-二甲氧基-1,4-萘醌(#6)能够有效地抑制LPS诱导巨噬细胞NO的分泌及iNOS蛋白质的表达和细胞内ROS水平的上升, 而不影响细胞的吞噬能力, 同时选择性地抑制ERK、JNK信号通路, 在有效作用浓度下并没有明显的细胞毒性作用。这一发现为进一步了解和研究萘醌类药物对巨噬细胞诱导的炎症反应提供了理论依据, 为萘醌类药物的有机合成提供了新的思路。

参考文献 (References)

- 1 Kolb H, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide in autoimmune disease: Cytotoxic or regulatory mediator? *Immunol Today* 1998; 19(12): 556-61.
- 2 Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology* 2007; 15(6): 252-9.
- 3 Pfeilschifter J, Eberhardt W, Beck KF. Regulation of gene expression by nitric oxide. *Pflugers Arch* 2001; 442(4): 479-86.
- 4 卢秀红, 邓祝新, 黄维义, 张为宇. 一氧化氮在免疫效应机制中的作用及其细胞因子的调控. *河南畜牧兽医(综合版)(Lu Xiuhong, Deng Zhuxin, Huang Weiyi, Zhang Weiyu. Regulatory function of NO in immunoregulatory mechanism and cytokine production. Henan Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine)* 2009; 12(30): 10-2.
- 5 刘建国, 王宪, 陈明哲. 一氧化氮与细胞因子之间的相互调节作用. *生理科学进展(Liu Jianguo, Wang Xian, Chen Mingzhe. The interaction between NO and cytokines. Progress in Physiological Sciences)* 2000; 1(31): 61-4.
- 6 Moncada S, Plamer RM, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43(2): 109-42.
- 7 van Furth R, Cohn ZA. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 1968; 128(3): 415-35.
- 8 Pålsson-McDermott EM, O'Neill LA. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 2004; 113(2): 153-62.
- 9 周忠江, 叶海燕, 吴赛珠, 孟素荣. NO前体——左旋精氨酸相关肽对大鼠血小板聚集、血栓形成及血浆NO、cGMP、PGI-2的影响. *第一军医大学学报(Zhou Zhongjiang, Ye Haiyan, Wu Saizhu, Meng Surong. The effect of NO precursor-L-arginine associated peptide on rat platelet aggregation, thrombosis and plasma NO, cGMP, PGI-2 productions. Journal of First Military Medical University)* 1999; 6(19): 540-2.
- 10 Wang J, Mazza G. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN- γ -activated RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem* 2002; 50(4): 850-7.
- 11 Adeniyi BA, Fong HH, Pezzuto JM, Luyengi L, Odelola HA. Antibacterial activity of diospyrin, isidiospyrin and bisidiospyrin.

- spyrin from the root of *Diospyros piscatoria* (Gurke) (Ebenaceae). *Phytother Res* 2000; 14(2): 112-7.
- 12 Chakrabarty S, Roy M, Hazra B, Bhattacharya RK. Induction of apoptosis in human cancer cell lines by diospyrin, a plant-derived bisnaphthoquinonoid, and its synthetic derivatives. *Cancer Lett* 2002; 188(1/2): 85-93.
- 13 de Rezende LC, Fumagalli F, Bortolin MS, de Oliveira MG, de Paula MH, de Andrade-Neto VF, *et al.* *In vivo* antimalarial activity of novel 2-hydroxy-3-anilino-1,4-naphthoquinones obtained by epoxide ring-opening reaction. *Bioorg Med Chem Lett* 2013; 23(16): 4583-6.
- 14 Hernández-Pérez M, Rabanal RM, de la Torre MC, Rodríguez B. Analgesic, anti-inflammatory, antipyretic and haematological effects of aethiopinone, an o-naphthoquinone diterpenoid from *Salvia aethiopsis* roots and two hemisynthetic derivatives. *Planta Med* 1995; 61(6): 505-9.
- 15 Checker R, Sharma D, Sandur SK, Khanam S, Poduval TB. Anti-inflammatory effects of plumbagin are mediated by inhibition of NF-kappaB activation in lymphocytes. *Int Immunopharmacol* 2009; 9(7/8): 949-58.
- 16 Subbaramaiah K, Bulic P, Lin Y, Dannenberg AJ, Pasco DS. Development and use of a gene promoter-based screen to identify novel inhibitors of cyclooxygenase-2 transcription. *J Biomol Screen* 2001; 6(2): 101-10.
- 17 Cheng YW, Chang CY, Lin KL, Hu CM, Lin CH, Kang JJ. Shikonin derivatives inhibited LPS-induced NOS in RAW 264.7 cells via downregulation of MAPK/NF-kappaB signaling. *J Ethnopharmacol* 2008; 120(2): 264-71.
- 18 Han AR, Min HY, Nam JW, Lee NY, Wiryawan A, Suprpto W, *et al.* Identification of a new naphthalene and its derivatives from the bulb of *eleutherine americana* with inhibitory activity on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2008; 56(9): 1314-6.
- 19 Pan JS, Hong MZ, Ren JL. Reactive oxygen species: A double-edged sword in oncogenesis. *World J Gastroenterol* 2009; 15(14): 1702-7.
- 20 Aruoma OI, Grootveld M, Bahorun T. Free radicals in biology and medicine: From inflammation to biotechnology. *Biofactors* 2006; 27(1/2/3/4): 1-3.
- 21 Torres M. Mitogen-activated protein kinase pathways in redox signaling. *Front Biosci* 2003; 8: d369-91.
- 22 Torres M, Forman HJ. Redox signaling and the MAP kinase pathways. *Biofactors* 2003; 17(1/2/3/4): 287-96.
- 23 Pawate S, Shen Q, Fan F, Bhat NR. Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferon gamma. *J Neurosci Res* 2004; 77(4): 540-51.
- 24 Laskin DL, Pendino KJ. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35: 655-77.
- 25 Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; 6(12): 3051-64.
- 26 Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411(2/3): 217-30.
- 27 Butler AR, Flitney FW, Williams DL. NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: A chemist's perspective. *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16(1): 18-22.
- 28 Brooker, Robert J. *Genetics: Analysis and principles* (4th ed). McGraw-Hill Science, 2011.
- 29 Sekhon B, Sekhon C, Khan M, Patel SJ, Singh I, Singh AK. N-Acetyl cysteine protects against injury in a rat model of focal cerebral ischemia. *Brain Res* 2003; 971(1): 1-8.
- 30 Patten DA, Germain M, Kelly MA, Slack RS. Reactive oxygen species: Stuck in the middle of neurodegeneration. *J Alzheimers Dis* 2010; 20(suppl 2): S357-67.
- 31 Andújar I, Recio MC, Bacelli T, Giner RM, Ríos JL. Shikonin reduces oedema induced by phorbol ester by interfering with IkappaBalpha degradation thus inhibiting translocation of NF-kappaB to the nucleus. *Br J Pharmacol* 2010; 160(2): 376-88.
- 32 Yang Y, Wang J, Yang Q, Wu S, Yang Z, Zhu H, *et al.* Shikonin inhibits the lipopolysaccharide-induced release of HMGB1 in RAW264.7 cells via IFN and NF-kB signaling pathways. *Int Immunopharmacol* 2014; 19(1): 81-7.
- 33 Yoshida LS, Kawada T, Irie K, Yuda Y, Himi T, Ikemoto F. Shikonin directly inhibits nitric oxide synthases: Possible targets that affect thoracic aorta relaxation response and nitric oxide release from RAW 264.7 macrophages. *J Pharmacol Sci* 2010; 112(3): 343-51.
- 34 Cao W, Bao C, Padalko E, Lowenstein CJ. Acetylation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 inhibits Toll-like receptor signaling. *J Exp Med* 2008; 205(6): 1491-503.
- 35 Cheng YW, Chang CY, Lin KL, Hu CM, Lin CH, Kang JJ. Shikonin derivatives inhibited LPS-induced NOS in RAW 264.7 cells via downregulation of MAPK/NF-kappaB signaling. *J Ethnopharmacol* 2008; 120: 264-71.
- 36 Xie C, Kang J, Ferguson ME, Nagarajan S, Badger TM, Wu X. Blueberries reduce pro-inflammatory cytokine TNF-alpha and IL-6 production in mouse macrophages by inhibiting NF-kappaB activation and the MAPK pathway. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55: 1587-91.
- 37 Chu X, Ci X, He J, Wei M, Yang X, Cao Q, *et al.* A novel anti-inflammatory role for ginkgolide B in asthma via inhibition of the ERK/MAPK signaling pathway. *Molecules* 2011; 16: 7634-48.
- 38 Chakrabarty S, Roy M, Hazra B, Bhattacharya RK. Induction of apoptosis in human cancer cell lines by diospyrin, a plant-derived bisnaphthoquinonoid, and its synthetic derivatives. *Cancer Lett* 2002; 188(1/2): 85-93.
- 39 Kong AN, Yu R, Lei W, Mandlekar S, Tan TH, Ucker DS. Differential activation of MAPK and ICE/Ced-3 protease in chemical-induced apoptosis. The role of oxidative stress in the regulation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) leading to gene expression and survival or activation of caspases leading to apoptosis. *Restor Neurol Neurosci* 1998; 12(2/3): 63-70.
- 40 Singh S, Upadhyay AK, Ajay AK, Bhat MK. p53 regulates ERK activation in carboplatin induced apoptosis in cervical carcinoma: A novel target of p53 in apoptosis. *FEBS Lett* 2007; 581(2): 289-95.