

安徽医科大学学报  
*Acta Universitatis Medicinalis Anhui*  
ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

## 《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目: Kobophenol A 通过 Prdx6 抑制 LPS 诱导的巨噬细胞 M1 型极化  
作者: 陈天宇, 王浩, 王金虹, 赵英杰, 周仁鹏, 胡伟, 鲁超  
网络首发日期: 2025-07-07  
引用格式: 陈天宇, 王浩, 王金虹, 赵英杰, 周仁鹏, 胡伟, 鲁超. Kobophenol A 通过 Prdx6 抑制 LPS 诱导的巨噬细胞 M1 型极化[J/OL]. 安徽医科大学学报. <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250707.1347.004>



**网络首发:** 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认:** 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

## Kobophenol A 通过 Prdx6 抑制 LPS 诱导的巨噬细胞 M1 型极化

陈天宇<sup>1,2</sup>, 王浩<sup>1,2</sup>, 王金虹<sup>1,2</sup>, 赵英杰<sup>1,2</sup>, 周仁鹏<sup>1,2</sup>, 胡伟<sup>1,2</sup>, 鲁超<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>安徽医科大学药学科学学院, 合肥 230032; <sup>2</sup>安徽医科大学第二附属医院药物临床试验研究中心, 合肥 230601; <sup>3</sup>安徽理工大学第一附属医院临床试验研究中心, 淮南 232007)

**摘要 目的** 探究 Kobophenol A (KPA) 对脂多糖 (LPS) 诱导的巨噬细胞 M1 型极化的作用及机制, 以为炎症免疫性疾病的治疗和新药研发提供理论依据。**方法** 使用 LPS 诱导建立 RAW264.7 巨噬细胞 M1 型极化模型, 并使用 Prdx6 的抑制剂 MJ33 和 Prdx6-siRNA 构建 Prdx6 沉默模型。采用不同浓度的 KPA 处理小鼠巨噬细胞系 RAW264.7, CCK-8 法检测细胞活力。Western blot 和免疫荧光染色法检测巨噬细胞过氧化物还原酶 6 (Prdx6) 和巨噬细胞 M1 型极化相关蛋白诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、环氧合酶-2 (COX-2) 的表达水平。RT-qPCR 检测巨噬细胞 Prdx6 和巨噬细胞 M1 型极化相关基因 iNOS、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的表达水平。流式检测 M1 型巨噬细胞标志 CD86 分子 (CD86) 的表达情况。**结果** 与 LPS 诱导的巨噬细胞 M1 型极化模型相比, KPA 可以显著恢复 RAW264.7 巨噬细胞 M1 型极化形态学变化, 降低巨噬细胞 M1 型极化相关蛋白 iNOS、COX-2、CD86 和相关基因 iNOS、IL-6、TNF- $\alpha$  的表达 (均  $P < 0.05$ )。此外, LPS 显著下调 RAW264.7 巨噬细胞中 Prdx6 的表达, 而加入 KPA 可以上调 Prdx6 的表达, 并且 Prdx6 的抑制剂 MJ33 处理能够显著上调 RAW264.7 巨噬细胞 M1 型极化标志蛋白 iNOS 的表达, 而 KPA 处理可以显著下调 iNOS 的表达 (均  $P < 0.05$ )。**结论** KPA 通过上调 Prdx6 的表达抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 M1 型极化。

**关键词** Kobophenol A; RAW264.7 巨噬细胞; LPS; M1 型极化; Prdx6; MJ33

中图分类号 R 966

文献标志码 A 文章编号 1000-1492

### Kobophenol A inhibits LPS-induced macrophage M1 polarization via Prdx6

Chen Tianyu<sup>1,2</sup>, Wang Hao<sup>1,2</sup>, Wang Jinhong<sup>1,2</sup>, Zhao Yingjie<sup>1,2</sup>, Zhou Renpeng<sup>1,2</sup>, Hu Wei<sup>1,2</sup>, Lu Chao<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>School of Pharmaceutical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032; <sup>2</sup>Drug Clinical

基金项目: 安徽省自然科学基金项目 (编号: 2208085MH215)

作者简介: 陈天宇, 男, 硕士研究生;

鲁超, 男, 研究员, 博士生导师, 通信作者, E-mail: chaolu@aust.edu.cn

Trial Research Center, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601 ;<sup>3</sup> Clinical Trial Research Center, The First Affiliated Hospital, Anhui University of Science & Technology, Huainan 232007)

**Abstract Objective** To explore the effects and mechanisms of Kobophenol A (KPA) on lipopolysaccharide (LPS)-induced M1 macrophage polarization, and to provide a theoretical basis for the treatment of inflammatory immune diseases and the development of new drugs. **Methods** The M1 macrophage polarization model of RAW264.7 was established by LPS induction, and the Prdx6 knockdown model was constructed using the Prdx6 inhibitor MJ33 and Prdx6-siRNA. RAW264.7 cells, a mouse macrophage cell line, were treated with various concentrations of KPA. Cell viability was assessed using the CCK-8 assay. The expression levels of peroxiredoxin 6 (Prdx6) and M1 macrophage polarization-related proteins, including inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2), were detected by Western blot and immunofluorescence staining. The expression levels of *Prdx6* and M1 macrophage polarization-related genes *iNOS*, interleukin-6 (*IL-6*), and tumor necrosis factor  $\alpha$  (*TNF- $\alpha$* ), were measured by RT-qPCR. Flow cytometry was employed to detect the expression of CD86, a marker of M1 macrophages. **Results** Compared with the LPS-induced M1 macrophage polarization model, KPA significantly reversed the morphological changes of M1 macrophage polarization in RAW264.7 macrophages and decreased the expression of M1 macrophage polarization-related proteins iNOS, COX-2, CD86 and related genes *iNOS*, *IL-6*, *TNF- $\alpha$*  (all  $P < 0.05$ ). In addition, LPS significantly downregulated the expression of Prdx6 in RAW264.7 macrophages, while KPA upregulated the expression of Prdx6. Moreover, treatment with the Prdx6 inhibitor MJ33 significantly upregulated the expression of iNOS, a marker of M1 macrophage polarization, in RAW264.7 macrophages, whereas treatment with KPA significantly downregulated the expression of iNOS (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** KPA inhibits LPS-induced M1 polarization of RAW264.7 macrophages by upregulating the expression of Prdx6.

**Key words** Kobophenol A; RAW264.7 macrophages; LPS; M1 polarization; Prdx6; MJ33

**Fund program** Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 2208085MH215)

**Corresponding author** Lu Chao, E-mail: chaolu@aust.edu.cn

巨噬细胞是具有高度可塑性和功能多样性的先天免疫细胞<sup>[1]</sup>。巨噬细胞向 M1 型极化过

程中，分泌促炎细胞因子促进炎症的发生发展，巨噬细胞 M1/M2 极化比例失衡是多种炎症免疫性疾病发生和发展的始动因素<sup>[2-3]</sup>。近期研究<sup>[4-6]</sup>表明，细胞内氧化应激异常活化，促炎细胞因子分泌增加和活性氧（reactive oxygen species, ROS）是巨噬细胞极化至 M1 表型的重要因素。过氧化物还原酶 6（peroxiredoxin6, Prdx6）是过氧化物还原酶家族中的成员之一，具有维持细胞内氧化还原稳态和清除 ROS 的能力<sup>[7]</sup>。研究<sup>[8]</sup>表明，Prdx6 可抑制脂多糖（lipopolysaccharide, LPS）诱导的巨噬细胞中促炎细胞因子分泌，使抗炎细胞因子分泌增加，并减少 ROS 的产生和抑制 iNOS 在 RAW264.7 细胞中的过表达。然而 Prdx6 是否能抑制巨噬细胞 M1 型极化尚不完全清楚。

蒿草酚 A（Kobophenol A, KPA）是金雀根乙酸乙酯提取物中的一种低聚二苯乙烯的天然化合物，其结构如图（图 1A）<sup>[9]</sup>。具有抗氧化、抗菌活性、抗氧化应激等功能<sup>[10]</sup>。此外，研究<sup>[11]</sup>显示 KPA 通过阻断 J774 A.1 细胞中核因子  $\kappa$ B（nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B）的核易位抑制促炎细胞因子的释放。但是 KPA 是否通过 Prdx6 调控 RAW264.7 巨噬细胞 M1 型极化尚无报道。该文拟探究 KPA 对巨噬细胞 M1 型极化的作用及可能的机制，为炎症性疾病的防治和新药研发提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞株** 小鼠巨噬细胞系 RAW264.7（武汉普诺赛生命科技有限公司，货号：CL-0190）。

**1.1.2 药物和主要试剂** KPA（上海源叶生物科技有限公司，货号：B50420，纯度 $\geq$ 95%）；DMEM 培养基（美国 Hyclone 公司，货号：SH30022.01）；脂多糖（德国 Merck 公司，货号：L2880）；MJ33（美国 MedChemExpress 公司，货号：HY-115062）；DEPC 水（合肥白鲨公司，货号：BL510A）；Anti-Prdx6（英国 Abcam 公司，货号：ab73350）；Anti-iNOS、Anti-COX-2（武汉 Proteintech 公司，货号：18985-1-AP、12375-1-AP）；Anti-CD86（美国 Biologend 公司，货号：105008）；CCK-8 试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司，货号：C0038）；荧光羊抗兔 IgG（Alexa Flour488）、Western blot 羊抗兔 IgG、羊抗小鼠 IgG（北京中杉金桥生物技术有限公司，货号：ZF-0512、ZB-2301、ZB-2305）。

**1.1.3 主要仪器** CO<sub>2</sub> 培养箱、流式细胞仪、酶标仪（美国 Thermo Fisher 公司，型号：371Steri-Cy-cle、A00-1-1102、800TS）；荧光倒置显微镜（德国 ZEISS 公司，型号 AxioVert.A1）；电泳仪（上海天能电子有限公司，型号：EPS 600）；低温离心机（德国 Eppendorf 公司，型号：5425R）；超低温冰箱（青岛海尔股份有限公司，型号：DW-86L626）。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞分组及药物处理** 实验 1: 探究 KPA 对巨噬细胞 M1 型极化的影响。分组和处理如下: Control 组、LPS 组 (1 mg/L LPS)、KPA 组 (27  $\mu$ mol/L KPA) 和 LPS+KPA 组 (1 mg/L LPS+27  $\mu$ mol/L KPA)。实验 2: 探究 Prdx6 的抑制剂 MJ33 对巨噬细胞 M1 型极化的影响。分组和处理如下: Control 组、LPS 组 (1 mg/L LPS)、MJ33 组 (5  $\mu$ mol/L MJ33) 和 LPS+MJ33 组 (1 mg/L LPS+5  $\mu$ mol/L MJ33)。实验 3: 探究敲低 *Prdx6* 是否可以逆转 KPA 对巨噬细胞 M1 型极化的影响。分组和处理如下: Control 组、LPS 组 (1 mg/L LPS)、LPS+KPA+si-NC 组 (1 mg/L LPS+27  $\mu$ mol/L KPA) 和 LPS+KPA+si-Prdx6 组 (1 mg/L LPS+27  $\mu$ mol/L KPA)。各组添加的药物浓度均为配制浓度, LPS 母液浓度为 1 g/L, KPA 母液浓度为 10 mmol/L, 置于 4°C 冰箱避光保存。

**1.2.2 细胞培养** 采用 DMEM 培养基 (10% BI 血清和 1% 双抗) 并在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 环境下培养细胞, 并定时观察细胞状态及密度, 长满后按照 1:3 的比例进行吹打传代, 并用于后续研究。

**1.2.3 CCK-8 法检测细胞毒性** 将细胞接种到 96 孔板 (5 $\times$ 10<sup>4</sup> 个/孔) 中培养 24 h。首先用 1 mg/L LPS 诱导 M1 型极化体外模型。在模型建立的基础上加入不同浓度 (3.37、6.75、13.5、27、54  $\mu$ mol/L) KPA 进行处理 24 h 后, 弃掉培养基并用 PBS 洗涤 1 次, 将 CCK-8 溶液与空 DMEM 培养基按照 1:10 比例混匀, 每孔加入混合液 110  $\mu$ L, 在 37 °C 培养箱避光孵育 40 min 后检测 450 nm 处吸光度值, 并计算细胞活力值。

**1.2.4 Western blot 检测蛋白表达水平** 将细胞接种到 6 孔板 (2 $\times$ 10<sup>6</sup> 个细胞/孔) 中过夜, 按照实验 1 和实验 2 的分组情况处理细胞 24 h。细胞加入蛋白裂解液后置于冰上提取细胞蛋白, 并在 100 °C 条件下加热 10 min, 使蛋白变性并用于后续电泳。蛋白进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜后在脱脂牛奶中封闭 2 h, 在一抗 (iNOS 1:5 000, COX-2 1:1 000, Prdx6 1:1 000) 中 4 °C 条件下孵育过夜, 在室温下羊抗兔/小鼠 IgG 二抗 (1:5 000) 中孵育 1 h, 加显影液后曝光显影。蛋白条带用 ImageJ 软件分析。

**1.2.5 免疫荧光染色** 将细胞接种到 24 孔板 (2 $\times$ 10<sup>5</sup> 个细胞/孔) 中过夜, 按照实验 1 和实验 3 的分组情况处理细胞 24 h。弃培养基, 取出爬片置于载玻片上, PBS 洗涤 3 次, 多聚甲醛固定细胞 20 min, PBS 洗涤 3 次, 0.2% TritonX-100 通透细胞 10 min, PBS 洗涤 3 次, 1% BSA 室温封闭 1 h, 在湿盒中敷一抗 (1:500 稀释的兔抗 iNOS、1:200 稀释的兔抗 COX-2), 于 4 °C 冰箱孵育过夜, PBS 洗涤 3 次, 爬片用荧光羊抗兔 IgG (Alexa Fluor 488) 避光孵育 1 h, DAPI 染色 8 min, 抗荧光淬灭剂封片。用荧光倒置显微镜观察并采集图像。

**1.2.6 RT-qPCR 检测 mRNA 表达水平** 将细胞接种到 6 孔板 ( $2 \times 10^6$  个细胞/孔) 中过夜, 按照实验 1、实验 2 和实验 3 的分组情况处理细胞 24 h。细胞先用 PBS 洗涤 1 次, 加入 TRIzol 提取细胞总 RNA, 并检测 RNA 浓度, RNA 经过反转录得到 cDNA, 用于后续 PCR 反应。采用两步法扩增 cDNA,  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算 mRNA 的相对表达量。RT-qPCR 引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Tab.1 qRT-PCR primers sequences

Primer	Forward	Reverse
<i>iNOS</i>	5'-ggagtgcacggcaaacatgact-3'	5'-tcgatgcacaactgggtgaac-3'
<i>IL-6</i>	5'-cttcttgggactgatgctggtgac-3'	5'-tctgttgggagtggtatcctctgtg-3'
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	5'-cgctcttctgtctactgaactcgg-3'	5'-gtggtttgtgagtgtaggggtctg-3'
<i>Prdx6</i>	5'-ttgatgataagggcagggac-3'	5'-ctaccatcacgctctctccc-3'
<i>GAPDH</i>	5'-ggttctctctcgacttca-3'	5'-tgggccagggttcttactcc-3'

**1.2.7 流式细胞术检测 CD86 的表达** 将细胞接种到 6 孔板 ( $2 \times 10^6$  个细胞/孔) 中过夜, 按照实验 1 的分组情况处理细胞 24 h。细胞用 PBS 洗涤 1 次, 加入胰酶消化后收集, 在 4 °C、2 000 r/min、5 min 条件下离心, 并用 100  $\mu$ L PBS 重悬细胞。加入 0.26  $\mu$ g 荧光染料染色 30 min, PBS 洗涤 3 次, 上机检测, 使用 FlowJo 软件分析。以 CD86 阳性 (PE-A<sup>+</sup>) 标记百分率代表 M1 型极化的比例。

**1.2.8 统计学处理** 用 GraphPad Prism 9.0 分析数据并作图, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间差异的比较采用 *t* 检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 KPA 对 RAW264.7 巨噬细胞 M1 型极化细胞活性及形态学的影响** CCK-8 法分析结果显示, 用 KPA 处理 RAW264.7 巨噬细胞 24 h 后, KPA 的浓度在 27  $\mu$ mol/L 以下, 不影响细胞活性, 当 KPA 的浓度达到 54  $\mu$ mol/L 时, 细胞活性下降 (图 1B,  $t=6.27$ ,  $P < 0.01$ )。使用 1 mg/L 的 LPS 处理 RAW264.7 巨噬细胞 24 h 后, LPS 组细胞活性显著上升 ( $t=4.09$ ,  $P < 0.01$ ), 1 mg/L LPS 和 KPA (3.37、6.75、13.5、27、54  $\mu$ mol/L) 联合用药处理 RAW264.7 巨噬细胞 24 h 后, 当 KPA 的浓度达到 54  $\mu$ mol/L 时, 细胞活性受到抑制 (图 1C,  $t=4.32$ ,  $P < 0.01$ )。同时, 形态学结果显示, Control 组和 KPA 组细胞呈圆形, 小且明亮, LPS 组 RAW264.7 巨噬细胞形态变成梭形, 细胞显著增大, 出现伪足, 呈现 M1 型巨噬细胞典型形

态；LPS+KPA 组 RAW264.7 巨噬细胞呈现圆形而明亮的形态，并且伪足变短（图 1D）。因此，在本实验中将 KPA 的浓度确定为 27  $\mu\text{mol/L}$ 。

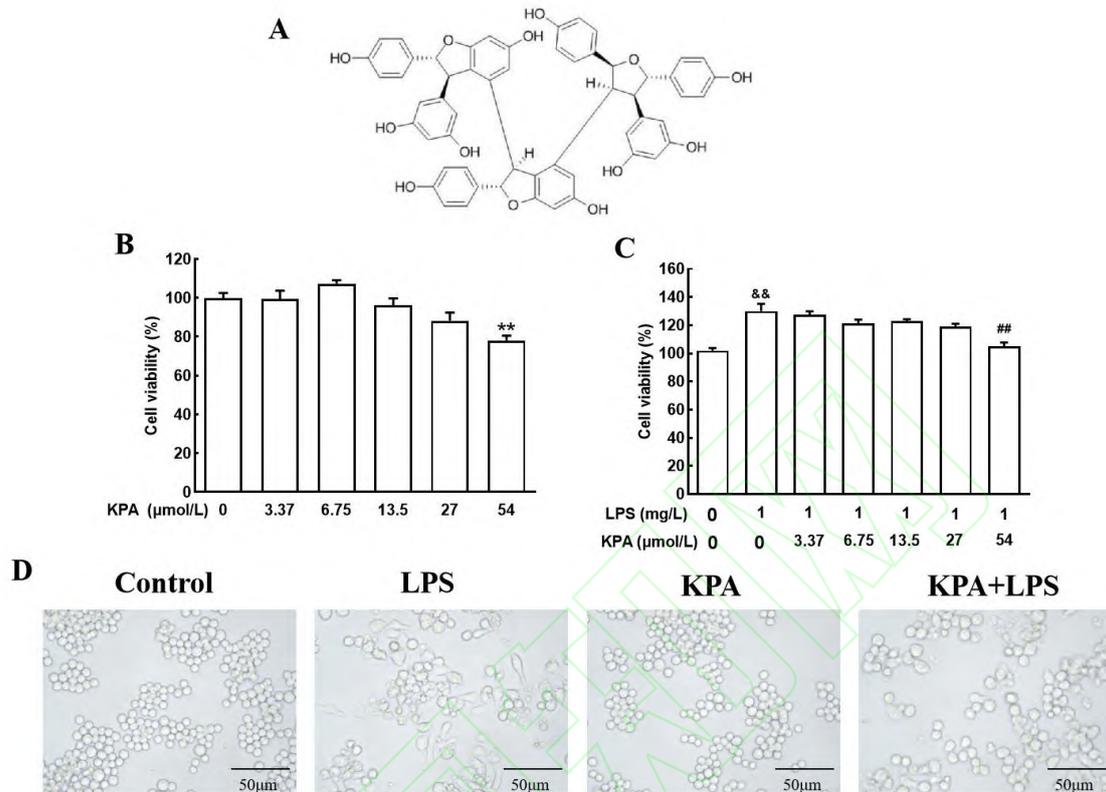


图 1 KPA 对 RAW264.7 巨噬细胞活力和细胞形态的影响

Fig.1 The effects of KPA on the viability and morphology of RAW264.7 macrophages

A: Structural diagram of Kobophenol A; B, C: Cell viability measured by CCK-8 assay ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ ); D: Cell morphology of RAW264.7 macrophages after KPA and LPS treatment  $\times 200$ ; \*\* $P < 0.01$  vs 0  $\mu\text{mol/L}$  KPA; && $P < 0.01$  vs 0  $\mu\text{mol/L}$  KPA + 0 mg/L LPS; ## $P < 0.01$  vs 0  $\mu\text{mol/L}$  KPA + 1 mg/L LPS group.

**2.2 KPA 对 RAW264.7 巨噬细胞 M1 型极化蛋白表达的影响** 通过 Western blot 检测巨噬细胞 M1 型极化相关蛋白 iNOS、COX-2 的表达水平。结果显示，与 Control 组相比，LPS 组 iNOS 和 COX-2 的表达明显上升 ( $t=16.70$ 、 $9.52$ ，均  $P < 0.01$ )，与 LPS 组相比，LPS+KPA 处理后可降低 iNOS 和 COX-2 的表达 (图 2A-2C,  $t=14.16$ 、 $2.36$ ，均  $P < 0.05$ )。免疫荧光染色法结果显示，LPS 组 iNOS 和 COX-2 的荧光强度明显增加 ( $t=16.90$ 、 $7.13$ ，均  $P < 0.01$ )，与 LPS 组相比，LPS+KPA 处理使 iNOS 和 COX-2 的荧光强度降低，几乎恢复到正常水平(图 2D、2E,  $t=35.92$ 、 $6.14$ ，均  $P < 0.01$ )。提示 KPA 具有抑制巨噬细胞 M1 型极化的作用。

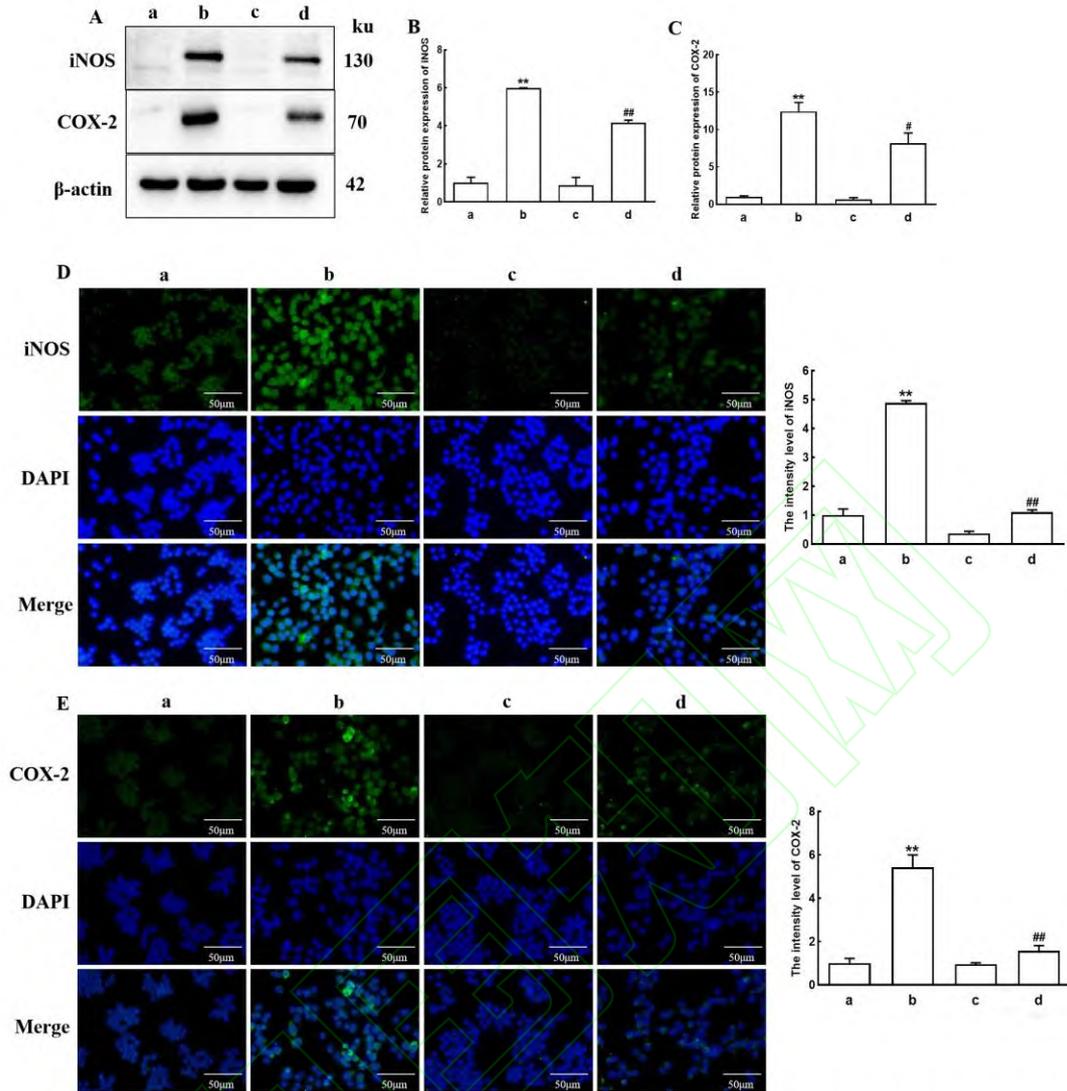


图2 KPA对LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞M1型极化相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig.2 The effect of KPA on protein expression in LPS-induced M1 polarization of RAW264.7

macrophages ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

A-C: Western blot analysis of iNOS and COX-2 protein expression levels in different groups of RAW264.7 macrophages; D, E: Immunofluorescence staining was used to detect the expression levels of iNOS and COX-2 proteins in different groups of RAW264.7 macrophages  $\times 200$ ; a: Control group; b: LPS group; c: KPA group; d: LPS+KPA group; \*\* $P < 0.01$  vs Control group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs LPS group.

**2.3 KPA对RAW264.7巨噬细胞M1型极化基因表达的影响** 通过RT-qPCR检测巨噬细胞M1型极化相关基因*iNOS*、*IL-6*和*TNF- $\alpha$* 的表达水平。结果显示,相比Control组,LPS组*iNOS*、*IL-6*和*TNF- $\alpha$* 的表达上升( $t=7.49$ 、 $8.90$ 、 $41.86$ ,均 $P < 0.01$ ),而加入KPA后,可以逆转其表达的上升(图3A-3C, $t=7.49$ 、 $2.29$ 、 $12.88$ ,均 $P < 0.05$ )。表明KPA能够通过抑制*iNOS*、*IL-6*和*TNF- $\alpha$* 基因的表达来缓解巨噬细胞M1型极化。

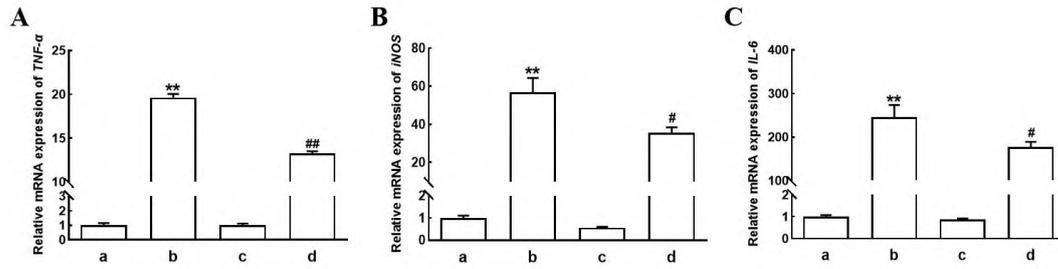


图3 KPA对LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞M1型极化相关基因的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig.3 The effect of KPA on LPS-induced M1 polarization genes in RAW264.7 macrophages ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

A-C: The expression levels of *TNF-α*, *iNOS* and *IL-6* genes in each group of RAW264.7 macrophages were detected by RT-qPCR; a: Control group; b: LPS group; c: KPA group; d: LPS+KPA group; \*\* $P < 0.01$  vs Control group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs LPS group.

2.4 KPA对RAW264.7巨噬细胞CD86表达的影响 通过流式细胞术检测RAW264.7巨噬细胞CD86的表达。结果显示，LPS组CD86的表达明显升高 ( $t=11.17, P < 0.01$ )；加入KPA处理后CD86的表达明显下降 (图4A、4B,  $t=9.25, P < 0.01$ )。

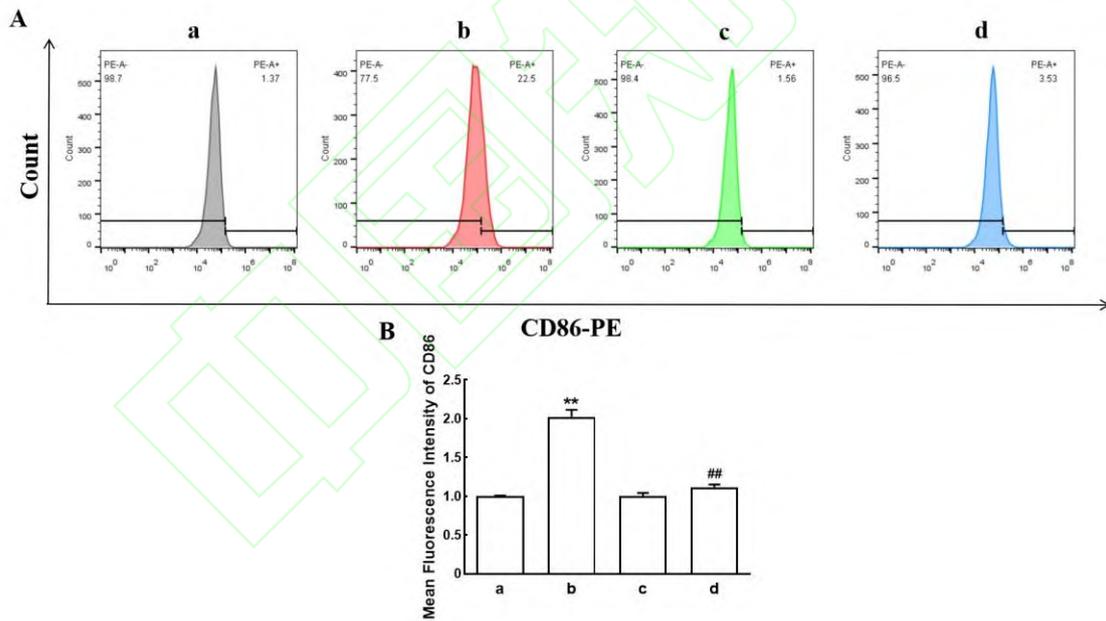


图4 KPA对LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞CD86的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig.4 The effect of KPA on CD86 in LPS-induced RAW264.7 macrophages ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

A: Flow cytometry was used to measure the proportion of CD86-positive cells among RAW264.7 macrophages. B: The average fluorescence intensity of CD86 protein in RAW264.7 macrophages across different groups was also determined; a: Control group; b: LPS group; c: KPA group; d: LPS+KPA group; \*\* $P < 0.01$  vs Control group; ## $P < 0.01$  vs LPS group.

**2.5 KPA 对 RAW264.7 巨噬细胞 Prdx6 表达水平的影响** Western blot 和 RT-qPCR 检测结果显示, LPS 组 Prdx6 的蛋白和 mRNA 表达(图 5A、5B)相对于 Control 组明显降低( $t=6.30$ 、 $6.73$ , 均  $P<0.01$ ), 而 KPA 处理显著上调巨噬细胞 Prdx6 蛋白和 mRNA 的表达( $t=3.45$ 、 $4.15$ , 均  $P<0.01$ ), 表明 KPA 可以上调巨噬细胞 Prdx6 的表达。为验证 KPA 抑制巨噬细胞 M1 型极化是否通过 Prdx6 实现, 使用 Prdx6 的抑制剂 MJ33 处理细胞 24 h。实验分组为 Control 组、LPS 组(1 mg/L LPS)、MJ33 组(5  $\mu$ mol/L)和 LPS+MJ33(1 mg/L LPS+5  $\mu$ mol/L MJ33)。采用 Western blot 和 RT-qPCR 检测 iNOS、Prdx6 的表达情况(图 5C、5D), 结果均显示: 相对于 Control 组, LPS 组 iNOS 的蛋白和 mRNA 表达上升( $t=14.79$ 、 $9.95$ , 均  $P<0.01$ ), 与 LPS 组相比, LPS+MJ33 组 iNOS 的蛋白和 mRNA 表达明显上升( $t=3.03$ 、 $2.63$ , 均  $P<0.05$ ); 这表明抑制 Prdx6 后巨噬细胞 M1 型极化更严重。因此, KPA 抑制 RAW264.7 巨噬细胞 M1 型极化可能是通过上调 Prdx6 实现的。

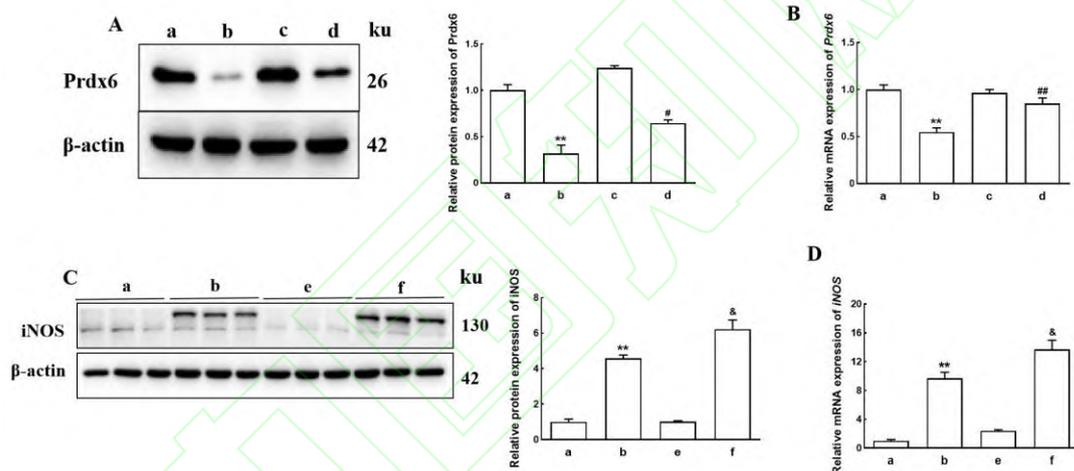


图 5 KPA 对 RAW264.7 巨噬细胞 Prdx6 蛋白和 mRNA 表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig.5 The Effect of KPA on protein and mRNA expression levels of Prdx6 in RAW264.7 macrophages

( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

A: The expression levels of Prdx6 proteins in RAW264.7 macrophages of each group were detected by Western blot analysis; B: The expression levels of Prdx6 mRNA in RAW264.7 macrophages of each group were detected by RT-qPCR; C: The expression levels of iNOS proteins in RAW264.7 macrophages of each group were detected by Western blot analysis; D: The expression levels of iNOS mRNA in RAW264.7 macrophages of each group were detected by RT-qPCR; a: Control group; b: LPS group; c: KPA group; d: LPS+KPA group; e: MJ33 group; f: LPS+MJ33 group; \*\* $P<0.01$  vs Control group; # $P<0.05$ , ### $P<0.01$  vs LPS group; & $P<0.05$  vs LPS group.

**2.6 敲低 Prdx6 后 KPA 对 RAW264.7 巨噬细胞 M1 型极化的影响** 通过转染 si-RNA 敲低 Prdx6。采用 RT-qPCR 检测各组细胞 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 iNOS 的表达, 并采用免疫荧光染色法

检测 iNOS 的表达。结果均显示，与 Control 组相比，LPS 组 *iNOS*、*IL-6* 和 *TNF- $\alpha$*  的表达明显上升（RT-qPCR:  $t=33.45$ 、 $23.14$ 、 $91.85$ ；免疫荧光染色:  $t=7.50$ ，均  $P<0.01$ ）。与 LPS 组相比，LPS+KPA+si-NC 组 *iNOS*、*IL-6* 和 *TNF- $\alpha$*  的表达下降（RT-qPCR:  $t=20.94$ 、 $8.07$ 、 $3.43$ ，均  $P<0.05$ ；免疫荧光染色:  $t=5.38$ ， $P<0.01$ ）。与 LPS+KPA+si-NC 组相比，LPS+KPA+si-Prdx6 组 *iNOS*、*IL-6* 和 *TNF- $\alpha$*  的表达上升（图 6A-6D，RT-qPCR:  $t=6.88$ 、 $19.58$ 、 $3.09$ ，均  $P<0.05$ ；免疫荧光染色:  $t=4.79$ ， $P<0.01$ ）。提示敲低 *Prdx6* 可以逆转 KPA 对 RAW264.7 巨噬细胞 M1 型极化的抑制作用。

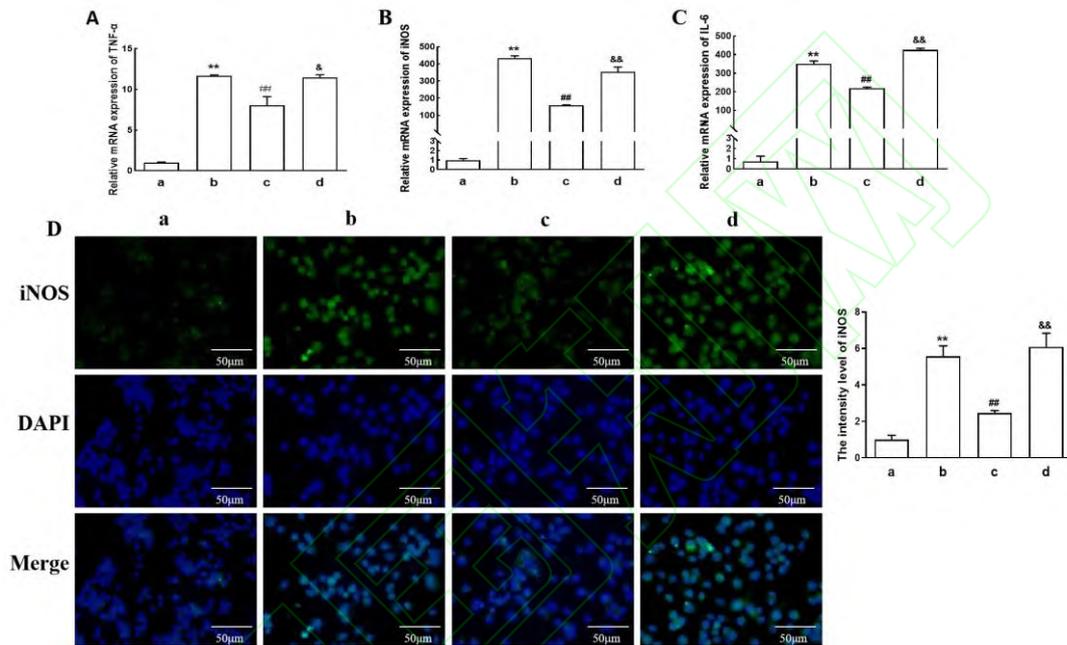


图 6 敲低 *Prdx6* 后 KPA 对 RAW264.7 巨噬细胞 M1 型极化相关基因及蛋白的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig.6 The effects of *Prdx6* knockdown on KPA-induced M1 polarization-related genes and proteins in RAW264.7 macrophages ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

A-C: The expression levels of *TNF- $\alpha$* , *iNOS* and *IL-6* genes in each group of RAW264.7 macrophages were detected by RT-qPCR; D: Immunofluorescence staining was used to detect the expression levels of *iNOS* proteins in different groups of RAW264.7 macrophages  $\times 200$ ; a: Control group; b: LPS group; c: LPS+KPA+si-NC group; d: LPS+KPA+si-Prdx6 group; \*\* $P<0.01$  vs Control group; ## $P<0.01$  vs LPS group; & $P<0.05$ , && $P<0.01$  vs LPS+KPA+si-NC group.

### 3 讨论

巨噬细胞是参与先天免疫应答的髓系细胞，在不同的环境下可以极化为不同的表型，主要为促炎 M1 型和抗炎 M2 型<sup>[1]</sup>。如果能够调节巨噬细胞极化平衡，将在缓解甚至治愈各种炎症性疾病中发挥重要作用<sup>[12]</sup>。因此，寻求巨噬细胞 M1 型极化的发生机制及抑制途径至关

重要。研究<sup>[11, 13]</sup>表明 KPA 可以清除胞内的 ROS, 并且可通过阻断细胞中 NF- $\kappa$ B 的核易位抑制促炎细胞因子的释放。这提示 KPA 可能通过降低胞内的 ROS 水平及其抗炎作用抑制巨噬细胞 M1 型极化。本研究首先筛选出对 RAW264.7 巨噬细胞无毒性的 KPA 加药浓度, 明场环境下观察细胞形态, KPA 可以恢复 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞的形态学改变。为进一步验证 KPA 对巨噬细胞 M1 型极化的抑制作用, 本研究使用 LPS 构建了体外巨噬细胞 M1 型极化模型, 结果显示, 巨噬细胞 M1 型极化相关蛋白 iNOS、COX-2, 相关基因 *iNOS*、*IL-6*、*TNF- $\alpha$*  和细胞 CD86 的表达均上调, 而 KPA 处理后可以逆转这一现象。这些发现表明 KPA 可以抑制巨噬细胞 M1 型极化, 这将为炎症免疫性疾病的防治提供潜在方向。

Prdx6 是过氧化物酶家族中的重要成员, 具有谷胱甘肽过氧化物酶活性、酸性钙非依赖性磷脂酶活性和溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶活性, 在抗氧化防御中发挥重要作用<sup>[14, 15]</sup>。并且 Prdx6 可通过抑制自由基引起的损伤和线粒体产生的过氧化氢来抑制炎症性疾病<sup>[16]</sup>, 并通过与 C-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 途径结合激活 NF- $\kappa$ B/AP-1 来预防炎症性疾病<sup>[17]</sup>。此外, 有研究<sup>[8]</sup>表明在 LPS 刺激的巨噬细胞中, 添加 Prdx6 可导致 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的产生减少, 抑制巨噬细胞中 iNOS 的过度表达和 ROS 的增加。本研究中 LPS 诱导的巨噬细胞 M1 型极化中 Prdx6 的表达降低, 并且在使用 MJ33 抑制 Prdx6 的活性和 si-RNA 敲低 *Prdx6* 后, 巨噬细胞 M1 型极化标志蛋白 iNOS 的表达和标志基因 *iNOS*、*IL-6*、*TNF- $\alpha$*  上调更加显著, 而加入 KPA 后, Prdx6 的表达显著升高, 并且能够逆转 iNOS 的表达和标志基因 *iNOS*、*IL-6*、*TNF- $\alpha$*  上调的现象。由此推测, KPA 可能通过上调 Prdx6 的表达抑制巨噬细胞向 M1 型极化。但 KPA 具体上调 Prdx6 三种酶活性中的哪一种仍需进一步探索。

综上所述, KPA 对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 M1 型极化的抑制作用可能是通过上调 Prdx6 的表达, 从而恢复氧化应激平衡和清除胞内 ROS 实现的, 这为炎症免疫性疾病的治疗提供了新的策略。本实验的研究结果主要是基于体外实验验证, 后续将进行体内实验进一步验证该结论。

### 参考文献

- [1] Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity[J]. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 2020, 15: 123-47. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718.
- [2] Yunna C, Mengru H, Lei W, et al. Macrophage M1/M2 polarization[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 877: 173090. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173090.
- [3] 王乐乐, 谭彩霞, 张薇, 等. 大黄酚通过 AMPK/PGC-1 $\alpha$  通路促进线粒体生物合成影响

- 巨噬细胞极化 [J]. 安徽医科大学学报, 2025, 60(3): 488-94. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.03.014.
- [3] Wang L L, Tan C X, Zhang W, et al. Chrysophanol affects macrophage polarization by promoting mitochondrial biosynthesis through AMPK/PGC-1 $\alpha$  pathway[J]. Acta Univ Med Anhui, 2025, 60(3): 488-94. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.03.014.
- [4] de Groot L E S, van der Veen T A, Martinez F O, et al. Oxidative stress and macrophages: Driving forces behind exacerbations of asthma and chronic obstructive pulmonary disease?[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2019, 316(2): L369-84. doi: 10.1152/ajplung.00456.2018.
- [5] Song M G, Ryoo I G, Choi H Y, et al. NRF2 signaling negatively regulates phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)-induced differentiation of human monocytic U937 cells into pro-inflammatory macrophages[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0134235. doi: 10.1371/journal.pone.0134235.
- [6] Yao Y, Zhao X, Zheng S, et al. Subacute cadmium exposure promotes M1 macrophage polarization through oxidative stress-evoked inflammatory response and induces porcine adrenal fibrosis[J]. Toxicology, 2021, 461: 152899. doi: 10.1016/j.tox.2021.152899.
- [7] Hampton M B, O' Connor K M. Peroxiredoxins and the regulation of cell death[J]. Mol Cells, 2016, 39(1): 72-6. doi: 10.14348/molcells.2016.2351.
- [8] Parfenyuk S B, Glushkova O V, Sharapov M G, et al. Protective effects of peroxiredoxin 6 in pro-inflammatory response model using raw 264.7 macrophages[J]. Biochemistry Moscow, 2023, 88(8): 1156-64. doi: 10.1134/s0006297923080096.
- [9] Liang G L, Bi J B, Huang H Q, et al. Metabolites and the pharmacokinetics of kobophenol A from *Caragana sinica* in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2005, 101(1-3): 324-9. doi: 10.1016/j.jep.2005.05.016.
- [10] Lee S R, Kwak J H, Park D S, et al. Protective effect of kobophenol A on nitric oxide-induced cell apoptosis in human osteoblast-like MG-63 cells: involvement of JNK, NF- $\kappa$ B and AP-1 pathways[J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(9): 1251-9. doi: 10.1016/j.intimp.2011.04.004.
- [11] Cho H, Park J H, Ahn E K, et al. Kobophenol A isolated from roots of *Caragana sinica* (buc'hoz) rehder exhibits anti-inflammatory activity by regulating NF- $\kappa$ B nuclear translocation in J774A.1 cells[J]. Toxicol Rep, 2018, 5: 647-53. doi: 10.1016/j.toxrep.2018.05.011.

- [12] Luo M, Zhao F, Cheng H, et al. Macrophage polarization: an important role in inflammatory diseases[J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1352946. doi: 10.3389/fimmu.2024.1352946.
- [13] Kwak J H, Lee S R, Park H J, et al. Kobophenol A enhances proliferation of human osteoblast-like cells with activation of the p38 pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 17(3): 704-13. doi: 10.1016/j.intimp.2013.08.015.
- [14] 王 浩, 周富丽, 朱仁弟, 等. 槲皮素对 Erastin 诱导的软骨细胞铁死亡的影响[J]. *中国药理学通报*, 2024, 40(10): 1945-52.
- [14] Wang H, Zhou F L, Zhu R D, et al. Effect of quercetin on erastin-induced ferroptosis in chondrocytes[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2024, 40(10): 1945-52.
- [15] Rahaman H, Herojit K, Singh L R, et al. Structural and functional diversity of the peroxiredoxin 6 enzyme family[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2024, 40(13-15): 759-75. doi: 10.1089/ars.2023.0287.
- [16] Zhou F, Chen F, Ouyang Z, et al. Functions of peroxiredoxins and their roles in autoimmune diseases[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2024, 40(4-6): 329-44. doi: 10.1089/ars.2022.0139.
- [17] Park M H, Jo M, Kim Y R, et al. Roles of peroxiredoxins in cancer, neurodegenerative diseases and inflammatory diseases[J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 163: 1-23. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.03.018.