

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

陈天宇^{1,2}, 王浩^{1,2}, 王金虹^{1,2}, 赵英杰^{1,2}, 周仁鹏^{1,2}, 胡伟^{1,2}, 鲁超^{1,3}

(¹ 安徽医科大学药学科学学院, 合肥 230032; ² 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; ³ 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, 以期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, 并使用过氧化物还原酶 6 (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 Prdx6 和巨噬细胞 M1 型极化相关蛋白诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、环氧化酶-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 α (*TNF-\alpha*) 的表达水平。流式检测 M1 型巨噬细胞标志分化簇 86 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(2025)09-1644-09

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.09.011

2025-06-20 接收

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@auat.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^[1]。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^[2-3]。近期研究^[4-6]表明, 细胞

NF- κ Bp65 and CBS protein expression significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the vitamin D group exhibited increased PWTL, MWT, 25(OH) D₃ levels and VDR protein expression ($P < 0.05$), while H₂S content, CGRP and PGE2 levels, and NF- κ Bp65 and CBS protein expression significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the activator group, the activator + Vitamin D group showed increased PWTL, MWT, 25(OH) D₃ levels and VDR protein expression, and decreased H₂S content, CGRP and PGE2 levels and decreased NF- κ Bp65, CBS protein expression ($P < 0.05$). Compared with the vitamin D group, the activator + vitamin D group showed decreased PWTL, MWT, 25(OH) D₃ levels and VDR protein expression, while H₂S content, CGRP and PGE2 levels, and NF- κ Bp65 and CBS protein expression significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Exogenous supplementation of vitamin D can relieve nerve pain and reduce pain sensitivity in CCI rats, possibly by inhibiting NF- κ B/CBS-H₂S signaling pathway.

Key words sciatic nerve chronic injury; vitamin D; pain behavior; the pain threshold; receptors; NF- κ B/CBS-H₂S signaling pathway

Fund program Scientific and Technological Project of Guizhou Health Commission (No. gzwkj2024-417)

Corresponding author Jiang Zhongjin, E-mail: 670934573@qq.com

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)增加是巨噬细胞极化至 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^[7]。研究^[8]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 1A^[9]。具有抗氧化、抗菌活性、抗氧化应激等功能^[10]。此外,研究^[11]显示 KPA 通过阻断 J774A.1 细胞中核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ 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); Prdx6 抑制剂 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-诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、Anti-环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)(武汉 Proteintech 公司,货号: 18985-1-AP、12375-1-AP); Anti-分化簇 86(cluster of differentiation 86, CD86)(美国 Biolegend 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 Fluor488)、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); Lipofectamine™ 3000 转染试剂(美国 Thermo Fisher 公司,货号: L3000015); 小干扰

RNA(si-RNA)由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.1.3 主要仪器 CO₂ 培养箱、流式细胞仪、酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司,型号: 371Steri-Cycle、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 μ mol/L KPA) 和 LPS + KPA 组(1 mg/L LPS + 27 μ 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 μ mol/L MJ33) 和 LPS + MJ33 组(1 mg/L LPS + 5 μ 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 μ mol/L KPA + si-NC) 和 LPS + KPA + si-Prdx6 组(1 mg/L LPS + 27 μ mol/L KPA + si-Prdx6), 按照试剂说明书操作,使用 Lipofectamine™ 3000 转染试剂将 si-NC 和 si-Prdx6 分别转染至 RAW264.7 巨噬细胞中。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% CO₂ 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 × 10⁴ 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 μ 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 μ 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 × 10⁶ 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 ℃ 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 ℃ 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(2×10^5 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 ℃ 冰箱孵育过夜,PBS 洗涤 3 次,爬片用荧光羊抗兔 IgG(Alexa Flour488) 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(2×10^6 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, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 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
iNOS	5'-ggagtgacggcaaacatgact-3'	5'-tcgatgcacaactgggtgaac-3'
IL-6	5'-cttcttggaactgatctgtgac-3'	5'-ctgtgtgggagtgatcctctgtg-3'
TNF- α	5'-cgcctctctgtctactgaactcgg-3'	5'-gtggtttgtgagtgtaggggtctg-3'
Prdx6	5'-ttgatataaggcagggac-3'	5'-ctaccatcacgctctctccc-3'
GAPDH	5'-ggttgtctctcgcacttca-3'	5'-tggtccagggtttcttactcc-3'

1.2.7 流式细胞术检测 CD86 的表达 将细胞接种到 6 孔板(2×10^6 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 ℃、2 000 r/min 离心 5 min,并用 100 μ L PBS 重悬细胞。加入 0.26 μ 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⁺) 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 μ mol/L 以下,不影响细胞活性,当 KPA 的浓度达到 54 μ 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 μ 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 μ 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;KPA + LPS (27 μ mol/L) 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 μ mol/L。

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。

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- α 的表达水平。结果显示,相比 Control 组,LPS 组 iNOS、IL-6 和 TNF- α 的表达上升($t = 7.49、8.90、41.86$,均 $P < 0.01$),而加入 KPA 后,可以抑制其表达的上升程度(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- α 基因的

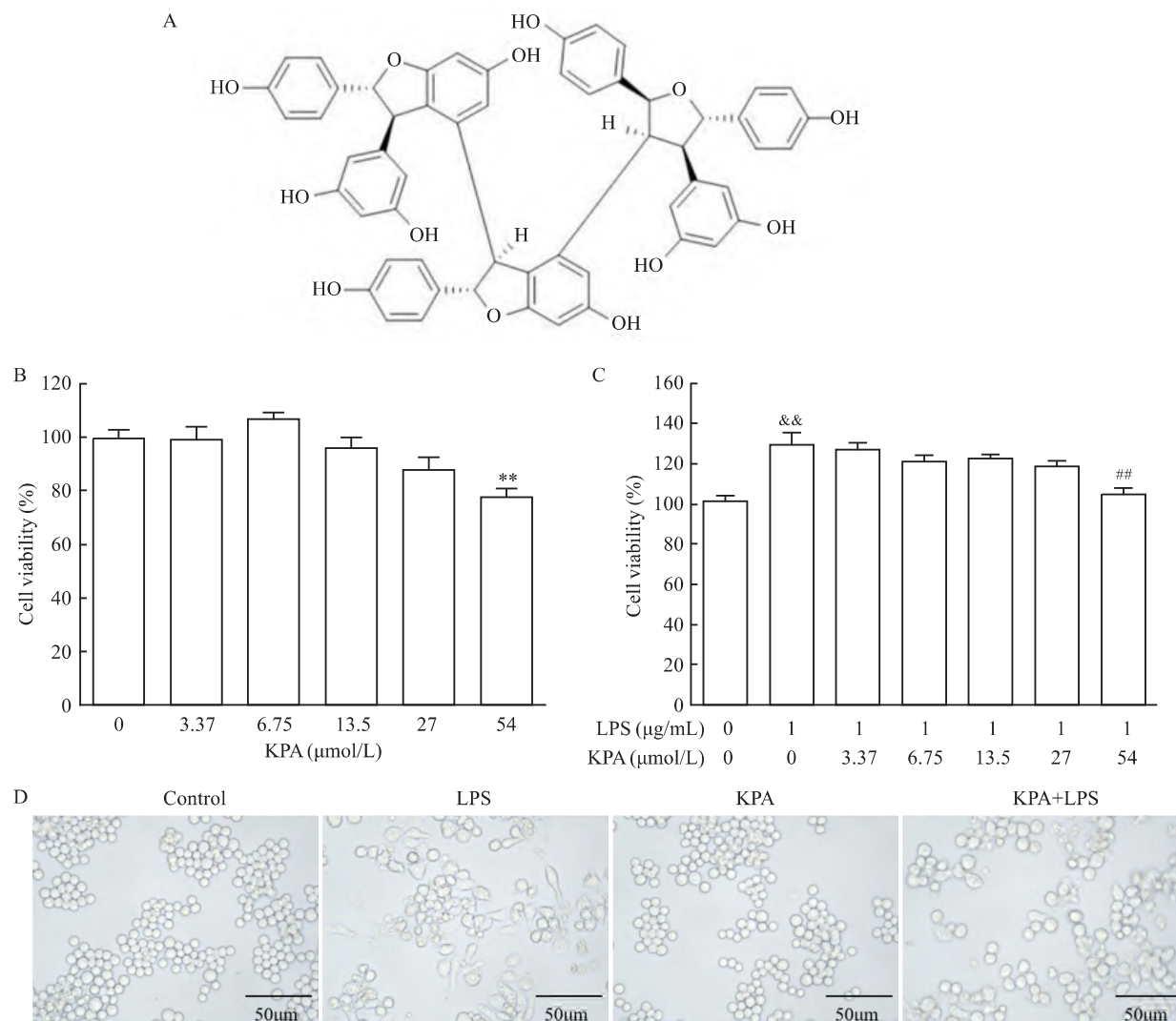


图1 KPA对RAW264.7巨噬细胞活力和细胞形态的影响

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.

表达来缓解巨噬细胞 M1 型极化。

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, $t = 9.25$, $P < 0.01$)。

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 处理后明显上调巨噬细胞 Prdx6 蛋白和 mRNA 的表达 ($t = 3.45$ 、 4.15 , 均 $P < 0.05$), 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 $\mu\text{mol/L}$) 和 LPS + MJ33 (1 mg/L LPS + 5 $\mu\text{mol/L}$ 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

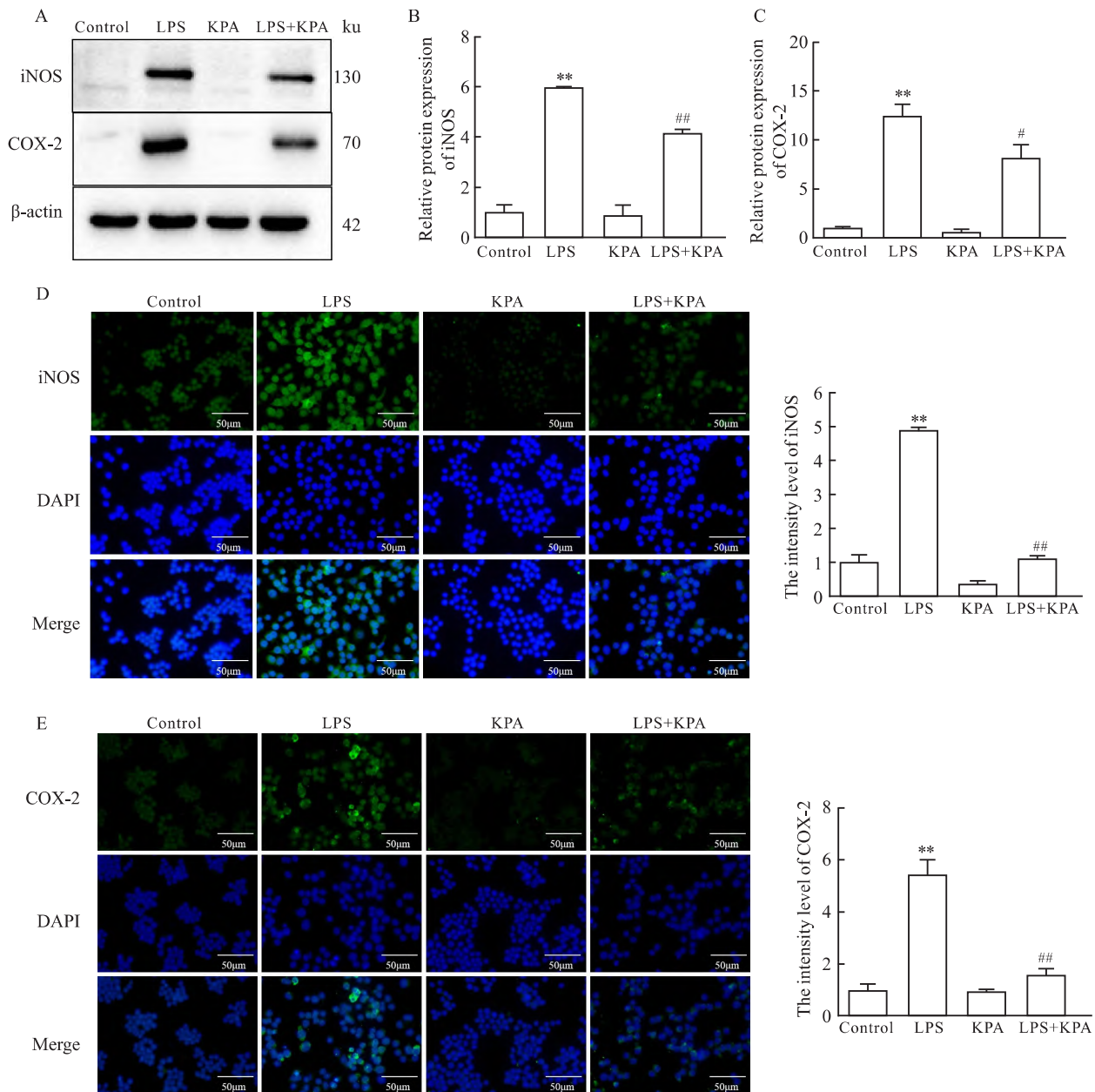


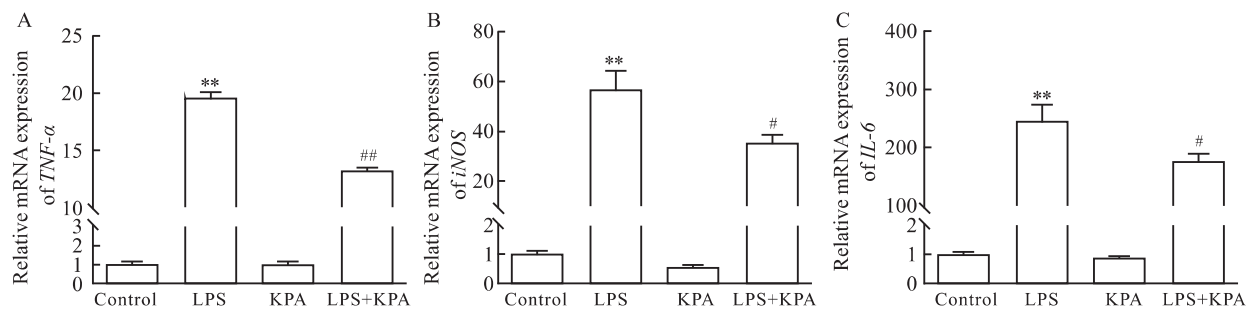
图2 KPA对LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞M1型极化相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.2 The effect of KPA on protein expression in LPS-induced M1 polarization of RAW264.7 macrophages ($\bar{x} \pm s, n=3$)

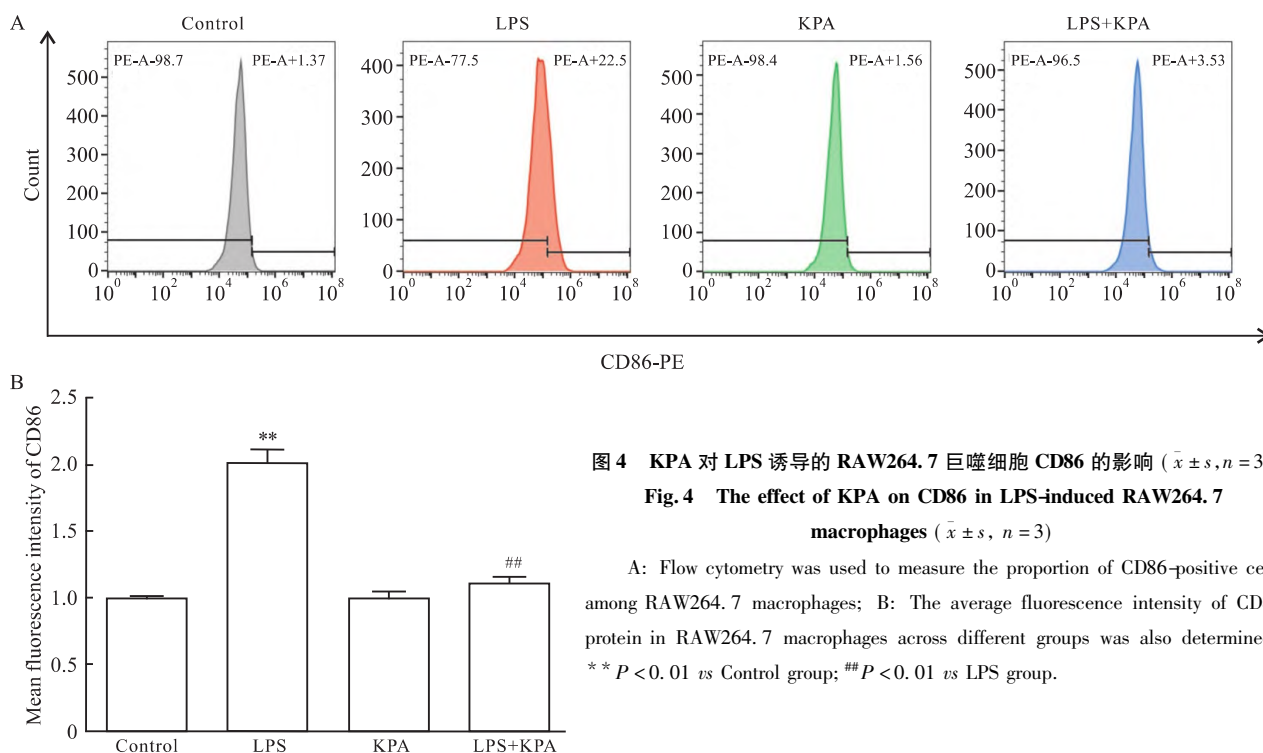
A - C: Western blot analysis of iNOS and COX-2 protein expression levels in different groups of RAW264.7 macrophages; D, E: Immunofluorescence staining was used to detect the expression levels of iNOS and COX-2 proteins in different groups of RAW264.7 macrophages $\times 200$; ** $P < 0.01$ vs Control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

巨噬细胞 M1 型极化可能是通过上调 Prdx6 实现的。
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(图6)。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 $P < 0.01$;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(RT-qPCR: $t = 6.88$ 、19.58、3.09,均 $P < 0.05$;免疫荧光

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; ** $P < 0.01$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs LPS group.

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; ** $P < 0.01$ vs Control group; ## $P < 0.01$ vs LPS group.

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。

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^[1]。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^[12]。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^[11, 13]表明 KPA

可以清除胞内的 ROS,并且可通过阻断细胞中 NF- κ 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,发现 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-α* 和细胞 CD86 的

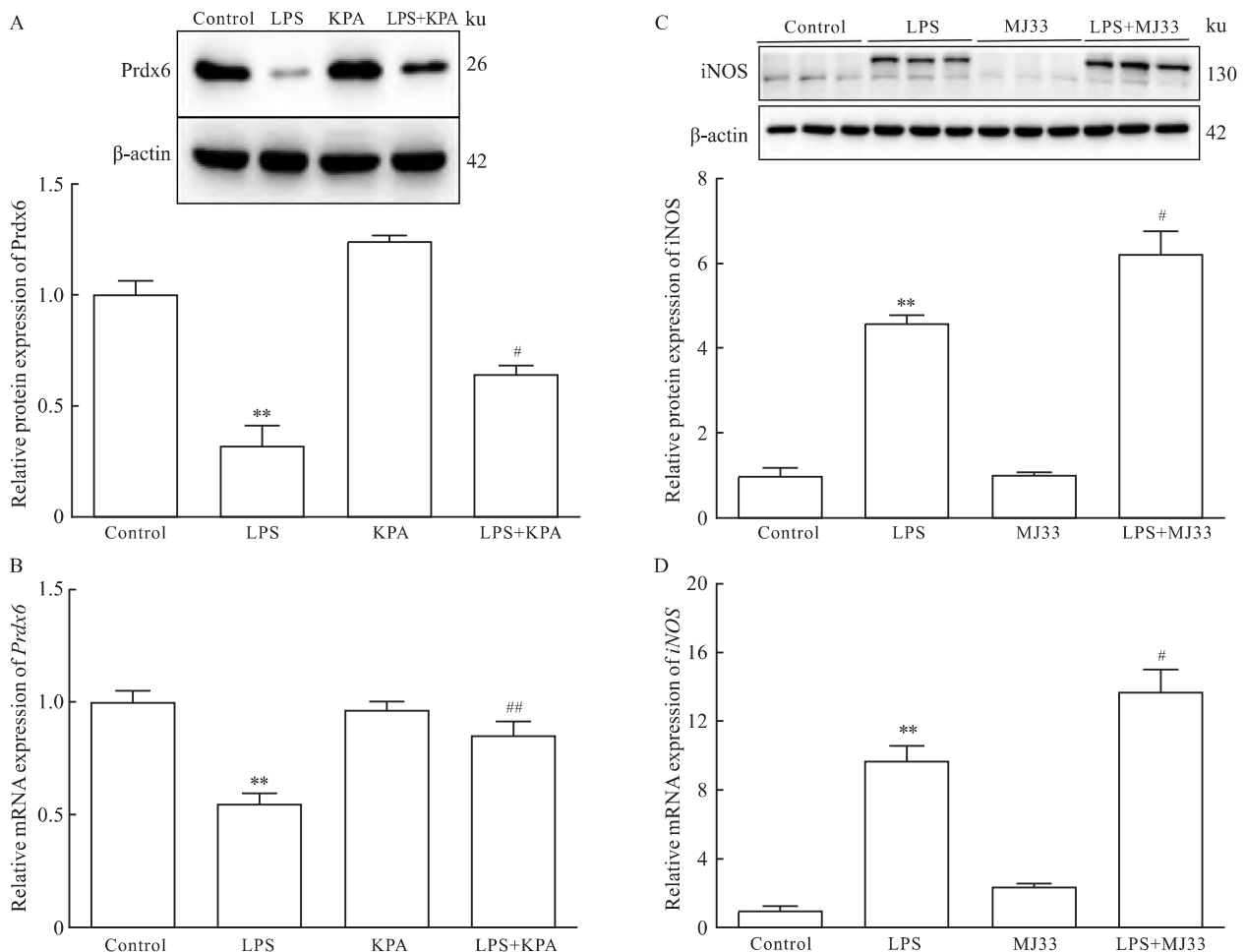


图5 KPA对RAW264.7巨噬细胞Prdx6蛋白和mRNA表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 The Effect of KPA on protein and mRNA expression levels of Prdx6 in RAW264.7 macrophages ($\bar{x} \pm s, n=3$)

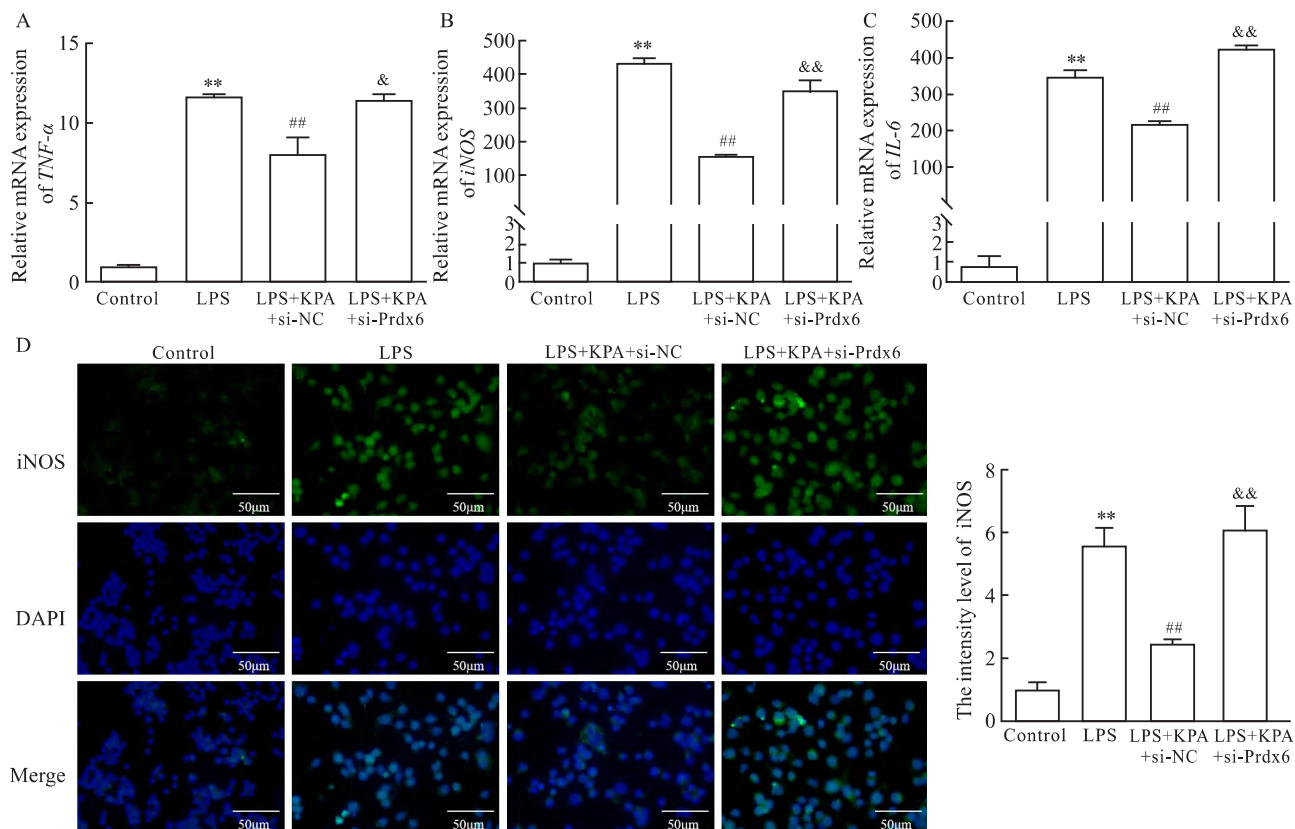
A: The expression levels of Prdx6 proteins in RAW264.7 macrophages of each group were detected by Western blot analysis; B: The expression levels of Prdx6 mRNA in RAW264.7 macrophages of each group were detected by RT-qPCR; C: The expression levels of iNOS proteins in RAW264.7 macrophages of each group 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; ** $P < 0.01$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs LPS group.

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^[14-15]。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^[16],并通过与C-Jun氨基末端激酶(JNK)途径结合激活NF- κ B/AP-1来预防炎症性疾病^[17]。此外,有研究^[8]表明在LPS刺激的巨噬细胞中,添加Prdx6可导致TNF- α 和IL-1 β 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- α* 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- α* 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

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-α*, *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 $\times 200$; ** $P < 0.01$ vs Control group; ## $P < 0.01$ vs LPS group; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$ vs LPS + KPA + si-NC group.

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 α 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 α 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- κ 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- κ 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. doi: 10.12360/CPB202403026.
- [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. doi: 10.12360/CPB202403026.
- [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.

Kobophenol A inhibits LPS-induced macrophage M1 polarization via Prdx6

Chen Tianyu^{1,2}, Wang Hao^{1,2}, Wang Jinhong^{1,2}, Zhao Yingjie^{1,2}, Zhou Renpeng^{1,2}, Hu Wei^{1,2}, Lu Chao^{1,3}

(¹*School of Pharmaceutical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032*; ²*Drug Clinical Trial Research Center, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601*; ³*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 peroxiredoxin 6 (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 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 α (*TNF- α*), were measured by RT-qPCR. Flow cytometry was employed to detect the expression of cluster of differentiation 86 (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- α* (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 up-regulating 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