

• 研究论文 •

白藜芦醇抑制单钠尿酸盐诱导 RAW264.7 巨噬细胞氧化损伤的机制

冯佳¹, 黄侠², 李赫宇³, 鞠单², 杨年安¹, 田瑞¹, 夏燕¹, 袁林^{1*}

(1. 湖北民族大学, 风湿性疾病发生与干预湖北省重点实验室, 湖北恩施 445000; 2. 湖北民族大学附属民大医院, 湖北恩施 445000; 3. 天津益倍生物科技集团有限公司, 天津 300000)

摘要: 探讨白藜芦醇对单钠尿酸盐 (monosodium urate, MSU) 晶体诱导小鼠 RAW264.7 巨噬细胞的炎症因子、氧化应激指标及核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2, Nrf2)/血红素氧合酶 1 (heme oxygenase 1, HO-1) 信号通路相关基因的作用机制, 为急性痛风性关节炎 (acute gouty arthritis, AGA) 的治疗提供理论依据。使用不同浓度白藜芦醇作用于 RAW264.7 细胞 5 h 后, 再加入 MSU 刺激 24 h。采用 CCK-8 法检测白藜芦醇对 RAW264.7 细胞增殖的作用; ELISA 法检测细胞分泌肿瘤坏死因子 α (tumour necrosis factor- α , TNF- α) 水平; 应用 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯 (2',7'-dichlorodi-hydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 探针法检测细胞内活性氧自由基 (reaction oxygen species, ROS); 测定细胞内超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 含量; 实时荧光定量 PCR (real-time PCR) 法检测 Nrf2、Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)、醌氧化还原酶 1 [NAD(P)H quinone oxidoreductase 1, NQO1] 和 HO-1 mRNA 的表达。结果显示, 白藜芦醇能够抑制 RAW264.7 细胞增殖; 明显抑制 MSU 诱导 RAW264.7 细胞分泌的 TNF- α 水平; 明显抑制 MSU 诱导 RAW264.7 细胞内的 ROS、MDA 表达, 增加 SOD 表达; 降低 MSU 诱导 RAW264.7 细胞内的 Keap1 mRNA 表达, 增高 Nrf2、NQO1 和 HO-1 mRNA 的表达。综上, 白藜芦醇能够抑制 MSU 诱导 RAW264.7 巨噬细胞产生的炎症反应, 并通过调节 Nrf2/HO-1 信号通路提高巨噬细胞抗氧化能力。

关键词: 白藜芦醇; 痛风性关节炎; 巨噬细胞; 核因子 E2 相关因子 2/血红素氧合酶 1; 氧化应激

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2020)10-2368-07

Mechanism of resveratrol inhibiting monosodium urate induced oxidative damage of RAW264.7 macrophages

FENG Jia¹, HUANG Xia², LI He-yu³, JU Dan², YANG Nian-an¹, TIAN Rui¹, XIA Yan¹, YUAN Lin^{1*}

(1. Hubei Provincial Key Laboratory of Occurrence and Intervention of Rheumatic Diseases, Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, China; 2. University Hospital of Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, China; 3. Tianjin Ubasio Biotechnology Group Co. Ltd., Tianjin 300000, China)

Abstract: The aim of this research is to investigate the effects of resveratrol on the inflammatory factors, oxidative stress indexes and the related genes of nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) signaling pathway in RAW264.7 macrophages induced by monosodium urate (MSU) and to provide a theoretical basis for the treatment of acute gouty arthritis (AGA). Different concentrations of resveratrol were used to treat RAW264.7 cells for 5 hours, then MSU was added to stimulate them for 24 hours. The proliferation of RAW264.7 cells were detected by CCK-8 method. The level of tumor necrosis factor α secreted by cells were detected by ELISA method. The content of reaction oxygen species (ROS) in cells were detected by 2',7'-dichlorodi-hydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) probe method. The contents of superoxide dismutase (SOD) and malonal-

收稿日期: 2020-01-17; 修回日期: 2020-05-07.

基金项目: 湖北省重点实验室开放基金项目 (OIR19002A); 湖北省教育厅科学研究计划资助项目 (Q20191901).

*通讯作者 Tel: 86-718-8301984, E-mail: linyuanchina@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0065

dehyde (MDA) in cells were detected by the kits. The expression of Nrf2, Kelch like ECH related protein 1 (Keap1), NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1), HO-1 mRNA were detected by real time PCR method. The results showed that resveratrol could inhibit the proliferation of RAW264.7 cells, significantly inhibit the TNF- α level of RAW264.7 cells induced by MSU, significantly inhibit the expression of ROS and MDA, and increase the expression of SOD in RAW264.7 cells induced by MSU. Resveratrol could reduce the expression of Keap1 mRNA in RAW264.7 cells induced by MSU, and increase the expression of Nrf2, NQO1, HO-1 mRNA. It is suggested that resveratrol can inhibit the inflammatory response of RAW264.7 macrophages induced by MSU, and improve the antioxidant capacity of macrophages by regulating Nrf2 / HO-1 signal pathway.

Key words: resveratrol; gouty arthritis; macrophage; nuclear factor erythroid 2-related factor 2/heme oxygenase-1; oxidative stress

急性痛风性关节炎 (acute gouty arthritis, AGA) 是单钠尿酸盐 (monosodium urate, MSU) 晶体沉积于关节及关节周围组织引起的一种急性炎症性反应^[1]。目前认为巨噬细胞吞噬 MSU 是 AGA 炎症过程的核心^[2]。沉积于人体内的 MSU 能与巨噬细胞等多种细胞发生反应, 合成和分泌肿瘤坏死因子 α (tumour necrosis factor- α , TNF- α) 等多种炎症因子, 从而引起炎症反应和组织破坏, 同时抑制炎症细胞凋亡进一步影响 AGA 的发展^[3]。研究发现氧化应激在 AGA 急性炎症反应的发生发展过程中发挥重要作用^[4]。当机体受到氧化应激刺激时能够激活核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2, Nrf2) 信号通路, 激活下游靶蛋白表达^[5]。有研究证实 MSU 能够刺激 RAW264.7 巨噬细胞产生炎症因子, 还能诱导大鼠出现疼痛加剧的反应并产生白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和 TNF- α , 可能通过 Nrf2 途径激活氧化应激反应^[6]。白藜芦醇 (resveratrol) 又名芪三酚, 是一种存在于葡萄、虎杖、蓝莓和桑椹等植物中的多酚化合物, 是天然的抗氧化剂和自由基清除剂, 具有抗炎、抗氧化、抗菌、心脏保护和抗肿瘤等多种治疗作用^[7]。研究发现白藜芦醇能够明显减轻 AGA 小鼠足部肿胀, 并减少炎症细胞浸润^[8]; 能够通过 Nrf2/血红素氧合酶 1 (heme oxygenase 1, HO-1) 信号通路发挥抗氧化作用^[9]。对于白藜芦醇能否通过 Nrf2/HO-1 信号通路抑制 MSU 诱导炎症模型的氧化损伤尚未见相关报道。本实验使用 MSU 诱导 RAW264.7 巨噬细胞建立炎症细胞模型, 观察不同浓度白藜芦醇对 MSU 诱导 RAW264.7 巨噬细胞的炎症因子、氧化应激指标及 Nrf2/HO-1 信号通路相关基因的影响, 探讨白藜芦醇的抗炎及抗氧化作用机制, 为 AGA 的治疗提供理论依据。

材料与方法

材料 小鼠 RAW264.7 巨噬细胞株购自北京北纳创联生物技术研究院; 白藜芦醇由天津益倍生物科

技集团有限公司提供, 溶于二甲基亚砜, 储备液浓度 400 mmol·L⁻¹, 使用时用培养基稀释至工作浓度; 0.25% 胰酶 (浙江森瑞生物科技有限公司, 批号: 1907190101); DMEM 培养基 (Gibco 公司, 批号: 1927561); 胎牛血清 (澳洲 CLARK 公司, 批号: JC63483); 活性氧自由基 (reaction oxygen species, ROS) 检测试剂盒 (大连美仑生物技术有限公司, 批号: MA0219); 鼠 TNF- α ELISA 试剂盒 (Novus Biologicals 公司, 批号: VAL609); 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 测定试剂盒 (批号: A001-3)、细胞丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 测试盒, 批号: A003-4) (南京建成生物工程有限公司); MSU (美国 Sigma 公司, 批号: BCBS7438); Cell counting kit-8 (CCK-8, 批号: CK04, 东仁化学科技有限公司); TRIzol Reagent (Ambion 公司, 批号: 113605); Prime script RT reagent kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (批号: AK4401) 及 SYBR Premix Ex Taq (Tli RNase H Plus, 批号: AK8904) (TaKaRa 公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号: P0012S); 引物购自上海生物工程技术服务有限公司。

仪器 OD-1000+超微量分光光度计 (南京五义科技有限公司); 5810R 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); MULTISKAN GO 酶标检测仪 (德国 Thermo 公司); LC480 实时荧光定量 PCR 仪 (Roche 公司); 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); IX71 荧光倒置显微镜 (日本 Olympus 公司)。

细胞培养 使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养 RAW264.7 细胞, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。实验共分 5 组: 对照组、MSU 组 (MSU 终浓度为 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、白藜芦醇 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组, 每组重复 3 次。

MSU 制备 参考文献^[10]方法将尿酸盐 1 g 和 NaOH 溶液 (1 mol·L⁻¹) 6 mL 加至 194 mL 蒸馏水中, 煮沸, 使尿酸盐完全溶解, 自然降温并搅拌, 滴入 HCl

(1 mol·L⁻¹) 调 pH 值至 7.2, 3 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 取沉淀, 再 3 000 r·min⁻¹ 离心至沉淀不再析出, 60 °C 烘干, 置 4 °C 冰箱保存。实验前取 MSU 置于 180 °C 干燥箱干燥 2 h, 称取干燥 MSU 100 mg, 高压灭菌烘干后, 加入 DMEM 培养液 10 mL, 配制成质量浓度为 10 mg·mL⁻¹ 的 MSU 溶液。

CCK-8 法检测细胞增殖 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液将 RAW264.7 巨噬细胞数调整为 5×10⁴ 个/mL, 接种于 96 孔板中每孔 100 μL, 3 个复孔, 细胞贴壁后加入不同浓度白藜芦醇 (终浓度为 10、20、40、80、120、160、200 μmol·L⁻¹) 作用 24 及 48 h 后, 弃上清, 每孔加入含 10 μL CCK-8 溶液的 DMEM 100 μL, 放置培养箱内孵育 2 h。用酶标仪测定各组在 450 nm 波长处的吸光度值 (OD), 计算细胞存活率 (CV)。

$$CV (\%) = \frac{(OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白孔}})}{(OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白孔}})} \times 100\% \quad (1)$$

ELISA 法检测细胞上清 TNF-α 水平 将 RAW264.7 巨噬细胞接种于 96 孔板中, 每孔 5×10³ 个, 加入不同浓度白藜芦醇 (终浓度为 20、40、80 μmol·L⁻¹) 作用 5 h 后, 加入 MSU 终浓度 100 μg·mL⁻¹ 作用 24 h, 收集细胞上清, 4 °C、3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后, 按鼠 TNF-α ELISA 检测试剂盒说明书检测细胞上清中 TNF-α 水平。

ROS 检测 将 RAW264.7 巨噬细胞接种于 96 孔板, 上述 5 组细胞培养 24 h 后, 去除上清, 用无血清 DMEM 培养基清洗细胞 1 次, 加入 10 μmol·L⁻¹ DCFH-DA 稀释液 100 μL, 37 °C 下培养箱中避光孵育 30 min, 用无血清 DMEM 清洗细胞 3 次, 充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA, 在荧光显微镜下观察。

SOD 和 MDA 检测 将 RAW264.7 巨噬细胞接种于 6 孔板, 上述 5 组细胞培养 24 h 后, 去除上清, 收集各组细胞并检测细胞蛋白浓度。按说明书检测, 计算 SOD (U·mg⁻¹)、MDA (nmol·mg⁻¹) 含量。

$$SOD \text{ 活力} = \frac{[(SOD \text{ 抑制率}/50\%) \times \text{反应体系稀释倍数}]/\text{样本蛋白浓度}}{\quad} \quad (2)$$

$$MDA \text{ 含量} = \frac{[(OD_{\text{样本}} - OD_{\text{空白}})/(OD_{\text{标准}} - OD_{\text{空白}})] \times \text{标准品浓度}}{\text{样本蛋白浓度}} \quad (3)$$

Real-time PCR 法检测 mRNA 表达 收集各组细胞, 按照 TRIzol Reagent 说明书提取 RNA, 测定 RNA 纯度及浓度, A260/A280 比值为 1.8~2.0。按逆转录试剂盒说明书合成 cDNA, 反应条件: 42 °C 2 min、37 °C 15 min 和 85 °C 5 s。cDNA 储存于 -20 °C。引物序列如下, Nrf2 上游引物: 5'-CCATTACGGAGACCCAC-3', 下游引物: 5'-GGATTACGCATAGGAGC-3'; 醌氧化还原酶 1 [NAD(P)H quinoneoxidoreductase 1, NQO1] 上游引物: 5'-GAGAAGAGCCCTGATTGT-3', 下游引

物: 5'-AAAGGACCGTTGTCGTAC-3'; Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) 上游引物: 5'-GGTCGCCCTGTGCCTCTAT-3', 下游引物: 5'-ACGCCAATCCTCCGTGTC-3'; HO-1 上游引物: 5'-AGATGGCGTCACTTCGTC-3', 下游引物: 5'-GGC AAGATTCTCCCTTACAG-3'; GAPDH 上游引物: 5'-CCCTTCATTGACCTCAACTACATG-3', 下游引物: 5'-TGGGATTTCATTGATGACAAGC-3'。RT-PCR 反应体系 10 μL, 反应条件: 95 °C 预变性 30 s、95 °C 变性 5 s、58 °C 退火 30 s 和 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环。基因表达量以 2^{-ΔΔCT} 表示实验组目的基因表达相对于对照组的变化倍数。

统计学方法 使用 SPSS19.0 统计软件分析数据, 计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 对符合正态分布满足方差齐性的采用单因素方差分析 (ANOVA) 进行组间两两比较, 不符合的采用非参数 (秩和) 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结果

1 白藜芦醇对 RAW264.7 巨噬细胞增殖的影响

如图 1 所示, 20、40、80 和 160 μmol·L⁻¹ 白藜芦醇作用于 RAW264.7 巨噬细胞 24 h, 细胞存活率分别为 101.08%、89.97%、72.81% 和 46.08%; 作用 48 h 后, 细胞存活率均有所降低, 分别为 89.01%、61.44%、36.31% 和 19.64%。结果说明, 白藜芦醇能够抑制 RAW264.7 巨噬细胞增殖, 在 24 和 48 h 的 IC₅₀ 值分别为 144.51 和 78.84 μmol·L⁻¹, 具有浓度及时间依赖性。为避免药物的细胞毒性影响, 本研究选择细胞存活率大于 70% 的白藜芦醇的浓度 20、40 和 80 μmol·L⁻¹、作用时间为 24 h, 进行后续实验。

2 白藜芦醇对 MSU 诱导 RAW264.7 巨噬细胞分泌 TNF-α 水平的影响

如图 2 所示, 与对照组相比, MSU 组细胞上清中 TNF-α

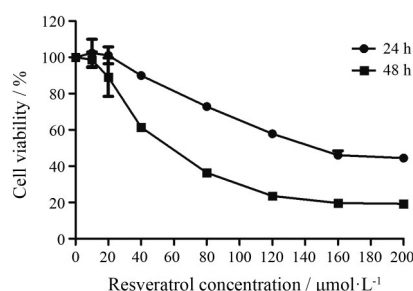


Figure 1 Effect of resveratrol on the survival rate of RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were treated with resveratrol (10, 20, 40, 80, 120, 160, 200 μmol·L⁻¹) for 24 h and 48 h, respectively. Cell viability was determined by CCK-8 assay. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

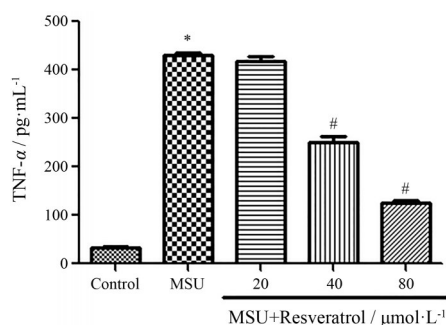


Figure 2 Resveratrol inhibits TNF- α secretion of RAW264.7 cells induced by MSU. The secretion of TNF- α was measured in the supernatant of RAW264.7 cells by ELISA. MSU: Monosodium urate; TNF- α : Tumour necrosis factor- α . $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs MSU group

水平明显增高 ($P < 0.05$); 加入 20、40 和 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白藜芦醇后, TNF- α 水平均降低; 与 MSU 组相比, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白藜芦醇降低最为明显 ($P < 0.05$)。结果提示, MSU 能够诱导 RAW264.7 巨噬细胞炎症反应的发生, 白藜芦醇能明显抑制 MSU 诱导 RAW264.7 巨噬细胞分泌 TNF- α 水平。

3 白藜芦醇对 MSU 诱导 RAW264.7 巨噬细胞内 ROS、SOD 和 MDA 含量的影响

如图 3 所示, 与对照组相比, MSU 组细胞内 ROS 和 MDA 含量明显增高 ($P < 0.05$), SOD 含量明显减少 ($P < 0.05$); 加入 20、40 和 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白藜芦醇后, ROS 及 MDA 表达均有所降低, SOD 含量均增高; 与 MSU 组相比, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白藜芦醇作用最为明显 ($P < 0.05$)。结果提示, MSU 能够促进 RAW264.7 巨噬细胞的氧化

应激反应, 白藜芦醇能明显抑制 MSU 所诱导的氧化应激。

4 白藜芦醇对 MSU 诱导 RAW264.7 巨噬细胞内 Nrf2、Keap1、NQO1 和 HO-1 mRNA 表达量的影响

如图 4A~D 所示, 与对照组相比, MSU 组细胞内 Keap1 mRNA 表达量明显增高 ($P < 0.05$), Nrf2、NQO1 和 HO-1 mRNA 表达量均明显减少 ($P < 0.05$); 加入 20、40 和 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白藜芦醇后, Keap1 mRNA 表达量降低, Nrf2、NQO1 和 HO-1 mRNA 表达量均增高, 白藜芦醇 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 Keap1 mRNA 表达量为 MSU 组的 0.746 倍 ($P < 0.05$), Nrf2、NQO1 和 HO-1 mRNA 表达量分别为 MSU 组的 2.176、3.237 和 16.76 倍 ($P < 0.05$), 作用最为明显。结果提示, MSU 能够激活 Keap1/Nrf2 信号通路, 白藜芦醇通过抑制 Keap1 mRNA 表达, 增加 Nrf2、NQO1 和 HO-1 mRNA 的表达起到抗氧化作用。

讨论

痛风是由于嘌呤代谢紊乱所致的一组慢性炎症性疾病, AGA 是痛风最常见的首发症状^[11]。MSU 是 AGA 的关键诱导因素, 其诱导的炎症是痛风的病理基础^[12]。单核巨噬细胞系统在 MSU 触发的痛风炎症启动、进展及缓解中均起到核心作用^[13]。研究发现, MSU 可直接刺激单核/巨噬细胞产生 TNF- α , 从而促发痛风炎症反应^[14]。在 MSU 诱导的 AGA 模型中, 通过阻断 TNF- α 的产生能明显抑制内皮细胞的激活和多形核白细胞的募集, 从而抑制炎症的发生^[15]。说明 TNF- α 在 AGA 的发生、发展中起着极其重要的作用。本实验使用 MSU

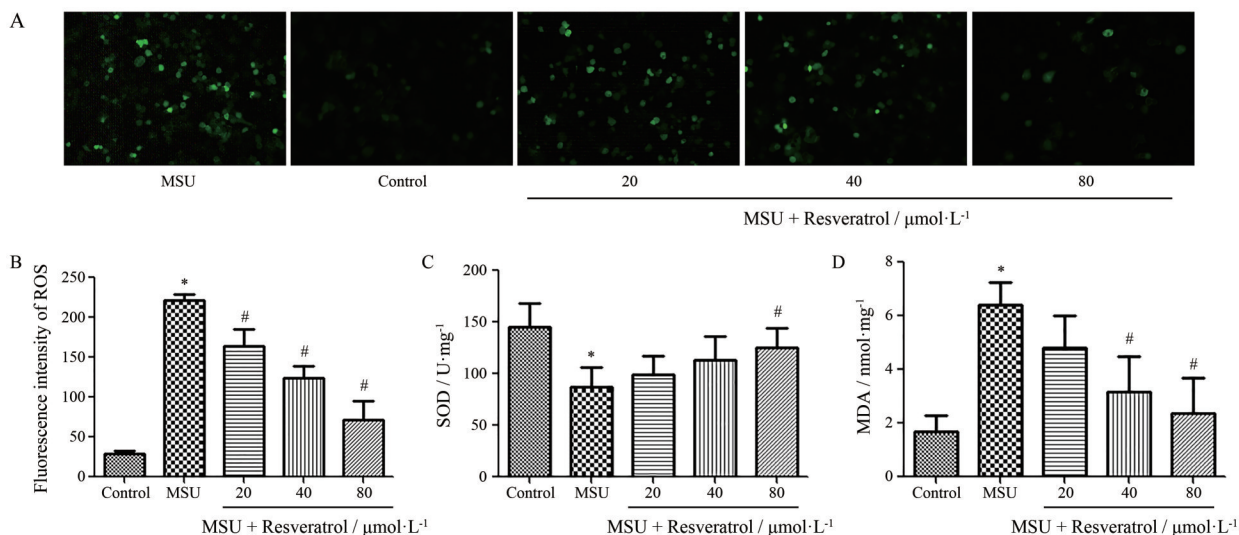


Figure 3 Effects of resveratrol on ROS, SOD, MDA stimulated by MSU in RAW264.7 cells. A, B: Expression of ROS was detected in RAW264.7 cells by DCFH-DA fluorescence probe; C: Expression of SOD was detected in RAW264.7 cells by the SOD assay; D: Expression of MDA was detected in RAW264.7 cells by the MDA assay. ROS: Reaction oxygen species; SOD: Superoxide dismutase; MDA: Malonaldehyde. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs MSU group

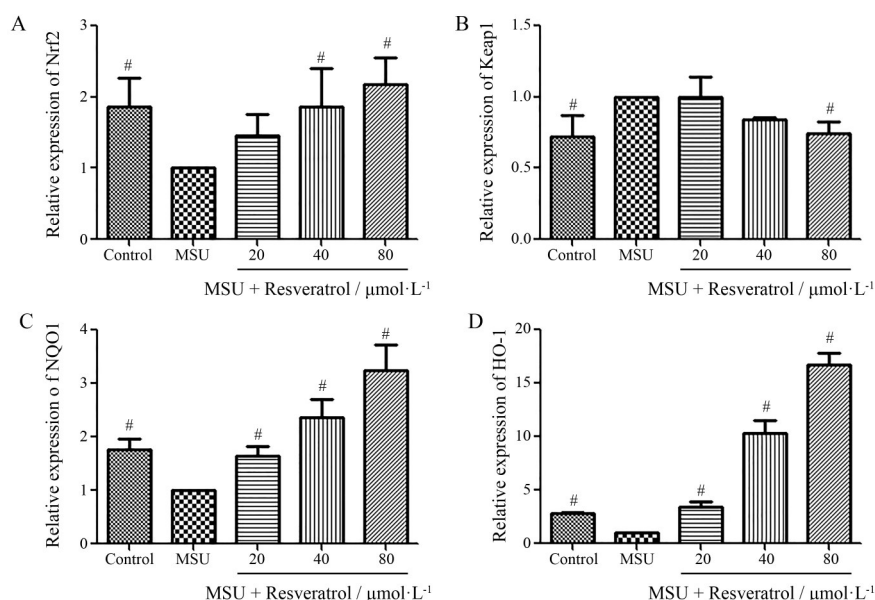


Figure 4 Effects of resveratrol on the expression of Nrf2, Keap1, NQO1, HO-1 mRNA stimulated by MSU in RAW264.7 cells. A, B, C, D: Relative expression of Nrf2, Keap1, NQO1, HO-1 mRNA were detected in RAW264.7 cells by Real time PCR, respectively. Nrf2: nuclear factor erythroid-2-related factor 2; Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1; NQO1: NAD(P)H quinoneoxidoreductase 1; HO-1: Heme oxygenase 1. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. # $P < 0.05$ vs MSU group

刺激RAW264.7巨噬细胞,发现细胞上清中TNF- α 水平明显增高,说明MSU能够通过诱导RAW264.7巨噬细胞炎症反应的发生,建立炎症细胞模型。

白藜芦醇广泛存在于自然界植物中,多项研究证明其具有治疗痛风的作用,但具体机制尚未阐明^[16]。Xiao等^[17]认为白藜芦醇可能通过促进巨噬细胞M2极化,抑制炎症因子产生,缓解小鼠AGA。本实验使用不同浓度白藜芦醇作用于RAW264.7细胞,发现白藜芦醇能抑制RAW264.7巨噬细胞增殖,具有浓度和时间依赖性,并发现白藜芦醇能明显抑制MSU诱导RAW264.7巨噬细胞分泌的TNF- α 水平,以80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用最为明显,说明白藜芦醇能抑制MSU所诱导的细胞炎症反应的发生。

氧化应激损伤主要由活性氧物质所致,当机体受到外来刺激干扰,会加速ROS形成,并加剧脂质氧化反应。MDA是脂质过氧化产物,含量的大小可反映机体内脂质过氧化的程度,间接地反映出细胞损伤的程度^[18]。大量ROS和MDA的产生能够导致关节的损伤,出现剧烈疼痛和功能障碍。SOD是抗氧化防御系统的重要组成部分,能够清除机体内过多的ROS和MDA,具有保护细胞和组织的作用,SOD活力的高低间接反映了机体抗氧化应激能力^[19]。本实验证实,MSU能明显增高RAW264.7巨噬细胞内ROS和MDA含量,并显著降低SOD含量,说明MSU能够促进RAW264.7巨噬细胞的氧化应激反应。研究发现,使用过氧化氢

(H_2O_2)诱导THP-1源性巨噬细胞氧化损伤模型,白藜芦醇能使氧化损伤巨噬细胞MDA含量明显下降,SOD活力显著升高,并明显降低巨噬细胞的IL-1 β 、IL-6和TNF- α 表达^[20]。还有研究发现佐剂性关节炎(AA)大鼠存在氧化应激,白藜芦醇能够显著降低AA大鼠足肿胀度,降低MDA含量,提高SOD活性,发挥抗氧化能力^[21]。本实验以RAW264.7巨噬细胞为研究对象,发现白藜芦醇能明显抑制MSU诱导RAW264.7巨噬细胞内的ROS和MDA表达,增加SOD表达,以80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度作用最为明显。说明白藜芦醇能够明显抑制MSU所诱导的氧化应激。

Nrf2信号通路为重要的内源性抗氧化通路,Nrf2是调节体内氧化应激进行自我保护并与炎症相关的关键转录因子,几乎在全身各组织器官中都有表达^[22]。静息状态下,Nrf2与胞质中的Keap1相结合,处于非活性状态;当机体受到其他亲核物质刺激或处于氧化应激状态时,Nrf2与Keap1解偶联后转入核内,与抗氧化反应元件(ARE)结合,激活NQO1和HO-1等下游II相代谢酶及抗氧化蛋白基因的表达,以减少氧化损伤,发挥保护细胞的作用^[23]。HO-1是血红素降解的限速酶,在抗炎和抗氧化性组织损伤中具有重要作用^[24]。NQO1在胞浆内属于II相抗氧解毒酶,能阻止氧化应激反应,并减少ROS的产生,使细胞免受氧化损伤^[25]。研究发现,白藜芦醇能够抑制脂多糖(LPS)诱导RAW264.7巨噬细胞所产生的炎症因子,并促进HO-1表达^[26]。白藜

芦醇还能抑制黄曲霉毒素B1诱导的MAC-T牛乳腺上皮细胞ROS升高,并通过Nrf2信号通路发挥抗氧化作用^[27]。本实验使用MSU刺激RAW264.7巨噬细胞,明显增高细胞内Keap1 mRNA表达,明显减少Nrf2、NQO1和HO-1 mRNA表达量。说明MSU能够激活RAW264.7巨噬细胞Keap1/Nrf2信号通路。白藜芦醇干预后,Keap1 mRNA表达量降低,Nrf2、NQO1和HO-1 mRNA表达量均增高,以80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度作用最为明显。说明白藜芦醇能够通过Keap1/Nrf2信号通路起到抗氧化作用。

综上,白藜芦醇能抑制MSU诱导RAW264.7巨噬细胞产生的炎症反应,并通过调节Nrf2/HO-1信号通路提高巨噬细胞抗氧化能力,为白藜芦醇防治AGA提供了实验依据。

作者贡献: 冯佳、袁林负责提出研究选题及设计研究方案;冯佳、黄侠、鞠单负责实施研究过程;李赫宇负责材料支持;杨年安、田瑞负责采集整理数据;冯佳、夏燕负责起草、修改论文;袁林负责技术指导。

利益冲突: 本研究不存在研究者与公开研究成果有关的利益冲突。

References

- [1] Cronstein BN, Sunkureddi P. Mechanistic aspects of inflammation and clinical management of inflammation in acute gouty arthritis [J]. J Clin Rheumatol, 2013, 19: 19-29.
- [2] Zhou M, Wang YF, Yuan JQ, et al. Research progress on the immune-pathogenesis of acute gouty arthritis [J]. World Clin Drug (世界临床药物), 2018, 39: 62-65.
- [3] Kingsbury SR, Conaghan PG, Mcdermott MF. The role of the NLRP3 inflammasome in gout [J]. J Inflamm Res, 2011, 4: 39-49.
- [4] Trevisan G, Hoffmeister C, Rossato MF, et al. TRPA1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger hyperalgesia and inflammation in a model of acute gout [J]. Free Radic Biol Med, 2014, 72: 200-209.
- [5] Krajka-Kuźniak V, Paluszczak J, Baer-Dubowska W, et al. The Nrf2-ARE signaling pathway: an update on its regulation and possible role in cancer prevention and treatment [J]. Pharmacol Rep, 2017, 69: 393-402.
- [6] Dinesh P, Rasool MK. Berberine, an isoquinoline alkaloid suppresses TXNIP mediated NLRP3 inflammasome activation in MSU crystal stimulated RAW 264.7 macrophages through the upregulation of Nrf2 transcription factor and alleviates MSU crystal induced inflammation in rats [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 44: 26-37.
- [7] Dong W, Wang R. Effects of resveratrol-induced cellular autophagy in control of neurodegenerative diseases [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 24-28.
- [8] Li HM, Ou GC, He YL, et al. Resveratrol attenuates the MSU crystal-induced inflammatory response through the inhibition of TAK1 activity [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 67: 62-68.
- [9] Yadav A, Sunkaria A, Singhal N, et al. Resveratrol loaded solid lipid nanoparticles attenuate mitochondrial oxidative stress in vascular dementia by activating Nrf2/HO1 pathway [J]. Neurochem Int, 2018, 112: 239-254.
- [10] Xu W, Sun WF, Li J. Influence of monosodium urate crystals on vitality and chemotaxis to the neutrophils of cells related to gouty arthritis [J]. Military Med J South China (华南国防医学杂志), 2015, 29: 4-7.
- [11] Zhou JG. Gout and its multiple system damage [J]. Chin J Clin (中华临床医师杂志), 2013, 7: 15-17.
- [12] Guo YX, Xiong H, Yi FY, et al. Effect of Juanbi Lijieqing Formula on TLR4, NF- κ B and PPAR γ in synovial membrane of rats with amelioration of gouty arthritis [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2018, 24: 126-133.
- [13] Zhang MY, Li Z, Li XQ, et al. Effects of differentiated macrophages on gouty inflammation [J]. Acta Acad Med Wannan (皖南医学院学报), 2016, 35: 320-323.
- [14] Amaral FA, Costa VV, Tavares LD, et al. NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hyper nociception depend on leukotriene (B)₄ in a murine model of gout [J]. Arthritis Rheum, 2012, 64: 474-484.
- [15] Chapman PT, Yarwood H, Harrison AA, et al. Endothelial activation in monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation: *in vitro* and *in vivo* studies on the roles of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 [J]. Arthritis Rheum, 1997, 40: 955-965.
- [16] Yang QB, He YL, Zhong XW, et al. Resveratrol ameliorates gouty inflammation via upregulation of sirtuin 1 to promote autophagy in gout patients [J]. Inflammopharmacology, 2019, 27: 47-56.
- [17] Xiao WZ, Zhao L, Zou HJ. Resveratrol promotes macrophage M2 polarization and alleviates acute gouty arthritis in mice [J]. Acad J Sec Mil Med Univ (第二军医大学学报), 2019, 40: 860-865.
- [18] Huang F, Sheng XX, Zhang HJ. DUSP26 regulates podocyte oxidative stress and fibrosis in a mouse model with diabetic nephropathy through the mediation of ROS [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 515: 410-416.
- [19] Liu LJ, Qian H, Yin HM, et al. Unsaturated fatty acid of Actinidia chinensis Planch seed oil enhances the antioxidative stress ability of rats with pulmonary fibrosis through activating Keap 1/Nrf 2 signaling pathway [J]. Chin J Cell Mol Immunol (细胞与分子免疫学杂志), 2016, 32: 479-483.
- [20] Song DQ. Study of the Protective Effect and the Mechanism of Resveratrol on THP-1 Macrophages Following Oxidative Injury (白藜芦醇对THP-1源性巨噬细胞氧化损伤的保护作用及机制

- 研究) [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2018.
- [21] Zhang JQ, Song XB, Cao W, et al. Autophagy and mitochondrial dysfunction in adjuvant-arthritis rats treatment with resveratrol [J]. Sci Rep, 2016, 6: 32928.
- [22] Zhang W, Song JK, Yan R, et al. Salvianolic acid A alleviate the brain damage in rats after cerebral ischemia-reperfusion through Nrf2/HO-1 pathway [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 1717-1723.
- [23] Li W, Kong AN. Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response [J]. Mol Carcinog, 2009, 48: 91-104.
- [24] Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism [J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73: 3221-3247.
- [25] Yadav U, Kumar P, Rai V, et al. NQO1 gene C609T polymorphism (dbSNP: rs1800566) and digestive tract cancer risk: a meta-analysis [J]. Nutr Cancer, 2018, 70: 557-568.
- [26] Son Y, Chung HT, Pae HO. Differential effects of resveratrol and its natural analogs, piceatannol and 3, 5, 4'-trans-trimethoxystilbene, on anti-inflammatory heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages [J]. Biofactors, 2014, 40: 138-145.
- [27] Zhou YF, Jin YC, Yu H, et al. Resveratrol inhibits aflatoxin B1-induced oxidative stress and apoptosis in bovine mammary epithelial cells and is involved the Nrf2 signaling pathway [J]. Toxicon, 2019, 6: 10-15.