

· 论著 ·

DOI: 10.12464/j.issn.0253-9802.2024-0475

胸腺素 $\beta 4$ 在 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型中的抗炎作用机制

吴天羽¹, 林昱君¹, 林笑宇¹, 朱轶¹, 余慕雪¹, 刘王凯^{1,2}✉

(1. 中山大学附属第一医院新生儿科, 广东 广州 510080; 2. 广东省妇幼保健院儿科, 广东 广州 511400)

【摘要】 目的 探讨胸腺素 $\beta 4$ (T $\beta 4$) 对脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠单核-巨噬细胞 RAW264.7 极化趋向, 以及其对炎症反应的影响。方法 用 LPS 诱导 RAW264.7 细胞建立炎症模型。采用 CCK-8 法检测细胞活力, 酶联免疫吸附法检测细胞因子 [肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6 (IL-6)] 的质量浓度; Griess 法检测细胞培养上清液中一氧化氮 (NO) 的分泌情况; 实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 检测核因子- κB (NF- κB)、环氧酶-2 (COX-2)、TNF- α 、IL-6 mRNA 表达水平; 蛋白免疫印迹法检测诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、NF- κB 、磷酸化 NF- κB (p-NF- κB)、NF- κB 抑制蛋白 α (I κB - α) 和磷酸化 I κB α (p-I κB α) 蛋白水平; 荧光染色双标法观察巨噬细胞的极化状态; 免疫荧光染色检测 NF- κB 定位及表达。结果 1 000 $\mu g/L$ 的胸腺素 $\beta 4$ 作用于 RAW264.7 细胞 24 h 后, 细胞存活率为 90.2%, 与空白对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。各质量浓度的 T $\beta 4$ 均可有效抑制 NO 的产生 (均 $P < 0.000 1$)。T $\beta 4$ 降低 LPS 诱导的炎症模型 RAW264.7 细胞中促炎因子 (TNF- α 和 IL-6) 质量浓度及 NO 浓度, 下调 NF- κB 、COX-2、TNF- α 、IL-6 mRNA 表达水平和 iNOS、p-NF- κB 和 p-I κB α 蛋白表达水平, 抑制 NF- κB 的核转移, 降低 CD80 的表达 (均 $P < 0.05$)。结论 T $\beta 4$ 具有抑制炎症反应的作用, 其机制可能与抑制 NF- κB 信号通路和巨噬细胞 M1 极化有关。

【关键词】 胸腺素 $\beta 4$; 脓毒症; 巨噬细胞; 感染; 炎症; NF- κB 通路

The anti-inflammatory mechanism of thymosin $\beta 4$ in a RAW 264.7 macrophage inflammation model

WU Tianyu¹, LIN Yujun¹, LIN Xiaoyu¹, ZHU Yi¹, YU Muxue¹, LIU Wangkai^{1,2}✉

(1. Department of Neonatology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Pediatrics, Guangdong Maternal and Child Health Hospital, Guangzhou 511400, China)

Corresponding author: LIU Wangkai, E-mail: liuwk@mail.sysu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the effects of Thymosin $\beta 4$ (T $\beta 4$) on the lipopolysaccharide (LPS)-induced polarization tendency of murine monocyte-macrophage RAW264.7 cells and its influence on inflammatory responses. **Methods** An inflammation model was established by LPS induction in RAW264.7 cells. Cell viability was assessed using the CCK-8 assay. The concentrations of cytokines [tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6)] were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Nitric oxide (NO) secretion in the cell culture supernatant was detected using the Griess method. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was employed to detect mRNA expression levels of nuclear factor- κB (NF- κB), cyclooxygenase-2 (COX-2), TNF- α , and IL-6. Western blotting was used to analyze protein levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS), NF- κB , phosphorylated NF- κB (p-NF- κB), NF- κB inhibitor α (I κB - α), and phosphorylated I κB α (p-I κB α). The polarization status of macrophages was observed using double fluorescence staining. Immunofluorescence staining was performed to examine NF- κB localization and expression. **Results** After treatment with 1 000 $\mu g/L$ T $\beta 4$ for 24 hours, the cell viability of RAW 264.7 cells was 90.2%, showing a statistically significant difference compared to the blank control group ($P < 0.05$). T $\beta 4$ at various concentrations effectively inhibited NO production (all $P < 0.000 1$). T $\beta 4$ decreased the concentrations of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-6) and NO in the LPS-induced RAW264.7 inflammatory model. It also downregulated mRNA expression of NF- κB ,

收稿日期: 2024-11-19

基金项目: 广东省自然科学基金 (2022A1515010031)

作者简介: 吴天羽, 硕士研究生, 研究方向: 儿童脓毒症, E-mail: wuty35@mail2.sysu.edu.cn; 刘王凯, 通信作者, 主任医师, 博士生导师, 研究方向: 新生儿危重症疾病诊治及早产儿呼吸、营养管理, E-mail: liuwk@mail.sysu.edu.cn

COX-2, TNF- α , and IL-6, as well as protein expression of iNOS, p-NF- κ B, and p-I κ B α . Additionally, T β 4 inhibited NF- κ B nuclear translocation and decreased CD80 expression (all $P < 0.05$). **Conclusion** T β 4 exhibits anti-inflammatory effects, the mechanisms of which may be associated with the inhibition of the NF- κ B signaling pathway and suppression of macrophage M1 polarization.

[Key words] Thymosin β 4; Sepsis; Macrophages; Infection; Inflammation; NF- κ B pathway

脓毒症是由感染引起的宿主反应失调, 导致危及生命的器官功能障碍^[1], 是重症患者最常见的死亡原因^[2]。在脓毒症中, 机体对感染的反应导致免疫细胞激活和大量炎症介质的释放, 这些炎症介质诱发了局部或全身性的炎症反应。若炎症反应进一步恶化并导致免疫系统严重受抑, 便可能引发脓毒症, 这表明机体的免疫和炎症反应已经失衡至无法自我调节的程度^[3]。炎症反应是身体对感染或组织损伤的自然反应, 构成了防御外来病原体的前线。脓毒症反应的发病机制包括炎症反应、免疫失调等复杂反应^[4]。巨噬细胞的持续性激活是推动脓毒症反应进展的关键因素之一^[5]。研究表明, 巨噬细胞作为炎症反应的核心细胞, 是固有免疫不可或缺的组成部分, 在脓毒症的发生、发展中起着至关重要的作用^[6]。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 作为革兰阴性细菌感染的生物标志物^[7], 其诱导的 RAW264.7 巨噬细胞是经典的细胞炎症模型, 而 RAW264.7 细胞炎症模型也是筛选抗炎药物的经典模型^[8]。因此, 抑制巨噬细胞的炎症反应可为脓毒症的治疗提供新的思路, 对其深入研究具有一定的价值。

胸腺素 β 4 (thymosin β 4, T β 4) 是一种小分子多肽, 广泛且保守地存在于哺乳动物 (除红细胞外) 的各类细胞中^[9]。其不仅分布于细胞质与细胞核中, 还能作为内分泌因子参与机体多种生理功能的调节。现有研究表明, T β 4 具有保护并修复心肌组织、促进角膜修复和伤口愈合、诱导血管新生、参与神经系统的修复、促进毛发的生长以及减轻炎症损伤等多种生物学功能^[10]。此外研究表明, T β 4 可作用于核因子 - κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 信号通路, 从而改善肝纤维化^[11]。然而, 当前对于 T β 4 的抗炎作用机制的了解尚不全面。因此, 本研究通过使用 LPS 激活 RAW264.7 细胞, 构建体外炎症模型, 探索 T β 4 对于 RAW264.7 细胞中的炎症反应及其在 NF- κ B 信号通路中的作用, 以期明确 T β 4 的抗炎活性和相关机制, 为 T β 4 的深入研究和临床应用推广提供实验数据支撑, 并为脓毒症的临床治疗提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

包括 Raw264.7 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 (RAW264.7, 上海中乔新舟生物科技有限公司), T β 4 冻干粉剂 (上海易恩化学技术有限公司), 大肠杆菌来源脂多糖 LPS [西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司], CCK-8 试剂盒 (上海碧云天生物技术股份有限公司), 一氧化氮 (nitric oxide, NO) 检测试剂盒 (上海碧云天生物技术股份有限公司), 白介素 -6 (interleukin-6, IL-6) 及肿瘤坏死因子 - α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的酶联免疫吸附测定试剂盒 (欣博盛生物科技有限公司), 反转录预混型试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司), ChamQ qPCR 专用预混液试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司), 一抗 I κ B α 、磷酸化 I κ B α (phospho-I κ B α , p-I κ B α)、NF- κ B 的转录活性形式磷酸化 NF- κ B p65 (phospho-NF- κ B p65, p-NF- κ B p65)^[12] 购于美国 Cell Signaling Technology 公司, NF- κ B p65 (蛋白免疫印迹法)、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 购于英国 Abcam 公司, 辣根过氧化物酶标记的二抗购于北京博奥森生物技术有限公司, NF- κ B p65 (免疫荧光法)、CD80/B7-1 抗体、CD86 抗体均购于美国 Proteintech 公司。

1.2 细胞培养

将小鼠单核巨噬细胞 (RAW264.7) 置于 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中传代, 在含 5%CO₂、37 °C 的细胞培养箱中孵育。

1.3 RAW264.7 细胞存活率的测定

采用 CCK-8 法: 取传代 RAW264.7 细胞以每孔 1×10^4 个细胞的密度接种到 96 孔细胞培养板中, 并在 37°C、5% CO₂ 条件下的细胞培养箱中培养 24 h。然后弃培养液, 向每孔中加入 100 μ L 含有不同质量浓度 T β 4 (0~1 000 μ g/L) 的细胞培养基, 每个质量浓度设置 3 个重复孔 (后续相同), 继续培养 24 h。之后, 向每孔中加入 10 μ L 的增强型 CCK-8 溶液培养 1 h。最后, 在 450 nm 波长处测量吸光度。细胞存活率为给药组细胞 OD 值与对照组细胞

OD值的百分比。

1.4 一氧化氮浓度的测定

采用 Griess 法：取一个无菌的 24 孔细胞培养板，每孔中加入 1 000 μL 的细胞悬浮液（每毫升 3×10^5 个细胞）。培养 24 h 后，倒去培养液。然后，向每个孔中分别加入含有 LPS（1 ng/L）和不同质量浓度 T β 4（0、50、100、200、500 $\mu\text{g/L}$ ）的细胞培养液 500 μL ，继续培养 24 h。培养结束后，收集每孔中的上清液，使用 NO 检测试剂盒检测含量。

1.5 肿瘤坏死因子- α 和白介素-6 质量浓度的测定

按“1.4”项的方法处理细胞。培养 24 h 后，弃上清液。T β 4 组添加含 50 $\mu\text{g/L}$ T β 4 和 1 ng/L LPS 的培养基，另设仅含 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 的 LPS 组和使用空白培养基的空白组，培养 24 h 后，取细胞上清液，使用酶联免疫吸附法测定培养上清液中 TNF- α 及 IL-6 的含量。

1.6 RAW264.7 细胞中细胞因子 mRNA 表达水平的测定

按“1.4”项的方法处理细胞，采用实时荧光定量聚合酶链反应（real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR）检测 NF- κ B、COX-2、TNF- α 、IL-6 的 mRNA 表达水平。收集细胞，提取总 RNA。将 RNA 逆转录为模板 DNA。各基因引物序列如表 1 所示。以 GAPDH 为内参，使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算样品中基因的相对含量。

表 1 引物序列
Table 1 Sequences of the primers

基因	引物序列（5'-3'）
NF- κ B	正向：TGGAAGGCTCATGGTTGGATGTG 反向：AGTGACTTTATGGGAACCCGATGG
COX-2	正向：TCCAACCTCTCCTACTACACCAG 反向：GGGTCAGGGATGAACTCTCTC
TNF- α	正向：CCACCACGCTCTTCTGTCTACTG 反向：TGTTTCTGAGTGTGAGGGTCTG
IL-6	正向：GGGACTGATGCTGGTGACAACC 反向：CATGTGTAATTAAGCCTCCGACTTGTG
GAPDH	正向：CGACTTCAACAGCAACTCCCACTCTTCC 反向：TGGGTGGTCCAGGGTTTCTTACTCCTT

1.7 蛋白表达水平的测定

采用蛋白免疫印迹法分析：按“1.4”项的方法处理细胞，收集细胞，每孔加入 RIPA 充分裂解后，提取细胞蛋白并检测蛋白含量。蛋白煮沸 5 min 后，电泳分离蛋白并转膜。室温下，使用快

速封闭液封闭 30 min 后，4 $^{\circ}\text{C}$ 一抗过夜孵育，清洗后加入相应二抗孵育 2 h。最后加入 ECL 发光。以 GAPDH 为内参，使用 ImageJ 分析蛋白条带灰度值，并计算各蛋白的相对表达量。

1.8 免疫荧光检测

巨噬细胞可以极化成为 M1 型巨噬细胞和 M2 型巨噬细胞^[13]。在 LPS 的刺激下，巨噬细胞可发生 M1 型极化，促进炎症反应，是炎症性疾病的基础^[14]。CD80 是 M1 型巨噬细胞的表面标记物^[15]，通过免疫荧光标记法检测 CD80 的表达可观察巨噬细胞向 M1 型极化的程度，从而反映巨噬细胞的炎症反应状态。CD80 表达降低则说明巨噬细胞向 M1 型极化的效应减轻，炎症反应得到抑制。细胞中 NF- κ B 二聚体的核转移是调节基因表达程序和生物反应的基础^[16]，核转移减少可说明 NF- κ B 通路得到抑制，炎症反应减轻。按“1.4”项的方法处理细胞，收集细胞，用 4% 的多聚甲醛固定，封闭液处理 30 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 一抗孵育过夜（NF- κ B 稀释比例为 1 : 100，CD80 稀释比例为 1 : 200，CD86 稀释比例为 1 : 100）。次日清洗后加入相应荧光二抗（稀释比例为 1 : 500），湿盒中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h，清洗后滴加 DAPI 避光孵育 5 min 染核，用含抗荧光淬灭剂的封片液封片，然后在荧光显微镜下观察采集图像。在细胞核转移分析中，获取图像后，用 ImageJ 软件分析，统计出每个视野的 DAPI 数量和 NF- κ B 入核数量（核转移率为入核细胞数量与 DAPI 数量的百分比）。针对 CD80 表达的检测，获取图像后，用 ImageJ 软件分析，平均荧光强度等于所求区域荧光强度总和与区域面积荧光强度的比值。

1.9 统计学方法

数据采用 GraphPad Prism 9.4.0 进行分析与绘图。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 Dunnett 检验、Tukey 检验。双侧 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 胸腺素 β 4 对 RAW264.7 细胞存活率的影响

CCK-8 法检测 T β 4 对 RAW264.7 细胞存活率的结果显示，与对照组相比，当 RAW264.7 细胞分别经 50、100、200、500 $\mu\text{g/L}$ 的 T β 4 处理 24 h 后，各处理组的细胞存活率比较差异无统计学意义（均 $P > 0.05$ ）。1 000 $\mu\text{g/L}$ 的胸腺素 β 4 作用于

RAW264.7 细胞 24 h 后, 细胞存活率为 90.2%, 与空白对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 胸腺素 $\beta 4$ 对细胞存活率的影响
Table 2 The effect of T $\beta 4$ on cell survival rate

组别	细胞存活率 /%	F 值	P 值
空白对照组	100		
T $\beta 4$ 50 $\mu\text{g/L}$ 组	102.485 \pm 4.966	8.623	0.001 1
T $\beta 4$ 100 $\mu\text{g/L}$ 组	103.645 \pm 1.834		
T $\beta 4$ 200 $\mu\text{g/L}$ 组	102.345 \pm 4.531		
T $\beta 4$ 500 $\mu\text{g/L}$ 组	96.054 \pm 0.521		
T $\beta 4$ 1 000 $\mu\text{g/L}$ 组	90.294 \pm 2.247 ^a		

注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.01$ 。

2.2 胸腺素 $\beta 4$ 降低脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞中一氧化氮的生成

各质量浓度的 T $\beta 4$ 均可有效抑制 NO 的产生 (均 $P < 0.000 1$)。见表 3。

表 3 不同条件下胸腺素 $\beta 4$ 对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞释放一氧化氮的影响

Table 3 Effects of T $\beta 4$ on LPS induced NO release in RAW264.7 cells under different conditions

组别	NO 浓度 / ($\mu\text{mol/L}$)	F 值	P 值
空白对照组	3.285 \pm 1.796		
LPS 组	34.044 \pm 5.490	44.374	<0.000 1
T $\beta 4$ 50 $\mu\text{g/L}$ 组	11.878 \pm 0.448 ^{ab}		
T $\beta 4$ 100 $\mu\text{g/L}$ 组	14.485 \pm 1.233 ^{ab}		
T $\beta 4$ 200 $\mu\text{g/L}$ 组	12.325 \pm 0.976 ^{ab}		
T $\beta 4$ 500 $\mu\text{g/L}$ 组	13.294 \pm 2.477 ^{ab}		

注: NO 为一氧化氮; 与空白对照组比较, ^a $P < 0.000 1$; 与 LPS 组比较, ^b $P < 0.000 1$ 。

2.3 胸腺素 $\beta 4$ 减少脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞中细胞因子的分泌及表达

RAW264.7 细胞经 LPS 处理 24 h 后, 培养上清液中的 TNF- α 、IL-6 质量浓度相较于空白组增加 (均 $P < 0.000 1$)。与 LPS 处理组相比, 50 $\mu\text{g/L}$ 的 T $\beta 4$ 处理降低了 RAW264.7 细胞中 TNF- α 、IL-6 的分泌 (均 $P < 0.01$)。RT-qPCR 测定 RAW264.7 细胞中 COX-2、IL-6、TNF- α 、NF- κB 的表达水平结果显示, T $\beta 4$ 处理降低了 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 COX-2、IL-6、TNF- α 、NF- κB mRNA 表达水平 (均 $P < 0.01$)。见图 1。

2.4 脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞炎症相关蛋白及核因子- κB 通路相关蛋白表达变化

与 Control 组相比, LPS 组 p-I κB - α 、iNOS、p-NF- κB p65 的蛋白表达水平较高 (均 $P < 0.001$)。与 LPS 组相比, T $\beta 4$ 组 p-I κB - α 、iNOS、p-NF- κB p65 的表达水平低于 LPS 组 (均 $P < 0.01$)。见图 2。

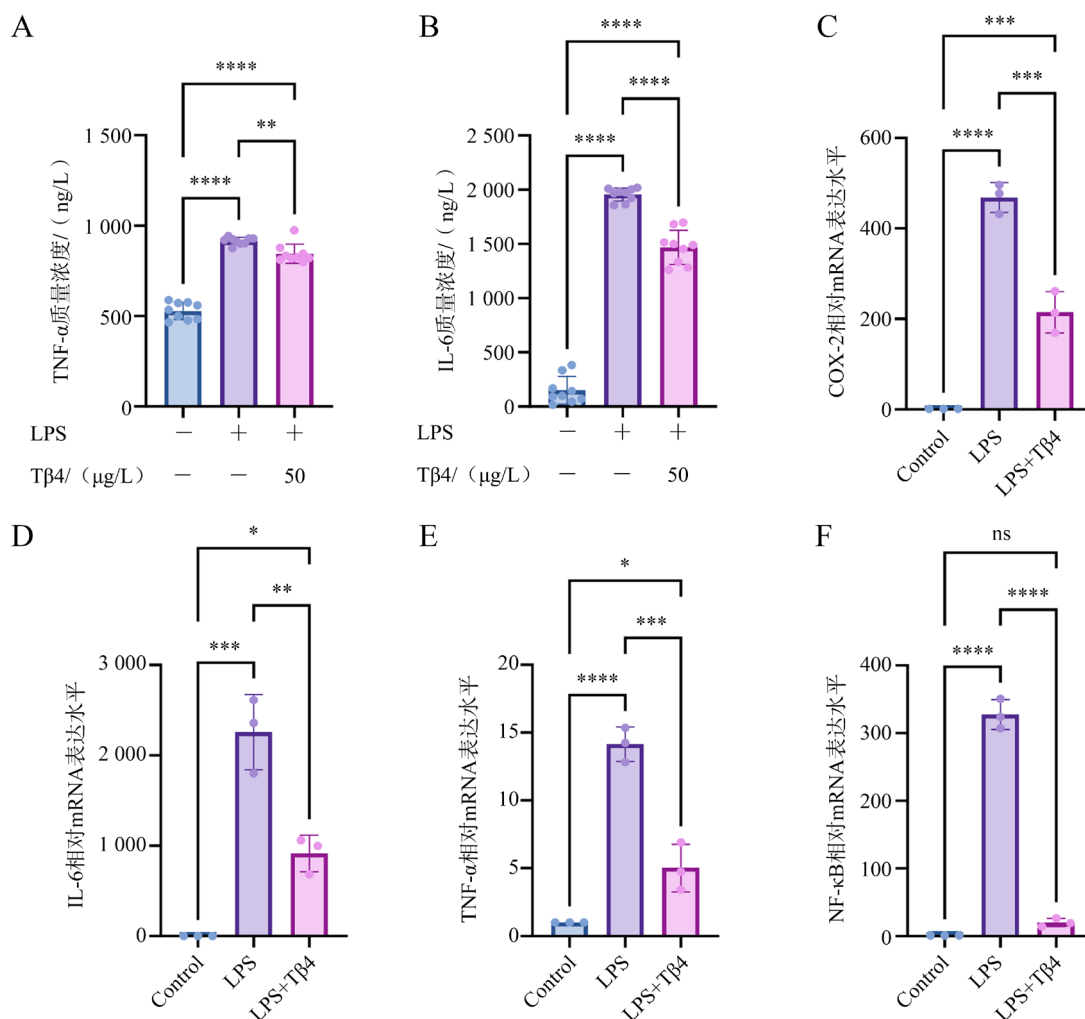
2.5 胸腺素 $\beta 4$ 对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞核因子- κB 活化及 M1 极化的影响

与 Control 组相比, LPS 组 NF- κB 核转移增多; 与 LPS 组相比, T $\beta 4$ 组 NF- κB 核转移减少 (均 $P < 0.001$)。见图 3。与 Control 组相比, LPS 组 CD80 表达升高; 与 LPS 组相比, T $\beta 4$ 组 CD80 表达降低 (均 $P < 0.01$)。见图 4。

3 讨论

脓毒症是包括外伤在内的严重感染、烧伤及术后常见并发症, 主要表现为机体炎症细胞的大量活化, 构成炎症因子风暴, 引起多器官功能衰竭而致死^[17]。炎症是机体组织受损 (如各种炎症因子) 时发生的一系列保护性反应^[18]。炎症反应对于抵抗细菌和病毒感染至关重要, 但如果炎症反应持续或过度, 可能会引发一系列病理生理变化, 从而增加多种疾病如糖尿病、支气管哮喘、类风湿关节炎等的发生风险。在极端情况下, 过度的炎症反应甚至可能导致多器官功能障碍综合征, 这是一种可能危及生命的严重状况^[19]。因此, 开发安全、有效的抗炎药物是一项长期且重要的科研任务。

巨噬细胞是一类关键的免疫细胞, 它们在维持组织稳态、炎症反应和疾病进展中扮演着至关重要的角色^[20]。炎症的启动和消退受到巨噬细胞调控。巨噬细胞可极化成为 M1 型巨噬细胞和 M2 型巨噬细胞。当巨噬细胞极化成 M1 型时可促进炎症反应, 而 M2 型极化可以抑制机体过度炎症反应。M1 型巨噬细胞是促炎细胞因子 IL-1、IL-6、TNF- α 的主要来源^[21], 是导致多数炎症性疾病的基础^[22]。巨噬细胞在炎症反应中发挥重要作用, 能够识别病原体相关的分子模式, 如 LPS。LPS 通过细胞表面表达的 toll 样受体 (toll-like receptor, TLR) 激活巨噬细胞^[23]。TLR4 作为一种广泛存在于多种组织细胞 (包括单核细胞和巨噬细胞) 中的受体, 能



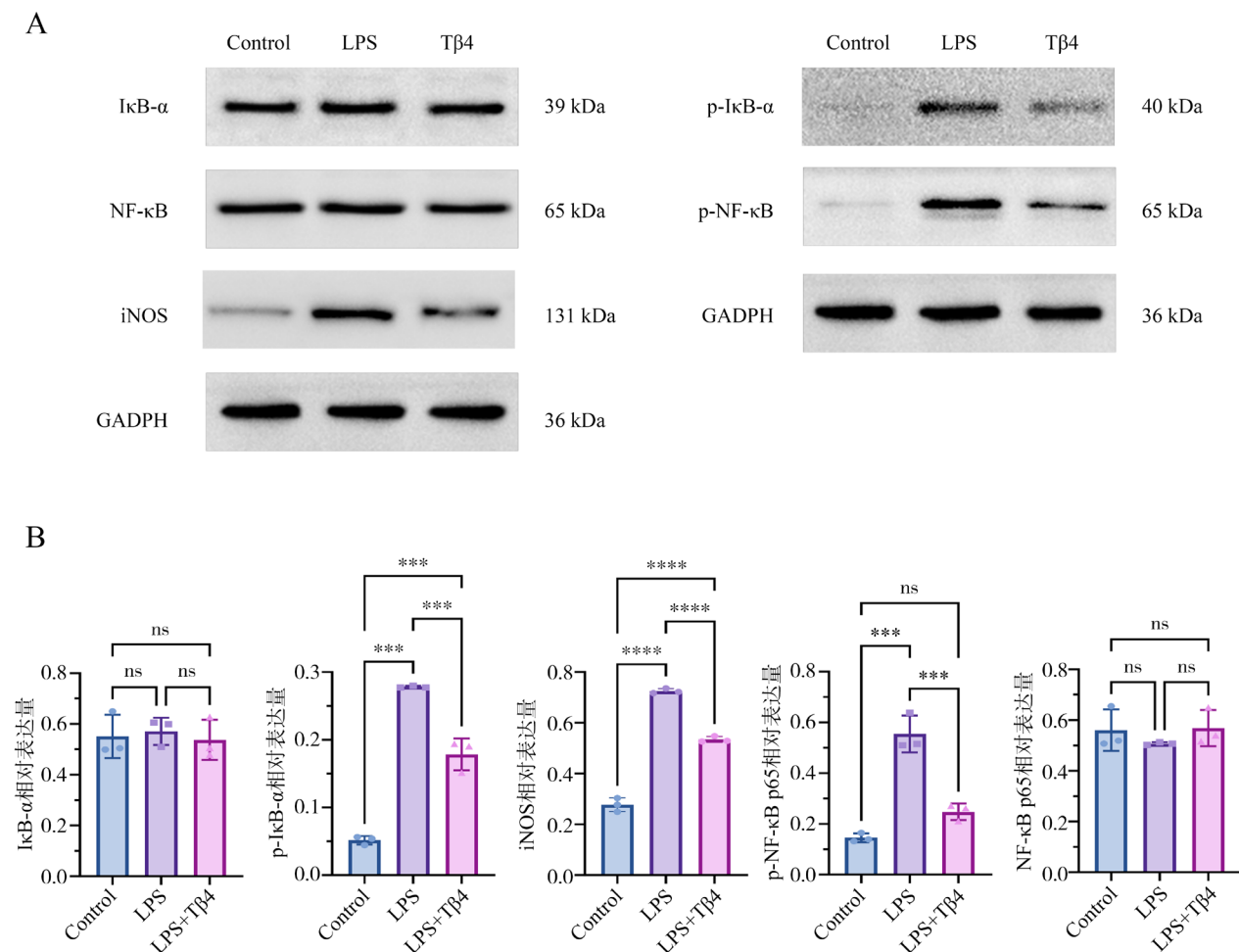
注: A、B 分别为 Tβ4 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞培养上清液中 TNF-α 和 IL-6 质量浓度的影响; C~E 分别为 Tβ4 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞培养上清液中 COX-2、IL-6、TNF-α、NF-κB mRNA 表达水平的影响; 组间比较, ns $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图 1 胸腺素 β4 对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞培养上清液中细胞因子的影响

Figure 1 The effect of Tβ4 on cytokines in LPS induced RAW264.7 cell culture supernatant

够直接识别 LPS, 并通过 NF-κB 信号通路激活细胞内的信号传导过程^[24]。NF-κB 在调控促炎细胞因子的产生中起着至关重要的作用。在静息状态下, NF-κB 是一种重要的转录因子, 它在细胞内与抑制因子 IκB-α 结合, 以非活化状态存在于胞质中。当细胞受到炎症刺激时, IκB 激酶 (inhibitor of κB kinase, IκK) 被激活, 特别是 IκKβ 的活化, 导致 IκB-α 的 N 端调节区的 Ser32/36 位点磷酸化。这一磷酸化过程触发 IκB-α 的泛素化和随后的降解, 从而释放 NF-κB p65 亚基。释放的 NF-κB p65 亚基随后进入细胞核, 与靶基因的 κB 序列结合, 促进炎症相关基因的转录, 包括 TNF-α、IL-6 以及

诱导型 NO 合酶, 后者产生 NO; 这些基因的激活和表达在炎症反应中起着关键作用, 促进炎症介质的产生和炎症过程的进展^[25]。RAW264.7 细胞是一种常用于炎症研究的巨噬细胞模型。受炎症刺激时, RAW264.7 细胞能够分化为促炎性的 M1 型, 并分泌大量促炎细胞因子, 如 TNF-α、IL-6 等^[26]。LPS 是革兰阴性菌细胞壁的主要成分之一, 可以活化巨噬细胞。在 LPS 的刺激下, 巨噬细胞会极化为 M1 型并分泌炎症因子形成强烈的炎症级联反应, 其生物标志物主要有 TNF-α、IL-6、COX-2、NO、iNOS 等^[27]。NO 作为一种重要的炎症信使, 其过度生成并与超氧自由基反应形成过氧亚硝酸



注: A 为蛋白免疫印迹结果; B 为定量分析; 组间比较, ns $P > 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

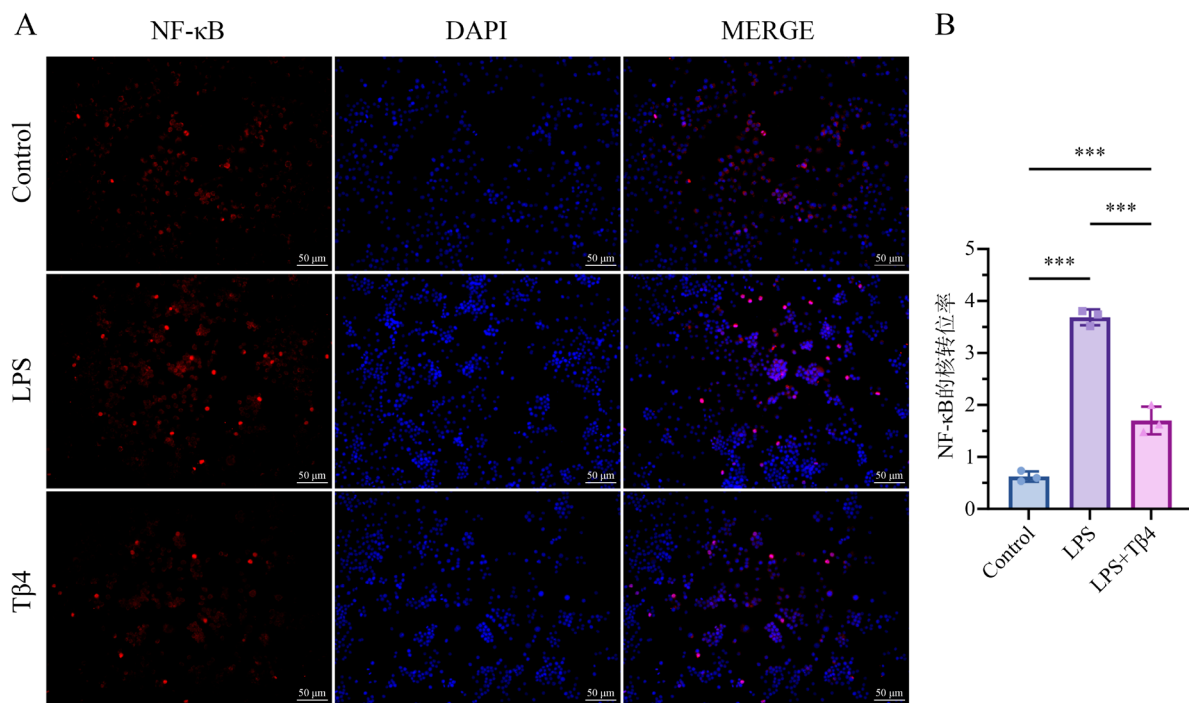
图 2 胸腺素 $\beta 4$ 对脂多糖刺激的 RAW264.7 细胞中与炎症相关的蛋白及核因子 κB 信号通路相关蛋白水平的影响

Figure 2 The effect of T $\beta 4$ on the levels of inflammation related proteins and NF- κB signaling pathway related proteins in LPS stimulated RAW264.7 cells

盐, 与炎症性疾病的进展密不可分^[28]。TNF- α 是一种关键的炎症介质, 它能够激发其他免疫因子的产生, 并促进 NO 的合成, 在炎症反应中扮演着重要角色。IL-6 作为一种典型的炎症介质, 它在感染、组织损伤和炎症过程中被产生和释放, 参与调节多种炎症反应, 包括发热、疼痛、红肿以及局部白细胞的迁移。此外, IL-6 有时与 NF- κB 信号通路相关联, 其信号传导能够激活 NF- κB 通路^[25]。TNF- α 和 IL-6 的释放水平可以作为衡量炎症水平的间接指标。CD80 作为 M1 型巨噬细胞的标志物, 通过免疫荧光技术检测其表达水平可以评估巨噬细胞向 M1 型分化的程度, 从而反映炎症状态。NF- κB 二聚体向细胞核的转移对于调控基因表达程序和生物反应至关重要, 核内转移的减少表明 NF- κB 信号通路受到抑制, 炎症反应得到

减轻。

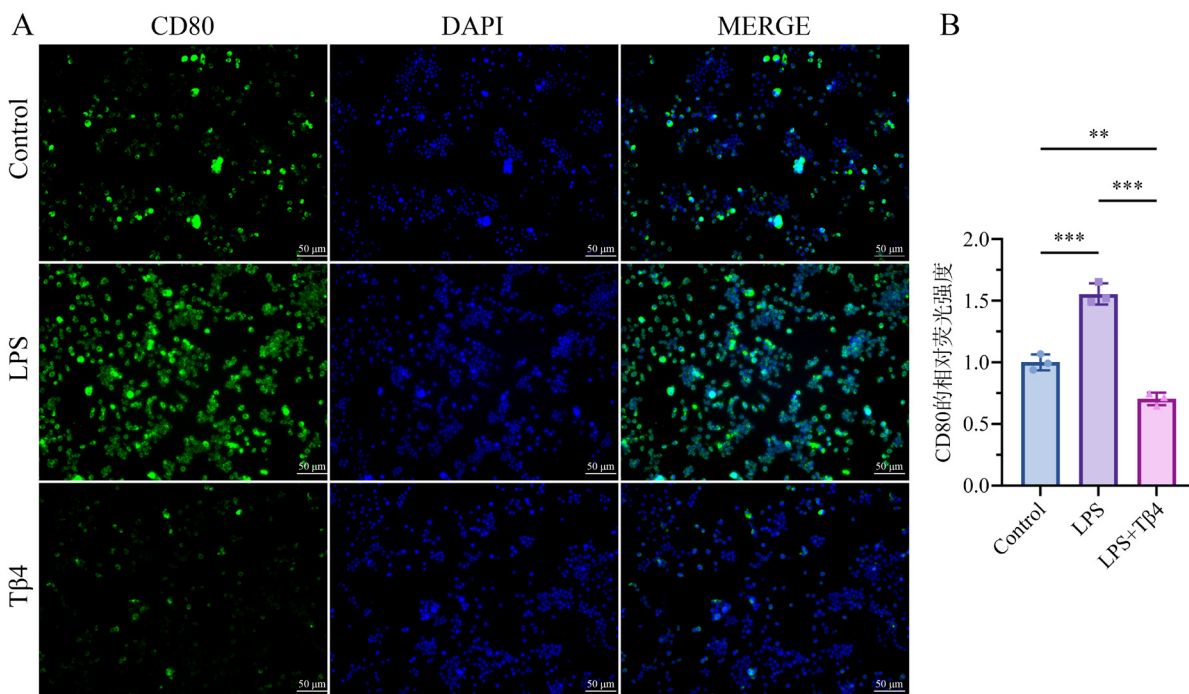
T $\beta 4$ 具有减轻炎症损伤的功能, 本研究旨在探究其抗炎机制: 首先, 采用不同质量浓度 T $\beta 4$ 刺激 RAW264.7 细胞, 发现当 T $\beta 4$ 质量浓度在 50~500 $\mu g/L$ 时, 对 RAW264.7 细胞存活率无明显影响; 质量浓度达到 1 000 $\mu g/L$ 后, 细胞活力下降, 提示其安全剂量范围应小于 500 $\mu g/L$ 。NO 参与多种生理和病理过程。过量的 NO 会促进炎症疾病的发生和发展, 而细胞中 TNF- α 、IL-6 作为炎症因子, 其分泌量可间接反映炎症程度^[29]。本研究使用 Griess 法检测细胞培养上清液中 NO 的分泌情况。当 LPS 刺激 RAW264.7 细胞后, 与对照组相比, NO 分泌量明显升高; 而与 LPS 组相比, 各质量浓度 T $\beta 4$ 均有效抑制 NO 的产生。在炎症因子的表达方面, 酶联免疫吸附法结果显示, LPS 诱导



注：A 为免疫荧光检测结果（DAPI 染色， $\times 200$ ，标尺为 $50\ \mu\text{m}$ ）；B 为定量分析结果；组间比较， $***P < 0.001$ 。

图3 核因子-κB核转移现象

Figure 3 NF-κB nuclear transfer phenomenon



注：A 为免疫荧光检测结果（DAPI 染色， $\times 200$ ，标尺为 $50\ \mu\text{m}$ ）；B 为定量分析结果；组间比较， $**P < 0.01$ ， $***P < 0.001$ 。

图4 M1型巨噬细胞标志物CD80的表达

Figure 4 Expression of M1 macrophage marker CD80

的 RAW264.7 细胞分泌的 IL-6 和 TNF- α 明显增多, 这与刘芬等^[30]的研究结果相符, 他们发现 LPS 能够显著增加炎症因子的表达; 而 T β 4 的干预则降低了促炎因子的水平, 提示经过 T β 4 处理后, 细胞模型的炎症程度减轻^[31]。同时, 本研究还显示 T β 4 抑制了 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 p-NF- κ B 和 pI κ B- α 、INOS 蛋白水平的表达, 表明 T β 4 可通过抑制 I κ B- α 和 NF- κ B P65 的磷酸化来调控 NF- κ B 通路起到抑制炎症的作用。此外, 本研究还观察到 T β 4 降低了 TNF- α 、NF- κ B、COX-2、TNF- α 和 IL-6 等炎症基因的 mRNA 表达水平, 这进一步证实了 T β 4 的抗炎作用。此外, 本研究还通过免疫荧光双标法检测了巨噬细胞极化状态及 NF- κ B 核转移, 并观察了 LPS 刺激和 T β 4 处理对这些过程的影响。实验发现 LPS 显著促进了 NF- κ B 的核转移及 M1 型巨噬细胞标志物 CD80 的表达, 这与 Liu 等^[32]、李梦等^[33]的研究结果一致, 前者发现 LPS 能够诱导巨噬细胞向 M1 型极化, 后者发现巨噬细胞标志物 CD80 的表达增加。T β 4 处理降低了 CD80 的表达, 并减少了 NF- κ B 的核转移。免疫荧光结果表明, 在 T β 4 的作用下, 巨噬细胞向 M1 型极化得到了抑制, 炎症反应得以减轻; 同时, T β 4 可以减少巨噬细胞 NF- κ B 的核转移, 抑制了 NF- κ B 信号通路的效应。上述结果提示 T β 4 具有抑制炎症反应的作用, 其机制可能与抑制 NF- κ B 信号通路有关, 同时与其抑制巨噬细胞的 M1 极化有关。

综上所述, T β 4 显示出对炎症损伤的一定治疗潜力, 其作用机制可能涉及抑制 NF- κ B 信号通路以及巨噬细胞的极化, 从而发挥抗炎效果。这一发现对于开发新的抗炎药物具有重要意义, 特别是在治疗由巨噬细胞极化失衡引起的脓毒症方面。然而, T β 4 与 NF- κ B 之间的直接相互作用及其在巨噬细胞极化中的具体机制仍需进一步研究来阐明。

利益冲突声明: 本研究未受到企业、公司等第三方资助, 不存在潜在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] SINGER M, DEUTSCHMAN C S, SEYMOUR C W, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3) [J]. JAMA, 2016, 315 (8): 801-810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.
- [2] XIE J, WANG H, KANG Y, et al. The epidemiology of sepsis in Chinese ICUs: a national cross-sectional survey [J]. Crit Care Med, 2020, 48 (3): e209-e218. DOI: 10.1097/CCM.0000000000004155.
- [3] SRISKANDAN S, ALTMANN D M. The immunology of sepsis [J]. J Pathol, 2008, 214 (2): 211-223. DOI: 10.1002/path.2274.
- [4] VAN DER POLL T, VAN DE VEERDONK F L, SCICLUNA B P, et al. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets [J]. Nat Rev Immunol, 2017, 17 (7): 407-420. DOI: 10.1038/nri.2017.36.
- [5] LOCATI M, CURTALE G, MANTOVANI A. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity [J]. Annu Rev Pathol, 2020, 15: 123-147. DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718.
- [6] CAVAILLON J M, ADIB-CONQUY M. Monocytes/macrophages and sepsis [J]. Crit Care Med, 2005, 33 (12 Suppl): S506-S509. DOI: 10.1097/01.ccm.0000185502.21012.37.
- [7] WANG X, QUINN P J. Lipopolysaccharide: biosynthetic pathway and structure modification [J]. Prog Lipid Res, 2010, 49 (2): 97-107. DOI: 10.1016/j.plipres.2009.06.002.
- [8] KAUFMANN S, ILG K, MASHAGHI A, et al. Supported lipopolysaccharide bilayers [J]. Langmuir, 2012, 28 (33): 12199-12208. DOI: 10.1021/la3020223.
- [9] GÓMEZ-MÁRQUEZ J, DOSIL M, SEGADÉ F, et al. Thymosin-beta 4 gene. Preliminary characterization and expression in tissues, thymic cells, and lymphocytes [J]. J Immunol, 1989, 143 (8): 2740-2744.
- [10] RENG A, OIKONOMOU V, STINCARDINI C, et al. Thymosin β 4 limits inflammation through autophagy [J]. Expert Opin Biol Ther, 2018, 18 (sup1): 171-175. DOI: 10.1080/14712598.2018.1473854.
- [11] WANG Z, ZHANG Y, WANG Y, et al. Mechanism of thymosin β 4 in ameliorating liver fibrosis via the MAPK/NF- κ B pathway [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2023, 37 (7): e23338. DOI: 10.1002/jbt.23338.
- [12] 王强, 廖清奎. 一氧化氮在炎症反应中的作用 [J]. 医学综述, 2002, 8 (4): 198-200. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2002.04.007.
- [13] WANG Q, LIAO Q K. The role of nitric oxide in inflammatory reaction [J]. Med Recapitul, 2002, 8 (4): 198-200. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2002.04.007.
- [14] YU H, LIN L, ZHANG Z, et al. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5 (1): 209. DOI: 10.1038/s41392-020-00312-6.
- [15] 王晓晨, 吉爱国. NF- κ B 信号通路与炎症反应 [J]. 生理科学进展, 2014, 45 (1): 68-71.
- [16] WANG X C, JI A G. NF- κ B signaling pathway and inflammatory response [J]. Prog Physiol Sci, 2014, 45 (1): 68-71.
- [17] SICA A, MANTOVANI A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas [J]. J Clin Invest, 2012, 122 (3): 787-795. DOI: 10.1172/JCI59643.

- [16] HE C, BRENT CARTER A. The metabolic prospective and redox regulation of macrophage polarization [J]. *J Clin Cell Immunol*, 2015, 6 (6): 371. DOI: 10.4172/2155-9899.1000371.
- [17] CUTOLO M, CAMPITIELLO R, GOTELLI E, et al. The role of M1/M2 macrophage polarization in rheumatoid arthritis synovitis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 867260. DOI: 10.3389/fimmu.2022.867260.
- [18] MIYAMOTO S. Nuclear initiated NF- κ B signaling: NEMO and ATM take center stage [J]. *Cell Res*, 2011, 21 (1): 116-130. DOI: 10.1038/cr.2010.179.
- [19] GOTTS J E, MATTHAY M A. Sepsis: pathophysiology and clinical management [J]. *BMJ*, 2016, 353: i1585. DOI: 10.1136/bmj.i1585.
- [20] FERRERO-MILIANI L, NIELSEN O H, ANDERSEN P S, et al. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation [J]. *Clin Exp Immunol*, 2007, 147 (2): 227-235. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2006.03261.x.
- [21] CARL N. Nonresolving inflammation redux [J]. *Immunity*, 2022, 55 (4): 592-605. DOI: 10.1016/j.immuni.2022.03.016.
- [22] LASKIN D L. Macrophages and inflammatory mediators in chemical toxicity: a battle of forces [J]. *Chem Res Toxicol*, 2009, 22 (8): 1376-1385. DOI: 10.1021/tx900086v.
- [23] MAMILOS A, WINTER L, SCHMITT V H, et al. Macrophages: from simple phagocyte to an integrative regulatory cell for inflammation and tissue regeneration—a review of the literature [J]. *Cells*, 2023, 12 (2): 276. DOI: 10.3390/cells12020276.
- [24] GUPTA S, SARANGI P P. Inflammation driven metabolic regulation and adaptation in macrophages [J]. *Clin Immunol*, 2023, 246: 109216. DOI: 10.1016/j.clim.2022.109216.
- [25] SCHMALZ G, KRIFKA S, SCHWEIKL H. Toll-like receptors, LPS, and dental monomers [J]. *Adv Dent Res*, 2011, 23 (3): 302-306. DOI: 10.1177/0022034511405391.
- [26] OLONA A, HATELEY C, MURALIDHARAN S, et al. Sphingolipid metabolism during toll-like receptor 4 (TLR4) - mediated macrophage activation [J]. *Br J Pharmacol*, 2021, 178 (23): 4575-4587. DOI: 10.1111/bph.15642.
- [27] IONITA M G, ARSLAN F, DE KLEIJN D P V, et al. Endogenous inflammatory molecules engage toll-like receptors in cardiovascular disease [J]. *J Innate Immun*, 2010, 2 (4): 307-315. DOI: 10.1159/000314270.
- [28] FACCHIN B M, DOS REIS G O, VIEIRA G N, et al. Inflammatory biomarkers on an LPS-induced RAW 264.7 cell model: a systematic review and meta-analysis [J]. *Inflamm Res*, 2022, 71 (7/8): 741-758. DOI: 10.1007/s00011-022-01584-0.
- [29] ZHOU D, HUANG C, LIN Z, et al. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways [J]. *Cell Signal*, 2014, 26 (2): 192-197. DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.11.004.
- [30] 刘芬, 赵宁, 李东海, 等. 乙酰胆碱对脂多糖诱导肺泡巨噬细胞炎症反应的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2015, 27 (10): 811-815. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.10.006.
- LIU F, ZHAO N, LI D H, et al. Anti-inflammatory effect of acetylcholine on lipopolysaccharide induced inflammatory response of alveolar macrophages [J]. *Chin Crit Care Med*, 2015, 27 (10): 811-815. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.10.006.
- [31] DONG J, LI J, CUI L, et al. Cortisol modulates inflammatory responses in LPS-stimulated RAW264.7 cells *via* the NF- κ B and MAPK pathways [J]. *BMC Vet Res*, 2018, 14 (1): 30. DOI: 10.1186/s12917-018-1360-0.
- [32] LIU L, GUO H, SONG A, et al. Progranulin inhibits LPS-induced macrophage M1 polarization via NF- κ B and MAPK pathways [J]. *BMC Immunol*, 2020, 21 (1): 32. DOI: 10.1186/s12865-020-00355-y.
- [33] 李梦, 熊永福, 黄徐建, 等. CCAAT/增强子结合蛋白 δ 通过调控巨噬细胞向 M1 型极化抑制肝癌侵袭转移 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2021, 29 (8): 794-798. DOI: 10.3760/cma.j.cn501113-20200330-00149.
- LI M, XIONG Y F, HUANG X J, et al. CCAAT/enhancer binding protein δ inhibits invasion and metastasis of liver cancer by regulating M1 type macrophages polarization [J]. *Chin J Hepatol*, 2021, 29 (8): 794-798. DOI: 10.3760/cma.j.cn501113-20200330-00149.

(责任编辑: 林燕薇)