

Tempol 对过氧化氢致 RAW264.7 巨噬细胞氧化损伤的保护作用

麻丽霞 郭萍 任晨霞 曹文君

【摘要】 目的:研究 4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶(Tempol)对过氧化氢(H_2O_2)引起的 RAW264.7 巨噬细胞氧化损伤的影响。 方法:建立 H_2O_2 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞氧化损伤模型,分为空白对照组、 H_2O_2 损伤组(0.2 mmol/L H_2O_2)、低剂量 Tempol 组(0.2 mmol/L H_2O_2 + 0.4 mmol/L Tempol)和高剂量 Tempol 组(0.2 mmol/L H_2O_2 + 0.8 mmol/L Tempol),测定每组细胞培养上清液中丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)和乳酸脱氢酶(LDH)活性。 结果:与空白对照组相比, H_2O_2 损伤组培养上清中 MDA 含量和 LDH 活性显著升高,SOD 活性显著降低(P 均 < 0.05)。与 H_2O_2 损伤组相比,低剂量 Tempol 组与高剂量 Tempol 组细胞培养上清中 MDA 的含量 $[(7.27 \pm 0.35) \text{ nmol/mL}$ 和 $(7.27 \pm 0.26) \text{ nmol/mL}$ 对 $(9.55 \pm 0.31) \text{ nmol/mL}$, P 均 < 0.05]和 LDH 的活性 $[(509.36 \pm 38.73) \text{ U/L}$ 和 $(492.81 \pm 40.36) \text{ U/L}$ 对 $(706.24 \pm 48.46) \text{ U/L}$, P 均 < 0.05]均显著降低,而 SOD 的活性 $[(24.84 \pm 0.54) \text{ U/mL}$ 和 $(24.84 \pm 0.28) \text{ U/mL}$ 对 $(21.16 \pm 0.61) \text{ U/mL}$, P 均 < 0.05]均显著升高。低剂量 Tempol 组和高剂量 Tempol 组 MDA 含量、SOD 和 LDH 活性无明显差异,Tempol 的作用不呈剂量依赖性。 结论:Tempol 可能通过调节细胞氧化还原系统,对 H_2O_2 引起的 RAW264.7 氧化损伤起到保护作用。

【关键词】 4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶;巨噬细胞;过氧化氢;氧化损伤;抗氧化
doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2017.02.015

Protective effects of tempol on hydrogen peroxide-induced toxicity in RAW264.7 macrophages MA Lixia, GUO Ping, REN Chenxia, CAO Wenjun. Central Laboratory of Changzhi Medical College, Shanxi 046000, China

【Abstract】 Objective: To study the protective effects of tempol on oxidative damage induced by hydrogen peroxide (H_2O_2) in RAW264.7 cells. **Methods:** Oxidative damage model of RAW264.7 macrophages was established by H_2O_2 treatment. RAW264.7 cells were divided into four groups: blank control group, H_2O_2 -injury group (0.2 mmol/L H_2O_2), Tempol low-dose group (0.2 mmol/L H_2O_2 + 0.4 mmol/L tempol) and Tempol high-dose group (0.2 mmol/L H_2O_2 + 0.8 mmol/L tempol). The levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and lactate dehydrogenase (LDH) were measured in the culture medium of each group. **Results:** The content of MDA and the activity of LDH were increased in H_2O_2 -injury group compared with blank control group, while the activity of SOD was decreased (all $P < 0.05$). Compared with H_2O_2 -injury group, the content of MDA $[(7.27 \pm 0.35) \text{ nmol/mL}$ and $(7.27 \pm 0.26) \text{ nmol/mL}$ vs. $(9.55 \pm 0.31) \text{ nmol/mL}$, both $P < 0.05$] and the activity of LDH $[(509.36 \pm 38.73) \text{ U/L}$ and $(492.81 \pm 40.36) \text{ U/L}$ vs. $(706.24 \pm 48.46) \text{ U/L}$, both $P < 0.05$] in Tempol low-dose group and Tempol high-dose group reduced significantly, while the activity of SOD

基金项目:山西省基础研究计划(2015021185);长治医学院普及项目(QDZ201630)

作者单位:046000 山西省长治医学院中心实验室

通信作者:麻丽霞,Email:datong19861125@163.com

[(24.84 ± 0.54) U/mL and (24.84 ± 0.28) U/mL vs. (21.16 ± 0.61) U/mL, both $P < 0.05$] increased. There was no significant difference in MDA content, SOD and LDH activity between Tempol low-dose group and Tempol high-dose group, and the effects of tempol were not dose-dependent.

Conclusion: Tempol has protective effects on H_2O_2 -induced injury in RAW264.7 cells by regulating cell redox system.

【Key words】 Tempol; Macrophage; Hydrogen peroxide; Oxidative damage; Antioxidant capacity

全球每年死于心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 的人数可达 1 600 万^[1-2]。动脉粥样硬化是 CVD 的重要病理基础之一^[3-5], 氧化应激贯穿动脉粥样硬化斑块形成、发展及斑块破裂触发临床事件的始终。脂质易被活性氧以及相关酶修饰, 进而激发炎症反应^[6]。因此, 抗氧化治疗有望成为抗动脉粥样硬化的新方法。目前用于临床的抗氧化剂主要有天然抗氧化剂和人工合成抗氧化剂两种^[7]。与天然抗氧化剂相比, 人工合成抗氧化剂经过优化设计, 抗氧化能力强。

4-羟基-2, 2, 6, 6-四甲基哌啶 (Tempol, $C_9H_{18}NO_2$, TPL) 是超氧化物歧化酶 (SOD) 类似物, 具有分子量小, 通透性好, 稳定性强等优点^[8]。研究表明, Tempol 具有抗氧化、抗炎、抗脂质代谢、雌激素样调节作用、心血管和神经保护作用等多种生物学活性^[9-11]。本研究利用过氧化氢 (H_2O_2) 体外建立 RAW264.7 巨噬细胞氧化损伤模型, 研究 Tempol 对氧化损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞购于中国科学院上海生命科学研究院。DMEM 培养基购于北京康彻赛尔生物技术有限公司, 胰蛋白酶、CCK8 购于北京索莱宝科技有限公司, 胎牛血清购于以色列 BI 公司; Tempol 购于美国 Sigma 公司, 丙二醛 (MDA) 含量、SOD 活性及乳酸脱氢酶 (LDH) 活性测试盒购于南京建成生物工程研究所。

1.2 RAW264.7 细胞的培养

将 RAW264.7 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基中, 置于 $37^\circ C$ 、5% CO_2 细胞培养箱中进行培养, 细胞实验前传代 3 次。当细胞密度达到 80% 时, 0.25% 胰酶消化细胞用于后续实验。

1.3 H_2O_2 致 RAW264.7 巨噬细胞氧化损伤模型的建立

将密度为 1×10^6 个/mL 的 RAW264.7 单细胞

悬液接种于 96 孔板, 每孔 100 μL , 置于 $37^\circ C$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养 24 h 后弃去培养基, 加入含 H_2O_2 、10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基。共设置 7 个浓度梯度组, H_2O_2 终浓度分别为 0 (H_2O_2 空白组)、0.1、0.2、0.3、0.4、0.6、1.0 mmol/L, 每个浓度梯度设置 5 个重复孔。细胞培养 24 h 后, 每孔加入 CCK8 溶液, 继续培养 3 h, 酶标仪于 490 nm 波长处测量吸光度值 (OD 值), 计算细胞的存活率, RAW264.7 细胞存活率 = (实验组 OD 值/对照组 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.4 Tempol 作用于 RAW264.7 巨噬细胞最佳剂量的筛选

细胞培养和检测过程同 1.3, 使用含不同浓度 Tempol、10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基, Tempol 终浓度分别为 0 (Tempol 空白组)、0.1、0.2、0.3、0.4、0.8、1.0、1.5 mmol/L, CCK8 检测 RAW264.7 细胞存活率。

1.5 不同浓度的 Tempol 和 H_2O_2 处理下 RAW264.7 细胞培养液中 MDA 含量、SOD 和 LDH 活性的测定

将密度为 1×10^6 个/mL 的 RAW264.7 单细胞悬液接种于 6 孔板, 每孔 2 mL, 分为 4 组, 每组 3 个重复孔。 H_2O_2 损伤组加入 0.2 mmol/L H_2O_2 后培养 24 h, 低剂量 Tempol 组和高剂量 Tempol 组分别加入 0.4 mmol/L 和 0.8 mmol/L Tempol 预处理 4 h, 随后加入 0.2 mmol/L H_2O_2 继续培养 24 h。空白对照组仅用含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基培养。细胞培养结束后收集细胞培养液, 于 $4^\circ C$ 、10 000 转/min 离心 5 min 后取上清液。按照测试盒说明书检测上清液中 MDA 含量、LDH 和 SOD 活性。

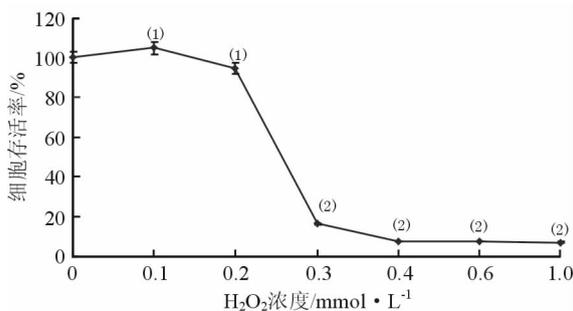
1.6 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计学分析, 实验数据以均数 \pm 标准差表示, 用单因素方差分析对多组数据进行分析, 组间数据比较采用最小显著性差异法检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H₂O₂ 致 RAW264.7 巨噬细胞氧化损伤

筛选 H₂O₂ 浓度的条件是不对 RAW264.7 细胞的正常生长造成影响(与 H₂O₂ 空白组比较)。由图 1 可见,与 H₂O₂ 空白组相比,H₂O₂ 浓度在 0.1 mmol/L 和 0.2 mmol/L 时对 RAW264.7 细胞存活均无明显影响($P > 0.05$),H₂O₂ 浓度 ≥ 0.3 mmol/L 时 RAW264.7 细胞存活率显著降低($P < 0.05$)。在对细胞存活不造成影响的前提下,后续实验选择 0.2 mmol/L H₂O₂ 建立氧化损伤模型。



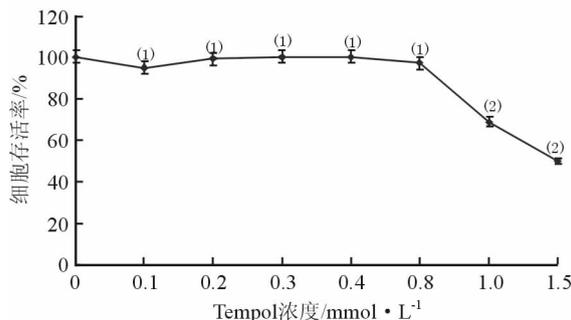
注:与 H₂O₂ 空白组比较,⁽¹⁾ $P > 0.05$,⁽²⁾ $P < 0.05$

图 1 不同浓度 H₂O₂ 对 RAW264.7 细胞存活率的影响

2.2 不同浓度 Tempol 对 RAW264.7 细胞存活率的影响

筛选 Tempol 浓度的条件是不对细胞的正常生长造成影响(与 Tempol 空白组比较)。由图 2 可见,与 Tempol 空白组相比,Tempol 浓度 ≤ 0.8 mmol/L

时对 RAW264.7 细胞存活无明显影响($P > 0.05$),Tempol 浓度 ≥ 1.0 mmol/L 时 RAW264.7 细胞存活率显著降低($P < 0.05$)。因此,选择 0.4 mmol/L 和 0.8 mmol/L Tempol 用于后续实验。



注:与 Tempol 空白组比较,⁽¹⁾ $P > 0.05$,⁽²⁾ $P < 0.05$

图 2 不同浓度 Tempol 对 RAW264.7 细胞存活率的影响

2.3 Tempol 对 H₂O₂ 致 RAW264.7 细胞氧化损伤的保护作用

与空白对照组相比,H₂O₂ 损伤组培养上清中 MDA 含量和 LDH 活性显著升高,SOD 活性显著降低($P < 0.05$)。而低剂量 Tempol 组和高剂量 Tempol 组 MDA 含量和 LDH 活性较 H₂O₂ 损伤组明显下降,SOD 活性明显升高($P < 0.05$)。低剂量 Tempol 组和高剂量 Tempol 组 MDA 含量、SOD 和 LDH 活性无明显差异,Tempol 的作用不呈剂量依赖性。见表 1。

表 1 Tempol 对 H₂O₂ 引起 RAW264.7 细胞氧化损伤的影响

组别	MDA/nmol \cdot mL ⁻¹	SOD/U \cdot mL ⁻¹	LDH/U \cdot L ⁻¹
空白对照组	7.50 \pm 0.27	24.38 \pm 0.45	554.91 \pm 42.51
H ₂ O ₂ 损伤组	9.55 \pm 0.31 ⁽¹⁾	21.16 \pm 0.61 ⁽¹⁾	706.24 \pm 48.46 ⁽¹⁾
低剂量 Tempol 组	7.27 \pm 0.35 ⁽²⁾	24.84 \pm 0.54 ⁽²⁾	509.36 \pm 38.73 ⁽²⁾
高剂量 Tempol 组	7.27 \pm 0.26 ⁽²⁾	24.84 \pm 0.28 ⁽²⁾	492.81 \pm 40.36 ⁽²⁾

注:与空白对照组比较,⁽¹⁾ $P < 0.05$;与 H₂O₂ 损伤组比较,⁽²⁾ $P < 0.05$

3 讨论

氧化应激学说在众多动脉粥样硬化斑块形成学说中占重要地位,具体是指机体活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生过多和(或)抗氧化能力降低,氧化系统和抗氧化系统平衡紊乱,导致潜在性损伤的病理过程^[12-13]。近年来,巨噬细胞通过介导氧化应激参与心血管疾病的发生发展成为研究热点^[14]。动物实验发现,在动脉粥样硬化损伤部位单核细胞/巨噬细胞还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸

磷酸(NADPH)氧化酶可能是生成超氧阴离子的重要来源。在动脉粥样硬化斑块中超氧阴离子生成增多,并伴有巨噬细胞 NADPH 氧化酶催化亚基 gp91phox(NOX2)和 p22phox 的表达增加。在人冠状动脉粥样硬化斑块易受损的肩区,gp91phox 广泛表达,且与巨噬细胞定位一致。以上结果提示,巨噬细胞氧化应激在动脉粥样硬化发展过程中起关键作用^[15-16]。

MDA 是脂质过氧化的生物标记物,反映脂质

过氧化水平。SOD 对维持机体氧化与抗氧化平衡起重要作用, SOD 活性反映了组织清除自由基的能力。LDH 存在于细胞浆, 当细胞受损时可释放出来, 细胞培养上清液中的 LDH 活性可反映组织细胞受损情况。本研究发现, 0.2 mmol/L H_2O_2 处理的 RAW264.7 细胞的培养上清液中 MDA 含量及 LDH 活性均显著增高, SOD 活性显著下降, 这表明 0.2 mmol/L H_2O_2 对 RAW264.7 细胞可产生氧化损伤。

Tempol 是人工合成的氮氧化物抗氧化剂, 本研究通过 Tempol 预处理 RAW264.7 细胞, 可逆转 H_2O_2 对细胞造成的氧化损伤, 与 H_2O_2 损伤组相比, 细胞培养上清液中 MDA 含量及 LDH 活性显著降低, 而 SOD 活性显著增高。这说明 Tempol 可能通过增强 SOD 活性, 提高细胞清除 ROS 的能力, 防止细胞膜中不饱和脂肪酸过度氧化, 保持细胞膜结构的完整性, 从而保护细胞不受 H_2O_2 的氧化损伤。

本研究通过筛选 H_2O_2 浓度, 确定在不影响 RAW264.7 细胞正常生长的情况下, 0.2 mmol/L H_2O_2 可以用于建立 RAW264.7 细胞的氧化损伤模型。Tempol 对 H_2O_2 导致的 RAW264.7 细胞氧化损伤具有保护作用, 能够逆转 H_2O_2 损伤引起的 MDA 含量、LDH 活性升高和 SOD 活性降低, Tempol 对 RAW264.7 细胞氧化损伤的保护作用不呈剂量依赖关系。

参 考 文 献

- [1] Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2002, 105(9):1135-1143.
- [2] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease[J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2):115-126.
- [3] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(16):1685-1695.
- [4] Libby P. Inflammatory mechanisms; the molecular basis of inflammation and disease[J]. *Nutr Rev*, 2007, 65(12 Pt 2):S140-146.
- [5] Libby P. Inflammation in atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(9):2045-2051.
- [6] Griending KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease[J]. *Circ Res*, 2000, 86(5):496-501.
- [7] Rock CL, Jacob RA, Bowen PE. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids[J]. *J Am Diet Assoc*, 1996, 96(7):693-702.
- [8] Wangyong Y, Zefeng T, Xiufeng X, et al. Tempol alleviates intracerebral hemorrhage-induced brain injury possibly by attenuating nitrate stress[J]. *Neuroreport*, 2015, 26(14):842-849.
- [9] Salvi A, Patki G, Khan E, et al. Protective effect of tempol on buthionine sulfoximine-induced mitochondrial impairment in hippocampal derived HT22 cells [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016:5059043.
- [10] Yamato M, Kawano K, Yamanaka Y, et al. TEMPOL increases NAD(+) and improves redox imbalance in obese mice[J]. *Redox Biol*, 2016, 8:316-322.
- [11] 樊鹏程. 新型自由基清除剂抗高原缺氧作用及保护机制研究[D]. 西安:第四军医大学, 2013.
- [12] Annu KM, Zilmer M, Fellstrom B. Endothelium-dependent vasodilation and oxidative stress in chronic renal failure: impact on cardiovascular disease[J]. *Kidney Int Suppl*, 2003, 84:S50-53.
- [13] Delbose S, Paizanis E, Magous R, et al. Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat[J]. *Atherosclerosis*, 2005, 179(1):43-49.
- [14] Groemping Y, Lapouge K, Smerdon SJ, et al. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase[J]. *Cell*, 2003, 113(3):343-355.
- [15] Sorescu D, Weiss D, Lassegue B, et al. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2002, 105(12):1429-1435.
- [16] Vendrov AE, Hakim ZS, Madamanchi NR, et al. Atherosclerosis is attenuated by limiting superoxide generation in both macrophages and vessel wall cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(12):2714-2721.

(收稿:2016-07-14 修回:2016-12-28)

(本文编辑:胡晓静)