

# 艾拉莫德(T-614)对巨噬细胞 M1 型极化的影响

潘杰, 许建国, 许萍

(溧阳市人民医院风湿免疫科, 江苏 溧阳 213300)

**摘要:** [目的] 研究艾拉莫德(T-614)对小鼠巨噬细胞(RAW264.7) M1 型极化的影响。[方法] 细胞毒性实验观察 3 个浓度(400 g/L, 800 g/L, 1 200 g/L)的 T-614 对 RAW264.7 的影响, 使用 LPS/IFN- $\gamma$  诱导 RAW264.7 发生 M1 型分化, 同时进行 T-614 干预。流式细胞术检测 RAW264.7 表面 F4/80 + CD86 + 与 MHC II + 的比例, ELISA 检测细胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的含量, RT-PCR 检测细胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1、CD86 和 iNOS 基因的表达, Western Blot 检测细胞中 MCP-1、CD86 和 iNOS 蛋白表达水平。[结果] 3 个浓度 T-614 对未分化的巨噬细胞没有毒性; 高浓度 T-614 降低 M1 巨噬细胞表面的 F4/80 + CD86 + 与 MHC II + 比例( $P < 0.05$ ), 降低 MCP-1、CD86 和 iNOS 的基因表达水平与蛋白表达水平( $P < 0.05$ ), 降低 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  基因表达与减少 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的含量( $P < 0.05$ )。[结论] T-614 能抑制 RAW264.7 进行 M1 型极化, 抑制 MCP-1、CD86 和 iNOS 的表达, 减少 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的形成与分泌。

**关键词:** 艾拉莫德(T-614); 巨噬细胞; M1 型极化; 炎症

中图分类号: R976 文献标识码: A DOI: 10.16519/j.cnki.1004-311x.2022.02.0027

## Effect of Iguratimod(T-614) on M1 polarization of macrophages

PAN Jie, XU Jian-guo, XU ping

(Department of Rheumatology and Immunology, Liyang People's Hospital, Liyang 213300, China)

**Abstract** [Objective] To explore the effect of Iguratimod(T-614) on M1-type polarization of mouse macrophage(RAW 264.7). [Method] The effect of T-614 at three concentrations(400 g/L, 800 g/L and 1 200 g/L) on RAW264.7 was investigated by cytotoxicity assay. Then M1-type differentiation of RAW264.7 was induced by LPS/IFN- $\gamma$  and T-614 was also administered. The ratio of F4/80 + CD86 + to MHC II + on RAW264.7 was determined by flow cytometry. The contents of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in RAW264.7 cells were determined by ELISA. The expression levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1, CD86 and iNOS were detected by RT-PCR, and the expression levels of MCP-1, CD86 and iNOS were detected by Western Blot. [Result] Three concentrations of T-614 had no effect on undifferentiated macrophages( $P < 0.05$ ); High concentration of T-614 reduced the ratio of F4/80 + CD86 + to MHC II + on the surface of M1 macrophages( $P < 0.05$ ), decreased the gene expression level and protein expression level of MCP-1, CD86 and iNOS( $P < 0.05$ ), and decreased the expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and the content of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ( $P < 0.05$ ). [Conclusion] T-614 can inhibit m1-type polarization of macrophages, inhibit the expression of MCP-1, CD86 and iNOS, and reduce the formation and secretion of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ , thus reducing the inflammatory response of the body.

**Keywords:** Iguratimod(T-614); macrophages; M1 polarization; inflammation

艾拉莫德(Iguratimod)也称为 T-614, 是一种在中国、日本已广泛用于治疗类风湿性关节炎的药物<sup>[1]</sup>。T-614 最初报道作用是抑制选择性抑制剂环氧酶 2、核转录因子(NF- $\kappa$ B)和各种炎性细胞因子的生成<sup>[2]</sup>, 在多种疾病中均有抗炎抗免疫的作用<sup>[3-6]</sup>, 但详细机制尚不清楚。

巨噬细胞是先天免疫细胞, 可以根据微环境极化成 M1 型与 M2 型<sup>[7-8]</sup>。巨噬细胞 M1 型极化促进

炎症反应, M2 型极化以抗炎为主<sup>[9]</sup>, 王志强等<sup>[10]</sup>使用紫草素调节了小鼠肺泡巨噬细胞中 M1/M2 型极化平衡, 改善新生小鼠缺氧诱导的肺损伤, 这说明调节巨噬细胞 M1/M2 平衡对许多疾病具有治疗潜力。目前 T-614 调节巨噬细胞 M1/M2 平衡的研究较少, 为了更全面地挖掘 T-614 的抗炎机制, 笔者采用流式细胞、RT-PCR、ELISA 与 Western Blotting 技术从基因与蛋白水平, 以小鼠巨噬细胞(RAW264.7)

收稿日期: 2021-04-02

资助项目: 溧阳市人民医院科技项目(2019YJKT013)

作者简介: 潘杰(1989-), 男, 江苏省溧阳人, 硕士, 主治医师, 研究方向: 风湿免疫病, 发表论文 1 篇, E-mail: 3259055707@qq.com。

为对象,针对 F4/80、MHC II、MCP-1、CD86、iNOS、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  多个巨噬细胞 M1 型极化标志因子,研究 T-614 对巨噬细胞 M1 型极化的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验细胞

小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7)购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

#### 1.1.2 试剂

艾拉莫德(T-614)(国药准字 H20110084),海南先声药业有限公司;DMEM 培养基、脂多糖、胰蛋白酶-EDTA 消化液、BCA 蛋白定量试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司;胎牛血清,浙江天杭生物科技股份有限公司;重组小鼠干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ),美国 PeproTech 公司。单核细胞趋化蛋白(MCP-1)、CD86、一氧化氮合成酶(iNOS)、F4/80 抗体均购自艾博抗(上海)贸易有限公司;IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  免疫酶联试剂盒,上海茁彩生物科技有限公司;MCP-1、CD86、iNOS 引物与 RNA 逆转录试剂盒均购自广州锐博生物技术有限公司。

#### 1.1.3 仪器

倒置显微镜 XDS-1B,重庆光电仪器有限公司;实时荧光定量(RT-PCR)仪,PIKORed 96,美国 ThermoFisher 仪器有限公司;凝胶成像分析仪 ChemiDoc,美国 Bio-Rad。

#### 1.1.4 培养基

DMEM 高糖培养基加入青链霉素双抗与 10% 胎牛血清混合。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

将 RAW264.7 复苏后使用培养基在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱下进行培养,中途更换培养基 2~3 次,待细胞生长至 80% 丰度后加入含 EDTA 的胰蛋白酶进行传代,待细胞生长至对数期进行实验。

#### 1.2.2 细胞毒性实验

将生长对数期的细胞随机分为 4 组,即空白对照组、T-614 低剂量组(400  $\mu$ g/L)、T-614 中剂量组(800  $\mu$ g/L)、T-614 高剂量组(1200  $\mu$ g/L)。细胞过夜培养贴壁后,除空白对照组使用培养基培养

外,其余各组加入 T-614 进行刺激,培养 24 h 后加入 10  $\mu$ L CCK-8 试剂,室温孵育 1 h 后于 450 nm 波长处测定吸光度值(A),每组细胞设置 3 个复孔。

#### 1.2.3 流式细胞术

取生长对数期的细胞,培养细胞至 80% 时,接种到 6 孔细胞板中,将细胞随机分为 5 组,即空白对照组、模型组、T-614 低剂量组(400  $\mu$ g/L)、T-614 中剂量组(800  $\mu$ g/L)、T-614 高剂量组(1200  $\mu$ g/L),空白组加入培养基,模型组加入培养基+LPS(1 mg/L)+IFN- $\gamma$ (0.02 mg/L),T-614 组分别加入培养基+LPS(1 mg/L)+IFN- $\gamma$ (0.02 mg/L)和低、中、高三个浓度的 T-614。干预完成后收集各组的细胞,使用冰冻的 PBS 清洗 3 次,避光孵育流式抗体 FITC-F4/80、PE-CD86 和 FITC-MHC II,孵育时间 45 min。使用流式细胞仪检测各组细胞 F4/80+CD86+ 与 MHC II+ 的表达水平,每组细胞设置 3 个复孔。

#### 1.2.4 ELISA 法测定 T-614 对 LPS/IFN- $\gamma$ 诱导 RAW264.7 细胞中炎症因子的水平

取生长对数期的细胞,培养细胞至 80% 时,接种到 6 孔细胞板中,将细胞随机分为 5 组,细胞分组、造模与给药方法同 1.2.3。给药 24 h 后收集细胞培养上清液,按 ELISA 试剂盒说明书操作测定细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的水平,每组细胞设置 3 个复孔。

#### 1.2.5 RT-PCR

取生长对数期的细胞,培养细胞至 80% 时,接种到 6 孔细胞板中,将细胞随机分为 5 组,细胞分组、造模与给药方法同 1.2.3。待细胞孵育 24 h 后弃去培养液收集细胞,使用 PBS 清洗 3 次。按照 RNA 提取试剂盒说明书操作提取细胞中总 RNA,然后按照 RNA 逆转录试剂盒说明书操作将总 RNA 逆转录得到 cDNA,同时进行 PCR 的扩增,得到样本的 Ct 值,以  $\beta$ -actin 为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算细胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1、CD86 和 iNOS 的相对表达水平,每组细胞设置 3 个复孔。

#### 1.2.6 Western Blotting

取生长对数期的细胞,培养细胞至 80% 时,接种到 6 孔细胞板中,将细胞随机分为 5 组,细胞分组、造模与给药方法同 1.2.3。待细胞孵育 24 h 后使用 PBS 清洗干净后在冰上进行蛋白质提取,使用

BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白质定量, 然后以每个样本 20  $\mu\text{g}$  蛋白量进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将电泳完毕的蛋白样本电转移至 PVDF 膜上, 置于 5% 脱脂奶粉中室温震荡封闭 2 h, 置于稀释好的 MCP-1 (1:500)、CD86 (1:500)、iNOS (1:500)、 $\beta$ -actin (1:1 000) 一抗中 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜孵育, TBST 漂洗 3 遍后置于二抗 (1:5 000) 中室温孵育 2 h, 最后经过 ECL 试剂盒显影后在凝胶成像系统中拍照分析, 以  $\beta$ -actin 作为内参, 采用灰度值反映蛋白表达水平, 每组细胞设置 3 个复孔。

### 1.2.7 统计学处理

统计数据使用平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。统计软件为 SPSS 25.0。统计方法为单因素方差分析 (one-way ANOVA)。 $P < 0.05$  被认为具有统计学显著差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 T-614 对 RAW264.7 细胞增殖活性的影响

与空白对照组相比, 3 个剂量的 T-614 对 RAW264.7 细胞增殖率均无影响, 不具有统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结果见表 1。

### 2.2 T-614 对 LPS/IFN- $\gamma$ 诱导 RAW264.7 细胞 M1 型极化的影响

与空白对照组相比, 模型组细胞中 MCP-1、CD86 和 iNOS 的基因与蛋白表达水平增多 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, T-614 中、高剂量组 MCP-1、CD86 和 iNOS 的基因表达水平与蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$ )。结果见表 2、图 1。

### 2.3 T-614 对巨噬细胞表面 M1 极化标志因子的影响

与空白对照组相比, 模型组细胞中 F4/80 + CD86 + 的比例增多 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, T-614 低、中、高剂量组 F4/80 + CD86 + 的比例降低 ( $P < 0.05$ )。结果见表 3、图 2。

表 1 T-614 浓度对 RAW264.7 细胞增殖率的影响  
( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Tab.1 Effects of T-614 at three doses on proliferation rate of RAW264.7 cells

组别	剂量 ( $\mu\text{g/L}$ )	增殖率 (%)
空白对照组	-	100.0 $\pm$ 5.9
T-614 低剂量组	400	98.9 $\pm$ 6.5
T-614 中剂量组	800	98.6 $\pm$ 7.3
T-614 高剂量组	1 200	97.9 $\pm$ 6.2

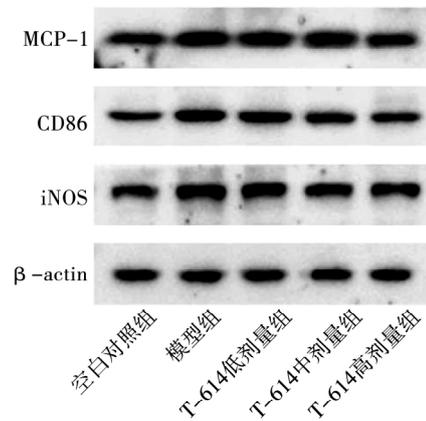


图 1 Western Blot 检测结果  
Fig.1 Western Blot analysis results

表 2 LPS/IFN- $\gamma$  诱导 RAW264.7 细胞后 3 种剂量 T-614 对细胞 M1 标志物的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Tab.2 Effects of T-614 at three doses on M1 markers in RAW264.7 cells after LPS/IFN- $\gamma$  induction

组别	剂量 ( $\mu\text{g/L}$ )	MCP-1 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )	CD86 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )	iNOS ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )	MCP-1	CD86	iNOS
空白对照组	-	1.020 $\pm$ 0.238	1.013 $\pm$ 0.198	1.017 $\pm$ 0.217	1.005 $\pm$ 0.148	1.003 $\pm$ 0.072	1.002 $\pm$ 0.057
模型组	-	1.870 $\pm$ 0.095**	1.700 $\pm$ 0.090**	1.597 $\pm$ 0.191**	1.907 $\pm$ 0.157**	2.046 $\pm$ 0.271**	1.966 $\pm$ 0.318**
T-614 低剂量组	400	1.527 $\pm$ 0.306*	1.420 $\pm$ 0.166*	1.430 $\pm$ 0.215*	1.621 $\pm$ 0.281**	1.764 $\pm$ 0.296**	1.698 $\pm$ 0.171**
T-614 中剂量组	800	1.347 $\pm$ 0.191#	1.260 $\pm$ 0.254#	1.333 $\pm$ 0.075*#	1.470 $\pm$ 0.179*#	1.495 $\pm$ 0.170*##	1.456 $\pm$ 0.283*#
T-614 高剂量组	1200	1.123 $\pm$ 0.226##	1.073 $\pm$ 0.123##	1.077 $\pm$ 0.081##	1.180 $\pm$ 0.165##	1.257 $\pm$ 0.098##	1.325 $\pm$ 0.238##

注: 与空白对照相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组相比, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control control, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; Compared with the model group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ .

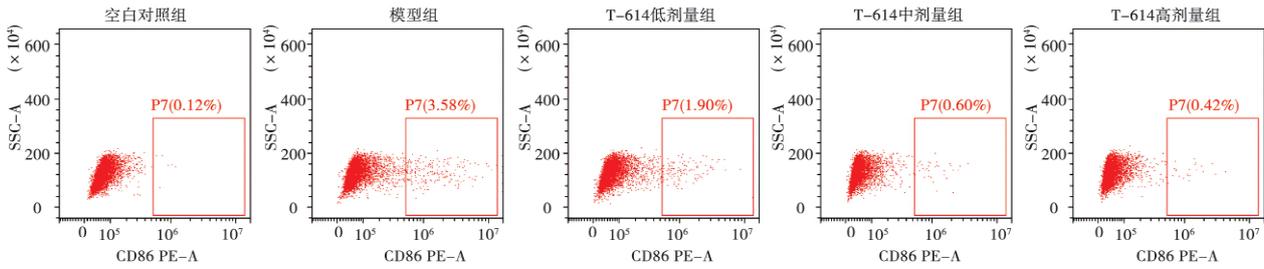


图2 流式细胞术检测细胞中 F4/80 + CD86 + 比例

Fig.2 F4/80 + CD86 + ratio was detected by flow cytometry

表3 LPS/IFN- $\gamma$  诱导 RAW264.7 细胞后 3 种浓度 T-614 对细胞中 F4/80 + CD86 + 比例的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab.3 Effects of T-614 at three doses on the proportion of F4/80 + CD86 + in RAW264.7 cells after LPS/IFN- $\gamma$  induction

组别	剂量( $\mu\text{g/L}$ )	F4/80 + CD86 + (%)
空白对照组	-	0.303 $\pm$ 0.202
模型组	-	3.087 $\pm$ 0.829*
T-614 低剂量组	400	1.563 $\pm$ 0.592#
T-614 中剂量组	800	1.417 $\pm$ 0.967#
T-614 高剂量组	1200	0.777 $\pm$ 0.711#

注: 与空白对照相比, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组相比, #  $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, \*  $P < 0.05$ ; Compared with the model group, #  $P < 0.05$ .

2.4 T-614 对巨噬细胞 M1 极化过程中抗原提呈相关分子 MHC II 的影响

流式细胞术结果显示 与空白对照组相比 模型

组细胞中 MHC II+ 的比例增多 ( $P < 0.05$ ) ; 与模型组相比, T-614 低、中、高剂量组 MHC II+ 的比例降低 ( $P < 0.05$ ) 结果见表 5、图 3。

表4 LPS/IFN- $\gamma$  诱导 RAW264.7 细胞后 3 种剂量 T-614 对细胞中 MHC II+ 表达比例的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab.4 Effects of T-614 on MHC II+ expression in RAW264.7 cells after LPS/IFN- $\gamma$  induction

组别	剂量( $\mu\text{g/L}$ )	MHC II (%)
空白对照组	-	1.590 $\pm$ 0.874
模型组	-	8.583 $\pm$ 3.527*
T-614 低剂量组	400	4.597 $\pm$ 2.165#
T-614 中剂量组	800	4.210 $\pm$ 1.778#
T-614 高剂量组	1200	3.440 $\pm$ 1.884#

注: 与空白组相比, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组相比, #  $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, \*  $P < 0.05$ ; Compared with the model group, #  $P < 0.05$ .

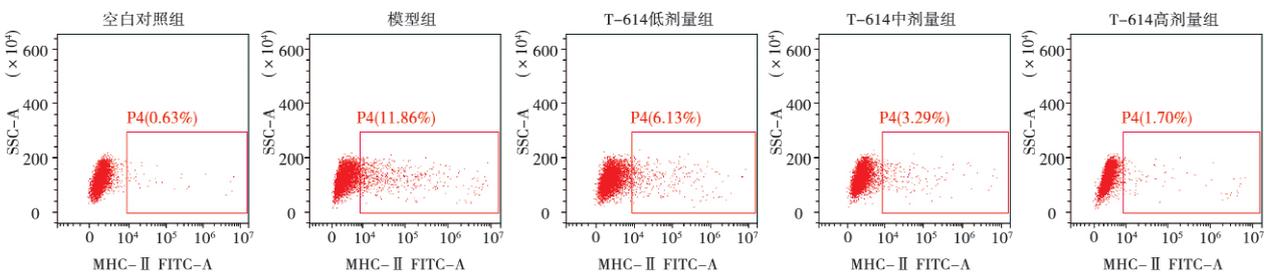


图3 流式细胞术检测细胞中 MHC II+ 比例

Fig.3 MHC II+ ratio was detected by flow cytometry

2.5 T-614 对巨噬细胞 M1 极化过程中对炎症因子产生的影响

与空白对照组相比 模型组细胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的基因表达水平与含量升高 ( $P < 0.05$ ) ;

与模型组相比, T-614 高剂量组能降低细胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的基因表达量与含量 ( $P < 0.05$ ) 中、低剂量对 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  基因表达与含量的影响不明显 ( $P > 0.05$ ) 结果见表 4。

表 5 3 种浓度 T-614 对巨噬细胞 M1 极化过程中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )Tab. 5 Effects of three concentrations of T-614 on the levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in macrophage M1 polarization

组别	剂量 ( $\mu\text{g/L}$ )	IL-1 $\beta$ ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )	IL-6 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )	TNF- $\alpha$ ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )	IL-1 $\beta$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	IL-6 ( $\mu\text{g/mL}$ )	TNF- $\alpha$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
空白对照组	-	1.003 $\pm$ 0.081	1.063 $\pm$ 0.482	1.020 $\pm$ 0.231	6.348 $\pm$ 0.501	3.631 $\pm$ 0.615	50.48 $\pm$ 2.31
模型组	-	1.983 $\pm$ 0.280**	2.720 $\pm$ 0.602**	1.827 $\pm$ 0.304**	8.032 $\pm$ 0.188**	5.982 $\pm$ 0.592**	61.92 $\pm$ 2.61**
T-614 低剂量组	400	1.633 $\pm$ 0.305*	2.143 $\pm$ 0.391*	1.600 $\pm$ 0.364*	7.562 $\pm$ 0.350**	5.536 $\pm$ 0.362**	58.08 $\pm$ 3.54*
T-614 中剂量组	800	1.453 $\pm$ 0.446#	1.770 $\pm$ 0.639	1.333 $\pm$ 0.250	7.126 $\pm$ 0.373*#	5.258 $\pm$ 0.794**	56.34 $\pm$ 4.35
T-614 高剂量组	1200	1.273 $\pm$ 0.174#	1.393 $\pm$ 0.614#	1.253 $\pm$ 0.244#	6.796 $\pm$ 0.400##	4.347 $\pm$ 0.223##	52.89 $\pm$ 3.70##

注:与空白对照相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组相比,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ; Compared with the model group,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ .

### 3 讨论

巨噬细胞在机体早期识别和清除病原体方面发挥着关键作用,M1/M2 比例失调与组织炎症、糖尿病、动脉粥样硬化和癌症等多种疾病的进展有关<sup>[11]</sup>。当受到外界物质的刺激时,巨噬细胞分化为 M1 型和 M2 型参与炎症反应<sup>[12]</sup>。杨冰等<sup>[13]</sup>研究发现,巨噬细胞 M1 型极化后促炎能力增强,使用黄芩苷后抑制了巨噬细胞的 M1 极化能力,说明抑制机体内巨噬细胞 M1 极化具有抗炎潜力。T-614 作为临床上治疗风湿性关节炎的药物,单用与联用均具有不错的抗炎抗免疫能力。Liu Sha 等<sup>[14]</sup>发现 T-614 通过抑制 NF- $\kappa$ B 通路调节了风湿性关节炎患者血清与关节积液中的巨噬细胞极化平衡。为了更好地解释 T-614 对巨噬细胞 M1 型极化的影响,本实验首先设计了细胞毒性实验确定 T-614 是否对巨噬细胞有毒性作用,结果发现,T-614 对未分化的巨噬细胞增殖活性并无影响( $P > 0.05$ ),说明 3 种浓度的 T-614 均可进行下一步实验。

巨噬细胞是先天和获得性免疫系统的重要组成部分<sup>[15]</sup>。LPS、IFN- $\gamma$  等物质的刺激会导致巨噬细胞活化并极化 M1 型<sup>[16]</sup>。M1 巨噬细胞可以诱导高水平的促炎细胞因子,放大免疫反应,增强炎症反应<sup>[17]</sup>,损伤远端器官和阻碍器官正常功能的运作<sup>[18]</sup>。F4/80 与 MHC II 都是 M1 巨噬细胞表面的标志因子,其阳性率高低可以反映巨噬细胞 M1 极化数量;同样,MCP-1、CD86 和 iNOS 都是 M1 巨噬细胞的标志产物,其基因与蛋白表达水平变化反映 M1 巨噬细胞极化程度的高低。本研究结果发现,

LPS/IFN- $\gamma$  刺激 RAW264.7 细胞后,MCP-1、CD86 和 iNOS 基因表达水平与蛋白表达水平升高( $P < 0.05$ ),说明巨噬细胞开始 M1 型极化,使用中、高剂量的 T-614 干预后,标志因子表达降低( $P < 0.05$ ),说明 T-614 能抑制巨噬细胞 M1 型极化,与管新竹<sup>[19]</sup>等研究结果基本一致。同时流式细胞术的结果显示,3 个剂量的 T-614 均能降低 M1 巨噬细胞表面的 F4/80 与 MHC II 阳性率,进一步说明 T-614 能抑制巨噬细胞 M1 型极化。

炎症是由机体对病原体或组织损伤的免疫防御反应引起的,会导致免疫细胞,包括巨噬细胞或小胶质细胞产生各种炎症介质<sup>[20]</sup>。M1 巨噬细胞的募集大多数是由 MCP-1 介导的,MCP-1 可以吸引更多的 M1 巨噬细胞迁移到炎症组织中<sup>[21]</sup>。IL-6 和 IL-1 $\beta$  是早期炎症的典型标志物<sup>[22]</sup>,TNF- $\alpha$  在炎症急性期增殖,可引起机体发热<sup>[23]</sup>。M1 巨噬细胞聚集后,导致 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 过度分泌,加重炎症反应<sup>[24]</sup>。在本研究中发现高剂量 T-614 能降低巨噬细胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的基因表达量与含量,与倪宇昕<sup>[25]</sup>等研究基本一致。这说明 M1 型巨噬细胞比例减少后,炎症介质的分泌与形成也随之减少,侧面证明了 T-614 可以减少在 LPS/IFN- $\gamma$  刺激下巨噬细胞 M1 极化。

### 4 结论

通过细胞毒性实验证明了在 400 ~ 1200  $\mu\text{g/L}$  的浓度范围中,T-614 对巨噬细胞抑制作用,通过流式细胞术检测证明了浓度为 1 200  $\mu\text{g/L}$  的 T-614 能显著抑制巨噬细胞表面 F4/80 与 MHC II

标志因子的阳性表达,通过 RT-PCR 与 Western Blotting 实验证明了 T-614 对 MCP-1、CD86 和 iNOS 的基因表达水平与蛋白表达水平均有明显的抑制作用,显著降低 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  基因表达与减少 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的含量,说明 T-614 能减少炎症反应中巨噬细胞 M1 性极化,减少炎症介质的形成,降低机体损伤。

#### 参考文献

- [1] Wei Y, Sun X X, Hua M H, et al. Inhibitory effect of a novel anti-rheumatic drug T-614 on the IL-6-induced RANKL/OPG/IL-17 and MMP-3 expression in synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients[J]. Biomed Res Int 2015; 2015:214683.
- [2] Tanaka K, Yamaguchi T, Hara M. Igaratimod for the treatment of rheumatoid arthritis in Japan[J]. Expert Rev Clin Immunol 2015, 11(5):565-573.
- [3] Jiang X P, Huang X L, Yang Z P, et al. Igaratimod ameliorates inflammatory responses by modulating the Th17/Treg paradigm in dextran sulphate sodium-induced murine colitis[J]. Mol Immunol 2018, 93(1):9-19.
- [4] Hou C Q, Zhu X L, Shi C Y, et al. Igaratimod(T-614) attenuates severe acute pancreatitis by inhibiting the NLRP3 inflammasome and NF- $\kappa$ B pathway[J]. Biomed Pharmacother 2019, 119(1):109455-109455.
- [5] Song J L, Liu H L, Zhu Q, et al. T-614 promotes osteoblastic cell differentiation by increasing Dlx5 expression and regulating the activation of p38 and NF- $\kappa$ B[J]. Biomed Res Int 2018, 2018(1):4901591-4901591.
- [6] Ci W P, Wang T T, Li T, et al. T-614 inhibits human aortic adventitial fibroblast proliferation and promotes interleukin-8 production in vitro[J]. Vascular 2020, 28(3):314-320.
- [7] Ginhoux F, Schultze J L, Murray P J, et al. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function[J]. Nat Immunol 2016, 17(1):34-40.
- [8] Kamo T, Akazawa H, Komuro I. Cardiac nonmyocytes in the hub of cardiac hypertrophy[J]. Circ Res 2015, 117(1):89-98.
- [9] Hu J, Huang C X, Rao P P, et al. Inhibition of microRNA-155 attenuates sympathetic neural remodeling following myocardial infarction via reducing M1 macrophage polarization and inflammatory responses in mice[J]. Eur J Pharmacol 2019, 851(1):122-132.
- [10] 王志强, 常克, 曾靖雯, 等. 紫草素调节新生小鼠缺氧诱导的肺损伤和肺泡巨噬细胞中 M1/M2 型极化及炎症因子水平[J]. 免疫学杂志 2021, 37(5):404-409.
- [11] Fujimori K, Aritake K, Oishi Y, et al. L-PGDS-produced PGD (2) in premature but not in mature adipocytes increases obesity and insulin resistance[J]. Sci Rep 2019, 9(1):1931-1931.
- [12] Liu L L, Guo H M, Song A M, et al. Progranulin inhibits LPS-induced macrophage M1 polarization via NF- $\kappa$ B and MAPK pathways[J]. BMC Immunol 2020, 21(1):32-32.
- [13] 杨冰, 朱路明, 江丽丽, 等. 黄芩苷通过抑制 HMGB-1 减少 U937 巨噬细胞的 M1 型极化和减轻小鼠的急性肺损伤[J]. 中国病理生理杂志 2021, 37(7):1233-1239.
- [14] Liu S, Song L P, Li R B, et al. Igaratimod promotes transformation of mononuclear macrophages in elderly patients with rheumatoid arthritis by nuclear factor- $\kappa$ B pathway[J]. World J Clin Cases, 2021, 9(10):2181-2191.
- [15] Wynn T A, Vannella K M. Macrophages in tissue repair, regeneration and fibrosis[J]. Immunity 2016, 44(3):450-462.
- [16] Sica A, Erreni M, Allavena P, et al. Macrophage polarization in pathology[J]. Cell Mol Life Sci 2015, 72(21):4111-4126.
- [17] Labonte A C, Tosello-Tramont A C, Hahn Y S. The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases[J]. Mol Cells 2014, 37(4):275-285.
- [18] Shi Y L, Luo P, Wang W K, et al. M1 but not M0 extracellular vesicles induce polarization of RAW264.7 macrophages via the TLR4-NF $\kappa$ B pathway in vitro[J]. Inflammation 2020, 43(5):1611-1619.
- [19] 管新竹, 王怡茹, 张一凡, 等. ERK5 对 M1 型巨噬细胞标志炎症因子 iNOS、MCP-1 表达的影响[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版) 2020, 41(1):10-15.
- [20] Murata T, Kohno S, Ito C, et al. Inhibitory effect of carbazolequinone derivatives on lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$ -induced nitric oxide production in mouse macrophage RAW264.7 cells[J]. J Pharm Pharmacol 2013, 65(8):1204-1213.
- [21] Xiao H T, Peng J, Hu D D, et al. Qing-dai powder promotes recovery of colitis by inhibiting inflammatory responses of colonic macrophages in dextran sulfate sodium-treated mice[J]. Chin Med 2015, 10(1):29-29.
- [22] Gordon S, Martinez F O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions[J]. Immunity, 2010, 32(5):593-604.
- [23] Zhao T, Feng Y, Li J, et al. Schisandra polysaccharide evokes immunomodulatory activity through TLR4-mediated activation of macrophages[J]. Int J Biol Macromol 2014, 65:33-40.
- [24] Jing M, Wang Y, Xu L. Andrographolide derivative al-1 ameliorates dextran sodium sulfate-induced murine colitis by inhibiting NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways[J]. Oxid Med Cell Longev 2019, 2019(1):6138723-6138723.
- [25] 倪宇昕, 王勇, 邓艳芳. D-缬氨酸抑制巨噬细胞 M1 极化的体外研究[J]. 中国实验诊断学 2021, 25(8):1221-1224.