

比在冷热试验中无明显改善($P > 0.05$),但 DHI 评分在两组间差异具有统计学意义($P < 0.05$);提示前庭康复治疗使急性周围性单侧前庭损伤患者症状得到恢复。由于给予急性周围性单侧前庭损伤患者一段时间前庭康复治疗,在周围前庭客观评价中与无康复治疗组相比无明显差异,但在主观评分中有显著改善,提示前庭康复可能通过视觉、本体感觉等多个系统整合功能的提升来纠正外周前庭输入信息的不对称,达到改善头晕症状及恢复患者社会功能的目的^[11,12]。虽然前庭神经炎患者可能存在较长时间的前庭功能受损,但本研究显示通过康复干预能有效改善患者症状,提高生活质量。

因此,本研究表明,对于急性前庭神经炎患者,在标准化药物治疗的基础上,早期予以前庭康复治疗能够有效改善患者预后,降低致残率,值得临床推广应用。

参考文献

- 1 Strupp M, Brandt T. Peripheral vestibular disorders[J]. Curr Opin Neurol, 2013,26(1):81-89
- 2 Smith P. In a spin: acute vestibular neuritis[J]. Pract Neurol, 2013, 13(5):326-327
- 3 Reinhard A, Maire R. Vestibular neuritis: treatment and prognosis [J]. Rev Med Suisse, 2013,9(400):1775-1779
- 4 Manzari L, Burgess AM, MacDougall HG, et al. Vestibular function after vestibular neuritis [J]. Int J Audiol, 2013,52(10):713-718
- 5 Eleftheriadou A, Skalidi N, Velegrakis GA. Vestibular rehabilitation strategies and factors that affect the outcome[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2012,269(11):2309-2316
- 6 Baloh RW. Clinical practice. Vestibular neuritis[J]. N Engl J Med, 2003, 348(11):1027-1032
- 7 Goudakos JK, Markou KD, Psillas G, et al. Corticosteroids and vestibular exercises in vestibular neuritis. Single-blind randomized clinical trial [J]. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg, 2014,140(5):434-440
- 8 丁雷,刘畅,王嘉玺,等.眩晕残障程度评定量表(中文版)的评价[J].中华耳科学杂志,2013,2(11):228-230
- 9 Corna S, Nardone A, Prestinari A, et al. Comparison of Cawthorne-Cooksey exercises and sinusoidal support surface translations to improve balance in patients with unilateral vestibular deficit[J]. Arch Phys Med Rehabil, 2003,84(8):1173-1184
- 10 Jeong SH, Kim HJ, Kim JS. Vestibular neuritis[J]. Semin Neurol, 2013, 33(3):185-194
- 11 Han BI, Song HS, Kim JS. Vestibular rehabilitation therapy: review of indications mechanisms, and key exercises[J]. J Clin Neurol, 2011,7(4):184-196
- 12 Lacour M, Bernard-Demanze L. Interaction between vestibular compensation mechanisms and vestibular rehabilitation therapy: 10 recommendations for optimal functional recovery[J]. Front Neurol, 2015, 5:285

(收稿日期:2015-01-29)

(修回日期:2015-02-09)

褪黑素通过抑制 p38 通路减少腹腔巨噬细胞 NO 和 ROS 的产生

邵布勒 张雨雪 王恺婧 应斐 孙学成 吴建胜

摘要 **目的** 探究褪黑素对脂多糖刺激后大鼠腹腔巨噬细胞产生的 NO、ROS、p38 及磷酸化 p38 的影响及其相关机制。**方法** 使用 CCK8 试验检测褪黑素对大鼠腹腔巨噬细胞的药物毒性;使用酶标仪检测 NO 的表达;使用荧光显微镜检测 ROS 的表达;RT-PCR 法检测 mRNA 水平总 p38 的表达量;Western blot 法检测 p38 MAPK 通路中 p38 以及磷酸化 p38 的表达量。**结果** 褪黑素对大鼠腹腔巨噬细胞无药物毒性。褪黑素及 p38 抑制剂(SB203580)均有效抑制了脂多糖刺激后大鼠腹腔巨噬细胞 NO、ROS、以及磷酸化 p38 的表达,同时总 p38 的表达量并没有改变。**结论** 褪黑素通过抑制 p38 MAPK(mitogen-activated protein kinase)信号通路的激活进而减少脂多糖刺激后大鼠腹腔巨噬细胞的 NO($P = 0.000$)和 ROS($P = 0.000$)的产生。

关键词 褪黑素 巨噬细胞 一氧化氮 活性氧簇 p38

中图分类号 R363

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.05.017

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Q12H030005)

作者单位:325000 温州医科大学附属第一医院消化内科

通讯作者:吴建胜,电子信箱:wzwujs@163.com

Melatonin Decreases the Production of NO and ROS of Peritoneal Macrophages in Rat via Suppressing Activation of p38. Shao Bule, Zhang Yuxue, Wang Kaijing, et al. Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To investigate the effect and mechanisms of melatonin on the production of nitric oxygen, reactive oxygen species (ROS), p38 and phosphorylated p38 of lipopolysaccharides (LPS) stimulated rat peritoneal macrophages. **Methods** The toxicity of melatonin was assessed by cell counting kit-8 (CCK8) assay. ROS was detected by fluorescence microscope. The mRNA expression of total p38 was measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and the protein expression of p38 as well as phosphorylated p38 were detected by Western blot. **Results** Melatonin showed no toxicity on rat peritoneal macrophages. Melatonin along with p38 inhibitor (SB203580) both effectively suppressed the production of NO, ROS and the expression of phosphorylated p38 on LPS stimulated rat peritoneal macrophages, while did not change the expression of total p38. **Conclusion** Melatonin reduce the production of NO ($P=0.000$) and ROS ($P=0.000$) of LPS stimulated rat peritoneal macrophages via inhibiting the activation of p38 MAPK signal pathway.

Key words Melatonin; Macrophage; NO; ROS; p38

褪黑素(N-丙酰基-5-甲氧基色胺)是由哺乳动物松果体分泌的一种吲哚胺,最先于两栖动物和爬行动物皮肤变色的研究中被发现^[1]。褪黑素具有广泛的生物功能,包括调节昼夜规律、抗炎、免疫调节以及抗氧化作用,褪黑素能清除不同类型的自由基并激活抗氧化物质从而减弱氧化应激。大量的研究已经表明褪黑素能减轻由脂多糖引起的炎症,但是褪黑素究竟通过什么具体的机制与途径抑制促炎因子仍然不是很明确^[2]。在炎症过程中,大量的促炎介质一氧化氮(NO)通过一氧化氮合酶(NOS)产生。诱导型一氧化氮合酶(iNOS)催化精氨酸合成一氧化氮(NO),一氧化氮通过各种机制诱导炎性反应与组织损伤。有研究表明褪黑素可能通过下调诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达和减少细胞因子的分泌而抑制免疫系统的激活^[3]。活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)是正常氧代谢的副产物,并且在细胞信号转导,和保持机体内稳态起很大作用,但在外界刺激因素的影响下产生的过量活性氧簇会导致细胞的DNA受到破坏甚至突变^[4-6]。高水平的ROS能诱导氧化应激和炎性反应,进而导致生化与生理损伤^[7]。ROS能被体内的抗氧化剂清除,很多研究都已证明褪黑素是一种抗氧化剂^[8]。

p38是丝裂原激活蛋白激酶类的一种蛋白,能被许多刺激因素激活,例如细胞因子、紫外线等,同时也能被脂多糖激活,p38参与细胞生长、发育、凋亡等一系列生命过程。本研究的目的在于研究褪黑素在炎性反应中的抗炎与抗氧化应激作用,并探讨其与p38 MAPK通路的关系。

材料与方法

1. 材料:普通级标准健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠

18只,体重为 200 ± 20 g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,实验动物许可证号:[SCXK(沪)2007-0005]。

2. 试剂及仪器:褪黑素(MLT,美国Sigma公司)、脂多糖(LPS,美国Sigma公司)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO,北京索莱宝生物技术有限公司)、SB203580(美国Sigma公司)、1640培养基(美国Gibco公司)、胎牛血清(美国Gibco公司)、Trypsin-EDTA(美国Gibco公司)、兔抗磷酸化p38、兔抗p38、兔抗 β -actin(均为美国CST公司)、恒温二氧化碳培养箱(美国Thermo Forma公司)、超净工作台(Air-Tech公司,苏州净化设备厂)、生物倒置相差显微镜(日本Nikon公司)、EXL-808酶标仪(美国Biotek公司)、PCR仪(美国Thermo Hybrid公司)、荧光显微镜(日本Nikon公司)。

3. 方法:(1)大鼠腹腔巨噬细胞悬液的制备:用4%水合氯醛($0.7 \sim 0.8$ ml/100g)腹腔麻醉SD大鼠后,脱颈处死,于75%乙醇中浸泡5min,移入超净工作台,固定,剪去大鼠腹部皮肤后用20ml一次性无菌注射器于腹腔内注射无血清预冷RPMI1640培养液15ml,轻揉大鼠腹部4min,静置4min,于无菌条件下打开大鼠腹腔收集腹腔冲洗液。收集细胞悬液到15ml的离心管中,1000r/min离心5min,弃上清,用预冷PBS洗2次,然后用含10%胎牛血清(FBS)、100U/ml青霉素及100 μ g/ml链霉素的RPMI 1640培养基重悬,并将细胞密度调整为 3×10^6 /L,接种到96孔或6孔细胞培养板中,于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱培养3h后,弃上层培养液,用预冷的RPMI 1640培养基轻轻洗2次,去除未贴壁细胞即得已贴壁的巨噬细胞,台盼蓝染色示细胞活力 $\geq 96\%$ 。(2)褪黑素药物毒性试验:按“大鼠腹腔巨噬细胞悬液的制备”项中的方法提取大鼠腹腔巨噬细胞,将浓度为 3×10^6 /ml的细胞悬液200 μ l/孔接种于96孔板中,置37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中常规培养,3h后弃上层培养液纯化巨噬细胞,随后实验组加入含相应浓度褪黑素的RPMI 1640培养基200 μ l,对照组加不含褪黑素的等量培养基,继续培养24h,随后每孔加入100 μ l无血清培养液和10 μ l CCK8 (5mg/ml)溶液,继续培养3h,然后用酶标仪测定各孔在450nm波长处的吸光度(A值)。并用公式计算细胞

存活率: 细胞存活率(%) = 实验组 A 值均数/对照组 A 值均数 $\times 100\%$ 。(3) 采用 Griess 试剂盒检测 NO: 将浓度为 $3 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞悬液 200 微升/孔接种于 96 孔细胞培养板, 置 37°C 、5% CO_2 培养箱中常规培养, 3h 后弃上层培养液纯化巨噬细胞, 随后实验组加入含不同浓度 (500 $\mu\text{mol/L}$ 、250 $\mu\text{mol/L}$ 、125 $\mu\text{mol/L}$ 、62.5 $\mu\text{mol/L}$) 褪黑素的 RPMI1640 培养基 200 μl , SB 组加入相应浓度 SB203580 (5 $\mu\text{mol/L}$), 对照组加不含褪黑素的等量培养基培养 1h 后, 除空白对照组外各组加入 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) 作用 20h 后, 取各孔培养液上清 50 μl 加到 96 孔培养板, 按 50 微升/孔在各孔中加入室温 Griess Reagent I, 随后按 50 微升/孔, 各孔中加入室温 Griess Reagent II, 室温避光孵育 5 ~ 10min。使用酶标仪在 540nm 波长处检测吸光度。同时按 Griess 试剂盒说明书获得标准曲线方程并计算出各组产生的 NO 量。(4) 巨噬细胞活性氧簇 (ROS) 测定: 将浓度为 $3 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞悬液接种到 6 孔细胞培养板, 空白对照组、LPS 组、MLT 组 (250 $\mu\text{mol/L}$ 、125 $\mu\text{mol/L}$ 、62.5 $\mu\text{mol/L}$)、SB 组 (5 $\mu\text{mol/L}$), 每组设 3 个复孔。MLT 组与 SB 组加入相应浓度的 MLT 和 SB203580, 37°C 培养 1h 后 LPS 组、MLT 组与 SB 组加入等量 LPS (终浓度为 1 $\mu\text{g/ml}$), 37°C 培养 20h, 弃上清, 加入含 DCFH-DA (终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$) 探针的 RPMI 1640 培养基, 37°C 孵育 30min 后用 PBS 洗 3 次。用荧光显微镜在发射光波长 485nm, 检测光波长 520nm 处观察拍照。(5) RNA 提取与反转录聚合酶链反应 (RT-PCR): 使用 Trizol 试剂盒 (Invitrogen) 按照说明书步骤提取细胞总 RNA, 按 RT 试剂盒 (Tiangen) 说明书反转录并进行 PCR 扩增。以大鼠 β -actin 为内参。引物序列如下: β -actin (165bp): 上游引物: 5' - GCTACAGCTTACCACCACAG - 3'; 下游引物: 5' - GGTCTTTACGGATGTCAACGTC - 3'。p38 (367bp): 上游引物: 5' - CCGTTTCAGTCCATCATTC - 3'; 下游引物: 5' - TCATTTCGTCATCAGTGTGC - 3'。PCR 反应条件: 94°C 预变性 5min; 94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 30s, 30 个循环; 72°C 延伸 10min。扩增结束后, 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上 90V 电压恒压电泳约 30min, 随后使用凝胶成像系统拍照并分析吸光度值, mRNA 相对表达量 = 目的基因条带吸光度值/对应的 β -actin 条带吸光度值。(6) 巨噬细胞总蛋白提取: 将浓度为 $3 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞悬液接种到 10cm 细胞培养皿上, 设空白对照组、LPS 组、MLT 组 (250 $\mu\text{mol/L}$ 、125 $\mu\text{mol/L}$ 、62.5 $\mu\text{mol/L}$)、SB 组 (5 $\mu\text{mol/L}$)。MLT 组与 SB 组预先加入相应浓度的 MLT 和 SB203580, 37°C 培养 1h, 随后 LPS 组、MLT 组与 SB 组加入等量 LPS (终浓度为 1 $\mu\text{g/ml}$), 37°C 培养 20h 从培养箱中取出细胞, 弃去培养基, 预冷 PBS 洗 2 次。加入 1ml PBS, 刮下细胞并收集细胞悬液于 EP 管, 4°C , 8000r/min, 离心 3min。弃上清, 加入适量细胞蛋白裂解液 (每 1000 μl RIPA 加入 10 μl PMSF、100 μl 磷酸化酶抑制剂), 冰上裂解 40min, 提取的总蛋白样品经 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。配置 12% SDS-PAGE 分离胶及 5% 浓缩胶, 各样品取 50 μg 总蛋白量上样, 设置 60V 转 110V 恒压电泳, 随后 300mA 转膜 (PVDF 膜) 43 ~ 65min。

转膜完毕后 5% BSA 室温封闭 2h, 接着分别与相应待测蛋白的第 1 抗体反应, 所用的第 1 抗体兔抗磷酸化 p38、兔抗 p38、兔抗 β -actin 稀释度均为 1:1000。第 1 抗体与膜 4°C 孵育过夜, 过夜孵育后的膜用 TBST 在摇床上洗 3 次, 每次 10min, 接着室温孵育二抗 (抗兔二抗 1:20000), TBST 摇床洗膜 3 次, 每次 10min。最后用 ECL 化学发光显色法在凝胶成像仪下成像分析。

4. 统计学方法: 采用 SPSS 12.0 软件进行统计分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 进行方差分析。灰度分析使用 Image J 软件, 做图使用 Graphpad Prism 软件, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 褪黑素对大鼠腹腔巨噬细胞的药物毒性: 笔者首先用 CCK8 试验检测不同浓度 MLT (62.5、125、250、500 $\mu\text{mol/L}$) 对大鼠腹腔巨噬细胞的毒性。CCK8 数据显示不同浓度褪黑素与对照组相比, 差异无统计学意义, 说明褪黑素在设计的浓度范围内无任何不良反应 (图 1)。

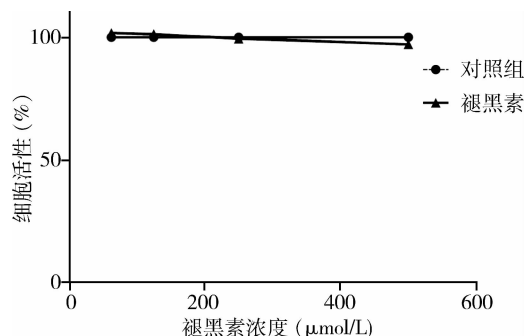


图 1 褪黑素对大鼠腹腔巨噬细胞的活力影响 ($n = 4$)

本实验所用的褪黑素浓度对大鼠腹腔巨噬细胞的活力没有影响。大鼠腹腔巨噬细胞在褪黑素 (62.5、125、250、500 $\mu\text{mol/L}$) 干预下培养 24h 后, 细胞活力用相应实验组吸光度/对照组吸光度 $\times 100\%$ 来计算

2. 褪黑素抑制一氧化氮 (NO) 的产生: 脂多糖能诱导巨噬细胞表达诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 进而释放一氧化氮 (NO)^[9]。大鼠腹腔巨噬细胞在脂多糖刺激后一氧化氮明显升高, 但在褪黑素干预下显著降低了巨噬细胞的一氧化氮产物 (与 LPS 组相比, $P < 0.01$), 并呈浓度相关性, 同时 P38 抑制剂也有效地抑制了 NO 的产生 (图 2)。浓度为 62.5、125、250、500 $\mu\text{mol/L}$ 的褪黑素组以及 SB 组与 LPS 组相比分别降低 NO 的程度达 4.74%、8.02%、19.09%、31.36% 和 6.52%。

3. 褪黑素对腹腔巨噬细胞内 ROS 产生的影响: 脂多糖的刺激使腹腔巨噬细胞内的 ROS 急剧升高 ($P = 0.000$), 然而褪黑素组能明显抑制巨噬细胞内

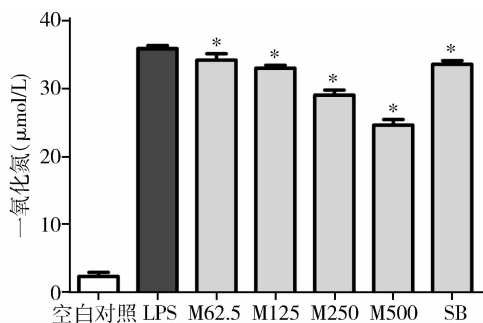


图2 褪黑素对脂多糖刺激后大鼠腹腔巨噬细胞一氧化氮产物生成的影响 ($n=4$)

巨噬细胞按 3×10^6 /ml 接种于 96 孔板, 提前与褪黑素、p38 抑制剂 (SB203580) 培养 1h 后, 加入脂多糖继续培养 20h, 空白对照组只有细胞未加 LPS 刺激。如柱状图所示为分别 4 次实验, 表示为均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 与 LPS 组相比, * $P < 0.01$

ROS 的产生 ($P=0.000$), 并且呈浓度相关性 (图 3)。终浓度为 62.5、125、250 $\mu\text{mol/L}$ 的褪黑素组和 SB 组能分别降低受刺激后巨噬细胞的 ROS 程度达 18%、45%、62% 和 46%。说明褪黑素能显著降低活化的腹腔巨噬细胞内的 ROS。

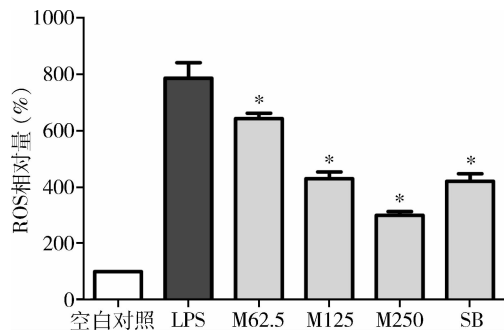


图3 褪黑素对脂多糖刺激后大鼠腹腔巨噬细胞 ROS 产物生成的影响 ($n=3$)

巨噬细胞按 3×10^6 /ml 接种于 6 孔板, 提前与褪黑素、p38 抑制剂 (SB203580) 培养 1h 后, 加入脂多糖继续培养 20h, 空白对照组只有细胞未加 LPS 刺激。如柱状图所示为分别 3 次实验, 表示为均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 与 LPS 组相比, * $P=0.000$

4. 褪黑素对腹腔巨噬细胞 p38 MAPK 通路激活的影响: MAPK 信号通路的激活跟许多炎性介质的合成有关, 比如 iNOS、TNF- α 。为了进一步探讨褪黑素抗炎、抗氧化应激的分子机制, 笔者通过 Western blot 法检测分析了磷酸化 p38 蛋白的表达。LPS 使正常大鼠腹腔巨噬细胞的 p38 磷酸化明显增加, 而褪黑素治疗组与 SB 组在不同程度上抑制了 p38 的激活即磷酸化与 LPS 组相比 ($P < 0.01$, 图 4), 同时笔者在基因水平同样也证明了总 p38 的量并没有改变 (图 5)。

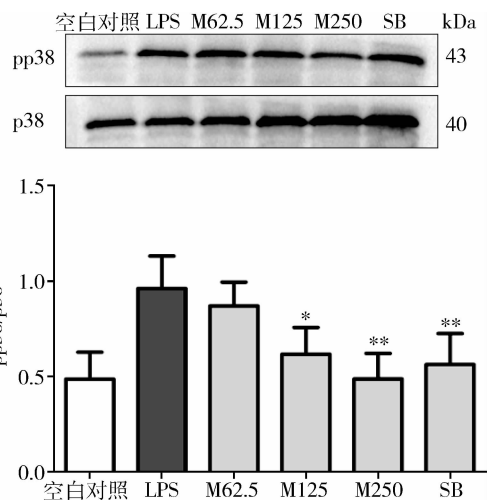


图4 褪黑素对脂多糖刺激后大鼠腹腔巨噬细胞磷酸化 p38 表达的影响 ($n=3$)

褪黑素与 p38 抑制剂 (SB203580) 的干预均能显著抑制 p38 的磷酸化。巨噬细胞按 3×10^6 /ml 接种于 10cm 细胞培养皿, 提前与褪黑素、p38 抑制剂 (SB203580) 培养 1h 后, 加入脂多糖继续培养 20h, 空白对照组只有细胞未加 LPS 刺激。如柱状图所示为分别 3 次实验, 表示为均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 与 LPS 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

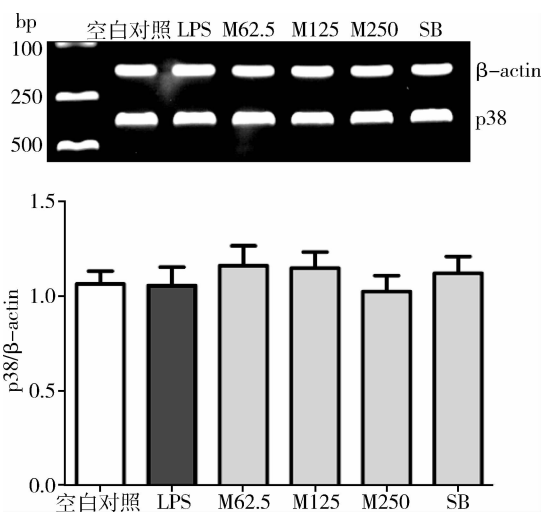


图5 褪黑素对脂多糖刺激后大鼠腹腔巨噬细胞总 p38 RNA 水平的影响 ($n=3$)

褪黑素与 p38 抑制剂 (SB203580) 的干预均没有改变细胞总 p38 的量。巨噬细胞按 3×10^6 /ml 接种于 6 孔板, 与褪黑素、p38 抑制剂 (SB203580) 预先培养 1h 后, 加入脂多糖继续培养 20h, 空白对照组只有细胞未加 LPS 刺激。如柱状图所示为分别 3 次实验, 表示为均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$)

讨 论

巨噬细胞是固有免疫的主要效应细胞。当微生物产物结合在病原体识别受体时, 巨噬细胞被激活,

并产生一系列的炎性介质和宿主炎性反应。本实验的目的是通过 LPS 刺激体外巨噬细胞造成炎症模型进而评估褪黑素在体外对炎症、氧化应激反应的作用。巨噬细胞受到外界刺激时, iNOS 基因被诱导, 产生大量的 NO, NO 作为细胞间的信使, 调节多种细胞功能, 如病原体的炎症和清除。但是, 过多的 NO 会结合 O_2^- 生成 $ONOO^-$, 引起氧化应激和细胞损伤^[10]。本实验表明, 褪黑素治疗能显著降低腹腔巨噬细胞内 NO 的产生, 提示褪黑素能够抑制 iNOS 基因的表达从而减少 NO 的产生, 进而对细胞内炎症及氧化应激起到了治疗作用。ROS 主要由线粒体产生, 在病原入侵的免疫反应中起主要作用。LPS 刺激巨噬细胞干扰细胞内氧化还原, 导致氧化应激反应, 改变细胞内氧化还原平衡, 产生 ROS 等相关损伤^[11]。ROS 引起一系列病理损伤, 包括细胞质、蛋白、DNA 的过氧化反应。实验结果表明, MLT 能显著降低炎症反应下巨噬细胞内的 ROS, 提示 MLT 的保护机制可能是通过清除腹腔巨噬细胞内的 ROS, 以减轻细胞内氧化应激反应。

为了进一步探讨褪黑素抑制氧化应激的分子机制, 笔者研究了褪黑素与 LPS 刺激下巨噬细胞 p38 MAPK 通路蛋白表达水平的关系。p38 是 MAPKs 家族中的一个成员, MAPKs 是丝氨酸 - 苏氨酸激酶家族, 控制基因转录, 蛋白合成, 细胞周期, 凋亡, 分化, 对细胞外的炎症刺激和氧化应激做出反应^[12]。研究发现哺乳动物细胞受各种刺激时, MAPKs 与 ROS 和 NO 的上调有密切关系。Niranjan 等^[2]的研究表明, 褪黑素能明显降低 LPS 诱导的星形肿瘤细胞内磷酸化 p38 的激活, 且与褪黑素呈浓度及时间相关性。同时, Esposito 等^[13]也验证了此观点, 证明褪黑素抑制 p38 MAPKs 激活与降低小鼠脊柱损伤有关。SB203580 是一种特异性的 p38 抑制剂, 能有效地抑制 p38 的自身磷酸化, 图 4 中的结果表明, 褪黑素与 p38 抑制剂都能明显抑制由 LPS 诱导的大鼠腹腔巨噬细胞 p38 的磷酸化, 而且 p38 抑制剂同样有效抑制了大鼠腹腔巨噬细胞 NO 和 ROS 的产生, 因此结合以上的实验结果可以解释褪黑素对细胞内氧化应激的改善是通过抑制 p38 MAPK 通路的激活即 p38 的磷酸化而起作用的, 但是 MAPKs 通路的其他两个因子是否起作用, 有待于继续研究和探讨。

综上所述, 褪黑素能够通过抑制 p38 MAPK 通路的激活, 从而减少 NO 的产生, 降低 ROS 水平, 从而改

善由 LPS 诱导的大鼠腹腔巨噬细胞的炎症和氧化应激反应。

参考文献

- 1 Filadelfi AM, Castrucci AM. Comparative aspects of the pineal/melatonin system of poikilothermic vertebrates[J]. J Pineal Res, 1996, 20(4):175-186
- 2 Niranjan R, Nath C, Shukla R. Melatonin attenuated mediators of neuroinflammation and alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor mRNA expression in lipopolysaccharide (LPS) stimulated rat astrocytoma cells, C6[J]. Free Radic Res, 2012, 46(9):1167-1177
- 3 Kang YS, Kang YG, Park HJ, et al. Melatonin inhibits visfatin-induced inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in macrophages[J]. J Pineal Res, 2013, 55(3):294-303
- 4 Yu JY, Zheng ZH, Son YO, et al. Mycotoxin zearalenone induces AIF- and ROS-mediated cell death through p53- and MAPK-dependent signaling pathways in RAW264.7 macrophages[J]. Toxicol In Vitro, 2011, 25(8):1654-1663
- 5 Zaidi SF, Ahmed K, Yamamoto T, et al. Effect of resveratrol on Helicobacter pylori-induced interleukin-8 secretion, reactive oxygen species generation and morphological changes in human gastric epithelial cells[J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(11):1931-1935
- 6 Lonkar P, Dedon PC. Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: reconciling chemical mechanisms and biological fates[J]. Int J Cancer, 2011, 128(9):1999-2009
- 7 Dangli R, Hekong W, Jiqin L, et al. ROS-induced ZNF580 expression: a key role for H2O2/NF-kappaB signaling pathway in vascular endothelial inflammation[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 359(1-2):183-191
- 8 Ahsen A, Gonul Y, Genc A, et al. Protective effect of melatonin on infrarenal aortic occlusion: this effect is related to anti-inflammatory effect and antioxidant effect[J]. Inflammation, 2014, 37(4):1111-1119
- 9 Chen H, Sohn J, Zhang L, et al. Anti-inflammatory effects of chicanine on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory cytokines in IkappaBalpha/MAPK/ERK signaling pathways[J]. Eur J Pharmacol, 2014, 724:168-174
- 10 Brown GC. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase[J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1504(1):46-57
- 11 Kang JW, Lee SM. Melatonin inhibits type 1 interferon signaling of toll-like receptor 4 via heme oxygenase-1 induction in hepatic ischemia/reperfusion[J]. J Pineal Res, 2012, 53(1):67-76
- 12 Munoz L, Ammit AJ. Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease[J]. Neuropharmacology, 2010, 58(3):561-568
- 13 Esposito E, Genovese T, Caminiti R, et al. Melatonin reduces stress-activated/mitogen-activated protein kinases in spinal cord injury[J]. J Pineal Res, 2009, 46(1):79-86

(收稿日期:2014-11-19)

(修回日期:2014-11-25)