

# STAT5 通路抑制剂匹莫齐特对 RAW264.7 细胞炎症模型 NO 和 iNOS 表达的影响<sup>△</sup>

喻鹏久<sup>1\*</sup>, 万利梅<sup>2</sup>, 谢 慧<sup>1#</sup>(1. 广州医科大学附属第一医院药学部, 广州 510120; 2. 中山大学附属博济医院呼吸内科, 广州 511300)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)22-3043-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.22.06

**摘要** 目的: 研究 STAT5 通路抑制剂匹莫齐特对脂多糖(LPS)诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 炎症模型一氧化氮(NO)和一氧化氮合成酶(iNOS)表达的影响。方法: 取对数生长期 RAW264.7 细胞, 分为空白对照组、药物对照(匹莫齐特 10 μmol/L)组、模型(LPS 1 μg/ml)组和匹莫齐特低、中、高浓度(2.5、5、10 μmol/L)组, 给予 LPS 前 30 min 给予匹莫齐特, 继续培养 24 h。采用 Griess 法检测各组细胞培养液上清中 NO 的含量; 实时定量聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 iNOS mRNA 表达; Western blot 法检测 iNOS 和磷酸化 STAT5(p-STAT5)的蛋白表达。结果: 与空白对照组比较, 模型组细胞中 NO 含量、iNOS mRNA 和蛋白表达、p-STAT5/STAT5 均增加, 差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 匹莫齐特中、高浓度组细胞中 NO 含量、iNOS mRNA 和蛋白表达、p-STAT5/STAT5 均降低, 差异具有统计学意义( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。结论: STAT5 通路抑制剂匹莫齐特可通过抑制细胞中 iNOS mRNA 和蛋白的表达而抑制 NO 的释放。

**关键词** 匹莫齐特; 脂多糖; 小鼠巨噬细胞 RAW264.7; STAT5 通路; 一氧化氮; 一氧化氮合成酶

## Effect of STAT5 Pathway Inhibitor Pimozide on NO and iNOS Expressions in the Inflammation Model of RAW264.7 Cell

YU Peng-jiu<sup>1</sup>, WAN Li-mei<sup>2</sup>, XIE Hui<sup>1</sup>(1. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510120, China; 2. Dept. of Respiratory Medicine, Boji Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 511300, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To investigate the effect of STAT5 pathway inhibitor pimozide on the expressions of nitric oxide (NO) and nitric oxide synthetase (iNOS) in the model of mouse macrophage RAW264.7 inflammation induced by lipopolysaccharide (LPS). METHODS: RAW264.7 cells in logarithmic growth phase were divided into blank control group, drug control group (10 μmol/L pimozide), model group (1 μg/ml LPS) and the pimozide groups of low, middle and high doses (2.5, 5 and 10 μmol/L), where the corresponding cells were given pimozide 30 min before the administration of LPS, and then were cultured for 24 h. Griess method was used to determine the content of NO in the supernate of cell culture solutions of all groups, real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) to determine iNOS mRNA expression, and Western blot method to determine the protein expression of iNOS and phosphorylated STAT5 (p-STAT5). RESULTS: The content of NO, iNOS mRNA and protein expressions and the content of p-STAT5/STAT5 in the cells in the model group were higher than those in the blank control group, with statistically difference ( $P < 0.01$ ). Compared to the model group, the pimozide groups of middle and high doses had lower content of NO, iNOS mRNA and protein expressions and the content of p-STAT5/STAT5 in the cells, with statistically difference ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). CONCLUSIONS: STAT5 pathway inhibitor pimozide can inhibit the release of NO by inhibiting iNOS mRNA and protein expressions in cells.

**KEYWORDS** Pimozide; Lipopolysaccharide; Mouse macrophage RAW264.7; STAT5 pathway; Nitric oxide; Nitric oxide synthetase

一氧化氮(NO)是一个具有多重生物活性的自由基分子。生理状态下, 适度浓度的NO具有舒张血管、介导神经信号传

△ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81402992); 广州医科大学博士科研项目(No.2013C31)

\* 主管药师, 博士。研究方向: 抗炎免疫药理学。电话: 020-83062528。E-mail: ypj725@163.com

# 通信作者: 主管药师, 博士。研究方向: 新药筛选及评价。电话: 020-83062528。E-mail: bernnan\_huixie@126.com

递等作用; 但在炎症过程中, 大量的NO由诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)合成, 与超氧阴离子反应生成过氧化亚硝基阴离子, 造成细胞脂质过氧化、蛋白质酪氨酸硝基化以及巯基氧化等, 介导了多种炎症性疾病的发生<sup>[1]</sup>。iNOS的表达受到多种转录因子的调节, 早期研究主要集中在转录因子κB(NF-κB)和丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)信号通路上<sup>[2-3]</sup>; 近年来研究发现, 信号传导与转录激活子(STAT)通路中的亚基STAT1也参与了iNOS的调节<sup>[4]</sup>。

匹莫齐特是一个多巴胺受体拮抗药,于1970年上市,临床主要用于精神分裂症的治疗。2011年,Nelson EA等<sup>[5]</sup>首次报道了匹莫齐特是STAT5通路的抑制剂,具有抗慢性髓细胞性白血病的药理活性。本实验建立脂多糖(LPS)诱导的小鼠巨噬细胞炎症模型<sup>[6]</sup>,以匹莫齐特作为工具药,探讨STAT5通路对iNOS表达潜在的调控作用。

## 1 材料

### 1.1 仪器

多功能酶标仪(美国Bio-Rad公司);ABI 7500型实时定量荧光聚合酶链反应(RT-PCR)仪(美国Applied Biosystems公司)。

### 1.2 药品与试剂

匹莫齐特对照品(美国Sigma公司,批号:P1793,纯度:>98%);LPS(美国Sigma公司,批号:l2880,超纯级);DMEM培养基、双抗、胎牛血清(美国Gibco公司);总RNA抽提试剂Trizol、逆转录试剂盒以及SYBR Green qPCR SuperMix-UDG kit试剂[宝生物工程(大连)有限公司];MTT、蛋白裂解液、Griess试剂盒、二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒以及羊抗兔二抗(碧云天生物技术有限公司);总STAT5和磷酸化STAT5(p-STAT5)单抗(美国Bioworld公司);iNOS和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单抗(美国Cell Signaling Technology公司)。

### 1.3 细胞

小鼠巨噬细胞株RAW264.7购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

将RAW264.7细胞培养于含双抗(100 u/ml的青霉素+100 μg/ml的链霉素)和10%胎牛血清的DMEM培养基中,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱孵育,当生长至70%~80%融合后进行传代。

### 2.2 细胞活性的检测

采用MTT法,将对数生长期的RAW264.7细胞以10 000个/孔的密度接种于96孔板上,贴壁过夜,分别给予0、2.5、5.0、10 μmol/L的匹莫齐特刺激24 h后,每孔加入20 μl MTT溶液(5 mg/ml),37℃下孵育4 h,吸去孔内培养液,加入150 μl 二甲基亚砜(DMSO),细胞置于摇床上振荡10 min以充分溶解结晶物,然后在酶标仪上于450 nm波长处检测光密度(OD)。

### 2.3 细胞中NO含量的检测<sup>[6]</sup>

将对数生长期的RAW264.7细胞以2×10<sup>5</sup>个/孔接种于24孔板中,贴壁过夜,分为空白对照组、药物对照(匹莫齐特10 μmol/L)组、模型(LPS 1 μg/ml)组和匹莫齐特低、中、高浓度(2.5、5、10 μmol/L)组,每组3个复孔,后4组细胞分别加入1 μg/ml LPS诱导复制细胞炎症模型,匹莫齐特于LPS诱导前30 min给药进行处理。细胞置于培养箱孵育24 h,采用Griess试剂盒检测各组细胞培养液上清中NO的含量。按公式计算NO的抑制率,抑制率=100%-[受试组NO含量-空白对照组NO含量]/(模型组NO含量-空白对照组NO含量)×100%]。

### 2.4 细胞中iNOS mRNA表达的检测

将对数生长期的RAW264.7细胞以1×10<sup>6</sup>个/孔接种于6孔板中,贴壁过夜,按“2.3”项下方法分组和给药。置于培养箱孵育6 h后,Trizol法提取细胞总RNA,提取出的RNA在紫外分光光度计下定量后逆转录获得cDNA。采用RT-PCR仪运行qPCR。引物由上海英潍捷基公司合成,iNOS上游引物序列:5'-

TCCATGACTCCCAGCACA-3',下游序列:5'-CCATCTCCTG-CATTCTTCC-3';GAPDH上游序列:5'-GGTGAAGGTCG-GTGTGAACG-3',下游序列:5'-CTCGCTCCTGGAAGATG-GTG-3'。反应条件:50℃ 2 min;95℃ 30 s;95℃ 5 s,60℃ 34 s,40个循环。扩增后运行溶解曲线程序以鉴定扩增产物的特异性。数据采用相对定量的 $\Delta\Delta C_t$ 法处理,以iNOS mRNA/GAPDH进行评价,并计算iNOS mRNA的抑制率。

### 2.5 细胞中iNOS、STAT5和p-STAT5蛋白表达的检测

采用Western blot法,将对数生长期的RAW264.7细胞以1×10<sup>6</sup>个/孔接种于6孔板中,贴壁过夜,按“2.3”项下方法分组和给药。用蛋白提取试剂盒分别提取细胞总蛋白,BCA蛋白定量法测定样品蛋白含量。取20~50 μg总蛋白加上样缓冲液煮沸后,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,半干转法将胶上蛋白转到PVDF膜上,用5%脱脂奶粉室温封闭1 h后,用封闭液稀释相应一抗(iNOS、GAPDH、STAT5和p-STAT5单抗)并室温孵育1 h,洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温反应1 h,洗膜后用电化学发光(ECL)试剂盒化学发光,X胶片曝光显影。使用Quantify One凝胶分析软件计算压片条带的灰度值,以iNOS/GAPDH、p-STAT5/STAT5评估各组蛋白表达的相对强度。

### 2.6 统计学分析

采用SPSS 13.0软件进行统计学分析。实验数据均为计量数据,采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,应用单因素方差检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 匹莫齐特对细胞活性的影响

结果表明,0、2.5、5.0、10 μmol/L的匹莫齐特对RAW264.7细胞无明显细胞毒作用。因此,本研究以下使用的匹莫齐特浓度范围为2.5~10 μmol/L。

### 3.2 匹莫齐特对细胞中NO释放的影响

结果显示,空白对照组、药物对照组、模型组和匹莫齐特低、中、高浓度组细胞中NO含量分别为(2.55±1.23)、(2.75±1.07)、(19.28±1.19)、(16.55±0.81)、(11.40±0.75)、(9.10±0.56) μmol/L( $n=3$ ),低、中、高浓度匹莫齐特对细胞中NO释放的抑制率分别为14.2%、40.9%、52.8%。与空白对照组比较,模型组细胞中NO含量增加,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。与模型组比较,匹莫齐特中、高浓度组细胞中NO含量降低,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。

### 3.3 匹莫齐特对细胞中iNOS mRNA和蛋白表达的影响

与空白对照组比较,模型组细胞中iNOS mRNA和蛋白表达增强,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。与模型组比较,匹莫齐特中、高浓度组细胞中iNOS mRNA和蛋白表达降低,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ )。其中低、中、高浓度匹莫齐特对细胞中iNOS mRNA表达的抑制率分别为19.3%、42.4%、56.4%。各组细胞中iNOS蛋白表达的电泳图见图1;各组细胞中iNOS mRNA和蛋白表达的测定结果见表1。

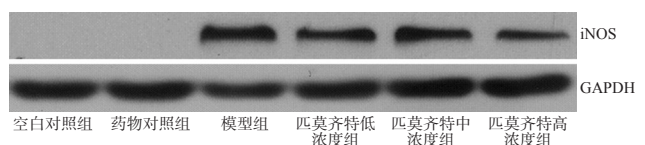


图1 各组细胞中iNOS蛋白表达的电泳图  
Fig 1 Electrophoretograms of the protein expression of iNOS in the cells in all groups

表1 各组细胞中iNOS mRNA和蛋白表达的测定结果( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Tab 1 Determination results of iNOS mRNA and protein expressions in the cells in all groups( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

组别	iNOS mRNA/GAPDH	iNOS 蛋白/GAPDH
空白对照组	1.00 ± 0	1.00 ± 0
药物对照组	1.07 ± 0.27	0.98 ± 0.02
模型组	108.90 ± 21.34*	12.74 ± 2.56*
匹莫齐特低浓度组	87.90 ± 16.86	9.45 ± 1.41
匹莫齐特中浓度组	62.77 ± 2.35**	8.43 ± 1.73*
匹莫齐特高浓度组	47.53 ± 7.31**	4.59 ± 1.06**

注:与空白对照组比较,\* $P<0.01$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

Note: vs. blank control group, \* $P<0.01$ ; vs. model group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

### 3.4 匹莫齐特对细胞中p-STAT5/STAT5的影响

结果显示,空白对照组、药物对照组、模型组和匹莫齐特低、中、高浓度组细胞中p-STAT5/STAT5分别为(1.00 ± 0)、(0.98 ± 0.05)、(6.64 ± 1.47)、(6.42 ± 1.44)、(4.10 ± 0.41)、(2.20 ± 0.48)。与空白对照组比较,模型组细胞中p-STAT5/STAT5增加,差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。与模型组比较,匹莫齐特中、高浓度组细胞中p-STAT5/STAT5降低,差异具有统计学意义( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )。各组细胞中p-STAT5、STAT5蛋白表达的电泳图见图2。

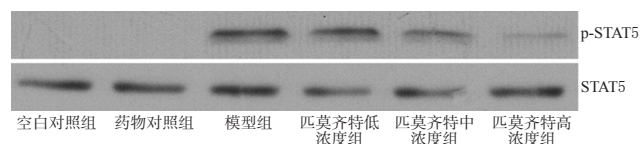


图2 各组细胞中p-STAT5、STAT5蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electrophoretograms of p-STAT5 and STAT5 expressions in the cells in all groups

## 4 讨论

炎症本质是机体应对各种损伤性刺激实现自我保护的复杂防御反应。在炎症过程中,巨噬细胞作为重要的效应细胞,一方面通过抗原识别及呈递,激活免疫反应;另一方面分泌大量的炎症介质,导致广泛的炎症级联反应。NO作为主要的炎症介质,在炎症的发生和发展中发挥着重要作用。研究显示,通过基因敲除或者药物干预等手段抑制NO的合成可明显改善患者或实验动物的炎症反应<sup>[8-9]</sup>。

为了研究STAT5通路对iNOS的表达是否具有调控作用,在本实验中,笔者观察了STAT5抑制剂匹莫齐特对巨噬细胞中iNOS表达以及NO释放的影响。根据前期研究表明,LPS刺激细胞24 h后NO释放及iNOS表达达到高峰平台期<sup>[6]</sup>,因此本研究选择24 h作为研究时间点。研究结果显示,匹莫齐特在2.5~10 μmol/L范围内可剂量依赖性地抑制LPS诱导的iNOS蛋白和mRNA表达,以及细胞中NO的释放。同时,笔者也研究了匹莫齐特对p-STAT5蛋白表达的影响。文献显示,p-STAT5蛋白在LPS刺激3 h后达到高峰<sup>[10]</sup>,本研究显示,匹莫齐特也抑制了LPS诱导的p-STAT5蛋白表达。MTT实验结果则显示,上述匹莫齐特的抑制作用是药物本身的活性,而不是通过对细胞的毒性作用而产生。鉴于氟哌啶醇和利培酮等其

他多巴胺受体抑制剂对iNOS的表达无影响<sup>[11]</sup>,笔者推断,对STAT5通路的抑制作用是匹莫齐特减少NO释放的主要机制。

综上所述,STAT5抑制剂匹莫齐特可抑制LPS诱导的iNOS mRNA和蛋白表达,进而减少NO的释放。抑制p-STAT5蛋白表达可能成为治疗NO介导的炎症性疾病的新靶点,这一结论可以为其新药研制提供参考。

## 参考文献

- [1] Litvinova L, Atochin DN, Fattakhov N, et al. Nitric oxide and mitochondria in metabolic syndrome[J]. *Front Physiol*, 2015, doi:10.3389/fphys.2015.00020.
- [2] Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy: from molecular mechanisms to therapeutic benefits[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1754(1/2):253.
- [3] 李冬梅,徐丽,张红果,等.芍药苷对脑缺血再灌注模型沙土鼠脑组织炎症反应因子的影响[J]. *中国药房*, 2015, 26(1):56.
- [4] Rauch I, Müller M, Decker T. The regulation of inflammation by interferons and their STATs[J]. *JAKSTAT*, 2013, 2(1):e23 820.
- [5] Nelson EA, Walker SR, Weisberg E, et al. The STAT5 inhibitor pimozide decreases survival of chronic myelogenous leukemia cells resistant to kinase inhibitors[J]. *Blood*, 2011, 117(12):3421.
- [6] Yu PJ, Jin H, Zhang JY, et al. Pyranocoumarins isolated from peucedanum praeruptorum dunn suppress lipopolysaccharide-induced inflammatory response in murine macrophages through inhibition of NF-κB and STAT3 activation[J]. *Inflammation*, 2012, 35(3):967.
- [7] 廖晖, Banbury LK, Leach DN. 12味止血中药对脂多糖诱导小鼠巨噬细胞产生一氧化碳的抑制作用[J]. *中国药房*, 2007, 18(9):649.
- [8] Barbanti P, Egeo G, Aurilia C, et al. Drugs targeting nitric oxide synthase for migraine treatment[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2014, 23(8):1 141.
- [9] Liu Q, Rehman H, Krishnasamy Y, et al. Improvement of liver injury and survival by JNK2 and iNOS deficiency in liver transplants from cardiac death mice[J]. *J Hepatol*, 2015, doi:10.1016/j.jhep.2015.02.017.
- [10] Choi HI, Chung KJ, Yang HY, et al. Peroxiredoxin V selectively regulates IL-6 production by modulating the Jak2-Stat5 pathway[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.038.
- [11] Zhang XR, Zhang ZJ, Jenkins TA, et al. The effect of chronic antipsychotic drug administration on nitric oxide synthase activity and gene expression in rat penile tissues [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2010, 20(4):211.

(收稿日期:2015-04-03 修回日期:2015-06-02)

(编辑:邹丽娟)