

·论著·

# 低强度脉冲式超声波在脂多糖诱导的RAW264.7巨噬细胞分化中的抗炎和抗氧化作用

尹娟<sup>1</sup> 杨兴<sup>2</sup> 李平<sup>1</sup> 徐曼馨<sup>3</sup> 鲍玉<sup>3</sup> 张志鹏<sup>3</sup> 薛慧<sup>3</sup>

<sup>1</sup>南京医科大学姑苏学院,南京医科大学附属苏州医院,苏州市立医院中心实验室,苏州 215008; <sup>2</sup>南京医科大学姑苏学院,南京医科大学附属苏州医院,苏州市立医院骨科,苏州 215008; <sup>3</sup>南京医科大学姑苏学院,南京医科大学附属苏州医院,苏州市立医院口腔科,苏州 215008

通信作者:薛慧,Email:xuehuislyy@126.com

**【摘要】目的** 研究低强度脉冲式超声波(LIPUS)对RAW264.7巨噬细胞极化的影响及相关分子机制。**方法** 100 ng/mL脂多糖(LPS)和10 ng/mL白细胞介素(IL)-4诱导巨噬细胞RAW264.7分别向M1和M2型极化,45 mW/cm<sup>2</sup>强度LIPUS对巨噬细胞处理25 min。采用流式细胞术检测巨噬细胞氧化应激活性氧(ROS)水平、M1分化标志物CD80和CD11b,以及M2分化标志物CD163的表达水平。采用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测CD80、CD11b、核转录因子κB(NF-κB) p65、肿瘤坏死因子α(TNF-α)、白细胞介素(IL)-1β和IL-6的mRNA水平。采用Western blot技术检测细胞p65、p-p65、TNF-α、IL-1β和IL-6表达水平。采用流式细胞术检测细胞培养上清TNF和IL-6表达水平。**结果** LIPUS可明显减少LPS诱导的RAW264.7细胞ROS水平。LPS诱导后,RAW264.7细胞M1分化标志物CD80和CD11b表达和转录水平均上调;LIPUS可抑制LPS对RAW264.7细胞向M1的诱导,差异具有统计学意义。并且,LIPUS可促进IL-4诱导的巨噬细胞M2分化标志物CD163表达。LPS诱导的RAW264.7细胞炎症因子NF-κB p65、TNF-α、IL-1β和IL-6 mRNA水平上调,LIPUS可下调这些炎症因子的mRNA水平,差异均具有统计学意义。LIPUS抑制了LPS对RAW264.7细胞因子蛋白p65和p-p65、IL-1β、TNF-α和IL-6蛋白表达上调的作用。胰酶可以通过激活ROS-NF-κB通路,回复LIPUS促进巨噬细胞M1分化的作用。**结论** LIPUS可通过ROS-NF-κB抑制RAW264.7向巨噬细胞M1型分化,促进RAW264.7向巨噬细胞M2型分化。氧化应激和炎症因子表达水平被抑制。LIPUS可能在牙周疾病中起到抑制氧化和炎症的作用,从而发挥对牙周疾病的治疗功能。

**【关键词】** 低强度脉冲式超声波; 氧化应激活性氧; 炎症; 巨噬细胞分化; 牙周疾病

**基金项目:**江苏省科技计划(BE2022737);苏州市科技发展计划(SYSD2020245、SYS2020177、SKJY2021123);苏州市第五批姑苏卫生人才培养项目(GSWS2019062、GSWS2020077)

**引用著录格式:**尹娟,杨兴,李平,等.低强度脉冲式超声波在脂多糖诱导的RAW264.7巨噬细胞分化中的抗炎和抗氧化作用[J/OL].中华口腔医学研究杂志(电子版),2023,17(1):26-36.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2023.01.004

## The mechanism of anti-inflammatory and antioxidant effects of low-intensity pulsed ultrasound on lipopolysaccharide-induced RAW264.7 macrophage differentiation

Yin Juan<sup>1</sup>, Yang Xing<sup>2</sup>, Li Ping<sup>1</sup>, Xu Minxin<sup>3</sup>, Bao Yu<sup>3</sup>, Zhang Zhipeng<sup>3</sup>, Xue Hui<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Central Laboratory, Suzhou Municipal Hospital, The Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University, Gusu School, Nanjing Medical University, Suzhou 215008, China; <sup>2</sup>Department of Orthopedics, Suzhou Municipal Hospital, The Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University, Gusu School, Nanjing Medical University, Suzhou 215008, China; <sup>3</sup>Department of Stomatology, Suzhou Municipal Hospital, The Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University, Gusu School, Nanjing Medical University, Suzhou 215008, China

Corresponding author: Xue Hui, Email: xuehuislyy@126.com

**[Abstract]** **Objective** To study the effects of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on the polarization of RAW264.7 macrophages and related molecular mechanisms. **Methods** Lipopolysaccharide (LPS, 100 ng/mL) or IL-4 (10 ng/mL) was used to induce M1 or M2 polarization of macrophages RAW264.7. The macrophages were treated with 45 mW/cm<sup>2</sup> LIPUS for 25 min. Flow cytometry was used to detect the reactive oxygen species (ROS) level of macrophages and the expression levels of CD80 and CD11b, or CD163, which were markers of M1 or M2. The mRNA levels of *CD80*, *CD11b*, *NF-κB p65*, *TNF-α*, *IL-1β* and *IL-6* were detected by RT-PCR. The expression levels of p65, p-p65, TNF-α, IL-1β and IL-6 were detected by Western blot. The expression levels of TNF and IL-6 in the supernatant of cell culture were detected by flow cytometry. **Results** LIPUS could significantly reduce the ROS level of LPS-induced RAW264.7 cells. After LPS induction, the expression and transcription levels of CD80 and CD11b, markers of M1 differentiation, were up-regulated in RAW 264.7 cells. LIPUS inhibited the differentiation induction of LPS on RAW264.7 cells to M1, and the difference was statistically significant. Moreover, LIPUS promoted the expression of CD163, a marker of M2. The mRNA levels of *NF-κB p65*, *TNF-α*, *IL-1β* and *IL-6* in LPS-induced RAW264.7 cells were up-regulated, and LIPUS down-regulated the mRNA levels of these inflammatory factors, with statistically significant differences. LIPUS inhibited the up-regulation of RAW264.7 cytokine proteins p65 and p-p65, IL-1β, TNF-α and IL-6 by LPS. Trypsin restored the role of LIPUS in promoting macrophage M1 differentiation by activating the ROS-NF-κB pathway. **Conclusions** LIPUS inhibited the LPS-induced differentiation of RAW264.7 into macrophages M1 type through ROS-NF-κB, oxidative stress and the expression levels of inflammatory factors of RAW264.7. LIPUS promoted the M2 polarization of RAW264.7. LIPUS may play a therapeutic role in periodontal diseases by inhibiting M1 differentiation of macrophages, which reduced oxidative stress and inflammation.

**[Key words]** Low-intensity pulsed ultrasound; Reactive oxygen species; Inflammation; Macrophage differentiation; Periodontal diseases

**Fund Programs:** Science and Technology Planning Project of Jiangsu Province (BE2022737); Science and Technology Development of Suzhou (SYS2020245, SYS2020177, SKJY2021123); The Fifth Gusu Training Project of Medical Talents in Health System of Suzhou, Jiangsu Province (GSWS2019062, GSWS2020077)

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2023.01.004

低强度脉冲式超声波 (low-intensity pulsed ultrasound, LIPUS) 是一种频率低、强度低、脉冲式输出的超声波。有研究表明, LIPUS 具有抑制炎症<sup>[1]</sup>、促进成骨再生<sup>[2]</sup>和刺激血管生成因子生成<sup>[3]</sup>等作用。LIPUS 又因为其无创和成本低等优势, 近年来常被应用于骨科<sup>[4-6]</sup>、口腔科<sup>[2]</sup>和心血管内科<sup>[7]</sup>等相关疾病的辅助治疗。

LIPUS 常被应用于牙周炎的辅助治疗。目前, 对于 LIPUS 在牙周疾病及其相关机制研究主要集中在牙周膜干细胞和牙囊干细胞。LIPUS 作用于牙周膜干细胞时, 可以促进细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 合成增加, 并促进成骨分化基因蛋白的表达<sup>[8]</sup>。LIPUS 作用于聚乙二醇/聚乳酸-羟基乙酸共聚物 [poly (ethylene glycol)-poly (lactide-co-glycolic acid), PEG-PLGA] 纳米粒可调节骨形成蛋白 2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2) 和基质细

胞衍生因子-1α (stromal-cell derived factor-1 alpha, SDF-1α) 的释放, 促进人牙周膜干细胞迁移和成骨分化<sup>[9]</sup>。已有研究表明, 巨噬细胞相对数量及其分化在牙周炎症中起重要调节作用<sup>[10-11]</sup>。在膝骨关节炎的研究中, 有学者发现 SQSTM1 依赖的 PKM2 自噬降解抑制成熟白细胞介素 (IL)-1β 的产生, 有助于 LIPUS 介导的抗炎作用<sup>[1]</sup>。此外, LIPUS 可通过调节巨噬细胞极化, 加速肌腱-骨界面修复, 促进脊柱融合<sup>[6,12]</sup>。关于 LIPUS 对牙周疾病中巨噬细胞分化的研究较少。

在心血管相关疾病的研究中, 有学者发现 LIPUS 处理可下调小鼠骨髓来源巨噬细胞核转录因子 κB (nuclear transcription factor-kappa B, NF-κB)/丝裂素活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 通路相关蛋白水平及巨噬细胞 M1 分化标志物 *IL-6*、*IL-23α*、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis

factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的mRNA水平,并减弱巨噬细胞的吞脂能力<sup>[13]</sup>。慢性牙周炎患者的唾液可刺激外周血单个核细胞(peripheral blood monocellular cell, PBMC)和人单核细胞白血病细胞(tohoku hospital pediatrics 1, THP1)巨噬细胞样分化和活化,且促进破骨成熟因子的分泌<sup>[14]</sup>。牙周炎患者的唾液中存在较多的微生物代谢产物、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)等毒力因子及炎症因子等,可能促进巨噬细胞向M1型分化。而M1型分化的巨噬细胞又可以促进IL-6、TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 等炎症因子表达,维持炎性微环境<sup>[15-16]</sup>。LIPUS可通过活性氧(reactive oxygen species, ROS)、免疫检查点、细胞因子和免疫耐受重构等途径,抑制炎症和肿瘤生长<sup>[17]</sup>。有研究表明,脊髓损伤后牙髓干细胞来源的外泌体通过降低ROS调控MAPK-NF- $\kappa$ B p65信号通路抑制M1巨噬细胞极化<sup>[18]</sup>。

PBMC从外周血中分离出来,其成分复杂,主要包括淋巴细胞(T细胞、B细胞和NK细胞)、单核细胞、吞噬细胞、树突状细胞和其他少量细胞类型。若要用于LIPUS刺激实验,还需分选其中可用于诱导巨噬细胞分化的单核细胞,实验成本太高,成功率难以预计。其中大部分细胞已不具备分化增殖能力,因此并不适于培养及后续诱导分化及刺激。THP1细胞在诱导分化前为悬浮细胞,诱导分化后才贴壁,且诱导周期较长,加入的刺激因子较多。本课题组其他方向的实验有用到THP1细胞巨噬细胞M1或M2分化,但分化成功率不如RAW264.7细胞,并且在预实验中尝试过LIPUS刺激THP1 M1分化的细胞,因状态不佳难以继续后续实验。RAW264.7半贴壁,生长状态良好,诱导分化比较容易,也常被用于巨噬细胞M1和M2分化。结合预实验中LIPUS刺激对THP1状态细胞的影响较大,本研究采用了RAW264.7细胞。

综上所述,推测在牙周疾病临床治疗中,LIPUS可能通过ROS-NF- $\kappa$ B通路抑制巨噬细胞M1分化,促进M2分化,调控牙周炎症微环境。本研究旨在研究LIPUS对巨噬细胞分化的作用,以期探索LIPUS治疗牙周疾病的具体分子机制。

## 材料与方法

### 一、实验相关材料

巨噬细胞 RAW264.7 (CL - 0190, 普诺赛),

DMEM高糖培养基(SH30243.01, Hyclone, 美国), 胎牛血清(10270-106, Gibco, 美国), LPS(HY-D1056, MCE, 美国), 小鼠 IL4(HY-P70644, MCE, 美国), 青霉素链霉素双抗溶液(SV30010.01, Hyclone, 美国), PE-抗 CD80 抗体(PE-65076, 武汉三鹰生物技术有限公司), PE-抗 CD163 抗体(156703, Biolegend, 美国), FITC-抗 CD11b 抗体(101205, Biolegend, 美国), 2', 7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(2', 7'- dichlorodihydrofluorescein diacetate, H2DCFDA, 别名DCFH-DA, HY-D0940, MCE, 美国), 活性氧检测试剂盒(S0033S, 上海碧云天生物科技有限公司), TRIzol试剂(15596018-200ml, Invitrogen, 美国), 预混型反转录试剂盒PrimeScript™ RT Master Mix -Perfect Real Time盒(TKR-RR036A, TaKaRa, 日本), 预混型定量试剂盒SYBR® Premix Ex Taq™ II -Tli RNaseH plus (TKR-RR820B A×2, TaKaRa, 日本), DEPC处理水(B501005-0500, 上海生工生物工程股份有限公司), 罗氏480荧光定量PCR板(4729692001, Roche, 德国), 引物合成(苏州金唯智生物科技有限公司)。

### 二、脂多糖诱导RAW264.7巨噬细胞分化

使用含 $\varphi=10\%$  FBS和 $\varphi=1\%$ 青霉素链霉素双抗溶液的DMEM高糖培养基培养巨噬细胞RAW264.7,以 $1.2\times10^6$ 个/mL接种。培养基中加入100 ng/mL LPS处理48 h,诱导RAW264.7巨噬细胞M1分化。培养基中加入10 ng/mL IL-4处理48 h,诱导RAW264.7巨噬细胞M2分化。

### 三、低强度脉冲式超声波处理细胞方法

使用低强度超声波治疗仪(OSTEOTRON IV, 伊藤, 日本)对巨噬细胞进行处理。

1. 超声设置条件:强度45 mW/cm<sup>2</sup>,时间25 min,间隔24 h超声处理1次,每组细胞超声处理2次。

2. RAW264.7细胞分组及处理方法:(1)RAW组:DMEM培养基培养细胞作为阴性对照组;(2)诱导组:RAW+LPS组,用含100 ng/mL LPS的DMEM培养基培养细胞诱导M1型分化;RAW+IL-4组,用10 ng/mL IL-4的DMEM培养基培养细胞诱导M2型分化;(3)诱导并LIPUS处理组:RAW+LPS+LIPUS组,用含100 ng/mL LPS DMEM培养基培养细胞,并使用LIPUS处理;RAW+IL-4+LIPUS组,用含10 ng/mL IL-4的DMEM培养基培养细胞,并使用LIPUS处理;(4)RAW+Rosup组:DMEM培养基培养细胞,并加入Rosup试剂促进细胞活性氧生成作为阳性对照组,本组只在活性氧检测实验中出现;(5)RAW+LIPUS

组:DMEM 培养基培养细胞,同时使用 LIPUS 刺激;(6)RAW+LPS+LIPUS+Trypsin 组:使用 LPS 诱导,并 LIPUS 和 Trypsin(0.025%)刺激细胞,本组只在胰酶回复实验中出现。

#### 四、流式细胞术检测细胞氧化水平

RAW264.7 细胞贴壁不牢,轻轻吹打使细胞重悬。收集至 1.5 mL 离心管中,1 500 r/min 离心 5 min(离心半径 15 cm),去上清。每管加入 3 mL 磷酸盐缓冲液(PBS),轻轻吹打重悬,1 500 r/min 离心 5 min,去上清,洗涤 2 次。每 EP 管中加入 1 mL 预热 PBS 配置的 5 μmol/L 活性氧荧光探针 H2DCFDA,37 °C 避光孵育 30 min。阳性对照组(RAW+Rosup 组)细胞,未经 LPS 和 LIPUS 刺激,于 5 μmol/L H2DCFDA,37 °C 避光孵育 30 min 后,向 PBS 中加入活性氧检测试剂盒中的 Rosup 试剂使终质量浓度为 50 μg/mL,37 °C 避光孵育 30 min。每管加入 3 mL PBS,轻轻吹打重悬,1 500 r/min 离心 5 min,去上清。将样本立即上流式细胞分析仪(FACS Canto II, BD, 美国)检测 FITC 通道信号强度。

#### 五、流式细胞术检测巨噬细胞 M1 或 M2 分化

收集 LIPUS 超声处理的细胞,及其对照组细胞,至 1.5 mL 离心管中;PBS 洗涤 2 次后,使用 5 μL PE-抗 CD80 抗体,5 μL FITC-抗 CD11b 抗体,或 20 μL PE-抗 CD163 抗体,4 °C 孵育 30 min,上流式细胞分析仪检测 PE 或 FITC 信号强度。

#### 六、实时定量反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测巨噬细胞分化标志物及炎症因子转录水平

收集  $1 \times 10^6$  细胞加入 1 mL 的 TRIZOL 试剂,加入 0.2 mL 氯仿,手动颠倒混匀 15 s,室温放置 2~3 min;4 °C,12 000 ×g 离心 15 min;转移上层水相至 0.5 mL 异丙醇,混匀室温放置 10 min;4 °C,1 200 ×g 离心 15 min,去上清;加入  $\varphi = 75\%$  乙醇溶液,混匀,4 °C,7 500 ×g 离心 5 min,去除乙醇溶液,空气中干燥 5~10 min;加入 40 μL DEPC 水,反复吹打溶解后,使用 NanoDrop 超微量分光光度计(NanoDrop Lite,Thermo,美国)检测 RNA 浓度和质量。

使用预混型反转录试剂 PrimeScript<sup>TM</sup> Master Mix-Perfect Real Time(TKR-RR036A,TaKaRa,日本)试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA。使用预混型 PCR 定量试剂盒 TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II-Tli RNaseH Plus(TKR-RR820B A×2,TaKaRa,日本)检测巨噬细胞分化标志物(CD80 和 CD11b)及炎症因子(NF-κB、IL-6、TNF-α 和 IL-1β)转录水平。引物序列见表 1。

表 1 反转录聚合酶链反应(RT-PCR)引物序列

基因	引物序列
$\beta$ -actin	正向:5'-GCAGGAGTAGCATGAGTCGG-3' 反向:5'-ACGCAGCTCAGTAACAGTC-3'
IL-6	正向:5'-CTGCAAGAGACTTCCATCCAG-3' 反向:5'-AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG-3'
TNF- $\alpha$	正向:5'-CCGATGGGTTGTACCTTGTC-3' 反向:5'-AGATAGCAAATCGGCTGACG-3'
IL-1 $\beta$	正向:5'-CAGGCAGGCAGTATCACTCA-3' 反向:5'-AGGTGCTCATGTCCTCATCC-3'
CD11b	正向:5'-CCAGTACTTCGGGCAGTCTC-3' 反向:5'-GGCTCTGAGCAGCAGAAGAT-3'
CD80	正向:5'-GGAGATGCTCACGTGTCAGA-3' 反向:5'-CAACGATGACGACGACTGTT-3'
NF-κB p65	正向:5'-TCAATGGCTACACAGGACCA-3' 反向:5'-GGCAGAGGTCAGCCTCATAG-3'

#### 七、统计学处理方法

使用软件 GraphPad Prism 8.0.1 进行统计学分析。使用 Descriptive statistics 进行数据描述,统计均值、标准差和标准误等。采用重复测量资料的数据进行 One-Way ANOVA 单因素方差分析。若方差齐则采用 Dunnett 法进行实验组与对照组间差异比较;若方差不齐,则采用 Dunnett's T3 方法进行组间差异比较。当  $P < 0.05$  时,组间差异被认为有统计学意义。

### 结 果

#### 一、低强度脉冲式超声波抑制脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞氧化水平

LPS 诱导 48 h 后,RAW264.7 细胞(图 1A)末端分叉变多,细胞呈蛋饼状。为检测 LIPUS 对 RAW264.7 细胞内 ROS 生成的作用,实验采用流式细胞术检测 ROS 的生成强度。结果显示:LPS 诱导可促进细胞内 ROS 增多(图 1B),LIPUS 处理细胞可显著减少细胞内 ROS 生成,并显著逆转 LPS 对 ROS 生成的诱导作用,流式检测结果  $ROS_{LPS\text{组}} = 1798 \pm 149$ , $ROS_{LPS+LIPUS\text{组}} = 838 \pm 22$ ,差异有统计学意义 [95% CI(788, 1 133)], $P < 0.001$ ,图 1C、图 2]。表明 LIPUS 抑制 LPS 诱导的 ROS 生成。

#### 二、低强度脉冲式超声波抑制脂多糖诱导的 RAW264.7 向巨噬细胞 M1 型分化,促进巨噬细胞 M2 型分化

为研究 LIPUS 对 RAW264.7 向 M1 型分化的影响,流式细胞术和 RT-PCR 被用于检测巨噬细胞 M1 型标志物 CD80 和 CD11b 的表达量和 mRNA 水平。

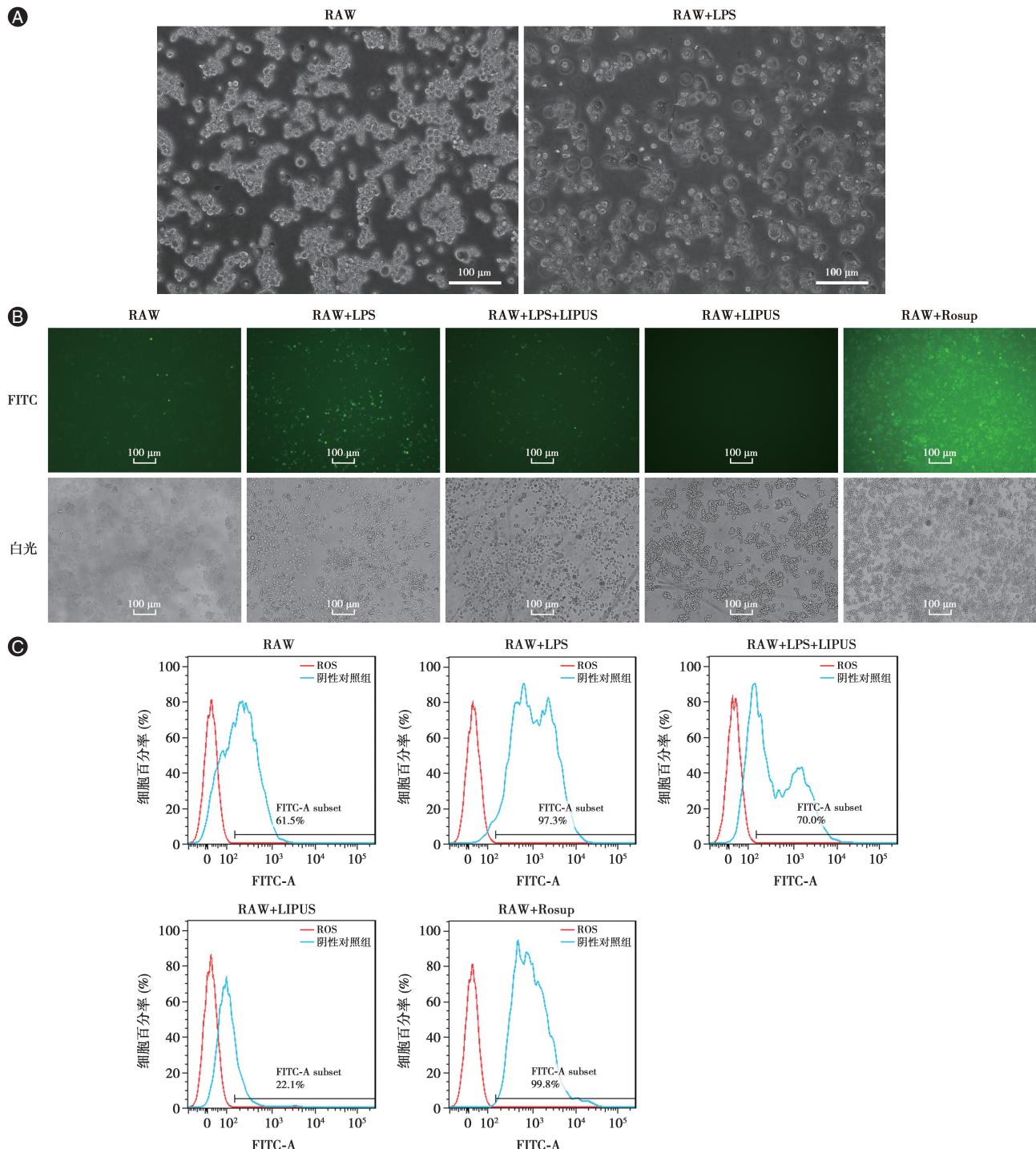


图1 低强度脉冲式超声波(LIPUS)抑制100 ng/mL脂多糖(LPS)诱导的RAW264.7细胞氧化水平 A:LPS诱导RAW264.7分化相差显微镜图; B:LPS诱导RAW264.7分化活性氧(ROS)染色荧光检测; C:LPS诱导RAW264.7分化ROS染色流式检测。

1. LIPUS抑制LPS诱导的RAW264.7细胞分化：流式散点图结果显示，LPS诱导RAW264.7分化后，细胞前向散射光(forward scatter, FSC)和侧向散射光(side scatter, SSC)信号均变强，表明细胞大小和复杂程度变大。LIPUS处理，可一定程度上逆转LPS诱导后RAW264.7细胞FSC和SSC信号变强(图3A)。

## 2. LIPUS抑制LPS诱导的RAW264.7细胞CD80表达：

LPS诱导后，流式检测RAW264.7细胞CD80表达(图3B)增强，LIPUS处理细胞可逆转LPS诱导对CD80表达上调的作用， $CD80_{LPS}$ 组 =  $1\ 762 \pm 6$ ， $CD80_{LPS+LIPUS}$ 组 =  $1\ 160 \pm 6$ ，差异有统计学意义[95% CI (514, 691)， $P < 0.001$ ，图3C]。RT-PCR检测CD80 mRNA转录水平与流式检测结果相符合： $CD80$  mRNA<sub>LPS</sub>组 =  $0.018\ 5 \pm 0.003\ 5$ ， $CD80$  mRNA<sub>LPS+LIPUS</sub>组 =

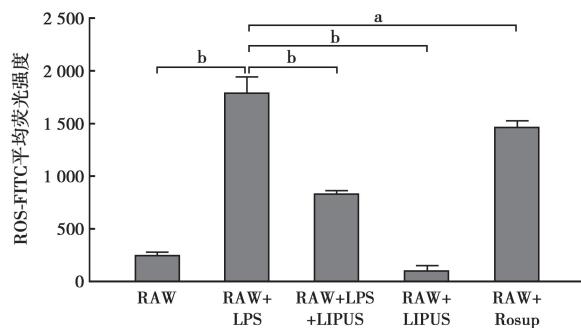


图2 活性氧(ROS)流式检测结果 FITC 通道平均荧光强度统计图  
采用 One-Way ANOVA 分析统计组间差异,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.001$ 。

0.005 3±0.000 4, 差异有统计学意义[95% CI(0.007 8, 0.018 7),  $P < 0.001$ , 图 3D]。

3. LIPUS 抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 CD11b 表达: RAW264.7 细胞 CD11b 表达在 LPS 诱导下同样明显增强, LIPUS 处理亦可逆转这一效应(图 4A)。CD11b<sub>LPS</sub> 组 = 317 ± 7, CD11b<sub>LPS+LIPUS</sub> 组 = 216 ± 3, 差异有统计学意义 [95% CI(91, 111),  $P < 0.001$ , 图 4B]。

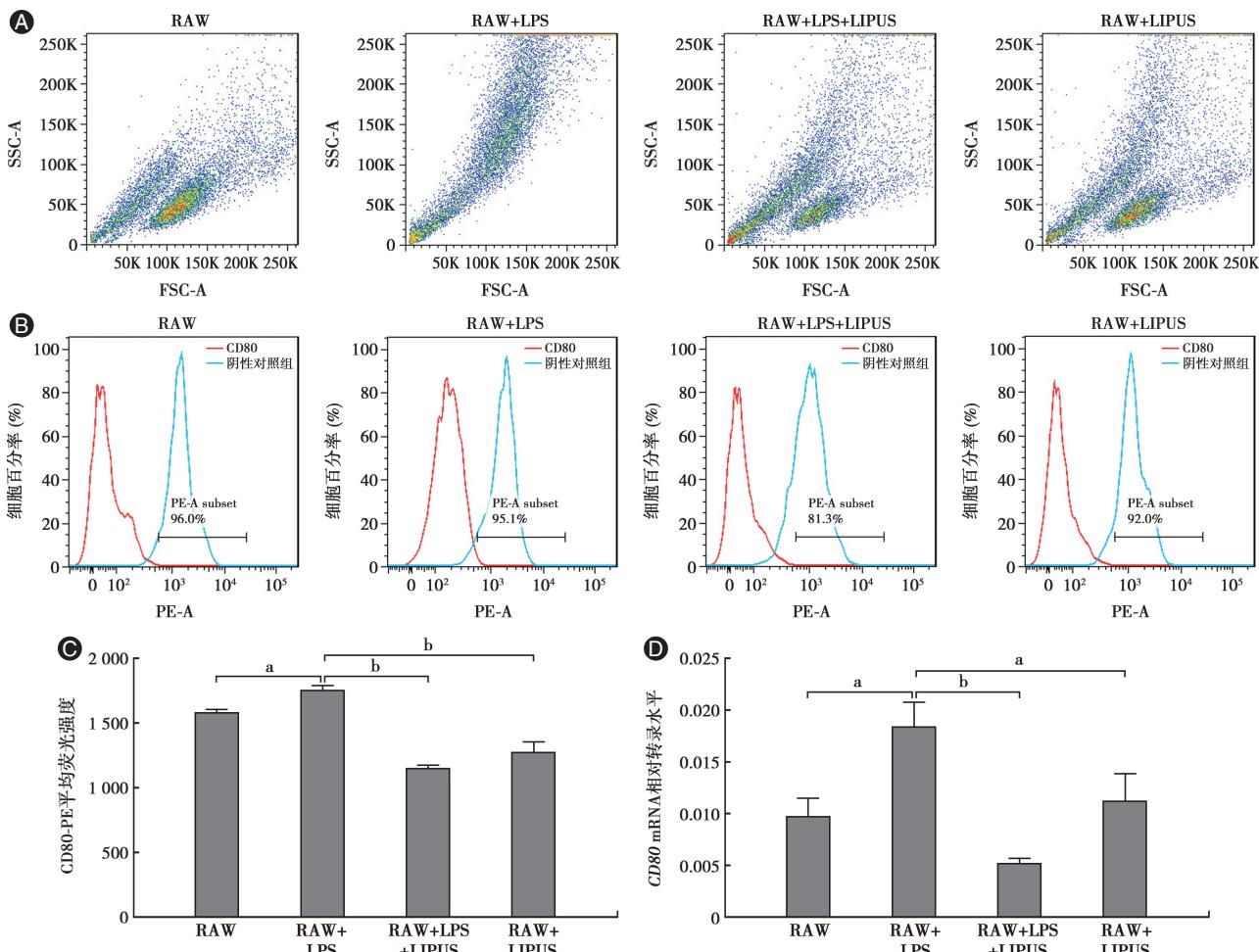


图3 低强度脉冲式超声波(LIPUS)抑制脂多糖(LPS)诱导的 RAW264.7 细胞 CD80 表达  
A: 流式检测 LPS 和 LIPUS 处理后 RAW264.7 细胞前向散射光和侧向散射光信号变化; B: 流式检测 RAW264.7 细胞巨噬细胞 M1 分化标志物 CD80 表达变化; C: 流式检测 CD80 平均荧光强度差异统计; D: RT-PCR 检测 CD80 mRNA 水平差异统计; 采用 One-Way ANOVA 分析统计组间差异,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.001$ 。

RT-PCR 检测 CD11b mRNA 转录水平与流式检测结果相符合: CD11b mRNA<sub>LPS</sub> 组 = 0.060 ± 0.012, CD11b mRNA<sub>LPS+LIPUS</sub> 组 = 0.032 ± 0.001, 差异有统计学意义 [95% CI(0.011, 0.043),  $P < 0.05$ , 图 4C]。

4. LIPUS 促进 IL-4 诱导的 RAW264.7 细胞 CD163 表达:LIPUS 处理后, 促进了 IL-4 诱导的巨噬细胞 M2 型分化, 流式检测 CD163 表达增强(图 5)。CD163<sub>LPS</sub> 组 = 225 ± 1, CD163<sub>LPS+LIPUS</sub> 组 = 261 ± 6, 差异有统计学意义 [95% CI(-45, -27),  $P < 0.001$ , 图 6]。

### 三、低强度脉冲式超声波抑制脂多糖诱导的 RAW264.7 炎症相关因子转录和表达水平

为研究 LIPUS 对 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬样分化后炎症因子转录水平的变化, 通过 RT-PCR 实验检测 NF-κB p65(图 7A)、TNF-α(图 7B)、IL-1β(图 7C) 和 IL-6(图 7D) mRNA 转录水平。LIPUS 可在一定程度上抑制以上炎症因子 mRNA 水平, 逆转 LPS 对炎症因子的上调作用, 差异均有统计学意义( $P <$

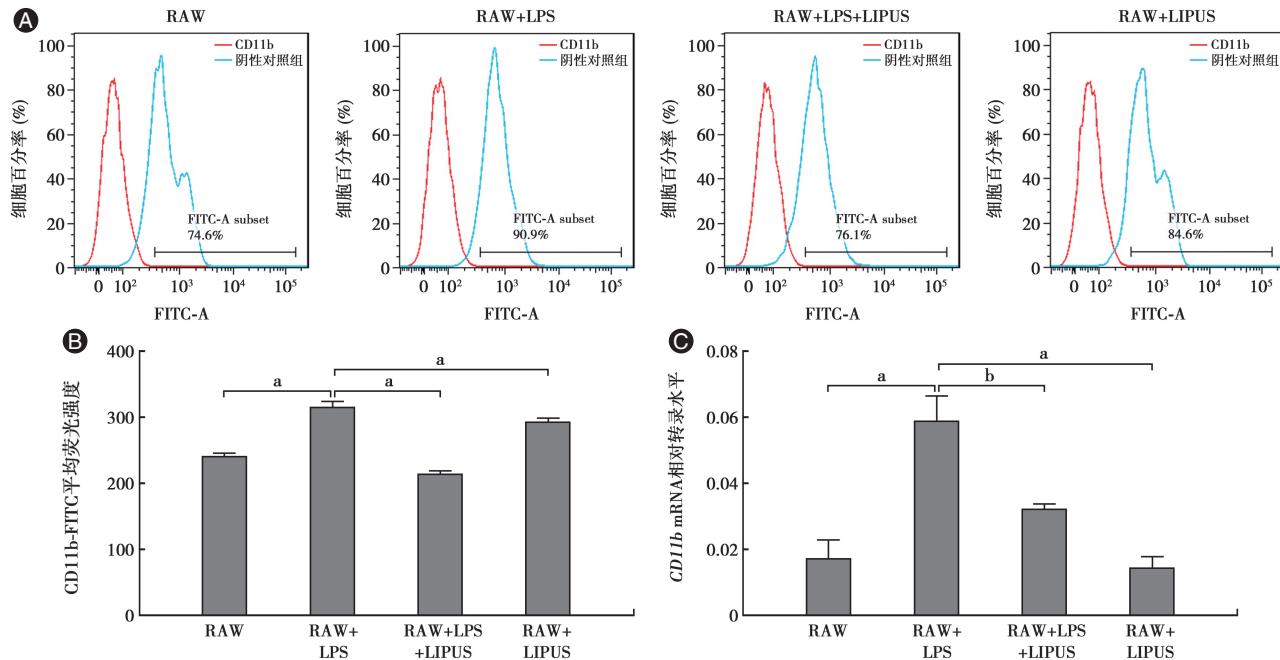


图4 低强度脉冲式超声波(LIPUS)抑制脂多糖(LPS)诱导的RAW264.7细胞CD11b表达 A:流式检测RAW264.7细胞巨噬细胞M1分化标志物CD11b表达变化。B:流式检测CD11b平均荧光强度差异统计图;C:RT-PCR检测CD11b mRNA水平差异统计图。采用One-Way ANOVA分析统计组间差异,<sup>a</sup> $P < 0.001$ ,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

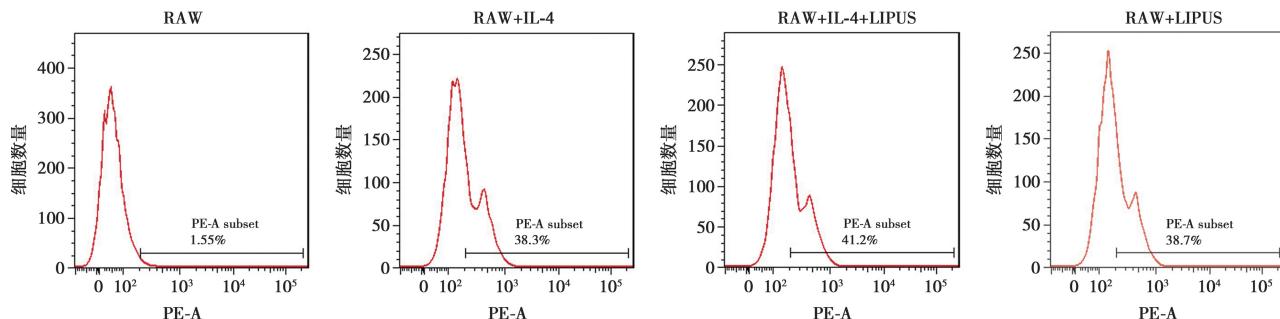


图5 低强度脉冲式超声波(LIPUS)促进白细胞介素(IL)-4诱导的RAW264.7向巨噬细胞M2型分化流式细胞图(CD163)

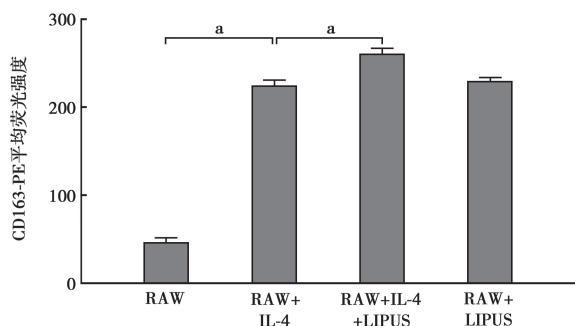


图6 流式检测CD163平均荧光强度差异统计图 采用One-Way ANOVA分析统计组间差异,<sup>a</sup> $P < 0.001$ 。

0.05)。Western blot实验结果表明:LPS诱导分化后,RAW264.7细胞炎症因子NF- $\kappa$ B p65、p-p65、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6蛋白水平升高(图7E),LIPUS可在一定程度上抑制以上炎症因子蛋白水平,逆转

LPS对炎症因子的上调作用。

四、胰酶(Trypsin)回复低强度脉冲式超声波对脂多糖诱导后RAW264.7 ROS水平升高,M1型巨噬细胞样分化增多,NF- $\kappa$ B p65磷酸化激活,及下游炎症因子表达增强的抑制效应

为证明LIPUS通过ROS-NF- $\kappa$ B通路调控巨噬细胞分化及下游炎症微环境,本课题组通过胰酶激活PAR2下游NF- $\kappa$ B通路。

1. 胰酶回复LIPUS对LPS诱导的RAW264.7细胞ROS升高的抑制效应:流式分析结果表明,LPS诱导RAW264.7细胞ROS生成增多。LIPUS可抑制LPS诱导的ROS生成增多,但胰酶可以回复LIPUS的抑制效应[ROS<sub>RAW+LPS+LIPUS</sub>组=795±140,ROS<sub>RAW+LPS+LIPUS+Trypsin</sub>组=10 400±200,95% CI(-10 072,-9139), $P < 0.001$ ,图8~9]。

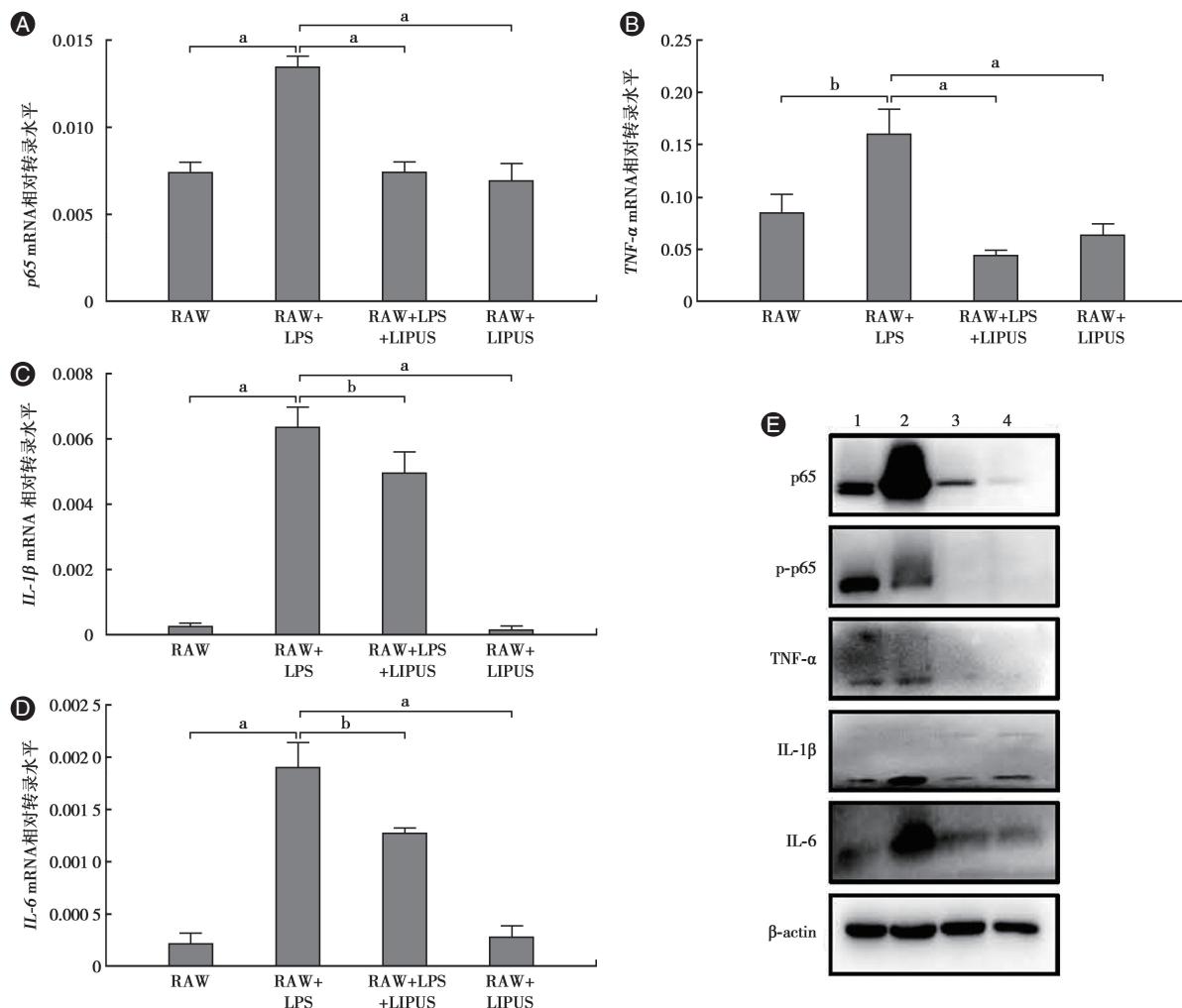


图7 低强度脉冲式超声波(LIPUS)抑制脂多糖(LPS)诱导的RAW264.7炎症因子表达 RT-PCR检测*p65*(A)、*TNF-α*(B)、*IL-1β*(C)、*IL-6*(D)mRNA转录水平;采用One-Way ANOVA分析统计组间差异,<sup>a</sup>*P*<0.001,<sup>b</sup>*P*<0.05;E:Western blot分析*p65*、*p-p65*、*TNF-α*、*IL-1β*和*IL-6*蛋白表达水平;1:RAW;2:RAW+LPS;3:RAW+LPS+LIPUS;4:RAW+LIPUS。

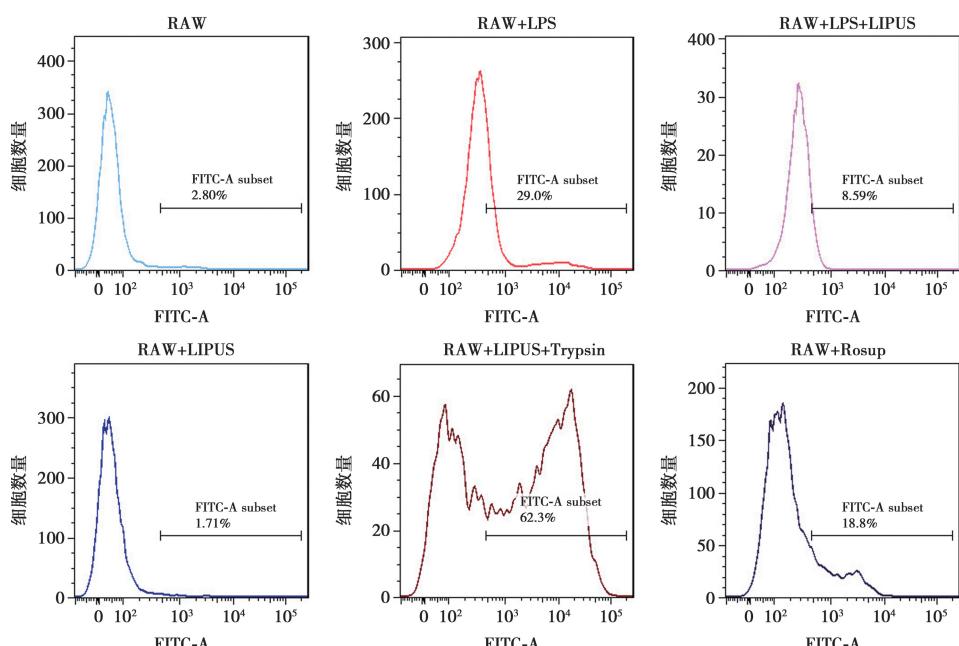


图8 胰酶(Trypsin)回复低强度脉冲式超声波(LIPUS)对脂多糖(LPS)诱导的RAW264.7细胞活性氧(ROS)升高的抑制效应流式细胞图

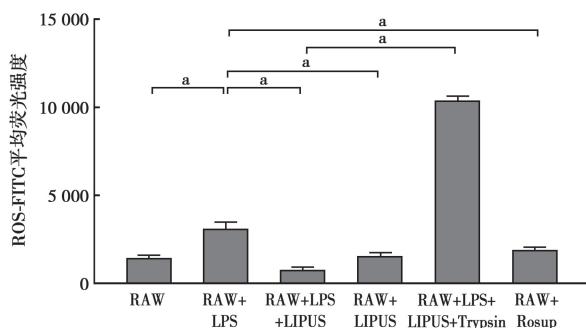


图9 各组活性氧(ROS)平均荧光强度差异统计图 采用One-Way ANOVA分析统计组间差异,  $^aP < 0.001$ 。

2. 胰酶回复 LIPUS 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 CD80 上调的抑制效应: LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞样 M1型分化, 标志物 CD80 表达上调。LIPUS 可抑制 LPS 对 CD80 的上调作用, 但胰酶可以回复

LIPUS 的抑制效应 [ $CD80_{RAW+LPS+LIPUS}$  组 =  $1\ 161 \pm 14$ ,  $CD80_{RAW+LPS+LIPUS+Trypsin}$  组 =  $1\ 272 \pm 22$ , 95% CI(70, 151),  $P < 0.001$ , 图 10~11]。

3. 胰酶回复 LIPUS 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 p65、p-p65、IL-6 和 TNF- $\alpha$  表达上调的抑制效应: Western blot 结果显示, LIPUS 抑制了 LPS 对 NF- $\kappa$ B p65 磷酸化 (p-p65) 激活的效应, 而胰酶一定程度上回复了 LIPUS 的抑制效应(图 12)。流式分析结果表明, 下游炎症因子 IL-6<sub>RAW+LPS+LIPUS</sub> 组 =  $2 \pm 2$ 、IL-6<sub>RAW+LPS+LIPUS+Trypsin</sub> 组 =  $4\ 667 \pm 127$  [95% CI (-4 997, -4 333),  $P < 0.001$ ] 和 TNF- $\alpha$ <sub>RAW+LPS+LIPUS</sub> 组 =  $17\ 500 \pm 265$ 、TNF- $\alpha$ <sub>RAW+LPS+LIPUS+Trypsin</sub> 组 =  $24\ 233 \pm 666$  [95% CI (-6 127, -3 806),  $P < 0.001$ ] 表达均增多, 差异均有统计学意义(图 13)。

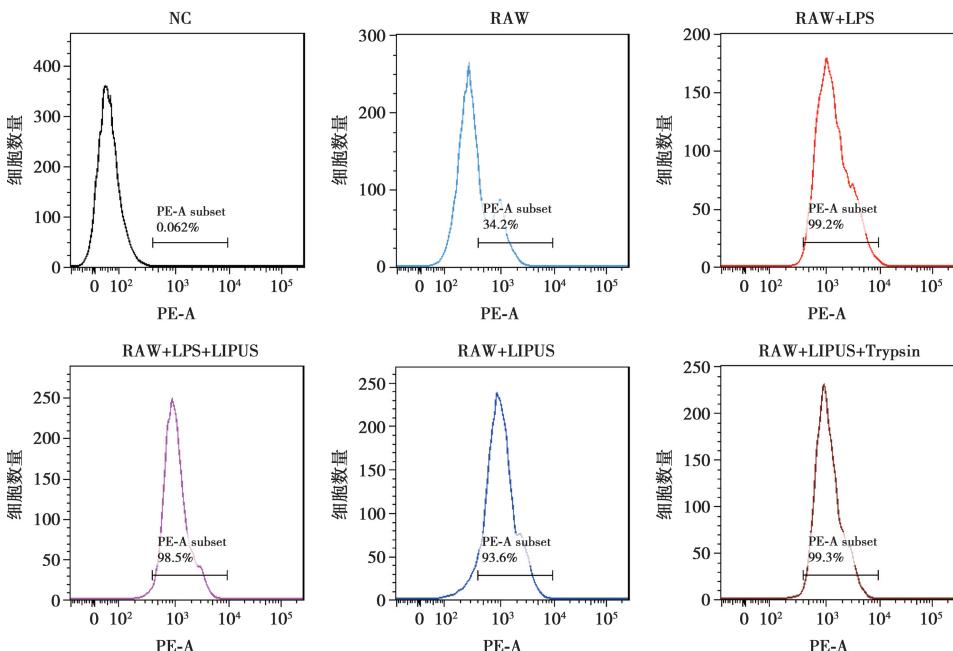


图10 胰酶(Trypsin)回复低强度脉冲式超声波(LIPUS)对脂多糖(LPS)诱导的RAW264.7细胞CD80上调的抑制效应流式细胞图

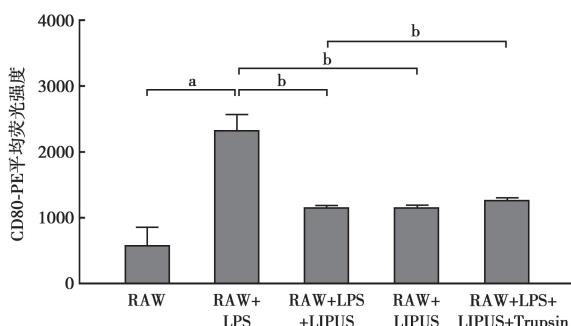


图11 各组CD80荧光强度统计图 采用One-Way ANOVA分析统计组间差异,  $^aP < 0.001$ ,  $^bP < 0.05$ 。

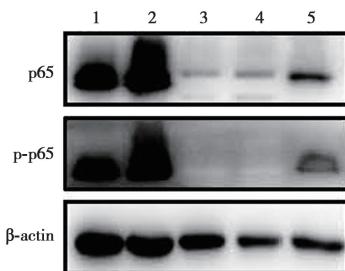


图12 Western blot 检测胰酶(Trypsin)回复低强度脉冲式超声波(LIPUS)对脂多糖(LPS)诱导的 RAW264.7 细胞 p65、p-p65、IL-6 和 TNF- $\alpha$  表达上调的抑制效应 1: RAW; 2: RAW+LPS; 3: RAW+LPS+LIPUS; 4: RAW+LIPUS; 5: RAW+LPS+Trypsin。

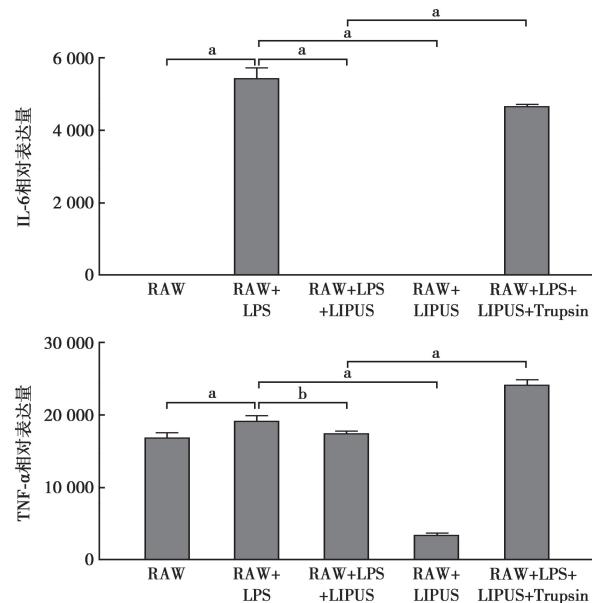


图13 流式细胞检测各组上清液中白细胞介素6(IL-6)和肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )蛋白表达水平差异 采用One-Way ANOVA分析统计组间差异,<sup>a</sup> $P < 0.001$ ,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

## 讨 论

LIPUS常作为辅助治疗手段应用于牙周疾病的临床治疗<sup>[19]</sup>。LIPUS对牙周组织的再生作用及对炎症的抑制作用,近年来得到了动物模型研究结果的证明<sup>[20-21]</sup>。而在人牙周膜细胞(periodontal ligament cell,hPDLC)的研究中,有学者发现LIPUS可通过抑制NF- $\kappa$ B信号通路抑制炎症因子的表达,而且可以促进hPDLC的成骨分化能力。LIPUS可抑制IL-6和IL-8等炎症因子表达,上调成骨基因RUNX2、OPN、OSX和OCN表达。LPS可诱导NF- $\kappa$ B1、NF- $\kappa$ B2和REIA(p65)基因表达,而LIPUS可逆转LPS对这些蛋白表达的诱导作用;I $\kappa$ B $\alpha$ 减少,而p-I $\kappa$ B $\alpha$ 增多;胞质中p65增多,而核中p65减少<sup>[22]</sup>。而在牙周疾病治疗中,少有文献报道LIPUS在巨噬细胞分化中的作用和相关机制。

ROS可作为NF- $\kappa$ B上游分子介导炎症反应。现有研究表明其具体机制为:蛋白酶激活受体2(PAR2)抑制和缺失,可显著抑制炎症和氧化应激水平,分别与IL-6和IL-1 $\beta$ 水平降低和抗氧化分子MnSOD水平增加相关。此外,体内PAR2的抑制和缺失降低了NF- $\kappa$ B磷酸化<sup>[23]</sup>。体内M1/M2巨噬细胞极化的稳态被打破,可导致炎症的发生,ROS在其中发挥重要作用<sup>[16,24]</sup>。因此,推测在巨噬细胞分化过程中,LIPUS可能也可通过ROS和NF- $\kappa$ B抑制

炎症因子表达,进而抑制巨噬细胞向M1型分化,促进M2型分化。

本研究的实验结果表明:LIPUS可明显减少LPS诱导的RAW264.7细胞ROS水平。LPS诱导后,RAW264.7细胞M1分化标志物CD80和CD11b表达和转录水平均上调;LIPUS可抑制LPS对RAW264.7细胞向M1分化的诱导。LPS诱导的RAW264.7细胞炎症因子NF- $\kappa$ B p65、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6的蛋白和mRNA水平上调,p65磷酸化(p-p65)上调。而LIPUS可下调这些炎症因子表达水平。同时,LIPUS也可促进IL-4诱导的巨噬细胞M2分化。而通过胰酶刺激PAR2通路,可促进ROS产生,激活下游NF- $\kappa$ B途径,回复了LIPUS对巨噬细胞M1分化及下游炎症因子表达的影响。

因此推断,LIPUS可通过ROS-NF- $\kappa$ B抑制LPS诱导的RAW264.7向巨噬细胞M1型分化,促进M2型分化,从而抑制氧化和炎症因子表达水平。LIPUS可能通过调控巨噬细胞分化,在牙周疾病中起到抑制氧化和炎症的作用,从而发挥对牙周疾病的治疗功能。

本课题重点研究LIPUS对RAW264.7巨噬细胞M1型分化的影响,从ROS-NF- $\kappa$ B通路探讨LIPUS对巨噬细胞分化及下游炎症因子表达的影响。而LIPUS对巨噬细胞M2分化的促进作用和参与成骨分化的过程,及其相关分子机制,尚待深入研究探讨。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 尹娟:酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、统计分析和解释数据、起草文章;杨兴:对文章的知识性内容作批评性审阅,获取研究经费,行政、技术或材料支持,指导;李平:分析/解释数据、统计分析、支持性贡献;徐昊馨:实施研究、采集数据、分析/解释数据;鲍玉、张志鹏:采集数据,统计分析;薛慧:酝酿和设计实验,对文章的知识性内容作批评性审阅,统计分析,获取研究经费,行政、技术或材料支持

## 参 考 文 献

- Zhang B, Chen H, Ouyang J, et al. SQSTM1 - dependent autophagic degradation of PKM2 inhibits the production of mature IL1B/IL-1 $\beta$  and contributes to LIPUS - mediated anti-inflammatory effect [J]. Autophagy, 2020, 16(7): 1262-1278. DOI:10.1080/15548627.2019.1664705.
- Ying S, Tan M, Feng G, et al. Low-intensity Pulsed Ultrasound regulates alveolar bone homeostasis in experimental Periodontitis by diminishing Oxidative Stress[J]. Theranostics, 2020, 10(21): 9789-9807. DOI:10.7150/thno.42508.
- Crossman J, Alzaheri N, Abdallah MN, et al. Low intensity pulsed ultrasound increases mandibular height and Col- II and

- VEGF expression in arthritic mice [J]. Arch Oral Biol, 2019, 104:112-118. DOI:10.1016/j.archoralbio.2019.05.032.
- [4] Kamatsuki Y, Aoyama E, Furumatsu T, et al. Possible reparative effect of low - intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on injured meniscus [J]. J Cell Commun Signal, 2019, 13 (2) : 193- 207. DOI:10.1007/s12079-018-0496-9.
- [5] Murakami R, Sanada T, Inagawa M, et al. Can low - intensity pulsed ultrasound (LIPUS) accelerate bone healing after intramedullary screw fixation for proximal fifth metatarsal stress fractures? A retrospective study[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2021, 22(1):725. DOI:10.1186/s12891-021-04611-z.
- [6] Zhang ZC, Yang YL, Li B, et al. Low-intensity pulsed ultrasound promotes spinal fusion by regulating macrophage polarization [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 120: 109499. DOI:10.1016/j.bioph.2019.109499.
- [7] Cuomo A, Pirozzi F, Tocchetti CG. Low - intensity pulsed ultrasound (LIPUS) in heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) : Lupus in fabula?[J]. Cardiovasc Res, 2021, 117(5):1238-1240. DOI:10.1093/cvr/cvab069.
- [8] Li H, Zhou J, Zhu M, et al. Low - intensity pulsed ultrasound promotes the formation of periodontal ligament stem cell sheets and ectopic periodontal tissue regeneration [J]. J Biomed Mater Res A, 2021, 109(7):1101-1112. DOI:10.1002/jbm.a.37102.
- [9] 晏殊瑾,杨珂,王河,等.低强度脉冲超声靶向纳米粒控释SDF-1及BMP-2调节hPDLCs迁移和成骨分化[J].中国超声医学杂志, 2022, 38 (2) : 222- 226. DOI: 10.3969/j.issn.1002 - 0101. 2022.02.030.
- [10] Garaicoa - Pazmino C, Fretwurst T, Squarize CH, et al. Characterization of macrophage polarization in periodontal disease [J]. J Clin Periodontol, 2019, 46 (8) : 830- 839. DOI: 10.1111/jcpe.13156.
- [11] 黎家君,刘明,宋立婷,等.微RNA-126对牙龈卟啉单胞菌脂多糖刺激下人巨噬细胞极化的调节作用[J].中华口腔医学杂志, 2022, 57 (4) : 390 - 396. DOI: 10.3760/cma.j.cn112144 - 20210701-00310.
- [12] Xu Z, Li S, Wan L, et al. Role of low - intensity pulsed ultrasound in regulating macrophage polarization to accelerate tendon-bone interface repair [J]. J Orthop Res, 2022. DOI: 10.1002/jor.25454.
- [13] 陈绩,杨传熙,徐天华,等.低强度脉冲式超声波对小鼠骨髓来源巨噬细胞极化和吞噬能力的影响[J].南京医科大学学报(自然科学版), 2021,41(4):489-495. DOI:10.7655/NYDXBNS 20210403.
- [14] 李小英,李倩,崔博森,等.慢性牙周炎患者唾液诱导巨噬细胞分化和活化的研究[J].华西口腔医学杂志, 2018, 36(5):508- 513. DOI:10.7518/hxkq.2018.05.009.
- [15] Zhang X, Fan L, Wu J, et al. Macrophage p38 $\alpha$  promotes nutritional steatohepatitis through M1 polarization[J]. J Hepatol, 2019, 71(1):163-174. DOI:10.1016/j.jhep.2019.03.014.
- [16] Tsai CF, Chen GW, Chen YC, et al. Regulatory effects of quercetin on M1/M2 macrophage polarization and oxidative/antioxidative balance [J]. Nutrients, 2021, 14(1) : 67. DOI: 10.3390/nu14010067.
- [17] Yang Q, Zhang R, Tang P, et al. Ultrasound may suppress tumor growth, inhibit inflammation, and establish tolerogenesis by remodeling innatome via pathways of ROS, immune checkpoints, cytokines, and trained immunity/tolerance [J]. J Immunol Res, 2021:6664453. DOI:10.1155/2021/6664453.
- [18] Liu C, Hu F, Jiao G, et al. Dental pulp stem cell - derived exosomes suppress M1 macrophage polarization through the ROS-MAPK-NF $\kappa$ B P65 signaling pathway after spinal cord injury [J]. J Nanobiotechnology, 2022, 20 (1) : 65. DOI: 10.1186/s12951- 022-01273-4.
- [19] 李晖,杨永进,吕晓宁,等.低强度脉冲超声波辅助治疗中度和重度慢性牙周炎的临床观察 [J].牙体牙髓牙周病学杂志, 2013, 23 (6) : 406-409. DOI: 10.15956/j.cnki.chin.j.conserv.dent. 2013.06.015.
- [20] Shirakata Y, Imafuji T, Sena K, et al. Periodontal tissue regeneration after low - intensity pulsed ultrasound stimulation with or without intra-marrow perforation in two-wall intra-bony defects—A pilot study in dogs[J]. J Clin Periodontol, 2020, 47 (1):54-63. DOI:10.1111/jcpe.13197.
- [21] Hazan - Molina H, Reznick AZ, Kaufman H, et al. Periodontal cytokines profile under orthodontic force and extracorporeal shock wave stimuli in a rat model [J]. J Periodontal Res, 2015, 50(3):389-396. DOI:10.1111/jre.12218.
- [22] Liu S, Zhou M, Li J, et al. LIPUS inhibited the expression of inflammatory factors and promoted the osteogenic differentiation capacity of hPDLCs by inhibiting the NF -  $\kappa$ B signaling pathway [J]. J Periodontal Res, 2020, 55 (1) : 125 - 140. DOI: 10.1111/jre.12696.
- [23] Bang E, Kim DH, Chung HY. Protease - activated receptor 2 induces ROS-mediated inflammation through Akt-mediated NF-  $\kappa$ B and FoxO6 modulation during skin photoaging [J]. Redox Biol, 2021, 44:102022. DOI:10.1016/j.redox.2021.102022.
- [24] Blaser H, Dostert C, Mak TW, et al. TNF and ROS crosstalk in inflammation [J]. Trends Cell Biol, 2016, 26(4):249-261. DOI: 10.1016/j.tcb.2015.12.002.

(收稿日期:2022-08-22)

(本文编辑:王嫚)