

• 实验研究 •

槟榔碱改善脂多糖诱导的 BV2 细胞神经炎症及作用机制

孙源^{1,2}, 王丹阳¹, 孙晶¹, 范蓓¹, 宋洪波², 刘新民³, 卢聪^{1*}, 王凤忠^{1*}

1. 中国农业科学院 农产品加工研究所, 北京 100193

2. 福建农林大学 食品科学学院, 福建 福州 350002

3. 宁波大学 新药技术研究院, 浙江 宁波 315000

摘要: **目的** 探讨槟榔碱对脂多糖(LPS)诱导小鼠小胶质细胞 BV2 炎症反应的改善作用及机制。**方法** 取对数生长期的 BV2 细胞分为空白组和 LPS (0.01、0.1、1、10、20 $\mu\text{g/mL}$) 组, CCK-8 法检测细胞活力, 分光光度法检测一氧化氮(NO)含量。另取细胞分为空白组、模型组、槟榔碱(10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 组。CCK-8 法检测细胞活力; 分光光度法检测 NO 含量; 酶联免疫吸附法(ELISA)检测上清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)和抗炎因子白细胞介素 10(IL-10)水平; 实时荧光定量 PCR(qPCR)法检测细胞中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、一氧化氮合酶(iNOS) mRNA 表达表达; Western blotting 法检测 Toll 样受体 4(TLR4)、p-p65、p65、环氧合酶 2(COX2)、iNOS、胞内磷脂酰肌醇激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(Akt)、p-Akt 蛋白表达水平。**结果** 0.01~20 $\mu\text{g/mL}$ LPS 诱导对 BV2 小胶质细胞的细胞活力无显著影响, 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 诱导显著上调了细胞中 NO 含量; 槟榔碱在 10~40 $\mu\text{mol/L}$ 内对细胞活力无显著影响, 且均可缓解 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞损伤。与模型组相比, 槟榔碱组可降低细胞内 NO 含量, 下调炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA 相对表达量及其血清水平; 抑制 TLR4、p-P65、iNOS、COX2、PI3K、p-Akt 蛋白表达量。**结论** 槟榔碱对 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞炎症模型具有显著改善作用, 其作用机制可能与抑制 NO 生成、下调 iNOS 表达、调控 TLR4/核因子- κB (NF- κB)、PI3K/Akt 信号通路有关。

关键词: 槟榔碱; 脂多糖; 神经炎症; 小胶质细胞; Toll 样受体 4/核因子- κB ; 胞内磷脂酰肌醇激酶/蛋白激酶 B

中图分类号: R285; R971 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2024)03-0541-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.03.001

Arecoline improves neuroinflammation of BV2 cells induced by lipopolysaccharide and its mechanism

SUN Yuan^{1,2}, WANG Danyang¹, SUN Jing¹, FAN Bei¹, SONG Hongbo², LIU Xinmin³, LU Cong¹, WANG Fengzhong¹

1. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

2. College of food science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

3. Institute of New Drug Technology, Ningbo University, Ningbo 315000, China

Abstract: Objective To investigate the effects of arecoline on lipopolysaccharide (LPS) induced BV2 inflammatory response in mouse microglia and its mechanisms. **Method** BV2 cells were divided into blank group and LPS group (0.01, 0.1, 1, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$). The cell viability was detected by CCK-8 method, and the content of NO was detected by spectrophotometry. Cells were divided into blank group, model group and arecoline group (10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$). Cell viability was detected by CCK-8 method. NO content was detected by spectrophotometry. The levels of TNF- α , IL-6, IL-1 β , and anti-inflammatory factor IL-10 in supernatant were detected by

收稿日期: 2023-11-29

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFD1600303); 中国农业科学院农产品加工研究所创新工程(CAAS-ASTIP-2023-IFST); 三亚中国农业科学院国家南繁研究院“南繁专项”(YYLH05); 三亚中国农业科学院国家南繁研究院“南繁专项”(ZDXM2302)

作者简介: 孙源, 男, 硕士研究生, 主要研究方向为食药同源物质功能挖掘及作用机制研究。E-mail: sy061998@163.com

***通信作者:** 卢聪, 女, 博士, 副研究员, 主要研究方向为食药同源物质功能挖掘、功效评价及机制研究。E-mail: lucong198912@126.com

王凤忠, 男, 博士, 研究员, 主要研究方向为农产品时空多维品质评价及综合利用研究。E-mail: wangfengzhong@sina.com

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) was used to detect the mRNA expression of *TNF- α* , *IL-6*, *IL-1 β* , *iNOS* in cells. The expression levels of TLR4, p-P65, P65, COX2, *iNOS*, PI3K, Akt, and p-Akt were detected by Western blotting. **Result** In the concentration range (0.01 — 20 $\mu\text{g/mL}$), LPS induction had NO significant effect on the cell viability of BV2 microglia, and 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS induction significantly increased the content of NO in the cells. Arecaline had no significant effect on cell viability in the range of 10 to 40 $\mu\text{mol/L}$, and could alleviate LPS-induced damage of BV2 microglia. Compared with the model group, arecoline group could decrease the intracellular NO content, down-regulate the mRNA expression of inflammatory factors *TNF- α* , *IL-6*, *IL-1 β* and their serum levels. The expression levels of TLR4, p-P65, *iNOS*, COX2, PI3K and p-Akt were inhibited. **Conclusion** Arecaecine can significantly improve the LPS-induced inflammation model of BV2 microglia, and its mechanism may be related to inhibiting NO production, down-regulating the expression of *iNOS*, and regulating the TLR4/NF- κB and PI3K/Akt signaling pathways.

Key words: arecoline; lipopolysaccharides; inflammation; microglia; TLR4/NF- κB ; PI3K/Akt

近年来,研究发现神经炎症参与了多种神经退行性疾病的发生,如抑郁症、帕金森综合征、阿尔茨海默病等^[1]。研究证明,神经炎症是神经退行性疾病发病的重要因素之一^[2]。大量研究表明,当免疫细胞被激活后,可产生多种致炎因子,如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6、一氧化氮(NO)、诱导型一氧化氮合酶(*iNOS*)等,炎症因子在脑内堆积过多则能引起脑内神经元死亡,造成不可逆转的神经炎症^[3-4]。由此可见,致炎细胞因子对激活免疫细胞以及正反馈调控炎症介质的分泌是必不可少的,而这些作用又与神经退行性疾病的发生及发展密切相关。因此,如何有效控制神经炎症的发生或是减轻神经炎症能够为中枢神经系统疾病提供有效的改善方法。BV2 小胶质细胞是一类先天固有的免疫细胞,占脑细胞总数的 10%~15%,与外周巨噬细胞和淋巴细胞作用类似,能够作为脑的免疫屏障抵抗疾病和外界刺激^[5]。研究表明,小胶质细胞介导的神经炎症在神经退行性疾病中发挥着核心作用^[6]。正常状态下小胶质细胞处于静息状态,当脑内产生感染或损伤时,小胶质细胞被激活,启动机体免疫系统的自我修复,感染及损伤恢复后小胶质细胞又处于静息状态^[7]。如果外界刺激因子及脑感染、损伤不断激活小胶质细胞,则会打破免疫系统的免疫应答反应^[8],释放出 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、*iNOS* 等炎症因子,导致神经系统严重损伤,产生神经炎症。脂多糖(LPS)是革兰阴性细菌外膜的中心组分,LPS 诱导 BV2 小胶质细胞激活是常用的一种体外神经炎症模型^[9],常用于天然活性成分的筛选及基于抗炎发挥神经保护功效有效组分的机制探索。

槟榔具有驱虫、改善消化功能、神经保护、改善心血管系统、镇痛、抗炎、抗病毒、抗氧化、抗

菌等作用^[10],其中槟榔碱被视为槟榔发挥生物活性的主要活性成分,在槟榔果中占比 0.3%~0.6%^[11]。现代药理学研究表明,槟榔碱具有抗炎^[12]、抗抑郁^[13]、改善神经系统^[14-16]、抑制病毒蛋白活性^[17]等多种功效。张伟等^[18]研究发现,槟榔碱能抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的小鼠巨噬细胞 TNF- α 、IL-6、细胞间黏附分子 1 (*ICM-1*) mRNA 的表达,减轻细胞炎症。吴江涛^[19]在研究中指出,槟榔碱的抗炎机制与阻碍核因子- κB (NF- κB) 信号通路、抑制细胞产生促炎因子有关。为充分揭示槟榔碱对神经炎症反应的改善效果及调控机制,本研究采用 LPS 诱导小鼠 BV2 小胶质细胞所致神经炎症模型探究槟榔碱的神经保护作用及分子机制,以期对槟榔碱这一活性组分的药用价值提供数据支持,并为槟榔的开发利用奠定理论基础。

1 材料

1.1 细胞

BV2 小胶质细胞购自武汉尚恩生物技术有限公司。

1.2 试剂

BV2 完全培养基(武汉尚恩生物技术有限公司);槟榔碱(上海源叶生物科技有限公司,质量分数 $\geq 98\%$,货号 B74705-50 mg);磷酸盐缓冲液(PBS)购于 Hyclone;BCA 试剂盒(货号 P0012)、RIPA 裂解液(货号 G2002)购于碧云天生物技术有限公司;DMSO(货号 D8371-50 mL)、CCK-8(货号 CA1210-500)细胞活性检测试剂盒购于索莱宝科技有限公司;PVDF 膜 0.45 μm (货号 IPVH00010)购于 Millipore 公司、Trizol 美国 Invitrogen 公司;M-MLV 逆转录酶、dNTP (10 mmol/L)、Premix Taq™、TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)、DL2000 DNA Marker、RNase-free H₂O、50 $\times$ TAE 购

于宝生物工程（大连）有限公司；DNase I、6×Loading Dye、RNase Inhibitor、RL 6 000 RNA 购于 Marker 美国 Fermentas 公司；琼脂糖购于西班牙 Biowest 公司；甲醛（分析纯）、异丙醇（分析纯）、氯仿（分析纯）、无水乙醇（分析纯）、10×MOPS 购于北京化学试剂公司；GelRed 染色试剂购于美国 Biotium 公司；Real Time PCR 384 孔板购于瑞士 Roche 公司。

1.3 仪器

Herocell 180 细胞培养箱（上海润德生物科技有限公司）；低温冷冻离心机（德国 Sigma 公司）；spectra MAX190 酶标仪（Molecular devices）；超微量核酸/蛋白分析仪（英国 BioDrop μ Lite）；电泳仪（美国伯乐 Bio-Rad）；EUV-LDUV 凝胶成像系统（韩国 KoreaBiotech 公司）；Mupid 2plus 电泳槽（日本 TAKARA 公司）；垂直电泳仪、转印电泳仪（Tanon 公司）；扫描仪（EPSON 公司）。2720 型 PCR 仪（美国 ABI 公司）；DHG-9240A 鼓风干燥箱（上海一恒公司）；Roche LightCycler®480II 实时荧光定量 PCR 系统（瑞士 Roche 公司）；Olympus BX53 倒置光学显微镜（日本 Olympus 公司）。

2 方法

2.1 细胞培养

BV2 细胞用含 10%胎牛血清、1%青 - 链霉素的完全培养基，置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞密度达 60%~70%时进行传代。取对数生长期的细胞进行后续实验。

2.2 模型制备

取对数生长期的 BV2 细胞进行铺板。以 5×10⁴/mL 接种于 96 孔板中，每孔 100 μ L，每组设置 5 个复孔，待细胞贴壁后培养 12 h。弃除原有培养基，空白组换上等量培养基，LPS 组换上含有 LPS 对应浓度（0.01、0.1、1、10、20 μ g/mL）的培养基，继续培养 24 h 后用于后续实验^[20]。

2.3 实验分组

LPS 和槟榔碱用细胞级 DMSO 溶解后分装储存在-20℃，避免反复冻融。取对数生长期的 BV2 细胞进行铺板，将细胞分为空白组、模型组、槟榔碱（10、20、40 μ mol/L）组。铺板 12 h 后，弃除原培养基，空白组和模型组换上等量培养基，槟榔碱组则换上含有对应浓度槟榔碱（10、20、40 μ mol/L）的培养基进行预保护，换液 2 h 后，模型组和槟榔碱组加入含相应质量浓度 LPS 的培养基，空白组则

加入等量培养基，LPS 造模浓度从 2.2 项中得出。

2.4 CCK-8 法检测细胞活力

取对数生长期的 BV2 细胞进行铺板。以 5×10⁴ 个/mL 接种于 96 孔板中，每孔 100 μ L，每组设置 5 个复孔，待细胞贴壁后培养 12 h。分别检测 LPS、槟榔碱、槟榔碱+LPS 对 BV2 细胞活力的影响。再每组处理 24 h 后，每孔加入 CCK-8 工作液 10 μ L，继续孵育 2 h 后，450 nm 测定吸光度（A）值。

$$\text{细胞存活率} = \frac{A_{\text{加药}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}}$$

2.5 分光光度法检测 NO 含量

取对数生长期的 BV2 细胞进行铺板。以 5×10⁴ 个/mL 接种于 24 孔板中，每孔 500 μ L，每组设置 3 个复孔，待细胞贴壁后培养 12 h。按照 2.3 项下方法处理细胞，按照试剂盒操作方法，检测细胞中 NO 含量。

2.6 ELISA 检测相关炎症因子

取对数生长期的 BV2 细胞进行铺板。以 5×10⁴ 个/mL 接种于 6 孔板中，每孔 2 000 μ L，每组设置 4 个复孔，待细胞贴壁后培养 12 h。按 2.3 项下处理细胞，离心收集上清，按照 ELISA 试剂盒说明书测定细胞上清液中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-10 水平。

2.7 qPCR 分析相关 mRNA 表达

取对数生长期的 BV2 细胞进行铺板。以 5×10⁴ 个/mL 接种于 6 孔板中，每孔 2 000 μ L，每组设置 4 个复孔，待细胞贴壁后培养 12 h。按照 2.3 项下分组处理细胞，用 Trizol 提取样品 RNA，最后加入 100 μ L 无 RNase 的水，溶解 RNA。按照 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA，用 NanoDrop 定量，并按照说明书将其逆转录为 cDNA。后按照文献报道方法^[20]进行处理。使用 β -actin 作为内参基因，采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 分析数据，qPCR 所用引物见表 1。

表 1 qPCR 引物序列
Table 1 Primer sequence for qPCR

引物名称	序列（3'-5'）
TNF- α	正向：TAACTTAGAAAGGGGATTATGGCT
	反向：TGGAAAGGTCTGAAGGTAGGAA
IL-6	正向：TTGCCTTCTTGGGACTGATG
	反向：ACTCTTTTCTCATTTCACGATTT
IL-1 β	正向：TCACAAGCAGAGCACAAGCC
	反向：CATTAGAAACAGTCCAGCCCATAC
iNOS	正向：TGGAGCGAGTTGTGGATTGT
	反向：TGAGGGCTTGGCTGAGTGA
β -actin	正向：GAGATTACTGCTCTGGCTCCTA
	反向：GGACTCATCGTACTCCTGCTTG

2.8 Western blotting 法检测相关蛋白表达

2.8.1 细胞蛋白提取 按 2.3 项下分组处理细胞 24 h 后, 1 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞沉淀, 使用预冷的 RIPA 蛋白裂解液裂解细胞, 置于-4 ℃充分裂解 30 min, 并每隔 5 min 振荡 30 s。裂解结束后 12 000 r/min, 4 ℃, 5 min。取上清, 进行蛋白定量。

2.8.2 蛋白浓度测定及样品制备 按照 BCA 蛋白定量试剂盒使用说明操作, 测定蛋白浓度。绘制标准曲线图并计算蛋白浓度。(1) 根据所测目的蛋白的相对分子质量, 配制 8%~10%分离胶;(2) 将待测蛋白样品以 30 μg/孔上样;(3) 电泳: 浓缩胶恒压 90 V, 约 20 min; 分离胶恒压 120 V, 通过预染蛋白 Marker 来确定电泳停止时间;(4) 转膜: 去除浓缩胶、保留分离胶, 裁剪合适大小的 0.45 μm 孔径的 PVDF 膜, 转膜 300 mA 恒流, 60 min;(5) 封闭: 取出的 PVDF 膜完全浸没于 5% BSA-TBST 中, 水平摇床孵育 1 h;(6) 一抗孵育: 5% BSA-TBST 稀释一抗, 磷脂酰肌醇激酶单克隆抗体 (PI3KP85)、p-蛋白激酶 B (Akt)、Akt、p-p65、环氧化酶 2 (COX2)、Toll 样受体 4 (TLR4)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 稀释比例 1:1 000, p65、iNOS 稀释比例 1:500, 4 ℃水平摇床孵育过夜。次日, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min;(7) 二抗孵育: 5% BSA-TBST 稀释二抗, 山羊抗兔 IgG (H+L) HRP 1:10 000 室温孵育 1 h 后 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min;(8) 胶片曝光: ECL 滴加到膜的蛋白面, 反应 3~5 min 后曝光 2 min, 显影 2 min, 定影。

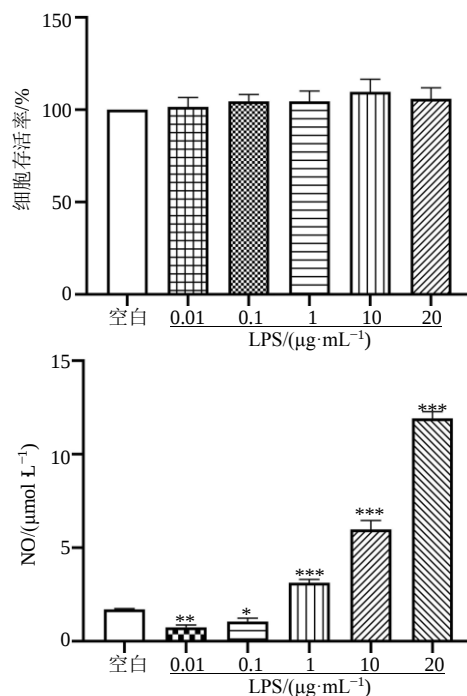
2.9 统计学分析

SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 8.0 做数据分析及绘图。Image-PRO 做灰度分析。多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), LSD 法验证两两比较的显著性。

3 结果

3.1 不同质量浓度 LPS 对 BV2 细胞存活率及 NO 含量的影响

如图 1 所示, 与空白组相比, 在 LPS 作用 BV2 细胞 24 h 后, LPS 各浓度组并未对 BV2 细胞存活率产生影响。而在 0.01、0.1 μg/mL LPS 作用 BV2 细胞 24 h 后, NO 含量显著下降 ($P<0.05$ 、 0.01), 分析原因可能是 LPS 浓度过低或是由于操作误差空白组细胞量多于其他组, 然而 LPS 1、10、20 μg/mL 组细胞中 NO 含量显著升高 ($P<0.001$)。为确保成功建立模型的同时减少 LPS 对细胞的影响, 后续实



与空白组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs blank group.

图 1 LPS 对 BV2 细胞存活率和 NO 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 1 Effect of LPS on BV2 cell viability rate and NO content ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

验选择 1 μg/mL LPS 进行造模处理。

3.2 不同浓度槟榔碱对 BV2 细胞存活率和 LPS 诱导的 BV2 细胞存活率的影响

如图 2 所示, 与空白组相比, 在槟榔碱作用 BV2 细胞 24 h 后, 槟榔碱 10、20、40 μmol/L 组细胞存活率无明显差异, 可见此浓度范围内槟榔碱对 BV2 细胞没有毒性作用。因此选择 10、20、40 μmol/L 的槟榔碱与 LPS 共同作用对 BV2 存活率影响实验。

与模型组相比, 槟榔碱 10 μmol/L 组细胞存活率呈显著上升趋势 ($P<0.05$), 而槟榔碱 20、40 μmol/L 组细胞存活率并未有显著性影响。本课题组此前研究发现槟榔碱在一定浓度范围内能促进细胞增殖, 分析导致槟榔碱 10 μmol/L 组细胞存活率显著上升的原因可能是孔板边缘效应导致培养液挥发所致。

3.3 槟榔碱对 LPS 诱导的 BV2 细胞 NO 含量的影响

如图 3 所示, 与空白组相比, 模型组 BV2 细胞中 NO 含量显著增加 ($P<0.001$)。与模型组相比, 不同浓度的槟榔碱组预处理使 BV2 细胞 NO 含量显著降低 ($P<0.001$)。结果表明, 槟榔碱可以在一

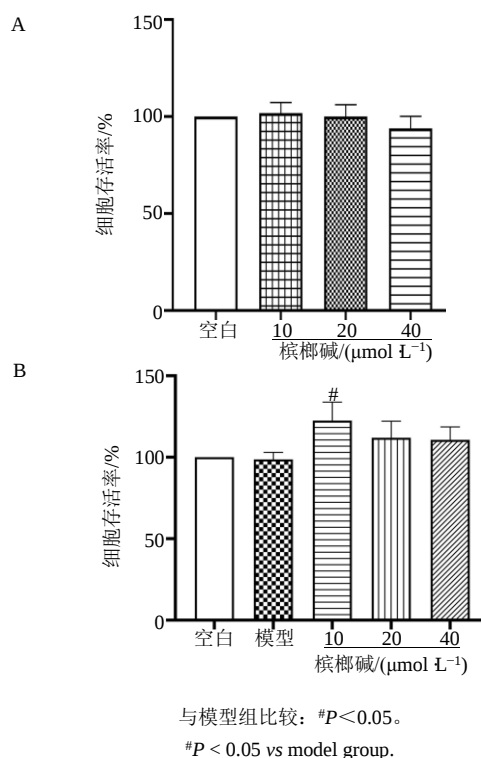


图 2 槟榔碱对 BV2 细胞存活率 (A) 和槟榔碱对 LPS 诱导的 BV2 细胞存活率 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)
 Fig. 2 Effects of arecoline on BV2 cell viability rate (A) and arecoline on LPS induced BV2 cell viability rate (B) ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

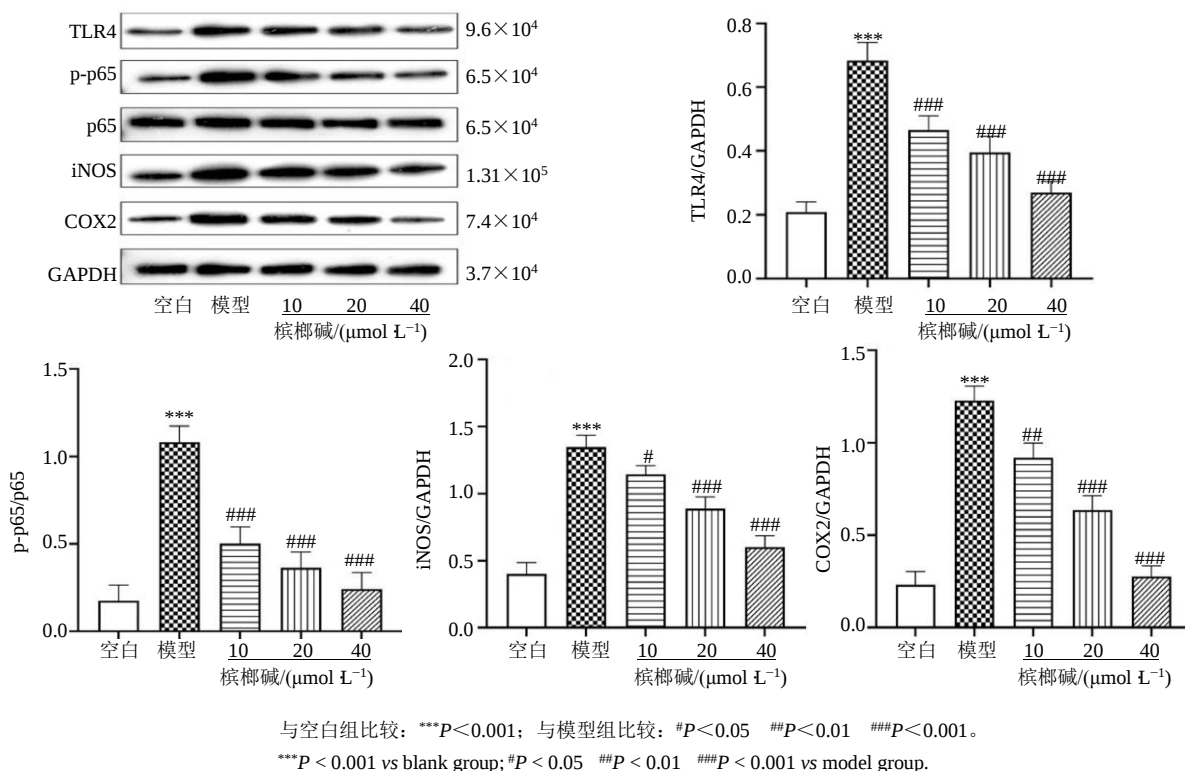
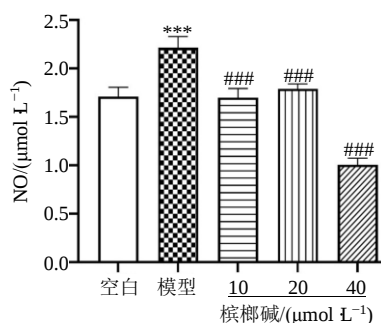


图 4 槟榔碱对 LPS 诱导的 BV2 细胞 TLR4/NF- κ B 信号通路相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
 Fig. 4 Effect of arecoline on TLR4/NF- κ B signaling pathway-related proteins induced by LPS in BV2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



与空白组比较: ^{***} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{###} $P < 0.001$.

^{***} $P < 0.001$ vs blank group; ^{###} $P < 0.001$ vs model group.

图 3 槟榔碱对 LPS 诱导的 BV2 细胞 NO 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 3 Effect of arecoline on LPS induced content of NO in BV2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

一定程度上抑制 LPS 诱导的 NO 释放。

3.4 槟榔碱对 LPS 诱导的 BV2 细胞 TLR4/NF- κ B 信号通路相关蛋白的影响

与空白组相比, BV2 细胞经 LPS 处理后 TLR4、p-p65/p65、iNOS、COX2 蛋白水平显著升高 ($P < 0.001$), 而槟榔碱组干预显著逆转了此现象 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 且呈浓度相关性。此结果表明槟榔碱可能通过调控 TLR4/NF- κ B 信号通路来减轻 LPS 诱导的 BV2 细胞炎症, 见图 4。

3.5 槟榔碱对 LPS 诱导的 BV2 细胞 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白的影响

与空白组相比,模型组 BV2 细胞 PI3K、p-Akt/Akt 蛋白水平显著升高 ($P<0.001$);与空白组相比,槟榔碱 10、40 $\mu\text{mol/L}$ 组可显著降低 PI3K 蛋白水平 ($P<0.01$ 、0.001),槟榔碱 20、40 $\mu\text{mol/L}$ 组 p-Akt/Akt 蛋白水平出现显著下降 ($P<0.001$)。此结果表明在槟榔碱可能通过调控 PI3K/Akt 信号通路来减轻 LPS 诱导的 BV2 细胞炎症,见图 5。

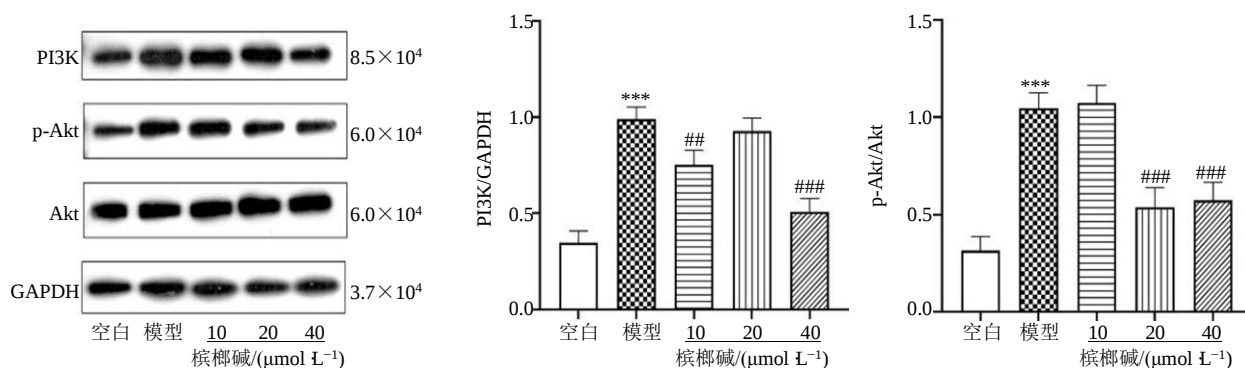
3.6 槟榔碱对 LPS 诱导的 BV2 细胞炎症因子的影响

采用 qPCR 和 ELISA 实验测定槟榔碱对 LPS

诱导的 BV2 细胞炎症因子的影响。qPCR 结果显示,模型组 BV2 细胞中炎症因子 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 、 $IL-1\beta$ 、 $iNOS$ mRNA 相对表达量显著增加 ($P<0.001$),槟榔碱各剂量组 BV2 细胞中炎症因子的 mRNA 相对表达量显著下降 ($P<0.05$ 、0.01、0.001)。ELISA 结果显示,模型组 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 、 $IL-1\beta$ 水平显著增加,IL-10 水平显著降低 ($P<0.05$ 、0.01、0.001);槟榔碱各剂量组 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 、 $IL-1\beta$ 水平显著降低,IL-10 水平显著升高 ($P<0.01$ 、0.001),见图 6。

4 讨论

本研究结果表明,槟榔碱可显著抑制 LPS 诱导 BV2 细胞中 NO 的释放,降低细胞中 COX2、iNOS、

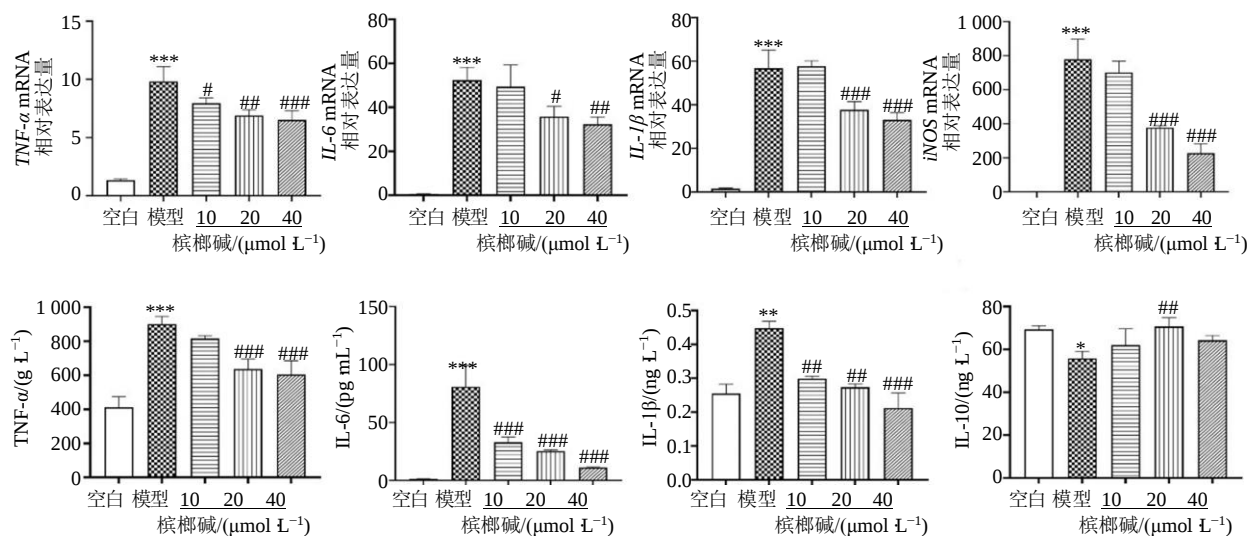


与空白组比较: *** $P<0.001$; 与模型组比较: ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ 。

*** $P<0.001$ vs blank group; ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs model group.

图 5 槟榔碱对 LPS 诱导的 BV2 细胞 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Effect of arecoline on PI3K/Akt signaling pathway-related proteins induced by LPS in BV2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



与空白组比较: *** $P<0.001$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ 。

*** $P<0.001$ vs blank group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs model group.

图 6 槟榔碱对 LPS 诱导的 BV2 细胞炎症因子的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 6 Effect of arecoline on LPS induced release of inflammatory factors in BV2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

TLR4 蛋白及 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 、 $IL-1\beta$ mRNA 的表达,表明槟榔碱具有显著的抗炎作用,对 LPS 诱导的 BV2 细胞神经炎症具有显著改善效果,这与文献报道一致^[18-19]。此外,本研究还发现 LPS 诱导提高了 PI3K 与 p-Akt 蛋白水平,而槟榔碱干预则能显著降低 PI3K、p-Akt 蛋白水平。当 Akt 被激活时,随之激活了下游促炎趋化因子 NF- κ B,大量炎症因子释放,聚集于炎症组织细胞,加重炎症反应^[21]。推测槟榔碱通过抑制 Akt 磷酸化,阻止 NF- κ B 的激活,降低炎症因子 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 、 $IL-1\beta$ 的释放,发挥抗炎作用。

TLR4 在小胶质细胞中广泛表达^[22],其可通过外源性和内源性受体,结合相应炎症因子,完成炎症信号的传导,激发细胞炎症反应。多项研究表明,TLR4 在炎症调节中起着关键作用^[9,23]。LPS 能够结合 BV2 小胶质细胞膜上的 TLR4 受体,上调 TLR4 蛋白表达,激活下游 MyD88 依赖性信号通路传递炎症信号,进一步激活 NF- κ B,从而诱导了炎症反应^[24-25]。激活的 NF- κ B 随之进入细胞核,与特定 DNA 有序结合,促进炎症因子($TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 、 $IL-1\beta$)表达,加剧炎症反应,严重损伤细胞组织。此外,分布在神经元内的 NO 也是机体促进细胞炎症的重要介质^[26],激活的小胶质细胞可表达大量 iNOS,导致细胞产生大量 NO,而 iNOS 和 COX2 是 NF- κ B 通路下游的 2 个靶点,大量游离 NO 的产生和 NF- κ B 通路的激活也会使得 iNOS 和 COX2 高度表达,一并加重细胞炎症^[27]。本研究结果表明,在 LPS 诱导损伤的 BV2 小胶质细胞炎症模型中,TLR4 和 p65,炎症蛋白 COX2 和 iNOS 的表达显著上升,提示小胶质细胞 BV2 中 p65 核转位,下游炎症通路被激活。后续实验中也发现模型组中 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 、 $IL-1\beta$ 蛋白表达增多,细胞炎症加剧。而槟榔碱能够显著抑制 TLR4 和 p65,炎症蛋白 COX2 和 iNOS 表达、抑制了 p65 的核转位以及下游 NF- κ B 炎症通路的过度激活。

此外,PI3K 是一种脂质激酶,可诱导 Akt 磷酸化^[28],调节各种细胞内的下游信号如细胞增殖、凋亡、自噬和分化,从而减轻细胞炎症^[29]。研究表明,PI3K/Akt 信号通路可以调控包括 $IL-6$ 、 $IL-1\beta$ 和 $TNF-\alpha$ 在内的多种炎症因子^[30]。当 PI3K/Akt 信号通路被激活后,可抑制 TLR4 的表达,从而减轻下游 NF- κ B 炎症通路的激活,下调炎症因子 $IL-6$ 、 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 的释放,炎症反应得到缓解^[31]。本研究

发现,LPS 诱导可明显促使 BV2 小胶质细胞中 PI3K 与 p-Akt 过表达,提示炎症通路被激活,与之对应的 qPCR 结果中显示,炎症因子 $IL-6$ 、 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 的释放增加,细胞中炎症反应加剧。当槟榔碱预处理后,小胶质细胞 BV2 中 PI3K 与 p-Akt 含量显著下降,并且通路下游炎症因子 $IL-6$ 、 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 的释放得以抑制,提示炎症反应减弱。结果表明,槟榔碱可通过调节 TLR4/NF- κ B、PI3K/Akt 信号通路抑制神经炎症反应发挥改善功效。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Kumari S, Dhapola R, Sharma P, et al. Implicative role of cytokines in neuroinflammation mediated AD and associated signaling pathways: Current progress in molecular signaling and therapeutics [J]. *Ageing Res Rev*, 2023, 92: 102098.
- [2] 何沙潼, 蒋梦若, 陈嘉豪, 等. 抑郁的中枢神经炎症机制相关研究进展 [J]. *生命的化学*, 2022, 42(7): 1315-1321.
- [3] Dong L H, Li Y, Wang S J, et al. Esculentoside A inhibits LPS-induced BV2 microglia activation through activating PPAR- γ [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 813: 61-65.
- [4] Loiola R A, Wickstead E S, Solito E, et al. Estrogen promotes pro-resolving microglial behavior and phagocytic cell clearance through the actions of annexin A1 [J]. *Front Endocrinol*, 2019, 10: 420.
- [5] Subhramanyam C S, Wang C, Hu Q D, et al. Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2019, 94: 112-120.
- [6] 薛小燕, 郭小华, 李敏, 等. 神经退行性疾病发病机制研究进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(11): 3149-3152.
- [7] González H, Elgueta D, Montoya A, et al. Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases [J]. *J Neuroimmunol*, 2014, 274(1-2): 1-13.
- [8] 付海鑫, 王慧影, 张良, 等. 神经变性疾病与神经炎症: 小胶质细胞和星形胶质细胞的作用 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2023, 40(9): 859-864.
- [9] Jin X, Liu M Y, Zhang D F, et al. Baicalin mitigates cognitive impairment and protects neurons from microglia-mediated neuroinflammation via suppressing NLRP3 inflammasomes and TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2019, 25(5): 575-590.
- [10] 梁焕宴, 冀沛然, 弓宝, 等. 槟榔的药用历史及其应用现状 [J]. *中草药*, 2024, 55(2): 678-687.

- [11] 李亚军. 槟榔抗抑郁化学成分的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2011.
- [12] Saeed S A, Farnaz S, Simjee R U, *et al.* Triterpenes and B-sitosterol from piper betle: Isolation, antiplatelet and anti-inflammatory effects [J]. *Biochem Soc Trans*, 1993, 21(4): 462S.
- [13] 裴海月, 姜宁, 王孟迪, 等. 槟榔对小鼠的抗抑郁作用影响及机制研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(1): 24-32.
- [14] Dar A, Khatoon S. Behavioral and biochemical studies of dichloromethane fraction from the *Areca catechu* nut [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2000, 65(1): 1-6.
- [15] Maiese K, Holloway H H, Larson D M, *et al.* Effect of acute and chronic arecoline treatment on cerebral metabolism and blood flow in the conscious rat [J]. *Brain Res*, 1994, 641(1): 65-75.
- [16] Ono M, Minamoto Y, Shibata S, *et al.* Attenuating effect of arecoline and physostigmine on an impairment of mealtime-associated activity rhythm in old rats [J]. *Physiol Behav*, 1995, 57(1): 189-191.
- [17] Bhandare A M, Kshirsagar A D, Vyawahare N S, *et al.* Potential analgesic, anti-inflammatory and antioxidant activities of hydroalcoholic extract of *Areca catechu* L. nut [J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(12): 3412-3417.
- [18] 张伟, 周寿红, 凌红艳, 等. 槟榔碱抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的小鼠巨噬细胞炎症因子表达及其机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17(4): 269-272.
- [19] 吴江涛. 槟榔碱的抗炎活性及其对 NF- κ B 信号通路的影响 [D]. 广州: 华南农业大学, 2019.
- [20] 关杨. 萝卜硫素及其衍生物对 LPS 活化的 BV2 小胶质细胞神经炎性的保护作用及分子机制研究 [D]. 沈阳: 辽宁大学, 2021.
- [21] 何菁菁, 吴通前, 晏世荣, 等. 人胎盘提取物通过 TLR4/NF- κ B 信号通路负调控由 LPS 诱导的小胶质细胞炎症反应 [J/OL]. *中国免疫学杂志*: 1-22. [2024-02-28]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1126.r.20231106.1019.002.html>.
- [22] Li L, Jiang W F, Yu B J, *et al.* Quercetin improves cerebral ischemia/reperfusion injury by promoting microglia/macrophages M2 polarization via regulating PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 168: 115653.
- [23] Zhao Y L, Zhao Y H, Zhang M, *et al.* Inhibition of TLR4 signalling-induced inflammation attenuates secondary injury after diffuse axonal injury in rats [J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: 4706915.
- [24] Guo L T, Wang S Q, Su J, *et al.* Baicalin ameliorates neuroinflammation-induced depressive-like behavior through inhibition of toll-like receptor 4 expression via the PI3K/AKT/FoxO1 pathway [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 95.
- [25] Cao L H, Zhao Y Y, Bai M, *et al.* Mechanistic studies of gypenosides in microglial state transition and its implications in depression-like behaviors: Role of TLR4/MyD88/NF- κ B signaling [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 838261.
- [26] Jiang H S, Yang X Y, Wang Y Z, *et al.* Vitamin D protects against traumatic brain injury via modulating TLR4/MyD88/NF- κ B pathway-mediated microglial polarization and neuroinflammation [J]. *Biomed Res Int*, 2022, 2022: 3363036.
- [27] Tse J K Y. Gut microbiota, nitric oxide, and microglia as prerequisites for neurodegenerative disorders [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2017, 8(7): 1438-1447.
- [28] Heo Y J, Lee N, Choi S E, *et al.* Amphiregulin induces iNOS and COX-2 expression through NF- κ B and MAPK signaling in hepatic inflammation [J]. *Mediators Inflamm*, 2023, 2023: 2364121.
- [29] Chen S P, Peng J H, Sherchan P, *et al.* TREM2 activation attenuates neuroinflammation and neuronal apoptosis via PI3K/Akt pathway after intracerebral hemorrhage in mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 168.
- [30] Vergadi E, Ieronymaki E, Lyroni K, *et al.* Akt signaling pathway in macrophage activation and M1/M2 polarization [J]. *J Immunol*, 2017, 198(3): 1006-1014.
- [31] Liu Q, Zhang J Q, Xiao C H, *et al.* Akebia saponin D protects hippocampal neurogenesis from microglia-mediated inflammation and ameliorates depressive-like behaviors and cognitive impairment in mice through the PI3K-Akt pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 927419.

[责任编辑 高源]