

• 研究论文 •

延龄草苷对脂多糖刺激的小胶质细胞炎症抑制作用

杨红云, 郭虹, 柴丽娟, 王少峡, 胡利民*

天津中医药大学中医药研究院, 天津市中药药理学重点实验室, 教育部方剂学重点实验室, 天津 300193

摘要: **目的** 探讨延龄草苷(trillin)对小胶质细胞(BV-2)的炎性激活的抑制作用。**方法** 不同浓度的延龄草苷孵育0.5 h, 然后用脂多糖进行刺激, 培养24 h后收集上清, Greiss法检测NO浓度; CCK-8检测延龄草苷对小胶质细胞活力的影响; Elisa检测肿瘤坏死因子(TNF- α)的浓度; 实时定量PCR(RT-PCR)检测TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、iNOS、COX-1、COX-2基因的表达。**结果** 在不影响细胞活力的前提下, 延龄草苷能明显抑制NO的释放, 同时能抑制激活诱导细胞死亡, 能明显抑制TNF- α 的产生, 能明显抑制TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、iNOS、COX-2 mRNA的表达, 但是不能抑制COX-1 mRNA的表达。**结论** 延龄草苷可以抑制LPS诱导的小胶质细胞的炎性激活, 抑制炎性基因的表达。

关键词: 小胶质细胞; 延龄草苷; 炎症因子; 脂多糖

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2014)03-0218-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.03.006

Inhibition of trillin on inflammation of microglia cells induced by lipopolysaccharides

YANG Hong-yun, GUO Hong, CHAI Li-juan, WANG Shao-xia, HU Li-min

Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medical Formulae, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Chinese medicine Pharmacology, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To study the inhibition of trillin on the inflammatory activation of microglia (BV-2). **Methods** The BV-2 cells were incubated with trillin at different concentration for 0.5 h and stimulated with lipopolysaccharide (LPS). The supernatant was collected after 24 h culture, and the NO level was detected by Greiss method; The activity of BV-2 cells was detected with CCK-8; The expression of tumor necrosis factor (TNF- α), IL-1 β , IL-6, iNOS, COX-1, and COX-2 was detected by real time quantitative (RT-PCR). **Results** Trillin can inhibit the NO release in microglia induced by LPS without affecting the cell viability and inhibit the inflammatory factors such as TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS, and COX-2. **Conclusion** Trillin can inhibit the inflammatory activation of BV-2 cells induced by LPS and inhibit the expression of inflammatory factor.

Key words: microglia; trillin; inflammatory factor; lipopolysaccharide

小胶质细胞(microglia)是中枢神经的巨噬细胞, 其最显著特点是对外界环境刺激敏感, 在脑缺血、神经退行性疾病、感染等病理条件下, 许多微环境因子的变化可使小胶质细胞迅速激活。显著上调许多细胞因子的分泌水平, 其中少部分为神经营养因子或抗炎因子(如BDNF、IL-10等), 能够促进神经元的存活或产生抗炎作用; 而大部分为促炎因子(如TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等), 还有趋化因子、活性氧簇(ROS)等, 能直接损伤神经元或引起其

他继发性损伤。抑制小胶质细胞过度活化所引起的炎症反应可以作为治疗和缓解神经退行性疾病和脑损伤的重要途径之一^[1-2]。

延龄草苷是很多种中药含有的单体成分, 如蒺藜、延龄草等。本实验采用脂多糖(LPS)激活小胶质细胞, 考察其抗神经炎症的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 小胶质细胞株 BV-2(北京协和医科大

收稿日期: 2014-01-06

基金项目: 国家重大新药创制项目(2011ZX09201-201)

作者简介: 杨红云(1987—), 女, 河北保定人, 2012级硕士研究生, 现就读于天津中医药大学药理学专业。

Tel: 18206808942 E-mail: yanghongyun360@163.com,

*通信作者 胡利民(1966—), 男, 内蒙古人, 研究员, 主要从事神经药理学研究。E-mail: huliminth@126.com

学); 延龄草苷(天津中新药业集团股份有限公司, CAS: 14144-06-0); DMEM 培养基(C11995, Gibco); 双抗(15140, Gibco); 胎牛血清(16000-044, Gibco); 0.05%胰蛋白酶(25300062, Gibco); 一氧化氮检测试剂盒(S0021, 碧云天); Cell Counting Kit-8(CK04, 同仁化学); LPS(S1732, 碧云天); TNF- α Elisa 试剂盒(MTA00B, R&D, USA), 米诺环素(Sigma, CAS:13614-98-7)。

1.1.2 仪器 FORMA3111 型 CO₂ 恒温培养箱(美国 Thermo 公司), TE200 倒置相差显微镜(日本 Nikon 公司), 7500 型定量 PCR 仪(美国 ABI 公司), 64R 型低温高速离心机(美国 Beckman 公司), DU—800 紫外分光光度计(DNA/Protein Analyzer, 美国 Beckman 公司)。

1.2 分组

正常对照组(DMSO, 终体积浓度 1:1 000)、LPS 组(终质量浓度 0.1 $\mu\text{g/mL}$)、延龄草苷(终浓度为 10、5、1 $\mu\text{mol/L}$)加 LPS 组、阳性对照米诺环素(终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$)加 LPS 组。

1.3 延龄草苷对小胶质细胞活力的影响

完全 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素)培养小鼠小胶质细胞株 BV-2, 调整细胞浓度为 4×10^5 个/mL, 接种到 48 孔培养板内过夜, 加入不同浓度的延龄草苷(1、5、10 $\mu\text{mol/L}$)培养 24 h 后, 弃上清, 加入 CCK-8(终体积浓度 1:10), 继续孵育 0.5 h, 于 450 nm 波长处测定吸光度(A)值。

1.4 延龄草苷对小胶质细胞分泌炎症介质的影响

完全 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素)培养小鼠小胶质细胞株 BV-2。调整细胞浓度为 4×10^5 个/mL, 接种到 48 孔培养板内过夜, 加入不同浓度的延龄草苷(终浓度为 1、5、10 $\mu\text{mol/L}$)预孵育 0.5 h, 然后加入 LPS(终质量浓度 0.1 $\mu\text{g/mL}$)进行刺激。细胞加入 LPS 后培养 24 h 后收集各处理组细胞培养上清液, 用 Greiss 法检测 NO 的浓度。Elisa 法检测细胞因子 TNF- α 含量。操作步骤按试剂盒说明书(R&D Systems 公司)完成。

1.5 延龄草苷对小胶质细胞 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、iNOS、COX-1、COX-2 mRNA 表达的影响

小鼠小胶质细胞系 BV-2 加入延龄草苷(10 $\mu\text{mol/L}$)预孵育 0.5 h, 然后加入 LPS(0.1 $\mu\text{g/mL}$)进行刺激 8 h。用 PBS 洗 1 次, 以 Trizol 试剂提取

细胞总 RNA。采用 TaqMan Reverse Transcription Reagents 试剂盒将总 RNA(1.5 μg)反转录为 cDNA(20 μL 体系)。取 1 μL 的 cDNA 产物用作定量 PCR 扩增的模板, 看家基因 GAPDH 作为内参。数据采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 相对定量法分析, 数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

1.6 统计学处理

所有试验数据采用 SPSS 软件进行统计, 实验组与对照组间比较用 t 检验, 组间差异性比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 CCK-8 检测延龄草苷对小胶质细胞活力的影响

与对照组相比, 阳性药米诺环素没有细胞毒作用; 延龄草苷(1~10 $\mu\text{mol/L}$)没有细胞毒作用(图 1)。

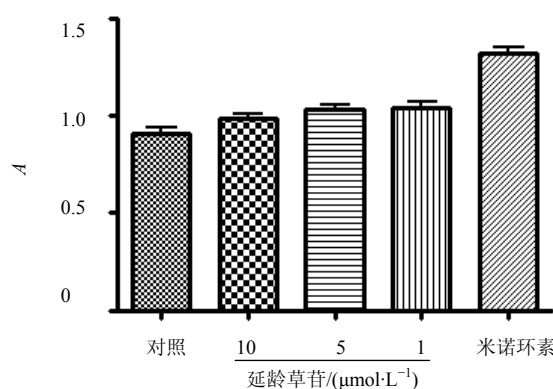
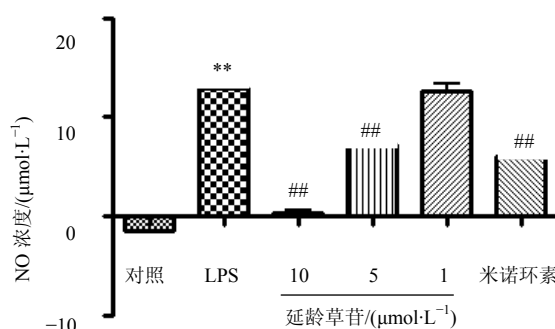


图 1 延龄草苷对小胶质细胞活力的影响
Fig. 1 Effect of trillin on microglia viability

2.2 Greiss 法检测延龄草苷对小胶质细胞分泌 NO 的影响

与对照组相比, LPS 组能增加 NO 的释放; 与 LPS 组相比, 阳性对照组能明显抑制 NO 的释放, 延龄草苷也能抑制 NO 的释放, 并且在一定范围内呈剂量相关关系, 见图 2。



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$
** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs LPS group

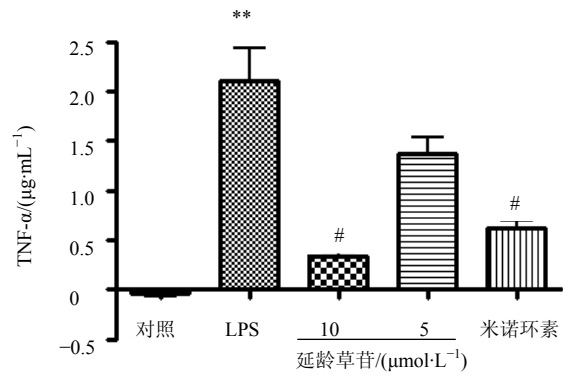
图 2 延龄草苷对活化的小胶质细胞分泌 NO 的影响
Fig. 2 Effect of trillin on NO release in active microglia cells

2.3 ELISA 试剂盒检测小胶质细胞对 TNF- α 的影响

与对照组相比, LPS 组能显著提高 BV-2 细胞对 TNF- α 的分泌; 与 LPS 组相比, 延龄草苷能明显抑制 TNF- α 的分泌, 并且在一定范围内呈剂量相关关系, 见图 3。

2.4 延龄草苷 (10 $\mu\text{mol/L}$) 对 LPS 诱导的 BV-2 细胞炎症因子 mRNA 的表达量的影响

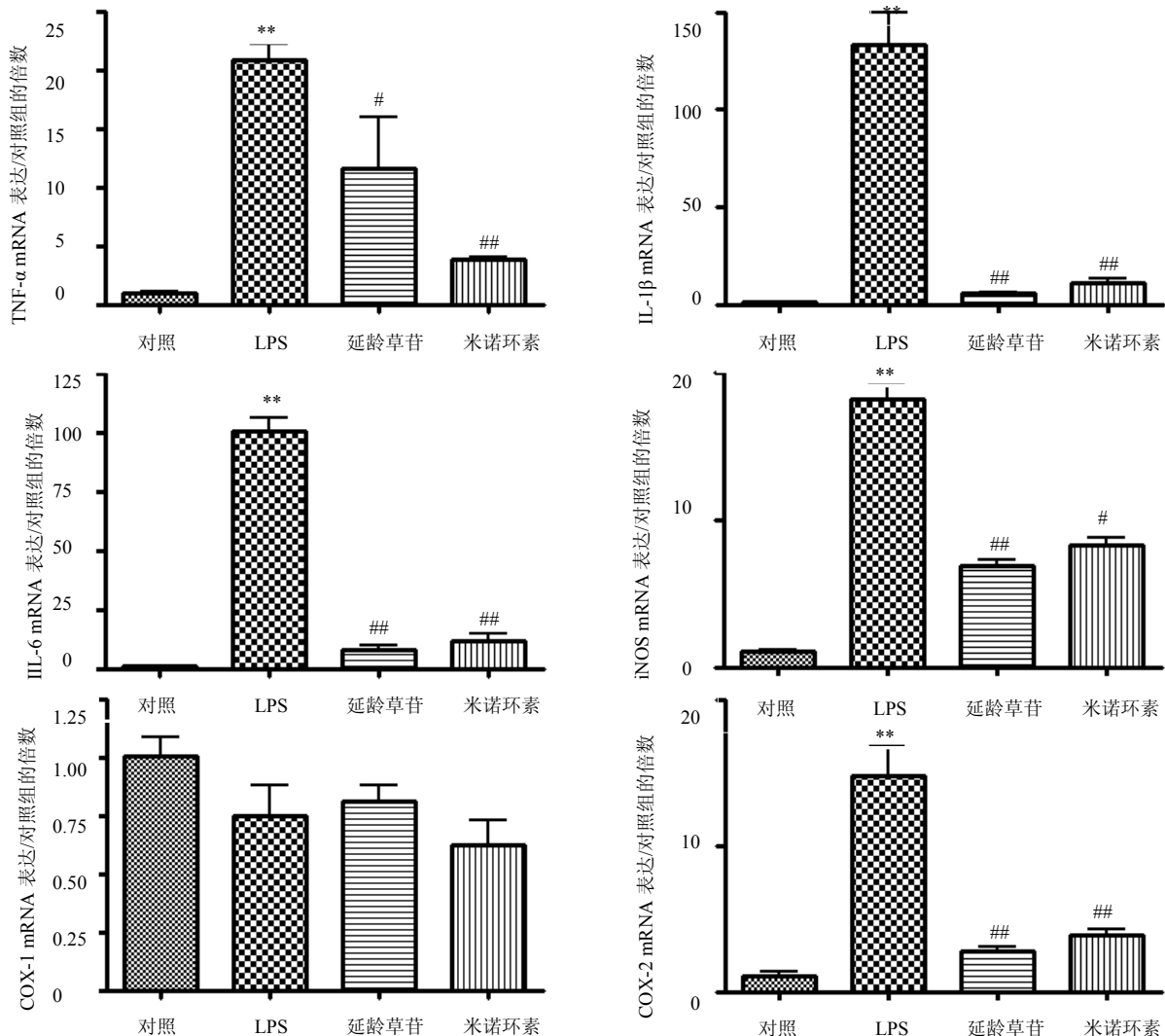
与对照组比较, LPS 组可以显著提高 BV-2 细胞中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、iNOS、COX-2 mRNA 的表达; 与 LPS 组比较, 延龄草苷 (10 $\mu\text{mol/L}$) 可以不同程度降低 LPS 诱导的神经炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、iNOS、COX-2 mRNA 的表达, 对 COX-1 mRNA 的表达没有抑制作用, 见图 4。



与对照组比较: ** $P<0.01$; 与 LPS 组比较: # $P<0.05$

** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ vs LPS group

图 3 延龄草苷对活化的小胶质细胞分泌 TNF- α 的影响
Fig. 3 Effect of trillin on TNF- α release in active microglia



与对照组比较: ** $P<0.01$; 与 LPS 组比较: # $P<0.05$, ### $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$, ### $P<0.01$ vs LPS group

图 4 延龄草苷对 LPS 诱导的 BV-2 细胞炎症因子 mRNA 的表达量的影响
Fig. 4 Effect of trillin on mRNA expression of inflammatory factor in BV2 cells induced by LPS

3 讨论

延龄草苷 1~10 $\mu\text{mol/L}$ 能抑制 LPS 诱导的小胶质细胞 NO 的产生, 能显著抑制促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、iNOS、COX-2 等 mRNA 的表达。

小胶质细胞是中枢神经系统的巨噬细胞, 具有免疫防御和炎症反应^[3]。在生理条件下, 休眠的小胶质细胞有平衡神经系统和支持神经细胞的重要作用。抑制小胶质细胞过度活化所引起的炎症反应可以作为治疗和缓解神经退行性疾病和脑损伤的重要途径之一^[1-2]。脂多糖能激活休眠的小胶质细胞产生促炎介质和神经毒性。活化的小胶质细胞通过吸引活化的 T 细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞进入神经系统而产生基质金属蛋白酶和趋化因子破坏血脑屏障^[4]。研究表明, 延龄草苷在不影响细胞活力的前提下, 能有效抑制小胶质细胞 NO 的释放, 并且能明显抑制炎症基因的表达。因此, 延龄草苷抑制小胶质细胞炎症介质的释放可能是其发挥神经保护作用的机制之一。

参考文献

- [1] Giovannini M G, Scali C, Prosperi C. *et al.* Beta-amyloid-induced inflammation and cholinergic hypofunction in the rat brain *in vivo*: involvement of the p38MAPK pathway [J]. *Neurobiol Dis*, 2002, 11(2): 257-274.
- [2] van Rossum D, Hanisch U K. Microglia [J]. *Metab Brain Dis*, 2004, 19(3-4): 393-411.
- [3] Kim S S, Kong P J, Kim B S, *et al.* Inhibitory action of minocycline on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide and prostaglandin E2 in BV2 microglial cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2004, 27(3):314-318.
- [4] Li J, Zhang S, Lu M. Hydroxysafflor yellow A suppresses inflammatory responses of BV₂ microglia after oxygen-glucose deprivation [J]. *Neurosci Lett*, 2013, 535: 51-56.
- [5] Ladecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation [J]. *Nat Med*, 2011, 17(7): 796-808.
- [6] Casaretto L, Sousa P L R, Mari J J, *et al.* Chemotherapy versus support cancer treatment in advanced gastric cancer: a meta-analysis [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2006, 39: 431-440.
- [9] Vanhoefer U, Rougier P, Wilke H, *et al.* Final results of a randomized phase III trial of sequential high-dose methotrexate, fluorouracil, and doxorubicin vs etoposide, leucovorin, and fluorouracil vs infusional fluorouracil and cisplatin in advanced gastric cancer: a trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Tract Cancer Cooperative Group [J]. *J Clin Oncol*, 2000, 18: 2648-2657.
- [10] Van Cutsem E, Moiseyenko V M, Tjulandin S, *et al.* V325 Study Group Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24: 4991-4997.
- [11] Lichtman S M, Wildiers H, Chatelut E, *et al.* International society of geriatric oncology chemotherapy taskforce: evaluation of chemotherapy in older patients-an analysis of the medical literature [J]. *J Clin Oncol*, 2007b, 25: 1832-1843.
- [12] Zaniboni A, Meriqqi F. The emerging role of oxaliplatin in the treatment of gastric cancer [J]. *J Chemother*, 2005, 17: 656-662.
- [13] Al-Batran S E, Hartmann J T, Probst S, *et al.* Phase III trial in metastatic gastroesophageal adenocarcinoma with fluorouracil, leucovorin plus either oxaliplatin or cisplatin: a study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26: 1435-1442.
- [14] Kang Y, Kang W K, Shin D B. Randomized phase III trial of capecitabine/cisplatin (XP) versus continuous infusion of 5FU/cisplatin (FP) as first-line therapy in patients with advanced gastric cancer: efficacy and safety results [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(18-suppl): LBA4018.
- [15] Boku N, Yamamoto S, Shirao K. Randomised phase III study of 5-fluorouracil alone versus combination of irinotecan and cisplatin versus S-1 alone in advanced gastric cancer (JCOG9912) [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(18S): LBA4513.
- [16] Blum M, Suzuki A, Ajani J A. A comprehensive review of S-1 in the treatment of advanced gastric adenocarcinoma [J]. *Future Oncol*, 2011, 7: 715-726.
- [17] Sato A, Ito T, Tomita T, *et al.* Chemotherapy of gastric cancer-a review of clinical trials in Japan [J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2002, 29: 1522-1531.
- [18] Van Groenigen C J, Peters G J, Schornagel J H, *et al.* Phase I clinical and pharmacokinetic study of oral S-1 in patients with advanced solid tumors [J]. *J Clin Oncol*, 2000, 18: 2772-2779.

(上接第 214 页)