

醒脑静注射液活性成分麝香酮对LPS诱导的BV-2小胶质细胞炎症反应的影响

张可, 李芮琳, 赵磊, 殷孟兰, 徐耀, 张彤, 贾壮壮, 胡利民, 王少峡*

天津中医药大学 中西医结合学院, 中医药研究院, 天津市中药药理学重点实验室, 方剂学教育部重点实验室, 天津 301600

摘要: 目的 筛选醒脑静注射液8种单体(吉马酮、莪术二酮、 β -榄香烯、樟脑、莪术烯醇、麝香酮、天然冰片、龙脑)中抑制BV-2细胞炎症反应的活性成分, 研究其对炎症因子释放的影响。方法 CCK-8法检测8种单体(10 $\mu\text{mol/L}$)对小胶质细胞活力的影响; 10 $\mu\text{mol/L}$ 的8种单体孵育BV-2细胞0.5 h, 用0.1 $\mu\text{g/mL}$ 脂多糖(LPS)进行刺激, 培养24 h后收集上清, Greiss法检测NO浓度; Elisa检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6 (IL-6)的浓度。不同浓度的麝香酮孵育BV-2细胞0.5 h, 用0.1 $\mu\text{g/mL}$ LPS刺激, 培养24 h后收集上清, Greiss法检测NO浓度; Elisa法检测TNF- α 、IL-6、白介素1受体 α (IL-1R α)的浓度。结果 与对照组比较, 醒脑静注射液各个单体成分对正常培养的BV-2细胞无毒性作用。LPS刺激BV-2细胞后, 模型组与对照组比较, 产生的NO、TNF- α 、IL-6、IL-1R α 显著增多 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 麝香酮5.0、7.5、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度可显著抑制NO、IL-6的产生, 10 $\mu\text{mol/L}$ 麝香酮可显著抑制TNF- α 的产生, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 其他7种单体成分均无显著影响; 2.5、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 麝香酮组IL-1R α 的释放量有升高趋势, 但无统计学意义。结论 麝香酮可以显著抑制LPS诱导的BV-2细胞炎症因子的产生。

关键词: 醒脑静注射液; 麝香酮; 小胶质细胞; 炎症因子; 吉马酮; 莪术二酮; β -榄香烯; 樟脑; 莪术烯醇; 天然冰片、龙脑

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2020) 06-1046-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.06.011

Effect of Xingnaojing Injection's active ingredient muscone on LPS-induced BV-2 microglia inflammatory response

ZHANG Ke, LI Ruilin, ZHAO Lei, YIN Menglan, XU Yao, ZHANG Tong, JIA Zhuangzhuang, HU Limin, WANG Shaoxia

College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine and Pharmacology, Ministry of Education, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301600, China

Abstract: Objective To study the effect of 8 monomers of Xingnaojing injection (gematrone, zedoary diketone, β -elemene, camphor, zedoary enol, musk ketone, borneol, borneol) on the release of inflammatory factors, the active components were screened. **Methods** CCK-8 was used to detect the effects of eight monomers on the microglia activity. Xingnaojing eight monomers of 10 $\mu\text{mol/L}$ concentration: gemone, sputum dione, β -elemene, camphor, zephyrenol, musk ketone, natural borneol, borneol to incubate BV-2 cells for 0.5 h, then stimulated with LPS. The supernatant was collected after 24 h of culture. The Greens method was used to detect the concentration of NO. Elisa detected tumor necrosis factor (TNF- α) and the concentration of interleukin-6 (IL-6). Different concentrations of musk ketone were used to incubate BV-2 cells for 0.5 h, then stimulated with lipopolysaccharide. After 24 h of culture, the supernatant was collected. CCK-8 was used to detect the effects of different concentrations of musk ketone on the microglia viability. Greiss method NO concentration was measured; Elisa detected the concentrations of tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin 6 (IL-6), and interleukin-1 receptor alpha (IL-1R α). **Results** Compared with the control group, Xingnaojing injection has no toxic effect on BV-2 cells. After LPS stimulated BV-2 cells, NO, TNF- α , IL-6 and IL-1R α were significantly increased in

收稿日期: 2019-09-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81573644); 国家中药标准化项目(ZYBZH-C-JS-35); “十三五”期间天津市高等学校“创新团队培养计划”(NO.TD13-5050)

第一作者: 张可(1994-), 女, 硕士研究生, 主要从事中药神经保护和小胶质细胞方面的研究。E-mail: zhangkehbt@163.com

*通信作者: 王少峡, 研究员。Tel: (022)59596539 E-mail: wangshaoxia1@163.com

the model group compared with the control group ($P < 0.01$). Compared with the model group, musk ketone of 5.0, 7.5, and 10.0 $\mu\text{mol/L}$ can significantly inhibit the production of NO and IL-6, the difference was statistically significant ($P < 0.01$). The other 7 monomers had no significant effect. The release of IL-1Ra in 10 $\mu\text{mol/L}$ musk ketone group increased, but there was no statistical significance. **Conclusion** Musk ketone can inhibit the inflammatory activation of LPS-induced microglia and inhibit the production of inflammatory factors.

Key words: Xingnaojing injection; musk ketone; microglia; inflammation factors; gematrone; zedoary diketone; β -elemene; camphor; zedoary enol; musk ketone; borneol; borneol

随着社会压力的不断增大,卒中发生越来越年轻化,缺血性脑卒中比例可达到全部卒中的80%。小胶质细胞是中枢神经系统的常驻型免疫细胞,在脑缺血情况下,小胶质细胞快速脱髓化伴随强烈的激活反应^[1]。激活的小胶质细胞参与脑缺血的病理进程^[2],释放多种效应因子调节炎症反应。因此,调节小胶质细胞的激活对脑缺血组织有重要意义。

脂多糖(LPS)为革兰阴性菌细胞壁的主要成分,为炎症反应的强诱导剂,也是典型的小胶质细胞活化剂,LPS与小胶质细胞细胞膜的LPS受体结合,诱发炎症反应,其病理过程与机制与缺血性脑卒中病理过程中的炎症反应类似,故本研究采用LPS诱导的小胶质细胞模型为实验载体^[3]。

醒脑静注射液是以古方安宫牛黄丸为基础改制而成的水溶性静脉注射液^[4],方中黄连、黄芩泻火解毒;栀子清热凉血;麝香、冰片醒脑开窍;郁金疏理气机。醒脑静注射液可透过血脑屏障发挥抗炎^[5]、清除氧自由基、降低血管内皮损伤^[6]等作用。近年来,越来越多的研究^[4]表明,醒脑静注射液能有效提高急性脑梗死患者的临床疗效^[7]。本研究旨在探究醒脑静注射液8种成分^[8](吉马酮、莪术二酮、 β -榄香烯、樟脑、麝香酮、天然冰片、龙脑、莪术烯醇)中抑制小胶质细胞炎症反应的成分,及其对脑缺血进程中激活的小胶质细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 药物及主要试剂

吉马酮,批号111665-201204;莪术二酮,批号111800-201302; β -榄香烯,批号100268-200401;樟脑,批号111759-201105;麝香酮,批号110719-201215;天然冰片,批号111688-200501;龙脑,批号110881-201508;质量分数均为98%,均购于中国食品药品检定研究院;莪术烯醇,批号19431-84-6,质量分数98%,购于成都瑞芬恩生物科技有限公司;阳性药米诺环素(Minocycline, Mino),购自MedChemExpress。

DMEM培养基、PBS,购自美国Corning公司;胎牛血清,购自以色列Biological Industries公司;双

抗、胰蛋白酶,均购自美国Gibco公司;CCK-8试剂盒,购自日本同仁化学公司;Greiss法试剂盒,购自上海碧云天生物技术有限公司;肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素-6(IL-6)、白介素-1受体拮抗剂(IL-1Ra)试剂盒,购自美国R&D Systems。

1.2 细胞

BV-2小鼠小胶质细胞株,购自中国医学科学院基础研究所。

2 方法

2.1 BV-2细胞的培养

BV-2细胞培养于DMEM+10%FBS+双抗(100 U/L青霉素和100 $\mu\text{g/L}$ 链霉素)培养液中,每2天胰酶消化传代。BV-2细胞生长至融合度达到80%~90%,传代至细胞培养板,待细胞融合度达到90%给药。

2.2 药物配制

醒脑静8种单体:吉马酮、莪术二酮、 β -榄香烯、樟脑、莪术烯醇、麝香酮、天然冰片、龙脑,均用DMSO配制成0.1 mmol/L储存浓度,用DMEM配制成10 $\mu\text{mol/L}$ 工作浓度^[8]。阳性药Mino用过滤除菌的超纯水溶解为10 mmol/L的储存液,用DMEM配制成10 $\mu\text{mol/L}$ 工作浓度。梯度浓度麝香酮:用DMEM配制成1.0、2.5、5.0、7.5、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 进行实验。

2.3 CCK-8法检测细胞活力

将BV-2细胞以 $1.5 \times 10^5/\text{mL}$ 、每孔200 μL 接种至96孔细胞培养板,待细胞融合度达到90%,给予10 $\mu\text{mol/L}$ 吉马酮、莪术二酮、 β -榄香烯、樟脑、莪术烯醇、麝香酮、天然冰片、龙脑(或1.0、2.5、5.0、7.5、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的麝香酮),对照组给予等体积的DMSO,处理24 h后加入CCK-8检测液(10% CCK-8+90%DMEM),100 $\mu\text{L}/$ 孔,450 nm处测定吸光度(A)值。

2.4 一氧化氮(NO)检测

细胞接种操作及醒脑静注射液单体给药浓度同“2.3”项,单体药物及阳性药Mino(10 mmol/L)预处理BV-2细胞30 min后,给药组置换含

LPS (0.1 μg/mL) 及药物的无血清 DMEM 培养基处理 24 h; 阳性药模型组不加药, 给予 LPS 刺激; 对照组给予等体积的 DMSO。取上清, NO 含量测定采用 Griess 法试剂盒。

2.5 Elisa 法测定 TNF-α、IL-6、IL-1Ra 释放量

将 BV-2 细胞以 1.5×10⁵/mL、每孔 400 μL 接种至 48 孔细胞培养板, 除不加阳性药外, 给药操作同“2.4”项。取细胞培养上清, 10 000×g 离心 15 min, 试剂盒法检测 TNF-α、IL-6、IL-1Ra 水平。

2.6 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。

3 结果

3.1 醒脑静注射液中抑制小胶质细胞激活活性成分的筛选

与对照组比较, 醒脑静注射液各个单体成分对正常培养的 BV-2 细胞无毒性作用。LPS 刺激 BV-2 细胞后, 模型组与对照组比较, 产生的 NO、TNF-α、

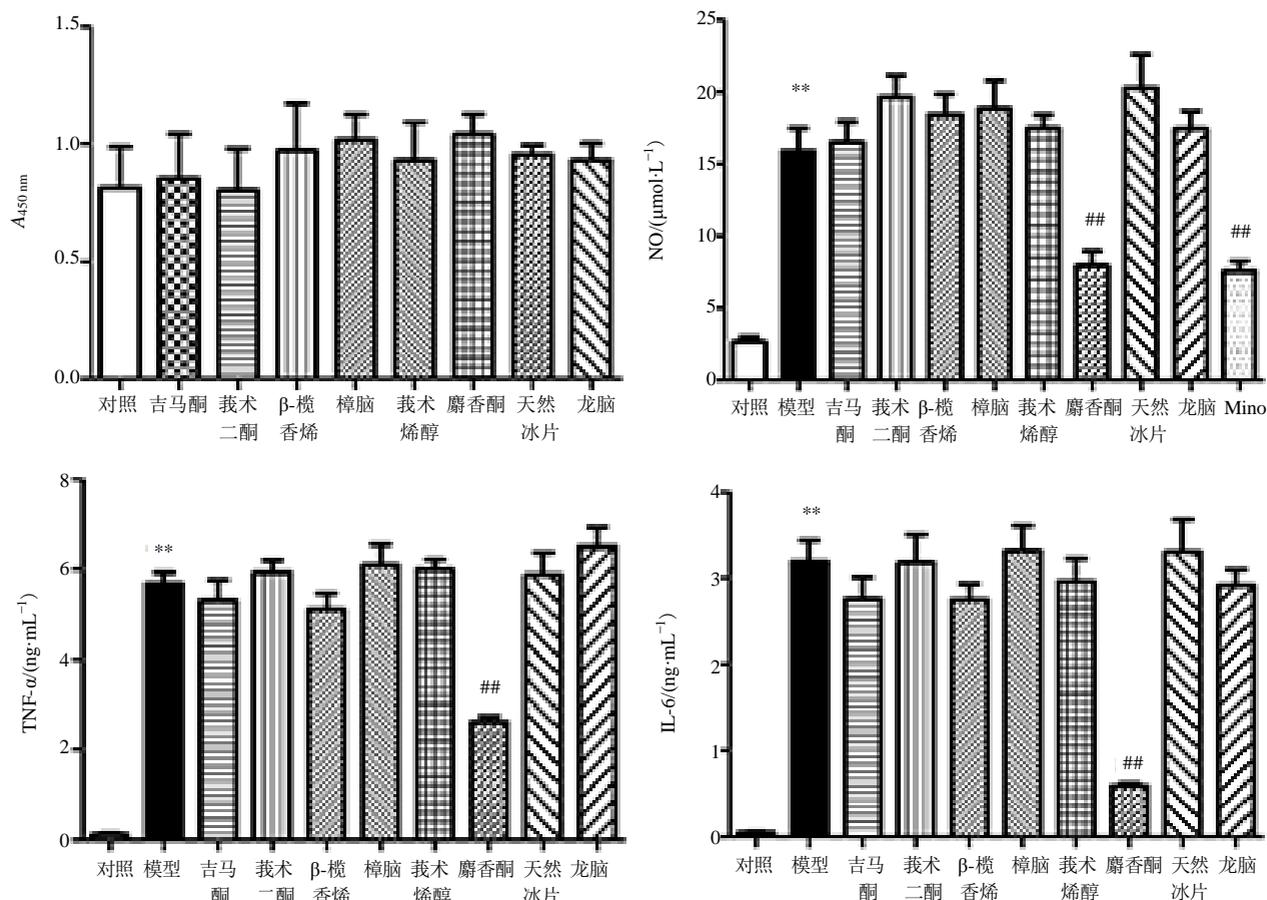
IL-6 显著增多 ($P < 0.01$); 8 种单体成分干预后, 麝香酮与模型组比较, NO、TNF-α、IL-6 含量明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。其他 7 种单体成分无显著影响。结果见图 1。

3.2 麝香酮抑制 LPS 诱导的 BV-2 细胞 NO、TNF-α、IL-6 的产生

1~10 μmol/L 的麝香酮对正常培养的小胶质细胞无细胞毒作用。BV-2 细胞经 0.1 μg/mL LPS 刺激 24 h 后, 其 NO、TNF-α、IL-6 的释放量较对照组显著升高 ($P < 0.01$)。给予梯度浓度 (1.0、2.5、5.0、7.5、10.0 μmol/L) 麝香酮后, 5.0、7.5、10.0 μmol/L 浓度组与模型组比较, 可显著抑制 NO、IL-6 的产生, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 10 μmol/L 麝香酮组与模型组比较, 可显著抑制 TNF-α 的产生, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 2。

3.3 麝香酮对 LPS 诱导的 BV-2 细胞 IL-1Ra 产生的影响

BV-2 细胞经 0.1 μg/mL LPS 刺激 24 h 后, 其 IL-1Ra 的释放量较对照组显著升高 ($P < 0.01$); 给予梯

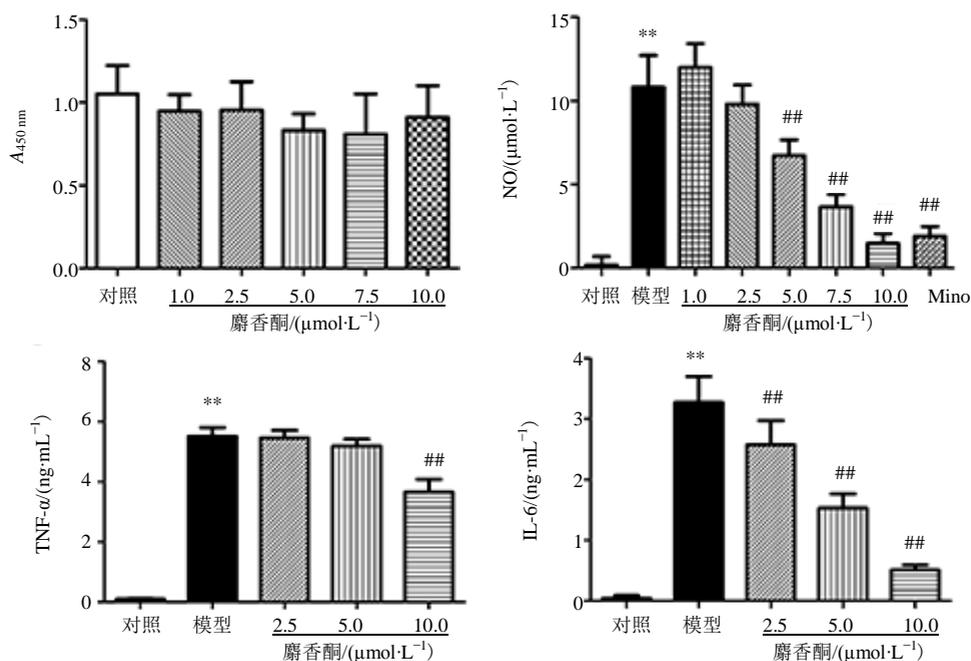


与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group

图1 醒脑静注射液中抑制小胶质细胞激活活性成分的筛选 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 Screening of active ingredients that inhibit microglia activation in Xingnaojing injection ($\bar{x} \pm s, n=6$)



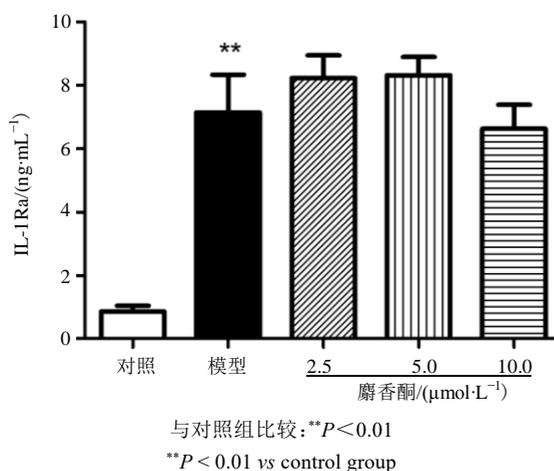
与对照组比较:** $P < 0.01$;与模型组比较:## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group

图2 麝香酮抑制LPS诱导的BV-2细胞NO、TNF- α 、IL-6的产生($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Muskone inhibits production of NO, TNF- α and IL-6 in BV-2 cells induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n=6$)

度浓度(2.5、5.0 $\mu\text{mol/L}$)麝香酮后,与对照组比较,IL-1Ra的释放量有升高趋势,但差异无统计学意义。见图3。



与对照组比较:** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

图3 麝香酮不抑制LPS诱导的BV-2细胞IL-1Ra的产生($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 3 Muskone does not inhibit LPS-induced IL-1Ra production in BV-2 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

4 讨论

小胶质细胞是中枢神经系统的主要免疫细胞^[9]。脑缺血发生时,小胶质细胞快速活化,活化的小胶质细胞在调节脑缺血期间的炎症和免疫反应中起关键作用。一方面,其能够表达趋化因子,以聚集大量炎性细胞到坏死的部位,随后炎性细胞入

脑进一步加重炎症^[9];另一方面,其对于组织保护和脑修复至关重要,因为活化的小胶质细胞还可以抑制局部炎症,清除细胞碎片并提供营养因子^[10]。根据小胶质细胞发挥促炎或抗炎作用将其定义为M1/M2极化表型^[11]。IL-1R通过与IL-1受体竞争性结合,阻断IL-1生物学效应,对抗由IL-1引起的病理作用而减轻脑组织炎性损伤^[8]。

本研究采用小胶质细胞为研究对象,建立了LPS诱导的炎症模型(M1型),在细胞水平上表明,在不影响细胞活力的前提下,醒脑静注射液中的麝香酮可显著降低LPS诱导小胶质细胞释放的NO、TNF- α 、IL-6,且呈剂量相关性,对LPS诱导的小胶质细胞释放的IL-1Ra有一定程度的增强作用。结果表明,麝香酮对小胶质细胞的影响可能是醒脑静注射液发挥脑缺血保护作用的机制之一,可能的机制是麝香酮抑制小胶质细胞的激活,降低激活小胶质细胞释放的NO、TNF- α 、IL-6炎症因子,同时使IL-1Ra增加,增加IL-1Ra和IL-1与受体的竞争结合,抑制IL-1导致的炎症作用。

麝香酮作为醒脑静注射液的主要有效成分之一,目前已有研究证明麝香酮可以减少脊髓损伤后的水肿、炎症、神经元变性和坏死等继发性损伤,促进大鼠神经恢复^[12],诱导癌细胞的生长抑制和凋亡,抑制MMP9的表达改善早期创伤性脑损伤的学

习记忆能力^[13],下调脑缺血后 Pannexin1 蛋白表达保护急性脑缺血损伤^[14]等,但麝香酮对脑缺血后小胶质细胞的动态变化的影响尚未见报道。本研究结果进一步阐明了醒脑静注射液治疗缺血性卒中的作用机制,为进一步开发醒脑静注射液在脑血管系统疾病中的临床应用提供了参考。

参考文献

- [1] Li T, Zhang S. Microgliosis in the injured brain: infiltrating cells and reactive microglia both play a role [J]. *Neuroscientist*, 2016, 22(2): 165-170.
- [2] Zhang S. Microglial activation after ischaemic stroke [J]. *Stroke Vasc Neurol*, 2019, 4(2): 71-74.
- [3] 黄欢,武汪洋,吴阳洋,等. LPS 诱导小胶质细胞活化模型的建立及评价 [J]. *安徽医药*, 2013, 17(1): 31-33.
- [4] 蔡定芳,阮晴珉,沈思钰,等. 醒脑静注射液治疗急性缺血性中风的临床与实验研究 [J]. *中国中医急症*, 2000, 4(2): 46-48.
- [5] 陈红. 醒脑静对急性缺血性脑卒中患者神经功能缺损评分及生活质量的研究 [J]. *湖北民族学院学报: 医学版*, 2019, 36(2): 86-87.
- [6] 任晓幸,朱净净. 醒脑静联合阿托伐他汀对缺血性脑卒中患者炎性因子及后期执行功能的影响 [J]. *广东医学*, 2018, 39(23): 3565-3568.
- [7] Lai X, Cao K, Kong L, et al. Xingnaojing for Moderate-to-severe Acute ischemic Stroke (XMAS): study protocol for a randomized controlled trial [J]. *Trials*, 2017, 18(1): 479.
- [8] 李芮琳,张彤,刘文杰,等. 醒脑静注射液的活性成分对 BV-2 细胞中白细胞介素 1 受体拮抗剂分泌的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(19): 2331-2334.
- [9] Xu L, He D, Bai Y. Microglia-mediated inflammation and neurodegenerative disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(10): 6709-6715.
- [10] Liu X, Liu J, Zhao S, et al. Interleukin-4 is essential for microglia/macrophage M2 polarization and long-term recovery after cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2016, 47(2): 498.
- [11] Zhao R, Ying M, Gu S, et al. Cysteinyl leukotriene receptor 2 is involved in inflammation and neuronal damage by mediating microglia M1/M2 polarization through NF- κ B pathway [J]. *Neuroscience*, 2019, 422: 99-118.
- [12] Guo L, Quan Z X, Zhao Z H, et al. Effects of musk ketone on nerve recovery after spinal cord injury [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(2): 2958-2963.
- [13] 蒋光元,罗超,彭彤,等. 麝香酮对大鼠创伤性脑损伤后早期 MMP9 蛋白表达的影响 [J]. *中国中医急症*, 2018, 27(1): 90-93.
- [14] 徐林根,王亚玲,徐阳,等. 麝香酮对急性脑缺血大鼠缝隙联结蛋白 Pannexin1 表达的影响 [J]. *中国中医药科技*, 2018, 25(2): 194-196.