

姜黄素下调NF- κ B信号通路抑制化学缺氧诱导的U87细胞炎症反应

胡晨, 汪玉馨, 孟长虹*

江苏省食品药品监督检验研究院, 江苏 南京 210019

摘要: 目的 研究姜黄素对化学缺氧所致人源性神经星形胶质瘤细胞系U87炎症反应的影响, 并探讨相关分子机制。方法 100 μ mol/L CoCl_2 处理U87细胞不同时间(1、3、6、12、24 h), 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) mRNA表达变化。100 μ mol/L CoCl_2 处理U87细胞12 h制备化学缺氧模型, 同时给予1、5和10 μ mol/L姜黄素处理, 对照组(不添加 CoCl_2)和模型组给予等体积DMSO; qRT-PCR法检测IL-1 β 、IL-6、TNF- α mRNA表达变化; Western Blotting法检测NF- κ B/p65蛋白磷酸化水平及核转位。结果 CoCl_2 上调U87细胞IL-1 β 、IL-6、TNF- α mRNA水平并呈时间相关性, 炎症反应在约12 h达到高峰。与模型组比较, 姜黄素显著下调炎症因子IL-1 β 、IL-6和TNF- α 的mRNA水平, 5和10 μ mol/L浓度组差异显著($P < 0.05$); 显著下调p65的磷酸化水平($P < 0.05$); 导致细胞核内NF- κ B/p65蛋白显著减少、细胞质中NF- κ B/p65蛋白显著增加($P < 0.05$)。结论 姜黄素通过下调NF- κ B信号通路抑制化学缺氧诱导的U87细胞炎症反应。

关键词: 姜黄素; CoCl_2 ; 化学缺氧; 星形胶质细胞; 炎症细胞因子; NF- κ B

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2018)11-1989-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.11.010

Curcumin inhibits chemical hypoxia-induced astrocyte inflammation

HU Chen, WANG Yuxin, MENG Changhong

Jiangsu Institute of Food and Drug Control, Nanjing 210019, China

Abstract: **Objective** to investigate effects of traditional Chinese herbal extract monomer- curcumin (Cur) on astrocyte inflammation induced by hypoxia. **Methods** cobalt chloride (CoCl_2) was applied to the astrocyte cell line U87 resulting in cellular hypoxia. The changes of inflammatory cytokines after hypoxia and Cur treatment were determined by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. The effects of Cur on NF- κ B signaling pathway and nuclear translocation in hypoxic U87 cells were studied by Western Blotting. **Results** CoCl_2 up-regulated the transcriptional level of astrocyte inflammatory cytokines in a dose-dependent manner, and Cur significantly inhibited inflammation of astrocyte induced by chemical hypoxia. CoCl_2 -induced chemical hypoxia lead to increased phosphorylation of p65 in the cytosol and promotes nuclear translocation of p65. Cur pretreatment significantly inhibited the activation of the above signaling pathway. **Conclusion** Cur exerts neuroprotective effects by inhibiting NF- κ B signaling pathway and down-regulation of astrocyte inflammation induced chemical hypoxia.

Key words: curcumin; CoCl_2 ; chemical hypoxia; astrocyte; inflammatory cytokines; NF- κ B

姜黄素是一类从姜黄等姜科和天南星科植物根茎中提取的低分子量多酚化合物。我国早在《唐本草》中就有报道,其味辛苦,大寒,无毒^[1]。现代医学研究识表明,姜黄素具有抗炎、抗氧化、抗菌、抗病毒和抗肿瘤等广泛的药理活性,且药物毒性低、不良反应小^[2-5]。姜黄素具备成为多种疾病临床治疗药物的潜能,但目前其对神经疾病的治疗作用及相关机制研究较少。

缺氧性脑损伤是临床高发脑病,与脑血栓、脑外伤、肝功损伤等多种致病因素密切相关,治疗后,脑内供血供氧恢复,诱导神经细胞,尤其是星形胶质细胞的异常激活。激活的胶质细胞触发炎症反应,加剧脑神经的次级损伤和脑功能恢复障碍,成为当前缺氧性脑损伤治疗面临的重大医学问题^[6],如何改善缺氧后脑功能恢复成为当前药物研究的热点。

收稿日期: 2018-09-02

第一作者: 胡晨,博士,研究方向为药理学。E-mail: huhorace@163.com

*通信作者: 孟长虹 E-mail: 794975821@qq.com

CoCl₂处理细胞能抑制类血红素蛋白的合成与功能,促进缺氧诱导因子-1(HIF-1 α)表达,导致活性氧(ROS)蓄积等,一系列变化与神经细胞缺氧损伤的反应类似。既往研究发现,CoCl₂在体内体外均可成功模拟神经细胞的缺氧损伤^[7],且其所致化学缺氧与神经胶质激活及其炎症密切相关^[8]。由于使用便利,理化性质稳定等独特优势,CoCl₂逐渐成为诱导神经细胞慢性缺氧损伤的首选药物,尤其是在体外造模中应用广泛^[9]。本研究采用这一化学缺氧模型,研究姜黄素治疗缺氧所致神经胶质炎症的药效及相关分子机制。

1 材料

1.1 细胞

人源性神经星形胶质瘤细胞系 U87, 来自美国模式菌种收集中心(ATCC)。

1.2 药物及主要试剂

姜黄素、无水 CoCl₂, 分析纯(AR, 质量分数>99%)级,(南京良纬生物科技有限公司);细胞培养基 DMEM、胎牛血清、青霉素、链霉素,(维森特生物技术有限公司);逆转录试剂盒(TaKaRa, Otsu, Shiga, Japan);半定量 SYBR PCR 试剂盒(TaKaRa Bio);RIPA 裂解缓冲液(Beyotime Inc, Shanghai, China);BCA 试剂盒(Beyotime Inc, Shanghai, China);NE-PER 细胞质、核蛋白提取试剂盒(Pierce Biotechnology);磷酸化 p65(Ser536)、NF- κ B/p65 抗体(博奥森, 中国北京);抗 β -肌动蛋白抗体(博士德, 中国武汉);二抗(中杉, 中国北京);ECL 免疫印迹分析试剂盒(密理博, 中国北京)。

1.3 主要仪器

二氧化碳细胞培养箱、生物安全柜和 Realtime PCR 仪, 购于美国 Thermo 公司;免疫电泳槽、半干转仪和电泳仪, 购于 Bio-Rad 公司;Stratagene MX3000P 实时荧光定量 PCR 仪, 购于 Agilent, CA。

2 方法

2.1 细胞培养

用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 添加 100

U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素, 于 60、100 mm 培养皿中培养 U87 细胞, 细胞培养箱条件为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂。

2.2 CoCl₂诱导缺氧时间的确定

2.2.1 细胞分组及 CoCl₂ 处理 用无菌水配制 100 mmol/L 的 CoCl₂ 并过滤除菌, 分装后 -20 $^{\circ}$ C 避光贮存备用。参照已有文献报道^[5], U87 细胞复苏传至 3 代后, 消化收集细胞, 接种于 24 孔板中, 待细胞生长至铺满底面的 80%, 均更换无血清培养基, 分为对照组、100 μ mol/L CoCl₂ 处理不同时间(1、3、6、12、24 h)组。

2.2.2 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测炎症因子 mRNA 表达 CoCl₂ 处理结束后, 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测炎症因子白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) mRNA 表达。采用 Trizol 试剂从细胞中提取和纯化总 RNA, 应用逆转录试剂盒按照说明书的操作步骤, 逆转录为 cDNA。接着应用半定量 SYBR PCR 试剂盒进行 qRT-PCR 反应, 于 Stratagene MX3000P 实时荧光定量 PCR 仪上运行。 β -actin 作为内参, 采用 ^ΔC_t 法定量。所用引物序列均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, 序列见表 1。

2.3 姜黄素对炎症因子 mRNA 表达的影响

细胞培养及接种操作同“2.2.1”项, 更换无血清培养基, 分为对照组、模型组和姜黄素 1、5、10 μ mol/L 组, 模型组和姜黄素组均给予 100 μ mol/L CoCl₂ 处理, 姜黄素组同时给予相应浓度的姜黄素 DMSO 溶液, 对照组和模型组给予等体积 DMSO。给药 12 h 后收集细胞, 检测炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α mRNA 表达, 方法同“2.2.2”项。

2.4 姜黄素对 NF- κ B/P65 蛋白表达的影响

2.4.1 总蛋白提取及胞质和胞核蛋白分离 U87 接种于 6 孔板中, 待细胞生长至铺满底面的 80%, 均更换无血清培养基, 分为对照组、模型组和姜黄素 10 μ mol/L 组。模型组和姜黄素组均给予 100

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
IL-1 β	GGCCCTAAACAGCTGAAGTGC	CATGGCCACAACAACACTGACG
IL-6	CAATCTGGATTCAATGAGGAGAC	CATTTGTGGTTGGGTCAGGG
TNF- α	AGCCCATGTTGTAGCAAACC	CTGATGGTGTGGGTGAGGAG
β -actin	CCCAGCACAAATGAAGATCAAGAT	GGACTCGTCATACTCCTGCTT

$\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理,姜黄素组同时给予相应浓度的姜黄素 DMSO 溶液,对照组和模型组给予等体积 DMSO。给药 12 h 后收集细胞,加入含 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟的 RIPA 裂解缓冲液诱导细胞裂解,使用 BCA 试剂盒测定蛋白总含量。

应用 NE-PER 细胞质和胞核蛋白提取试剂盒分离胞质和胞核蛋白,将 U87 细胞与 200 μL 冰冷的 CER I 试剂混合,剧烈振荡后,冰水浴 10 min。再加入 11 μL 冰冷的 CER II,离心并提取上清液,为细胞质蛋白。将沉淀物振荡,重新悬浮在冰冷的 NER 试剂中,4 $^{\circ}\text{C}$, 16 000 $\times g$ 离心 10 min,提取上清液,为核蛋白,均储存在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.4.2 Western blotting 法检测 p65 蛋白表达 将上述蛋白加入 5 $\times$ 上样缓冲液后煮沸 5 min 变性,冰上冷却。采用 10% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白样品,然后转移到 PVDF 膜。封闭后给予 p-p65(Ser536)、NF- κB /p65 和 β -actin 抗体孵育液,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,漂洗 3 遍后加入相应二抗,孵育 1 h 后漂洗 3 遍。采用 ECL 免疫印迹分析试剂盒曝光拍照,进行蛋白质条带灰度分析。

2.5 数据统计分析

采用 SPSS 22.0 进行统计学分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间显著性用单因素方差分析,组间两两比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 CoCl_2 诱导缺氧时间的确定

100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用于 U87 细胞制备体外缺氧模型,qRT-PCR 结果表明,炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 水平在 CoCl_2 作用 6、12、24 h 后显著上调,与对照组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),且呈时间相关性。 CoCl_2 所致炎症反应在约 12 h 达到高峰,后续研究选择造模时间为 12 h。结果表明,化学缺氧能诱导 U87 细胞炎症因子表达,增强其活化和炎症反应。结果见图 1。

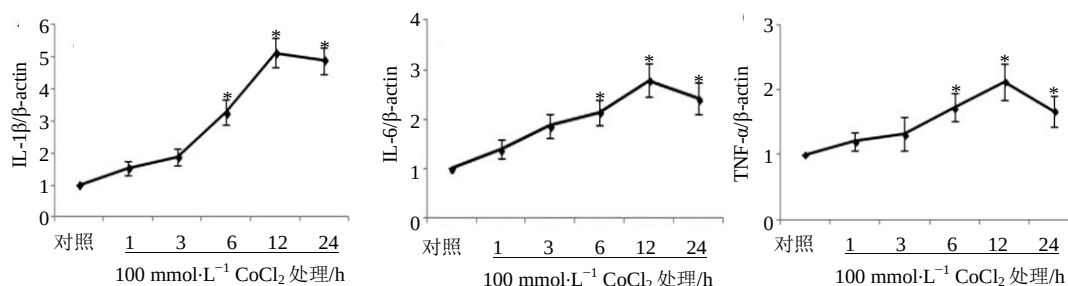
0.05),且呈时间相关性。 CoCl_2 所致炎症反应在约 12 h 达到高峰,后续研究选择造模时间为 12 h。结果表明,化学缺氧能诱导 U87 细胞炎症因子表达,增强其活化和炎症反应。结果见图 1。

3.2 姜黄素对化学缺氧诱导的炎症因子表达的影响

如图 2 所示,与对照组比较,模型组 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 水平显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,姜黄素下调炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 水平,其中 5、10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组差异显著($P < 0.05$)。结果提示,姜黄素通过下调缺氧诱导的炎症因子表达,阻断缺氧后神经胶质细胞的激活及其相关次级神经损伤,发挥对缺氧性脑病的保护作用。

3.3 姜黄素对化学缺氧诱导 NF- κB /P65 蛋白磷酸化的影响

核转录因子 NF- κB 激活是诱导炎症因子表达的重要机制之一^[10],为进一步揭示姜黄素抑制胶质炎症的分子机制,检测 10 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理化学缺氧 U87 细胞后 P65 蛋白磷酸化水平。如图 3 所示,与对照组比较,模型组 p65 蛋白的磷酸化水平显著升高($P < 0.05$);给予姜黄素处理显著下调 p65 的磷酸化水平,与模型组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,姜黄素处理后还导致细胞核内 NF- κB /p65 蛋白显著减少、细胞质中 NF- κB /p65 蛋白显著增加($P < 0.05$)。结果表明,姜黄素抑制化学缺氧导致的 NF- κB 活化与核转位,提示姜黄素可能通过阻断 NF- κB 信号通路的激活,参与了调节星形胶质细胞的激活及其相关神经炎症。



与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

图1 CoCl_2 作用不同时间后 U87 细胞炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α mRNA 水平变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig.1 Changes of IL-1 β , IL-6 and TNF- α mRNA levels in U87 cells treated with CoCl_2 at different time points ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

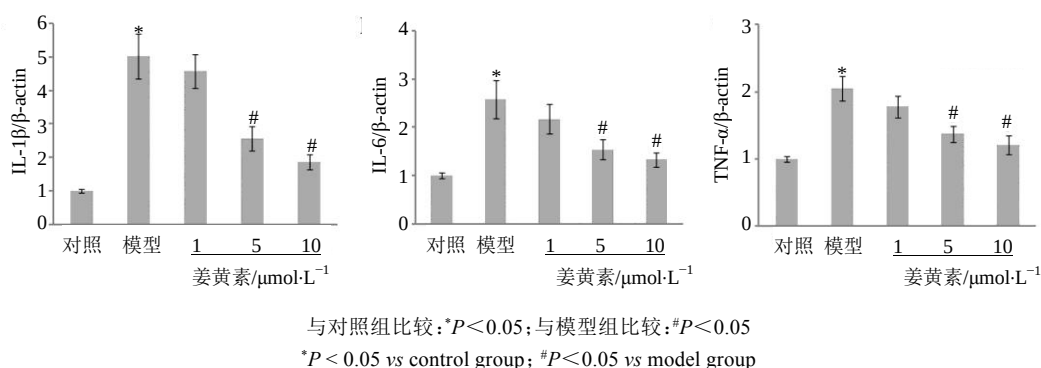


图2 姜黄素抑制化学缺氧所致星形胶质细胞炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 2 Curcumin inhibits expression of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in astrocytes induced by chemical hypoxia ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

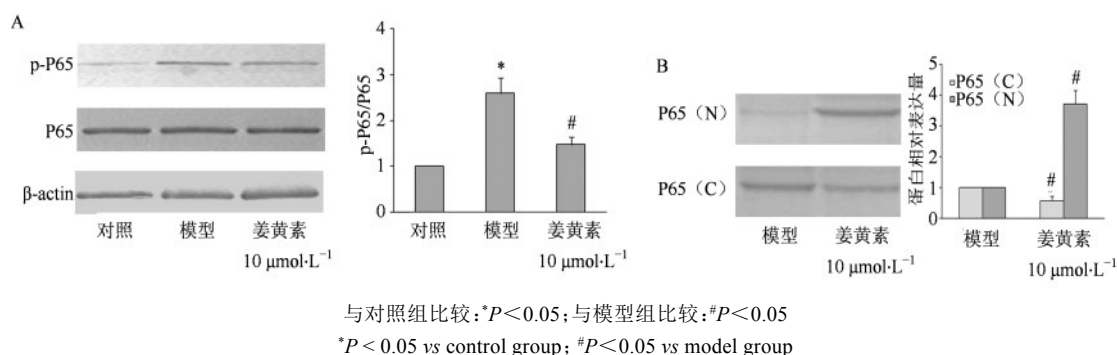


图3 姜黄素抑制化学缺氧诱导的U87细胞NF- κ B/p65的激活(A)与入核(B)($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 3 Curcumin inhibits chemical hypoxia induced activation (A) and entry (B) of NF- κ B/p65 in astrocytes ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

星形胶质细胞是中枢神经系统含量最多的胶质细胞,具有多种免疫功能^[6]。病毒感染、创伤性损伤和辐射等均可促使星形胶质细胞释放多种细胞因子和趋化因子,诱导神经炎症反应^[11-13]。此外,脑缺血或缺氧也能激活胶质细胞,诱导星形胶质细胞释放TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等炎症因子^[14],导致中枢神经系统炎症反应。已有研究结果揭示,星形胶质细胞中NF- κ B相关性的炎症反应在多种神经系统疾病中都发挥着重要作用,而胶质细胞的过度激活和炎症因子过度表达导致创伤性脑损伤(TBI)、缺血性神经变性等多种脑病的继发性脑损伤,也成为脑病治疗备受关注问题^[10]。

姜黄素是传统中草药姜黄的主要活性成分之一,对多种慢性疾病具有较好疗效,包括神经系统疾病^[2]。姜黄素为多酚化合物,酚基团的H原子能够还原氧化分子,作为天然自由基清除剂,其药用价值得到了很多专家学者的肯定和推崇。除了依赖还原功能下调氧化应激以外,姜黄素还能阻断

NF- κ B信号通路,抑制炎症因子的生成和释放。最新研究发现姜黄素能通过Nrf2-keap1途径阻断NF- κ B信号通路,缓解氧化应激和炎症反应,从而抑制多种慢性疾病相关的炎症反应^[15]。还有研究表明,姜黄素能与TNF结合抑制其相关下游炎症信号通路及其生物学效应。本研究进一步探索姜黄素能否抑制胶质细胞的炎症反应而对缺氧所致神经损伤发挥有益作用。通过应用CoCl₂构建体外缺氧模型,发现姜黄素可抑制NF- κ B信号,下调其活性及其核转位,从而阻断其作为核转录因子介导的炎症因子的转录表达,减轻缺氧诱导的胶质炎症反应。

此外,CoCl₂诱导的化学缺氧不同于机体缺血及体外细胞缺氧刺激,其主要通过激活低氧诱导因子-1(HIF-1 α)发挥重要的调控作用,因而,其诱导神经缺氧损伤或胶质细胞激活有更明确的分子机制^[8]。HIF-1 α 信号通路激活已被证实与NF- κ B介导的炎症应激密切联系,同时缺氧激活的NF- κ B信号也能增强HIF的活性,两者作为核转录因子共同促进炎症介质的表达和炎症的发生^[16]。因而,推测姜黄素

能通过下调两者的功能及相互作用,减弱炎症因子生成及胶质炎症的发生。

星形胶质炎症是缺氧等多种脑病诱导脑损伤的次级诱发因素,本研究结果表明,姜黄素抑制化学缺氧诱导的U87细胞炎症反应,机制可能与下调NF- κ B信号通路相关。

参考文献

- [1] He Y, Yue Y, Zheng X, et al. Curcumin, inflammation, and chronic diseases: how are they linked [J]. *Molecules*, 2015, 20(5): 9183-9213.
- [2] Kunnumakkara A B, Bordoloi D, Padmavathi G, et al. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases [J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(11): 1325-1348.
- [3] 常明向, 吴梅梅, 李瀚旻. 姜黄素与甘草次酸联用对肝癌HepG-2细胞增殖的抑制作用 [J]. *药物评价研究*, 2017, (1): 42-47.
- [4] 杨雪梅, 邱红梅, 田蜜, 等. 姜黄素对人过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 1激活作用的研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(15): 3122-3126.
- [5] Niranjana R. The role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease: focus on astrocytes [J]. *Mol Neurobiol*, 2014, 49(1): 28-38.
- [6] Zhang D, Luo J Y, Yan D, J, et al. Effects of two Curcuminoids on *Candida albicans* [J]. *Chin Herb Med*, 2012, 4(3): 205-212.
- [7] Jones S M, Novak A E, Elliott J P. The role of HIF in cobalt-induced ischemic tolerance [J]. *Neuroscience*, 2013, 252: 420-430.
- [8] Wang Z, Liao S G, He Y, et al. Protective effects of fractions from *Pseudostellaria heterophylla* against cobalt chloride - induced hypoxic injury in H9c2 cell [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 147(2): 540-545.
- [9] Karovic O, Tonazzini I, Rebola N, et al. Toxic effects of cobalt in primary cultures of mouse astrocytes. Similarities with hypoxia and role of HIF-1 α [J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 73(5): 694-708.
- [10] Zhao H, Liu Y, Cheng L, et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor inhibits oxygen-glucose deprivation-induced cell damage and inflammation by suppressing endoplasmic reticulum stress in rat primary astrocytes [J]. *J Mol Neurosci*, 2013, 51(3): 671-678.
- [11] Rodriguez M, Lapierre J, Ojha C R, et al. Importance of autophagy in mediating Human Immunodeficiency Virus (HIV) and morphine-induced metabolic dysfunction and inflammation in human astrocytes [J]. *Viruses*, 2017, 9(8): E201.
- [12] Gyoneva S, Ransohoff R M. Inflammatory reaction after traumatic brain injury: therapeutic potential of targeting cell-cell communication by chemokines [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2015, 36(7): 471-480.
- [13] Moore E D, Kooshki M, Metheny-Barlow L J, et al. Angiotensin-(1-7) prevents radiation-induced inflammation in rat primary astrocytes through regulation of MAP kinase signaling [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 65: 1060-1068.
- [14] Lau L T, Yu A C. Astrocytes produce and release interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor α and interferon- γ following traumatic and metabolic injury [J]. *J Neurotrauma*, 2001, 18(3): 351-359.
- [15] Li W, Suwanwela N C, Patumraj S. Curcumin by down-regulating NF- κ B and elevating Nrf2, reduces brain edema and neurological dysfunction after cerebral I/R [J]. *Microvasc Res*, 2016, 106: 117-127.
- [16] Remels A H, Gosker H R, Verhees K J, et al. TNF- α -induced NF- κ B activation stimulates skeletal muscle glycolytic metabolism through activation of HIF-1 α [J]. *Endocrinology*, 2015, 156(5): 1770-1781.