

天麻素对终末糖基化产物诱导神经小胶质细胞炎症因子表达的影响

张媛元¹, 毛瑞阳², 杜晓红², 刘毅^{3*}

1. 温州市平阳县第二人民医院 肾内科, 浙江 温州 325405

2. 温州医学院第一附属医院 干部科, 浙江 温州 325000

3. 温州医学院第一附属医院 肾内科, 浙江 温州 325000

摘要: 目的 观察终末糖基化产物(AGEs)对小鼠神经小胶质细胞 BV-2 炎症因子白细胞介素(IL-1 β 、IL-6)表达的影响及天麻素的干预效应。方法 将体外培养的小鼠小胶质细胞分成对照组、AGEs 组、天麻素(12.5、25、50、100 mg/L)组,培养 18 h,观察细胞形态变化,酶联免疫吸附法(ELISA)测定培养上清中 IL-1 β 、IL-6 水平,逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法测定 IL-1 β 、IL-6 mRNA 表达。结果 倒置显微镜下观察,对照组小胶质细胞多为静止期,突起较少,AGEs 组多数细胞突起较多,呈阿米巴样,以 AGEs 质量浓度为 300 mg/L 时最明显,天麻素干预组细胞突起较 AGEs 组有所减少,其中以天麻素 50 mg/L 组最少。与对照组相比,AGEs 组细胞培养上清液中 IL-1 β 、IL-6 水平,以及细胞内 IL-1 β 、IL-6 mRNA 表达明显增加,具有显著差异($P < 0.05$);与 AGEs 组相比,天麻素组细胞培养上清液中 IL-1 β 、IL-6 水平,以及细胞 IL-1 β 、IL-6 mRNA 表达均有所降低,其中天麻素 25、50、100 mg/L 组差异显著($P < 0.05$),以天麻素 50 mg/L 组降低最显著($P < 0.01$)。结论 AGEs 能够诱发神经小胶质细胞产生 IL-1 β 、IL-6,天麻素能部分抑制 AGEs 对小胶质细胞的诱导作用。

关键词: 天麻素; 终末糖基化产物; 神经小胶质细胞; 白细胞介素 1 β ; 白细胞介素 6

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253 - 2670(2011)02 - 0330 - 05

Effects of gastrodine on expression of inflammatory cytokines in nerve microglia cell induced by advanced glycation end products

ZHANG Yuan-yuan¹, MAO Rui-yang², DU Xiao-hong², LIU Yi³

1. Department of Nephrology, Second People's Hospital of Pingyang County, Wenzhou 325405, China

2. Department of Cadres, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China

3. Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China

Abstract: Objective To investigate the effects of gastrodine (GAS) on the expression of IL-1 β and IL-6 in nerve microglia BV-2 cell of mice induced by different concentrations of advanced glycation end products (AGEs) and GAS intervention. **Methods** The cultured BV-2 cells of mice were divided into AGEs group, GAS (12.5, 25, 50, and 100 mg/L) groups, which were cultured for 18 h to observe the changes of cell morphology. The levels of IL-1 β and IL-6 in the cell culture supernate were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and the expressions of IL-1 β and mRNA were analysed by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Observed under an inverted microscope, microglia is mostly quiescent and less protruding in control group; Most cell processes were more and amoeba-like in AGEs group, which was most obviously at the concentration of 300 mg/L. Cell processes in GAS groups reduced less than those in AGEs groups, of which the least was in GAS group at concentration of 50 mg/L. Compared with the control group, the levels of IL-1 β and IL-6 in supernatants of cell culture in AGEs group and the expressions of IL-1 β and IL-6 mRNA increased with significant difference ($P < 0.05$). Compared with AGEs groups, the levels of IL-1 β and IL-6 in supernatants of cell culture in AGEs group and the expressions of IL-1 β and IL-6 mRNA obviously decreased, there were significant differences in AGE groups at the concentrations of 25, 50, and 100 mg/L ($P < 0.05$), among which the decrease was most significant in the AGE group of 50 mg/L ($P < 0.01$). **Conclusion** AGEs could induce that nerve microglia produce IL-1 β and IL-6 and GAS could partly inhibit the induction of AGEs on microglia.

Key words: gastrodine (GAS); advanced glycation end products (AGEs); nerve microglia; IL-1 β ; IL-6

收稿日期: 2010-05-18

基金项目: 温州市科技局基金资助课题(Y20070010)

作者简介: 张媛元(1974—),女,河北张家口人,硕士,主治医师,主要从事中药治疗尿毒症并发症研究。

Tel: (0577)88844105 E-mail: 63950063@163.com

*通讯作者 刘毅 Tel: 13868408899 E-mail: liuyi@Hosp1.an.cn

尿毒症脑病是慢性肾功能不全患者常见的中枢神经系统并发症,有报道慢性肾功能衰竭未透析患者尿毒症脑病发生率高达82%^[1],然而其发病机制目前尚不完全清楚。近年来,有研究发现终末糖基化产物(advanced glycation end products, AGEs)可与神经小胶质细胞表面的特异性受体(receptor of AGEs, RAGE)结合,引起神经小胶质细胞产生炎症介质,参与尿毒症脑病的发生^[2],是尿毒症脑病发病的影响因素,因此,如何抑制AGEs的作用可能是治疗尿毒症脑病的一种值得探索的方法。天麻素系天麻的主要有效成分,具有抗炎、抗氧化、稳定细胞膜等作用^[3],临床上具有抗惊厥,抗焦虑,改善学习记忆等功效。现代研究证实天麻素也可减轻体外模拟脑缺血损伤^[4-5]。在临床中也常用来治疗尿毒症脑病,但治疗机制尚不清楚。天麻素能否抑制AGEs诱导小胶质细胞的炎症因子表达目前国内国外尚未见报道。为此,本研究通过培养神经小胶质细胞,观察天麻素对AGEs所致小胶质细胞炎症状态的干预作用,探讨其对尿毒症脑病的防治作用。

1 材料

BV-2小胶质细胞购自中国医学科学院协和医科大学基础医学细胞中心(编号0063),天麻素购自中国药品生物制品检定所(批号110807-200205,质量分数99%),DMEM高糖培养基购自Hyclon公司,胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司,0.25%胰蛋白酶为捷瑞生物公司产品,琼脂糖为Genetech公司产品,牛血清白蛋白(BSA)为Sigma公司进口分装,trizol为Invitrogen公司产品,白细胞介素1 β (IL-1 β)、白细胞介素6(IL-6)ELISA试剂盒为RB生物科技公司进口分装,RT-PCR试剂盒购自宝生物工程(上海)有限公司,DU800型紫外分光光度计为Beckman公司产品,其他试剂均为国产分析纯。AGEs-BSA及AGEs对照物的制备与检测参照文献方法^[6]。

2 方法

2.1 细胞培养

BV-2细胞使用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养液,在5%CO₂、37℃培养箱中培养。将处于对数生长期的细胞以2×10⁵/孔的密度移入6孔板中,待细胞长至80%融合时换无血清DMEM高糖培养基饥饿处理24h后,进行实验处理。每组设3个复孔,实验重复3次。

2.2 实验分组

随机分为阴性对照组、AGEs(实验中加入AGEs-BSA)模型对照组(AGEs 300 mg/L)和天麻素干预组(AGEs 300 mg/L+天麻素,天麻素的终质量浓度分别为12.5、25、50、100 mg/L,AGEs与天麻素同时加入),5%CO₂、37℃培养箱中培养18h(预试验获得的最佳时间点)。

2.3 细胞形态学观察

取对数生长期BV-2细胞以2×10⁵/孔的密度接种于6孔培养板中,培养18h后,倒置相差显微镜下观察各组细胞形态学变化。

2.4 BV-2细胞活力的检测

将对数生长期的细胞消化后,用含10%胎牛血清的培养基配成单个细胞悬液,以2×10⁵/孔的密度接种至96孔板,每孔体积100 μ L,培养24h后换液,每孔加入含AGEs 300 mg/L的无血清培养基100 μ L,干预组加入含AGEs 300 mg/L和含天麻素的无血清培养基100 μ L,天麻素的终质量浓度分别为12.5、25、50、100 mg/L,每组设6个复孔。5%CO₂、37℃培养箱中培养18h后,每孔加入CCK8试剂10 μ L,37℃继续孵育30 min,450 nm测定各孔吸光度(A)值,计算细胞活力。

细胞活力=(干预组A值-阴性对照组A值)/(模型对照组A值-阴性对照组A值)

2.5 细胞培养上清液中IL-1 β 、IL-6水平的测定

将细胞以1×10⁵/孔的密度接种于96孔培养板内,每孔100 μ L,每组设6个复孔,细胞贴壁生长至80%时换无血清培养液培养24h,使细胞同步化后,再换含AGEs以及不同质量浓度天麻素的培养液进行培养,18h后吸取上清,12 000 r/min离心5 min,提取细胞上清,-80℃保存待测。根据ELISA试剂盒说明测上清液中蛋白浓度。

2.6 RT-PCR法检测培养细胞IL-1 β 、IL-6 mRNA的表达

2.6.1 引物合成 根据GenBank设计IL-1 β 、IL-6及 β -actin引物:IL-1 β 上游引物5'-TCAGGAGGCAGTATCAC-3',下游引物5'-TTACACAGGACAGTATAGATT-3',扩增长度390 bp,退火温度54℃,30个循环;IL-6上游引物5'-TTCACAAGTCCGGACAGGAG-3',下游引物5'-TGGTCTTGGTCCTTAGCCAC-3',扩增长度488 bp,退火温度54℃,32个循环; β -actin上游引物5'-CCCACTCCTAAGAGGAGGATG-3',下游引物5'-AGG

GAGACCAAAGCCTTCAT-3'，扩增长度 214 bp，退火温度 52 °C，28 个循环。由上海捷瑞生物工程有限公司合成，聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化。

2.6.2 抽提细胞总 RNA 用 Trizol 试剂按照说明书抽提培养后各组细胞的总 RNA，经紫外分光光度计测定 RNA 的 A_{260} 与 A_{280} 的比值在 1.8~2.0，1% 甲醛变性凝胶电泳证实总 RNA 的完整性较好（28 S 与 18 S 两条电泳带吸光度比值约为 2:1）。

2.6.3 RT-PCR 逆转录法合成 cDNA 根据宝生物公司 RT 试剂盒说明，采用的逆转录体系为 $MgSO_4$ 2 μ L（25 mmol/L）、 $2\times$ Bcalst Buffer 5 μ L、RNase Free dH_2O 0.75 μ L、dNTP mixture（各 10 mmol/L）0.5 μ L、RNase inhibitor（40 U/ μ L）0.25 μ L、BcaBEST polymerase（22 U/ μ L）0.5 μ L，Random 9 mers 0.5 μ L，实验样品 RNA 0.5 μ L，反应总体系为 10 uL。PCR 扩增：以 IL-1 β 、IL-6 及 β -actin 上下游引物分别扩增目的基因及内参对照，进行 PCR 反应，扩增反应体系为 $MgSO_4$ 3 μ L（25 mmol/L）， $5\times$ Bca 2nd Buffer 8 uL，灭菌蒸馏水 27.75 μ L，Bca-Optimized Taq 0.25 μ L，上下游引物分别为 0.5 μ L，反应总体系为 40 μ L。扩增条件为 94 °C 预变性 5 min，94 °C 变性 30 s，退火 30 s，延伸 1 min，72 °C 末端延伸 10 min。取溴酚蓝加样缓冲液 2 μ L，PCR 扩增产物 8 μ L，混匀后点样于 2% 琼脂糖凝胶（含 EB 0.5 mg/L）加样孔中，120 V 电泳 20 min。

2.6.4 半定量结果分析 将 PCR 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像分析系统成像，对扩增产物的电泳条带进行灰度扫描，Gelpro3.1 软件分析各

条带吸光度，分别计算 IL-1 β 、IL-6 基因与 β -actin 的比值，每次实验均重复 3 次。

2.7 统计学方法

使用 SPSS 11.5 统计软件进行分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较用独立样本 t 检验，多组间比较用单因素方差分析，组间比较及多组与对照组比较用 S-N-K、Dunnett- t 检验。

3 结果

3.1 AGEs-BSA 荧光光谱分析

荧光光谱扫描显示，本实验制备的 AGE-BSA 相对于单纯的 BSA 有较强的 450 nm 发射峰，前者是后者的 5 倍，单纯的 BSA 也存在一定的 450 nm 发射峰^[7]，但较低。本实验制备的 AGE-BSA 符合 AGEs 的激发荧光特性的文献报道^[8-9]。

3.2 细胞的形态学变化

倒置显微镜下阴性对照组多为静止期小胶质细胞，此期细胞生长迅速，胞体较小，呈圆形，少量细胞有突起；AGEs 组可发现较多细胞聚集成团，有的胞体变得肥大，胞核大而圆，核仁明显；有的胞体变为梭形，由胞体伸出 1 个或多个较长的枝状突起，细胞立体感、折光度减弱，胞浆内颗粒物增多；天麻素组的这种表现有所好转，细胞突触减少，立体感，折光度增强，以质量浓度为 50 mg/L 组最明显，见图 1。

3.3 对 BV-2 细胞活力的影响

AGEs 及天麻素作用于小胶质细胞并不能影响小胶质细胞的数量，各组 A 值无显著性差异（ $P > 0.05$ ），见表 1。

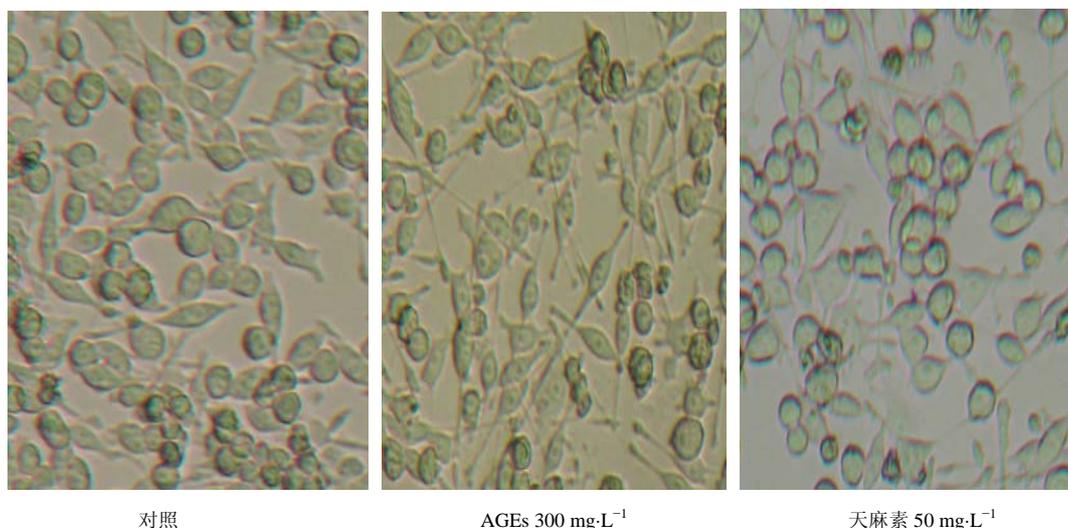


图 1 BV-2 细胞的形态学变化

Fig. 1 Morphological changes of BV-2 cells

表1 天麻素对小胶质细胞 BV-2 活力及 IL-1 β 和 IL-6 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 1 Effect of GAS on vitality of BV-2 cells and expressions of IL-1 β and IL-6 mRNA ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	ρ /(mg·L ⁻¹)	A	IL-1 β /(ng·L ⁻¹)	IL-6/(ng·L ⁻¹)	IL-1 β mRNA	IL-6 mRNA
对照	-	0.70 \pm 0.16	27.73 \pm 9.97	22.13 \pm 6.72	0.557 \pm 0.125	0.485 \pm 0.112
AGEs	300	0.64 \pm 0.15	94.92 \pm 9.41**	183.19 \pm 41.16**	0.948 \pm 0.160**	0.970 \pm 0.146**
GAS	12.5	0.59 \pm 0.23	86.55 \pm 6.84**	179.77 \pm 26.89**	0.840 \pm 0.086**	0.828 \pm 0.097**
	25	0.76 \pm 0.13	65.47 \pm 8.13***	103.43 \pm 25.67***	0.718 \pm 0.152**	0.773 \pm 0.099**
	50	0.72 \pm 0.18	44.52 \pm 5.36***	55.54 \pm 21.69***	0.583 \pm 0.110**	0.558 \pm 0.096**
	100	0.61 \pm 0.24	54.47 \pm 9.13***	76.05 \pm 25.36***	0.628 \pm 0.080#	0.610 \pm 0.085#

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

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

3.4 培养上清液中 IL-1 β 和 IL-6 水平

与对照组相比, AGEs 组培养上清液 IL-1 β 、IL-6 水平明显升高, 差异显著 ($P < 0.05$); 与 AGEs 组相比, 天麻素各组培养上清中 IL-1 β 、IL-6 水平均明显降低, 差异非常显著 ($P < 0.01$), 其中以天麻素 50 mg/L 组最低, 与天麻素 12.5、25、100 mg/L 组相比, 差异显著 ($P < 0.05$), 见表 1。

3.5 IL-1 β 、IL-6 mRNA 的表达

RT-PCR 结果提示, AGEs 组细胞 IL-1 β 、IL-6 mRNA 表达量明显高于对照组 ($P < 0.01$), 天麻素组细胞 IL-1 β 、IL-6 mRNA 表达有所减少, 与 AGEs 组相比, 均差异显著 ($P < 0.01$), 其中以天麻素 50 mg/L 组表达量最少, 与天麻素 12.5、25、100 mg/L 组相比, 差异显著 ($P < 0.05$), 见表 1 和图 2。

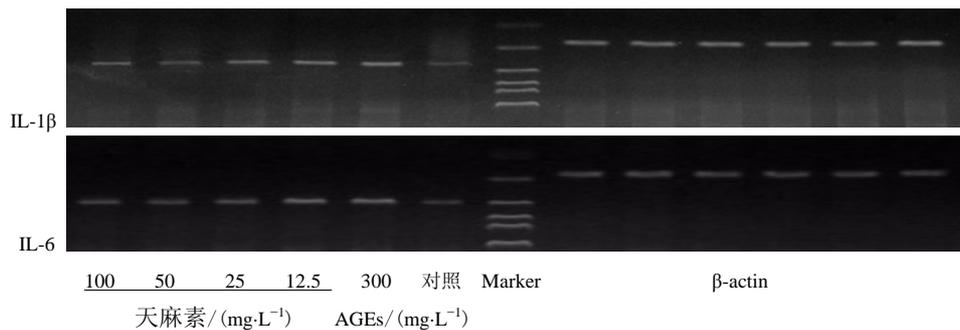


图2 天麻素对 AGEs 诱导 BV-2 细胞 IL-1 β 和 IL-6 mRNA 表达的影响

Fig. 2 Effect of GAS on expressions of IL-1 β and IL-6 mRNA in BV-2 cells induced by AGEs

4 讨论

慢性肾衰病人, 由于 AGEs 清除率下降, 以及尿毒症本身氧化应激增强, AGEs 生成增加, 致使循环和组织中 AGEs 水平明显增高^[10]。有研究发现在慢性肾功能不全状态下, 中枢神经系统有 AGEs 物质沉积, 可能是引起尿毒症脑病的原因之一^[11-12], 但 AGEs 通过哪种途径影响中枢神经系统功能目前尚不清楚。

近年来的研究显示神经小胶质细胞在维持中枢神经系统正常功能中起着重要作用, 神经小胶质细胞广泛分布于中枢神经系统, 在中枢神经系统中起着支持、营养、保护和修复的作用。小胶质细胞还参与神经损伤后的免疫反应。一般情况下, 激活的小胶质细胞可以中止或者降低受累组织或细胞的生

化代谢紊乱, 但持续激活后小胶质细胞往往具有细胞毒性效应, 也可对周围残存组织或正常组织造成继发损害, 影响正常神经功能。Mohamed 等^[13]发现椎体神经元和神经胶质细胞中也存在 AGEs 受体, AGEs 修饰的蛋白质与 AGE 受体结合, 吸引胶质细胞, 当大量神经小胶质细胞聚集并激活, 分泌包括 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和氮氧化物在内的一系列炎症细胞因子和细胞毒性物质, 可损伤神经元。因此, 推测尿毒症脑病发生与 AGEs 激活神经小胶质细胞产生炎症介质有关。

本研究发现 AGEs 可诱导神经小胶质细胞产生 IL-1 β 、IL-6。神经小胶质细胞产生的 IL-1 β 、IL-6 与 AGEs 呈剂量依赖性关系, 这与以往一些研究一致^[14]。AGEs 作用于细胞上 AGEs 受体, 介导细胞

产生氧化应激反应,并进一步促进炎症细胞产生炎症介质^[15],活性氧自由基具有自身正反馈效应,一旦激活,就有逐渐放大的趋势。在尿毒症状态下,机体细胞氧化和抗氧化系统失衡,过度激活小胶质细胞产生过量的前炎症细胞因子、自由基和 NO,引起神经细胞损伤,影响神经功能。因此,研究如何阻断小胶质细胞激活,改善神经细胞炎症状态具有重要意义。为此,本实验选用 BV-2 细胞系进行培养,研究天麻素对 AGEs 诱导产生 IL-1 β 、IL-6 的影响,探讨尿毒症脑病发病机制,寻找防治尿毒症脑病新靶点。

本实验发现一定质量浓度的天麻素能够抑制 AGEs 刺激下神经小胶质细胞 IL-1 β 、IL-6 的表达,其中 50 mg/L 时这种作用最明显。其机制可能是天麻素能够通过抑制氧自由基产生,减少脂质过氧化物(LPO)的产生,清除自由基,抑制小胶质细胞的活化,减少 IL-1 β 、IL-6 等炎症因子表达,从而减轻神经系统微炎症状态,对神经细胞起到保护作用。

总之,本研究发现 AGEs 可以诱发神经小胶质细胞 IL-1 β 、IL-6 的表达,而天麻素可部分抑制这种作用,但具体机制尚不清楚,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 王海燕. 肾脏病学 [J]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996.
- [2] 陆福明, 顾亢霞, 郭晓敏, 等. 终末糖基化产物在尿毒症患者血清中的水平及血管壁和腹膜上的表达 [J]. 中华肾病杂志, 2000, 16(3): 147-151.
- [3] 胡建军, 洪庆涛, 唐一鹏, 等. 天麻素对缺血再灌注损伤星形胶质细胞的保护作用及其对一氧化氮合成酶活性的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2001, 24(5): 11.
- [4] 胡金红, 司银楚, 洪庆涛. 天麻素对体外模拟脑缺血损伤大鼠脑微血管内皮细胞的保护作用 [J]. 中华中医药杂志, 2007, 22(2): 124-126.
- [5] 曾祥慧, 葛亚坤, 严明, 等. 天麻素对酸中毒诱导的大鼠海马神经元损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2007, 38(12): 1867-1869.
- [6] Yamagishi S, Yonekura H, Yamamoto Y, *et al.* Advanced glycation end products-driven angiogenesis *in vitro*. Induction of the growth and tube formation of human microvascular endothelial cells through autocrine vascular endothelial growth factor [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(13): 8723-8730.
- [7] Ichikawa K, Yoshinari M, Iwase M, *et al.* Advanced glycosylation end products induced tissue factor expression in human monocyte-like U937 cells and increased tissue factor expression in monocytes from diabetic patients [J]. *Atherosclerosis*, 1998, 136(2): 281-287.
- [8] Minghetti L. Role of inflammation in neurodegenerative diseases [J]. *Curr Opin Neurol*, 2005, 18(3): 315-321.
- [9] Lu M, Kuroki M, Amano S, *et al.* Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression [J]. *J Clin Invest*, 1998, 101(6): 1219-1224.
- [10] 侯凡凡, 张训. 慢性肾功能衰竭时晚期糖基化终产物的病理生理 [J]. 中华肾脏病杂志, 1997, 13(5): 312-314.
- [11] Enomoto A, Takeda M, Taki K, *et al.* Interactions of human organic anion as well as cation transporters with indoxyl sulfate [J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 466(1-2): 13-20.
- [12] Topczewska-Bruns J, Pawlak D, Chabielska E, *et al.* Increased levels of 3-hydroxykynurenine in different brain regions of rats with chronic renal insufficiency [J]. *Brain Res Bull*, 2002, 58(4): 423-428.
- [13] Mohamed A K, Bierhaus A, Schiekofe S, *et al.* The role of oxidative stress and NF-kappaB activation in late diabetic complications [J]. *Biofactors*, 1999, 10(2-3): 157-167.
- [14] 杨海华. 小胶质细胞与系统变性疾病 [J]. 国外医学: 内科学分册, 2006, 33(1): 37-38.
- [15] Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, *et al.* Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products [J]. *J Mol Med*, 2005: 83: 876-886.