

· 经典名方 ·

半夏厚朴汤对脂多糖诱导神经炎症损伤的保护机制

苏慧琳¹, 陈雅明², 白浩东², 王宇星¹, 曾元宁¹, 王秋红^{1*}

(1. 广东药科大学 中药学院 广东省中药饮片规范化炮制工程技术研究中心, 广州 510006;

2. 黑龙江中医药大学 教育部北药基础与应用研究重点实验室 黑龙江省中药及天然药物
药效物质基础研究重点实验室, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:研究半夏厚朴汤(BHT)对脂多糖(LPS)诱导小胶质细胞(BV2细胞)炎症的抑制作用以及对人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y细胞)的神经保护作用。方法:经LPS诱导BV2细胞构建神经炎症模型后,分别给予模型组(LPS 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、给药组(LPS+1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BHT、LPS+2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BHT、LPS+5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BHT、LPS+10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BHT),空白组同体积DEME培养基给药;同时建立LPS诱导BV2细胞炎症培养基与SH-SY5Y细胞共培养(LPS-DMEM)系统构建小胶质细胞炎症反应诱导的神经元凋亡模型按上分组分别给药。通过细胞增殖与活性检测(CCK-8)法检测细胞活性, Griess法测定一氧化氮(NO)的含量,酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)的含量,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)测定TNF- α 、IL-1 β 、IL-4、一氧化氮合酶(iNOS)、IL-10 mRNA的水平,蛋白免疫印迹法(Western blot)测定细胞内信号传导及转录激活蛋白3(STAT3)、Janus激酶2(JAK2)、核转录因子- κ B p65(NF- κ B p65)、蛋白激酶B(Akt)、NF- κ B抑制蛋白激酶- α (I κ B α)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)及Bcl-2相关X蛋白(Bax)表达水平。结果:与空白组比较,模型组可增加BV2细胞NO释放,增加TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、iNOS水平,减少IL-4、IL-10的含量,增加Akt、NF- κ B p65、I κ B α 、JAK2和STAT3蛋白的表达,并引起共培养的SH-SY5Y细胞的凋亡($P<0.01$)。与模型组比较,而BHT能显著降低NO、TNF- α 、IL-1 β 、iNOS含量($P<0.01$),显著升高IL-4、IL-10的含量($P<0.01$),显著降低Akt、NF- κ B p65、I κ B α 、JAK2和STAT3蛋白的表达($P<0.01$)。同时,BHT能抑制LPS-DMEM引起的SH-SY5Y细胞的凋亡($P<0.01$)。结论:实验揭示BHT通过调控Akt/NF- κ B/JAK2/STAT3信号通路抑制LPS诱导的BV2细胞炎症反应,并在SH-SY5Y细胞中表现出神经保护作用。

[关键词] 半夏厚朴汤; 小胶质细胞; 人神经母细胞瘤细胞; 神经炎症; 神经保护

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R284;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)09-0001-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220509

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220124.0946.002.html>

[网络出版日期] 2022-01-25 17:54

Protective Mechanism of Banxia Houputang on Lipopolysaccharide-induced Neuroinflammatory Injury

SU Hui-lin¹, CHEN Ya-ming², BAI Hao-dong², WANG Yu-xing¹, ZENG Yuan-ning¹, WANG Qiu-hong^{1*}

(1. Guangdong Engineering Technology Research Center for Standardized Processing of Chinese Herbal Decoction Pieces, School of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Heilongjiang Key Laboratory of TCM Pharmacodynamic Material Bases and Natural Medicines, Key Laboratory of Northern Medicine Foundation and Application, Ministry of Education, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To study the inhibitory effect of Banxia Houputang (BHT) on

[收稿日期] 2021-10-27

[基金项目] 国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项(2018YFC1707100)

[第一作者] 苏慧琳,在读硕士,从事中药复方药效物质基础研究,E-mail:18022272583@163.com

[通信作者] *王秋红,博士,教授,从事中药炮制、中药药效物质基础及活性研究、新药研发,E-mail:qhwang668@sina.com

lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation of microglia (BV2) cells and the neuroprotective effect on human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. **Method:** After the neuroinflammatory model was constructed by LPS inducing BV2 cells, model group (LPS 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), administration groups (LPS+1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BHT, LPS+2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BHT, LPS+5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BHT, LPS+10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BHT), and blank group were given DEME medium at the same volume. In addition, neuronal apoptosis model was established by co-culture of LPS-induced BV2 cell inflammation medium and SH-SY5Y cells (LPS-DMEM) and was administrated according to the above grouping. Cell viability was detected by Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay. The content of nitric oxide (NO) and that of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and interleukin-6 (IL-6) were determined by Griess assay and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), respectively. The mRNA levels of TNF- α , IL-1 β , interleukin-4 (IL-4), nitric oxide synthase (iNOS), and interleukin-10 (IL-10) were measured by real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). Western blot was used to detect the expression levels of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), Janus kinase 2 (JAK2) and nuclear factor kappa-B (NF- κ B p65), protein kinase B (Akt), inhibitor of nuclear factor κ B α (I κ B α), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), and Bcl-2 associated X protein (Bax). **Result:** Compared with blank group, LPS increased the NO release, levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, and iNOS and protein expression of Akt, NF- κ B p65, I κ B α , JAK2 and STAT3, decreased the content of IL-4 and IL-10 in BV2 cells, and induced apoptosis of co-cultured SH-SY5Y cells ($P<0.01$). Compared with model group, BHT reduced the content of NO, TNF- α , IL-1 β , and iNOS ($P<0.01$) and protein expression of Akt, NF- κ B p65, I κ B α , JAK2 and STAT3 ($P<0.01$), elevated the content of IL-4 and IL-10 ($P<0.01$), and inhibited the apoptosis of SH-SY5Y cells induced by LPS-DMEM ($P<0.01$). **Conclusion:** This experiment reveals that BHT inhibited LPS-induced inflammation in BV2 cells by regulating Akt/NF- κ B/JAK2/STAT3 signaling pathway and showed neuroprotective effects on SH-SY5Y cells.

[Keywords] Banxia Houputang; microglia (BV2); human neuroblastoma (SH-SY5Y); neuroinflammation; neuroprotection

神经炎症主要是中枢神经系统(CNS)内的炎症反应,由各种病理性损伤导致,包括感染、创伤、缺血和毒性积累等^[1]。神经炎症是多种神经系统性疾病是重要发病机制之一,包括抑郁症(MDD)、阿尔兹海默症(AD)、帕金森(PD)等。抑郁症患者脑组织中小胶质细胞激活产生神经炎症^[2-3],导致白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等促炎细胞因子浓度升高;AD患者可观察到激活的小胶质细胞,在体内检测出大量促炎因子包括 IL-1 β 、IL-6、TNF- α ^[4-5]。小胶质细胞(BV2)是中枢神经系统内常驻的先天免疫细胞^[6-7],在实验中,常用脂多糖(LPS)诱导小胶质细胞的激活^[8],以激活 Janus 激酶(JAK)/信号传导及转录激活蛋白(STAT)信号通路、核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路等炎症通路,产生促炎细胞因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-4)并大量释放,同时上调促炎介质一氧化氮合成酶(iNOS)、环氧合酶-2(COX-2)、一氧化氮(NO)和前列腺素 E₂(PGE₂)^[9]。经激活的小胶质细胞能释放具有神经毒性的细胞因子和趋化因子,诱导神经元凋亡,因此神经炎症与多种神经精神性疾病

的发生密切相关^[10-12]。

半夏厚朴汤由半夏、厚朴、茯苓、生姜、紫苏叶组成,记载于张仲景《金匮要略》,现代研究表明,半夏厚朴汤能减少抑郁症大鼠行为学差异抑制下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)亢进和增强免疫强度^[13],此外还能抑制大鼠肝脏、下丘脑、海马体前额叶皮层的核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体的激活^[14]。基于半夏厚朴汤能通过抑制炎症小体的激活治疗抑郁症,因此,本研究将通过体外实验对半夏厚朴汤治疗神经炎症的作用及机制进行探究。

本实验通过 LPS 诱导 BV2 构建神经炎症模型,旨在研究半夏厚朴汤(BHT)对神经炎症反应的抑制作用,并通过 BV2 细胞炎症培养基与人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)共培养构建炎症诱导的神经元凋亡模型,旨在研究 BHT 抑制神经炎症及发挥神经保护的作用机制,为临床使用提供理论依据和科学基础。

1 材料

1.1 药品与试剂 姜半夏(广东时珍制药有限公

司,货号18040702);厚朴(广州市诚济药业有限公司,货号200401);茯苓(广东时珍制药有限公司,货号210701);紫苏叶(广东时珍制药有限公司,货号180703051),经广东药科大学中药学院刘基柱教授鉴定所有饮片均符合2020年版《中华人民共和国药典》项下性状要求。小鼠BV2细胞、SH-SY5Y(中国科学院上海细胞库,货号分别为CL-0493、CL0208);LPS(美国Sigma公司,批号0452078994);STAT3抗体、JAK2抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(中国BOSTER公司,批号分别为4729976、1372864、4718884);NF- κ B p65抗体、蛋白激酶B抗体(Akt)、NF- κ B抑制蛋白激酶 α 抗体(I κ B α)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)抗体、Bcl-2相关X蛋白(Bax)抗体、 α -微管蛋白(α -Tubulin)抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G(H+L)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)、一氧化氮试剂盒(中国碧云天,批号分别为110117190311、122018190201、110119190301、070618190201、062718190304、082418190222、110117190311、100673811609、012318190311);DMEM、胎牛血清、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)、双抗(青霉素-链霉素)、磷酸盐缓冲液(PBS)(美国Gibco公司,批号分别为C1195500CP、190319、2322962、20210409、MA001506G2);RNA提取液、逆转录(Evo-M-MLV反转录试剂盒II)、SYBR Green Pro Tag HS预混型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(中国瑞真生物有限公司,批号分别为A3A0320、A2A1192、A3A1207);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒、ECL显色剂(中国大连美仑生物,批号分别为042033211025、052021211025);TNF- α 、IL-1 β 、IL-6酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(江苏酶免实业有限公司,批号均为20210721M);TNF- α 、IL-1 β 、IL-4、iNOS、IL-10、18S引物[生工生物工程(上海)股份有限公司]。

1.2 仪器 BC-J160-S型CO₂恒温培养箱(中国上海博讯)、KA-1000型台式低速离心机(中国上海安亭公司)、Epoch 2型酶标仪(美国BioTek公司)、DYY-6C型电泳仪(美国Bio-Rad公司)、UVP ChemStudio PLUS型显影仪(德国Analytikjena公司)、D1008E型八联管离心机(美国Scilogex公司)、Colibri 1400301型核酸蛋白定量仪(德国Titertek Berthold公司)、Cycler 720型PCR扩增仪(美国Thermal公司)、LightCycler96型Real-time PCR仪(美国Roche公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 将BV2细胞、SH-SY5Y细胞分别接种DMEM完全培养基中(37℃、5% CO₂恒温培养箱)培养。待细胞生长至80%时,用0.2% EDTA-胰酶消化传代。

2.2 BHT药液制备 姜半夏12 g、厚朴9 g、茯苓12 g、生姜15 g、紫苏叶6 g加入10倍水浸泡0.5 h,煎煮1 h后过滤,再加入8倍水煎煮,浓缩后冻干,冻干率为15.9%,临用前用无菌水溶解成1 g·mL⁻¹(1 g冻干粉相当于6.27 g生药量),分装后-20℃保存。

2.3 细胞模型建立

2.3.1 BV2细胞炎症模型建立 将BV2细胞以1×10⁵个/mL用含有DMEM完全培养基接种于96孔板或者6孔板中,培养24 h后,加入100 μg·L⁻¹的LPS溶液,继续培养24 h后,造模完成^[15]。

2.3.2 SH-SY5Y细胞损伤模型建立 将SH-SY5Y细胞以1×10⁵个/mL用含有DMEM完全培养基接种于96孔板或者6孔板中,培养24 h后,与LPS诱导BV2细胞炎症培养基(LPS-DMEM)共培养24 h后,造模完成^[16]。

2.4 CCK-8法检测细胞活力 将细胞接种到96孔板中,每孔约100 μL细胞悬液,37℃培养箱中培养24 h后,加入培养基与BHT药液制备不同质量浓度给药组(0、1、2、5、10、20、40、80、160、320、700 g·L⁻¹)培养24 h,配制含10% CCK-8的培养基,每孔加入100 μL,混匀后置于培养箱中1 h,使用酶标仪测定在450 nm的吸光度A,按以下公式计算各组细胞成活率。细胞成活率=(实验孔A-对照孔A)/(对照孔A-空白孔A)×100%。

2.5 Griess法测定BV2产生NO的含量 将BV2细胞以2×10⁵个/mL接种于96孔板中,造模后,分别给予空白组、模型组、给药组处理24 h,收集50 μL上清液加入96孔板,加入试剂Griess Reagent I 50 μL后加入Griess Reagent II 50 μL,使用酶标仪在540 nm下测定A。

2.6 ELISA检测TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的含量 将BV2细胞以1×10⁵个/mL接种于6孔板中,造模后,分别给予空白组(纯培养基)、模型组(100 μg·L⁻¹ LPS)、给药组(LPS+1 g·L⁻¹ BHT、LPS+2 g·L⁻¹ BHT、LPS+5 g·L⁻¹ BHT、LPS+10 g·L⁻¹ BHT)处理24 h,收集上清,使用ELISA试剂盒,根据说明书检测上清液中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的含量。

2.7 Real-time PCR测定TNF- α 、IL-1 β 、IL-4、iNOS、IL-10 mRNA表达 BV2细胞以1×10⁵个/mL

接种于6孔板中,造模后,按2.5项下分组给药处理24 h,用RNAex提取总RNA,按照Evo-M-MLV反转录试剂盒操作,cDNA使用SYBR Green Pro HS染

料和特异性引物通过PCR扩增,条件为95 °C变性20 s,60 °C延伸30 s,45个循环,数据分析使用如下 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算,引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	上游序列	下游序列	长度/bp
TNF- α	5'-ATGTCTCAGCCTCTTCTCATT-3'	5'-GCTTGTCACCTCGAATTTGAGA-3'	179
IL-1 β	5'-TGGTGTGTGACGTTCCATT-3'	5'-CAGCACGAGGGTTTTTGTG-3'	71
IL-4	5'-TGAATGACTGGAGGAGCTGAGACC-3'	5'-CGGAGTGGCGACATCGTACATAAC-3'	90
IL-10	5'-GCTCTTACTGACTGGCATGAG-3'	5'-CGCAGCTCTAGGAGCATGTG-3'	105
iNOS	5'-GGGCTGTCACGGAGATCAATG-3'	5'-GCCCGGTACTCATTCTGCATG-3'	121
18S	5'-AGTTCCAGCACATTTTGCAG-3'	5'-TCATCCTCCGTGAGTTCTCCA-3'	166

2.8 蛋白免疫印迹法 (Western blot)测定相关蛋白表达水平 BV2、SH-SY5Y细胞分别以 1×10^5 个/mL接种于6孔板中,分组给药处理24 h,去除培养液,加入RIPA裂解液收集蛋白,BCA法测定蛋白定量后,制样。根据蛋白分子量采用8% SDS-PAGE胶进行分离,蛋白上样量为20 μ L,转至PVDF膜上。使用5%脱脂奶粉封闭1 h, BV2细胞的PVDF膜分别孵育STAT3、JAK2、Akt、NF- κ B p65、I κ B α (1:2 000), SH-SY5Y细胞的PVDF膜分别孵育Bax、Bcl-2 (1:2 000) 4 °C孵育过夜。在室温下分别与相应二抗(1:2 000)室温孵育1 h,使用ECL超敏化学发光试剂盒和成像仪进行成像,并用Vision Works软件对条带进行灰度分析。

2.9 统计学分析 采用GraphPad Prism 8.0软件对实验数据进行组间与组内的差异比较,使用单因素方差分析比较组间差异, $P < 0.05$ 表示差异有明显统计学意义。

3 结果

3.1 对BV2、SH-SY5Y细胞活力的影响 BV2细胞在处理时间为12 h和24 h质量浓度为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上的BHT都产生一定毒性,且细胞存活率 $< 50\%$ 。对于SH-SY5Y细胞, $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上的BHT均能对SH-SY5Y细胞产生毒性。BHT对于BV2细胞和SH-SY5Y细胞处理时间在24 h存活率较高,综合结果故选择BHT为质量浓度在 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下,药物作用时间为24 h作为后续实验的给药条件。见表2。

表2 BHT对BV2细胞、SH-SY5Y细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of BHT on cell viability of BHT on BV2 cells, SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

%

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	BV2细胞存活率		SH-SY5Y细胞存活率	
		12 h	24 h	12 h	24 h
空白组		100.04 \pm 4.06	99.97 \pm 5.04	100.00 \pm 8.03	100.00 \pm 3.28
BHT组	1	125.72 \pm 22.46	96.62 \pm 3.70	92.95 \pm 4.43	87.71 \pm 1.69
	2	97.90 \pm 5.26	85.85 \pm 11.79	90.07 \pm 1.80	85.00 \pm 3.01
	5	117.13 \pm 11.03	106.94 \pm 9.27	92.58 \pm 1.84	98.59 \pm 5.36
	10	38.30 \pm 1.48 ¹⁾	25.06 \pm 0.50 ¹⁾	78.65 \pm 1.87 ¹⁾	78.01 \pm 3.56
	20	38.12 \pm 1.62 ¹⁾	23.38 \pm 0.25 ¹⁾	73.95 \pm 3.31 ¹⁾	73.61 \pm 4.38 ¹⁾
	40	36.64 \pm 1.67 ¹⁾	21.91 \pm 1.70 ¹⁾	45.94 \pm 3.24 ¹⁾	57.38 \pm 3.70 ¹⁾
	80	44.79 \pm 1.89 ¹⁾	20.41 \pm 0.45 ¹⁾	24.23 \pm 1.13 ¹⁾	27.06 \pm 0.77 ¹⁾
	160	38.12 \pm 1.62 ¹⁾	25.46 \pm 0.96 ¹⁾	33.39 \pm 0.32 ¹⁾	21.06 \pm 1.30 ¹⁾
	320	36.63 \pm 1.67 ¹⁾	29.74 \pm 0.30 ¹⁾	33.01 \pm 0.45 ¹⁾	17.75 \pm 1.00 ¹⁾
700	30.34 \pm 0.40 ¹⁾	25.53 \pm 0.45 ¹⁾	28.98 \pm 0.79 ¹⁾	16.23 \pm 0.11 ¹⁾	

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$

3.2 不同质量浓度BHT对LPS诱导BV2细胞炎症的影响

3.2.1 对LPS诱导BV2细胞分泌NO、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的影响

与空白组比较,模型组能显著增加

BV2细胞NO、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 促炎细胞因子的含量($P<0.01$);与模型组比较,给药组能降低NO产生率,降低IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量($P<0.01$)。见表3。

表3 BHT对LPS诱导BV2细胞分泌NO、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of BHT on NO, IL-1 β , IL-6 and TNF- α secretion in LPS stimulated BV2 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	NO/%	IL-1 β /μg·L ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹	TNF- α /μg·L ⁻¹
空白组		45.14±10.37	59.15±1.97	84.34±6.81	111.70±2.56
模型组		100.00±16.60 ¹⁾	103.65±8.40 ¹⁾	137.47±4.56 ¹⁾	173.54±14.54 ^{1,2)}
BHT组	1	66.51±14.92 ^{1,2)}	70.81±2.28 ²⁾	89.50±6.37 ²⁾	129.62±2.02 ^{1,2)}
	2	37.76±10.89 ²⁾	56.08±1.72 ²⁾	87.68±5.82 ²⁾	124.03±5.24 ^{1,2)}
	5	26.83±7.08 ¹⁾	46.28±1.46 ²⁾	81.74±4.94 ²⁾	118.38±11.96 ²⁾
	10	36.15±6.79 ²⁾	54.02±2.04 ²⁾	90.83±6.11 ²⁾	131.05±1.27 ^{1,2)}

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$ (表4-表7同)

3.2.2 对LPS诱导BV2细胞中IL-1 β 、IL-4、TNF- α 、iNOS、IL-10 mRNA表达的影响

与空白组比较,经LPS诱导BV2细胞的IL-1 β 、TNF- α 、iNOS mRNA表达显著增加,IL-4、IL-10 mRNA表达显著下降

($P<0.01$);与模型组比较,给药组显著降低IL-1 β 、TNF- α 、iNOS mRNA表达($P<0.01$),显著升高IL-4、IL-10 mRNA表达($P<0.01$),且质量浓度为5 g·L⁻¹作用效果最好。见表4。

表4 BHT对LPS诱导BV2细胞中IL-1 β 、IL-4、TNF- α 、iNOS、IL-10 mRNA的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of BHT on IL-1 β , IL-4, TNF- α , iNOS and IL-10 mRNA in LPS stimulated BV2 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	IL-1 β	IL-4	TNF- α	iNOS	IL-10
空白组		1.00±0.05	1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.02
模型组		9.69±0.06 ¹⁾	0.56±0.05 ¹⁾	2.71±0.17 ¹⁾	11.34±0.01 ¹⁾	0.42±0.01
BHT组	1	6.60±0.44 ^{1,2)}	1.11±0.06 ²⁾	1.81±0.02 ^{1,2)}	8.34±0.04 ^{1,2)}	2.92±0.06 ^{1,2)}
	2	4.10±0.15 ^{1,2)}	1.20±0.06 ²⁾	1.65±0.21 ^{1,2)}	8.11±0.06 ^{1,2)}	3.53±0.07 ^{1,2)}
	5	1.67±0.13 ²⁾	3.39±0.15 ^{1,2)}	1.32±0.15 ²⁾	5.80±0.19 ^{1,2)}	6.11±0.12 ^{1,2)}
	10	7.26±0.02 ^{1,2)}	2.73±0.17 ^{1,2)}	2.20±0.17 ¹⁾	9.07±0.03 ^{1,2)}	2.68±0.18 ^{1,2)}

3.2.3 对LPS诱导BV2细胞中炎症信号通路蛋白表达的影响

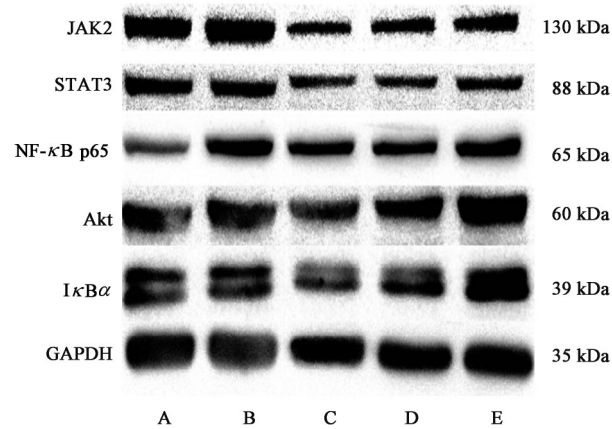
与空白组比较,模型组NF- κ B p65、Akt、I κ B α 蛋白表达量显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,给药组NF- κ B p65、Akt、I κ B α 相关蛋白显著降低($P<0.01$)。此外,本实验还探索了NF- κ B下游

JAK2/STAT3通路。与空白组比较,模型组JAK2、STAT3蛋白表达量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组均能显著降低JAK2、STAT3蛋白表达($P<0.01$),且5 g·L⁻¹作用效果最明显。见表5和图1。

表5 BHT对LPS诱导BV2细胞中JAK2、STAT3、NF- κ B p65、Akt、I κ B α 蛋白表达影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of BHT on JAK2, STAT3, NF- κ B p65, Akt, I κ B α proteins expression in LPS stimulated BV2 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	JAK2/GAPDH	STAT3/GAPDH	NF- κ B p65/GAPDH	Akt/GAPDH	I κ B α /GAPDH
空白组		0.63±0.02	0.46±0.02	0.32±0.01	0.72±0.02	0.68±0.07
模型组		1.00±0.07 ¹⁾	0.59±0.02 ¹⁾	0.69±0.58 ¹⁾	0.89±0.01	0.83±0.04
BHT组	1	0.50±0.01 ²⁾	0.43±0.04 ²⁾	0.59±0.01 ²⁾	0.82±0.12	0.82±0.07 ²⁾
	2	0.46±0.01 ²⁾	0.35±0.01 ²⁾	0.53±0.01 ²⁾	0.57±0.13 ²⁾	0.55±0.02 ²⁾
	5	0.41±0.01 ²⁾	0.32±0.01 ²⁾	0.48±0.01 ²⁾	0.49±0.02 ²⁾	0.47±0.04 ²⁾



注: A. 空白组; B. 模型组; C. BHT 5 g·L⁻¹组; D. BHT 2 g·L⁻¹组; E. BHT 1 g·L⁻¹组(图2同)

图1 各组BV2细胞中JAK2、STAT3、NF-κB p65、Akt、IκBα蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of JAK2, STAT3, NF-κB p65, Akt, IκBα proteins expression in BV2 cells of each groups

3.3 不同浓度BHT对LPS-DMEM诱导SH-SY5Y细胞凋亡的影响

3.3.1 对LPS-DMEM诱导SH-SY5Y细胞活性的影响 与空白组比较, SH-SY5Y细胞经LPS-DMEM共培养后细胞活力下降, 与模型组比较, 各给药组均能提高细胞活性, 表明给药组能不同程度减低造模诱导的细胞凋亡, 且在质量浓度为1、2、5 g·L⁻¹均能达到较好的治疗效果。见表6。

表6 BHT对LPS-DMEM诱导SH-SY5Y细胞活性的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of BHT on activity of SH-SY5Y cells induced by LPS-DMEM ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	细胞存活率/%
空白组		100.00±0.03
模型组		51.91±0.13 ¹⁾
BHT组	1	108.47±0.17 ²⁾
	2	112.38±0.63 ^{1,2)}
	5	102.79±0.03 ²⁾
	10	69.61±0.27 ¹⁾

3.3.2 对LPS-DMEM诱导SH-SY5Y细胞Bcl-2、Bax蛋白的影响 与空白组比较, 模型组的Bax蛋白表达量增加, Bcl-2蛋白表达显著降低($P<0.01$), 表明LPS-DMEM共培养能诱导SH-SY5Y细胞凋亡。与模型组比较, 给药组均能抑制Bax蛋白表达量, 显著增加Bcl-2蛋白表达量($P<0.01$)。实验表明BHT可能通过抑制凋亡蛋白对LPS-DMEM共培养后SH-SY5Y细胞发挥保护作用。见图2和表7。

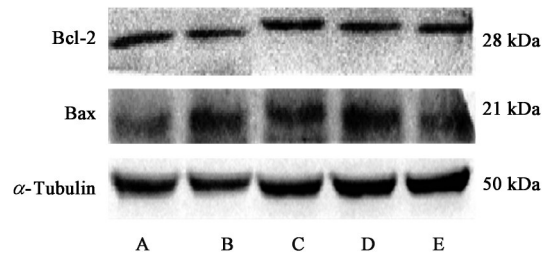


图2 各组SH-SY5Y细胞Bcl-2、Bax蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Bcl-2, Bax proteins expression in SH-SY5Y cells of each groups

表7 BHT对LPS-DMEM诱导SH-SY5Y细胞Bcl-2、Bax蛋白的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of BHT on Bcl-2, Bax proteins expression in LPS-DMEM stimulated SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	Bcl-2/α-Tubulin	Bax/α-Tubulin
空白组		0.31±0.02	0.30±0.01
模型组		0.28±0.01	0.52±0.03 ¹⁾
BHT组	1	0.35±0.01 ²⁾	0.31±0.03 ²⁾
	2	0.35±0.01 ²⁾	0.37±0.03 ²⁾
	5	0.39±0.02 ¹⁾	0.35±0.02 ²⁾

4 讨论

在半夏厚朴汤中, 半夏提取物能抑制中枢神经系统, 具有一定的抗炎抗菌功效^[17]; 厚朴能下调NF-κB p65磷酸化的水平发挥明显的抗炎活性^[18], 并能促进小鼠海马神经元再生发挥抗抑郁作功效^[19-20]; 茯苓能通过下调iNOS和COX-2的表达, 抑制NO和PGE₂的生成产生抗炎作用^[21]; 紫苏叶可通过降低炎症因子的水平发挥神经保护作用, 并通过抗炎作用改善小鼠抑郁样行为^[22]。方中药物大多具有抗炎作用, 厚朴和紫苏叶还具有神经保护作用。炎症反应和神经元凋亡在多种神经系统性疾病中具有重要作用^[23]。因此, 本实验开展关于半夏厚朴汤治疗经LPS诱导的神经细胞炎症反应及其机制的探究。

小胶质细胞介导的神经炎症在许多神经性疾病发挥重要作用^[20], 因此本实验使用LPS诱导BV2细胞作为炎症模型评估BHT在抑制炎症的疗效。实验表明, BHT能降低LPS处理后BV2细胞内及分泌的TNF-α、IL-1β等促炎因子的表达, 增加IL-4、IL-10等抗炎因子的表达, 在BV2神经炎症模型中具有显著的抗炎作用。LPS可以激活关键的核转录因子NF-κB, 通过蛋白免疫印迹结果, LPS诱导Akt表达显著增加, 并增加NF-κB信号通路中NF-κB p65及IκBα的表达水平, 诱导IL-1β分泌, 促进JAK2/STAT3信号通路的激活。BHT能抑制LPS诱

导 BV2 细胞导致 JAK2、STAT3、NF- κ B p65、Akt、I κ B α 相关蛋白的增加,表明 BHT 能通过抑制 Akt/NF- κ B/JAK2/STAT3 信号通路发挥抗炎作用,抑制 BV2 细胞的神经炎症反应。病理性中枢神经系统疾病,例如脑炎症、脑缺血、抑郁症等都与神经炎症密不可分^[24]。Akt 通路是神经元存活的重要通路之一^[25-26],Akt 被完全激活后,糖原合成酶激酶-3 (GSK-3) 促进小胶质细胞的迁移和炎症活化^[27],经由 NF- κ B 诱导 BV2 细胞产生促炎细胞因子和 NO^[28-29]。NF- κ B 蛋白通过促进小胶质细胞 M1 表型活化,增加细胞促炎因子水平,JAK/STAT 通路是细胞因子主要信号通路之一,该通路对于最终导致免疫反应和炎症至关重要^[30]。JAK/STAT 通路中的差异性表达,对神经炎症疾病具有病理学意义^[31]。此外,炎症反应也能促进乙酰胆碱、去甲肾上腺素、多巴胺等神经递质导致神经细胞凋亡^[29]。本实验结果表明 BHT 可通过调节 Akt/NF- κ B/JAK2/STAT3 信号通路抑制小胶质细胞神经炎症反应。

过度激活的小胶质细胞可释放过量的炎症因子,诱导神经元凋亡。为了研究小胶质细胞炎症反应发生后,BHT 能否发挥神经保护作用,抑制 SH-SY5Y 细胞凋亡,本实验使用了 LPS-DMEM 与 SH-SY5Y 细胞共培养系统。实验结果表明,当 SH-SY5Y 细胞与经 LPS-DMEM 共培养 24 h 后,SH-SY5Y 细胞大量凋亡,而 BHT 可使 SH-SY5Y 细胞活力恢复至正常水平,与空白组比较差异无统计学意义。因此,BHT 具有保护神经元免受 LPS 诱导小胶质细胞产生的神经毒性的作用。

本实验表明 BHT 可通过抑制 BV2 细胞炎症反应,并对 SH-SY5Y 细胞具有神经保护作用,但 BHT 能否在体内发挥抑制神经炎症,发挥神经保护作用仍需要通过动物模型进行验证,同时鉴于中药复方成分复杂,未来可进一步探索半夏厚朴汤治疗神经炎症的药效物质基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] LENG F, EDISON P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: Where do we go from here? [J]. *Nat Rev Neurol*, 2021, 17(3): 157-172.
- [2] HOWREN M B, LAMKIN D M, SULS J. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: A meta-analysis [J]. *Psychosom Med*, 2009, 71(2): 171-186.
- [3] KIM Y K, NA K S, SHIN K H, et al. Cytokine imbalance in the pathophysiology of major depressive disorder [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2007, 31(5): 1044-1053.
- [4] SPANGENBERG E E, GREEN K N. Inflammation in Alzheimer's disease: Lessons learned from microglia-depletion models [J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 61: 1-11.
- [5] MARTIN E, BOUCHER C, FONTAINE B, et al. Distinct inflammatory phenotypes of microglia and monocyte-derived macrophages in Alzheimer's disease models: Effects of aging and amyloid pathology [J]. *Aging Cell*, 2017, 16(1): 27-38.
- [6] HANISCH U K, KETTENMANN H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain [J]. *Nat Neurosci*, 2007, 10(11): 1387-1394.
- [7] TAMBUYZER B R, PONSARTS P, NOUWEN E J. Microglia: Gatekeepers of central nervous system immunology [J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 85(3): 352-370.
- [8] LEHNARDT S, MASSILLON L, FOLLETT P, et al. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(14): 8514-8519.
- [9] HE P, YAN S, ZHENG J, et al. Eriodictyol attenuates LPS-induced neuroinflammation, amyloidogenesis, and cognitive impairments via the inhibition of NF- κ B in Male C57BL/6J mice and BV2 microglial cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(39): 10205-10214.
- [10] MAMIK M K, POWER C. Inflammasomes in neurological diseases: Emerging pathogenic and therapeutic concepts [J]. *Brain*, 2017, 140(9): 2273-2285.
- [11] FAKHRI S, ABBASZADEH F, DARGAHI L, et al. Astaxanthin: A mechanistic review on its biological activities and health benefits [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 136: 1-20.
- [12] SHABAB T, KHANABDALI R, MOGHADAMTOUSI S Z, et al. Neuroinflammation pathways: A general review [J]. *Int J Neurosci*, 2017, 127(7): 624-633.
- [13] 程林江, 兰敬昀, 于涛, 等. 半夏厚朴汤对慢性应激抑郁模型大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响 [J]. *中医药信息*, 2009, 26(4): 45-46.
- [14] JIA K K, ZHENG Y J, ZHANG Y X, et al. Banxiahoupu decoction restores glucose intolerance in CUMS rats through improvement of insulin signaling and suppression of NLRP3 inflammasome activation in

- liver and brain [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 209: 219-229.
- [15] YAN A, LIU Z, SONG L, et al. Idebenone alleviates neuroinflammation and modulates microglial polarization in LPS-stimulated BV2 cells and MPTP-induced Parkinson's disease mice [J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 529.
- [16] SHIH Y T, CHEN I J, WU Y C, et al. San-Huang-Xie-Xin-Tang protects against activated microglia- and 6-OHDA-induced toxicity in neuronal SH-SY5Y cells [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011, 2011: 429384.
- [17] 张明发, 沈雅琴. 半夏提取物抗菌抗炎及其抗肿瘤药理作用研究进展[J]. *抗感染药学*, 2017, 14(6): 1089-1094.
- [18] 符吴萸. 厚朴酚的免疫抗炎作用及其对相关信号转导通路的调控[D]. 广州: 广东药科大学, 2016.
- [19] 黄世敬, 陈宇霞, 张颖. 厚朴治疗抑郁症及抗抑郁机理探讨[J]. *世界中西医结合杂志*, 2015, 10(7): 1023-1026.
- [20] 傅强, 马占强, 杨文, 等. 厚朴酚对慢性温和刺激所致抑郁小鼠的抗抑郁作用研究[J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(2): 47-51.
- [21] 王悦, 田双双, 刘晓谦, 等. 茯苓多糖的提取、结构及药理作用研究进展[J]. *世界中医药*, 2021, 16(17): 2548-2555.
- [22] XU L, LI Y, FU Q, et al. Perillaldehyde attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury-triggered overexpression of inflammatory cytokines via modulating Akt/JNK pathway in the rat brain cortex [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 454(1): 65-70.
- [23] 邹龔, 杜源, 傅风华. 解郁安神颗粒对卒中后抑郁小鼠模型的抗抑郁作用[J]. *医药导报*, 2019, 38(1): 22-26.
- [24] O'SHEA J J, PLENGE R. JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease[J]. *Immunity*, 2012, 36(4): 542-550.
- [25] ZHANG F, JIANG L. Neuroinflammation in Alzheimer's disease [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2015, 11: 243-256.
- [26] TU X K, ZHANG H B, SHI S S, et al. 5-LOX inhibitor zileuton reduces inflammatory reaction and ischemic brain damage through the activation of PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(10): 2779-2787.
- [27] YUSKAITIS C J, JOPE R S. Glycogen synthase kinase-3 regulates microglial migration, inflammation, and inflammation-induced neurotoxicity [J]. *Cell Signal*, 2009, 21(2): 264-273.
- [28] WANG M J, HUANG H Y, CHEN W F, et al. Glycogen synthase kinase-3 β inactivation inhibits tumor necrosis factor- α production in microglia by modulating nuclear factor κ B and MLK3/JNK signaling cascades [J]. *J Neuroinflammation*, 2010, 7: 99.
- [29] HUANG W C, LIN Y S, WANG C Y, et al. Glycogen synthase kinase-3 negatively regulates anti-inflammatory interleukin-10 for lipopolysaccharide-induced iNOS/NO biosynthesis and RANTES production in microglial cells [J]. *Immunology*, 2009, 128(1 Suppl): e275-e286.
- [30] O&APOS J J, SHEA J J, SCHWARTZ D M, et al. The JAK-STAT pathway: Impact on human disease and therapeutic intervention [J]. *Annu Rev Med*, 2015, 66: 311-328.
- [31] BENVENISTE E N, LIU Y, MCFARLAND B C, et al. Involvement of the janus kinase/signal transducer and activator of transcription signaling pathway in multiple sclerosis and the animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2014, 34(8): 577-588.

[责任编辑 周冰冰]