

黄连解毒汤对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 HT22 细胞 NF- κ B 活化及炎症因子水平的影响

张茹兰¹, 黄秀芳², 陶彦谷², 李建军¹, 黄启辉^{1*}

(1. 中山大学孙逸仙纪念医院, 广州 510300; 2. 广州中医药大学, 广州 510080)

[摘要] 目的:探讨黄连解毒汤对 β -淀粉样蛋白₂₅₋₃₅ (β -amyloid protein 25-35, $A\beta_{25-35}$) 诱导的 HT22 细胞核转录因子- κ B (NF- κ B) 活化及炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β), IL-6, 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的影响。方法:培养 HT22 细胞, HT22 细胞分为空白组、模型组、多奈哌齐组 (0.000 9 g·kg⁻¹) 和黄连解毒汤低、高剂量组 (2.7, 8.1 g·kg⁻¹), 空白组、模型组加入空白血清, 各药物组分别加入含药血清 1 h 后, 模型组和各药物组细胞分别加入 $A\beta_{25-35}$ (40 μ mol·L⁻¹), 24 h 后运用蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 p-NF- κ B p65 表达水平; 免疫荧光法检测分析各组 NF- κ B p65 核移位情况; 用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测 IL-1 β , IL-6, TNF- α 蛋白含量及实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 检测 IL-1 β , IL-6, TNF- α mRNA 的表达情况。结果:与空白组比较, 模型组的 IL-1 β , IL-6, TNF- α 蛋白分泌及其 mRNA 表达增多, NF- κ B 活化水平增高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 黄连解毒汤低、高剂量组及多奈哌齐组的炎症因子及 mRNA 表达量均减低 ($P < 0.05$), 并且能抑制 NF- κ B 活化。结论:黄连解毒汤可降低 $A\beta_{25-35}$ 诱导 HT22 细胞炎症反应, 从而减轻 $A\beta_{25-35}$ 神经毒性作用, 作用机制可能与抑制 NF- κ B 活化有关。

[关键词] 阿尔茨海默病; β 淀粉样蛋白; 黄连解毒汤; 核转录因子- κ B (NF- κ B); 炎症因子

[中图分类号] R22; R24; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)13-0159-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181331

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180416.1700.002.html>

[网络出版时间] 2018-04-17 9:49

Effect of Huanglian Jiedutang on $A\beta_{25-35}$ -induced Activation of NF- κ B and Level of Inflammatory Factor in HT22 Cells

ZHANG Ru-lan¹, HUANG Xiu-fang², TAO Yan-gu², LI Jian-jun¹, HUANG Qi-hui^{1*}

(1. Sun Yat-Sen memory hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510300, China;

2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510080, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Huanglian Jiedutang on the activation of nuclear transcription factor κ B (NF- κ B) and the level of inflammatory factors including interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) of HT22 cells induced by β -amyloid protein 25-35 ($A\beta_{25-35}$). **Method:** The HT22 cells were cultured and divided into five groups: blank group, model group, donepezil-treated group (0.000 9 g·kg⁻¹) and low and high doses Huanglian Jiedutang-treated groups (2.7, 8.1 g·kg⁻¹). The HT22 cells in blank group and model group were treated with blank serum and various treatment groups were treated with corresponding drug-serum and cultured for 1 h, following the incubation with 40 μ mol·L⁻¹ $A\beta_{25-35}$ for 24 h in model group and treatment groups. Then the protein expression level of p-NF- κ B p65 was detected by Western blot. Nuclear translocation of NF- κ B p65 was determined by immunofluorescence assay. The protein expression and mRNA expression levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α were respectively detected by enzyme-linked immunosorbent

[收稿日期] 20180123(022)

[基金项目] 广东省中医药局科研项目(20171065)

[第一作者] 张茹兰,在读硕士,从事中西医结合防治老年病研究, E-mail: zhangrulan1992@163.com

[通信作者] * 黄启辉, 硕士, 副教授, 从事中西医结合防治老年病研究, E-mail: hqhui84181833@sina.com

assay (ELISA) and real time fluorescence quantification polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** As compared with the blank group, the protein and mRNA expression levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α and the activation level of NF- κ B were increased in the model group ($P < 0.05$). As compared with the model group, low and high dose Huanglian Jiedutang and donepezil could decrease the inflammatory factors and mRNA expression levels ($P < 0.05$) and inhibit NF- κ B activation. **Conclusion:** Huanglian Jiedutang may reduce the $A\beta_{25-35}$ -induced HT22 cells inflammatory response and relieve $A\beta_{25-35}$ neurotoxicity, which may be related to inhibiting the activation of NF- κ B.

[**Key words**] Alzheimer's disease; β -amyloid; Huanglian Jiedutang; nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B); inflammatory factor

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是以记忆丧失和认知障碍为特征的中枢退行性疾病, 是痴呆症中最常见的一种形式。AD 的病理特征是细胞外 $A\beta$ 沉积形成老年斑和细胞内过度磷酸化的 tau 蛋白组成神经原纤维缠结 (NFTS)^[1]。 β -淀粉样蛋白 ($A\beta$) 是引起 AD 触发机制的关键^[2]。 $A\beta_{25-35}$ 是 $A\beta$ 其中的毒性片段之一, 对体外培养及在体的神经细胞均具有毒性作用^[3]。 $A\beta_{25-35}$ 可通过 NF- κ B 途径刺激神经元和小胶质细胞产生促炎细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素 (IL)-1 β , IL-6 等, 慢性神经炎症使 β 淀粉样前体蛋白和 β 分泌酶的表达上调, 使 $A\beta$ 增加和沉积加快, 引起神经元细胞功能缺失或引起凋亡, 使神经系统功能减退^[4]。核转录因子- κ B (NF- κ B) 由异二聚体 p65 和 p50 亚基组成, 以非活性的形式存在细胞质中, 在 $A\beta_{25-35}$ 刺激下, 亚基 p65 可发生磷酸化解离进入细胞核, 随后激活细胞防御程序引起炎症因子分泌^[5], 抑制 NF- κ B 活化可改善神经炎症^[6-7]。因此, 抑制 $A\beta_{25-35}$ 引起神经炎症对神经细胞的毒性作用的激活途径可能会发挥治疗 AD 的重要作用。

黄连解毒汤是清热解毒法的代表方剂, 能有效抑制一些疾病过程的炎症反应。目前已由研究表明, 黄连解毒汤可中和 LPS 导致的脓毒症, 降低脂多糖 LPS 诱导的 IL-6 和 TNF- α 的释放, 保护人体重要脏器^[8]。邱昕等^[9] 研究表明黄连解毒汤可降低 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠脑组织自由基及 IL-6, IL-1 β 含量。而其对 AD 的抗炎作用及其作用机制有待进一步研究。HT22 细胞系是小鼠海马神经元细胞系, 具有神经元的基本特性^[10], 故选用 HT22 细胞作为细胞工具进行研究。多奈哌齐为乙酰胆碱酯酶抑制剂, 可通过抗炎发挥神经保护作用^[11], 为临床治疗 AD 常用药物, 故选用多奈哌齐作为阳性药物。本实验通过研究黄连解毒汤对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 HT22 细胞 NF- κ B 活性及炎症因子的水平的影响,

为黄连解毒汤防治 AD 及其在 AD 的发病机制中的作用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物及细胞 SPF 级雄性 SD 大鼠 (3 月龄) 40 只, 体质量 (200 \pm 20) g, 购自中山大学实验动物中心, 在中山大学实验动物中心 (清洁级) 饲养, 实验动物合格证号 SCXK (粤) 2004-0011, 本实验经过中山大学实验动物伦理委员会批准, 符合实验动物伦理委员会指导原则。HT22 细胞购于中山大学孙逸仙纪念医院实验室。

1.2 药物及试剂 黄连解毒汤由黄连 9 g, 黄芩 6 g, 黄柏 6 g, 栀子 9 g 组成, 中山大学孙逸仙纪念医院中药制剂中心提供 (批号分别为 20110802, 20110413, 20110616, 20110919), 经中山大学孙逸仙纪念医院黄启辉教授鉴定, 符合 2015 版《中国药典》规定。按处方量称取药材, 用蒸馏水煎煮中药, 水煎液浓缩至 1:2 (mL:g) 时停止煎煮, 待药液放冷后, 边搅拌边缓慢加入乙醇使含醇量达 50%, 静置 48 h, 滤取上清液, 回收乙醇, 用蒸馏水配制提取液生药质量浓度 6.48 g \cdot mL⁻¹; 盐酸多奈哌齐 (卫材中国药业有限公司, 批号 100801053), 将多奈哌齐用蒸馏水稀释成 0.09 g \cdot L⁻¹; DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶 (0.25%) (美国 Gibco 公司, 批号分别为 1181947, 1862835, 1320590); 磷酸盐缓冲液 (PBS, 北京索莱宝科技有限公司, 批号 20110725); Hoechst 33342 染色液 (上海碧云天公司, 批号 C0003); IL-1 β , IL-6, TNF- α 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (中国 R&D 公司, 批号分别为 96400025, 964001910, 964001920); $A\beta_{25-35}$, 二甲基亚砜 (DMSO) (美国 Sigma 公司, 批号分别为 094M4822V, 090M01549V); β -肌动蛋白 (β -actin), p-NF- κ B p65 抗体 (美国 Proteintech 公司, 批号分别为 20536-1-AP, 10745-1-AP); RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、扩增试剂盒 (日本 Takara 公司, 批号分

别为 A1605A, AK2501, A1903A); PCR 引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.3 动物及含药血清制备 随机分为空白组、模型组、多奈哌齐组、黄连解毒汤低、高剂量组, 每组 8 只, 用药剂量按动物体表面积比率换算等剂量法^[12], 黄连解毒汤低、高剂量组分别以成人等效剂量的 1 倍, 3 倍喂服大鼠, 即用黄连解毒汤提取液分别以低剂量(生药 2.7 g·kg⁻¹), 高剂量(生药 8.1 g·kg⁻¹)灌胃(将 6.48 g·mL⁻¹黄连解毒提取液用蒸馏水分别稀释为 0.27, 0.81 g·mL⁻¹溶液), 多奈哌齐组用 0.09 g·L⁻¹多奈哌齐溶液灌胃, 空白组、模型组大鼠用蒸馏水灌胃, 各组大鼠每只每次灌胃 2 mL, 1 次/d, 连续 7 d。最后 1 次给药 3 h 后腹主动脉穿刺取血, 3 500 r·min⁻¹离心 5 min, 取上清, 除菌, 灭活, -20 °C 贮存备用。

1.4 仪器 Galaxy 170 S 型 CO₂ 细胞培养箱(德国 Eppendorf 公司), 2720 型 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司), Reader M3 型多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司), HWS-12 型电热恒温水浴锅(上海一恒公司), GCZX3 型垂直电泳仪、转膜仪(美国 Becton 公司), SW-CJ-1F 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)。

2 方法

2.1 HT22 的培养 在 37 °C 5% CO₂ 的条件下, 在含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基中培养, 每 2 d 更换 1 次培养基。

2.2 Aβ₂₅₋₃₅ 和药物的作用 Aβ₂₅₋₃₅ 溶解于去离子水中, 用 0.22 μm 滤纸过滤, 在 37 °C 孵化器中孵育 7 d 后, 在 -20 °C 避光贮存。根据文献[13], 40 μmol·L⁻¹的 Aβ₂₅₋₃₅ 作用于 HT22 细胞 24 h 可作为较理想的 AD 细胞模型。HT22 细胞, 分为空白组、模型组, 多奈哌齐组, 黄连解毒汤低、高剂量药物组。培养 12 h 后, 空白组、模型组给予空白血清 200 μL, 多奈哌齐组加多奈哌齐血清 200 μL, 黄连解毒汤低、高剂量组分别加黄连解毒汤低、高剂量血清 200 μL。培养 1 h 后, 各治疗组和模型组再加 Aβ₂₅₋₃₅ 使其终浓度 40 μmol·L⁻¹ 孵育 24 h, 空白组加无血清 DMEM 培养液。

2.3 ELISA 检测细胞因子含量 取各组细胞以 9 × 10⁴ 个/孔接种于 6 孔板中培育 12 h, 每孔体积 200 μL, 药物和 Aβ₂₅₋₃₅ 处理后, 取各组细胞上清液, 1 500 r·min⁻¹, 4 °C 离心 10 min。严格按照试剂盒说明书进行 IL-1β, IL-6, TNF-α 蛋白表达的 ELISA 测定。

2.4 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测细胞因子 mRNA 表达 药物和 Aβ₂₅₋₃₅ 处理后, 取各组细胞 trizol 溶液提取总 RNA, 逆转录成 cDNA。将设计好的 IL-1β, IL-6, TNF-α 引物与 cDNA 结合进行 PCR。逆转录反应体系: 37 °C 反应 15 min, 85 °C 反应 5 s 至合成 cDNA 第 1 链。PCR 扩增参数为变性 95 °C, 1 min; 52 ~ 56 °C, PCR 反应 1 min; 延伸 72 °C 1 min, 为 40 循环。结果采用 2^{-ΔΔC_t} 法分析 mRNA 相对表达量, 实验重复 3 次。引物序列见表 1。

表 1 基因引物序列

Table 1 Primer sequences of relevant genes

基因	引物序列	片段长度 /bp
IL-1β	上游 5'-GCCAGTTGACTAGGATAAAGG-3'	156
	下游 5'-CAGTCTGTCTCTTCTTGAGG-3'	
IL-6	上游 5'-AAGAAAGACAAAGCCAGAGTC-3'	265
	下游 5'-CACAAACTGATATGCTTAGGC-3'	
TNF-α	上游 5'-TCAGCCTCTTCTCATTCTGTC-3'	203
	下游 5'-TTGCTGGTTTGTCTACGACCTG-3'	
β-actin	上游 5'-AGGGAAATCGTGCGTGACAT-3'	452
	下游 5'-CATCTGCTGGAAGGTGGACA-3'	

2.5 免疫荧光双标法检测 NF-κB p65 表达 HT22 细胞接种于密度为 4 × 10³ 细胞/孔的 24 孔板中, 培养 12 h, 加药和 Aβ₂₅₋₃₅ 处理方法同前, 细胞用预冷 PBS 洗 3 次, 在室温下用固定液处理 15 min 及用 1% TritonX-100 在室温下反应 5 min, 用 PBS 洗涤 3 次后在室温下用 10% 山羊血清在室温下孵育 30 min。然后用 NF-κB p65 抗体(1:100)溶于含 1% BSA 的 PBST(含 0.05 聚山梨酯-20 的 PBS)孵育 2 h, PBS 洗涤 3 次后, 用含 1% BSA 的 PBST 稀释二抗(1:200)(Alexa luor® 488 标记的 IgG)在室温下避光孵育细胞 1 h, PBS 洗涤 2 次后, 细胞核用 hoechst33342 溶液(5 g·mL⁻¹)复染避光 10 min。最后, 用 PBS 洗涤后运用荧光显微镜采集图像, 然后用 Image-Pro plus 软件分析图像, 计算荧光强度。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 p-NF-κB p65 蛋白表达 HT22 细胞培养密度为 10 × 10⁴ 个/孔, 6 孔板培养 12 h, 用药物及 Aβ₂₅₋₃₅ 处理后, 按照文献[14]方法提取蛋白, 行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳, 浓缩胶 90 V, 分离胶 120 V; 电转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, TBST(含 10 mmol·L⁻¹

Tris-HCl, 150 mmol · L⁻¹ NaCl, 0.5% Tween 20, pH 7.5) 洗涤 3 次, 各 5 min; 加 p-NF-κB p65 抗体 (1:2 000), β-actin (1:2 000), 4 °C 冰箱过夜; TBST 洗膜 3 次, 各 5 min; 加兔二抗 (1:2 000), 室温下 2 h; TBST 洗膜 3 次, 各 5 min; 滴加 ECL 发光液, GE 凝胶成像系统测量各目的条带灰度值, 计算目的蛋白灰度值与内参 β-actin 蛋白灰度值之比^[15]。

2.7 统计学处理 采用 SPSS 22.0 进行数据分析, 计量资料数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不同实验组的比较采用单因素方差分析, 组间的差异的多重比较采用

SNK 法, 检验水平取 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 HT22 细胞 IL-1β, IL-6, TNF-α 含量的影响
与空白组比较, 模型组 IL-1β, IL-6, TNF-α 含量均明显高于空白组 ($P < 0.05$); 各治疗组 IL-1β, IL-6, TNF-α 含量均明显低于模型组 ($P < 0.05$), 随着黄连解毒汤浓度增加, IL-1β, IL-6, TNF-α 含量逐渐下降, 且黄连解毒汤高剂量组低于多奈哌齐组的 IL-1β, IL-6, TNF-α 含量 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 黄连解毒汤对 HT22 细胞 IL-1β, IL-6, TNF-α 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g · kg ⁻¹	IL-1β	IL-6	TNF-α
空白	-	23.513 ± 18.615	131.141 ± 6.125	361.416 ± 71.612
模型	-	411.541 ± 3.414 ¹⁾	618.212 ± 6.512 ¹⁾	1 611.711 ± 65.439 ¹⁾
多奈哌齐	0.000 9	241.514 ± 9.561 ²⁾	518.153 ± 51.562 ²⁾	947.813 ± 83.696 ²⁾
黄连解毒汤	2.7	289.636 ± 3.575 ²⁾	616.410 ± 5.375 ²⁾	990.051 ± 631.525 ²⁾
	8.1	172.513 ± 9.612 ^{2,3)}	412.728 ± 5.261 ^{2,3)}	861.541 ± 78.514 ^{2,3)}

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$; 与多奈哌齐组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 3 同)。

3.2 对 HT22 细胞 IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA 表达的影响 不同实验组 IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA 表达有统计学差异 ($P < 0.05$)。其中, 模型组 IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA 表达均明显高于空白组 ($P < 0.05$); 各治疗组的 IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA 表达均低于模型组 ($P < 0.05$), 随着黄连解毒汤浓度增加, IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA 的表达量逐渐下降, 且黄连解毒汤高剂量组的 IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA 水平低于多奈哌齐组 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 黄连解毒汤对 HT22 细胞 IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 3 Effect of Huanglian Jiedutang on expression of IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA in HT22 cell ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g · kg ⁻¹	IL-1β	IL-6	TNF-α
空白	-	1.001 ± 0.025	1.001 ± 0.017	1.001 ± 0.063
模型	-	2.498 ± 0.102 ¹⁾	2.517 ± 0.019 ¹⁾	2.657 ± 0.016 ¹⁾
多奈哌齐	0.000 9	1.789 ± 0.044 ²⁾	1.905 ± 0.078 ²⁾	1.992 ± 0.081 ²⁾
黄连解毒汤	2.7	1.974 ± 0.571 ²⁾	1.971 ± 0.061 ²⁾	1.941 ± 0.572 ²⁾
	8.1	1.351 ± 0.052 ^{2,3)}	1.259 ± 0.057 ^{2,3)}	1.313 ± 0.018 ^{2,3)}

3.3 对 HT22 细胞 p-NF-κB p65 蛋白表达水平的影响 与空白组比较, 模型组 p-NF-κB p65 蛋白表达

明显增高 ($P < 0.01$); 多奈哌齐组、黄连解毒汤低、高剂量组同模型组比较, p-NF-κB p65 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$), 其中黄连解毒汤高剂量组较模型组蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), 表明黄连解毒汤可能是通过抑制 NF-κB p65 磷酸化进而抑制 NF-κB 信号通路的激活达到抑制 HT22 细胞炎症因子作用, 并呈剂量依赖性。见表 4 和图 1。

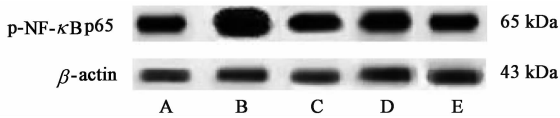
表 4 黄连解毒汤对 HT22 细胞 p-NF-κB p65 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 4 Effect of Huanglian Jiedutang on expression of p-NF-κB p65 in HT22 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g · kg ⁻¹	p-NF-κB p65/β-actin
空白	-	1.23 ± 0.03
模型	-	1.96 ± 0.01 ¹⁾
多奈哌齐	0.000 9	1.57 ± 0.04 ²⁾
黄连解毒汤	2.7	1.50 ± 0.06 ²⁾
	8.1	1.20 ± 0.03 ^{3,4)}

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$; 与多奈哌齐组比较⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.4 不同实验组 NF-κB p65 核移位情况 空白组中绿色荧光主要位于胞浆区, 基本上不进入蓝色核区, 而模型组中绿色荧光较多地进入蓝色核区, 致使核区显示绿色。说明加入 Aβ₂₅₋₃₅ 后可诱导 NF-κB



A. 空白组; B. 模型组; C. 多奈哌齐组; D. 黄连解毒汤 2.7 g·kg⁻¹ 组; E. 黄连解毒汤 8.1 g·kg⁻¹ 组 (图 2 同)

图 1 黄连解毒汤对 HT22 细胞 p-NF-κB p65 蛋白表达水平的影响
Fig. 1 Effect of Huanglian Jiedutang on expression of p-NF-κB p65 in HT22

p65 进入细胞核, 模型组细胞内的 NF-κB p65 核移位阳性率较空白组显著增高 ($P < 0.01$)。黄连解毒汤低、高剂量组与模型组相较, 仅有极少量绿色荧光位于胞核区, NF-κB p65 核移位阳性表达明显下降 ($P < 0.01$), 说明黄连解毒汤起可能通过抑制 NF-κB p65 核移位从而抑制 NF-κB 信号通路激活; 多奈哌齐组绿色荧光主要位于胞浆区, 有少量进入蓝色核区, 与黄连解毒汤高剂量组相较, 黄连解毒汤

高剂量组蓝色核区中的绿色荧光更少, 细胞内 NF-κB p65 核移位阳性率明显下降 ($P < 0.05$), 说明多奈哌齐亦可抑制 NF-κB p65 核移位, 但作用效果明显低于黄连解毒汤高剂量组。见表 5, 图 2。

表 5 黄连解毒汤对 HT22 细胞 NF-κB p65 核移位阳性表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of Huanglian Jiedutang on nuclear translocation of NF-κB p65 in HT22 cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NF-κB p65 核移位阳性表达
空白	-	0.29 ± 0.04
模型	-	0.92 ± 0.03 ¹⁾
多奈哌齐	0.000 9	0.43 ± 0.02 ²⁾
黄连解毒汤	2.7	0.40 ± 0.03 ²⁾
	8.1	0.35 ± 0.05 ^{2,3)}

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$; 与多奈哌齐组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

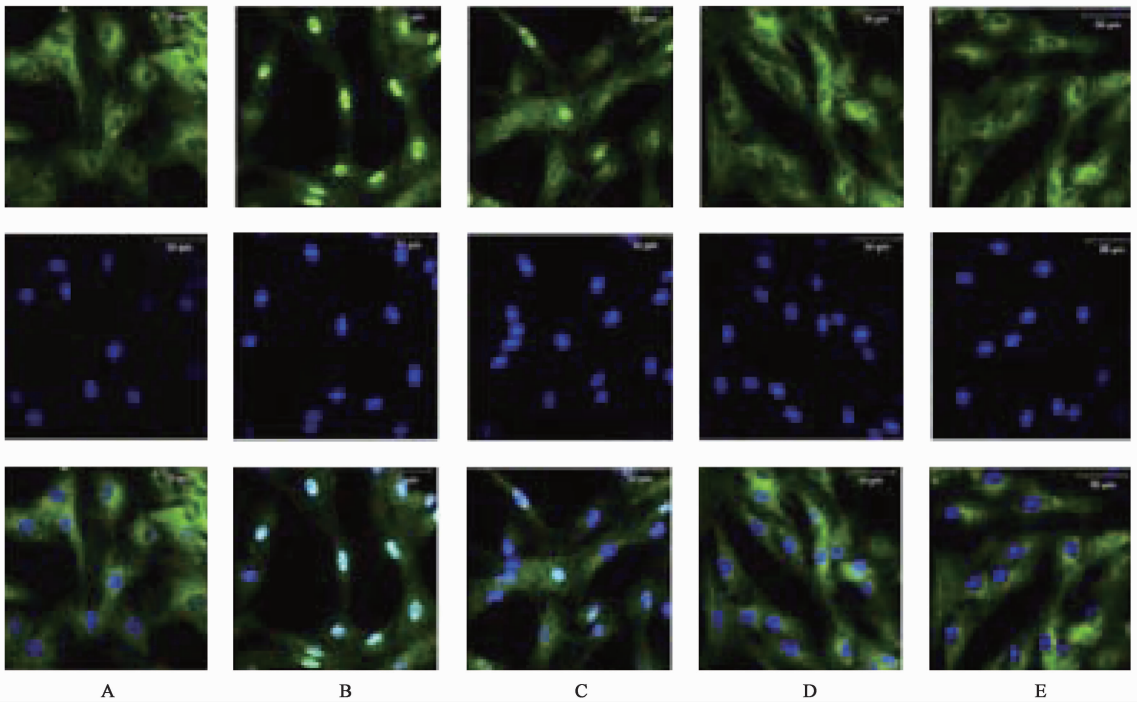


图 2 黄连解毒汤对 NF-κB p65 核移位的影响 (免疫荧光, ×400)

Fig. 2 Effects of Huanglian Jiedutang on nuclear translocation of NF-κB p65 in HT22 cell (immunofluorescence, ×400)

4 讨论

AD 属中医“痴呆”范畴,《黄帝内经·灵枢·海论》记载:“脑为髓之海。”《黄帝内经·素问·脉要精微论》云:“头者精明之府,头倾视深,精神将夺矣”。王清任认为“灵机记性不在心而在脑”。王永炎院士提出了“毒损脑络”理论,浊毒内生,导致脑窍壅塞,神机失用而发为痴呆^[16]。苏芮等^[17]认

为 AD 是由 β-淀粉样蛋白的病理产物损伤脑髓而致,可归为内生浊毒一类,故 AD 发病机制可认为由浊毒损害脑髓而致。浊毒损伤脑髓,终至脑髓亏乏,神机失用,最终导致痴呆的产生。

炎症因子可引起中枢神经元损伤和凋亡^[18], IL-1β 增多时,能够导致学习和记忆力的缺陷,而阻断其受体后,模型大鼠短期和长期记忆力提高^[19]。

Mori 等^[20]研究显示在 Tg2576 AD 大鼠模型中,IL-6 过量释放与神经元的退变和行为学损害关系密切。TNF- α 的过度表达在 A β 斑块形成、神经元退行性病变中具有重要作用^[21]。A β 的聚集和沉积可引起 NF- κ B p65 入核及磷酸化,进而诱导产生炎症因子 IL-1 β ,IL-6,TNF- α ,导致神经损伤^[22],在 AD 的发病机制中具有关键作用。因此,通过抑制 NF- κ B 活化来阻断炎症过程可作为治疗 AD 的主要靶点。中医病机中的毒损脑络与 A β 刺激引起慢性神经炎症,从而介导一系列的神经毒性有着共通之处。

黄连解毒汤为清热解毒的代表方剂,源于唐代王焘《外台秘要》,基于“痰、瘀、火”为 AD 的病机基础,由清热解毒药物黄连、黄芩、黄柏和栀子组成。方青等^[23]研究显示黄连解毒汤可能通过干预 A β 沉积对神经细胞的作用而显著改善 AD 动物模型的记忆障碍和学习能力,陈国华等^[24]研究显示黄连解毒汤能减少 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠海马 CA1 区 SP 数量和胞外诱捕网(NETs)形成及降低 IL-6,IL-1 β 水平。上述研究提示黄连解毒汤能保护神经细胞,减少老年斑生成,降低炎症反应,对 AD 起防治作用。临床研究也表明,黄连解毒汤能够增加 AD 患者脑部血流量,对其认知功能有明显的改善作用^[25]。黄连解毒汤的神经保护作用,受到 AD 研究者的广泛重视,有可能成为中 AD 的重要药物。

上述研究都说明了 IL-1 β ,TNF- α ,IL-6 与 AD 的发病有重要的关系,A β 可通过激活 NF- κ B 诱导神经细胞发生炎症反应,本实验通过 ELISA 检测及 Real-time PCR 检测验证在 A β ₂₅₋₃₅ 作用下,模型组 IL-1 β ,TNF- α ,IL-6 分泌量及 mRNA 表达升高,而在黄连解毒汤作用下,IL-1 β ,TNF- α ,IL-6 分泌水平及 mRNA 表达量均降低;通过免疫荧光检测发现空白组 HT22 细胞胞质仅有少量 NF- κ B p65,细胞核内几乎不存在 NF- κ B p65,模型组用 A β ₂₅₋₃₅ (40 μ mol·L⁻¹) 干预后 HT22 细胞胞质和细胞核内均有 NF- κ B p65,表明存在明显核转移现象,且 Western blot 进一步验证了模型组 p-NF- κ B p65 蛋白较其他组高表达,提示 NF- κ B 处于激活状态,而黄连解毒汤预处理组和多奈哌齐组中,NF- κ B p65 核移位及 p-NF- κ B p65 蛋白表达减少,说明黄连解毒汤和多奈哌齐可通过抑制 NF- κ B p65 核移位及降低 NF- κ B p65 磷酸化水平从而抑制 NF- κ B 激活,尤其以黄连解毒汤高剂量组最明显。

本实验采用 A β ₂₅₋₃₅ (40 μ mol·L⁻¹, 24 h) 建立 A β 诱导 HT22 细胞炎症模型,NF- κ B p65 发生核移位及

p-p65 蛋白处于高表达状态,并诱导炎症因子 IL-1 β ,IL-6,TNF- α 过量分泌及 mRNA 高表达,实验结果说明黄连解毒汤处理减少了 A β ₂₅₋₃₅ 诱导的 NF- κ B 活化,并呈剂量依赖性地下调 HT22 的 IL-1 β ,IL-6 及 TNF- α 的分泌及 mRNA 的表达,提示黄连解毒汤在 20 ~ 80 μ mol·L⁻¹ 可通过抑制 NF- κ B 表达,下调由 A β ₂₅₋₃₅ 激活 HT22 细胞产生的炎症因子,发挥治疗 AD 的作用,并呈剂量依赖趋势。因此,黄连解毒汤可能成为预防或治疗 AD 的潜在药物,而其临床应用还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Gandy S. Molecular basis for anti-amyloid therapy in the prevention and treatment of Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Aging, 2002,23(6):1009-1016.
- [2] Marcello E, Epis R, Di Luca M. Amyloid flirting with synaptic failure: towards a comprehensive view of Alzheimer's disease pathogenesis [J]. Eur J Pharmacol, 2007,585(1):109-118.
- [3] 张萌涛,钱亦华,杨杰,等. 丹参酮 II A 对谷氨酸联合淀粉样蛋白诱导细胞损伤的保护作用 [J]. 中国老年学杂志,2009,29(19):2465-2468.
- [4] Inoue S, Nakase H, Matsuura M, et al. The effect of proteasome inhibitor MG132 on experimental inflammatory bowel disease [J]. Clin Exp Immunol, 2009,156(1):172-82.
- [5] 朱金墙,宋雯珊,张妍,等. PI3K/Akt 信号通路与血管性痴呆的关系及中药干预作用的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(9):223-229.
- [6] Rubio-Perez J M, Morillas-Ruiz J M. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines [J]. Sci World J, 2012,2012:756357.
- [7] WANG S, YANG H, YU L, et al. Oridonin attenuates Abeta1-42-induced neuroinflammation and inhibits NF-kappaB pathway [J]. PLoS One, 2014, 9(8): e104745.
- [8] CHEN G, XU Y, JING J, et al. The anti-sepsis activity of the components of Huanglian Jiedu decoction with high lipid a-binding affinity [J]. Int Immunopharmacol, 2017,46: 87-96.
- [9] 邱昕,陈国华,梅瑰. 黄连解毒汤对 APP/PS1 双转基因阿尔茨海默病小鼠脑组织自由基代谢及 IL-6,IL-1 β 含量的影响 [J]. 卒中与神经疾病,2011,18(2): 72-74.
- [10] LIU J, LI L, SUO W Z. HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties [J]. Life Sci,2009,84:267-271.

- [11] 石秋艳,张琪,孙鹏,等.多奈哌齐对血管性痴呆大鼠海马CA₁区NF- κ B及COX-2表达的影响[J].中馈与神经疾病杂志,2010,27(12):1093-1096.
- [12] 王力倩,李仪奎,等.血清药理学方法研究探索[J].中药药理与临床,1997,13(3):29-31.
- [13] 孙凤芹. β -淀粉样蛋白诱导HT22细胞建立阿尔茨海默病细胞模型[J].中国老年学,2016,36(3):521-522.
- [14] Michael V S, Harry V V. Astrocytes: biology and pathology[J]. Acta Neuropathol,2010,119(1):7-35.
- [15] WANG R, CHEN S, LIU Y, et al. All-trans retinoic acid reduces BACE1 expression under inflammatory conditions via modulation of NF- κ B signaling [J]. J Biol Chem, 2015, 290 (37): 22532-22542.
- [16] 王永炎.关于提高脑血管疾病疗效难点的思考[J].中国中西医结合杂志,1997,17(4):195-196.
- [17] 苏芮,韩振蕴,范吉平.基于“毒损脑络”理论的老年性痴呆中医病机探讨[J].南京中医药大学学报,2010,26(2):93-94.
- [18] McGeer E G, McGeer P L. Inflammatory processes in Alzheimer's disease [J]. Prog Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry, 2003,27(5):741-749.
- [19] Tanaka T, Isoe-Wada K, Yamamori H, et al. Neurobiological studies of dementia--biological markers and neuroprotective strategies for Alzheimer disease[J]. Acta Neurol Taiwan,2006,15(1):68-71.
- [20] Mori T, Koyama N, Arendash G W, et al. Overexpression of human S100B exacerbates cerebral amyloidosis and gliosis in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease[J]. Glia,2010, 58(3): 300-314.
- [21] 雷洪涛,王筠,马淑骅. IL-1 β 、TNF- α 与阿尔茨海默病的研究进展[J].中国老年学杂志,2014,34(24):7115-7117.
- [22] Youn K, Lee S, Jeong W S, et al. Protective role of corilagin on A β ₂₅₋₃₅-induced neurotoxicity: suppression of NF-kappaB signaling pathway[J]. J Med Food,2016,doi:10.1089/jmf.2016.3714.
- [23] 方青,詹小萍,莫剑翎,等.黄连解毒汤对AD大鼠的治疗作用及对细胞因子含量的影响[J].中国中药杂志,2004,29(6):575-578.
- [24] 陈国华,梅瑰,邱昕,等.黄连解毒汤对APP/PS1双转基因AD小鼠脑组织IL-6I、L-1 β 水平及SP、NFTs数量的干预作用[J].中国神经免疫学和神经病学杂志,2011,18(5):352-356.
- [25] 柴山周乃,杜武勋,朱明丹,等.日本老年期认知症常用汉方制剂的研究[J].湖南中医杂志,2010,26(1):104-106.

[责任编辑 周冰冰]