

# 半夏有效成分大黄酚对肿瘤坏死因子- $\alpha$ 诱导人脑微血管内皮细胞的作用机制

刘畅<sup>1</sup>, 张颖<sup>1</sup>, 马阮昕<sup>2</sup>, 秦劭晨<sup>3\*</sup>

(1. 广州市越秀区光塔街社区卫生服务中心, 广州 510120; 2. 中山大学附属第六医院, 广州 510655; 3. 山西中医学院附属医院, 太原 030024)

**[摘要]** **目的:**研究半夏有效成分大黄酚对肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )诱导人脑微血管内皮细胞(HBMEC)的作用机制。**方法:**体外培养 HBMEC,用 TNF- $\alpha$  诱导 HBMEC 造模,将细胞分为正常组、模型组、大黄酚组、依达拉奉组。采用噻唑蓝比色(MTT)法检测大黄酚对 HBMEC 增殖能力的影响,用逆转录 PCR 法(RT-PCR)检测 TNF- $\alpha$ ,白细胞介素-6(IL-6),IL-8 mRNA 的表达,用酶联免疫吸附法(ELISA)检测 TNF- $\alpha$ ,IL-6,IL-8,磷酸化氨基末端蛋白激酶(p-JNK)和磷酸化细胞外调节蛋白激酶(p-ERK)的含量,用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 p-JNK,total JNK,p-ERK 和 total ERK 的蛋白表达。**结果:**在 256  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度时,大黄酚对 HBMEC 细胞有明显的抑制作用( $P < 0.01$ )。与模型组比较,在 64 ~ 128  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度时,大黄酚对模型细胞生长有明显的促进作用( $P < 0.05$ );大黄酚组 TNF- $\alpha$ ,IL-6,IL-8 mRNA 表达明显下降( $P < 0.01$ );大黄酚组 TNF- $\alpha$ ,IL-6,IL-8,p-JNK 和 p-ERK 的含量明显减少( $P < 0.05$ );大黄酚组磷酸化 JNK/JNK,磷酸化 ERK/ERK 表达明显下降( $P < 0.05$ )。**结论:**半夏有效成分大黄酚具有抑制 TNF- $\alpha$  诱导 HBMEC 损伤作用,可能是通过下调 ERK/JNK 信号通路减少炎症相关因子 TNF- $\alpha$ ,IL-6 和 IL-8 的表达。

**[关键词]** 大黄酚;人脑微血管内皮细胞;炎症;ERK/JNK 信号通路

**[中图分类号]** R22;R24;R273;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)03-0160-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2018030160

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171113.1434.004.html>

**[网络出版时间]** 2017-11-13 14:34

## Effect of Chrysophanol from Pinellia on Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -induced Human Cerebral Microvascular Endothelial Cells

AN Chang<sup>1</sup>, ZHANG Ying<sup>1</sup>, MA Ruan-xin<sup>2</sup>, QIN Shao-chen<sup>3\*</sup>

(1. Guangzhou Yuexiu District Guangta Street Community Health Service Center, Guangzhou 510120, China;  
2. The Sixth Affiliated Hospital of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510655, China;  
3. Hospital Affiliated to Shanxi College of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of chrysophanol from pinellia on tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-induced human cerebral microvascular endothelial cells (HBMEC). **Method:** HBMECs were cultured *in vitro*, and modeled with TNF- $\alpha$ . The cells were divided into normal group, model group, chrysophanol group and edaravone group. TNF- $\alpha$ , interleukin-6 (IL-6) and IL-8 mRNA expressions were detected by RT-PCR. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, p-JNK and p-ERK were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Protein expressions of p-JNK, total JNK, p-ERK and total ERK were detected by Western blot. **Result:** At the concentration of 256  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , chrysophanol significantly inhibited HBMEC cells ( $P < 0.01$ ). Compared with the

**[收稿日期]** 20170921(015)

**[基金项目]** 山西省卫生和计划生育委员会科研项目(201601119)

**[第一作者]** 刘畅,硕士,主治医师,从事神经内科工作,Tel:020-83362275,E-mail:acwater@126.com

**[通信作者]** \*秦劭晨,博士,主治医师,从事神经内科工作,Tel:0351-8618541,E-mail:410291246@qq.com

model group, chrysophanol had a significant effect on the growth of model cells at concentrations between 64  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  and 128  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $P < 0.05$ ). Expressions of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-6, IL-8, p-JNK and p-ERK in chrysophanol group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Expressions of p-JNK/JNK and p-ERK/ERK in chrysophanol group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Chrysophanol has an effect in inhibiting TNF- $\alpha$ -induced HBMEC damage, and may reduce the expressions of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-8 by down-regulating ERK/JNK signaling pathway.

**[Key words]** chrysophanol; human cerebral microvascular endothelial cell; inflammation; ERK/JNK signaling pathway

脑卒中是临床上的常见神经系统疾病,其起病急剧,致残致死率较高,其发病率为 80%,该病主要是由于血管阻塞或血栓形成导致脑组织血流量减少<sup>[1]</sup>。其表现在中医学中可以归纳于“中风”范畴,其病机是“血脉不通,经络瘀阻”<sup>[2]</sup>,而金代医家刘完素提出“脑之玄府说”,脑之玄府闭塞是脑卒中的关键发病因素,治疗以宣通玄府为要<sup>[3]</sup>。最近研究发现,肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 诱导的屏障功能障碍已被证明,其是多种疾病的病理生理学基础, TNF- $\alpha$  诱导内皮细胞的炎症会引起细胞通透性的变化,导致局部炎症反应、血管渗漏和水肿形成<sup>[4-5]</sup>。半夏白术天麻汤出自《医学心悟》,全方有熄风化痰、活血通络功效<sup>[6]</sup>,临床可治疗痰湿中阻型急性缺血性脑卒中<sup>[1]</sup>。而半夏是君药,其辛、温,有毒。归脾、胃、肺经,有燥湿化痰,降逆止呕,消痞散结之功效<sup>[7]</sup>。为了明确该方的作用机制,本实验从半夏的有效成分大黄酚<sup>[8]</sup>着手,探讨大黄酚对 TNF- $\alpha$  诱导人脑微血管内皮细胞的作用机制研究。

## 1 材料

**1.1 试药** 大黄酚(中国食品药品检定研究院,批号 110796-201615);依达拉奉(Edaravone, EDA,南京先声药业,批号 P2017123144254453);人脑微血管内皮细胞株(HBMEC,美国 ATCC 公司);胰酶, DMEM 培养基,胎牛血清(美国 Gibco 公司,货号分别是 15050057, 12100046, 16000044);噻唑蓝(MTT,货号 M2128),二甲基亚砷(DMSO,货号 D4540)(美国 Sigma 公司);TNF- $\alpha$ , 白细胞介素-6(IL-6), IL-8 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,货号分别是 EK0525, EK0410, EK0413);磷酸化氨基末端蛋白激酶(p-JNK)和磷酸化细胞外调节蛋白激酶(p-ERK)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(美国 Abcam 公司,货号分别是 ab207477, ab207469);trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司,批号 1392923);反转录试剂盒(大连 TaKaRa 生物科技有限公司,货号 D9108A);荧光定量 PCR 试剂盒(美

国 Agilent 公司,批号 0006205172);目标基因引物(TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 mRNA)由中国科学院北京基因组研究所合成;p-JNK, total JNK, p-ERK, total ERK 和  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(美国 CST 公司,货号分别是 4668, 9252, 3510, 4695, 4970)。

**1.2 仪器** INFINITE M200 型多功能酶标仪(奥地利 TE-CAN);Stratgene M3000 型荧光定量 PCR 仪(德国 Agilent 公司);MR1822 型低温高速离心机(法国 Jouan 公司);Poucr Pac 系列电泳仪、转膜仪和 ChemiDoc™ XRS + System 成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 药物制备** 大黄酚实验前用 *N,N*-二甲基甲酰胺溶解,聚山梨酯-80 助溶,再加入生理盐水混匀, *N,N*-二甲基甲酰胺-聚山梨酯-80-生理盐水 1:1:8, 实验前用生理盐水稀释至所需浓度<sup>[9]</sup>。

**2.2 人脑微血管内皮细胞培养** 复苏人脑微血管内皮细胞株,将其用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基转移至细胞培养瓶中,置 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续传代培养,待细胞生长至融合状态后用 0.5% 胰蛋白酶消化传代备用。

**2.3 TNF- $\alpha$  损伤人脑微血管内皮细胞的细胞模型制备**<sup>[10]</sup> 待人脑微血管内皮细胞生长状态良好时,取对数生长期的人脑微血管内皮细胞以 10<sup>5</sup> 个/mL 密度接种于 96 孔板,加入含 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TNF- $\alpha$  的 DMEM 培养液,培养 4 h。

**2.4 实验分组** 细胞培养后,取对数生长期的人脑微血管内皮细胞以 10<sup>5</sup> 个/mL 密度接种于 96 孔板。实验分为正常组,用 10% FBS 的 DMEM 培养基培养 24 h 后进行检测;模型组,按 2.3 项方法造模;大黄酚组:细胞培养后,不同浓度的大黄酚预处理 20 h,再加入终质量浓度为 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TNF- $\alpha$  作用 4 h 诱导细胞损伤;依达拉奉组,细胞培养后,终浓度为 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的依达拉奉预处理 20 h,再加入终质量浓度为 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TNF- $\alpha$  作用 4 h 诱导

细胞损伤。

### 2.5 检测指标

**2.5.1 MTT 法检测细胞活力** 细胞培养液调整每组细胞密度均为  $5 \times 10^4$  个/mL。取 96 孔板,每孔加入细胞悬液 100  $\mu$ L,每组设 6 个平行培养孔。各组经不同浓度的 TNF- $\alpha$  或大黄酚处理 24 h 后,每孔加入 MTT( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 20  $\mu$ L 继续培养 4 h,经洗涤离心弃去上清,加入二甲基亚砷(DMSO)100  $\mu$ L,震荡 10 min,在酶标仪上读取波长为 570 nm 的吸光度  $A$ 。

**2.5.2 逆转录 PCR 法(RT-PCR)检测 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 mRNA 的表达** 各组细胞按 trizol 试剂盒说明书操作,提取总 RNA。取总 RNA 500 ng,使用 PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒,按说明书操作将 RNA 反转录成 cDNA。DNA 扩增按照 Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix 试剂盒说明书操作。TNF- $\alpha$  上游 5'-AGATGATCTGACTGCCTGGG-3', 下游 5'-CAGCC TCTTCTCCTTCCTGA-3', 长度 142 bp; IL-6 上游 5'-AAATTCCGTACATCCTCGAC-3', 下游 5'-CCTCT TTGCTGCTTTTCACAC-3', 长度 84 bp; IL-8 上游 5'-TACTCCAAACCTTTCCACCC-3', 下游 5'-AAAACCT CTCCACAACCCTC-3', 长度 160 bp; $\beta$ -actin 上游 5'-GCAGAAGGAGATCACAGCCCT-3', 下游 5'-GCTGAT CCACATCTGCTGGAA-3', 长度 136 bp。以  $\beta$ -actin 为内参,用所得各样品 Ct 计算出各样品 RNA 的相对表达量。

**2.5.3 ELISA 检测 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, p-JNK 和 p-ERK 的含量** 实验结束时收集各组细胞,用细胞裂解液后收集各组细胞裂解液,3 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,离心 5 min 后,把所得上清液于  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  保存待测。采用人来源的 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, p-JNK 和 p-ERK 试剂盒检测细胞内 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, p-JNK 和 p-ERK 的浓度,具体操作步骤完全按照 ELISA 试剂盒说明书进行。

**2.5.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 p-JNK, total JNK, p-ERK 和 total ERK 蛋白表达** 先把各组收集的细胞裂解液,再用 BCA 蛋白测试盒测出总蛋白。接着按照 35  $\mu$ g, 15  $\mu$ L 每孔上样置 10% SDS-PAGE 上,于电泳浓缩胶 50 V,分离胶 120 V 分离,切胶后在 300 mA 条件下进行湿法转膜,5% 脱脂牛奶封闭 2 h,再分别加入 p-JNK, total JNK, p-ERK 和 total ERK 抗体(1:1 000)和  $\beta$ -actin 抗体(1:1 000)中,4  $^\circ\text{C}$  孵育过夜,次日取出条带用 TBST 洗膜后,加入相对应的二抗(1:2 000)室温孵育 1 h 后用 TBST

洗膜,ECL 孵育后曝光,采用 Image Lab Software 进行分析。

**2.6 统计学处理** 实验数值以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 SPSS 17.0 统计软件分析,组间比较采用多样本均数的 One-way ANOVA 检验,两组均数比较采用  $t$  检验, $P < 0.05$  表示有显著性差异。

### 3 结果

**3.1 大黄酚对 HBMEC 生长的影响** 与正常组相比,大黄酚浓度在 8 ~ 128  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,对 HBMEC 细胞的生长没有明显影响,在 256  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度时,大黄酚对 HBMEC 细胞有明显的抑制作用( $P < 0.001$ )。见表 1。

表 1 大黄酚对 HBMEC 的生长情况的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Effect of chrysophanol on growth of HBMEC ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$A$
正常	-	$1.05 \pm 0.06$
大黄酚	8	$0.98 \pm 0.04$
	16	$1.00 \pm 0.07$
	32	$0.96 \pm 0.04$
	64	$0.96 \pm 0.07$
	128	$0.94 \pm 0.12$
	256	$0.73 \pm 0.05^{1)}$

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.2 大黄酚对 TNF- $\alpha$  诱导 HBMEC 的生长变化的影响** 与正常组相比,模型组对 HBMEC 细胞生长有明显的抑制作用( $P < 0.01$ );与模型组相比,大黄酚在 8 ~ 32  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,对模型细胞的生长没有明显影响,在 64 ~ 128  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度时,大黄酚对模型细胞生长有明显的促进作用( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 大黄酚对 TNF- $\alpha$  诱导 HBMEC 的生长情况( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effect of chrysophanol on growth of HBMEC induced by TNF- $\alpha$  ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$A$
正常	-	$1.05 \pm 0.09$
模型	-	$0.69 \pm 0.17^{1)}$
大黄酚	8	$0.68 \pm 0.07$
	16	$0.70 \pm 0.06$
	32	$0.80 \pm 0.09$
	64	$0.99 \pm 0.19^{2)}$
	128	$1.00 \pm 0.05^{3)}$

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.3 大黄酚对 TNF- $\alpha$  诱导 HBMEC 炎症相关因子 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 mRNA 的影响** 与正常组相比,模型组 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 mRNA 表达明显上升 ( $P < 0.01$ ); 与模型组相比,大黄酚组和依达拉奉组 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 mRNA 表达明显下降 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

**3.4 大黄酚对 TNF- $\alpha$  诱导 HBMEC 的 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, p-JNK 和 p-ERK 的含量变化** 与正常组相比,模型组 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, p-JNK 和 p-ERK 的含量明显增加 ( $P < 0.01$ ); 与模型组相比,大黄酚组和依达拉奉组 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, p-JNK 和 p-ERK 的含量明显减少 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

表 4 大黄酚对 TNF- $\alpha$  诱导 HBMEC 的 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, p-JNK, p-ERK 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-8	p-JNK	p-ERK
正常	-	990.15 $\pm$ 80.54	98.51 $\pm$ 5.65	1.24 $\pm$ 0.05	86.54 $\pm$ 5.59	60.49 $\pm$ 3.59
模型	-	1 862.42 $\pm$ 117.90 <sup>1)</sup>	236.44 $\pm$ 12.69 <sup>1)</sup>	13.59 $\pm$ 1.09 <sup>1)</sup>	428.36 $\pm$ 26.95 <sup>1)</sup>	398.48 $\pm$ 20.99 <sup>1)</sup>
大黄酚	100	1 459.59 $\pm$ 99.16 <sup>2)</sup>	151.14 $\pm$ 9.86 <sup>2)</sup>	7.28 $\pm$ 0.37 <sup>2)</sup>	111.68 $\pm$ 9.87 <sup>3)</sup>	94.56 $\pm$ 4.98 <sup>3)</sup>
依达拉奉	5	1 193.02 $\pm$ 96.49 <sup>3)</sup>	109.48 $\pm$ 7.61 <sup>3)</sup>	3.59 $\pm$ 0.12 <sup>3)</sup>	94.53 $\pm$ 6.15 <sup>3)</sup>	73.93 $\pm$ 3.91 <sup>3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.5 大黄酚对 TNF- $\alpha$  诱导 HBMEC 的 p-JNK, total JNK, p-ERK 和 total ERK 蛋白表达的影响** 与正常组相比,模型组磷酸化 JNK/JNK, 磷酸化 ERK/ERK 表达明显上升 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比,大黄酚组和依达拉奉组磷酸化 JNK/JNK, 磷酸化 ERK/ERK 表达明显下降 ( $P < 0.05$ )。见表 5, 图 1。

表 5 大黄酚对 TNF- $\alpha$  诱导 HBMEC 的 p-JNK, total JNK, p-ERK 和 total ERK 蛋白表达影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	p-JNK/total JNK	p-ERK/total ERK
正常	-	0.99 $\pm$ 0.28	0.99 $\pm$ 0.28
模型	-	4.43 $\pm$ 1.29 <sup>1)</sup>	3.10 $\pm$ 0.58 <sup>2)</sup>
大黄酚	100	2.29 $\pm$ 0.29 <sup>3)</sup>	1.95 $\pm$ 0.37 <sup>3)</sup>
依达拉奉	5	1.69 $\pm$ 0.52 <sup>3)</sup>	1.69 $\pm$ 0.52 <sup>3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$  (图 1 同)。

#### 4 讨论

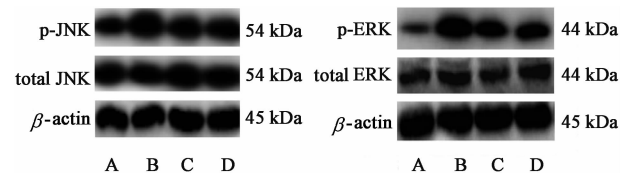
在脑卒中发生后会引起细胞因子和黏附分子的表达增高,激发炎症级联反应,导致白细胞黏附、聚集和迁移,损伤血脑屏障的通透性,随着白细胞浸润

表 3 大黄酚对 TNF- $\alpha$  诱导 HBMEC 炎症相关因子 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Effect of chrysophanol on inflammation-related factors mRNA in TNF- $\alpha$ -induced HBMEC ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-8
正常	-	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
模型	-	10.47 $\pm$ 0.23 <sup>1)</sup>	42.75 $\pm$ 3.59 <sup>1)</sup>	221.43 $\pm$ 14.53 <sup>1)</sup>
大黄酚	100	3.14 $\pm$ 0.83 <sup>2)</sup>	6.55 $\pm$ 2.04 <sup>2)</sup>	116.16 $\pm$ 23.38 <sup>2)</sup>
依达拉奉	5	2.39 $\pm$ 1.28 <sup>2)</sup>	4.45 $\pm$ 1.30 <sup>2)</sup>	123.97 $\pm$ 21.32 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。



A. 正常组; B. 模型组; C. 大黄酚组; D. 依达拉奉组

图 1 大黄酚对 TNF- $\alpha$  诱导 HBMEC 的 p-JNK, total JNK, p-ERK 和 total ERK 蛋白表达影响

Fig. 1 Effect of chrysophanol on TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, p-JNK and p-ERK expressions in HBMEC induced by TNF- $\alpha$

并产生大量的蛋白水解物酶,引发生物膜发生脂质过氧化反应,破坏了脑毛细血管内皮细胞和基底膜的完整性,进一步加剧了血脑屏障结构破坏,诱发血管源性水肿和脑出血<sup>[11]</sup>。而中医学认为,中风以气血亏虚为本,痰瘀阻络为标,痰瘀之邪可直接导致气机失和,津液渗于脉外,导致玄府内外水液失衡,开阖失司,气血逆乱,气不行津,津停为水,水积成浊,水浊充斥脑之玄府,玄府郁闭,发为水肿,从而影响神机运转,引发中风<sup>[3]</sup>。由此可见,血脑屏障通透性改变和玄府开合失司,二者理论相似,分别从中西医的不同角度,在微观层面阐释了中风发生前后的病理生理机制。

半夏为天南星科植物半夏的地下块茎,其常用功效为燥湿化痰、降逆止吐、消痞散结,医圣张仲景善用半夏来治疗痞、满、吐、结、疔相关的病证<sup>[12]</sup>。现代研究发现半夏具有有降血脂、抗炎、解毒作用<sup>[13]</sup>。半夏有效成分大黄酚通过抑制环氧化酶-2(COX-2)和金属基质蛋白酶-9(MMP-9)的蛋白表达来减轻炎症反应<sup>[14]</sup>,还可通过减少脑内一氧化氮(NO)含量和抗缺氧作用<sup>[15]</sup>,从而对脑缺血再灌注损伤发挥神经保护作用。研究发现 TNF- $\alpha$  诱导的血脑屏障通透性是多种疾病的病理生理学基础<sup>[4-5]</sup>。由于大黄酚保护脑血管内皮细胞的研究较少,其保护机制尚不明确,因此,本实验以 TNF- $\alpha$  诱导脑内皮细胞为研究对象,重点在于探讨半夏有效成分大黄酚是否用于治疗中风以保护内皮细胞,减少炎症反应的作用及其作用机制,有利于保护血脑屏障减少中风危害。

在神经疾病的发生与发展中,脑中始终存在着以胶质细胞激活为主要特征的炎症反应,星形胶质细胞可分泌大量的促炎因子和抑炎因子<sup>[16]</sup>,小胶质细胞在脑缺血损伤中发挥脑保护和神经毒性双相作用<sup>[17]</sup>,而 IL-6 可减少星形胶质细胞和小胶质细胞的氧化损伤<sup>[18]</sup>。抑制 TNF- $\alpha$  的产生,可有效减轻水肿及其周围炎细胞的浸润<sup>[19]</sup>。IL-8 可刺激肝脏合成超敏-C 反应蛋白,继而激活补体释放炎症介质,诱发血管炎症反应<sup>[20]</sup>。本实验结果发现, TNF- $\alpha$  诱导 HBMEC 后 TNF- $\alpha$ , IL-6 和 IL-8 分泌都显著增加,这提示造模成功。而经过大黄酚干预后,模型细胞的 TNF- $\alpha$ , IL-6 和 IL-8 分泌都显著减少,这说明半夏有效成分大黄酚对 TNF- $\alpha$  诱导 HBMEC 的细胞模型有抗炎作用。

MAPK 信号通路由丝/苏氨酸蛋白激酶组成,3 个具有不同亚型的独立家庭成员,它们分别是 ERK, P38 和 JNK,外界因素刺激炎症会活化 MAPK 信号通路的 3 个成员发生磷酸化作用<sup>[21]</sup>,这会引起促炎症细胞因子(IL-6, IL-8 等)的产生<sup>[22-23]</sup>。本实验结果发现, TNF- $\alpha$  诱导 HBMEC 后 p-JNK 和 p-ERK 表达显著增加,结合上述炎症因子结果,符合文献报道结果。而经过大黄酚干预后,模型细胞的 p-JNK 和 p-ERK 表达显著减少,这提示大黄酚减少模型细胞的炎症因子可能是通过抑制 ERK/JNK 通路的作用。

综上所述,半夏有效成分大黄酚具有抑制 TNF- $\alpha$  诱导 HBMEC 的炎症反应,通过调节 ERK/JNK 通路来减缓内皮细胞损伤,有利于保护血脑屏障,有助

于减弱中风危害。

#### [参考文献]

- [1] 宋立辉. 半夏白术天麻汤治疗痰湿中阻型急性缺血性脑卒中 25 例[J]. 光明中医, 2017, 32(10): 1428-1429.
- [2] 田爱荣. 半夏白术天麻汤加减联合依达拉奉治疗急性缺血性脑卒中疗效分析[J]. 中国实用医药, 2014, 9(27): 161-162.
- [3] 周红霞, 李鱼昆, 张运克. 从脑缺血后血脑屏障的通透性调节机制探索宣通玄府法的内涵[J]. 世界中西医结合杂志, 2017, 12(5): 717-720.
- [4] YU J, MA M, MA Z, et al. HDAC6 inhibition prevents TNF-alpha-induced caspase 3 activation in lung endothelial cell and maintains cell-cell junctions[J]. Oncotarget, 2016, 7(34): 54714-54722.
- [5] Good R B, Gilbane A J, Trinder S L, et al. Endothelial to mesenchymal transition contributes to endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension[J]. Am J Pathol, 2015, 185(7): 1850-1858.
- [6] 张秀芳. 半夏白术天麻汤加减联合依达拉奉治疗急性缺血性脑卒中疗效分析[J]. 实用中医药杂志, 2013, 29(7): 525-526.
- [7] 潘会朝, 郭富礼. 中药汤剂当用生半夏[J]. 时珍国医国药, 2003, 14(9): 28-31.
- [8] 杨虹, 俞桂新, 王峥涛, 等. 半夏的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 42(2): 99-101.
- [9] 傅兴圣, 陈菲, 刘训红, 等. 大黄化学成分与药理作用研究新进展[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(46): 1534-1539.
- [10] ZHANG Y, HAN Y, ZHAO Y, et al. DT-13 ameliorates TNF-alpha-induced vascular endothelial hyperpermeability via non-muscle myosin II<sub>A</sub> and the Src/PI3K/Akt signaling pathway[J]. Front Immunol, 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.00925.
- [11] 李曼霞, 董志. 脑缺血再灌注时血脑屏障损伤的炎症机制研究进展[J]. 解放军药理学学报, 2007, 23(1): 60-63.
- [12] 杜继浩, 马艳娟. 生半夏治疗中风后遗症的体会[J]. 中国社区医师·医学专业半月刊, 2010, 15(12): 112.
- [13] 耿黎明, 李可法, 杨振伟. 麻黄附子细辛汤加减治疗冠心病慢性心律失常 32 例[J]. 河南中医, 2010, 30(9): 852-853.
- [14] 房亚兰, 黄语悠, 赵咏梅, 等. 大黄酚对局灶性脑缺血再灌注小鼠缺血半暗带区环氧化酶 2 和基质金属蛋白酶-9 表达的影响[J]. 首都医科大学学报, 2017, 38(1): 47-52.
- [15] 王四海, 梁春利, 张海红, 等. 大黄酚对脑缺血/再灌

- 注小鼠脑组织 NO 的影响和断头抗缺氧作用[J]. 天津医药, 2017, 45(6): 593-595.
- [16] 武良玉, 鲍秀琦, 孙华, 等. 星形胶质细胞上的清道夫受体与神经炎症的关系[J]. 中国医学科学院学报, 2014, 36(3): 330-335.
- [17] 泰文娇, 叶旋, 鲍秀琦, 等. 小胶质细胞与脑缺血关系的研究进展[J]. 药学报, 2012, 47(3): 346-353.
- [18] 朱长庚. 神经免疫内分泌网络与癫痫发病机理的关系[J]. 解剖学报, 2002, 33(3): 321-324.
- [19] Matsushita K, MENG W, WANG X, et al. Evidence for apoptosis after intercerebral hemorrhage in rat striatum[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(2): 396-404.
- [20] FENG S, YANG Q, LIU M, et al. Edaravone for acute ischaemic stroke [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2011, 16(12): D7230.
- [21] Byun E B, Sung N Y, Park J N, et al. Gamma-irradiated resveratrol negatively regulates LPS-induced MAPK and NF-kappa B signaling through TLR4 in macrophages [J]. Int Immunopharmacol, 2015, 25(2): 249-259.
- [22] Julien P, Isabelle M, Beckley K, et al. Type I IFN triggers RIG-1/TLR3/1/NLRP3-dependent inflammatory activation in influenza A virus infected cells[J]. PLoS Pathog, 2013, 9(4): e1003256.
- [23] 郑堰心, 张丽, 邓虹珠, 等. 槐定碱、苦参碱和苦豆碱对 LPS 诱导结肠上皮细胞炎症模型中细胞因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(8): 133-136.
- [责任编辑 邹晓翠]