

加味五子衍宗方抑制脂多糖诱导的 BV-2 小胶质细胞炎症反应及机制研究

宋芳娇¹, 宋宜祥¹, 曾克武^{1,2}, 屠鹏飞², 王学美^{1*}

(1. 北京大学第一医院中西医结合研究室, 北京 100034; 2. 北京大学医学部药学院, 北京 100191)

[摘要] **目的:**研究加味五子衍宗方(MWP)对脂多糖(LPS)诱导的 BV-2 小胶质细胞炎症反应的抑制作用及潜在机制。**方法:**体外培养 BV-2 小胶质细胞系,用 LPS($1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)诱导炎症模型,将细胞分为空白对照组,炎症模型组和 MWP 药物组,药物组 MWP 设置 50,100,200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 3 个质量浓度。LPS 和药物处理细胞后分别检测各组细胞炎症因子一氧化氮(NO)的表达、诱导型一氧化氮合成酶(iNOS),环氧合酶-2(COX-2)的表达、核转录因子- κB (NF- κB)核转位以及还原型辅酶 II(NADPH)氧化酶活性和活性氧(ROS)的表达。**结果:**MWP 可剂量依赖性降低 LPS 激活的 BV-2 小胶质细胞内 iNOS,COX-2 的蛋白表达和 NO 的释放,抑制 NF- κB 的核转位,此外还可剂量依赖性降低 NADPH 氧化酶活性并明显降低 ROS 的产生。**结论:**MWP 可有效抑制 LPS 诱导的 BV-2 小胶质细胞炎症反应,可能是通过抑制 NF- κB 信号通路介导的炎症反应以及 NADPH 氧化酶介导的氧化应激实现的。

[关键词] 神经炎症; BV-2 小胶质细胞系; 加味五子衍宗方; 抗炎; 神经保护

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0177-04

[doi] 10.11653/syjf2013240177

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131012.0924.005.html>

[网络出版时间] 2013-10-12 9:24

Inhibitory Effects of Modified Wuzi Yanzong Prescription on LPS-induced Inflammatory Response on BV-2 Microglial Cells

SONG Fang-jiao¹, SONG Yi-xiang¹, ZENG Ke-wu^{1,2}, TU Peng-fei², WANG Xue-mei^{1*}

(1. Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine of

First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China;

2. Peking University Health Science Center, School of Pharmaceutical Sciences, Beijing 100191, China)

[Abstract] **Objective:** To study the inhibitory effects of modified Wuzi Yanzong prescription (MWP) on BV-2 microglial cells induced by lipopolysaccharides (LPS) and the potential mechanism. **Method:** BV-2 microglial cells were cultured *in vitro* and stimulated by LPS ($1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). The cells were divided into three groups: blank control group, model group and MWP treatment group. The gradient 50, 100, 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ three concentrations were used in the treatment group. The expression of inflammatory factor nitric oxide (NO), protein inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase (COX-2), the translocation of nuclear factor- κB (NF- κB), nicotinamide adenosine denucleotide hydrophosphori (NADPH) oxidase activity and reactive oxygen species were tested after treating the cells by LPS and MWP. **Result:** MWP could decrease the release of NO and expression of iNOS, COX-2 protein with a dose-dependent manner, the nuclear translocation of NF- κB was inhibited by MWP too. In addition, MWP could decrease the NADPH oxidase activity with a dose-dependent

[收稿日期] 20130423(016)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81173369);北京市自然科学基金面上项目(7132210);教育部博士点基金(20120001110105)

[第一作者] 宋芳娇,在读硕士研究生,从事中西医结合老年病研究,Tel:010-83575802,E-mail:songfangjiao@163.com

[通讯作者] *王学美,博士,教授,研究员,博士生导师,从事中西医结合老年病研究,Tel:010-83575802,E-mail:wangxuemeibjmu@163.com

manner and significantly reduced the generation of ROS. **Conclusion:** MWP can significantly inhibit the inflammatory response of BV-2 microglial cells induced by LPS via suppression of NF- κ B signaling pathway and NADPH oxidase-mediated oxidative stress.

[Key words] neuroinflammation; BV-2 microglia cell line; modified Wuzi Yanzong prescription; anti-inflammatory; neural protection

加味五子衍宗方(MWP)是根据“补肾以益智”的理论在传统古方五子衍宗方的基础上加味淫羊藿而成,由枸杞子、菟丝子、五味子、车前子、覆盆子和淫羊藿组成。前期研究发现, MWP 具有较好的改善认知障碍和保护学习记忆的功能^[1-2]。现代研究表明,慢性神经炎症在阿尔茨海默病(AD)的发生发展过程中具有重要作用^[3-4], AD 的主要特征性病理变化之一即是由大量过度激活的小胶质细胞所诱导的神经炎性损伤及神经元退行性病变,进而导致了记忆力的减退^[5]。本研究主要从拮抗神经炎症角度出发,探讨 MWP 对脂多糖诱导的 BV-2 小胶质细胞炎症反应模型的抑制作用及其潜在机制。

1 材料

1.1 细胞 BV-2 小胶质细胞系由中国医学科学院细胞中心提供。

1.2 药物 MWP 中的各单味药(枸杞子、菟丝子、覆盆子、五味子、车前子和淫羊藿)均购自北京同仁堂。

1.3 试剂与仪器 DMEM 培养基(Hyclone 公司, Logan, Utah, USA), 胎牛血清(Gibco 公司, Gaithersburg, MD, USA), NO 化学法试剂盒(南京建成生物公司, 南京, 中国), 氯化硝基四氮唑蓝(NBT)、溴化噻唑蓝四氮唑(MTT)、二氢乙锭(DHE)、荧光染料 4', 6-联脒-2-苯基吡啶二盐酸盐(DAPI)(Sigma 公司, California, USA), X81 型蛋白抗体(Cell Signaling Technology, Boston, USA), X81 型荧光显微镜(Olympus, Japan), 2200 PRO 凝胶成像分体系统(Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA), Sunrise-Basic 酶标仪(TECAN 公司, Mannedorf, Switzerland)。

2 方法

2.1 MWP 提取物的制备 MWP 按照枸杞子、菟丝子、覆盆子、五味子、车前子、淫羊藿 8:8:4:1:2:8 的质量比混合。为了增加药物提取率,提取溶剂采用 70% 乙醇。用 10 倍量 70% 乙醇煮沸提取 1 h,残渣加 5 倍量 70% 乙醇煮沸提取 1 h,混合两次提取液,减压低温(60 ℃)浓缩成药物干粉,4 ℃避光保存。使用时将药物干粉溶解于培养基,定终质量浓度为

50, 100, 200 mg·L⁻¹,用 0.2 μm 滤膜除菌后处理细胞。

2.2 细胞的培养和处理 BV-2 小胶质细胞系用高糖 DMEM 培养基(加 10% 胎牛血清,100 U·L⁻¹青霉素和 100 μg·L⁻¹链霉素)于 37 ℃,5% CO₂ 的培养箱中培养,每 1 d 传代 1 次。参考本课题组前期实验方法^[6],采用 MWP 和 LPS 同时处理细胞。

2.3 对激活细胞上清液中 NO 含量的影响 BV-2 细胞以 5 × 10⁴ 个密度接种于 48 孔板,培养过夜,空白对照组采用上述高糖 DMEM 培养基换液,模型组用 LPS(1 mg·L⁻¹)诱导炎症,MWP 组采用 50,100,200 mg·L⁻¹ 3 个剂量协同 LPS(1 mg·L⁻¹)处理细胞(各组 n = 3),刺激维持 24 h 后用 NO 化学法试剂盒检测 NO 浓度,按照说明书操作:吸取培养液上清(300 μL),加试剂 1 和 2(NO 化学法试剂盒提供),离心(6 000 r·min⁻¹,10 min)取上清(160 μL),加入显色剂,酶标仪 570 nm 波长检测吸光度(A)。

2.4 对 LPS 激活的 BV-2 细胞中 iNOS 和 COX-2 蛋白表达的影响 将细胞接种于 Ø100 mm 培养皿中,培养过夜,空白对照组培养基换液,模型组用 LPS(1 mg·L⁻¹)处理细胞,药物组用 50, 100, 200 mg·L⁻¹ 3 个剂量的 MWP 协同 LPS(1 mg·L⁻¹)处理细胞,刺激维持 24 h 后收集细胞,用 RIPA 裂解液(内有 Cocktail 蛋白酶抑制剂)裂解细胞,获取总蛋白。将总蛋白用 8% SDS-PAGE 分离,用半干转膜仪将蛋白转移到聚偏氟乙烯膜上,5% 脱脂奶粉封闭 5 min。一抗(1:1 000)室温孵育 2 h,充分洗涤,二抗(1:1 000)室温孵育 1 h,充分洗涤后,加 ECL 试剂显色,在凝胶成像系统上拍照。

2.5 检测 NF- κ B 核转位情况 在 24 孔板中加入显微镜盖玻片,多聚赖氨酸包被后,接种细胞于玻片上,10 × 10⁴/孔,分为空白对照组、模型组和 200 mg·L⁻¹ MWP 组,药物预处理 30 min,加 LPS 诱导细胞(各组 n = 3),温箱孵育 1 h,4% 多聚甲醛包被,封闭液(0.2% tritonX-100 + 5% BSA)室温孵育 30 min,加 1 抗(1:200 稀释),4 ℃过夜,PBS 充分洗涤,加 2 抗(1:200 稀释),室温摇床 1 h,PBS 冲洗 3 遍,DAPI (50 mg·L⁻¹)37 ℃避光处理 30 min,PBS 冲洗 3 遍,

甘油-PBS 封片剂封片,用荧光显微镜拍照。

2.6 测定 NADPH 氧化酶活性 将 BV-2 细胞种于 48 孔板, 5×10^4 /孔, 药物组各浓度药预处理 30 min, 再加 LPS 刺激 2 h, 加 NBT ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 温箱孵育 2 h (各组 $n = 3$), 弃上清加 500 μL DMSO, 酶标仪 340 nm 处检测 A。NADPH 氧化酶介导 ROS 产生, 在 ROS 诱导产生之前, NADPH 氧化酶已有激活的表现, 所以 LPS 诱导 NADPH 氧化酶激活时间 (2 h) 小于诱导 ROS 产生时间 (24 h)。

2.7 检测 ROS 准备 24 孔板, 加玻片, 多聚赖氨酸包被后, 将细胞接种于玻片上, 10×10^4 /孔, 设置空白对照组, 模型组和 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MWP 组, 做相应处理后温箱孵育 24 h, PBS 冲洗 1 遍, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS 荧光探针 (DHE) 温箱处理 30 min, PBS 充分洗涤, DAPI 处理, 充分洗涤, 封片, 荧光显微镜拍照。

2.8 统计学方法 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 16.0 统计软件对各组数据进行单因素方差分析及组间 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 MWP 对 LPS 激活的 BV-2 细胞上清液中 NO 含量的影响 LPS 诱导 BV-2 细胞释放 NO 的水平明显增高, 而 MWP 剂量依赖性的下调了 BV-2 细胞释放 NO 的水平, 其中高剂量组 ($200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 与 LPS 诱导的炎症模型组相比有显著性差异。见表 1。

表 1 MWP 对 LPS 激活的 BV-2 细胞上清液中 NO 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	LPS/ $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	MWP/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
对照	-	-	9.139 ± 1.034
模型	+	-	$16.512 \pm 1.102^{1)}$
MWP	+	50	16.423 ± 0.794
	+	100	15.629 ± 0.737
	+	200	$11.876 \pm 1.728^{2)}$

注:与对照组比¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.2 MWP 对 LPS 激活的 BV-2 细胞中 iNOS 和 COX-2 蛋白表达的影响 iNOS 和 COX-2 是 NF- κ B 通路中两条重要的炎症通路, 这两条通路分别产生的炎症因子 NO 和 PGE-2 会损伤细胞并继续诱导炎症发生。LPS 激活 NF- κ B 通路, 使 iNOS 和 COX-2 两种蛋白表达增加, MWP 可呈剂量依赖性降低其表达。见图 1。

3.3 MWP 对 LPS 激活的 BV-2 细胞中细胞因子 NF- κ B 核转移的影响 空白对照组细胞核内没有染色 NF- κ B 的绿色荧光, 模型组细胞核内有 NF- κ B 绿色荧光, 且与 DAPI 染色细胞核的蓝色荧光重叠, 表

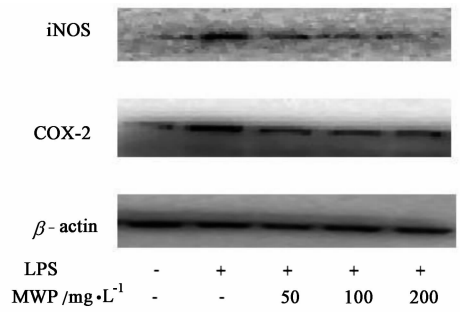
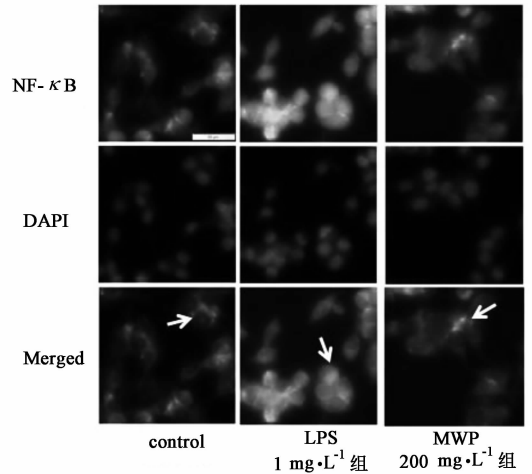


图 1 MWP 对 LPS 激活的 BV-2 细胞中 iNOS 和 COX-2 蛋白表达的影响

明模型组细胞在 LPS 诱导下产生 NF- κ B 核转位的现象, MWP 组细胞核内 NF- κ B 绿色荧光减少, 转移细胞核外围, 说明 MWP 可有效抑制 NF- κ B 的核转移。见图 2。



箭头示特征性细胞

图 2 MWP 对 LPS 激活的 BV-2 细胞 NF- κ B 核转移的影响

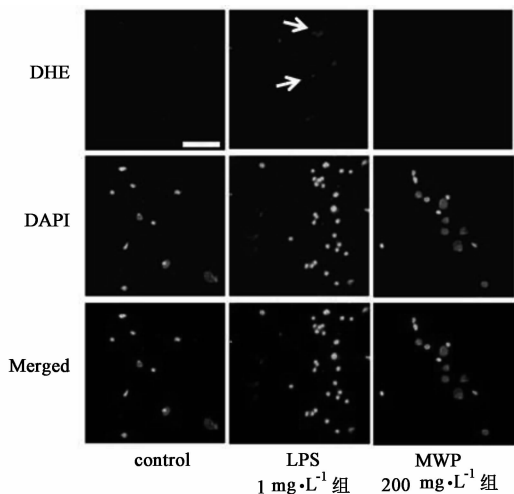
3.4 MWP 对 LPS 激活的 BV-2 细胞 NADPH 氧化酶活性影响 从表 2 可以看出, LPS 诱导 BV-2 细胞内 NADPH 氧化酶活性显著升高, 而 MWP 可有效抑制 BV-2 细胞内 NADPH 氧化酶的活性, 其高、中剂量组 ($100, 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 与模型组相比有显著性差异。

表 2 MWP 对 LPS 激活的 BV-2 细胞 NADPH 氧化酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	LPS/ $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	MWP/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	NADPH 氧化酶/A
对照	-	-	0.225 ± 0.017
模型	+	-	$0.282 \pm 0.011^{1)}$
MWP	+	50	0.261 ± 0.010
	+	100	$0.255 \pm 0.031^{2)}$
	+	200	$0.255 \pm 0.017^{2)}$

3.5 MWP 对 LPS 激活的 BV-2 细胞中 ROS 含量的影响 DHE 可自由透过细胞膜被细胞内的 ROS 氧化产生红色荧光, 根据红色荧光的产生可判断 ROS 的含量。如图 3 所示: LPS 组 DHE 红色荧光产生明

显,说明 LPS 可激发 BV-2 产生大量 ROS, MWP 组和空白对照组红色荧光产生均不明显,说明该方可有效抑制 LPS 诱导 ROS 的产生。



箭头示特征性细胞,比例尺为 50 μm

图 3 MWP 对 LPS 激活的 BV-2 细胞中 ROS 含量的影响

4 讨论

阿尔茨海默病(AD)病因不明,慢性炎症反应是其主要的神经损害因素之一。神经小胶质细胞是脑内主要的免疫效应细胞,受刺激的小胶质细胞会被异常活化,一方面可作为脑内的巨噬细胞吞噬 $A\beta$,减少神经团块的形成,另一方面,激活的小胶质细胞还可通过炎症通路释放大量的炎症因子(如: NO、 PGE_2 等),这些炎症因子既可继续诱发炎症^[7-8],又可促进 $A\beta$ 前体蛋白(APP)代谢成为 $A\beta$,加重炎症团块的形成,损伤神经元导致神经变性^[9]。

NF- κB 是一种多效性转录因子,在基因表达中起关键的调控作用,可与多种基因启动子位点发生特异性结合促进其转录表达。细胞在受到 LPS、氧化应激、细胞因子等多种刺激活化后,NF- κB 可调控编码前炎症性细胞因子、急性期反应蛋白和免疫调节因子等表达,参与炎症反应、免疫反应和细胞凋亡等多种生物过程。在本实验中,用 LPS 作为诱导剂,激活 NF- κB ,检测其下游的信号因子。免疫荧光观察 NF- κB 核转位情况,NBT 方法检测 NADPH 氧化酶活性,Western blot 检测相关蛋白 iNOS 和 COX-2 的表达,进而检测相关炎症因子 NO 的产生,且具有剂量依赖性。本实验结果证明 MWP 可通过调控 NF- κB 信号通路,降低激活细胞的炎症反应,减少炎症因子的产生,对慢性炎症性神经损伤具有保护作用,从抗炎角度解释了 MWP 多年临床抗痴呆的良好效果。

抗炎治疗在缓解 AD 发病中的作用日益受到人

们的重视,但是非甾体抗炎药在早期降低 AD 发生率效果不是很显著,并且有较多不良反应(如:消化性溃疡、恶心、呕吐等)^[10]。中药复方在防治痴呆性疾病有悠久的历史^[11-12],多靶点、整体调节是其作用特点,加之中药复方毒副作用极低,所以中药复方是治疗 AD 理想的药物选择。通过本实验研究证明,MWP 对细胞毒副作用小,可以通过抑制 NF- κB 通路及其下游信号通路有效降低炎症因子的释放,减轻神经系统炎症反应。在抗炎治疗 AD 方面有广阔的发展前景。

【参考文献】

- [1] 王学美,富宏,刘庚信,等. 加味五子衍宗颗粒治疗轻度认知障碍的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2004,24(5):392.
- [2] 褚松龄,王学美,富宏,等. 加味五子衍宗方及有效组分对记忆障碍小鼠中枢胆碱能系统的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2006,13(2):18.
- [3] Akiyama H, Barger S, Barnum S, et al. Inflammation and Alzheimer's disease[J]. Neurobiol Aging, 2000, 21(3):383.
- [4] 刘冬戈,何淑蓉,张伟,等. 阿尔茨海默病神经细胞凋亡与小胶质细胞活化的关系[J]. 中华病理学杂志, 2004,33(5):404.
- [5] Liu B, Hong J S. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative disease: mechanisms and strategies for therapeutic intervention[J]. JEPT, 2003, 304(1):1.
- [6] Zeng K W, Zhang T, Fu H, et al. Modified Wu-Zi-Yan-Zong prescription, a traditional Chinese polyherbal formula, suppresses lipopolysaccharide-induced neuroinflammatory processes in rat astrocytes via NF- κB and JNK/p38 MAPK signaling pathways [J]. Phytomedicine, 2012,19(2):122.
- [7] Block M L, Hong J S. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism[J]. Prog Neurobiol, 2005,76(2):77.
- [8] Stalder M, Phinney A, Probst A, et al. Association of microglia with amyloid plaques in brains of APP23 transgenic mice[J]. Am J Pathol,1999,154(6):1673.
- [9] Kreutzberg G W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS [J]. Trends Neurosci, 1996, 19(8):312.
- [10] 顾希钧,周昕. 非甾体类抗炎药物不良反应概述[J]. 中国临床药理学杂志,2005,14(6):388.
- [11] 张少卓,陆小左. 抗阿尔茨海默病中药的药理研究进展[J]. 天津中医药,2012,29(2):201.
- [12] 李慧. 中医中药对阿尔茨海默病的干预作用[J]. 中国中药杂志,2008,33(21):2449.

[责任编辑 聂淑琴]