

基于 BV2 小胶质细胞极化探索片仔癀抗炎机制

舒海洋^{1,2}, 樊丹采^{1,2}, 赵宁¹, 吕诚¹, 吕爱平³, 何小鹏^{1*}

(1. 中国中医科学院 中医临床基础医学研究所, 北京 100700;

2. 广州中医药大学 第二临床医学院, 广州 510504;

3. 香港浸会大学 中医药学院, 香港特别行政区 999077)

[摘要] **目的:**从小鼠小胶质瘤细胞(BV2)极化角度探索片仔癀(PTH)的抗炎作用机制。**方法:**将对数生长期的 BV2 细胞分为空白组, M1 模型组[脂多糖(LPS)100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 干扰素- γ (IFN- γ) 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$], M1 片仔癀组[LPS 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ + IFN- γ 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ + PTH 0.4 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$], M2 模型组[白细胞介素-4(IL-4) 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$], M2 片仔癀组[IL-4 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ + PTH 0.4 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$], 给以相应处理。通过酶联免疫吸附测定(ELISA)检测细胞上清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 一氧化氮(NO), 白细胞介素-10(IL-10), 转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)的含量, 使用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测细胞中一氧化氮诱导合酶(iNOS), 精氨酸-1(Arg-1) mRNA 的水平, 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞中 iNOS, p-STAT1, p-STAT3, Arg-1, p-STAT6 蛋白表达情况。**结果:**与空白组比较, M1 模型组上清 TNF- α , NO 含量显著升高($P < 0.01$), 细胞 iNOS mRNA, iNOS, p-STAT1, p-STAT3 蛋白水平显著升高($P < 0.01$), 而与 M1 模型组比较, M1 片仔癀组上清 TNF- α 及 NO 的含量显著下调($P < 0.01$), 细胞 iNOS mRNA 显著下调($P < 0.01$), iNOS, p-STAT1, p-STAT3 蛋白水平也明显下调($P < 0.05, P < 0.01$)。与空白组比较, M2 模型组细胞培养上清中 IL-10 及 TGF- β_1 含量显著升高($P < 0.01$), 细胞 Arg-1 mRNA, Arg-1, p-STAT6 蛋白水平显著升高($P < 0.01$)。与 M2 模型组比较, M2 片仔癀组上清中 IL-10 及 TGF- β_1 含量明显上调($P < 0.05, P < 0.01$), 细胞 Arg-1 mRNA 水平, Arg-1 及 p-STAT6 蛋白水平明显上调($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**片仔癀可以通过调节 BV2 的极化发挥抗炎作用。

[关键词] 片仔癀; 小胶质细胞; 极化; 抗炎; 中医药

[中图分类号] R2-0; R285; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)05-0048-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200541

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191120.1018.005.html>

[网络出版时间] 2019-11-20 10:38

Exploring Anti-inflammation Mechanism of Pien Tze Huang via Regulating of Microglia Polarization

SHU Hai-yang^{1,2}, FAN Dan-cai^{1,2}, ZHAO Ning¹, LYU Cheng¹, LYU Ai-ping³, HE Xiao-juan^{1*}

(1. *Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese*

Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. *The Second Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510504, China;*

3. *Law Sau Fai Institute for Advancing Translational Medicine in Bone and Joint Diseases, School of Chinese Medicine, Hong Kong Baptist University, Hong Kong 999077, SAR, China)*

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-inflammation mechanism of Pien Tze Huang (PTH) via regulating microglia polarization. **Method:** The experiment was divided into five groups, Blank, M1 [lipopolysaccharide (LPS) 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ + interferon- γ (IFN- γ) 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$], M1-PTH group [LPS 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ + IFN- γ 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ + PTH 0.4 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$], M2 group [interleukin-4 (IL-4) 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$], and M2-PTH group [IL-4

[收稿日期] 20190829(002)

[基金项目] 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(Z0551)

[第一作者] 舒海洋,在读博士,从事中西医结合基础研究, E-mail:457259776@qq.com

[通信作者] *何小鹏,博士,研究员,从事中西医结合基础研究, E-mail:hxj19@126.com

20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ + PTH 0.4 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]. The concentration of nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-10 (IL-10), and transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) in the culture supernatant were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and arginine-1 (Arg-1) mRNA were detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction technique (Real-time PCR), and the expression levels of p-STAT1, p-STAT3, iNOS, p-STAT6, and Arg-1 were detected by Western blot. **Result:** The concentration of NO and TNF- α of the culture supernatant, the level of iNOS mRNA, as well as the level of p-STAT1, p-STAT3 and iNOS in M1 group, which were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with blank group, but the concentration of NO and TNF- α were down-regulated ($P < 0.01$), and iNOS mRNA ($P < 0.05$), as well as the expression of iNOS, p-STAT1, and p-STAT3 was decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) after the invention of PTH in M1-PTH group compared with M1 group. The concentration of IL-10 and TGF- β_1 in the culture supernatant, the mRNA level of Arg-1, as well as the levels of p-STAT6 and Arg-1 were significantly increased in M2 group when compared with Blank group, addition to the concentration of IL-10 and TGF- β_1 were up-regulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the expression of Arg-1 mRNA, the level of Arg-1, p-STAT6 were enhanced ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in M2-PTH group compared with M2 group. **Conclusion:** PTH plays an anti-inflammatory role via regulating microglia polarization.

[**Key words**] Pien Tze Huang; microglia cell; polarization; anti-inflammation; traditional Chinese medicine

小胶质细胞是脑组织固有免疫细胞,相当于外周组织的巨噬细胞,生理情况下主要发挥免疫监护作用,病理情况,则广泛参与脑神经组织的损伤^[1]。小胶质细胞一方面可以激活极化为 M1 型,此型主要介导一系列炎症反应;同时也可以激活极化为 M2 型,此型主要发挥炎症抑制作用,二者保持动态平衡^[2]。病理情况下,小胶质细胞异常极化为 M1 型,分泌大量细胞毒性产物如肿瘤坏死因子- α (TNF- α),诱导性一氧化氮合酶-1 (iNOS),介导神经细胞的损伤或死亡^[3],因此抑制小胶质细胞异常 M1 型极化十分重要。

片仔癀(PTH)是由三七粉、牛黄、蛇胆、麝香等中药所组成的国家保护中药制剂,具有清热解毒、消肿止痛的功效。PTH 开始较多用于治疗热毒蕴结的肝炎、胆囊炎或肝癌等肝胆疾病^[4-5],近年来发现作为 PTH 组方的主要药物如三七粉、熊胆等具有多方面的抗炎作用^[6-8],且可以改善脑缺血再灌注所引起的炎症性神经损伤^[9],本课题组前期研究证实,片仔癀可以通过影响实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠的小胶质细胞极化从而改善其临床症状并抑制中枢神经系统炎症损伤^[10],但 PTH 在体外对神经小胶质细胞炎症的影响尚未见报道。脂多糖(LPS)是革兰氏阴性菌细胞壁中的成分之一,可以刺激小胶质细胞株(BV2)向 M1 型极化,介导炎症级联反应,而白细胞介素-4(IL-4)则可以刺激小胶质细胞株向 M2 型极化,发挥抑制炎症的作用^[11-12]。因此本研究采用 LPS 诱导 BV2 细胞的 M1 极化模

型,同时利用 IL-4 诱导 M2 极化模型,明确 PTH 对 BV2 极化的影响,从而为 PTH 在神经系统疾病领域的应用提供基础研究方面的证据。

1 材料

1.1 药物及试剂 片仔癀(漳州片仔癀药业股份有限公司,批号 1607039),本实验用含 10% 胎牛血清稀释至相应浓度;细胞增殖毒性检测(CCK-8)试剂盒(东仁化学科技有限公司,批号 KV560);LPS(美国 Sigma 公司,批号 025M4040V);干扰素- γ (IFN- γ),IL-4(美国 Pepro Tech 公司,批号分别是 061798,021749);胎牛血清(杭州四季青公司,批号 18110506);胰蛋白酶,青霉素-链霉素(美国 Gibco 公司,批号分别是 2042337,2068817);DMEM 高糖培养基(美国 Hyclone 公司,批号 AE24921270);TNF- α ,IL-10 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(法国 Diaclone 公司,批号分别是 210043T,2010-26);NO ELISA 试剂盒(美国 RD 公司,批号 P163481);转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)ELISA 试剂盒(美国 Invitrogen 公司,批号 200353031);实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)逆转录酶及扩增酶(北京艾德莱生物科技有限公司,批号分别为 PC5801,PC3301);引物精氨酸-1(Arg-1)上游 5'-CATATCTGCCAAAGACATCGTG-3',长度 22 bp,下游 5'-GACATCAAAGCTCAGGTGAATC-3',长度 22 bp; iNOS 上游 5'-TGCCACGGACGAGACGG ATAG-3',长度 21 bp,下游 5'-CTCTTCAAGCACCT CCAGGAACG-3',长度 23 bp;甘油醛-3-磷酸脱氢酶

(GAPDH) 上游 5'-AAGAAGGTGGTGAAGCAGG CATC-3', 长度 23 bp, 下游 5'-CGGCATCGAAGGTGG AAGAGTG-3', 长度 22 bp[生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成]; 一抗 p-STAT6, p-STAT1, iNOS, p-STAT3 抗体(美国 CST 公司, 批号分别为 56554S, 9167S, 13120S, 9145S); Arg-1, TREM-2 抗体(美国 SAB 公司, 批号分别为 4801, 5324); β -肌动蛋白(β -actin), 二抗山羊抗兔, 二抗山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G(碧云天生物技术有限公司, 批号分别为 AA128-1, A0208, A0216)。

1.2 细胞株 小胶质细胞瘤 BV2 细胞株(购自中国协和细胞库, 编号 3111C0001CCC000063)。

1.3 仪器 BSA124S 型电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司); 371 型二氧化碳培养箱[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; L500 型离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); DK-8D 型数显恒温水浴锅(金坛市城东新瑞仪器厂); Power Pac U 型电泳系统、多功能成像系统(美国伯乐公司); Synergy H1MF 型酶标仪(美国伯腾仪器有限公司); SW-OJ-1FD 型洁净工作台(苏静集团苏州安泰空气技术有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养和干预 BV2 细胞使用的完全培养基, DMEM(高糖) + 10% FBS + 1% PS, 每 2 d 换液 1 次, 细胞长至 90% 左右时传代。于 37 °C 5% CO₂, 饱和湿度的培养箱内培养。每隔 1 ~ 2 d 传代, 当 BV2 细胞贴壁且生长良好时接种于 96 孔板或 6 孔板以进行后续的实验。

2.2 CCK-8 法检测 BV2 细胞增殖 采用 CCK-8 法检测片仔癀对 BV2 细胞活力的影响。铺 96 孔板, 细胞种板密度为 1×10^4 个细胞/孔, 体积为 100 μ L, 种板 48 h 后, 弃去旧培养基, 用 PBS 洗 2 遍, 然后加入含有不同质量浓度(0.2, 0.4, 0.8, 1.6 $g \cdot L^{-1}$) 片仔癀的新鲜培养基作为实验组, 不含片仔癀的培养基作为空白组。每个浓度设置 6 个复孔, 孵育 45 h 后, 每孔加入 CCK-8 10 μ L, 置于 37 °C 5% CO₂ 的培养箱中, 再孵育 3 h, 使用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度 A, 进一步计算各浓度片仔癀细胞的存活率, 以确定片仔癀下一步实验的最适浓度。

2.3 分组及给药 收集生长状态良好的 BV2 细胞, 计数, 将细胞密度调整至 5×10^5 个/mL, 然后将细胞接种到 6 孔板, 2 mL/孔。约 24 h 后于细胞对数生长期, 弃去旧培养基, 用 PBS 缓冲液洗 2 遍, 设空白组, M1 模型组(LPS 100 $\mu g \cdot L^{-1}$, IFN- γ

10 $\mu g \cdot L^{-1}$), M1 片仔癀组(LPS 100 $\mu g \cdot L^{-1}$, IFN- γ 10 $\mu g \cdot L^{-1}$, PTH 0.4 $g \cdot kg^{-1}$), M2 模型组(IL-4 20 $\mu g \cdot L^{-1}$), M2 片仔癀组(IL-4 20 $\mu g \cdot L^{-1}$, PTH 0.4 $g \cdot kg^{-1}$)。

2.4 ELISA 检测 TNF- α , NO, IL-10, TGF- β_1 含量 细胞培养上清中 TNF- α , NO, IL-10, TGF- β 浓度的检测按照试剂盒说明书操作。

2.5 Real-time PCR 检测 iNOS 和 Arg-1 mRNA 的表达 收集各组细胞, 加入 trizol 1 mL, 吹打后室温静置 30 min, 提取 RNA, 进行逆转录及扩增。反应条件: 95 °C 变性 4 min; 95 °C 30 s, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 38 个循环; 72 °C 延伸 5 min。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算出各组细胞中目的 mRNA 相对表达量。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各蛋白的表达 收集各组细胞, 加入胰蛋白酶与磷酸酶抑制剂及裂解液, 冰上裂解 25 min, 4 °C 12 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 15 min, BCA 法定量后, 调整蛋白浓度, 水浴煮沸变性后添加 Loading buffer。各组取等量蛋白, 用 10% 的 SDS-PAGE 电泳, 采用湿转法 150 mA 120 min 将蛋白转移至 PVDF 膜上。采用封闭液封闭 2 h 后, TBST 清洗后, 分别加入 iNOS(1:1 000), p-STAT1(1:1 000), p-STAT3(1:2 000), Arg-1(1:1 000), p-STAT6(1:1 万), β -actin(1:1 000) 一抗, 4 °C 摇床孵育过夜。二抗(1:1 000) 室温孵育 2 h, TBST 清洗 3 次后, 添加显影液, 采用 Image lab 进行曝光处理, 并采用灰度值法进行半定量分析。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件分析数据, 所有数据均为计量资料, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组之间数据比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对 BV2 细胞活性的影响 与空白组比较, 片仔癀 1.6 $g \cdot kg^{-1}$, 0.8 $g \cdot kg^{-1}$ 组的细胞活性明显升高($P < 0.05$), 而片仔癀 0.4 $g \cdot kg^{-1}$, 0.2 $g \cdot kg^{-1}$ 组细胞活性无显著变化, 因此本实验后续采用片仔癀 0.4 $g \cdot kg^{-1}$ 进行实验。见表 1。

3.2 对 BV2 细胞 TNF- α , NO, IL-10, TGF- β_1 表达的影响 与空白组比较, M1 模型组细胞上清的 TNF- α 及 NO 均显著升高($P < 0.01$), 而 M1 片仔癀组细胞上清的 TNF- α 及 NO 含量较 M1 模型组显著降低($P < 0.01$); 与空白组比较, M2 模型组细胞上清中的 IL-10 与 TGF- β_1 含量均显著增加($P < 0.01$), 且 M2 片仔癀组较 M2 模型组增加更为显著($P < 0.01$)。见表 2。

表 1 片仔癀对 BV2 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of PTH on BV2 cell proliferation inhibition ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	细胞活性
空白	-	1.081 ± 0.033
片仔癀	0.2	1.182 ± 0.099
	0.4	1.047 ± 0.118
	0.6	1.238 ± 0.093 ¹⁾
	0.8	1.278 ± 0.087 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01。

表 2 片仔癀对细胞上清促炎因子或抑炎因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of PTH on concentration of pro or anti-inflammation cytokines in supernatant of BV2 cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$) ng·L⁻¹

组别	剂量	TNF-α	NO	IL-10	TGF-β ₁
空白	-	238.205 ± 21.775	33.903 ± 5.285	28.750 ± 6.793	504.791 ± 115.665
M1 模型	LPS 100 μg·L ⁻¹ + IFN-γ 10 μg·L ⁻¹	1 065.337 ± 29.457 ¹⁾	79.832 ± 6.815 ¹⁾	-	-
M1 片仔癀	LPS 100 μg·L ⁻¹ + IFN-γ 10 μg·L ⁻¹ + PTH 0.4 g·kg ⁻¹	848.533 7 ± 37.578 ³⁾	58.283 ± 3.495 ³⁾	-	-
M2 模型	IL-4 20 μg·L ⁻¹	-	-	235.284 ± 22.237 ¹⁾	1 718.760 ± 73.607 ¹⁾
M2 片仔癀	IL-4 20 μg·L ⁻¹ + PTH 0.4 g·kg ⁻¹	-	-	297.966 ± 10.947 ³⁾	2 008.929 ± 105.684 ²⁾

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(表 3,4 同)。

p-STAT3, iNOS 的表达显著升高 ($P < 0.01$), 与 M1 模型组比较, M1 片仔癀组细胞中 iNOS, p-STAT1, p-STAT3 蛋白的表达量明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与空白组比较, M2 模型组细胞中

3.3 对 BV2 细胞 iNOS 和 Arg-1 mRNA 表达的影响

与空白组比较, M1 模型组细胞中 iNOS mRNA 表达显著上调 ($P < 0.01$), 而 M1 片仔癀组与 M1 模型组比较则表达显著降低 ($P < 0.01$)。与空白组比较, M2 模型组细胞中 Arg-1 mRNA 显著上调 ($P < 0.01$), 与 M2 组比较 M2 片仔癀组明显升高 ($P < 0.05$)。见表 3。

3.4 对 p-STAT1, p-STAT3, iNOS 蛋白表达的影响

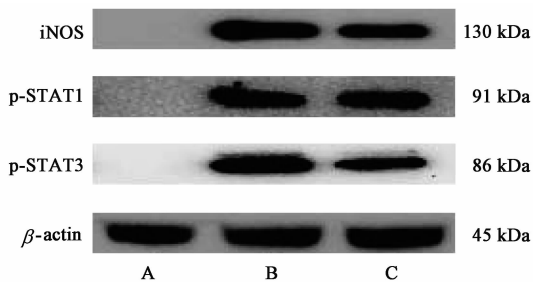
与空白组比较, M1 模型组细胞中 p-STAT1,

p-STAT6 及 Arg-1 的表达显著升高 ($P < 0.01$), 与 M2 模型组比较 M2 片仔癀组细胞中 p-STAT6 和 Arg-1 蛋白的表达明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 1, 2, 表 4。

表 3 片仔癀对 BV2 细胞 iNOS 和 Arg-1 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of PTH on level of iNOS and Arg-1 mRNA in BV2 cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

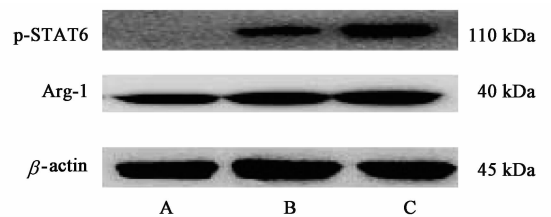
组别	剂量	iNOS mRNA	Arg-1 mRNA
空白	-	1.024 ± 0.208	1.010 ± 0.147
M1 模型	LPS 100 μg·L ⁻¹ + IFN-γ 10 μg·L ⁻¹	37.013 ± 13.018 ¹⁾	-
M1 片仔癀	LPS 100 μg·L ⁻¹ + IFN-γ 10 μg·L ⁻¹ + PTH 0.4 g·kg ⁻¹	8.329 ± 3.039 ³⁾	-
M2 模型	IL-4 20 μg·L ⁻¹	-	4.768 ± 1.223 ¹⁾
M2 片仔癀	IL-4 20 μg·L ⁻¹ + PTH 0.4 g·kg ⁻¹	-	6.787 ± 0.529 ²⁾



A. 空白组; B. M1 模型组; C. M1-PTH 组

图 1 BV2 细胞 iNOS, p-STAT1, p-STAT3 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of iNOS, p-STAT1, p-STAT3 expression in BV2 cells



A. 空白组; D. M2 模型组; E. M2-PTH 组

图 2 BV2 细胞 p-STAT6, Arg-1 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of p-STAT6, Arg-1 expression in BV2 cells

4 讨论

PTH 是中医传统名方, 其所包含的牛黄、蛇胆

表 4 片仔癀对 BV2 细胞 iNOS, p-STAT1, p-STAT3, p-STAT6, Arg-1 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of PTH on expression of iNOS, p-STAT1, p-STAT3, p-STAT6, Arg-1 level in BV2 cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量	iNOS/ β -actin	p-STAT1/ β -actin	p-STAT3/ β -actin	p-STAT6/ β -actin	Arg-1/ β -actin
空白	-	0.117 \pm 0.013	0.247 \pm 0.075	0.096 \pm 0.018	0.135 \pm 0.016	0.419 \pm 0.077
M1 模型	LPS 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ + IFN- γ 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	1.170 \pm 0.174 ¹⁾	1.073 \pm 0.104 ¹⁾	1.117 \pm 0.065 ¹⁾	-	-
M1 片仔癀	LPS 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ + IFN- γ 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ + PTH 0.4 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.723 \pm 0.109 ³⁾	0.869 \pm 0.048 ²⁾	0.751 \pm 0.144 ³⁾	-	-
M2 模型	IL-4 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	-	-	-	0.427 \pm 0.091 ¹⁾	0.653 \pm 0.053 ¹⁾
M2 片仔癀	IL-4 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ + PTH 0.4 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	-	-	-	0.760 \pm 0.107 ³⁾	0.855 \pm 0.037 ²⁾

尤善清热解毒,麝香尤善活血通经,消肿止痛,三七粉尤善散瘀消肿,其在治疗急慢性肝炎,肝癌,以及各种炎症所引起的发热疼痛,均具有良好的效果^[8]。现代研究证明三七粉皂苷可以显著降低脑梗死小鼠模型 iNOS 的水平,改善脑的免疫微环境^[13-15]。本课题组之前的研究证明,PTH 在体内可以通过调节小胶质细胞的极化,从而显著改善实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠的临床症状并抑制其中枢神经系统的炎症^[10]。由于发生 M1 型极化的小胶质在细胞主要分泌促炎因子如 NO, TNF- α 等,而发生 M2 型极化的小胶质细胞主要分泌抑炎因子如 IL-10, TGF- β 等^[16],因此为了明确 PTH 对小胶质细胞的极化影响及其发挥抗炎作用的机制,本实验首先利用 LPS 及 IFN- γ 诱导 BV2 细胞构建 M1 型极化模型,并用片仔癀对模型进行干预。通过比较细胞上清 NO, TNF- α 炎症因子的浓度来评估片仔癀对 M1 型细胞极化的作用。其次利用细胞因子 IL-4 诱导 BV2 细胞构建 M2 型极化模型,并检测细胞上清中 IL-10, TGF- β 抑炎因子浓度来评估片仔癀对 M2 型细胞极化的影响。ELISA 检测结果显示,经 LPS + IFN- γ 诱导后 BV2 细胞上清中的 NO, TNF- α 浓度明显增加,表明 BV2 细胞株 M1 型极化模型构建成功。而加入片仔癀干预后 M1 模型细胞上清的炎症因子浓度显著降低,提示 PTH 可以抑制 M1 型的功能。另一方面,经 IL-4 诱导后 BV2 细胞上清中的 IL-10, TGF- β 浓度明显上升,表明 M2 型极化模型构建成功。而经 PTH 干预后这些抑炎因子浓度进一步增加,提示 PTH 具有增强 M2 型功能的作用。

iNOS 是 NO 合成过程中的重要的催化酶^[17]。研究证明, BV2 细胞经 LPS 诱导发生 M1 型极化后 iNOS 大量表达,因此常被认为是小胶质细胞 M1 型极化的标志性蛋白^[16, 18]。精氨酸酶-1 (Arg-1) 是一种双核锰金属合酶,主要通过调控细胞内精氨酸的浓度限制 NO 的合成,并常被当作小胶质细胞发生

M2 型极化的标志^[19]。为了进一步明确 PTH 对 BV2 细胞极化的作用,本实验检测了 BV2 细胞株 M1 型极化的标志性蛋白 iNOS 以及 M2 型极化的标志蛋白 Arg-1 的 mRNA 表达水平及蛋白表达水平。结果表明片仔癀干预显著抑制了 LPS + IFN- γ 诱导的 iNOS 表达上调。另一方面,片仔癀处理明显促进了 IL-4 诱导的 Arg-1 表达上调。这也与本课题组之前的研究相吻合,片仔癀通过调控小胶质细胞极化来治疗进展型 EAE^[20],本实验与课题组之前的研究分别从体内体外两个途径较充分的证明了片仔癀调节小胶质细胞极化的功效。

JAK/STAT 通路是中枢神经系统介导炎症和免疫反应的关键信号^[17-18],动物实验证实片仔癀可以调控 STATs 的磷酸化水平^[21-22]。由于 STAT1 及 STAT3 通路是小胶质细胞发生 M1 型极化的重要信号通路,而 STAT6 通路则是 M2 型极化的重要信号通路,因此在本研究中笔者检测了 STAT1, STAT3 以及 STAT6 蛋白的磷酸化水平。结果显示片仔癀可以抑制 LPS + IFN- γ 诱导的 p-STAT1 及 p-STAT3 表达上调,并促进 IL-4 诱导的 p-STAT6 表达上调,这也与课题组之前的动物实验结果相一致^[20]。

综上,笔者发现 PTH 可以通过调控小胶质细胞极化发挥抗炎作用,这无疑为其临床应用提供了更为坚实的依据。然而,与其他中药复方一样,片仔癀成分复杂,其中究竟是哪些成分在小胶质细胞的极化中发挥了作用,仍有待进一步探索。

【参考文献】

[1] 李莹,杜旭飞,杜久林. 小胶质细胞的生理特性和功能[J]. 生理学报, 2013, 65(5): 471-482.
[2] 尚进. 活化小胶质细胞在急性脑梗死中的作用机制[J]. 中国地方病防治杂志, 2016, 31(9): 982-985.
[3] 潘显梅,杨碧莹,杜宝新,等. 健脾益肺方对肌萎缩侧索硬化 hSOD1-G93A 转基因小鼠脊髓 p38 MAPK 蛋白及炎症因子表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂

- 志, 2018, 24(15):155-160.
- [4] 钟蕊, 段钟平, 陈煜, 等. 片仔癀治疗慢性乙型肝炎的临床研究 [J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2017, 26(11):1290-1293.
- [5] 郭珮蕾, 刘吉华, 余伯阳. 片仔癀体外抗肿瘤作用研究 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3):171-173.
- [6] 尚敏, 王玉萍, 万春艳, 等. 复方熊胆滴眼剂抗炎、抑菌作用的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2000, 6(3):42-43.
- [7] 崔宇, 李晓栩, 黄斌. 三七粉和银杏叶片对高原脱习服大鼠心功能及血清炎症因子的影响及其机制 [J]. 中国应用生理学杂志, 2019, 35(1):34-38.
- [8] 黄秋妹, 许文, 沙玫, 等. 片仔癀的药理及临床研究进展 [J]. 海峡药学, 2017, 29(5):60-64.
- [9] 张小琴, 侯丽颖, 强国芳, 等. 片仔癀对局灶性脑缺血/再灌注大鼠皮质中 NMDAR1 和 GluR2 表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(2):288-292.
- [10] QIU X, GUO Q, LU A, et al. Pien Tze Huang alleviates relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis mice by regulating Th1 and Th17 cells [J]. Front Pharmacol, 2018, 9:1237.
- [11] 王欢, 熊梅, 张滔, 等. IL-4 对脂多糖激活的小鼠小胶质细胞炎症相关因子表达的影响 [J]. 临床和实验医学杂志, 2013, 12(23):1877-1880.
- [12] 常佳慧, 赵晖, 王蕾, 等. 侯氏黑散化学成分对脂多糖诱导 BV2 细胞活化中炎症反应因子分泌平衡的影响 [J]. 首都医科大学学报, 2017, 38(2):213-219.
- [13] 姚茹冰, 赵智明, 蔡辉. 活血化痰中药三七粉抗炎及免疫调节作用研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2009, 7(6):720-721.
- [14] 唐婧姝, 裴清华. 三七粉总皂苷对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15):210-213.
- [15] 王时云, 罗海芸, 吴兰鸥. 三七粉皂苷改善实验性脑异常微环境及机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(1):328-332.
- [16] 陈浩, 师亮, 王燕宏, 等. 甘草黄酮对 MPTP 帕金森病模型小鼠的神经保护效应及对小胶质细胞活化的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(20):225-229.
- [17] 楚冬海, 张振秋. 瓜蒌皮提取物基于 PI3K/Akt/NO 信号通路保护缺氧/复氧损伤心肌细胞的机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(22):42-48.
- [18] JAE-WON L, JUN B C, YONG-JUN C, et al. 3,4,5-trihydroxycinnamic acid inhibits LPS-induced iNOS expression by suppressing NF- κ B activation in BV2 microglial cells [J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2012, 16(2):107-112.
- [19] 路艳, 陈莹, 陆庆明, 等. 大鼠创伤失血性休克心肌巨噬细胞极化标志蛋白变化规律研究 [J]. 生物技术进展, 2017, 7(3):225-229, 264-265.
- [20] QIU X, LUO H, LIU X, et al. Therapeutic potential of pien tze huang on experimental autoimmune encephalomyelitis rat [J]. J Immunol Res, 2018, doi: 10.1155/2018/2952471.
- [21] ZHUANG Q, HONG F, SHEN A, et al. Pien Tze Huang inhibits tumor cell proliferation and promotes apoptosis via suppressing the STAT3 pathway in a colorectal cancer mouse model [J]. Int J Oncol, 2012, 40(5):1569-1574.
- [22] 贺一新, 石海莲, 刘宏帅, 等. 黄芩甲苷调控 STAT1/I κ B/NF- κ B 信号通路抑制 γ -干扰素诱导 BV-2 细胞激活 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(1):124-128.

[责任编辑 孙丛丛]