

## · 基础研究 ·

## 肉豆蔻提取物对小鼠小胶质 BV2 细胞环氧合酶 2 表达的影响\*

崔春爱, 毛 翹, 金德山, 张庆镐<sup>△</sup>

(延边大学基础医学院, 吉林延吉 133000)

**摘要:**目的 探讨肉豆蔻提取物对小鼠小胶质 BV2 细胞的作用机制。方法 运用 WST-8 法检测肉豆蔻提取物对小鼠小胶质 BV2 细胞生存率的影响, 倒置显微镜观察其形态学改变, Western Blot 检测脂多糖(LPS)所诱导的小鼠小胶质细胞环氧合酶 2(COX-2)的表达。结果 肉豆蔻提取物对小鼠小胶质 BV2 细胞无明显毒性; 可抑制谷氨酸对小鼠小胶质 BV2 细胞的形态学损害; 抑制 LPS 所诱导的小鼠小胶质 BV2 细胞 COX-2 的表达。结论 肉豆蔻提取物对小鼠小胶质 BV2 小胶质细胞具有保护作用。

**关键词:**小神经胶质细胞; 环加氧酶; 肉豆蔻提取物; 谷氨酸; 脂多糖类

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.17.027

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)17-1731-02

## Effects of myristica fragrans extracts on expression of cyclooxygenase 2 in murine microglial BV2 cells\*

Cui Chunai, Mao Qiao, Jin Deshan, Zhang Qinggao<sup>△</sup>

(Faculty of Basic Medical Sciences, Yanbian University, Yanji, Jilin 133000, China)

**Abstract:** Objective To study the mechanism of myristica fragrans extracts on murine microglial BV2 cells. **Methods** WST-8 method was used to detect the effect of myristica fragrans extract on viability rate of murine microglial BV2 cells, inverted microscope was employed to observed its morphological changes and Western Blot was conducted to measure the expression of cyclooxygenase 2(COX-2) in murine microglial BV2 cells induced by lipopolysaccharide(LPS). **Results** Myristica fragrans extracts showed no sign of obvious toxicity on murine microglial BV2 cells, but it could inhibit glutamic acid caused damage to murine microglial BV2 cells and inhibit expression of COX-2 in murine microglial BV2 cells induced by LPS. **Conclusion** Myristica fragrans extracts show a protective effect on murine microglial BV2 cells.

**Key words:** microglia; cyclooxygenase; myristica fragrans extracts; glutamic acid; lipopolysaccharides

神经退行性疾病是一系列以神经元凋亡为特征的神经疾病的总称, 可导致学习和记忆力下降, 如阿尔茨海默病 (alzheimer's disease, AD)、帕金森病 (parkinson's disease) 及亨廷顿病 (huntington's disease, HD) 等<sup>[1]</sup>。流行病学研究表明, 长时间应用非甾体类消炎药可降低患 AD 的危险性, 改善症状, 但易导致胃肠道出血, 长期服用时具有一定的危险性。肉豆蔻提取物是从肉豆蔻科高大乔木植物 Myristica fragrans 中提取的天然成分, 常作食用佐料<sup>[2-3]</sup>, 并可抑制脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的大鼠脑内小胶质细胞的激活及空间学习记忆的降低<sup>[4-6]</sup>。小胶质细胞作为中枢神经系统内的免疫细胞, 既可通过吞噬脑组织中的病原体及有害颗粒对神经元起保护作用, 又可在致炎因子的作用下激活成反应性小胶质细胞, 分泌炎性细胞因子, 对神经元起毒性作用<sup>[7-8]</sup>, 是治疗神经炎症及神经退行性疾病的一个重要靶点<sup>[9-10]</sup>, 本课题主要对小胶质细胞功能的调控进行研究, 使其向保护神经元的方向发展。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂** 小鼠小胶质 BV2 细胞购自韩国细胞株银行; DMEM 细胞培养基及小牛血清为 GIBCO 公司产品; WST-8 试剂盒为日本株式会社同仁化学研究所 Dojindo 产品; LPS、兔抗小鼠环氧合酶 2(cyclooxygenase 2, COX-2) 多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 及常规试剂均购自美国 Sigma 公司。

**1.2 细胞培养** 小鼠小胶质 BV2 细胞以适量细胞密度接种于培养瓶中, 加入含 10% 小牛血清、100 U/mL 青霉素及 100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养液, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培

养箱中常规培养、传代。

**1.3 WST-8 法检测** 将对数生长期小鼠小胶质 BV2 细胞密度调整至  $1 \times 10^5$  个/mL, 接种于 96 孔板。将细胞分为对照组及肉豆蔻组。对照组加等量生理盐水; 肉豆蔻组用质量浓度为 10、20、50 μg/mL 的肉豆蔻提取物处理小鼠小胶质 BV2 细胞。培养 22 h 后, 加入 WST-8 试剂 10 μL/孔, 再培养 2 h, 用 450 nm 波长测定吸光度。每组设 8 复孔、实验重复 3 次, 取平均值, 检测肉豆蔻提取物对小鼠小胶质 BV2 细胞生存率的影响。

**1.4 形态学观察** 将对数生长期小鼠小胶质 BV2 细胞密度调整至  $1 \times 10^5$  个/mL, 接种于直径为 60 mm 的培养皿上, 细胞贴壁后, 实验分对照组 (等量生理盐水)、谷氨酸组 (谷氨酸终浓度为 5 μg/mL) 及谷氨酸-肉豆蔻联合组 (终浓度为 5 μg/mL 的谷氨酸及 20 μg/mL 的肉豆蔻提取物), 细胞分组处理 24 h 后, 在倒置显微镜下进行观察。

**1.5 Western Blot 检测** 接种于培养基的细胞完全贴壁后, 实验分对照组 (等量生理盐水)、LPS 组 (LPS 终浓度为 1 μg/mL) 及 LPS-肉豆蔻联合组 (终浓度为 1 μg/mL 的 LPS 及终浓度分别为 10、20、50 μg/mL 的肉豆蔻提取物)。培养 24 h 后, 在冰上收集细胞, 提取蛋白质。样品上样于 10% 的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶, 在电压 70~100 V 电泳 1.5~2 h, 转膜至二氟化树脂膜 (polyvinylidene fluoride membrane, PVDF) 上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 兔抗小鼠 COX-2 多克隆抗体 (1:1000) 为一抗, HRP 标记的羊抗兔 IgG (1:5000) 为二抗进行反应, 增强型化学发光剂 (enhanced chemiluminescence, ECL) 显色后观察。

1.6 统计学处理 采用 Statview(SAS Inc)软件,实验数据采用  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肉豆蔻提取物对小鼠小胶质 BV2 细胞生存率的影响

WST-8 法检测显示,肉豆蔻提取物作用于小鼠小胶质 BV2 细胞 24 h,不同质量浓度的肉豆蔻提取物组与对照组相比,细胞生存率无明显影响(见图 1),表明肉豆蔻提取物对小鼠小胶质 BV2 细胞无毒性作用。

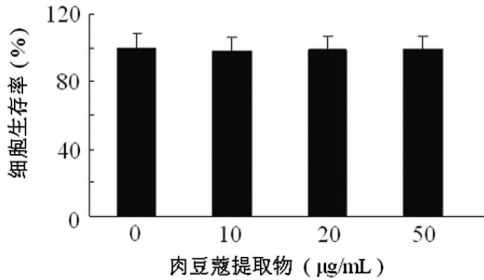
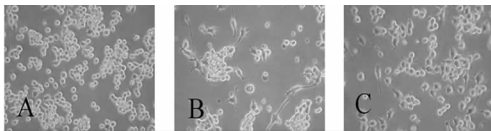


图 1 肉豆蔻提取物对小鼠小胶质 BV2 细胞生存率的影响

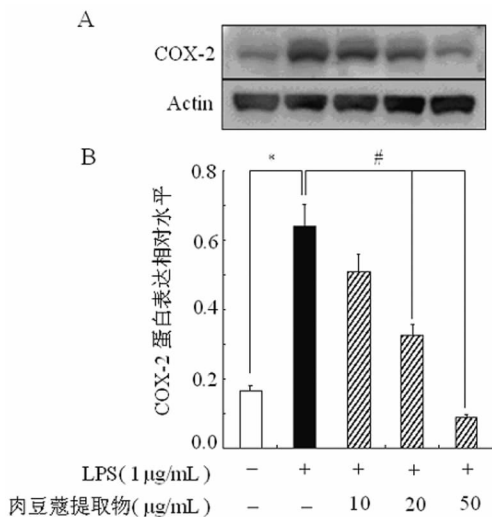
### 2.2 谷氨酸及肉豆蔻提取物对小鼠小胶质 BV2 细胞形态学的影响

谷氨酸是小胶质细胞被激活后产生的兴奋性神经毒物质,在神经细胞缺血、缺氧、退行性病变及炎症损伤等方面发挥重要作用。本实验对对照组的细胞呈圆形或椭圆形,细胞间连接紧密,生长旺盛(见图 2A);谷氨酸组细胞肿胀,部分细胞脱壁、悬浮,增殖减慢,细胞周围碎片增多(见图 2B);谷氨酸-肉豆蔻联合组细胞呈圆形或椭圆形,细胞间连接紧密,细胞生长旺盛(见图 2C),表明肉豆蔻提取物抑制了谷氨酸对小鼠小胶质 BV2 细胞的损害作用,显示其神经保护作用。



A: 对照组; B: 谷氨酸组; C: 谷氨酸-肉豆蔻联合组

图 2 小鼠小胶质 BV2 细胞的形态学观察 (倒置显微镜  $\times 40$ )



\*:  $P < 0.05$ , 与对照组相比; #:  $P < 0.05$ , 与 LPS 组相比。

图 3 LPS 和肉豆蔻提取物对小鼠小胶质 BV2 细胞 COX-2 表达的影响

### 2.3 LPS 及肉豆蔻提取物对小鼠小胶质 BV2 细胞 COX-2 表

达的影响 与对照组相比,LPS 组 COX-2 的表达明显增加,LPS(1 μg/mL)分别与终浓度为 10、20、50 μg/mL 的肉豆蔻提取物联合处理后,COX-2 的表达随浓度的增加而减少(图 3A)。将 Western Blot 表达结果,运用 Sigmaplot 软件进行量化,显示 LPS 组与对照组之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。LPS-肉豆蔻联合组与 LPS 组之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(见图 3B),表明肉豆蔻提取物可抑制一些炎症因子的释放,具有抗炎作用。

## 3 讨论

AD 是一种以进行性认知障碍和记忆力损害为主的中枢神经系统退行性疾病。AD 的关键性特征之一是脑内神经炎症反应。 $\beta$  淀粉样蛋白沉积,激活小胶质细胞引起的炎症反应是其病理机制<sup>[11]</sup>。AD 患者脑内激活的小胶质细胞,产生大量过氧化物、谷氨酸、一氧化氮、ATP、神经生长因子(nerve growth factor,NGF)及一些前炎症细胞因子,具有潜在神经毒性作用。Myristica fragrans 是肉豆蔻科高大乔木植物肉豆蔻,具有抗血小板凝集、抗真菌及抗炎等多种作用<sup>[12-14]</sup>。本实验肉豆蔻提取物作用于小鼠小胶质 BV2 细胞 24 h 后,细胞生存率与对照组相比,无显著差异,提示其对细胞无毒性作用;肉豆蔻提取物还可抑制由谷氨酸所导致的小鼠小胶质 BV2 细胞形态学改变,表明其对小胶质细胞具有神经保护作用。COX-2 是花生四烯酸转化为前列腺素的关键酶,在受到 LPS 及炎症因子等刺激后,呈诱导型高表达,是炎症过程中的诱导酶,通过调节氧化应激和炎症反应参与各种疾病的发病过程<sup>[15]</sup>。COX-2 的表达调控主要在转录水平,即细胞受到细胞内外的各种刺激后,经过一系列的信号传导促进 COX-2 转录及表达。LPS 也称为细菌内毒素,可刺激大鼠神经细胞产生炎症因子。本课题前期研究采用微型渗透泵将 LPS 以 0.25 μL/h 的速度自动注入大鼠第四脑室达 28 d 后,大鼠的空间学习和记忆能力受到影响,在大脑海马区可见到大量被兔抗鼠单克隆 OX-6 抗体染成灰色的具有活性的小胶质细胞<sup>[4]</sup>。本实验中,LPS 明显增加小鼠小胶质 BV2 细胞的 COX-2 蛋白表达,与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),与在体实验相符;LPS 与肉豆蔻提取物联合处理后细胞 COX-2 的表达随药物浓度的增加而减少,与 LPS 组之间差异有统计学意义,提示肉豆蔻提取物发挥了抗炎作用。

综上所述,肉豆蔻提取物抑制 LPS 所诱导的小胶质细胞的激活及炎症因子的释放,这可能是其抑制神经炎症的发生和发展,提高学习和记忆能力的重要机制之一。

## 参考文献:

- [1] Politis M, Pavese N, Tai YF, et al. Microglial activation in regions related to cognitive function predicts disease onset in Huntington's disease: A multimodal imaging study[J]. Hum Brain Mapp, 2011, 32(2): 258-270.
- [2] Hamada S, Koga T, Ooshima T. Virulence factors of Streptococcus mutans and dental caries prevention[J]. J Dent Res, 1984, 63(3): 407-411.
- [3] Loesche WJ. Role of Streptococcus mutans in human dental decay[J]. Microbiol Rev, 1986, 50(4): 353-380.
- [4] Cui CA, Jin DQ, Hwang YK, et al. Macelignan attenuates LPS-induced inflammation and reduces LPS-induced spatial learning impairments in rats[J]. Neurosci Lett, 2008, 448(1): 110-114.
- [5] Jin DQ, Lim CS, Hwang JK, et al. Anti-(下转第 1735 页)

染色发现细胞中含有大小不等脂肪滴,脂滴被染成橙红色,进一步证实了低温冻存不会影响 hCDMSC 的多向分化诱导能力。

hCDMSC 的冻存和复苏在一定程度上弥补了其在体外不能连续培养的不足,并满足了人们对种子细胞的需求,在实验和研究中具有重要意义。冻存过程中低温保护剂的种类、配法、降温复温的程序和时间等直接关系到细胞冻存的成败。DMSO 是常用的细胞保护剂,相对分子质量小,溶解度大,易穿透细胞膜,在细胞冷冻前保护细胞免受高浓度电解质的损害,同时水分不会过分外渗。本研究采用的冻存液对冻存复苏后的细胞活力、增殖以及多向诱导分化能力没有影响,在实际应用中具有可行性,这项研究为组织工程中具有潜力的种子细胞-hCDMSC 的大量及长期保存积累了实验资料。

#### 参考文献:

[1] Fehrer C, Lepperding G. Mesenchymal stem cell aging [J]. *Exp Gerontol*, 2005, 40(12): 926-230.

[2] Parolini O, Caruso M. Review: Preclinical studies on placenta-derived cells and amniotic membrane: an update [J]. *Placenta*, 2011, 32 Suppl 2: S186-195.

[3] Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(2): 300-311.

[4] Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D. et al. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential [J]. *Stem Cells*, 2004, 22(5): 649-658.

[5] 樊艳, 张卫泽, 陈永洁, 等. 成人脂肪间充质干细胞冻存前后的生物学特性 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(25): 4882-4886.

[6] 沙文琼, 王自能, 王冬菊. 人胚胎滋养细胞和胎盘间充质干细胞的分离与纯化 [J]. *中国组织工程研究与临床康*

复, 2010, 14(10): 1833-1837.

[7] Soncini M, Vertua E, Gibelli L, et al. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2007, 1(4): 296-305.

[8] 刘志辉, 周延民, 万博蔚, 等. 体外定向诱导人胎盘源间充质干细胞向内皮细胞分化 [J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2010, 36(3): 500-507.

[9] Mohr S, Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, et al. Generation of an osteogenic graft from human placenta and placenta-derived mesenchymal stem cells [J]. *Reprod Sci*, 2010, 17(11): 1006-1015.

[10] Barlow S, Brooke G, Chatterjee K, et al. Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2008, 17(6): 1095-1107.

[11] Yen BL, Huang HI, Chien CC, et al. Isolation of multipotent cells from human term placenta [J]. *Stem Cells*, 2005, 23(1): 3-9.

[12] Wang Y, Nathanson L, McNiece IK. Differential Hematopoietic Supportive Potential and Gene Expression of Stroma Cell Lines from Midgestation Mouse Placenta and Adult Bone Marrow [J]. *Cell Transplant*, 2010, Nov 5.

[13] 邹旭凤, 于润红, 刘玉峰. 胎盘间充质干细胞对骨髓、脐血、胎盘不同来源造血干细胞的体外扩增支持作用比较 [J]. *中国实用医刊*, 2009, 36(19): 32-33.

[14] 霍思维, 苏永锋, 刘元林, 等. 人胎盘间充质干细胞对脐血 CD34<sup>+</sup> 细胞迁移作用的影响 [J]. *中国科学生命科学*, 2010, 40(5): 399-407.

[15] Nur Fariha MM, Chua KH, Tan GC, et al. Human chorion-derived stem cells: changes in stem cell properties during serial passage [J]. *Cytherapy*, 2011, 13(5): 582-593.

(收稿日期: 2011-02-16 修回日期: 2011-04-11)

(上接第 1732 页)

oxidant and anti-inflammatory activities of macelignan in murine hippocampal cell line and primary culture of rat microglial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331(4): 1264-1269.

[6] Ma J, Hwang YK, Cho WH, et al. Macelignan attenuates activations of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor kappa B induced by lipopolysaccharide in microglial cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(6): 1085-1090.

[7] Akiyama H, Barger S, Barnum S, et al. Inflammation and Alzheimer's disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2000, 21(3): 383-421.

[8] Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, et al. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism [J]. *Ann Neurol*, 2005, 57(1): 67-81.

[9] Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8(1): 57-69.

[10] Block ML, Hong JS. Microglia and inflammation-mediated

neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism [J]. *Prog Neurobiol*, 2005, 76(2): 77-98.

[11] McGeer EG, McGeer PL. Inflammatory processes in Alzheimer's disease [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2003, 27(5): 741-749.

[12] Capasso R, Pinto L, Vuotto ML, et al. Preventive effect of eugenol on PAF and ethanol-induced gastric mucosal damage [J]. *Fitoterapia*, 2000, 71 Suppl 1: S131-137.

[13] Morita T, Jinno K, Kawagishi H, et al. Hepatoprotective effect of myristicin from nutmeg (*Myristica fragrans*) on lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced liver injury [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(6): 1560-1565.

[14] Sonavane GS, Sarveiya VP, Kasture VS, et al. Anxiogenic activity of *Myristica fragrans* seeds [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2002, 71(1/2): 239-244.

[15] 王世飞, 安伟. COX-2、VEGF 在鼻息肉中的表达及其临床意义 [J]. *重庆医学*, 2010, 39(8): 905-906.

(收稿日期: 2010-12-09 修回日期: 2011-01-28)