

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.22.004

紫铆因抑制脂多糖诱导小胶质细胞炎症反应的作用机制研究*

付媛¹, 杨浩池², 陆睿², 陈明会², 李剑星², 吕婕², 刘亦恒³, 张海英^{2△}

(1. 广东医科大学人体解剖学教研室, 广东东莞 523808; 2. 海南医学院人体解剖学教研室, 海口 571101; 3. 海南省海口市人民医院骨科中心 570208)

[摘要] **目的** 探讨紫铆因抑制脂多糖(LPS)诱导 BV2 小胶质细胞炎症反应的作用机制。**方法** 以 LPS 诱导 BV2 小胶质细胞活化建立体外神经炎症细胞模型。MTT 法检测紫铆因对 BV2 细胞存活率的影响; qPCR 法检测各组细胞中炎症因子白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的 mRNA 表达水平; Western blot 法检测各组细胞内核因子- κ B(NF- κ B) p65 和 ERK 信号通路相关蛋白的表达变化; 免疫荧光染色观察各组细胞内 NF- κ B p65 的核转录活性变化。**结果** 紫铆因干预 BV2 细胞 24 h 后, 对细胞活力无明显影响; 紫铆因能显著下调 LPS 诱导 BV2 细胞活化后炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 表达水平; 紫铆因能明显降低 LPS 诱导 BV2 细胞活化后, ERK 信号通路相关蛋白的磷酸化水平, 并且能有效抑制 NF- κ B p65 的核转录活性, 阻止其向核内转移。**结论** 紫铆因可以抑制 LPS 诱导的小胶质细胞活化, 降低 BV2 小胶质细胞的炎症反应。

[关键词] 紫铆因; 神经炎症; 小胶质细胞; 核因子- κ B; ERK 信号通路

[中图分类号] R322.8

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)22-2896-05

Study on mechanism of butein on inhibiting LPS induced microglia inflammatory reaction*

FU Yuan¹, YANG Haochi², LU Rui², CHEN Minghui², LI Jianxing²,

LV Jie², LIU Yihen³, ZHANG Haiying^{2△}

(1. Department of Human Anatomy, Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong 523808, China; 2. Department of Human Anatomy, Hainan Medical College, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Haikou Municipal People's Hospital, Haikou, Hainan 570208, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of butein on inhibiting LPS induced BV2 microglia inflammatory reaction. **Methods** LPS induced BV2 microglia activation was used to establish the in vitro neuroinflammation cell model. The MTT assay was used to detected the effects of butein on BV2 cells survival rate; the inflammatory factor IL-1 β , IL-6 and TNF- α mRNA expression levels were measured by qPCR; the NF- κ B p65 protein expression and ERK signaling pathway related protein expression changes were detected by Western blot; NF- κ B p65 nuclear transcriptional activity in each group was detected by immunofluorescence staining. **Results** Butein intervention on BV2 cells for 24 h, had no effect on cell viability; butein could significantly inhibit IL-1 β , IL-6 and TNF- α mRNA expression level after LPS inducing BV2 cell activation; butein could significantly reduce ERK signaling pathway related proteins phosphorylation level after LPS inducing BV2 cells activation, moreover could effectively inhibit the NF- κ B p65 nuclear transcriptional activity, and prevent it transfer to intranuclear. **Conclusion** Butein can inhibit LPS induced BV2 microglia activation and reduces the inflammatory reaction of microglia.

[Key words] butein; neuroinflammation; microglia; NF- κ B; ERK signal pathway

小胶质细胞是位于中枢神经系统内的固有的巨噬细胞样免疫效应细胞, 同时也是脑内神经炎症调节过程中的主要效应细胞^[1-2]。但当小胶质细胞被异常激活, 长期处于过度活化状态时, 可以产生大量的炎症介质和炎症因子, 引起慢性炎症反应, 损伤神经元, 使神经元退化、变性甚至死亡^[3]。漆树科植物漆树

(*Rhus verniciflua* Stokes)皮中含有丰富的黄酮类物质, 其活性成分有紫铆因。研究发现, 紫铆因具有抗氧化、抗炎症、诱导肿瘤细胞凋亡等多种药理作用^[4]。因此, 本研究拟用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)作为诱导激活剂, 用 BV2 细胞系作为小胶质细胞的体外模型细胞, 建立体外神经炎症模型, 探讨紫铆因对 LPS 诱导小

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81100246; 81660224); 海南省重点研发计划项目(ZDYF2017120); 大学生创新创业训练计划项目(HYCX2016010)。作者简介: 付媛(1989—), 硕士, 主要从事神经退行性病变研究。△ 通信作者, E-mail: hyzhang_xjtu2013@aliyun.com。

胶质细胞活化引起炎症反应的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 BV2 小鼠小胶质细胞系购自中国科学院昆明细胞库;紫柳因、脂多糖、MTT 购自 Sigma 公司; TRIzol Reagent 购自 Life Invitrogen 公司; Taq SYBR Green qPCR Premix 购自 Nova 公司; HRP 山羊抗小鼠 IgG、HRP 驴抗兔 IgG 购自 Thermo 公司; Cy3 山羊抗兔 IgG 购自 Millipore 公司;β-actin 小鼠单克隆抗体购自 Sigma 公司;p44/42 MAPK(ERK1/2)兔单克隆抗体、Phospho-p44/42 MAPK(ERK1/2)兔单克隆抗体、MEK1/2 兔单克隆抗体、Phospho-MEK1/2 兔单克隆抗体、Phospho-c-Raf 兔单克隆抗体、NF-κB p65 兔单克隆抗体购自 Cell Signalling 公司;Raf-1 兔单克隆抗体购于 Abcam 公司;Lamin B 兔多克隆抗体购于 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 BV2 小胶质细胞使用含 10% 胎牛血清和 1% 的青链霉素的 RPMI 1640 培养基,培养于 25 cm² 的细胞瓶中,置 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。实验分为正常组:BV2 细胞正常培养,不添加任何干预因素;模型组:LPS(10 μg/mL)诱导 BV2 小胶质细胞活化;实验组:紫柳因(1、10、30 μg/mL)预处理 2 h 后,与 LPS(10 μg/mL)共培养。培养 24 h 后,收集细胞用于后续实验。

1.2.2 MTT 法检测紫柳因对小胶质细胞存活率的影响 取对数生长期的正常 BV2 细胞,以 1×10⁵ 个/mL 密度接种于 96 孔板,培养过夜后换无血清培养基进行加药处理,加入不同浓度紫柳因(0、1、10、30、50、100 μg/mL)继续培养,每组设 6 个复孔,24 h 后进行 MTT 实验,检测细胞存活率,实验重复 3 次。

1.2.3 qPCR 法检测炎症因子 IL-1β、IL-6、TNF-α mRNA 的表达变化 根据实验分组收集细胞按 TRIzol 说明书提取 RNA,检测所提 RNA 纯度及完整性,根据 HiFi-MMLV cDNA Kit 说明书进行反转录反应合成 cDNA,根据 Taq SYBR Green qPCR Premix 进行 qPCR 反应,观察炎症因子 IL-1β、IL-6、TNF-α mRNA 的表达,引物于 NCBI 网站设计,并经过比对,由上海生工公司合成,具体序列见表 1;反应参数为:94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 10 s,60 °C 退火 15s,72 °C 延伸 30 s,共 40 个循环,以 GAPDH 为内参扩增目的基因,用 2^{-ΔΔCt} 方法进行相对定量分析,实验重复 3 次。

1.2.4 Western blot 检测 NF-κB p65、ERK 信号通路相关蛋白的表达 根据实验分组收集细胞,根据细胞核蛋白和浆蛋白提取试剂盒提取核蛋白和胞浆蛋白,用 RAPI 裂解液提取总蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度后,取 30 μL 上样经 SDS-PAGE 电泳后转移到 NC 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,β-actin (1 : 5 000),p-ERK(1 : 2 000)、ERK、MEK、p-MEK、

Raf、p-Raf、NF-κB p65 均(1 : 1 000)4 °C 摇床低速孵育过夜;加入 HRP 标记的二抗(1 : 5 000)室温轻摇孵育 1 h,于凝胶成像仪中显影拍照,以 β-actin 作为内参确定组间目标蛋白表达的差异和变化,实验重复 3 次。

表 1 qPCR 引物序列

基因	序列
IL-1β	正向:5'-CCACCTTTTGACAGTGATGAGA-3' 反向:5'-GACAGCCCAGGTCAAAGGTT-3'
IL-6	正向:5'-TGATGGATGCTACCAAAGTGA-3' 反向:5'-TCTGTGACTCCAGCTTATCTCTTG-3'
TNF-α	正向:5'-CACCACGCTCTTCTGTCTAC-3' 反向:5'-TTGTCTTTGAGATCCATGCCGT-3'
GAPDH	正向:5'-GGGTCCCAGCTTAGGTTTCAT-3' 反向:5'-TACGGCAAATCCGTTTACA-3'

1.2.5 免疫荧光法检测紫柳因对 NF-κB p65 核转移的影响 将各组细胞接种于小圆片上,处理结束后 4% 多聚甲醛室温固定细胞 20 min;5% 驴血清 + 0.1% Triton 封闭、打孔、通透 90 min;NF-κB p65(1 : 400)4 °C 摇床低速孵育过夜;加入 cy3 山羊抗免疫荧光二抗(1 : 200),37 °C 孵育 1 h;加入 DAPI 复染细胞核 5 min;取出小圆片,事先于载玻片上滴加抗荧光淬灭剂,于正置荧光显微镜下观察、成像,实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 全部实验数据采用 GraphPad Prism 5 统计软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 One-Way ANOVA 分析法进行方差齐性分析,并进行组间重复比较,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS 诱导 BV2 小胶质细胞活化细胞模型建立 参照文献[5-6]中采用的 LPS 剂量,本实验中选用 LPS 浓度为 10 μg/mL 干预正常 BV2 小胶质细胞,并且预实验结果显示用 LPS 10 μg/mL 干预正常 BV2 细胞 24 h 后,对细胞存活率无明显影响。

2.2 MTT 法检测紫柳因对 BV2 小胶质细胞存活率的影响 与正常组相比,各浓度的紫柳因对 BV2 细胞存活率均无明显影响,差异无统计学意义(P > 0.05),见图 1。

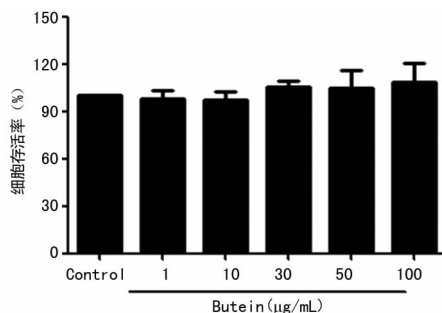


图 1 紫柳因对 BV2 细胞存活率的影响 (n=3)

2.3 qPCR 检测紫柳因对 LPS 诱导 BV2 小胶质细胞

活化后炎症因子 mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组细胞炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 表达水平明显上调;而实验组添加紫柳因预处理后,IL-1 β 、IL-6、TNF- α mRNA 的表达显著下调,并呈浓度依赖性,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

2.4 免疫荧光观察紫柳因对 LPS 诱导 BV2 小胶质

细胞活化后 NF- κ B p65 核转移的影响 正常组细胞中 NF- κ B p65 主要在胞质表达,核内几乎看不到其荧光表达;模型组细胞中 NF- κ B p65 被激活,NF- κ B p65 从胞质转移至核内;而实验组细胞结果显示,紫柳因能明显抑制 NF- κ B p65 的激活并下调其转录活性,阻止 NF- κ B p65 向核内转移,见图 3。

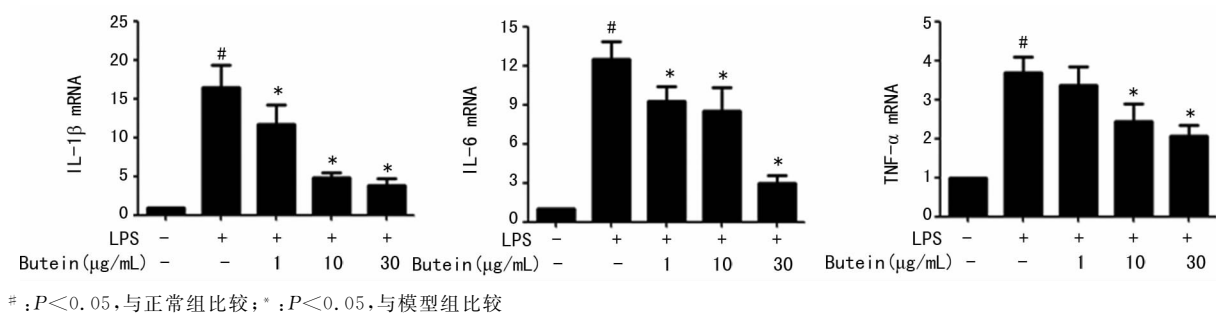


图 2 紫柳因对 LPS 诱导 BV2 小胶质细胞活化后炎症因子 mRNA 表达的影响($n=3$)

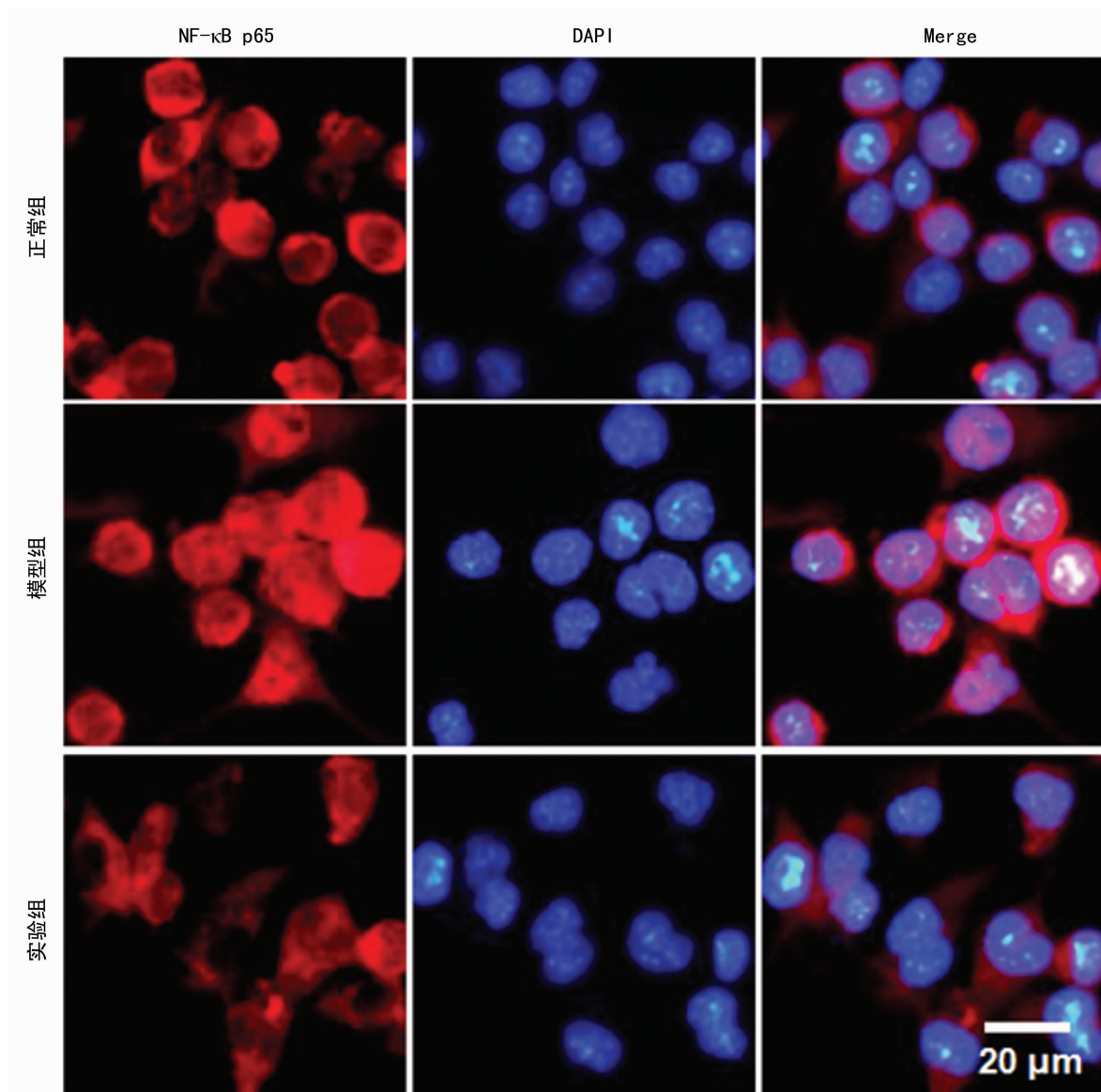


图 3 紫柳因对 LPS 诱导 BV2 小胶质细胞活化后 NF- κ B p65 核转移的影响($\times 400, n=3$)

2.5 Western blot 检测紫铆因对 LPS 诱导 BV2 小胶质细胞活化后 NF- κ B p65 蛋白表达的影响 Western blot 结果显示,正常组细胞中 NF- κ B p65 蛋白主要在胞质中表达,细胞核内不表达或表达量很低;模型组细胞内 NF- κ B p65 蛋白发生明显的核转移,由胞质转移至核内,表现为胞质内 NF- κ B p65 蛋白表达明显降低,核内 NF- κ B p65 蛋白表达明显升高;而实验组添加紫铆因预处理后,NF- κ B p65 在核内表达降低,胞质内表达升高,并呈一定的浓度依赖性,见图 4。

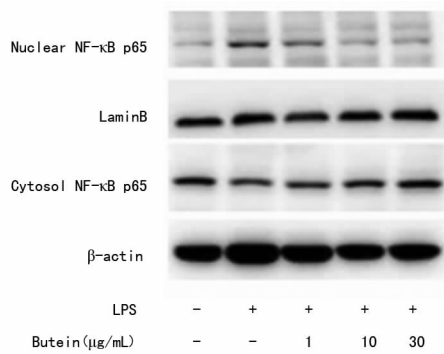


图 4 紫铆因对 LPS 诱导 BV2 小胶质细胞活化后 NF- κ B p65 蛋白表达的影响 (n=3)

2.6 Western blot 检测紫铆因对 LPS 诱导 BV2 小胶质细胞活化后 ERK 信号通路相关蛋白表达的影响

Western blot 结果显示,与正常组相比,模型组细胞在 LPS 诱导 BV2 小胶质细胞活化后,细胞内 ERK 信号通路蛋白的磷酸化水平明显上调,p-MEK、p-ERK 蛋白表达水平显著升高,但是 p-Raf 表达无明显变化。实验组添加紫铆因预处理后,能明显抑制细胞内 p-MEK、p-ERK 蛋白表达增强,对 p-Raf 表达依然无明显作用,Raf、MEK、ERK 的表达均无变化,见图 5。

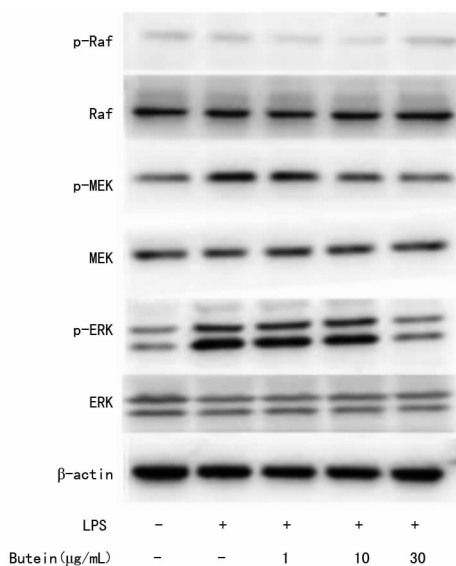


图 5 紫铆因对 LPS 诱导 BV2 小胶质细胞活化后 ERK 信号通路相关蛋白表达的影响 (n=3)

3 讨 论

小胶质细胞是脑内主要的免疫效应细胞,对中枢

神经系统稳态的改变非常敏感,很容易受外界刺激而激活,小胶质细胞一旦被激活,诱发一系列的慢性炎症反应,释放大量的炎症介质、促炎因子和神经毒素,产生过量的氧自由基和亚硝基复合物,长期炎症刺激,导致神经元的突触功能障碍,促使神经元死亡,加速神经退行性疾病的发生发展^[7-8]。因此,针对存在慢性神经炎症损伤的中枢神经退行性疾病的治疗中,比如是阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD),抑制小胶质细胞的异常激活或许具有潜在的临床应用前景。紫铆因是一种黄酮类化合物,是漆树科植物漆树皮的主要活性成分,具有抗氧化、抗炎症、抗癌等多种生物活性^[4]。近来的研究表明,紫铆因对谷氨酸诱导的神经毒性具有抑制作用,可以降低氧化应激及减少氧自由基的产生^[9];有研究证实,紫铆因对大鼠急性脊髓损伤模型具有保护作用,但其抗炎作用机制尚不明确。本实验中 MTT 结果显示,紫铆因本身对细胞活力无明显影响,说明紫铆因对小胶质细胞无细胞毒性。在 LPS 激活小胶质细胞后,细胞内 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的 mRNA 表达明显升高,而紫铆因干预后,可以显著降低以上炎症因子的表达,说明紫铆因可以抑制小胶质细胞的活化,减少炎症因子的产生。进而,对紫铆因抑制小胶质活化的可能作用机制进行初步探讨。结果发现,LPS 活化小胶质细胞后,NF- κ B p65 被激活,从胞质转移至核内,并且 ERK 信号通路相关蛋白 p-MEK、p-ERK 水平升高。紫铆因干预后,明显逆转 NF- κ B p65 的核转移,下调 p-MEK、p-ERK 的表达,进而减轻炎症反应。由此推断,紫铆因的抗炎作用可能与 ERK 信号通路相关蛋白的调控有关。

神经炎症的病理过程与炎症因子和炎症介质的产生密切相关,NF- κ B(核转录因子 κ B)和 MAPK 家族(包括 JNK,p38 和 ERK)在其中起到了关键的调节作用^[10]。NF- κ B 是一种在细胞及组织内广泛存的转录因子,是多种信号转导途径的交叉点,并且是细胞凋亡、增殖及分化的关键位点,参与多种相关基因的转录调控^[11]。NF- κ B 广泛存在于胶质细胞系,属于 NF- κ B/Rel 蛋白家族中的一员,最常见形式是由多肽链 P50 和 P65 2 个亚基组成的异源二聚体。细胞处于静息状态时,NF- κ B 位于胞质中,与抑制蛋白(I κ B)单体结合组成复合物,呈非活性形式。当细胞受到外界各种信号刺激时,NF- κ B 被激活,从复合物结构中游离出来,并移位至细胞核,启动基因转录^[12-13]。炎症基因的表达正是受 NF- κ B 的转录调控^[14]。本实验结果显示,正常组细胞中 NF- κ B p65 主要在胞质内表达;模型组由于炎症因子的刺激,NF- κ B p65 被激活,由胞质转移至核内,而添加紫铆因预处理抑制 NF- κ B p65 的激活,降低它的转录活性,阻止其向核内转移,进而下调炎症因子的表达,抑制炎症反应,从而阻止炎症反应对神经元的损伤。MAPKs 信号通路是细胞

内最重要的信号通路之一,广泛参与细胞的生长、增殖、分化、凋亡等过程。ERK 是其中一条途径,Raf、MEK 都是 ERK 的上游分子。正常情况下,细胞中的 Raf/MEK/ERK 均以非磷酸化的形式存在,呈无活性状态;当受外界刺激时,Raf/MEK/ERK 蛋白发生磷酸化,呈功能活性状态,启动相关细胞因子和炎性介质的基因表达^[15-16]。本实验结果显示,模型组细胞中 p-MEK、p-ERK 蛋白表达均明显升高,呈活性功能状态,而添加紫铆因预处理可以显著逆转这一现象,并呈一定的浓度依赖性。说明紫铆因抑制小胶质细胞活化的作用机制可能与调节 ERK 信号通路相关蛋白的表达有关。

综上所述,紫铆因可以抑制小胶质细胞的激活,通过下调炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达从而减轻炎性反应,其作用机制可能与紫铆因下调 NF- κ B p65 的转录活性和抑制 ERK 信号通路相关蛋白的表达有关。本实验通过这一系列的离体实验为紫铆因可能具有抑制慢性神经炎症发展的这一作用,提供了一定的理论依据,也为后续的在体试验打下了坚实的基础。

参考文献

- [1] AMOR S, PUENTES F, BAKER D, et al. Inflammation in neurodegenerative diseases [J]. *Immunology*, 2010, 129(2):154-169.
- [2] GRIFFITHS M R, GASQUE P, NEAL J W. The multiple roles of the innate immune system in the regulation of apoptosis and inflammation in the brain [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2009, 68(3):217-226.
- [3] KAUSHAL V, SCHLICHTER L C. Mechanisms of microglia-mediated neurotoxicity in a new model of the stroke penumbra [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(9):2221-2230.
- [4] LEE J C, LIM K T, JANG Y S. Identification of rhus verniciflua stokes compounds that exhibit free radical scavenging and anti-apoptotic properties [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1570(3):181-191.
- [5] PANGESTUTI R, BAK S S, KIM S K. Attenuation of pro-inflammatory mediators in LPS-stimulated BV2 microglia by chitoooligosaccharides via the MAPK signaling pathway [J]. *Int J Biol Macromol*, 2011, 49(4):599-606.
- [6] MOON D O, CHOI Y H, KIM N D, et al. Anti-inflammatory effects of β -lapachone in LPS-stimulated BV2 microglia [J]. *Inter Immunopharmacol*, 2007, 7(4):506-514.
- [7] CALDERO J, BRUNET N, CIUTAT D, et al. Development of microglia in the chick embryo spinal cord: implications in the regulation of motoneuronal survival and death [J]. *J Neurosci Res*, 2009(87):2447-2466.
- [8] WAKE H, MOORHOUSE A J, JINNO S, et al. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals [J]. *Neuroscience*, 2009(29):3974-3980.
- [9] LEE D S, JEONG G S. Butein provides neuroprotective and anti-neuroinflammatory effects through Nrf2/ARE-dependent haem oxygenase 1 expression by activating the PI3K/Akt pathway [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(19):2894-2909.
- [10] JUNG H W, CHUNG Y S, KIM Y S, et al. Celastrol inhibits production of nitric oxide and proinflammatory cytokines through MAPK signal transduction and NF- κ B in LPS-stimulated BV2 microglial cells [J]. *Exp Mol Med*, 2007(39):715-721.
- [11] KALTSCHMIDT B, WIDERA D, KALTSCHMIDT C. Signaling via NF- κ B in the nervous system [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1745(3):287-299.
- [12] COLLISTER K A, ALBENSI B C. Potential therapeutic targets in the NF- κ B pathway for Alzheimer's disease [J]. *Drug News Perspect*, 2005, 18(10):623-629.
- [13] PIZZI M, SAMICO I, BORONI F, et al. Inhibition of I κ B α phosphorylation prevents glutamate-induced NF- κ B activation and neuronal cell death [J]. *Acta Neurochir*, 2005, 93(1):59-63.
- [14] ZHU L, BI W, LU D, et al. Luteolin inhibits SH-SY5Y cell apoptosis through suppression of the nuclear transcription factor- κ B, mitogen-activated protein kinase and protein kinase B pathways in lipopolysaccharide-stimulated cocultured BV2 cells [J]. *Exp Therapeutic Med*, 2014, 7(5):1065-1070.
- [15] KIM S H, SMITH C J, VAN ELDIK L J. Importance of MAPK pathways for microglial pro-inflammatory cytokine IL-1 beta production [J]. *Neurobiol Aging*, 2004, 25(4):431-439.
- [16] DENNER L A, RODRIGUEZ-RIVERA J, HAIDACHER S J, et al. Cognitive enhancement with rosiglitazone links the hippocampal PPAR γ and ERK MAPK signaling pathways [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(47):1635-1672.

(收稿日期:2018-01-18 修回日期:2018-04-06)