

栝楼桂枝汤对活化小胶质细胞抗炎作用的研究*

胡海霞¹ 朱晓勤¹ 李钻芳¹ 林如辉¹ 陈立典^{2#}

(1 福建中医药大学中西医结合研究院 福州 350122; 2 福建中医药大学康复医学院 福州 350122)

摘要:目的:探讨栝楼桂枝汤对活化小胶质细胞抗炎因子的表达水平及上游炎症信号通路的活化情况。方法:先用 MTT 实验筛选出药物的最佳干预浓度,然后体外 LPS 刺激制备出小胶质细胞的细胞炎症模型,经栝楼桂枝汤水提液处理后,应用 ELISA 法、RT-PCR 法、Western-blotting 法分别检测细胞抗炎因子的表达及相关炎症信号通路蛋白的表达水平。结果:栝楼桂枝汤水提液可显著促进 LPS 诱导的小胶质细胞中抗炎因子的表达,并上调相应通路蛋白的表达水平。结论:栝楼桂枝汤可通过 TRIF 信号通路发挥抗神经炎症的作用。

关键词:神经炎症;栝楼桂枝汤;小胶质细胞;抗炎

中图分类号:R743

文献标识码:B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2017.01.090

小胶质细胞(Microglia, MG)是公认的中枢神经系统中主要的固有免疫细胞,约占成年中枢神经系统细胞总量的 10%~20%^[1],主要介导中枢神经系统损伤等疾病的免疫反应,在免疫调节过程中发挥核心作用^[2]。神经炎症反应的标志就是 MG 的激活^[3],MG 作为 CNS 固有的免疫效应细胞参与缺血性中风过程中的免疫反应和病理过程^[4]。在中枢神经系统中,TLR4 主要表达于小胶质细胞,而 TLR4 所识别的外源性配体主要为 LPS。前期实验研究^[5]已证实栝楼桂枝汤可以抑制 LPS 刺激所引起的细胞促炎因子的表达,且可能与炎症通路 TLR4/NFκB 有关。本实验中,先用 MTT 实验检测细胞活力后得出最佳刺激浓度,再以 LPS 干预小胶质细胞在体外制备小胶质细胞炎症模型,然后用栝楼桂枝汤水提液进行干预处理,观察药物对于活化小胶质细胞中抗炎因子的影响作用,并探讨其可能的作用机制。现报告如下:

1 材料

1.1 细胞 小鼠源小脑胶质瘤细胞 BV2(购自上海复祥生物科技有限公司),源自 C57BL/6 小鼠小胶质细胞,成纤维样细胞,半贴壁生长。

1.2 药物 栝楼桂枝汤组方:栝楼根 30 g,桂枝 9 g,芍药 9 g,甘草 6 g,生姜 9 g,大枣 12 枚(药材购自福州国医堂医药公司)。

1.3 试剂 高糖 DMEM 培养基、胰蛋白酶、青链双抗、PBS 缓冲液(美国 Hyclone 公司),胎牛血清(美国 GIBCO 公司),LPS (Escherichia coli 055:B5)、MTT(美国 Sigma 公司),DEPC 处理水(上海基尔顿生物技术公司),Trizol(美国 Invitrogen 公司),反转录试剂盒(美国 Promega 公司),SYBR-Green I 定量

PCR 试剂盒(日本 Takara 公司),引物合成(上海生物工程公司),ELISA kit IFNβ、IL10(美国 R&D 公司),大鼠抗 TLR3、TRIF(美国 Santa Cruz 公司),PVDF 膜(美国 Millipore 公司),RAPI 细胞裂解液、凝胶配制试剂盒、化学增强发光试剂盒(碧云天生物技术有限公司)。

1.4 仪器 SW-CJ-1FD 超净工作台(苏州安泰仪器设备有限公司);ELX808 酶标仪(美国 BioTek 公司);HF212UV CO₂ 培养箱(香港力康仪器设备有限公司);电泳仪、凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司),TS-100F 型倒置显微镜(日本 Nikon 公司)。7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),垂直电泳槽、转移槽(北京六一仪器厂),凝胶成像分析系统(美国 BioRad 公司)。

2 方法

2.1 栝楼桂枝汤水提液的制备 取栝楼根 30 g,桂枝 9 g,芍药 9 g,甘草 6 g,生姜 9 g,大枣 12 枚,浸泡 0.5 h,加 5 倍量的水加热回流 2 次,1 h/次,过滤,滤液合并,旋转蒸发器减压浓缩,真空干燥成干浸膏,-20℃冻存备用。

2.2 细胞培养 BV2 培养于含 10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素双抗的高糖 DMEM 培养基中,置于饱和湿度、37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,待细胞呈现 80%汇合度后,用 0.05%胰蛋白酶消化传代,至对数生长期用于后续实验。

2.3 MTT 法筛选栝楼桂枝汤水提液干预浓度和细胞炎症模型制备 小胶质细胞株 BV2 生长至对数期,以 5×10⁴ 个/ml 的细胞浓度接种于 96 孔板,LPS (1 μg/ml)和栝楼桂枝汤水提液 (50 μg/ml、100 μg/ml、200 μg/ml) 分别干预细胞 24 h 后,加入 MTT

* 基金项目:国家自然科学基金(编号:81403265)

通讯作者:陈立典, E-mail: cld@fjtcu.edu.cn

(0.5 mg/ml) 100 μ l 继续培养 4 h 后, 再加入培养级 DMSO 100 μ l 溶解甲瓨, 振荡后在 570 nm 处检测各孔吸光度值, 观察细胞的生长活力。本研究选用的细胞干预浓度为不影响细胞生长活力的浓度范围。

2.4 ELISA 法检测细胞培养上清液中的炎症因子 细胞生长至对数增长后期, 将细胞以 5×10^5 个/ml 的细胞浓度接种于 24 孔板, 贴壁过夜后, 按如下分组: 对照组、LPS (1 μ g/ml) 干预组、栝楼桂枝汤 (50 μ g/ml)+LPS 组、栝楼桂枝汤 (100 μ g/ml)+LPS 组、栝楼桂枝汤 (200 μ g/ml)+LPS 组, 每组各 3 孔。干预 24 h 后, 收集各组的细胞培养上清, 按照 TGF β 、IL10 的 ELISA 试剂盒说明书操作, 检测培养上清液中抗炎因子的含量。

2.5 Western-blotting 实验检测炎症相关蛋白的表达水平 细胞以 5×10^5 个/ml 的细胞浓度接种于细胞培养瓶 (规格为 25 cm^2), 用与 2.5 相同的干预方式干预细胞 24 h, 干预结束后, 提取细胞总蛋白/核蛋白, 按每 20 mg 组织加 200~400 μ l 的比例加入裂解液, 冰上放置 30 min, 每隔 10 min 摇晃 1 次助融。然后将 EP 管置于低温离心机中, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清。采用 BCA 蛋白定量法测定样本蛋白浓度。进行 SDS-PAGE 凝胶电泳及转膜, 转膜结束后, 取出转移膜放入封闭液中, 在摇床上常温封闭 1 h。用封闭液稀释一抗 (抗体稀释度为 1:1 000), 封闭结束后将膜浸入配制好的一抗中, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。将洗涤后的一抗反应膜放入二抗工作液 (抗体稀释度为 1:3 000) 中, 置于摇床上室温反应 1 h。用 TBST 洗膜, 增强化学发光法 (ECL) 显色; 置于凝胶成像分析系统进行显色并拍照。实验结果应用 Gel Doc 凝胶成像系统进行半定量分析。

2.7 统计学分析 采用 SPSS15.0 统计软件 (One-way ANOVA) 进行统计学分析, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间数据比较采用单因素方差分析。P<0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 栝楼桂枝汤对小胶质细胞生长活力的影响 MTT 实验结果表明, 栝楼桂枝汤在 50 μ g/ml、100 μ g/ml、200 μ g/ml 浓度范围内对细胞活力的影响相比较, 差异无统计学意义, 即对 BV2 细胞没有毒性。说明栝楼桂枝汤在该浓度范围内可用于后续细胞实验的干预。见图 1。

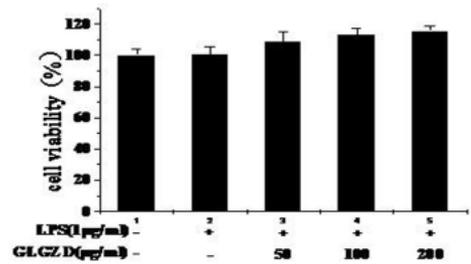


图 1 MTT 法观察栝楼桂枝汤对小胶质细胞 (BV2) 生长活力的影响

3.2 栝楼桂枝汤对小胶质细胞炎症介质基因和蛋白表达水平的影响 LPS 刺激小胶质细胞活化后可释放抗炎因子 TGF β 、IL10 等, 但主要释放哪类因子与细胞的活化状态和时间有关。抗炎因子 TGF β 、IL10 在 LPS 刺激细胞后变化不明显, 而栝楼桂枝汤可促进抗炎因子的分泌, $P < 0.05$, 与蛋白表达实验结果一致; RT-PCR 结果提示, 小胶质细胞经 LPS 活化后 TGF β 、IL10 等抗炎因子的基因表达量没有显著变化, $P > 0.05$; 栝楼桂枝汤可以促进抗炎因子的基因表达, $P < 0.05$ 。见图 2~ 图 3。

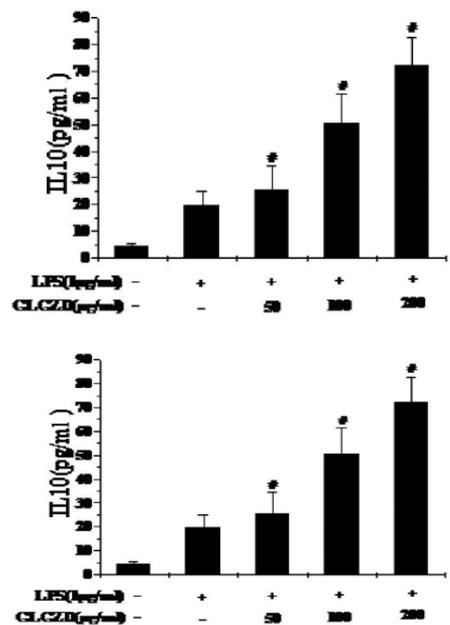


图 2 栝楼桂枝汤对小胶质细胞炎症介质分泌水平的影响 注: 与 LPS 组相比, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$ 。

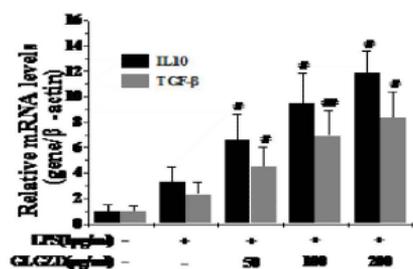


图 3 栝楼桂枝汤对小胶质细胞炎症介质基因表达水平的影响 注: 与 LPS 组相比, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$ 。

3.3 栝楼桂枝汤对炎症相关通路蛋白表达水平的影响 TLR3 是唯一启动 MyD88 非依赖性途径 TRIF-IRF3 的 Toll 样受体。LPS 干预小胶质细胞 BV2 后,TLR3 和 TRIF 的基因及蛋白表达水平变化不大, $P>0.05$; 而栝楼桂枝汤可以浓度依赖性促进 TLR3 和 TRIF 基因和蛋白水平的升高,差异有统计学意义, $P<0.05$ 。见图 4~ 图 5。

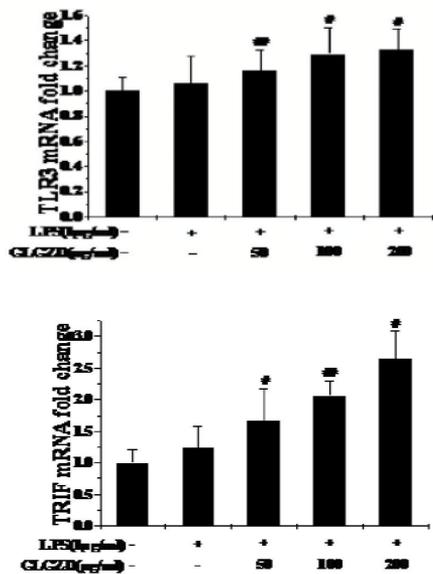


图 4 栝楼桂枝汤对小胶质细胞 IRF3 介导的通路蛋白基因表达的影响注:与 LPS 组相比,* $P<0.05$,# $P<0.01$ 。

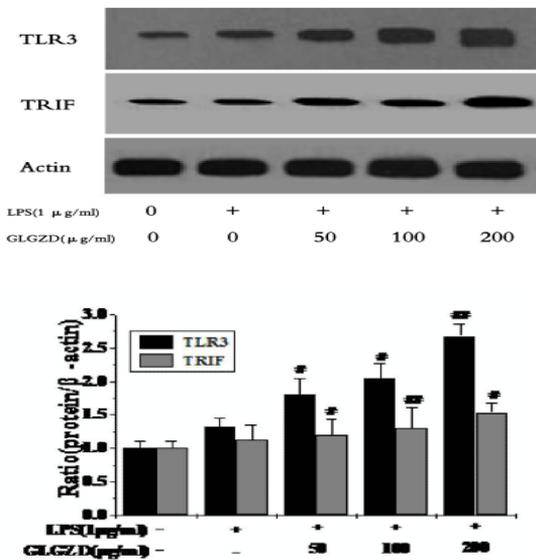


图 5 栝楼桂枝汤对小胶质细胞 IRF3 介导的通路蛋白表达的影响注:与 LPS 组相比,* $P<0.05$,# $P<0.01$ 。

4 讨论

小胶质细胞在神经炎症调节中发挥着关键的作用。在正常生理状态下,小胶质细胞呈静息状态,当脑缺血损伤发生时,小胶质细胞被活化,但小胶质细

胞的过度激活会启动强烈的免疫应答,释放大量炎症因子和细胞毒性物质,引发神经元损伤^[6-7]。

在人类中枢神经系统中小胶质细胞可表达 TLR1-9^[8],基于募集特异的衔接蛋白,TLRs 诱导的信号转导通路主要有 MyD88 依赖和非 MyD88 依赖的两个信号转导通路^[9]。最近的研究证实,TLRs 家族中 TLR3 发挥着重要的抗炎作用。TLR3 特异性募集衔接蛋白 TRIF 可启动 TRIF 依赖性途径从而诱导一系列神经保护因子的表达,如 IFN β 、TGF β 、IL10、BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor)、神经营养蛋白 4 (Neurotrophin)、多效生长因子 (Pleiotrophin) 等,以上这些因子均已证实具有抗炎和 / 或神经保护作用。研究显示,TGF β 具有很强的抗炎活性,它能降低脑梗死面积和减轻脑水肿,修复脑组织损伤^[10],对兴奋性神经毒素和缺氧所致的神经细胞死亡发挥重要的保护作用^[11]。Bsibsi 等^[12]的研究表明,TLR3 激活后还可上调胶质细胞表达抗炎细胞因子 IL10,IL10 本身可减少 MCAO 大鼠的脑梗死体积^[13],且与正常小鼠相比,IL10 缺乏的小鼠的神经细胞对兴奋性毒性和低糖低氧所致损伤更敏感^[14]。TLR3 的信号通路则是由衔接蛋白 TRIF 启动的 MyD88 非依赖性途径,TRIF 被招募至受体启动 IKK ϵ 磷酸化,最终活化转录因子 IRF3、IRF7 的活化,转移到细胞核,产生抗炎因子 TGF β 等^[15]。

本实验首先采用 MTT 法检测了细胞存活率的变化,通过观察药物对小胶质细胞的毒性作用影响,筛选 LPS 和栝楼桂枝汤的干预浓度。与对照组相比,LPS 和栝楼桂枝汤干预组中细胞存活率未见显著改变,表明 LPS 在 1 μ g/ml、栝楼桂枝汤在 50~200 μ g/ml 浓度范围对小胶质细胞无明显毒性影响,即后续实验中选用 LPS 和栝楼桂枝汤的相应浓度范围干预结果是在不影响小胶质细胞活力的前提下得出的。

实验结果显示,用 LPS 干预小胶质细胞后,栝楼桂枝汤在抑制 TLR4 途径活化的情况^[4],同时激活了 TLR3 信号途径,TLR3/TRIF/IRF3 信号途径可启动抑炎因子的表达,包括 TGF β 、IL10 等,且与该通路相关的蛋白水平也显著升高,而 LPS 刺激组中 TLR3/TRIF 信号通路无明显变化,因此,可以推断,栝楼桂枝汤对小胶质细胞活化的抑制作用是双向调节完成的,即是通过下调 TLR4 信号和 TLR3 信号而实现其抑制作用的,维持一定的内环境,即调控小胶质细胞中 TLR3 通路的活化状态可能是栝楼桂枝汤发挥潜在的神经保护作用的机制之一。

参考文献

- [1] Lawson LJ, Perry VH, Dri P, et al. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain [J]. *Neuroscience*, 1990, 39(1): 151-170
- [2] Streit WJ, Conde JR, Fendrick SE, et al. Role of microglia in the central nervous system's immune response [J]. *Neurol Res*, 2005, 27(7): 685-691
- [3] Wilms H, Zecca L, Rosenstiel P, et al. Inflammation in Parkinson's diseases and other neurodegenerative diseases: cause and therapeutic implications [J]. *Curr Pharm Des*, 2007, 13(18): 1925-1928
- [4] Haixia Hu, Zuanfang Li, Xiaoqin Zhu, et al. Gua Lou Gui Zhi decoction suppresses LPS-induced activation of TLR4/NF- κ B pathway in BV-2 murine microglia cells [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(6): 1327-1332
- [5] Taylor RA, Sansing LH. Microglial responses after ischemic stroke and intracerebral hemorrhage [J]. *Clin Dev Immunol*, 2013: 746068
- [6] Ouyang YB. Inflammation and stroke [J]. *Neurosci Lett*, 2013, 548: 1-3
- [7] Kumral A, Tuzun F, Ozbal S, et al. Lipopolysaccharide-preconditioning protects against endotoxin-induced white matter injury in the neonatal rat brain [J]. *Brain Res*, 2012, 1489: 81-89
- [8] 陈莹莹, 孙光玲, 兰倩, 等. Toll 样受体与脑缺血 [J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(12): 2369-2375
- [9] Marsh BJ, Williams-Karnesky RL, Stenzel-Poore MP. Toll-Like receptor signaling in endogenous neuroprotection and stroke [J]. *Neuroscience*, 2009, 158(3): 1007-1020
- [10] 付剑亮, 刘雨, 聂成福, 等. 转化生长因子- β 1 与脑缺血 [J]. *卒中与神经疾病*, 2000, 7(2): 125-126
- [11] Henrich-Noack P, Prehn JH, Krieglstein J. TGF- β 1 protects hippocampal neurons against degeneration caused by transient global ischemia. Dose-response relationship and potential neuroprotective mechanisms [J]. *Stroke*, 1996, 27(9): 1609-1614
- [12] Bsibsi M, Persoon-Deen C, Verwer RW, et al. Toll-like receptor 3 on adult human astrocytes triggers production of neuroprotective mediators [J]. *Glia*, 2006, 53(7): 688-695
- [13] Spera PA, Ellison JA, Feuerstein GZ, et al. IL-10 reduces rat brain injury following focal stroke [J]. *Neurosci Lett*, 1998, 251(3): 189-192
- [14] 张莉, 杜冠华. 细胞因子在脑缺血损伤机制中的作用 [J]. *国外医学: 脑血管疾病分册*, 2004, 12(5): 379-382
- [15] Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways [J]. *Semin Immunol*, 2004, 16(1): 3-9

(收稿日期: 2016-12-30)

蜂胶中短叶松素的提取分离与含量测定*

文萍 刘雯 张娣 康明 陈乐[#]

(江西省中医药研究院 南昌 330046)

摘要:目的:研究蜂胶中短叶松素的制备工艺及含量测定方法,并测定和比较 12 个产地蜂胶中短叶松素的含量。方法:采用溶剂提取、大孔树脂吸附及葡聚糖凝胶色谱和重结晶等方法进行分离纯化,根据理化性质和核磁数据对化合物进行结构鉴定为短叶松素;用 HPLC 法测定蜂胶中短叶松素含量, YMC C₁₈ 柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), 流速为 1.0 ml \cdot min⁻¹, 甲醇-0.1%磷酸溶液 (60:40), 检测波长: 292 nm。结果:所得短叶松素的纯度在 98.5% 以上,短叶松素在 8.512~425.6 μ g 线性关系良好,平均回收率 ($n=6$) 为 98.60%, RSD 为 0.97%, 12 个产地的蜂胶中短叶松素以新疆、云南、陕西三地含量较高。结论:提取分离的短叶松素含量高,可作为含量测定用对照品,含量测定方法稳定、可靠,可作为蜂胶中短叶松素含量测定方法。

关键词:蜂胶;短叶松素;提取分离;含量测定

中图分类号: R284.2

文献标识码: B

doi: 10.13638/j.issn.1671-4040.2017.01.091

蜂胶具有抗过敏、抗炎、抗氧化、强化血管、抑制病毒、抗肿瘤、增强机体免疫力等保护身体健康、抵御疾病入侵的作用^[1-2]。蜂胶中含有丰富的黄酮类^[3]等生物活性成分,具有极为丰富的药理活性。短叶松素及其衍生物具有强化血管、抗菌、抗炎、抗氧化作用^[4-5],还具防止肝功能损伤、保肝护肝的作用^[6],也是发挥蜂胶功效的物质基础之一。蜂胶的分布非常广泛,不同产地的蜂胶中各成分含量参差不齐^[7]。本文采用简单有效的方法提取分离出蜂胶中的短叶松素,并采用高效液相色谱法对 12 个产地的 54 批蜂胶中短叶松素含量进行了测定和比较,为蜂胶质量标准的制定及资源开发利用提供参考依据。现报告如下:

1 仪器与试剂

1.1 仪器 旋转蒸发仪 (Eyela 公司), 低温循环水式真空泵 (郑州长城科工贸有限公司), Waters 1525-2487-2707 型高效液相色谱仪, TU-1810 型紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司), 中压液相色谱仪 (Brucker 公司), 400 MHz 和 600 MHz 核磁共振仪 (Varian 公司), Micromass Auto specultima ETOF 型质谱仪, CQ-250 超声波清洗器 (上海船舶电子设备研究所), Mettler Tkleo AG135 双量程电子天平 (十万分之一), SimplicityTM 超纯水系统 (Millipore 公司)。

1.2 药品与试剂 蜂胶为课题组收集云南 (样品编号 16、17)、四川 (编号 35、37、38)、江西 (编号 90、

* 基金项目:江西省科技计划项目 (编号: 20141BBG70075)

[#] 通讯作者: 陈乐, E-mail: 76349830@qq.com