

加味五子衍宗方及其活性部位对脂多糖诱导神经炎症反应的抑制作用及机制研究

宋芳娇 曾克武 屠鹏飞 王学美

【摘要】 目的 研究加味五子衍宗方及其活性部位对脂多糖诱导的 BV-2 小胶质细胞炎症反应的抑制作用及潜在机制。**方法** 通过大孔树脂柱,将加味五子衍宗方乙醇总提取物洗脱分离得到水提组、20% 醇提组、50% 醇提组、70% 醇提组和 95% 醇提组 5 个部位。针对无细胞毒性的部位研究了其对炎症因子一氧化氮和炎症蛋白诱导型一氧化氮合酶、环氧合酶-2 表达的影响,明确了抗炎活性部位,同时进一步研究了活性部位对核转录因子的激活以及活性氧表达的调控作用。**结果** 70% 醇提组和 95% 醇提组对细胞具有毒性,其余各部位(水提组、20% 醇提组、50% 醇提组)均无细胞毒性且表现出一定的抗炎活性。其中 50% 醇提组抗炎活性最优,甚至高于复方组。**结论** 加味五子衍宗方的抗炎活性部位可能主要富集于 50% 醇提部分,其抗炎活性可能是通过抑制 NF- κ B 信号通路介导的炎症反应以及抗氧化应激实现的。

【关键词】 神经炎症; BV-2 小胶质细胞; 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 doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.10.010

Inhibitory effects of modified Wuzi-Yanzong prescription and its active components on LPS-induced inflammatory response on BV-2 microglial cells SONG Fang-jiao, ZENG Ke-wu, TU Peng-fei, et al. Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine of First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China

Corresponding author: WANG Xue-mei, Email: wangxuemeibjmu@163.com

【Abstract】 Objective To study the inhibitory effects of modified Wuzi-Yanzong prescription (MWP) and its active components on LPS-induced BV-2 microglial cells and the potential mechanism. **Methods** 70% ethanol extracts of MWP was separated by macro porous resin column, collecting water elution group, 20% alcohol elution group, 50% alcohol elution group, 70% alcohol elution group and 95% alcohol elution group. For the non-cytotoxic components, we detected the expression of nitric oxide, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 to identify the anti-inflammatory active components. The regulatory effects of active components on nuclear factor κ B (NF- κ B) activation and expression of reactive oxygen species (ROS) were also investigated. **Results** 70% ethanol and 95% ethanol elution components were toxic to cells while the remaining components (water elution component, 20% alcohol elution component, 50% alcohol elution component) didn't show any cytotoxicity and exhibited some anti-inflammatory activity. The 50% alcohol elution component is better than the other components or even higher than MWP. **Conclusions** 50% alcohol extracts are responsible for the major anti-inflammatory

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81173369,81303253);北京市自然科学基金面上项目(7132210);教育部博士点基金(20120001110105);中国博士后基金(2013T60045)

作者单位:100034 北京大学第一医院中西医结合研究室[宋芳娇(硕士研究生)、曾克武、王学美];北京大学医学部药学院天然药物化学系(曾克武、屠鹏飞)

作者简介:宋芳娇(1987-),女,2011 级在读硕士研究生。研究方向:中西医结合治疗老年病。E-mail: songfangjiao@163.com

通讯作者:王学美(1964-),女,博士,教授,研究员,博士生导师。研究方向:中西医结合治疗老年病。E-mail: wangxuemeibjmu@163.com

effective component of MWP and the anti-inflammatory activity may be achieved through inhibiting NF- κ B signaling pathway and oxidative stress.

【Key words】 Neuroinflammation; BV-2 microglia cell line; Modified Wuzi-Yanzong prescription; Anti-inflammatory; Neural protection

“肾主智,肾虚则智不足”是中医学的传统理论,研究室根据多年临床经验和“补肾以益智”的中医理论在古方五子衍宗丸基础上加淫羊藿形成加味五子衍宗方,其成分包括枸杞子、菟丝子、五味子、车前子、覆盆子和淫羊藿。据前期临床疗效和实验观察,加味五子衍宗方可有效改善轻度认知障碍患者的记忆功能,对海马体积的萎缩有一定的防治作用^[1]。此外,加味五子衍宗方及其总黄酮、总多糖能提高东莨菪碱所引起的记忆获得障碍模型小鼠的胆碱能系统活性,提高学习记忆水平^[2]。轻度认知障碍是阿尔茨海默病(alzheimer disease, AD)的早期临床表现。近年来,随着对 AD 研究的深入,许多学者认为 AD 是一种中枢神经系统慢性炎症性疾病,脑内炎症不仅能引起神经炎性损伤和神经元的退行性病变,还可能是其他病理特征(老年斑和神经元纤维缠结)形成和发展的诱因。本研究从抗炎角度出发,以脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导 BV-2 小胶质细胞系炎症模型为研究对象,探讨加味五子衍宗方及其活性部位对神经系统的保护作用 and 潜在机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 BV-2 小胶质细胞系购自中国医学科学院细胞中心。

1.1.2 药物 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。

1.1.3 试剂与仪器 胎牛血清(美国 Gibco 公司)、DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司)、NO 化学法试剂盒(中国南京建成生物公司)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、氯化硝基四氮唑蓝(nitrotetrazolium blue chloride, NBT)、溴化噻唑蓝四氮唑(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)、二氢乙錠(dihydroethidium, DHE)荧光染料、4',6-联脒-2-苯基吲哚二盐酸盐(4',6-Diamidino-2-phenylindole, DAPI)(美国 Sigma 公司)、兔抗大鼠 iNOS, COX-2 和 β -actin 多克隆抗体(美国 CST 公司)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔

IgG(美国 Vector 公司)、电化学发光(electrochemical luminescence ECL)试剂盒(美国 Pierce 公司)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(中国北京鼎国昌盛生物技术有限公司)、荧光显微镜(日本奥林巴斯公司)、2200 PRO 凝胶成像分体系统(美国伊斯曼柯达公司)、Sunrise-Basic 酶标仪(瑞士帝肯公司)、UV-2401PC 紫外分光光度计(日本岛津公司)。

1.2 加味五子衍宗方及其活性部位的提取和测定

(1) 枸杞子、菟丝子、覆盆子、五味子、车前子、淫羊藿按质量比 8:8:4:1:2:8 混合,为提高药物提取率,溶剂采用 70% 乙醇,用 10 倍和 5 倍量微沸提取 2 遍,每遍 1 小时。(2) 大孔树脂柱分离:将复方提取液过大孔树脂柱,分别用 4 倍柱体积纯净水、20% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇和 2 倍柱体积 95% 乙醇洗脱,收集各洗脱液。(3) 将各部分洗脱液 60℃ 低温减压浓缩,冷冻干燥成粉末,4℃ 避光保存,使用时用培养液或 DMSO 溶解(终浓度为 5%),用 0.2 μ m 滤膜除菌后作用于细胞。(4) 分离组分成分鉴定:总多糖含量检测用酚硫酸法,葡萄糖为标准品,紫外分光光度计 490 nm 处测定;总黄酮含量检测用氢氧化钾显色法,芦丁为标准品,紫外分光光度计 216 nm 处测定。

1.3 细胞培养和处理

BV-2 小胶质细胞系 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养,加入高糖 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清,100 U/L 青霉素和 100 μ g/L 链霉素),每 1 天传代 1 次。

将细胞分为空白对照组,炎症模型组和药物治疗组。其中 MTT 细胞存活率检测时药物治疗组分为复方组,水提组,20% 醇提组,50% 醇提组,70% 醇提组和 95% 醇提组 6 组,其余抗炎机制研究实验药物治疗组分为复方组,水提组,20% 醇提组,50% 醇提组 4 组。LPS 诱导炎症模型的浓度为 1 μ g/mL,药物浓度设置为 200 μ g/mL。药物治疗和 LPS 同时处理细胞,方法参照本课题组前期实验^[3]。

1.4 MTT 细胞活性分析

BV-2 小胶质细胞系以 5×10^4 /孔密度接种于 48

孔板,培养过夜,空白组采用上述高糖 DMEM 培养基换液,模型组用 LPS 诱导炎症,药物组 LPS 与药物同时处理细胞,刺激维持 24 小时,弃上清,加 MTT 染色,温箱孵育 4 小时,弃上清,加入 500 μ L DMSO,酶标仪 570 nm 处检测光密度(optical density,OD)值。

1.5 细胞上清液 NO 含量测定

BV-2 小胶质细胞系接种于 48 孔板,密度为 5×10^4 /孔,空白组换液,模型组用 LPS 诱导炎症,药物组加药和 LPS 处理,刺激维持 24 小时,用 NO 化学法试剂盒检测 NO 浓度,按照说明书操作:吸取 300 μ L 培养液上清,加试剂 1 和 2(NO 化学法试剂盒提供),6000 rmp 离心 10 分钟,取 160 μ L 上清,加入显色剂,酶标仪 570 nm 波长检测 OD 值。

1.6 Western blot 蛋白分析

将细胞接种于 \varnothing 100 mm 培养皿中,培养过夜,空白组换液,模型组用 LPS 处理细胞,药物组 LPS 协同药物处理细胞,刺激维持 24 小时后收集细胞,用 RIPA 裂解液(内有 Cocktail 蛋白酶抑制剂)裂解细胞,获取总蛋白。将总蛋白用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,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 分钟。兔抗鼠 iNOS,COX-2 和 β -actin 一抗(1:1000)室温孵育 2 小时,充分洗涤,加入 HRP 标记的羊抗兔二抗(1:1000)室温孵育 1 小时,充分洗涤后加入 ECL 液,室温反应 5 分钟,在凝胶成像系统上拍照。

1.7 免疫荧光检测核转录因子- κ B 核转位情况

在 24 孔板中铺入显微镜盖玻片,多聚赖氨酸包被后,接种密度为 10×10^4 细胞于玻片上,药物预处理 30 分钟后加 LPS 诱导,温箱孵育 1 小时,4%多聚甲醛包被,封闭液(0.2% tritonX-100+5% BSA)室温孵育 30 分钟,加一抗(1:200 稀释),4℃过夜,PBS 充分洗涤,加二抗(1:200 稀释),室温摇床 1 小时,PBS 充分洗涤,DAPI(50 μ g/mL)37℃避光处理 30

分钟,PBS 充分洗涤,甘油-PBS 封片剂封片,用荧光显微镜拍照。

1.8 免疫荧光检测 ROS 的产生

将细胞接种于铺有盖玻片的 24 孔内, 10×10^4 /孔,多聚赖氨酸包被后,药物处理 24 小时后,PBS 冲洗 1 遍,1 μ mol/L ROS 荧光探针(DHE)温箱处理 30 分钟,PBS 充分洗涤,DAPI 处理,充分洗涤,封片,荧光显微镜拍照。

1.9 统计学处理

统计学方法数据用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用 SPSS 16.0 统计学软件进行单因素方差(One-way ANOVA)分析。组间两两比较采用 LSD 检验, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各分离部位总多糖和总黄酮含量

本实验中总多糖以葡萄糖为对照品,苯酚-浓硫酸方法检测,总黄酮以芦丁为对照品,紫外分光光度法检测。本次实验中的总方提取物含(62.35 \pm 0.05)%总多糖成分,(0.08% \pm 0.03)总黄酮成分,抗炎效果最好的 50%醇提组中含(46.66 \pm 0.04)%总多糖成分,(4.66 \pm 0.12)%总黄酮成分,其中各洗脱成分组中,含总黄酮量最多的为 70%醇提组,含总多糖量最多的为水提组,具体见表 1。

2.2 各分离组分对 BV-2 小胶质细胞系存活率的影响

加味子五子衍宗方水提组、20%醇提组和 50%醇提组对细胞存活率没有明显影响,70%醇提组和 95%醇提组对细胞毒性较大,经 LSD 检验,与空白组相比 $P<0.01$ 。因此在后续实验中主要针对总提取物、水提组、20%醇提组和 50%醇提组的抗炎机制进行了研究,具体见表 2。

表 1 加味子五子衍宗方各分离部位总多糖、总黄酮含量($\bar{x}\pm s$,%, $n=3$)

	复方组	水提组	20%醇提组	50%醇提组	70%醇提组	95%醇提组
总多糖含量	62.35 \pm 0.05	99.24 \pm 0.05	47.68 \pm 0.01	46.66 \pm 0.04	28.91 \pm 0.09	9.97 \pm 0.03
总黄酮含量	0.08 \pm 0.03	—	3.53 \pm 0.05	4.66 \pm 0.12	5.22 \pm 0.08	3.13 \pm 0.04

表 2 加味子五子衍宗方各活性部位对 BV-2 小胶质细胞系存活率的影响($\bar{x}\pm s$,%, $n=3$)

空白对照组	模型组	复方组	水提组	20%醇提组	50%醇提组	70%醇提组	95%醇提组
100.01 \pm 0.51	90.40 \pm 13.92	82.22 \pm 6.01	92.09 \pm 0.37	95.75 \pm 0.29	95.24 \pm 1.95	25.24 \pm 3.75 ^a	7.38 \pm 1.35 ^a

表 3 MWP 各活性部位对细胞上清液中 NO 含量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

空白对照组	模型组	复方组	水提组	20% 醇提组	50% 醇提组
9.14±1.03	16.51±1.10 ^a	11.88±1.73 ^b	12.89±0.50 ^c	13.95±0.85 ^b	9.62±1.27 ^c

注:模型组与空白组相比,^a $P<0.01$;各药物治疗组与模型组相比,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ 。

2.3 加味五子衍宗方及其各活性部位对细胞上清液中 NO 的影响

NO 与炎症反应关系密切,炎症反应中大量产生的 NO 具有细胞毒性,是炎症反应造成正常组织损伤的原因之一。加味五子衍宗方及其各活性部位均能降低 NO 产生,经 LSD 检验复方组和 50% 醇提组与空白对照组相比有统计学差异($P<0.01$),且 50% 醇提组要优于其他组分和复方组,可能是神经炎性保护的主要物质基础,见表 3。

2.4 加味五子衍宗方复方及其各活性部位对炎症相关蛋白表达的影响

一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)和环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)是核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)调控的 2 个重要的炎症相关蛋白,在炎症反应中具有非常重要的作用。NO 和 PGE₂ 等炎性因子分别是 iNOS 和 COX-2 合成的产物,用 Western blot 检测此两种蛋白表达,可以帮助阐明细胞炎症激活和药物的抗炎机制。MWP 复方及其各活性部位可降低 iNOS 和 COX-2 的表达,其中 50% 醇提组的抑制作用最明显且优于复方组,见图 1。

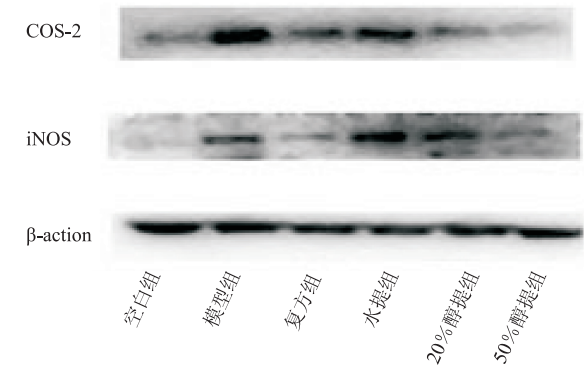


图 1 MWP 及其活性部位对 LPS 激活的 BV-2 小胶质细胞系中 iNOS 和 COX-2 蛋白表达的影响

2.5 加味五子衍宗方及其活性部位对激活 BV-2 小胶质细胞系 NF- κ B 核转移的影响

NF- κ B 一种多效性的转录因子,当细胞处于非激活状态,NF- κ B 存在于细胞浆,外界信号(氧化应

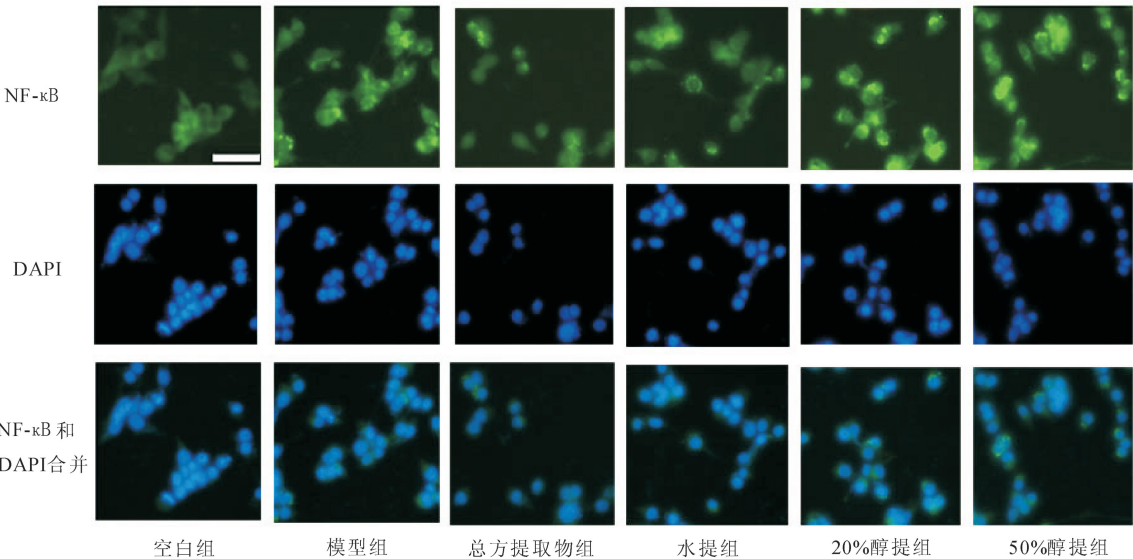
激、LPS 或细胞因子)刺激细胞后,NF- κ B 从细胞浆转移到细胞核,促进相应基因转录表达,参与炎症因子的生成。如图 2 所示:NF- κ B 被绿色荧光标记,DAPI 染色细胞核为蓝色,空白组细胞核内几乎没有绿色荧光标记,荧光标记在核外周的细胞浆,模型组细胞内 NF- κ B 绿色荧光与蓝色荧光有重叠现象,说明 NF- κ B 从细胞浆转移至细胞核,加味五子衍宗方及其活性部位组细胞核内绿色荧光减少,说明核转位现象被抑制,具体见图 2。

2.6 加味五子衍宗方及其活性部位对激活 BV-2 小胶质细胞系 ROS 含量的影响

活性氧(reactive oxygen species, ROS)参与细胞多种生理和病理形成机制,高浓度的 ROS 能通过氧化应激反应诱导细胞凋亡甚至坏死。DHE 是 ROS 的荧光探针,可透过细胞膜被 ROS 氧化产生红色荧光,根据细胞中红色荧光的产生可判断 ROS 的含量。DAPI 染色细胞核为蓝色,如图 3 所示:模型组 DHE 红色荧光产生明显,说明 LPS 可激发 BV-2 产生大量 ROS,空白组和药物组细胞红色荧光产生均不明显,其中 50% 醇提组红色荧光略高于其他组,说明 MWP 及其活性部位能有效抑制激活细胞 ROS 的产生,50% 醇提组抗氧化能力较其他组弱,具体见图 3。

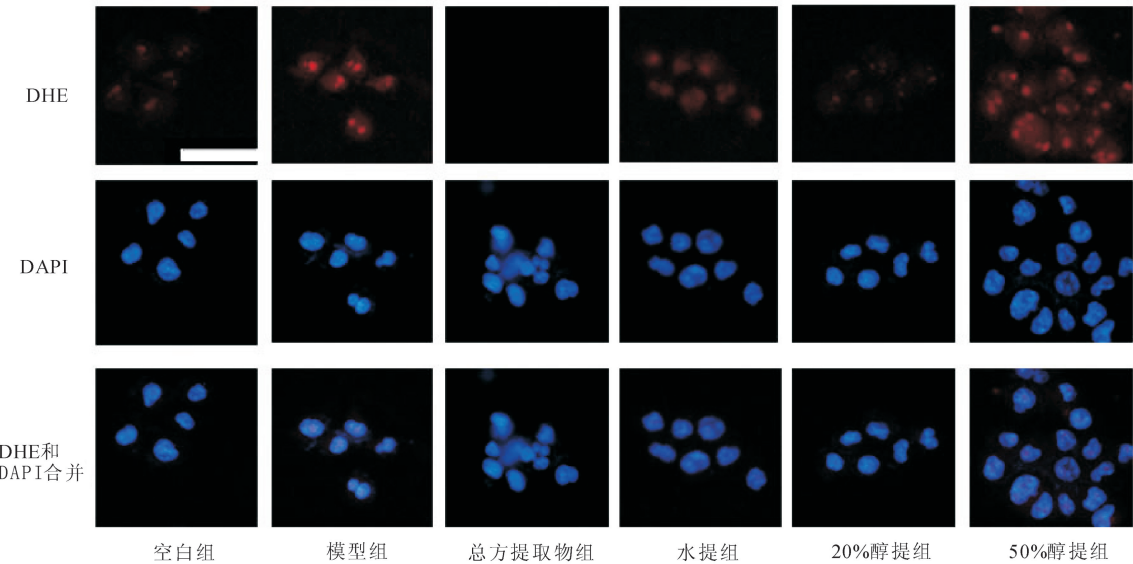
3 讨论

随着全世界人口老龄化速度的加快,老年期痴呆已成为全球性公共健康问题。AD 在老年期痴呆中发病率最高,对 AD 的研究已成为热点。加味五子衍宗方经过多年的临床观察和实验研究发现其有良好的临床抗痴呆和神经保护作用。AD 的病因复杂,涉及诸多病理生理过程^[4],单一靶点药物往往不能有效抑制病程发展,并且存在毒副作用^[5],中药毒副作用小且在防治痴呆方面有悠久的历史^[6-7],特别是针对像 AD 这种的多因素相关的复杂性疾病,更能显示出其多靶点,多途径的治疗优势。



注:空白组细胞核没有 NF-κB 绿色荧光,模型组细胞核有 NF-κB 聚集现象,总方提取物组及其活性部位组细胞核 NF-κB 聚集现象减弱。标尺为 50 μM

图 2 加味五子衍宗方及其活性部位对 LPS 激活的 BV-2 细胞 NF-κB 核转移的影响



注:空白组 DHE 红色荧光不明显,模型组 DHE 红色荧光明显,总方提取物组 DHE 无红色荧光,其余各组分红色荧光不明显。标尺为 50 μM

图 3 加味五子衍宗方及其活性部位对 LPS 激活的 BV-2 细胞中 ROS 含量的影响

近年来,炎症反应和氧化应激在 AD 的发生发展中的作用越来越受到关注^[8]。小胶质细胞 (microglia, MG) 是神经系统中的专职巨噬细胞,在 AD 神经病理变化中起“双刃剑”作用。一方面,激活的 MG 可吞噬 β 淀粉样蛋白,减轻 β 淀粉样蛋白聚集对神经元的损伤,另一方面,激活的 MG 可释放大量的炎症因子(如 NO 和 TNF-α),这些炎症因子,既可诱发脑内炎症,造成神经元的炎性损伤,又能继续诱发炎症,产生炎症瀑布效应,形成恶性循

环^[9]。MG 在炎症反应中活化并释放炎症因子的这一过程,可为新药的研发提供靶点和实验依据。本实验用 LPS 诱导 BV-2 小胶质细胞系形成炎症模型,通过对 NF-κB 信号通路中的蛋白表达和炎症因子的释放探讨加味五子衍宗方及其活性部位对神经系统保护作用的机制。加味五子衍宗方及其活性部位可降低 NO 的释放,抑制 COX-2 和 iNOS 蛋白的表达,抑制 NF-κB 核转移和 ROS 的释放,从抗炎和抗氧化方面对神经细胞产生保护作用,且 50% 醇

提组的抗炎效果优于其他活性部位和复方,为加味五子衍宗方神经保护研究奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 富宏,王学美,刘庚信,等. 加味五子衍宗颗粒对轻度认知障碍患者记忆功能及海马体积的磁共振研究[J]. 中国中西医结合杂志,2006,26(12):1066-1069.
- [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):18-19.
- [3] 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- κ B and JNK/p38 MAPK signaling pathways [J]. Phytomedicine, 2012, 19(2):122.

- [4] 付剑亮,邵福源. 阿尔茨海默病发病机制研究进展[J]. 世界临床药物,2010,31(7):390-394.
- [5] 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):388-390.
- [6] 苏芮,韩振蕴,范吉平,等. 中医对老年性痴呆病因病机及中药治疗研究[J]. 中华中医药杂志,2011,26(9):1917-1920.
- [7] 倪敬年,时晶,田金洲,等. 中药治疗痴呆临床试验中证候结局的评价[J]. 中国中西医结合杂志,2013,33(3):404-407.
- [8] Akiyama H, Barger S, Barnum S, et al. Inflammation and Alzheimer's disease[J]. Neurobiol Aging, 2000, 21(3):383-421.
- [9] 陈艳,王光楠,金英. 小胶质细胞及其炎性细胞因子参与阿尔茨海默病因果关系的研究[J]. 中国医药导报,2008,5(27):16-18.

(收稿日期:2014-09-15)

(本文编辑:董历华)