片仔癀通过抑制 TLR4/MAPK 信号通路减轻 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞神经炎症损伤研究

黄贞伟, 张 庆, 黄莉莉, 张小琴*, 黄鸣清*

福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122

* 通信作者: 张小琴, E-mail: 2012030@fitem.edu.cn; 黄鸣清, E-mail: hmq1115@126.com

收稿日期: 2020-06-09; 接受日期: 2020-07-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(81973437、81673561); 福建省自然科学基金项目(2019J01724); 福建中医药大学

校管课题(X2018013)

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2021.01007

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

摘要 目的:研究片仔癀(PZH)对脂多糖(LPS)诱导的 BV2 小胶质细胞神经炎症损伤的保护作用及机制。**方法:**将 BV2 小胶质细胞培养于含有 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素的 RPMI-1640 完全培养基中,并置于 5% CO₂, 37 °C 培养箱中常规培养。将 BV2 小胶质细胞以 5×10⁴ 个/mL 的密度接种于 96 孔板, LPS(100 ng/mL)诱导 BV2 小胶质细胞炎症反应,同时分别用不同浓度 PZH(0.05、0.10、0.15 mg/mL)干预 12 h,加入 MTT 并于 4 h 后检测其 490 nm 处吸光度。将 BV2 小胶质细胞以 5×10⁴ 个/mL 的浓密度接种于 24 孔板, LPS(100 ng/mL)诱导 BV2 小胶质细胞炎症反应,分别用不同浓度 PZH(0.05、0.10 和 0.15 mg/mL)干预 12 h,收集上清并使用 ELISA 法测定细胞上清中 IL-6 的水平。将 BV2 小胶质细胞以 1.6×10⁵ 个/mL 的密度接种于 6 孔板, LPS(100 ng/mL)诱导 BV2 小胶质细胞炎症反应,同时分别用不同浓度 PZH(0.05、0.10、0.15 mg/mL)干预 12 h,使用 TRIzol 试剂提取总 RNA,逆转录制备 cDNA,然后采用 RT-qPCR 法检测 BV2 小胶质细胞中炎症因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 转录水平。将 BV2 小胶质细胞以 1.6×10⁵ 个/mL 的密度接种于 6 孔板, LPS(100 ng/mL)诱导 BV2 小胶质细胞炎症反应,同时分别用不同浓度 PZH(0.05、0.10、0.15 mg/mL)干预 12 h,加入 RIPA 蛋白裂解液提取蛋白质,然后采用 Western blot 法检测 BV2 小胶质细胞中 TLR4、ERK1/2、p-ERK1/2、p38、p-p38、JNK、p-JNK、COX-2 和 iNOS 蛋白表达水平。**结果:**① MTT 实验结果显示,与正常对照组比较,不同浓度 PZH 和 LPS 各自单独干预或者两者共同干预对 BV2 小胶质细胞活力均无明显影响($P>0.05$)。② ELISA 结果显示,与正常对照组比较,模型组 IL-6 分泌水平明显上升($P<0.001$);与模型组比较,不同浓度 PZH 可显著降低 IL-6 分泌水平($P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.01$)。③ RT-qPCR 结果显示,与正常对照组比较,模型组 IL-1β($P<0.001$)、IL-6($P<0.001$)和 TNF-α($P<0.01$)转录水平明显上升;与模型组比较,不同浓度 PZH 可明显降低 IL-1β($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$)、IL-6($P>0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$)和 TNF-α($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.001$)转录水平。④ Western blot 结果显示,不同浓度 PZH 能显著抑制 LPS 诱导的 TLR4/MAPK 信号通路的激活,减少 TLR4($P>0.05$, $P<0.05$, $P<0.05$)、p-ERK1/2($P>0.05$, $P<0.05$, $P<0.01$)、p-p38($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$)、COX-2($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.001$)和 iNOS($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.01$)蛋白表达水平,但对 p-JNK 蛋白表达无明显影响($P>0.05$)。**结论:**片仔癀可明显改善 LPS 诱导的神经炎症损伤,其作用可能与抑制 TLR4/MAPK 信号通路激活相关。**关键词** 神经炎症损伤;片仔癀;BV2 小胶质细胞;TLR4/MAPK 信号通路

引用格式:黄贞伟,张庆,黄莉莉,等. 片仔癀通过抑制 TLR4/MAPK 信号通路减轻 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞神经炎症损伤研究[J]. 康复学报, 2021, 31(1): 44-51.

HUANG Z W, ZHANG Q, HUANG L L, et al. Pien Tze Huang attenuates neuro-inflammatory injury in BV2 microglial cells induced by lipopolysaccharide via inhibition of TLR4/MAPK signaling pathway [J]. Rehabilitation Medicine, 2021, 31(1): 44-51.

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2021.01007

缺血性脑卒中是一种急性脑血管疾病,可导致偏瘫,甚至死亡,影响人们生活质量,加重社会负担^[1]。小胶质细胞是中枢神经系统中一种固有的免疫细胞,在缺血性脑卒中发生、发展过程中过度活化的小胶质细胞引发神经炎症反应,进而损伤脑组织^[2]。Toll 受体 4(TLR4)是 Toll 样受体家族中的一员,是脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)的关键受体之一,其在脑内主要分布于小胶质细胞,可参与炎症相关信号通路的转导^[3]。丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)是一种丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶,主要包括细胞外信号调节蛋白激酶(ERK1/2)、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)和 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK),可参与调节多种生理活动,与细胞炎症反应密切相关^[4]。既往研究表明,TLR4/MAPK 信号通路在缺血性脑卒中引发以及 LPS 诱导的小胶质细胞神经炎症反应中均发挥重要作用^[5-6]。

片仔癀(Pien Tze Huang,PZH)是我国一种名贵中成药,由麝香、牛黄、三七、蛇胆等名贵药材精制而成,具有清热解毒、凉血化瘀、消肿止痛等功效。现代药理研究也发现 PZH 具有抗肿瘤、解热抗炎和脑保护作用^[7-8]。刘丽星等^[9]发现 PZH 可降低大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion,MCAO)大鼠脑内 IL-6 等促炎因子的表达水平,减轻脑卒中后神经炎症损伤。本课题组前期研究也表明 PZH 可以抑制神经炎症反应,减轻脑缺血再灌注损伤^[10]。以上提示 PZH 具有抑制神经炎症反应的作用,但是 PZH 是否通过 TLR4/MAPK 信号通路改善小胶质细胞神经炎症损伤未见报道,因此本实验通过 LPS 建立 BV2 小胶质细胞神经炎症损伤模型对此进行深入研究。

1 材料与方法

1.1 药品和主要试剂

PZH(漳州片仔癀药业有限公司);LPS、MTT(美国 Sigma 公司);BCA 蛋白浓度检测试剂盒、ELISA 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);RPMI-1640 完全培养基(美国 Gibco 公司);SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);ChamTM SYBR® qPCR Master Mix(南京 Vazyme 公司)、逆转录试剂盒(美国 Thermo 公司);TLR4(美国 SANTA CRUZ 公司);iNOS(美国 abcam 公司); β -actin、ERK1/2、p-ERK1/2、p38、p-p38、JNK、p-JNK、COX-2 和兔二抗(美国 CST 公司)。

1.2 主要仪器

电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);光学显微镜、细胞培养箱(美国 Thermo Fisher 公司);4℃离心机(德国 Eppendorf 公司);酶标仪(瑞士 TECAN 公司);BIO-RAD 电泳仪、化学发光成像仪(美国 BIO-RAD 公司);7900H 荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

1.3 药物制备

将 PZH 研磨至粉末状,称取一定量粉末,溶于含 20% DMSO 的磷酸缓冲盐中,配制成浓度为 25 mg/mL 的母液备用。

1.4 细胞培养

复苏 BV2 小胶质细胞(中国典型培养物保存中心),培养于 RPMI-1640 完全培养基(含 10% 胎牛血清和 1%青霉素-链霉素)中,置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养,每天换液,隔天传代,供后续实验使用。

1.5 模型建立和分组

将处于对数生长期、状态良好的 BV2 小胶质细胞接种于 96 孔板,然后置于 37℃、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中继续培养 12 h,再用 LPS 刺激 BV2 小胶质细胞 12 h,LPS 终浓度为 100 ng/mL。实验分组:正常对照组,LPS 模型组(100 ng/mL),PZH 低剂量组(0.05 mg/mL PZH+100 ng/mL LPS),PZH 中剂量组(0.10 mg/mL PZH+100 ng/mL LPS),PZH 高剂量组(0.15 mg/mL PZH+100 ng/mL LPS)。

1.6 MTT 法检测 BV2 小胶质细胞存活率

将 BV2 小胶质细胞种于 96 孔板,种板密度为 5×10^4 个/mL,每孔 100 μ L,设置 6 个复孔,置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱培养。MTT 实验分组:正常对照组,LPS 模型组(100 ng/mL),单独 PZH 组(0.05 mg/mL、0.10 mg/mL、0.15 mg/mL),PZH 低剂量组(0.05 mg/mL PZH+100 ng/mL LPS),PZH 中剂量组(0.10 mg/mL PZH+100 ng/mL LPS),PZH 高剂量组(0.15 mg/mL PZH+100 ng/mL LPS)。培养 12 h 细胞后更换新的培养基,按照组别加入对应的 PZH 和 LPS,再将孔板放入 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱继续培养 12 h,然后取出 96 孔板更换新的培养基,再加入 MTT(5 mg/mL)10 μ L,继续培养 4 h 后吸弃培养基,加入 150 μ L DMSO,置于摇床振荡 10 min,然后使用酶标仪测定 490 nm 处吸光度(A 值),最后根据 A 值计算细胞存活率。

细胞存活率(%)=实验组 A 值/正常对照组 A 值 $\times$ 100%

1.7 显微镜下观察 BV2 小胶质细胞形态变化

将 BV2 小胶质细胞接种于 24 孔板,种板密度为 5×10^4 个/mL,每孔 500 μ L,设置 3 个复孔,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 饱和湿度培养箱培育 12 h 后更换新培养基,按照组别加入对应的 PZH 和 LPS,继续培养 12 h 后取出,置于显微镜下观察各组细胞的形态并拍片。

1.8 ELISA 法检测细胞上清中促炎因子 IL-6 的水平

细胞种板、造模和给药方法同“1.7”,然后收集细胞上清液,于 4 $^{\circ}$ C 离心机离心(12 000 r/min)5 min,然后取上清。按照 ELISA 法测定说明书,依次加入样品/标准品、生物素化抗体、亲和素-过氧化物酶复合物以及显色液,最后加入终止液后于 450 nm 处测定吸光度,根据标准曲线计算各样品中 IL-6 的

含量。

1.9 RT-qPCR 法检测 BV2 小胶质细胞中促炎因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 转录水平

将 BV2 小胶质细胞接种于 6 孔板,种板密度为 1.6×10^5 个/mL,每孔 2 mL,设置 3 个复孔,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 饱和湿度培养箱培育 12 h 后更换新培养基,按照组别加入对应的 PZH 和 LPS,置于培养箱中继续培养 12 h 后弃上清,用预冷的 PBS 洗涤 3 遍后加入 TRIzol 提取总 RNA,使用逆转录试剂盒制备 cDNA,然后以该 cDNA 为模板,使用扩增试剂盒进行扩增。采用引物设计软件 Primer 5 设计促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 以及内参 GAPDH 的引物序列。PCR 扩增反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,退火 60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环。相应引物序列见表 1。

表 1 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 GAPDH 基因引物序列
Table 1 Primer sequences of IL-1 β , IL-6, TNF- α and GAPDH genes

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
IL-1 β	GAAATGCCACCTTTTGACAGTG	TGGATGCTCTCATCAGGACAG
IL-6	CTGCAAGAGACTTCCATCCAG	AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG
TNF- α	GCCGATGGGTTGTACCTTGT	TCTTGACGGCAGAGAGGAGG
GAPDH	GAGAAACCTGCCAAGTATGATGAC	AGAGTGGAAGTTCCTGTTGAAG

1.10 Western blot 法检测 BV2 小胶质细胞中炎症蛋白酶 COX-2 和 iNOS 的水平

细胞种板、造模和给药同“1.9”,然后弃上清液,用预冷的 PBS 洗涤 3 遍后加入细胞裂解液提取总蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度,再加入 5% 加样缓冲液,于 100 $^{\circ}$ C 中煮 10 min 制备蛋白样品。每组取 40 μ g 蛋白样品,使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)分离蛋白,再将蛋白转至 PVDF 膜,然后置于脱脂奶粉(或 BSA)中封闭 1.5 h。接着孵育一抗(COX-2、iNOS、 β -actin)和相应二抗,再置于凝胶成像系统中显影,最后使用 Image Lab 软件分析图像。

1.11 Western blot 法检测 BV2 小胶质细胞中 TLR4/MPAK 通路相关蛋白表达水平

蛋白样品制备方法同“1.10”。每组取 40 μ g 蛋白样品,使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)分离蛋白,再将蛋白转至 PVDF 膜,然后置于脱脂奶粉(或 BSA)中封闭 1.5 h。然后依次孵育一抗(TLR4、ERK1/2、p-ERK1/2、p38、p-p38、

JNK、p-JNK、 β -actin)和相应二抗,然后置于凝胶成像系统中显影,最后使用 Image Lab 软件分析图像。

1.12 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行统计处理。计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,当数据满足正态分布时,组间比较采用单因素方差分析,如果方差齐则采用 LSD- t 法,如果方差不齐则采用 Games-Howell 法;当数据不满足正态分布时,组间比较则采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PZH 和 LPS 对 BV2 小胶质细胞活力的影响

采用 MTT 法检测 LPS 和 PZH 干预后 BV2 小胶质细胞的存活率。与正常对照组比较,LPS (100 ng/mL)刺激 BV2 小胶质细胞 12 h 后,细胞存活率没有发生明显变化;当 PZH(0.05、0.10、0.15 mg/mL)单独作用或 PZH 和 LPS 同时刺激 BV2 小胶质细胞 12 h 时,细胞存活率仍然没有明显变化。综上所述,在本实验条件下,LPS 和 PZH 对 BV2 小胶质细胞无明显毒性作用。见表 2。

表 2 PZH 和 LPS 对 BV2 小胶质细胞活力的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Effect of PZH and LPS on the viability of BV2 microglial cells ($\bar{x}\pm s$)

组 别	<i>n</i>	存活率/%
正常对照组	6	100.00±4.40
LPS 模型组	6	102.97±9.89
0.05 mg/mL PZH 组	6	95.52±15.71
0.10 mg/mL PZH 组	6	101.07±8.73
0.15 mg/mL PZH 组	6	107.47±7.55
PZH 低剂量组(0.05 mg/mL PZH+100 ng/mL LPS)	6	106.47±4.74
PZH 中剂量组(0.10 mg/mL PZH+100 ng/mL LPS)	6	100.24±4.20
PZH 高剂量组(0.15 mg/mL PZH+100 ng/mL LPS)	6	103.94±8.38

2.2 PZH 对 LPS 诱导后 BV2 小胶质细胞形态的影响

显微镜下观察发现,与正常对照组比较,BV2 小胶质细胞在 LPS 刺激 12 h 后,细胞胞体变大,细

胞突起增多变长,表明细胞被激活;而加入不同浓度 PZH 干预后,BV2 小胶质细胞突起明显减少,表明 PZH 可抑制 BV2 小胶质细胞的活化,见图 1。

注:A. 正常对照组;B. LPS 模型组;C. PZH 低剂量组;D. PZH 中剂量组;E. PZH 高剂量组。

Note: A. Normal control group; B. LPS model group; C. Low-dose PZH group; D. Medium-dose PZH group; E. High-dose PZH group.

图 1 PZH 对 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞形态的影响($\times 200$)

Figure 1 Effect of PZH on the morphology of LPS-induced BV2 microglial cells ($\times 200$)

2.3 PZH 对 LPS 诱导后 BV2 小胶质细胞促炎因子 IL-6 表达的影响

采用 ELISA 法检测细胞上清中 IL-6 的水平。与正常对照组比较,BV2 小胶质细胞在 LPS 刺激 12 h 后,IL-6 表达水平明显上升($P<0.001$);与 LPS 模型组比较,在给予不同浓度的 PZH(0.05、0.10、0.15 mg/mL)共同干预 12 h 后,IL-6 表达水平明显下降($P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.01$)。见表 3。

2.4 PZH 对 LPS 诱导后 BV2 小胶质细胞中促炎因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 水平的影响

RT-qPCR 法检测 BV2 小胶质细胞中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 转录水平。与正常对照组比较,LPS 刺激 12 h 后,BV2 小胶质细胞中 IL-1 β ($P<0.001$)、IL-6($P<0.001$)和 TNF- α ($P<0.01$)的 mRNA 水平明显上升;与 LPS 模型组比较,不同浓度的 PZH 可明显降低细胞中 IL-1 β ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$)、IL-6($P>0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$)和 TNF- α ($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.001$)的 mRNA 水平。见表 4。

表 3 PZH 对 BV2 小胶质细胞分泌 IL-6 的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effect of PZH on the IL-6 secretion of BV2 microglial cells ($\bar{x}\pm s$)

组 别	<i>n</i>	IL-6/(pg/mL)
正常对照组	3	56.80±1.79
LPS 模型组	3	1 240.39±15.83 ¹⁾
PZH 低剂量组	3	843.50±51.33 ²⁾
PZH 中剂量组	3	597.30±69.44 ²⁾
PZH 高剂量组	3	394.97±59.40 ³⁾⁴⁾

注:与正常对照组比较,1) $P<0.001$;与 LPS 模型组比较,2) $P<0.05$,3) $P<0.01$;与 PZH 低剂量组比较,4) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the normal control group, 1) $P<0.001$; Compared with the LPS model group, 2) $P<0.05$, 3) $P<0.01$; Compared with the low-dose PZH group, 4) $P<0.05$.

表 4 PZH 对 LPS 诱导后 BV2 小胶质细胞中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α mRNA 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$)
Table 4 Effect of PZH on the mRNA levels of IL-1β, IL-6 and TNF-α in LPS-induced BV2 microglial cells ($\bar{x}\pm s$)

组 别	<i>n</i>	IL-1β mRNA	IL-6 mRNA	TNF-α mRNA
正常对照组	3	1.00±0.06	1.00±0.07	1.00±0.20
LPS 模型组	3	749.24±77.73 ¹⁾	223.77±19.40 ¹⁾	7.61±1.59 ²⁾
PZH 低剂量组	3	589.43±89.81 ³⁾	208.15±12.11	2.71±0.47 ⁴⁾
PZH 中剂量组	3	469.66±73.09 ⁴⁾	162.79±23.27 ⁴⁾	2.39±0.99 ⁴⁾
PZH 高剂量组	3	188.41±20.96 ⁵⁾	73.31±10.04 ^{5/6)}	0.88±0.09 ⁵⁾

注:与正常对照组比较,1) $P<0.001$,2) $P<0.01$;与 LPS 模型组比较,3) $P<0.05$,4) $P<0.01$,5) $P<0.001$;与 PZH 低剂量组比较,6) $P<0.001$ 。
Note: Compared with the normal control group, 1) $P<0.001$, 2) $P<0.01$; Compared with the LPS model group, 3) $P<0.05$, 4) $P<0.01$, 5) $P<0.001$; Compared with the low-dose PZH group, 6) $P<0.001$.

2.5 PZH 对 LPS 诱导后 BV2 小胶质细胞中炎症蛋白酶 COX-2 和 iNOS 表达的影响

Western blot 法检测 BV2 小胶质细胞质中 COX-2 和 iNOS 蛋白表达水平。与正常对照组比较,LPS 刺激 12 h 后,BV2 小胶质细胞中 COX-2 和 iNOS 蛋白水平均明显增加($P<0.001$, $P<0.001$);与 LPS 模型组比较,不同浓度 PZH(0.05、0.10 和 0.15 mg/mL)共同干预 12 h 时,PZH 可明显降低细胞中 COX-2 蛋白表达水平($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.001$)以及 iNOS 蛋白表达水平($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.01$),见表 5 和图 2。

表 5 PZH 对 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞中 COX-2 和 iNOS 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 5 Effect of PZH on the protein expression of COX-2 and iNOS in LPS-induced BV2 microglial cells ($\bar{x}\pm s$)

组 别	<i>n</i>	COX-2 蛋白	iNOS 蛋白
正常对照组	3	1.00±0.00	1.00±0.00
LPS 模型组	3	4.23±0.25 ¹⁾	2.28±0.41 ¹⁾
PZH 低剂量组	3	3.01±0.15 ²⁾	1.47±0.29 ²⁾
PZH 中剂量组	3	2.33±0.17 ^{2/4)}	1.17±0.24 ²⁾
PZH 高剂量组	3	1.13±0.22 ^{3/5)}	1.12±0.06 ²⁾

注:与正常对照组比较,1) $P<0.001$;与 LPS 模型组比较,2) $P<0.01$,3) $P<0.001$;与 PZH 低剂量组比较,4) $P<0.05$,5) $P<0.01$ 。
Note: Compared with the normal control group, 1) $P<0.001$; Compared with the LPS model group, 2) $P<0.01$, 3) $P<0.001$; Compared with the low-dose PZH group, 4) $P<0.05$, 5) $P<0.01$.

注:1. 正常对照组;2. LPS 模型组;3. PZH 低剂量组;4. PZH 中剂量组;5. PZH 高剂量组。
Note: 1. Normal control group; 2. LPS model group; 3. Low-dose PZH group; 4. Medium-dose PZH group; 5. High-dose PZH group.

图 2 PZH 对 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞中 COX-2 和 iNOS 蛋白表达的影响

Figure 2 Effect of PZH on the protein expression of COX-2 and iNOS in LPS-induced BV2 microglial cells

2.6 PZH 对 LPS 诱导后 BV2 小胶质细胞 TLR4/MAPK 信号通路的影响

Western blot 法检测 BV2 小胶质细胞中 TLR4/MAPK 信号通路相关蛋白的表达水平。与正常对照组比较,LPS 刺激 12 h 后,BV2 小胶质细胞中 TLR4 ($P<0.05$)、p-ERK1/2 ($P<0.01$)、p-p38 ($P<0.01$) 表达水平明显上升;与 LPS 模型组比较,不同浓度的 PZH 可抑制 TLR4 ($P>0.05$, $P<0.05$, $P<0.05$)、p-ERK1/2 ($P>0.05$, $P<0.05$, $P<0.01$)、p-p38 ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$)蛋白表达。LPS 刺激后 BV2 小胶质细胞中 p-JNK 有一定上升,但差异无统计学意义($P>0.05$),PZH 对 p-JNK 蛋白表达则无明显影响。见表 6 和图 3。

表 6 PZH 对 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞中 TLR4/MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$)
Table 6 Effect of PZH on the protein expression of TLR4/MAPK signal pathway-related proteins in LPS-induced BV2 microglial cells ($\bar{x}\pm s$)

组 别	<i>n</i>	TLR4 蛋白	p-ERK1/2 蛋白	p-p38 蛋白	p-JNK 蛋白
正常对照组	3	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
LPS 模型组	3	1.55±0.07 ¹⁾	2.10±0.07 ²⁾	2.09±0.28 ²⁾	1.24±0.17
PZH 低剂量组	3	1.37±0.24	1.44±0.24	1.32±0.36 ³⁾	1.25±0.11
PZH 中剂量组	3	1.16±0.20 ³⁾	1.00±0.03 ³⁾	0.99±0.28 ⁴⁾	1.13±0.05
PZH 高剂量组	3	1.09±0.23 ³⁾	0.88±0.04 ⁴⁾	0.81±0.26 ⁴⁾	1.25±0.11

注:与正常对照组比较,1) $P<0.05$, 2) $P<0.01$;与 LPS 模型组比较,3) $P<0.05$, 4) $P<0.01$ 。
Note: Compared with the normal control group, 1) $P<0.05$, 2) $P<0.01$; Compared with the LPS model group, 3) $P<0.05$, 4) $P<0.01$.

注:1. 正常对照组;2. LPS 模型组;3. PZH 低剂量组;
4. PZH 中剂量组;5. PZH 高剂量组。
Note: 1. Normal control group; 2. LPS model group; 3. Low-dose PZH group; 4. Medium-dose PZH group; 5. High-dose PZH group.

图 3 PZH 对 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞中 TLR4/MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响
Figure 3 Effect of PZH on the protein expression of TLR4/MAPK signaling pathway-related proteins in LPS-induced BV2 microglial cells

3 讨 论

神经炎症反应是缺血性脑卒中发生、发展过程

中一个非常重要的分子机制,参与脑缺血再灌注损伤,造成脑内组织坏死、水肿,最终导致机体多重功能损伤。小胶质细胞是脑内的巨噬细胞,约占大脑胶质细胞的 10%~20%,正常情况下激活的小胶质细胞具有维持脑内稳态和促进神经系统损伤修复的重要生理作用,但是在缺血性脑卒中发生后过度活化的小胶质细胞会释放促炎因子和炎性蛋白酶,如 IL-6、COX-2 和 iNOS 等,参与神经炎症反应并损伤周围神经元。而且,损伤的神经元细胞会释放出毒性物质再次刺激小胶质细胞,进一步加重神经炎症反应^[11-12]。因此,抑制小胶质细胞引发的神经炎症反应,可减轻神经炎症造成的损伤,且有益于神经系统损伤的修复,这在缺血性脑卒中的治疗及康复过程中具有重要的意义。

IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 是小胶质细胞神经炎症损伤过程中重要的炎症因子,参与炎症信号网络的启动和放大以及炎症反应损伤,其表达水平代表神经炎症反应损伤的程度^[13]。本实验结果显示,经过 LPS 刺激后,BV2 小胶质细胞中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 水平明显上升,促炎因子 IL-6 分泌大量增加;PZH 干预后,BV2 小胶质细胞中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 水平明显下降,抑制 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞分泌 IL-6。COX-2 是将花生四烯酸转化成前列腺素的一种限速酶,后者在参与调控慢性和急性炎症中扮演重要角色^[14]。iNOS 是 NO 合成的关键酶,炎症反应发生后 iNOS 高表达,进而促进合成大量的 NO 以参与炎症反应,可导致自由基形成、血脑屏障通透性增加,进而加重脑损伤^[15]。本实验结果显示,在 LPS 刺激后,BV2 小胶质细胞高表达 COX-2 和 iNOS 蛋白,PZH 干预可以显著抑制 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞表达 COX-2 和 iNOS。总之,结果表明 PZH 可抑制 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞神经炎症反应。

为了阐明 PZH 抑制 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞中 IL-6、COX-2 和 iNOS 表达的机制,本研究进一步探究了 PZH 对信号通路 TLR4/MAPK 的影响。研究发现,LPS 与小胶质细胞膜上的 TLR4 受体相结合后可促进 TLR4 高表达,并且在髓样分化因子(MyD88)的作用下激活 MAPKs (ERK1/2、JNK 和 p38 MAPK)信号通路,而 MAPKs 信号通路在调节免疫反应和炎症应答中扮演重要角色,与 IL-6、iNOS 和 COX-2 等一系列促炎因子和炎性蛋白酶的大量合成释放密切相关^[16]。本实验结果显示,在 LPS 刺激 BV2 小胶质细胞后,TLR4 表达增加,且磷酸化 MAPKs 水平升高,即 TLR4/MAPK 信号通路被激活。PZH 的干预则可明显降低 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞 TLR4 的表达,并且抑制 MAPKs 磷酸化,即降低了 p-ERK1/2 和 p-p38 蛋白的表达水平,但是 PZH 对 p-JNK 蛋白的表达无明显影响,结果提示 PZH 可抑制 LPS 诱导的 TLR4/MAPK 信号通路的激活。

综上所述,PZH 可能是通过抑制 TLR4/MAPK 信号通路,进而抑制炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 转录,降低促炎因子 IL-6 以及促炎性蛋白酶 COX-2、iNOS 的表达,发挥其改善 LPS 诱导 BV2 小胶质细胞神经炎症损伤的作用。本实验为进一步研究 PZH 治疗脑卒中的机制以及其临床应用提供依据和实验基础。

参考文献

- [1] JIE L Q, HAN G X. Research progress of Chinese and Western medicine on acute ischemic stroke [J]. Chin J Convalesc Med, 2019, 28(10): 1047-1050.
解兰琴, 韩冠先. 急性缺血性脑卒中的中西医研究进展[J]. 中国疗养医学, 2019, 28(10): 1047-1050.
- [2] SALTER M W, STEVENS B. Microglia emerge as central players in brain disease [J]. Nature Med, 2017, 23(9): 1018-1027.
- [3] XUE Y, ZHOU J, LIU Z P, et al. Dexmedetomidine inhibits the lipopolysaccharide-stimulated inflammatory response in microglia through the pathway involving TLR4 and NF- κ B [J]. Kaohsiung J Med Sci, 2019, 35(12): 750-756.
- [4] XU M, WANG J, ZHANG X, et al. Polysaccharide from Schisandra chinensis acts via LRP-1 to reverse microglia activation through suppression of the NF- κ B and MAPK signaling [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 256: 112798.
- [5] QU Z, CHEN Y, LUO Z H, et al. 7-methoxyflavanone alleviates neuroinflammation in lipopolysaccharide-stimulated microglial cells by inhibiting TLR4/MyD88/MAPK signalling and activating the Nrf2/NQO-1 pathway [J]. J Pharm Pharmacol, 2020, 72(3): 385-395.
- [6] GU J, SU S, GUO J, et al. Anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of the combination of Ligusticum chuanxiong and Radix Paeoniae against focal cerebral ischaemia via TLR4/MyD88/MAPK/NF- κ B signaling pathway in MCAO rats [J]. J Pharm Pharmacol, 2018, 70(2): 268-277.
- [7] HUANG Q M, XU W, SHA M, et al. Recent pharmacologic actions and clinical applications of Pien-Tze-Huang [J]. Strait Pharm J, 2017, 29(5): 60-64.
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.
- [8] ZHUANG Q C, LIN M H, WEI L H, et al. Pien Tze Huang inhibits colorectal cancer cell via regulating hedgehog signaling pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. Rehabil Med, 2018, 28(1): 31-36.
庄群川, 林明和, 魏丽慧, 等. 片仔癀对大肠癌细胞 Hedgehog 信号通路调控的体内外研究[J]. 康复学报, 2018, 28(1): 31-36.
- [9] LIU L X, ZHANG X M, ZHU L Q, et al. Effect of Pien Tze Huang on amount of IL-6, IL-1 β of focal cerebral infarction rats [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2014, 32(3): 515-517.
刘丽星, 张晓萌, 朱陵群, 等. 片仔癀对局灶性脑梗死大鼠炎症相关因子 IL-6、IL-1 β 含量的影响[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(3): 515-517.
- [10] ZHANG X Q, ZHANG Y P, TANG S Q, et al. Pien-Tze-Huang protects cerebral ischemic injury by inhibiting neuronal apoptosis in acute ischemic stroke rats [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 219: 117-125.
- [11] QIN C, ZHOU L Q, MA X T, et al. Dual functions of microglia in ischemic stroke [J]. Neurosci Bull, 2019, 35(5): 921-933.
- [12] XIE D, HE M, HU X. Microglia/macrophage diversities in central nervous system physiology and pathology [J]. CNS neurosci ther, 2019, 25(12): 1287-1289.
- [13] NICHOLAS D A, ZHANG K, HUNG C, et al. Palmitic acid is a toll-like receptor 4 ligand that induces human dendritic cell secretion of IL-1 β [J]. PloS One, 2017, 12(5): e0176793.
- [14] YAN Y, TONG F, CHEN J, et al. Endogenous BMP-4/ROS/COX-2 mediated IPC and resveratrol alleviated brain damage [J]. Curr Pharm Des, 2019, 25(9): 1030-1039.
- [15] KUMAR G, MUKHERJEE S, PALIWAL P, et al. Neuroprotective effect of chlorogenic acid in global cerebral ischemia-reperfusion rat model [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2019, 392(10): 1293-1309.
- [16] LEE S, KIM D C, BAEK H Y, et al. Anti-neuroinflammatory effects of tryptanthrin from *Polygonum tinctorium* Lour. in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells [J]. Arch Pharm Res, 2018, 41(4): 419-430.

Pien Tze Huang Attenuates Neuro-inflammatory Injury in BV2 Microglial Cells Induced by Lipopolysaccharide via Inhibition of TLR4/MAPK Signaling Pathway

HUANG Zhenwei, ZHANG Qing, HUANG Lili, ZHANG Xiaoqin*, HUANG Mingqing*

College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China

*Correspondence: ZHANG Xiaoqin, E-mail: 2012030@fjtc.edu.cn; HUANG Mingqing, E-mail: hmq1115@126.com

ABSTRACT Objective: To investigate the protective effect and the molecular mechanism of Pien Tze Huang (PZH) on Lipopolysaccharide (LPS)-induced neuro-inflammatory injury in BV2 microglial cells. **Methods:** BV2 microglial cells were cultured with RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin at 5% CO₂ and 37 °C in a humidified incubator. BV2 microglial cells were seeded at a density of 5×10⁴ cells/mL in 96-well plate. The inflammatory response in BV2 microglial cells was induced by LPS (100 ng/mL), while the cells were treated with different concentrations of PZH (0.05, 0.10 and 0.15 mg/mL) for 12 h. And then its absorbance at 490 nm was detected after the treatment of MTT for 4 h. BV2 microglial cells were seeded at a density of 5×10⁴ cells/mL in 24-well plate. The inflammatory response in BV2 microglial cells was induced by LPS (100 ng/mL), while the cells were treated with different concentrations of PZH (0.05, 0.10 and 0.15 mg/mL) for 12 h. Then supernatant was collected and the concentration of IL-6 was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit. BV2 microglial cells were seeded at a density of 1.6×10⁵ cells/mL in 6-well plate. The inflammatory response in BV2 microglial cells was induced by LPS (100 ng/mL), while the cells were treated with different concentrations of PZH (0.05, 0.10 and 0.15 mg/mL) for 12 h. Total RNA was extracted using TRIzol reagent and it was reverse-transcribed to synthesize the complementary DNA. And then the mRNA expression of IL-1β, IL-6 and TNF-α were determined using real time-qPCR. BV2 microglial cells were seeded at a density of 1.6×10⁵ cells/mL in 6-well plate. The protein extracts were isolated from each group of cells using RIPA protein lysis buffer after the administration of LPS (100 ng/mL) and different concentrations of PZH (0.05, 0.10 and 0.15 mg/mL) for 12 h. Then the protein expression of TLR4, ERK1/2, p-ERK1/2, p38, p-p38, JNK, p-JNK, COX-2, iNOS in BV2 microglial cells were detected by Western blot. **Results:** 1) The result of MTT assay showed that PZH at 0.05-0.15 mg/mL concentration and LPS at 100 ng/mL concentration had no significant cytotoxicity on BV2 microglial cells ($P>0.05$). 2) The result of ELISA showed that the secretion of IL-6 was significantly increased in BV2 microglial cells induced by LPS compared with the normal control group ($P<0.001$); compared with the LPS group, different concentrations of PZH significantly decreased the expression level of IL-6 in LPS-induced BV2 microglial cells ($P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.01$). 3) The result of RT-qPCR showed that the transcriptional levels of IL-1β ($P<0.001$), IL-6 ($P<0.001$) and TNF-α ($P<0.01$) were significantly increased after the induction of LPS compared with normal control group; different concentrations of PZH significantly inhibited the LPS-induced IL-1β ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$), IL-6 ($P>0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$) and TNF-α ($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.001$) mRNA upregulation. 4) The result of Western blot showed that PZH significantly inhibited the LPS-induced TLR4/MAPK signaling pathway activation, and decreased the protein expressions of TLR4 ($P>0.05$, $P<0.05$, $P<0.05$), p-ERK1/2 ($P>0.05$, $P<0.05$, $P<0.01$), p-p38 ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$), COX-2 ($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.001$) and iNOS ($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.01$), but not p-JNK. **Conclusion:** PZH can significantly improve the LPS-induced neuro-inflammatory injury, which may be related to the inhibition of the activation of TLR4/MAPK signaling pathway.

KEY WORDS neuro-inflammatory injury; Pien Tze Huang; BV2 microglial cells; TLR4/MAPK signaling pathway

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2021.01007

欢迎投稿，欢迎订阅！