

# 朝藿定 B 对 BV2 小胶质细胞炎症反应的作用及机制

胡子凡, 谷雨, 范育辰, 戴玮, 陈文芳

(青岛大学基础医学院生理学与病理生理学系, 山东 青岛 266071)

**[摘要]** **目的** 探讨朝藿定 B 对脂多糖(LPS)诱导的 BV2 小胶质细胞炎症反应的抑制作用及雌激素受体(ER)特异性阻断剂 ICI 182,780 的阻断效应。**方法** 常规培养 BV2 小胶质细胞, 加或不加朝藿定 B、LPS、ICI 182,780 处理, 采用 3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5 二苯基溴化四唑(MTT)比色法检测细胞活力, 实时聚合酶链反应检测肿瘤坏死因子- $\alpha$ (*TNF- $\alpha$* )和白细胞介素-6(*IL-6*) mRNA 的表达。**结果** 不同浓度朝藿定 B 对 BV2 小胶质细胞活力没有影响( $P>0.05$ )。LPS 可明显上调促炎因子 *TNF- $\alpha$*  ( $F=10.64, q=9.157, P<0.001$ )和 *IL-6* ( $F=25.25, q=12.630, P<0.001$ ) mRNA 的表达; 1、10  $\mu\text{mol/L}$  朝藿定 B 预处理均能明显抑制 LPS 诱导的 *TNF- $\alpha$*  mRNA 表达上调( $q=4.655, 5.408, P<0.05$ ), 10  $\mu\text{mol/L}$  朝藿定 B 对 LPS 诱导的 *IL-6* mRNA 表达有明显的抑制作用( $q=4.696, P<0.05$ )。朝藿定 B 对 LPS 诱导的 *TNF- $\alpha$*  和 *IL-6* mRNA 表达的抑制作用可被 ICI 182,780 所阻断( $F=12.53, 28.71, q=5.318, 4.684, P<0.05$ )。**结论** 朝藿定 B 能够抑制 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞促炎因子的表达, 其机制可能与 ER 信号途径有关。

**[关键词]** 朝藿定 B; 脂多糖类; 炎症; 受体, 雌激素; 小神经胶质细胞

**[中图分类号]** R338.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2096-5532(2023)03-0333-04

**doi:** 10.11712/jms.2096-5532.2023.59.092

**[开放科学(资源服务)标识码(OSID)]**



**[网络出版]** <https://link.cnki.net/urlid/37.1517.R.20230801.1834.004>;

2023-08-02 11:03:43

**ROLE AND MECHANISM OF EPIMEDIN B IN INFLAMMATORY RESPONSE IN BV2 MICROGLIA CELLS** HU Zifan, GU Yu, FAN Yuchen, DAI Wei, CHEN Wenfang (Department of Physiology and Pathophysiology, School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the inhibitory effect of Epimedin B on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory response in BV2 microglial cells and the blocking effect of the estrogen receptor (ER)-specific blocker ICI 182,780. **Methods** BV2 microglial cells were routinely cultured and treated with or without Epimedin B, LPS, and ICI 182,780. MTT colorimetry was used to measure cell viability, and real-time PCR was used to measure the mRNA expression levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (*TNF- $\alpha$* ) and interleukin-6 (*IL-6*). **Results** Different concentrations of Epimedin B had no effect on the viability of BV2 microglial cells ( $P>0.05$ ). LPS significantly upregulated the mRNA expression levels of the proinflammatory factors *TNF- $\alpha$*  ( $F=10.64, q=9.157, P<0.001$ ) and *IL-6* ( $F=25.25, q=12.630, P<0.001$ ). Epimedin B pretreatment at concentrations of 1 and 10  $\mu\text{mol/L}$  significantly inhibited the upregulated mRNA expression of *TNF- $\alpha$*  induced by LPS ( $q=4.655, 5.408; P<0.05$ ), and Epimedin B at a concentration of 10  $\mu\text{mol/L}$  significantly inhibited the LPS-induced mRNA expression of *IL-6* ( $q=4.696, P<0.05$ ). The inhibitory effect of Epimedin B on the LPS-induced mRNA expression of *TNF- $\alpha$*  and *IL-6* could be blocked by ICI 182,780 ( $F=12.53, 28.71; q=5.318, 4.684; P<0.05$ ). **Conclusion** Epimedin B can inhibit the expression of proinflammatory factors induced by LPS in BV2 microglial cells, which may be associated with the ER signaling pathway.

**[KEY WORDS]** Epimedin B; lipopolysaccharides; inflammation; receptors, estrogen; microglia

神经炎症是一种复杂的先天免疫反应, 能够对病原体、受损细胞和中枢神经系统刺激物等有害刺激做出反应<sup>[1]</sup>, 在中枢神经系统疾病发病中发挥着重要的作用, 是神经退行性疾病发病的主要驱动因素<sup>[2-4]</sup>。在各种致炎因子的刺激下, 与神经炎症相关的小胶质细胞被过度激活, 释放促炎因子, 诱导神经

元损伤, 使炎症反应加剧, 进而加速某些神经退行性疾病的进程<sup>[5-7]</sup>。因此, 有效抑制小胶质细胞的炎症反应是治疗中枢神经系统炎症的有益思路。淫羊藿作为传统中药, 具有补肾壮骨、抗癌、抗抑郁、改善学习记忆等多种功效<sup>[8-10]</sup>。朝藿定 B 是淫羊藿总黄酮主要的活性成分, 具有低毒的优势<sup>[11-12]</sup>。研究表明, 朝藿定 B 具有调节炎症和骨保护等作用, 其机制可能与雌激素受体(ER)有关<sup>[13-14]</sup>。但在神经系统, 朝藿定 B 是否具有抗炎神经保护作用尚未见报道。本研究应用脂多糖(LPS)制备 BV2 小胶质细胞炎症

**[收稿日期]** 2022-12-10; **[修订日期]** 2023-06-12

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(31871144)

**[第一作者]** 胡子凡(1997-), 男, 硕士研究生。

**[通信作者]** 陈文芳(1968-), 女, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: chenwenfangqd@163.com。

模型,探讨朝藿定 B 对 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞炎症反应的作用及其可能机制。现将实验结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 主要材料

BV2 小胶质细胞属于小鼠小胶质瘤细胞系,购自北京市协和医学院细胞资源中心;朝藿定 B 购自上海同田生物技术有限公司;LPS 和 ICI 182,780 购自美国 Sigma 公司;DMEM 高糖培养液购自 BI 公司;青霉素/链霉素储存液购自新华制药厂,分装后-20℃保存备用;胎牛血清购自 BI 公司,分装后-40℃保存备用;3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5 二苯基溴化四唑(MTT)购自国风生物公司,应用浓度为 0.01 mol/L 的 PBS 溶解,配制成 5 g/L 的母液;TRIzol 试剂购自美国 Life Technologies 公司;聚合酶链反应(PCR)逆转录试剂盒购自美国 TaKaRa 公司;SYBR Green(Master Mix)购自诺维赞医疗科技有限公司;PCR 引物由青岛蔚来生物科技有限公司设计并合成。

1.2 细胞培养及分组

BV2 小胶质细胞接种于培养瓶或孔板中,应用 DMEM 高糖培养液(内含体积分数 0.01 的青链霉素和体积分数 0.10 的胎牛血清),置于无菌培养箱(含体积分数 0.05 CO<sub>2</sub>、37℃)中常规培养。

为观察不同浓度朝藿定 B 对细胞活力的影响,实验分为对照组、不同浓度(1、10、20 μmol/L)朝藿定 B 组、LPS(1 g/L)与不同浓度朝藿定 B 合用组。为观察不同浓度朝藿定 B 对 LPS 诱导的肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和白细胞介素-6(IL-6)mRNA 表达的影响,实验分为对照组(A 组)、LPS 组(B 组)、1 μmol/L 朝藿定 B+LPS 组(C 组)、10 μmol/L 朝藿定 B+LPS 组(D 组)和 20 μmol/L 朝藿定 B+LPS 组(E 组)。为验证 ICI 182,780 是否能阻断朝藿定 B 对 LPS 诱导的 TNF-α 和 IL-6 mRNA 表达的作用,实验分为对照组(a 组)、LPS 组(b 组)、朝藿定 B+LPS 组(c 组)和 ICI 182,780+朝藿定 B+LPS 组(d 组)。

1.3 MTT 法检测细胞活力

对 BV2 小胶质细胞悬液进行计数,调整细胞的密度为 8×10<sup>7</sup>/L,随后将细胞悬液均匀接种在 96 孔板中,每孔 100 μL,置于含体积分数 0.05 CO<sub>2</sub>、37℃培养箱中培养 24 h。培养至细胞融合度达到

70%时,按照分组加入药物处理 24 h。弃去细胞培养液,每孔加入 5 g/L 浓度的 MTT 溶液 20 μL,继续避光培养 4 h。吸去上清液,每孔加 100 μL 二甲基亚砷,使甲瓚晶体溶解。在低速摇床(80~90 r/min)上避光振荡 10 min。最后用酶标仪在 490 nm 波长下检测各孔吸光度(A)值。

1.4 实时聚合酶链反应(real-time PCR)方法检测 TNF-α 和 IL-6 mRNA 的表达

在显微镜下观察 12 孔板中的细胞融合度,达 80%~90%时按分组进行加药处理。收集细胞,应用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,按照 TaKaRa 试剂盒说明书配制两步法反应体系,将 RNA 逆转录为 cDNA。配制 20.0 μL 的 PCR 反应体系,包括 Master Mix 10.0 μL、RNase free water 8.2 μL、上下游引物各 0.4 μL 以及 cDNA 1.0 μL。将此反应体系放入 real-time PCR 仪中进行扩增。经 40 个循环完成扩增,采用 2<sup>-ΔΔCT</sup>法计算目的基因 IL-6、TNF-α 的相对表达量(以 GAPDH 为内参基因)。PCR 扩增引物及其序列见表 1。

表 1 PCR 引物及其序列

引物名称	位置	引物序列(5'→3')
IL-6	上游	AACGATGATGCACTTGCAGA
	下游	GAACGTCACACACCAGCAGGTTA
TNF-α	上游	TATGGCCCAGACCCTCACA
	下游	GGAGTAGACAAGGTACAACCCATC
GAPDH	上游	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA
	下游	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG

1.5 统计学处理

应用 Graph Pad Prism 8.0 软件进行统计学处理。所得结果以  $\bar{x} \pm s$  形式表示,多组比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),继以 Turkey 法进行组间两两比较。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同浓度朝藿定 B 对 BV2 小胶质细胞活力的影响

MTT 检测结果显示,对照组、不同浓度(1、10、20 μmol/L)朝藿定 B 组、LPS 与不同浓度朝藿定 B 合用组的细胞存活率分别为 1.000±0.035、1.006±0.025、1.014±0.024、0.984±0.032、1.006±0.036、1.021±0.034、0.999±0.032( $n=3$ )。不同浓度朝藿定 B 对 BV2 小胶质细胞活力没有影响( $P > 0.05$ ),

表明实验所选的用药浓度对 BV2 小胶质细胞没有毒性。

2.2 不同浓度朝藿定 B 对 LPS 诱导的 *TNF-α* 和 *IL-6* mRNA 表达的影响

real-time PCR 检测结果显示,与对照组相比,LPS 组 BV2 小胶质细胞中 *TNF-α* 和 *IL-6* mRNA 表达水平显著升高( $F=10.64, 25.25, q=9.157, 12.630, P<0.001$ );1、10  $\mu\text{mol/L}$  朝藿定 B 预处理均能明显抑制 LPS 诱导的 *TNF-α* mRNA 表达上调( $q=4.655, 5.408, P<0.05$ ),10  $\mu\text{mol/L}$  朝藿定 B 对 LPS 诱导的 *IL-6* mRNA 表达有明显的抑制作用( $q=4.696, P<0.05$ );1、20  $\mu\text{mol/L}$  朝藿定 B 对 LPS 诱导的 *IL-6* mRNA 表达有一定的抑制作用,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。故选择 10  $\mu\text{mol/L}$  的朝藿定 B 进行后续实验。见表 2。

2.3 ICI 182,780 对朝藿定 B 的阻断效应

real-time PCR 检测结果显示,朝藿定 B 对 LPS 诱导的炎症反应的抑制作用可以被 ICI 182,780 所阻断( $F=12.53, 28.71, q=5.318, 4.684, P<0.05$ )。见表 3。

表 2 不同浓度朝藿定 B 对 *TNF-α* 和 *IL-6* mRNA 表达影响( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	<i>TNF-α</i> mRNA	<i>IL-6</i> mRNA
A 组	1.000±0.035	1.003±0.097
B 组	3.230±0.181***	5.120±0.611***
C 组	2.097±0.594 <sup>#</sup>	4.559±0.624***
D 组	1.913±0.380 <sup>#</sup>	3.590±0.788**** <sup>#</sup>
E 组	2.164±0.598*	4.538±0.854***

各组 *TNF-α* 和 *IL-6* mRNA 表达比较, $F=10.64, 25.25, P<0.001$ 。与 A 组相比,\* $P<0.05$ ,\*\*\* $P<0.001$ ;与 B 组相比,<sup>#</sup> $P<0.05$ 。

表 3 ER 特异性阻断剂 ICI 182,780 对朝藿定 B 的阻断效应( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	<i>TNF-α</i> mRNA	<i>IL-6</i> mRNA
a 组	1.000±0.021	1.001±0.061
b 组	1.438±0.079**	4.346±0.620***
c 组	1.086±0.075 <sup>△</sup>	2.425±0.309* <sup>△△</sup>
d 组	1.429±0.194** <sup>#</sup>	3.721±0.660**** <sup>#</sup>

各组 *TNF-α* 和 *IL-6* mRNA 表达比较, $F=12.53, 28.71, P<0.001$ 。与 a 组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ ;与 b 组相比,<sup>△</sup> $P<0.05$ ,<sup>△△</sup> $P<0.01$ ;与 c 组相比,<sup>#</sup> $P<0.05$ 。

3 讨 论

ER 分为核受体和膜受体两大类,经典 ER 即核

受体包括  $\text{ER}\alpha$  和  $\text{ER}\beta$ ,其表达具有组织和细胞特异性<sup>[15]</sup>。ER 可由雌激素激活,被激活的 ER 发生易位,进而与靶 DNA 序列结合,调控基因表达<sup>[16]</sup>。ER 参与多个系统的发育和功能维持,如生殖系统、大脑、心脏和肌肉骨骼系统等。除了核受体,以 G-蛋白偶联雌激素受体(GPER)为代表的雌激素膜受体,可介导雌激素的快速非基因组效应,同样在机体正常功能维持和疾病治疗中发挥多种作用<sup>[17]</sup>。雌激素在相关疾病治疗过程中会导致其受体过度表达,引起组织损伤,进一步诱发自身免疫性疾病和肿瘤等,严重影响疾病的治疗和病人的身体健康<sup>[18]</sup>。因此,寻找补充或替代药物对于治疗相关疾病具有十分重要的意义。类雌激素是一种与雌激素结构并不完全相同,但能发挥雌激素功能的物质,二者的作用机制也并不完全相同。黄酮类化合物作为一种天然植物雌激素,具有类雌激素样作用,可改善认知障碍,调节免疫炎症<sup>[19-21]</sup>。在前期工作中我们鉴定了淫羊藿总黄酮指纹图谱中的 21 个黄酮类化合物,证实了淫羊藿总黄酮及其含量最高的活性成分淫羊藿苷能够对抗神经毒素对多巴胺能神经元的损伤<sup>[22]</sup>。研究表明,朝藿定 B 为含量第二高的单体成分,能够提高骨肉瘤细胞(UMR-106)骨保护素 mRNA 的表达,发挥骨保护功能,其机制可能与 ER 有关<sup>[14]</sup>。近年来研究显示,朝藿定 B 在 MC3T3-E1 细胞、泼尼松龙诱导的斑马鱼骨质疏松模型以及骨质疏松小鼠模型中均表现出很好的骨保护作用<sup>[10,12,23]</sup>。但朝藿定 B 能否抑制 LPS 诱导的小胶质细胞的炎症反应,其作用机制如何,目前尚未见报道。本研究结果显示,1、10  $\mu\text{mol/L}$  的朝藿定 B 能够对抗 LPS 诱导的细胞炎症,10  $\mu\text{mol/L}$  朝藿定 B 作用效果最明显,能够显著下调促炎因子 *TNF-α* 和 *IL-6* mRNA 的表达。1  $\mu\text{mol/L}$  药物浓度相对较低,并不能发挥良好的保护作用,20  $\mu\text{mol/L}$  浓度相对较高,可能在一定程度上抑制了部分活性,导致保护效果有所降低。1、10  $\mu\text{mol/L}$  浓度朝藿定 B 可显著降低 LPS 诱导的 *TNF-α* mRNA 的表达升高,而 10  $\mu\text{mol/L}$  的朝藿定 B 对 *IL-6* mRNA 的作用效果更好,这可能是因为不同因子对炎症刺激的反应性有所不同,所以其 mRNA 的表达也会有一定差异。

我们最新的研究结果证实,朝藿定 B 能够对抗 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶及其活性神经毒性代谢物 1-甲基-4-苯基吡啶诱导的多巴胺能神经元损伤,GPER 介导的信号途径参与了朝藿定 B 的

神经保护作用<sup>[24]</sup>。而朝藿定 B 能否通过经典 ER 基因组途径发挥抗炎作用,有待进一步探讨。本实验应用 ER 特异性阻断剂 ICI 182,780 预处理 BV2 小胶质细胞,结果显示朝藿定 B 的抗炎作用能够被 ICI 182,780 所阻断,提示 ER 核受体介导的信号途径参与了朝藿定 B 的抗炎作用。

综上所述,朝藿定 B 能够抑制 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞促炎因子的表达,其机制可能与 ER 信号途径有关。

### [参考文献]

- [1] CHAKRABORTY S, KAUSHIK D K, GUPTA M, et al. Inflammasome signaling at the heart of central nervous system pathology[J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2010,88(8):1615-1631.
- [2] CORPS K N, ROTH T L, MCGAVERN D B. Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury[J]. *JAMA Neurology*, 2015,72(3):355-362.
- [3] JAYARAJ R L, AZIMULLAH S, BEIRAM R, et al. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2019,16(1):142.
- [4] WAISMAN A, LIBLAU R S, BECHER B. Innate and adaptive immune responses in the CNS[J]. *The Lancet Neurology*, 2015,14(9):945-955.
- [5] LIDDELOW S A, GUTTENPLAN K A, CLARKE L E, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia[J]. *Nature*, 2017,541(7638):481-487.
- [6] KETTENMANN H, HANISCH U K, NODA M, et al. Physiology of microglia[J]. *Physiological Reviews*, 2011,91(2):461-553.
- [7] DECZKOWSKA A, KEREN-SHAUL H, WEINER A, et al. Disease-associated microglia: a universal immune sensor of neurodegeneration[J]. *Cell*, 2018,173(5):1073-1081.
- [8] CHO J H, JUNG J Y, LEE B J, et al. Epimedii herba: a promising herbal medicine for neuroplasticity[J]. *Phytotherapy Research*, 2017,31(6):838-848.
- [9] CHEN M X, WU J F, LUO Q L, et al. The anticancer properties of herba epimedii and its main bioactive components icaritin and icaridin II [J]. *Nutrients*, 2016,8(9):563.
- [10] GUO Y N, WANG X F, GAO J. Simultaneous preparation and comparison of the osteogenic effects of epimedins A—C and icaritin from *Epimedium brevicornu* [J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2018,15(4):e1700578.
- [11] ZHONG R L, CHEN Y, LING J, et al. The toxicity and metabolism properties of *Herba epimedii* flavonoids on Laval and adult zebrafish[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2019,2019:3745051.
- [12] DIAO X Y, WANG L W, ZHOU Y T, et al. The mechanism of Epimedin B in treating osteoporosis as revealed by RNA sequencing-based analysis[J]. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2021,129(6):450-461.
- [13] XIA J, HU J N, WANG Z, et al. Based on network pharmacology and molecular docking to explore the protective effect of Epimedium Folium extract on cisplatin-induced intestinal injury in mice[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022,13:1040504.
- [14] XIAO H H, FUNG C Y, MOK S K, et al. Flavonoids from *Herba epimedii* selectively activate estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) and stimulate ER-dependent osteoblastic functions in UMR-106 cells[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2014,143:141-151.
- [15] MATTHEWS J, GUSTAFSSON J A. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta[J]. *Molecular Interventions*, 2003,3(5):281-292.
- [16] LEVIN E R. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen[J]. *Molecular Endocrinology*, 2005,19(8):1951-1959.
- [17] ARTERBURN J B, PROSSNITZ E R. G protein-coupled estrogen receptor GPER: molecular pharmacology and therapeutic applications[J]. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2023,63:295-320.
- [18] PATEL S, HOMAEI A, RAJU A B, et al. Estrogen: the necessary evil for human health, and ways to tame it[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapie*, 2018,102:403-411.
- [19] DIXON R A. Phytoestrogens[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2004,55:225-261.
- [20] CHEN Y, PENG F, XING Z W, et al. Beneficial effects of natural flavonoids on neuroinflammation[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022,13:1006434.
- [21] XIA H J. Extensive metabolism of flavonoids relevant to their potential efficacy on Alzheimer's disease[J]. *Drug Metabolism Reviews*, 2021,53(4):563-591.
- [22] CHEN W F, MOK S K, WANG X L, et al. Total flavonoid fraction of the *Herba epimedii* extract suppresses urinary calcium excretion and improves bone properties in ovariectomised mice[J]. *The British Journal of Nutrition*, 2011,105(2):180-189.
- [23] 詹扬,韦英杰,王长梅,等. 基于斑马鱼模型评价微量淫羊藿苷和朝藿定 B 的抗骨质疏松活性[J]. *中国药理学杂志*, 2014,49(1):30-35.
- [24] ZHANG M, HU Z F, DONG X L, et al. Epimedin B exerts neuroprotective effect against MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease: GPER as a potential target[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapie*, 2022,156:113955.

(本文编辑 马伟平)