

淫羊藿总黄酮对 LPS 诱导 BV2 小胶质细胞炎症反应的作用

谷雨,王皓田,苗悦,王晓雯,孙佳文,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 探讨淫羊藿总黄酮(HEP)对脂多糖(LPS)诱导的 BV2 小胶质细胞炎症反应的作用。方法 常规培养 BV2 小胶质细胞,将其分为对照组、LPS 组、20 mg/L HEP+LPS 组、40 mg/L HEP+LPS 组、60 mg/L HEP+LPS 组,后 3 组先用相应浓度 HEP 预保护 1 h,再给予 1 mg/L 的 LPS 处理细胞 6 h。采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测各组细胞活力,实时反转录聚合酶链反应检测白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) mRNA 的表达。结果 1 mg/L 的 LPS 和 20、40、60 mg/L 的 HEP 对 BV2 小胶质细胞活力没有影响($F=0.59$, $P>0.05$)。LPS 可明显上调 BV2 小胶质细胞炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 的表达水平($F=28.94, 53.28, q=5.908, 20.930, P<0.01$);与 LPS 组相比,20、40、60 mg/L 的 HEP 预处理均能明显抑制 LPS 诱导的 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 的表达($q=5.097\sim 7.669, P<0.01$)。结论 HEP 可明显抑制 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 的表达,提示其可能具有抗炎作用。

[关键词] 淫羊藿;黄酮类;小神经胶质细胞;脂多糖类;炎症

[中图分类号] Q426;R592;R364.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2096-5532(2019)01-0006-04

doi:10.11712/jms201901002

[开放科学(资源服务)标识码(OSID)]



EFFECT OF TOTAL FLAVONOIDS OF HERBA EPIMEDII AGAINST LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED INFLAMMATORY RESPONSE IN BV2 MICROGLIAL CELLS GU Yu, WANG Haotian, MIAO Yue, Wang Xiaowen, SUN Jiawen, CHEN Wenfang (Department of Physiology and Pathophysiology, School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of total flavonoids of Herba Epimedii (HEP) against lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory response in BV2 microglial cells. **Methods** BV2 microglial cells were cultured using conventional methods and then divided into control group, LPS group, 20 mg/L HEP+LPS group, 40 mg/L HEP+LPS group, and 60 mg/L HEP+LPS group. The cells in the latter three groups were pretreated with HEP for 1 hour and then treated with 1 mg/L LPS for 6 hours. MTT assay was used to measure cell viability, and real-time RT-PCR was used to measure the mRNA expression of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α). **Results** LPS at a concentration of 1 mg/L and HEP at concentrations of 20, 40, and 60 mg/L had no influence on the viability of BV2 microglial cells ($F=0.59, P>0.05$). LPS significantly upregulated the mRNA expression of inflammatory factors IL-1 β and TNF- α in BV2 microglial cells ($F=28.94$ and $53.28, q=5.908$ and $20.930, P<0.01$). Compared with the LPS group, the 20, 40, and 60 mg/L HEP+LPS groups had significant reductions in the mRNA expression of IL-1 β and TNF- α induced by LPS ($q=5.097\sim 7.669, P<0.01$). **Conclusion** HEP can significantly inhibit the mRNA expression of IL-1 β and TNF- α induced by LPS in BV2 microglial cells, suggesting that HEP may have an anti-inflammatory effect.

[KEY WORDS] Epimedium Brevicornum; flavones; microglia; lipopolysaccharides; inflammation

越来越多的临床和实验证据表明,慢性炎症与神经退行性疾病如帕金森病和老年痴呆等的发病密切相关^[1-4]。在各种致炎因子的作用下,小胶质细胞过度激活,释放肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)等炎性因子,这些炎性因子可导致神经元的损伤^[5]。因此,有效抑制小胶质细胞的炎症反应,将为神经退行性疾病的

治疗提供有益思路。淫羊藿作为一种传统中药^[6],400 多年前已被广泛应用于多种配方中,被认为能够“滋肾脏,强壮阳”^[7]。淫羊藿总黄酮(HEP)是淫羊藿的主要活性成分,具有明显的抗衰老、抗炎、抗骨质疏松^[8]、改善学习记忆能力^[9]等作用。本实验室在前期工作中,从淫羊藿总提取物中分离获得了 HEP,并分离鉴定了 21 种黄酮类化合物,指认了 HEP 活性馏分中的主要色谱峰^[10]。应用帕金森病小鼠模型和离体细胞模型研究结果均证实 HEP 能够对抗神经毒素 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)对多巴胺(DA)能神经元的损伤^[11]。有研

[收稿日期] 2018-10-02; **[修订日期]** 2019-01-10

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(31871144)

[作者简介] 谷雨(1993-),女,硕士研究生。

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

究表明,HEP 能够通过抑制 MAPK/NF- κ B 信号通路,减轻自然衰老大鼠脑组织的炎症反应^[12]。但 HEP 对小胶质细胞炎症反应的作用尚未见报道。本研究应用脂多糖(LPS)制备 BV2 小胶质细胞的炎症模型,旨在探讨 HEP 能否对抗 LPS 诱导的炎症反应,以期对神经退行性疾病的治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及其来源

HEP 购于上海同田生物公司;DMEM 高糖培养基购自美国 Hyclone 公司;LPS 由 Sigma 公司提供;四甲基偶氮唑蓝(MTT)由 Duchefa 公司提供;PCR 逆转录试剂盒购自 Roche 公司;SYBR Green 购自美国 Takara 公司。

1.2 细胞培养

BV2 小胶质细胞培养于含体积分数 0.10 Cell-Max 胎牛血清、100 kU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素混合双抗的 DMEM 高糖培养基中,在 37 ℃、体积分数 0.05 CO₂ 条件下培养。

1.3 MTT 法检测药物对细胞活力的影响

将 BV2 小胶质细胞接种于 96 孔板中,每孔细胞数为 8×10³ 个。当细胞均匀贴壁生长时,用 HEP 处理细胞 24 h 后去除培养液,加入 5 g/L 的 MTT 溶液,置于 37 ℃、含体积分数 0.05 CO₂ 的培养箱中继续培养 4 h,每孔加入二甲基亚砷(DMSO)溶液 100 μ L,震荡混匀后用酶标仪检测波长 490 nm 处的吸光度(A)值,计算细胞存活率^[13]。

1.4 实时反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 的表达

将传代细胞接种于 12 孔板中,分为对照组(A 组)、LPS 组(B 组)、20 mg/L HEP+LPS 组(C 组)、40 mg/L HEP+LPS 组(D 组)和 60 mg/L HEP+LPS 组(E 组)。后 3 组细胞先用相应浓度 HEP 预保护 1 h,再给予 1 mg/L 的 LPS 处理细胞 6 h。采用 Trizol 法冰上裂解各组细胞 10~20 min,小心从细胞中提取总 RNA,取 2 μ g 总 RNA 加入 1 μ L 锚定的寡聚(dT)18 引物,用 RNA free water 补至 13 μ L,55 ℃变性 10 min;随后向上述反应物中加入 7 μ L 的反应体系(内含逆转录酶 0.5 μ L、RNase 抑制剂 0.5 μ L、缓冲液 4.0 μ L 以及 dNTP 2.0 μ L),55 ℃作用 30 min,继以 85 ℃作用 5 min 逆转录合成 cDNA^[14]。采用 SYBR Green 染料法相对定量检测 IL-1 β 、TNF- α 和 GAPDH mRNA

表达。RT-PCR 检测所用引物及其序列见表 1。应用 2^{- $\Delta\Delta$ CT}法计算目的基因相对表达量。

表 1 RT-PCR 检测所用引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')
GAPDH	F:GTGTCCGTCGTGGATCTGA R:TGCTGTTGAAGTCGCAGGAG
IL-1 β	F:TCCAGGATGAGGACATGAGCAC R:GAACGTCACACACCAGCAGGTTA
TNF- α	F:TATGGCCCAGACCCTCACA R:GGAGTAGACAAGGTACAACCCATC

1.5 统计学处理

实验所得计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,应用 GraphPad Prism 5.0 统计学软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),并继以 Tukey 法进行两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 LPS 和不同浓度 HEP 对 BV2 小胶质细胞活力的影响

用 LPS(1 mg/L)和不同浓度的 HEP(20、40、60 mg/L)分别处理细胞 24 h,4 组细胞存活率分别为 0.989±0.058、1.053±0.108、1.006±0.136 和 1.094±0.184,与对照组(1.000±0.110)相比差异无显著性($F=0.59, P>0.05$)。表明 1 mg/L 的 LPS 和 20、40、60 mg/L 的 HEP 对 BV2 小胶质细胞的活力没有明显影响,本研究选用的药物浓度对细胞没有毒性。

2.2 HEP 对 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达的作用

与对照组相比,LPS 处理 BV2 小胶质细胞 6 h,可使炎性因子 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 的表达分别升高 11.49 和 5.73 倍($F=28.94, 53.28, q=16.520, 20.550, P<0.01$)。应用 20、40、60 mg/L 的 HEP 预处理均能明显抑制 LPS 诱导的 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 的表达,与 LPS 组相比,IL-1 β mRNA 表达分别下降了 29%、31% 和 41% ($q=5.278 \sim 5.629, P<0.01$),TNF- α mRNA 表达分别下降了 17%、20% 和 39% ($q=5.097 \sim 7.669, P<0.01$)。见表 2。

3 讨 论

HEP 作为淫羊藿的主要活性成分,具有多种药理作用。大量研究表明,HEP 具有抗骨质疏松和神经保护作用,能够促进成骨细胞的生成,明显对抗

表 2 不同浓度 HEP 对 LPS 诱导 BV2 小胶质细胞 *IL-1β* 和 *TNF-α* mRNA 表达作用 ($n=3, x \pm s$)

组别	<i>IL-1β</i>	<i>TNF-α</i>
A 组	0.999±0.187	0.807±0.370
B 组	11.481±2.043	4.622±0.242
C 组	8.132±0.997	3.837±0.229
D 组	7.910±1.445	3.699±0.328
E 组	6.812±2.007	2.829±0.794

MPTP 诱导的帕金森病模型小鼠黑质纹状体系统 DA 能神经元的损伤^[15-20];HEP 可通过直接增加免疫细胞的数量,促进免疫细胞分泌淋巴因子,从而提高免疫力^[21];HEP 及其主要活性成分淫羊藿苷预保护,可以通过 AMPK/SIRT1/NF-κB 信号通路,减轻自然衰老大鼠睾丸组织炎症反应^[22]。此外,有研究表明,HEP 能通过下调促炎细胞因子表达以及上调抗炎因子表达干预老年大鼠海马炎性衰老^[23]。近年来炎症反应在神经退行性疾病发病过程中的作用越来越受到人们的重视。尸检结果表明,帕金森病病人的黑质含有大量的反应性小胶质细胞,过度激活的小胶质细胞导致了 DA 能神经元的损伤和丢失。因此,阻止炎症因子的产生、抑制炎症反应被认为是治疗中枢炎症反应性疾病的一条有效途径。

LPS 为革兰阴性菌细胞壁的组成成分,被广泛用于炎症反应的诱导^[24]。本研究应用 LPS 制备了 BV2 小胶质细胞系炎症模型,通过检测炎症因子 *IL-1β* 和 *TNF-α* mRNA 的水平,探讨了不同浓度 HEP 对炎症反应中小胶质细胞活化的抑制作用。*IL-1β* 是由活化的巨噬细胞产生的一种细胞因子,可作用于白细胞或免疫细胞,在炎症反应中发挥着重要的作用。*TNF-α* 主要由单核巨噬细胞产生,与炎症反应的诱导及维持有密切关系。本文结果显示,LPS 处理可明显上调 BV2 小胶质细胞炎症因子 *IL-1β* 和 *TNF-α* mRNA 的表达,应用 20~60 mg/L 的 HEP 预保护对 LPS 诱导的 *IL-1β* 和 *TNF-α* mRNA 表达均有明显抑制作用,其中以 60 mg/L HEP 的抗炎作用最明显。提示 HEP 能够抑制 LPS 诱导的小胶质细胞的激活。有研究发现,HEP 中的主要活性成分能够选择性激活雌激素受体,刺激成骨细胞的产生^[10]。HEP 及其主要活性成分是否能够通过雌激素受体发挥抗炎作用,我们将在后续的实验中进行进一步探讨。

综上所述,HEP 能明显对抗 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞的炎症反应,抑制炎症因子 *IL-1β* 和 *TNF-α* mRNA 的表达。本文研究结果为 HEP 对

抗中枢神经系统炎症反应提供了实验依据。

[参考文献]

[1] LONG-SMITH C M, SULLIVAN A M, NOLAN Y M. The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease[J]. Prog Neurobiol, 2009,89(3):277-287.

[2] DE WAAL G M, ENGELBRECHT L, DAVIS T, et al. Correlative light-electron microscopy detects lipopolysaccharide and its association with fibrin fibers in Parkinson's disease, Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus[J]. Scientific Reports, 2018,8(1):16798.

[3] GUO Y S, LIANG P Z, LU S Z, et al. Extracellular αB-crystallin modulates the inflammatory responses[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019,508(1):282-288.

[4] HENEGA M T, KUMMER M P, LATZ E. Innate immune activation in neurodegenerative disease[J]. Nature Reviews Immunology, 2014,14(7):463-477.

[5] LIDDELOW S A, GUTTENPLAN K A, LARKE L E, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia[J]. Nature, 2017,541(7638):481-487.

[6] CHEN Meixia, WU Jinfeng, LUO Qingli, et al. The anticancer properties of herba epimedii and its main bioactive components icaritin and icaridin II [J]. Nutrients, 2016,8(9):563.

[7] SZE S C, TONG Y, NG T B, et al. Herba epimedii:anti-oxidative properties and its medical implications[J]. Molecules, 2010,15(11):7861-7870.

[8] ZHANG D W, ZHANG J C, FONG C, et al. Herba epimedii flavonoids suppress osteoclastic differentiation and bone resorption by inducing G2/M arrest and apoptosis[J]. Biochimie, 2012,94(12):2514-2522.

[9] 邓炜,郑民强,张静,等. 两种黔产淫羊藿总黄酮对痴呆大鼠学习记忆的影响[J]. 中国药理学通报, 2011,27(6):868-871.

[10] 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]. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2014,143:141-151.

[11] WU Lin, DU Zhongrui, XU Aili, et al. Neuroprotective effects of total flavonoid fraction of the Epimedium koreanum Nakai extract on dopaminergic neurons:in vivo and in vitro[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017,91:656-663.

[12] 宋来新,张长城,王婷,等. 淫羊藿总黄酮通过抑制 MAPK/NF-κB 信号通路减轻自然衰老大鼠脑组织炎症反应[J]. 中国药理学通报, 2017,33(1):84-90.

[13] 冯晓庆,袁良杰,惠雅,等. E2 对 MPP⁺ 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤保护作用及 G15 的阻断效应[J]. 青岛大学学报(医学版), 2018,54(1):6-9.

[14] 张学杰,任晓璐,陈文芳. Rg1 对胶质细胞 iNOS 基因表达的抑制作用及 RU486 对其影响[J]. 青岛大学医学院学报, 2017, 53(2):133-135,139.

- [15] WANG Lili, LI Yu, GUO Yubo, et al. Herba epimedii; an ancient Chinese herbal medicine in the prevention and treatment of osteoporosis [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2016,22(3):328-349.
- [16] 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]. *British Journal of Nutrition*, 2011,105(2):180-189.
- [17] MOK S K, CHEN W F, LAI W P, et al. Icaritin protects against bone loss induced by oestrogen deficiency and activates oestrogen receptor-dependent osteoblastic functions in UMR 106 cells[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2010,159(4):939-949.
- [18] ZHANG Jinfang, LI Guo, MENG Chunling, et al. Total flavonoids of Herba Epimedii improves osteogenesis and inhibits osteoclastogenesis of human mesenchymal stem cells[J]. *Phytomedicine*, 2009,16(6/7):521-529.
- [19] LIU Yiheng, ZANG Hongmin, ZHANG Haiying, et al. Effect of herba epimedii flavone on expression of OPG and RANKL in rat osteoblasts[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2005,28(12):1076-1078.
- [20] 吴林,薛丹丹,杨晶,等. 淫羊藿总黄酮对帕金森病模型小鼠多巴胺能神经元保护作用[J]. *青岛大学医学院学报*, 2013,49(1):4-6.
- [21] WANG Chengcheng, SU Jiayan, CAI Jiyan, et al. Response surface analysis for the optimization of extraction condition for polysaccharides from Epimedium polysaccharides and studies on its tumor immune activities[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2016,51(9):1464-1471.
- [22] 韩贵芳,张长城,陈茜,等. 淫羊藿总黄酮通过 AMPK/SIRT1/NF- κ B 信号通路减轻自然衰老大鼠睾丸组织炎症反应[J]. *天然产物研究与开发*, 2018,30(9):1489-1493.
- [23] 夏世金,沈自尹,俞卓伟,等. 基于基因表达谱研究淫羊藿总黄酮干预老年大鼠海马炎症衰老的效果与机制[J]. *实用老年医学*, 2010,24(1):24-27.
- [24] LIU Mei, BING Guoying. Lipopolysaccharide animal models for Parkinson's disease[J]. *Parkinson's Disease*, 2011,2011:327089. (本文编辑 马伟平)
- (上接第 5 页)
- Free Radic Biol Med*, 2013,62:52-64.
- [70] MARTIN-BASTIDA A, WARD R J, NEWBOULD R, et al. Brain iron chelation by deferiprone in a phase 2 randomised double-blinded placebo controlled clinical trial in Parkinson's disease[J]. *Sci Rep*, 2017,7(1):1398.
- [71] DEVOS D, MOREAU C, DEVEDJIAN J C, et al. Targeting chelatable iron as a therapeutic modality in Parkinson's disease [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014,21(2):195-210.
- [72] ATHAUDA D, FOLTYNIE T. Insulin resistance and Parkinson's disease: a new target for disease modification[J]? *Prog Neurobiol*, 2016,145/146:98-120.
- [73] DUNN L, ALLEN G F, MAMAI S A, et al. Dysregulation of glucose metabolism is an early event in sporadic Parkinson's disease[J]. *Neurobiol Aging*, 2014,35(5):1111-1115.
- [74] AKSOY D, SOLMAZ V, CAVUSOGLU T, et al. Neuroprotective effects of exenatide in a rotenone-induced rat model of Parkinson's disease[J]. *Am J Med Sci*, 2017,354(3):319-324.
- [75] AHMANN A J, CAPEHORN M, CHARPENTIER G, et al. Efficacy and safety of once-weekly semaglutide versus exenatide ER in subjects with type 2 diabetes (SUSTAIN 3): a 56-week, open-label, randomized clinical trial[J]. *Diabetes Care*, 2018,41(2):258-266.
- [76] JANKOVIC J, GOODMAN I, SAFIRSTEIN B, et al. Safety and tolerability of multiple ascending doses of PRX002/RG7935, an anti-alpha-synuclein monoclonal antibody, in patients with parkinson disease: a randomized clinical trial[J]. *JAMA Neurol*, 2018,75(10):1206-1214.
- [77] MANDLER M, VALERA E, ROCKENSTEIN E, et al. Next-generation active immunization approach for synucleinopathies: implications for Parkinson's disease clinical trials[J]. *Acta Neuropathol*, 2014,127(6):861-879.
- [78] WRASIDLO W, TSIGELNY I F, PRICE D L, et al. A de novo compound targeting alpha-synuclein improves deficits in models of Parkinson's disease[J]. *Brain*, 2016,139(Pt 12):3217-3236.
- [79] PALFI S, GURRUCHAGA J M, RALPH G S, et al. Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial[J]. *Lancet*, 2014,383(9923):1138-1146.
- [80] JARRAYA B, BOULET S, RALPH G S, et al. Dopamine gene therapy for Parkinson's disease in a nonhuman primate without associated dyskinesia[J]. *Sci Transl Med*, 2009,1(2):2-4.
- [81] CIESIELSKA A, SAMARANCH L, SAN SEBASTIAN W, et al. Depletion of AADC activity in caudate nucleus and putamen of Parkinson's disease patients; implications for ongoing AAV2-AADC gene therapy trial[J]. *PLoS One*, 2017,12(2):e0169965.
- [82] SAN SEBASTIAN W, KELLS A P, BRINGAS J, et al. Safety and tolerability of MRI-guided infusion of AAV2-hAADC into the mid-brain of nonhuman primate[J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2014,1:14049.
- [83] WILLIAMS A, GILL S, VARMA T, et al. Deep brain stimulation plus best medical therapy versus best medical therapy alone for advanced Parkinson's disease (PD SURG trial): a randomised, open-label trial[J]. *Lancet Neurol*, 2010,9(6):581-591.
- [84] SCHULZ-SCHAEFFER W J, MARGRAF N G, MUNSER S, et al. Effect of neurostimulation on camptocormia in Parkinson's disease depends on symptom duration[J]. *Mov Disord*, 2015,30(3):368-372. (本文编辑 于国艺)