

钩藤中钩藤碱对肿瘤坏死因子- α 诱导人星型胶质细胞炎症模型作用机制研究

安畅¹,张颖¹,马阮昕²,秦劭晨³

(1.广州市越秀区光塔街社区卫生服务中心,广州 510120;

2.中山大学 附属第六医院药学部,广州 510655;3.山西中医学院 附属医院,太原 030024)

摘要:目的 研究钩藤中钩藤碱对肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)诱导人星型胶质细胞(Human Astrocytes, HA)的炎症模型的作用机制.方法:体外培养 HA,用 TNF- α 诱导 HA 造模,将细胞分为正常组、模型组、钩藤碱组、依达拉奉组.采用噻唑蓝(MTT)法检测钩藤碱对 HA 增殖能力的影响,用逆转录 PCR 法(RT-PCR)检测一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS) mRNA、白细胞介素-23(interleukin-23, IL-23) mRNA、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6) mRNA 的表达,用分光光度法检测一氧化氮(nitric oxide, NO)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)的表达,用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 p-mTOR, mTOR, p-Stat3 和 Stat3 的蛋白表达.结果 与正常组比较,32 ng \cdot mL⁻¹ 的 TNF- α 对星形胶质细胞有明显抑制作用($P < 0.001$);400 μ mol \cdot L⁻¹ 的钩藤碱对星形胶质细胞活力有明显抑制作用($P < 0.001$).与模型组相比,200 μ mol \cdot L⁻¹ 的钩藤碱对模型细胞有明显的增殖作用($P < 0.01$);钩藤碱组和依达拉奉组 NOS mRNA, NO 和 SOD 都显著上升($P < 0.001$),IL-23 mRNA, IL-6 mRNA 和 MDA 都显著下降($P < 0.001$);钩藤碱组 p-mTOR/mTOR 和 p-Stat3/Stat3 都显著下降($P < 0.01$).结论 钩藤有效成分钩藤碱具有抑制 TNF- α 诱导 HA 炎症的损伤作用,可能是通过下调 mTOR/STAT3 信号通路增加氧化相关因子 NOS, NO, SOD 的表达,减少氧化相关因子 MDA 以及炎症相关因子 IL-23 和 IL-6 的表达.

关键词:钩藤碱;人星型胶质细胞;炎症;mTOR/STAT3 信号通路

中图分类号:R285

文献标志码:A

神经炎症反应是多种中枢神经病变重要的病理特征.急性神经炎症反应延续及慢性神经炎症反应引起神经元损伤或神经元丢失^[1],导致认知功能障碍及慢性神经退行性病变的进展^[2].近期研究发现,预先外周途径拮抗全身性炎症反应能阻断神经炎症反应、改善认知功能,否则无效^[3].由此可见,中枢神经炎症反应是多种急慢性神经病理变化的机制之一,日益增多的研究显示,老龄脑内星形胶质细胞是中枢神经炎症反应的重要参与者,老龄脑内星形胶质细胞免疫特性的改变使其成为延续性神经炎症因子表达的主要来源.因此,星形胶质细胞是调控神经炎症反应的重要靶点^[4].

借鉴中医“扶正祛邪、辨证施治”的治疗思想,中药通过协调炎症因子水平与功能在治疗与缓解炎症相关疾病具有一定的优势^[5].天麻钩藤饮由天麻、钩藤、石决明、栀子、黄芩、川牛膝、杜仲、益母草、桑寄生、夜交藤和茯神共 11 味中药组成,具有平肝熄风、补益肝肾、清热潜阳、安神定志等功效.现代药理学研究认为,天麻钩藤饮可通过对血清钙离子浓度及血管平滑肌细胞钙通道的调控、一氧化氮、内皮素的调节、血管内皮生长

收稿日期:2018-09-16;**修回日期:**2019-01-10.

基金项目:国家自然科学基金(81804142);广东省自然科学基金项目(2018A030307037);广东省中医药管理局项目(201811114);山西省卫生和计划生育委员会科研项目(201601119).

作者简介:安畅(1983-),女,广西合浦人,广州市越秀区光塔街社区卫生服务中心主治医师,研究方向为神经内科临床及基础工作,E-mail:acwater@126.com.

通信作者:秦劭晨(1987-),女,山西太原人,博士,主治医师,研究方向为神经内科临床及基础工作,E-mail:410291246@qq.com.

因子及血管内皮生长因子 2 受体的影响等机制产生脑保护作用^[6]。

钩藤是天麻钩藤饮的君药之一,具有熄风止痉、清热平肝之功效,主要用于治疗惊痫、抽搐、眩晕、头痛等神经病症.现代研究表明钩藤的主要有效成分为钩藤碱(rhynchophylline)^[7],研究发现钩藤碱对脑缺血-再灌注损伤有保护作用,其机制与抑制自由基产生或增加自由基消除有关^[8],钩藤碱能使多巴胺诱导的转染 bcl-2 基因神经元和未转染 bcl-2 基因神经元的凋亡率均明显减少^[9].由于钩藤碱对神经炎症的机制研究鲜有报道,则本实验以星形胶质细胞为研究对象,探讨钩藤碱对肿瘤坏死因子- α 诱导星型胶质细胞的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

钩藤碱(上海融禾科技发展有限公司,批号 2017109761);依达拉奉(Edaravone,EDA,南京先声药业,批号 P2017123144254453);TNF- α (美国 Peprotech 公司,货号 300-01A);人星型胶质细胞株(Human astrocyte,HA,美国 ATCC 公司)。

1.2 实验试剂

DF12 培养基,胎牛血清和胰酶(美国 Gibco 公司,货号分别为 12491015,10100147,25300062);噻唑蓝(MTT,上海信裕生物技术有限公司,货号 XY-100896);二甲基亚砜(DMSO,美国 Sigma 公司,货号 D2650);NO,SOD,MDA 试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别是 20180122,20180216,20180225);trizol 试剂(美国 Sigma 公司,货号 T9424);PrimeScriptTM RT reagent kit 和 SYBR Premix Ex Taq II(大连 TaKaRa 生物科技有限公司,货号分别为 RR047A,RR820A);RIPA 裂解液(美国 Sigma 公司,货号 R0278);BCA 试剂盒(美国 BIO-RAD 公司,货号 # 2634);loading buffer(美国 invitrogen 公司,货号 10816015);mTOR,p-mTOR,Stat3,p-Stat3 和 GAPDH 抗体(CST 公司,货号分别为:# 2983S,# 5536S,# 12640S,# 49081S,# 5174S);NOS,IL-23,IL-6(上海英潍捷基贸易有限公司合成)。

1.3 实验仪器

多功能酶标仪(PerkinElmer 公司,型号 EnVision),高速冷冻离心机(美国贝克曼库尔特有限公司,型号 Allegra64R),荧光定量 PCR 仪(德国 Agilent 公司,型号 M3000),电泳仪和转模仪(美国 Bio-Rad 公司,PowerPac 系列),凝胶成像仪(中国 FUJIFILM 公司,型号 LAS-4000)。

1.4 细胞培养

人星型胶质细胞用含 10%FBS 的 DF12 培养,置于 37 °C,5%CO₂ 培养箱中,每隔 2 d 换液。

1.5 实验分组

实验分为正常组,模型组,钩藤碱组,依达拉奉组.取对数生长期的人星形胶质细胞,以 10⁶ 个·mL⁻¹ 的密度种于 12 孔板中,12 h 后换 DF12 培养液,钩藤碱组加入 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的钩藤碱,依达拉奉组加入依达拉奉 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,正常组不做处理,其余各组再加入 32 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 TNF- α 共同刺激 24 h。

1.6 检测指标

1.6.1 不同浓度的钩藤碱对星形胶质细胞活力的影响

取对数生长期的人星形胶质细胞,以 10⁵ 个·孔⁻¹ 的密度种于 96 孔板中,12 h 后换 DF12 培养液,除正常组外,其余各组加入各浓度的钩藤碱(12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).24 h 后吸出培养基,加入 MTT 继续培养 4 h 后吸出 MTT,加入 150 μL DMSO,震荡 10 min 摇匀,490 nm 波长的酶标仪下检测吸光度。

1.6.2 不同剂量的 TNF- α 对星形胶质细胞活力的影响

取对数生长期的人星形胶质细胞,以 10⁵ 个·孔⁻¹ 的密度种于 96 孔板中,12 h 后换 DF12 培养液,除正常组外,其余各组分别加入各质量浓度的 TNF- α (4 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,8 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,16 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,32 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,64 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,128 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$).24 h 后吸出培养基,加入 MTT 继续培养 4 h 后吸出 MTT,加入 150 μL DMSO,震荡 10 min 摇匀,490 nm 波长的酶标仪下检测吸光度。

1.6.3 钩藤碱对 TNF- α 刺激星形胶质细胞活力的影响

取对数生长期的人星形胶质细胞,以 10^5 个·孔⁻¹的密度种于 96 孔板中,12 h 后换 DF12 培养液.正常组不做处理,模型组加入 $32 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 TNF- α ,除模型组和正常组外其余各组加入各浓度的钩藤碱 ($12.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 TNF- α 共同作用 24 h.24 h 后吸出培养基,加入 MTT 继续培养 4 h 后吸出 MTT,加入 $150 \mu\text{L}$ DMSO,震荡 10 min 摇匀,490 nm 波长的酶标仪下检测吸光度.

1.6.4 分光光度法检测 NO, SOD 和 MDA 的表达

取对数生长期的人星形胶质细胞,以 10^6 个·孔⁻¹的密度种于 12 孔板中,12 h 后换 DF12 培养液,正常组不做处理,其余各组加入 $32 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 TNF- α 共同刺激 24 h.钩藤碱组加入 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的钩藤碱刺激 24 h,依达拉奉组加入依达拉奉 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作用 24 h.收集细胞上清, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存待测.根据 NO, SOD, MDA 试剂盒说明书检测样品.

1.6.5 RT-PCR 检测 NOS mRNA, IL-23 mRNA 和 IL-6 mRNA 的表达

取对数生长期的人星形胶质细胞,以 10^6 个·孔⁻¹的密度种于 12 孔板中,12 h 后换 DMEM 培养液,正常组不做处理,其余各组加入 $32 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 TNF- α 共同刺激 24 h.24 h 后收集细胞悬液.按照 trizol 试剂盒操作提取总 RNA 500 ng,根据 PrimeScriptTM RT reagent kit 说明书操作反转录 cDNA,根据 Prime-ScriptTM RT reagent kit 说明书扩增 cDNA.

引物序列: NOS 上游: TAAACCAGTCGGGTGGACG, 下游: GCTGGAAACGCGGCATAAAT, 长度: 141 bp. IL-23 上游: ACTTGTGGGTGGCGTTAGA, 下游: TCCCATCTCTGGTCCCCATT, 长度: 92 bp. IL-6 上游: TCAATATTAGAGTCTCAACCCCA, 下游: TTCTCTTTCGTTCCCGGTGG, 长度: 90 bp. 内参为 GAPDH 上游 AAGAGGGATGCTGCCCTTAC, 下游 ATCCGTTACACCGACCTTC, 长度: 126 bp.

1.6.6 Western blot 检测 p-mTOR, p-Stat3, mTOR 和 Stat3 的表达

取对数生长期的人星形胶质细胞,以 2×10^6 个·孔⁻¹的密度种于 12 孔板中,12 h 后换 DF12 培养液,正常组不做处理.依达拉奉组加入依达拉奉和 TNF- α 共同刺激 24 h.24 h 后收集细胞悬液加入 RIPA 裂解液,裂解 30 min 后离心收集上清,BCA 定量试剂盒检测上清蛋白含量,取蛋白上样量 $40 \mu\text{g}$,使用 $5 \times$ loading buffer 配平各组蛋白浓度,10 min, $100 \text{ }^\circ\text{C}$,煮沸变性.聚丙烯酰胺凝胶电泳;配胶浓度:分离胶 10%,浓缩胶 5%.浓缩胶 50 V,分离胶 100 V 电压跑胶.用湿法 255 mA 电泳转膜,脱脂奶粉 5% 摇床室温封闭 2 h,摇床室温孵育一抗(1:3 000)1 h 再 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜,加入二抗(1:2 000), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 摇床孵育 1.5 h 后 TBST 洗膜,加入显影液后曝光成像.采用 Image Lab 分析条带.

1.7 统计学处理

统计学分析采用 SPSS 17.0 分析软件,数据用表示,多组间差异用 One-way ANOVA 分析,t 检验用于两组均数比较, $P < 0.05$ 即记录有统计学意义.

2 结 果

2.1 不同浓度的钩藤碱对星形胶质细胞活力的影响

见表 1 所示,除正常组 ($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 外,其余各组加入各浓度的钩藤碱 ($12.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用 24 h.与正常组相比, $12.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组对星形胶质细胞的活力没有明显的影响,差异无统计学意义 ($P > 0.05$). $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组对星形胶质细胞活力有明显抑制作用,差异有统计学意义 ($P < 0.001$).

2.2 不同剂量的 TNF- α 对星形胶质细胞活力的影响

见表 2 所示,除正常组 ($0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 外,其余各组分别加入各质量浓度的 TNF- α ($4 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $8 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $16 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $32 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $64 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $128 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$).与正常组相比, $32 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组

的 TNF- α 星形胶质细胞有明显抑制作用,差异有统计学意义($P < 0.001$),其余各浓度组的 TNF- α 对星形胶质细胞的活力没有明显的影响,差异无统计学意义($P > 0.05$).因此,研究采用 $32 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 TNF- α 刺激星形胶质细胞为造模浓度。

表 1 不同浓度的钩藤碱对星形胶质细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab.1 Effect of different concentrations of rhynchophylline on the viability of astrocytes($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	OD 值
0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	1.05 \pm 0.06
12.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	1.04 \pm 0.07
25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	1.03 \pm 0.11
50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	1.15 \pm 0.12
100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	1.12 \pm 0.11
200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	1.03 \pm 0.08
400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	0.88 \pm 0.07 ^{###}

注:与正常组(0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)比较,###表示 $P < 0.001$.

2.3 钩藤碱在 TNF- α 造模情况下对星形胶质细胞活力的影响

见表 3 所示,模型组加入 $32 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 TNF- α ,除模型组和正常组外其余各组加入各浓度的钩藤碱($12.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和 TNF- α 作用 24 h.与正常组相比,模型组的星形胶质细胞明显被抑制,差异有统计学意义($P < 0.001$).与模型组相比, $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组的星形胶质细胞有明显的增殖作用,差异有统计学意义($P < 0.01$),其余各浓度组的星形胶质细胞活力没有明显的变化,差异无统计学意义($P > 0.05$).因此,研究采用 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的钩藤碱作为给药浓度。

2.4 分光光度法检测 NO, SOD, MDA 的表达

见表 4 所示,与正常组相比,模型组 MDA 显著上升,NO 和 SOD 显著下降,差异有统计学意义($P < 0.001$).与模型组相比,钩藤碱组和依达拉奉组 MDA 显著下降,NO 和 SOD 显著上升,差异有统计学意义($P < 0.001$).

表 4 各组对细胞 NO, SOD, MDA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab.4 Effect of each group on NO, SOD and MDA in cells($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	NO/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	SOD/(U $\cdot \text{mL}^{-1}$)	MDA/(nmol $\cdot \text{mL}^{-1}$)
正常组	1 240.63 \pm 9.60	31.67 \pm 1.22	6.58 \pm 0.48
模型组	443.44 \pm 50.44 ^{###}	16.54 \pm 1.53 ^{###}	47.19 \pm 2.09 ^{###}
钩藤碱组	983.52 \pm 36.13 ^{***}	27.47 \pm 1.75 ^{***}	22.32 \pm 0.61 ^{***}
依达拉奉组	971.10 \pm 15.88 ^{***}	27.00 \pm 0.98 ^{***}	21.72 \pm 2.73 ^{***}

注:与正常组比较,###表示 $P < 0.001$;与模型组比较,***表示 $P < 0.001$.

表 2 不同剂量的 TNF- α 对星形胶质细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab.2 Effect of different doses of TNF- α on the viability of astrocytes($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	OD 值
0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组	1.09 \pm 0.05
4 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组	1.08 \pm 0.09
8 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组	1.07 \pm 0.10
16 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组	1.06 \pm 0.08
32 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组	0.89 \pm 0.06 ^{###}
64 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组	1.05 \pm 0.06
128 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组	1.11 \pm 0.06

注:与正常组(0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)比较,###表示 $P < 0.001$.

表 3 钩藤碱对 TNF- α 诱导模型细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab.3 Effect of rhynchophylline on cell viability in TNF- α -induced model ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	OD 值
正常组	—	1.07 \pm 0.06
模型组	—	0.87 \pm 0.05 ^{###}
钩藤碱组	12.5	0.86 \pm 0.05
	25	0.85 \pm 0.08
	50	0.88 \pm 0.06
	100	0.90 \pm 0.07
	200	1.08 \pm 0.12 ^{**}
	400	0.94 \pm 0.09

注:与正常组比较,###表示 $P < 0.001$;与模型组比较,**表示 $P < 0.01$.

2.5 RT-PCR 检测 NOS mRNA, IL-23 mRNA, IL-6 mRNA 的表达

见表 5 所示,与正常组相比,模型组 NOS mRNA 显著下降,IL-23 mRNA 和 IL-6 mRNA 显著上升,差异有统计学意义($P < 0.001$).与模型组相比,钩藤碱组和依达拉奉组 NOS mRNA,显著上升,IL-23 mRNA 和 IL-6 mRNA 显著下降,差异有统计学意义($P < 0.001$).

表 5 各组对细胞 NOS mRNA, IL-23 mRNA, IL-6 mRNA 的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab.5 Effects of each group on NOS mRNA, IL-23 mRNA and IL-6 mRNA in cells($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	NOS mRNA	IL-23 mRNA	IL-6 mRNA
正常组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	0.54±0.09 ^{###}	28.57±0.71 ^{###}	23.16±1.13 ^{###}
钩藤碱组	0.88±0.04 ^{***}	14.13±0.89 ^{***}	17.41±0.79 ^{***}
依达拉奉组	0.82±0.09 ^{***}	11.81±1.52 ^{***}	17.13±0.99 ^{***}

注:与正常组比较,###表示 $P < 0.001$;与模型组比较,***表示 $P < 0.001$.

2.6 Western blot 检测 p-mTOR 和 p-Stat3 的表达

见图 1 所示,与正常组相比,模型组 p-mTOR/mTOR, p-Stat3/Stat3 显著上升,差异有统计学意义($P < 0.01$).与模型组相比,钩藤碱组和依达拉奉组 p-mTOR/mTOR, p-Stat3/Stat3 显著下降,差异有统计学意义($P < 0.01$).

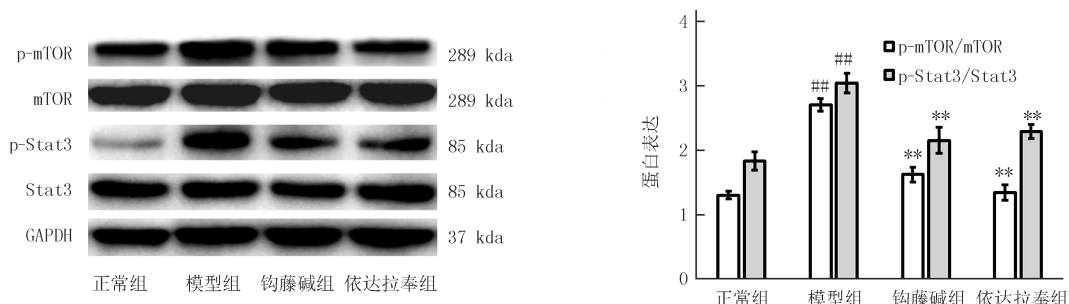


图 1 各组的 p-mTOR 和 p-Stat3 的蛋白表达 (与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ** $P < 0.01$)

Fig.1 Protein expression of p-mTOR and p-Stat3 in each group (** $P < 0.01$ vs normal group; ** $P < 0.01$ vs model group)

3 讨论

神经炎症主要由脑中固有免疫细胞小胶质细胞和星形胶质细胞引起,以往对神经炎症的研究主要集中在小胶质细胞上,但星形胶质细胞作为脑中数量最多的免疫细胞,在脑中与神经细胞、小胶质细胞、血管等密切接触,在神经免疫系统中处于重要的战略位置,其介导神经炎症的作用同样不可忽视^[10].

天麻钩藤饮于 20 世纪 50 年代由胡光慈收载于《中医内科杂病症治新义》中,主治高血压头痛眩晕,失眠,为平肝降逆之剂^[11].以天麻、钩藤、生决明之平肝降逆祛风为主,辅以山栀、黄芩、桑寄生、杜仲、牛膝等,其中山栀、黄芩的主要功效为清降,桑寄生、杜仲的主要功效为滋肝肾,牛膝的主要功效为活血等,诸药合用能够达到滋肾以平肝之逆的功效;夜交藤、朱茯神的主要功效为安神安眠,对其失眠进行缓解,用于肝厥之头痛、眩晕、失眠^[12].经临床及药效学实验研究均证明其对老年人血管性痴呆肝阳上亢、肝肾阴虚所表现的记忆、认知功能减退、人格障碍有很好的疗效,对其伴发的神经症状以及头痛眩晕、烦躁易怒、失眠等症状有显著疗效^[13].

钩藤为多源中药材,药典收载的原植物品种有茜草科植物钩藤 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Jacks、大叶钩藤 *U. macrophylla* Wall.、毛钩藤 *U. hirsuta* Havil.、华钩藤 *U. sinensis* (Oliv.) Havil. 以及无柄果钩藤 *U. sessilifructus* Roxb. 药材入药部位为它们的干燥带钩茎枝,钩藤早已在中国传统医药中发现并应用,其主要成分为羟基吲哚生物碱,经过广泛深入的研究,其对中枢神经系统的作用及机制的研究目前是神经递质的变化与中枢神经功能状态联系^[9].由于钩藤碱对神经炎症的作用鲜有报道,则本实验从钩藤单一成分有效成分

钩藤碱着重研究,探讨钩藤碱对 TNF- α 诱导 HA 的作用机制是否通过调节 mTOR/Stat3 信号通路来实现的,有助于以现代医学的理念将钩藤碱的作用阐述清晰,在开发新药的同时,进一步推进中药现代化发展。

TNF- α 是早期促炎细胞因子,继而放大炎症级联反应,而且能持续发挥促炎效应^[14]。因此本实验用 TNF- α 作为造模剂,由于用它来对星形胶质细胞的造模鲜有报道,首先摸索 TNF- α 造模浓度,经过 MTT 法得出较优的造模浓度($32 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$),由此进一步确定本实验中钩藤碱的较佳作用浓度($200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

NO 是一种在炎症介导的神经元退行性病变中起重要作用的介质。NO 由一氧化氮合酶 NOS 催化 L-精氨酸产生,NO 作用于自身细胞或者邻近细胞,与转录因子或蛋白激酶等结合,NO 抑制 NF- κ B,减少炎症因子介质的释放^[15]。IL-23 在炎症性疾病的发病机制中处于关键地位,它是促炎性细胞因子,它的水平间接反映炎症程度^[16]。IL-6 在免疫系统中具有多效性和多功能性,IL-6 在机体的炎症反应调控过程中发挥重要的作用,它是多功能炎性细胞因子,是炎性介质网络的关键成分,参与炎症反应中重要的白介素成分^[17]。本实验结果表明,模型细胞的 IL-23,IL-6 表达比正常组的都显著增加($P < 0.001$),NOS 表达比正常组的都显著减少($P < 0.001$),这说明模型较成功。经过钩藤碱和依达拉奉的干预后,模型细胞的 IL-23,IL-6 表达比模型组的都显著降低($P < 0.001$),NOS 表达比模型组的都显著升高($P < 0.001$),这提示钩藤碱和依达拉奉对该模型有一定的缓解作用。

氧自由基不但可以通过生物膜中多不饱和脂肪酸的过氧化反应攻击脑细胞脂质膜,而且通过脂质氢过氧化物的分解产物引起细胞损伤,导致细胞膜构型和结构的破坏^[18]。MDA 等脂质过氧化物生成过多,说明活性氧损害细胞导致细胞代谢异常,SOD 是机体清除体内氧自由基的重要酶之一,则 SOD 活性、MDA 水平的高低间接反映了机体清除氧自由基的能力^[19]。其中 NO 也有消除自由基的作用^[20]。本实验结果表明,模型细胞的 MDA 表达比正常组的都显著增加($P < 0.001$),NO 和 SOD 的表达比正常组的都显著减少($P < 0.001$),说明模型细胞受损伤,造模较成功。经过钩藤碱和依达拉奉的干预后,模型细胞的 MDA 表达比模型组的都显著降低($P < 0.001$),NO 和 SOD 的表达比模型组的都显著升高($P < 0.001$),这提示钩藤碱和依达拉奉对该模型有一定的保护作用。

mTOR 被激活后,可引起其下游的信号分子的表达与活性增加,不仅可以促进细胞生长、增殖、分化,还可以抑制细胞凋亡^[21]。活化的 mTOR 很容易被雷帕霉素完全阻断。STAT3 可被许多细胞因子和生长因子激活,而且很容易被活化的 mTOR 磷酸化。活化的 STAT3 在调控细胞生长、增殖、分化和凋亡等方面起重要作用^[22]。可见 mTOR 与 STAT3 有密切的联系,还有研究发现在缺血性细胞瘤的细胞中 mTOR 通路可以调节 STAT3 的丝氨酸磷酸化^[23]。近年研究发现,mTOR 和它的下游的效应器也许会涉及神经性炎症疼痛,局部皮肤给予雷帕霉素,阻断激活的 mTOR 下游目标,缓解了局部炎症性疼痛的机械性过敏反应^[24]。本实验结果中,模型组的 mTOR 和 STAT3 的磷酸化程度比正常组的都显著增加($P < 0.001$),提示模型较成功,激活了 mTOR/STAT3 通路。经过钩藤碱的干预后,钩藤组的 mTOR 和 STAT3 的磷酸化都有所抑制,这提示钩藤碱的作用可能是抑制 mTOR 和 STAT3 的磷酸化。

综上所述,钩藤碱对 TNF- α 诱导 HA 氧化炎症模型的具有保护作用,其作用机制可能是通过下调 mTOR/STAT3 信号通路,从而实现增加氧化相关因子 NOS,NO,SOD 的表达,减少氧化相关因子 MDA 的表达,以及减少炎症相关因子 IL-23 和 IL-6 的表达。

参 考 文 献

- [1] Sama D M, Norris C M. Calcium dysregulation and neuroinflammation: discrete and integrated mechanisms for age-related synaptic-dysfunction[J]. Ageing Res Rev, 2013, 12(4): 982-995.
- [2] Qin L, Wu X, Block M L, et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration[J]. Glia, 2007, 55(5): 453-462.
- [3] Terrando N, Monaco C, Ma D, et al. Tumor necrosis factor- α triggers a cytokine cascade yielding postoperative cognitive decline [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(47): 20518-20522.
- [4] 付惠群, 王天龙. 星形胶质细胞与老龄脑中中枢神经炎症反应[J]. 北京医学, 2015, 37(8): 777-779.
- [5] 张瀚元, 张秀英, 施路一. 疾病的炎症本质及其中药干预[J]. 西北农业学报, 2017, 26(1): 1-13.
- [6] 张昕, 黄李法, 寿迪文, 等. 天麻钩藤饮对轻型颅脑损伤患者脑保护作用的临床研究[J]. 浙江医学, 2018, 40(6): 557-559.

- [7] 黄华,丁伯平.钩藤生物碱对中枢神经系统的药理作用研究进展[J].现代药物与临床,2013,28(5):806-810.
- [8] 吴二兵,黄燮南,石京山,等.钩藤碱对脑缺血再灌注损伤的保护作用及其机制的实验研究[J].四川生理科学杂志,2001,23(3):121
- [9] 石京山,Kenneth H.钩藤碱对 DA 诱导 NT2 细胞凋亡的保护作用[J].中国药理学会通讯,2000,17(2):18.
- [10] 武良玉,鲍秀琦,孙华,等.星形胶质细胞上的清道夫受体与神经炎症的关系[J].中国医学科学院学报,2014,36(3):330-335.
- [11] 张永全,谭文澜,陆晖,等.天麻钩藤饮合美多巴治疗帕金森病 62 例[J].陕西中医,2008,29(6):666-667
- [12] 王宏献.天麻钩藤饮治疗高血压病的临床研究[J].中华中医药学刊,2008,26(2):338-340
- [13] 李根龙.辩证分型治疗老年痴呆 120 例临床观察[J].实用中医内科杂志,2013,27(4):9-11.
- [14] Ramberg P, Sekino S, Uzel NG, et al. Bacterial colonization during de novo plaque formation[J]. J Clin Periodontol. 2003, 30(11):990-995.
- [15] 周武庆,郑家润.一氧化氮在炎症和免疫调节中的作用[J].国外医学(皮肤性病学分册),1999,25(4):233-235.
- [16] 王冬梅,王久敏,刘桂芝.IL-23/IL-17 炎症通路的研究进展[J].现代中西医结合杂志,2013,22(6):674-677.
- [17] 张伟洁,郑宏.IL-6 介导免疫炎症反应作用及其与疾病关系的研究进展[J].细胞与分子免疫学杂志,2017,33(5):699-703.
- [18] 刘利群,毛定安,薄涛,等.川芎嗪对幼鼠惊厥性脑损伤脂质过氧化及抗氧化水平的影响[J].中国医院药学杂志,2008,28(4):253-256.
- [19] 付俊鲜,杨光路.醒脑静注射液联合高压氧治疗病毒性脑炎疗效及对血清 SOD 活性、MDA 含量及脑神经损害的影响[J].现代中西医结合杂志,2016,25(32):3606-3608.
- [20] 李申,湛先保,许国铭.胃黏膜损伤与保护[M].基础与临床:上海,上海科学技术出版社,2004:300-309.
- [21] Weichhart T. Mammalian target of rapamycin: a signaling kinase for every aspect of cellular life[J]. Methods Mol Biol, 2012, 821:1-14.
- [22] Dziennis S, Alkayed N J. Role of signal transducer and activator of transcription 3 in neuronal survival and regeneration[J]. Rev Neurosci, 2008, 19(4-5):341-361.
- [23] PARK S Y, BAIK Y H, CHO J H, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthesis by nicotine through S6K1-p42/44 MAPK pathway and STAT3(Ser 727) phosphorylation in Raw 264.7 cells[J]. Cytokine, 2008, 44(1):126-134.
- [24] 吕婧.mTOR 信号通路在慢性痛形成和维持中的作用及机制[D].广州:广州医科大学,2015.

Effects of rhynchophylline on the inflammation model of human astrocyte induced by tumor necrosis factor- α

An Chang¹, Zhang Ying¹, Ma Ruanxin², Qin Shaochen³

(1. Guangzhou Yuexiu District Guangta Street Community Health Service Center,

Guangzhou 510120, China; 2. Department of Pharmacy, The Sixth Affiliated Hospital of SUN Yat-sen University,

Guangzhou 510655, China; 3. The Hospital of Shanxi College of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030012, China)

Abstract; Objective This study aims to study the mechanism of rhynchophylline in the inflammation model of human astrocyte (HA) induced by tumor necrosis factor- α (TNF- α). **Method** HA was cultured in vitro, was induced by TNF- α , and the cells were divided into normal group, model group, rhynchophylline group and edaravone group. The effect of rhynchophylline on the proliferative capacity of HA was detected by MTT assay. Nitric oxide synthase (NOS) mRNA and interleukin-23 (IL-23) mRNA, interleukin-6 (IL-6) mRNA expression were detected by reverse transcription-PCR (RT-PCR). Determination of nitric oxide (NO), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) by spectrophotometry. The protein expression of p-mTOR, mTOR, p-Stat3 and Stat3 were detected by Western blot. **Result** Compared with the normal group, 32 ng \cdot mL⁻¹ TNF- α significantly inhibited astrocytes viability ($P < 0.001$) and 400 μ mol \cdot L⁻¹ rhynchophylline significantly inhibited astrocyte viability ($P < 0.001$). Compared with the model group, 200 μ mol \cdot L⁻¹ of rhynchophylline had significant proliferation effects on model cells ($P < 0.01$); NOS mRNA, NO and SOD in the rhyndamine group and captopril group were significantly increased ($P < 0.001$); IL-23 mRNA, IL-6 mRNA and MDA in the rhyndamine group and edaravone group were significantly decreased ($P < 0.001$); p-mTOR/mTOR and p-Stat3/Stat3 were significantly decreased in the rhyndamine group ($P < 0.01$) **Conclusion:** The active constituent of Uncaria sinensis, rhynchophylline, has the inhibitory effect of inhibiting inflammation of TNF- α -induced HA, possibly by down-regulating mTOR/STAT3 signaling pathway to increase the expression of NOS, NO and SOD in oxidative related factors, reduce the expression of MDA in oxidative related factors and IL-23 and IL-6 in inflammation-related factors.

Keywords: rhynchophylline; human astrocyte; inflammation; mTOR/STAT3 signaling pathway