

钩藤碱对 LPS 诱导的多巴胺能神经元及胶质细胞炎症 及 TNF- α 和 IL-1 β 影响 *

张 婷^{1,2}, 李继君^{1 Δ} , 孙克兴¹, 刘 忠³, Xiaohong Li¹

(1. 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心中医科, 上海 200127;
2. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053; 3. 上海交通大学药学院, 上海 200240)

摘要: **目的** 观察钩藤碱对脂多糖(LPS)诱导的多巴胺能神经元及胶质细胞产生的炎症的影响。**方法** 体外培养胎鼠神经元及神经胶质细胞,通过免疫细胞荧光染色鉴定后,分为 4 组:空白对照组、LPS 模型组、LPS+钩藤碱组、LPS+宁动颗粒组,在干预后 0、1、3、6、12 h 收集细胞培养液,并 ELISA 法检测细胞培养液中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 的含量。**结果** LPS 介导的炎症组中,在时间上 3、6 h 作用 TNF- α 、IL-1 β 的含量达到高峰;TNF- α 、IL-1 β 浓度,与 LPS 模型组比较,空白对照组、LPS+钩藤碱组与 LPS+宁动颗粒组培养液中 IL-1 β 含量均显著降低($P<0.05$),且 LPS+钩藤碱组与 LPS+宁动颗粒组间无显著性差异。**结论** 钩藤碱可以显著抑制 LPS 诱导的神经元及神经胶质细胞的炎症因子 TNF- α 、IL-1 β ,起到抗炎而保护神经元作用。

关键词: 钩藤碱; 脂多糖; 多巴胺能神经元; 胶质细胞; 炎症因子

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2018)02-0006-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2018.02.002

Rhynchophylline Effects on Inflammation and Related Inflammatory Factor of TNF- α and IL-1 β of Dopaminergic Neurons and Glial Cells Induced by Lipopolysaccharide

ZHANG Ting^{1,2}, LI Jijun¹, SUN Kexing¹, LIU Zhong³, Xiaohong Li¹

(1. Department of Integrative Medicine on Pediatrics, Shanghai Children's Medical Center, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China;
2. School of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;
3. School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

ABSTRACT: **Objective** To observe the influence of rhynchophylline (Rh) on inflammation and related inflammatory factor of TNF- α and IL-1 β in dopaminergic neurons and glial cells induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Dopaminergic neurons and glial cells were extracted, eparated and cultured in 18-day pregnant Wistar rats, and is divided into four groups: control group, LPS model group, the LPS + Rhy group and LPS + NDG group, each group respectively in processing after the completion of 0, 1, 3, 6, 12 h collecting cells and cell culture medium after treated. After immunofluorescence staining, the content of TNF- α and IL-1 β in cell culture medium was detected by ELISA. **Results** The content of the IL-1 β and TNF- α went content peak from 3 and 6 hours after treating. Compared with LPS model group, the content of IL-1 β and TNF- α were significantly lower in LPS + Rhy group and LPS + NDG ($P<0.01$), but there was no statistically significant difference between the group of the LPS + Rh and the LPS + NDG. **Conclusion** Rh can effectively suppress the content of IL-1 β and TNF- α , and then to inhibit the inflammatory and protect dopaminergic neurons.

KEY WORDS: rhynchophylline, lipopolysaccharide; dopaminergic neurons; glial cells; inflammatory factor

收稿日期: 2018-04-12

* 基金项目: 国家自然科学基金(81528023,81202724);上海交通大学医工交叉项目(YG2015MS35)

第一作者简介: 张婷(1993-),女,在读硕士研究生,专业方向:中药药理与新产品开发。

Δ 通信作者: 李继君, E-mail: lijijun523@hotmail.com

多巴胺能神经元及胶质细胞功能异常与多种神经类疾病密切相关,如帕金森、儿童抽动症、多动症等,此类疾病的病因及发病机制较为复杂,近年来,越来越多的研究表明免疫炎症反应对此类疾病具有较大的影响^[1-2]。钩藤碱(Rhynchophylline, Rh)是茜草科植物钩藤(*Uncaria rhynchophylla* Jacks)中含量最高的生物碱^[3],现代药理研究表明钩藤碱在癫痫、惊厥、焦虑症等中枢神经系统障碍性疾病方面具有促进神经损伤修复作用^[4],其具体作用机制不是十分明确。我们前期研究表明,以钩藤为君药的宁动颗粒(Ningdong granule, NDG)可影响大脑神经元细胞内的多巴胺(Dopamine, DA)和代谢产物高香草酸(Homovanillic acid, HVA)的含量^[5-6],也具有调节抽动症患者异常的血清炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)的作用^[7],为进一步研究 Rh 对神经元及胶质细胞作用,本研究拟对体外细胞实验利用脂多糖诱导多巴胺能神经元及胶质细胞产生炎症反应,观察 Rh 对 IL-1 β 和 TNF- α 的影响。

1 材料和方法

1.1 材料及试剂 钩藤碱(Rh):南京泽朗医药科技有限公司;宁动颗粒(NDG):深圳三九中药有限公司;LPS:Sigma 公司,美国;胰酶细胞消化液(0.25% Trypsin-EDTA 1X):100mL/瓶,HyClone 公司,美国;PBS 缓冲液(10X):HydnoneLaboraories 公司,美国;胎牛血清(含双抗):500ml/瓶,Gibco 公司,美国;培养液(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM),Hyclone 公司,美国;1%青霉素(Penicillin, PC),Sigma 公司,美国;DAPI 染色液、兔抗色氨酸羟化酶(Tryptophan hydroxylase, TH)、兔抗胶质纤维酸性蛋白(Glial fibrillary acidic protein, GFAP)、羊抗兔荧光 II 抗 IgG/异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC)和羊抗兔 IgG/菁荧光染料(Cy 3):Abcam 公司,美国;TNF- α 和 IL-1 β ELISA 试剂盒:IBL 公司,德国。

1.2 仪器 低温高速台式离心机:2-16PK, 德国 SIGMA 公司;37 °C 培养箱:美国 Thermo 公司;激光扫描共聚焦显微镜:德国 Leica 公司 TY3833 型显微系统;-80 °C 超低温冰箱:MDF-C8V 型,美国 Thermo 公司;微量移液器:0.1-1 000 μ L,德国 Eppendorf 公司;酶标仪:美国 Thermo 公司;干燥箱:DHG-9145A 型,上海姚氏仪器设备厂;245 mm 细胞培养皿、75 cm² 细胞培养瓶、6 孔细胞培养板、48 孔板细胞培养

板和 24 孔玻底细胞培养板(激光共聚焦专用):上海耐思科学有限公司。

1.3 动物 18 d 孕龄的 Wistar 大鼠,由上海儿童医学中心动物实验中心提供。

1.4 新生大鼠多巴胺神经元及胶质细胞的分离培养 取孕 18d 孕龄的 Wistar 大鼠,脱颈处死,浸入 75% 的酒精消毒 3~4 min,取出子宫,置于无菌培养皿内,在显微镜下,取出胎鼠全脑的额叶前回,转移到 5 mL EP 管中,内含有 20% 的葡萄糖和 80% 的 HBSS。在 37.5 °C 下用 0.25% 胰蛋白酶消化,将表面的胰蛋白酶液洗去,将细胞悬液打碎,充分打散,多次反复操作,将沉淀后的上层细胞悬液吸出,用计数板进行细胞计数,显微镜下观察,将细胞数调整为 1×10^6 cells/mL,分装于培养瓶中,放入 CO₂ 培养箱,5% CO₂,37 °C 静置培养;24 h 后换液,继续孵育 24 h 后,换液,分装植入在 6 孔板中继续培养,24 h 后开始加药观察。

1.5 细胞鉴定 放入培养箱中培养 2 d 后,取出盖玻片,用免疫荧光间接法对 GFAP 和 TH 抗体染色,II 抗分别使用 FITC 和 Cy 3 的 IgG 抗体,细胞核 DAPI 染色。使用 Leica 激光扫描共聚焦荧光显微镜成像系统拍摄。

1.6 LPS 诱导及细胞分组 将原代混合细胞随机,每组 6 只小鼠随机取材,同时加入含有 LPS 或含有 LPS 与药物处理培养,分为空白对照组、LPS (1 μ g/mL)模型组、LPS+钩藤碱(5 μ g/ μ L)组、LPS+宁动颗粒(10 μ g/ μ L)组,各组分别于给药后 0、1、3、6、12 h 收集细胞及细胞培养液后,检测 TNF- α 、IL-1 β 含量。

1.7 TNF- α 、IL-1 β 检测 干预后 0、1、3、6、12 h 收集细胞培养液,进行酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 的含量。

1.8 统计学分析 数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料采用单因素方差分析或者 Kruskal-Wallis 检验;统计分析软件使用 SPSS 19.0, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经胶质细胞及多巴胺能神经元鉴定 神经胶质细胞及多巴胺能神经元培养后,神经胶质细胞通过 GFAP 抗体与荧光 II 抗 FITC 标记染色,多巴胺能神经元通过 TH 抗体与荧光 II 抗 Cy 3 标记染色,Leica 激光扫描共聚焦荧光扫描后如图 1 显色分布,扫描结果表明体外培养的 DA 能神经元和胶质细胞

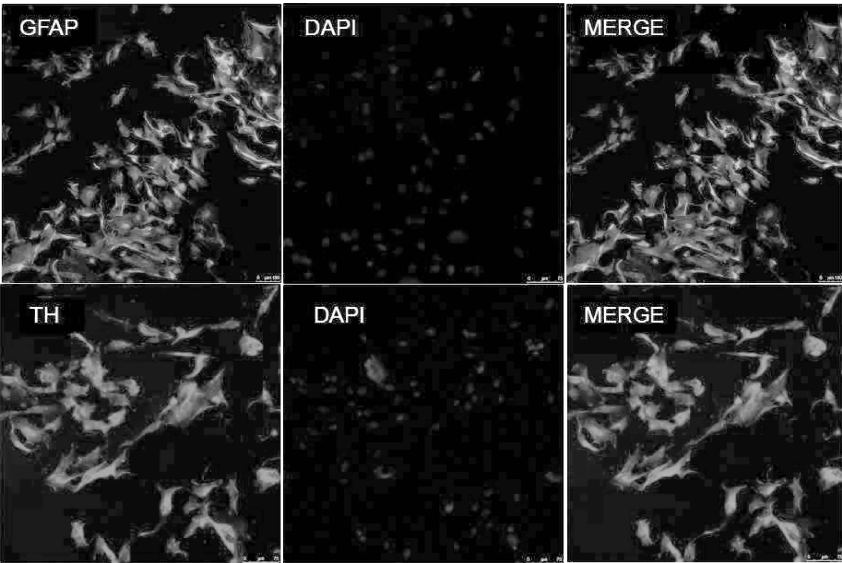


图 1 神经胶质细胞及 DA 能神经元鉴定

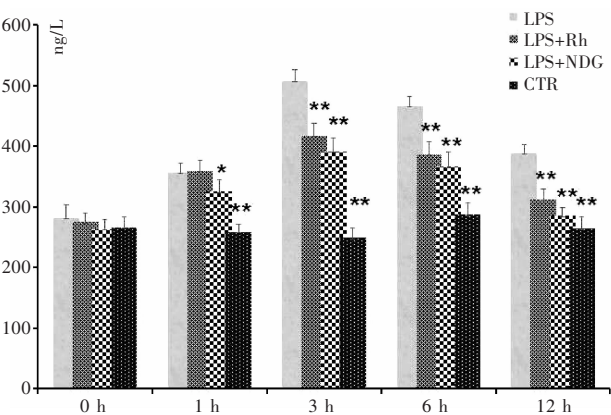
均匀分布。

2.2 细胞培养液中 TNF- α 的含量 组间不同时间点 TNF- α 的含量及时间变化,如表 1 和图 2:在 LPS 干预前 (0 h),LPS 组、LPS+Rh 组、LPS+NDG 组和 CTR 组,TNF- α 浓度分别为:(281.7 $\pm$ 22.1)、(274.6 $\pm$ 15.0)、(263.2 $\pm$ 16.5)、(266.5 $\pm$ 17.6)ng/L, 组间浓度无显著性,而在加药干预后 3~6 h TNF- α 浓度达到高峰:3 h 分别为 (507.1 $\pm$ 19.8)、(417.7 $\pm$ 20.5)、(391.4 $\pm$ 21.2)、(248.5 $\pm$ 17.1)ng/L,6 h 分别为 (466.3 $\pm$ 16.3)、(386.4 $\pm$ 21.3)、(366.2 $\pm$ 23.9)、(286.7 $\pm$ 19.4)ng/L,且相对 LPS 组 TNF- α 浓度比较,LPS+钩 Rh 组和 LPS+NDG 组浓度显著降低 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$),CTR 组 TNF- α 浓度显著低于其他组($P<0.01$),而 LPS+钩 Rh 和 LPS+NDG 组间 TNF- α 浓度无显著性差异。

表 1 细胞培养液中在不同时间段 TNF- α 的含量($\bar{x}\pm s,n=6,\text{ng/L}$)

	0 h	1 h	3 h	6 h	12 h
LPS(脂多糖组)	281.7 $\pm$ 22.1	356.2 $\pm$ 16.0	507.1 $\pm$ 19.8	466.3 $\pm$ 16.3	387.9 $\pm$ 15.3
LPS+Rh(脂多糖+钩藤碱组)	274.6 $\pm$ 15.0	359.3 $\pm$ 17.4	417.7 $\pm$ 20.5**	386.4 $\pm$ 21.3**	312.0 $\pm$ 16.6**
LPS+NDG(宁动颗粒组)	263.2 $\pm$ 16.5	324.9 $\pm$ 19.8*	391.4 $\pm$ 21.2**	366.2 $\pm$ 23.9**	285.3 $\pm$ 13.9**
CTR(对照组)	266.5 $\pm$ 17.6	258.1 $\pm$ 13.5**	248.5 $\pm$ 17.1**	286.7 $\pm$ 19.4**	263.8 $\pm$ 19.4**

注:与 LPS 比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$



注:与 LPS 比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

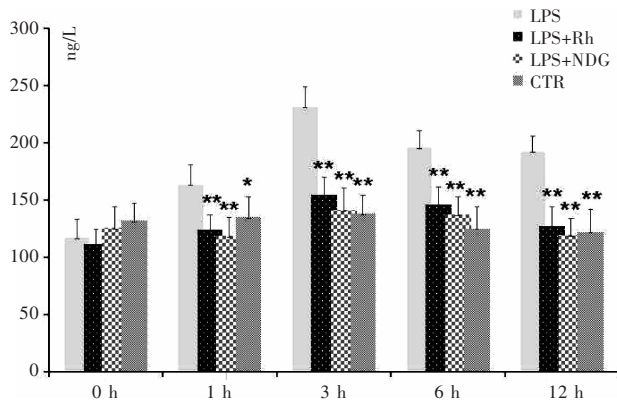
图 2 各组中不同时间点 TNF- α 的含量(ng/L)

2.3 细胞培养液中 IL-1 β 的含量 组间不同时间点 IL-1 β 的含量及时间变化,如表 2 和图 3,各时间段及浓度变化趋势与 TNF- α 的含量变化趋势相似:在 LPS 干预前 (0 h),LPS 组、LPS+Rh 组、LPS+NDG 组、CTR 组,IL-1 β 浓度分别为 (117.2 $\pm$ 16.1)、(111.9 $\pm$ 12.3)、(125.5 $\pm$ 18.3)、(131.7 $\pm$ 15.2)ng/L, 组间浓度无显著性,而在加药干预后 3~6h,IL-1 β 浓度达到高峰:3 h 分别为 (231.8 $\pm$ 17.3)、(154.7 $\pm$ 14.9)、(141.4 $\pm$ 19.1)、(138.3 $\pm$ 15.8)ng/L,6 h 分别为 (196.2 $\pm$ 14.8)、(145.9 $\pm$ 15.1)、(137.5 $\pm$ 15.6)、(125.2 $\pm$ 19.0)ng/L,且相对 LPS 组比较,药物干预后 LPS+Rh 组和 LPS+NDG 组 IL-1 β 浓度显著降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$),而 LPS+

表 2 细胞培养液中在不同时间段中 IL-1β 的含量($\bar{x} \pm s, n=6, \text{ng/L}$)

	0 h	1 h	3 h	6 h	12 h
LPS	117.2±16.1	163.6±17.3	231.8±17.3	196.2±14.8	192.6±13.1
LPS+Rh	111.9±12.3	123.8±13.5**	154.7±14.9**	145.9±15.1**	127.3±16.7**
LPS+NDG	125.5±18.3	118.5±16.0**	141.4±19.1**	137.5±15.6**	119.5±14.3**
CTR	131.7±15.2	135.0±18.1*	138.3±15.8**	125.2±19.0**	122.1±19.4**

注:与 LPS 比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$



注:与 LPS 比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

图 3 各组中不同时间点 IL-1β 的含量(ng/L)

钩 Rh 和 LPS+NDG 组间 IL-1β 浓度无显著性差异。

3 讨论

胶质细胞是重要的免疫细胞,具有为神经元提供营养和代谢底物,调节突触活性,维持其正常功能的作用^[8]。脂多糖(LPS)可与神经胶质细胞膜上的受体结合,刺激胶质细胞,启动炎症细胞内多条信号通路转导,产生各种炎性细胞因子(TNF-α 和 IL-1β 等)、脂性炎症介质等,诱发炎症反应,是一种最常用的炎症诱导剂^[9-10],故本研究选择 LPS 做炎性诱导剂,而炎症反应产生的炎性因子,如白介素 IL-1β 和肿瘤坏死因子 TNF-α 等,具有神经毒性,可引起 DA 神经元凋亡和坏死,并能激活 DA 能神经元退变受体,是帕金森病(PD)、注意力缺陷多动症(ADHD)等神经性疾病的研究热点^[11-12]。胶质细胞可通过 LPS 活化,释放神经毒性细胞因子(TNF-α,IL-1β 等)间接造成 DA 能神经元损伤^[13-14]。

Rh 是茜草科植物钩藤中含量最高的生物碱^[5],中药钩藤具有清热平肝,熄风定惊之功效,现代药理研究表明钩藤碱在癫痫、惊厥、焦虑症等中枢神经系统障碍性疾病方面具有促进神经损伤修复作用^[6],可以减轻原代星形胶质细胞氧化应激损伤^[7]。我们前期研

究表明,以钩藤为君药的宁动颗粒复方制剂是治疗儿童多动症和儿童抽动症的名中医验方,研究表明其可调节大脑神经元细胞内的 DA 和 HVA 的代谢^[8-9],也具有调节抽动症患者异常的血清 IL-1β 和 TNF-α 的作用^[10]。

神经元及神经胶质细胞炎症反应所介导的神经细胞损伤过程主要是因为被激活的胶质细胞释放神经毒性因子(如 TNF-α、IL-1β 等)引起继发的神经元损伤,本实验结果也表明 LPS 体外诱导神经胶质及多巴胺能神经元产生炎性因子 IL-1β 和 TNF-α,在 3-6h 达到浓度高峰,钩藤碱和宁动颗粒体外均有明显抑制 IL-1β 和 TNF-α 作用,且证明宁动颗粒和钩藤碱对多巴胺能神经元和胶质细胞都具有显著抑制炎症作用,且无显著性差异,同时,经过药物干预后,经过炎性因子有显著降低,仍高于未经过 LPS 诱导健康对照组(CTR)。

本实验仅发现钩藤碱可以显著地抑制 LPS 刺激的胶质细胞炎性因子 IL-1β 的释放,提示钩藤碱在抗炎作用上可能具有靶向特异性,通过钩藤碱作用于 LPS 诱导的神经元及神经胶质细胞产生的炎性因子 IL-1β 和 TNF-α 变化,表明钩藤碱抗炎及间接推断对神经元的保护作用,具体机制探讨有待深入,本研究可为传统中药钩藤的药理研究及中药复方宁动颗粒的抗炎及神经元保护等药理研究及拆方研究提供一定实验依据。

参考文献:

- [1] ROS-BEENAL F,HUNOT S,HERRERO M T,et al. Microglial glucocorticoid receptors play a pivotal role in regulating dopaminergic neurodegeneration in parkinsonism[J]. National Academy of Sciences,2011,108 (16): 6632-6637.
- [2] SEBASTIÁN,RODRÍGUEZ,KAZUYUKI,et al. Striatal TH-immunopositive fibers recover after an intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in golden hamsters treat-

- ed with prednisolone; roles of tumor necrosis factor- α and inducible nitric oxide synthase in neuro- degeneration[J]. Neuroscience Research, 2013, 76(1-2): 83-92.
- [3] SHI J S, YU J X, CHEN X P, et al. Pharmacological Actions of Uncaria Alkaloids, Rhynchophylline and Isorhynchophylline[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2003, 24(2): 97.
- [4] KANG T H, MURAKAMI Y, TAKAYAMA H, et al. Protective Effect of Rhynchophylline and Isorhynchophylline on in vitro Ischemia-Induced Neuronal Damage in the Hippocampus: Putative Neurotransmitter Receptors Involved in their Action [J]. Life Sciences, 2004, 76(3): 331-343.
- [5] LI J J, LI Z W, WANG S Z, et al. Ningdong granule: a complementary and alternative therapy in the treatment of attention deficit/hyperactivity disorder [J]. Psychopharmacology, 2011, 216(4): 501-509.
- [6] JIJUN L, ZAIWANG L, ANYUAN L, et al. Abnormal expression of dopamine and serotonin transporters associated with the pathophysiologic mechanism of Tourette syndrome[J]. Neurol India, 2010, 58(4): 523-529.
- [7] 汤海霞, 李安源, 李继君, 等. 宁动颗粒对抽动-秽语综合征患儿 IL-12、TNF- α 的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(4): 435-438.
- [8] ALLIOT F, GODIN I, PESSAC B. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain [J]. Brain Res Dev Brain Res, 1999, 117(2): 145-152.
- [9] HOBAN D B, CONNAUGHTON E, CONNAUGHTON C, et al. Further characterisation of the LPS model of Parkinson's disease: A comparison of intra-nigral and intra-striatal lipopolysaccharide administration on motor function, microgliosis and nigrostriatal neurodegeneration in the rat [J]. Brain, Behavior, and Immunity, 2013, 27(1): 91-100.
- [10] CHOI Y, LEE M K, LIM S Y, et al. Inhibition of inducible NO synthase, cyclooxygenase-2 and interleukin-1 β by torilin is mediated by mitogen-activated protein kinases in microglial BV2 cells [J]. British Journal of Pharmacology, 2009, 156(6): 933-940.
- [11] PHANI S, LOIKE J D, PRZEDBORSKI S. Neurodegeneration and Inflammation in Parkinson's disease[J]. Parkinsonism & Related Disorders, 2012, 18(S1): S207-S209.
- [12] TANAKA S, ISHII A, OHTAKI H, et al. Activation of microglia induces symptoms of Parkinson's disease in wild-type, but not in IL-1 knockout mice [J]. Journal of Neuroinflammation, 2013, 10: 907.
- [13] PARK K M, YULE D I, BOWERS W J. Tumor necrosis factor- α potentiates intraneuronal Ca²⁺ signaling via regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor[J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(48): 3069-3079.
- [14] YUAN D, MA B, YANG J Y, et al. Anti-inflammatory effects of rhynchophylline and isorhynchophylline in mouse N9 microglial cells and the molecular mechanism.[J]. International Immunopharmacology, 2009, 9(13): 1549-1554.