

小檗碱通过 NF- κ B 相关通路抑制 AGEs 诱导的小鼠小胶质细胞活化的实验研究

王瑾舒 顾 蓓 刘玉琴 南凤尾 张孟仁

摘 要 **目的** 探讨小檗碱对 AGEs 诱导的小鼠小胶质细胞活化的干预作用和机制。**方法** 将细胞分为 CON 组、AGEs 组、小檗碱和 BSA 阴性对照组,MTT 法检测细胞活力,倒置相差显微镜下观察细胞的形态变化,ELISA 法检测细胞上清液中 TNF- α 的分泌情况,Western blot 法检测细胞内 CD68、RAGE、pNF- κ B p65 蛋白的表达。**结果** AGEs 在不改变细胞活力的情况下,对小胶质细胞的形态有改变作用,并且可以显著上调细胞上清液中的炎性细胞因子 TNF- α 的分泌量($P=0.000$),增加 CD68、RAGE 及 pNF- κ B p65 蛋白的表达($P<0.05$)。小檗碱可以改善 AGEs 诱导的小胶质细胞形态改变,显著下调小鼠小胶质细胞 CD68 和 pNF- κ B p65 蛋白的表达($P<0.05$),对 TNF- α 的分泌量没有影响。**结论** 小檗碱可以抑制 AGEs 诱导的小鼠小胶质细胞的活化,其作用可能与 NF- κ B 介导的炎性信号通路有关。

关键词 小檗碱 AGEs 小胶质细胞 神经炎症反应 糖尿病认知功能障碍

中图分类号 R587.1

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.03.024

Experimental Study on the Effects of Berberine on Mouse Microglia Cultured with Advanced Glycation end Products (AGEs) via the NF- κ B Signaling Pathway. Wan Jinshu, Gu Bei, Liu Yuqin, et al. Department of Traditional Chinese Medicine, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

Abstract **Objective** To explore the effects of AGEs on the activation of mouse microglia and the effects of berberine on mouse microglia cultured with AGEs. **Methods** The microglia were divided into four groups: control group, AGEs group, berberine group and BSA group. The morphological changes of microglia were observed by inverted phase contrast microscope and cell viability was evaluated by MTT assays. Meanwhile, we adopted Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to determine the concentration of TNF- α in the supernatant of cultured microglia and Western blot analysis to semiquantitatively detect the expression of CD68, RAGE and pNF- κ B p65. **Results** AGEs (300 μ g/ml) could remarkably up-regulate the expression of CD68, RAGE and pNF- κ B p65 ($P<0.05$), thus increase the secretion of TNF- α in microglia ($P=0.000$), while had no effect on the viability of microglia. Meanwhile, berberine could down-regulate the expression of CD68 and pNF- κ B p65 ($P<0.05$) in mouse microglia cultured with AGEs (300 μ g/ml) for 24h, while had no effect on the expression of RAGE and the concentration of TNF- α in the cell supernatant. **Conclusion** Berberine can inhibit the activation of microglia cultured with AGEs and the mechanism may be involved with the NF- κ B signaling pathway.

Key words Berberine; AGEs; Microglia; Inflammation; Diabetic cognitive deficiency

神经炎症反应是糖尿病认知功能下降的重要机制,减轻或有效抑制炎症反应可能是防治糖尿病认知功能障碍的重要途径^[1~3]。有研究表明,高糖状态下,体内炎症因子水平的升高可能与小胶质细胞中非酶糖基化产生过多的晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs),从而引发晚期糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products,

RAGE)相关的胞内炎性信号通路有关^[4,5]。AGEs 可以与细胞表面 RAGE 结合,激活胞内炎症信号通路并产生活性氧,同时,核转录因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)磷酸化后入核,启动下游基因转录,进而诱发炎症,导致炎症因子肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)的释放,从而对神经细胞造成损伤^[6,7]。

黄连(Rhizoma Coptis),属毛茛科、黄连属多年生草本植物,是笔者课题组自拟中药复方脑复聪的主要成分之一,现代药理研究表明其具有抗炎、抗氧化、降糖、降脂等作用,小檗碱(berberine)是其主要的有效成分之一。本研究通过研究小檗碱对 AGEs 诱导

作者单位:100730 中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院中医科(王瑾舒、南凤尾、张孟仁);100730 北京,中国医学科学院基础医学研究所协和细胞资源中心(顾蓓、刘玉琴)

通讯作者:张孟仁,主任医师,博士生导师,电子信箱:zhzhmr@163.com

小胶质细胞活化后引发的炎症反应的作用,探讨小槩碱在糖尿病认知功能障碍中发挥神经保护作用的可能机制。

材料与方法

1. 材料:小鼠小胶质 BV-2 细胞细胞株购自北京协和医学院基础学院细胞中心,编号:3111C0001CCC000063。RPMI-1640 液体培养基、胎牛血清(FBS)、MTT(美国 Sigma 公司),盐酸小槩碱(百灵威科技有限公司),AGEs 蛋白质(北京博奥森有限公司),DMSO(北京化工厂),Anti-CD68 抗体(ab53444,英国 Abcam 公司),Anti-RAGE 抗体(ab181293,英国 Abcam 公司),pNF- κ Bp65 抗体(#3033T,美国 CST 公司),TNF- α ELISA 试剂盒(美国 eBioscience 公司),AGEs-BSA(美国 Biovision 公司),Tris、APS、SDS、TEMED、Tween-20、丙氨酸、甘氨酸、甲叉双丙酮酰胺、丽春红(美国 Sigma 公司),ECL Plus 超敏发光液(美国 Millipore 公司),羊抗兔 HRP 标记的二抗、羊抗大鼠 HRP 标记的二抗(美国 Jackson 公司)。倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司),ELX 800 酶标仪(美国 BioTek 公司),全自动多功能酶标仪(美国 Thermo 公司),CO₂ 培养箱(美国 Forma3111 公司),自动洗板机(美国 Thermo 公司),电热恒温培养箱(中国 DH4000A),GL-802B 微型台式真空泵、MINI shaker、摇床(中国其林贝尔公司),台式冷冻离心机(中国湘仪公司),电泳仪、转膜仪(中国 J-MAX 公司)。

2. 方法:(1)细胞培养:小鼠小胶质细胞 BV-2 以含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基培养在 37℃ 含 5% CO₂ 的细胞培养箱内,隔日换液 1 次,隔 2~3 日传代一次(细胞长至 70%~80% 时传代)。(2)细胞给药与分组:取对数生长期 BV-2 细胞以 3×10^4 /ml 的密度接种于 6 孔培养板,待细胞贴壁后,吸弃旧培养基,然后按分组更换培养基后继续培养约 24h 后继续后续实验,(3)分组情况:Con 组培养基为无血清的 RPMI1640 培养基,AGEs 组为无血清的 RPMI1640 培养基 + AGEs(终浓度为 300 μ g/ml),小槩碱组更换为 10 μ mol/L 小槩碱预处理 1h 后再更换为 300 μ g/ml AGEs 培养基培养 23h,BSA 阴性对照组为无血清的 RPMI1640 培养基 + BSA(终浓度为 300 μ g/ml)。(4)细胞形态观察及 ELISA 检测:更换培养基继续培养 24h 后倒置相差显微镜下观察各组细胞形态学变化并摄片。细胞形态观察结束后提取细胞上清液,采用 TNF- α ELISA 试剂盒检测各组细胞上清液中 TNF-

α 含量。(5)细胞活力检测:取对数生长期 BV-2 细胞以 3×10^3 /孔的密度接种于 96 孔培养板中,每孔加含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基约 100 μ l,每组设 8 个平行孔,外周 1 圈空白孔内加 100 μ l 0.01mmol/L PBS 做空白对照,细胞贴壁后按上述实验分组给药继续培养 24h 后采用 MTT 对细胞活力进行检测,选择 570nm 波长在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度(A)值,记录并分析结果。(6)Western blot 法检测:采用 Western blot 法对各组细胞中 CD68、RAGE、pNF- κ B p65 蛋白进行检测,蛋白相对表达量用各目的蛋白灰度值与相应内参(actin)灰度值的比值表示。

3. 统计学方法:所有实验均重复 3 次以上,数据采用 SPSS 22.0 统计学软件对数据进行统计分析,分析前采用 One Sample 方差同质性检验,符合正态分布的数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)描述,多组独立样本的比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA);两组间相互比较:满足方差齐性时用 LSD 检验,不满足方差齐性时用 T2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 小槩碱对小胶质细胞 BV-2 形态的改变:显微镜下可见:常规对照组细胞 50%~60% 贴壁良好,胞体呈梭状或三角状,约 40% 悬浮生长。AGEs 组细胞贴壁数量较 Con 组增多,约 70%~80% 贴壁,部分细胞活化为胞体较大、突起缩短的阿米巴样类巨噬细胞(图 1)。BSA 对照组与 Con 组比较悬浮细胞比例相似,并且没有出现阿米巴样细胞,提示 AGEs 对小胶质细胞形态的改变与其蛋白属性无关。小槩碱组较 AGEs 组阿米巴样细胞数目减少,多为梭形或三角状细胞,提示小槩碱对 AGEs 导致的形态学改变有一定的恢复作用。

2. 小槩碱对小胶质细胞 BV-2 细胞活力的影响:与 Con 组比较,AGEs 组、小槩碱组及 BSA 组与 Con 组之间 A 值比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),详见图 2。

3. 小槩碱对小胶质细胞上清液中 TNF- α 分泌量的影响:与 Con 组比较,AGEs 组上清液中 TNF- α 分泌量显著升高($P = 0.000$);与 AGEs 组比较,小槩碱组细胞上清液中 TNF- α 分泌量差异无统计学意义($P > 0.05$);与 Con 组比较,BSA 阴性对照组上清液中 TNF- α 分泌量差异无统计学意义($P > 0.05$),详见图 3。

4. 小槩碱对小胶质细胞 CD68、RAGE、pNF- κ B p65 蛋白表达的影响:与 Con 组比较,AGEs 组小胶质

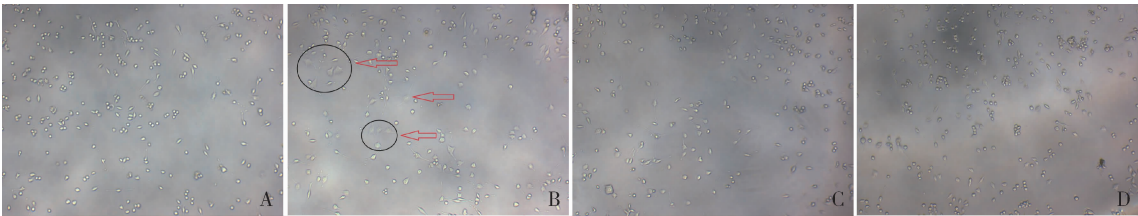


图 1 不同培养条件下小胶质细胞倒置相差显微镜下形态观察 (×40)
A. Con 组; B. 300 µg/ml AGEs 组; C. 小檗碱组; D. BSA 对照组

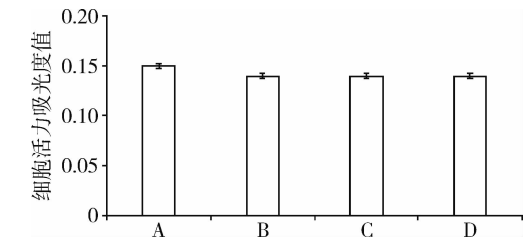


图 2 各组小胶质细胞 BV-2 细胞活力比较 (n = 24)
A. Con 组; B. 300 µg/ml AGEs 组; C. 小檗碱组; D. BSA 对照组

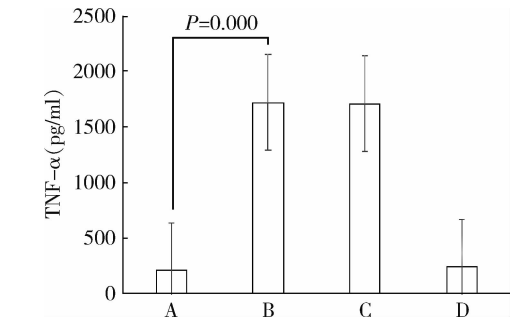


图 3 不同组小胶质细胞上清液中 TNF-α 分泌量 (n = 4)
A. Con 组; B. 300 µg/ml AGEs 组; C. 小檗碱组; D. BSA 对照组

细胞中 CD68、RAGE 及 pNF-κB p65 蛋白的表达量均明显升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$), 小檗碱组 CD68、pNF-κB p65 蛋白的表达量均较 AGEs 组显著下降 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), RAGE 蛋白的表达量与 AGEs 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 详见图 4。

讨 论

多项研究表明, AGEs 与糖尿病认知功能障碍关系密切, 2 型糖尿病认知功能障碍患者血清 AGEs 水平明显高于糖尿病非认知功能障碍患者^[8,9]。AD 样病理改变是认知功能障碍的重要病理基础, AGEs 与 AD 样病理改变的发生、发展亦关系密切。AGEs 不仅常与 Aβ 共同沉积在 AD 患者/动物模型神经细胞外, 同时参与并增加 Aβ 的错误折叠^[10]。另外, Aβ-AGEs 复合物可通过 RAGE 相关信号通路加重 Aβ 的神经毒性作用^[11]。Tau 蛋白过度磷酸化方面,

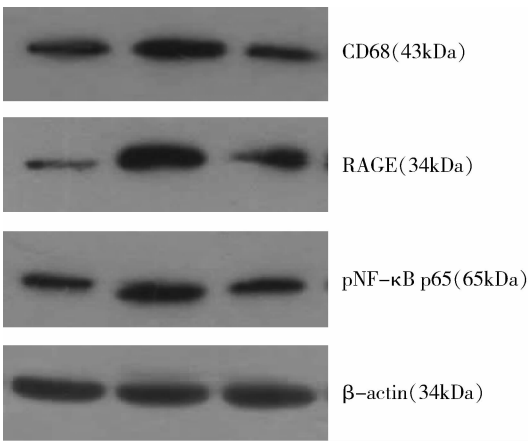


图 4 小檗碱对小胶质细胞 CD68、RAGE、pNF-κB p65 蛋白表达的影响

在 AD 患者的神经原纤维缠结处同样可检测到 AGEs 的表达, 另外, AGEs 亦可通过 RAGE 介导的糖原合成酶 3 (glycogen synthase kinase 3, GSK-3) 激活诱导 AD 样 tau 蛋白改变^[12]。上述研究均表明 AGEs 与糖尿病认知功能障碍关系密切, 在认知功能障碍发病过程中发挥重要作用, 故本研究选用 AGEs 为小胶质细胞激活剂, 模拟高糖状态下神经系统的炎症激活后的细胞状态。预实验过程中通过观察不同浓度下小胶质细胞细胞形态学变化、MTT、细胞免疫荧光及 ELISA 检测结果, 同时结合相关文献报道, 笔者最终采用了 300 µg/ml 作为 AGEs 实验干预浓度。

有研究表明, AGEs 可以与细胞表面 RAGE 结合, 激活胞内炎症信号通路并产生活性氧, 同时, NF-κB 磷酸化后入核, 启动下游基因转录, 进而诱发炎症, 导致炎症因子 TNF-α、IL-6 的释放^[4,5]。本实验结果显示 AGEs 能显著上调小鼠小胶质细胞表面白细胞分化抗原 68 (cluster of differentiation 68, CD68)、RAGE、pNF-κB p65 蛋白的表达, 增加炎症因子 TNF-α 的分泌量。本实验的研究结果与其相一致。但 AGEs 诱导的小胶质细胞激活及炎症因子释放其具体机制到底是 AGEs 直接激活小胶质细胞

导致 CD68 的表达增高,从而激活 RAGE/NF- κ B 通路,增加炎症因子的释放还是 AGEs 与其受体 RAGE 结合激活其下游 NF- κ B 通路激活使炎症因子升高从而导致小胶质细胞的激活尚不清楚。该信号转导通路中各信号分子之间相互影响的具体过程及机制尚待进一步分子生物学研究阐明。

根据认知障碍的中医病因病机特点及治疗认知障碍的临床经验并参考现代药理学研究,笔者设计的中药复方脑复聪临床应用对脾肾亏虚、痰浊血瘀型轻度认知功能障碍的患者有良好疗效^[6]。既往研究表明脑复聪能够增加海马 CA1 区胰岛素样生长因子-1(IGF-1)的含量,下调糖尿病认知功能障碍大鼠海马 CA1 区 NF- κ B 的表达水平、有效抑制高糖条件下小鼠小胶质细胞的活化,NF- κ B 的活力及 NF- κ B p65 的表达,显著下调 BV-2 上清液中的 IL-6、TNF- α 蛋白和 BV-2 中 IL-6-mRNA、TNF- α -mRNA 的表达^[6,7]。

黄连作为该复方的组成药物之一,其主要有效成分小檗碱在脑缺血、阿尔茨海默病、帕金森病、多发性硬化、糖尿病认知功能障碍等多种中枢神经损伤性疾病中均能起到一定的神经保护作用^[13]。因此,本实验选用中药黄连的有效成分小檗碱作为研究药物。综合小檗碱对小胶质细胞活化的抑制作用及其对炎症因子 pNF- κ B p65 蛋白的下调作用,参考文献[14~16],本研究最终采用了 10 μ mol/L 的作用浓度。

本实验研究结果显示小檗碱对 AGEs 导致的细胞上清液中 TNF- α 的升高无明显降低作用,这与于希忠等^[17]和 Lu 等^[18]所报道的小檗碱能抑制炎症反应、降低 TNF- α 含量的研究结果不一致,推测实验结果不一致的原因可能为小檗碱预处理时间不足或者更换培养基的过程使得细胞上清液中能降低 TNF- α 的有效成分流失有关。Western blot 法检测结果显示,小檗碱可以显著下调 AGEs 培养的小胶质细胞 CD68 和 pNF- κ B p65 蛋白的表达,说明小檗碱可以抑制 300 μ g/ml AGEs 培养条件下小鼠小胶质细胞的活化,其原因可能与其调控 NF- κ B 相关信号通路有关。

本研究结果提示小檗碱可以通过抑制 AGEs 诱导的小鼠小胶质细胞的活化发挥神经保护作用,但具体机制尚待进一步实验明确,希望能为探讨小檗碱作为糖尿病认知功能障碍的防治药物的可能机制及潜在靶点提供参考。

参考文献

- Marioni RE, Strachan MW, Reynolds RM, *et al.* Association between raised inflammatory markers and cognitive decline in elderly people with type 2 diabetes: the Edinburgh Type 2 Diabetes Study[J]. *Diabetes*, 2010,59(3):710-713
- Sima AA, Zhang W, Kreipke CW, *et al.* Inflammation in diabetic encephalopathy is prevented by C-peptide[J]. *Rev Diabet Stud*, 2009,6(1):37-42
- Marsland AL, Gianaros PJ, Kuan DCH, *et al.* Brain morphology links systemic inflammation to cognitive function in midlife adults[J]. *Brain Behav Immun*, 2015,48(6):195-204
- Wetzels S, Wouters K, Schalkwijk CG, *et al.* Methylglyoxal-derived advanced glycation endproducts in multiple sclerosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2017,18(2):E421
- Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. The RAGE axis: a fundamental mechanism signaling danger to the vulnerable vasculature[J]. *Circ Res*, 2010,106(5):842-853
- 宋登华, 孙家忠, 王进. 晚期糖基化终末产物在 2 型糖尿病认知功能障碍患者血清中的表达及临床意义[J]. *现代医学*, 2016,44(10):1461-1463
- 高霞, 张红霞, 高聆, 等. 2 型糖尿病患者轻度认知功能障碍和血清 AGEs 水平的关系[J]. *山东大学学报:医学版*, 2009,47(9):11-13
- Takeuchi M, Yamagishi S. Possible involvement of advanced glycation end-products (AGEs) in the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. *Curr Pharm Des*, 2008,14(10):973-978
- Chen C, Li X H, Tu Y, *et al.* Abeta-AGE aggravates cognitive deficit in rats via RAGE pathway[J]. *Neuroscience*, 2014,257(2):1-10
- Valente T, Gella A, Fernández-Busquets X, *et al.* Immunohistochemical analysis of human brain suggests pathological synergism of Alzheimer's disease and diabetes mellitus[J]. *Neuro biol Dis*, 2010,37(1):67-76
- 崔雅忠, 景光婵, 张孟仁, 等. 脑复聪对脂多糖激活的小胶质细胞合成环氧化酶-2 和分泌前列腺素 E₂ 作用的实验研究[J]. *医学研究杂志*, 2013,42(7):101-104
- Jing GC, Zhang MR, Ji C, *et al.* Effect of Chinese herbal compound Naofucong on the inflammatory process induced by high glucose in BV-2 cells[J]. *Chin J Integr Med*, 2016, 22(11):p832-839
- 万瑾舒, 张孟仁. 小檗碱的神经保护作用? 用及其相关机制的研究进展[J]. *医学研究杂志*, 2018,47(6):197-200
- Jia L, Liu J, Song Z, *et al.* Berberine suppresses amyloid-beta-induced inflammatory response in microglia by inhibiting nuclear factor-kappaB and mitogen-activated protein kinase signalling pathways[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64(10):1510-1521
- Liu YQ, Cheng MC, Wang LX, *et al.* Rhizoma coptidis and berberine-induced activation of murine microglia N9 cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010,129(1):121-126
- Liu YM, Niu L, Wang LL, *et al.* Berberine attenuates depressive-like behaviors by suppressing neuro-inflammation in stressed mice[J]. *Brain Res Bull*, 2017, 134(7):220-227
- 于希忠, 刘佳, 程罗根, 等. 小檗碱对 3T3-L1 脂肪细胞炎症因子分泌和炎症信号通路的影响[J]. *南京中医药大学学报*, 2010,26(3):217-219
- Lu DY, Tang CH, Chen YH, *et al.* Berberine suppresses neuroinflammatory responses through AMP-activated protein kinase activation in BV-2 microglia[J]. *J Cell Biochem*, 2010,110(3):697-705

(收稿日期:2019-05-21)

(修回日期:2019-07-11)