

知母皂苷元对脂多糖诱导的 BV2 小胶质细胞亚型 M1/M2 的极化及其抗炎活性

杨志友, 胡雪琼

(广东海洋大学食品科技学院, 广东湛江 524088)

摘要: 本研究探讨了知母皂苷元 (SAR) 对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 BV2 小胶质细胞 M1 向 M2 亚型的极化及其抗炎作用机制。采用 MTT 法评价 SAR 对小胶质细胞存活率的影响; Griess 法检测 NO 释放水平; ELISA 法检测细胞上清中 TNF α 、IL1 β 、IL6 和 IL10 的表达; 免疫细胞化学法检测原代小胶质细胞 M1 和 M2 亚型, 检测 p-p65 (磷酸化核转录因子亚基 65)、p-p38 (磷酸化促分裂素原活化蛋白激酶 38) 和 PPAR γ 在小胶质细胞中的表达。SAR 0.01~1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时对正常状态和 LPS 100 ng/mL 诱导的炎症状态下 BV2 小胶质细胞存活率无显著影响, 10 和 25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时表现出一定的细胞毒性; 与正常组相比, LPS 组 NO 释放量增加了 22.64%, TNF α 、IL1 β 和 IL6 的表达量上调了 25.5%、13.28% 和 48.21%, 而 IL10 的表达量下调了 14.97%, Cox2 阳性和 Ym1/2 阴性表达的 M1 亚型小胶质细胞显著增加, p38 和 p65 的磷酸化水平分别是正常组的 2.80 倍和 1.86 倍, PPAR γ 的表达量降低了 73.90%; 与 LPS 模型组比较, SAR 在 0.1 和 1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时能抑制 NO 的释放和炎症因子 TNF α 、IL1 β 、IL6 的分泌; 0.1 和 1 $\mu\text{mol/L}$ SAR 促进小胶质细胞向 M2 亚型极化, 显著降低 p38 和 p65 的磷酸化水平并上调 PPAR γ 的表达。知母皂苷元的抗炎作用机制为通过激活 PPAR γ 而抑制 p65 和 p38 的磷酸化, 促进小胶质细胞由 M1 向 M2 亚型极化, 减少炎症因子的表达和炎症效应分子 NO 的释放。

关键词: 知母皂苷元; 小胶质细胞; M1/M2 极化; 脂多糖; PPAR γ

文章编号: 1673-9078(2020)11-1-8

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.11.0406

Effect of Sarsasapogenin on Lipopolysaccharide-induced BV2 Microglial Subtype M1/M2 Polarization and Sarsasapogenin's Anti-inflammatory Activity

YANG Zhi-you, HU Xue-qiong

(College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: In this study, the effect of sarsasapogenin (SAR) on the polarization of BV2 microglia from M1 to M2 subtypes induced by lipopolysaccharide as well as the mechanism underlying SAR's anti-inflammatory activity were investigated. The MTT method was used to evaluate the effect of SAR on the cell viability of microglia. The release of NO was measured by the Griess method. The expressions of TNF α , IL1 β , IL6, and IL10 in the cell culture supernatants were measured by the ELISA. The immunocytochemistry method was used to detect the primary microglia M1 and M2 phenotypes, and the expression levels of p65, p38 and PPAR γ in microglia. The results showed that SAR (0.01~1 $\mu\text{mol/L}$) had no effect on the cell viability of BV2 microglia under normal conditions and in LPS (100 ng/mL)-induced inflammatory state, however, high doses of SAR (10 and 25 $\mu\text{mol/L}$) showed certain cytotoxic effects. Compared with the normal group, LPS-treated model group exhibited an increased level of released NO (by 22.64%), upregulated expressions of TNF α , IL1 β and IL6 (by 25.5%, 13.28%, and 48.21%,

引文格式:

杨志友, 胡雪琼. 知母皂苷元对脂多糖诱导的 BV₂ 小胶质细胞亚型 M1/M2 的极化及其抗炎活性[J]. 现代食品科技, 2020, 36(11): 1-8

YANG Zhi-you, HU Xue-qiong. Effect of sarsasapogenin on lipopolysaccharide-induced BV₂ microglial subtype M1/M2 polarization and sarsasapogenin's anti-inflammatory activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(11): 1-8

收稿日期: 2020-04-30

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (2020A1515010779); 国家自然科学基金青年基金项目 (81803753)

作者简介: 杨志友 (1989-), 男, 博士研究生, 讲师, 研究方向: 神经退行性疾病创新药物研发及其作用机制

通讯作者: 胡雪琼 (1970-), 女, 高级实验师, 研究方向: 神经药理学

respectively), downregulated expression of IL10 (by 14.97%), and significantly increased levels of Cox2 positive and Ym1/2 negative expressed M1 microglia. Furthermore, the phosphorylation levels of p38 and p65 were 2.80 times and 1.86 times, respectively, that of the normal group, while the expression of PPAR γ decreased by 73.90% in the LPS-treated group. Compared with the LPS model group, the treatment with SAR (0.1 and 1 μ mol/L) inhibited the release of NO and secretion of TNF α , IL1 β and IL6, and promoted LPS-induced polarization of microglia to M2 phenotype, decreased significantly the phosphorylation of p38 and p65, and up-regulated the PPAR γ expression. The mechanisms underlying SAR's anti-inflammatory function were attributed to the inhibition of the phosphorylation of p65 and p38 via the activation of PPAR γ , promotion of the polarization of microglia from M1 to M2 subtype, and reduction of the expression of inflammatory cytokines and release of NO.

Key words: sarsasapogenin; microglia; M1/M2 polarization; LPS; PPAR γ

炎症反应在神经退行性疾病的发生和发展过程中起着重要的促进作用,如阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)、帕金森病(Parkinson's disease)和肌萎缩侧索硬化病(Amyotrophic lateral sclerosis)等^[1]。小胶质细胞是中枢神经系统最主要的免疫细胞,行使脑微环境监测和炎症调节的作用^[2]。小胶质细胞可以分为 M1 和 M2 两种亚型, M1 具有分泌炎症因子引起神经细胞炎症并促进神经细胞死亡的作用,而 M2 具有抗炎、清除 A β 并改善记忆的功能^[3,4]。研究发现神经退行性疾病患者脑中存在 M1 型小胶质细胞过度激活的现象,导致脑脊液中炎症因子和氧化自由基的表达水平显著升高,加速神经细胞的死亡^[5]。最近的一些研究也证实了如脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)、炎症相关因子(interleukin (IL)-1 β 、tumor necrosis factor (TNF)- α)及 A β 均可以激活 M1 型小胶质细胞,引起神经细胞的死亡^[6]。

百合科植物知母(*Anemarrhena asphodeloides* Bge.)是一种常用于保健食品的传统中药,其主要成分知母皂苷及知母皂苷元(Sarsasapogenin, SAR)具有广泛的药理学活性,如抗衰老、抗抑郁及对脑缺血-再灌注损伤的保护作用等^[7]。研究表明知母皂苷 AIII 具有显著抑制三硝基苯磺酸诱导的小鼠急性肠道损伤和 LPS 诱导的腹腔巨噬细胞 IL1 β 、TNF α 和 IL6 的释放,其作用机制可能是通过抑制 TLR4-NF- κ B/MAPK 信号通路实现的^[8];知母皂苷元衍生物 AA13 具有显著的抑制二甲苯致小鼠耳肿胀作用和 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞一氧化氮(NO)释放和炎症因子分泌作用^[9],此外,它还能促进胰岛素降解酶(Insulin-degrading enzyme, IDE)和脑啡肽酶(Neprilysin, NEP)的表达并清除 A β ,实现其对记忆损伤的改善作用^[10]。这些研究结果表明知母皂苷具有良好的抗炎、抗氧化和抗老年痴呆的作用。然而,知母皂苷元是否具有改善 LPS 诱导的小胶质细胞炎症的作用未见报道,其作用是否通过调节小胶质细胞的亚型以及具体的作用机制尚未明确。本研究从知母皂

苷元抗神经炎症的角度出发,探讨其对 LPS 诱导小胶质细胞炎症反应的保护作用及可能的作用机制,为其临床应用提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株

小鼠 BV2 小胶质细胞,购自中国科学院上海分院细胞库。

1.1.2 药物与试剂

知母皂苷元购自成都德思特生物技术有限公司(126-19-2);胎牛血清(Gibco, 10270-106);DMEM 高糖培养基(HyClone, SH30022.01);DMEM/F12 培养基(Gibco, 12634010);DNase I/Trypsine 抑制剂(Gibco, 17075-011);LPS (Sigma, L2654);Griess 试剂盒(Promega, G2930);0.25% Trypsin-EDTA (Gibco, 25200-072);MTT (Sigma, M2003);IL6、TNF α 、IL1 β 、IL10 ELISA 试剂盒(dogesce, 北京);Cox2 (Santa Cruz, sc-514489);Ym1/2 (Abcam, ab192029);p-p65 (Santa Cruz, sc-166748);p-p38 (Santa Cruz, sc-166182);PPAR γ (Santa Cruz, sc-7273);Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (Abcam, ab150077);Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-mouse IgG (Abcam, ab150116)。

1.1.3 主要仪器

SW-CJ-2FD 超净工作台,上海博讯实业公司医疗设备厂;二氧化碳 CO₂ 恒温培养箱,美国 Crystal;IX73 倒置荧光显微镜,日本 OLYMPUS;Elx800 酶标仪,美国 Bio-tek;H1850R 离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;移液枪,德国 Eppendorf;Countstar 细胞计数仪,ALIT Life Science;电子分析天平,苏黎世 Mettler toledo。

1.2 方法

1.2.1 原代小胶质细胞及 BV2 细胞培养

从大脑皮层中分离并培养原代小胶质细胞的方法参照之前发表的文章^[1], 简言之, 取新生小鼠 (P2-4, ICR) 大脑皮层、去掉硬膜、剪碎, 加 0.25% 的 Trypsin-EDTA 于 37 °C 消化 30 min, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基终止消化, 然后加入 600 U/mL DNase I 和 0.3 mg/mL 的 Trypsine 抑制剂, 37 °C 孵育 15 min, 加入含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基后, 离心 (1000 r/min, 3 min) 去上清, 将细胞重悬于含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基中, 从底部加入 15% 的牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA), 离心 (2000 r/min, 6 min), 细胞培养于直径 10 cm 培养皿中, 约 14 d 后, 使用中度胰酶消化法从混合胶质细胞中分离出小胶质细胞。将细胞按 $2.17 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种于 8-孔板中。

BV2 细胞培养采用 DMEM 完全培养基 (含 10% FBS, 100 U/L 青霉素和 100 $\mu\text{g/L}$ 链霉素) 于 37 °C, 5% CO_2 的饱和湿度培养箱中培养, 待细胞贴壁生长至 90% 左右时继续传代培养。用常温不含血清的 DMEM 培养基清洗细胞 1 次, 再加入 0.25% 的 Trypsin-EDTA 进行消化, 显微镜下观察待细胞变圆可加入含血清培养基终止消化, 离心 (1000 r/min, 5 min)、重悬、计数, 取对数生长期的 BV2 细胞进行传代培养或接种于培养板进行后续实验。

1.2.2 知母皂苷元对 BV2 细胞的增殖作用

取 BV2 细胞按 $2 \times 10^4/\text{mL}$ 的密度接种于 96 孔板 (每组 5 个复孔) 中, 每孔 100 μL , 培养 12 h。实验设置空白对照组、LPS (100 ng/mL) 诱导的炎症模型组、不同浓度知母皂苷元 (0.01、0.1、1、10、25 $\mu\text{mol/L}$) 处理组, 分别孵育 12 h 后, 加入空白试剂或 LPS 培养 24 h, 每孔加入 10 μL MTT (5 mg/mL), 37 °C 培养 3~4 h, 弃去上清, 加入 150 μL 每孔的二甲基亚砜 (DMSO) 溶液, 室温下避光振荡 10~15 min, 于 570 nm 处检测吸光度值。

1.2.3 BV2 细胞上清中 NO 的检测

取 BV2 细胞按 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种于 96 孔板 (每组 5 个复孔) 中, 每孔 100 μL , 培养 12 h。加入不同浓度的知母皂苷元 (0.01、0.1、1 $\mu\text{mol/L}$) 预保护 12 h, 然后加入 LPS (100 ng/mL) 刺激 24 h。收集上清按 Griess 法测定 NO 的含量, 用酶标仪在 540 nm 处测定吸光度。

1.2.4 ELISA 法测定 BV2 细胞上清中 TNF- α , IL-6, IL-1 β 和 IL-10 的含量

取 BV2 细胞按 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种于 96 孔板 (每组 5 个复孔) 中, 每孔 100 μL , 培养 12 h。加入

不同浓度的知母皂苷元 (0.1、1 $\mu\text{mol/L}$) 预保护 12 h, 然后加入 LPS (100 ng/mL) 刺激 24 h。收集上清, 分别用 TNF α 、IL-6、IL-1 β 和 IL-10 酶联免疫 (ELISA) 试剂盒测定上清中炎症因子的含量。

1.2.5 免疫荧光检测原代小胶质细胞 M1 和 M2 亚型

取大脑皮层原代小胶质细胞按 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 的密度接种于 8 孔板中, 每孔 300 μL , 培养 2 h。加入知母皂苷元 (0.1、1 $\mu\text{mol/L}$) 预保护 2 h, 然后加入 LPS (100 ng/mL) 刺激 24 h。细胞用 4% 的多聚甲醛固定 60 min, 用含 5% 山羊血清的 0.3% Triton-X-PBS 封闭 30 min。加入一抗 Cox2 (1:100, M1 小胶质细胞标记物) 和 Ym1/2 (1:200, M2 小胶质细胞标记物), 4 °C 过夜孵育。Alexa Fluor 488 山羊抗兔和 Alexa Fluor 594 山羊抗鼠 (1:300) 作为二次抗体, DAPI (1 ng/mL) 用于细胞核的染色。最后用抗荧光猝灭剂封片, 实验重复三次, 每孔随机选择 10 个不同的区域用荧光显微镜观察拍照。

1.2.6 免疫荧光检测 BV2 小胶质细胞 p-p65、p-p38 和 PPAR γ 的表达水平

取 BV2 细胞按 $2 \times 10^4/\text{mL}$ 的密度接种于 48 孔板中, 每孔 300 μL , 培养 12 h。加入知母皂苷元 (0.1、1 $\mu\text{mol/L}$) 预保护 12 h, 然后加入 LPS (100 ng/mL) 刺激 1 h (p-p65、p-p38) 和 24 h (PPAR γ)。细胞固定和封闭后, 加入一抗 p-p65 (1:100)、p-p38 (1:100) 或 PPAR γ (1:200) 和二抗 Alexa Fluor 594 山羊抗鼠 (1:300), DAPI (1 ng/mL) 用于细胞核的染色。实验重复三次, 每孔随机选择 10 个不同的区域用荧光显微镜观察拍照。

1.2.7 数据统计分析

采用 GraphPad Prism 5 对数据进行作图和统计学分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差 (one-way ANOVA) 分析组间差异, $p < 0.05$ 被认为具有显著的统计学差异。

2 结果与讨论

2.1 知母皂苷元对 BV2 小胶质细胞存活率的影响

知母皂苷元 (0.01~1 $\mu\text{mol/L}$) 对 BV2 细胞存活率无明显影响, 存活率在 100% 左右。知母皂苷元 10 和 25 $\mu\text{mol/L}$ 能显著降低正常培养组 BV2 细胞存活率至 73.28% 和 74.05%, 使 LPS 处理组 BV2 细胞存活率降低至 83.23% 和 74.89%。因为高浓度知母皂苷元对细

胞有一定的毒性,因此选择 $\leq 1 \mu\text{mol/L}$ 的知母皂苷元进行后续实验。结果如图1所示。

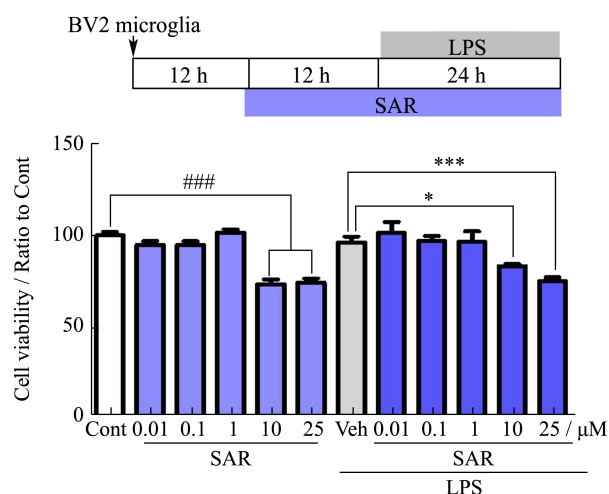


图1 知母皂苷元对BV2小胶质细胞存活率的影响

Fig.1 Effects of Sarsapogenin (SAR) on BV2 cell viability (n=3)

注: ### $p < 0.001$ vs control (Cont); * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs LPS group.

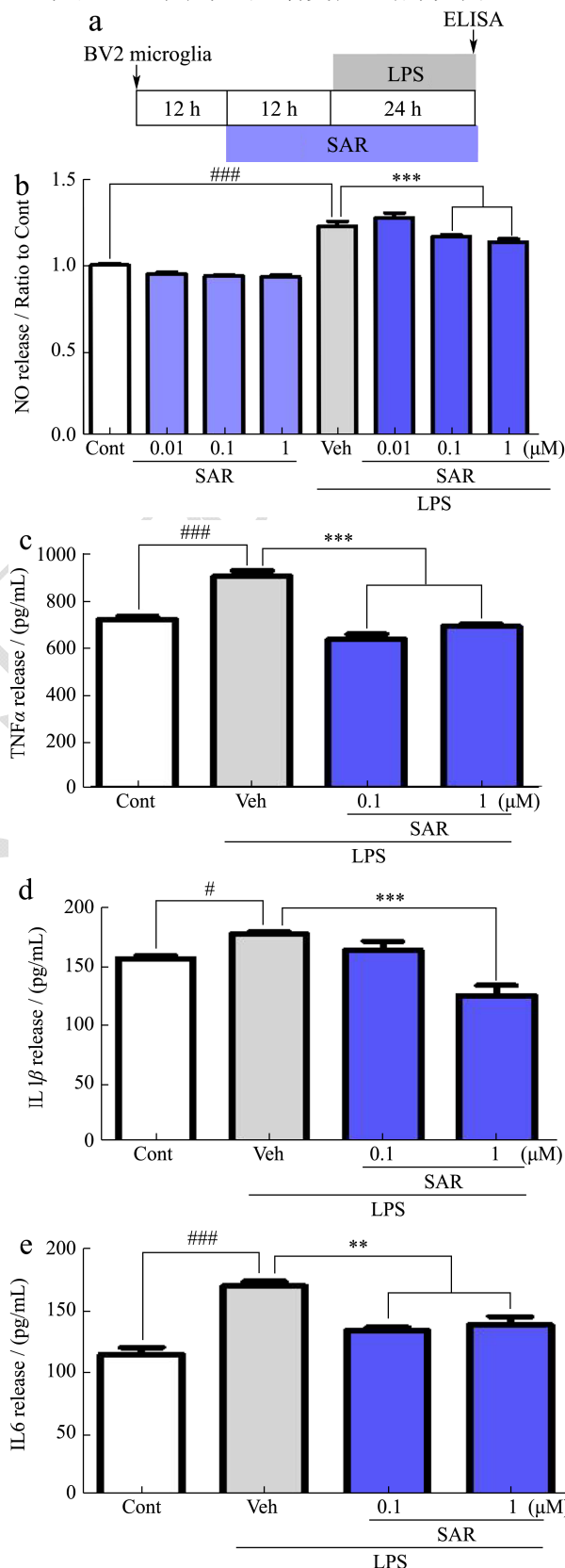
2.2 知母皂苷元对LPS诱导的BV2细胞炎症

因子和NO释放的影响

NO是一种非常重要的调节人体功能的气体递质,具有抑制血栓形成、促进血液流动并介导细胞免疫和炎症反应的作用^[12]。巨噬细胞被LPS、炎症因子等激活后,会诱导iNOS基因的过度表达,精氨酸在iNOS的催化作用下产生大量的瓜氨酸和NO^[3]。NO在高浓度状态下激活NF- κ B,诱导促炎细胞因子TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的表达,进而导致细胞死亡^[13]。在本实验中,与正常组相比较,LPS组NO的释放量增加了22.64%;与LPS模型组相比较,0.1和1 $\mu\text{mol/L}$ 知母皂苷元预处理12 h能够显著降低NO的释放量,分别降低了6.20%和9.17%。结果见图2a和b。

小胶质细胞被激活后可以分为M1和M2亚型,其中M2型小胶质细胞会释放抗炎因子(如IL-4、IL-10、IL-13等),吞噬杂质碎片、促进组织修复和神经元的再生;当小胶质细胞被过度激活后会转化为M1亚型,释放大量的神经炎症因子,如IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等,这些炎症因子会导致神经元的凋亡,促进神经退行性疾病的发展^[14]。在本次实验中,与正常组相比,LPS组TNF- α 、IL-1 β 、IL-6分别上升了25.50%、13.28%和48.21%,0.1和1 $\mu\text{mol/L}$ 知母皂苷元预处理12 h,LPS再刺激24 h后,TNF- α 、IL-1 β 、IL-6能够

显著降低,其中1 $\mu\text{mol/L}$ 知母皂苷元组分别降低了23.54%、29.39%和18.39%,结果如图2c~e。LPS组与正常组相比,IL-10的表达量下降了14.97%,知母皂苷元处理组未表现出显著变化,结果如图2f。



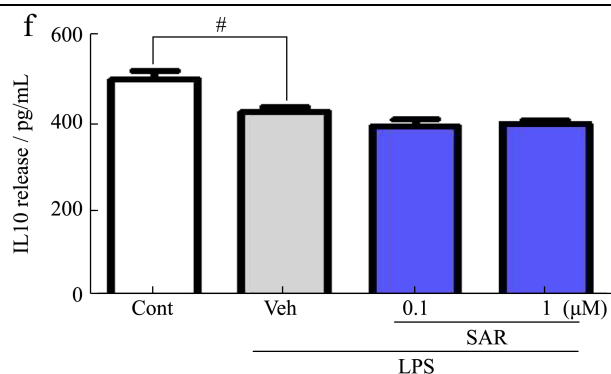


图2 知母皂苷元对LPS诱导的BV2细胞TNF α 、IL1 β 、IL6、IL10和NO释放的影响

Fig.2 Effects of Sarsasapogenin (SAR) on LPS-induced release of TNF α , IL1 β , IL6, IL10 and NO (n=3)

注: # $p<0.05$, ### $p<0.001$ vs control (Cont); ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs LPS group.

2.3 知母皂苷元促进LPS诱导的原代小胶质

细胞M1亚型向M2亚型极化

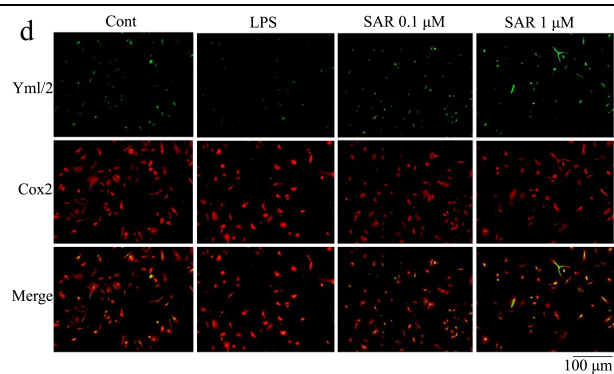
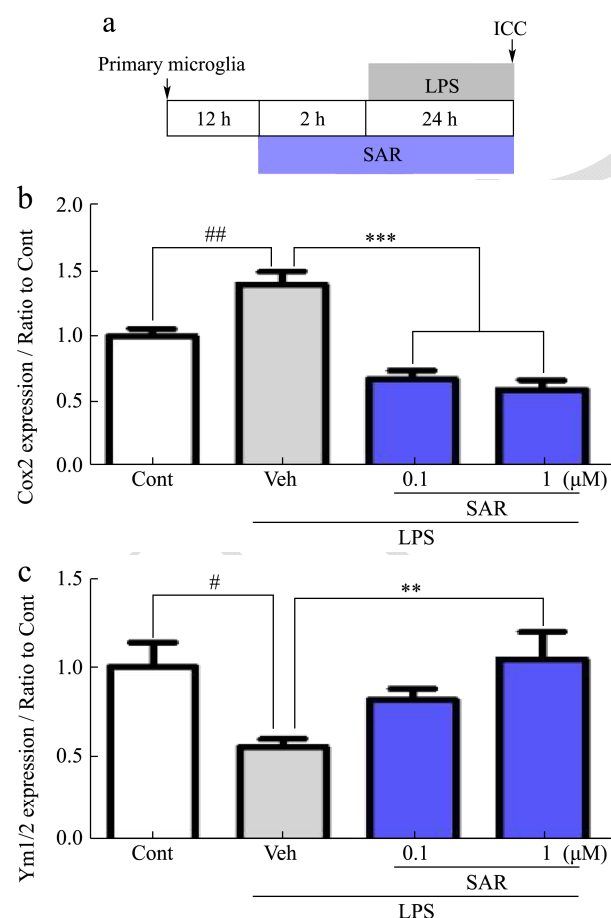


图3 知母皂苷元促进LPS诱导的原代小胶质细胞M1亚型向M2亚型极化

Fig.3 Sarsasapogenin (SAR) promotes LPS-induced M1 phenotype to M2 microglia polarization

注: # $p<0.05$, ## $p<0.01$ vs control (Cont); ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs LPS group.

LPS激活并诱导小胶质细胞向M1亚型转变,释放炎症因子,导致神经元的凋亡;相反M2亚型小胶质细胞能够分泌抗炎因子和神经营养因子,对神经元具有营养和再生的作用^[6]。因此,本实验评价了知母皂苷元是否能够促进小胶质细胞M1向M2亚型极化。研究发现Yml/2、Arginase I、CD206和Fizz1是M2亚型标记物,而iNOS、Cox2、TNF α 、CD16/32是M1亚型的标记物。在本实验中,与正常组相比,LPS处理能够显著上调原代小胶质细胞中Cox2的表达(1.40倍)并下调Yml/2的表达(0.46倍);知母皂苷元预处理2h,LPS再刺激24h后,Cox2的表达显著降低而Yml/2的表达显著上升,其中1 μ mol/L知母皂苷元组Cox2的表达显著降低了57.14%,而Yml/2的表达上升了94.44%(图3)。

2.4 知母皂苷元对p38、p65磷酸化和PPAR γ

表达的影响

NF- κ B是一种重要的核转录因子,它的激活会导致活性氧和细胞炎症因子的产生。正常状态下,NF- κ B与I κ B以复合物的形式存在于细胞质中,LPS刺激加速NF- κ B p65的磷酸化,使之与I κ B解离,转移至细胞核与核转录因子CBP/p300或HDAC-1结合,促进炎症基因的转录和炎症因子的表达^[15]。有研究表明NF- κ B的核转移与MAPK p38的磷酸化密切相关^[16]。因此,抑制p38和p65的磷酸化将有助于抑制炎症反

应。本研究发现, LPS 能够显著增加 p38 和 p65 的磷酸化水平, 分别达到空白对照组的 2.80 和 1.86 倍; 知母皂苷元预处理 12 h 后, p38 和 p65 的磷酸化水平显著降低, 其中 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 知母皂苷元组使 p38 和 p65 的磷酸化水平降至 50.71% 和 57.53%, 1 $\mu\text{mol/L}$ 知母皂苷元组使 p38 和 p65 的磷酸化水平降至 43.57% 和 41.94%, 结果如图 4。

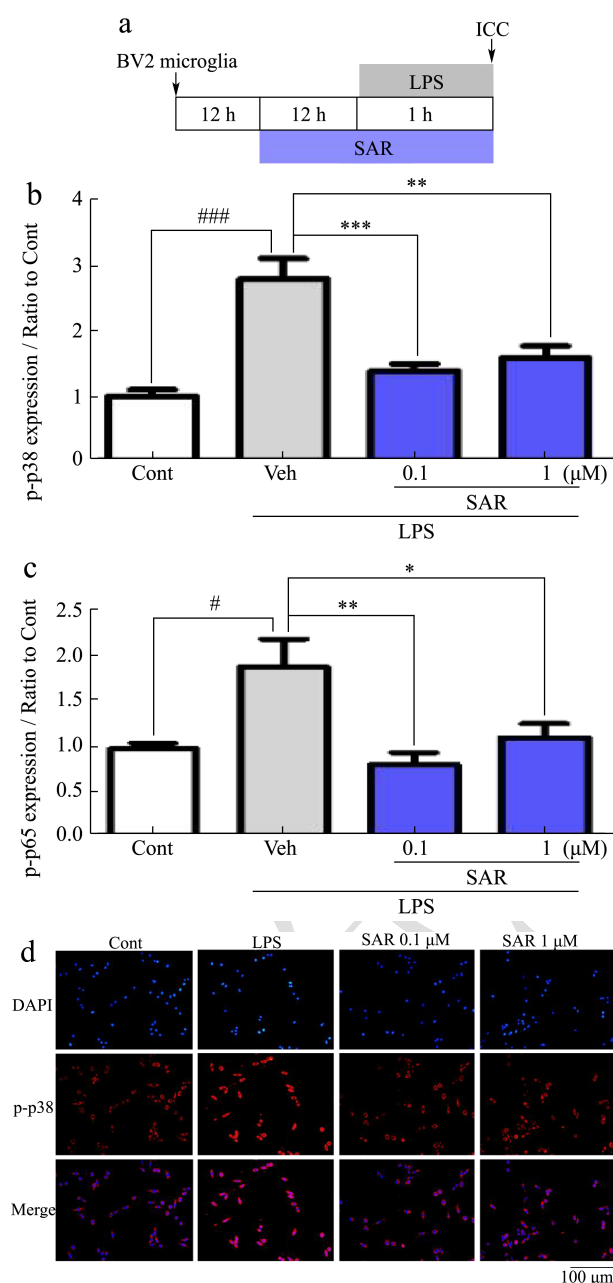


图4 知母皂苷元对LPS诱导的NF- κ B p65和MAPK p38磷酸化的影响

Fig.4 Effects of Sarsasapogenin (SAR) on LPS-induced phosphorylation of NF- κ B p65 and MAPK p38

注: # $p<0.05$, ### $p<0.001$ vs control (Cont); * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs LPS group.

PPAR γ 是核激素受体家族中的配体激活受体, 在

配体的激活作用下, 与视黄醇类 X 受体(RXR)形成异二聚体, 与靶基因启动子上游的PPAR反应元件(PPRE)结合, 最终调节靶基因的转录^[17]。PPAR γ 激动剂能够抑制阿尔茨海默病模型鼠大脑炎症反应和神经元凋亡, 同时还能够促进抗炎因子如 IL-10、IL-4 和 IL-13 的表达^[18]。有研究发现 PPAR γ 激动剂通过抑制 p38 的磷酸化和 p65 的核转移起到抑制小胶质细胞 M1 亚型极化的作用, 并且促进小胶质细胞向 M2 亚型极化^[17,19]。由图 5 可知, 与空白组相比, LPS 刺激能够使 PPAR γ 的表达降低 73.90%, 而 0.1 和 1 $\mu\text{mol/L}$ 知母皂苷元能够显著增加 PPAR γ 的表达, 与 LPS 组相比, 分别增加 161.54% 和 196.15%。

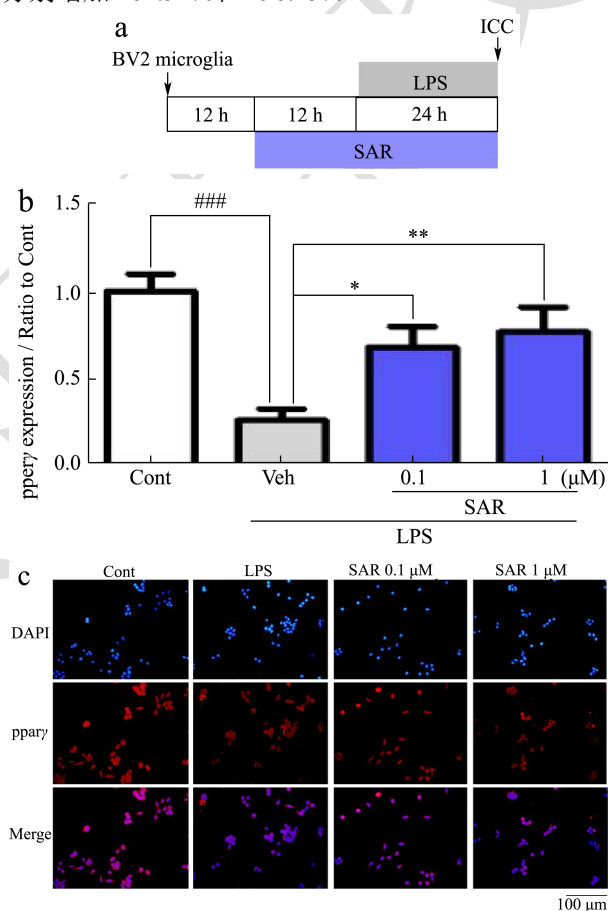


图5 知母皂苷元对LPS诱导的PPAR γ 表达的影响

Fig.5 Effect of Sarsasapogenin (SAR) on LPS-induced expression of PPAR γ

注: ### $p<0.001$ vs control (Cont); * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs LPS group.

知母是种常用的苦寒清热传统中药, 主要活性成分是知母皂苷, 研究显示知母皂苷元的衍生物知母皂苷元 AA13 具抑制 LPS 诱导的巨噬细胞株 RAW264.7 释放 NO、TNF- α 和 PGE₂ 的作用, 且能抑制 LPS 诱导的 p38 和 JNK 的磷酸化, 并抑制核转录因子 NF- κ B 的核转移^[9]。知母皂苷 AIII 在体内胃肠道菌群的作用

下可以代谢为知母皂苷元,因此,知母皂苷元可能是药物起作用的显效形式^[8]。该研究还发现知母皂苷元能够抑制 LPS 诱导的腹腔巨噬细胞炎症因子如 IL6、TNF α 、IL1 β 的表达,其作用机制可能是通过抑制 p65 和 p38 磷酸化信号通路实现的^[8]。本研究首次阐明了知母皂苷元在小胶质细胞中的抗炎作用,并发现其抗炎作用是通过激活 PPAR γ 促进小胶质细胞 M1 亚型向 M2 亚型转变,因此抑制了 M1 亚型中 NF- κ B p65 和 MAPK p38 磷酸化通路而起到抗炎作用。

许多学者认为,抑制大脑小胶质细胞激活引起的炎症反应是神经退行性疾病的一种治疗方案,研究也发现一些中药提取物及单体具有显著的抗炎活性,如竹节参总提物能够抑制小胶质细胞的炎症反应,其主要机制为抑制了 NF- κ B 的核转移^[20];松果菊苷通过 mTOR/STAT3 通路抑制 LPS 诱导的肠上皮细胞炎症反应^[21];异土木香内酯通过 NF- κ B 通路抑制 LPS 诱导的腹腔巨噬细胞炎症反应^[22]。然而这些化合物能否改善神经退行性疾病,首先取决于其血脑屏障的透过性,一些大分子物质不能有效透过血脑屏障从而起不到对小胶质细胞诱发的神经炎症的抑制作用;其次,Meta 分析显示一些抗炎药物如 Cox1/2 抑制剂、PPAR γ 激活剂对于阿尔茨海默症的认知记忆改善作用并无效果,因此,仅仅通过抗炎作用可能起不到治疗神经退行性疾病的作用,而激活 M2 亚型的小胶质细胞并清除脑内有毒物质(如 A β 、 α -synuclein),避免造成再生的神经元二次损伤或许是治疗神经退行性疾病的新策略^[11]。前期的研究发现,小胶质细胞向 M2 亚型极化对阿尔茨海默症模型鼠大脑中 A β 的清除起着至关重要的作用,其可能的作用机制是通过增加 M2 亚型中 IDE 和 NEP 的表达^[11]。在本研究中,我们发现知母皂苷元能够促进 M1 向 M2 小胶质细胞极化并抑制炎症因子的表达。有研究也显示知母皂苷元 AA13 能够增加小胶质细胞和星形胶质细胞中 IDE 和 NEP 的表达并促进其对 A β 的吞噬作用^[10],这些发现提示知母皂苷元具有潜在的抗神经退行性疾病的价值。然而,高剂量的知母皂苷元对细胞有一定的毒性作用,其在体内是否具有毒性作用尚需进一步的研究。

3 结论

综上所述,知母皂苷元能够抑制小胶质细胞的炎症反应,其作用机制为激活并增加 PPAR γ 的表达,从而促进小胶质细胞由 M1 向 M2 亚型极化,进一步抑制 NF- κ B p65 和 MAPK p38 的磷酸化,减少促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的分泌和炎症效应分子 NO 的释放。

参考文献

- [1] Stephenson Jodie, Nutma Erik, van der Valk Paul, et al. Inflammation in CNS neurodegenerative diseases [J]. Immunology, 2018, 154(2): 204-219
- [2] Wolf Susanne A, Boddeke H W G M, Kettenmann Helmut. Microglia in physiology and disease [J]. Annu Rev Physiol, 2017, 79: 619-643
- [3] TANG Yu, LE Wei-dong. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases [J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(2): 1181-1194
- [4] YANG Zhi-you, LIU Bai-ping, YANG Long-en, et al. Platycodigenin as potential drug candidate for Alzheimer's disease via modulating microglial polarization and neurite regeneration [J]. Molecules, 2019, 24(18): 3207
- [5] Walker Douglas G, Lue Lih-Fen. Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains [J]. Alzheimers Res Ther, 2015, 7(1): 56
- [6] HU Xiao-ming, Leak Rehana K, SHI Ye-jie, et al. Microglial and macrophage polarization-new prospects for brain repair [J]. Nat Rev Neurol, 2015, 11(1): 56-64
- [7] 张治强,李霞,孙连娜.知母皂苷及其苷元在中枢神经系统的药理作用[J].医药导报,2009,28(1):1318-1321
ZHANG Zhi-qiang, LI Xia, SUN Lian-na. Pharmacological effect of Timsaponin and its aglycone in central nervous system [J]. Herald of Medicine, 2009, 28(1): 1318-1321
- [8] Lim Su-Min, Jeong Jin-Ju, Kang Geum-Dan, et al. Timosaponin AIII and its metabolite sarsasapogenin ameliorate colitis in mice by inhibiting NF- κ B and MAPK activation and restoring Th17/Treg cell balance [J]. Int Immunopharmacol, 2015, 25(2): 493-503
- [9] DONG Dong, ZHOU Nan-nan, LIU Rui-xuan, et al. Sarsasapogenin-AA13 inhibits LPS-induced inflammatory responses in macrophage cells *in vitro* and relieves dimethylbenzene-induced ear edema in mice [J]. Acta Pharmacol Sin, 2017, 38(5): 699-709
- [10] HUANG Cui, DONG Dong, JIAO Qian, et al. Sarsasapogenin-AA13 ameliorates A β -induced cognitive deficits via improving neuroglial capacity on A β clearance and antiinflammation [J]. CNS Neurosci Ther, 2017, 23(6): 498-509
- [11] YANG Zhi-you, Kuboyama Tomoharu, Tohda Chihiro. Naringenin promotes microglial M2 polarization and A β degradation enzyme expression [J]. Phytother Res, 2019,

- 33(4): 1114-1121
- [12] Ghimire Kedar, Altmann Helene M, Straub Adam C, et al. Nitric oxide: what's new to NO? [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2017, 312(3): 254-262
- [13] 范精华,刘康,刘保林.NO 在炎症及免疫应答中的调节作用[J].中外医疗, 2009,25:163-166
- FAN Jing-hua, LIU Kang, LIU Bao-lin. Regulation of NO in inflammation and immune response [J]. China Foreign Medical Treatment, 2009, 25: 163-166
- [14] 吴海歌,刘雨晴,姚子昂.小胶质细胞及相关神经退行性疾病[J].中国细胞生物学学报,2015,37(4):560-564
- WU Hai-ge, LIU Yu-qing, YAO Zi-ang. Microglia and related neurodegenerative diseases [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2015, 37(4): 560-564
- [15] ZHONG Hai-hong, J MayMichael, Jimi Eijiro, et al. Phosphorylation of NF- κ B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300 [J]. Mol Cell, 1998, 1(5): 661-671
- [16] Saha Ramendra N, Jana Malabendu, Pahan Kalipada. MAPK p38 regulates transcriptional activity of NF-kappaB in primary human astrocytes via acetylation of p65 [J]. J Immunol, 2007, 179(10): 7101-7109
- [17] Ahmadian Maryam, Suh Jae Myoung, Hah Nasun, et al. PPAR γ signaling and metabolism: The good, the bad and the future [J]. Nat Med, 2013, 19(5): 557-566
- [18] JI Huo-yan, WANG Hui-min, ZHANG Fu-peng, et al. PPAR γ agonist pioglitazone inhibits microglia inflammation by blocking p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways [J]. Inflamm Res, 2010, 59(11): 921-929
- [19] Bouhlef M Amine, Derudas Bruno, Rigamonti Elena, et al. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties [J]. Cell Metab, 2007, 6(2): 137-143
- [20] 郑杰,赵晴晴,望金欣,等.竹节参总提物对 LPS 诱导 BV2 小胶质细胞炎症反应的保护作用[J].现代食品科技,2019, 35(12):8-13
- ZHENG Jie, ZHAO Qing-qing, WANG Jin-shu, et al. The effects of total extract of panacis japonici rhizoma on LPS induced BV2 microglia inflammation [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(12): 8-13
- [21] LI Lei, WAN Guang-wen, HAN Bing, et al. Echinacoside alleviated LPS-induced cell apoptosis and inflammation in rat intestine epithelial cells by inhibiting the mTOR/STAT3 pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 104: 622-628
- [22] HE Guo-dong, ZHANG Xu, CHEN Yan-hua, et al. Isoalantolactone inhibits LPS-induced inflammation via NF- κ B inactivation in peritoneal macrophages and improves survival in sepsis [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 90: 598-607

(上接第 86 页)

- [18] 任向峰,姚婷,张萌,等.4 株水果采后链格孢属真菌的 rDNA ITS 区序列与碳源代谢指纹图谱差异性分析[J].食品科学技术学报,2018,36(1):72-78
- REN Xiang-feng, YAO Ting, ZHANG Meng, et al. Comparison of rDNA ITS sequence and carbon metabolic fingerprinting of four *Alternaria nees* isolated from fruits [J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 36(1): 72-78
- [19] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979
- WEI Jing-chao. Manual of Fungi Identification [M]. Shang Hai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1979
- [20] 张惠艳,李艳菊,顾金刚,等.基于 Biolog-FF 技术的金霉素降解真菌的碳代谢特征研究[J].微生物学通报,2015,42(7): 1241-1247
- ZHANG Hui-yan, LI Yan-ju, GU Jin-gang, et al. On carbon metabolism of fungi in chlortetracycline degradation based on Biolog-FF system. [J]. Microbiology China, 2015, 42(7): 1241-1247
- [21] 王晓晋,郭全友,姜朝军.轻微加工即食对虾优势腐败菌鉴定及碳源代谢动力学[J].中国食品学报,2019,19(5):244-252
- WANG Xiao-jin, GUO Quan-you, JIANG Chao-jun. Carbon source metabolism dynamics and identification of dominant spoilage bacteria in lightly preserved ready-to-eat shrimp [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(5): 244-252