

京尼平对脂多糖诱导小胶质细胞炎症及凋亡的作用及机制研究

阳敏燕

成都市第四人民医院, 四川 成都 610036

摘 要:目的 探讨京尼平 (genipin) 对脂多糖 (LPS) 诱导小胶质细胞 (BV-2) 炎症及凋亡反应的作用及机制。方法 采用 LPS 诱导 BV-2 小胶质细胞建立中枢神经系统炎症和凋亡反应模型。实验细胞分为 4 组: 空白对照组、京尼平组、LPS 组、LPS + 京尼平组。通过 ELISA、RT-PCR、Western Blot、细胞流式检测细胞的炎症及凋亡反应。结果 与空白对照组比较, LPS 可以诱导 BV-2 细胞上清培养基中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 释放和细胞内 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 转录的增加; 同时, LPS 还可以激活凋亡蛋白 Bax 并抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 导致细胞凋亡率的明显升高。京尼平预处理可以有效抑制小胶质细胞介导的炎症因子 (IL-6、IL-1 β 和 TNF- α) 激活, 并减少 LPS 诱导的小胶质细胞凋亡。结论 genipin 干预可对 LPS 诱导的小胶质细胞炎症及凋亡反应起到保护作用。

关键词: 小胶质细胞; 京尼平; 脂多糖; 炎症; 凋亡

中图分类号: R741.02

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2020.02.012

Protective effect and mechanism of action of genipin in lipopolysaccharide-induced inflammation and apoptosis in microglial cells

YANG Min-Yan. Department of Internal Medicine, The fourth people's hospital of Chengdu, Chengdu, Sichuan 610036, China

Corresponding author: YANG Min-Yan, Email: 33015207@qq.com

Abstract: Objective To investigate the effect of genipin on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation and apoptosis in BV-2 microglial cells and the underlying mechanism. **Methods** LPS was used to stimulate BV-2 cells to mimic inflammatory and apoptotic responses in the central nervous system. BV-2 cells were divided into four groups: blank control group, genipin group, LPS group, and LPS + genipin group. The inflammatory and apoptotic responses of the cells were determined by ELISA, RT-PCR, Western blot, and flow cytometry. **Results** Compared with the blank control group, LPS significantly increased the levels of IL-6, IL-1 β , and TNF- α in the supernatant medium and their mRNA levels in the cells. LPS also significantly upregulated the expression of the apoptosis protein Bax, but significantly inhibited the expression of the anti-apoptosis protein Bcl-2, resulting in a significantly increased cell apoptosis rate. Genipin pretreatment effectively reduced LPS-induced upregulation of the inflammatory factors (IL-6, IL-1 β , and TNF- α) and LPS-induced apoptosis of BV-2 cells. **Conclusions** Genipin can protect microglia from LPS-induced inflammation and apoptosis.

Key words: microglia; genipin; lipopolysaccharide; inflammation; apoptosis

小胶质细胞是中枢神经系统中最重要的天然固有免疫细胞^[1]。在生理状态下,小胶质细胞在神经系统具有保护、支持、营养和修复重要作用;而在病理状态下,小胶质细胞被迅速激活成 M1 和 M2 两种表型。其中, M1 表型释放促炎介质导致组织损伤; M2 表型释放抗炎介质帮助损伤组织修

复。晚期炎症持续刺激免疫细胞的活化,最终导致神经系统的不可逆损伤^[1-2]。在阿尔茨海默病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、帕金森病和多发性硬化等各种神经退行性疾病中,最显著的共同特征之一是持续激活状态下的小胶质细胞介导的神经炎症反应,而这一反应会导致或者加重神经元的退化、变

收稿日期: 2019-11-27; 修回日期: 2020-04-15

作者简介: 阳敏燕 (1985-), 女, 主治医师, 神经病学硕士, 主要从事脑血管病的研究。

性甚至死亡^[3-4]。因此,小胶质细胞介导的炎症反应在各种神经退行性疾病的病理生理过程中发挥着极其重要的作用。

京尼平 (genipin) 是茜草科植物梔子的主要活性成分,为梔子苷中提取的苷元^[5]。京尼平具有多种药理活性,包括抗炎、抗氧化应激,抗凋亡和抗血管生成等作用,被认为可用于治疗糖尿病、癌症及各种炎症相关性疾病^[6-11]。

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是常用的炎症和凋亡反应诱导剂,包括在神经、肝脏、肾脏等系统^[12]。有研究表明,京尼平可减轻脂多糖引起的小鼠记忆功能减退以及持续小胶质细胞炎性活化^[13-14]。凋亡是对神经炎症产生的重要适应性反应。因此,本研究旨在神经系统中,进一步明确京尼平对脂多糖诱导小胶质细胞炎症和凋亡的作用及其机制,为京尼平应用于神经退行性疾病临床治疗的提供更多的基础试验支持。

1 材料与方法

1.1 材料

京尼平,质量分数大于 98%,购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司;LPS 和 ELISA 检测试剂盒购于 Sigma 公司;DMEM 培养基、胎牛血清均购自 HyClone 公司;Anti-β-actin 抗体、Anti-Bax 抗体、Anti-Bcl-2 抗体均购自 Santa 公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 BV-2 小胶质细胞的培养

BV-2 小胶质细胞购自中国医学科学院基础医学研究,并使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基在 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱传代培养。

1.3 主要试剂配制

将京尼平粉末按照 10 mM 浓度于 37℃、超声波搅拌下,溶解于 DMEM 培养基中,并用 0.22 μm 微孔滤膜过滤后,置于冰盒上低温避光保存,现配现用。LPS 粉末按照 1 mg/1 ml DMEM 的浓度,70~80℃ 下涡旋振荡溶解,0.22 μm 微孔滤膜过滤后,-80℃ 避光保存。

1.4 实验分组及预处理方式

细胞分为 4 组:①对照组:完全培养基中培养 24 h;②京尼平组:用含 5~20 μmol/L 浓度京尼平的完全培养基培养 12 h 后,再置于正常完全培养基中培养 24 h;③LPS 组:置于终浓度为 1 μg/mL 的 LPS 培养基中培养 24 h;④京尼平 + LPS 组:先加入浓度 10 μmol/L 京尼平作用 12 h 后,再置于

终浓度为 1 μg/mL 的 LPS 培养基中培养 24 h。

1.5 MTT 法

小胶质细胞 BV-2 接种于 96 孔板,待细胞融合度达到 50% 左右,用不同浓度的京尼平处理细胞 12 h 后,使用移液枪加 20 μL MTT (5 μg/mL) 到每个细胞孔板中孵化 4 h,然后去掉上层清液,加入 200 μL DMSO 溶液溶解甲瓚晶体。用酶联免疫检测仪于 570 nm 波长处测定其光吸收值。

1.6 酶联免疫吸附法

根据酶联免疫吸附法 (ELISA) 试剂盒说明书方法测定各组细胞上清液中的 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 因子含量。

1.7 Western Blot

各组小胶质细胞加入 RIPA 裂解液裂解,低温高速离心机 4℃ 预冷,12 000 rpm 高速离心 10 min,用 BCA 法测定蛋白浓度,每孔以 40 μg 样品上样进行 SDS-PAGE,转膜 (PVDF 膜) 1 h,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,孵育 I 抗 (Bax、Bcl-2 浓度为 1:500~1:1 000,β-actin 浓度为 1:3 000) 4℃ 过夜,II 抗 37℃ 1 h,ECL 发光试剂进行化学显色,Fusion Imaging 软件分析蛋白表达水平。

1.8 细胞流式学检测

待细胞处理时间结束后,用 0.25% 的胰酶消化细胞约 1 min,吸取细胞悬液放入 10 mL 离心管中离心弃除上清液。再用 PBS 轻柔清洗并离心 3 次,最后用 400 μL 的冰 PBS 将细胞重悬,根据 FITC-Annexin 说明书检测细胞凋亡,用 Cell Quest Pro 软件获取各实验分组数据,用 Mod Fit 软件对数据进行分析细胞的凋亡率。

1.9 RT-PCR

采用 Trizol 法提取总 RNA,然后用 ThermoNanoDrop 2000 软件检测目的 RNA 浓度并计算 100 ng RNA 的体积量,再用逆转录酶进行逆转录,最后用 PCR 进行基因扩增。引物设计与合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Gene	Primer sequences (5'→3')
TNF-α	Forward: TCAACCTCTCTCTGCGGTCAAG
	Reverse: TCCAGGTCACTGTCCCAGCATCT
IL-1β	Forward: CACCTTCTTTTCCTTCATCTTTG
	Reverse: GTCGTTGCTTGCTTCCTTGTAAC
IL-6	Forward: GCCTTCTTGGGACTGATGCTGGT
	Reverse: GGTCTTGCTCCTTAGCCACTCCT
GADPH	Forward: ACCACAGTCCATGCCATCAC
	Reverse: TCCACCACCTGTGCTGTAG

扩增条件为:第一步 95℃ 30 s;第二步 95℃ 10 s,58℃ 31 s,72℃ 30 s 重复 40 个循环;第三步 95℃ 15 s,60℃ 30 s,95℃ 15 s;用 GAPDH 作内参,计算目的基因 mRNA 的相对表达量,通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算每个样品 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的 mRNA 表达量。

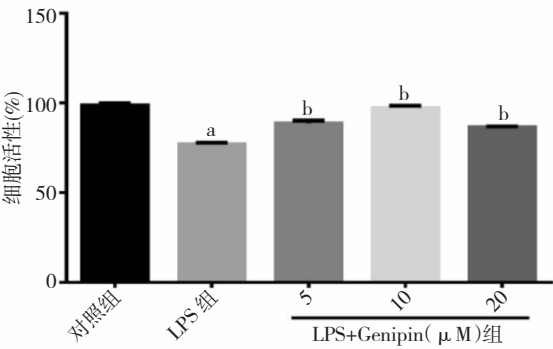
1.10 统计学分析

使用 SPSS 15.0 软件进行统计学分析。实验数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,每组实验至少重复三次,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 京尼平对 LPS 诱导的小胶质细胞毒性的抑制效应

采用 MTT 法检测京尼平对 BV-2 细胞活性的影响。结果表明 LPS 导致小胶质细胞的活性降低,而 0~10 μM 浓度范围内的京尼平以剂量依赖的方式减轻了 LPS 诱导的细胞毒性反应,但京尼平在 20 μM 浓度时对细胞毒性增加。因此,10 μM 浓度的京尼平被用于后续研究。见图 1。



注:用不同浓度(5、10、20 μM)的京尼平预处理细胞 12 h 后,再将细胞置于终浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 培养基中培养 24 h,通过 MTT 法测定细胞活力。a 为与对照组比较, $P < 0.05$; b 为与 LPS 组比较, $P < 0.05$

图 1 京尼平对 LPS 诱导的小胶质细胞毒性的抑制效应

2.2 京尼平抑制 LPS 诱导的小胶质细胞炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 释放

小胶质细胞是参与脑内炎症反应的主要免疫

细胞,因此,为了进一步了解小胶质细胞是否介导了炎症因子的释放,我们通过 ELISA 法对上清培养基中的 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 因子的释放量进行了测定。结果表明,仅用 LPS 处理 BV-2 细胞,TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的释放显著增加,而京尼平可以有效抑制 LPS 诱导的 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 产生。见表 2。

表 2 京尼平抑制 LPS 诱导的小胶质细胞炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 释放 [ng/L; ($\bar{x} \pm s$)]

组别	TNF- α	IL-1 β	IL-6
对照组	2.7 \pm 0.4	8.1 \pm 1.6	1.4 \pm 0.2
京尼平组	3.4 \pm 0.4	9.2 \pm 1.9	2.8 \pm 0.3
LPS 组	19.6 \pm 2.1 ^a	128 \pm 11.6 ^a	16.1 \pm 2.6 ^a
LPS + 京尼平组	5.7 \pm 0.4 ^b	67 \pm 8.1 ^b	4.7 \pm 1.3 ^b

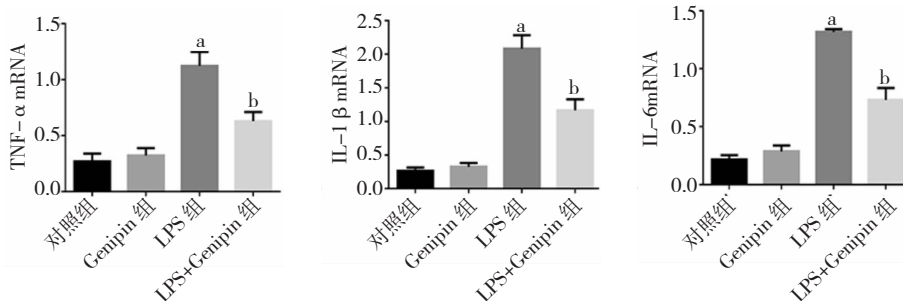
注:a 为与对照组比较, $P < 0.05$; b 为与 LPS 组比较, $P < 0.05$

2.3 京尼平抑制 LPS 诱导的小胶质细胞炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 转录

为了进一步验证京尼平对炎症因子的作用,我们测定了细胞内 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的转录水平变化。研究结果显示,BV-2 细胞在 LPS 的刺激下,细胞炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的 mRNA 表达水平显著增加。京尼平干预处理后,与 LPS 组相比,TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的 mRNA 表达水平明显降低(图 2)。这也进一步证实了,小胶质细胞作为固有免疫细胞介导了炎症因子的转录及释放,而京尼平能够有效干预这一过程。

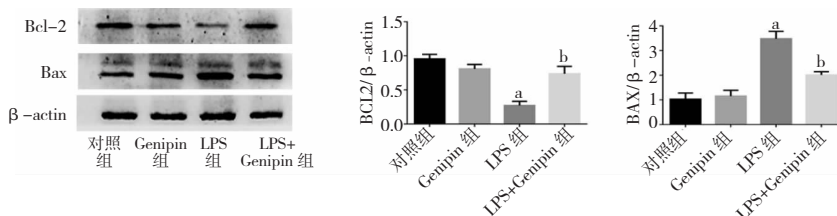
2.4 京尼平对 LPS 诱导的凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 表达水平的影响

通常,适应性增加的凋亡反应可以清除堆积的炎症因子,因此,我们测定了凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 表达水平。Western Blot 实验结果显示,在 LPS 刺激 BV-2 细胞 24 h 后,促凋亡蛋白 Bax 表达水平明显增高,而抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平明显降低(图 3)。京尼平干预处理后,可以明显抑制 LPS 诱导的 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达量的变化。这一结果初步表明,LPS 除了诱导小胶质细胞的炎症反应,还可以引起促凋亡反应,而京尼平能够有效阻断凋亡反应的产生。



注:通过 RT-PCR 测定各组细胞中,炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的 mRNA 表达量。a 为与对照组比较, $P < 0.05$; b 为与 LPS 组比较, $P < 0.05$

图 2 京尼平抑制 LPS 诱导的小胶质细胞炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 转录

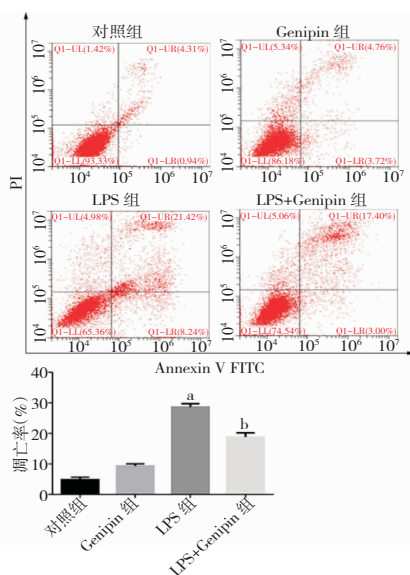


注:Western blot 检测小胶质细胞 Bax 和 Bcl-2 的表达, β -actin 作为内参。a 为与对照组比较, $P < 0.05$; b 为与 LPS 组比较, $P < 0.05$

图 3 京尼平对 LPS 诱导的凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 表达水平的影响

2.5 京尼平对 LPS 诱导的小胶质细胞凋亡率的影响

为了进一步明确 LPS 诱导的凋亡反应对小胶质细胞本身的影响,以及京尼平在该病理生理过程中作用,我们采用了流式细胞术对凋亡细胞进行分类及计数。实验结果显示(图 4),LPS 刺激 BV-2 细胞 24 h 后, BV-2 细胞凋亡率明显增加,京尼平预处理后,细胞凋亡率显著下降,该结果与上述凋亡相关蛋白测定所得出的结论一致。



注:流式细胞术被用来对凋亡细胞进行分类及计数。a 为与对照组比较, $P < 0.05$; b 为与 LPS 组比较, $P < 0.05$

图 4 京尼平对 LPS 诱导的小胶质细胞凋亡率的影响

3 讨论

在阿尔茨海默病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、帕金森病和多发性硬化等多种神经退行性疾病中,中枢神经系统慢性炎症是其重要病理特征之一^[3, 15]。大量研究表明,通常在这些神经退行性疾病的病变周围,通常能发现被活化的小胶质细胞。小胶质细胞是神经元变性和坏死的效应因子,参与坏死神经元的清除。但持续活化的小胶质细胞可释放 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 等炎症细胞因子,加速多种神经退行性疾病的疾病进展^[2-4, 16]。因此,小胶质细胞介导的炎症被认为是神经退行性疾病发生或恶化的可能机制。

有研究结果显示,京尼平具有抗炎作用,值得注意的是,已有实验证实京尼平具有中枢神经系统抗炎作用^[7, 13]。本研究表明 LPS 诱导的急性神经炎症,可导致 BV-2 细胞的炎症因子(IL-6、IL-1 β 和 TNF- α)的转录和释放增加;而京尼平预处理可以部分抑制炎症因子的激活,与既往实验结果一致。这表明,京尼平能对 LPS 刺激的 BV-2 小胶质细胞发挥抗炎作用。同时,本研究还发现, LPS 可以导致小胶质细胞的凋亡增加,通常,适应性增加的凋亡反应可以清除堆积的炎症因子。而京尼平作用后, LPS 诱导的凋亡反应减轻,我们推测这可能是京尼平减轻了炎症反应,而凋亡反应因此下调

以与炎症反应的程度相适应。这也间接证实了京尼平对炎症的调控作用。

细胞凋亡的启动主要包括外源性凋亡途径和内源性凋亡途径,其中,外源性凋亡途径主要是由死亡受体和配体的结合启动,而内源性凋亡途径主要是由于线粒体外膜的通透化导致细胞色素 c 等凋亡因子的释放,从而结合 Apaf-1 激活 caspase-9,最终导致 caspase-3 的激活触发细胞凋亡的发生。Bcl-2 家族蛋白在线粒体外膜通透化中起着重要的调节作用,例如 Bax/Bcl-2 的比例失衡可以引起细胞线粒体外膜的通透化,导致内源性凋亡途径的激活,最终导致凋亡的发生^[17-18]。本研究发现 LPS 刺激 BV-2 细胞后,可以促进促凋亡蛋白 Bax 的表达,同时减少抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达;而京尼平的干预可以有效的阻断该病理生理过程,从而减轻 LPS 刺激的 BV-2 细胞凋亡反应。

本实验结果表明,京尼平对脂多糖刺激小胶质细胞产生的炎症反应具有一定的调节作用。此外,本研究还发现,京尼平的干预可致小胶质细胞凋亡减少。结合此前的研究表明,京尼平有较好的血脑屏障透过性^[19]。所以,京尼平可能具有很好的临床应用价值。进一步阐明对京尼平在神经炎症反应中的作用及机制,以及药物安全性的相关研究,对于京尼平应用于神经退行性疾病临床治疗至关重要。

参 考 文 献

- [1] Xu L, He D, Bai Y. Microglia-Mediated Inflammation and Neurodegenerative Disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53 (10): 6709-6715.
- [2] Cheon SY, Kim EJ, Kim JM, et al. Regulation of Microglia and Macrophage Polarization via Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 Silencing after Ischemic/Hypoxic Injury [J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 14 (10): 261.
- [3] Chitnis T, Weiner HL. CNS inflammation and neurodegeneration [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127 (10): 3577-3587.
- [4] Stephenson J, Nutma E, van der Valk P, et al. Inflammation in CNS neurodegenerative diseases [J]. *Immunology*, 2018, 154 (2): 204-219.
- [5] Shanmugam MK, Shen H, Tang FR, et al. Potential role of genipin in cancer therapy [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 133 (2): 195-200.
- [6] Kim SJ, Kim JK, Lee DU, et al. Genipin protects lipopolysaccharide-induced apoptotic liver damage in D-galactosamine-sensitized mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 635 (1-3): 188-193.
- [7] Yu SX, Du CT, Chen W, et al. Genipin inhibits NLRP3 and NLRC4 inflammasome activation via autophagy suppression [J]. *Sci Rep*, 2015, 11 (5): 17935.
- [8] Mahgoub E, Kumaraswamy SM, Kader KH, et al. Genipin attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity by counteracting oxidative stress, inflammation, and apoptosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93 (3): 1083-1097.
- [9] Su J, Liu J, Yan XY, et al. Cytoprotective Effect of the UCP2-SIRT3 Signaling Pathway by Decreasing Mitochondrial Oxidative Stress on Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (7): 24.
- [10] Dutra MRH, Feliciano RDS, Jacinto KR, et al. Protective Role of UCP2 in Oxidative Stress and Apoptosis during the Silent Phase of an Experimental Model of Epilepsy Induced by Pilocarpine [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 6736721.
- [11] Pan P, Zhang H, Su L, et al. Melatonin Balance the Autophagy and Apoptosis by Regulating UCP2 in the LPS-Induced Cardiomyopathy [J]. *Molecules*, 2018, 23 (3): 16.
- [12] 周立春,樊丽超,安春华. 银杏总黄酮对脂多糖诱导的小胶质细胞炎症反应的抑制作用 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2018, 45 (5): 39-42.
- [13] Wang J, Chen L, Liang Z, et al. Genipin Inhibits LPS-Induced Inflammatory Response in BV2 Microglial Cells [J]. *Neurochem Res*, 2017, 42 (10): 2769-2776.
- [14] Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease [J]. *Cell*, 2012, 149 (2): 274-293.
- [15] Wu Y, Chen M, Jiang J. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and drug targets via apoptotic signaling [J]. *Mitochondrion*, 2019, 49 (2): 35-45.
- [16] Kawamata H, Manfredi G. Proteinopathies and OXPHOS dysfunction in neurodegenerative diseases [J]. *J Cell Biol*, 2017, 216 (12): 3917-3929.
- [17] Antonsson B. Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways [J]. *Mol Cell Biochem*, 2004, 256-257 (1-2): 141-155.
- [18] Kim DH, Jung YJ, Lee AS, et al. COMP-angiopoietin-1 decreases lipopolysaccharide-induced acute kidney injury [J]. *Kidney Int*, 2009, 76 (11): 1180-1191.
- [19] Che X, Wang M, Wang T, et al. Evaluation of the Antidepressant Activity, Hepatotoxicity and Blood Brain Barrier Permeability of Methyl Genipin [J]. *Molecules*, 2016, 21 (7): 923.