

连翘酯苷 A 通过 TLR4/NF- κ B 抑制 PC12 细胞低氧/再复氧诱导的炎症反应

马忠英 张迪 孙金卉 静任茜 武倩雯 王婧雯

摘要 目的 研究连翘酯苷 A (FA) 对缺血再灌注诱导的 PC12 细胞炎症反应的抑制作用。方法 建立 PC12 细胞氧糖剥夺/再灌注 (OGD/R) 模型, 给予不同浓度的 FA (1.25、2.5 和 5 μ mol/L) 处理, 测定炎症因子: 白细胞介素 (IL)-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和 IL-6 的水平, Western blot 测定 TLR4/NF- κ B 通路相关蛋白的表达情况, 并采用慢病毒激活颗粒进行机制验证。结果 FA 可显著抑制炎症因子释放水平, 抑制 TLR4 和 NF- κ B p65 蛋白表达水平, 同时可抑制细胞核内 NF- κ B p65 表达。分别采用 Toll 样受体 4 (TLR4) 和核转录因子 kappa B (NF- κ B) 慢病毒激活颗粒验证发现 FA 通过 TLR4 调控 NF- κ B p65 核转移, 从而抑制炎症因子释放, 减轻炎症反应。结论 FA 可通过调控 TLR4 抑制 NF- κ B p65 核转移抑制炎症因子表达, 从而减轻缺血再灌注诱导的炎症反应, 发挥脑保护作用。

关键词 连翘酯苷 A; 脑缺血再灌注损伤; Toll 样受体 4; 核转录因子 kappa B

中图分类号 R 285.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)05-0730-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.05.011

脑缺血引起的神经元坏死和活性氧释放触发炎症级联反应, 同时, 血脑屏障受损, 过量的免疫细胞进入脑组织, 与脑内固有免疫相互作用, 放大炎症反应, 加重脑损伤^[1-2]。炎症反应贯穿脑损伤的发生发展过程, 调节炎症反应, 将有可能减轻脑损伤程度^[3-4]。连翘具有清热、抗炎等功效, 连翘酯苷 A (forsythoside A, FA) 是其主要成分之一^[5]。FA 可抑制低糖低血清、谷氨酸和 A β 25-35 诱导的神经细胞损伤^[6], 此外, FA 表现出很好的抗炎效果^[7-8]。PC12 细胞是大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞, 具有典型的神经细胞特征, 广泛应用于神经疾病模型研究^[6]。该研究拟在前期基础上, 进一步研究 FA 对氧糖剥

夺/再灌注 (oxygen and glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 引起的 PC12 细胞损伤的作用, 并阐明作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品和试剂 FA (纯度 > 98%) 购自北京索莱宝科技有限公司; 细胞培养用胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS)、DMEM 培养基和胰蛋白酶购自美国 GIBICO 公司; 白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor - alpha, TNF- α) 和 IL-6 购自上海碧云天生物有限公司; Toll 样受体 4 (toll-like receptor-4, TLR4)、I- κ B、P-I- κ B、核转录因子 kappa B (nuclear factor kappa B, NF- κ B)、PCNA 和 GAPDH 抗体购自美国 Cell signaling 公司; TLR4 慢病毒激活颗粒、NF- κ B 慢病毒激活颗粒和转染试剂均购自美国 Santa Cruz 公司; 其余试剂均是分析纯。

1.1.2 仪器 低温离心机、CO₂ 培养箱、低氧小管和全波长酶标仪均购自美国 Thermo 公司; 凝胶电泳系统和化学发光系统购自美国 Bio-Rad 公司。

1.1.3 细胞 大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 PC12 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.2 细胞培养 细胞采用含 10% FBS 的 DMEM 培养基在 37 $^{\circ}$ C 的 CO₂ 培养箱中培养, 每 2 d 换液 1 次。细胞融合至 90% 左右时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 800 r/min 离心 5 min 收集细胞, 加入新鲜培养基按 1:3 进行传代培养。待细胞生长至对数期, 收集细胞, 根据实验目的接种于 96 孔板或者 6 孔板中, 进行药物处理和造模。实验分组 ($n = 6$): 正常 (正常条件培养)、模型 (OGD/R) 和给药组 (1.25、2.5 和 5 μ mol/L, 细胞预处理 24 h 后, 进行 OGD/R)。FA 的给药剂量根据前期 MTT 实验结果筛选而来。

1.3 OGD/R 模型 给药组采用 FA 预处理 24 h, 然后将含药培养基换成无血清培养液, 将培养板放

2020-11-20 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81774190)

作者单位: 空军军医大学西京医院药剂科, 西安 710032

作者简介: 马忠英, 女, 主管药师;

王婧雯, 女, 副主任药师, 责任作者, E-mail: wangjingwen8021@163.com

置于含 95% N_2 的缺氧小室中,继续培养 3 h,低氧结束后,将无血清培养液换成含药培养基,培养 6 h,完成再复氧。模型组再灌注时给予正常培养基进行再灌注,正常组采用正常培养基在正常条件下培养。收集各组细胞,根据不同实验目的进行处理。

1.4 炎症因子测定 收集细胞培养基上清液,在 1 500 r/min 4 °C 条件下离心 5 min,按照试剂盒说明书绘制标准曲线,然后测定培养基中 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的含量,每个样本设定 5 个复孔,450 nm 测定各孔吸光度值。通过标准曲线计算样品中炎症因子的浓度。

1.5 细胞转染 转染试剂采用 Lipofectamine 3000 进行。选择合适密度细胞接种于 6 孔板中,培养 24 h;用 Opti-MEM 培养基稀释 Lipofectamine 3000,充分混合并标记为 1 号管;用 Opti-MEM 培养基稀释质粒制成预混液,充分混合并标记为 2 号管;1 号和 2 号管混合,充分混匀,室温孵育 15 min,制成质粒-脂质体复合物。将复合物滴加入需转染细胞组,继续培养 48 h 检测转染效率,进行后续处理。

1.6 Western blot 检测 细胞经过不同处理后,收集各组细胞,细胞裂解液在 4 °C 裂解 20 min,10 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,分装,在 -20 °C 冷冻保存。用 BCA 蛋白含量测定试剂盒测定每组的蛋白质含量。10% SDS-PAGE 分离蛋白,湿法转膜至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 60 min 后,孵育一抗 (TLR4、I- κ B、P-I- κ B、NF- κ B p65、PCNA 和 GAPDH 抗体,1:1 000 稀释) 4 °C 过夜。洗净一抗后,孵育羊抗兔二抗,60 min,37 °C。最后,TBST 洗净残余二抗后,ECL 发光液进行显色,扫描灰度值,计算与正常组的比值。内参蛋白为 GAPDH。

1.7 统计学处理 数据统计采用 Graphpad Prism 9.0 进行分析,用表示,各组间的比较采用单因素方差分析检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FA 抑制炎症因子水平 如图 1 所示,正常组与模型组上清液中 IL-1 β 含量比较差异有统计学意义 ($F = 46.13, P < 0.01$)。正常组上清液中 TNF- α 含量与模型组上清液中 IL-1 β 含量比较差异有统计学意义 ($F = 70.51, P < 0.01$)。正常组上清液中 IL-6 含量与模型组上清液中 IL-1 β 含量比较差异有统计学意义 ($F = 10.68, P < 0.01$)。这些结果表明 OGD/R 使 PC12 细胞产生炎症反应。与模型组比较,FA 使细胞上清液中 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的含

量降低,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),并且呈剂量依赖关系,表明 FA 可抑制 OGD/R 引起的炎症反应。

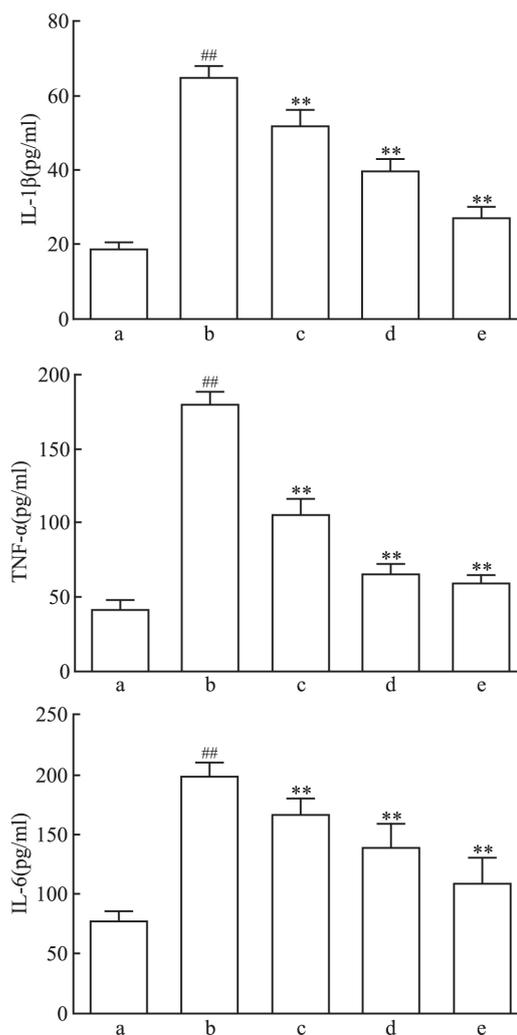


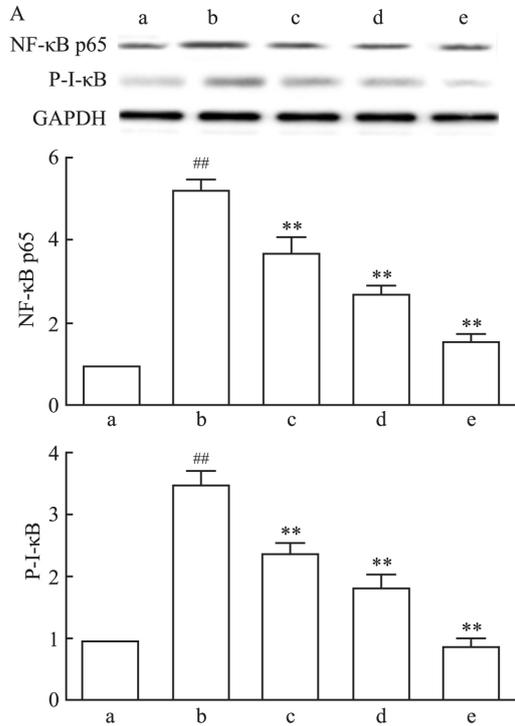
图 1 FA 对炎症因子水平的影响

a: 正常组; b: 模型组; c: 1.25 μ mol/L FA 给药组; d: 2.5 μ mol/L FA 给药组; e: 5 μ mol/L FA 给药组; 与正常组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$

2.2 FA 对 NF- κ B 核转移的影响 如图 2 所示,模型组细胞内 P-I- κ B 和 NF- κ B p65 细胞质中表达量均增加,并且与正常组比较差异有统计学意义 ($F_{NF-\kappa B} = 58.24, F_{I-\kappa B} = 47.67, P < 0.01$)。同时,图 2B 结果显示,模型组细胞的细胞核内 NF- κ B p65 的表达量增加 ($F = 49.27, P < 0.01$),表明 OGD/R 不仅促进 NF- κ B p65 蛋白表达,还可促进其转移入核。而 FA 处理组细胞质内 P-I- κ B 和 NF- κ B p65 表达量降低 ($P < 0.01$),同时细胞核内 NF- κ B p65 表达量也减少,并差异有统计学意义 ($P < 0.01$),表明 FA 可抑制 NF- κ B p65 从细胞质向细胞核转移。

2.3 FA 通过抑制 NF- κ B 调控炎症反应 为验证 FA 的抗炎作用是否通过调控 NF- κ B,采用质粒转染

过表达 NF-κB。如图 3A 所示,过表达 NF-κB 使细胞质和细胞核中 NF-κB p65 表达量均增加,表明质粒转染成功。如图 3B 所示,过表达 NF-κB 后,FA 对细胞核中 NF-κB p65 表达的抑制作用减弱,与 FA 处理组差异有统计学意义 ($F = 143.6, P < 0.01$)。同时,FA 对 IL-6 的抑制作用被减弱 ($F = 70.88, P < 0.01$),表明 FA 通过 NF-κB 发挥抗炎作用。



2.4 FA 对 TLR4 蛋白表达的影响 如图 4 所示,模型组细胞内 TLR4 蛋白表达量增加,且与正常组比较差异有统计学意义 ($F = 59.01, P < 0.01$),表明 OGD/R 可以激活细胞内 TLR4 通路。而 FA 处理组,TLR4 蛋白表达量被抑制,且与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$),表明 FA 可抑制 TLR4 的蛋白激活。

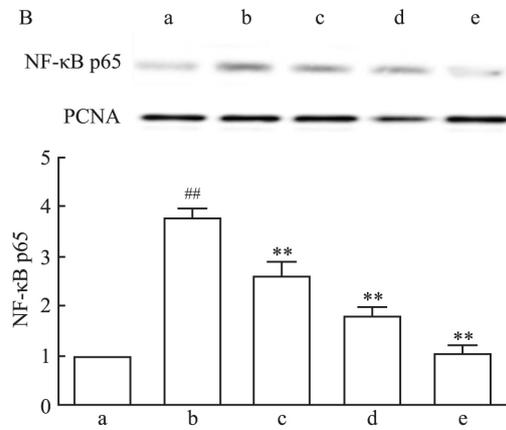


图 2 FA 对 NF-κB 表达的影响

A: FA 对细胞质中 P-I-κB 和 NF-κB p65 表达的影响; B: FA 对细胞核中 NF-κB p65 表达的影响; a: 正常组; b: 模型组; c: 1.25 μmol/L FA 给药组; d: 2.5 μmol/L FA 给药组; e: 5 μmol/L FA 给药组; 与正常组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$

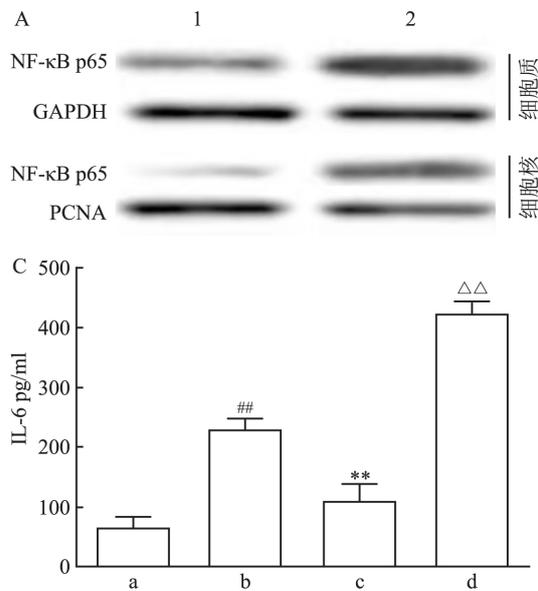
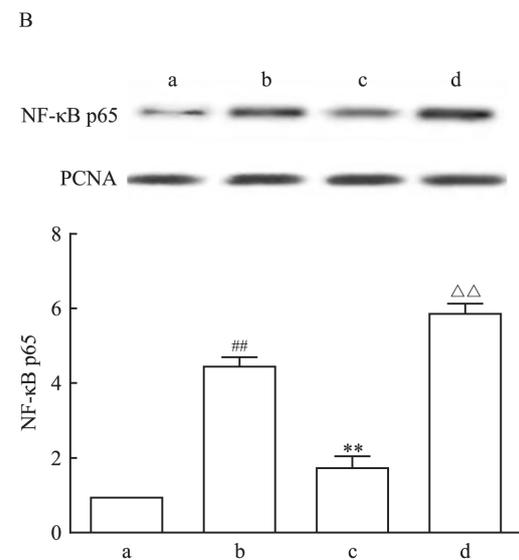


图 3 FA 通过抑制 NF-κB 抑制炎症反应

A: 过表达 NF-κB 对细胞质和细胞核中 NF-κB p65 蛋白表达的影响; 1: scrb 组; 2: 过表达 NF-κB 组; B: 过表达 NF-κB 使 FA 对细胞核中 NF-κB p65 蛋白的抑制作用减弱; C: 过表达 NF-κB 使 FA 对 IL-6 分泌的抑制作用减弱; a: 正常组; b: 模型组; c: scrb + FA 组; d: 过表达 NF-κB + FA 组; 与正常组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与 scrb + FA 组比较: ^{△△} $P < 0.01$



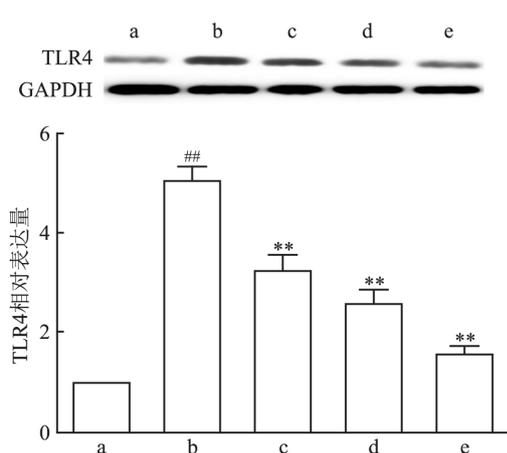


图4 FA对TLR4蛋白表达的影响

a: 正常组; b: 模型组; c: 1.25 μmol/L FA 给药组; d: 2.5 μmol/L FA 给药组; e: 5 μmol/L FA 给药组; 与正常组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$

2.5 FA通过TLR4调控NF-κB活性 为验证FA是否通过TLR4发挥抗炎作用,采用质粒过表达TLR4。如图5A所示,过表达使TLR4蛋白表达量增加,表明细胞转染成功,同时,课题组还观察到FA可使TLR4表达减少,进一步说明FA对TLR4具有抑制作用。图5B结果显示,与scr + FA组比较,过表达TLR4组细胞核内NF-κB p65蛋白表达升高($F = 206.5$, $P < 0.01$)表明过表达TLR4使FA对NF-κB的抑制作用减弱。同时,ELISA结果显示(图5C),过表达TLR4使细胞内IL-6含量升高($F = 57.32$, $P < 0.01$),与FA + scr组比较差异有统计学意义,表明过表达TLR4FA对炎症的抑制作用减弱。

3 讨论

炎症反应在脑缺血和再灌注引起的脑损伤过程中具有十分重要的作用,并且影响患者的临床预后。炎症反应还可与其他脑损伤机制(氧化应激、线粒体应激等)交互影响,共同促进脑组织损伤^[9]。因此,抑制炎症反应是治疗脑卒中,改善患者预后的重要途径。前期研究表明,FA具有一定的抗炎效果,但是否能够通过抑制炎症反应发挥脑保护作用还未见报道。本研究通过体外OGD/R模型,研究了FA的抗炎作用,并初步阐明了可能的作用机制。

OGD/R可升高细胞培养基上清液中炎症因子(IL-1β、TNF-α和IL-6)的含量,表明OGD/R引起PC12细胞发生炎症反应。而FA处理组细胞内炎症因子水平被抑制,且与模型组比较差异有统计学意义,表明FA可抑制细胞内的炎症反应。这些结

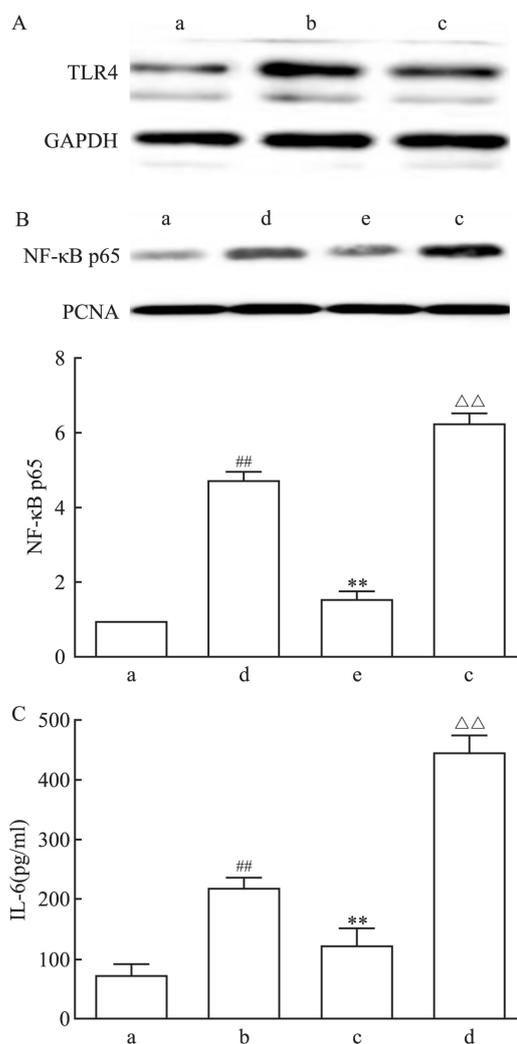


图5 FA通过TLR4调节NF-κB表达

A: 过表达TLR4对TLR4蛋白表达量的影响; B: 过表达TLR4对FA抑制NF-κB p65核内表达作用的影响; C: 过表达TLR4对FA抑制IL-6释放作用的影响; a: 正常组; b: TLR4过表达组; c: FA + TLR4过表达组; d: 模型组; e: scr + FA组; 与正常组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与scr + FA组比较: ^{△△} $P < 0.01$

果表明,FA在PC12细胞模型上具有抗炎效果。

为阐明FA的抗炎作用机制,本研究测定了TLR4/NF-κB信号通路。TLR4是在人类中发现的第一个TLR,在炎症免疫过程中发挥重要作用^[10]。机体内的炎症因子可识别TLR4并与其结合,诱导下游通路激活,进一步促进炎症反应,这种诱导放大效应可加重炎症反应和组织损伤^[11]。TLR4通过髓样分化因子88促使NF-κB和I-κB解离,NF-κB p65从细胞质转移至细胞核,与其核转录因子结合后,诱导炎症因子(TNF-α和IL-6等)释放,诱导产生和加重炎症反应^[12-13]。因此,有效抑制TLR4/NF-κB通路可阻断炎症反应的级联关系,减轻炎症反应和组

织损伤。

本研究结果显示, OGD/R 不仅升高细胞质 NF- κ B p65 的表达水平, 同时细胞核中 NF- κ B p65 表达水平也增加, 表明 FA 激活 NF- κ B p65 通路。为进一步验证 FA 对 NF- κ B 的调控作用, 采用慢病毒颗粒过表达 NF- κ B, 结果显示过表达 NF- κ B 使 FA 对细胞核内 NF- κ B p65 蛋白表达的抑制作用减弱, 同时失去对 IL-6 的抑制作用, 表明 FA 通过抑制 NF- κ B 抑制炎症反应。为进一步明确 FA 对 TLR4 的调控作用, 测定了 TLR4 的蛋白表达情况。结果表明, FA 可抑制 TLR4 表达, 同时采用慢病毒质粒进一步证实 FA 通过 TLR4 调控 NF- κ B 发挥抗炎作用。

综上所述, FA 能够抑制 OGD/R 诱导的 PC12 细胞炎症反应, 其作用机制可能是通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路减少炎症因子释放, 从而减轻细胞炎症损伤。本研究为进一步开发利用 FA 提供理论基础, 将加速该药的推广应用。

参考文献

- [1] Wang Q, Dai P, Bao H, et al. Anti-inflammatory and neuroprotective effects of sanguinarine following cerebral ischemia in rats [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(1): 263-8.
- [2] Edwards D N, Bix G J. The inflammatory response after ischemic stroke: targeting β 2 and β 1 integrins [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 540.
- [3] Dziedzic T. Systemic inflammation as a therapeutic target in acute ischemic stroke [J]. *Expert Rev Neurother*, 2015, 15(5): 523-31.
- [4] Jin R, Liu L, Zhang S, et al. Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2013, 6(5): 834-51.
- [5] 张天锡, 史磊, 刘雯, 等. 连翘化学成分、药理活性现代研究 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2016, 018(012): 222-4.
- [6] 孙秀萍, 王亿杭, 王立为, 等. 连翘酯苷对 PC12 细胞增殖及其细胞损伤模型的保护作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(24): 197-200.
- [7] 何文琰. 连翘酯苷 A 抗炎活性及代谢组学初步研究 [D]. 山西, 山西大学, 2014.
- [8] 程广东, 岳丽红, 吕冬云, 等. 连翘酯苷 A 抗 LPS 介导大鼠类风湿性关节炎机制研究 [J]. *东北农业大学学报*, 2014, 45(6): 103-8.
- [9] Shichita T, Ito M, Yoshimura A. Cerebral post-ischemic inflammation [J]. *Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2015, 26(2): 135-9.
- [10] Peri, F, Calabrese V. Toll-like receptor 4 (TLR4) modulation by synthetic and natural compounds: an update [J]. *J Med Chem*, 2014, 57(9): 3612-22.
- [11] Figueiredo R T, Bittencourt V C B, Lopes L C L, et al. Toll-like receptors (TLR2 and TLR4) recognize polysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* cell wall [J]. *Carbohydrate Research*, 2012, 356(15): 260-4.
- [12] Wu Y, Zhou B P. TNF- α /NF- κ B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion [J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(4): 639-44.
- [13] Fu Y J, Xu B, Huang S W, et al. Baicalin prevents LPS-induced activation of TLR4/NF- κ B p65 pathway and inflammation in mice *via* inhibiting the expression of CD14 [J]. *Acta Pharmacol Sin* 2020, 42(1): 88-96.

Forsythiaside A inhibits inflammation induced by cerebral ischemia through TLR4/NF- κ B

Ma Zhongying, Zhang Di, Sun Jin, et al

(Dept of Pharmacy, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032)

Abstract Objective To study the inhibitory effect of forsythoside A (FA) on the inflammation induced by ischemia/reperfusion in PC12 cells. **Methods** Oxygen glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) model was established in PC12 cells, and PC12 cells were treated with different concentrations of FA (1.25, 2.5 and 5 μ mol/L) to determine inflammatory factors (IL-1 β , TNF- α and IL-6) level, Western blot was used to determine the expression of toll-like receptor-4 (TLR4); nuclear factor kappa (NF- κ B) pathway-related proteins, and the mechanism was verified using lentiviral activation particles. **Results** FA could significantly inhibit the release of inflammatory factors, inhibit the protein expression of TLR4 and NF- κ B p65, and also inhibit the expression of NF- κ B p65 in the nucleus. TLR4 and NF- κ B lentiviral activation particles were used to verify that FA regulated NF- κ B p65 nuclear transfer through TLR4, thereby inhibiting the release of inflammatory factors and reducing inflammation. **Conclusion** FA can inhibit the expression of inflammatory factors by inhibition of NF- κ B p65 nuclear translocation regulated by TLR4, so as to reduce the inflammatory response induced by ischemia-reperfusion and show brain protection effects.

Key words forsythiaside A; cerebral ischemia-reperfusion injury; toll-like receptor-4; nuclear factor kappa B