

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.32.014

姜黄素对小胶质细胞的活化的影响*

靳晓芳 郭琪[△] 李蓓 马宝玉 王晨

(西安市第四医院药剂科 陕西 西安 710000)

摘要 目的:研究姜黄素对脂多糖引起的小胶质细胞活化状态的影响,并探讨 TOLR4 受体在其中的作用。**方法:**采用体外培养 N9 小鼠小胶质细胞系,脂多糖作为刺激,激活小胶质细胞。采用 ELISA 法检测小胶质细胞培养基中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的含量;相差显微镜观测细胞形态;免疫细胞化学和 western blot 观测小胶质细胞 TOLR4 受体表达情况。**结果:**与对照组相比,暴露于 100 ng/ml 脂多糖 24 h 的小胶质细胞促炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 释放量明显增加($P<0.05$),姜黄素浓度为 10 μ M 时,可显著减少小胶质细胞释放 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6($P<0.05$),此外,姜黄素还可改善小胶质细胞形态,并降低暴露于脂多糖中的小胶质细胞 TOLR4 受体的表达。**结论:**姜黄素可能通过抑制 TOLR4 表达,减轻了脂多糖对小胶质细胞的激活。

关键词:小胶质细胞;姜黄素;炎症;TOLR4;脂多糖

中图分类号:Q291 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)32-6257-03

The Effect of Curcumin on Microglial Activation*

JIN Xiao-fang, GUO Qi[△], LI Bei, MA Bao-yu, WANG Chen

(Department of Pharmacology, Xi'an No.4 Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of curcumin (Cur) on lipopolysaccharide (LPS)-induced microglial activation and the role of Toller Receptor 4 (TOLR4) in the effect. **Methods:** N9 microglia cell line exposed to LPS for 24 h was used to mimic the model of microglial inflammation. ELISA was used to assess the concentrations of tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β and IL-6. Phase contrast microscope was used to record the morphology of microglial cells exposed to LPS. Immunocytochemistry and western blot were used to measure the expression of TOLR4. **Results:** Compared with that in the control, LPS of 100 ng/ml increased the concentrations of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the supernatant ($P<0.05$), while curcumin of 10 μ M decreased the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 markedly ($P<0.05$). In addition, curcumin ameliorated the morphology and decreased the expression of TOLR4 in microglial cells exposed to LPS. **Conclusion:** Curcumin attenuated microglial activation induced by LPS, and the inhibition of TOLR4 may be associated with the effect.

Key words: Microglia; Curcumin; Inflammation; TOLR4; Lipopolysaccharide

Chinese Library Classification: Q291 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)32-6257-03

前言

过度的炎症反应,是造成中枢神经系统(Central Nervous System, CNS)继发性损伤的重要原因^[1]。小胶质细胞的过度活化,可释放大量促炎症因子,加重 CNS 的炎性损伤^[2]。因此,如何调控小胶质细胞的活化状态,避免其过度活化、加重炎症,是减轻 CNS 继发性损伤的重要途径。姜黄素是姜黄根茎中提取的一种多酚类物质。研究发现,姜黄素具有抗炎和抗氧化作用^[3]。应用姜黄素可减轻中枢神经系统的缺血再灌注损伤和氧化应激损伤^[4],但其具体神经保护机制至今不明。Toller Receptor 4 (TOLR4)是一种分布于小胶质细胞上的受体^[5],该受体过度激活可增加小胶质细胞的活化水平^[6],进而加重 CNS 炎症和损伤程度^[7]。本文研究姜黄素对脂多糖引起的小胶质细胞活化状态的影响,并探讨 TOLR4 受体在其中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

N9 小鼠小胶质细胞系由中科院上海生命科学研究所以赠予。N9 小胶质细胞在含 5% 胎牛血清(Hyclone, 美国)的 IMDM 培养基(Sigma-Aldrich, 美国)中培养,培养基中含 1% 青链霉素混合溶液(索来宝, 中国)。培养箱内含 5% CO₂ 和 95% 空气。姜黄素和脂多糖购自 Sigma-Aldrich。

1.2 炎症因子检测

将小胶质细胞接种于 24 空细胞培养板中,密度为 1×10^5 个/孔。细胞经不同药物处理 24 h 后,收集细胞上清液并离心,取上清液,采用相应试剂盒(南京建成),应用比色法进行 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量检测。

1.3 免疫细胞化学

将小胶质细胞接种于共聚焦显微镜专用培养皿,密度为 5×10^4 个/皿,处理完毕后,4% 多聚甲醛固定 1 h, PBS 清洗 3 次,每次 5 min, 5% 牛血清白蛋白包被 30 min, 兔抗小鼠

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81171237)

作者简介:靳晓芳(1960-),女,主管药师,主要研究方向:神经保护药物,电话:13572030866, E-mail: yuanjian300@126.com

[△] 通讯作者:郭琪,药师, E-mail: yuanjian300@icloud.com

(收稿日期:2014-02-24 接受日期:2014-03-22)

TOLR4 一抗(Abcam, 英国, 1:100 稀释)4℃ 孵育 24 h, Cy3 标记的山羊抗兔二抗(碧云天, 中国, 1:200 稀释)常温孵育 2 h, 随后, 每孔加 DAPI 染色液标记 10 min 后, PBS 清洗 3 次, 共聚焦显微镜下观察。

1.4 Western Blot

将细胞接种于 6 孔培养板上, 密度为 5×10^6 个/孔, 处理完毕后, 每孔细胞加入 500 μ L 细胞裂解液, 5 min 后, 将细胞用细胞刮收集至离心管, 4℃ 离心后, 收集上清蛋白溶液, 定量后用于检测。蛋白质经聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 转移至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。5% 脱脂奶粉封闭, 4℃ 过夜, 加入 1:500 稀释的兔抗小鼠 TOLR4 一抗, 37℃ 孵育 4 h, 再加上 Cy3 标记的山羊抗兔二抗 4℃ 过夜, 化学发光法显色, 凝胶成像系统(Bio-Rad 公司, 美国)进行图像分析, 应用 β 肌动蛋白(β -Actin)作为内参。

1.5 统计分析

采用 SPSS11.0 进行数据分析。实验数据采用均数 标准差 (Means S.D.) 表示, 数据处理采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), $P < 0.05$ 被认为具有统计学差异。

2 结果

2.1 姜黄素对脂多糖引起的小胶质细胞 TNF- α 释放的影响

将小胶质细胞暴露于含不同浓度 (0-500 ng/ml) 脂多糖的 IMDM 培养基中 24 h (图 1), 随后采用比色法, 应用试剂盒检测各组培养基上清液中 TNF- α 浓度, 根据 TNF- α 释放量确定脂多糖浓度。与对照组 (5.2-1.2 ng/ml) 相比, 10、100 和 500 ng/ml 组可显著增加 TNF- α 释放量, 选取浓度为 100 ng/ml 的脂多糖 (84.5-4.6 ng/ml) 进行随后实验。随后, 将细胞暴露于含脂多糖浓度为 100 ng/ml、姜黄素浓度分别为 1、10 和 50 mM 的培养基中暴露 24 h 后 (图 1), 检测各组 TNF- α 释放量。与单纯脂多糖组 (89.3 $\pm$ 6.4 ng/ml) 相比, 1、10 和 50 μ M 的姜黄素可显著降低 TNF- α 释放, 选取姜黄素浓度为 10 μ M 进行随后实验。

2.2 姜黄素对小胶质细胞形态、IL-1 β 和 IL-6 释放量的影响

正常对照组小胶质细胞呈多角形 (图 2), 部分有伪足, 100 ng/ml 脂多糖暴露 24 h 后, 胞体变大变圆, 伪足消失, 10 μ M 的姜黄素可显著改善小胶质细胞形态, 抑制其变大变圆的过度活化状态产生。此外, 与单纯暴露于 100 ng/ml 脂多糖组相比, 10 μ M 的姜黄素可显著减低培养基中 IL-1 β 和 IL-6 含量 (图 2)。上述结果表明, 姜黄素可明显减轻脂多糖引起的小胶质细胞过度活化。

2.3 姜黄素对脂多糖引起的 TOLR4 受体表达的影响

本研究采用免疫细胞化学和 western blot 观测 TOLR4 受体表达情况 (图 3)。与对照组相比, 暴露于 100 ng/ml 脂多糖 24 h 后, 可显著上调小胶质细胞 TOLR4 受体表达, 10 μ M 的姜黄素可显著降低 TOLR4 受体表达, 上述结果表明, 姜黄素可能通过抑制 TOLR4 受体表达, 减轻了暴露于脂多糖中的小胶质细胞的活化程度。

3 讨论

小胶质细胞的过度活化参与了多种 CNS 疾病的发生和发

展, 包括脑缺血 / 再灌注损伤、Parkinson's disease 和 Alzheimer's disease^[8-10]。小胶质细胞过度活化后, 可释放多种促炎症因子, 包括 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等, 这些促炎症因子的大量释放可引起神经元细胞发生坏死和凋亡, 进而造成神经功能障碍^[11,12]。因此, 抑制小胶质细胞的过度活化对减轻 CNS 的激发性损伤意义重大。

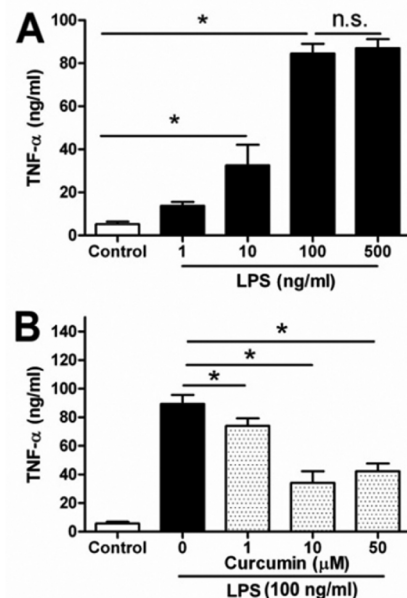


图 1 姜黄素可降低脂多糖引起的小胶质细胞 TNF- α 释放量。A: 脂多糖暴露 24 h 可增加小胶质细胞 TNF- α 释放量; B: 姜黄素(curcumin)可抑制脂多糖引起的小胶质细胞释放 TNF- α

Fig.1 Curcumin decreased the concentration of TNF- α released by microglial cells exposed to LPS. A: Exposure of LPS for 24 h increased the release of TNF- α from microglial cells; B: Curcumin decreased LPS-induced TNF- α release from microglial cells dose-dependently.

注: *: $P < 0.05$, n.s.: 无统计学差异, n=8;

Note: *: $P < 0.05$, n.s.: no significance, n=8.

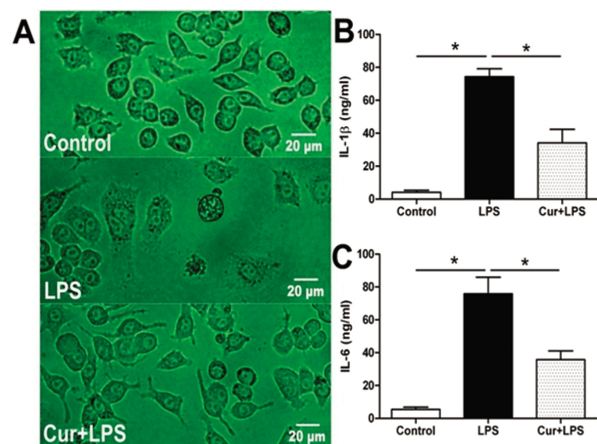


图 2 姜黄素可改善暴露于 LPS 中的小胶质细胞形态、抑制 IL-1 β 和 IL-6 释放。A: 姜黄素改善了暴露于脂多糖中的小胶质细胞形态; B: 姜黄素降低脂多糖引起的小胶质细胞释放 IL-1 β ; C: 姜黄素降低脂多糖引起的小胶质细胞释放 IL-6

Fig.2 Curcumin ameliorated the morphology, reduced the release of IL-1 β and IL-6 of microglial cells exposed to LPS. A: Curcumin ameliorated the morphology of microglial cells exposed to LPS; B: Curcumin reduced the release of IL-1 β ; C: Curcumin reduced the release of IL-6;

注: *: $P < 0.05$, n = 6

Note: *: $P < 0.05$, n = 6

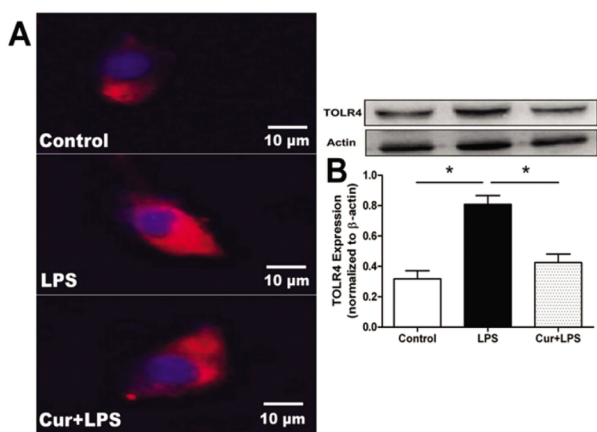


图3 姜黄素抑制了暴露于脂多糖中的小胶质细胞 TOLR4 受体表达的上调。A:免疫细胞化学结果显示姜黄素抑制了小胶质细胞 TOLR4 受体(红色)表达上调;B: Western blot 结果显示姜黄素抑制了小胶质细胞 TOLR4 受体表达上调;

Fig.3 Curcumin inhibited the over-expression of TOLR4 in microglial cells exposed to LPS. A: Immucytochemistry result indicated that curcumin inhibited the over-expression of TOLR4 (red) in microglial cells exposed to LPS for 24 h; B: Western blot results indicated that curcumin inhibited TOLR4 over-expression of microglial cells exposed to LPS for 24 h;

注: *: $P < 0.05$, $n = 4$

Note: *: $P < 0.05$, $n = 4$

姜黄素 (curcumin) 是从姜黄根茎中提取的一种酚类色素, 是姜黄的重要活性成分, 具有抗炎、抗氧化、抑制异常蛋白聚集等广泛的药理作用^[13,14]。其抗氧化能力约为维生素 E 的 10 倍^[15]。已有研究显示, 姜黄素可降低脂多糖所致小胶质细胞释放炎症因子^[16]。TOLR4 受体主要分布于 CNS 的小胶质细胞和外周的巨噬细胞等免疫细胞^[17,18], 该受体表达上调, 可激活小胶质细胞, 其表达程度与小胶质细胞激活程度呈正相关。然而, TOLR4 受体是否参与姜黄素抑制 CNS 炎症的作用尚未知。本研究结果显示, 10 μ M 的姜黄素可显著降低促炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 释放和 TOLR4 受体表达, 表明姜黄素可能通过抑制 TOLR4 受体表达减轻炎症因子释放。此外, 还有研究显示姜黄素可降低脂多糖引起的小胶质细胞的 NF- κ B 表达, 而脂多糖对 NF- κ B 的上调可通过 MAPK 通路来调控^[19]。

除了抗炎作用, 姜黄素有较强的抗氧化效应。有研究显示, 姜黄素可通过抑制细胞 NADPH 氧化酶 II (NADPH Oxidase 2, NOX2) 来实现^[16]。NOX2 是表达于细胞膜上的一种膜结合蛋白, 其激活后可产生自由基并消耗细胞内的超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 等成分, 进而可引起 DNA 和细胞膜脂质过氧化, 最终可诱发细胞死亡^[19]。而小胶质细胞受到氧化刺激后, 亦可发生激活^[20]。研究发现, 姜黄素还可通过抑制暴露于脂多糖中的小胶质细胞上的 NOX2 活力, 进而下调小胶质细胞的激活程度^[16]。姜黄素的相关衍生物, 如去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素, 其抗炎作用机制与姜黄素类似, 可通过下调小胶质细胞的激活程度起到抑制炎症程度的作用^[16]。因此, 姜黄素及其类似物的抗炎作用, 为 CNS 炎症相关疾病的防治, 提供了新选择。

参考文献(References)

- [1] Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS [J]. Trends Neurosci, 1996, 19(8): 312-318
- [2] Cole GM, Teter B, Frautschy SA. Neuroprotective effects of curcumin

[J]. Adv Exp Med Biol, 2007, 595: 197-212

- [3] Franco-Robles E, Campos-Cervantes A, Murillo-Ortiz BO, et al. Effects of curcumin on brain-derived neurotrophic factor levels and oxidative damage in obesity and diabetes [J]. Appl Physiol Nutr Metab, 2014, 39(2): 211-218
- [4] Ahmad N, Umar S, Ashafaq M, et al. A comparative study of PNIPAM nanoparticles of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin and their effects on oxidative stress markers in experimental stroke [J]. Protoplasma, 2013, 250(6): 1327-1338
- [5] Bell MT, Puskas F, Agoston VA, et al. Toll-like receptor 4-dependent microglial activation mediates spinal cord ischemia-reperfusion injury [J]. Circulation, 2013, 128(11 Suppl 1): S152-156
- [6] Kim SJ and Li J. Caspase blockade induces RIP3-mediated programmed necrosis in Toll-like receptor-activated microglia [J]. Cell Death Dis, 2013, 4: e716
- [7] Kohno H, Chen Y, Kevany BM, et al. Photoreceptor proteins initiate microglial activation via Toll-like receptor 4 in retinal degeneration mediated by all-trans-retinal [J]. J Biol Chem, 2011, 288(21): 15326-15341
- [8] Yenari MA, Kauppinen TM and Swanson RA. Microglial activation in stroke: therapeutic targets [J]. Neurotherapeutics, 2010, 7(4): 378-391
- [9] Taetzsch T and Block ML. Pesticides, microglial NOX2, and Parkinson's disease [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2013, 27(2): 137-149
- [10] Prokop S, Miller KR, Heppner FL. Microglia actions in Alzheimer's disease [J]. Acta Neuropathol, 2013, 126(4): 461-477
- [11] Park HY, Park C, Hwang HJ, et al. 7,8-Dihydroxyflavone attenuates the release of pro-inflammatory mediators and cytokines in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells through the suppression of the NF- κ B and MAPK signaling pathways [J]. Int J Mol Med, 2014, 33(4): 1027-1034
- [12] Lai AY, Dibal CD, Armitage GA, et al. Distinct activation profiles in microglia of different ages: a systematic study in isolated embryonic to aged microglial cultures [J]. Neuroscience, 2013, 254: 185-195
- [13] Cho YJ, Yi CO, Jeon BT, et al. Curcumin attenuates radiation-induced inflammation and fibrosis in rat lungs [J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2013, 17(4): 267-274
- [14] Aldebasi YH, Aly SM, Rahmani AH. Therapeutic implications of curcumin in the prevention of diabetic retinopathy via modulation of anti-oxidant activity and genetic pathways [J]. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol, 2013, 5(4): 194-202
- [15] 崔群力, 孙圣刚. 姜黄素通过抗氧化作用拮抗鱼藤酮所致 PC12 细胞损伤的研究 [J]. 华中科技大学学报, 2010, 39(1): 37-46
- [16] Cui Qun-li, Sun Sheng-gang. Curcumin antagonizes rotenone-induced injury of PC12 cells by antioxidant activity [J]. J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci, 2010, 39(1): 37-46
- [17] Zhang L, Wu C, Zhao S, et al. Demethoxycurcumin, a natural derivative of curcumin attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses through down-regulation of intracellular ROS-related MAPK/NF-kappaB signaling pathways in N9 microglia induced by lipopolysaccharide [J]. Int Immunopharmacol, 2010, 10(3): 331-338
- [18] Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, et al. The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS [J]. J Neurosci, 2002, 22(7): 2478-2486 (下转第 6310 页)

- 例动态预警分析[J]. 中华流行病学杂志, 2012, 33(11): 1155-1158
Meng Lei, Wang Xin-hua, Li Juan-sheng, et al. Dynamic prediction on the number of influenza-like cases in Gansu province based on data from the influenza sentinel surveillance program, from 2006 to 2011 [J]. Chin J Epidemiol, 2012, 33(11): 1155-1158
- [9] 张静, 杨维中, 郭元吉, 等. 中国 2001-2003 年流感性感冒流行特征分析[J]. 中华流行病学杂志, 2004, 25(6): 461-465
Zhang Jing, Yang Wei-zhong, Guo Yuan-ji, et al. Epidemiologic characteristics of influenza in China, from 2001 to 2003 [J]. Chin J Epidemiol, 2004, 25(6): 461-465
- [10] 王昕, 程小雯, 房师松, 等. 指数平滑模型在流感样病例预测中的应用[J]. 中国热带医学, 2011, 11(8): 938-939
Wang Xin, Cheng Xiao-wen, Fang Shi-song, et al. Application of exponential smoothing model in forecasting influenza incidence[J]. China Tropical Medicine, 2011, 11(8): 938-939
- [11] 马萍, 王学良, 田小萍, 等. 陕西省 2005-2009 年流感性感冒监测分析[J]. 中国初级卫生保健, 2011, 25(3): 65-67
Ma Ping, Wang Xue-liang, Tian Xiao-ping, et al. Analysis of Influenza Surveillance in Shanxi Province from 2005 to 2009 [J]. Chinese Primary Health Care, 2011, 25(3): 65-67
- [12] 宋绍霞, 林艺, 王宇路, 等. 2005-2011 年山东省流行性感冒监测结果与分析[J]. 疾病监测, 2012, 27(1): 42-45
Song Shao-xia, Lin Yi, Wang Yu-lu, et al. Surveillance of influenza in Shandong, 2005-2011[J]. Disease Surveillance, 2012, 27(1): 42-45
- [13] 李亚品, 钱全, 方立群. 中国大陆 2009 年早期确诊的 420 例甲型 H1N1 流感病例流行病学特征分析 [J]. 中华流行病学杂志, 2009, 30(11): 1102-1105
Li Ya-pin, Qian Quan, Fang Li-qun, et al. Epidemiological characteristics of 420 influenza A (H1N1) cases confirmed in the early stage of the epidemic in mainland China[J]. Chin J Epidemiol, 2009, 30(11): 1102-1105
- [14] 陈健, 蔡华, 袁政安, 等. 2009 年上海市甲型 H1N1 流感大流行的特征分析[J]. 复旦学报(医学版), 2011, 38(2): 121-125
Chen Jian, Cai Hua, Yuan Zheng-an, et al. Analysis on epidemiological characteristics of pandemic influenza H1N1 in 2009 in Shanghai, China[J]. Fudan University Journal of Medical Sciences, 2011, 38(2): 121-125
- [15] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Serum cross-reactive antibody response to a novel influenza A (H1N1) virus after vaccination with seasonal influenza vaccine [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2009, 58: 521-524
- [16] Hancock K, Veguilla V, Lu X, et al. Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus [J]. N Engl J Med, 2009, 361(20): 1945-1952
- [17] 李婵媛. 2009 年-2011 年铁岭市流感样病例病原学监测结果分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(10): 2493-2495
Li Chan-yuan. Analysis of aetiological surveillance of influenza-like cases from 2009 to 2010 [J]. Chin J Health Laboratory Technology, 2011, 21(10): 2493-2495
- [18] 陈冬华, 钱杰, 钟培松. 上海市嘉定区流感样病例监测与病原学监测相关性分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2011, 15(9): 817-818
Chen Dong-hua, Qian Jie, Zhong Pei-song. Analysis of the sentinel surveillance data on influenza like illness in Jiading District, Shanghai[J]. Chin J Dis Control Prev, 2011, 15(9): 817-818
- [19] 王亚丽. 2010 年开封市流行性感冒监测分析 [J]. 现代预防医学, 2012, 39(9): 2304-2305
Wang Ya-li. Analysis of the surveillance on influenza in Kaifeng, 2010[J]. Modern Preventive Medicine, 2012, 39(9): 2304-2305
- [20] 段佩若, 赵华. 北京甲 3 流感流行中合并其他呼吸道感染病毒的调查[J]. 免疫学杂志, 2000, 16(2): 127-129
Duan Pei-ruo, Zhao Hua. Serological analysis and detection of multi-virus during the prevalence of FluA3 in Beijing [J]. Immunological Journal, 2000, 16(2): 127-129
- [21] 王冰, 陈建平, 王迎春, 等. 沈阳市 2005-2009 年度冬春流感样病例病原学监测情况分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(4): 852-853
Wang Bing, Chen Jian-ping, Wang Ying-chun, et al. Analysis of aetiological surveillance of influenza-like cases in epidemic seasons in Shenyang from 2005 to 2009 [J]. Chin J Health Laboratory Technology, 2010, 20(4): 852-853
- (上接第 6259 页)
- [18] Valerio MS, Minderman H, Mace T, Awad AB. β -Sitosterol modulates TLR4 receptor expression and intracellular MyD88-dependent pathway activation in J774A.1 murine macrophages [J]. Cell Immunol, 2013, 285(1-2): 76-83
- [19] Song SX, Gao JL, Wang KJ, et al. Attenuation of brain edema and spatial learning deficits by the inhibition of NADPH oxidase activity using apocynin following diffuse traumatic brain injury in rats [J]. Mol Med Rep, 2013, 7(1): 327-331
- [20] Won SY, Kim SR, Maeng S, Jin BK. Interleukin-13/Interleukin-4-induced oxidative stress contributes to death of prothrombin-2 (pKr-2)-activated microglia [J]. J Neuroimmunol, 2013, 265 (1-2): 36-42