

儿茶素对脂多糖诱导的 BV-2 细胞炎症反应的作用

王青¹, 贾哲琳², 宋丽娟¹, 尉杰忠³, 杨智超¹, 姜维佳¹,
肖保国⁴, 马存根^{1,3*}

(1. 山西中医药大学国家中医药管理局益气活血重点研究室, 山西 晋中 030619;
2. 山西医科大学第一临床医学院, 山西 太原 030001; 3. 山西大同大学脑科学
研究所, 山西 大同 037009; 4. 上海复旦大学神经病学研究所, 上海 200040)

摘要: 探索儿茶素对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 BV-2 细胞炎症反应的作用。MTT 法观察儿茶素对 BV-2 细胞增殖的影响; 1 mg·L⁻¹ LPS 处理 BV-2 细胞建立体外小胶质细胞炎症模型; 在该模型下加入儿茶素共孵育后, 分别用 ELISA 法、HE 染色和 Western blot 法检测儿茶素对 LPS 诱导的 BV-2 细胞分泌的肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 及细胞形态改变和 NF- κ B 磷酸化的影响。另外, 采用 transwell 法检测不同浓度儿茶素对 LPS 介导的细胞趋化行为的影响。儿茶素对 BV-2 细胞无毒性; 且与 LPS 组相比, 儿茶素可显著降低 LPS 引起的 BV-2 细胞的 TNF- α 和 IL-1 β 的释放及细胞趋化行为, 逆转细胞形态改变, 抑制 NF- κ B 的磷酸化。因此, 儿茶素能够抑制 LPS 诱导的 BV-2 细胞的炎症反应。

关键词: 儿茶素; 脂多糖; BV-2 细胞; 炎症反应

中图分类号: R967

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 02-0244-05

The effects of catechin on inflammatory response induced by lipopolysaccharide in BV-2 cells

WANG Qing¹, JIA Zhe-lin², SONG Li-juan¹, YU Jie-zhong³, YANG Zhi-chao¹,
JIANG Wei-jia¹, XIAO Bao-guo⁴, MA Cun-gen^{1,3*}

(1. The Key Research Laboratory of Benefiting Qi for Acting Blood Circulation Method to Treat Multiple Sclerosis of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China;

2. First Affiliated Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 3. Institute of Brain Science, Shanxi Datong University, Datong 037009, China; 4. Institute of Neurology, Fudan University, Shanghai 200040, China)

Abstract: The effects of catechin on inflammatory response of BV-2 cells were investigated using the lipopolysaccharide (LPS) model. BV-2 cells were incubated with LPS (1 mg·L⁻¹) for 12 h in the microglia inflammatory model *in vitro*. After catechin and LPS co-incubation for 12 h, MTT, ELISA and Western blot were used to detect cell viability, cytokines, cell migration and protein expression. In addition, transwell assay was conducted to investigate the effect of catechin on cell chemokaxis. Catechin did not show any cytotoxicity effect on BV-2 cells, but reversed the change in cell morphology and inhibited the release of TNF- α and IL-1 β , cell chemotaxis and phosphorylation of NF- κ B/p65. In conclusion, Catechin could inhibit the LPS-induced

收稿日期: 2017-10-11; 修回日期: 2017-11-18.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473577); 山西省卫生计生委科研课题资助项目 (201601112); 山西中医药大学校内博士启动基金资助项目 (2014BK04).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-352-7158665, E-mail: macungen2001@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0993

inflammatory response in BV-2 cells.

Key words: catechin; lipopolysaccharide; BV-2 cell; inflammatory response

众多研究结果表明, 人类大部分高发的慢性疾病可能与炎症有关, 如中枢神经系统变性疾病——阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、帕金森 (Parkinson's disease, PD) 和多发性硬化 (multiple sclerosis, MS) 等的发生、发展都有神经炎症的参与^[1]。在循环系统疾病——动脉粥样硬化病 (atherosclerosis, AS)、血液黏稠和原发性高血压等的发病过程中炎症起着重要作用^[2], 而各类恶性肿瘤也与炎症有着密切的关系^[3]。因此, 开发具有抗炎活性的药物是现在的发展趋势。儿茶素 (catechin, C) 是广泛存在于自然界中的一种黄烷醇型黄酮化合物, 能够清除氧自由基和抗炎, 还可以通过血脑屏障, 到达中枢神经系统^[4,5]。因此, 研究儿茶素能否抑制中枢神经系统神经炎症反应, 对于预防和缓解中枢神经疾病的发生、发展具有重要的现实意义。

小胶质细胞 (microglia, MG) 是中枢神经系统的常驻免疫细胞, 它的持续活化是诱发和加重中枢神经炎症的关键因素, 因此, 本研究以脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 BV-2 细胞 (MG 系) 体外炎症模型为研究对象^[6,7], 初步探索儿茶素对小胶质细胞引起炎症反应的影响, 为进一步的临床开发奠定理论和实验基础。

材料与方法

试剂与仪器 CO₂ 培养箱 (Thermo 公司); 全波长酶标仪 (Molecular Devices 公司); 小型垂直电泳槽、小型基础通用电源、小型半干转膜仪 (Bio-Rad 公司); 凝胶成像系统 (上海天能科技有限公司); DMEM 高糖培养基 (Gibco 公司); BV-2 细胞 (小胶质细胞系, 武汉大学细胞库); 脂多糖 (Sigma 公司); 胎牛血清 (HyClone 公司); Leu-Glu-Ser-Ile-Phe-Arg-Ser-Leu-Leu-Phe-Arg-Val-Met (MMK-1) (Tocris Bioscience 公司); 噻唑蓝、DAPI (碧云天生物技术公司); PVDF 膜 (Milipore 公司); BCA 试剂盒 (康为世纪生物科技有限公司); RAPI 细胞裂解液 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司]; ECL [爱必信 (上海) 生物科技有限公司]; 小鼠 β -actin 抗体 (Santa Cruz 公司); IL-1 β 和 TNF- α ELISA 试剂盒 (R&D 公司), 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司)。

MTT 实验 高糖 DMEM 培养液 (10% 胎牛血

清) 培养 BV-2 细胞, 调整细胞数为每毫升 1×10^5 个, 接种于 96 孔细胞培养板, 每孔 100 μ L 细胞悬液, 培养 12~24 h 后, 各孔加入浓度为 2.5、5、10、20、30、50 和 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 儿茶素, 孵育 24、48 和 72 h 后, 各孔加入 5% MTT 10 μ L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h 后, 移除培养液, 各孔再加入 DMSO 100 μ L 溶解, 震荡混匀后, 在 490 nm 处读取其 OD 值。

ELISA 法检测 IL-1 β 和 TNF- α 高糖 DMEM 培养液 (10% 胎牛血清) 培养 BV-2 细胞, 调整细胞数为每毫升 1×10^5 个, 接种于 96 孔细胞培养板, 实验设为空白组、LPS 组和 LPS+儿茶素组, 每组 6 个复孔, 每孔 100 μ L。LPS 组: BV-2 细胞加入 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 孵育 12 h; LPS+儿茶素组: BV-2 细胞用不同浓度的儿茶素 (5、10、20 和 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 共同孵育 12 h。用 ELISA 法检测其上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 的分泌情况。

Transwell 趋化实验 取对数生长期的 BV-2 细胞, 接种于 35 mm 细胞培养皿, 预孵育 12 h 后, 胰酶消化、离心, 用新鲜的完全培养液重悬; 设空白组和 LPS 组; LPS 组分为 5 组, LPS 各组加入 0、5、10、20 和 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 儿茶素, 分别调整细胞数为每毫升 5×10^5 个。各取细胞 200 μ L 置于 transwell 小室上室, 下室以 20 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MMK-1 为趋化剂; CO₂ 培养箱孵育 12 h 后, 弃去培养液, 用 PBS 漂洗 3 次, 甲醇室温固定 10 min, 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DAPI 室温孵育 20 min, PBS 漂洗 3 次, 荧光显微镜下观察计数细胞。实验结果用趋化指数表示, 趋化指数为给药组与空白组细胞个数的比值^[8]。

HE 染色法 取对数生长期的 BV-2 细胞, 接种于 6 孔板中, 培养 12 h 后, 分为空白组、LPS 组和 LPS+儿茶素组。LPS 组: BV-2 细胞加入 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 孵育 12 h; LPS+儿茶素组: BV-2 细胞用 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 儿茶素和 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 共同孵育 12 h。移除培养液, 用 PBS 洗 3 次, 用甲醇固定 10 min, 双蒸水洗涤后, 每孔加入苏木素 1 mL 染色 5 min, 自来水洗涤, 1% 盐酸乙醇分化 10 s 后, 自来水洗涤, 每孔加入伊红 1 mL 染色 2 min, 自来水洗涤后, 显微镜下观察。

Western blot 实验 取对数生长期的 BV-2 细胞, 分为空白组、LPS 组和 LPS+儿茶素组。LPS 组: BV-2 细胞加入 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 孵育 20 min; LPS+儿茶素组:

BV-2 细胞用 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 儿茶素和 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS 共同孵育 20 min。收集各组细胞，使用 RAPI 裂解液，提取总蛋白，Bicinchoninic acid 法检测蛋白浓度。然后，蛋白用 $5\times$ 上样缓冲液配制后，上样量为 $20\sim 40 \mu\text{g}$ ，10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳，采用半干法将蛋白转到 PVDF 膜，5% 脱脂奶粉封闭 2 h，一抗 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜，二抗孵育后，ECL 法曝光。

统计学分析 应用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析。数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。单因素方差分析 (one-way ANOVA) 后，用 Dunnett's test 方法比较组间差异， $P<0.05$ 具有统计意义^[9]。

结果

1 儿茶素对 BV-2 细胞存活的影响

不同浓度儿茶素作用 BV-2 细胞 24、48 和 72 h，没有表现出细胞毒性，且高浓度的儿茶素 (50 和 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)，与空白组相比，能显著促进 BV-2 细胞增殖 (图 1)。结果表明，儿茶素在 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 之内对体外培养的 BV-2 细胞无细胞毒性，为后续实验药物浓度的确定提供了依据。

2 儿茶素对 BV-2 细胞趋化的影响

MG 异常活化后，其表面受体密度急剧增加，介导炎症因子分泌和细胞趋化^[9,10]。因此，甲酰肽受体-2 (formylpeptide receptor-2, FPR2) 的激动剂 MMK-1 可诱导 LPS 刺激的 BV-2 细胞趋化 (图 2)。不同浓度的儿茶素孵育 BV-2 细胞后，与 LPS 组相比，20 和 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 儿茶素可以显著减少 MMK-1 诱导的 BV-2 细胞趋化。

3 儿茶素对 BV-2 细胞炎症因子分泌的影响

与空白组相比，LPS 孵育 BV-2 细胞后，可以使细胞上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 分泌显著升高。不同浓度的儿茶素孵育 BV-2 细胞后，发现与 LPS 组相比，20 和 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 儿茶素可以显著抑制 IL-1 β 和 TNF- α 的分泌 (图 3)。

4 儿茶素对 BV-2 细胞形态的影响

BV-2 细胞经过 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS 处理后，形态发生明显的变化；处理前的 MG 呈现相对静息状态，胞体较小，突出细而长；处理后的细胞，突起回缩并变粗，呈阿米巴样 (图 4)。用 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 儿茶素和 LPS 共同处理 BV-2 细胞 12 h 后，发现儿茶素能够逆转 LPS 引起的 BV-2 细胞形态改变。

5 儿茶素对 BV-2 细胞 NF- κ B 磷酸化的影响

经 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS 刺激后，BV-2 细胞的 NF- κ B/p65 磷酸化增加，而 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 儿茶素可显著下调 NF- κ B/p65 的磷酸化水平 (图 5)。

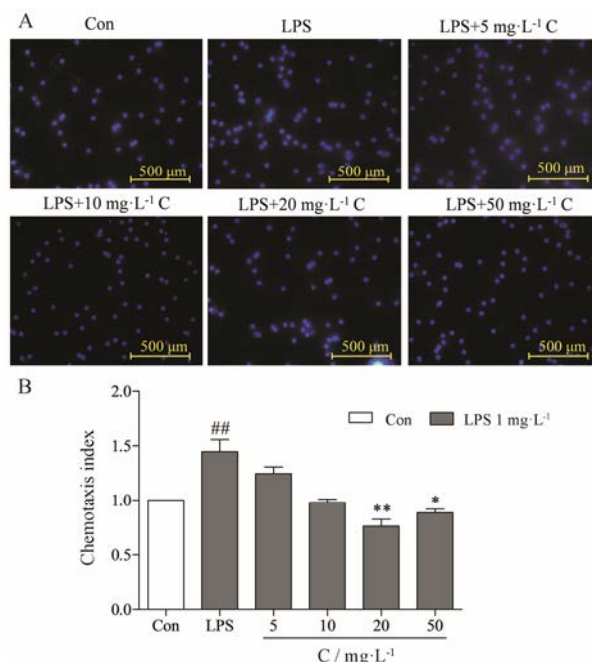


Figure 2 Catechin inhibited BV-2 cells chemotaxis induced by MMK-1. The upper chamber of transwell was placed BV-2 cells which incubated with culture medium, LPS, LPS+catechin ($0, 5, 10, 20$ and $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), and lower chamber contained $20 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MMK-1. Data is exhibited by $\bar{x}\pm s$, and three samples in each group. A: Cell chemotaxis at the concentration of 20 and $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. B: The quantitative analysis of cell chemotaxis. LPS: Lipopolysaccharide. $##P<0.01$ vs Con; $*P<0.05$, $**P<0.01$ vs LPS

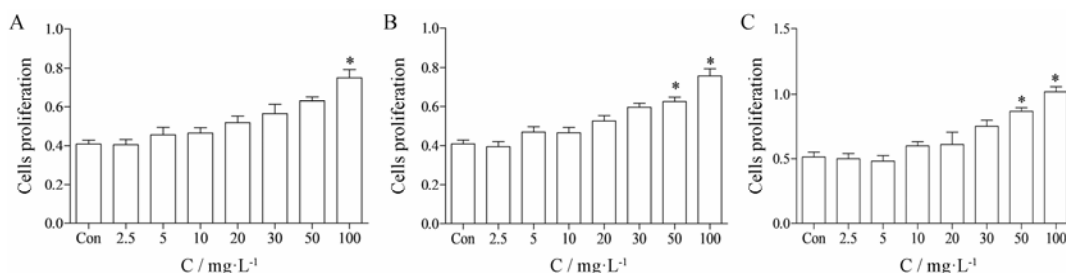


Figure 1 Catechin (C) promoted the viability of BV-2 cells. Data is exhibited by $\bar{x}\pm s$, and three samples in each group. A, B, C are incubated for 24, 48, 72 h, respectively. $*P<0.05$ vs Con

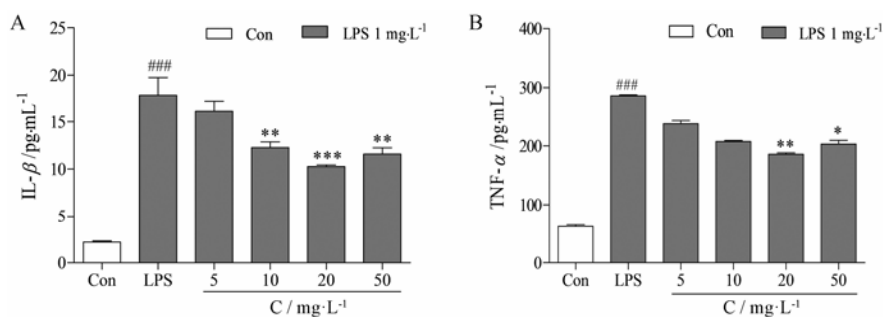


Figure 3 Catechin inhibited the secretion of IL-1 β and TNF- α of BV-2 cells induced by LPS. Data is exhibited by $\bar{x} \pm s$, and three samples in each group. A: The release of IL-1 β ; B: The release of TNF- α . ^{###} $P < 0.001$ vs Con; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$ vs LPS

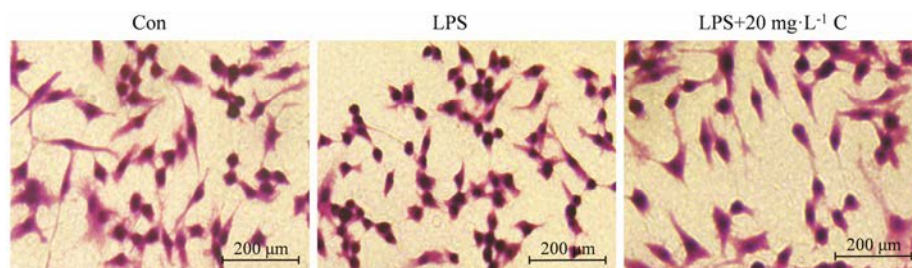


Figure 4 Catechin (20 mg·L⁻¹) reversed the change of BV-2 cell morphology induced by LPS

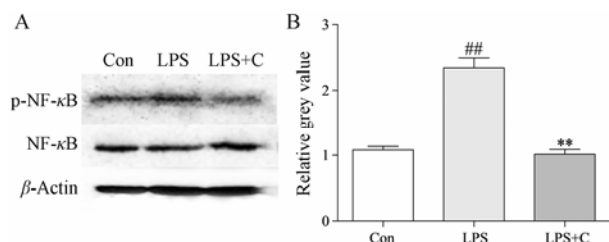


Figure 5 Catechin inhibited the phosphorylation of NF- κ B of BV-2 cells induced by LPS. Data is exhibited by $\bar{x} \pm s$, and three samples in each group. A: Representative bands of phosphorylated NF- κ B; B: The semi-quantitative analysis of protein. ^{##} $P < 0.01$ vs Con; ^{**} $P < 0.01$ vs LPS

讨论

儿茶素广泛分布于植物中,是天然来源的最佳的抗氧化剂之一,具有防癌抗癌、防治心血管疾病和保护神经等多种功能。且关于儿茶素提取分离、含量测定和纯度检查的技术成熟,质量可控;在体内的反应方式、作用路线、代谢过程的研究较为充分;长期深入的基础和临床数据也表明儿茶素及其制剂毒副作用少,安全性高,不易蓄积、残留极少;这些内容增进了人们对儿茶素的认识,将促进儿茶素的开发利用^[10]。本研究在此基础上,从炎症的角度初步探讨了儿茶素对LPS诱导的MG细胞系BV-2活化的影响,为下一步的在体实验提供理论依据,为其开发为预防和治疗神经炎症所致中枢神经系统退行性疾病药物奠定基础。

MG是中枢神经系统的“巡查员”,一旦遭遇异物或有害刺激,MG会被迅速活化,释放大量的细胞因子来发挥免疫和炎症调节作用,能够消除或缓解所牵涉神经组织或细胞的生化代谢紊乱^[11]。但是持续激活的MG会释放过量的炎症因子,促进神经炎症的恶性循环,对正常的神经组织造成损伤。LPS可诱导MG产生一系列的炎症反应,可使MG膜表面炎症相关的受体表达急剧升高,炎症因子分泌增加,促进神经炎症的发生和发展。因此,抑制MG的异常活化和炎症反应对于改善炎性微环境、保护神经元免受损伤,具有重要的临床意义。本研究发现,儿茶素显著抑制炎性BV-2 MG细胞释放炎症因子,影响其炎症受体的功能和核转录因子NF- κ B的磷酸化,说明儿茶素可以通过抑制MG的异常活化,预防和缓解中枢神经系统炎性损伤。

MG细胞异常活化后,TNF- α 和IL-1 β 是其分泌的主要炎性细胞因子,是推动神经炎症的关键因素。TNF- α 不仅是促进多种促炎因子分泌的诱因,还能引起细胞凋亡,诱发炎症级联反应,其在脑部表达量的增多可直接反映神经炎症的严重程度^[12];而IL-1 β 是IL-1家族的重要促炎因子之一,是一种调节蛋白,可通过MG中的NF- κ B磷酸化促进TNF- α 、IL-6、干扰素和趋化因子的分泌,从而诱导神经炎症持续恶化^[13]。本研究发现,儿茶素显著抑制LPS诱导的BV-2细胞分泌TNF- α 和IL-1 β ,进而可以缓解神经炎

症引起的循环恶化。

FPR2 是趋化受体家族中的一员, 是 7 次跨膜的 G 蛋白偶联受体, 由于其遗传和基因的多态性, 具有复杂的功能, 能通过与不同起源和高度结构多样性的配体结合介导炎症和免疫反应^[14]。其特异性的激动剂 MMK-1 可通过 FPR2 趋化和激活中性粒细胞、单核细胞和 T 细胞, 促进 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等细胞因子的分泌, 促进细胞趋化, 发挥促炎的作用^[15]。本研究发现, 儿茶素显著抑制 MMK-1 诱导的 BV-2 细胞趋化, 表明儿茶素可通过抑制 FPR2 的功能, 影响炎症的发生。

近年来, 参与炎症、免疫调节、细胞黏附和趋化的核转录因子 NF- κ B 引起了国内外专家学者的广泛关注。其信号转导通路可被氧化应激、LPS 和细胞因子 (IL-1 β) 等激活, 调控细胞促炎因子、黏附分子和其他转录因子等的生成分泌和活化, 进而介导细胞行为^[16]。因此, 抑制 NF- κ B 的活化, 可以阻断 NF- κ B 介导的细胞炎症反应, 减少炎症对受累神经细胞和组织的损伤。儿茶素可以抑制 NF- κ B 的活化, 说明儿茶素可通过其信号通路影响细胞行为, 但具体的机制还需进一步研究。

综上所述, 儿茶素可以抑制 LPS 诱导的 BV-2 细胞的炎症反应, 其抗炎作用与抑制免疫细胞炎症因子释放、减少炎症细胞趋化和 NF- κ B 磷酸化有关。为探索儿茶素抑制神经炎症作用机制提供了理论依据和实验基础。

References

- [1] Liu HS, Shi HL, Gao YC, et al. Review on the relationship between neuroinflammation and neurodegenerative diseases and the effect of traditional chinese medicine [J]. Acta Univ Tradit Med Sin Pharmacol Shanghai (上海中医药大学学报), 2016, 30: 82–89.
- [2] Huang WL, Yang J, Yang J. Progress of inflammation induced by NLRP3 in cardiovascular disease [J]. Chin J Gerontol (中国老年学杂志), 2016, 36: 6289–6290.
- [3] Tian TD, Yang F, Yue LY, et al. Effect of yanghetang in chemotherapeutic enhancement response among patients of advanced gastric cancer with syndrome of yang deficiency and cancer inflammatory factors Treg and MDSCs [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2016, 22: 160–164.
- [4] Wang XQ, Yu HJ, Zhao YQ. Determination of catechin, epicatechin, resveratrol and procyanidine in dry red wine [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2009, 5: 754–757.
- [5] Xu F, Liu LC. Antiseptic mechanism of tea polyphenol [J]. Chin Med Rep (中国医药导报), 2008, 5: 21–22.
- [6] Li YH, Xie C, Zhang Y, et al. FSD-C10, a fasudil derivative, promotes neuro-regeneration through indirect and direct mechanism [J]. Sci Rep, 2017, 7: 41227.
- [7] Yang XW, Li YH, Zhang H, et al. Safflower yellow regulates microglial polarization and inhibits inflammatory response in LPS-stimulated BV-2 cells [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2016, 29: 54–64.
- [8] Yang JY, Wang Q, Zhao RJ, et al. Identification of oligomer proanthocyanidins (F2) isolated from grape seeds as a formyl peptide receptor 1 partial agonist [J]. Int Immunopharmacol, 2013, 15: 756–763.
- [9] Zhou NN, Zhu R, Zhao XM, et al. Effect and mechanism of gastrodin inhibiting A β -amyloid plaques in brain of mice [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 4: 588–594.
- [10] Chen ZM, Lin Z. Tea and human health: biomedical functions of tea active components and current issues [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2015, 16: 87–102.
- [11] Rice RA, Pham J, Lee RJ, et al. Microglial repopulation resolves inflammation and promotes brain recovery after injury [J]. Glia, 2017, 65: 931–944.
- [12] Jiang Y, An Y, Jiang D, et al. TNF- α regulating interleukin-33 induces acute pancreatic inflammation in rats [J]. Ann Clin Lab Sci, 2016, 46: 54–59.
- [13] Bucher H, Mang S, Keck M, et al. Neutralization of both IL-1 α /IL-1 β plays a major role in suppressing combined cigarette smoke/virus-induced pulmonary inflammation in mice [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2017, 44: 96–105.
- [14] Li Y, Cai L, Wang H, et al. Pleiotropic regulation of macrophage polarization and tumorigenesis by formyl peptide receptor-2 [J]. Oncogene, 2011, 30: 3887–3899.
- [15] Lee HY, Kim H, Lee SY, et al. A membrane-tethering pepducin that inhibits formyl peptide receptor 2-induced signaling [J]. Pharmazie, 2014, 69: 293–296.
- [16] Wang YW, Zhang HH, Wang YL, et al. Effect of huangqin tang on the regulatory NF- κ B p65 signal pathway in rats with ulcerative colitis [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2015, 50: 21–27.