

五味子乙素调控小神经胶质 BV-2 细胞氧化应激损伤的机制研究

吴靖, 常丽英, 肖娟, 续蕾^{*} (襄阳市中心医院神经内科, 湖北 襄阳 441021)

摘要: 目的 研究五味子乙素对 H_2O_2 诱导小神经胶质 BV-2 细胞氧化应激损伤的保护作用, 并探讨其可能的作用机制。方法 体外常规培养 BV-2 细胞, 用 H_2O_2 诱导细胞氧化应激损伤模型, 将细胞分为正常对照组、模型组、五味子乙素 10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组。CCK8 试剂盒检测五味子乙素对细胞存活率的影响, 相关试剂盒检测细胞匀浆中 MDA、NO 含量及 SOD 活性, 免疫印迹方法检测 Jak2、p-Jak2、State3、p-State3、HO-1 及 SOD1 蛋白表达水平。结果 与模型组相比, 不同剂量的五味子乙素可明显增加细胞的存活率、降低氧化应激产物 MDA 及 NO 的释放、增强 SOD 酶活性, 差异均有统计学意义($P<0.05$); 免疫印迹结果显示五味子乙素可明显提高 HO-1、SOD1 蛋白水平, 并抑制 Jak2、State3 的磷酸化水平, 与模型组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 五味子乙素可明显降低 BV-2 细胞的氧化应激损伤, 其作用机制可能与抑制 Jak2/State3 信号通路的活化有关。

关键词: 五味子乙素; BV-2 小神经胶质细胞; 氧化应激; 机制

中图分类号: R285.4 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2018)10-1507-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.10.016

引用本文: 吴靖, 常丽英, 肖娟, 等. 五味子乙素调控小神经胶质 BV-2 细胞氧化应激损伤的机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(10): 1507-1510.

Protective Effects of Schisandrin B on Oxidative Stress in BV-2 Microglial Cells

WU Jing, CHANG Liying, XIAO Juan, XU Lei^{*} (Department of Neurology, Xiangyang Central Hospital, Xiangyang 441021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the protective effect of schisandrin B on BV-2 microglia injury stimulated by H_2O_2 , and investigate its possible mechanism. **METHODS** BV-2 cells were cultured *in vitro* and H_2O_2 was used to induce the oxidative stress model of cells. The cells were divided into 5 groups: control group, model group, schisandrin B treatment groups (10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). CCK8 kit was used to measure the relative survival rate of BV-2 cells and related kits were used to analyze the levels of MDA, NO and the activity of SOD. Western Blot was used to determine the expression levels of Jak2, p-Jak2, State3, p-State3, HO-1 and SOD1. **RESULTS** Compared with model group, the BV-2 cells relative survival rates and the activity of SOD after treatment with different concentrations of schisandrin B were significantly increased, while the expression levels of MDA and NO were significantly decreased ($P<0.05$). The results of Western blot indicated that the expression levels of p-Jak2 and p-State3 were significantly decreased after treatment for schisandrin B, while the levels of HO-1 and SOD1 were greatly increased (all $P<0.05$). **CONCLUSION** Schisandrin B can significantly inhibit the oxidative stress injury of BV-2 cells and its underlying mechanism may involve in suppressing the activation of Jak2/State3 signaling pathway.

KEY WORDS: schisandrin B; BV-2 microglial cells; oxidative stress; mechanism

五味子乙素是提取自中草药五味子的一种活性物质, 属于脂素类物质。五味子乙素具有多种药理作用, 抗氧化应激损伤效果尤为明显^[1-4]。研究表明, 五味子乙素对短暂性局部脑缺血大鼠的神经细胞具有保护作用^[5], 可以明显改善中枢神经系统的功能。氧化应激能够引起生物活性分子的氧化损伤, 导致机体产生过剩的氧自由基和炎症因子的释放, 从而活化更多炎症细胞, 促使机体发生慢性炎症反应。小胶质细胞是中枢神经系统

中固有免疫细胞, 当其被过度激活时会产生大量细胞因子及免疫因子, 导致神经损伤, 进一步诱发氧化应激反应。其中阿尔茨海默症、帕金森病都是由于小胶质细胞活化诱导神经炎症反应引起的神经退行性疾病^[6]。张博等^[7]研究表明 Jak2/State3 信号通路在瘦素诱导小胶质 BV-2 细胞活化过程中发挥重要作用。本实验通过研究五味子乙素对 BV-2 细胞氧化应激损伤的保护作用, 对其可能调控 Jak2/State3 信号通路活化这一机制进

基金项目: 湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队计划项目(T201715)

作者简介: 吴靖, 男, 主治医师 Tel: 13597525066 E-mail: 13597525066@163.com *通信作者: 续蕾, 女, 主治医师 Tel: 13871777640 E-mail: xiaoxu19821982@163.com

行探讨。

1 材料及方法

1.1 材料

小神经胶质 BV-2 细胞(武汉巴菲尔生物科技有限公司);五味子乙素(北京博奥森生物科技有限公司,批号:61281-37-6;纯度:98%);CCK8 试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司,批号:59-20061);丙二醛试剂盒(MDA,深圳宝安康生物科技有限公司,批号:HSP-70);一氧化氮试剂盒(NO,深圳宝安康生物科技有限公司,批号:HPT-64);超氧化物歧化酶试剂盒(SOD,深圳宝安康生物科技有限公司,批号:HTC-40);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(长沙赢润生物科技有限公司,批号:P0006);SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(沈阳万类生物科技有限公司,批号:P0012A);RPMI 1640 培养基(Gibco 公司,批号:HS30809); β -actin、HO-1、SOD1、Jak2、p-Jak2、State3 及 p-State3 一抗均购自英国 Abcam 公司;对应二抗购自上海谷歌生物有限公司。

1.2 仪器

ELX808IU 型酶标仪(美国宝特公司);SW-CJ-1C 型单人超净台(广州沪瑞明仪器有限公司);HERAcell 2401 型细胞培养箱(美国 Thermo 公司);LI-COR ODYSSEY 型(核)双色红外激光成像系统(美国 BIO-RAD);752 型紫外分光光度计(南京科捷分析仪器有限公司)。

1.3 BV-2 细胞培养

将单人超净工作台及相关实验物品紫外光照 30 min,复苏 BV-2 细胞进行传代培养,细胞用 1640 完全培养基(10%胎牛血清,1%的 $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素及 $100\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素)于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养,每隔 2 d 换液 1 次,培养 3~4 d 后进行传代培养,并在倒置显微镜下观察细胞形态,取对数生长期细胞进行后续试验。

1.4 分组及给药

将细胞分为空白对照组、模型组、五味子乙素 10, 20, $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组。采用 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ H}_2\text{O}_2$ 干预 BV-2 细胞构建氧化应激模型。药物与 H_2O_2 同时给予细胞干预 24 h 后进行后续试验。

1.5 细胞存活率试验

取对数期细胞进行消化、离心、重悬、计数后,取适量细胞数接种于 96 孔板中,培养过夜,按“1.4”项下方法分组及给药,培养 24 h 后吸净

旧培养基,每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 含 $10\text{ }\mu\text{L}$ CCK8 试剂的完全培养基,继续于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 1 h,然后在波长 450 nm 处的酶标仪中测定每孔吸光度值。

1.6 细胞匀浆 MDA、NO 及 SOD 检测

取对数期细胞进行消化、离心、重悬、计数后,取适量细胞数接种于 6 孔板中,培养过夜,按“1.4”项下方法分组及给药,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后,收集细胞制备成匀浆,按照试剂盒操作说明书进行 MDA、NO 水平及 SOD 活性检测。

1.7 免疫印迹检测蛋白水平

取对数期细胞进行消化、离心、重悬、计数后,取适量细胞数接种于 6 孔板中,培养过夜,按“1.4”项下方法分组及给药,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后,收集细胞、裂解、离心、收集上清、检测蛋白浓度。然后每孔上样量 $50\text{ }\mu\text{g}$,进行电泳分析、转膜、封闭、孵育一抗(稀释比均为 1:1 000)过夜、洗膜、孵育二抗、洗膜及蛋白表达分析。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析检验, $P<0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 五味子乙素对 BV-2 细胞存活率的影响

采用 CCK8 试剂盒对 BV-2 细胞存活率的检测结果表明,空白对照组,模型组,五味子乙素 10, 20, $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的细胞存活率分别为 100%, $(56.7\pm 2.61)\%$, $(66.3\pm 3.42)\%$, $(74.6\pm 3.92)\%$, $(84.7\pm 4.12)\%$; H_2O_2 可明显降低细胞的存活率,与空白对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$);五味子乙素可明显升高细胞的存活率,并表现出浓度依赖性,各药物组与模型组之间差异均有统计学意义($P<0.05$),药物组两两之间的比较差异也有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 五味子乙素对 BV-2 细胞氧化应激产物的影响

细胞匀浆中的氧化应激产物检测结果见表 1。结果表明, H_2O_2 干预可明显增加 MDA、NO 的水平及抑制 SOD 的活性,与空白对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$);经过不同浓度五味子乙素处理后,匀浆中 MDA、NO 的水平显著降低,而 SOD 酶活性显著升高,与模型组相比差异均有统计学

意义($P<0.05$), 并且随着药物浓度的升高, 3 种指标与 H_2O_2 诱导组之间的差异越显著, 表现出浓度依赖性。

表 1 不同组别间细胞氧化应激产物的比较($n=6$)

Tab. 1 Comparison of oxidative stress parameters in cells among groups($n=6$)

组别	MDA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	NO/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	SOD/ $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$
空白对照组	18.2 $\pm$ 1.9	43.7 $\pm$ 3.5	28.9 $\pm$ 1.8
模型组	42.5 $\pm$ 3.2 ¹⁾	83.3 $\pm$ 5.7 ¹⁾	11.4 $\pm$ 0.4 ¹⁾
五味子乙素组			
10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	34.9 $\pm$ 2.7 ²⁾	71.4 $\pm$ 5.2 ²⁾	17.6 $\pm$ 0.7 ²⁾
20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	27.5 $\pm$ 2.4 ²⁾³⁾	62.7 $\pm$ 4.4 ²⁾³⁾	22.5 $\pm$ 1.3 ²⁾³⁾
40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	22.7 $\pm$ 1.8 ²⁾³⁾⁴⁾	51.2 $\pm$ 3.4 ²⁾³⁾⁴⁾	27.0 $\pm$ 1.7 ²⁾³⁾⁴⁾

注: 与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$; 与 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 五味子乙素组比较, ³⁾ $P<0.05$; 与 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 五味子乙素组比较, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$; compared with 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ schisandrin B group, ³⁾ $P<0.05$; compared with 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ schisandrin B group, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

2.3 五味子乙素对 BV-2 细胞中 HO-1 及 SOD1 表达水平的影响

BV-2 细胞中 NADPH 氧化酶表达水平的检测结果见图 1。结果提示, 模型组细胞中 HO-1 及 SOD1 表达水平均显著低于空白对照组($P<0.05$), 经 3 种浓度五味子乙素处理细胞后, 发现 HO-1 及 SOD1 表达水平相对于模型组明显升高, 差异均有统计学意义($P<0.05$), 并且随着五味子乙素剂量的增加显著性增强, 表现出浓度依赖性。

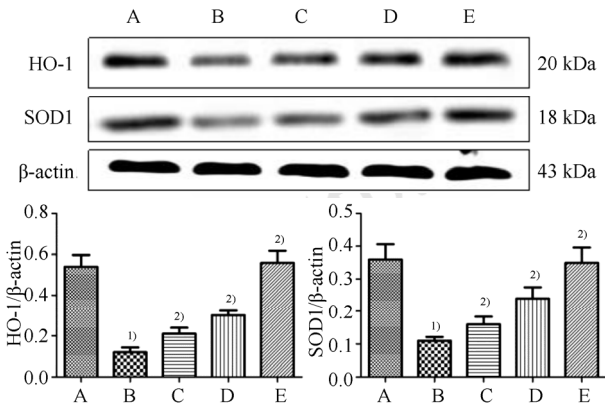


图 1 五味子乙素对 HO-1 及 SOD1 表达水平的影响($n=6$)
A-空白对照组; B-模型组; C-五味子乙素 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; D-五味子乙素 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; E-五味子乙素 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; 与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 1 The effects of schisandrin B on the expression levels of HO-1 and SOD1($n=6$)

A-control group; B-model group; C-schisandrin B 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; D-schisandrin B 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; E-schisandrin B 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$ 。

2.4 五味子乙素对 BV-2 细胞中 Jak2/State3 信号通路活化的影响

五味子乙素对 BV-2 细胞中 Jak2/State3 信号通路的影响见图 2。结果表明, 模型组中 Jak2 及 State3 磷酸化水平显著高于空白对照组($P<0.05$), 说明 H_2O_2 可诱导 Jak2/State3 信号通路活化导致氧化应激。不同剂量药物处理细胞后, Jak2 及 State3 磷酸化水平显著低于 H_2O_2 诱导组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。可见随着药物剂量的增加, Jak2 及 State3 磷酸化水平显著降低, 说明五味子乙素呈浓度依赖性影响 H_2O_2 诱导 BV-2 细胞中 Jak2/State3 信号通路的激活。

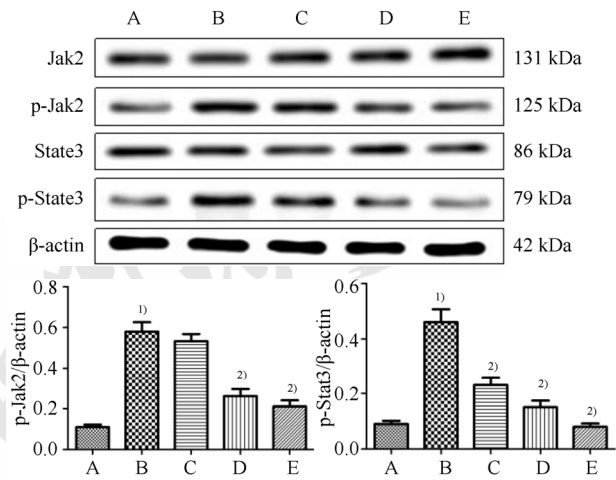


图 2 五味子乙素对 Jak2/State3 信号通路活化的影响($n=6$)
A-空白对照组; B-模型组; C-五味子乙素 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; D-五味子乙素 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; E-五味子乙素 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; 与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 2 The effects of schisandrin B on the activation of Jak2/State3 pathway($n=6$)

A-control group; B-model group; C-schisandrin B 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; D-schisandrin B 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; E-schisandrin B 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$ 。

3 讨论

阿尔茨海默症是一种神经退行性疾病, 与脑组织的氧化损伤相关。五味子为木兰科植物干燥成熟果实, 有益气生津和补肾宁心等作用^[8]; 研究发现木质素类、五味子乙素为其主要的生物活性物质^[9], 有较为明显的抗炎和抗氧化效果^[10]。李昆等^[11]早期研究证实了五味子乙素对体外培养的神经元细胞及阿尔茨海默症小鼠模型的氧化损伤具有保护作用, 但对其作用机制研究不明确。因此, 本实验探讨了五味子乙素对 BV-2 细胞氧化应激损伤的保护作用, 并研究了其可能的作用机制。结果表明五味子乙素可以显著升高 BV-2 细胞的存活

率, 并明显降低了细胞中氧化应激产物 MDA 及 NO 的释放, 显著升高了 SOD 酶活性, 呈现出明显的浓度依赖性。

Jak2/State3 是 Jak/State 家族成员, 也是研究较为清楚的信号传导通路^[12]。Jak2/State3 信号传导调控着细胞氧化损伤、增殖、分化及凋亡等过程^[13-14]。而在心肌细胞的氧化损伤过程中, 发现 Jak2/State3 通路活化可明显抑制线粒体抗氧化合酶的产生并诱导了氧化应激损伤^[15-16]。然而, Jak2/State3 信号通路在五味子乙素作用 BV-2 细胞氧化应激损伤中的调控作用未见相关报道。本研究发现 H₂O₂ 可明显诱导 BV-2 细胞的氧化应激, 并激活细胞中 Jak2/State3 信号通路, 引起氧化应激损伤, 但经过不同剂量的五味子乙素处理后, 可明显降低氧化应激相关产物的释放, 并且还抑制了 Jak2/State3 信号通路的活化。

BV-2 细胞中存在多种抗氧化酶, 如 SOD1、HO-1 及 GSH-Px 等, 它们能清除活性氧, 保护细胞免受氧化应激损伤^[17]。为研究五味子乙素是否可以介导调控抗氧化酶活性来抵抗氧化应激产物的生成, 本实验检测 SOD1 及 HO-1 蛋白的表达水平, 结果显示 H₂O₂ 可明显抑制 SOD1 及 HO-1 蛋白的表达, 而经过不同浓度药物处理 BV-2 细胞后, SOD1 及 HO-1 蛋白表达水平显著升高, 从而抑制氧化应激产物的释放, 降低了氧化应激损伤。本研究提示五味子乙素具有潜在的保护小胶质神经细胞免于氧化应激损伤的作用, 为五味子乙素的临床应用提供了实验依据。

REFERENCES

- [1] JIANG E P, LI H, YU C R, et al. Schisandrin B protects PC12 cells against oxidative stress of neurodegenerative diseases [J]. *Neuroreport*, 2015, 26(6): 360-366.
- [2] GIRIDHARAN V V, THANDAVARAYAN R A, ARUMUGAM S, et al. Schisandrin B ameliorates ICV-infused amyloid β induced oxidative stress and neuronal dysfunction through inhibiting RAGE/NF- κ B/MAPK and up-regulating HSP/Beclin expression [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142483.
- [3] THANDAVARAYAN R A, GIRIDHARAN V V, ARUMUGAM S, et al. Schisandrin B prevents doxorubicin induced cardiac dysfunction by modulation of DNA damage, oxidative stress and inflammation through inhibition of MAPK/p53 signaling [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119214.

- [4] GIRIDHARAN V V, THANDAVARAYAN R A, BHILWADE H N, et al. Schisandrin B, attenuates cisplatin-induced oxidative stress, genotoxicity and neurotoxicity through modulating NF- κ B pathway in mice [J]. *Free Radic Res*, 2012, 46(1): 50-60.
- [5] LEE T H, JUNG C H, LEE D H. Neuroprotective effects of Schisandrin B against transient focal cerebral ischemia in Sprague-Dawley rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(12): 4239-4245.
- [6] YU Z W, BAO Z J, RUAN Q W, et al. Oxi-inflamm-aging and its association with the polymorphism of ApoE genes [J]. *Acta Physiol Sin*(生理学报), 2013, 65(3): 338-346.
- [7] 张博. 瘦素对小胶质细胞炎症反应调节的研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2016.
- [8] YU Y, LAI Q. Study on Activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 pathway with Fructus Schisandrae extracts medicated by kinase pathways such as extracellular signal-regulated kinase [J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med*(广州中医药大学学报), 2014, 31(6): 957-962.
- [9] 肖瑞颖, 王伟, 钱俊峰. 五味子不同产地、部位及提取工艺对木脂素成分含量影响的研究[J]. *天津药学*, 2016, 28(5): 8-11.
- [10] THANDAVARAYAN R A, GIRIDHARAN V V, ARUMUGAM S, et al. Schisandrin B prevents doxorubicin induced cardiac dysfunction by modulation of DNA damage, oxidative stress and inflammation through inhibition of MAPK/p53 signaling [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119214.
- [11] LI K, LI J R, ZHANG J Y, et al. Anti-oxidative damage effect in Schisandrin B in mice of Alzheimer's disease and its mechanism [J]. *J Jilin Univ(Med Ed)*(吉林大学学报: 医学版), 2017, 43(3): 582-588.
- [12] KURDI M, BOOZ G W. JAK redux: a second look at the regulation and role of JAKs in the heart [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 297(5): H1545-H1556.
- [13] BARRY S P, TOWNSEND P A, LATCHMAN D S, et al. Role of the JAK-STAT pathway in myocardial injury [J]. *Trends Mol Med*, 2007, 13(2): 82-89.
- [14] BOENGLER K, HILFIKER-KLEINER D, DREXLER H, et al. The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure [J]. *Pharmacol Ther*, 2008, 120(2): 172-185.
- [15] DUAN W, YANG Y, YAN J, et al. The effects of curcumin post-treatment against myocardial ischemia and reperfusion by activation of the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Basic Res Cardiol*, 2012, 107(3): 263-269.
- [16] YANG Y, DUAN W, JIN Z, et al. JAK2/STAT3 activation by melatonin attenuates the mitochondrial oxidative damage induced by myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *J Pineal Res*, 2013, 55(3): 275-286.
- [17] ZHANG J, FU B, ZHANG X, et al. Bicyclol upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia [J]. *Brain Res Bull*, 2014, 100: 38-43.

收稿日期: 2017-08-28

(本文责编: 曹粤锋)