

洋川芎内酯 I 通过调控 Nrf2 表达对脂多糖诱导的星形胶质细胞活化及功能的影响

曹好好, 刘 涛, 许美霞*
(武汉市第四医院重症医学科, 湖北 武汉 430033)

摘要: **目的** 探讨洋川芎内酯 I 对脂多糖 (LPS) 诱导的星形胶质细胞的活化及功能的影响及其机制。**方法** 以不同浓度洋川芎内酯 I (20、50、100 $\mu\text{mol/L}$) 及核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 特异性通道阻滞剂 ML385 (10 $\mu\text{mol/L}$) 干预 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) 诱导的星形胶质细胞。采用 CCK-8 法检测星形胶质细胞活性, 免疫荧光法检测细胞 GFAP 表达, Western blot 法检测细胞神经胶质酸性蛋白 (GFAP)、Nrf2、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 表达, Grisse 法检测培养上清液中一氧化氮 (NO) 水平, 比色法检测细胞超氧化物歧化酶 (SOD) 活性及丙二醛 (MDA) 水平。**结果** 与对照组比较, LPS 组星形胶质细胞活性升高 ($P<0.01$), GFAP 荧光强度增加, GFAP、iNOS 蛋白表达及 MDA、NO 水平升高 ($P<0.01$), Nrf2 蛋白表达和 SOD 活性降低 ($P<0.01$); 与 LPS 组比较, LPS+洋川芎内酯 I 各浓度组细胞活性降低 ($P<0.01$), MDA、NO 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), SOD 活性升高 ($P<0.01$), LPS+洋川芎内酯 I 50 $\mu\text{mol/L}$ 组 GFAP 荧光强度减弱, GFAP、iNOS 蛋白表达降低 ($P<0.01$), Nrf2 蛋白表达升高 ($P<0.01$), LPS+ML385 组细胞活性升高 ($P<0.01$), GFAP 荧光强度增加, GFAP、iNOS 蛋白表达及 MDA、NO 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), Nrf2 蛋白表达和 SOD 活性降低 ($P<0.05$); 与 LPS+洋川芎内酯 I 组比较, LPS+洋川芎内酯 I+ML385 组细胞活性升高 ($P<0.01$), GFAP 荧光强度增加, GFAP、iNOS 蛋白表达及 MDA、NO 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), Nrf2 蛋白表达和 SOD 活性降低 ($P<0.01$)。**结论** 洋川芎内酯 I 可抑制 LPS 刺激引起的星形胶质细胞过度活化, 上调 Nrf2 表达, 减少星形胶质细胞氧化应激产物的分泌, 从而起到调控星形胶质细胞功能的作用。

关键词: 洋川芎内酯 I; 脓毒症; 星形胶质细胞; Nrf2

中图分类号: R285.5 文献标志码: B 文章编号: 1001-1528(2024)01-0268-04
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.01.046

脓毒症所致脑功能障碍 (sepsis-induced brain dysfunction, SIBD) 是一种弥漫性脑功能障碍, 由非中枢神经系统感染的脓毒症所致, 因此也被称为脓毒症相关性脑病 (sepsis-associated encephalopathy, SAE), 是脓毒症患者严重的中枢神经系统并发症^[1]。近年来, 临床上发现合并 SAE 的患者预后明显变差^[2], 是决定脓毒症死亡率的关键因素之一^[3-4]。然而, 对于 SAE 的治疗, 临床上尚没有特异性的诊断和治疗手段。血脑屏障 (BBB) 完整性破坏是 SAE 发展的关键因素^[5]。星形胶质细胞是 BBB 的重要组成部分, 在维持中枢神经系统的稳态和功能中扮演着十分重要的角色^[6]。Nrf2 被认为是细胞对抗氧化损伤最重要的作用机制之一^[7]。多项研究证实, 川芎的多种有效成分能透过 BBB, 有效减轻炎症因子和氧化应激对脑组织的损伤^[8-10]。但目前该药物成分洋川芎内酯 I 针对星形胶质细胞功能调节作用及其分子机制的研究尚未见报道。因此,

本研究通过 LPS 刺激星形胶质细胞并检测相关指标, 探讨洋川芎内酯 I 对星形胶质细胞功能的影响及机制, 以期为川芎在脓毒症脑病治疗方面提供理论参考。

1 材料

1.1 细胞 大鼠神经星形胶质细胞 (货号 CP-R137) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司, 用含 10% 胎牛血清及双抗的培养液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中进行培养, 按时更换新培养液。

1.2 试剂与药物 洋川芎内酯 I (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 货号 S412878)。Nrf2 特异抑制剂 ML385 (美国 MCE 公司, 货号 846657-71-9)。胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 货号 10270-106); 大鼠星形胶质细胞完全培养基 (武汉普诺赛生命科技有限公司, 货号 CM-R137); 脂多糖 (美国 Sigma 公司, 货号 L3012); 一氧化氮检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 货号 S0021S); 兔抗

收稿日期: 2023-06-01
基金项目: 湖北省卫健委医学科科研项目 (WJ2019M022); 武汉市卫健委医学科科研项目 (WZ21Q32)
作者简介: 曹好好 (1983—), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向为脓毒症所致器官功能障碍。Tel: 13429888050, E-mail: hhcao8050@163.com
* 通信作者: 许美霞 (1982—), 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向为脓毒症所致器官功能障碍。Tel: (027) 68831578, E-mail: 157006188@qq.com

GFAP 多克隆抗体、Nrf2 多克隆抗体、HRP 标记羊抗兔 IgG (武汉贝茵莱生物科技有限公司, 货号 PAB36507、PAB30175、SAB43732); 兔抗 iNOS 多克隆抗体 (英国 Abcam 公司, 货号 ab283655); CCK-8 试剂 (北京索莱宝科技有限公司, 货号 CA1210); MDA 检测试剂盒、SOD 活性检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所有限公司, 货号 A003-1-2、A001-3-2)。

2 方法

2.1 分组 星形胶质细胞以 1.0×10^5 /mL 的密度接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后分为①对照组, 培养基培养, 不作任何处理; ②LPS 组, 1 μ g/mL LPS 干预 24 h; ③LPS+不同浓度洋川芎内酯 I 组, 分别以 20、50、100 μ mol/L 洋川芎内酯 I 与 1 μ g/mL LPS 共同干预 24 h; ④LPS+ML385 组, 先用终浓度为 10 μ mol/L 的 ML385 预处理 24 h, 再予以 1 μ g/mL LPS 共同干预 24 h; ⑤LPS+洋川芎内酯 I+ML385 组, 用终浓度为 10 μ mol/L 的 ML385 预处理 24 h, 再予以 50 μ mol/L 洋川芎内酯 I 和 1 μ g/mL LPS 共同干预 24 h。

2.2 CCK-8 法检测星形胶质细胞活性 将星形胶质细胞混悬液按每孔 3.0×10^3 个细胞的密度接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养过夜, 按“2.1”项下方法处理细胞, 培养 24 h。取出细胞培养板, 每孔加入 10 μ L CCK8 溶液, 继续培养 4 h, 使用酶联免疫检测仪在 450 nm 波长处测量各孔光密度 (OD) 值。

2.3 Western blot 法检测星形胶质细胞 GFAP、Nrf2、iNOS 蛋白表达 从星形胶质细胞裂解液中分离出总蛋白, BCA 试剂盒测定浓度, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳后转移至 PVDF 膜上, 5% BSA 封闭后加入一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBST 洗涤 3 次, 加入二抗室温孵育 1 h, ECL 显影。以 GAPDH 为内参, 通过 Image J 软件分析条带灰度值, 计算目的蛋白相对表达量。

2.4 Griess 法检测细胞培养上清液 NO 水平 细胞按“2.1”项下方法处理, 培养 24 h 后收集上清液, 按试剂盒说明书检测 NO 水平。

2.5 比色法检测细胞 SOD 活性和 MDA 水平 细胞按“2.1”项下方法处理, 培养 24 h 后与 0.1 mol/L TBA、0.05 mmol/L EDTA 溶液混合, 加入 1% TritonX100 50 μ L, 置于振荡器上反应 1 min, 再加入 100 μ L HPO₃ 溶液, 将蛋白沉淀于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 严格按照相应试剂盒说明书操作, 检测 SOD 活性及 MDA 水平。

表 1 洋川芎内酯 I 对星形胶质细胞 SOD 活性和 MDA、NO 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

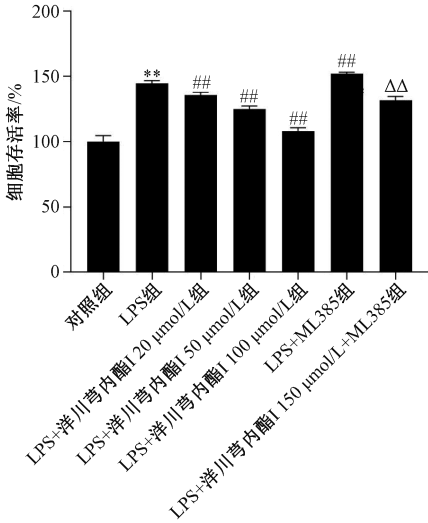
组别	SOD/(U·mg prot ⁻¹)	MDA/(nmol·mg prot ⁻¹)	NO/(μ mol·L ⁻¹)
对照组	63.90 $\pm$ 0.13	3.73 $\pm$ 0.15	11.12 $\pm$ 0.18
LPS 组	47.02 $\pm$ 0.83 **	9.01 $\pm$ 0.30 **	20.37 $\pm$ 0.34 **
LPS+洋川芎内酯 I 20 μ mol/L 组	51.35 $\pm$ 1.11 ##	8.52 $\pm$ 0.32 #	18.71 $\pm$ 0.46 ##
LPS+洋川芎内酯 I 50 μ mol/L 组	58.05 $\pm$ 1.18 ##	7.08 $\pm$ 0.27 ##	15.11 $\pm$ 0.31 ##
LPS+洋川芎内酯 I 100 μ mol/L 组	62.25 $\pm$ 0.69 ##	6.21 $\pm$ 0.24 ##	11.65 $\pm$ 0.32 ##
LPS+ML385 组	45.71 $\pm$ 0.92 #	9.40 $\pm$ 0.29 #	21.64 $\pm$ 0.36 ##
LPS+洋川芎内酯 I 50 μ mol/L+ML385 组	50.59 $\pm$ 0.92 ## $\Delta\Delta$	8.83 $\pm$ 0.45 $\Delta\Delta$	19.63 $\pm$ 0.44 ## $\Delta\Delta$

注: 与对照组比较, ** $P<0.01$; 与 LPS 组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; 与 LPS+洋川芎内酯 I 50 μ mol/L 组比较, $\Delta\Delta$ $P<0.01$ 。

2.6 统计学分析 通过 SPSS 22.0 软件进行处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 2 组间比较采用 t 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 洋川芎内酯 I 对星形胶质细胞活性的影响 如图 1 所示, 与对照组比较, LPS 组细胞活性增加 ($P<0.01$); 与 LPS 组比较, LPS+ML385 组细胞活性增加 ($P<0.01$), LPS+洋川芎内酯 I 不同浓度组细胞活性降低 ($P<0.01$); 与 LPS+洋川芎内酯 I 50 μ mol/L 组比较, LPS+洋川芎内酯 I+ML385 组细胞活性升高 ($P<0.01$)。



注: 与对照组比较, ** $P<0.01$; 与 LPS 组比较, ## $P<0.01$; 与 LPS+洋川芎内酯 I 50 μ mol/L 组比较, $\Delta\Delta$ $P<0.01$ 。

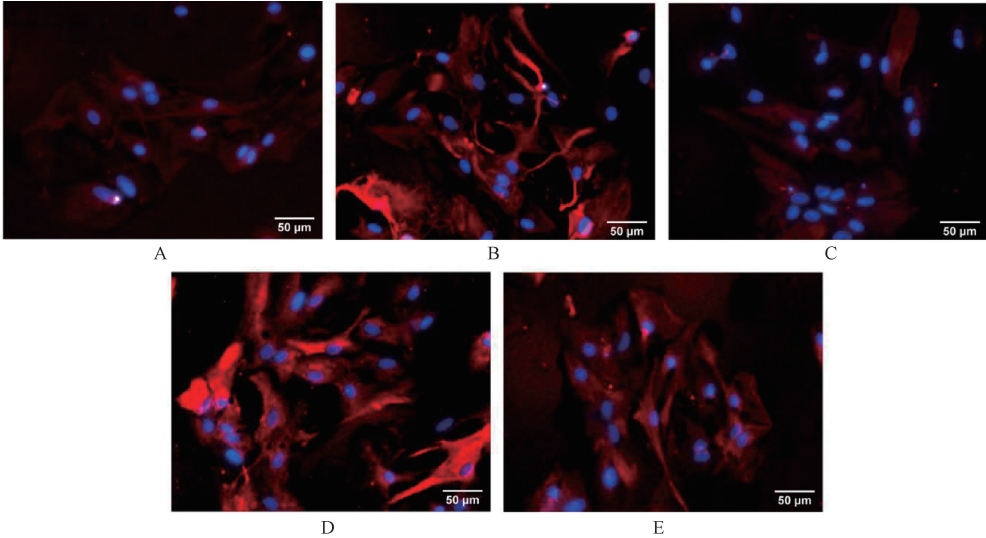
图 1 洋川芎内酯 I 对星形胶质细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

3.2 洋川芎内酯 I 对星形胶质细胞 SOD 活性和 MDA、NO 水平的影响 如表 1 所示, 与对照组比较, LPS 组细胞 SOD 活性降低 ($P<0.01$), MDA、NO 水平升高 ($P<0.01$); 与 LPS 组比较, LPS+ML385 组细胞 SOD 活性降低 ($P<0.01$), MDA、NO 水平升高 ($P<0.01$), LPS+洋川芎内酯 I 不同浓度组细胞 SOD 活性升高 ($P<0.01$), MDA、NO 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与 LPS+洋川芎内酯 I 50 μ mol/L 组比较, LPS+洋川芎内酯 I+ML385 组细胞 SOD 活性降低 ($P<0.01$), MDA、NO 水平升高 ($P<0.01$)。

由此可知, 洋川芎内酯 I 在 20~100 μ mol/L 浓度范围内对 LPS 诱导的星形胶质细胞均有较好的保护作用, 故选择 50 μ mol/L 进行后续机制探索。

3.3 洋川芎内酯 I 对星形胶质细胞 GFAP 荧光表达的影响 如图 2 所示,与对照组比较,LPS 组细胞 GFAP 荧光强度增强;与 LPS 组比较,LPS+ML385 组细胞 GFAP 荧光强

度增强,LPS+洋川芎内酯 I 组细胞 GFAP 荧光强度减弱;与 LPS+洋川芎内酯 I 组比较,LPS+洋川芎内酯 I+ML385 组 GFAP 荧光强度增强。

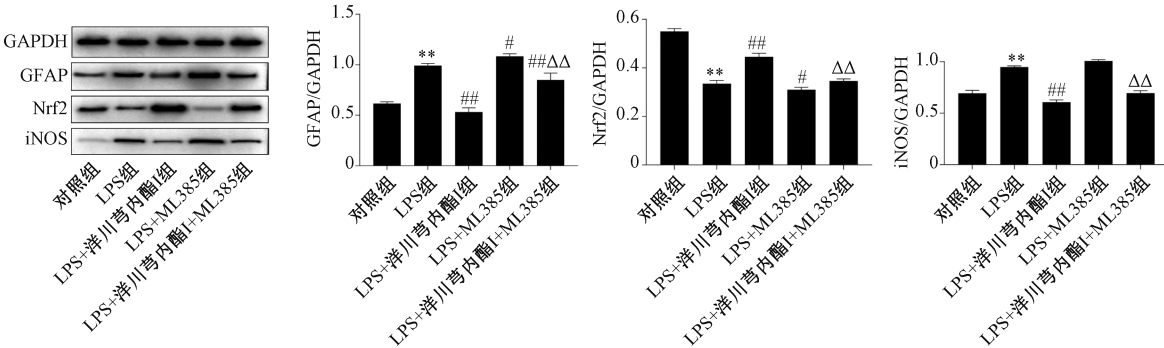


注: A 为对照组, B 为 LPS 组, C 为 LPS+洋川芎内酯 I 组, D 为 LPS+ML385 组, E 为 LPS+洋川芎内酯 I+ML385 组。

图 2 各组星形胶质细胞 GFAP 免疫荧光反应

3.4 洋川芎内酯 I 对星形胶质细胞 GFAP、Nrf2、iNOS 蛋白表达的影响 如图 3 所示,与对照组比较,LPS 组细胞 GFAP、iNOS 蛋白表达升高 ($P<0.01$), Nrf2 蛋白表达降低 ($P<0.01$);与 LPS 组比较,LPS+ML385 组细胞 GFAP、iNOS 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), Nrf2 蛋白表达降

低 ($P<0.05$), LPS+洋川芎内酯 I 组细胞 GFAP、iNOS 蛋白表达降低 ($P<0.01$), Nrf2 蛋白表达升高 ($P<0.01$);与 LPS+洋川芎内酯 I 组比较,LPS+洋川芎内酯 I+ML385 组 GFAP、iNOS 蛋白表达升高 ($P<0.01$), Nrf2 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。



注:与对照组比较,** $P<0.01$;与 LPS 组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与 LPS+洋川芎内酯 I 组比较,ΔΔ $P<0.01$ 。

图 3 洋川芎内酯 I 对星形胶质细胞 GFAP、Nrf2、iNOS 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

4 讨论

目前认为,血脑屏障破坏和氧化应激是 SAE 重要的病理生理基础,各种损伤因素如感染、炎症、颅脑损伤、卒中、神经退行性疾病等,均会导致星形胶质细胞活化。一方面,活化的星形胶质细胞通过延长足突、迁移,对 BBB 起到直接的物理支持作用,还能分泌如血管生成素-1 (ANG-1)、胶质源性神经营养因子 (GDNF) 的一些保护性细胞因子^[11]。脓毒症时,炎性因子、活性氧族 (ROS) 和活性氮族 (RNS) 持续大量产生,直接造成星形胶质细胞损伤,导致血脑屏障物理结构被破坏。另一方面,过度活

化的星形胶质细胞不仅会持续、大量分泌炎症因子,而且在氧化应激反应过程中产生的各种自由基通过激活多种炎症信号通路,又进一步刺激星形胶质细胞释放炎症因子。此外,过度活化的星形胶质细胞还能分泌包括血管内皮生长因子、NO 和内皮素等活性因子,通过不同方式造成 BBB 破坏^[12-13]。

氧化应激是破坏血脑屏障的重要因素。有研究表明,脓毒症患者的长期认知功能障碍与脓毒症早期即出现的氧化应激有关^[14]。Nrf2 在对抗氧化损伤的过程中扮演着关键角色。冯竞成、徐革等^[15-16]研究表明,上调 Nrf2 介导的抗

氧化通路对大鼠血脑屏障具有保护作用。另有研究显示，上调 Nrf2/HO-1 表达可使星形胶质细胞发生具有保护作用的反应性增生^[17]。本实验结果显示，LPS 诱导星形胶质细胞的活性增加，细胞活化的主要标志蛋白 GFAP 表达升高，同时细胞内 iNOS 表达上调，SOD 活性降低，MDA 和 NO 水平升高。川芎有效成分在治疗脓毒症方面的研究也有较多报道^[18-19]。洋川芎内酯 I 是一种从川芎中提取出的单体。本实验结果显示，以不同浓度的洋川芎内酯 I 干预后，星形胶质细胞活性降低，GFPA、iNOS 表达下调，Nrf2 表达上调，SOD 活性升高，MDA 和 NO 水平降低；在同时加入 Nrf2 特异性阻滞剂 ML385 后，洋川芎内酯 I 的保护作用被减弱，提示洋川芎内酯 I 可能是通过上调 Nrf2 表达起到对 LPS 诱导的星形胶质细胞的保护作用，因 ML385 并不能完全抑制洋川芎内酯 I 这种保护作用，提示洋川芎内酯 I 可能还通过其他通路同时发挥保护作用。

综上所述，洋川芎内酯 I 可减轻 LPS 诱导的星形胶质细胞的过度活化，减轻氧化应激产物的释放，增加抗氧化产物的表达，其机制可能与上调 Nrf2 表达有关，但仍需大量实验研究加以确定。

参考文献：

[1] Wilson J X, Young G B. Progress in clinical neurosciences: sepsis-associated encephalopathy: evolving concepts[J]. *Can J Neurol Sci*, 2003, 30(2): 98-105.

[2] Pytel P, Alexander J J. Pathogenesis of septic encephalopathy [J]. *Curr Opin Neurol*, 2009, 22(3): 283-287.

[3] Kübler A, Adamik B, Ciszewicz-Adamiczka B, *et al.* Severe sepsis in intensive care units in Poland-a point prevalence study in 2012 and 2013 [J]. *Anaesthesiol Intensive Ther*, 2015, 47(4): 315-319.

[4] Lonneke A, Van V, Peter M C, *et al.* Incidence, risk factors, and attributable mortality of secondary infections in the intensive care unit after admission for sepsis[J]. *J Am Med Assoc*, 2016, 315(14): 1469-1479.

[5] Kuperberg S J, Wadgaonkar R. Sepsis-associated encephalopathy: the blood-brain barrier and the sphingolipid rheostat[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 597.

[6] Daneman R, Engelhardt B. Brain barriers in health and disease [J]. *Neurobiol Dis*, 2017, 107: 1-3.

[7] Zhao B, Wang Z, Han J, *et al.* Rhizoma Paridis total saponins alleviate H₂O₂ induced oxidative stress injury by upregulating the Nrf2 pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(1): 220-228.

[8] 胡鹏翼. 以体外细胞模型研究川芎活性成分调控天麻素等苷类成分透过血脑屏障的作用及机制[D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.

[9] 左爱华, 程孟春, 王 莉, 等. 川芎吸收入脑成分的 UPLC-Q-TOF-MS 分析[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(23): 3647-3650.

[10] 盛艳梅, 孟宪丽, 李春雨, 等. 川芎挥发油对大鼠大脑皮层神经细胞体外存活及脑缺血再灌注损伤的影响[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(3): 536-538.

[11] Bonsack B, Borlongan M C, Lo E H, *et al.* Brief overview: Protective roles of astrocyte-derived pentraxin-3 in blood-brain barrier integrity[J]. *Brain Circ*, 2019, 5(3): 145-149.

[12] Michinaga S, Koyama Y. Dual roles of astrocyte-derived factors in regulation of blood-brain barrier function after brain damage [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(3): 571.

[13] Shulyatnikova T, Verkhratsky A. Astroglia in sepsis associated encephalopathy[J]. *Neurochem Res*, 2020, 45(1): 83-99.

[14] Schwalm M T, Pasquali M, Miguel S P, *et al.* Acute brain inflammation and oxidative damage are related to long-term cognitive deficits and markers of neurodegeneration in sepsis-survivor rats[J]. *Mol Neurobiol*, 2014, 49(1): 380-385.

[15] 冯竞成, 于 洋, 毛 幸, 等. 氢对脓毒症相关性脑病小鼠血脑屏障的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2018, 38(6): 719-722.

[16] 徐 革, 于 洋, 杨 曼, 等. 氢气对野生型及 Nrf2 基因敲除型脓毒症小鼠血脑屏障损伤和认知功能障碍的影响[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2020, 26(3): 409-415.

[17] 李泽惠. 参麻益智方调控星形胶质细胞改善 VaD 大鼠认知功能研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2020.

[18] 张晓娟, 张燕丽, 左冬冬. 川芎的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中医药信息, 2020, 37(6): 128-133.

[19] 杨 潇, 任 凯, 贾婷婷, 等. 中医药治疗脓毒症的研究进展[J]. 中国中医急症, 2020, 29(5): 933-936.