论著·中药研究

大黄酸对内毒素激活小胶质细胞的影响*

景浩然，柴丽娟，郭　虹，李美娇，刘青青，王少峡

摘要：[目的] 旨在观察大黄酸对小胶质细胞细胞株的作用。[方法] 培养小胶质细胞细胞株，检测大黄酸对小胶质细胞活力及内毒素（LPS）诱导小胶质细胞一氧化氮（NO）产生的影响。[结果] 大黄酸可以在不影响细胞活力的情况下抑制 NO 在激活小胶质细胞中的产生。[结论] 大黄酸可以抑制 LPS 对小胶质细胞的激活。

关键词：大黄酸；小胶质细胞；炎性反应
中图分类号：R285.5　　文献标识码：A　　文章编号：1673-9043(2012)01-0034-02

抑制小胶质细胞的过度活化，平衡其分泌的各种促炎因子，是防治中风、神经退行性疾病的重要途径[1-2]。

大黄具有抗炎、抗肿瘤、恢复肾功能、保肝利胆等作用，在预防和治疗多器官功能不全综合征、全身性炎症反应综合征和多器官功能紊乱综合征方面亦有显著疗效[3-4]。本研究旨在观察大黄酸对小胶质细胞的作用，阐明其神经保护机制。

1　材料与方法

1.1　实验材料　小鼠小胶质细胞 BV-2 株购自中国医学科学院基础研究所。

1.2　主要试剂　大黄酸购自天津市药检所。DMEM 培养基、胎牛血清（FBS）、双抗、胰蛋白酶购自 Invitrogen 公司，Greiss 法 NO 检测试剂盒购自 Promega 公司。

1.3　BV-2 小鼠小胶质细胞株的培养　培养于 DMEM+10%FBS+双抗培养液中，每 3 天胰酶消化传代。培养条件：5%CO_2、95%空气，37℃饱和湿度。

1.4　噻唑兰比色法（MTT）测定细胞活力　不同浓度的大黄酸处理小胶质细胞 24 h 后，弃去培养液，加入 MTT（0.5 mg/mL），继续孵育 4 h，弃上清液，加 DMSO 溶解后，酶标仪（分子仪器公司，FlexSation）570 nm 波长读取 OD 值。

1.5　Greiss 法检测 NO 的含量　不同浓度的大黄酸预处理小胶质细胞 0.5 h 后，加入 0.1 μg/mL 的内毒素（LPS），大黄酸和 LPS 共同孵育 24 h 后 Greiss 法检测 NO 的含量。取 50 μL 细胞培养上清液加入 96 孔平底酶标板中，依次加入氨基苯磺酸，萘基乙二胺，室温避光孵育 10 min，酶标仪 535 nm 波长读取 OD 值。

1.6　数据分析　计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析，组间比较采用单因素方差分析，$P<0.05$ 具有统计学意义。

2　结果

2.1　大黄酸对小胶质细胞性的影响　大黄酸（0.1、1、5、10 μmol/L）处理小胶质细胞 24 h 后，MTT 检测小胶质细胞活性。结果显示大黄酸（0.1、1、5、10 μmol/L）范围内对小胶质细胞没有细胞毒性，见图 1。

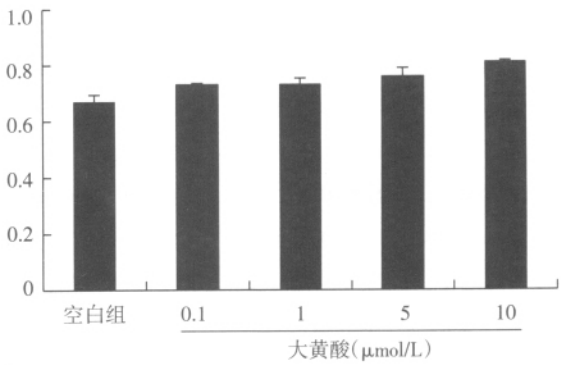

图 1　大黄酸对小胶质细胞活性的影响

大黄酸对小胶质细胞活性没有影响。$n=6$。重复 3 次，趋势一致。

2.2　大黄酸对 LPS 诱导的 NO 生成的影响　LPS 处理小胶质细胞 24 h 后，细胞培养液中 NO 含量较

* 基金项目：国家自然科学基金青年项目（81001654）；天津市卫生局科技基金（2010KZ120）。
作者单位：300193　天津中医药大学中医药研究院，天津市中药药理学重点实验室，教育部方剂学重点实验室
作者简介：景浩然（1987-），女，硕士在读，主要研究方向为药理学专业。
通讯作者：王少峡。

空白对照组显著升高近3倍（$P<0.01$）。与LPS组比较，0.1、1、5、10 μmol/L的大黄酸可不同程度显著抑制NO分泌，且呈良好的量效关系，见图2。

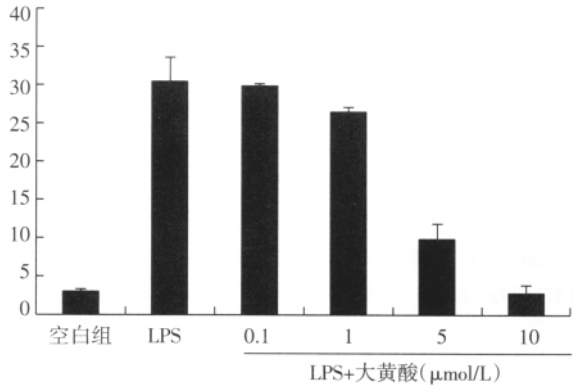

图2 大黄酸对LPS诱导的小胶质细胞NO分泌的影响

大黄酸抑制LPS诱导的小胶质细胞NO的分泌。$n=6$。重复3次，趋势一致。

3 讨论

本研究中，对照组小胶质细胞分泌的NO水平很低，而强致炎因子LPS刺激后，NO含量都增加近3倍，与报道相一致[5]，说明小胶质细胞的免疫性在体外得到很好的保持。

正常成熟大脑中的小胶质细胞为静息态，当遇到神经元碎屑、死亡细胞或中枢神经系统损伤后，静息态的小胶质细胞变为激活态，可迁移到组织溃变区，并作出不同的适应性反应,如膜受体密度迅速增加，分泌因子和吞噬细胞碎片等。活化的小胶质细胞所产生的大多数物质如NO、活性氧、白介素-1β（IL-1β）等，都具有神经毒性，可导致神经元死亡。其中NO-亚硝酸盐是淀粉样蛋白和LPS激活小胶质细胞神经毒性的主要介导者[6]。本研究发现，大黄酸可以抑制在激活小胶质细胞中产生的NO，这在平衡小胶质细胞炎性反应的研究中具有特别的意义，可能也是大黄酸的神经保护作用机制之一。

参考文献：

[1] Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain[J]. Nat Neurosci, 2007, 10(11): 1387-1394.

[2] Jang S, Kelley KW, Johnson RW. Luteolin reduces IL-6 production in microglia by inhibiting JNK phosphorylation and activation of AP-1[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(21): 7534-7539.

[3] Chen DC, Wang L. Mechanisms of therapeutic effects of rhubarb on gut origin sepsis[J]. Chin J Traumatol, 2009, 12(6): 365-369.

[4] 土屋千佳子. 大黄及其成分的抗炎作用[J]. 国外医学·中医中药分册，2003，21(1):54.

[5] Wang T, Liu B, Zhang W, et al. Andrographolide reduces inflammation-mediated dopaminergic neurodegeneration in mesence phalic neuron-glia cultures by inhibiting microglial activation[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2004, 308(3): 975-983.

[6] Xie Z, Wei M, Morgan TE, et al. Peroxynitrite mediates neurotoxicity of amyloid beta-peptide1-42 and lipopolysaccharide-activated microglia[J]. J Neurosci, 2002, 22(9): 3484-3492.

（收稿日期：2011-09-16）

Effects of 1.8-Dihydroxy-3-carboxy-anthraquinone on LPS-induced microglial activation

JING Hao-ran, CHAI Li-juan, GUO Hong, LI Mei-jiao, LIU Qing-qing, WANG Shao-xia

(*Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medical Formulae, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Chinese medicine Pharmacology, Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China*)

Abstract: **[Objective]** This study examined whether 1.8-Dihydroxy-3-carboxy-anthraquinone, a metabolite from Salvia miltiorrhiza, may exert an anti-inflammatory effect in microglia. **[Methods]** We examined the effect of 1.8-Dihydroxy-3-carboxy-anthraquinone on cell viability and the production of nitric oxide (NO) induced by LPS treatment in rat primary cultured microglia. **[Results]** 1.8-Dihydroxy-3-carboxy-anthraquinone could significantly inhibit the production of NO by LPS treatment in rat primary cultured microglia. **[Conclusion]** 1.8-Dihydroxy-3-carboxy-anthraquinone can suppress microglial activation and this may be a mechanism underlying the neuroprotective activity of it.

Key words: 1.8-Dihydroxy-3-carboxy-anthraquinone; microglia; inflammation