鬼针草总黄酮对脂多糖诱导小鼠神经炎症的改善作用及机制Δ

唐丰曼[1*]，庞晓军[1,2#]，谢　颜[1]，刘春芳[1]（1.广西医科大学药学院，南宁　530021；2.钦州市第二人民医院药学部，广西 钦州　535000）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408(2023)14-1719-05
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.14.11

摘　要　目的　探讨鬼针草总黄酮（TFB）对脂多糖（LPS）诱导小鼠神经炎症的改善作用及机制。**方法**　将50只C57BL/6小鼠随机分为正常对照组、LPS组和TFB低、中、高剂量组，每组10只。TFB低、中、高剂量组小鼠按60、120、240 mg/kg灌胃TFB溶液，正常对照组和LPS组小鼠灌胃等体积生理盐水，每日1次，连续给药21 d。从给药第15天起，除正常对照组外，其余组小鼠连续7 d腹腔注射LPS（400 μg/kg）建立神经炎症模型。末次给药4 h后麻醉小鼠取脑组织。观察小鼠神经元形态变化，检测小鼠脑组织中一氧化氮（NO）和肿瘤坏死因子α（TNF-α）、白细胞介素1β（IL-1β）、IL-6、IL-10的含量，检测小鼠脑组织中炎症通路相关蛋白[诱导型NO合酶（iNOS）、环氧合酶2（COX-2）、髓样分化因子88（Myd88）及蛋白激酶C（PKC）]的表达。**结果**　与正常对照组相比，LPS组小鼠脑组织的海马区神经元排列稀疏紊乱，大量神经元固缩，核缩小；脑组织中TNF-α、IL-1β、IL-6、NO含量均显著增加，IL-10含量显著降低，iNOS、COX-2、Myd88、PKC蛋白相对表达量均显著升高（$P<0.05$）。与LPS组相比，TFB低、中、高剂量组小鼠脑组织神经元病理变化明显改善，脑组织中上述指标变化均显著逆转（$P<0.05$）。**结论**　TFB具有抑制神经炎症的作用，其作用机制可能与下调炎症通路相关蛋白iNOS、COX-2、Myd88和PKC表达，减少炎症因子释放有关。

关键词　鬼针草总黄酮；脂多糖；神经炎症；炎症因子

Improvement effects and mechanism of total flavonoids of *Bidens pilosa* on lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in mice

TANG Fengman[1], PANG Xiaojun[1,2], XIE Yan[1], LIU Chunfang[1] (1. College of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Dept. of Pharmacy, the Second People's Hospital of Qinzhou, Guangxi Qinzhou 535000, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the effect and mechanism of total flavonoids of *Bidens pilosa* L. (TFB) on lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation in mice. **METHODS** Fifty C57BL/6 mice were randomly divided into normal control group, LPS group and TFB low-dose, medium-dose and high-dose groups, with 10 mice in each group. TFB low-dose, medium-dose and high-dose groups were given TFB solution intragastrically at 60, 120 and 240 mg/kg, and the normal control group and LPS group were given corresponding volume of normal saline, once a day, for consecutive 21 d. From the 15th day of administration, except for the normal control group, other groups were given LPS (400 μg/kg) intraperitoneally for 7 consecutive days to establish neuroinflammatory model. Brain tissues were taken under anesthesia 4 h after the final administration. The morphological changes of neuronal cells in mice were observed; the contents of nitric oxide (NO), tumor necrosis factor α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β), IL-6 and IL-10 were measured, and the expressions of inflammatory pathway-related proteins [inducible NO synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), myeloid differentiation factor 88 (Myd88) and protein kinase C (PKC)] were measured in the brain tissues of mice. **RESULTS** Compared with the normal control group, the neuronal arrangement in the hippocampal region of the brain tissue of mice in the LPS group was sparsely disorganized, with a large number of neuronal fixations and shrunken nuclei; the contents of TNF-α, IL-1β, IL-6 and NO in the brain tissue were significantly increased, the contents of IL-10 were significantly decreased, and the relative expressions of iNOS, COX-2, Myd88 and PKC proteins were significantly increased ($P<0.05$). Compared with the LPS group, the neuronal pathological changes in the brain tissue of mice in the TFB low-dose, medium-dose and high-dose groups were significantly improved, and the changes of the above indices in the brain tissue were significantly reversed ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** TFB has an inhibitory effect on neuroinflammation, and its mechanism of action may be

Δ **基金项目**　钦州市科学研究与技术开发计划项目（No. 202014810）

＊**第一作者**　硕士研究生。研究方向：药理学。E-mail：tangfman@163.com

＃**通信作者**　主任药师，硕士。研究方向：临床药学和中药药理学。E-mail：pangxjun@163.com

related to down-regulation of the expressions of inflammatory pathway-related proteins iNOS, COX-2, Myd88 and PKC, and reduction of inflammatory factors release.

KEYWORDS total flavonoids of *Bidens pilosa* L.; lipopolysaccharide; neuroinflammation; inflammatory factors

神经炎症是特指发生于中枢系统内的炎症反应，是神经退行性疾病如阿尔茨海默病、帕金森综合征、亨廷顿舞蹈症、多发性硬化症以及肌萎缩侧索硬化症等发病机制的关键因素[1]。小胶质细胞是中枢神经系统中的常驻免疫细胞，在机体的防御和组织修复中起着关键作用，一旦中枢神经系统受病原体刺激而发生轻微病理变化即可激活小胶质细胞[2]。活化的小胶质细胞经聚集、增殖、迁移后吞噬病原体，向T细胞呈递抗原，通过激活多种炎症通路，释放促炎因子诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase，iNOS）、环氧合酶2（cyclooxygenase-2，COX-2）、白细胞介素1β（interleukin-1β，IL-1β）、IL-6、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、一氧化氮（nitric oxide，NO）和神经毒性分子，引发神经炎症，促进神经元损伤和细胞死亡[3]。因此，抑制小胶质细胞活化引起的神经炎症反应对临床治疗中枢神经系统疾病具有重要意义。

鬼针草又名鬼骨针、婆婆针，为菊科一年生草本植物，全草均可用药，药用历史悠久，始载于《本草拾遗》；其味苦，性平，具有清热解毒、活血散瘀、消肿之功效[4]。近年来研究证实鬼针草具有抗炎、抗氧化、抗纤维化、抗肿瘤、降血压、调节免疫、抗糖尿病及抗血小板聚集等药理活性[5-6]。鬼针草总黄酮（total flavonoids of *Bidens pilosa* L.，TFB）是鬼针草的主要活性成分，具有抗炎作用，且本课题组前期开展TFB对胰岛素抵抗作用的细胞实验证实TFB在体外具有抗氧化能力，并对c-Jun氨基端激酶（c-Jun N-terminal kinase，JNK）和蛋白激酶C（protein kinase C，PKC）表达具有改善作用[7]。因JNK和PKC在神经炎症中具有调控的作用，以上提示TFB可能具有抑制神经炎症反应的作用。本实验通过脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）建立小鼠神经炎症模型，探究TFB对小鼠神经炎症的改善作用及可能的作用机制，为后期TFB的研究开发提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有BX53型生物显微镜（日本Olympus公司）、H1650-W型离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）、Flexstation3型多功能酶标仪（美国Molecular Devices公司）、ICV-450型电热恒温培养箱（日本Asone公司）、DYCZ-40型电转仪（北京六一仪器厂）。

1.2 主要药品与试剂

TFB[黄酮含量为52.72%（以芦丁计），货号20190604]由钦州医药有限责任公司提供；LPS（货号L4391）购自美国Sigma公司；IL-10、TNF-α、IL-6和IL-1β酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒（批号分别为E-EL-M0046c、E-EL-M0049c、E-EL-M0044c、E-EL-M0037c）均购自伊莱瑞特（武汉）生物技术有限公司；NO测定试剂盒（货号A013-2）购自南京建成生物工程研究所有限公司；BCA蛋白浓度测定试剂盒（货号P0010）购自上海碧云天生物技术有限公司；兔iNOS多克隆抗体（货号Bs-2072r）购自北京博奥森生物技术有限公司；小鼠β-肌动蛋白（β-actin）单克隆抗体（货号66009-1-ig）、兔COX-2多克隆抗体（货号12375-1-ap）、鼠髓样分化因子88（myeloid differentiation factor 88，Myd88）多克隆抗体（货号67969-1-ig）和兔PKC多克隆抗体（货号20877-1-ap）均购自武汉三鹰生物技术有限公司；辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠、山羊抗兔二抗（货号分别为BA1051、BA1054）均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 实验动物

50只SPF级健康雄性C57BL/6小鼠，体重为22～25 g，购自辽宁长生生物技术有限公司，生产许可证号为SCXK（辽）2020-0001。实验方案及规程符合广西医科大学动物伦理学审查标准（批准号202204004）。

2 方法

2.1 动物分组、给药、造模及取材

将小鼠适应性饲养1周后，随机分为正常对照组、LPS组和TFB低、中、高剂量组，每组10只。参照相关文献[8]的给药方法，TFB低、中、高剂量组小鼠按60、120、240 mg/kg剂量灌胃TFB溶液（以生理盐水制备），正常对照组和LPS组小鼠灌胃生理盐水，灌胃体积均为0.2 mL，每日1次，连续给药21 d。从给药第15天起，除正常对照组外，其余组小鼠连续7 d腹腔注射LPS（400 μg/kg）建立神经炎症模型[9]。末次给药4 h后，麻醉小鼠，取脑组织，每组3只小鼠脑组织用4%多聚甲醛固定，用于苏木精-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色实验；剩余7只小鼠脑组织分为左右两半，－20 ℃条件下冻存，7只小鼠左半脑用于NO含量和炎症因子含量检测，3只小鼠右半脑用于炎症通路相关蛋白含量检测。

2.2 小鼠神经元形态的观察

将4%多聚甲醛固定好的脑组织进行常规的脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、脱蜡，进行HE染色，中性树胶封片，显微镜下观察小鼠神经元形态的变化。

2.3 小鼠脑组织中NO含量的检测

取冻存的脑组织，称重后剪碎，加入磷酸盐缓冲液（PBS溶液，0.01 mol/L，pH7.4，下同）在冰浴下研磨成10%组织匀浆，于4 ℃下3 000 r/min离心10 min，取上清液，按照NO测定试剂盒说明书对NO含量进行检测。

2.4 小鼠脑组织中炎症因子含量的检测

取冻存的脑组织，加入PBS溶液在冰浴下研磨成10%组织匀浆，于4 ℃下3 000 r/min离心10 min，取上清液，按照ELISA试剂盒说明书对TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-10的含量进行检测。

2.5 小鼠脑组织中炎症通路相关蛋白表达的检测

取冻存脑组织剪碎，加入含苯甲基磺酰氟的RIPA裂解液研磨于冰上裂解30 min，取裂解液离心（4 ℃，12 000 r/min，5 min），用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定各组蛋白浓度。蛋白溶液与5×Loading Buffer混合沸水浴10 min变性，经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白，转移到聚偏二氟乙烯（PVDF）膜上，用含5%脱脂奶粉的TBST缓冲液在室温下封闭2 h。用封闭液分别稀释相应的β-actin、iNOS、COX-2、Myd88和PKC一抗（稀释比例分别为1∶5 000、1∶1 000、1∶500、1∶5 000、1∶5 000），使PVDF膜浸泡于一抗孵育液中，4 ℃孵育过夜；TBST缓冲液洗去一抗，室温孵育辣根过氧化物酶标记的二抗（1∶10 000）2 h；TBST缓冲液洗去二抗，PVDF膜浸泡于ECL化学发光液中显色，成像，采用IPP软件分析蛋白条带的灰度值。以β-actin作为内参，分析iNOS、COX-2、Myd88、PKC蛋白的相对表达量（蛋白相对表达量＝目的蛋白条带灰度值/内参条带灰度值）。

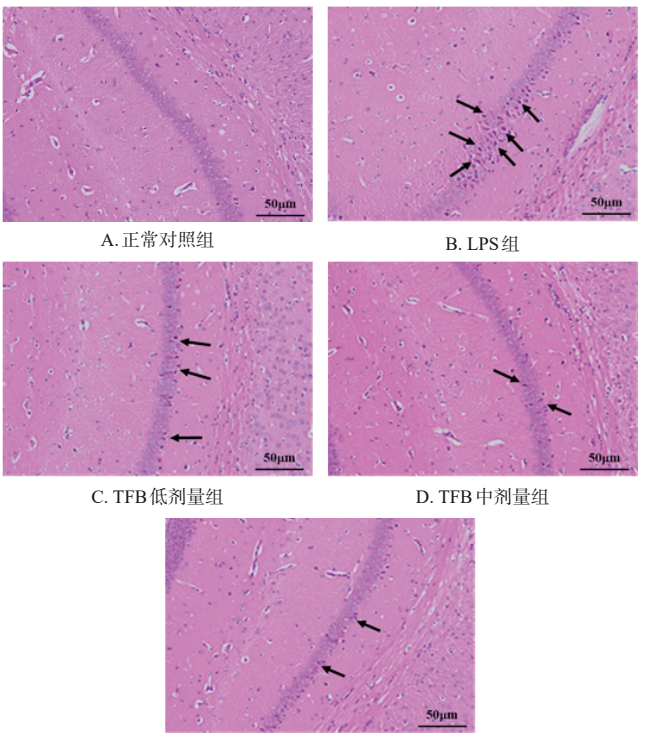
2.6 统计学方法

采用SPSS 17.0软件进行数据分析，结果以$\bar{x}\pm s$表示。采用单因素方差分析以及LSD-t检验进行多组间及组间两两比较，检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 TFB对神经炎症模型小鼠神经元形态的影响

正常对照组小鼠脑组织的海马结构较为完整，神经元形态规则，排列较为紧密，核大而圆。LPS组小鼠脑组织的海马区神经元排列稀疏紊乱，大量神经元固缩，核缩小。TFB低、中、高剂量组小鼠上述神经元病理变化较LPS组均明显改善。结果见图1。



A. 正常对照组　B. LPS组

C. TFB低剂量组　D. TFB中剂量组

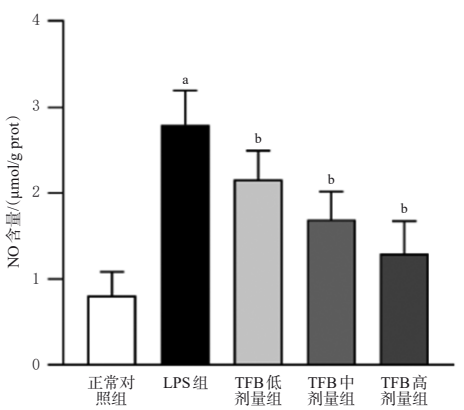
E. TFB高剂量组

→：细胞核固缩的神经元。

图1 小鼠大脑海马区神经元HE染色图

3.2 TFB对神经炎症模型小鼠脑组织中NO含量的影响

与正常对照组相比，LPS组小鼠脑组织中NO含量显著增加（$P<0.05$）；与LPS组相比，TFB低、中、高剂量组小鼠脑组织中NO含量均显著降低（$P<0.05$）。结果见图2。



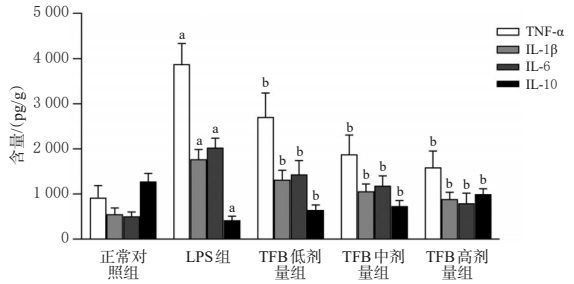
a：与正常对照组相比，$P<0.05$；b：与LPS组相比，$P<0.05$。

图2 TFB对LPS诱导的神经炎症模型小鼠脑组织中NO含量的影响（$n=7$）

3.3 TFB对神经炎症模型小鼠脑组织中炎症因子含量的影响

与正常对照组相比，LPS组小鼠脑组织中TNF-α、IL-1β、IL-6含量均显著增加，IL-10含量显著降低（$P<0.05$）；与LPS组相比，TFB低、中、高剂量组小鼠脑组织

中TNF-α、IL-1β、IL-6含量均显著降低，IL-10含量均显著增加（$P<0.05$）。结果见图3。

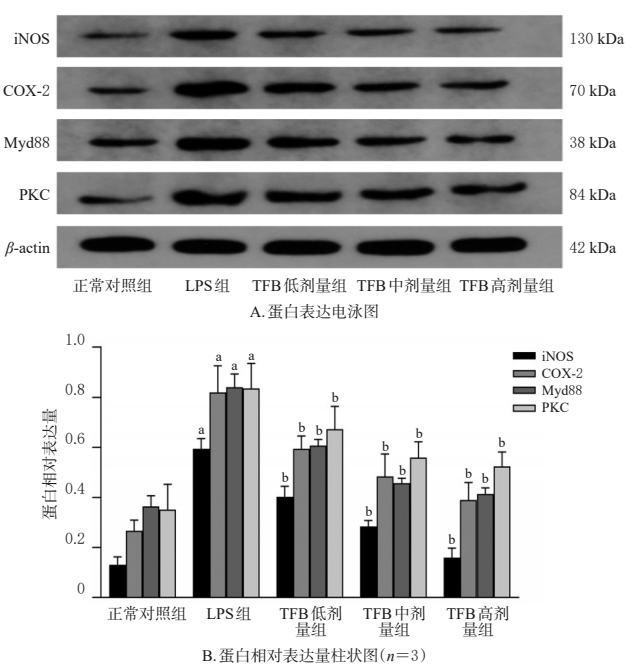


a：与正常对照组相比，$P<0.05$；b：与LPS组相比，$P<0.05$。

图3　TFB对LPS诱导的神经炎症模型小鼠脑组织中炎症因子含量的影响（$n=7$）

3.4　TFB对神经炎症模型小鼠脑组织中炎症通路相关蛋白表达的影响

与正常对照组相比，LPS组小鼠脑组织中iNOS、COX-2、Myd88、PKC蛋白相对表达量均显著升高（$P<0.05$）；与LPS组相比，TFB低、中、高剂量组小鼠脑组织中iNOS、COX-2、Myd88、PKC蛋白相对表达量均显著降低（$P<0.05$）。结果见图4。



a：与正常对照组相比，$P<0.05$；b：与LPS组相比，$P<0.05$。

图4　TFB对LPS诱导的神经炎症模型小鼠脑组织中炎症通路相关蛋白表达的影响

4　讨论

神经炎症是大多数中枢神经系统疾病发生的主要驱动因素，易导致神经变性及神经元死亡[10]。当中枢神经系统受多种病原体刺激时，小胶质细胞被激活。小胶质细胞根据活化类型分为促炎M1表型和抗炎M2表型，M1/M2表型随神经炎症不同发展阶段进行动态转换。LPS作为一种细菌内毒素，经腹腔注射后，诱导小胶质细胞向M1表型活化，增加炎症介质如TNF-α、IL-1β、IL-6释放，减少抗炎介质如IL-10分泌，加重神经炎症反应，损伤神经元[11-12]。本研究结果发现，腹腔注射LPS后，小鼠海马神经元排列紊乱、大量神经元固缩，核缩小，促炎因子TNF-α、IL-1β及IL-6含量明显上升，抗炎因子IL-10含量明显下降，表明腹腔注射LPS可诱导小鼠产生神经炎症反应，神经炎症模型制备成功；TFB预防性给药能够改善LPS引起的神经元损伤，显著降低促炎因子TNF-α、IL-1β及IL-6含量，升高抗炎因子IL-10含量，提示TFB具有改善神经炎症反应的药理活性。

iNOS和COX-2分别是NO的合成酶和催化花生四烯酸转化生成前列腺素过程中的关键限速酶。iNOS和COX-2在炎症反应中起重要的调节作用，在神经炎症中高度表达，分别促进NO和前列腺素E2等炎症介质的过度产生，是检测炎症反应的重要指标[13-14]。高浓度的NO是细胞毒性分子，可与超氧阴离子反应产生细胞毒性物质，诱导神经炎症疾病，如神经退行性疾病[15]。本研究结果显示，腹腔注射LPS后，炎症介质NO含量显著升高，炎症通路相关蛋白iNOS和COX-2表达水平均显著升高；TFB预防性给药可显著降低上述炎症通路相关蛋白表达及炎症介质的释放。这提示TFB可通过下调炎症通路相关蛋白iNOS和COX-2的表达，减少NO的释放来发挥抗神经炎症作用。

Myd88是Toll样受体4（Toll-like receptor 4，TLR4）信号通路中的一个关键衔接蛋白，在炎症疾病的发生发展中具有重要作用[16]。当TLR4识别LPS炎性刺激后，Myd88可通过Toll/IL-1受体结构域与TLR4结合，将炎性信号传递至下游信号转导通路，最终激活核因子κB（nuclear factor kappa B，NF-κB），诱导多种促炎因子表达，进而加剧细胞炎症损伤[17-18]。PKC是一个具有不同亚型的丝氨酸/苏氨酸激酶家族，PKC亚型广泛分布于小胶质细胞中，其中PKCβ和PKCδ亚型是调节小胶质细胞中iNOS表达的主要亚型[19]。同时，PKC的活化可激活TLR4信号通路，并触发其下游丝裂原活化蛋白激酶和NF-κB信号通路，使活化的小胶质细胞产生促炎因子，加重神经炎症反应[20]。因此，寻找PKC抑制剂已成为抗神经炎症药物研究的热点。本实验结果表明，LPS腹腔注射可诱导小鼠脑组织中Myd88和PKC蛋白表达升高，而TFB预防性给药可显著降低Myd88和PKC蛋白表达，提示TFB可能通过调控PKC/TLR4信号通路相关蛋白来改善LPS诱导的神经炎症反应。

综上所述，TFB可抑制LPS诱导的小鼠神经炎症反应，其机制可能是通过下调炎症通路相关蛋白iNOS、

COX-2、Myd88和PKC表达，抑制炎症因子释放来改善神经炎症反应。后续实验将从PKC/TLR4信号通路来深入探讨TFB抑制神经炎症的作用机制，为TFB用于神经炎症相关疾病的防治研究提供实验依据。

参考文献

[1] SINGHAL G，JAEHNE E J，CORRIGAN F，et al. Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function：a focused review[J]. Front Neurosci，2014，8：315.

[2] 赵铭，李冬，朱迅，等. 小胶质细胞在中枢神经系统疾病中作用的研究进展[J]. 现代免疫学，2018，38(5)：425-429.

[3] SHABAB T，KHANABDALI R，MOGHADAMTOUSI S Z，et al. Neuroinflammation pathways：a general review[J]. Int J Neurosci，2017，127(7)：624-633.

[4] 曹园，瞿慧，姚毅，等. 鬼针草化学成分研究[J]. 中草药，2013，44(24)：3435-3439.

[5] 潘海敏，方慧华，严士海. 鬼针草总黄酮对体外血小板聚集的影响[J]. 医药导报，2011，30(10)：1273-1274.

[6] 张媛媛，彭磊，徐涛，等. 鬼针草总黄酮对高脂血症大鼠脂质代谢的影响[J]. 安徽医药，2012，16(9)：1247-1249.

[7] 庞晓军，卢琳琳，黎东旺，等. 鬼针草总黄酮对HepG2细胞胰岛素抵抗的影响[J]. 中国药房，2022，33(8)：968-974.

[8] 程新燕. 鬼针草总黄酮对D-GalN致急性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19(14)：268-271.

[9] 曾菊，程斌，程肖蕊，等. 基于LPS诱导小鼠炎症模型的LW-AFC抗炎作用研究[J]. 神经药理学报，2018，8(2)：44.

[10] JAYARAJ R L，AZIMULLAH S，BEIRAM R，et al. Neuroinflammation：friend and foe for ischemic stroke[J]. J Neuroinflammation，2019，16(1)：142.

[11] ORIHUELA R，MCPHERSON C A，HARRY G J. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states[J]. Br J Pharmacol，2016，173(4)：649-665.

[12] WEN X J，XIAO L J，ZHONG Z Y，et al. Astaxanthin acts via LRP-1 to inhibit inflammation and reverse lipopolysaccharide-induced M1/M2 polarization of microglial cells[J]. Oncotarget，2017，8(41)：69370-69385.

[13] 阮洪生，牟晋珠. 表儿茶素对脂多糖诱导RAW264.7细胞分泌炎症因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23(4)：159-163.

[14] 刘思远，李志鹏，彭召云，等. 花青素对肺癌细胞相关炎性因子信号转导通路作用的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23(14)：219-225.

[15] AKBAR M，ESSA M M，DARADKEH G，et al. Mitochondrial dysfunction and cell death in neurodegenerative diseases through nitroxidative stress[J]. Brain Res，2016，1637：34-55.

[16] KIM Y C，LEE S E，KIM S K，et al. Toll-like receptor mediated inflammation requires FASN-dependent MYD88 palmitoylation[J]. Nat Chem Biol，2019，15(9)：907-916.

[17] PATRA S，MUTHURAMAN M S，MEENU M，et al. Anti-inflammatory effects of royal poinciana through inhibition of toll-like receptor 4 signaling pathway[J]. Int Immunopharmacol，2016，34：199-211.

[18] ZHAO L，LI M Y，SUN K C，et al. *Hippophae rhamnoides* polysaccharides protect IPEC-J2 cells from LPS-induced inflammation，apoptosis and barrier dysfunction *in vitro* via inhibiting TLR4/NF-κB signaling pathway[J]. Int J Biol Macromol，2020，155：1202-1215.

[19] WEN J，RIBEIRO R，ZHANG Y M. Specific PKC isoforms regulate LPS-stimulated iNOS induction in murine microglial cells[J]. J Neuroinflammation，2011，8：38.

[20] LIU Q，ZHANG Y L，LIU S，et al. Cathepsin C promotes microglia M1 polarization and aggravates neuroinflammation via activation of Ca^{2+}-dependent PKC/p38MAPK/NF-κB pathway[J]. J Neuroinflammation，2019，16(1)：10.

（收稿日期：2023-01-27　修回日期：2023-06-19）

（编辑：曾海蓉）