皮婷,梁月琴,欧雯励蓉,等. 远志皂苷元对脂多糖诱发神经细胞炎症损伤的保护作用［J］. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 52-58.
Pi T, Liang YQ, Ou WLR, et al. Senegenin protects against lipopolysaccharide-induced neurite toxicity in a nerve cell model［J］. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 52-58.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.11.009

远志皂苷元对脂多糖诱发神经细胞炎症损伤的保护作用

皮　婷[1],梁月琴[1],欧雯励蓉[2],朱　晗[3],陶彦林[3],金醒昉[1*]

(1.昆明医科大学附属延安医院,昆明　650051; 2.中南大学湘雅医学院,长沙　410013;
3.上海中医药大学中药研究所,上海　201203)

【摘要】 目的　研究具有神经营养作用的远志皂苷元对神经细胞炎症因子的影响,探讨远志皂苷元是否具有降低神经细胞炎症反应的作用,从而为缓解抗肿瘤药物的毒副作用寻找新的突破口。**方法**　体外培养小胶质细胞 BV2 细胞,采用脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)制备细胞炎症模型,观察不同浓度的远志皂苷元对 LPS 诱导的细胞炎症因子——一氧化氮(nitric oxide, NO)的影响,从而发现较佳的远志皂苷元浓度;远志皂苷元 2 μmol/L、2.5 μmol/L 及 3 μmol/L 和阳性对照组地塞米松 10 μmol/L,主要通过 Griess Reagent 法检测炎症介质 NO 浓度;定量聚合酶链反应(quantitative polymerase chain reaction, QPCR)法检测环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2) mRNA 表达量;Western blot 法检测 COX-2 蛋白表达量; 并用 LPS 诱导后的 BV2 炎症上清刺激 SH-SY5Y 细胞,再进行其细胞活力和 NO 浓度检测。**结果**　不同浓度远志皂苷元对 LPS 诱导的 BV2 细胞产生 NO 的影响不同。与 LPS 组相比较,(5 μmol/L、25 μmol/L、50 μmol/L、100 μmol/L)剂量组远志皂苷元抗炎作用不明显,且 50 μmol/L 及 100 μmol/L 远志皂苷元可提高炎症介质 NO 的浓度,具有明显的促炎作用;而(1 μmol/L、2 μmol/L、4 μmol/L、8 μmol/L)剂量组中发现 1 μmol/L、2 μmol/L 远志皂苷元具有明显抗炎症作用($P<0.05$ 或 $P<0.01$),综上结果发现低剂量远志皂苷元具抗炎作用;(1.5 μmol/L、2 μmol/L、2.5 μmol/L、3 μmol/L)剂量组远志皂苷元均具有明显的降低 NO 浓度的作用,但以 2 μmol/L 尤为显著($P<0.001$),据该结果后续实验中远志皂苷元分为低、中、高(2 μmol/L、2.5 μmol/L、3 μmol/L)剂量组;各组 COX-2 mRNA 表达情况对比发现,与 LPS 组相比,远志皂苷元 2 μmol/L、2.5 μmol/L 组中 COX-2 mRNA 表达显著降低($P<0.001$),仍稍弱于地塞米松组;另外相比 LPS 组,远志皂苷元 2 μmol/L、2.5 μmol/L、3 μmol/L 剂量组均可降低 COX-2 蛋白表达水平,以 2 μmol/L 效果最为显著($P<0.05$)。**结论**　远志皂苷元可抑制 LPS 诱导的细胞炎症因子的释放及表达,表明具有神经营养作用的远志皂苷元可能还具有保护神经细胞炎症损伤的作用。

【关键词】　远志皂苷元;神经保护;炎性介质;肿瘤;化疗脑;神经营养
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856(2020) 11-0052-07

Senegenin protects against lipopolysaccharide-induced neurite toxicity in a nerve cell model

PI Ting[1], LIANG Yueqin[1], OU Wenlirong[2], ZHU Han[3], TAO Yanlin[3], JIN Xingfang[1*]
(1.the Yan An Hospital Affilated Kun Ming University, Kunming 650051, China.

[基金项目]云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项资金项目(2018FE001(-271));云南省肿瘤免疫防治重点实验室开放课题(2017DG004-01)。
[作者简介]皮婷(1986—),女,硕士研究生,主管药师,研究方向:中药药理学及个体化药学。E-mail:308720051@qq.com。
[通信作者]金醒昉(1962—),女,教授,硕士生导师, 研究方向:老年病医学(心血管疾病方向)。E-mail:jinxf177@126.com

2. Xiangya School of Medicine,Central South University, Changsha 410013.
3. Institute of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203)

【**Abstract**】 **Objective** To study the neurotrophic and anti-inflammatory effects of senegenin on inflammatory factors in nerve cells to identify novel drugs that alleviate the toxic and side effects of anti-tumor drugs. **Methods** Microglial BV2 cells were cultured *in vitro*, and lipopolysaccharide (LPS) was used to prepare the cell inflammation model. The effects of different concentrations of senegenin (2, 2.5, 3 μmol/L) on the LPS-induced cellular inflammatory factor nitric oxide (NO) were observed to determine the optimal dose of senegenin compared with the positive control group (dexamethasone 10 μmol/L). The concentration of NO in inflammatory medium was detected by Griess Reagent. **Results** The effects of different concentrations of senegenin on the production of NO in LPS-induced BV2 cells were different. Compared with the LPS group, the anti-inflammatory effects of senegenin (5, 25, 50, 100 μmol/L) were not obvious. Moreover, the concentration of NO in the inflammatory medium was increased by 50 and 100, indicating a proinflammatory effect. In addition, in the senegenin 1, 2, 4, and 8 μmol/L dose range, 1, 2, and 2 kept up with each other and had significant anti-inflammatory effects ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The low doses of senegenin had anti-inflammatory effects. All doses of senegenin, especially 2 μmol/L ($P < 0.001$), significantly reduced the concentration of NO. According to this result , senegenin was divided into low, medium and high dose groups in a follow-up test. CoX-2 mRNA expression in the senegenin 2 and 2.5 μmol/L groups was significantly decreased ($P < 0.001$) compared with the LPS group, but was slightly lower than that in the dexamethasone group. In addition, compared with the LPS group, 2, 2.5, and 3 μmol/L senegenin reduced CoX-2 protein levels, with the most significant effect shown for 2 μmol/L senegenin ($P < 0.05$). **Conclusions** Senegenin reduces the release and expression of inflammatory factors in microglia induced by LPS, suggesting senegenin has neurotrophic effects that might protect nerve cells from inflammatory injury.

【**Keywords**】 senegenin; neurotrophic T; inflammatory diators; tumor; chemo-brain; neuroprotection

据全国肿瘤登记中心,最新的肿瘤登记年报显示中国新发恶性肿瘤发病约 392.9 万人,死亡约 233.8 万人。平均每天超过 1 万人被确认为癌症,每分钟有 7.5 个人被确证为癌症。随着恶性肿瘤发病率的增高,化疗药物所扮演的角色也越来越重要,同时这些药物所引起的近期或远期的不良反应也日渐受到关注。最早是在接受化疗后的乳腺癌患者中发现,很多幸存者都出现记忆力下降等认知功能障碍,被称为“化疗脑”(chemo-brain)。近几年体内外大量研究表明,长期使用化疗药物后可导致患者出现“化疗脑”;即化疗相关性认知功能障碍,是癌症患者在化疗后出现的记忆力、学习力、注意力、推理能力、执行功能、信息加工速度和视觉空间功能等认知功能的损害[1-4]。而有研究认为“化疗脑”主要是由于少量化疗药物或炎症反应细胞因子等透过血脑屏障,多因素作用后,造成中枢神经毒性,导致神经元损伤甚至神经再生障碍[5-6]。由此可知,炎症因子在“化疗脑”的发生发展中起到了举足轻重的作用,且炎症细胞因子级联反应所引起的神经损伤是“化疗脑”发生的关键因素。

学者们发现神经营养因子或神经保护因子,如神经生长因子(neurogrowthfactor, NGF)[7-8]、胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor - 1, IGF1)[9]、促红细胞生成素[10-11]、白血病抑制因子(leukaemia factor, LIF)[12]等,可一定程度的减缓神经病变,改善“化疗脑”。然而,由于它们的分子量大难以透过血脑屏障、稳定性差、或对人体有害副作用等等,限制了其临床应用。

远志为常用药用植物,《神农本草经》记载:主咳逆伤中,补不足,除邪气,利九窍,益智慧,耳目聪明,不忘,强志倍力。富含皂苷类、寡聚糖类、口山酮类化合物,具有提高记忆、改善认知等药理作用[13-15]。远志皂苷元为远志皂苷水解产物,为齐墩果烷型三萜,我们前期研究发现远志皂苷元可促进皮质神经元存活,促进神经元突起生长,具有类似神经营养因子作用[16-18]。但远志皂苷元对神经细胞炎症损伤方面的影响研究较少。

为了探讨远志皂苷元对神经细胞的炎症损伤是否具有保护作用,本文以脂多糖作用小神经胶质细胞 BV2 诱导神经炎症损伤模型,通过观察炎症因子及炎症相关蛋白的表达,来探究具有神经营养作用的小分子中药单体—远志皂苷元对神经细胞炎症损伤的保护作用,为进一步研究“化疗脑”的防治提供新思路及新方向。

1 材料和方法

1.1 实验细胞

本研究中涉及细胞人多巴胺能神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y 由中科院细胞库提供;小鼠小胶质细胞 BV2 购自 ATCC。

1.2 主要试剂与仪器

远志皂苷元,购自北京索莱宝科技有限公司,含量 > 99.0%,实验时用二甲基亚砜(dimethylsulfoxide,DMSO)配置成相应浓度,4℃保存;地塞米松(dexamethasone,Dex)(M0606AS)购自大连美仑生物技术有限公司;胰蛋白酶(美国 Amresco 公司);DMEM(美国 Gibco 公司);胎牛血清(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司);磺胺(S9251),盐酸萘乙二胺(N9125)均购自美国 Sigma 公司;COX-2 引物(mus-cox2-F:CTGAGTGGGGTGATGAGCAA;mus-cox2-R:GAGGCAATGCGGTTCTGATAC)购自上海捷瑞生物工程有限公司;兔抗人 COX-2 单克隆抗体(12282)购自美国 CST 公司;GAPDH(GAPDH-F-5'ATGTGTCCGTCGTGGATC TGA3';GAPDH-R-5'ATGCCTGCTTCACCACCTTCT3')购自上海捷瑞生物工程有限公司;其余试剂均为国产分析纯。12 孔板、96 孔板(美国 Corning 公司产品);SW-CJ-1F 型超净工作台(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);培养箱(英国 GalaxyS 公司);倒置显微镜(日本 lympus 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 神经细胞的制备和培养

小胶质细胞 BV2 细胞用 DMEM/FBS+1% PS 的培养液,在 5% CO_2、37℃湿饱和条件下培养。细胞生长至 80% 融合度时,以 0.25%的胰酶消化后按 1 瓶传至 3 瓶进行传代,取其对数生长期细胞进行实验。

人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 用 DMEM/FBS + 1% PS 的培养液,在 5% CO_2、37℃湿饱和条件下培养。细胞生长至 80%融合度时,以 0.25%的胰酶消化后按 1 瓶传至 4 瓶进行传代,取其对数生长期细胞进行实验。

1.3.2 炎症介质 NO 浓度检测

调整 BV2 细胞浓度为每毫升 1.5×10^6 个,种于 96 孔板中过夜,预给药远志皂苷元后 2 h,加入 LPS(终浓度 200 ng/mL),分为:空白对照组,LPS 组,地塞米松组及远志皂苷元各浓度组。继续培养 22 h 后,利用 Griess Reagent 法检测炎症介质 NO 浓度。于超净台内分别每孔吸 80 μL 上清液到新的 96 孔板中,同时制作 $NaNO_2$ 标准曲线(200、100、50、25、12.5、0 μmol/L),每个浓度设置 2 个副孔,避光下加入 80 μL 预先配置好的 Greiss 试剂(A 液:B 液 = 1:1),混匀后于培养箱中孵育 15 min,利用酶标仪在 540 nm 处测定吸光度值。绘制 $NaNO_2$ 标准曲线,将吸光度值带入标准曲线中计算 NO 含量。

调整 SH-SY5Y 细胞浓度为每毫升 1.6×10^6 个,种于 96 孔板中过夜,加入远志皂苷元作用于 LPS 诱发 BV2 细胞炎症的上清刺激细胞,培养 24 h。然后利用通过上述 Griess Reagent 法检测 NO 浓度。

1.3.3 兔抗人环氧合酶 2(cyclooxygenase-2,COX2)表达水平检测

调整 BV2 细胞浓度为每毫升 1.5×10^6 个/mL,种于 12 孔板中过夜。分为:空白对照组,LPS 组,地塞米松组及远志皂苷元(2 μmol/L、2.5 μmol/L、3 μmol/L)低、中、高剂量组,预给药低、中、高剂量远志皂苷元后 2 h,加入 LPS(终浓度终浓度 200 ng/mL),再继续培养 22 h 后,1000 r/min 离心 5 min,收集细胞,QPCR 法检测 COX-2 mRNA(mus-cox2-F:CTGAGTGGGGTGATGAGCAA;mus-cox2-R:GAGGCAATGCGGTTCTGATAC)表达水平,Western blot 法检测 COX-2 蛋白表达水平。

1.3.4 QPCR 法检测 COX-2 mRNA 表达

实验分组如前所述,各组细胞均于药物干预 24 h 后提取 RNA。按试剂盒说明书进行总 RNA 的提取、逆转录成 cDNA,再进行 PCR 扩增。PCR 反应体系总体积为 18 μL。反应条件如下:95℃预变性 5 min,继之 95℃变性 10 s,60℃退火 30 s,95℃ 延 15 s,共 42 个循环。计算结果用 GAPDH 标化目的基因的相对表达,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$定量目的基因。

1.3.5 Western blot 印迹法检测 COX-2 蛋白表达

实验分组如前所述。各组细胞均于药物干预 24 h 后提取细胞蛋白。上样前先将制备好的蛋白样品 95℃煮 5 min,冷却后瞬时离心,待用。取变性后的各组细胞蛋白等量上样到 SDS 聚丙烯酰胺凝胶,电泳结束后将胶上的蛋白转移到 PVDF 膜,100 V 转模 2 h 后用 5%脱脂奶粉在室温下封闭 1.5 h,孵育相应的一抗 4℃过夜,次日用 PBST 室温下洗涤 3 次,每次 10 min。然后据一抗的抗性选择相同抗性的二抗(稀释比例为 1:5000)进行室温下孵育 1

h,用 PBST 洗涤 3 次,每次 10 min。再据底物试剂盒要求显影、拍照,并保存图像。运用 TanonImage 软件进行目的蛋白灰度分析。

1.3.6　细胞活力检测

调整 SH-SY5Y 细胞浓度为每毫升 1.6×10^6 个,种于 96 孔板中过夜。分为:空白对照组(不做任何处理),对照组(除远志皂苷元外,其余均加入),LPS 组,地塞米松组及远志皂苷元低、中、高剂量组。SH-SY5Y 细胞贴壁后,弃上清换用 LPS 诱发小胶质细胞 BV2 炎症的上清 1 mL,并加入远志皂苷元(2 μmol/L、2.5 μmol/L、3 μmol/L)继续培养 24 h 后,加入 CCK-8 孵育 0.5 h,采用波长 450 nm 测定吸光值。

1.4　统计学方法

实验结果数据以平均数±标准误差($\bar{x}\pm s\bar{x}$)表示,应用 SPSS 22.0 软件作统计分析。先经方差齐性检验后,方差齐性采用 Tukey 法,方差不齐采用 Tamhane 法进行组间比较。显著性校检水平 $\alpha=0.05$。

2　结果

2.1　不同浓度的远志皂苷元对 LPS 诱发小胶质细胞 BV2 产生 NO 的影响

因前期研究发现[16-18] 2 μmol/L 远志皂苷元具有较好的神经营养作用,故在 BV2 细胞上摸索远志皂苷元的抗炎有效浓度时,设计了 1、2、4、8 μmol/L,5、25、50、100 μmol/L 两个梯度。如图 1A-C 所示,图 1A 是从 1、2、4、8 μmol/L 的远志皂苷元,结果显示 1、2 μmol/L 两个浓度的远志皂苷元有抗炎作用($P<0.01$ 或 $P<0.05$);图 1B 是从 5、25、50、100 μmol/L 的远志皂苷元,结果显示均无抗炎作用,还具有促炎作用,且呈浓度依赖性;根据以上结果缩窄远志皂苷元的浓度,图 1C 是 1.5、2、2.5、3、3.5 μmol/L 的远志皂苷元,结果显示这些浓度下的远志皂苷元均有抗炎作用($P<0.01$ 或 $P<0.05$ 或 $P<0.001$),且以 2 μmol/L 的远志皂苷元抗炎作用最为明显。

2.2　远志皂苷元对 LPS 诱导的 BV2 细胞 COX-2 mRNA 表达的影响

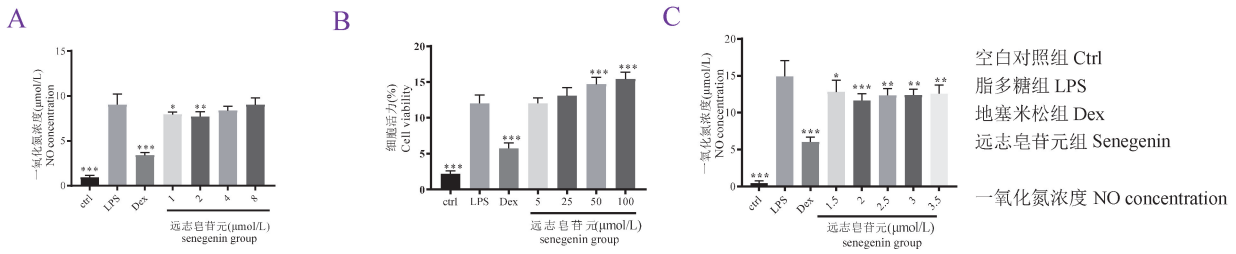
根据以上结果选取 2、2.5、3 μmol/L(低、中、高)剂量远志皂苷元作用的细胞进行 COX-2 mRNA 表达的检测,结果如图 2 所示,LPS 作用后的 BV2 细胞 COX-2 mRNA 显著升高($P<0.001$),阳性药地塞米松组和 LPS 组相比显著降低($P<0.001$),2、2.5 μmol/L 的远志皂苷元组和 LPS 组相比也显著降低($P<0.001$)。

2.3　远志皂苷元对 LPS 诱导的 BV2 细胞 COX-2 蛋白表达的影响

Western blot 检测低、中、高剂量组远志皂苷元 COX-2 蛋白的表达情况。结果如图 3 所示,LPS 作用后的 BV2 细胞中 COX-2 蛋白表达显著升高($P<0.001$),与 LPS 组相比,阳性药地塞米松组 COX-2 蛋白表达显著降低($P<0.001$),虽 2 μmol/L 远志皂苷元组 COX-2 蛋白表达量高于阳性对照组,但相比 LPS 组也有较明显的降低($P<0.05$)。

2.4　远志皂苷元对 SH-SY5Y 接受 BV2 炎症上清刺激后的细胞活力影响

该部分实验主要是研究远志皂苷元对 SH-SY5Y 接受 BV2 炎症上清刺激后的炎症影响,需加入前部分实验中 LPS 诱导 BV2 细胞炎症后的上清,所以该部分实验分了两个实验对照(Ctrl)组,一个对照组不加 BV2 细胞炎症上清,另一个对照加入该上清。这样更好的排除了其他因素对结果的影响,增加该实验结果的说服力,确保该部分实验中远志皂苷元为主要实验变量,明确远志皂苷元在该部分实验中的作用。



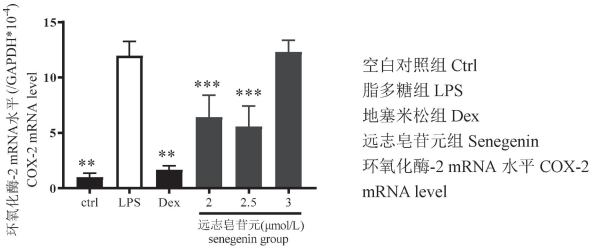
注:与 LPS 组比较,* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$。

图 1　不同浓度远志皂苷元对 LPS 诱导的 BV2 细胞 NO 释放量的影响

Note. Compared with the LPS group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Table 1　Effects of different concentrations of senegenin on the release of NO in LPS-induced BV2 cells

如图 4 所示,SH-SY5Y 接受 BV2 炎症上清刺激后,LPS 刺激 BV2 上清组的细胞活力和对照组相比显著下降($P<0.05$),给 2.5、3 μmol/L 远志皂苷元 BV2 上清可以保护 SH-SY5Y 细胞活力免遭 LPS 的影响($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。



注:与 LPS 组比较, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$。

图 2 远志皂苷元对 LPS 诱导的 BV2 细胞 COX-2 mRNA 表达水平的影响

Note. Compared with the LPS group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

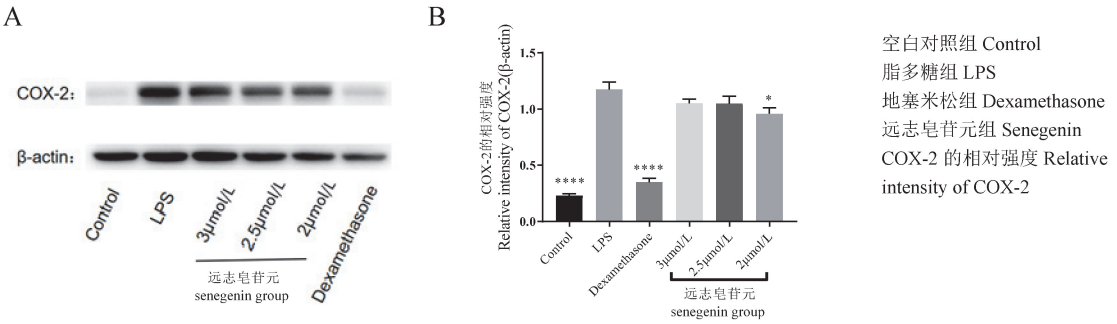
Table 2 Effect of senegenin on the expression level of coX-2 mRNA in LPS-induced BV2 cells

2.5 远志皂苷元对 SH-SY5Y 接受 BV2 炎症上清刺激后的细胞产生 NO 影响

如图 5 所示,实验分组与上述分组情况一样。SH-SY5Y 接受 BV2 炎症上清刺激后,LPS 刺激 BV2 上清组的 SH-SY5Y 细胞分泌 NO 和空白对照组相比显著上升($P<0.001$);相比 LPS 的 BV2 上清组,2、2.5、3 μmol/L 远志皂苷元 BV2 上清组均可较为显著地降低 SH-SY5Y 细胞 NO 释放量($P<0.001$)。

3 讨论

目前,因化疗药物所产生的不良反应,如:周围神经病变等神经毒性效应,在很大程度上影响了其临床使用。而对于某些高效抗肿瘤药,如铂类似物或紫杉烷家族成员而言尤为严重,由于这些药物一般需依赖剂量或治疗方案来发挥治疗效果。这种神经毒性效应将严重影响患者的生活质量[19],即使在化疗停止很长一段时间仍存在。尽管可见一些神经再生,但其再生速度缓慢,且在很多情况下,神

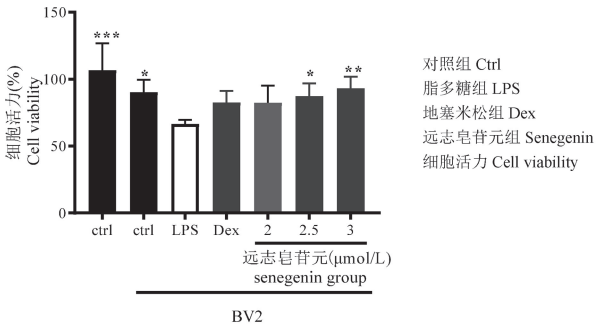


注:A: WB 条带;B:灰度值比较。与 LPS 组比较, * $P<0.01$, **** $P<0.001$。

图 3 远志皂苷元对 LPS 诱导的 BV2 细胞 COX-2 蛋白表达水平的影响

Note. A, WB strip. B, Gray value comparison. Compared with the LPS group, * $P<0.01$, **** $P<0.001$.

Table 3 Effect of senegenin on the expression level of COX-2 protein in LPS-induced BV2 cells

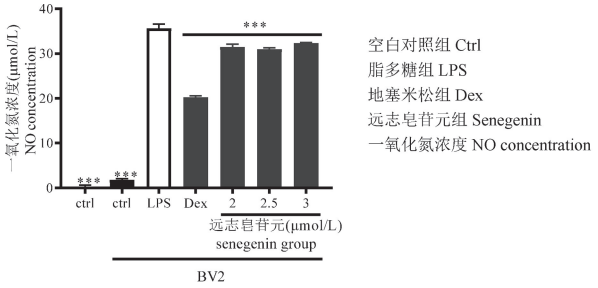


注:与 LPS 组比较, * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$。

图 4 远志皂苷元对 SH-SY5Y 接受 BV2 炎症上清刺激后细胞活力的影响

Note. Compared with the LPS group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Table 4 Effects of senegenin on cell viability of SH-SY5Y after BV2 supernatant stimulation



注:与 LPS 组比较, *** $P<0.001$。

图 5 远志皂苷元对 SH-SY5Y 接受 BV2 炎症上清刺激后 NO 释放量的影响

Note. Compared with the LPS group, *** $P<0.001$.

Table 5 Effects of senegenin on the release of NO after SH-SY5Y received BV2 supernatant stimulation

经病变的逆转也并不完全,甚至还可能影响生活质量及正常功能长达多年。

“化疗脑”作为一种神经系统的疾病,主要是癌症患者化疗后的认知功能的受损[20],但其诱因较为复杂,发生机制仍未明确。有猜测“化疗脑”是异常大脑重构、延缓的损伤修复系列活动后,为神经-内分泌-免疫学改变所导致的结果[21]。有研究报道化疗可引起促炎细胞因子水平的升高,引起炎症反应,可能是周围组织中产生的炎症因子,穿过血脑屏障影响大脑功能,也可能是化疗后直接导致大脑内部产生炎症反应,这点尚未明确[22-23]。但有研究明确炎症因子与化疗后认知障碍的发生密切相关,且化疗后大量炎症因子的产生又促进了患者“化疗脑”的发展[24]。体外实验中发现 5-FU 等可显著地促进促炎因子的产生[25]。有学者发现在恶性肿瘤如乳腺癌、霍奇金病等患者体内炎症因子水平显著升高[26-27]、神经元凋亡,猜测这一改变与“化疗脑”的发生密切相关。可肯定的是炎症反应及其相关细胞因子可致神经元受损并降低海马神经元再生功能,导致认知障碍[28]。因此,抑制炎症因子的释放,可能对改善神经损伤及延缓“化疗脑”具有重要的意义。

本研究中不同浓度远志皂苷元对 LPS 诱导的 BV2 细胞产生 NO 的影响的浓度筛选结果显示, 5、25、50、100 μmol/L 的远志皂苷元均无抗炎症反应作用,且与 LPS 组相比,5、25、50、100 μmol/L 的远志皂苷元反而有明显地促炎作用,以 100 μmol/L 效果最显著($P<0.001$);而 1.5、2、2.5、3、3.5 μmol/L 的远志皂苷元均可显著地降低 NO 释放,尤以 2 μmol/L 远志皂苷元降低作用较为显著($P<0.001$)。表明低浓度远志皂苷元可降低 NO 释放,可能具有抗炎症作用。环氧化酶(cyclooxygenase, COX)是花生四烯酸代谢前列腺素过程的主要限速酶,COX 同工酶一 COX-2 是一种重要的炎症介质,炎症反应伴随 COX-2 表达增加与许多神经疾病的病理过程中神经元的变性和凋亡有关。Yang 等[29]发现经甲氨蝶呤治疗乳腺癌小鼠后其海马功能障碍,与其前列腺素合成酶、COX-2 及 NO 合成酶 iNOS 表达上调密切相关。在认知障碍患者或动物模型的研究中发现,氟西汀可通过提高海马神经的再生及可塑性,增加脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)的表达,来改善其认知功能[30-31]。仝太山等[32]研究发现乳腺癌患者化疗后的认知功能障碍与其自身 BDNF 水平下降具有显著相关。茅东升等[33]报道 NGF 可减少 LPS 引起的 PC12 细胞的坏死和凋亡,对 LPS 损伤具有保护作用。还有研究报道 NGF 可抑制 LPS 诱导的成骨细胞产生 NO,同时抑制 COX-2 mRNA 的表达,具有抗炎作用[34]。前期研究中,我们发现远志皂苷元可促进神经突起生长、促进细胞存活,具有类似神经营养因子作用,且还发现远志皂苷元可提高 BDNF mRNA 表达水平[16-18]。本研究选取 2、2.5、3 μmol/L 的远志皂苷元作用于 LPS 诱导的 BV2 细胞,观察炎症因子 COX-2 的表达情况。结果显示,远志皂苷元可不同程度地抑制炎症相关蛋白 COX-2 的表达,以 2 μmol/L 远志皂苷元抑制作用较为明显($P<0.05$)(图 2、3)。表明远志皂苷元可抑制神经炎症因子释放,具有改善神经损伤的作用。

本研究还观察了远志皂苷元对 SH-SY5Y 接受 BV2 炎症上清刺激后是否具有保护作用,发现远志皂苷元不仅可促进 BV2 炎症上清刺激后的 SH-SY5Y 细胞的存活,且呈剂量依赖性;还可显著地降低 SH-SY5Y 接受 BV2 炎症上清刺激后 NO 的释放,这表明远志皂苷元可能具有降低炎症反应的作用,具有神经保护作用。

综上所述,远志皂苷元不仅可降低 LPS 诱导后炎症介质 NO 的释放,抑制炎症介质 COX-2 的表达;也能促进 SH-SY5Y 接受 BV2 炎症上清刺激后细胞存活的同时抑制 NO 的释放量,表明远志皂苷元具有类似神经营养因子作用,改善神经炎症病变,具有潜在的缓解“化疗脑”的作用。在下一步实验中,将建立不同的细胞及动物模型,如化疗药物损伤模型等,进一步观察远志皂苷元的神经保护作用,为“化疗脑”的治疗提供新方向、新思路。

参考文献:

[1] Lange M, Rigal O, Clarisse B, et al. Cognitive dysfunctions in elderly cancer patients: A new challage for oncologists [J]. Cancer Treat Rev, 2014, 40(6): 810-817.

[2] Ren X, St Clair DK, Butterfield DA. Dysregulation of cytokine mediated chemotherapy induced cognitive impairment [J]. Pharmacol Res, 2017, 117: 267-273.

[3] Lyons L, Bennett G, Wigmore P. Animal models of cognitive impairment induced by methotrexate. In: Castillo V, moyano L (eds) methotrexate: pharmacology, clinical uses and adverse effects [J]. Nova Sci Pub, 2012, 11: 181-198.

[4] Kanaskie ML, Loeb SJ. Erratum to: the experience of cognitive change in women with breast cancer following chemotherapy [J].

J Cancer Surviv, 2015, 9(2): 373.

[5] Wang XM, Walitt B, Saligan L, et al. Chemobrain: A critical review and causal hypothesis of link between cytokines and epigenetic reprogramming associated with chemotherapy [J]. Cytokine, 2015, 72(1): 86-96.

[6] Ren X, St Clair DK, Butterfield DA. Dysregulation of cytokine mediated chemotherapyinduced cognitive impairment [J]. Pharmacol Res, 2017, 117: 267 - 273.

[7] Apfel SC, Arezzo JC, Lipson L, et al. Nerve growth factor prevents experimental cisplatin neuropathy [J]. Ann Neurol, 1992, 31(1): 76-80.

[8] Hayakawa K, Itoh T, Niwa H, et al. NGF prevention of neurotoxicity induced by cisplatin, vincristine and taxol depends on toxicity of each drug and NGF treatment schedule: *in vitro* study of adult rat sympathetic ganglion explants [J]. Brain Res, 1998, 794(2): 313-319.

[9] Contreras PC, Vaught JL, Gruner JA, et al. Insulin-like growth factor-I prevents development of a vincristine neuropathy in mice [J]. Brain Res,1997, 774(1-2): 20-26.

[10] Bianchi R, Brines M, Lauria G, et al. Protective effect of erythropoietin and its carbamylated derivative in experimental Cisplatin peripheral neurotoxicity [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(8): 2607-2612.

[11] Orhan B, Yalcin S, Nurlu G, et al. Erythropoietin against cisplatin-induced peripheral neurotoxicity in rats [J]. Med Oncol, 2004, 21(2): 197-203.

[12] Oztürk G, Erdoğan E, Anlar O, et al. Effect of leukemia inhibitory factor in experimental cisplatin neuropathy in mice [J]. Cytokine, 2005, 29(1): 31-41.

[13] 马洪伟, 付文亮, 钟美蓉, 等. 远志药理活性研究进展 [J]. 承德医学院学报, 2010, 27(2): 196-198.

[14] 杨贤志, 陈勤, 陈庆林, 等. 远志皂苷元对 β 淀粉样蛋白片段 1-40 诱导 PC12 细胞凋亡的抑制作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(3): 379-384.

[15] 别曼, 徐颖, 胡慧玲, 等. 远志皂苷元对氧化应激损伤的视网膜神经节细胞的保护作用 [J]. 中国病理生理学杂志, 2012, 28(6): 1091-1096.

[16] 皮婷, 薛小燕, 林炼峰, 等. 远志皂苷元对新生大鼠皮质神经元的营养作用 [J]. 中国药理学与毒理学, 2011, 25(1): 40-44.

[17] 皮婷, 薛晓燕, 罗焕敏. 远志皂苷元神经营养作用研究 [J]. 中药材, 2012, 36(9): 1477-1480.

[18] Pi T, Zhou XW, Cai L, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase activation by senegenin is required for survival and neurite outgrowth of cortical neurons [J]. Mol Med Rep, 2016, 13(2): 1257-1262.

[19] Quasthoff S, Hartung HP. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy [J]. J Neurol, 2002, 249(1): 9-17.

[20] Field TM, Shin M, Stucky CS, et al. Electrochemical measurement of dopamine release and uptake in zebrafish following treatment with carboplatin [J]. Chemphyschem, 2018, 19(10): 1192-1196.

[21] Ahles TA, Saykin AJ. Candidate mechanisms for chemotherapy-induced cognitive changes [J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(3): 192 - 201.

[22] Wu MD, Hein AM, Moravan MJ, et al. Adult murine hippocampal neurogenesis is inhibited by sustained IL-1beta and not rescued by voluntary running [J]. Brain Behav Immun, 2012, 26(2): 292-300.

[23] Bastos GN, Moriya T, Inui F, et al. Involvement of cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-inducedimpairment of the newborn cell survival in the adult mouse dentate gyrus [J]. Neuroscience, 2008, 155(2): 454 - 462.

[24] 李帅, 谢长生. 化疗脑发病机制及治疗的研究进展 [J]. 肿瘤学杂志, 2019, 25(4): 355-358.

[25] Elsea CR, Roberts DA, Druker BJ, et al. Inhibition of p38 MAPK suppresses inflammatory cytokine induction by etoposide, 5-fluorouracil, and doxorubicin without affecting tumoricidal activity [J]. PLoS One, 2008, 3(6): e2355.

[26] Janelsins MC, Mustian KM, Palesh OG, et al. Differential expression of cytokines in breast cancer patients receiving different chemotherapies: implications for cognitive impairment research [J]. Support Care Cancer, 2012, 20(4): 831-839.

[27] Kesler S, Michelle J, Della K, et al. Reduced hippocampal volume and verbal memory performance associated with interleukin - 6 and tumor necrosis factor-alpha levels in chemotherapy-treated breast cancer survivors [J]. Brain Behav Immun, 2013, 30(Suppl0): S109-S116.

[28] Wigmore P. The effect of systemic chemotherapy on neurogenesis, plasticity and memory [J]. Curr Top Behav Neurosci, 2013, 15: 211-240.

[29] Yang M, Kim JS, Kim J, et al. Acute treatment with methotrexate induces hippocampal dysfunction in a mouse model of breast cancer [J]. Brain Res Bull, 2012, 89(1-2): 50-56.

[30] Castrén E, Rantamäki T. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: reactivation of developmental plasticity [J]. Dev Neurobiol, 2010, 70(5): 289-297.

[31] Pechnick RN, Zonis S, Wawrowsky K, et al. Antidepressants stimulate hippocampal neurogenesis by inhibiting p21 expression in the subgranular zone of the hipppocampus [J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27290.

[32] 仝太山, 叶智存, 宗剑, 等. 乳腺癌“化疗脑”与脑源性神经营养因子的相关性 [J].西南医科大学学报, 2017, 40(5): 472-474.

[33] 茅东升, 宋必卫, 朱旭红, 等. 神经生长因子对 PC12 细胞脂多糖损伤的保护作用及其机制 [J]. 中国应用生理学杂志, 2011, 27(1): 93-98, 后插 10.

[34] 汪琼, 路晓淼, 张红园, 等. 神经生长因子对脂多糖诱导的成骨细胞炎症反应的影响 [J]. 现代口腔医学杂志, 2011, 25(4): 290-293.

〔收稿日期〕2020-04-07