

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.02.015

蒺藜超微粉对血管紧张素 II 诱导的下丘脑神经元细胞损伤 IKK- β /NF- κ B 信号通路的影响

郭金昊¹, 姜月华², 杨传华^{2*}, 王震^{1,2}

(1. 山东中医药大学第一临床医学院, 山东省济南市经十路 16369 号, 250355; 2. 山东中医药大学附属医院)

摘要 目的 探讨蒺藜治疗高血压病的可能作用机制。方法 体外原代培养 Wistar 乳鼠下丘脑神经元细胞, 并以血管紧张素 II (Ang II) 诱导细胞损伤即高血压细胞模型。药效学观察时细胞分为 5 组, 模型组 (2×10^{-6} mol/L Ang II)、蒺藜低剂量组 (3 μ g/ml 蒺藜预孵育 2 h 后加入 2×10^{-6} mol/L Ang II)、蒺藜高剂量组 (30 μ g/ml 蒺藜预孵育 2 h 后加入 2×10^{-6} mol/L Ang II)、缬沙坦组 (10^{-5} mol/L 缬沙坦预孵育 2 h 后加入 2×10^{-6} mol/L Ang II)、正常组 (无任何干预), 分别于 Ang II 作用 24、48、72 h 时检测各组细胞绝对数量、神经元轴突长度、胞体面积、存活率、凋亡率, 并于 72 h 时检测细胞因子 IKK- α 、IKK- β 、NF- κ B p65、I κ B α 、JAK2、STAT3、AT1、GnRH、PKC、PI3K 的 mRNA 表达; 药理学观察时细胞分为 6 组, 模型组 (2×10^{-6} mol/L Ang II)、蒺藜组 (30 μ g/ml 蒺藜预孵育 2 h 后加入 2×10^{-6} mol/L Ang II)、缬沙坦组 (10^{-5} mol/L 缬沙坦预孵育 2 h 后加入 2×10^{-6} mol/L Ang II)、拮抗剂组 (20 μ mol/L TPCA-1 预孵育 2 h 后加入 2×10^{-6} mol/L Ang II)、蒺藜 + 拮抗剂组 (30 μ g/ml 蒺藜 + 20 μ mol/L TPCA-1 预孵育 2 h 后加入 2×10^{-6} mol/L Ang II)、正常组 (无任何干预), 根据药效学观察结果确定 Ang II 作用时间及相关细胞因子, 并检测各组细胞相关因子 mRNA 及蛋白的表达。结果 与正常组比较, 模型组从 Ang II 干预 24 h 开始的各时间点细胞绝对数量、胞体面积、存活率、凋亡率均显著升高, 神经元轴突长度显著降低; 与模型组比较, 蒺藜高剂量组、缬沙坦组各时间点细胞绝对数量、胞体面积、存活率、凋亡率均显著下降, 神经元轴突长度增加 ($P < 0.05$)。与正常组比较, 模型组 IKK- β 、NF- κ B p65、JAK2、STAT3、AT1、GnRH、PKC、PI3K 表达显著上调, IKK- α 、I κ B α 表达显著下调 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 蒺藜高剂量组 IKK- β 、NF- κ B p65、JAK2、AT1、GnRH、PKC 表达下降, IKK- α 、I κ B α 表达升高; 蒺藜低剂量组 IKK- β 、NF- κ B p65、AT1、PKC 表达下降, IKK- α 、I κ B α 表达升高; 缬沙坦组 IKK- β 、NF- κ B p65、AT1、GnRH、PKC 表达下降, IKK- α 、I κ B α 表达上调 ($P < 0.05$)。根据以上结果确定药理学观察时 Ang II 干预时间为 24 h, 相关细胞因子为 I κ B α 、IKK- β 、NF- κ B p65、NF- κ B p50。与正常组比较, 模型组下丘脑神经元细胞 IKK- β 、NF- κ B p50、NF- κ B p65 mRNA 和蛋白表达上调, I κ B α 表达下调; 与模型组比较, 缬沙坦组和蒺藜组 NF- κ B p50、NF- κ B p65、IKK- β 的表达下调, I κ B α 表达上调; 与缬沙坦组比较, 蒺藜组 NF- κ B p65、IKK- β 表达下调, I κ B α 表达上调 ($P < 0.05$)。结论 蒺藜可有效维持血压调节中枢功能, 其降压机制可能与调节下丘脑 IKK- β /NF- κ B 信号通路活性有关。

关键词 高血压病; 蒺藜; 下丘脑神经元; IKK- β /NF- κ B 通路; 降压机制; 血管紧张素 II

高血压病是现代社会的常见病、多发病。《中国高血压防治指南 2010》^[1]指出“我国 60 岁以上人群中高血压患病率为 49%, 导致老年高血压的根本原因是老年动脉硬化性血管壁僵硬增加和

血压调节中枢的功能减退。”中药蒺藜具有补肾平肝、化湿祛痰、活血化瘀的功效, 现代药理学研究证实其具有降压、抗动脉硬化、改善中风后遗症、利尿、提高睾酮水平等作用^[2]。本研究旨在观察蒺藜超微粉对血管紧张素 II (Ang II) 诱导的下丘脑神经元损伤是否具有保护作用, 并通过观察其对下丘脑神经元 IKK- β /NF- κ B 通路活性的影响初步

基金项目: 国家自然科学基金(81573916); 泰山学者岗位建设项目; 山东省科技发展计划(2014GSF119011)

* 通讯作者: yangchuanhua1962@126.com, {0531} 68616602

探究其降压的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

出生 24 h 内的 Wistar 乳鼠 20 只, 雌雄不限, 体重 5 ~ 7 g, 清洁级, 购自山东大学动物实验中心, 实验动物合格证号: SCXK (鲁) 2013-0009。

1.2 药物

蒺藜购于山东中医药大学附属医院中药房, 空气干燥, 控制水分含量 < 6%, 经普通研磨式粉碎机、贝利粉碎机依次粉碎, 介质填充率 60% ~ 70%, 振幅 5 mm, 粉碎温度 10 ~ 15℃, 粉碎时间 25 min, 得超微粉, 颗粒度 1 ~ 30 μm, 水提 3 次, 经高效液相色谱法 (HPLC) 鉴定同批药材蒺藜总皂苷含量范围 1.7% ~ 5.0%, 萃取液低温真空蒸发, 实验前以培养基溶解, 0.22 μm 一次性除菌滤器过滤除菌, 4℃ 冰箱保存; 缬沙坦胶囊, 诺华制药生产, 批号: X1763, 80 mg/粒, 实验前先经 DMSO 溶解、培养基稀释 (DMSO 与培养基比例 ≤ 1 : 1000), 0.22 μm 一次性除菌滤器过滤除菌, 4℃ 冰箱保存。

1.3 主要试剂和仪器

神经细胞培养基 (Neurobasal-A, 批号 10888-022)、B27 神经营养因子添加剂 (批号 17504-044), 美国 Gibco 公司; IKK-2 选择性抑制剂 (TPCA-1, 批号 S2824), Selleckchem 公司; 兔抗大鼠 IKKβ 受体 (IKK-β) 多克隆抗体 (批号 15649-1-AP)、兔抗大鼠 NF-κB1 受体 (NF-κB p50) 多克隆抗体 (批号 14220-1-AP)、兔抗大鼠 p65 RELA 受体 (NF-κB p65) 多克隆抗体 (批号 10745-1-AP)、兔抗大鼠 IκBα 受体 (IκBα) 多克隆抗体 (批号 18220-1-AP), 均购于武汉 Proteintech 公司; 二甲基亚砜 (DMSO, 批号 INAF20050), 北京伊诺凯科技有限公司; Ang II (批号 A9525), Sigma 公司; DNA 酶 (批号 D8070)、木瓜蛋白酶 (批号 G8430) 检测试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; 多聚赖氨酸 (批号: 25988630), Sigma 公司; 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑盐 (MTT, 批号 XY-100896), AMRESCO 公司; 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

BB16uV/BB5060uV CO₂ 培养箱, Heraeus 公司; Axiovert 40 倒置相差显微镜, 德国蔡司公司; BD Accuri C6 流式细胞仪, 美国 BD 公司; Light Cycler 480 II 实时荧光定量 PCR 仪, 瑞士罗氏公

司; Multiskan GO 酶标仪, 美国 Thermo Scientific 公司; Fluor Chem Q Protein simple 数字成像系统, 美国普诺森生物科技有限公司。

1.4 细胞培养

50 μg/ml 多聚赖氨酸孵育过夜预包被培养瓶、培养板, 用前超净工作台内吹干。冰上无菌分离剪取 Wistar 乳鼠大脑, 预冷 PBS 漂洗 1 次, 剥除脑膜和血管, 逐层剥离皮层海马等无关脑组织, 暴露下丘脑, 培养基漂洗 1 次, 剪碎成 1 mm³ 左右组织块。加入 2 mg/ml 木瓜蛋白酶 2 ml、42 μg/ml DNA 酶 2 μl, 37℃ 消化 30 min, 每 5 min 轻微震荡 1 次, 之后吹打收集滤液于离心管里, 800 r/min 离心 5 min。弃上清, 加入 Neurobasal-A 或 B27 神经营养因子添加剂 0.5 mmol/L 谷氨酰胺培养基, 镜下计数板计数, 以上述培养基调整细胞密度, 6 孔板和 96 孔板分别种板, 接种密度 7 × 10⁵ /孔, 饱和湿度、5% CO₂、37℃ 培养箱培养, 种板后 4 ~ 6 h 换液。培养 5 ~ 7 天后加各组药物干预。每组设 6 个复孔。

1.5 细胞分组与处理方法

1.5.1 药效学观察 细胞分为 5 组: 模型组 (2 × 10⁻⁶ mol/L Ang II)、蒺藜低剂量组 (3 μg/ml 蒺藜预孵育 2 h 后加入 2 × 10⁻⁶ mol/L Ang II^[8])、蒺藜高剂量组 (30 μg/ml 蒺藜预孵育 2 h 后加入 2 × 10⁻⁶ mol/L Ang II)、缬沙坦组 (10⁻⁵ mol/L 缬沙坦预孵育 2 h 后加入 2 × 10⁻⁶ mol/L Ang II)、正常组 (无任何干预)。

1) 细胞形态学观察: Ang II 作用 24、48、72 h 后, 光学显微镜 200 倍下观察计数下丘脑神经元细胞数量, 每组选取 5 个视野, 取平均值; 采用 Image J 1.48U 软件测量神经元轴突长度、胞体面积。

2) 细胞存活率: 各组细胞分别于加 Ang II 后 20、44、68 h 时加入 5 g/L MTT 20 μl, 再继续培养 4 h, 弃去培养液, 加入 DMSO 150 μl, 震荡、混匀后于酶标仪 490 nm 波长下测吸光度 (OD), 细胞存活率以 OD 值来表示。

3) 细胞凋亡率: 各组细胞分别于加 Ang II 后 24、48、72 h 胰酶消化收集细胞, 预冷的 PBS 洗 1 次, 按照说明书依次以 Annexin V-FITC/PI 孵育, 上流式细胞仪检测细胞凋亡率。

4) 细胞因子检测: Ang II 作用 72 h 后, 对 IκBα、IKK-α、IKK-β、NF-κBp65、JAK2、STAT3、AT1、GnRH、PKC、PI3K 的 mRNA 表达进行初筛。

采用实时荧光定量 PCR 法检测, 检测步骤根据试剂盒说明书进行, 数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析, 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示各药物干预组与对照组间对应基因的表达差异^[4-5]。

1.5.2 药理学观察 细胞分为 6 组: 模型组 (2×10^{-6} mol/L Ang II)、蒺藜组 (30 μ g/ml 蒺藜预孵育 2 h 后加入 2×10^{-6} mol/L Ang II)、缬沙坦组 (10^{-5} mol/L 缬沙坦预孵育 2 h 后加入 2×10^{-6} mol/L Ang II)、拮抗剂组 (20 μ mol/L TPCA-1 预孵育 2 h 后加入 2×10^{-6} mol/L Ang II)、蒺藜 + 拮抗剂组 (30 μ g/ml 蒺藜 + 20 μ mol/L TPCA-1 预孵育 2 h 后加入 2×10^{-6} mol/L Ang II)、正常组 (无任何干预)。Ang II 作用时间根据 1.5.1 结果确定。神经元对 Ang II 的消耗分解作用较快^[3], 每 6 h 补充 1 次 Ang II 以维持培养液中 Ang II 的作用浓度。

细胞因子 mRNA 及蛋白表达检测: 根据 1.5.1 结果确定相关因子, mRNA 表达检测方法同 1.5.1 中细胞因子检测方法, 蛋白表达检测如下: 加入预冷的含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液冰上裂解 5 min, 12 000 r/min 离心 15 min, 提取总蛋白。BCA 法检测蛋白浓度。12% SDS-PAGE 电泳, 上样量 50 μ g; 半干法电转印后, 以含 5% 脱脂奶的 PBS-T 室温封闭 1 h。分别加入兔抗大鼠 IKK- β 一抗 (1: 500 稀释)、兔抗大鼠 NF- κ B p50 一抗 (1: 500 稀释)、兔抗大鼠 NF- κ B p65 一抗 (1: 1000 稀释)、兔抗大鼠 I κ B α 一抗 (1: 800 稀释), 以 β -actin 为内参, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日 PBS 洗涤 5 次, 每次 5 min, 加入山羊抗兔 IgG 二抗 (1: 20 000) 室温孵育 1 h。化

学发光显色, Fluor Chem Q 曝光, 条带半定量分析。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组不同时间细胞存活率、凋亡率、细胞绝对数量、轴突长度和胞体面积比较

表 1 示, 模型组各时间点细胞存活率、凋亡率、细胞绝对数量、胞体面积均显著高于正常组, 神经元轴突长度显著低于正常组 ($P < 0.05$)。因此, 认为 Ang II 干预 24 h 即可表现出下丘脑神经元细胞被诱导造模的细胞学特征, 故在 1.5.2 药理学观察中选择 24 h 为观察时间点。与模型组比较, 蒺藜高剂量组、缬沙坦组各时间点存活率、凋亡率、细胞绝对数量、胞体面积均显著下降, 神经元轴突长度增加, 蒺藜低剂量组各时间点细胞凋亡率下降 ($P < 0.05$); 蒺藜高剂量组各指标与缬沙坦组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 在 24 h 时蒺藜低剂量组细胞存活率显著低于缬沙坦组 ($P < 0.05$)。蒺藜高剂量组各时间点细胞绝对数量、细胞胞体面积明显小于蒺藜低剂量组 ($P < 0.05$)。

2.2 蒺藜调节下丘脑神经元可能的相关因子 mRNA 表达的初筛

表 2 示, 与正常组比较, 模型组 AT1、GnRH、IKK- β 、NF- κ B p65、JAK2、STAT3、PKC、PI3K 表达显著上调, IKK- α 、I κ B α 表达显著下调 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 蒺藜高剂量组 AT1、IKK- β 、

表 1 各组下丘脑神经元细胞不同时间细胞存活率、凋亡率、绝对数量、轴突长度和胞体面积比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	样本数	存活率 (OD 值)	凋亡率 (%)	绝对数量 (个/mm ²)	轴突长度 (μ m)	胞体面积 (μ m ²)
正常组	24 h	6	0.41 $\pm$ 0.02	3.21 $\pm$ 0.48	90.62 $\pm$ 11.25	98.65 $\pm$ 12.34	163.39 $\pm$ 21.05
	48 h	6	0.63 $\pm$ 0.03	3.58 $\pm$ 0.37	141.23 $\pm$ 17.81	135.22 $\pm$ 20.66	254.31 $\pm$ 24.36
	72 h	6	0.74 $\pm$ 0.05	3.97 $\pm$ 0.52	162.33 $\pm$ 20.32	182.67 $\pm$ 25.18	317.52 $\pm$ 19.34
模型组	24 h	6	0.56 $\pm$ 0.04*	9.49 $\pm$ 1.12*	123.19 $\pm$ 13.56*	70.34 $\pm$ 8.68*	247.82 $\pm$ 28.25*
	48 h	6	0.81 $\pm$ 0.05*	14.86 $\pm$ 1.41*	198.58 $\pm$ 22.67*	94.55 $\pm$ 13.07*	324.68 $\pm$ 29.81*
	72 h	6	0.95 $\pm$ 0.04*	25.71 $\pm$ 2.16*	231.74 $\pm$ 30.18*	128.84 $\pm$ 15.06*	420.36 $\pm$ 27.31*
蒺藜高剂量组	24 h	6	0.47 $\pm$ 0.02 Δ	5.37 $\pm$ 0.64 $\Delta\Delta$	92.87 $\pm$ 9.18 $\Delta\Delta$	93.48 $\pm$ 10.39 Δ	170.36 $\pm$ 22.67 $\Delta\Delta$
	48 h	6	0.70 $\pm$ 0.04 Δ	8.95 $\pm$ 0.81 $\Delta\Delta$	145.87 $\pm$ 17.64 $\Delta\Delta$	129.54 $\pm$ 15.31 Δ	261.31 $\pm$ 26.15 $\Delta\Delta$
	72 h	6	0.83 $\pm$ 0.04 Δ	17.13 $\pm$ 1.82 Δ	170.31 $\pm$ 21.34 $\Delta\Delta$	169.51 $\pm$ 20.62 Δ	334.25 $\pm$ 27.68 $\Delta\Delta$
蒺藜低剂量组	24 h	6	0.50 $\pm$ 0.03	7.38 $\pm$ 0.78 Δ	117.54 $\pm$ 12.31	77.69 $\pm$ 8.98	209.21 $\pm$ 25.14
	48 h	6	0.75 $\pm$ 0.04	11.19 $\pm$ 1.28 Δ	189.69 $\pm$ 20.16	106.64 $\pm$ 17.91	301.64 $\pm$ 27.34
	72 h	6	0.88 $\pm$ 0.05	20.47 $\pm$ 2.33 Δ	220.36 $\pm$ 26.46	145.63 $\pm$ 16.18	380.91 $\pm$ 28.34
缬沙坦组	24 h	6	0.44 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta$	6.24 $\pm$ 0.77 Δ	97.89 $\pm$ 9.98 Δ	91.61 $\pm$ 9.12 Δ	183.47 $\pm$ 21.34 Δ
	48 h	6	0.68 $\pm$ 0.03 Δ	9.67 $\pm$ 1.36 Δ	156.45 $\pm$ 16.48 Δ	124.87 $\pm$ 15.02 Δ	264.33 $\pm$ 22.18 $\Delta\Delta$
	72 h	6	0.79 $\pm$ 0.05 Δ	18.54 $\pm$ 2.14 Δ	175.97 $\pm$ 20.67 Δ	162.89 $\pm$ 17.08 Δ	361.67 $\pm$ 25.54 Δ

注: 与正常组同时点比较, * $P < 0.05$; 与模型组同时点比较, $\Delta P < 0.05$; 与蒺藜低剂量组同时点比较, $\Delta\Delta P < 0.05$

NF- κ B p65、JAK2、GnRH、PKC 表达下降, IKK- α 、I κ B α 表达升高; 蒺藜低剂量组 IKK- β 、NF- κ B p65、AT1、PKC 表达降低, IKK- α 、I κ B α 表达升高; 缬沙坦组显著下调 IKK- β 、NF- κ B p65、AT1、GnRH、PKC, 上调 IKK- α 、I κ B α 表达 ($P < 0.05$)。与缬沙坦组比较, 蒺藜高剂量组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 蒺藜低剂量组上调 IKK- β 、NF- κ B p65 表达, 下调 IKK- α 、I κ B α 表达 ($P < 0.05$)。与蒺藜低剂量组比较, 蒺藜高剂量组显著降低 I κ B α 、IKK- β 、NF- κ B p65、GnRH、PI3K 表达, 上调 IKK- α 、I κ B α 表达 ($P < 0.05$)。

2.3 各组下丘脑神经元相关因子 mRNA 和蛋白质表达比较

根据 2.2 初筛结果, 我们推测 IKK- β /NF- κ B 通路是蒺藜调节下丘脑神经元数量、形态、功能的

主要通路之一, 因此, 在 1.5.2 药理学观察中确定相关因子为 I κ B α 、IKK- β 、NF- κ B p65, 为了全面研究, 同时确定 NF- κ B p50 这一重要因子。表 3、表 4 示, 与正常组比较, 模型组下丘脑神经元细胞 IKK- β 、NF- κ B p50、NF- κ B p65 mRNA 和蛋白表达显著上调, I κ B α 表达显著下调 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 缬沙坦组和蒺藜组 IKK- β 、NF- κ B p50、NF- κ B p65 的表达显著下调, I κ B α 表达显著上调 ($P < 0.05$)。与缬沙坦组比较, 蒺藜组 NF- κ B p65、IKK- β 表达下调, I κ B α 表达上调 ($P < 0.05$)。

3 讨论

下丘脑中核转录因子 NF- κ B 家族分布广泛, 通常与抑制蛋白 I κ B 结合呈非激活状态。Ang II 与其受体 AT1 结合后, 可以激活 IKK- β /NF- κ B 通路

表 2 各组下丘脑神经元细胞相关因子 mRNA 表达初筛比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	I κ B α	IKK- α	IKK- β	NF- κ B p65	JAK2
正常组	6	1.01 $\pm$ 0.03	1.03 $\pm$ 0.05	1.02 $\pm$ 0.04	1.06 $\pm$ 0.03	1.04 $\pm$ 0.07
模型组	6	0.33 $\pm$ 0.04*	0.21 $\pm$ 0.06*	14.58 $\pm$ 0.31*	15.31 $\pm$ 0.36*	2.15 $\pm$ 0.07*
蒺藜高剂量组	6	0.86 $\pm$ 0.07 Δ $\blacktriangle$	0.75 $\pm$ 0.04 Δ $\blacktriangle$	8.57 $\pm$ 0.12 Δ $\blacktriangle$	7.79 $\pm$ 0.12 Δ $\blacktriangle$	1.93 $\pm$ 0.08 Δ
蒺藜低剂量组	6	0.62 $\pm$ 0.06 Δ	0.64 $\pm$ 0.08 Δ	11.88 $\pm$ 0.08 Δ	12.48 $\pm$ 0.15 Δ	1.96 $\pm$ 0.18
缬沙坦组	6	0.85 $\pm$ 0.02 Δ $\blacktriangle$	0.83 $\pm$ 0.06 Δ $\blacktriangle$	6.63 $\pm$ 0.11 Δ $\blacktriangle$	7.94 $\pm$ 0.13 Δ $\blacktriangle$	1.79 $\pm$ 0.09 Δ

组别	样本数	STAT3	AT1	GnRH	PKC	PI3K
正常组	6	1.02 $\pm$ 0.09	1.03 $\pm$ 0.07	1.05 $\pm$ 0.05	1.07 $\pm$ 0.06	1.06 $\pm$ 0.04
模型组	6	1.67 $\pm$ 0.19*	2.01 $\pm$ 0.14*	2.35 $\pm$ 0.17*	1.66 $\pm$ 0.04*	1.86 $\pm$ 0.13*
蒺藜高剂量组	6	1.55 $\pm$ 0.03	1.44 $\pm$ 0.05 Δ	1.69 $\pm$ 0.06 Δ $\blacktriangle$	1.48 $\pm$ 0.04 Δ	1.88 $\pm$ 0.05 Δ $\blacktriangle$
蒺藜低剂量组	6	1.64 $\pm$ 0.09	1.52 $\pm$ 0.05 Δ	2.13 $\pm$ 0.14	1.37 $\pm$ 0.07 Δ	1.72 $\pm$ 0.09
缬沙坦组	6	1.45 $\pm$ 0.12	1.48 $\pm$ 0.05 Δ	1.88 $\pm$ 0.14 Δ	1.47 $\pm$ 0.06 Δ	1.85 $\pm$ 0.07

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与蒺藜低剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

表 3 各组下丘脑神经元细胞相关因子 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	I κ B α	IKK- β	NF- κ B p50	NF- κ B p65
正常组	6	1.06 $\pm$ 0.08	1.01 $\pm$ 0.09	1.05 $\pm$ 0.07	1.03 $\pm$ 0.05
模型组	6	0.23 $\pm$ 0.08*	15.92 $\pm$ 1.86*	11.82 $\pm$ 1.03*	16.46 $\pm$ 1.67*
拮抗剂组	6	0.67 $\pm$ 0.06	5.21 $\pm$ 0.79	3.27 $\pm$ 0.47	6.26 $\pm$ 0.71
蒺藜组	6	0.54 $\pm$ 0.06 Δ $\blacktriangle$	7.68 $\pm$ 1.12 Δ	5.45 $\pm$ 0.68 Δ	8.51 $\pm$ 0.71 Δ $\blacktriangle$
蒺藜 + 拮抗剂组	6	0.78 $\pm$ 0.05	4.18 $\pm$ 0.63	2.22 $\pm$ 0.67	4.17 $\pm$ 0.84
缬沙坦组	6	0.43 $\pm$ 0.03 Δ	8.61 $\pm$ 1.09 Δ	6.55 $\pm$ 0.72 Δ	10.63 $\pm$ 0.65 Δ

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与缬沙坦组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

表 4 各组下丘脑神经元细胞相关因子蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	I κ B α	IKK- β	NF- κ B p50	NF- κ B p65
正常组	6	0.72 $\pm$ 0.05	0.26 $\pm$ 0.03	0.24 $\pm$ 0.04	0.29 $\pm$ 0.03
模型组	6	0.31 $\pm$ 0.04*	0.67 $\pm$ 0.06*	0.77 $\pm$ 0.07*	0.81 $\pm$ 0.09*
拮抗剂组	6	0.61 $\pm$ 0.07	0.39 $\pm$ 0.04	0.36 $\pm$ 0.06	0.46 $\pm$ 0.05
蒺藜组	6	0.51 $\pm$ 0.04 Δ	0.41 $\pm$ 0.03 Δ $\blacktriangle$	0.49 $\pm$ 0.05 Δ	0.56 $\pm$ 0.06 Δ
蒺藜 + 拮抗剂组	6	0.68 $\pm$ 0.06	0.32 $\pm$ 0.03	0.31 $\pm$ 0.03	0.37 $\pm$ 0.04
缬沙坦组	6	0.48 $\pm$ 0.04 Δ	0.51 $\pm$ 0.04 Δ	0.47 $\pm$ 0.05 Δ	0.61 $\pm$ 0.07 Δ

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与缬沙坦组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

导致炎症反应^[6-8]。研究证实, IKK- β /NF- κ B 通路的活化及其所诱发的炎症反应参与高血压、神经退行性变、肥胖等多种中枢调节异常疾病的关键环节^[9]。随着年龄的增长, 脑细胞逐渐衰老, 脑重量下降、神经元数量减少、脑功能减退, 而下丘脑衰老的具体表现之一即是对血压调节能力的降低^[10]。激活下丘脑内侧基底部和背内侧核 IKK- β /NF- κ B 信号通路可加强小鼠促阿片黑皮素前体神经元合成与释放、加强黑皮素 4 受体的表达, 导致小鼠血压快速增高^[11], 且增龄和高血压在激活下丘脑 IKK- β /NF- κ B 通路过程中具有协同作用^[12], 而下丘脑低度炎症状态和 IKK- β /NF- κ B 通路的活化亦可加剧老年高血压的发生、发展, 造成恶性循环。

神经元结构和功能的完整性是维持神经正常功能的基础, 其轴突是神经元易于受损的细胞部位。本研究中, 在 Ang II 的诱导下, 下丘脑神经元出现轴突长度减小、胞体肿胀等形态改变, 且细胞数量增多、凋亡率上升, 应用蒺藜干预后, 下丘脑神经元细胞数量和凋亡率下降、神经元轴突长度增加、胞体肿胀减轻, 提示其可有效改善 Ang II 诱导的下丘脑神经元细胞损伤, 并呈现一定的剂量依赖性。

蒺藜味苦辛、性温, 功善补肾平肝、化湿祛痰、活血化瘀, 为补肾平肝要药, 是中医心血管内科和神经内科的常用药。既往研究发现, 蒺藜可以改善 Ang II、氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 所诱导的血管内皮细胞增生、功能紊乱和内皮损伤, 证实了其降压、抗动脉粥样硬化的药效^[3], 但其作用机制是以中枢降压为主抑或是以改善血管功能为主尚未明确。本研究结果显示, 蒺藜可有效抑制 Ang II 诱导的下丘脑神经元细胞中 NF- κ B p65 的活化, 升高 IKK- α 、IkB α 表达, 降低 IKK- β /NF- κ B 通路活性, 改善下丘脑神经元的炎症状态。在以 IKK- β 拮抗剂 TPCA-1 阻断了 IKK- β /NF- κ B 通路后, 细胞 IKK- β /NF- κ B 通路相关基因、蛋白改变基本恢复正常, 说明 IKK- β /NF- κ B 通路的活化在 Ang II 诱导的下丘脑神经元病理改变中具有重要的作用; 应用蒺藜和 TPCA-1 同时干预时, 下丘脑神经元 IKK- β /NF- κ B 通路重要的基因、蛋白改变基本恢复正常, 蒺藜药效表现不明显, 推测一方面由于 TPCA-1 作用强大, 另一方面也说明 IKK- β /NF- κ B 通路可能是蒺藜的作用靶点。因此, 我们推测蒺藜降压可能与其调节下丘脑 IKK- β /NF- κ B 信号通路活性密切相关。但是, 蒺藜和 TPCA-1 同时干预细胞时, 下丘脑神经元的凋亡率低于蒺藜或

TPCA-1 单独干预, 推测蒺藜和 TPCA-1 可能具有一定的协同作用, 或 IKK- β /NF- κ B 通路只是其作用靶点之一, 蒺藜还有其他的靶点和作用通路有待深入研究。本研究中以蒺藜全药材超微粉进行观察, 未能充分明确其有效成分, 复杂成分导致药物表现出多靶点效应, 因此, 其药理机制和确切的作用靶点尚有待进一步研究。

参考文献

- [1] 中国高血压防治指南修订委员会. 中国高血压防治指南 2010 [J]. 中华心血管病杂志, 2011, 39(7): 579-616.
- [2] STAESSEN JA, GASOWSKI J, WANG JG, et al. Risks of untreated and treated isolated systolic hypertension in the elderly: meta-analysis of outcome trials [J]. Lancet, 2000, 355(9207): 865-872.
- [3] JIANG YH, YANG CH, LI W, et al. Aqueous extracts of Tribulus terrestris protects against oxidized low-density lipoprotein-induced endothelial dysfunction [J]. Chin J Integr Med, 2016, 22(3): 193-200.
- [4] CHANG L, KARIN M. Mammalian MAP kinase signalling-cascades [J]. Nature, 2001, 410(6824): 37-40.
- [5] YAMAMOTO K, HAMADA H, SHINKAI H, et al. The KDEL receptor modulates the endoplasmic reticulum stress response through mitogen-activated protein kinase signaling cascades [J]. J Biol Chem, 2003, 278(36): 34525-34532.
- [6] BARDGETT ME, HOLBEIN WW, HERRERA-ROSALES M, et al. Ang II salt hypertension depends on neuronal activity in the hypothalamic paraventricular nucleus but not on local actions of tumor necrosis factor- α [J]. Hypertension, 2014, 63(3): 527-534.
- [7] MAKAROV SS. NF- κ B in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction [J]. Arthritis Res, 2001, 3(4): 200-206.
- [8] TAK PP, FIRESTEIN GS. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases [J]. J Clin Invest, 2001, 107(1): 7-11.
- [9] LESNIKOV VA, LESNIKOVA MP, DEEG HJ. Neuroimmunomodulation and aging: a role for transferrin and the hypothalamus/thymus axis [J]. Curr Aging Sci, 2013, 6(1): 21-28.
- [10] BIANCARDI VC, SON SJ, AHMADI S, et al. Circulating angiotensin II gains access to the hypothalamus and brain stem during hypertension via breakdown of the blood-brain barrier [J]. Hypertension, 2014, 63(3): 572-579.
- [11] PURKAYASTHA S, ZHANG G, CAI D. Uncoupling the mechanisms of obesity and hypertension by targeting hypothalamic IKK- β and NF- κ B [J]. Nat Med, 2011, 17(7): 883-887.
- [12] TANG Y, PURKAYASTHA S, CAI D. Hypothalamic

microinflammation: a common basis of metabolic syndrome

and aging [J]. Trends Neurosci, 2015, 38(1): 36-44.

Effects of Jili [*Tribulus terrestris* L. 蒺藜] on IKK- β /NF- κ B Signaling Pathway in Hypothalamic Neuron Injury Induced by Angiotensin II

GUO Jinhao¹, JIANG Yuehua², YANG Chuanhua², WANG Zhen^{1,2}

(1. First School of Clinical Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, 250355; 2. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the potential mechanism of Jili [*Tribulus terrestris* L. 蒺藜] in the treatment of hypertension. **Methods** The hypertension cell model was induced by angiotensin II (Ang II) in the primary cultured hypothalamic neurons from neonatal Wistar rats. During the pharmacodynamics observation, the cells were divided into 5 groups: model group (2×10^{-6} mol/L Ang II), low dose Jili group (preincubated with 3 μ g/ml Jili for 2 hours, then 2×10^{-6} mol/L Ang II was added), high dose Jili group (preincubated with 30 μ g/ml Jili for 2 hours, then 2×10^{-6} mol/L Ang II was added), Valsartan group (preincubated with 10^{-5} mol/L Valsartan for 2 hours, then 2×10^{-6} mol/L Ang II was added) and control group (with no intervention). Then the cell number, the axonal length, the soma area, the survival rate and the apoptosis rate in each group were detected at the 24th, 48th and 72nd hour after Ang II intervention. Also, the mRNA expression level of some cytokines, such as I κ B α , IKK- α , IKK- β , NF- κ B p65, JAK2, STAT3, AT1, GnRH, PKC and PI3K, were detected at the 72nd hour. During the pharmacological observation, the cells were divided into 6 groups: model group (2×10^{-6} mol/L Ang II), Jili group (preincubated with 30 μ g/ml Jili for 2 hours, then 2×10^{-6} mol/L Ang II was added), Valsartan group (preincubated with 10^{-5} mol/L Valsartan for 2 hours, then 2×10^{-6} mol/L Ang II was added), antagonist group (preincubated with 20 μ mol/L TPCAK-1 for 2 hours, then 2×10^{-6} mol/L Ang II was added), Jili plus antagonist group (preincubated with 30 μ g/ml Jili and 20 μ mol/L TPCAK-1 for 2 hours, then 2×10^{-6} mol/L Ang II was added) and control group (with no intervention). Then based on the results of pharmacodynamics observation, the action time of Ang II and the related cytokines were determined. Also, the expression level of mRNA and protein of related cytokines of each group were detected.

Results Compared with those in the control group, the cell number, the soma area, the survival rate and the apoptosis rate in the model group increased significantly, while the axonal length decreased significantly at each time point after 24 hours after Ang II intervention; compared with those in the model group, the cell numbers, the soma areas, the survival rates and the apoptosis rates in the high dose Jili group and Valsartan group decreased significantly, while the axonal lengths increased significantly ($P < 0.05$). Compared with those in the control group, the expression levels of IKK- β , NF- κ B p65, JAK2, STAT3, AT1, GnRH, PKC and PI3K increased significantly, while the levels of IKK- α and I κ B α decreased significantly in the model group ($P < 0.05$). Compared with those in the model group, the expression levels of IKK- β , NF- κ B p65, JAK2, AT1, GnRH and PKC decreased, and the levels of IKK- α and I κ B α increased in the high dose Jili group; the expression levels of IKK- β , NF- κ B p65, AT1 and PKC decreased, and the levels of IKK- α and I κ B α increased in the low dose Jili group; the expression levels of IKK- β , NF- κ B p65, AT1, GnRH and PKC decreased, and the levels of IKK- α and I κ B α increased in Valsartan group ($P < 0.05$). Based on the results above, the intervention time of Ang II was determined as 24h, and the related cytokines were determined as I κ B α , IKK- β , NF- κ B p65 and NF- κ B p50. Compared with those in the control group, the expression levels of the mRNA and the protein of IKK- β , NF- κ B p50 and NF- κ B p65 increased, while those of I κ B α decreased in the model group; compared with those in the model group, the expressions of IKK- β , NF- κ B p50 and NF- κ B p65 decreased, while the expression of I κ B α increased in Valsartan group and Jili group; compared with those in Valsartan group, the expressions of NF- κ B p65 and IKK- β decreased, while the expression of I κ B α increased in Jili group ($P < 0.05$).

Conclusion Jili could maintain the function of the blood pressure regulation center, and its potential mechanism of anti-hypertension might be related to regulating the IKK- β /NF- κ B signaling pathway in hypothalamic neurons.

Keywords hypertension; Jili [*Tribulus terrestris* L. 蒺藜]; hypothalamic neuron; IKK- β /NF- κ B signaling pathway; mechanism of anti-hypertension; angiotensin II

(收稿日期: 2016-06-30; 修回日期: 2016-10-23)

编辑: 王利芬