

虫草素抑制脂多糖诱导的小胶质细胞活化及神经保护作用

孟雪莲¹, 陈长兰^{1,*}, 孔维娟², 单玉华¹, 代启超², 李 丹¹, 王 旭¹, 富晓越¹, 贲松彬²

(1. 辽宁大学药学院, 辽宁 沈阳 110036; 2. 辽宁大学生命科学院, 辽宁 沈阳 110036)

摘 要: 目的: 研究虫草素抑制脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 诱导小胶质细胞激活及其神经保护作用。方法: 培养原代小鼠小胶质细胞, 以LPS激活小胶质细胞使NO大量释放, 同时给予不同浓度的虫草素 (0.1~10 μmol/L) 处理, 四甲基偶氮唑蓝 (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT) 法检测细胞存活率, Griess法测定小胶质细胞NO释放, 逆转录聚合酶链式反应法检测细胞内诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 的mRNA表达。以硝普钠作为NO供体, 以1,1-二苯基苦基苯肼 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基作为自由基的供体, 分别考察虫草素对NO和DPPH自由基的直接清除作用。分别以H₂O₂和以LPS激活的小胶质细胞条件培养液损伤小鼠PC12神经元细胞, MTT法考察虫草素对PC12细胞损伤的保护作用。此外, 以羟胺法测定超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性。结果: 虫草素能够显著抑制LPS激活的原代小鼠小胶质细胞NO产生及iNOS mRNA表达, 同时不影响细胞的存活率; 虫草素具有显著的NO清除和DPPH自由基清除作用; 虫草素本身对PC12小鼠神经元细胞的生长没有显著影响, 但能够显著抑制H₂O₂或活化小胶质细胞的条件培养液引起的PC12细胞损伤。此外, 虫草素可显著提高H₂O₂损伤的PC12细胞中SOD活性。结论: 虫草素可通过抑制iNOS转录和直接清除NO而抑制LPS激活小胶质细胞的NO产生; 虫草素还可通过抑制小胶质细胞激活而对PC12神经元细胞产生保护作用, 也可通过提高SOD活性而保护H₂O₂损伤的PC12细胞。因此, 虫草素可能对与小胶质细胞激活相关的神经退行性疾病具有潜在的防治作用。

关键词: 虫草素; 脂多糖; 小胶质细胞激活; 一氧化氮; 诱导型一氧化氮合酶; 神经保护

Cordycepin Inhibits Microglial Activation Induced by Lipopolysaccharide and Provides Neuroprotection

MENG Xue-lian¹, CHEN Chang-lan^{1,*}, KONG Wei-juan², SHAN Yu-hua¹, DAI Qi-chao², LI Dan¹, WANG Xu¹, FU Xiao-yue¹, BEN Song-bin²

(1. School of Pharmacy, Liaoning University, Shenyang 110036, China;

2. School of Life Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China)

Abstract: Objective: To evaluate the inhibition of cordycepin on microglial activation induced by lipopolysaccharide (LPS) and the protection of neuronal cells by cordycepin. Methods: The effect of cordycepin (0.1–10 μmol/L) on cell viability was evaluated by MTT assay. Nitrite levels in culture supernatants were examined by Griess assay. The mRNA expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) was evaluated by RT-PCR. The NO-scavenging and DPPH free radical-scavenging activities of cordycepin were measured using SNP as a NO donor and DPPH as a free radical donor, respectively. The effect of cordycepin on the decreased viability of PC12 neurons induced by H₂O₂ or conditioned medium obtained from LPS-activated microglial cells was evaluated by MTT assay. In addition, the superoxide dismutase (SOD) activity was examined by hydroxylamine method. Results: Cordycepin could inhibit the production of NO and the mRNA expression of iNOS in LPS-activated primary mouse microglial cells obviously. However, treatment with cordycepin (0.1–10 mol/L) had no significant cytotoxicity. Cordycepin showed significant scavenging activity towards nitric oxide radical (NO) and DPPH free radicals. Cordycepin alone did not influence the viability of PC12 neurons; however, it improved the decreased viability of PC12 neurons induced by H₂O₂ or conditioned medium from LPS-activated microglia. In addition, the SOD activity in H₂O₂-

收稿日期: 2014-01-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31371085); 辽宁省教育厅科学研究一般项目 (L2013010);

辽宁省自然科学基金项目 (2014020171); 辽宁大学本科教学改革研究项目 (JG2013YA0024);

辽宁省天然产物制药工程技术研究中心资助项目

作者简介: 孟雪莲 (1978—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为神经药理学。E-mail: rubymxl@163.com

*通信作者: 陈长兰 (1963—), 男, 教授, 博士, 研究方向为遗传学与生物制药。E-mail: chenchanglanbio@aliyun.com

treated PC12 cells could be upgraded. Conclusion: It is suggested that cordycepin can inhibit LPS-induced NO production by blocking the transcriptional levels of iNOS in microglial cells. Cordycepin can protect PC12 neurons from toxic influence by activated microglia, and protect H_2O_2 -impaired PC12 cells by improving SOD activity. Cordycepin may have therapeutic potential for the treatment of neurodegenerative diseases accompanied by microglial activation.

Key words: cordycepin; lipopolysaccharide; microglial activation; nitric oxide; iNOS; neuroprotection

中图分类号: R967

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 19-0224-07

doi:10.7506/spkx1002-6630-201419045

小胶质细胞是脑内常驻的免疫和吞噬细胞,在中枢神经系统发挥重要作用^[1]。损伤信号刺激后小胶质细胞激活,导致细胞因子和炎症介质(如NO、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、活性氧等)的表达和释放增加,进一步导致神经细胞的损伤和死亡,最终将导致如阿尔茨海默病、帕金森病、多发性硬化症、人类免疫缺陷病毒相关性痴呆等神经退行性疾病的发生^[2]。研究表明,抑制小胶质细胞的活化可能成为防治神经退行性疾病的一个重要策略^[3]。

虫草是指包括冬虫夏草在内的广义的虫草属真菌的总称。虫草性甘、温平、无毒,是著名的滋补强壮保健品,有补虚健体之效,是我国传统的名贵中药材,与人参、鹿茸并称“中药三大宝”^[4]。其特有的活性成分虫草素(cordycepin)即3'-脱氧腺苷(3'-deoxyadenosine),为嘌呤类生物碱,分子式为 $C_{10}H_{13}N_5O_3$,其结构式如图1所示。1951年首次从蛹虫草(*Cordyceps militaris*)的培养液中分离获得虫草素。因虫草素具有抗肿瘤、抗炎、抗菌、免疫调节、抗衰老、抗自由基等多种生物活性,已引起世界范围内广泛的关注^[5]。研究证实,在LPS活化的RAW 264.7巨噬细胞中,虫草素能抑制NO的产生和诱导型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的表达,抑制Akt和p38的磷酸化表达,抑制TNF- α 的产生、I κ B- α 的磷酸化和NF- κ B的活化,从而发挥抗炎作用^[6]。在LPS激活的BV2小胶质细胞中,虫草素可通过抑制NF- κ B、Akt、MAPKs通路,进而抑制NO、前列腺素E2及多种前炎症因子的释放^[7]。已有研究证实,虫草素可透过血脑屏障发挥神经保护作用^[8-10]。本课题组前期研究了蛹虫草的发酵培养技术及虫草素的分离、提取等工艺^[11-12],本实验主要考察了虫草素的抗神经炎症及神经保护作用,为阐明其在以抑制小胶质细胞活化为靶点,防治炎症相关的中枢神经退行性疾病中的应用提供实验依据。

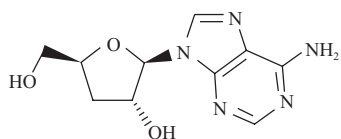


图1 虫草素的化学结构

Fig.1 Chemical structure of cordycepin

1 材料与方法

1.1 动物、材料与试剂

新生1 d的昆明种小鼠,由辽宁中医药大学动物实验中心提供。

虫草素(纯度98%) 沈阳鼎国生物技术有限公司;脂多糖(lipopolysaccharides, LPS, *E. coli* O26: B6) 美国Sigma公司;马血清、DMEM高糖培养基 美国HyClone公司;胰蛋白酶、胎牛血清、四甲基偶氮唑蓝(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT) 美国Gibco公司;小鼠抗大鼠CD11b/c单克隆抗体 德国ImmunoTools公司;RNAiso Plus、Taq酶、M-MLV逆转录酶 日本TaKaRa公司;Fluo-3/AM 美国Invitrogen公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒 南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器与设备

CO₂培养箱 德国Thermo Scientific公司;倒置显微镜 日本Olympus公司;酶标仪 瑞士帝肯公司;PCR仪 美国Bio-Rad公司;超低温-80℃冰箱 日本Sanyo公司;高速冷冻离心机 安徽科大创新股份有限公司;DYY-IIIB型稳压稳流定时电泳仪 北京六一仪器厂;凝胶成像系统 北京君意东方电泳设备有限公司;紫外分光光度计 日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养

1.3.1.1 原代小胶质细胞的培养和鉴定

参照文献[13]方法制备原代小胶质细胞。无菌条件下取新生1 d小鼠的大脑皮层,剥除脑膜及血管,组织剪碎后以质量分数0.25%的胰酶37℃消化10 min;以含体积分数5%的胎牛血清的DMEM培养基终止消化,1 000×g离心5 min后,以新鲜培养液重悬,之后用200目筛网过滤制备混合细胞悬液;计数,将细胞密度调整为 5×10^5 个/mL,种植于75 cm²培养瓶中,常规培养。每3~4 d换一次培养液,培养至11~14 d,待长出小胶质细胞后,振荡收集上清中的细胞,此时所得细胞成分即绝大部分为小胶质细胞;将收集得到的细胞悬液转移重新种植于96孔培养板中,用于以下实验研究。此方法制备的小胶质细胞经CD11b/c免疫细胞化学染色鉴定,纯度达95%以上。

1.3.1.2 PC12细胞的培养

大鼠PC12细胞株由辽宁大学生命科学院芦秀丽教授惠赠。以DMEM培养基（内含体积分数5%的胎牛血清、体积分数5%的马血清、100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素），37℃、5% CO₂条件下培养。待细胞80%汇合或接近汇合成片后，以0.25%胰蛋白酶消化传代。

1.3.2 细胞存活率的测定

采用MTT法测定。取对数生长期的原代小胶质细胞，以 5×10^5 个/mL接种于96孔板内，每孔100 μ L，细胞贴壁培养24 h后换成无血清的新鲜培养液，加虫草素处理。虫草素的浓度设置为0.1、0.3、1.0、3.0、10.0 μ mol/L单独或与LPS（1 μ g/mL）共同作用，同时设空白对照组（0 μ mol/L）。继续培养48 h后，向细胞液中加入MTT溶液（每孔10 μ L），于37℃下共同孵育3 h，吸除培养液，然后每孔加100 μ L的二甲基亚砜振荡10 min，492 nm波长处测定其光密度值，计算细胞存活率。

1.3.3 小胶质细胞NO释放的测定

应用Griess分析法检测细胞中亚硝酸盐水平。取对数生长期的原代小胶质细胞，以 5×10^5 个/mL接种于96孔板内，每孔100 μ L，细胞贴壁培养24 h后换成无血清的新鲜培养液，加虫草素处理。虫草素的浓度设置为0.1、0.3、1.0、3.0、10.0 μ mol/L单独或与LPS（1 μ g/mL）共同作用，同时设空白对照组（0 μ mol/L）。继续培养48 h后，取上清培养液50 μ L，转移到96孔细胞培养板，与50 μ L的Griess试剂（以蒸馏水配制的质量分数0.1%的萘乙二胺，以体积分数5%的磷酸配制质量分数1%的对氨基苯磺酸，二者以1:1等体积混合）室温下反应10 min，540 nm波长处测定其光密度值。

1.3.4 小胶质细胞内iNOS mRNA表达的测定

采用逆转录聚合酶链式反应（reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR）测定小胶质细胞内iNOS mRNA的表达。取对数生长期的原代小胶质细胞，以 5×10^5 个/mL接种于75 mL培养瓶中，8 mL/瓶，细胞贴壁培养24 h后换成无血清的新鲜培养液，加虫草素处理。虫草素浓度设置为1.0、3.0、10.0 μ mol/L与LPS（1 μ g/mL）共同作用，同时设空白对照组（0 μ mol/L）。继续培养24 h后，收集细胞用于RT-PCR分析。iNOS基因上游引物：5'-GAC AAG CTG CAT GTG ACA TC-3'；下游引物：5'-GCT GGT AGG TTC CTG TTG TT-3'。GAPDH基因上游引物：5'-AGT GGC AAA GTG GAG ATT GTT G-3'；下游引物：5'-CAG TCT TCT GGG TGG CAG TGA T-3'。PCR扩增条件如下：iNOS：94℃预变性5 min，扩增30个循环（94℃变性30 s，61℃退火30 s，72℃延伸30 s），72℃终末延伸7 min；GAPDH：94℃预变性5 min，扩增28个循环（94℃变性30 s，55℃退火30 s，72℃延伸30 s），72℃终末延伸7 min。

Quantity One软件分析、读取iNOS和GAPDH条带的光密度值，通过计算积分光密度值（iNOS）/积分光密度值（GAPDH）的比值，从而得到iNOS基因的相对表达丰度。

1.3.5 虫草素的NO清除作用^[14]

硝普钠（sodium nitroprusside, SNP）2.5 mmol/L单独或与虫草素混合，溶于磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline, PBS）中。虫草素的终浓度分别为0.1、0.3、1.0、3.0、10.0 μ mol/L，另设空白对照组（0 μ mol/L）。室温、光照下放置60 min后，Griess法检测溶液中NO₂⁻的含量。

1.3.6 虫草素的DPPH自由基清除作用

配制浓度为 1×10^{-4} mol/L的1,1-二苯基苦基苯肼（1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH）自由基乙醇溶液，闭光置于摇床上轻轻摇动10 min，备用。吸取 1×10^{-4} mol/L的DPPH自由基乙醇溶液900 μ L，加入虫草素水溶液，使虫草素的终浓度分别为0.1、0.3、1.0、3.0、10.0 μ mol/L，同时设空白对照组。摇匀后室温放置30 min，酶标仪检测517 nm波长处的吸光度。

1.3.7 虫草素单独或与H₂O₂作用对PC12神经元细胞存活率的影响

取对数生长期的PC12细胞，用新鲜的DMEM培养基将细胞密度调至 3×10^5 个/mL，接种于96孔板内，每孔100 μ L，细胞贴壁培养24 h后换成无血清的新鲜培养液，加虫草素处理。虫草素的浓度设置为1.0、3.0、10.0 μ mol/L，单独作用24 h或与H₂O₂（250 μ mol/L）联合作用4 h，同时设空白对照组（0 μ mol/L）。MTT法测定PC12的细胞成活率，MTT实验步骤同1.3.2节。

1.3.8 虫草素对H₂O₂损伤的PC12细胞中SOD活性的影响

取对数生长期的PC12细胞，细胞密度调至 3×10^5 个/mL，接种于培养瓶内，细胞贴壁培养24 h后换成无血清的新鲜培养液，加虫草素处理。虫草素的浓度设置为1.0、3.0、10.0 μ mol/L与H₂O₂（250 μ mol/L）联合作用4 h，同时设空白对照组（0 μ mol/L）。以PBS洗涤2次，冻融法裂解细胞后，12 000 r/min、4℃离心15 min，吸取上清液。以紫外分光光度法测定各细胞处理组样品的蛋白浓度，按照试剂盒操作说明测定SOD的活性。

1.3.9 虫草素对小胶质细胞活化导致神经元损伤的抑制作用^[15]

1.3.9.1 条件培养液的制备

取对数生长期的原代小胶质细胞，以 5×10^5 个/mL接种于24孔板内，600 μ L/孔，细胞贴壁培养24 h后换成无血清的新鲜培养液，加虫草素处理。虫草素浓度设置为1.0、3.0、10.0 μ mol/L与LPS（1 μ g/mL）共同作用，同时设空白对照组（0 μ mol/L）。继续培养48 h后，收集上层培养液。本实验中不加LPS或虫草素作用的小胶质细胞条件培养液为空白条件培养液（control

conditioned medium, C-CM); LPS刺激小胶质细胞48 h后收集的条件培养液为模型条件培养液(LPS conditioned medium, L-CM); 各浓度的虫草素与LPS共同作用于小胶质细胞48 h后收集的条件培养液为虫草素条件培养液(cordycepin-conditioned medium, CO-CM)。收集后立即使用或于 -80°C 条件下冷冻保存。

1.3.9.2 虫草素条件培养液对PC12神经元细胞损伤的影响

实验分4组。第1组为对照组(C-CM组), 即C-CM作用于PC12神经元细胞24 h; 第2组为模型组(L-CM组), 即L-CM作用于PC12神经元细胞24 h; 第3、4组为虫草素作用组(CO-CM组), 即以各浓度的CO-CM作用于PC12神经元细胞24 h。MTT法检测PC12神经元细胞的存活率, MTT实验步骤同1.3.2节。

1.4 数据分析

采用SPSS 13.0统计软件进行分析。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。单因素方差分析(One-Way ANOVA)后, 用Dunnett's test分析方法比较组间差异。两组间比较采用T-test法。

2 结果与分析

2.1 虫草素对LPS活化的小胶质细胞存活率的影响

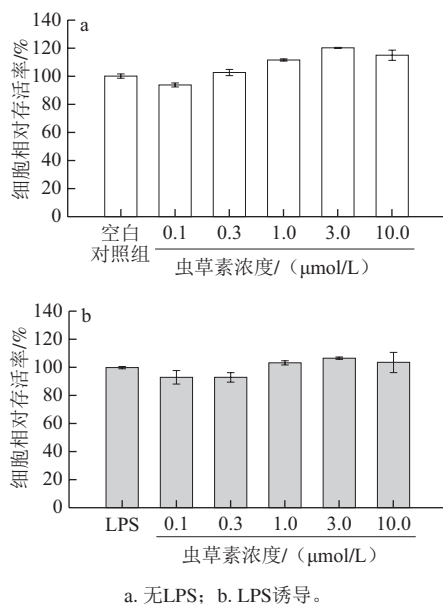
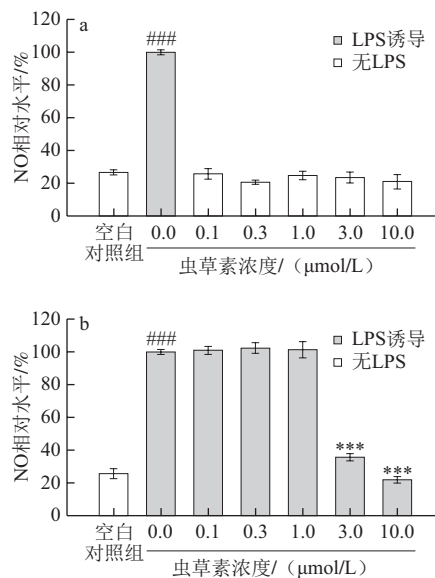


图2 虫草素单独或与LPS联合作用对小胶质细胞存活率的影响

Fig.2 Effect of cordycepin on viability of unstimulated or LPS-activated microglial cells

为了排除药物对小胶质细胞的毒性作用影响, 首先采用MTT法检测了细胞存活率的变化。由图2可知, 原代培养的小胶质细胞经虫草素($0.1 \sim 10.0 \mu\text{mol/L}$)单独或与LPS($1 \mu\text{g/mL}$)联合作用48 h后, 与空白对照组相比, 细胞存活率未见显著改变, 表明虫草素对小胶质细胞无明显毒性影响。

2.2 虫草素对LPS激活的小胶质细胞NO释放的影响



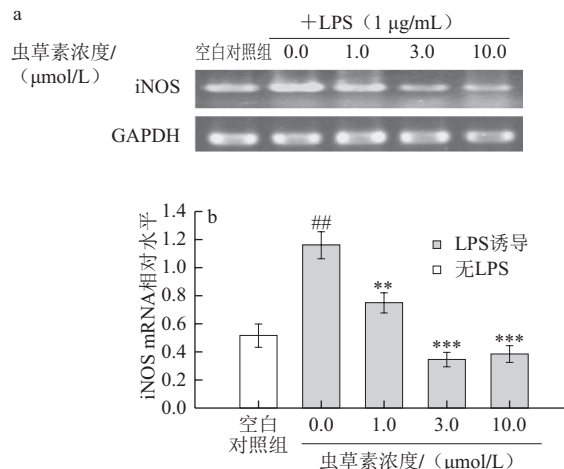
###. 与空白对照组相比, $P < 0.001$; ***. 与LPS模型组(0.0)相比, $P < 0.001$ 。图4同。

图3 虫草素单独或与LPS联合作用对小胶质细胞NO产生的影响

Fig.3 Effect of cordycepin on NO production in unstimulated or LPS-activated microglial cells

由图3可知, 未经LPS处理的小胶质细胞, 其培养液中NO含量较低。LPS激活的小胶质细胞产生大量的NO。虫草素(3.0 、 $10.0 \mu\text{mol/L}$)对LPS活化的小胶质细胞NO产生具有显著抑制作用($P < 0.001$) (图3b)。而虫草素($0.1 \sim 10.0 \mu\text{mol/L}$)单独作用于小胶质细胞, 对NO产生未产生显著影响(图3a)。

2.3 虫草素对LPS激活的小胶质细胞iNOS mRNA表达的影响



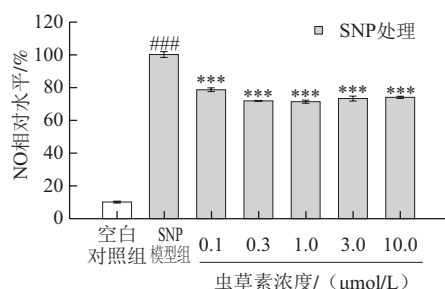
##. 与空白对照组相比, $P < 0.01$; **. 与LPS模型组(0.0)相比, $P < 0.01$ 。

图4 虫草素对LPS激活的小胶质细胞iNOS mRNA表达的影响

Fig.4 Effect of cordycepin on iNOS mRNA expression in LPS-activated microglial cells

如图4所示, LPS激活的小胶质细胞内iNOS mRNA表达显著升高。不同浓度的虫草素对LPS激活的小胶质细胞内iNOS mRNA的表达水平具有显著的抑制作用 ($P<0.01$ 或 $P<0.001$), 表明虫草素可抑制iNOS的转录。

2.4 虫草素对NO的清除作用



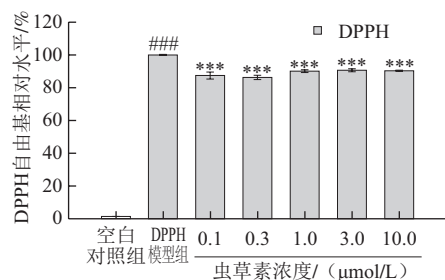
###. 与空白对照组相比, $P<0.001$; ***, 与SNP模型组相比, $P<0.001$ 。

图5 虫草素的NO清除作用

Fig.5 Nitric oxide-scavenging activity of cordycepin

由图5可知, 虫草素在0.1~10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内均可显著降低溶液中的NO水平 ($P<0.001$), 提示虫草素对NO具有直接清除作用。

2.5 虫草素对DPPH自由基的清除作用



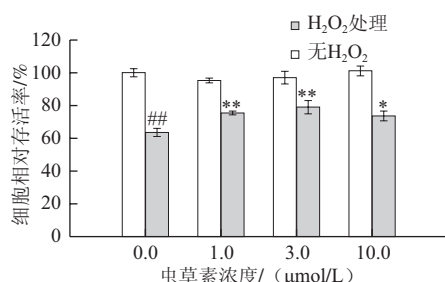
###. 与空白对照组相比, $P<0.001$; ***, 与DPPH模型组相比, $P<0.001$ 。

图6 虫草素的DPPH自由基清除作用

Fig.6 DPPH free radical-scavenging activity of cordycepin

由图6可知, 虫草素在0.1~10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围对DPPH自由基有显著的降低作用 ($P<0.001$)。

2.6 虫草素单独或与H₂O₂联合作用对PC12神经元细胞存活率的影响



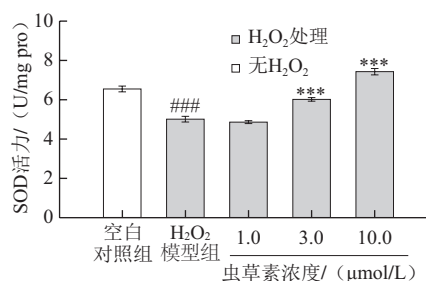
##. 与空白对照组 (无H₂O₂, 0.0) 相比, $P<0.01$; *. 与H₂O₂模型组 (H₂O₂处理, 0.0) 相比, $P<0.05$; **. 与H₂O₂模型组相比, $P<0.01$ 。

图7 虫草素单独或与H₂O₂联合作用对PC12细胞存活率的影响

Fig.7 Effect of cordycepin with or without H₂O₂ on the viability of PC12 cells

由图7可知, 同空白对照组相比, 虫草素 (1~10.0 $\mu\text{mol/L}$) 单独作用于PC12细胞24 h, 对细胞存活率无显著影响。H₂O₂作用4 h可造成PC12细胞存活率显著下降 ($P<0.01$), 而在H₂O₂损伤的同时, 给予不同浓度的虫草素可保护PC12细胞, 使细胞存活率显著提高。

2.7 虫草素对H₂O₂损伤的PC12细胞中SOD活性的影响



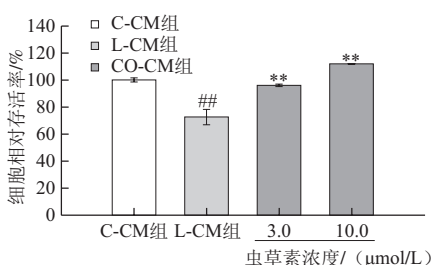
###. 与空白对照组相比, $P<0.001$; ***, 与H₂O₂模型组相比, $P<0.001$ 。

图8 虫草素对H₂O₂损伤的PC12细胞中SOD活性的影响

Fig.8 Effect of cordycepin on SOD activity in H₂O₂-treated PC12 cells

由图8可知, H₂O₂作用4 h可造成PC12细胞SOD活性显著降低, 而在H₂O₂损伤的同时, 给予不同浓度的虫草素 (3.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$) 可使PC12细胞中SOD活性显著增高 ($P<0.001$)。

2.8 虫草素对活化的小胶质细胞条件培养液损伤PC12细胞的影响



##. 与C-CM组相比, $P<0.01$; *. 与L-CM组相比, $P<0.01$ 。

图9 虫草素对活化的小胶质细胞条件培养液致PC12细胞存活率降低的影响

Fig.9 Effect of cordycepin on decreased viability of PC12 cells induced by conditioned medium from LPS-activated microglia

由图9可知, 小鼠PC12神经元细胞经LPS活化的小胶质细胞条件培养液处理24 h后 (L-CM), 与空白小胶质细胞条件培养液处理组 (C-CM) 比较, 细胞存活率显著降低 ($P<0.01$), 提示小胶质细胞条件培养液可对PC12细胞产生明显的毒性作用。虫草素 (3.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$) 可显著抑制LPS活化的小胶质细胞条件培养液造成的PC12细胞存活率的下降。

3 讨论

激活的小胶质细胞释放NO等神经毒性因子与几种常见的神经退行性疾病的发生、发展密切相关^[1]。本实验以抑制活化的小胶质细胞NO释放和iNOS表达作为检测指标,考察虫草素对小胶质细胞活化的抑制作用。此外,初步考察了虫草素的神经保护作用。

首先,MTT实验的结果表明虫草素(0.1~10.0 μmol/L)与LPS联合应用后对小胶质细胞存活率无显著影响,排除了化合物对LPS激活的小胶质细胞NO释放的影响是通过降低细胞数量所致。Griess实验结果表明,虫草素可显著抑制LPS激活的原代小鼠小胶质细胞NO释放,同时虫草素对非激活的小胶质细胞NO释放无显著影响。结果提示,虫草素可抑制炎症引起的小胶质细胞过度活化,而不影响小胶质细胞基础NO释放,这与Jeong等^[7]的研究结果一致。

一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)是催化产生内源性NO的惟一酶类,包括神经元型NOS(nNOS)、内皮型NOS(eNOS)和诱导型NOS(iNOS)。在正常生理条件下iNOS基因不表达,只有细胞受到某些炎症、免疫因子等刺激后可以表达,且其活性不依赖于外源性的钙调蛋白或Ca²⁺浓度的升高。在病理情况下主要是iNOS表达。LPS刺激下iNOS可以在小胶质细胞中持续大量地表达,使NO产生大量,而且小胶质细胞对神经元的部分毒性作用也是通过NO来实现的^[16]。RT-PCR实验结果证明了虫草素可通过抑制LPS活化的小胶质细胞内iNOS转录,调节过度激活的小胶质细胞NO的合成和释放。

为探讨虫草素对小胶质细胞培养液上清中NO水平的抑制作用是否部分的是由于该化合物对NO的直接捕捉作用而产生的,实验检测了其对SNP溶液中NO的直接清除能力。SNP作为NO的供体,在室温、光照的条件下会自发释放NO,常被用来检测不同物质的NO清除能力^[14,17]。本实验结果表明,虫草素在0.1~10.0 μmol/L的浓度范围内对NO具有直接清除作用。实验证明虫草素可能至少通过抑制iNOS转录表达和直接清除NO这两种途径,降低LPS活化的小胶质细胞上清液中NO水平。NO是一种重要的活性氧自由基,与中枢神经系统氧化应激损伤导致的多种神经退行性疾病的发生和发展密切相关^[18]。研究表明,NO清除剂可通过清除NO而发挥神经保护作用^[19,20]。虫草素的NO清除作用,可能是其产生神经保护作用的原因之一。

已有研究表明,虫草素对脑缺血再灌注损伤的海马神经元具有保护作用^[8-9]。本实验采用H₂O₂和LPS激活的小胶质细胞条件培养液造成PC12神经元细胞损伤这两种模型,应用MTT法考察了虫草素对PC12神经元损伤的保

护作用。结果表明虫草素本身对PC12细胞的生长无显著影响,但能够显著保护H₂O₂损伤的PC12细胞,且可以通过抑制小胶质细胞激活而对PC12神经元细胞产生保护作用。

H₂O₂主要来源于超氧阴离子自由基的歧化反应,其主要产物羟自由基具有很强的细胞毒性,破坏细胞内活性氧代谢的平衡,使抗氧化酶如SOD、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶等活性降低。实验结果表明,除了具有NO自由基清除作用外,虫草素还具有DPPH自由基清除作用,这与Won^[21]和Wang^[22]等的研究结果相一致。此外,本实验表明虫草素可通过增强SOD活性而保护H₂O₂损伤的PC12细胞。表明虫草素的抗氧化及抗自由基能力在其神经元保护中可能发挥了重要的作用。在过度激活的小胶质细胞NO释放、NO及神经炎症因子介导的神经元损伤死亡的过程中,活性氧自由基均发挥了十分重要的作用^[23-24]。虫草素抗氧化及抗自由基作用在其抑制小胶质细胞活化和神经保护中的详细分子机制,有待进一步的研究。

综上所述,虫草素可抑制过度激活的原代小胶质细胞iNOS转录表达及随后的NO产生,且可以直接捕捉NO;此外,虫草素可通过抑制小胶质细胞活化而保护PC12神经元细胞,也可保护H₂O₂损伤的PC12细胞。表明虫草素在以抑制小胶质细胞活化为靶点防治炎症相关的中枢神经退行性疾病中可能具有潜在的应用价值。

参考文献:

- [1] BLOCK M L, HONG J S. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism[J]. *Progress in Neurobiology*, 2005, 76(2): 77-98.
- [2] BURGUILLAS M A, DEIERBORG T, KAVANAGH E, et al. Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity[J]. *Nature*, 2011, 472(7343): 319-324.
- [3] LIU Bin, HONG J S. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative disease: mechanisms and strategies for therapeutic intervention[J]. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2003, 304(1): 1-7.
- [4] 张姝, 张永杰, SHRESTHA B, 等. 冬虫夏草菌和蛹虫草菌的研究现状、问题及展望[J]. *菌物学报*, 2013, 32(4): 577-597.
- [5] 刘桂君, 周思静, 杨素玲, 等. 蛹虫草中虫草素的研究进展[J]. *食品科学*, 2013, 34(21): 408-413.
- [6] KIM H G, SHRESTHA B, LIM S Y, et al. Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF-κB through Akt and p38 inhibition in RAW264.7 macrophage cells[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2006, 545(2/3): 192-199.
- [7] JEONG J W, JIN C Y, KIM G Y, et al. Anti-inflammatory effects of cordycepin via suppression of inflammatory mediators in BV2 microglial cells[J]. *International Immunopharmacology*, 2010, 10(12): 1580-1586.
- [8] HWANG I K, LIM S S, YOO K Y, et al. A Phytochemically characterized extract of *Cordyceps militaris* and cordycepin protect hippocampal neurons from ischemic injury in gerbils[J]. *Planta Medica*, 2008, 74(2): 114-119.

- [9] CHENG Zhenyong, HE Wei, ZHOU Xiaoxia, et al. Cordycepin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury *in vivo* and *in vitro*[J]. European Journal of Pharmacology, 2011, 664(1/3): 20-28.
- [10] YAO Lihua, LI Chuhua, YAN Wenwen, et al. Cordycepin decreases activity of hippocampal CA1 pyramidal neuron through membrane hyperpolarization[J]. Neuroscience Letters, 2011, 503(3): 256-260.
- [11] 孟雪莲, 孙冬梅, 马靖淇, 等. 蛹虫草发酵罐培养生产虫草多糖和虫草素条件的研究[J]. 辽宁大学学报: 自然科学版, 2013, 40(3): 260-265.
- [12] 陈长兰, 孟程程, 佟丽, 等. 不同种类氨基酸对蛹虫草菌丝体生长和虫草素含量的影响[J]. 食品科学, 2012, 33(23): 236-239.
- [13] MENG Xuelian, YANG Jingyu, CHEN Guoliang, et al. Effects of resveratrol and its derivatives on lipopolysaccharide-induced microglial activation and their structure-activity relationships[J]. Chemico-Biological Interactions, 2008, 174(1): 51-59.
- [14] MENG Xuelian, YANG Jingyu, CHEN Guoliang, et al. RV09, a novel resveratrol analogue, inhibits NO and TNF- α production by LPS-activated microglia[J]. International Immunopharmacology, 2008, 8(8): 1074-1082.
- [15] WANG X, CHEN S, MA G, et al. Involvement of proinflammatory factors, apoptosis, caspase-3 activation and Ca^{2+} disturbance in microglia activation-mediated dopaminergic cell degeneration[J]. Mechanisms of Ageing and Development, 2005, 126(12): 1241-1254.
- [16] POSSEL H, NOACK H, PUTZKE J, et al. Selective upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by lipopolysaccharide (LPS) and cytokines in microglia: *in vitro* and *in vivo* studies[J]. Glia, 2000, 32(1): 51-59.
- [17] HU Zhen, HUANG Yudong, GUAN Wenchao, et al. The protective activities of water-soluble C_{60} derivatives against nitric oxide-induced cytotoxicity in rat pheochromocytoma cells[J]. Biomaterials, 2010, 31(34): 8872-8881.
- [18] ZHAO Baolu. Nitric oxide in neurodegenerative diseases[J]. Frontiers in Bioscience, 2005, 10: 454-461.
- [19] YILMAZ B S, ALTUN M L, ORHAN I E, et al. Enzyme inhibitory and antioxidant activities of *Viburnum tinus* L. relevant to its neuroprotective potential[J]. Food Chemistry, 2013, 141(1): 582-588.
- [20] ARUNADEVI R, LATA S, BHADORIA B K, et al. Neuroprotective effect of 5,7,3',4',5'-pentahydroxy dihydroflavanol-3-O-(2''-O-galloyl)- β -D-glucopyranoside, a polyphenolic compound in focal cerebral ischemia in rat[J]. European Journal of Pharmacology, 2010, 626(2/3): 205-212.
- [21] WON S Y, PARK E H. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris*[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2005, 96(3): 555-561.
- [22] WANG B J, WON S J, YU Z R, et al. Free radical scavenging and apoptotic effects of Cordyceps sinensis fractionated by supercritical carbon dioxide[J]. Food and Chemical Toxicology, 2005, 43(4): 543-552.
- [23] ZHANG Ping, WONG T A, LOKUTA K M, et al. Microglia enhance manganese chloride-induced dopaminergic neurodegeneration: role of free radical generation[J]. Experimental Neurology, 2009, 217(1): 219-230.
- [24] NUÑEZ-FIGUERO Y, GARCÍA-PUPO L, RAMÍREZ-SÁNCHEZ J, et al. Neuroprotective action and free radical scavenging activity of guttiferone-A, a naturally occurring prenylated benzophenone[J]. Arzneimittel-Forschung, 2012, 62(12): 583-589.

《粮食加工》2015年征订启事

《粮食加工》杂志创刊于1976年,为中文核心期刊,被中国知网、中文科技期刊、中国学术期刊等著名数据库收录,并以其学术性与实用性结合、内容详实、信息量丰富、发行面广、印刷精美,在全国粮食加工行业具有很大的影响力。刊物主要栏目有粮食经济论坛、小麦加工、稻米加工、玉米及小杂粮加工、粮食加工设备、粮食深加工、粮食研究与开发、粮食物流与仓储及粮食检测分析等。

《粮食加工》为国内外公开发行,双月刊(逢双月1日出版),8元/期,全年定价:48元。国际标准A4开本,全国各地邮局均可订阅。邮发代号:52-202,外发代号:BM2990。

地 址:西安市莲湖区劳动路138号《粮食加工》杂志社

联系人:肖锋

电 话:029-88648175

传 真:029-88631191

邮 编:710082

E-mail: xibu98@sina.com

lsjg2004@126.com

网 址: <http://www.lsjg.cn>