

• 基础研究 •

吲哚美辛对 β 淀粉样蛋白1-42诱发BV-2细胞产生炎性介质的抑制作用

聂永慧 贾建军 王鲁宁 叶玲 王伟 刘建伟 韩志涛 房征宇

【摘要】 目的 研究吲哚美辛对 β 淀粉样蛋白1-42(A β 1-42)刺激小胶质细胞释放炎性介质一氧化氮(NO)及白细胞介素-1 β (IL-1 β)的抑制作用。方法 应用高度纯化的BV-2小胶质细胞作为体外小胶质细胞模型,应用不同浓度吲哚美辛(10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} mol/L)与20 μ mol/L A β 1-42单独或同时培养12h,测定细胞上清NO及IL-1 β 含量;RT-PCR法测定BV-2细胞iNOS mRNA及IL-1 β mRNA的表达。结果 吲哚美辛单独作用对BV-2细胞产生NO、IL-1 β 及iNOS mRNA、IL-1 β mRNA表达无明显作用。A β 1-42可以刺激BV-2细胞产生NO及IL-1 β ,并增加iNOS mRNA及IL-1 β mRNA表达,这种作用均可被吲哚美辛所抑制,在吲哚美辛浓度为 10^{-7} ~ 10^{-5} mol/L时抑制作用较为明显。结论 在体外吲哚美辛可以降低A β 1-42介导的BV-2细胞iNOS mRNA及IL-1 β mRNA表达,从而减少NO及IL-1 β 的产生,上述抑制作用可能参与了吲哚美辛在阿尔茨海默病治疗中的神经元保护机制。

【关键词】 吲哚美辛;淀粉样 β 蛋白;炎症;小神经胶质细胞;一氧化氮;白细胞介素1 β

Inhibitory effects of indomethacin on nitric oxide and interleukin-1 β production in β -amyloid1-42 stimulated BV-2 microglia *in vitro*

NIE Yonghui, JIA Jianjun, WANG Luning, et al.

Department of Geriatric Neurology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

【Abstract】 **Objective** To study the inhibitory effects of indomethacin on production of nitric oxide (NO) and interleukin-1 β (IL-1 β) in β -amyloid1-42 stimulated microglia *in vitro* in order to explore the role of β -amyloid and microglia in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD) and whether anti-inflammatory drugs might be an effective form of therapy. **Methods** Murine microglia BV-2 cells were cultured as the model of microglia *in vitro*. Different concentrations of indomethacin (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} mol/L) were added without or with β -amyloid1-42 20 μ mol/L and cultured continuously for 12h. The production of NO and IL-1 β was studied and iNOS mRNA and IL-1 β mRNA expression were assessed by RT-PCR. **Results** There was no influence on the production of NO and IL-1 β , and expression of iNOS mRNA and IL-1 β mRNA in BV-2 cells incubated with indomethacin alone. β Amyloid1-42 could stimulate BV-2 cells to produce NO and IL-1 β and enhance expression of iNOS mRNA and IL-1 mRNA. Indomethacin could inhibit NO and IL-1 β production and lower iNOS mRNA and IL-1 β mRNA expression in BV-2 cells stimulated by β -amyloid1-42, and the inhibitory effect was obvious at the concentrations of 10^{-7} — 10^{-5} mol/L. **Conclusion** As a conventional non-steroidal anti-inflammatory drug, indomethacin could inhibit NO and IL-1 β production and decrease iNOS mRNA and IL-1 β mRNA expression in BV-2 microglia stimulated by β -amyloid1-42 *in vitro*. The results suggest that the mechanism by which indomethacin being beneficial to treatment of AD might be due to the inhibition of NO production from microglia, blocking the inflammatory cascade reaction and reducing injury of neuron. As an effective model *in vitro*, BV-2 microglia are valuable in the study of AD.

【Key words】 indomethacin; amyloid beta-protein; inflammation; microglia; nitric oxide; interleukin-1beta

收稿日期:2006-11-08

作者单位:100853 北京市,解放军总医院老年神经内科(聂永慧、贾建军、王鲁宁、王伟),老年医学研究所(叶玲、刘建伟、韩志涛、房征宇)

作者简介:聂永慧,女,1973年9月生,山西省阳泉市人,医学博士,主治医师。E-mail:nieyonghui301@163.com.

通信作者:王鲁宁, Tel: 010-66939693, E-mail: ln_wang@sohu.com

炎症免疫机制在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的发生发展中具有十分重要的作用。流行病学以及临床研究表明,长期应用抗炎药物可以延缓AD的发病并缓解症状,脑的特异性抗炎药的研发已成为AD治疗的一个研究热点。非甾体类抗炎药(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)的代表药物吲哚美辛(indomethacin)可延缓AD病程,长期服用吲哚美辛的患者AD发病的危险性明显降低^[1]。但目前该药延缓AD病程以及保护神经元作用的具体环节尚不明确,多数研究集中在其对环氧合酶的抑制作用上。研究表明, β 淀粉样蛋白(β -amyloid, A β)异常代谢、沉积是AD发病的中心环节,A β 可以刺激脑内主要免疫细胞群小胶质细胞(microglia, MG)释放具有血管活性和免疫特性的重要内源性介质一氧化氮(nitric oxide, NO)及多种炎性细胞因子,从而介导神经元毒性作用。本研究应用BV-2细胞作为MG体外模型,研究吲哚美辛对A β 1-42刺激BV-2细胞释放炎性介质的调节作用,探讨其神经元保护作用机制,为AD的抗炎治疗提供依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器 A β 1-42、吲哚美辛购自Sigma公司。RT-PCR试剂盒购自Invitrogen公司。NO试剂盒(硝酸还原酶法)购自南京建成生物工程研究所。白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)放免试剂盒购自北方生物技术研究所。引物由上海生工公司合成。

1.2 细胞培养和传代 BV-2细胞株购自中国医学科学院协和医科大学基础医学细胞中心。含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基加青霉素100kU/L、链霉素100kU/L,置37℃、5%CO₂培养箱内培养,隔天换液1次,3~4d传代1次。每次实验前细胞在含有1%牛血清白蛋白的DMEM培养基中培养48h后使细胞处于同步化状态。

1.3 药物处理 A β 1-42溶于去离子水中,浓度为2.5mmol/L,-20℃保存备用;吲哚美辛溶于无菌PBS中,浓度为0.1mol/L,4℃保存备用。以上药物临用前按要求稀释。

1.4 细胞处理 取对数生长期BV-2细胞,以 2×10^5 /孔密度接种于6孔培养板中,每组设3个平行孔。本研究应用不同浓度吲哚美辛(10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} mol/L)与20 μ mol/L A β 1-42单独

或同时加入后培养12h。

1.5 细胞上清NO的测定 取上述各组细胞,分别吸取上清液,应用硝酸还原酶法测定各管吸光度值,按照试剂盒说明计算各组NO含量(μ mol/L)。每组实验均重复3次。

1.6 细胞上清IL-1 β 的测定 取上述各组细胞的上清液,由专业技师严格按照放免试剂盒要求操作,细胞上清IL-1 β 浓度按程序自动计算获得,每次实验均重复3次。

1.7 RT-PCR法半定量测定iNOS基因表达 按常规提取细胞总RNA,紫外分光光度计检测RNA的浓度和纯度,琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。逆转录过程按RT-PCR试剂盒说明书操作,PCR扩增循环参数iNOS为94℃ 45s、55℃ 45s、72℃ 2min,共28个循环,72℃终延伸5min;IL-1 β 为94℃ 30s、52℃ 30s、72℃ 1min,共30个循环,72℃终延伸5min; β -actin为94℃ 30s、57℃ 30s、72℃ 1min,共30个循环,72℃终延伸5min。引物序列分别为:iNOS(754bp)正义链5'-CATGGCTTGCCCTGGAAGTTTCTCTTCAAAG-3',反义链5'-GCTACCGTGGTAGTCTCCCCTACGACG-3'; IL-1 β (382bp)正义链5'-GCAACTGTTCTGAAGTCA-3',反义链5'-CTCGGAGCCTGTAGTGCAG-3'; β -actin(175bp)正义链5'-CAGTAACAGTCCGCCTAGAA-3',反义链5'-GATTACTGCTCTGGCCTCCTA-3'。将PCR反应产物进行琼脂糖凝胶电泳,Tanon GIS凝胶成像分析系统成像,分别计算iNOS基因与 β -actin及IL-1 β 基因与 β -actin光密度比值,比较各组间比值大小。每组实验均重复3次。

1.8 统计学处理 数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用SPSS 11.0软件进行方差分析。

2 结果

2.1 吲哚美辛对A β 刺激BV-2细胞释放NO的调节作用 20 μ mol/L A β 1-42作用6h后细胞上清液可以检测到NO,至12h达高峰(8 μ mol/L; $P < 0.01$),此后逐渐下降。吲哚美辛单独作用于静止的BV-2细胞对其产生NO无影响,而对A β 1-42刺激12h后的BV-2细胞产生NO的作用具有部分抑制作用,这种抑制作用在吲哚美辛浓度为 10^{-7} ~ 10^{-5} mol/L时较为明显($P < 0.05$,表1)。

2.2 吲哚美辛对A β 刺激BV-2细胞释放IL-1 β 的调节作用 20 μ mol/L A β 1-42作用6h后IL-1 β 升

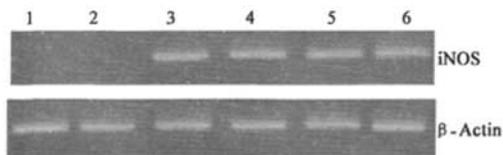
高,至12h达到高峰,约为对照组的3倍,此后逐渐下降。吲哚美辛单独作用于静止的BV-2细胞对其产生IL-1 β 无明显影响;在与A β 共同作用于BV-2细胞后,细胞分泌IL-1 β 的作用被抑制,这种作用在吲哚美辛浓度为10⁻⁷~10⁻⁵mol/L时较为明显,差异具有显著性(P<0.05,表1)。

表1 吲哚美辛对BV-2细胞释放NO及IL-1 β 的作用(x \pm s)

组别	NO(μ mol/L)	IL-1 β (ng/L)
对照组	1.48 \pm 0.20	12.6 \pm 3.0
吲哚美辛	1.50 \pm 0.32	12.3 \pm 3.4
A β	8.0 \pm 1.34	45.0 \pm 5.0
A β +吲哚美辛		
10 ⁻⁹	7.90 \pm 1.56	43.0 \pm 3.5
10 ⁻⁸	7.50 \pm 1.40	42.5 \pm 4.0
10 ⁻⁷	5.40 \pm 1.38*	35.0 \pm 3.7*
10 ⁻⁶	5.10 \pm 1.00*	28.0 \pm 2.8*
10 ⁻⁵	4.90 \pm 1.46*	26.0 \pm 4.2*

注:与A β 组相比,*P<0.05

2.3 吲哚美辛对A β 作用后BV-2细胞iNOS mRNA表达的调节作用 20 μ mol/L A β 1-42作用6h即出现iNOS mRNA的表达,在12h达高峰,此后逐渐下降。吲哚美辛单独作用于静止的BV-2细胞对其iNOS mRNA表达无影响,而对20 μ mol/L A β 1-42刺激12h后BV-2细胞iNOS mRNA表达的增加具有抑制作用,在10⁻⁷~10⁻⁵mol/L浓度时较为明显,iNOS/ β -actin mRNA比值由0.8降至0.6(P<0.05,图1)。

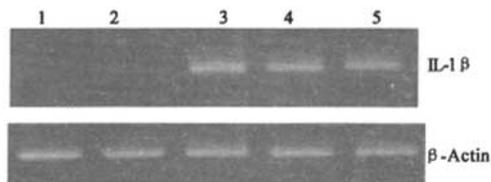


注:1:对照,2:吲哚美辛,3:A β ,4:A β +吲哚美辛(10⁻⁷mol/L),5:A β +吲哚美辛(10⁻⁶mol/L),6:A β +吲哚美辛(10⁻⁵mol/L)

图1 吲哚美辛对iNOS mRNA表达的作用

2.4 吲哚美辛对A β 作用后BV-2细胞IL-1 β mRNA表达的调节作用 在20 μ mol/L A β 1-42作用4h后IL-1 β mRNA出现表达增加,至6h达到高峰,为对照组的3倍,此后逐渐下降。吲哚美辛单独作用时对IL-1 β mRNA表达无明显影响,但与A β 1-42共同作用12h后,IL-1 β / β -actin mRNA比值表达较前降低,在吲哚美辛浓度为10⁻⁷~10⁻⁵mol/L时该比值降低

较为明显,由0.3降至0.22(P<0.05,图2)。



注:1:对照,2:吲哚美辛,3:A β ,4:A β +吲哚美辛(10⁻⁷mol/L),5:A β +吲哚美辛(10⁻⁵mol/L)

图2 吲哚美辛对IL-1 β mRNA表达的作用

3 讨论

目前认为炎症是AD发病机制的必要因素之一。AD患者脑组织中大量沉积的A β 具有很强的神经毒性,不仅可引起神经细胞的退行性改变,还可能是炎症反应的激发因子。A β 沉积激活MG引起的炎症反应被认为是AD脑结构改变的特征之一,是AD的核心病理机制^[2]。AD患者脑中反应性MG为AD炎性以及神经退行性变过程的始动细胞,除作为具有清除斑块作用的清道夫细胞外,也是一系列生物活性物质的来源^[3]。研究证实A β 不仅具有强的直接神经毒性作用,而且可以激活MG使其释放自由基NO及炎症细胞因子。

在中枢神经系统,NO具有双重活性^[4]:一方面作为特殊神经递质参与突触可塑、神经元发育、学习记忆和行为等众多生理机制;另一方面,过量的NO可通过氧化应激,破坏能量代谢过程中的多种酶类使ATP生成减少,损伤膜性结构、蛋白质及DNA,导致神经元坏死或凋亡,从而损伤神经系统。iNOS是一种诱导酶,表达后其活性可持续相当长时间,从而大量、持续产生NO,是介导包括神经变性疾病在内的许多病理过程的重要因素。本实验探讨了A β 1-42对BV-2细胞产生NO及iNOS表达的影响,结果提示NOS/NO在AD发病机制中可能具有重要作用。

IL-1是一个具有多种功能的、可以诱发炎症反应及机体防御反应的炎性细胞因子,它可以活化T细胞(间接活化B细胞)、提高黏附分子表达、诱导一系列其它前炎性细胞因子以及炎性相关蛋白表达,形成炎症反应的放大级联反应,是中枢神经系统内最重要的炎性细胞因子。IL-1与AD患者脑中淀粉样斑块、神经原纤维缠结的形成、发展关系密切^[5],其在AD脑内过度表达与神经元退行性变及AD炎性级联反应密切相关。AD的病理生理过程中多种细胞因子如IL-1、IL-6、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor

α , TNF- α)等都发生了上调,过多的细胞因子的产生可以导致组织的损伤。在生理条件下,这些前炎症因子的分泌由一些抑制性细胞因子如 IL-1Ra、IL-10、 β 型转化生长因子(transforming growth factor β , TGF- β)等来进行调节,在 AD 中前炎症细胞因子及其抑制剂之间的失衡可能与其发病机制有关。本实验结果显示,A β 1-42 可刺激 BV-2 释放 IL-1 β ,并在 mRNA 水平进行调控。

A β 诱导 MG 产生炎症介质的机制目前尚无定论。新近发现小胶质细胞表面的晚期糖基化终产物受体(receptor for advanced glycation end product, RAGE)、A 级清道夫受体(class A scavenger receptor, SR)、丝氨酸蛋白酶抑制剂酶复合物受体(secrin proteinase inhibitor-enzyme complex receptor, SECR)可促进 A β 与 MG 黏附。A β 通过 RAGE、SR 和 Mac-1 与 MG 结合,激活核因子(nuclear factor κ B, NF- κ B)及 IRF-1 途径,诱导炎症细胞因子的表达并产生大量 NO^[6,7];MG 产生的细胞因子又与 A β 协同诱导星形胶质细胞释放 NO;受累的神元和内皮细胞也因 Ca²⁺ 稳态失衡而出现 NOS 表达及活性上调。过量的 NO 及炎症细胞因子介导并放大氧化应激、炎症级联等反应,通过多种途径损伤蛋白质、脂质和 DNA 等,导致神经元坏死或凋亡,并形成 AD 的病理标志神经原纤维缠结及老年斑。与学习记忆有关的神经元(如胆碱能和含 nNOS 神经元)选择性受损导致了 AD 的临床表现,通过 A β -NO-A β 级联回路和 IL-1 引发的“细胞因子循环”,使 AD 的病变程度和范围逐渐扩大,从而表现出进行性的临床特征。

吲哚美辛是环氧合酶(cyclooxygenase, COX)的非选择性抑制剂。COX 亦称为前列腺素 G/H 合酶,是催化花生四烯酸转变为前列腺素(PGs)的关键酶,可分为 COX-1 和 COX-2 两型,其中 COX-2 为可诱导型酶,在脑和脊髓的神经元有生理性表达,其表达水平与炎症的严重程度呈正相关。细胞培养以及转基因动物研究均证实 COX-2 参与神经元的死亡机制^[8]。在 AD 中由于大量神经元丧失,COX-2 的表达和前列腺素 E₂ 的含量均减少,但在一些活性星形胶质细胞聚集的脑区 COX-2 表达增加,它与活化的 AC 一起参与 AD 的早期病理损伤^[9]。目前认为吲哚美辛至少可通过两种途径抑制胶质细胞和神经元产生 PGs:一是作为 COX 的强烈抑制剂减少 PGs 合成;二是通过竞争性地与过氧化物酶体增殖剂激活受体- γ (peroxisome proliferators-activated receptor- γ)结合而调节基因表达^[10~12]。

本研究显示,在体外吲哚美辛可降低 A β 介导的 BV-2 细胞 iNOS mRNA 及 IL-1 β mRNA 表达,从而减少 NO 和 IL-1 β 的产生,阻断炎症级联反应,进而阻止炎症介质发挥神经毒性作用,抑制 AD 病变程度和范围的逐渐扩大。因此,吲哚美辛对 NO 和 IL-1 β 合成以及分泌的早期干预可能为其神经保护作用的重要机制。

此外,吲哚美辛其他可能的作用环节还包括减少 RAGEs 生成,进而抑制过度的蛋白交连和氧化应激;抑制胶质细胞产生明胶酶(特异性基质金属蛋白酶)等。因此除对 COX-1、COX-2 具有抑制作用外,吲哚美辛可能还有多种神经保护作用机制,而我们的研究工作也为进一步探讨 NSAIDs 的神经保护作用机制提供了一定的实验依据。

参考文献

- [1] Rogers J, Kirby LC, Hempelman SR, et al. Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease. *Neurology*, 1993,43:1609-1611.
- [2] Meda L, Baron P, Scarlato G. Glial activation in Alzheimer's disease; the role of A β and its associated proteins. *Neurobiol Aging*, 2001,22:885-893.
- [3] Giulian D, Haverkamp LJ, Li J, et al. Senile plaques stimulate microglia to release a neurotoxin found in Alzheimer brain. *Neurochem Int*, 1995,27:119-137.
- [4] Smith MA, Richey Harris PL, Sayre LM, et al. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 1997, 17:2653-2657.
- [5] Sheng JG, Zhu SG, Griffin WST, et al. Interleukin-1 promotes expression and phosphorylation of neurofilament and tau protein *in vivo*. *Exp Neurol*, 2000,163:388-391.
- [6] Akama KT, Van Eldik LJ. Beta-amyloid stimulation of inducible nitric-oxide synthase in astrocytes is interleukin-1 β - and tumor necrosis factor- α (TNF α)-dependent, and involves a TNF α receptor-associated factor- and NF κ B-inducing kinase-dependent signaling mechanism. *J Biol Chem*, 2000, 275:7918-7924.
- [7] Combs OK, Karlo JC, Kao SC, et al. beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNF α -dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci*, 2001, 21: 1179-1188.
- [8] Kelley KA, Ho L, Winger D, et al. Potentiation of excitotoxicity in transgenic mice overexpressing neuronal cyclooxygenase-2. *Am J Pathol*, 1999, 155:995-1004.

[9] Hoffmann C. COX-2 in brain and spinal cord implications for therapeutic use. *Curr Med Chem*, 2000, 7: 1113-1120.

[10] Lehmann SM, Lenhard JM, Oliver BB, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem*, 1997, 272:3406-3410.

[11] Hirohata M, Ono K, Naiki H, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs have anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils *in vitro*. *Neuropharmacology*, 2005, 49:1088-1099.

[12] Gasparini L, Ongini E, Wenk G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in Alzheimer's disease: old and new mechanisms of action. *J Neurochem*, 2004, 91:521-536.

《中华老年多器官疾病杂志》第二届编委名单

顾问

王一镜	王今达	王永炎	王宝恩	王新德	刘玉清	刘彤华	牟善初
吴阶平	吴孟超	陈彤云	陈新	罗慰慈	顾复生	诸骏仁	黄翠芬
萧树东	臧益民	黎介寿	黎磊石				

总编辑

王士雯

副总编辑

王海燕	沈璐华	林仲翔	郑树森	胡大一	洪昭光	钱方毅	唐朝枢
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

编委 (按姓氏笔画顺序)

马长生	王辰	王征	王睿	王瑾	王巍	王士雯	王乐丰
王传馥	王晓峰	王海燕	王福生	方宁远	方唯一	卢才义	叶大训
叶平	叶兴蓉	田慧	付小兵	宁佩仪	成蓓	朱元珏	朱庆磊
朱妙章	朱健华	华琦	刘又宁	刘玉杰	刘志红	刘秀云	刘怀霖
刘国树	孙仁宇	孙宜萍	祁芸云	许玉韵	许国铭	许樟荣	纪宝华
李泱	李越	李呈亿	李文歌	李小鹰	李兰娟	李平生	李玉林
李向红	严静	杨连粤	杨庭树	杨新春	吴本伊	吴海云	吴清玉
吴智勇	何作祥	邱明才	汪月增	沈洪	沈谨	沈璐华	宋青
张宏	张运	张劲松	张和起	陆再英	陆守曾	陆菊明	陈兰英
陈良安	步荣发	范维虎	罗北捷	罗晓红	周荣斌	郑知刚	郑秋甫
郑树森	孟庆义	赵玉生	赵克森	林仲翔	俞森洋	姚咏明	洪昭光
胡大一	秦俭	贾三庆	顾健人	顾翔	柴家科	钱方毅	钱桂生
徐广飞	徐成斌	高长青	高树良	郭林妮	郭洪志	郭继鸿	郭静宣
唐杰	唐朝枢	晏沐阳	黄从新	黄晨	曹克将	曹起龙	曹雪滨
曹雅旻	盛净	盛树力	崔连群	崔德健	盖鲁粤	梁发启	韩梅
韩雅玲	程昱声	程蕴林	蒲传强	蔡幼铨	蔡昌豪	颜光涛	霍勇
魏盟							

通讯编委

王梅	王海鹰	王嘉陵	尹彤	刘丽	宋启哲	陈宇	张文莉
高磊	黄芸	黄河玲	程友琴				