

黄芩苷通过抑制小胶质细胞活化缓解吗啡耐受

宋华园¹, 周丹丽², 韩园³, 刘文涛^{1*}

(¹南京医科大学江苏省神经退行性疾病重点实验室, 南京 210029; ²中国药科大学临床药理学教研室, 南京 211198; ³徐州医学院江苏省麻醉学重点实验室, 徐州 221000)

摘要 探讨黄芩苷对小胶质细胞活化和慢性耐受的影响并考察其作用机制。应用 RT-PCR 和 ELISA 法考察细胞释放炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 的变化, Western blot 法检测细胞中 p-p38MAPK 和 IBA-1 蛋白表达变化, 热板法检测慢性吗啡耐受小鼠热板痛阈变化。实验结果发现, 黄芩苷(1, 10, 100 $\mu\text{mol/L}$) 剂量依赖性地抑制吗啡活化的 BV2 细胞释放 IL-1 β 和 TNF- α , 100 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩苷明显降低 p-p38MAPK 水平。鞘内注射黄芩苷(20, 40, 60 μg) 可剂量依赖性地改善慢性吗啡耐受, 鞘内注射黄芩苷 60 μg 可模拟出小胶质细胞抑制剂米诺环素的作用并能显著抑制慢性吗啡耐受小鼠脊髓 p-p38MAPK 以及 IBA-1 的表达。本研究表明, 黄芩苷可通过抑制 p38MAPK 信号通路抑制吗啡引起的小胶质细胞活化, 进而显著改善慢性吗啡耐受。

关键词 黄芩苷; 吗啡; 小胶质细胞; 慢性耐受

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2014)03-0346-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20140317

Baicalin attenuates morphine tolerance through suppressing spinal microglia activation in mice

SONG Huayuan¹, ZHOU Danli², HAN Yuan³, LIU Wentao^{1*}

¹Jiangsu Provincial Key Laboratory for Neurodegenerative Diseases, Nanjing Medical University, Nanjing 210029; ²Department of Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198; ³Jiangsu Provincial Key Laboratory of Anesthesiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000, China

Abstract The aim of the present study was to investigate the effects and possible mechanisms of baicalin on morphine induced microglia activation and morphine tolerance. Cytokine IL-1 β and TNF- α expression were analyzed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the level of p38 MAP kinase phosphorylation and IBA-1 expression was determined by Western blot, the antinociception and morphine tolerance were assessed in mice using hot-plate test. Results showed that baicalin (1, 10, 100 $\mu\text{mol/L}$) inhibited morphine induced up-regulated levels of IL-1 β , TNF- α in BV-2 microglia cells in a dose-dependent manner; and that 100 $\mu\text{mol/L}$ baicalin significantly inhibited the level of p38MAP kinase phosphorylation induced by morphine in BV2 microglia cells. Intrathecal (it.) injection of baicalin (20, 40, 60 μg) attenuated the development of chronic morphine tolerance in a dose-dependent manner. Baicalin (60 μg) mimicked the role of minocycline and significantly suppressed the level of p38MAP kinase phosphorylation induced by chronic morphine treatment and IBA-1 expression in mice spinal cord. In conclusion, baicalin suppresses morphine-induced microglia activation through suppressing p38MAPK signaling, resulting in significant attenuation of morphine antinociceptive tolerance.

Key words baicalin; morphine; microglia; chronic tolerance

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81200860, 81171044)

吗啡作为一种经典的阿片类镇痛药物广泛用于临床,但长时间应用会产生耐受^[1-2],影响了吗啡的临床应用。目前,吗啡耐受确切的分子机制尚不完全清楚。以往有关吗啡耐受的机制研究多集中于研究神经元自身的变化,尤其是关注吗啡受体的功能异常上。但神经元功能异常并不能完全解释吗啡耐受这种现象,在临床上将一些降低神经元兴奋性的药物与吗啡联用并不能很好地改善吗啡耐受,提示还有其他重要机制调控吗啡耐受的进程。最近研究发现,胶质细胞的活化尤其小胶质细胞的活化在吗啡耐受过程中发挥着重要作用^[3-4]。吗啡可以通过作用于小胶质细胞表面的吗啡受体或者 TLR-4 受体激活小胶质细胞^[5],活化的小胶质细胞会释放大量的细胞因子与炎症因子,如白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 等,这些因子分别作用于其对应的受体,导致脊髓背角中痛觉相关神经元的兴奋性增高并导致疼痛,进而减弱了吗啡的镇痛作用,加速耐受的进程^[6-7]。

黄芩苷 (baicalin) 是从唇形科植物黄芩的干燥根中提取的一种黄酮类化合物,其为黄芩的主要有效成分之一。黄芩苷具有抗菌、抗感染、抗氧化、镇静及心血管和脑神经损伤保护作用等多种药理作用^[8-10]。有研究显示,黄芩提取物可抑制脂多糖 (LPS) 诱发的小胶质细胞活化并降低炎症因子的释放^[11-12],LPS 是一种经典的 TLR-4 受体激动剂,而前人的研究证明吗啡可以直接激活 TLR-4 受体^[5],提示黄芩苷可能对吗啡导致的小胶质细胞活化具有抑制性作用。

本实验研究黄芩苷对吗啡导致的小胶质细胞活化的影响并考察其对吗啡慢性耐受的影响,并探讨其分子机制。

1 材料

1.1 药物与试剂

黄芩苷 (纯度 98%, 南京泽朗植提技术有限公司); 盐酸吗啡 (沈阳第一制药厂); ELISA 试剂盒 (深圳达科为生物工程有限公司); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司); DMEM 培养基 (美国 Hyclone 公司); p38MAPK 抗体、p-p38MAPK 抗体 (美国 Cell Signaling 公司); IBa-1 抗体 (日本 Wako 公司); GAPDH

抗体 (美国 Bioworld 公司); 羊抗兔二抗 (美国 R&D 公司)。

1.2 动物与细胞株

健康雌性 ICR 小鼠, 清洁级, 体重为 18 ~ 22 g, 由江苏省南京医科大学动物中心提供, 许可证号为: SYXK (苏) 2008-0007。BV-2 小鼠源性小胶质细胞株购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学细胞库。

1.3 仪器

Mini-Protean4 电泳仪 (美国 BioRad 公司); YLS-6B 智能热板仪 (济南益延科技发展有限公司); 7300 Real-time PCR 系统 (英国 Applied Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 BV2 小胶质细胞培养

使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 在 5% CO₂, 37 °C 恒温培养箱中培养 BV2 小胶质细胞。实验前 24 h, 将培养基换成 0.5% 胎牛血清高糖 DMEM。

细胞分为空白对照组、模型组、模型给药组及模型阳性给药组。模型组: 200 μ mol/L 吗啡处理 6 h; 模型给药组 (吗啡处理 + 黄芩苷): 吗啡处理前 30 min 分别预先给予 1, 10, 100 μ mol/L 黄芩苷, 然后再用吗啡 200 μ mol/L 处理 6 h; 模型阳性给药组 (吗啡处理 + 米诺环素): 吗啡处理前 30 min 预先给予 10 μ mol/L 小胶质细胞抑制剂米诺环素 (minocycline), 再用 200 μ mol/L 吗啡处理 6 h。

2.2 RT-PCR 测定细胞中炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 的表达

收集各组 BV2 细胞样品 (分组同“2.1”项), 加入 Trizol 500 μ L, 吹至液体澄清且无细胞团块, 颠倒混匀, 室温放置 5 min, 加氯仿 100 μ L, 颠倒混匀, 室温剧烈振摇 5 min, 4 °C 离心 (12 000 r/min) 15 min; 取上层水相约 200 μ L 于另一 1.5 mL EP 管中, 加异丙醇 200 μ L, 颠倒混匀, 室温放置 10 min, 4 °C 离心 (12 000 r/min) 10 min; 弃上清液, 加冰预冷的 DEPC 水配制的 75% 乙醇 1 mL, 4 °C 离心 (7 500 r/min) 5 min; 弃上清液, 空气干燥 5 ~ 10 min, 溶于 DEPC 水 10 μ L 中然后进行 RT-PCR (引物序列见表 1)。

Table 1 Primer sequences of some biological indicators in PCR

Biological indicator	Primer sequence
IL-1β	Sense: TCATTGTGGCTGTGAGAAG
	Antisense: AGGCCACAGGTATTTGTCTG
TNF-α	Sense: CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA
	Antisense: TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
GAPDH	Sense: AACGACCCCTTCATTGAC
	Antisense: TCCACGACATACTCAGCAC

2.3 ELISA 检测细胞释放 IL-1β 和 TNF-α 的水平
收集“2.1”项中各组 BV2 细胞培养的上清液,使用 ELISA 试剂盒检测 IL-1β 和 TNF-α 蛋白表达情况。

2.4 热板法测定小鼠的热板基础痛阈
将雌性 ICR 小鼠分为空白对照组、模型组、模型给药组、模型阳性给药组以及单纯给药组。模型组(慢性吗啡耐受模型):皮下注射吗啡 10 mg/kg,连续 7 d,每日 1 次;模型给药组(慢性吗啡耐受 + 黄芩苷):在每天注射吗啡前提前 10 min 分别鞘内注射(it.)20,40,60 μg 低、中、高不同剂量的黄芩苷(10 μL);模型阳性给药组(慢性吗啡耐受 + 米诺环素):在每天注射吗啡前提前 10 min 鞘内注射 20 μg 米诺环素(10 μL);单纯给药组(黄芩苷):在基础情况下每天鞘内注射高剂量 60 μg 黄芩苷(10 μL),连续 7 d。

将小鼠置于 55 ℃ 热板上,以其足部接触热板到开始舔足或跳离热板后的时间为热板基础痛阈(hot-plate pain test,HPPT)。记录给药前后的添足潜伏期,按照公式计算出最大镇痛效应百分比(MPE)。MPE(%)=(给药后潜伏期-给药前潜伏期)/(20-给药前潜伏期)×100。

2.5 免疫印迹法(Western blot)检测 p38MAPK、p-p38MAPK 和 Iba-1 蛋白水平的表达

小鼠慢性吗啡耐受模型实验中分组见“2.4”项。BV2 细胞分为空白对照组、模型组(见“2.1”项)、模型给药组以及单纯给药组。模型给药组(吗啡处理 + 黄芩苷):吗啡处理前 30 min 预先给予 100 μmol/L 黄芩苷,然后再用吗啡 200 μmol/L 处理 6 h;单纯给药组(黄芩苷):在基础情况下用 100 μmol/L 黄芩苷处理 6 h。

取小鼠 L4-L6 脊髓节段(用于检测 p38MAPK、p-p38MAPK 和 Iba-1 蛋白表达水平)或 BV2 细胞样品(用于检测 p38MAPK 和 p-p38MAPK 蛋白表达水平),按一定比例加入裂解液,处理样品,经聚

丙烯酰胺凝胶电泳,转移至 PDVF 膜上,6% BSA 封闭液室温封闭 3 h,分别加入 p38MAPK 抗体、p-p38MAPK 抗体和 Iba-1 抗体等一抗(1:1 000)室温孵育 3 h,4 ℃ 过夜,TBST 洗 5 min × 2,加入羊抗兔二抗(1:2 000),室温下孵育 3 h,TBST 洗 5 min × 3,显色,进行数据分析。

2.6 数据统计
结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.5 分析软件进行组间 *t* 检验,各组数据以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结 果
3.1 黄芩苷对吗啡活化 BV2 细胞释放炎症因子 IL-1β 和 TNF-α 的影响

RT-PCR 实验结果(图 1-A)表明:未经处理的 BV2 细胞(空白对照组)IL-1β 和 TNF-α mRNA 水平较低;BV2 细胞经吗啡活化后(模型组),IL-1β 和 TNF-α mRNA 水平显著上升(与空白对照组相比,*P* < 0.01)。图 1 显示,黄芩苷可剂量依赖性地抑制吗啡活化的 BV2 细胞 IL-1β 和 TNF-α 的表达(与模型组相比,*P* < 0.05),其中 100 μmol/L 黄芩苷抑制作用效果最为显著,基本达到米诺环素(10 μmol/L)的抑制水平。

ELISA 检测结果与 RT-PCR 的结果相一致,黄芩苷可剂量依赖性地抑制吗啡活化的 BV2 细胞 IL-1β 和 TNF-α 蛋白水平的高表达,其中以 100 μmol/L 黄芩苷抑制作用效果最为显著(图 1-B)。

3.2 黄芩苷对吗啡活化的 BV2 细胞中 p38MAPK 磷酸化水平的影响

吗啡处理过的 BV2 小胶质细胞(模型组)中 p38MAPK 磷酸化水平显著升高(与空白对照组相比,*P* < 0.01);而高剂量黄芩苷(100 μmol/L)可显著抑制吗啡活化的 BV2 细胞中 p38MAPK 磷酸化水平的升高(与模型组相比,*P* < 0.05);而黄芩苷对 BV2 细胞的基础 p38MAPK 磷酸化水平没有显著影响。实验各组总 p38MAPK 水平均没有显著变化(图 2)。

3.3 黄芩苷对小鼠基础痛阈以及吗啡慢性耐受的影响

热板法测定小鼠基础痛阈结果显示,黄芩苷和生理盐水对正常的雌性小鼠的舔足潜伏期没有显

著影响(图 3-A)。在 小鼠慢性吗啡耐受实验中检测结果显示,黄芩苷可以剂量依赖性的改善吗啡耐

受,其中高剂量的黄芩(60 μg , it.)效果最好,效果接近与阳性对照药物米诺环素(图 3-B)。

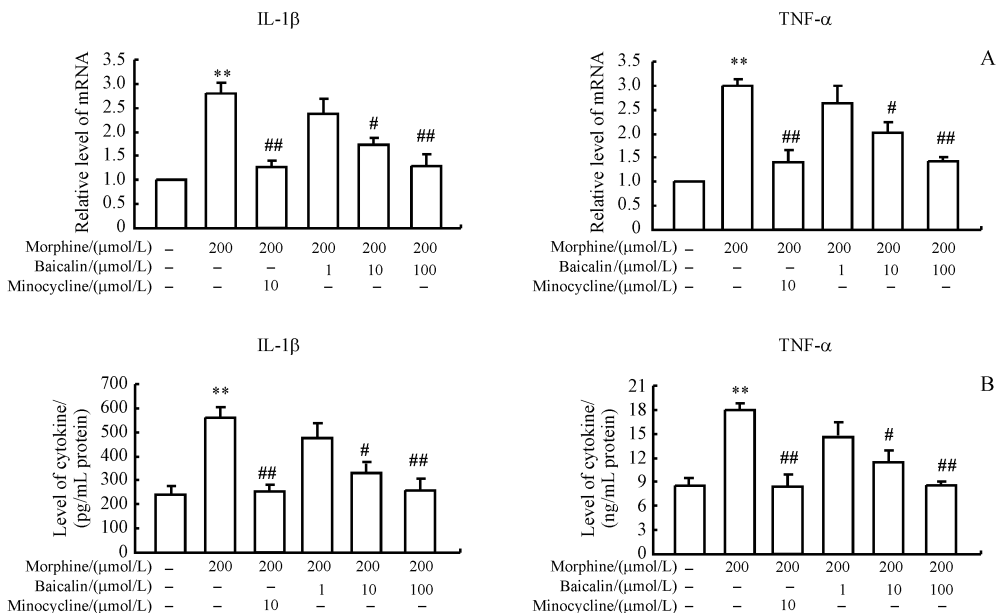


Figure 1 Baicalin inhibited morphine induced up-regulated levels of IL-1 β ,TNF- α in BV-2 microglia cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
A;mRNA levels of IL-1 β ,TNF- α in BV-2 microglia cells analyzed by RT-PCR ;B;Levels of IL-1 β ,TNF- α in BV-2 microglia cells analyzed by ELISA
** $P < 0.01$ vs control group;# $P < 0.05$,### $P < 0.01$ vs model group

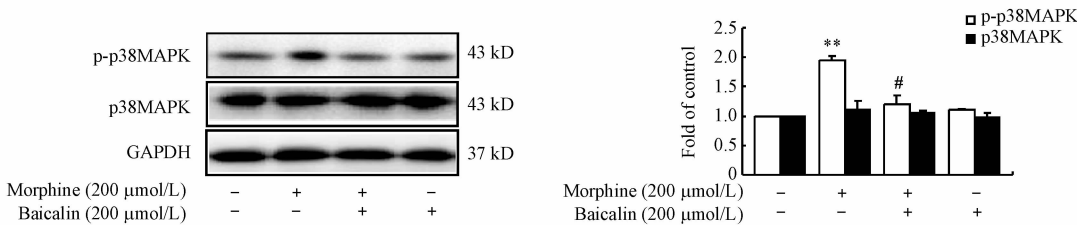


Figure 2 Baicalin inhibited morphine induced up-regulated phosphorylation level of p38MAPK in BV2 microglia cells($\bar{x} \pm s, n = 4$)
** $P < 0.01$ vs control group;# $P < 0.05$ vs model group

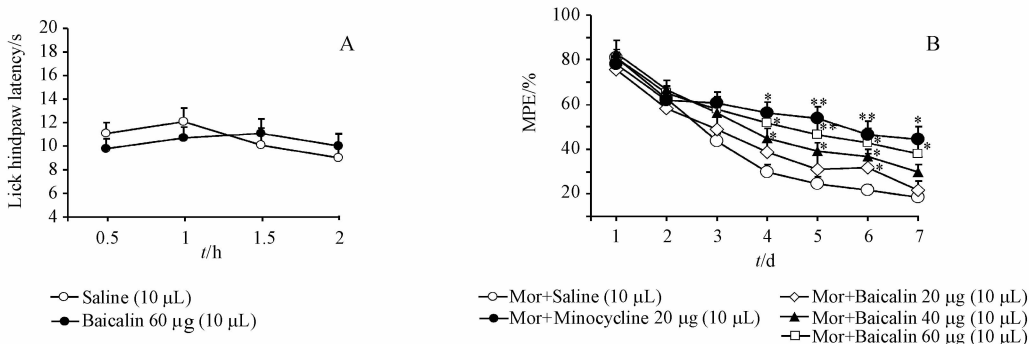


Figure 3 Baicalin prevented the development of chronic morphine (Mor) tolerance in mice($\bar{x} \pm s, n = 6$)
A;Effect of baicalin on the pain threshold of naive mice;B;Role of baicalin on the development of chronic morphine tolerance in mice
MPE;maximum possible effect. * $P < 0.05$,* * $P < 0.01$ vs model group

3.4 黄芩苷对慢性吗啡耐受小鼠脊髓小胶质细胞活化的影响

在慢性吗啡耐受模型中,IBA-1 表达水平显著

升高(与空白对照组相比, $P < 0.01$);而黄芩苷能够显著抑制慢性吗啡耐受模型小鼠脊髓水平 IBA-1 的表达(与模型组相比, $P < 0.05$);并且能够模

拟出阳性药物米诺环素(20 μg, it.)的作用;黄芩苷(60 μg, it.)对正常小鼠脊髓 IBA-1 表达没有显著影响(图 4)。

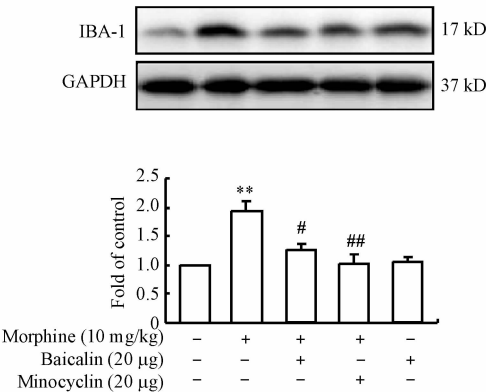


Figure 4 Baicalin mimicked the role of minocycline and inhibited chronic morphine treatment-induced spinal microglia activation in mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs model group

3.5 黄芩苷对慢性吗啡耐受小鼠脊髓 p38MAPK 磷酸化水平的影响

在慢性吗啡耐受模型组中, p38 磷酸化的表达水平显著上升(与空白对照组相比, $P < 0.01$);而黄芩苷显著抑制慢性吗啡耐受模型小鼠脊髓 p38MAPK 磷酸化水平的升高(与模型组相比, $P < 0.05$);其作用与米诺环素(20 μg, it.)类似;黄芩苷(60 μg, it.)对基础情况下的小鼠脊髓 p38 磷酸化水平的表达没有显著影响。实验各组总 p38MAPK 水平均没有显著变化(图 5)。

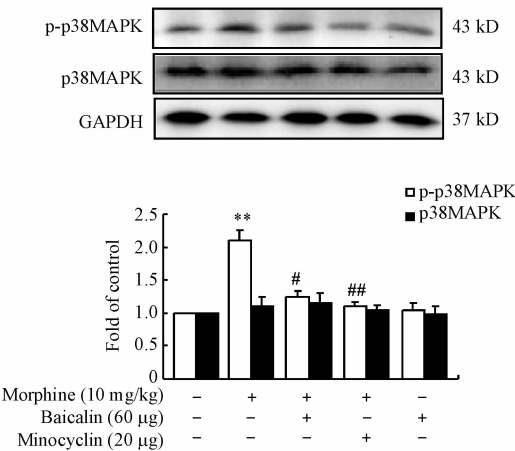


Figure 5 Baicalin suppressed chronic morphine treatment-induced up-regulated phosphorylation level of p38MAPK in mice spinal cord ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs model group

4 讨论

大量研究表明,慢性吗啡处理可以导致神经系统尤其是脊髓背角部位的小胶质细胞大量活化并伴随着神经炎症反应,表现为脊髓背角的小胶质细胞的标记物增多和炎症因子的大量增加^[13]。随后的研究发现,MAPK 家族的成员之一 p38MAPK 在吗啡导致的小胶质细胞的活化进程中发挥了重要作用^[3]。利用 p38MAPK 的抑制剂 SB203580 可以显著抑制吗啡导致的小胶质细胞炎症因子释放并改善吗啡耐受。同时发现利用小胶质细胞的抑制剂米诺环素可以抑制吗啡导致的脊髓背角的 p38MAPK 信号通路的激活,并抑制小胶质细胞介导的神经炎症反应而缓解吗啡耐受^[14-15],提示利用药物抑制小胶质细胞活化可以增加吗啡的镇痛作用。但是米诺环素作为一种广谱抗生素,长期使用可能造成伪膜性肠炎及软骨组织损伤等多种不良反应,使其临床应用受到限制。因此,寻找到一种安全有效的抑制小胶质细胞活化的药物,尤其是靶向小胶质细胞 p38MAPK 信号通路的药物,对于克服吗啡耐受进而提高慢性疼痛的治疗效果具有重要意义。

黄芩苷已经在临床上广泛应用,安全性相对较高。本研究首次发现黄芩苷可以在体外剂量依赖性地抑制吗啡导致的 BV2 细胞的 IL-1β 和 TNF-α 的 mRNA 水平的升高。同时,本研究的结果显示黄芩苷可抑制吗啡导致的 BV2 细胞活化后 p38MAPK 磷酸化水平的上升,提示黄芩苷的作用可能是通过抑制 p38MAPK 信号通路而抑制了吗啡导致的小胶质细胞活化。整体的行为学实验结果显示:黄芩苷能够剂量依从性地改善吗啡耐受,并显著抑制吗啡导致的小胶质细胞活化。进一步的分子机制研究中,发现黄芩苷可以显著抑制慢性吗啡耐受进程中脊髓 p38MAPK 磷酸化水平上升,这一点与离体 BV2 细胞的实验数据相一致。这些结果进一步提示黄芩苷可通过抑制 p38MAPK 信号通路的异常活化降低吗啡诱导的小胶质细胞活化,进而改善吗啡耐受。

本研究结果显示,黄芩苷可以剂量依赖性地改善吗啡耐受,其作用机制可能是通过抑制 p38MAPK 信号通路异常活化,降低吗啡导致的小胶质细胞活化而实现的。鉴于黄芩苷良好的安全

性,很可能成为临床改善吗啡耐受新的先导化合物。但是对于黄芩苷如何抑制小胶质细胞活化,尤其是抑制 p38MAPK 的异常激活还有待于进一步深入研究。

参考文献

- [1] Davis MP, Walsh D, Lagman R, *et al.* Controversies in pharmacotherapy of pain management[J]. *Lancet Oncol*, 2005, **6**(9): 696 – 704.
- [2] Menendez L, Lastra A, Meana A, *et al.* Analgesic effects of loperamide in bone cancer pain in mice[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2005, **81**(1): 114 – 121.
- [3] Cui Y, Chen Y, Zhi ZQ, *et al.* Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia mediates morphine antinociceptive tolerance[J]. *Brain Res*, 2006, **1 069**(1): 235 – 243.
- [4] Song P, Zhao ZQ. The involvement of glial cells in the development of morphine tolerance[J]. *Neurosci Res*, 2001, **39**(3): 281 – 286.
- [5] Wang XH, Lisa C, Khara R, *et al.* Morphine activates neuroinflammation in a manner parallel to endotoxin[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, **109**(16): 6 325 – 6 330.
- [6] Ferrini F, Trang T, Mattioli TA, *et al.* Morphine hyperalgesia gated through microglia-mediated disruption of neuronal $Cl(-)$ homeostasis[J]. *Nat Neurosci*, 2013, **16**(2): 183 – 192.
- [7] Berta T, Liu T, Liu YC, *et al.* Acute morphine activates satellite glial cells and up-regulates IL-1 β in dorsal root ganglia in mice via matrix metalloproteinase-9[J]. *Mol Pain*, 2012, **8**: 18.
- [8] Cao Y, Li G, Wang YF, *et al.* Neuroprotective effect of baicalin on compression spinal cord injury in rats[J]. *Brain Res*, 2010, **1 357**: 115 – 123.
- [9] Li YC, Shen JD, Li J, *et al.* Chronic treatment with baicalin prevents the chronic mild stress-induced depressive-like behavior: involving the inhibition of cyclooxygenase-2 in rat brain[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2013, **40**: 138 – 143.
- [10] Li HY, Hu J, Li M, *et al.* Comprehensive study of baicalin down-regulating NOD2 receptor expression of neurons with oxygen-glucose deprivation *in vitro* and cerebral ischemia-reperfusion *in vivo* [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, **649**(1/2/3): 92 – 99.
- [11] Woo KJ, Lim JH, Suh SI, *et al.* Differential inhibitory effects of baicalein and baicalin on LPS-induced cyclooxygenase-2 expression through inhibition of C/EBP β DNA-binding activity[J]. *Immunobiology*, 2006, **211**(5): 359 – 368.
- [12] Hou JC, Wang J, Zhang P, *et al.* Baicalin attenuates proinflammatory cytokine production in oxygen-glucose deprived challenged rat microglial cells by inhibiting TLR4 signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, **14**(4): 749 – 757.
- [13] Jun IG, Kim SH, Yoon YI, *et al.* Intrathecal lamotrigine attenuates antinociceptive morphine tolerance and suppresses spinal glial cell activation in morphine-tolerant rats[J]. *J Korean Med Sci*, 2013, **28**(2): 300 – 307.
- [14] Cui X, Liao XX, Liu W, *et al.* A novel role of minocycline: attenuating morphine antinociceptive tolerance by inhibition of p38 MAPK in the activated spinal microglia [J]. *Brain Behav Immun*, 2008, **22**(1): 114 – 123.
- [15] Seki Y, Kato T, Monji A, *et al.* Pretreatment of aripiprazole and minocycline, but not haloperidol, suppresses oligodendrocyte damage from interferon- γ -stimulated microglia in co-culture model [J]. *Schizophr Res*, 2013, **151**(1/2/3): 20 – 28.