

余焯,杜力军,秦川. TRPM8参与薄荷醇对炎症因子负调控作用的机制[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(6): 1-8.  
Yu X, Du LJ, Qin C. Role of TRPM8 in negative regulation of inflammatory factors by menthol [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(6): 1-8.  
doi: 10. 3969/ j. issn. 1671-7856. 2021. 06. 001

TRPM8参与薄荷醇对炎症因子负调控作用的机制

余焯<sup>1</sup>,杜力军<sup>2</sup>,秦川<sup>1\*</sup>

(1.中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,卫健委人类疾病比较医学重点实验室,北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心,北京100021;2.清华大学蛋白质科学教育部重点实验室,生命科学学院医学院药物药理实验室,北京100084)

**【摘要】** 目的 薄荷醇通过瞬时受体电位 TRPM8 对炎症因子负调控作用的机制。方法 首先在整体动物实验,检测薄荷醇对小鼠下丘脑中 TRPM8,核转录因子 NF-κB 以及炎症因子 TNF-α 表达水平的调控。然后通过体外实验,在细胞水平检测薄荷醇对 PC12 细胞中 TRPM8、NF-κB 和 TNF-α 表达的调控作用。最后,使用 TRPM8 表达敲低的 PC12 细胞系,检测薄荷醇对 TRPM8、NF-κB 和 TNF-α 调控作用的变化。结果 (1)尾静脉注射薄荷醇,可以激活小鼠脑中 TRPM8 的表达,抑制核转录因子 NF-κB 和炎症因子 TNF-α 的表达。(2)薄荷醇可以激活 PC12 细胞中 TRPM8 的表达,抑制 NF-κB 和炎症因子 TNF-α 的表达。(3)在 TRPM8 敲低的 PC12 细胞中,薄荷醇对 TRPM8 表达无显著调控作用,对 TNF-α 表达的抑制作用转为激活作用。结论 薄荷醇对炎症因子 TNF-α 及其上游核转录因子 NF-κB 的负调控作用依赖于其对 TRPM8 的激活作用。

**【关键词】** 瞬时受体电位;神经炎症;核转录因子;炎症因子

**【中图分类号】** R-33      **【文献标识码】** A      **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 06-0001-08

Role of TRPM8 in negative regulation of inflammatory factors by menthol

YU Xuan<sup>1</sup>, DU Lijun<sup>2</sup>, QIN Chuan<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS). Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC). NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine. Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Diseases, Beijing 100021, China. 2. MOE Key Laboratory of Protein Sciences. Laboratory of Molecular Pharmacology and Pharmaceutical Sciences, School of Life Sciences and School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084)

**【Abstract】 Objective** To elucidate the molecular mechanism of the negative regulation of inflammatory factors by menthol through transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8). **Methods** In an *in vivo* experiment, we detected expression of the cold-sensitive receptor TRPM8, nuclear transcription factor NF-κB, and inflammatory factor TNF-α after intravenous injection of (-)-menthol. In an *in vitro* experiment, we examined the effect of menthol on TRPM8, NF-κB, and TNF-α expression in PC12 cells. Finally, we examined the negative relationship between TRPM8 and TNF-α in PC12 cells (TRPM8 knockdown). **Results** The three main findings of this study are as follows. First, after intravenous injection

【基金项目】国家自然科学基金资助项目(81901342);2018 外专引智项目(T2018010)。  
【作者简介】余焯(1990—),助理研究员,研究方向:神经退行性疾病、神经炎症。E-mail: wyyx111@sina.com  
【通信作者】秦川(1959—),教授,博士生导师,研究方向:实验病理学、神经退行性疾病。E-mail: qinchuan@pumc.edu.cn

of menthol, expression of the cold-sensitive receptor TRPM8 in the hypothalamus of mice was activated, and expression of the nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B and inflammatory factor TNF- $\alpha$  was inhibited. Second, in the neuron-like PC12 cells, menthol activated TRPM8 expression and inhibited NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$ . Third, in PC12 cells with TRPM8 knockdown, menthol showed no significant effect on TRPM8 expression; in contrast, TNF- $\alpha$  expression was activated.

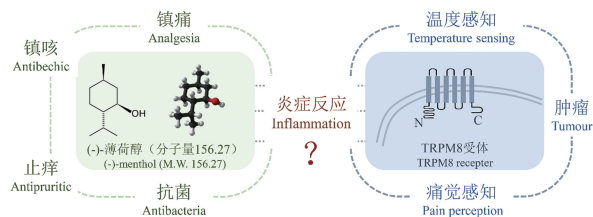
**Conclusions** The negative regulation of inflammatory factors by menthol depends on the activation of TRPM8 expression.

**[Keywords]** transient receptor potential; neural inflammation; nuclear transcription factors; inflammatory factors

薄荷(*Mentha haplocalyx* Briq),作为重要的药用植物,在我国种植和使用历史源远流长。其命名有“菝葜”(扬雄·甘泉赋)、“菱苦”(吕沉·字林)、“番荷”(孙思邈·千金方)、“菝兰”(陈士良·食性本草),直至李时珍的本草纲目中才称作“薄荷”<sup>[1]</sup>。薄荷在欧洲医学和西方医学的推广使用则要到 18 世纪后。薄荷醇(menthol),也称为薄荷脑,是一种环类单萜,主要存在于薄荷属草本植物,被用于胃肠道<sup>[2-3]</sup>、呼吸道<sup>[4]</sup>、泌尿生殖系统<sup>[5]</sup>炎症的治疗。薄荷醇与薄荷酮、异薄荷酮、一起赋予薄荷属植物新鲜和清凉的气味。薄荷醇有 4 对光学异构体,其中(-)-薄荷醇从薄荷草药中分离出来,拥有清新的薄荷味和多种药理学活性,包括镇咳<sup>[6]</sup>、镇痛<sup>[7]</sup>、止痒<sup>[8]</sup>、抗菌<sup>[9]</sup>、抗炎<sup>[10-12]</sup>、抗肿瘤<sup>[13-14]</sup>等(图 1)。

瞬时受体电位 TRPM8 (transient receptor potential melastatin-related 8),又称冷和薄荷醇诱导受体 CMR-1(cold and menthol induced receptor-1),属于瞬时受体电位(transient receptor potential, TRP)家族<sup>[15-16]</sup>。TRPM8 是一个具有六次跨膜结构域的非选择性阳离子通道,N 末端和 C 末端位于胞内(图 1),可以被冷和具有冷属性的化合物激活,如薄荷醇、Icilin、桉树油等<sup>[17-20]</sup>。

炎症反应是一个复杂的生物学过程,当机体暴露于感染性病原体,或遭遇物理或化学损伤时发生的一种防御反应。神经系统炎症会影响神经系统的功能,强迫症<sup>[21]</sup>、阿尔兹海默症<sup>[22]</sup>、中风<sup>[23]</sup>、创伤性脑损伤<sup>[24]</sup>等疾病都伴随神经系统的慢性炎症。



注:N:氨基端;C:羧基端。

图 1 薄荷醇和 TRPM8

Note. N, Amino terminal. C, Carboxyl terminal.

Figure 1 Menthol and TRPM8

目前有多个研究工作,通过小鼠模型或细胞模型表明薄荷醇对炎症反应的一直与 TRPM8 受体相关。Ramachandran 等<sup>[25]</sup>发现,在小鼠结肠炎模型中,薄荷醇和 Icilin (TRPM8 激动剂)对小鼠结肠炎症反应有缓解作用。Juergens 等<sup>[26]</sup>发现 L-薄荷醇在体外可以显著抑制单核细胞产生 PGE、LTB、IL-1 $\beta$  等炎症因子的释放。除了薄荷醇,其他一些可以激活 TRPM8 受体的因素,如低温<sup>[27]</sup>、Icilin<sup>[28]</sup>、桉树油<sup>[29]</sup>等,据研究报道也对炎症反应具有抑制作用。本研究工作通过小鼠模型和细胞模型,主要探讨了薄荷醇对神经系统炎症的抑制作用及其可能的机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

本实验使用 SPF 级 ICR 雄性 8 周龄小鼠购自华阜康公司[SCXK(京)2019-0008],体重约 22 g,共 24 只。实验小鼠饲养于中国医学科学院医学实验动物研究所小鼠 SPF 屏障设施[SYXK(京)2018-0019],恒温恒湿,12 h/12 h 固定明暗周期,提供充足的无菌饮水、垫料和食物。本研究工作中涉及的动物实验内容和所需动物数量通过中国医学科学院医学实验动物研究所伦理审查委员会的审批(IACUC QC18002),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

#### 1.1.2 实验细胞

大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤(PC12 细胞),购自 ATCC。

### 1.2 主要试剂与仪器

(-)-薄荷醇(63660-1G)和 DMSO 购自 Sigma Aldrich(美国);ECL 底物检测试剂盒(10095983)和蛋白质 Marker 购自 Thermo-Scientific;0.9% NaCl、PBS 和钙离子荧光探针 Fluo-3AM、RIPA 蛋白裂解液(P0013B)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型 P0010)、蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE 预混液、蛋白电泳液、半干转电转缓冲液、TBST、封闭液购自碧云天生物技术有限公司;动物组织总 RNA 提取试剂盒

(DP451)购自天根生化有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物和细胞分组

24 只小鼠,随机分为对照组(C),溶媒对照组(VC,含 0.1% DMSO 生理盐水),薄荷醇高剂量组(50 mg/kg)和薄荷醇低剂量组(10 mg/kg),通过尾静脉注射方式进行给药。90 min 后,颈椎脱臼处死小鼠,解剖取材获得小鼠脑组织,分离下丘脑核团部分,液氮速冷后-80℃低温保存。

PC12 细胞分为空白对照组、薄荷醇给药组(低剂量 200 nmol/L 和高剂量 500 nmol/L)。给药 3 h 后,收集细胞,进行 RNA 和蛋白抽提。

1.3.2 钙成像实验

钙离子荧光探针 Fluo-3AM(5 mmol/L)以 PBS 稀释至 1 μmol/L 工作液。细胞培养皿吸尽培养基后,用无菌 PBS 清洗 3 次,清除残留血清后,加入 Fluo-3AM 工作液于 37℃避光孵育 15 min,然后用无菌 PBS 清洗 3 遍。用激光共聚焦显微镜(Leica SP8)选取合适的视野进行拍照。所得图片结果,进行荧光强度统计分析。

1.3.3 荧光实时定量 PCR

动物组织总 RNA 提取试剂盒提取小鼠脑组织样本和 PC12 细胞样本的总 RNA, NanoDrop 分光光度检测所提 RNA 浓度和纯度。FastKing 一步法反转录-荧光定量试剂盒(SYBR Green)(天根,FP313)进行逆转录 PCR 和荧光实时定量 PCR。反应体系为:①2×FastKing RT-qPCR Buffer(SYBR Green) 25 μL,②25×RT-PCR Enzyme Mix 2 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 1.25 μL,③RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 将总体系补齐至 50 μL。反应步骤:①逆转

录,50℃,30 min;②预变性,95℃,3 min;③PCR 扩增,95℃,15 s→60℃,30 s,40 个循环;④溶解曲线分析。引物序列如表 1 所示。

1.3.4 免疫荧光标记

将处于生长对数期的 PC12 细胞接种至 24 孔板(密度约为 15%),分为对照组和薄荷醇高剂量组(500 nmol/L),细胞贴壁生长至 40%左右时进行给药处理。药物处理后的细胞以 4%多聚甲醛固定液室温固定,随后加入 0.1%的 Triton™-X-100 通透。以 1%的 BSA 进行封闭,随后加入目标基因一抗和二抗孵育,二抗孵育时注意避光。荧光标记后的细胞,置于激光共聚焦显微镜下观察、拍照。所得结果可进行荧光强度统计分析。进行免疫荧光双标记时,按如下顺序进行:表达量较低的蛋白一抗→二抗孵育→二次封闭→表达量较高的蛋白一抗→二抗孵育。

1.3.5 蛋白免疫印记

使用 RIPA 蛋白裂解液进行组织或细胞样本的蛋白质抽提,使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白浓度测定。免疫荧光和蛋白免疫印迹中使用的抗体见表 2。

1.4 统计学方法

本研究数据使用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,所有数值以平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。所得数据符合正态分布时,对组内前后差异比较采用配对样本 *t* 检验,组间差异比较采用独立样本 *t* 检验。\**P*<0.05 为差异有统计学意义,\*\**P*<0.01 为差异有显著统计学意义,\*\*\**P*<0.001 为差异有极显著统计学意义。

表 1 Real-time PCR 引物设计  
Table 1 Primers for Real-time PCR

| 种属<br>Species | 基因<br>Gene | 正向引物<br>Forward                | 反向引物<br>Reverse              |
|---------------|------------|--------------------------------|------------------------------|
| 小鼠<br>Mouse   | TRPM8      | 5'-GTGATGAAGTGAGGCACTGCT-3'    | 5'-GCCCAGAGTACAACGAGCTT-3'   |
|               | NF-κB      | 5'-GGAGGCATGTTGCGTAGTGG-3'     | 5'-CCCTGCGTTGGATTTCGTG-3'    |
|               | TNF-α      | 5'-CCTGTAGCCACGTCGTAG-3'       | 5'-GGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3' |
|               | β-Actin    | 5'-TGGCTCCTAGCACCATGAAG-3'     | 5'-AGCTCAGTAACAGTCCGCC-3'    |
| 大鼠<br>Rat     | TRPM8      | 5'-GCTGCCCTGAGTGGATCACC-3'     | 5'-ACATGGCGACCAGGAGATTG-3'   |
|               | NF-κB      | 5'-CGCCTGAGACCCGAGACAAG-3'     | 5'-CTGCCTCTGCTCCACTGAC-3'    |
|               | TNF-α      | 5'-CTCCAGCTGGAAGACTCCTCCCAG-3' | 5'-CCCGACTACGTGCTCCTCACC-3'  |
|               | β-Actin    | 5'-CCGTAAAGACCTCTATGCCAACA-3'  | 5'-CGGACTCATCGTACTCCTGCTT-3' |

2 结果

2.1 薄荷醇对小鼠下丘脑中 TRPM8 蛋白表达的调控作用

下丘脑(hypothalamus)属于机体的中枢神经系统,分布于下丘脑不同区域的神经元通过对温度、渗透压、血糖等因子的敏感,参与体温调节、摄食饮水、内分泌、情绪反应等众多生理活动。分布于外周神经系统的 TRPM8 是机体的温度感受器,对冷和薄荷醇敏感。我们通过体内实验,检测位于中枢神经系统的 TRPM8 是否对薄荷醇敏感。

如图 2 所示,ICR 小鼠经尾静脉注射薄荷醇 3 h 后,通过蛋白免疫印迹检测小鼠下丘脑中瞬时受体电位 TRPM8、核转录因子 NF-κB 和炎症因子 TNF-α 表达的变化。结果显示,相比对照组,薄荷醇高剂量(50 mg/kg)和低剂量(10 mg/kg)组小鼠下丘脑

中 TRPM8 蛋白的表达显著上调( $P<0.01$ ),NF-κB 和 TNF-α 蛋白的表达显著下调( $P<0.01$ )。

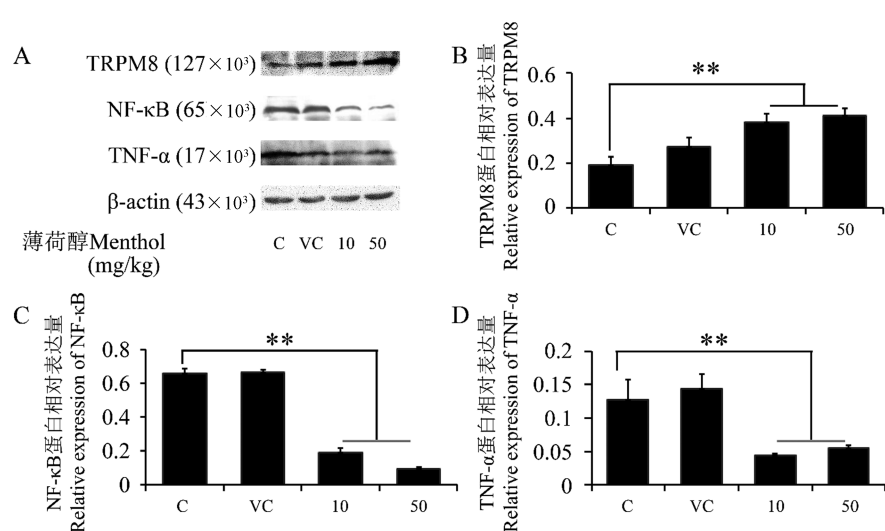
2.2 PC12 细胞对薄荷醇的响应

高度分化的 PC12 细胞是具有神经元生物特性的神经元样细胞,被广泛用于神经毒性、神经保护、神经分泌、神经炎症和突触损伤等多个领域的研究工作,是神经生物学体外实验中理想的细胞模型<sup>[30-32]</sup>。微管相关蛋白(microtubule-associated protein-2)是神经元细胞的骨架蛋白,参与神经系统发育、形成和再生等重要生物过程<sup>[33]</sup>。如图 3A 所示,在 PC12 细胞中进行神经元标志物 MAP2 的原位表达,结果显示,本研究工作中使用的 PC12 已经分化为具有神经元特性的细胞。

随后,通过钙成像技术,我们在检测薄荷醇对 PC12 细胞的作用。Fluo-3 AM 是常用的钙离子荧光探针之一,游离形式的 Fluo3 不具有荧光特性,

表 2 免疫荧光和蛋白免疫印迹抗体  
Table 2 Antibodies for Western blot and IF

| 抗体种类 Antibodies          | 名称 Product name                 | 货号 No.     | 品牌 Brand         |
|--------------------------|---------------------------------|------------|------------------|
| 一抗<br>Primary antibodies | TRPM8                           | NBP1-97311 | Novus Biological |
|                          | NF-κB                           | SC-8008    | Santa Cruz       |
|                          | TNF-α                           | ab199013   | Abcam            |
|                          | β-actin                         | SC-47778   | Santa Cruz       |
|                          | 山羊抗小鼠 IgG-HRP                   | SC-2005    | Santa Cruz       |
| 二抗<br>Second antibodies  | 山羊抗兔 IgG-HRP                    | SC-2004    | Santa Cruz       |
|                          | 山羊抗小鼠 IgG (H+L)-FITC            | F-2761     | Invitrogen       |
|                          | 山羊抗兔 IgG (H+L)-FITC             | F-2765     | Invitrogen       |
|                          | 山羊抗小鼠 IgG (H+L)-Alexa Fluor 647 | A-21235    | Invitrogen       |
|                          | 山羊抗兔 IgG (H+L)-Alexa Fluor 647  | A-21244    | Invitrogen       |



注:C:对照组,VC:溶媒对照组。与对照组比较,\*\* $P<0.01$ 。

图 2 注射薄荷醇小鼠蛋白表达情况

Note. C, Control group. VC, Vehicle control group. Compared with control group, \*\* $P<0.01$ .

Figure 2 Protein expression of mice injected with menthol

与细胞中的钙离子结合后会产生较强的荧光。如图 3B 所示,在 488 nm 激发光下,薄荷醇 (200 nmol/L) 在 PC12 细胞中引发强烈的钙内流反应。通过平均荧光强度分析显示,相比对照组 (MFI:  $61.07 \pm 5.01$ ),薄荷醇组的平均荧光强度为 ( $158.29 \pm 14.07$ ),与对照组相比具有极显著差异 ( $P < 0.001$ )。上述结果表明,具有神经元属性的 PC12 细胞可以很好的模拟小鼠下丘脑中神经元细胞对薄荷醇的响应。

2.3 薄荷醇对 PC12 细胞中 TRPM8 表达的调控作用

通过荧光实时定量 PCR,在 mRNA 水平检测薄荷醇对 PC12 细胞中 TPRM8、NF- $\kappa$ B 和 TNF- $\alpha$  表达的变化。结果如图 4A~4C 所示,200 nmol/L 和 500 nmol/L 的薄荷醇均可以促进 TRPM8 的表达,同时下调 NF- $\kappa$ B 和 TNF- $\alpha$  的转录水平。薄荷醇在转录水平对 TRPM8、NF- $\kappa$ B 和 TNF- $\alpha$  表达的调控作用呈现剂量相关性。

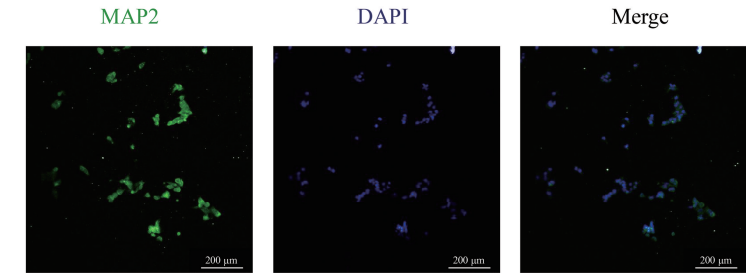
借助免疫荧光双标记实验,分别使用 FITC (绿色) 标记细胞中的 TRPM8 蛋白,Alex649 (红色) 标记细胞中的 TNF- $\alpha$  蛋白,结果如图 4D~4E 显示,相

比对照组,给药组 (薄荷醇 500 nmol/L) 中 TRPM8 (绿色) 的平均荧光强度显著升高,TNF- $\alpha$  (红色) 的平均荧光强度下降。以上结果表明,在 mRNA 和蛋白水平,薄荷醇对 TRPM8 的表达具有激活作用,对 TNF- $\alpha$  的表达具有抑制作用。

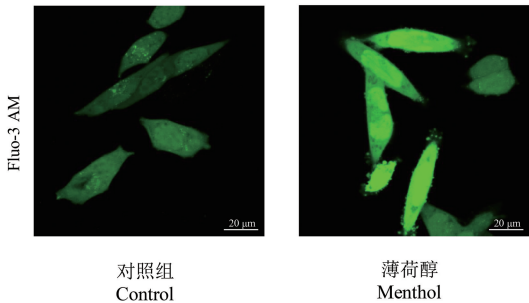
2.4 薄荷醇对 PC12 细胞 (TRPM8 敲低) 中相关基因表达的调控作用

为了进一步验证 TRPM8 蛋白与 TNF- $\alpha$  的负相关性,我们使用 TRPM8 敲低的 PC12 细胞 (KD 细胞) 进行实验。KD 细胞由清华大学药理实验室提前构建提供。如图 5A 所示,在 KD 细胞中,TRPM8 (红色) 的荧光强度显著减弱,表明细胞中 TPRM8 蛋白含量降低。所以我们进一步比较了薄荷醇在野生型 PC12 细胞 (WT 细胞) 和 KD 细胞中对 TRPM8 和 TNF- $\alpha$  表达的影响,结果如图 5B~5D 所示,在加入 200 nmol/L 和 500 nmol/L 薄荷醇时,KD 细胞中,薄荷醇不能激活细胞中 TRPM8 的表达,同时,薄荷醇失去对细胞中 NF- $\kappa$ B 和 TNF- $\alpha$  的抑制作用,并且激活了 TNF- $\alpha$  表达 ( $P < 0.01$ )。这一结果证实,在 TRPM8 的表达降低后薄荷醇对 TRPM8 和 TNF- $\alpha$  的负调控作用受到影响。

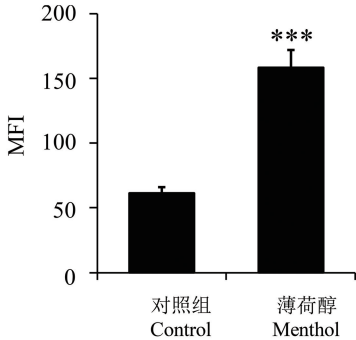
A PC12细胞中神经元标志物MAP-2的表达  
Expression of MAP-2 in PC12 cells



B 薄荷醇引起PC12细胞中发生钙内流  
Menthol induced calcium influx in PC12 cells



C 平均荧光强度  
Mean fluorescence intensity

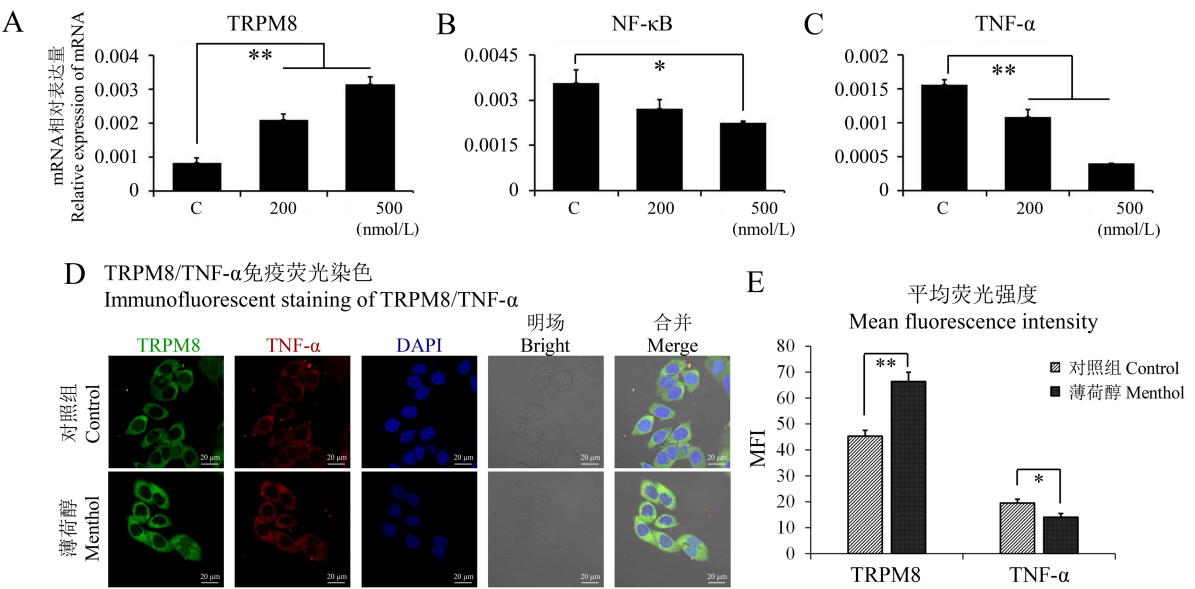


注:与对照组比较,\*\*\*  $P < 0.001$ 。薄荷醇浓度:200 nmol/L。

图 3 薄荷醇处理 PC12 细胞

Note. Compared with control group, \*\*\*  $P < 0.001$ . Menthol concentration, 200 nmol/L.

Figure 3 PC12 cells with menthol

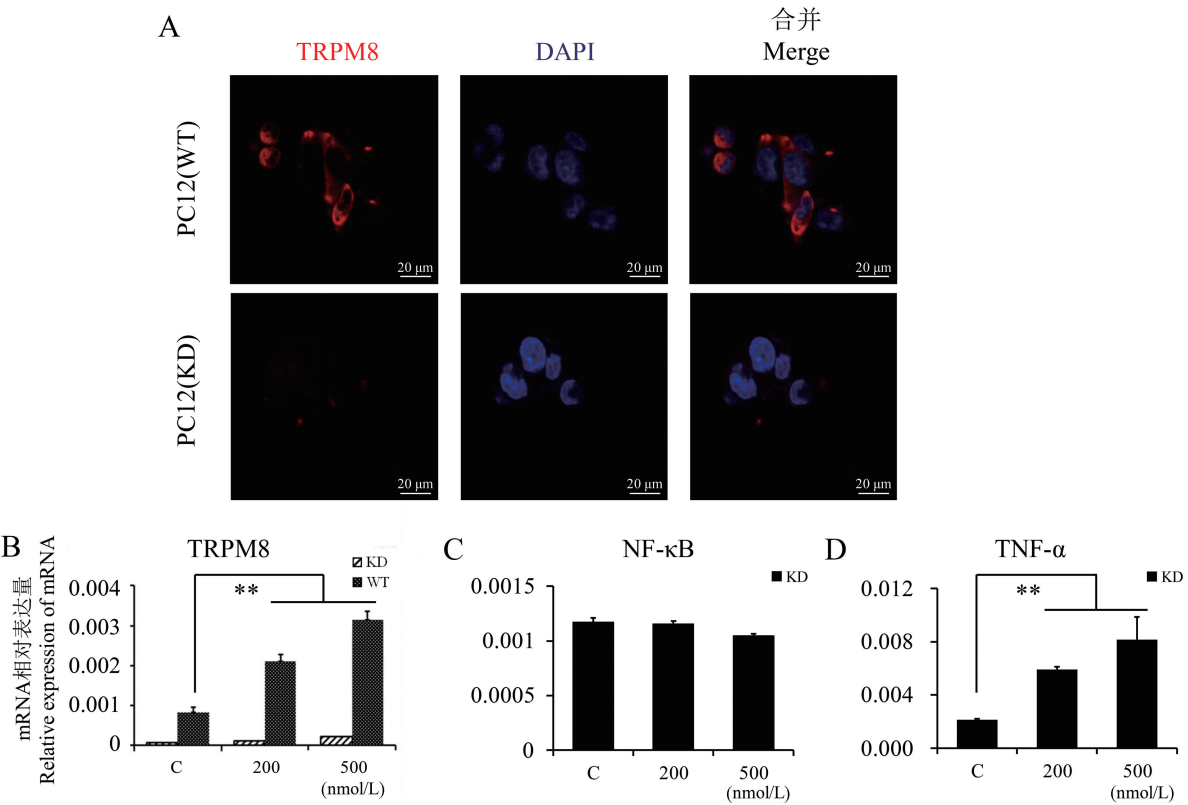


注: D、E:薄荷醇浓度 500 nmol/L。与对照组比较, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ 。

图 4 薄荷醇对基因表达的影响

Note. D/E, Menthol concentration, 500 nmol/L. Compared with control group, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ .

Figure 4 Effect of menthol on the gene expression



注: WT;野生型 PC12 细胞; KD;TRPM8 敲低的 PC12 细胞;C:对照组。与对照组比较, \*\*  $P<0.01$ 。

图 5 薄荷醇对 TRPM8 敲低细胞作用

Note. WT, Wild type PC12 cells. KD, PC12 cells with TRPM8 knockdown. C, Control group. Compared with control group, \*\*  $P<0.01$ .

Figure 5 Effect of menthol on TRPM8 knockdown cells

### 3 讨论

TRPM8 是一种重要的温度感受器受体,环境温度通过激活分布于外周神经系统的 TRPM8 受体,引起钙离子内流,进一步通过电兴奋将环境温度变化信息传递至中枢神经系统,产生相应温度变化的“冷感觉”。除了低温,TRPM8 受体还可以被薄荷醇及其类似物激活,同样通过电兴奋,产生“冷感觉”。已有的研究表明,在脑缺血、颅脑外伤、心脏骤停等疾病中,适当降低机体体温,有利于抑制炎症反应。长期以来,薄荷醇作为一种天然小分子药物因其抗炎镇痛的效应被广泛使用。同时,低温和薄荷醇都可以抑制炎症反应。因此,在本研究工作中,我们主要探讨了薄荷醇对炎症反应的抑制作用是否与其对冷敏感受体 TRPM8 的激活相关。

我们在体内实验(小鼠模型)和体外实验(PC12 细胞模型)中都发现,薄荷醇可以促进 TRPM8 的表达,抑制 NF- $\kappa$ B 和 TNF- $\alpha$  的表达。进一步,PC12 细胞中当 TRPM8 的表达降低,薄荷醇无法激活 TRPM8,进一步改变对 TNF- $\alpha$  表达的作用。这证实了薄荷醇对炎症因子的抑制作用依赖于其对 TRPM8 的激活作用。此外,在细胞模型中,我们还发现薄荷醇对 TRPM8 的激活包括两个层面:1)一方面,薄荷醇可以诱导 PC12 细胞产生钙内流现象,激活位于细胞膜的 TRPM8 作为膜受体的离子通道属性。2)分子层面,通过免疫荧光成像,可以直观的检测到 PC12 细胞胞浆中 TRPM8 蛋白表达水平被薄荷醇上调。分布于细胞膜表面和胞浆中的 TRPM8 蛋白具有不同的生物学特点,位于胞浆中的 TRPM8 蛋白可能作为信号分子,影响下游基因的转录表达<sup>[34]</sup>。

NF- $\kappa$ B 作为重要的核转录因子,广泛表达于哺乳动物组织细胞中,主要参与机体对外界刺激的响应,在免疫应答和炎症反应中具有重要作用。分布于胞浆的 NF- $\kappa$ B 与 I $\kappa$ B 结合形成无活性的二聚体,当受到细胞外信号激活时,I $\kappa$ B 激酶 IKK 被激活,I $\kappa$ B 降解后使 NF- $\kappa$ B 从 NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ Bs 复合物中解离,游离的 NF- $\kappa$ B 进入细胞核启动下游基因的转录表达<sup>[35-36]</sup>。在实验中我们发现,无论是在小鼠还是细胞模型中,薄荷醇对 NF- $\kappa$ B 和 TNF- $\alpha$  表达的调控具有相同趋势。薄荷醇可以激活胞浆中 TRPM8 的表达,位于胞浆中的 TRPM8 蛋白与 NF- $\kappa$ B 蛋白具有共同的空间,因此薄荷醇激活 TRPM8 对 TNF- $\alpha$  的

负调控作用可能有核转录因子 NF- $\kappa$ B 介导。综上所述,薄荷醇能够激活 TRPM8,并通过 TRPM8 影响了核转录因子 NF- $\kappa$ B 及其下游炎症因子 TNF- $\alpha$ 。该结果为薄荷醇抑制炎症反应可能的分子机制提供了一定的理论依据和思考方向,为薄荷醇的临床应用提供了研究基础。

### 参考文献:

- [1] 张侯侯. 薄荷、薄荷油与薄荷脑 [J]. 中国药学杂志, 1955, 3(7): 321-323.
- [2] Bastaki SM, Adeghate E, Amir N, et al. Menthol inhibits oxidative stress and inflammation in acetic acid-induced colitis in rat colonic mucosa [J]. Am J Transl Res, 2018, 10(12): 4210-4222.
- [3] Ghasemi-Pirbaluti M, Motaghi E, Bozorgi H. The effect of menthol on acute experimental colitis in rats [J]. Eur J Pharmacol, 2017, 805: 101-107.
- [4] Caceres AI, Liu B, Jabba SV, et al. Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8 channels mediate the anti-inflammatory effects of eucalyptol [J]. Br J Pharmacol, 2017, 174(9): 867-879.
- [5] Shahid M, Lee MY, Yeon A, et al. Menthol, a unique urinary volatile compound, is associated with chronic inflammation in interstitial cystitis [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 10859.
- [6] Ebi-hara S, Izukura H, Miyagi M, et al. Chemical senses affecting cough and swallowing [J]. Curr Pharm Des, 2016, 22(15): 2285-2289.
- [7] Pergolizzi JV Jr, Taylor R Jr, LeQuang JA, et al. The role and mechanism of action of menthol in topical analgesic products [J]. J Clin Pharm Ther, 2018, 43(3): 313-319.
- [8] Palkar R, Ongun S, Catich E, et al. Cooling relief of acute and chronic itch requires TRPM8 channels and neurons [J]. J Invest Dermatol, 2018, 138(6): 1391-1399.
- [9] Freires IA, Denny C, Benso B, et al. Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: a systematic review [J]. Molecules, 2015, 20(4): 7329-7358.
- [10] 蒋凤荣, 黄玉芳, 张爱华, 等. 薄荷醇对大鼠全脑缺血-再灌注模型脑组织凋亡基因的表达 [J]. 现代中药研究与实践, 2005, 19(4): 38-40.
- [11] Kamatou GP, Vermaak I, Viljoen AM, et al. Menthol: a simple monoterpene with remarkable biological properties [J]. Phytochemistry, 2013, 96: 15-25.
- [12] Silva H. Current knowledge on the vascular effects of menthol [J]. Front Physiol, 2020, 11: 298.
- [13] 陈晨, 刘兆国, 汪思亮, 等. 薄荷醇及其受体 TRPM8 与肿瘤关系研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(3): 312-314.
- [14] 陶兴魁, 张兴桃, 王海潮, 等. 薄荷醇对肝癌 HepG2 细胞增殖、迁移及 IL-8, CXCL-12, VEGF 表达的影响 [J]. 中国实验

- 方剂学杂志, 2019, 25(21): 60-65.
- [15] Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, et al. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold [J]. *Nature*, 2007, 448(7150): 204-208.
  - [16] Dhaka A, Murray AN, Mathur J, et al. TRPM8 is required for cold sensation in mice [J]. *Neuron*, 2007, 54(3): 371-378.
  - [17] Bharate SS, Bharate SB. Modulation of thermoreceptor TRPM8 by cooling compounds [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2012, 3(4): 248-267.
  - [18] DeFalco J, Duncion MA, Emerling D. TRPM8 biology and medicinal chemistry [J]. *Curr Top Med Chem*, 2011, 11(17): 2237-2252.
  - [19] Ulrich M, Wissenbach U, Thiel G. The super-cooling compound icilin stimulates c-Fos and Egr-1 expression and activity involving TRPM8 channel activation,  $\text{Ca}^{2+}$  ion influx and activation of the ternary complex factor Elk-1 [J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 177: 113936.
  - [20] Yin Y, Wu M, Zubcevic L, et al. Structure of the cold- and menthol-sensing ion channel TRPM8 [J]. *Science*, 2018, 359(6372): 237-241.
  - [21] Attwells S, Setiawan E, Wilson AA, et al. Inflammation in the neurocircuitry of obsessive-compulsive disorder [J]. *JAMA Psychiatry*, 2017, 74(8): 833-840.
  - [22] Spangenberg EE, Lee RJ, Najafi AR, et al. Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid-beta pathology [J]. *Brain*, 2016, 139(4): 1265-1681.
  - [23] Taylor RA, Chang CF, Goods BA, et al. TGF- $\beta$  modulates microglial phenotype and promotes recovery after intracerebral hemorrhage [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(1): 280-292.
  - [24] Kumar A, Stoica BA, Loane DJ, et al. Microglial-derived microparticles mediate neuroinflammation after traumatic brain injury [J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 47.
  - [25] Ramachandran R, Hyun E, Zhao L, et al. TRPM8 activation attenuates inflammatory responses in mouse models of colitis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(18): 7476-7481.
  - [26] Juergens UR, Stöber M, Vetter H. The anti-inflammatory activity of L-menthol compared to mint oil in human monocytes in vitro: a novel perspective for its therapeutic use in inflammatory diseases [J]. *Eur J Med Res*, 1998, 3(12): 539-545.
  - [27] Chamorro Á, Dirnagl U, Urrea X, et al. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation [J]. *Lancet Neurol*, 2016, 15(8): 869-881.
  - [28] Ewanchuk BW, Allan ERO, Warren AL, et al. The cooling compound icilin attenuates autoimmune neuroinflammation through modulation of the T-cell response [J]. *FASEB J*, 2018, 32(3): 1236-1249.
  - [29] Zhao C, Sun J, Fang C, et al. 1,8-cineol attenuates LPS-induced acute pulmonary inflammation in mice [J]. *Inflammation*, 2014, 37(2): 566-572.
  - [30] Das KP, Freudenrich TM, Mundy WR. Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2004, 26(3): 397-406.
  - [31] Teng KK, Angelastro JM, Cunningham ME, et al. Chapter 21-cultured PC12 cells: A model for neuronal function, differentiation, and survival [J]. *Cell Biology*, 2006, 21: 171-176.
  - [32] Wiatrak B, Kubis-Kubiak A, Piwowar A, et al. PC12 cell line: cell types, coating of culture vessels, differentiation and other culture conditions [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 958.
  - [33] Fontaine-Lenoir V, Chambraud B, Fellous A, et al. Microtubule-associated protein 2 (MAP2) is a neurosteroid receptor [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(12): 4711-4716.
  - [34] Wang XP, Yu X, Yan XJ, et al. TRPM8 in the negative regulation of TNF $\alpha$  expression during cold stress [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 45155.
  - [35] Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives [J]. *Oncogene*, 2006, 25(51): 6680-6684.
  - [36] Oh H, Ghosh S. NF- $\kappa$ B: roles and regulation in different CD4<sup>+</sup> T-cell subsets [J]. *Immunol Rev*, 2013, 252(1): 41-51.

[收稿日期]2020-10-28