

哈巴俄昔通过抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路减轻神经炎症诱导的神经元损伤

郝任娟¹, 胡颖超², 于顾然², 秦秀德³, 陆韵薇^{3*}

1. 广东省中医院, 广东 广州 510030

2. 南京中医药大学附属医院, 江苏 南京 210029

3. 深圳市中医院, 广东 深圳 518000

摘要:目的 研究哈巴俄昔对神经炎症诱导神经元损伤的作用。方法 采用 MTT 检测血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 和哈巴俄昔对小鼠小胶质 BV2 细胞活性的影响; 观察 BV2 细胞的形态变化; 检测细胞上清液中炎症因子水平; 采用免疫荧光检测核因子- κ B p65 (nuclear factor- κ B p65, NF- κ B p65) 核易位以及 CD86、髓系细胞触发受体 2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2, TREM2) 的表达; 采用 Western blotting 检测 Toll 样受体 4 (Toll like receptor 4, TLR4)、髓样分化因子 88 (molecule myeloid differentiation factor 88, MyD88)、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 蛋白表达。分别使用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 和 TLR4 抑制剂 (TAK-242) 进一步验证哈巴俄昔的作用机制。建立 BV2-HT22 细胞共培养模型, 检测线粒体膜电位、细胞凋亡情况以及凋亡相关蛋白表达, 研究哈巴俄昔对神经炎症引起的神经元损伤的影响。结果 Ang II 显著上调 BV2 细胞 TLR4、MyD88、IL-1 β 、TNF- α 和 iNOS 蛋白表达 ($P < 0.01$ 、 0.001), 促进 NF- κ B p65 入核 ($P < 0.001$), 调节小胶质细胞表面炎症标志物 CD86 和 TREM2 的表达 ($P < 0.05$)。哈巴俄昔和 TAK-242 可逆转 Ang II 或 LPS 诱导的 BV2 细胞的作用 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。此外, 哈巴俄昔可显著下调 BV2-HT22 共培养模型 HT22 细胞中凋亡相关蛋白的表达 ($P < 0.01$ 、 0.001), 抑制 HT22 细胞凋亡 ($P < 0.05$ 、 0.001)。结论 哈巴俄昔可能通过抑制 Ang II 诱导的 BV2 细胞 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路的激活来减轻炎症反应, 进而缓解炎症引起的神经元细胞的凋亡。

关键词: 哈巴俄昔; 血管紧张素 II; 神经炎症; 凋亡; 共培养

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)13-4202-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.13.013

Harpagoside alleviates neuronal damage caused by neuroinflammation via suppressing TLR4/MyD88/NF- κ B pathway

HAO Ren-juan¹, HU Ying-chao², YU Gu-ran², QIN Xiu-de³, LU Yun-wei³

1. Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510030, China

2. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

3. Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen 518000, China

Abstract: Objective To study the effect of harpagoside on neuron injury induced by neuroinflammation. **Methods** The effects of angiotensin II (Ang II) and harpagoside on viability of mouse microglia BV2 cells were detected by MTT assay; The morphological changes of BV2 cells was observed; The levels of inflammatory factors in cell supernatant were detected; The nuclear translocation of nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65) and expressions of CD86 and triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) in myeloid cells were detected by immunofluorescence; Toll like receptor 4 (TLR4) and myeloid differentiation factor 88 (MyD88), inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) protein expressions were detected by Western blotting. Lipopolysaccharide (LPS) and TLR4 inhibitor (TAK-242) were used to further verify the mechanism of harpagoside. The co-

收稿日期: 2023-01-03

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFC3501403); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK20191506); 深圳市“医疗卫生三名工程”项目 (SZZYSM202111011)

作者简介: 郝任娟 (1996—), 硕士研究生, 主要从事神经系统疾病的中医药研究。E-mail: 1320597106@qq.com

*通信作者: 陆韵薇 (1990—), 主治医师, 博士, 主要从事神经系统疾病的中医药研究。E-mail: 417213243@qq.com

culture model of BV2-HT22 cells was established, mitochondrial membrane potential, apoptosis and expressions of apoptosis-related proteins were detected to study the effect of harpagoside on neuronal damage caused by neuroinflammation. **Results** Ang II significantly increased the protein expressions of TLR4, MyD88, IL-1 β , TNF- α and iNOS in BV2 cells ($P < 0.01, 0.001$), promoted the nucleation of NF- κ B p65 ($P < 0.001$), and regulated the expressions of inflammatory markers CD86 and TREM2 on the surface of microglia ($P < 0.05$). Harpagoside and TAK-242 could reverse the effects of Ang II or LPS on BV2 cells ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). In addition, harpagoside could significantly down-regulate the expressions of apoptosis-related proteins in HT22 cells of BV2-HT22 co-culture model ($P < 0.01, 0.001$), and inhibit the apoptosis of HT22 cells ($P < 0.05, 0.001$). **Conclusion** Harpagoside may alleviate the inflammatory response by inhibiting the activation of TLR4/MyD88/ NF- κ B pathway in BV2 cells induced by Ang II, thus alleviating the apoptosis of neurons caused by inflammation.

Key words: harpagoside; angiotensin II; neuroinflammation; apoptosis; co-culture

高血压为脑小血管病最常见的发病原因, 研究表明血压的过度波动会对大脑产生影响, 与认知障碍、中风及痴呆的发生有关^[1-2]。血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 可引起高血压的发生, 可与体内的肾素血管紧张素 (renin angiotensin system, RAS) 效应系统结合并引起慢性激活, 导致机体多个系统的血管和组织炎症和稳态失衡^[3-4]。Ang II 可以诱导脑中小胶质细胞的激活, 导致神经系统炎症以及认知损伤^[4]。完整的血脑屏障可阻止 Ang II 入脑, 而持续的高血压可以增加血脑屏障的通透性, 引起 Ang II 持续入脑以及病理反应的发生^[5]。

炎症反应是一把“双刃剑”, 适量的炎症因子可以通过清除有害物质发挥保护作用, 而其过度释放则会破坏细胞和组织的稳态。许多研究表明, 小胶质细胞可维持神经系统稳态^[6-8], 参与大脑中的炎症反应^[9]。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 可激活小胶质细胞并促进脑中炎症因子等有害物质的产生, 导致神经元损伤^[10]。Toll 样受体 (Toll like receptors, TLRs) 作为模式识别受体可被小胶质细胞识别^[11-12], 其主要在神经系统中的星形胶质细胞和小胶质细胞中表达, 与炎症反应调控有关^[13-14]。TLR4 在小胶质细胞中高表达, 用于监测炎症反应^[11]。研究证明 TLR4 通路已成为 Ang II 诱导小胶质细胞活化及细胞炎症因子产生的潜在作用机制^[15]。核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 位于 TLR4 信号通路的下游, 可介导多种炎症过程^[16]。TLR4 可以招募下游信号分子髓样分化因子 88 (molecule myeloid differentiation factor 88, MyD88), 促进 NF- κ B 入核, 诱导白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、一氧化氮合酶等炎性介质的释放^[12,17-18]。

哈巴俄昔为环烯醚萜类化合物, 是玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. 的主要活性成分, 可

用于治疗类风湿关节炎、骨质疏松、糖尿病、神经退行性疾病等多种疾病^[19-20]。课题组前期已证明哈巴俄昔可通过抑制氧化损伤, 上调 bEnd.3 细胞连接蛋白以减轻 Ang II 诱导的血脑屏障损伤^[21], 尚未发现哈巴俄昔对 Ang II 诱导的小胶质细胞活化及神经元损伤的研究。本研究以 Ang II 处理小鼠小胶质 BV2 细胞并构建 BV2-小鼠海马神经元 HT22 细胞共培养细胞模型, 探讨哈巴俄昔的抗炎作用及神经保护作用, 并进一步研究其相关机制。

1 材料

1.1 细胞

BV2 细胞购自 CoBioer Biosciences 生物; HT22 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 药品与试剂

哈巴俄昔 (批号 MUST-19082120, 质量分数 $\geq 98\%$) 购自成都曼斯特生物有限公司, 溶于 PBS 配制浓度 8 mmol/L 于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存; Ang II (质量分数 $\geq 93\%$, 批号 HY-13948)、LPS (批号 HY-D1056)、TLR4 抑制剂 TAK-242 (批号 HY-11109) 购自 MCE 公司; 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 67-68-5)、MTT (批号 298-93-1) 购自美国 Sigma 公司; IL-1 β ELISA 试剂盒 (批号 88-7013)、TNF- α ELISA 试剂盒 (批号 88-7324)、FITC-CD86 单克隆抗体 (批号 11-0862-82) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; NO 试剂盒 (批号 S0021S)、JC-1 荧光探针 (批号 C2003S) 购自上海碧云天生物; Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒 (批号 A211-01/02)、TUNEL 染色 (批号 A113-01/02/03) 购自南京诺唯赞生物公司; 鬼笔环肽 (批号 CA1610) 购自北京索莱宝生物公司; DMEM-F12 培养基 (批号 31331093)、DMEM 培养基 (批号 11965092)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 批号 10091) 购自美国 Gibco 公司; TLR4 抗体 (批号 66350-1-Ig)、MyD88 抗体 (批号 66660-1-Ig)、诱导型一氧

化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)抗体(批号 18985-1-AP)、TNF- α 抗体(批号 17590-1-AP)、Caspase-3 抗体(批号 19677-1-AP)、B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体(批号 12789-1-AP)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)抗体(批号 50599-2-Ig)、NF- κ B p65 抗体(批号 10745-1-AP)、髓样细胞触发受体 2(triggering receptor expressed on myeloid cell 2, TREM2)抗体(批号 13483-1-AP)、离子钙结合适配器分子-1(ionized calcium binding adapter molecule-1, Iba-1)抗体(批号 10904-1-ap)、 β -actin 抗体(批号 66009-1-Ig)、CoraLite488-conjugated 羊抗兔/鼠 IgG 抗体(批号 SA00013-2)购自 Proteintech 公司; IL-1 β 抗体(批号 31202S)、Caspase-8 抗体(批号 4790)、Caspase-9 抗体(批号 9508)、细胞色素 C(cytochrome C, Cyt C)抗体(批号 11940)购自美国 CST 公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(批号 ZB-2301)、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体(批号 ZB-2305)购自北京中杉金桥生物。

1.3 仪器

1300A2 型生物安全柜、HERA cell 1501 型 CO₂ 细胞培养箱、Heraeus Fresco21 离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); CKX41 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司); ELX800 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司); 电泳仪及转膜仪(北京六一仪器厂); CHEMIDOC XRS+凝胶系统成像仪(美国 Bio-Rad 公司); FACSCelesta 型分析型流式细胞仪(美国 BD 公司); DS-Qi2 型正置荧光显微镜(日本 Nikon 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

BV2 细胞用含 10% FBS 的 DMEM-F12 培养基, HT22 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 于 37 °C 的培养箱中培养, 每 1~2 天换液, 当细胞生长至 80%密度时, 用于后续实验。

2.2 MTT 法检测细胞活性

BV2 细胞以 5×10^3 /孔接种于 96 孔板中, 培养 24 h, 之后加入不同浓度的 Ang II (0、0.001、0.01、0.1、1 μ mol/L) 或哈巴俄苷 (0、0.1、1、10、50、75、100、150、200、300 μ mol/L), 以加入 DMSO 作为空白, 继续培养 24 h。加入 10 μ L MTT 溶液, 于 37 °C 的细胞培养箱中培养 4 h, 加入 DMSO 充分震荡 10 min, 采用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度(A)值, 计算细胞存活率。

细胞存活率 = $(A_{\text{实验}} - A_{\text{调零}}) / (A_{\text{空白}} - A_{\text{调零}})$

2.3 Ang II 诱导 BV2 细胞炎症反应的剂量筛选

BV2 细胞以 5×10^5 /孔接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后, 加入不同浓度 (0、0.001、0.01、0.1、1 μ mol/L) 的 Ang II 处理 24 h。收集细胞, 用预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次, 加入裂解液, 冰上裂解细胞 20~30 min, 收集细胞液, 超声 3 次, 每次 15 s, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 取上清液为细胞总蛋白。用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度, 加入上样缓冲液, 100 °C 加热 10 min 使蛋白变性。蛋白样品经 10%~12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂牛奶室温封闭 60 min, 分别加入 TLR4、MyD88、iNOS、TNF- α 、IL-1 β 和 β -actin 抗体, 4 °C 孵育过夜; TBST 洗涤 3 次, 加入二抗, 室温孵育 60 min; TBST 洗涤 3 次, 加入 ECL 化学发光试剂显影, 采用 Image Lab 软件分析条带灰度。

2.4 鬼笔环肽染色检测哈巴俄苷对 Ang II 诱导的 BV2 细胞形态变化的影响

罗丹明标记的鬼笔环肽可以特异地与真核细胞中的肌动蛋白结合, 从而表示细胞骨架分布。BV2 细胞接种于含细胞爬片的 12 孔板中, 培养 24 h 后加入 0、50、75、100 μ mol/L 的哈巴俄苷预保护处理, 2 h 后加入 0.1 μ mol/L Ang II 处理 24 h。弃去培养基, PBS 洗涤细胞 2 次, 4% 多聚甲醛室温固定 20 min, 0.5% Triton X-100 室温通透 20 min, 鬼笔环肽避光孵育 30 min, DAPI 染色 3 min, 细胞封片后, 正置荧光显微镜下观察。

2.5 ELISA 和 Griess 法检测哈巴俄苷对 Ang II 诱导的 BV2 细胞上清液中炎症因子水平的影响

BV2 细胞以 5×10^5 /孔接种于 6 孔板中, 培养 24 h, 加入 0、50、75、100 μ mol/L 的哈巴俄苷或 TAK-242 (1 μ mol/L) 预保护处理 2 h, 之后加入 0.1 μ mol/L Ang II 处理 24 h。离心收集上清, 按照 ELISA 试剂盒说明书测定细胞上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 水平, 通过 Griess 法检测上清液中 NO 含量。

2.6 Western blotting 检测哈巴俄苷对 BV2 细胞 TLR4/MyD88 通路蛋白表达的影响

BV2 细胞以 5×10^5 /孔接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后, 加入 0、50、75、100 μ mol/L 的哈巴俄苷或 TAK-242 (1 μ mol/L) 预保护处理 2 h, 之后加入 0.1 μ mol/L Ang II 或 1 mg/mL LPS 处理 24 h。收集细胞, 按“2.3”项下方法检测 TLR4、MyD88、iNOS、TNF- α 、IL-1 β 蛋白表达。

2.7 免疫荧光染色检测哈巴俄苷对 BV2 细胞 NF- κ B p65、TREM2 和 Iba-1 蛋白表达的影响

BV2 细胞以 1×10^4 /孔接种于 12 孔板中, 培养 24 h, 加入 0、100 $\mu\text{mol/L}$ 的哈巴俄苷或 TAK-242 (1 $\mu\text{mol/L}$) 预保护处理 2 h, 之后加入 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Ang II 或 1 mg/mL LPS 处理 24 h。PBS 洗涤后, 4% 多聚甲醛室温固定 20 min, 0.3% Triton X-100 室温通透 20 min, 加入免疫荧光染色封闭液, 于摇床上室温封闭 60 min; 滴加 NF- κ B p65 (1:500)、TREM2 (1:500)、Iba-1 (1:500) 抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; PBST 洗涤 3 次, 滴加荧光二抗, 室温避光孵育 60 min, PBST 洗涤 3 次, DAPI 染色 10 min, PBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 扣片并用指甲油封片, 于正置荧光显微镜下拍照。

2.8 BV2-HT22 共培养模型构建

先单独培养 BV2 细胞, 用不同浓度的哈巴俄苷处理 BV2 细胞 2 h, 之后加入 Ang II 进一步刺激。同时单独培养 HT22 细胞于 Transwell 小室下层, Ang II 刺激 BV2 细胞 24 h 后收集 BV2 细胞置于 Transwell 小室上层, 与 HT22 细胞共培养 24 h, 之后用于后续实验。

2.9 MTT 法检测哈巴俄苷对共培养模型 HT22 细胞活性的影响

BV2-HT22 细胞共培养体系加入 50、75、100 $\mu\text{mol/L}$ 哈巴俄苷或 TAK-242 (1 $\mu\text{mol/L}$), 加入 10 μL MTT 溶液, 按“2.2”项下方法测定细胞活性。

2.10 JC-1 染色检测 BV2-HT22 共培养模型线粒体膜电位变化

JC-1 探针用于检测细胞线粒体膜电位的变化。JC-1 聚集在正常细胞的线粒体中, 激发出红色荧光, 而当线粒体膜电位去极化时, JC-1 以绿色单体的形式存在。一般情况下, 绿色荧光的增加和红色荧光的减少表明细胞凋亡^[22-23]。BV2-HT22 细胞共培养体系加入 50、75、100 $\mu\text{mol/L}$ 哈巴俄苷或 TAK-242 (1 $\mu\text{mol/L}$), 加入 JC-1 工作液, 于细胞培养箱中避光孵育 30 min。PBS 洗涤 3 次后, 于正置荧光显微镜下观察 JC-1 单体及聚集物的相对变化。采用 Image J 软件进行分析。

2.11 TUNEL 染色检测共培养模型细胞凋亡情况

BV2-HT22 细胞共培养体系加入 100 $\mu\text{mol/L}$ 哈巴俄苷或 TAK-242 (1 $\mu\text{mol/L}$), 用 4% 多聚甲醛室温固定细胞, 3% TritonX-100 室温通透细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 与 TUNEL 染色液反应 60 min, 然后室温下与 DAPI

染色 10 min, PBS 洗涤 3 次后, 于正置荧光显微镜下观察。细胞核中红色荧光的增加表明细胞凋亡。

2.12 Annexin V-FITC/PI 染色检测共培养模型细胞凋亡情况

BV2-HT22 细胞共培养体系加入 100 $\mu\text{mol/L}$ 哈巴俄苷或 TAK-242 (1 $\mu\text{mol/L}$), 用不含 EDTA 的胰酶消化并收集细胞, 预冷的 PBS 洗细胞 3 次, 然后用 Binding buffer 对细胞进行重悬, 分别用 Annexin V-FITC 和 PI 染色液对细胞进行染色, 室温避光孵育 10 min, 加入 400 μL Binding buffer。用 BD 流式细胞分选仪进行检测, 采用 FlowJo 软件分析数据。

2.13 Western blotting 检测共培养模型细胞凋亡相关蛋白表达

BV2-HT22 细胞共培养体系加入 100 $\mu\text{mol/L}$ 哈巴俄苷或 TAK-242 (1 $\mu\text{mol/L}$), 收集细胞, 按“2.3”项下方法提取蛋白, 并检测 Caspase-3、Bax、Bcl-2、Caspase-8、Caspase-9、Cyt C 蛋白表达。

2.14 统计学分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 SPSS 23.0 和 GraphPad Prism8.0 进行统计分析。数据统计满足正态性, 多组间比较使用单因素方差分析, 对于事后检验, 方差齐性使用 Tukey 检验, 方差不齐性则使用 Dunnett's T3 检验。

3 结果

3.1 Ang II 和哈巴俄苷对 BV2 细胞活性的影响

如图 1 所示, 不同浓度 (0.001、0.01、0.1、1 $\mu\text{mol/L}$) 的 Ang II 对 BV2 细胞活性无显著影响。如图 2 所示, 0~300 $\mu\text{mol/L}$ 的哈巴俄苷对 BV2 细胞活性也无显著影响, 因此选择 50、75、100 $\mu\text{mol/L}$ 的哈巴俄苷进行后续实验。

3.2 Ang II 对 BV2 细胞 TLR4/MyD88 通路蛋白表达的影响

为了确定 Ang II 诱导炎症反应的最佳浓度, 采用 Western blotting 检测不同浓度的 Ang II 对 BV2

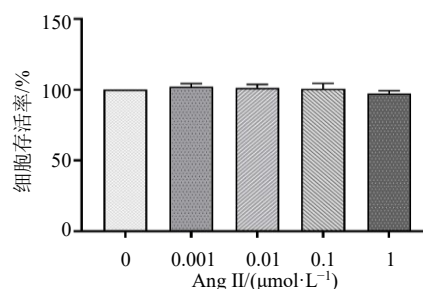


图 1 Ang II 对 BV2 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Effect of Ang II on viability of BV2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

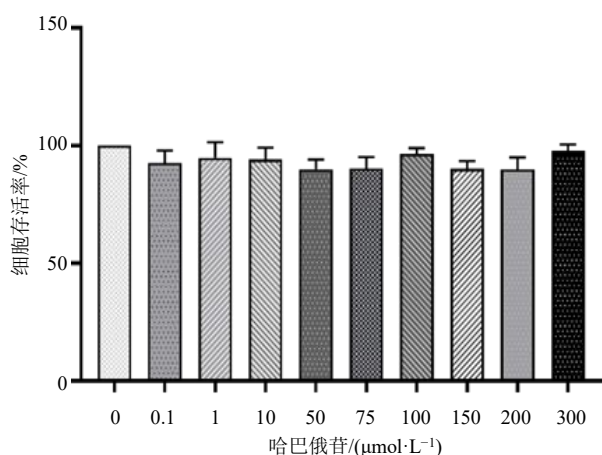
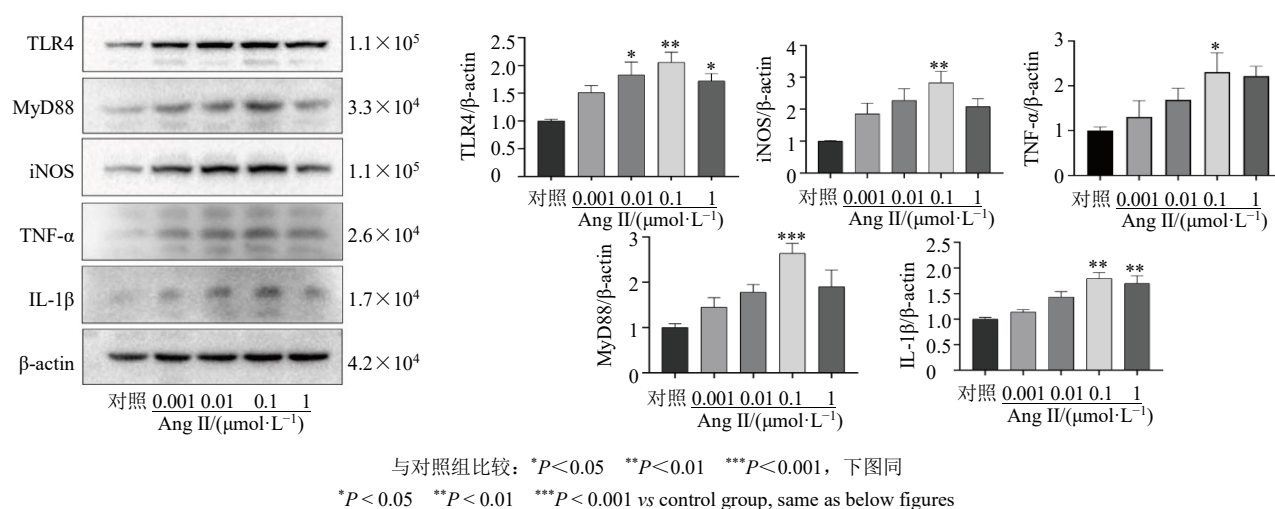


图 2 哈巴俄苷对 BV2 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of harpagoside on viability of BV2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as below figures

图 3 Ang II 对 BV2 细胞 TLR4/MyD88 通路蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Effect of Ang II on expressions of TLR4/MyD88 pathway protein in BV2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

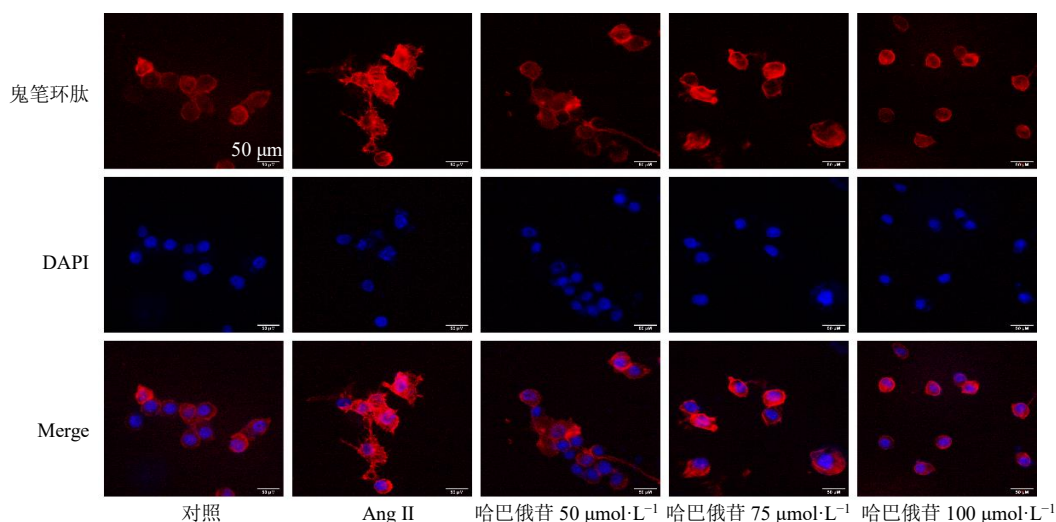


图 4 哈巴俄苷对 Ang II 诱导的 BV2 细胞形态变化的影响 ($\times 200$)

Fig. 4 Effect of harpagoside on morphological changes of Ang II-induced BV2 cells ($\times 200$)

细胞 TLR4/MyD88 通路蛋白表达的影响, 如图 3 所示, Ang II 能够剂量相关性地诱导 BV2 细胞产生炎症反应, 随着浓度增加, TLR4、MyD88 及炎症相关蛋白 IL-1 β 、TNF- α 、iNOS 的表达逐渐升高, 以 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Ang II 组的表达量最高 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。由于 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Ang II 对 BV2 细胞活力无损伤, 且具有最明显的促炎作用, 因此选择 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Ang II 作为后续模型诱导浓度。

3.3 哈巴俄苷对 Ang II 诱导的 BV2 细胞形态变化的影响

如图 4 所示, Ang II 可以诱导 BV2 细胞形态改变, 表现为阿米巴样形态; 而哈巴俄苷可以抑制 BV2 细胞形态的变化, 表明其可以抑制细胞的活化, 并呈剂量相关性。

3.4 哈巴俄苷对 Ang II 诱导的 BV2 细胞上清液中炎症因子水平的影响

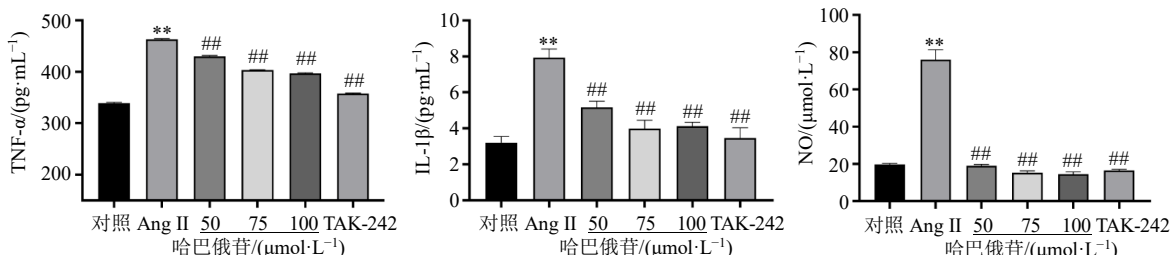
如图 5 所示, 与对照组比较, Ang II 显著诱导细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 的分泌 ($P < 0.01$), 促进 NO 的生成 ($P < 0.01$), 而哈巴俄苷的干预可以减少上述炎症相关产物的合成 ($P < 0.01$), TLR4 通路抑制剂 TAK-242 也表现出与哈巴俄苷相似的保护作用。

3.5 哈巴俄苷对 BV2 细胞 TLR4/MyD88 通路蛋白表达的影响

如图 6 所示, 75、100 $\mu\text{mol/L}$ 的哈巴俄苷显著

抑制 Ang II 诱导的 BV2 细胞中 TLR4、MyD88、iNOS、TNF- α 和 IL-1 β 表达 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。

为了进一步验证哈巴俄苷对 TLR4/MyD88 通路的作用, 以小胶质细胞中 TLR4 激动剂 LPS (1 mg/mL) [18] 以及 TLR4 通路抑制剂 TAK-242 (1 $\mu\text{mol/L}$) [24] 处理细胞, 如图 7、8 所示, 结果显示 100 $\mu\text{mol/L}$ 的哈巴俄苷可以显著抑制 LPS 诱导的 TLR4/MyD88 通路的激活及炎症产物的释放 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 与 TAK-242 表现出相似的作用。此外, 对于 Ang II 诱导的 BV2 细胞, 哈巴俄苷和 TAK-242 均表现出相似的保护作用。



与模型组 (Ang II 或 LPS) 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下同
$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group (Ang II or LPS), same as below figures

图 5 哈巴俄苷对 Ang II 诱导的 BV2 细胞上清液中炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 5 Effect of harpagoside on levels of inflammatory factors in supernatant of Ang II-induced BV2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

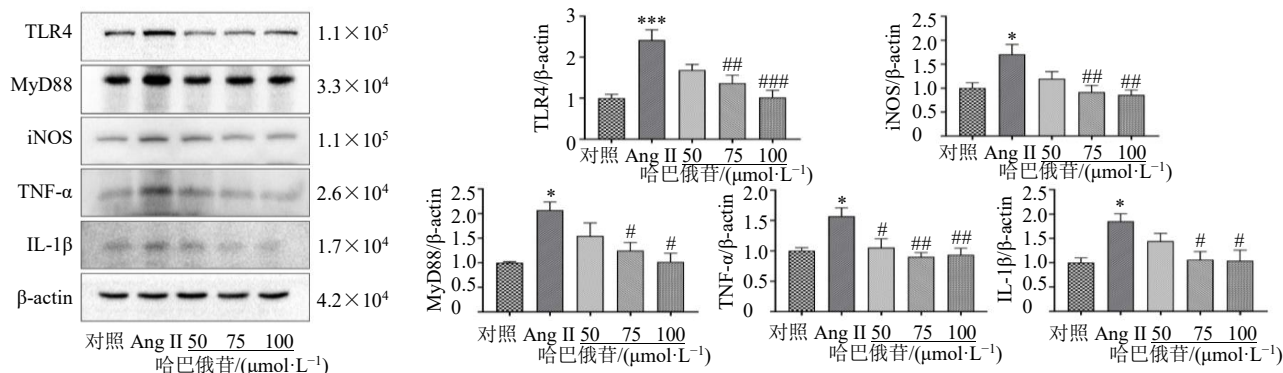


图 6 哈巴俄苷对 Ang II 诱导的 BV2 细胞 TLR4/MyD88 通路蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 Effect of harpagoside on TLR4/MyD88 pathway protein expressions in Ang II-induced BV2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

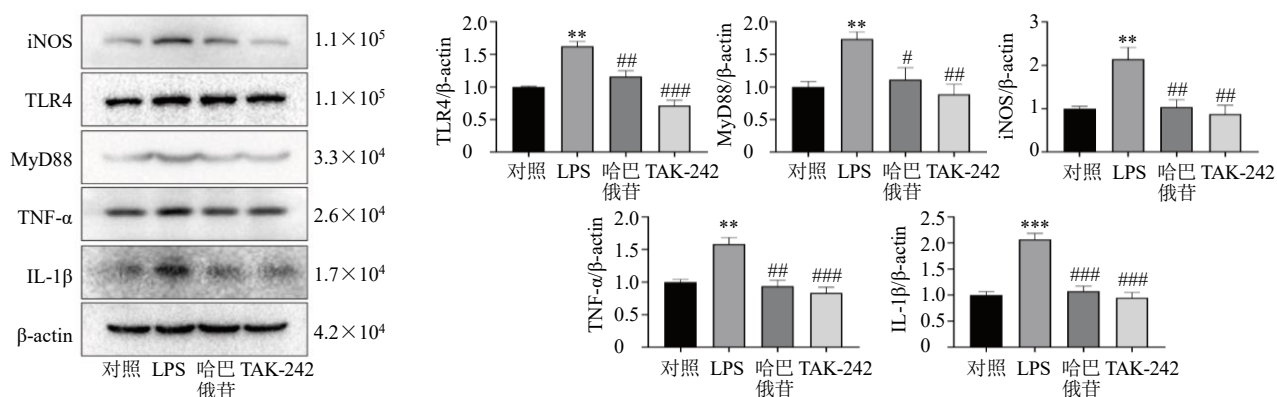


图 7 哈巴俄苷对 LPS 诱导的 BV2 细胞 TLR4/MyD88 通路蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 7 Effect of harpagoside on expressions of TLR4/MyD88 pathway protein in LPS-induced BV2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

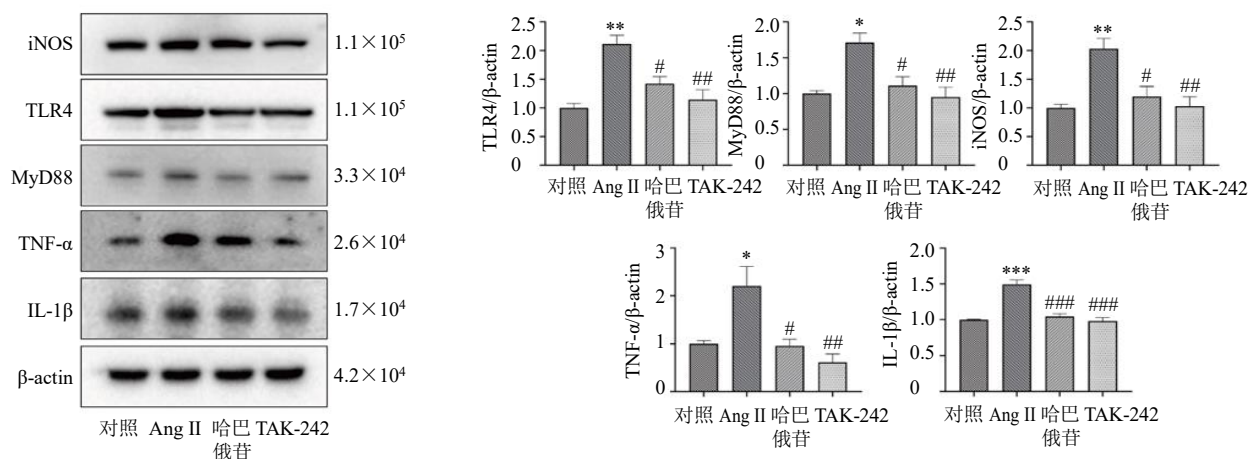


图 8 哈巴俄昔和 TAK-242 对 Ang II 诱导的 BV2 细胞 TLR4/MyD88 通路蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effects of harpagoside and TAK-242 on expressions of TLR4/MyD88 pathway protein in Ang II-induced BV2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.6 哈巴俄昔对 NF-κB 入核的影响

NF-κB 是一种可被 MyD88 激活的核转录因子，其核异位的增加与炎症反应相关。通过 NF-κB p65 免疫荧光染色观察其核异位情况，进一步研究哈巴俄昔与 NF-κB 的关系。如图 9 所示，Ang II 和 LPS 均可诱导 NF-κB p65 的入核 ($P < 0.01$ 、 0.001)，而

哈巴俄昔的干预可以减少 NF-κB p65 核异位 ($P < 0.05$ 、 0.01)，发挥抗炎作用。表明哈巴俄昔可以通过减少 NF-κB p65 的入核进而抑制后续的炎症级联反应。因此，在 Ang II 诱导的 BV2 细胞中，哈巴俄昔可以通过抑制 TLR4/MyD88/NF-κB 通路发挥抗炎作用。

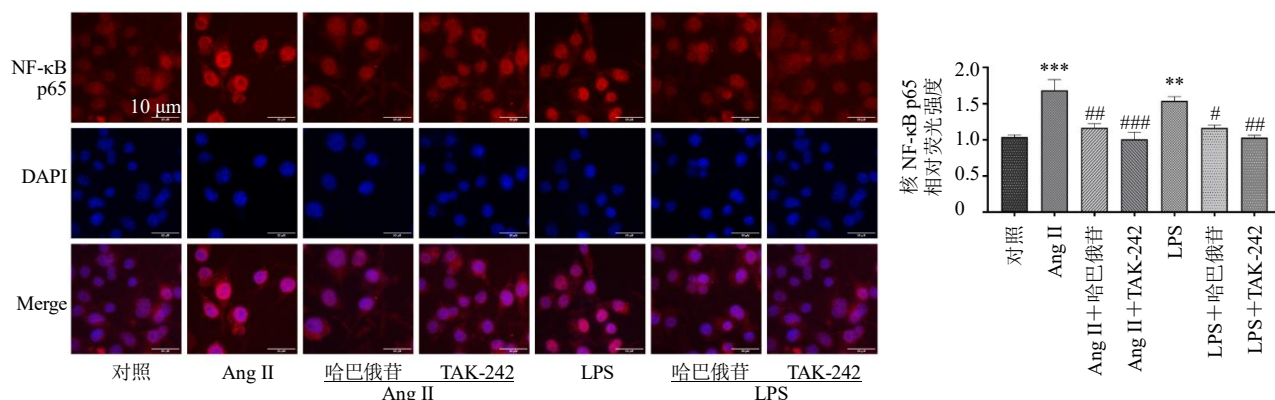


图 9 哈巴俄昔对 NF-κB p65 入核的影响 ($\times 400$; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effect of harpagoside on NF-κB p65 nuclear translocation ($\times 400$; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.7 哈巴俄昔对 BV2 细胞 CD86 和 TREM2 表达的影响

通过免疫荧光染色进一步观察了哈巴俄昔对小胶质细胞炎症标志物 CD86 和 TREM2 表达的影响。如图 10、11 所示，Ang II 可以诱导 CD86 的上调以及 TREM2 的下调 ($P < 0.05$)，而哈巴俄昔的作用相反，可以抑制 CD86 的表达并增加 TREM2 的表达 ($P < 0.01$)，表现出保护作用。此外，LPS 处理细胞可导致 CD86 的高表达以及 TREM2 的低表达 ($P < 0.001$)，哈巴俄昔同样表现出保护作用，抑制

剂 TAK-242 也具有相似的保护作用。

3.8 哈巴俄昔对 BV2-HT22 共培养模型中 HT22 活性的影响

前述实验证明哈巴俄昔可以抑制 Ang II 诱导的细胞炎症反应，接下来构建 BV2-HT22 共培养细胞模型观察 BV2 的活化对细胞的损伤作用以及哈巴俄昔的药理作用。通过 MTT 法检测共培养模型中 HT22 细胞的活性。如图 12 所示，Ang II 显著抑制共培养模型中 HT22 细胞的活性 ($P < 0.001$)，诱导细胞损伤；100 μmol/L 哈巴俄昔可以显著升高细胞

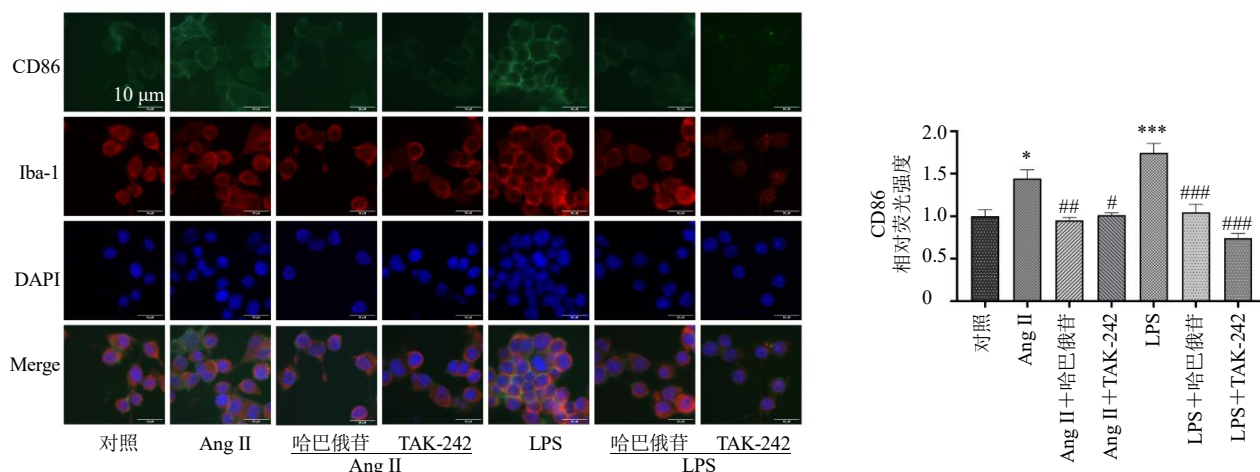


图 10 哈巴俄苷对 CD86 表达的影响 ($\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 10 Effect of harpagoside on CD86 expression ($\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

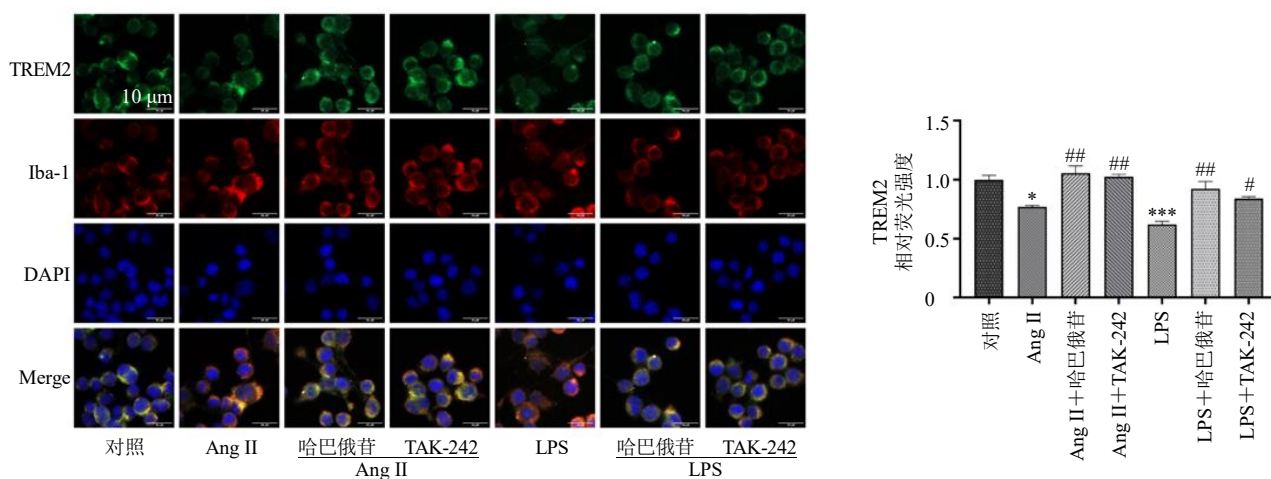


图 11 哈巴俄苷对 TREM2 表达的影响 ($\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 11 Effects of harpagoside on TREM2 expression ($\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

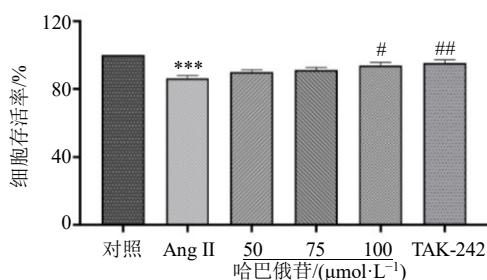


图 12 哈巴俄苷对共培养模型中 HT22 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 12 Effect of harpagoside on viability of HT22 cells in co-culture model ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

活力 ($P < 0.05$), 减轻 HT22 细胞的损伤。

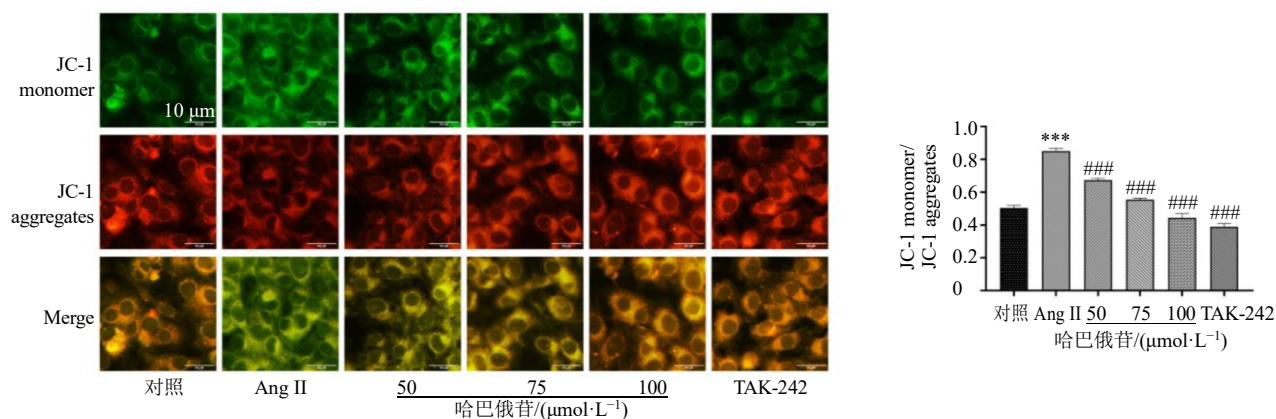
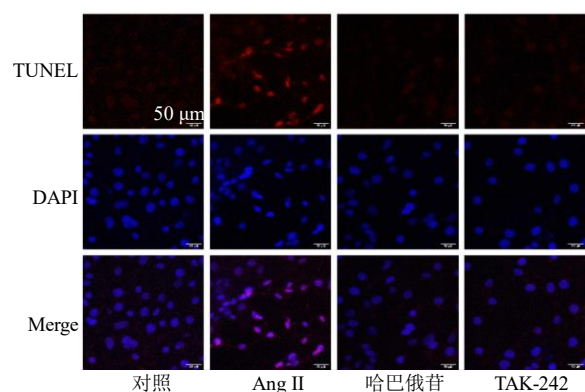
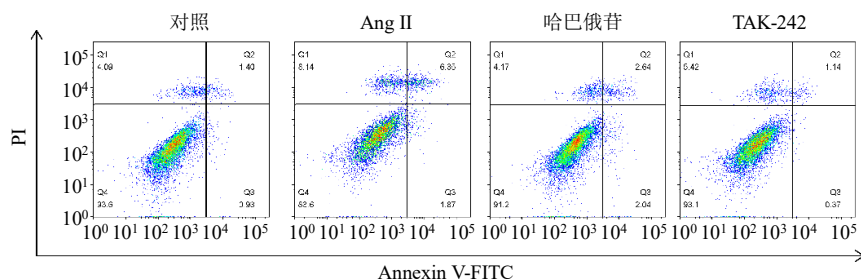
3.9 哈巴俄苷对共培养模型中 HT22 细胞凋亡的影响

使用 JC-1 探针检测线粒体膜电位的变化, 如图 13 所示, Ang II 可以增加绿色荧光及红色荧光的比

值 ($P < 0.001$), 而哈巴俄苷可以降低绿色荧光及红色荧光的比值 ($P < 0.001$), 增加线粒体膜电位, 减少细胞凋亡。TUNEL 染色结果 (图 14) 显示哈巴俄苷可以减轻 Ang II 诱导的细胞凋亡。细胞流式结果 (图 15) 也表明 Ang II 可明显增加凋亡细胞的数量 ($P < 0.01$), 而哈巴俄苷可以减少 Ang II 诱导的细胞凋亡 ($P < 0.05$)。

3.10 哈巴俄苷对共培养模型中 HT22 凋亡相关蛋白表达的影响

Caspases 家族可以调节细胞死亡。进一步分析共培养模型中 HT22 细胞凋亡相关蛋白的表达情况。如图 16 所示, Ang II 可明显增加 cleaved Caspase-3/Caspase-3、cleaved Caspase-8/Caspase-8、cleaved Caspase-9/Caspase-9、Bax/Bcl-2 及 Cyt C 表达 ($P < 0.01$ 、 0.001); 而用哈巴俄苷处理后, 上述凋亡相关

图 13 JC-1 探针检测线粒体膜电位变化 ($\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Fig. 13 Changes of mitochondrial membrane potential detected by JC-1 probe ($\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)图 14 TUNEL 染色检测细胞凋亡 ($\times 200$)Fig. 14 Apoptosis detected by TUNEL staining ($\times 200$)图 15 流式细胞术检测细胞凋亡 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Fig. 15 Apoptosis detected by flow cytometry ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

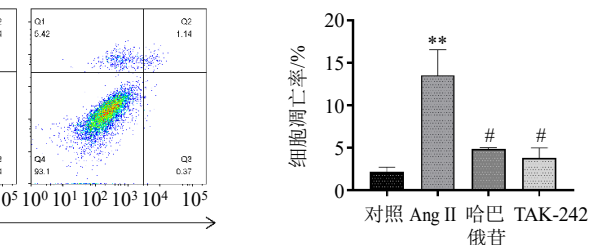
小胶质细胞的激活,保护神经元细胞免受炎症损伤,而这可能是通过调控 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路来实现的。

小胶质细胞在维持神经系统稳态方面发挥着重要作用。小胶质细胞的持续激活可在体内产生高水平的有害介质,包括 TNF- α 、IL-1 β 和 iNOS,具有神经毒性作用^[11,26]。TLR4 在小胶质细胞中高表达,参与了多种神经退行性疾病的小胶质细胞激活^[11]。激活的 TLR4 可募集下游的 MyD88 靶向 NF- κ B 信号级联^[27]。Ang II 可介导炎症反应,此外还可以激

活小胶质细胞中 TLR4 介导的信号通路^[28-29]。Ang II 可诱导 TLR4、MyD88、iNOS、TNF- α 和 IL-1 β 蛋白表达量增加,促进 BV2 上清中 TNF- α 、IL-1 β 和 NO 的分泌,诱导 NF- κ B p65 向细胞核内异位。因此,推测 Ang II 通过 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路激活小胶质细胞,使用 TLR4 抑制剂 TAK-242 进行验证,发现 TAK-242 可产生细胞保护作用。

4 讨论

小胶质细胞是中枢神经系统的先天免疫细胞,在许多神经退行性疾病中,其慢性激活可产生大量的炎症介质以及有害物质,导致神经元的死亡^[11]。Ang II 是高血压的主要发病因素,其在体内积累可导致血管和组织炎症,与小胶质细胞的激活有关,可促进多种神经系统疾病的进展^[4,25]。因此,抑制小胶质细胞的炎性激活可能为高血压脑小血管疾病的潜在治疗靶点。本研究证明了哈巴俄昔可抑制 BV2



活小胶质细胞中 TLR4 介导的信号通路^[28-29]。Ang II 可诱导 TLR4、MyD88、iNOS、TNF- α 和 IL-1 β 蛋白表达量增加,促进 BV2 上清中 TNF- α 、IL-1 β 和 NO 的分泌,诱导 NF- κ B p65 向细胞核内异位。因此,推测 Ang II 通过 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路激活小胶质细胞,使用 TLR4 抑制剂 TAK-242 进行验证,发现 TAK-242 可产生细胞保护作用。

哈巴俄昔可调节体外 3T3-L1 脂肪细胞^[30]、骨关节炎软骨细胞^[31]和 BEAS-2B 细胞^[32]的炎症反应。本研究已证明 Ang II 可通过 TLR4/MyD88/NF- κ B

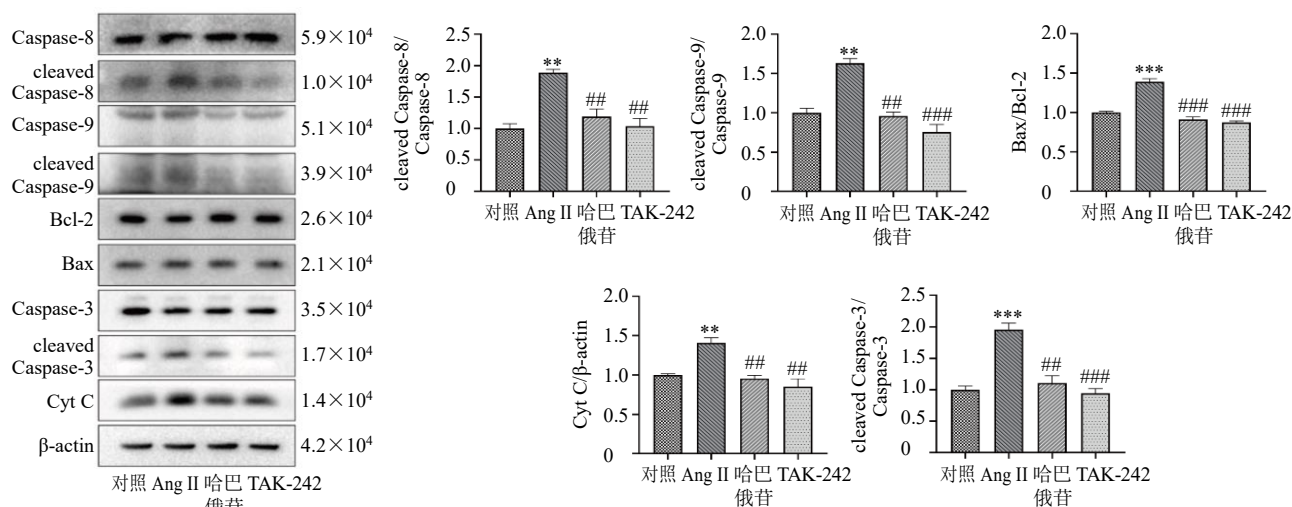


图 16 共培养模型中 HT22 细胞凋亡相关蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 16 Expressions of apoptosis-related proteins in HT22 cells in co-culture model ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

通路激活 BV2 细胞的炎症反应。为了探索哈巴俄昔对小胶质细胞的药理作用，用哈巴俄昔预处理 Ang II 诱导的 BV2 细胞。结果表明，哈巴俄昔可降低细胞中 TLR4、MyD88、iNOS、TNF- α 和 IL-1 β 蛋白表达，减少 BV2 上清中 TNF- α 、IL-1 β 和 NO 的分泌，抑制 NF- κ B p65 向细胞核的转运，表现出与 TAK-242 相似的药理作用。总之，哈巴俄昔可通过下调 Ang II 诱导的 BV2 小胶质细胞 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路激活发挥抗炎作用。TLR4 可以识别多种病原体相关分子模式，LPS 作为 TLR4 主要配体之一，与中枢神经系统中的其他细胞相比，主要作用于小胶质细胞^[11]。通常 LPS 与 CD14 蛋白结合并转移到 TLR4/MD-2 复合物，靶向 MyD88 依赖的炎症反应^[33]。因此，采用 LPS 进一步研究哈巴俄昔对上述通路的作用。结果表明，100 μ mol/L 哈巴俄昔可抑制 LPS 诱导的 BV2 细胞 TLR4、MyD88、iNOS、TNF- α 和 IL-1 β 蛋白表达及 NF- κ B p65 向细胞核内的转运，与 TAK-242 的作用相同。即哈巴俄昔确实参与 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路。综上，哈巴俄昔可抑制 Ang II 处理的 BV2 细胞 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路发挥抗炎作用。

研究发现，小胶质细胞可极化为促炎 M1 型和抗炎 M2 型^[11]。M1 表型的小胶质细胞与 iNOS、TNF- α 、IL-1 β 、CD86、主要组织相容性复合物 II (major compatibility complex II, MHC-II)、IL-6 等的上调有关，M2 表型小胶质细胞具有高水平的 CD206、TREM2 等^[11,34]。TREM2 主要在小胶质细胞上表达，可减轻大脑炎症^[35]。通过观察 CD86 和

TREM2 的表达分析小胶质细胞的状态，CD86 的上调表示其促炎活性增加，而 TREM2 的表达在一定程度上起到了保护作用。结果显示，在 Ang II/LPS 处理的小胶质细胞中，CD86 表达上调，TREM2 表达下调。而哈巴俄昔和 TAK-242 预处理均可以抑制 CD86 的表达，增加 TREM2 的表达。因此，哈巴俄昔可能通过调节小胶质细胞 CD86 和 TREM2 的表达来抵抗 Ang II 或 LPS 诱导的细胞凋亡。

BV2 细胞产生的炎症分子可导致周围神经元细胞损伤^[11]。为了进一步验证哈巴俄昔是否具有神经保护作用，构建了体外 BV2-HT22 细胞共培养模型。结果表明，哈巴俄昔可减轻共培养体系中 HT22 细胞的损伤，100 μ mol/L 哈巴俄昔、TAK-242 与模型组比较均有统计学意义。用 100 μ mol/L 哈巴俄昔预处理共培养模型，分析由 BV2 细胞炎症导致的 HT22 细胞凋亡。凋亡是一种细胞程序性死亡，主要由 Caspases 的激活引起。细胞凋亡途径包括线粒体途径和死亡受体途径。死亡受体与其配体结合，激活并水解 Caspase-8，进一步激活下游的 Caspase-3 (死亡受体通路)。炎症因子可改变线粒体膜通透性，影响促凋亡 Bax 家族和抗凋亡 Bcl-2 家族的表达，调节细胞色素 C 的释放，进而激活 Caspase-9 (线粒体依赖途径)。Caspase-8 和 Caspase-9 均可激活 Caspase-3，诱导细胞凋亡^[36-38]。哈巴俄昔可降低 Ang II 诱导的共培养模型中 HT22 细胞凋亡相关蛋白 cleaved Caspase-3/Caspase-3、cleaved Caspase-8/Caspase-8、cleaved Caspase-9/Caspase-9、Bax/Bcl-2 和 Cyt C 的表达。JC-1 染色、TUNEL 染色和流式细

胞术也证实了哈巴俄昔可减少 HT22 细胞的凋亡。表明哈巴俄昔可能通过抑制线粒体通路和死亡受体通路,减轻 Ang II 介导的共培养模型中 HT22 细胞的凋亡(图 17)。

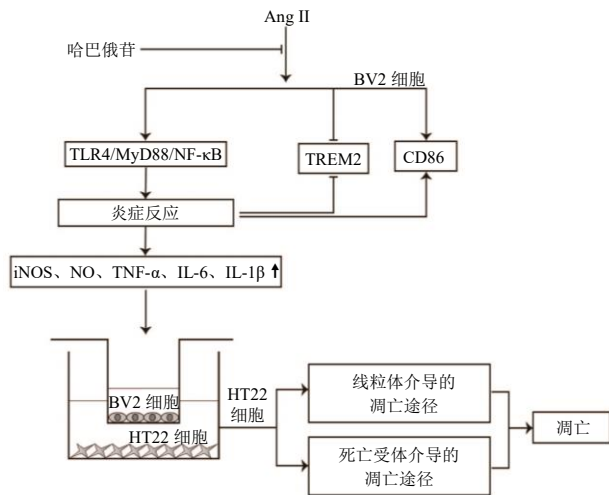


图 17 哈巴俄昔通过抑制 TLR4/MyD88/NF-κB 通路减轻神经炎症诱导的神经元损伤

Fig. 17 Harpagoside alleviates neuroinflammation-induced neuronal damage by inhibiting TLR4/MyD88/NF-κB pathway

综上,哈巴俄昔可能通过抑制 TLR4/MyD88/NF-κB 通路对 Ang II 诱导的小胶质细胞发挥抗炎作用,进而减轻神经炎症引起的神经元损伤,表明哈巴俄昔在预防或治疗高血压脑小血管疾病及其他中枢神经系统炎症疾病方面具有潜在的药用价值。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Sargurupremraj M, Suzuki H, Jian X Q, et al. Cerebral small vessel disease genomics and its implications across the lifespan [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 6285.
- [2] Ma Y, Song A, Viswanathan A, et al. Blood pressure variability and cerebral small vessel disease [J]. *Stroke*, 2020, 51(1): 82-89.
- [3] Jackson L, Eldahshan W, Fagan S C, et al. Within the brain: The renin angiotensin system [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): 876.
- [4] Benicky J, Sánchez-Lemus E, Honda M, et al. Angiotensin II AT1 receptor blockade ameliorates brain inflammation [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2011, 36(4): 857-870.
- [5] Park H S, You M J, Yang B, et al. Chronically infused angiotensin II induces depressive-like behavior via microglia activation [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 22082.
- [6] Prinz M, Jung S, Priller J. Microglia biology: One century

of evolving concepts [J]. *Cell*, 2019, 179(2): 292-311.

- [7] Nayak D, Roth T L, McGavern D B. Microglia development and function [J]. *Annu Rev Immunol*, 2014, 32: 367-402.
- [8] Wolf S A, Boddeke H M, Kettenmann H. Microglia in physiology and disease [J]. *Annu Rev Physiol*, 2017, 79: 619-643.
- [9] Kwon H S, Koh S H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: The roles of microglia and astrocytes [J]. *Transl Neurodegener*, 2020, 9(1): 42.
- [10] Zusso M, Lunardi V, Franceschini D, et al. Ciprofloxacin and levofloxacin attenuate microglia inflammatory response via TLR4/NF-κB pathway [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 148.
- [11] Subhramanyam C S, Wang C, Hu Q D, et al. Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2019, 94: 112-120.
- [12] Rodríguez-Gómez J A, Kavanagh E, Engskog-Vlachos P, et al. Microglia: Agents of the CNS pro-inflammatory response [J]. *Cells*, 2020, 9(7): 1717.
- [13] Vijay K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 59: 391-412.
- [14] Kouli A, Horne C B, Williams-Gray C H. Toll-like receptors and their therapeutic potential in Parkinson's disease and α-synucleinopathies [J]. *Brain Behav Immun*, 2019, 81: 41-51.
- [15] Biancardi V C, Bomfim G F, Reis W L, et al. The interplay between angiotensin II, TLR4 and hypertension [J]. *Pharmacol Res*, 2017, 120: 88-96.
- [16] Zhu L P, Han J K, Yuan R R, et al. Berberine ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting TLR4/NF-κB pathway [J]. *Biol Res*, 2018, 51(1): 9.
- [17] Lawrimore C J, Crews F T. Ethanol, TLR3, and TLR4 agonists have unique innate immune responses in neuron-like SH-SY5Y and microglia-like BV2 [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2017, 41(5): 939-954.
- [18] Wang Y, Hu H S, Yin J, et al. TLR4 participates in sympathetic hyperactivity post-MI in the PVN by regulating NF-κB pathway and ROS production [J]. *Redox Biol*, 2019, 24: 101186.
- [19] Menghini L, Recinella L, Leone S, et al. Devil's claw (*Harpagophytum procumbens*) and chronic inflammatory diseases: A concise overview on preclinical and clinical data [J]. *Phytother Res*, 2019, 33(9): 2152-2162.
- [20] Wang J Z, Zhang Y F, Xu F, et al. Investigation of the in vivo metabolism of harpagoside and distribution of its metabolites in rats by HPLC-IT-TOF-MSⁿ [J]. *Biomed*

- Chromatogr*, 2018, 32(7): e4218.
- [21] Lu Y W, Hao R J, Wei Y Y, *et al*. The protective effect of harpagoside on angiotensin II (Ang II)-induced blood-brain barrier leakage *in vitro* [J]. *Phytother Res*, 2021, 35(11): 6241-6254.
- [22] Chaoui D, Faussat A M, Majdak P, *et al*. JC-1, a sensitive probe for a simultaneous detection of P-glycoprotein activity and apoptosis in leukemic cells [J]. *Cytom B Clin Cytom*, 2006, 70(3): 189-196.
- [23] Voloboueva L A, Liu J K, Suh J H, *et al*. (R)-alpha-lipoic acid protects retinal pigment epithelial cells from oxidative damage [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(11): 4302-4310.
- [24] Zhou K, Wu J, Chen J, *et al*. Schaftoside ameliorates oxygen glucose deprivation-induced inflammation associated with the TLR4/Myd88/Drp1-related mitochondrial fission in BV2 microglia cells [J]. *J Pharmacol Sci*, 2019, 139(1): 15-22.
- [25] Ali Bhat S, Sood A, Shukla R, *et al*. AT2R activation prevents microglia pro-inflammatory activation in a NOX-dependent manner: Inhibition of PKC activation and p47^{phox} phosphorylation by PP2A [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(4): 3005-3023.
- [26] Gliozzi M, Scicchitano M, Bosco F, *et al*. Modulation of nitric oxide synthases by oxidized LDLs: Role in vascular inflammation and atherosclerosis development [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13): E3294.
- [27] Yang J, Wu Y P, Xu Y, *et al*. Dexmedetomidine resists intestinal ischemia-reperfusion injury by inhibiting TLR4/MyD88/NF-κB signaling [J]. *J Surg Res*, 2021, 260: 350-358.
- [28] Yang H Y, Song X S, Wei Z M, *et al*. TLR4/MyD88/NF-κB signaling in the rostral ventrolateral medulla is involved in the depressor effect of candesartan in stress-induced hypertensive rats [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2020, 11(19): 2978-2988.
- [29] Biancardi V C, Stranahan A M, Krause E G, *et al*. Cross talk between AT1 receptors and Toll-like receptor 4 in microglia contributes to angiotensin II-derived ROS production in the hypothalamic paraventricular nucleus [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016, 310(3): H404-H415.
- [30] Kim T K, Park K S. Inhibitory effects of harpagoside on TNF-α-induced pro-inflammatory adipokine expression through PPAR-γ activation in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Cytokine*, 2015, 76(2): 368-374.
- [31] Haseeb A, Ansari M Y, Haqqi T M. Harpagoside suppresses IL-6 expression in primary human osteoarthritis chondrocytes [J]. *J Orthop Res*, 2017, 35(2): 311-320.
- [32] Boeckenholt C, Begrow F, Verspohl E J. Effect of silymarin and harpagoside on inflammation reaction of BEAS-2B cells, on ciliary beat frequency (CBF) of trachea explants and on mucociliary clearance (MCC) [J]. *Planta Med*, 2012, 78(8): 761-766.
- [33] Płóciennikowska A, Hromada-Judycka A, Borzęcka K, *et al*. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(3): 557-581.
- [34] Aryanpour R, Pasbakhsh P, Zibara K, *et al*. Progesterone therapy induces an M1 to M2 switch in microglia phenotype and suppresses NLRP3 inflammasome in a cuprizone-induced demyelination mouse model [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 51: 131-139.
- [35] Liu W F, Taso O, Wang R, *et al*. Trem2 promotes anti-inflammatory responses in microglia and is suppressed under pro-inflammatory conditions [J]. *Hum Mol Genet*, 2020, 29(19): 3224-3248.
- [36] Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, *et al*. Old, new and emerging functions of caspases [J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(4): 526-539.
- [37] Zhang J H, Zhang Y P, Herman B. Caspases, apoptosis and aging [J]. *Ageing Res Rev*, 2003, 2(4): 357-366.
- [38] Nicotera P. Apoptosis and age-related disorders: Role of caspase-dependent and caspase-independent pathways [J]. *Toxicology Letters*, 2002, 127(1/3): 189-195.

[责任编辑 李亚楠]