

• 药理与临床 •

基于趋化因子网络研究黄芩素延缓 *D*-半乳糖诱导 BV-2 细胞衰老作用及机制伏 蕾^{1,2,3}, 秦雪梅^{1,2,3}, 高 丽^{1,2,3*}

1. 山西大学中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西 太原 030006

3. 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室, 山西 太原 030006

摘要: **目的** 探讨黄芩素延缓 *D*-半乳糖 (*D*-galactose, *D*-gal) 诱导 BV-2 小胶质细胞衰老的分子机制。**方法** 采用 200 mmol/L *D*-gal 诱导 BV-2 细胞衰老模型, 通过测定细胞活力、细胞形态、细胞周期、衰老相关 β -半乳糖苷酶 (senescence-associated- β -galactosidase, SA- β -gal)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, p21)、磷酸化组蛋白 H2AX (phospho-histone H2AX, γ H2AX) 的表达, 评价黄芩素延缓小胶质细胞衰老的作用。通过文献检索小胶质细胞衰老相关差异基因, 构建基因网络, 运用生信分析预测小胶质细胞衰老相关的关键基因及信号通路, 采用 qRT-PCR 技术验证黄芩素对小胶质细胞衰老关键基因的调节作用, 并进一步研究黄芩素对趋化因子 (C-X-C 基元) 配体 10 (C-X-C motif chemokine 10, CXCL10) 诱导 BV-2 细胞衰老的作用。**结果** 给予 50 μ mol/L 黄芩素 24 h 可通过提高细胞活力 ($P < 0.001$)、改善细胞形态、显著降低 SA- β -gal 蓝染细胞数量 ($P < 0.01$ 、 0.001)、下调 p21 和 γ H2AX 蛋白表达 ($P < 0.05$)、减少 G₀/G₁ 期细胞周期停滞 ($P < 0.01$) 来延缓小胶质细胞衰老。生信分析结果表明, 小胶质细胞衰老前后趋化因子通路显著富集。黄芩素可显著下调趋化因子及其相关基因趋化因子 (C-C 基元) 配体 2 (C-C motif chemokine 2, CCL2)、CCL4、趋化因子 (C-X-C 基元) 受体 4 (C-X-C chemokine receptor type 4, CXCR4)、趋化因子 (C-C 基元) 受体 5 (C-C chemokine receptor type 5, CCR5)、CXCL10、Toll 样受体 2 (Toll-like receptor 2, TLR2)、TLR4、肿瘤坏死因子 (tumour necrotizing factor, TNF)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 的 mRNA 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)、显著下调 CXCL10 的表达 ($P < 0.05$)、显著延缓 CXCL10 引起的细胞衰老 ($P < 0.001$)。**结论** 黄芩素可能通过调节趋化因子及相关基因的表达, 延缓 *D*-gal 诱导的 BV-2 细胞衰老。

关键词: 黄芩素; 小胶质细胞; 衰老; 趋化因子网络; CXCL10**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)21-7300-13**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.21.011Baicalein retards *D*-galactose-induced senescence of BV-2 cells through regulation of chemokine networkFU Lei^{1,2,3}, QIN Xuemei^{1,2,3}, GAO Li^{1,2,3}

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

3. Key Laboratory of Effective Substances Research and Utilization in TCM of Shanxi Province, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective To investigate the molecular mechanism of baicalein in delaying senescence induced by *D*-galactose (*D*-gal) in BV-2 microglia. **Methods** The senescence of BV-2 cell was induced by 200 mmol/L *D*-gal, and the effects of baicalein in delaying cell senescence were evaluated by measuring cell viability, cell morphology, expression of senescence marker senescence-associated- β -galactosidase (SA- β -gal), cell cycle protein-dependent kinase inhibitor 1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, p21) and phospho-histone H2AX (γ H2AX), and cell cycle. Differential genes related to microglia senescence were searched by literature, and the gene network was constructed. Key genes

收稿日期: 2024-06-20**基金项目:** 山西省基础研究计划自然科学面上项目 (202203021211292)**作者简介:** 伏 蕾, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。E-mail: 1577504249@qq.com***通信作者:** 高 丽, 副教授, 硕士生导师, 从事中药药理学、抗衰老研究。E-mail: gaoli87@sxu.edu.cn

and pathways related to microglia senescence were predicted using bioinformatics analysis, and baicalein regulatory effects on key genes related to microglia senescence were verified using qRT-PCR. The effects of baicalein on chemokine C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10) induced BV-2 cells were investigated. **Results** The results showed that 50 $\mu\text{mol/L}$ baicalein for 24h could delay microglia senescence by increasing cell viability ($P < 0.001$), improving cell morphology, significantly decreasing the number of SA- β -gal blue-stained cells ($P < 0.01$, 0.001), down-regulating the expression of p21 and γH2AX proteins ($P < 0.05$), and decreasing cell cycle arrest in the G_0/G_1 phase ($P < 0.01$). Bioinformatics analysis showed that the chemokine pathway was significantly enriched in microglia senescence. Baicalein significantly down-regulated the mRNA levels of chemokines and their related genes C-C motif chemokine 2 (*CCL2*), *CCL4*, C-X-C chemokine receptor type 4 (*CXCR4*), C-C chemokine receptor type 5 (*CCR5*), C-X-C motif chemokine 10 (*CXCL10*), toll-like receptor 2 (*TLR2*), *TLR4*, tumour necrotizing factor (*TNF*), interleukin-1 β (*IL-1\beta*) mRNA levels ($P < 0.05$, 0.01 , 0.001), significantly down-regulated the level of CXCL10 ($P < 0.05$) and reduced CXCL10-induced cell senescence in BV-2 cells ($P < 0.001$). **Conclusion** Baicalein may delay senescence induced by *D*-gal in BV-2 cells by regulating the expression of chemokines and related genes.

Key words: baicalein; microglia; senescence; chemokine network; CXCL10

脑衰老是阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD)、帕金森病 (parkinson's disease, PD) 和肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 等神经退行性疾病发生和发展的重要危险因素^[1]。衰老的本质是细胞衰老, 细胞衰老表现为永久性细胞周期停滞、细胞功能和细胞间通讯受损, 产生神经炎症, 并损害其它相邻的细胞^[2]。研究发现, 与正常衰老人群相比, AD 等神经退行性疾病患者脑内衰老的小胶质细胞数更多^[3-4], 提示小胶质细胞衰老可能在神经退行性疾病中发挥着重要作用。

小胶质细胞是大脑常驻免疫细胞, 参与调节神经发生、神经可塑性、血脑屏障通透性、髓鞘形成、损伤反应、炎症和组织修复等过程, 在维持大脑稳态中发挥着重要作用^[5-11]。然而, 在衰老状态下, 小胶质细胞的免疫监测能力及吞噬沉积斑块的能力下降^[12], 会分泌更多的促炎性细胞因子^[13], 通过抑制髓鞘形成抑制正常神经元功能, 从而导致神经元变性^[14]。因此, 延缓小胶质细胞衰老可能是治疗神经退行性疾病的潜在策略。

趋化因子是一种能引导细胞进行趋化运动的细胞因子, 是神经免疫系统的重要组成部分^[15-16]。趋化因子及其受体参与血管生成、造血、胚胎发育、树突状细胞成熟、免疫系统的发育和稳态、肿瘤生长和转移等过程^[17]。趋化因子可激活小胶质细胞使其迁移到炎症部位, 并分泌趋化因子、细胞因子和活性氧等分子, 进而影响突触可塑性。因此, 趋化因子与小胶质细胞相互作用在炎症和神经退行性疾病的发生发展中扮演着重要角色^[18]。

黄芩素有着广泛的生物活性, 具有抗炎、抗病毒、抗菌、抗氧化^[19-21]等作用。研究表明, 黄芩素可提高 *D*-半乳糖 (*D*-galactose, *D*-gal) 诱导的大鼠

空间学习和记忆能力^[23], 减轻丝裂霉素治疗引起的肺泡上皮细胞衰老^[24]。课题组前期研究表明, 黄芩素可改善 *D*-gal 诱导的大鼠^[25]和 SAMP8 小鼠衰老性认知障碍^[26], 延缓 H_2O_2 、低糖诱导的星形胶质细胞衰老^[27-28]。然而, 黄芩素能否延缓小胶质细胞衰老以及其具体的分子机制仍不明确。本研究采用 *D*-gal 诱导 BV-2 细胞, 构建小胶质细胞衰老模型。采用生物信息学方法分析小胶质细胞衰老过程中关键基因及信号通路, 以趋化因子网络为切入点, 探讨黄芩素延缓小胶质细胞衰老的作用及其机制, 为预防和延缓神经退行性疾病提供新的研究视角。

1 材料

1.1 细胞株

小鼠小胶质细胞 (BV-2 细胞) 购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 药品与试剂

D-gal (批号 A600215)、DMEM 高糖培养基 (批号 E600008)、特级胎牛血清 (批号 E600001)、青霉素/链霉素溶液 (批号 E607011)、胰酶 (批号 E607002)、二甲基亚砜 (批号 A610163)、BCA 蛋白检测试剂盒 (批号 G1580) 均购自上海生工生物工程有限公司; 黄芩素 (批号 JZ20150711, 质量分数 $> 98\%$) 购自南京景竹生物技术有限公司; SA- β -gal 染色试剂盒 (批号 G1580)、细胞周期试剂盒 (批号 CA1510) 购自索莱宝公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 10494-1-AP)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, p21) 抗体 (批号 28248-1-AP) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; 磷酸化组蛋白 H2AX (phospho-histone H2AX, γH2AX) 抗体 (批号

ab26350) 购自美国 Abcam 公司, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 bs-0295G-HRP) 购自博奥森生物技术有限公司; 趋化因子 (C-X-C 基元) 配体 10 (C-X-C motif chemokine 10, CXCL10) 试剂盒 (批号 AD2829Mo) 购自北京安迪基因公司; CXCL10 重组蛋白 (批号 1213153) 购自美国 PeproTech 公司; PrimeScript™ RT Master Mix (批号 RR036A)、TB Green® Premix Ex Taq™ II (批号 RR820A) 购自日本 TaKaRa 公司。

1.3 仪器

TE-2000 型荧光倒置显微镜 (日本 Nikon 公司), Infinite 200 PRO 型酶标仪 (瑞士 Tecan 公司), CytoFlex 流式细胞分析仪 (中国贝克曼库尔特公司), Mini-PROTEAN Tetra 电泳仪 (美国 BIO-RAD 公司), ChemiDoc™ XRS+ 化学发光成像系统 (美国 BIO-RAD 公司), CG-05 型 Real time PCR 仪 (中国力康生物医疗科技控股有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养、分组及给药

BV-2 细胞培养于含 10% FBS、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 高糖培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞长至 75%~85% 时用胰酶消化进行细胞传代以及后续实验。细胞分为对照组、模型组以及黄芩素不同剂量 (6.25、12.50、25.00、50.00 μmol/L) 给药组。对照组更换完全培养液, 模型组给予 200 mmol/L D-gal 诱导 24 h, 给药组给予不同剂量黄芩素预处理 2 h 后, 加入 200 mmol/L D-gal 诱导 24 h。

2.2 细胞活力测定

BV-2 细胞以每孔 5×10^3 个/mL 的密度接种于 96 孔板中培养至贴壁, 弃掉上清液, 根据 “2.1” 项下方法进行给药。每孔加入 10 μL MTT (5 mg/mL), 孵育 4 h 后于酶标仪 570 nm 处检测吸光度 (A) 值。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3 SA-β-gal 染色

将 BV-2 细胞以每孔 5×10^3 个/mL 的密度接种于 6 孔板中, 根据 “2.1” 项下方法进行给药, 使用 PBS 清洗 1 次, 每孔加入 1 mL 固定液室温固定 15 min, PBS 清洗 3 次, 按照 SA-β-gal 试剂盒说明书配制染色工作液, 每孔加入 1 mL 染色液, 在无 CO₂ 环境下避光孵育过夜。在荧光显微镜下随机选取不同视野图片进行拍照, 使用 Image-J 软件统计阳性细胞数, 并计算 SA-β-gal 染色阳性率。

$$\text{SA-}\beta\text{-gal 染色阳性率} = \text{蓝染细胞数 (衰老细胞)} / \text{总细胞数}$$

2.4 细胞形态观察

BV-2 细胞以 “2.3” 项下方法接种于 6 孔板中, 根据 “2.1” 项下方法进行给药, 在荧光显微镜下观察细胞形态并拍照。

2.5 细胞周期

BV-2 细胞以 “2.3” 项下方法接种于 6 孔板中, 根据 “2.1” 项下方法进行给药。收集细胞, 加入 500 μL 预冷的 70% 乙醇固定过夜, PBS 洗去固定液, 加入 100 μL RNase A 溶液, 37 °C 温育 30 min, 再加入 400 μL PI 溶液避光孵育 30 min, 使用流式细胞仪检测细胞不同时期 DNA 含量。

2.6 Western blotting 检测

取对数生长期的 BV-2 细胞, 根据 “2.1” 项下方法进行给药, 在冰上收集细胞, 按比例加入细胞裂解液进行超声破碎, 使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经 10% 或 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 脱脂奶粉封闭 2 h, 分别加入一抗 p21 (1:1 000)、γH2AX (1:800) 和 GAPDH (1:2 000), 于 4 °C 冰箱孵育过夜, TBST 溶液清洗后, 加入二抗孵育 2 h 后显影, 检测 p21、γH2AX 蛋白表达水平。

2.7 小胶质细胞衰老相关差异基因 PPI 网络的构建

在 PubMed 中以 “microglia” “senescence” “transcriptomics” 作为关键词进行检索, 查找并整理小胶质细胞衰老相关差异表达基因。导入 STRING (<https://string-db.org/>) 数据库, 设置基因相互作用得分阈值为 0.9, 导出基因-基因相互作用关系, 导入 Cytoscape (<http://cytoscape.org/>) 软件构建基因-基因相互作用网络。

2.8 生物信息学分析

使用 Metascape 数据库 (<https://metascape.org/>) 进行 GO 通路分析, 使用 Cytoscape 软件中 ClusterONE、MCODE 工具进行聚类分析, 其中 ClusterONE 选取 $P < 0.01$ 的结果, MCODE 中最小评分阈值设置为 2。Cytohubba 软件进行拓扑结构分析, 利用 Venn 网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 绘制不同分析工具所得基因的韦恩图, 寻找关键基因。

2.9 qRT-PCR 实验

采用 qRT-PCR 技术检测趋化因子 (C-C 基元) 受体 5 (C-C chemokine receptor type 5, CCR5)、趋化因子 (C-X-C 基元) 受体 4 (C-X-C chemokine receptor type 4, CXCR4)、趋化因子及其相关基因

趋化因子 (C-C 基元) 配体 2 (C-C motif chemokine 2, *CCL2*)、*CCL4*、*CXCL10*、Toll 样受体 2 (Toll-like receptor 2, *TLR2*)、*TLR4*、肿瘤坏死因子 (tumour necrotizing factor, *TNF*)、白细胞介素 -1 β (interleukin-1 β , *IL-1 β*) 和内参基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,

GAPDH) 的 mRNA 表达水平, 使用 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行引物设计, 引物序列见表 1。提取 BV-2 细胞总 RNA, 使用 PrimeScriptTMRT Master Mix 将其反转录为 cDNA, 使用 TB Green[®] Premix Ex TaqTM II 进行 qRT-PCR, 使用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 计算 mRNA 的表达。

表 1 引物序列
 Table 1 Primer sequence

基因	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
<i>CCR5</i>	ACCACACCGGGACTGTGAAA	TCTCATGGCTTCTGAGGGGC
<i>CXCR4</i>	AGGCAGTCTATGTGGGCGTC	GCTATCGGGGTAAAGGCGGT
<i>CCL4</i>	CTCCCGGCAGCTTCACAGAA	GAACGTGAGGAGCAAGGACG
<i>CXCL10</i>	GAGACATCCCGAGCCAACCT	TTCTCACTGGCCCCGTCATCG
<i>TLR4</i>	CGGCAACTTGGACCTGAGGA	GGTCCATAGCAGAGCCCCAG
<i>TNF</i>	CGCCACATCTCCCTCCAGAA	AGGCTGAGACATAGGCACCG
<i>CCL2</i>	AGGTGTCCCAAAGAAGCTGT	GACCTTAGGGCAGATGCAGTT
<i>IL-1B</i>	ACCTCACAAGCAGAGCACAA	GTCTTGCGCCGAGGACTAAGG
<i>TLR2</i>	GCAGGAGATGTGTCCGCAAT	CTGACCGGTGATGCAATTCTG
<i>GAPDH</i>	CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT

2.10 CXCL10 检测

取对数生长期的 BV-2 细胞, 根据“2.1”项下方法给药, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测各组细胞培养液中的 CXCL10 水平。

2.11 对 CXCL10 诱导 BV-2 细胞 SA- β -gal 染色的影响

取对数生长期的 BV-2 细胞, 以每孔 5 $\times$ 10³ 个/mL 的密度接种于 6 孔板中。黄芩素预处理 2 h 后, 加入 CXCL10 重组蛋白 125 ng/mL 培养 24 h, 使用 Image-J 软件统计阳性细胞数, 并计算 SA- β -gal 染色阳性率。

2.12 统计学分析

使用 Graph Pad Prism 8.0 软件进行统计分析, 实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析进行各组间比较。

3 结果

3.1 D-gal 诱导 BV-2 细胞衰老

采用 D-gal 诱导 BV-2 细胞衰老, 与对照组比较, 150、200、250、300 mmol/L D-gal 可显著降低细胞活力并呈剂量相关 (图 1-A)。SA- β -gal 常作为细胞衰老标志物^[29], 与对照组比较, 200、250 mmol/L D-gal 均可显著增加蓝染细胞数目 (图 1-B、C)。结果表明, 200 mmol/L D-gal 可诱导 BV-2 细胞衰老, 因此选取该浓度进行后续实验。

3.2 对 D-gal 诱导 BV-2 细胞的保护作用

通过细胞毒性、细胞活力、细胞形态观察研究黄芩素对 D-gal 诱导 BV-2 细胞的保护作用。结果显示, 50 μ mol/L 黄芩素对细胞活力没有影响 (图 2-A)。与

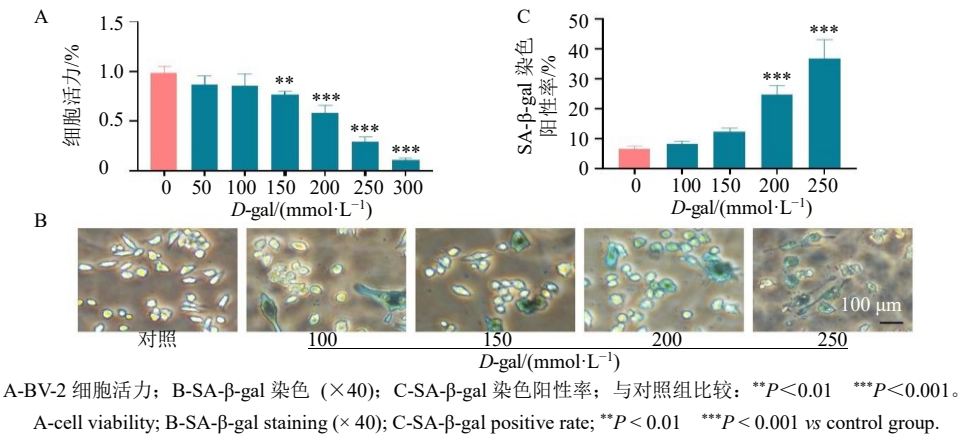
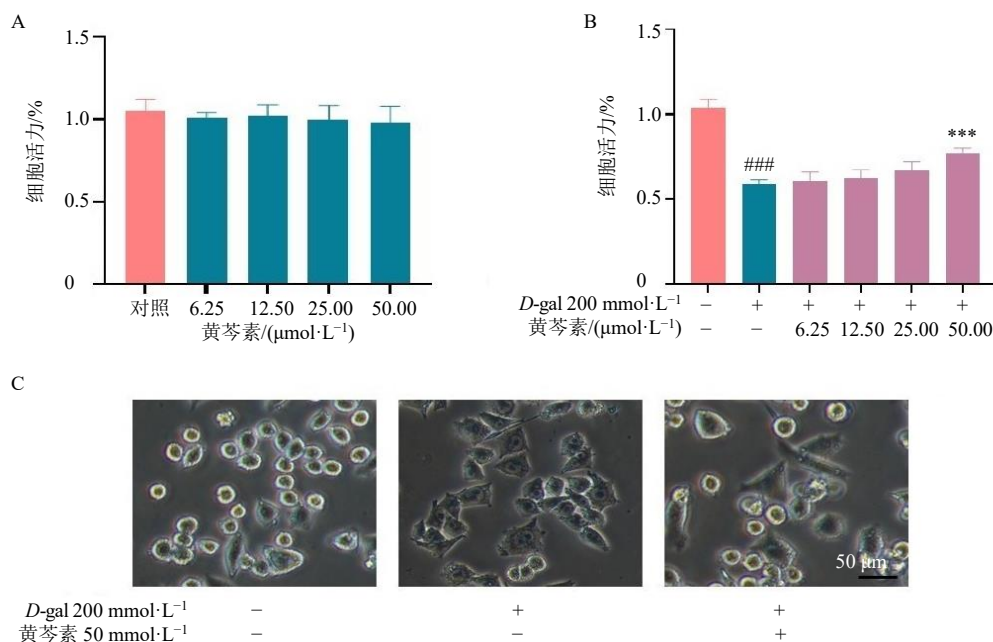


图 1 D-gal 对 BV-2 细胞活力和 SA- β -gal 染色的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)
 Fig. 1 Effects of D-gal on BV-2 cell viability and SA- β -gal staining ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)



A-黄芩素对 BV-2 细胞活力的影响; B-黄芩素对 *D*-gal 诱导 BV-2 细胞活力的影响; C-细胞形态图片 ($\times 100$); 与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: *** $P < 0.001$ 。

A-effects of baicalein on cell viability; B-effects of baicalein on cell viability of *D*-gal-induced BV-2 cells; C-images of cellular morphology ($\times 100$); ### $P < 0.001$ vs control group, *** $P < 0.001$ vs model group.

图 2 黄芩素对 *D*-gal 诱导 BV-2 的保护作用 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 2 Protective effects of baicalein on *D*-gal-induced BV-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

对照组比较, 在 *D*-gal 诱导下, 细胞活力明显下降 ($P < 0.001$), 细胞形态发生改变、细胞核增大且边缘粗糙; 与模型组比较, 给予 50 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩素可显著提高细胞活力 ($P < 0.001$)、改善细胞形态 (图 2-B、C), 结果表明, 50 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩素对 *D*-gal 诱导 BV-2 细胞衰老具有保护作用。

3.3 延缓 *D*-gal 诱导的 BV-2 细胞衰老作用

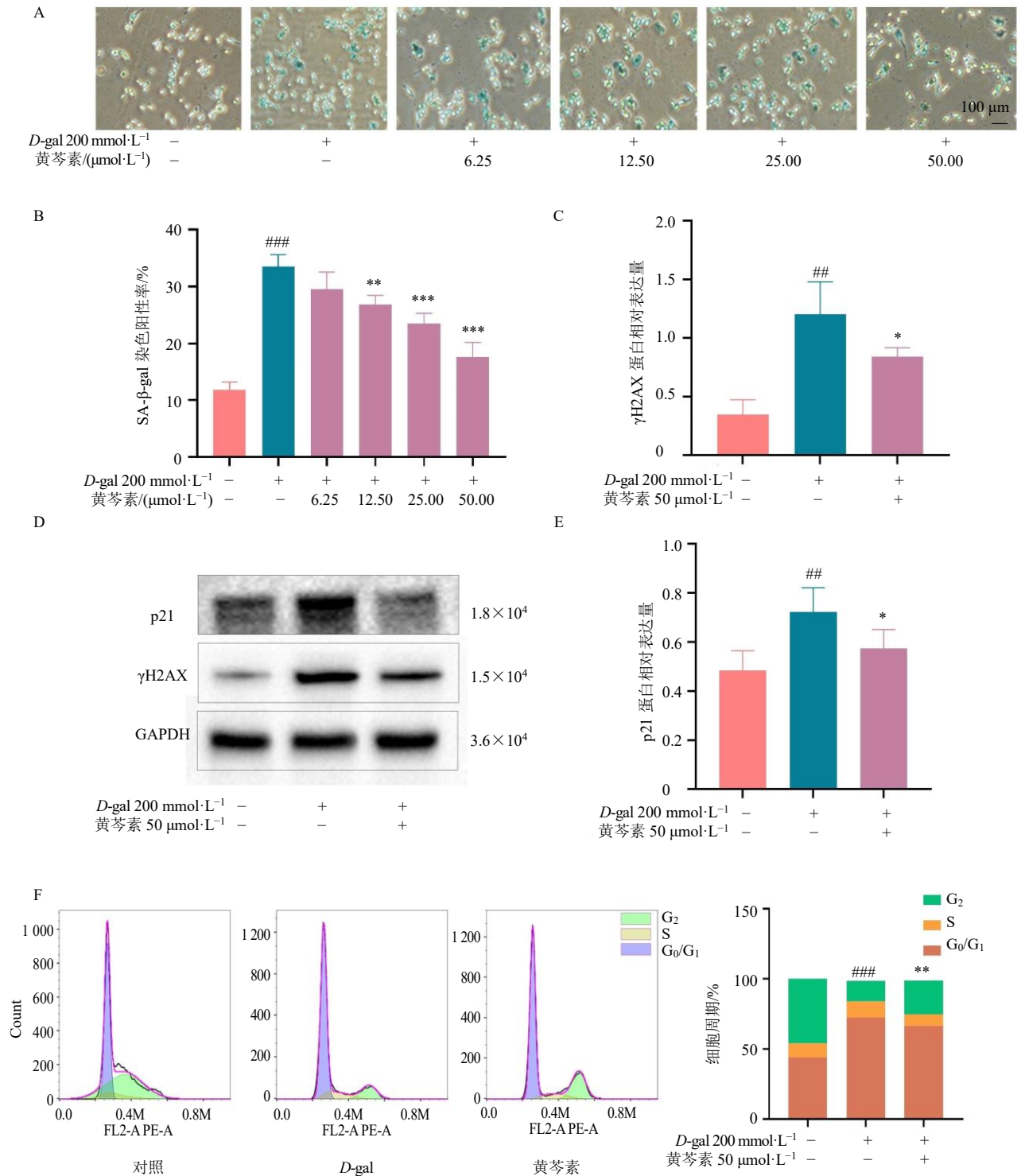
通过检测 SA- β -gal 阳性细胞数、衰老相关 p21 和 γH2AX 蛋白表达、细胞周期, 评价黄芩素延缓 BV-2 细胞衰老的作用。如图 3 所示, 与对照组比较, 衰老的 BV-2 细胞表现为 SA- β -gal 阳性细胞数显著增多、p21 和 γH2AX 蛋白表达显著增加、 G_0/G_1 期细胞周期停滞 ($P < 0.01$ 、 0.001)。与模型组相比, 给予 50 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩素可显著降低 SA- β -gal 阳性细胞数 ($P < 0.001$), 降低 p21 和 γH2AX 蛋白表达 ($P < 0.05$), 缓解 G_0/G_1 期的细胞周期停滞 ($P < 0.001$)。结果表明, 黄芩素可延缓 *D*-gal 诱导的 BV-2 细胞衰老。

3.4 小胶质细胞衰老相关基因生信分析

通过文献查阅^[30-35], 共收集到小胶质细胞衰老相关差异表达基因共 273 个, 将以上基因导入

STRING 数据库获取基因内部相互作用。删除游离的节点, 将置信度大于 0.9 的基因-基因相互作用导入 Cytoscape 软件, 共得到 77 个节点 (表 2)。根据节点的介数中心性 (Betweenness centrality) 对基因进行排序, 得到关键基因 *FN1*、*TLR4*、*VEGFA*、*TNF*、*CSFLR*、*TREM2*、*STAT1*、*CXCL10* 等, 以红色节点表示 (图 4-A)。

为了深入探究小胶质细胞衰老的机制, 将上述 77 个基因导入 Metascape 数据库进行 GO 分析 (图 4-B)。CytoHubba 是一种基于拓扑网络算法的基因排序工具, 利用 CytoHubba 得到排序前 10 的基因 (图 4-C)。利用 MCODE、ClusterONE 对图 4-A 中的基因进行聚类分析, 得到不同的聚类 (图 4-D、E)。运用 Venn 图对聚类分析和拓扑结构分析预测得到的关键基因进行整合, 结果显示, ClusterONE 与 CytoHubba 2 个工具所得的交集基因有 *CCL2*、*CCR5*; MCODE 与 CytoHubba 交集基因有 *IL-1B*、*TNF*、*TLR2*、*TLR4*; ClusterONE、MCODE 和 CytoHubba 三者交集基因有 *CXCL10*、*CXCR4*、*CCL4*。结果表明, 显示趋化因子网络可能在小胶质细胞衰老过程中发挥重要作用。



A-黄芩素给药 SA-β-gal 染色代表性图片 (×40); B-黄芩素对 SA-β-gal 染色阳性率的影响; C~E-黄芩素给药对 p21 和 γH2AX 蛋白表达的影响; F-黄芩素对 D-gal 诱导 BV-2 细胞周期的影响, 与对照组比较: ^{###}*P* < 0.01 ^{####}*P* < 0.001; 与模型组比较: ^{*}*P* < 0.05 ^{**}*P* < 0.01 ^{***}*P* < 0.001。A-representative pictures of SA-β-gal staining after baicalin administration (×40); B-effect of baicalin on positive rate of SA-β-gal staining; C~E-effects of baicalin administration on expression of p21 and γH2AX proteins; F-effect of baicalin on D-gal induced BV-2 cell cycle; ^{###}*P* < 0.01, ^{####}*P* < 0.001 vs control group; ^{*}*P* < 0.05 ^{**}*P* < 0.01 ^{***}*P* < 0.001 vs model group.

图 3 黄芩素延缓 D-gal 诱导的 BV-2 细胞衰老的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 3 Baicalein retards D-gal-induced senescence of BV-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

表 2 小胶质细胞衰老相关差异基因

Table 2 Differential expressed genes related with microglia senescence

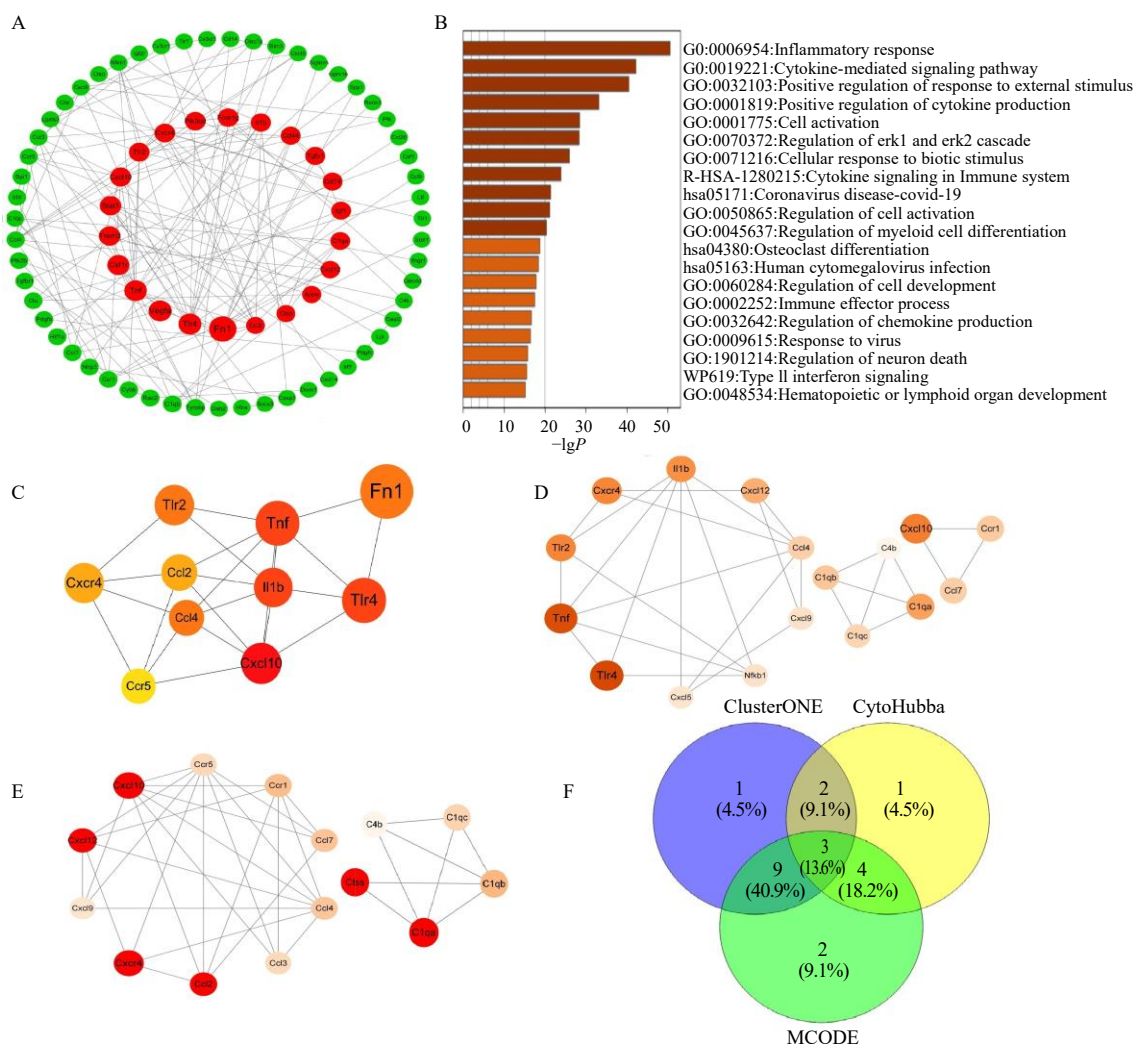
序号	基因	基因全称	介数中心性	上调/下调
1	<i>FN1</i>	Fibronectin-1	1 969.68	↓
2	<i>TLR4</i>	Toll-like receptor 4	1 075.54	↑
3	<i>VEGFA</i>	Vascular endothelial growth factor a	1 049.59	↑
4	<i>TNF</i>	Tumor necrosis factor	1 019.97	↑
5	<i>CSF1R</i>	Colony stimulating factor 1 receptor	886.34	↑
6	<i>TREM2</i>	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2	736.83	↑
7	<i>STAT1</i>	Signal transducer and activator of transcription 1	726.00	↑
8	<i>CXCL10</i>	C-X-C motif chemokine 10	654.60	↑
9	<i>TLR2</i>	Toll-like receptor 2	592.53	↑
10	<i>CXCR4</i>	C-X-C motif chemokine receptor 4	587.96	↑
11	<i>PIK3CD</i>	Phosphoinositide-3-kinase catalytic delta	571.40	↑
12	<i>FCER1G</i>	Fibroblast growth factor receptor 1	547.90	↑
13	<i>IL1B</i>	Interleukin 1 beta	515.35	↑
14	<i>CD44</i>	Cd44	475.80	↑
15	<i>TGFB1</i>	Transforming growth factor beta 1	461.17	↓
16	<i>CD74</i>	Cd74 molecule	437.79	↑
17	<i>IGF1</i>	Insulin-like growth factor 1	428.05	↑
18	<i>C1QA</i>	Complement c1q a chain	420.74	↑
19	<i>CXCL12</i>	C-X-C motif chemokine 12	334.86	↓
20	<i>APOE</i>	Apolipoprotein e	298.00	↑
21	<i>CTSS</i>	Cathepsin s	246.98	↑
22	<i>CCL2</i>	C-C motif chemokine 2	230.60	↑
23	<i>TYROBP</i>	Tyrobp	230.17	↑
24	<i>C1QB</i>	C1qb	197.73	↑
25	<i>RAC2</i>	Rac2	189.75	↑
26	<i>CYBB</i>	Cytochrome b-245 beta	183.02	↑
27	<i>CCR1</i>	C-C motif chemokine receptor 1	174.03	↑
28	<i>NLRP3</i>	Nod-like receptor thermal protein domain associated protein 3	161.81	↑
29	<i>CCL7</i>	C-C motif chemokine 7	150.67	↑
30	<i>CLU</i>	Clu	150.00	↑
31	<i>HIF1A</i>	Hypoxia-inducible factor 1 alpha	150.00	↑
32	<i>PDGFB</i>	Platelet derived growth factor subunit b	150.00	↓
33	<i>TGFBR1</i>	Transforming growth factor beta receptor 1	150.00	↓
34	<i>PTK2B</i>	Protein tyrosine kinase 2 beta	146.73	↑
35	<i>CCL4</i>	C-C motif chemokine 4	142.42	↑
36	<i>C1QC</i>	C1qc	98.68	↑
37	<i>IRF4</i>	Interferon regulatory factor 4	94.954	↓
38	<i>SPI1</i>	Spleen focus forming virus proviral integration oncogene	93.64	↑
39	<i>CCR5</i>	C-C chemokine receptor type 5	82.37	↑
40	<i>CCL3</i>	C-C motif chemokine ligand 3	75.59	↑
41	<i>LGALS3</i>	Galectin-3	51.36	↑
42	<i>CTSL</i>	Cathepsin l	34.00	↑
43	<i>CXCL9</i>	C-X-C motif chemokine 9	33.63	↑
44	<i>CTSD</i>	Cathepsin d	26.73	↑
45	<i>NFKB1</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in b-cells 1	25.93	↑
46	<i>IGF2R</i>	Insulin like growth factor 2 receptor	20.78	↑
47	<i>CX3CR1</i>	C-X3-C motif chemokine receptor1	18.10	↓
48	<i>TLR7</i>	Toll-like receptor 7	16.29	↑
49	<i>CX3CL1</i>	Fractalkine	13.61	↓
50	<i>CD14</i>	Cluster of differentiation 14	13.53	↑
51	<i>CLEC7A</i>	C-type lectin domain containing 7a	7.44	↑
52	<i>BIRC3</i>	Birc3	4.76	↑
53	<i>CXCL5</i>	C-X-C motif chemokine 5	4.61	↑
54	<i>C4B</i>	Complement component 4b	0.00	↑
55	<i>CASP1</i>	Caspase 1	0.00	↑
56	<i>CCL26</i>	C-C motif chemokine 26	0.00	↓
57	<i>CCL9</i>	C-C motif chemokine 9	0.00	↑
58	<i>CLEC4D</i>	Clec4d antigen	0.00	↓
59	<i>CSF1</i>	Macrophage colony stimulating factor 1	0.00	↓
60	<i>CXCL14</i>	C-X-C motif chemokine 14	0.00	↓
61	<i>DAB2</i>	Disabled homolog 2	0.00	↓
62	<i>DOCK1</i>	Dedicator of cytokinesis 1	0.00	↑
63	<i>GPNUMB</i>	Glycoprotein numb	0.00	↓

表 2 (续)

序号	基因	基因全称	介数中心性	上调/下调
64	<i>IFNGR1</i>	Interferon gamma receptor 1	0.00	↓
65	<i>IL6RA</i>	Interleukin 6 receptor	0.00	↓
66	<i>IRF7</i>	Interferon regulatory factor 7	0.00	↑
67	<i>LPL</i>	Lipoprotein lipase	0.00	↑
68	<i>LTF</i>	Lactotransferrin	0.00	↑
69	<i>OASL2</i>	Oasl2	0.00	↑
70	<i>PDGFC</i>	Platelet derived growth factor c	0.00	↓
71	<i>PF4</i>	Platelet factor-4	0.00	↑
72	<i>RUNX3</i>	Runt-related transcription factor 3	0.00	↑
73	<i>SIGLECH</i>	Siglech	0.00	↓
74	<i>SOCS3</i>	Suppressors of cytokine signaling 3	0.00	↓
75	<i>SORL1</i>	Sortilin-related receptor1	0.00	↓
76	<i>SPP1</i>	Secreted phosphoprotein 1	0.00	↑
77	<i>TLR1</i>	Toll-like receptor 1	0.00	↑

“↑”表示上调，“↓”表示下调。

“↑” indicates up-regulation, “↓” indicates down-regulation.



3.5 对 *D*-gal 诱导 BV-2 细胞 mRNA 水平的影响

采用 qRT-PCR 技术检测关键基因 (*CCL2*、*CCL4*、*CXCR4*、*CCR5*、*CXCL10*、*TLR2*、*TLR4*、*TNF*、*IL-1 β*) 的 mRNA 表达。如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组上述 9 个基因 mRNA 表达均升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。与模型组比较, 给予 $50 \mu\text{mol/L}$ 黄芩素可显著降低这 9 种基因的表达。以上结果表明, 黄芩素可显著降低基因 *CCL2*、*CCL4*、*CXCR4*、*CCR5*、*CXCL10*、*TLR2*、*TLR4*、*TNF* 和 *IL-1 β* 的 mRNA 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

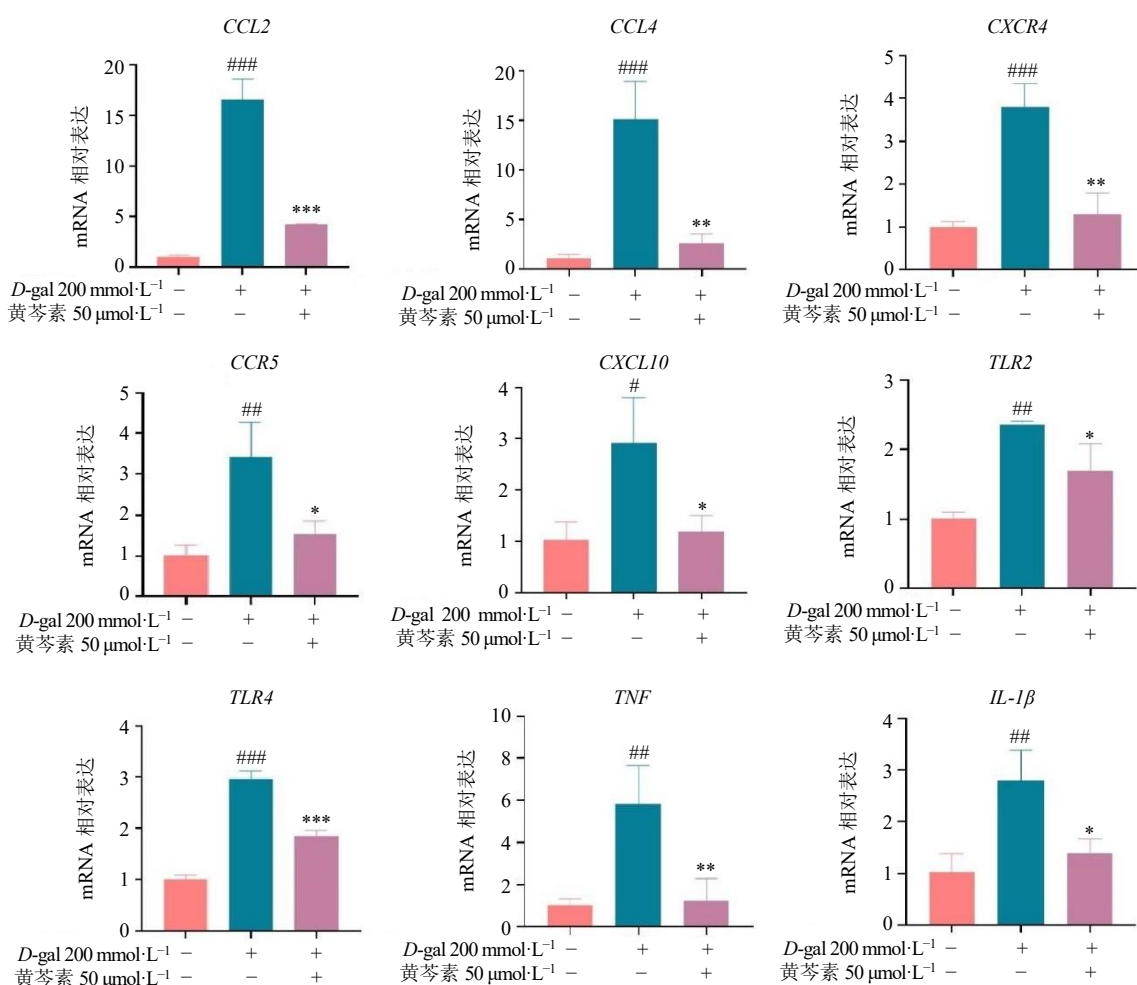
3.6 对 BV-2 细胞中 CXCL10 水平的影响

由于 CXCL10 是 3 种工具预测出的共有差异基因, 且 qRT-PCR 证实有显著变化, 因此进一步验证 CXCL10 在黄芩素延缓小胶质细胞衰老中的作用。

ELISA 结果表明, *D*-gal 可诱导 BV-2 细胞培养上清液中 CXCL10 水平升高, 给予 $50 \mu\text{mol/L}$ 黄芩素可降低 CXCL10 的水平 (图 6-A)。本研究采用外源加入重组蛋白的方法, 进一步验证 CXCL10 在细胞衰老中的潜在作用。结果表明, 125 ng/mL CXCL10 可诱导 BV-2 细胞衰老, 而给予 $50 \mu\text{mol/L}$ 黄芩素可显著降低 CXCL10 引起的细胞衰老 (图 6-B、C)。以上结果表明, 黄芩素可通过抑制 CXCL10 的表达来延缓 BV-2 细胞衰老。

4 讨论

D-gal 是一种还原糖, 在正常情况下会代谢为葡萄糖。然而, *D*-gal 与胺反应生成的产物具有不稳定性, 这种产物可以通过非酶促反应与蛋白质中游离的氨基酸结合, 形成高级糖基化终产物 (advanced

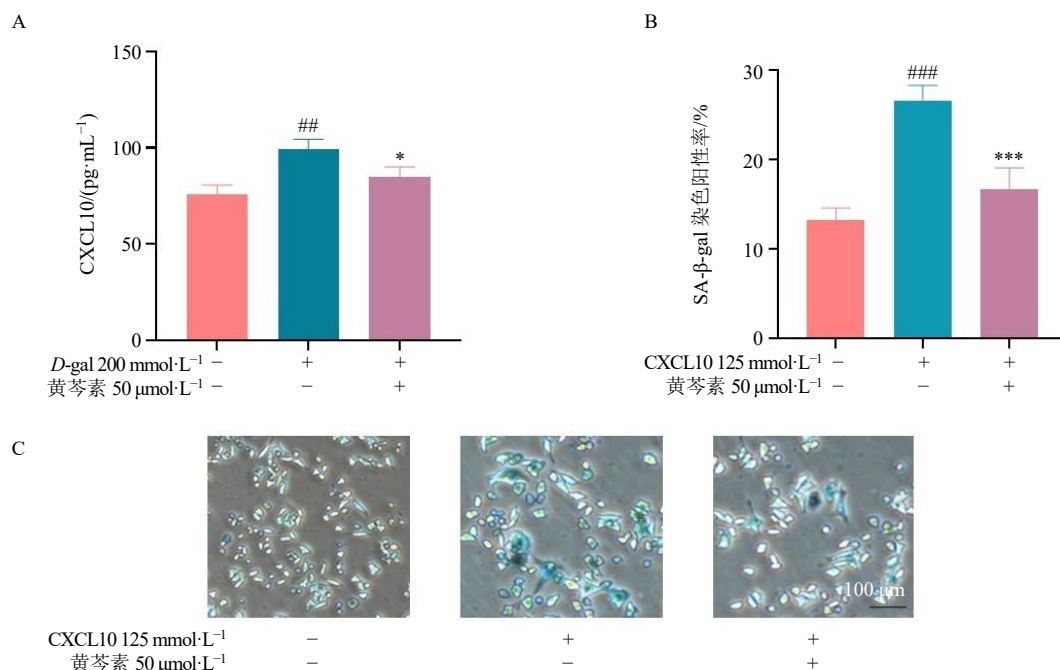


与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图 5 黄芩素对趋化因子及相关因子 mRNA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 5 Effect of baicalein on mRNA levels of chemokines and related genes ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



A-黄芩素对 *D*-gal 诱导 BV-2 细胞 CXCL10 分泌的影响; B-CXCL10 诱导 BV-2 细胞 SA-β-gal 染色阳性率; C-CXCL10 诱导 BV-2 细胞 SA-β-gal 染色代表性图片 (×40); 与对照组比较: ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ 。

A-Baicalein reduces *D*-gal-induced CXCL10 level; B-positive rate of SA-β-gal staining in CXCL10-induced BV-2 cells; C-representative images of SA-β-gal staining (×40); ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图 6 黄芩素对 CXCL10 水平和 CXCL10 诱导 BV-2 细胞衰老的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effects of baicalein on CXCL10 level and CXCL10-induced cell senescence ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

glycosylation end products, AGEs) [36]。当 AGEs 与这些产物的受体结合时,会导致氧自由基和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的形成[37]。通过氧化应激损伤、端粒缩短、免疫性炎症反应、线粒体功能障碍、代谢失调等机制诱导细胞、组织和器官发生应激性衰老和病理性改变[38]。因此, *D*-gal 被广泛用作衰老诱导剂。BV-2 细胞具有一些原代小胶质细胞的形态、表征和功能特征,是一种已经公认的典型神经细胞系,常被作为研究神经退行性疾病的体外模型。因此,选择 *D*-gal 来诱导 BV-2 细胞,建立小胶质细胞衰老模型。

作为中枢神经系统的第一道防线,小胶质细胞在正常情况下呈分枝状并形成密集的网络,维持大脑环境的稳定[39]。在 AD 患者和 AD 小鼠模型的大脑中,小胶质细胞表现出衰老表型[40]。本研究发现, *D*-gal 可诱导小胶质细胞衰老,表现出细胞活力下降、SA-β-gal 阳性细胞数增加、细胞周期停滞以及衰老相关蛋白 p21 和 γH2AX 表达升高,给予黄芩素后可逆转上述现象,表明黄芩素可延缓 *D*-gal 诱导的小胶质细胞衰老。

采用生物信息学方法预测小胶质细胞衰老相关基因,发现小胶质细胞衰老与趋化因子网络密切相关。趋化因子参与神经退行性疾病的发生发展。脑内趋化因子的过度表达将导致神经胶质细胞的招募与激活,发生炎症级联反应[41],导致神经退行性疾病的发生。在 AD 中,趋化因子可诱导并激活小胶质细胞转向促炎或抗炎状态。小胶质细胞可被趋化到机体损伤部位吞噬 Aβ 沉积和 Tau 蛋白,并通过分泌细胞因子、趋化因子产生抗炎或促炎的作用,还可通过旁分泌的形式影响周围细胞功能,改变细胞微环境,引发衰老相关疾病[42]。

衰老的小胶质细胞可以激活 Toll 样受体 (TLR2、TLR4) [43],并产生大量的促炎因子如促炎型趋化因子[44],进一步激活小胶质细胞和星形胶质细胞,引发慢性炎症。本研究发现, *D*-gal 可诱导小胶质细胞中 *CCL2*、*CCL4*、*CXCR4*、*CCR5*、*CXCL10*、*TLR2*、*TLR4*、*TNF*、*IL-1B* 9 个基因 mRNA 的显著上调,而黄芩素能显著降低上述基因的表达。

趋化因子 CCL2 是小胶质细胞激活的关键免疫

调节因子^[45],与胶质细胞衰老密切相关^[46]。研究发现,AD 患者脑内 CCL2 上调,且脑脊液中 CCL2 的浓度可作为诊断 AD 的生物标志物^[47-48]。在 AD 小鼠模型脑内,趋化因子 CCL4 表达升高^[49],CCL4 与其受体 CCR5 结合,可促进 mTORC1 激活并破坏自噬和 Tau 蛋白的清除,还可通过产生 ROS 和炎症反应促进细胞衰老^[50]。CXCR4 的表达与年龄相关^[51],CXCR4 能够调节神经传导、突触可塑性和细胞间通讯。在神经退行性疾病模型中,CXCR4 在神经元、星形胶质细胞、小胶质细胞和巨噬细胞中的表达均上调^[52]。TLR4 介导的促炎因子(如 TNF 和 IL-6)在驱动炎症衰老中起着关键作用^[53],TLR4/NF- κ B 信号通路的激活与 AD 记忆力减退相关^[54]。TLR2 通过调节 p53、p21 和 p16 来促进细胞周期停滞,并通过诱导急性期血清淀粉样蛋白 A1 和 A2 来调节衰老相关分泌表型(SASP)^[55]。IL-1B 是炎症反应的关键介质,参与细胞增殖、分化和凋亡^[56]。TNF 作为一种促炎介质,在老年人体内表达升高,且 TNF 可介导机体代谢变化^[57]。

CXCL10 通过与受体 CXCR3 结合可以促进小脑衰老、诱导细胞凋亡、调节细胞生长、增殖以及突触功能^[58-59]。研究发现,在 AD 患者和相应动物模型的脑脊液和脑组织中都检测到高水平的 CXCL10^[60]。在 APP/PS1 小鼠中发现,CXCR3 缺陷可减少 A β 斑块和斑块周围小胶质细胞的聚集^[61]。本研究发现,CXCL10 可能是小胶质细胞衰老过程中的关键基因,通过外源加入 CXCL10 重组蛋白的方法发现黄芩素可抑制 CXCL10 诱导的 BV-2 细胞衰老。作为 CXCL10 的上游信号,TNF- α 和 IL-1B 可通过 p38 MAPK、JAK/STAT 及 PI3K/AKT 信号通路上调 CXCL10 的表达。此外,TLR4-NF- κ B 也是介导 CXCL10 产生的重要上游信号,可以直接或间接诱导 CXCL10 等趋化因子的产生^[62-63]。因此,黄芩素可能通过上述通路抑制 CXCL10 的产生,但还需进一步验证。

综上,本研究表明,黄芩素可以延缓 D-gal 诱导的 BV-2 小胶质细胞衰老,其作用机制可能与调节 CXCL10 介导的趋化因子网络相关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Rim C, You M J, Nahm M, *et al.* Emerging role of senescent microglia in brain aging-related neurodegenerative diseases [J]. *Transl Neurodegener*,

2024, 13(1): 10.

- [2] Holmannova D, Borsky P, Parova H, *et al.* Non-genomic hallmarks of aging-the review [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(20): 15468.
- [3] Kritsilis M, Rizou S V, Koutsoudaki P N, *et al.* Ageing, cellular senescence and neurodegenerative disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10): 2937.
- [4] Baker D J, Petersen R C. Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: Evidence and perspectives [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(4): 1208-1216.
- [5] Lepiarz-Raba I, Gbadamosi I, Florea R, *et al.* Metabolic regulation of microglial phagocytosis: Implications for Alzheimer's disease therapeutics [J]. *Transl Neurodegener*, 2023, 12(1): 48.
- [6] Samuels J D, Lukens J R, Price R J. Emerging roles for ITAM and ITIM receptor signaling in microglial biology and alzheimer's disease-related amyloidosis [J]. *J Neurochem*, 2023, doi:10.1111/jnc.15981.
- [7] Dadwal S, Heneka M T. Microglia heterogeneity in health and disease [J]. *FEBS Open Bio*, 2024, 14(2): 217-229.
- [8] Gruol D L. The neuroimmune system and the cerebellum [J]. *Cerebellum*, 2023, doi:10.1007/s12311-023-01624-3.
- [9] Thakolwiboon S, Mills E A, Yang J, *et al.* Immunosenescence and multiple sclerosis: Inflammaging for prognosis and therapeutic consideration [J]. *Front Aging*, 2023, 4: 1234572.
- [10] Fang S Y, Wu Z B, Guo Y L, *et al.* Roles of microglia in adult hippocampal neurogenesis in depression and their therapeutics [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1193053.
- [11] Nagayach A, Wang C R. Autophagy in neural stem cells and glia for brain health and diseases [J]. *Neural Regen Res*, 2024, 19(4): 729-736.
- [12] Wendimu M Y, Hooks S B. Microglia phenotypes in aging and neurodegenerative diseases [J]. *Cells*, 2022, 11(13): 2091.
- [13] Wang Q Q, Duan L Y, Li X F, *et al.* Glucose metabolism, neural cell senescence and Alzheimer's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(8): 4351.
- [14] Latham A S, Moreno J A, Geer C E. Biological agents and the aging brain: Glial inflammation and neurotoxic signaling [J]. *Front Aging*, 2023, 4: 1244149.
- [15] Ahearn O C, Watson M N, Rawls S M. Chemokines, cytokines and substance use disorders [J]. *Drug Alcohol Depend*, 2021, 220: 108511.
- [16] Zhang Z J, Jiang B C, Gao Y J. Chemokines in neuron-glial cell interaction and pathogenesis of neuropathic pain [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(18): 3275-3291.
- [17] Wojcieszak J, Kuczyńska K, Zawilska J B. Role of chemokines in the development and progression of

- alzheimer's disease [J]. *J Mol Neurosci*, 2022, 72(9): 1929-1951.
- [18] Cornell J, Salinas S, Huang H Y, *et al*. Microglia regulation of synaptic plasticity and learning and memory [J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(4): 705-716.
- [19] Dinda B, Dinda M, Dinda S, *et al*. An overview of anti-SARS-CoV-2 and anti-inflammatory potential of baicalein and its metabolite baicalin: Insights into molecular mechanisms [J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 258: 115629.
- [20] Mokhtari T, Azizi M, Sheikhabaei F, *et al*. Plant-derived antioxidants for management of COVID-19: A comprehensive review of molecular mechanisms [J]. *Tanaffos*, 2023, 22(1): 27-39.
- [21] Bie B B, Sun J, Guo Y, *et al*. Baicalein: A review of its anti-cancer effects and mechanisms in hepatocellular carcinoma [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93: 1285-1291.
- [22] Liang W, Huang X B, Chen W Q. The effects of baicalin and baicalein on cerebral ischemia: A review [J]. *Aging Dis*, 2017, 8(6): 850-867.
- [23] Ma Y F, Ma Z M, Zhang Y Y, *et al*. Apigenin and baicalein ameliorate thoracic aortic structural deterioration and cognitive deficit via inhibiting AGEs/RAGE/NF- κ B pathway in D-galactose-induced aging rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 976: 176660.
- [24] Xu X F, Sun X H, Wan X L, *et al*. Mitomycin induces alveolar epithelial cell senescence by down-regulating GSK3 β signaling [J]. *Toxicol Lett*, 2021, 352: 61-69.
- [25] Duan D D, Wang K X, Zhou Y Z, *et al*. Baicalein exerts beneficial effects in d-galactose-induced aging rats through attenuation of inflammation and metabolic dysfunction [J]. *Rejuvenation Res*, 2017, 20(6): 506-516.
- [26] Gao L, Li J Q, Zhou Y Z, *et al*. Effects of baicalein on cortical proinflammatory cytokines and the intestinal microbiome in senescence accelerated mouse prone 8 [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2018, 9(7): 1714-1724.
- [27] Gao L, Zheng W G, Wu X K, *et al*. Baicalein delays H₂O₂-induced astrocytic senescence through inhibition of senescence-associated secretory phenotype (SASP), suppression of JAK2/STAT1/NF- κ B pathway, and regulation of leucine metabolism [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2021, 12(13): 2320-2335.
- [28] Gao L, Yang W Y, Qi H, *et al*. Unveiling the anti-senescence effects and senescence-associated secretory phenotype (SASP) inhibitory mechanisms of *Scutellaria baicalensis* Georgi in low glucose-induced astrocytes based on Boolean network [J]. *Phytomedicine*, 2022, 99: 153990.
- [29] González-Gualda E, Baker AG, Fruk L, *et al*. A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo [J]. *FEBS J*, 2021, 288(1): 56-80.
- [30] Marschallinger J, Iram T, Zardeneta M, *et al*. Lipid-droplet-accumulating microglia represent a dysfunctional and proinflammatory state in the aging brain [J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23(2): 194-208.
- [31] Srinivasan K, Friedman B A, Etxeberria A, *et al*. Alzheimer's patient microglia exhibit enhanced aging and unique transcriptional activation [J]. *Cell Rep*, 2020, 31(13): 107843.
- [32] Hammond T R, Dufort C, Dissing-Olesen L, *et al*. Single-cell RNA sequencing of microglia throughout the mouse lifespan and in the injured brain reveals complex cell-state changes [J]. *Immunity*, 2019, 50(1): 253-271.e6.
- [33] Lopes K P, Snijders G J L, Humphrey J, *et al*. Genetic analysis of the human microglial transcriptome across brain regions, aging and disease pathologies [J]. *Nat Genet*, 2022, 54(1): 4-17.
- [34] Pettas S, Karagianni K, Kanata E, *et al*. Profiling microglia through single-cell RNA sequencing over the course of development, aging, and disease [J]. *Cells*, 2022, 11(15): 2383.
- [35] Boche D, Gordon M N. Diversity of transcriptomic microglial phenotypes in aging and alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2022, 18(2): 360-376.
- [36] 马亚飞. 苦参总黄酮对 D-半乳糖致神经细胞衰老的改善作用及相关机制 [J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(4): 917-921.
- [37] Azman K F, Zakaria R. D-Galactose-induced accelerated aging model: An overview [J]. *Biogerontology*, 2019, 20(6): 763-782.
- [38] 刘不悔, 何伟明, 万毅刚, 等. 虫草菌丝抑制自噬相关 AMPK/ULK1 信号活性改善肾小管上皮细胞衰老的分子机制 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(6): 1258-1265.
- [39] Colonna M, Butovsky O. Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration [J]. *Annu Rev Immunol*, 2017, 35: 441-468.
- [40] Navarro V, Sanchez-Mejias E, Jimenez S, *et al*. Microglia in alzheimer's disease: Activated, dysfunctional or degenerative [J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10: 140.
- [41] Lindsay H G, Hendrix C J, Gonzalez Murcia J D, *et al*. The role of atypical chemokine receptors in neuroinflammation and neurodegenerative disorders [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(22): 16493.
- [42] Wei L, Yang X W, Wang J, *et al*. H3K18 lactylation of senescent microglia potentiates brain aging and alzheimer's disease through the NF κ B signaling pathway

- [J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20(1): 208.
- [43] Okun E, Griffioen K J, Lathia J D, *et al.* Toll-like receptors in neurodegeneration [J]. *Brain Res Rev*, 2009, 59(2): 278-292.
- [44] Harry G J. Microglia during development and aging [J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 139(3): 313-326.
- [45] Gao F, Zhang P F, Gao J, *et al.* The CCL2 rs4586 SNP is associated with slower amyloid- β deposition and faster tau accumulation of alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2022, 90(4): 1647-1657.
- [46] Dai L B, Gao F, Wang Q, *et al.* Molecules of senescent glial cells differentiate alzheimer's disease from ageing [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2023, 94(7): 550-559.
- [47] Madrigal J L M, Caso J R. The chemokine (C-C motif) ligand 2 in neuroinflammation and neurodegeneration [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 824: 209-219.
- [48] Griciuc A, Federico A N, Natasan J, *et al.* Gene therapy for alzheimer's disease targeting CD33 reduces amyloid beta accumulation and neuroinflammation [J]. *Hum Mol Genet*, 2020, 29(17): 2920-2935.
- [49] Festa B P, Siddiqi F H, Jimenez-Sanchez M, *et al.* Microglial-to-neuronal CCR5 signaling regulates autophagy in neurodegeneration [J]. *Neuron*, 2023, 111(13): 2021-2037.e12.
- [50] Chang T T, Lin L Y, Chen C, *et al.* CCL4 contributes to aging related angiogenic insufficiency through activating oxidative stress and endothelial inflammation [J]. *Angiogenesis*, 2024, 27(3): 475-499.
- [51] Sanfilippo C, Castrogiovanni P, Imbesi R, *et al.* Postsynaptic damage and microglial activation in AD patients could be linked CXCR4/CXCL12 expression levels [J]. *Brain Res*, 2020, 1749: 147127.
- [52] Li H Y, Wang R. A focus on CXCR4 in alzheimer's disease [J]. *Brain Circ*, 2017, 3(4): 199-203.
- [53] Panda A, Arjona A, Sapey E, *et al.* Human innate immunosenescence: Causes and consequences for immunity in old age [J]. *Trends Immunol*, 2009, 30(7): 325-333.
- [54] Kim H J, Kim H, Lee J H, *et al.* Toll-like receptor 4 (TLR4): New insight immune and aging [J]. *Immun Ageing*, 2023, 20(1): 67.
- [55] Hari P, Millar F R, Tarrats N, *et al.* The innate immune sensor Toll-like receptor 2 controls the senescence-associated secretory phenotype [J]. *Sci Adv*, 2019, 5(6): eaaw0254.
- [56] Tylutka A, Walas Ł, Zembron-Lacny A. Level of IL-6, TNF, and IL-1 β and age-related diseases: A systematic review and meta-analysis [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1330386.
- [57] Rea I M, Gibson D S, McGilligan V, *et al.* Age and age-related diseases: Role of inflammation triggers and cytokines [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 586.
- [58] Liu M L, Guo S C, Hibbert J M, *et al.* CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2011, 22(3): 121-130.
- [59] Su X, Xie L, Li J, *et al.* Exploring molecular signatures related to the mechanism of aging in different brain regions by integrated bioinformatics [J]. *Front Mol Neurosci*, 2023, 16: 1133106.
- [60] Guedes J R, Lao T T, Cardoso A L, *et al.* Roles of microglial and monocyte chemokines and their receptors in regulating alzheimer's disease-associated amyloid- β and tau pathologies [J]. *Front Neurol*, 2018, 9: 549.
- [61] Krauthausen M, Kummer M P, Zimmermann J, *et al.* CXCR3 promotes plaque formation and behavioral deficits in an alzheimer's disease model [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(1): 365-378.
- [62] Wang Z C, Ao X, Shen Z L, *et al.* TNF- α augments CXCL10/CXCR3 axis activity to induce Epithelial-Mesenchymal Transition in colon cancer cell [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(11): 2683-2702.
- [63] 盛琪, 童瑾. CXCL10/CXCR3 轴在急性呼吸窘迫综合征中的作用 [J]. *基础医学与临床*, 2024, 44(6): 892-896.

[责任编辑 罗 曦]