

远志皂苷元缓解脂多糖诱导的小鼠小胶质细胞炎症反应的机制

穆秉桃¹, 郭敏芳¹, 于婧文¹, 曹佳蕾², 杨凤君², 贾思玮³, 苏琴³, 孟涛¹, 马存根³, 尉杰忠^{1,4*}, 宋丽娟^{3*}

¹山西大同大学脑科学研究所/分子细胞免疫学大同市重点实验室, 山西大同 037009; ²山西大同大学医学院, 山西大同 037009; ³山西中医药大学国家中医药管理局多发性硬化益气活血重点研究室/神经生物学研究中心, 山西晋中 030619; ⁴大同市第五人民医院神经内科, 山西大同 037009

[中图分类号] R742; R285.5 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0199.2024.0906

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 穆秉桃, 郭敏芳, 于婧文, 等. 远志皂苷元缓解脂多糖诱导的小鼠小胶质细胞炎症反应的机制[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(2): 188-196.

[收稿日期] 2024-02-20 [录用日期] 2024-04-12 [上线日期] 2024-09-06

[摘要] **目的** 探究远志皂苷元(SEN)通过核转录因子E2相关因子2(Nrf2)/NOD样受体蛋白3(NLRP3)通路缓解小鼠小胶质细胞炎症反应的机制。**方法** 将BV2小鼠小胶质细胞随机分为对照组、模型组、SEN组与MCC950组。对照组细胞不做处理, 模型组细胞加入1 μg/ml脂多糖(LPS), SEN组细胞加入1 μg/ml LPS + 4 μmol/L SEN, MCC950组加入1 μg/ml LPS + 10 μmol/L MCC950, 作用24 h。采用CCK-8法检测不同浓度SEN对BV2细胞活力的影响。采用Griess法测定上清液一氧化氮(NO)释放量; 实时荧光定量PCR测定NLRP3、淋巴细胞凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、胱天蛋白酶-1(caspase-1)、白细胞介素(IL)-1β和IL-18 mRNA的表达水平; 免疫荧光染色检测ASC、IL-1β、Nrf2和血红素加氧酶-1(HO-1)的表达水平; Western blotting检测NLRP3、caspase-1、ASC、IL-1β、IL-18、Nrf2、HO-1及核因子κB(NF-κB)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达水平。**结果** CCK-8法检测结果显示, 2~20 μmol/L SEN处理的BV2细胞活力与对照组差异无统计学意义($P>0.05$)。与对照组比较, 模型组BV2细胞活力明显下降($P<0.05$); 与模型组比较, 4 μmol/L SEN组BV2细胞活力明显恢复($P<0.05$)。Griess法检测结果显示, 与对照组比较, 模型组细胞NO释放量明显增加($P<0.01$); 实时荧光定量PCR和Western blotting检测结果显示, 与对照组比较, 模型组细胞NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1β和IL-18 mRNA和蛋白表达水平均明显增高($P<0.05$); 免疫荧光染色结果显示, 与对照组比较, 模型组细胞iNOS、NF-κB蛋白表达水平增高, Nrf2和HO-1表达水平下降, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较, SEN组和MCC950组细胞NO释放量减少, NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1β、IL-18 mRNA和蛋白表达水平降低, 差异均有统计学意义($P<0.05$); SEN组iNOS和NF-κB表达水平降低, 免疫荧光染色显示Nrf2易位到核内, Nrf2和HO-1蛋白表达明显增多, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** SEN可缓解LPS诱导的小鼠小胶质细胞炎症反应, 抑制NLRP3炎性小体的活化和表达, 效果与炎性小体抑制剂MCC950相当; 其机制可能与调控上游因子Nrf2和HO-1的表达有关。

[关键词] 远志皂苷元; 脂多糖; 小胶质细胞; NLRP3炎性小体; 炎症反应**Mechanism of senegenin in improving lipopolysacchride-induced inflammatory response of BV2 microglial cell**Mu Bing-Tao¹, Guo Min-Fang¹, Yu Jing-Wen¹, Cao Jia-Lei², Yang Feng-Jun², Jia Si-Wei³, Su Qing³, Meng Tao¹, Ma Cun-Gen³, Yu Jie-Zhong^{1,4*}, Song Li-Juan^{3*}

¹Institute of Brain Science, Shanxi Datong University/the Key Laboratory of Molecular Cellular Immunology in Datong, Datong, Shanxi 037009, China

²School of Medicine, Shanxi Datong University, Datong, Shanxi 037009, China

³The Key Research Laboratory of Benefiting Qi for Acting Blood Circulation Method to Treat Multiple Sclerosis of State Administration

[基金项目] 国家自然科学基金(82004028); 山西省中医重点实验室建设项目(zyyjys2024027); 山西省“四个一批”科技兴医创新计划项目(2022XM33); 山西省卫健委中医药科研课题立项计划(2022ZYCY090); 山西省中医药管理局科研课题(2023ZYBY2042)

[作者简介] 穆秉桃, 医学硕士, 讲师, 主要从事神经免疫方面的研究

[通信作者] 尉杰忠, E-mail: sxdtyjz@qq.com; 宋丽娟, E-mail: slj_0354@126.com

of Traditional Chinese Medicine/Research Center of Neurobiology, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong, Shanxi 030619, China

⁴Department of Neurology, Datong Fifth People's Hospital, Datong, Shanxi 037009, China

^{*}Corresponding author. Yu Jie-Zhong, E-mail: sxdtjz@qq.com; Song Li-Juan, E-mail: slj_0354@126.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82004028), the Project of Key Research Laboratory of Traditional Chinese Medicine of Shanxi Province (zyyyjs2024027), the "Four Batches" Science and Technology Innovation Plan Project of Shanxi Province (2022XM33), the Chinese Medicine Scientific Research Project Establishment Plan of Shanxi Provincial Health Commission (2022ZYC090), and the Traditional Chinese Medicine Research Project of Shanxi Province (2023ZYB2042)

[Abstract] Objective To investigate the mechanism by which Senegenin (SEN) alleviates microglial inflammatory response through the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) pathway. **Methods** BV2 mouse microglia cells were randomly divided into control group, model group, SEN group and MCC950 group. Cells in control group were not treated, and cells in model group were added with 1 $\mu\text{g/ml}$ lipopolysaccharide (LPS); Cells in SEN group were added with 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS+4 $\mu\text{mol/L}$ SEN, and cells in MCC950 group were added with 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ MCC950 for 24 hours. CCK-8 method was used to detect the effect of different concentrations of SEN on the viability of BV2 cells. Griess method was used to determine the release amount of nitric oxide (NO) in the supernatant. Real-time fluorescent quantitative PCR was used to determine the mRNA expression levels of NLRP3, lymphocyte apoptosis-associated spect-like protein containing a CARD (ASC), caspase-1, interleukin (IL)-1 β and IL-18 mRNA. Immunofluorescence staining was used to detect the expression levels of ASC, IL-1 β , Nrf2 and heme oxygenase-1 (HO-1). Western blotting was used to detect the expression levels of NLRP3, caspase-1, ASC, IL-1 β , IL-18, Nrf2, HO-1, nuclear factor kappa B (NF- κ B) and inducible nitric oxide synthase (iNOS). **Results** The results of CCK-8 method showed that there was no significant difference in the viability of BV2 cells treated with 2~20 $\mu\text{mol/L}$ SEN compared with control group ($P>0.05$). Compared with control group, the viability of BV2 cells in model group decreased significantly ($P<0.05$). Compared with model group, the viability of BV2 cells in 4 $\mu\text{mol/L}$ SEN group was significantly restored ($P<0.05$). Compared with control group, the results of Griess method showed that the release amount of NO in cells of model group increased significantly ($P<0.05$); the results of real-time PCR showed that the expression levels of NLRP3, ASC, caspase-1, IL-1 β and IL-18 mRNA in cells of model group increased significantly ($P<0.05$); the results of Western blotting showed that the protein expression levels of NLRP3, ASC, caspase-1, IL-1 β and IL-18 proteins in cells of model group increased significantly ($P<0.05$), and the immunofluorescence staining results showed that the expression levels of iNOS and NF- κ B protein in cells of model group increased, and the expression levels of Nrf2 and HO-1 decreased, with statistically significant differences ($P<0.05$). Compared with model group, the release amount of NO in cells of SEN group and MCC950 group decreased, and the expression levels of NLRP3, ASC, caspase-1, IL-1 β and IL-18 mRNA and proteins decreased, with statistically significant differences ($P<0.05$); in the SEN group, the expression levels of iNOS and NF- κ B decreased, and immunofluorescence staining showed that Nrf2 was translocated into the nucleus, and the expression levels of Nrf2 and HO-1 proteins increased significantly, with statistically significant differences ($P<0.05$). **Conclusions** SEN could alleviate the inflammatory response of mouse microglia cells induced by LPS and inhibit the activation and expression of NLRP3 inflammasome, with an effect comparable to that of the inflammasome inhibitor MCC950. The mechanism may be related to the regulation of the expression of upstream factors Nrf2 and HO-1.

[Key words] senegenin; lipopolysaccharides; BV2 cells; NLRP3 inflammasome; inflammatory response

神经炎症在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森病(Parkinson's disease, PD)和多发性硬化(multiple sclerosis, MS)等神经退行性疾病的发病机制中均占据核心地位^[1]。小胶质细胞是神经系统常驻免疫细胞以及免疫反应的第一道防线,其介导的炎症反应机制一直是研究的焦点^[2-4]。远志皂苷元(senegenin, SEN)是从中药远志根部提取的活性成分,属于五环三萜类化合物,具有拮抗痴呆、衰老、感染、氧化应激等作用^[5]。研究显示,SEN可拮抗AD患者的 β -淀粉样蛋白(amyloid β -protein, A β)毒性,具有保护神经元的作用^[6]。袁惠莉等^[7]发现,SEN对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的PD模型大鼠黑质小胶质细胞具有抑炎作用。但SEN的抑

炎和神经保护作用机制尚不清楚。另有研究显示,SEN可抑制小胶质细胞的NOD样受体蛋白3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)炎性小体活化^[8],并可能通过激活核转录因子E2相关因子2(nuclear transcription factor E2-related factor 2, Nrf2)信号通路减缓氧化应激反应^[9-10]。由此推测SEN的抑炎和神经保护作用可能与调控Nrf2信号通路激活及抑制NLRP3炎性小体活化有关。MCC950是一种NLRP3炎性小体特异性抑制剂,可阻断NLRP3炎性小体参与的各类炎症反应^[11]。本研究采用LPS诱导BV2小鼠小胶质细胞炎性损伤,并应用SEN进行干预,从激活Nrf2信号通路、抑制NLRP3炎性小体活化、阻断炎症级联反应的角度,探究SEN对神经元的保护作用

及其机制；同时以MCC950为阳性对照，比较SEN对NLRP3炎性小体的抑制效果，以期对神经退行性疾病的防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料 BV2小鼠小胶质细胞株由军事医学研究院军事认知与脑科学研究所提供。SEN购自中国药品生物制品检定所(货号111572)；青霉素-链霉素混合液(批号15140163)、高糖DMEM(货号21013024)购自美国Sigma-Aldrich公司；LPS(货号L43910)、牛血清白蛋白(货号B2064)购自美国Gibco公司；兔抗Nrf2(货号ab62352)、血红素加氧酶-1(HO-1)(货号ab13243)、白细胞介素(interleukin, IL)-1 β (货号ab9722)、核因子 κ B(NF- κ B)(货号ab16502)抗体，Alexa Flour[®]594(货号ab150080)、以及Alexa Flour[®]488(货号ab150077)、辣根过氧化物酶(货号ab205718)标记的山羊抗兔IgG二抗购自美国Abcam公司；兔抗NLRP3(货号af2155)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC；货号af6234)、胱天蛋白酶-1(caspase-1；货号af1681)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS；货号af728)抗体，以及一氧化氮(NO)检测试剂盒、RIPA裂解液(货号P0013B)购自上海碧云天有限责任公司；兔抗IL-18(货号57058S)、GAPDH(货号5174S)抗体，以及化学发光底物试剂(WBKLS0500)购自美国Millipore公司；PCR反应试剂盒(货号M120201S)购自莫纳生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、分组及镜下形态观察 BV2小鼠小胶质细胞用10%胎牛血清(加入1%青霉素和链霉素双抗)配制的DMEM培养基，于5%CO₂、37℃培养箱常规培养，隔天换液一次，待细胞融合度达80%后用0.25%胰酶处理传代，取对数生长期细胞随机分为对照组、模型组、SEN组3组，以及对照组、模型组、SEN组、MCC950组4组分别进行观察。对照组细胞不做处理，模型组细胞加入1 μ g/ml LPS，SEN组细胞同时加入4 μ mol/L SEN和1 μ g/ml LPS，MCC950组细胞同时加入10 μ mol/L MCC950和1 μ g/ml LPS，处理24 h^[12-13]。显微镜下观察BV2细胞形态改变并拍照记录。

1.2.2 CCK-8法检测SEN处理后BV2细胞活力及筛选SEN的有效浓度 以4 \times 10³个/孔密度接种BV2细胞到96孔板，100 μ l/孔。第一板设空白组、对照组、SEN各浓度组(终浓度分别为2、4、10、20、40、80、160、300 μ mol/L)，第二板设空白组、对照组、模型组、SEN各浓度组(终浓度分别为4、10、20、40、80、160 μ mol/L)，每组设5个复孔。空白组只有培养液，对照组为细胞和培养液，模型组加

入1 μ g/ml LPS，SEN组同时加入1 μ g/ml LPS和各浓度SEN。处理24 h后添加10 μ l CCK-8到每孔中，然后置于培养箱孵育约1.5 h，然后采用酶标仪在450 nm波长处测定吸光度(A)值，根据公式计算细胞存活率。

1.2.3 Griess法检测上清液中一氧化氮(nitric oxide, NO)释放量 以5 \times 10³个/孔密度接种BV2细胞到96孔板，按1.2.1的细胞分组给药方案给予对应药物分组处理24 h后收集细胞上清液。按要求加入Griess Reagent I和II的相应溶液，用酶标仪测定540 nm处的吸光度值，将其代入标准曲线中计算NO释放量。

1.2.4 实时荧光定量PCR检测细胞炎性因子mRNA的表达水平 以每组两个复孔接种BV2细胞到6孔板，按1.2.1的细胞分组给药方案加对应药物处理24 h，然后加入500 μ l Monzol Reagent Pro试剂，依据说明书提取RNA，并将RNA反转录为cDNA，以GAPDH为内参，测定NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1 β 、IL-18 mRNA的相对表达水平，结果以2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法表示。PCR引物序列见表1。

表1 PCR引物序列

Tab.1 Primer sequences for PCR

基因	引物序列(5'→3')
NLRP3	正义: GCTGCGATCAACAGGCGAGAC
	反义: CCATCCACTCTTCTCAAGGCTGTC
ASC	正义: GATCAAGGAGGTAAGCGGCA
	反义: CACTCCGGTTCTGGTTCTGG
Caspase-1	正义: CCCCAGGCAAGCCAAATC
	反义: TGAGGGTCCCAGTCAGTCC
IL-1 β	正义: GGCTGGACTGTTTCTAATGC
	反义: ATGGTTTCTTGTGACCCTGA
IL-18	正义: ACACGCTTACTTTATACCT
	反义: GTCACAGCCAGTCCTCT
GAPDH	正义: TGTTTCCTCGTCCCCTAG
	反义: CAATCTCCACTTTGCCACT

NLRP3. NOD样受体蛋白3; ASC. 凋亡相关斑点样蛋白; caspase-1. 胱天蛋白酶-1; IL-1 β . 白细胞介素-1 β ; IL-18. 白细胞介素-18

1.2.5 Western blotting 检测 Nrf2、HO-1、NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1 β 、IL-18、NF- κ B、iNOS蛋白表达水平 以1 \times 10⁶个/孔密度接种BV2细胞到6孔板，按1.2.1中的各组细胞给药方案给予对应药物处理24 h。用RIPA裂解液裂解细胞收集标本，按说明将各组蛋白含量调成一致。在80 V、30 min，110 V、120 min条件下进行电泳分离蛋白，转膜2 h，然后5%脱脂奶粉室温封闭2 h，加入Nrf2、HO-1、NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1 β 、IL-18、NF- κ B、

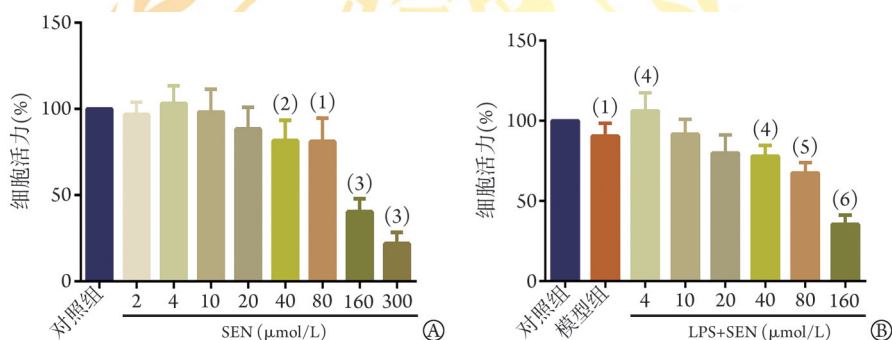
iNOS 和 GAPDH(1:1000)一抗, 4 °C 孵育过夜; 次日加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:3000), 避光条件下常温孵育 2 h, 使用 Bio-Rad 凝胶成像仪显影后对蛋白条带进行定量分析。

1.2.6 免疫荧光染色观察 Nrf2、HO-1、NLRP3、IL-1 β 的表达水平 将细胞接种在 24 孔板底部的圆形玻璃爬片上, 密度为 2×10^4 个/孔。按 1.2.1 中的细胞分组和给药方案给予对应的药物处理 24 h 后弃去上清液, 将细胞固定, 先用 PBS 清洗, 再加入含有 1% BSA 和 0.3% TritonX-100 的 PBS 液封闭 1 h, 加入 Nrf2、HO-1、NLRP3、IL-1 β 一抗(1:1000)4 °C 孵育过夜, 次日加入 Alex Fluor[®]594(红色)和 Alexa Fluor[®]488(绿色)标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:3000), 避光条件下常温孵育 2 h, PBS 清洗, 最后滴加 DAPI 封片, 在激光共聚焦显微镜下观察。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计分析。计量资料均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 Dunnett-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SEN 对 BV2 小鼠小胶质细胞活力的影响 CCK-8 法检测结果显示, 与对照组比较, 2~20 $\mu\text{mol/L}$ SEN 处理的 BV2 细胞活力无明显变化($P > 0.05$), 而 40~300 $\mu\text{mol/L}$ SEN 处理的 BV2 细胞活力明显下降($P < 0.01$, 图 1A)。与对照组比较, 模型组 BV2 细胞活力明显下降($P < 0.05$); 与模型组比较, 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS+4 $\mu\text{mol/L}$ SEN 组 BV2 细胞活力恢复明显($P < 0.05$, 图 1B)。故后续选用 4 $\mu\text{mol/L}$ SEN 进行实验。



SEN. 远志皂苷元; LPS. 脂多糖; A. SEN 对 BV2 细胞活力的影响; B. SEN 对 LPS 处理后 BV2 细胞活力恢复的影响; 与对照组比较, (1) $P < 0.05$, (2) $P < 0.01$, (3) $P < 0.001$; 与模型组比较, (4) $P < 0.05$, (5) $P < 0.01$, (6) $P < 0.001$

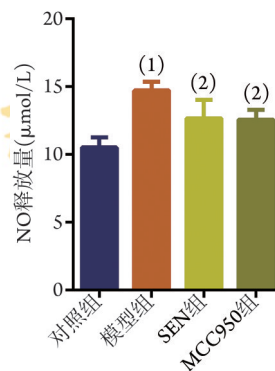
图 1 SEN 对 BV2 小鼠小胶质细胞活力的影响

Fig.1 Effects of SEN on BV2 mouse microglial cell viability

2.2 SEN 和 MCC950 对 LPS 诱导的 BV2 细胞 NO 释放量的影响 Griess 法检测结果显示, 与对照组比较, 模型组细胞在 LPS 作用后 NO 释放量明显增多($P < 0.01$); 与模型组比较, SEN 组和 MCC950 组 NO 释放量明显减少($P < 0.05$); SEN 组与 MCC950 组 NO 释放量比较差异无统计学意义($P > 0.05$, 图 2)。

2.3 SEN 和 MCC950 对 LPS 诱导的 BV2 细胞形态的影响 显微镜下观察显示, 对照组 BV2 小胶质细胞胞体较小而圆润、胞质清亮, 细胞突起边缘清晰; 模型组 BV2 小胶质细胞胞体变大、触角延伸变粗变长, 突起末端分支变多, 呈阿米巴样; SEN 组和 MCC950 组阿米巴样细胞数量明显减少, 细胞形态接近对照组(图 3)。

2.4 SEN 和 MCC950 对炎症因子 mRNA 表达的影响 实时荧光定量 PCR 检测结果显示, 与对照组比较, 模型组 BV2 细胞 NLRP3、ASC、*caspase-1*、*IL-1 β* 和 *IL-18* mRNA 表达水平均明显升高($P < 0.001$); 与模型组比较, SEN 组和 MCC950 组 BV2 细胞 NLRP3、



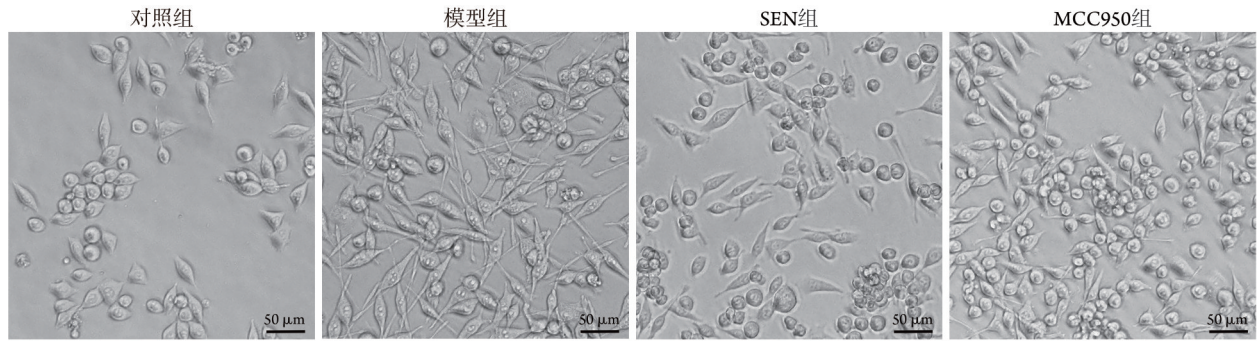
SEN. 远志皂苷元; MCC950. 一种 NLRP3 炎性小体拮抗剂; 与对照组比较, (1) $P < 0.01$, 与模型组比较, (2) $P < 0.05$

图 2 SEN 和 MCC950 对脂多糖诱导的 BV2 小鼠小胶质细胞 NO 释放量的影响

Fig.2 Effects of SEN and MCC950 on LPS-induced NO release from BV2 mouse microglial cells

ASC、*caspase-1*、*IL-1 β* 和 *IL-18* mRNA 表达水平明显降低($P < 0.01$)(图 4)。

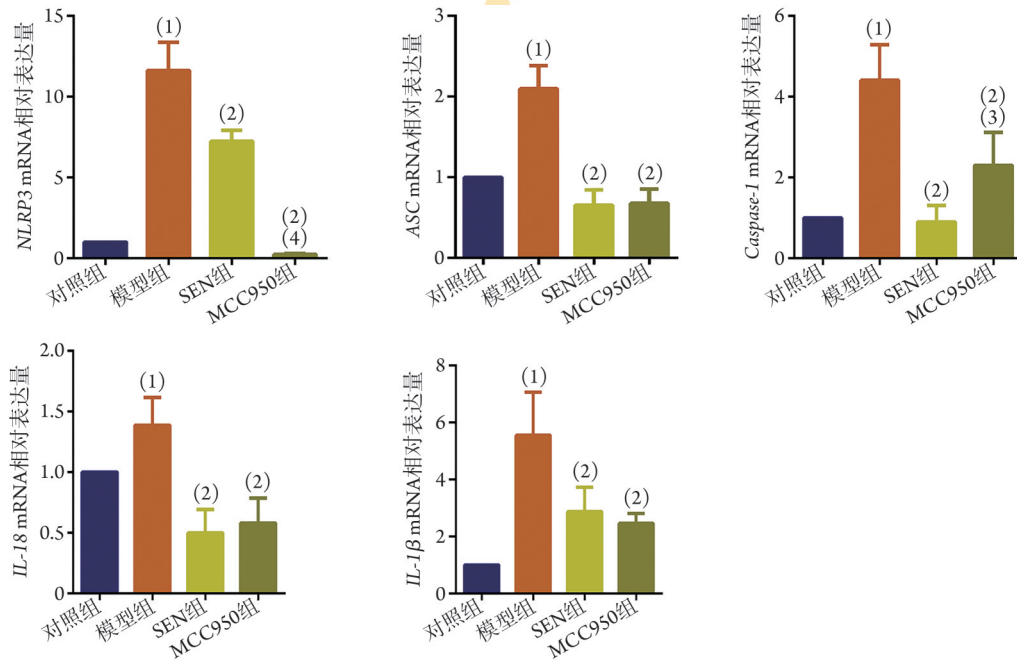
2.5 SEN 和 MCC950 对 LPS 诱导的 BV2 细胞炎性小



SEN. 远志皂苷元; MCC950. 一种NLRP3炎性小体拮抗剂

图3 SEN和MCC950对脂多糖诱导的BV2小鼠小胶质细胞形态的影响

Fig.3 Effect of SEN and MCC950 on the morphology of LPS-induced BV2 mouse microglial cells



SEN. 远志皂苷元; MCC950. 一种NLRP3炎性小体拮抗剂; NLRP3. NOD样受体蛋白3; ASC. 凋亡相关斑点样蛋白; caspase-1. 胱天蛋白酶-1; IL-18. 白细胞介素-18; IL-1β. 白细胞介素-1β; 与对照组比较, (1) $P<0.001$; 与模型组比较, (2) $P<0.01$; 与SEN组比较, (3) $P<0.05$, (4) $P<0.001$

图4 SEN和MCC950对脂多糖诱导的BV2小鼠小胶质细胞炎症因子mRNA表达的影响

Fig.4 Effect of SEN and MCC950 on LPS-induced inflammatory factor mRNA expression in BV2 mouse microglial cells

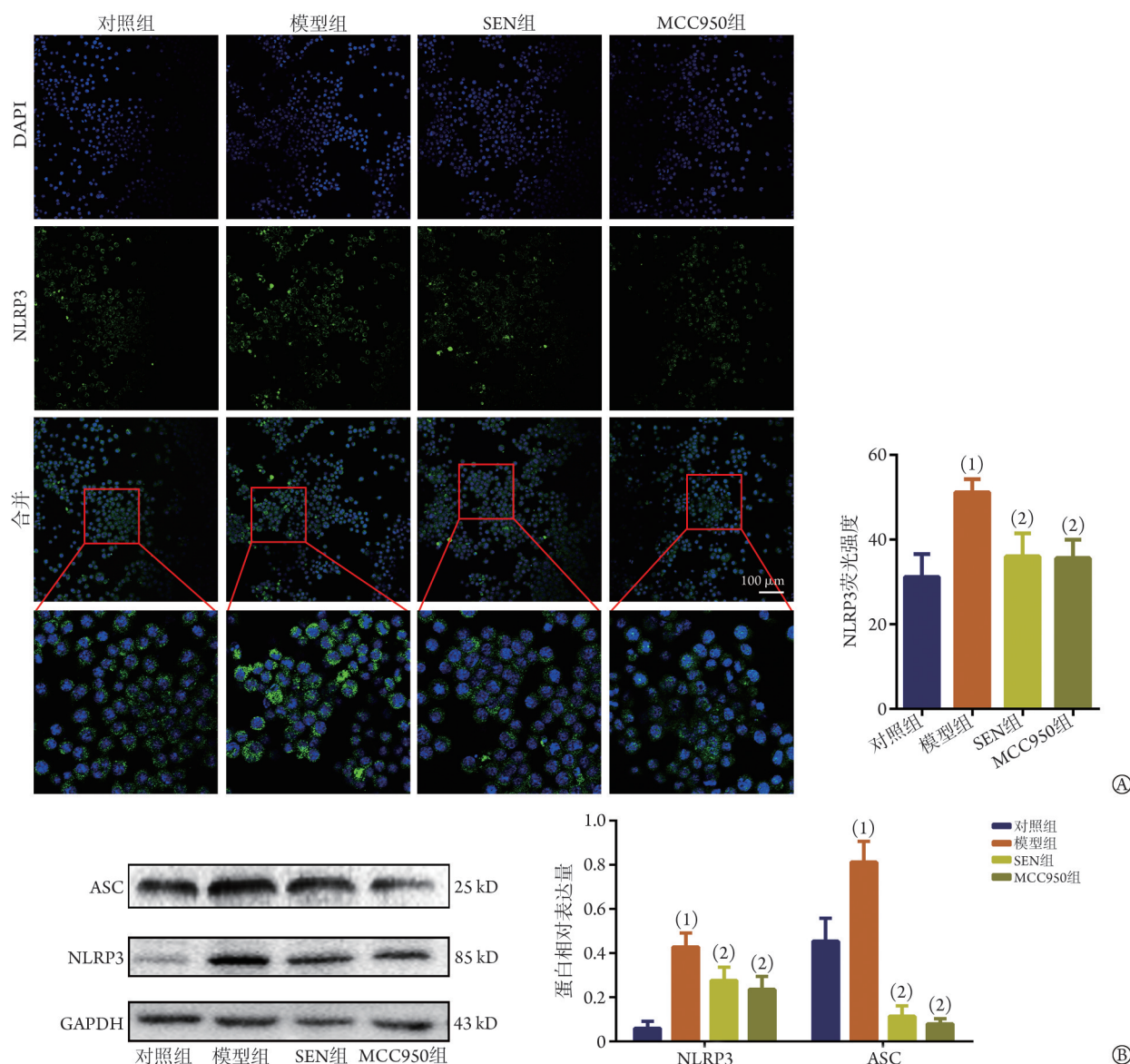
体和炎症因子表达的影响 免疫荧光染色结果显示, 与对照组比较, 模型组BV2细胞NLRP3、IL-1β表达水平增高($P<0.01$); 与模型组比较, SEN组和MCC950组BV2细胞NLRP3和IL-1β表达水平降低($P<0.05$, 图5、图6)。Western blotting检测结果显示, 与对照组比较, 模型组BV2细胞NLRP3、ASC、caspase-1、IL-18、IL-1β蛋白表达水平均明显增高($P<0.01$); 与模型组比较, SEN组和MCC950组BV2细胞上述蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$, 图5、图6)。

2.6 SEN对LPS诱导的BV2细胞氧化应激因子Nrf2、HO-1和iNOS、NF-κB表达的影响 免疫荧光染色结果显示, 与对照组比较, 模型组BV2细胞Nrf2和

HO-1表达水平均明显降低($P<0.05$); 与模型组比较, SEN组BV2细胞Nrf2和HO-1表达水平均明显增高($P<0.05$)。Western blotting检测结果显示, 与对照组比较, 模型组iNOS、NF-κB蛋白表达水平明显增高($P<0.05$), Nrf2和HO-1蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$); 与模型组比较, SEN组BV2细胞iNOS、NF-κB蛋白表达水平明显降低($P<0.05$), Nrf2和HO-1蛋白表达水平明显增高($P<0.05$)(图7)。

3 讨论

小胶质细胞是中枢神经系统免疫防御的第一道屏障^[14]; 在脑缺血或感染等病理条件下, 小胶质细胞被过度激活, 释放大量炎症因子造成中枢神经系



SEN. 远志皂苷元; MCC950. 一种 NLRP3 炎性小体拮抗剂; NLRP3. NOD 样受体蛋白 3; ASC. 凋亡相关斑点样蛋白; A. 免疫荧光染色检测 ASC 的表达; B. NLRP3、ASC 蛋白表达水平(Western blotting); 与对照组比较, (1) $P < 0.01$; 与模型组比较, (2) $P < 0.05$

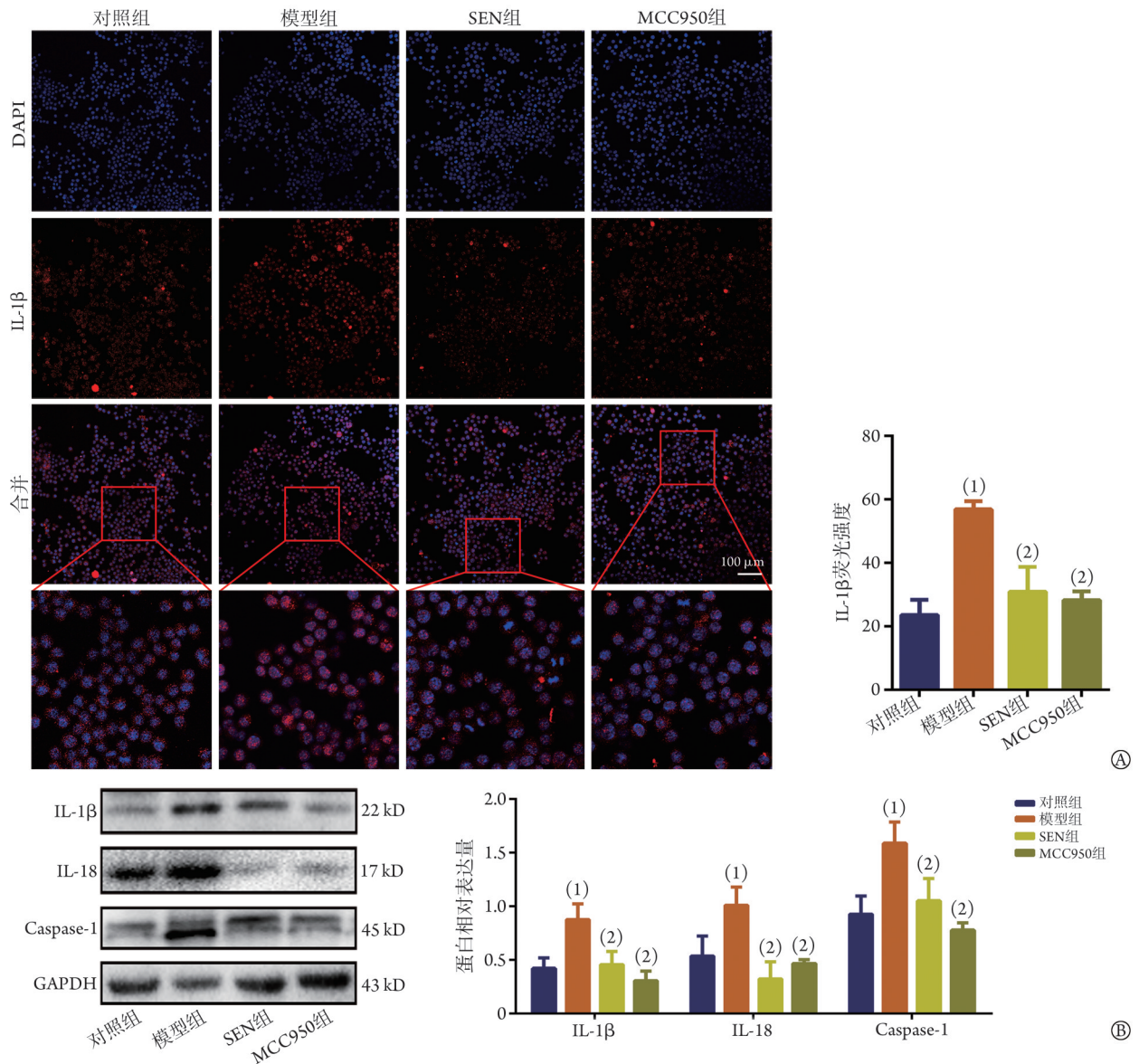
图 5 SEN 和 MCC950 对脂多糖诱导的 BV2 小鼠小胶质细胞炎性小体活化的影响

Fig.5 Effect of SEN and MCC950 on LPS-induced inflammatory vesicle expression in BV2 mouse microglial cells

统炎性损伤^[15]。在炎症相关神经退行性疾病的发病机制中, 由小胶质细胞驱动的神炎症发挥了核心作用^[16]。多项研究显示, 小胶质细胞中活化的 NLRP3 炎性小体是介导神经炎症的关键媒介, 也是小胶质细胞参与神经炎症性疾病进展的关键信号分子开关^[15-17]。近年来 NLRP3 及其上下游通路已逐渐成为神经炎症性疾病研究的热点。激活后的炎性小体由 NLRP3、ASC 和胱天蛋白酶-1 前体(pro-caspase-1)三者构成, 可将 pro-caspase-1 自剪切为活性更强的 caspase-1, 促使炎性因子 IL-18 和 IL-1 β 分泌增加而引起炎症反应。近年来研究发现, A β 沉积可促使炎性小体活化, 而抑制 NLRP3 炎性小体可诱导 APP/PS1 小鼠体内小胶质细胞 M2 型极化增多, 进而减少 A β

的沉积^[18]。NLRP3 炎性小体阳性的小胶质细胞驱动了 AD 和 PD 的神经变性^[19-20]。有研究显示, 调控 Nrf2/NLRP3/caspase-1 轴可在 PD 中发挥神经保护作用^[21]; Nrf2 分子可通过切割 caspase-1 抑制 NLRP3 的表达, 进而降低 IL-1 β 水平, 减轻神经炎症反应^[22]。这些结果提示, 通过调控 Nrf2 来抑制 NLRP3 炎性小体激活可作为神经炎症反应的治疗策略。而寻找新的可抑制相关靶点的药物, 对神经炎症性疾病的早期干预和治疗具有重要意义。

有研究报道, 在体外细胞模型中, LPS 可诱导小胶质细胞活化并释放大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)和 NO、IL-6、IL-18、IL-1 β 等炎性因子, 形成瀑布级联反应, 进而活化更多小胶质细



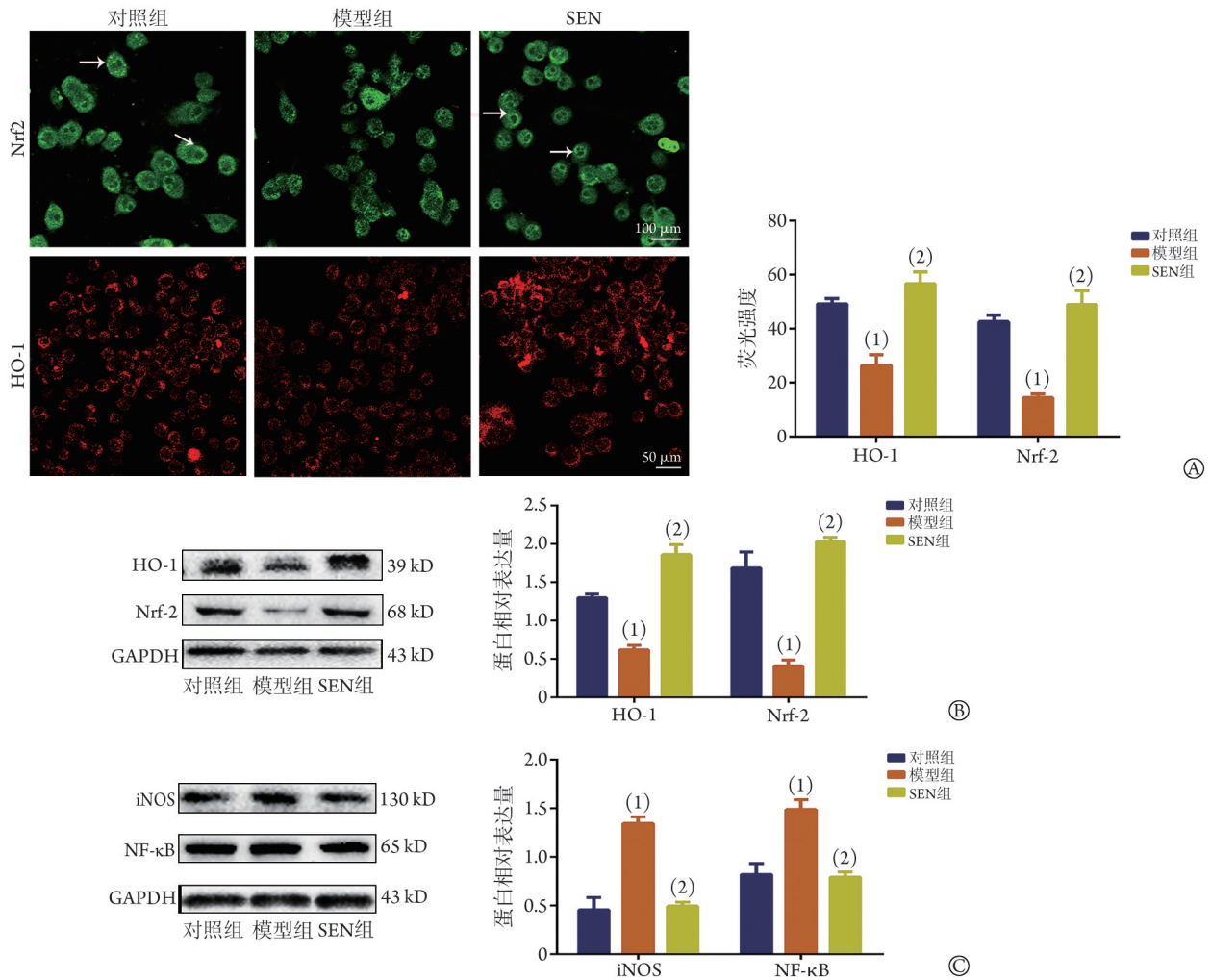
SEN. 远志皂苷元; MCC950. 一种 NLRP3 炎性小体拮抗剂; IL-1 β . 白细胞介素-1 β ; IL-18. 白细胞介素-18; caspase-1. 胱天蛋白酶-1; A. 免疫荧光染色检测 IL-1 β 的表达; B. IL-1 β 、IL-18 和 caspase-1 蛋白表达水平(Western blotting); 与对照组比较, (1) $P < 0.01$, 与模型组比较, (2) $P < 0.05$

图6 SEN和MCC950对脂多糖诱导的BV2小鼠小胶质细胞炎症因子表达的影响

Fig.6 Effect of SEN and MCC950 on LPS-induced inflammatory vesicle expression in BV2 mouse microglial cells

胞^[23-24], 因此抑制 NLRP3 炎性小体的激活可缓解小胶质细胞的炎症反应, 发挥神经保护作用。LPS 是经典的炎症模型诱导物, 可介导小胶质细胞向促炎表型极化。本研究采用 LPS 处理 BV2 小鼠小胶质细胞建立炎症细胞模型, 利用具有抗炎作用的 SEN 和炎性小体 NLRP3 的特异性拮抗剂 MCC950 分别作用于 LPS 诱导的 BV2 细胞 24 h, 结果显示, LPS 诱导后小胶质细胞 NO 释放量增加; 实时荧光定量 PCR 和 Western blotting 检测结果显示, 模型组 *NLRP3*、*ASC*、*caspase-1*、*IL-1 β* 、*IL-18* mRNA 和蛋白相对表达水平均明显增高, 提示 LPS 可刺激 NLRP3 炎性小体活化, 促进神经炎症的发生; 而 SEN 组和 MCC950 组 BV2

细胞 *NLRP3*、*ASC*、*caspase-1*、*IL-1 β* 、*IL-18* mRNA 和蛋白相对表达水平均明显降低; SEN 组与 MCC950 组的 *ASC*、*IL-1 β* 、*IL-18* 表达效果相近, 但 MCC950 组 *NLRP3* mRNA 表达下调效果优于 SEN 组。Coll 等^[25]发现, 无论 NLRP3 处于何种激活状态, MCC950 都会特异性结合在 NLRP3 的核苷酸寡聚化结构域(NACHT)的 Walker B 位点处, 阻止 ADP-ATP 交换, 使炎性复合体锁定为“封闭”的非活性构象, 抑制下游炎性体的组装。有研究报道, 细胞外氯离子浓度改变会影响 ATP 刺激引起的 *caspase-1* 激活和下游 IL-1 β 的产生^[26]。SEN 和 MCC950 在 NLRP3 结合方面以及抑制氯离子外流方面是否存在差异, 或是



SEN. 远志皂苷元; HO-1. 血红素加氧酶-1; Nrf2. 核转录因子E2相关因子2; iNOS. 诱导型一氧化氮合酶; NF-κB. 核因子κB; A. 免疫荧光染色检测Nrf2和HO-1的表达; B. Nrf2、HO-1蛋白表达水平(Western blotting); C. iNOS、NF-κB蛋白表达水平(Western blotting); 与对照组比较, (1) $P < 0.05$, 与模型组比较, (2) $P < 0.05$

图7 SEN对脂多糖诱导的BV2小鼠小胶质细胞氧化应激因子Nrf2、HO-1和iNOS、NF-κB表达的影响

Fig.7 Effects of SEN on LPS-induced expression of oxidative stress factors Nrf2, HO-1 and iNOS, NF-κB in BV2 mouse microglial cells

否有NLRP3以外的激活通路, 尚需进一步研究验证。上述结果提示, SEN可能通过抑制NLRP3炎性小体的激活, 进而抑制IL-1β和IL-18等炎性因子的释放, 缓解小胶质细胞中的炎症反应, 对LPS诱导后的小胶质细胞起到保护作用。

Nrf2/HO-1轴在维持细胞内氧化还原稳态和调节炎症方面具有重要作用^[27]。转录因子Nrf2广泛存在于小胶质细胞中, 在调节抗氧化基因表达方面起关键作用。Nrf2可通过清除ROS来抑制NLRP3炎性小体的活化^[28]。发生氧化应激后, Nrf2从胞质中解离入核, 上调下游抗氧化基因HO-1的表达; HO-1可抑制小胶质细胞中iNOS蛋白的表达和NO的产生^[29]。下游NF-κB通路激活可促进NLRP3和炎性因子IL-18及IL-1β前体的表达^[30]。因此, Nrf2-NLRP3轴可能是减轻氧化应激和神经炎症损伤的潜在治疗靶标。本研究免疫荧光染色和Western blotting检测结

果均显示, LPS处理后BV2细胞炎症相关酶iNOS和炎症反应关键调节因子NF-κB表达增高, 而Nrf2和HO-1表达降低, 对NLRP3小体活化的抑制作用减弱; SEN可显著提高细胞核内Nrf2的表达, 使HO-1蛋白水平增高, iNOS和NF-κB表达降低, 抑制NLRP3炎性小体的激活。提示SEN对炎性小胶质细胞活化的抑制作用可能是通过激活Nrf2/HO-1, 抑制氧化应激, 进而抑制NLRP3炎性小体活化, 即对抗氧化损伤、抑制炎症反应这一通路而实现的。

综上所述, 本研究结果显示, SEN可改善小胶质细胞的活力, 抑制NO的产生, 并可能通过调控Nrf2/NLRP3通路减轻炎症反应。本研究仅从Nrf2/HO-1和小胶质细胞NLRP3炎性小体活化方面进行了探究, 但鉴于神经退行性疾病发病机制尚不清晰, 不同信号通路可能存在串扰, 各通路之间的调控关系也有待进一步明确; 未来可在信号通路的关键节

点增加阳性对照和样本数, 以及进一步开展动物体内相关分子机制的研究。

【参考文献】

- [1] Nazam F, Shaikh S, Nazam N, *et al.* Mechanistic insights into the pathogenesis of neurodegenerative diseases: towards the development of effective therapy[J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(7): 2739-2752.
- [2] Sun M, Li X, Sun J, *et al.* The top-cited original articles on the role of microglia in neurodegenerative diseases: a bibliometric and visualized study[J]. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14: 869964.
- [3] Guo S, Wang H, Yin Y. Microglia polarization from M1 to M2 in neurodegenerative diseases[J]. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14: 815347.
- [4] 李明星, 应苗法, 顾胜龙, 等. CysLT₂受体拮抗剂HAMI3379对大鼠脑缺血损伤的保护作用及其机制[J]. *解放军医学杂志*, 2023, 48(12): 1395-1402.
- [5] 高丽娜, 周长征, 刘青芝. 远志皂苷类化合物及其药理作用研究进展[J]. *北京联合大学学报*, 2022, 36(3): 2-8.
- [6] Deng X, Zhao S, Liu X, *et al.* Polygala tenuifolia: a source for anti-Alzheimer's disease drugs[J]. *Pharm Biol*, 2020, 58(1): 410-416.
- [7] 袁惠莉, 宫晓丽, 范征. 远志皂苷对脂多糖诱导的帕金森病模型大鼠的作用及机制研究[J]. *首都医科大学学报*, 2020, 41(6): 914-922.
- [8] Fan Z, Liang Z, Yang H, *et al.* Tenuigenin protects dopaminergic neurons from inflammation *via* suppressing NLRP3 inflammasome activation in microglia[J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 256.
- [9] Wang X, Li M, Cao Y, *et al.* Tenuigenin inhibits LPS-induced inflammatory responses in microglia *via* activating the Nrf2-mediated HO-1 signaling pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 809: 196-202.
- [10] 赵沅杰, 拓振杰, 尚培骏, 等. β 淀粉样蛋白受体PirB对小鼠星形胶质细胞增殖及反应性增生的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2024, 49(1): 82-90.
- [11] Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics[J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19(8): 477-489.
- [12] 望金欣, 王婷, 赵晴晴, 等. 竹节参乙酸乙酯提取物对脂多糖诱导的BV2小胶质细胞炎症反应的影响及其机制研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2020, 31(9): 1001-1007.
- [13] 赵佩佩, 朱嘉睿, 李飞飞, 等. 中性粒细胞胞外诱捕网通过激活NLRP3炎症小体诱导人肺微血管内皮细胞焦亡[J]. *兰州大学学报(医学版)*, 2024, 50(5): 6-13.
- [14] 王均辉, 孙峰波, 秦绿叶, 等. 异常活化的小胶质细胞的特征与功能[J]. *生理科学进展*, 2008, 39(1): 41-44.
- [15] Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8(1): 57-69.
- [16] Siew JJ, Chern Y, Khoo KH, *et al.* Roles of Siglecs in neurodegenerative diseases[J]. *Mol Aspects Med*, 2023, 90: 101141.
- [17] Coll RC, Schroder K, Pelegrin P. NLRP3 and pyroptosis blockers for treating inflammatory diseases[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2022, 43(8): 653-668.
- [18] Liang T, Zhang Y, Wu S, *et al.* The role of NLRP3 inflammasome in Alzheimer's disease and potential therapeutic targets[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 845185.
- [19] Moonen S, Koper MJ, Van Schoor E, *et al.* Pyroptosis in Alzheimer's disease: cell type-specific activation in microglia, astrocytes and neurons[J]. *Acta Neuropathol*, 2023, 145(2): 175-195.
- [20] Han YH, Liu XD, Jin MH, *et al.* Role of NLRP3 inflammasome-mediated neuronal pyroptosis and neuroinflammation in neurodegenerative diseases[J]. *Inflamm Res*, 2023, 72(9): 1839-1859.
- [21] Zhang CY, Zhao M, Wang BW, *et al.* The Nrf2-NLRP3-caspase-1 axis mediates the neuroprotective effects of Celastrol in Parkinson's disease[J]. *Redox Biol*, 2021, 47: 102134.
- [22] Rajan S, Tryphena KP, Khan S, *et al.* Understanding the involvement of innate immunity and the Nrf2-NLRP3 axis on mitochondrial health in Parkinson's disease[J]. *Ageing Res Rev*, 2023, 87: 101915.
- [23] Mandal P, Pratt BT, Barnes M, *et al.* Molecular mechanism for adiponectin-dependent M2 macrophage polarization: link between the metabolic and innate immune activity of full-length adiponectin[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(15): 13460-13469.
- [24] Cunha C, Santos C, Gomes C, *et al.* Downregulated glia interplay and increased miRNA-155 as promising markers to track ALS at an early stage[J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(5): 4207-4224.
- [25] Coll RC, Robertson AA, Chae JJ, *et al.* A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases[J]. *Nat Med*, 2015, 21(3): 248-255.
- [26] Bakhshi S, Shamsi S. MCC950 in the treatment of NLRP3-mediated inflammatory diseases: latest evidence and therapeutic outcomes[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 106: 108595.
- [27] Saha S, Buttari B, Panieri E, *et al.* An overview of Nrf2 signaling pathway and its role in inflammation[J]. *Molecules*, 2020, 25(22): 5474.
- [28] Xu X, Zhang L, Ye X, *et al.* Nrf2/ARE pathway inhibits ROS-induced NLRP3 inflammasome activation in BV2 cells after cerebral ischemia reperfusion[J]. *Inflamm Res*, 2018, 67(1): 57-65.
- [29] Chakkittukandiyil A, Sajini DV, Karuppaiah A, *et al.* The principal molecular mechanisms behind the activation of Keap1/Nrf2/ARE pathway leading to neuroprotective action in Parkinson's disease[J]. *Neurochem Int*, 2022, 156: 105325.
- [30] 张朋, 韩荣荣, 张爱梅. NLRP3炎症小体: 缺血性脑卒中的潜在治疗靶点[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2023, 40(1): 89-93.

(责任编辑: 蒋铭敏)