



安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目：皮质酮预处理对 LPS 激活小胶质细胞的调节作用及鸡豆黄素 A 的抑制作用
作者：牛耕辰，王俊，张悦，尹艳艳
网络首发日期：2025-07-07
引用格式：牛耕辰，王俊，张悦，尹艳艳. 皮质酮预处理对 LPS 激活小胶质细胞的调节作用及鸡豆黄素 A 的抑制作用[J/OL]. 安徽医科大学学报.
<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250707.1343.002>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

皮质酮预处理对 LPS 激活小胶质细胞的调节作用及鸡豆黄素 A 的抑制作用

牛耕辰^{1,2}, 王 俊¹, 张 悦¹, 尹艳艳¹

(¹安徽医科大学药理学教研室, 合肥 230032;

²华威大学医学院, 考文垂, 英国 CV4 7AL)

摘要 目的 探讨皮质酮 (CORT) 预处理对脂多糖 (LPS) 激活小胶质细胞的调节作用及鸡豆黄素 A (Bio A) 对小胶质细胞活化的抑制作用。**方法** 用 MTT 法筛选出 LPS、CORT 和 Bio A 对 BV2 细胞的最适浓度; 将 BV2 细胞分为 5 组: Control 组、CORT (50 nmol/L) 组、LPS (1 μ g/mL) 组、LPS (1 μ g/mL) + CORT (50 nmol/L) 组、LPS (1 μ g/mL) + CORT (50 nmol/L) + Bio A (5 μ mol/L) 组, 除对照组外, 各组先加入 CORT (50 nmol/L) 孵育 2 h, 然后各组加入相应浓度的 LPS (1 μ g/mL) 和 BioA (5 μ mol/L) 共同孵育 36 h; DCFH-DA 探针法测定活性氧 (ROS) 含量; Western blot 法测定炎症细胞因子、5-羟色胺转运体 (5-HTT)、糖皮质激素受体 (GR)、盐皮质激素受体 (MR)、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3)、凋亡相关斑点样蛋白 (ASC) 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白 1 (Caspase-1) 的蛋白表达水平。**结果** 与 CORT (50 nmol/L) 组和 LPS (1 μ g/mL) 组比较, CORT (50 nmol/L) + LPS (1 μ g/mL) 组的 BV2 细胞的活力增加, ROS 的含量更高, 炎症细胞因子、NLRP3、ASC 和 Caspase-1 蛋白表达水平增加 ($P < 0.05$); 与 CORT (50 nmol/L) + LPS (1 μ g/mL) 组比较, CORT (50 nmol/L) + LPS (1 μ g/mL) + Bio A (5 μ mol/L) 组的细胞活力降低, ROS 的含量下降, 炎症细胞因子、NLRP3、ASC 和 Caspase-1 蛋白表达减少 ($P < 0.05$)。**结论** 小剂量的 CORT 预处理可以促进 LPS 激活 BV2 细胞; Bio A 抑制经 CORT 预处理后 LPS 诱导的 BV2 细胞活化, 其机制可能与抑制 NLRP3 炎症小体的激活有关。

关键词 皮质酮; 脂多糖; 小胶质细胞; 鸡豆黄素 A; 活性氧; NLRP3 炎症小体

中图分类号: R 285.5; R 364.5; R 977.6

文献标志码 A

The role of corticosterone pretreatment on LPS-activated microglia and the inhibitory effect of Biochanin A

Niu Gengchen^{1,2}, Wang Jun¹, Zhang Yue¹, Yin Yanyan¹

(¹Dept of Pharmacology, the School of Pharmaceutical Sciences, Anhui Medical University, Hefei

基金项目: 安徽省转化医学研究院科研基金项目 (编号: 2021zhyx-C18); 安徽省自然科学基金项目 (编号: 1908085MH270)

作者简介: 牛耕辰, 男, 硕士研究生

尹艳艳, 女, 教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: yinyanyan5678@126.com

Abstract Objective To investigate the regulatory effect of corticosterone (CORT) pretreatment on the activation of microglia by lipopolysaccharide (LPS) and the inhibitory effect of Biochanin A (Bio A) on microglia activation. **Methods** The MTT method was used to select the optimal concentrations for LPS, CORT and Bio A on BV2 cells; BV2 cells were divided into 5 groups: Control group, CORT (50 nmol/L) group, LPS (1 µg/mL) group, LPS (1 µg/mL) + CORT (50 nmol/L) group, and LPS (1 µg/mL) + CORT (50 nmol/L) + Bio A (5 µmol/L) group; Except for the control group, each group was first incubated with CORT (50 nmol/L) for 2 h, and then each group was co-incubated with the corresponding concentrations of LPS (1 µg/mL) and BioA (5 µmol/L) for 36 h; DCFH-DA probe method was used to detect reactive oxygen species (ROS) content; Western blot was used to detect the protein expression levels of inflammatory cytokines, 5-hydroxytryptamine(5-HTT), glucocorticoid receptor (GR), mineralocorticoid receptor (MR), NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3), apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) and cysteine-aspartic protease 1 (Caspase-1) **Results** Compared with the CORT (50 nmol/L) and LPS (1 µg/mL) groups, cells in the CORT (50 nmol/L) + LPS (1 µg/mL) group showed increased cell viability, higher levels of ROS, and increased levels of inflammatory cytokines, NLRP3, ASC, and Caspase-1 protein expression ($P<0.05$); Compared with the CORT (50 nmol/L) + LPS (1 µg/mL) group, the CORT (50 nmol/L) + LPS (1 µg/mL) + Bio A (5 µmol/L) group showed decreased cell viability, decreased levels of ROS, and decreased protein expression of inflammatory cytokines, NLRP3, ASC and Caspase-1 proteins ($P<0.05$). **Conclusion** A low dose of CORT pretreatment reinforces LPS-induced BV2 cell activation; Bio A inhibits CORT-pretreated LPS-induced BV2 cell activation. The mechanism of which may be related to the inhibition of NLRP3 inflammasome activation.

Key words corticosterone; lipopolysaccharide; microglia; biochanin A; reactive oxygen species; NLRP3 inflammasome

Fund programs Research Project of Anhui Provincial Institute of Translational Medicine (No. 2021zhxy-C18); Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 1908085MH270)

Corresponding author Yin Yanyan, E-mail: yinyanyan5678@126.com

帕金森病(Parkinson's disease, PD)的主要病理特征为黑质致密部多巴胺(dopamine, DA)能神经元损伤和路易小体的形成,其发病率随年龄增长而上升^[1]。近年研究^[2]表明,PD患者常伴抑郁、焦虑、妄想等精神症状,严重影响生活质量。长期的慢性不可预见性温和应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)会使机体内皮质酮(corticosterone, CORT)水平升高,损伤脑区神经元,诱发抑郁,且能促进其他疾病发生。最新临床研究^[3]显示,抑郁发生在PD之前,抑郁患者发展成为PD的可能性较无抑郁患者明显增加,提示抑郁或成为PD的独立危险因素。

鸡豆黄素A(biochanin, Bio A)作为植物雌激素具有神经保护作用^[4],研究^[5]表明,Bio A可以减少炎症因子释放,抑制小胶质细胞的活化。本课题组前期实验^[6]发现,CUMS预处理后的模型组黑质部位小胶质细胞活化更明显,且Bio A可以抑制小胶质细胞的活化。然而,关于体外CORT预处理是否与LPS存在协同激活小胶质细胞的作用仍缺乏明确结论。基于此,本研究旨在观察CORT预处理对LPS诱导的小胶质细胞活化的调控作用,以及Bio A对该活化的干预效应。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 BV2小胶质细胞株受赠于中国医学科学院北京协和医学院。

1.1.2 药品与试剂 Bio A、CORT、LPS、噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)(美国Sigma公司,货号:D2016、235135、L4516、M2128);DMEM培养基(美国Thermo Scientific公司,货号:12491015);胎牛血清FBS(杭州四季青公司,货号:13011-8611);活性氧检测试剂盒、一氧化氮(nitric oxide, NO)检测试剂盒、青霉素-链霉素溶液(江苏碧云天生物技术研究,货号:S0033S、S0021S、C0222);鼠抗 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号:TA-09);聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride membrane, PVDF)(美国Millipore公司,货号:IPVH00010);兔抗5-羟色胺转运体(5-Hydroxytryptamine transporter, 5-HTT)抗体、兔抗凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)抗体(美国Bioworld公司,货号:BS40767、BS80265);兔抗半胱氨酸天冬氨酸蛋白1(cysteine-aspartic protease 1, Caspase-1)抗体、兔抗白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)抗体、兔抗肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)抗体、兔抗白介素-6(interleukin-6, IL-6)抗体(英国abcam公司,货号:ab207802、ab283818、ab183218、ab290735);兔抗NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3)抗体、兔抗糖皮质

激素受体(glucocorticoid receptor, GR)抗体、兔抗盐皮质激素受体(mineralocorticoid receptor, MR)抗体(美国 CST 公司, 货号: 15101、12041、58883)。

1.1.3 主要仪器 光学显微镜购自日本 Olympus 公司[型号: CX23LED RF(S1C/S2)]; 电子分析天平购自上海天平仪器厂(型号: FA1004); 旋涡混合仪购自上海沪西分析仪器有限公司(型号: WH-2); 纯水机购自杭州惠邦净水设备有限公司(型号: HB-R/005); 精密 PH 计购自上海雷磁仪器厂(型号: PHSJ-4A); 转移电泳槽购自北京六一仪器厂(型号: DYY-II408); 化学发光成像系统购自上海欧翔科学仪器有限公司(型号: ChemiQ 4600); 全波长酶标仪购自美国 Molecular Device 公司(型号: SpectraMax190); Countstar 自动细胞计数仪购自睿钰生物科技有限公司(型号: IC1000)。

1.2 方法

1.2.1 小胶质细胞株培养 将 BV2 细胞置于 DMEM 培养基中(混合液含 1%的青-链霉素以及 10%的 FBS 溶液), 并放入 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中, 弃去原培养基, 使用胰酶进行细胞消化处理。随后将消化后的细胞重悬并接种至新的培养瓶中, 加入 6 mL 完全培养基, 继续置于恒温培养箱内培养。培养期间, 每 24~36 h 更换 1 次培养基, 同时每日观察细胞形态及培养基颜色变化。

1.2.2 MTT 法筛选 LPS、Bio A 剂量 为了检测 LPS、Bio A 的浓度对细胞活力的影响, 将 BV2 细胞以 1×10^4 个/孔左右的密度种植于 96 孔板中, 每孔培养基终体积为 200 μ L, 分组如下: LPS (0、0.01、0.1、1、10、100 μ g/mL) 组和 Bio A (0、2.5、5、10、20、40 μ mol/L) 组, 加入相对应的药物孵育 36 h 后, 每孔再加入 20 μ L 的 MTT (5mg/mL) 溶液, 继续培育 4 h。4 h 后, 弃去培养液, 每孔再加入 150 μ L 的二甲基亚砜, 振荡 10 min。使用酶标仪在波长 490 nm 处测量各孔的吸光度值, 至少进行 3 次以上的重复试验。

1.2.3 不同浓度的 CORT 预处理 BV2 细胞的分组及处理 用 MTT 法确定了 LPS 刺激 BV2 细胞的适宜浓度后, 为了检测 CORT 预处理对 BV2 细胞的影响, 将 BV2 细胞分为 7 组, 分别为 Control 组, LPS (1 μ g/mL) 组, CORT (25 nmol/L) + LPS (1 μ g/mL) 组, CORT (50 nmol/L) + LPS (1 μ g/mL) 组, CORT (100 nmol/L) + LPS (1 μ g/mL) 组, CORT (200 nmol/L) + LPS (1 μ g/mL) 组, CORT (400 nmol/L) + LPS (1 μ g/mL) 组。除对照组外, 每组用相应浓度的 CORT 孵育 2 h 后, 各组加入 LPS (1 μ g/mL) 孵育 36 h, 用于检测 NO。

1.2.4 Bio A 对 CORT 预处理 BV2 细胞活化的作用实验分组及处理 本实验将 BV2 细胞分为 5 组: Control 组(不进行任何处理)、CORT (50 nmol/L) 组、LPS (1 μ g/mL) 组、LPS (1 μ g/mL) + CORT (50 nmol/L) 组、LPS (1 μ g/mL) + CORT (50 nmol/L) + Bio A (5 μ mol/L)

组。除对照组外, 各组先加入 CORT (50 nmol/L) 孵育 2 h, 然后各组加入相应浓度的 LPS (1 μ g/mL) 和 BioA (5 μ mol/L) 共同孵育 36 h。

1.2.5 NO 的测定 将 BV2 细胞以 1×10^4 个/孔左右的密度种于 96 孔板中培养 24 h, 当细胞密度达 70%~80% 左右时, 根据分组, 各孔加入相应的药物在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中进行孵育, 随后使用 NO 检测试剂盒检测上清液中 NO 的含量, 使用检测波长 540 nm 的酶联免疫检测仪测定各孔的 OD 值。

1.2.6 ROS 检测 将 BV2 细胞以 1×10^5 个/孔左右的密度种于 24 孔板中并于 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 24h。各组加入相应的药物进行孵育, 孵育结束后, 吸出原培养基, 每孔加入 200 μ L DCFH-DA 工作液继续培养 30 min。使用倒置荧光显微镜检测细胞内荧光强度。

1.2.7 Western blot 实验 变性后的细胞蛋白样品经过电泳、转膜后转移到 PVDF 膜中, 将其置于摇床摇晃的封闭液 (TBST+5%脱脂牛奶) 中进行封闭, 将封闭后的 PVDF 用 TBST 进行洗涤 3 次, 每次 5 min, 孵育浓度为 1:1 000 的一抗 (5-HTT、GR、MR、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、ASC、Caspase-1、NLRP3 和 β -actin) 并在摇床中摇晃过夜, 取出孵育一抗 PVDF 膜用 TBST 进行洗涤 3 次, 每次 5 min, 用浓度为 1:5 000 的 HRP 标记羊抗兔二抗孵育 2 h, 随后用 TBST 洗膜 3 次, 最后将膜放在显影仪中曝光并保存。用 ImageJ 软件对蛋白条带进行灰度值分析。

1.2.8 统计学处理 所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间差异分析采用 t 检验; 多组之间的比较用单因素方差分析 (ANOVA), 再通过 LSD- t 检验进行组间两两事后比较。所有分析都采用 SPSS13.0 版本进行, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度的 LPS、Bio A 对小胶质细胞的活力影响 采用 MTT 法筛选 LPS 造模浓度和 Bio A 保护药物浓度, 结果如图 1A, 与 0 μ g/mL 相比, 当 LPS 的浓度从 0.01~1 μ g/mL, 实验组细胞的 MTT 值出现升高的趋势; 当 LPS 浓度达到或超过 10 μ g/mL 时, 实验组的 MTT 检测值较对照组降低 ($t=2.28$ 、 4.44 , $P < 0.05$)。提示实验所需的适宜 LPS 造模浓度为 1 μ g/mL。此外, 为了寻找合适的 Bio A 剂量, 我们用 2.5~40 μ mol/L Bio A 处理 BV2 细胞。如图 1B, 与 0 μ mol/mL 比较, 当 Bio A 的浓度为 10 μ mol/L 时, 细胞的活力下降但不明显 ($t=1.56$, $P > 0.05$); 当 Bio A 浓度达到 20 μ mol/L 时, 细胞的活力明显下降 ($t=2.82$, $P < 0.05$)。而浓度在 5 μ mol/L Bio A 对 BV2 细胞基本没有损伤, 故选择 5 μ mol/L 的 Bio A 作为实验剂量。

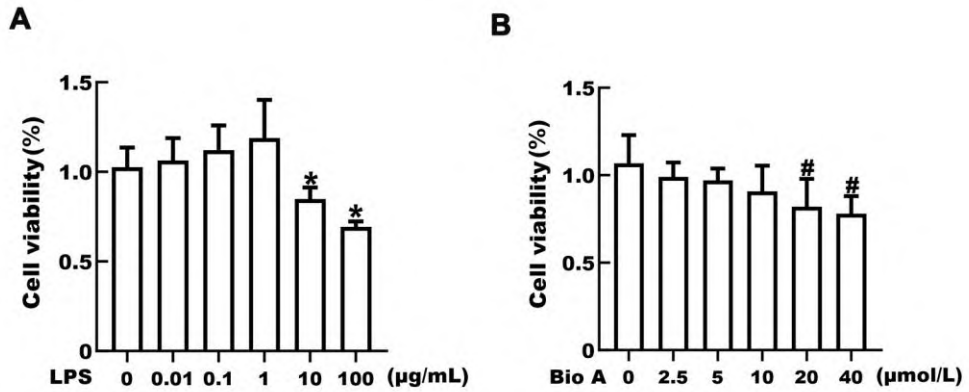


图 1 不同浓度的 LPS 和 Bio A 对 BV2 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig.1 The effect of various concentrations of LPS and Bio A on cell viability in BV2 microglia cell ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A: The effects of different concentrations of LPS on microglia cell activity; B: The effects of different concentrations of Bio A on microglia cell activity; * $P < 0.05$ vs 0 µg/mL LPS; # $P < 0.05$ vs 0 µmol/mL Bio A.

2.2 不同浓度的 CORT 预处理对 LPS 激活 BV2 细胞产生 NO 的影响及 Bio A 的抑制作用

NO 分泌增多是小胶质细胞活化的标志之一。本实验观察了不同浓度的 CORT 对 LPS 激活的 BV2 细胞 NO 分泌的影响。如图 2A 所示，与对照组比较，当 LPS 浓度为 1 µg/mL 时，细胞上清液的 NO 含量明显增加，具有统计学意义 ($t=10.29$, $P < 0.01$)；与 LPS 组相比较，CORT (50 nmol/L) 预处理组，其细胞上清液的 NO 含量明显增加 ($t=8.72$, $P < 0.01$)；而 CORT (200 nmol/L) 预处理组，其细胞上清液的 NO 含量明显降低 ($t=15.53$, $P < 0.01$)。提示低浓度的 CORT 预处理可以促进 LPS 激活 BV2 细胞，故选择 CORT (50 nmol/L) 作为预处理剂量。

为了观察 Bio A 对经 CORT 预处理后对 LPS 诱导 BV2 细胞活化的影响，采用 Griess 法检测各组细胞上清液中 NO 的含量。结果如图 2B 所示，与 CORT+LPS 组比较，Bio A+CORT+LPS 组 BV2 细胞中 NO 的产生降低 ($t=10.78$, $P < 0.01$)。实验结果表明低浓度 CORT 预处理可以促进 LPS 激活的小胶质细胞，而 Bio A 可以抑制小胶质细胞的活化。

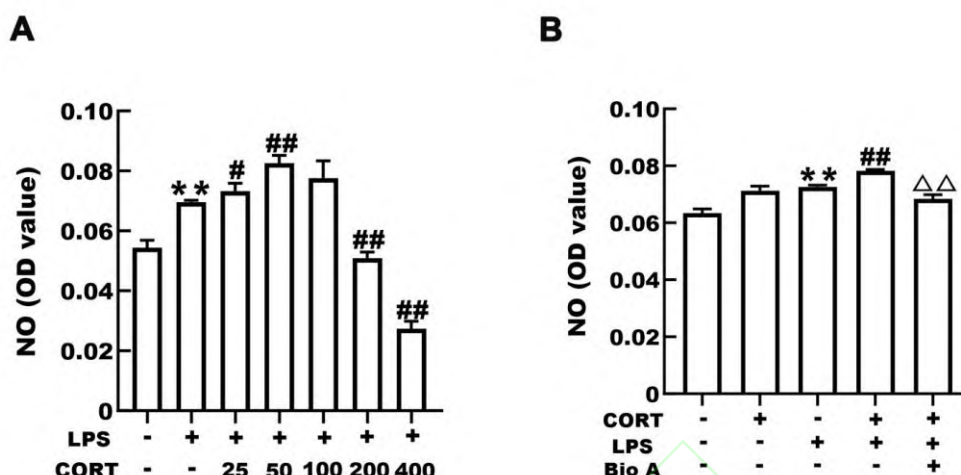


图 2 Bio A 对 LPS 诱导的 BV2 细胞产生 NO 的影响和对 CORT+ LPS 诱导的 BV2 细胞产生 NO 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig.2 The effects of Bio A on the production of NO in LPS-induced BV2 cells and the effects of Bio A on the production of NO in CORT+ LPS induced BV2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A: The effects of CORT pretreatment on the production of NO in LPS-activated microglia; B: The effects of Bio A on the production of NO in CORT+LPS induce microglia; ** $P<0.01$ vs Control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs LPS group; △△ $P<0.01$ vs CORT+LPS group.

2.3 CORT 预处理对 LPS 诱导 BV2 细胞产生 ROS 的影响及 Bio A 的抑制作用 为了确定 CORT 对 LPS 诱导的 BV2 细胞中 ROS 含量的变化情况以及 Bio A 的抑制作用, 采用 DCFH-DA 探针法检测各组细胞内 ROS 的产生情况, 如图 3 所示, 与 Control 组比较, LPS 组的 DCF 荧光强度明显增加 ($t=7.94$, $P<0.05$)。与 LPS 组比较, CORT 可明显增强 LPS 诱导的荧光强度 ($t=3.14$, $P<0.05$)。然而, 与 CORT+LPS 组比较, CORT+LPS + Bio A 组的 DCF 荧光强度明显减弱 ($t=4.07$, $P<0.05$)。这些结果证实, CORT 预处理可促进细胞内 ROS 的产生, 但 Bio A 对 CORT+LPS 组细胞内 ROS 的产生有明显的抑制作用。

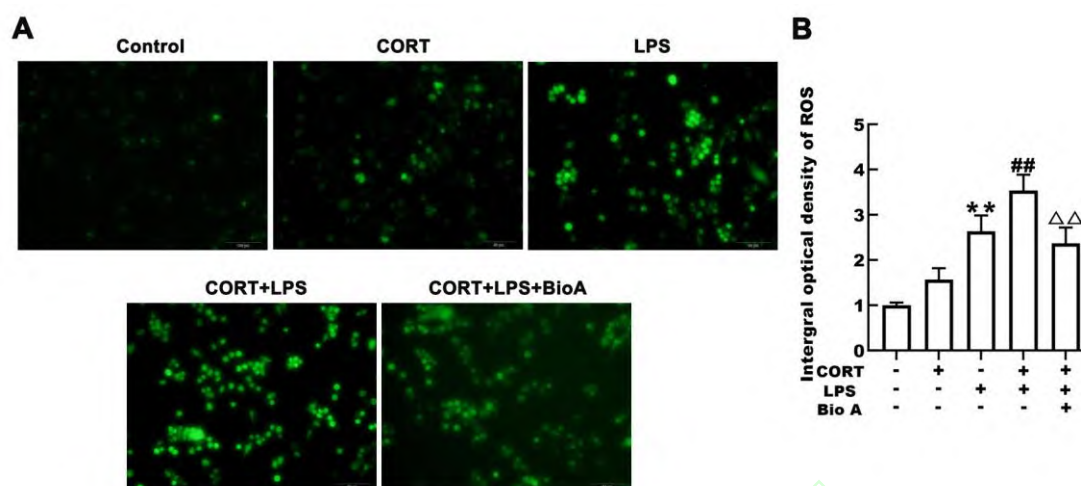


图3 Bio A 对 CORT 和 LPS 联合激活的 BV2 细胞中 ROS 影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig.3 The effects of Bio A on the ROS production in CORT and LPS co-activated BV2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A: ROS-Immunofluorescence images $\times 200$; B: The mean density of ROS production;

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.05$ vs LPS group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs CORT+LPS group.

2.4 Bio A 对 CORT 和 LPS 联合激活的 BV2 细胞中 5-HTT、GR 和 MR 蛋白表达的影响 采用通过 Western blot 检测 5-HTT 蛋白的表达, 结果如图 4A 所示, 与 Control 组比较, CORT 组或 LPS 组 5-HTT 蛋白的表达量均降低 ($t=4.33, 7.14$, $P < 0.05$); 与 LPS 组比较, LPS+CORT 组 5-HTT 蛋白的表达量进一步降低 ($t=2.84$, $P < 0.05$); 与 LPS+CORT 组比较, Bio A 可明显增加 5-HTT 蛋白的表达量 ($t=13.20$, $P < 0.05$)。结果表明 CORT 联合 LPS 能够进一步抑制小胶质细胞中 5-HTT 蛋白表达, 而 Bio A 可以增加小胶质细胞中 5-HTT 蛋白的表达。

此外, 通过 Western blot 进一步检测了 GR 和 MR 蛋白的表达水平。结果如图 4B、4C 所示, 与 LPS 组比较, CORT+LPS 组 GR 蛋白的表达量降低 ($t=2.82$, $P < 0.05$), MR 蛋白的表达量升高 ($t=2.90$, $P < 0.05$); 而 Bio A 能明显促进 GR 蛋白的表达 ($t=4.54$, $P < 0.05$), 抑制 MR 蛋白的表达 ($t=3.05$, $P < 0.05$)。结果表明, 在 CORT 和 LPS 的共同作用下, BV2 细胞的 GR/MR 比值降低, 而 Bio A 能改善这种异常情况。

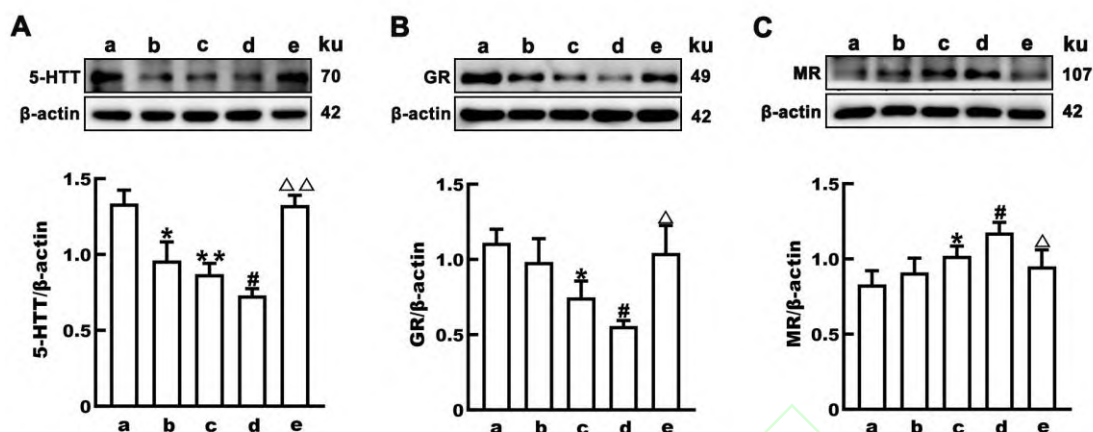


图 4 Bio A 对 CORT 和 LPS 联合激活的 BV2 细胞中 5-HTT、GR 和 MR 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig.4 The effects of Bio A on the expression of 5-HTT, GR and MR in CORT and LPS co-activated BV2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A: 5-HTT protein expression; B: GR protein expression; C: MR protein expression; a: Control group; b: CORT (50 nmol/L) group; c: LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) group; d: CORT (50 nmol/L) + LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) group; e: CORT (50 nmol/L) + LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) + Bio A (5 $\mu\text{mol/L}$) group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ vs LPS group; $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ vs CORT+LPS group.

2.5 Bio A 对 CORT 和 LPS 联合激活的 BV2 细胞中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 蛋白表达的影响

采用 Western blot 检测 CORT 对 LPS 诱导的小胶质细胞活化的促炎作用, 以及 Bio A 是否能减少 CORT+LPS 诱导的 BV2 细胞中促炎因子的产生。如图 5 所示, 与 Control 组比较, CORT 组 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 蛋白表达量的变化不明显 ($t=0.75$ 、 2.26 、 0.19 , 均 $P>0.05$); 但 LPS 组 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 蛋白的表达量升高 ($t=2.91$ 、 5.65 、 2.78 , 均 $P<0.05$); 与 LPS 组比较, CORT 预处理能够增加 LPS 诱导的小胶质细胞中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达 ($t=2.79$ 、 2.82 、 2.78 , 均 $P<0.05$)。此外, 与 CORT+LPS 组比较, 加入 Bio A 能够抑制 CORT+LPS 组 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 蛋白的表达 ($t=4.69$ 、 4.57 、 4.15 , 均 $P<0.05$)。提示 CORT 可促进 LPS 诱导的小胶质细胞中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达, 而 Bio A 可抑制 CORT+LPS 诱导的小胶质细胞中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达。

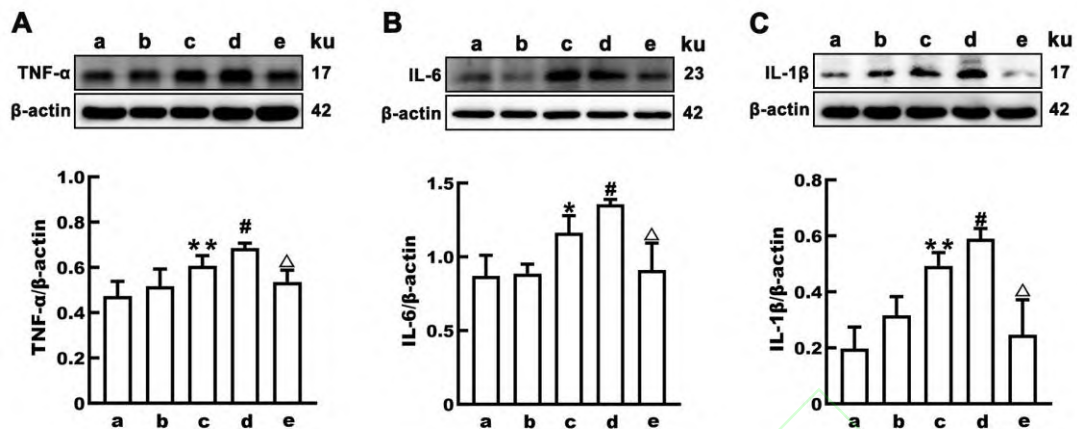


图5 Bio A 对 CORT 和 LPS 联合激活的 BV2 细胞中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig.5 The effects of Bio A on TNF- α , IL-1 β and IL-6 protein expression in CORT and LPS co-activated BV2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A: TNF- α protein expression; B: IL-6 protein expression; C: IL-1 β protein expression; a: Control group; b: CORT (50 nmol/L) group; c: LPS (1 μ g/mL) group; d: CORT (50 nmol/L) + LPS (1 μ g/mL) group; e: CORT (50 nmol/L) +LPS (1 μ g/mL) + Bio A (5 μ mol/L) group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ vs LPS group; $\Delta P<0.01$ vs CORT+LPS group.

2.6 Bio A 对 CORT 和 LPS 联合激活的 BV2 细胞中 ASC、Caspase-1 和 NLRP3 蛋白表达的影响 为了进一步研究 Bio A 的抗炎机制, 选择用 Western blot 检测了 ASC、Caspase-1 和 NLRP3 蛋白的表达。如图 6 所示, 与 Control 组比较, LPS 组 ASC、Caspase-1 和 NLRP3 蛋白的表达量增加 ($t=2.78$ 、 4.59 、 2.95 , $P<0.05$) ; 与 LPS 组比较, CORT+LPS 组的 ASC、Caspase-1 和 NLRP3 蛋白表达进一步增加 ($t=4.64$ 、 4.53 、 2.81 , $P<0.05$) ; 与 LPS+CORT 组比较, Bio A+LPS+CORT 组的 ASC、Caspase-1 和 NLRP3 蛋白表达降低 ($t=3.63$ 、 2.79 、 2.87 , $P<0.05$) 。结果表明, CORT 预处理可增加 LPS 激活的小胶质细胞中 ASC、Caspase-1 和 NLRP3 蛋白的表达, 而加入 Bio A 可抑制激活的小胶质细胞中 ASC、Caspase-1 和 NLRP3 蛋白的表达。

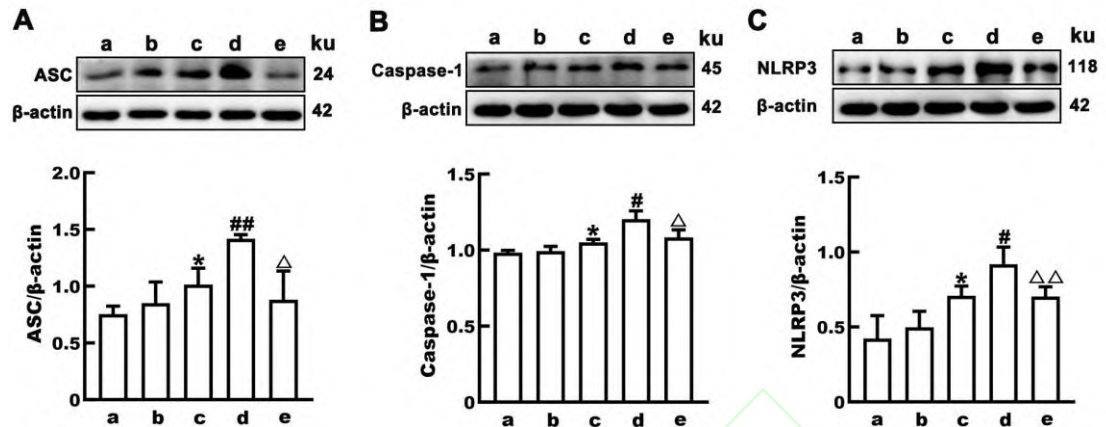


图 6 Bio A 对 CORT 和 LPS 联合激活的 BV2 细胞中 ASC、Caspase-1 和 NLRP3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig.6 The effects of Bio A on ASC, Caspase-1 and NLRP3 protein expressions in CORT and LPS co-activated BV2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A: ASC protein expression; B: Caspase-1 protein expression; C: NLRP3 protein expression; a: Control group; b: CORT (50 nmol/L) group; c: LPS (1 μ g/mL) group; d: CORT (50 nmol/L) + LPS (1 μ g/mL) group; e: CORT (50 nmol/L) + LPS (1 μ g/mL) + Bio A (5 μ mol/L) group; * $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs LPS group; $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ vs CORT+LPS group.

3 讨论

神经炎症在 PD 的病理进程中起着重要的作用。小胶质细胞作为中枢神经系统内核心的免疫反应细胞，也是神经免疫炎症的关键介导者。当微环境中的各类因子出现动态改变，或是遭受免疫炎症因子等因素的刺激时，小胶质细胞能够快速进入激活状态。大量炎性介质及神经毒性物质可通过激活的小胶质细胞释放，可诱导神经元发生变性损伤乃至凋亡性死亡^[7]。同时，在 PD 患者中，有不少患者常伴有抑郁等精神症状。有研究^[8]表明，长期的慢性应激会使下丘脑-垂体-肾上腺 (hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA) 轴功能亢进，导致 CORT 分泌增加、机体内分泌紊乱，进而引发抑郁。此外，最新临床研究^[9]发现抑郁症可先于 PD 出现，抑郁患者发展为 PD 的风险显著高于无抑郁者，提示抑郁症可能成为 PD 发病的独立危险因素。此外，在机体中，正常水平的 ROS 在细胞信号传导、病原体防御和体内平衡起着关键作用。然而，大量的 ROS 会引起脂质过氧化和 DNA 损伤，从而影响细胞结构和功能。由 ROS 介导的氧化应激在神经退行性疾病的发生和发展中占据关键地位^[10]。细胞内

ROS 信号通路可能是氧化应激和过度炎症反应的基础,过量的 ROS 会导致体内氧化应激水平升高,激活 NLRP3 炎症小体。NLRP3 炎症小体的核心组分为 NLRP3、ASC 及 Caspase-1,三者通过构建 NLRP3-ASC-Caspase-1 级联信号网络,实现对促炎细胞因子成熟与释放过程的精准调控,从而影响 DA 的转运,导致 DA 丢失^[11]。为了探究抑郁症对帕金森病影响的潜在途径,本研究采用 CORT 预处理联合 LPS 激活 BV2 细胞的实验模型,系统观察该处理对 NLRP3 炎症小体激活状态的调控效应,同时观察了 Bio A 对其的抑制作用,发现在 CORT 的预处理后, LPS 激活小胶质细胞分泌的 ROS 和 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达明显增加,而 Bio A 可以降低 ROS 和 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达。

CUMS 会使糖皮质激素分泌增多,破坏 GR,进而抑制负反馈调节,最终引起免疫、神经等多功能的失调。研究^[12]表明,长期应激导致抑郁的机制可能与机体内糖皮质激素水平升高,HPA 轴呈脱抑制状态有关。在 GR 低表达的转基因小鼠模型中,因糖皮质激素对 HPA 轴的负反馈抑制效应显著减弱,致使该轴系调控功能发生紊乱,进而诱导小鼠表现出典型的抑郁样行为表型^[13]。同时,糖皮质激素受体下调会激活小胶质细胞,活化的小胶质细胞会释放多种炎症细胞因子,如: IL-1 β , IL-6, TNF- α 等。这些炎症因子又可以反过来进一步活化小胶质细胞,损伤神经细胞,诱导神经退行性疾病的发生^[14]。本实验结果表明, CORT 和 LPS 联合影响了 BV2 细胞中 5-HTT、GR 和 MR 蛋白的表达,而 Bio A 能促进 GR 并抑制 MR 的表达水平。同时, CORT 预处理后增加了 LPS 激活小胶质细胞分泌的炎性细胞因子 IL-1 β , IL-6 和 TNF- α 的表达水平,而 Bio A 预处理后有效降低了 IL-1 β , IL-6 和 TNF- α 的表达水平。

上述实验结果表明,经 CORT 预处理的小胶质细胞可显著加剧 LPS 诱导的细胞活化程度及促炎细胞因子的表达水平;而 Bio A 能够有效拮抗 CORT 预处理后 LPS 诱导的小胶质细胞激活状态,其保护作用的潜在分子机制可能涉及对 NLRP3 炎症小体活性的抑制调控。

参考文献

- [1] Liu Y, Liu T, Zhou Y, et al. Impeding the combination of astrocytic ASCT2 and NLRP3 by talniflumate alleviates neuroinflammation in experimental models of Parkinson's disease[J]. Acta Pharm Sin B, 2023, 13(2): 662-77. doi: 10.1016/j.apsb.2022.07.021.
- [2] Fornari Laurindo L, Aparecido Dias J, Cressoni Araújo A, et al. Immunological dimensions of

- neuroinflammation and microglial activation: exploring innovative immunomodulatory approaches to mitigate neuroinflammatory progression[J]. *Front Immunol*, 2024, 14: 1305933. doi: 10.3389/fimmu.2023.1305933.
- [3] Li L, Wang Z, You Z, et al. Prevalence and influencing factors of depression in patients with Parkinson's disease[J]. *Alpha Psychiatry*, 2023, 24(6): 234-8. doi: 10.5152/alphapsychiatry.2023.231253.
- [4] 俞益桂, 薛海霞, 韩俊辉, 等. 鸡豆黄素 A 对 MPP⁺ 诱导 PC12 细胞凋亡的保护作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(8): 1204-8. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.08.011.
- [4] Yu Y G, Xue H X, Han J H, et al. The protective effects of Bioch A on MPP⁺ induced PC12 cell apoptosis[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2020, 55(8): 1204-8. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.08.011.
- [5] 韩俊辉, 杨 丽, 俞益桂, 等. 鸡豆黄素 A 抑制血管紧张素 II 诱导的小胶质细胞活化及其机制的研究[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(8): 1117-23.
- [5] Han J H, Yang L, Yu Y G, et al. BiochA inhibits Ang II-induced microglial activation and its mechanism[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2020, 36(8): 1117-23.
- [6] Kong H, Yang L, He C, et al. Chronic unpredictable mild stress accelerates lipopolysaccharide-induced microglia activation and damage of dopaminergic neurons in rats[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2019, 179: 142-9. doi: 10.1016/j.pbb.2019.01.004.
- [7] Lee S J, Wang C, Hooker J. Microglia matters: visualizing the immune battle in Parkinson's disease[J]. *J Clin Invest*, 2025, 135(12): e192919. doi: 10.1172/JCI192919.
- [8] Yan Z, Yang F, Sun L, et al. Role of gut microbiota-derived branched-chain amino acids in the pathogenesis of Parkinson's disease: An animal study[J]. *Brain Behav Immun*, 2022, 106: 307-21. doi: 10.1016/j.bbi.2022.09.009.
- [9] Zhao X, Li L, Ma X, et al. The role of immune and inflammatory-related indicators in cognitive dysfunction and disease severity in patients with Parkinson's disease[J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2024, 131(1): 13-24. doi: 10.1007/s00702-023-02704-8.
- [10] Heidari A, Yazdanpanah N, Rezaei N. The role of Toll-like receptors and neuroinflammation in Parkinson's disease[J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 135. doi: 10.1186/s12974-022-02496-w.
- [11] Wang T, Shi C, Luo H, et al. Neuroinflammation in Parkinson's Disease: triggers,

mechanisms, and immunotherapies[J].

Neuroscientist,2022,28(4):364-81.doi:10.1177/1073858421991066.

[12] Palumbo M L, Prochnik A, Wald M R, et al. Chronic stress and glucocorticoid receptor resistance in asthma[J]. *Clin Ther*, 2020, 42(6): 993-1006. doi: 10.1016/j.clinthera.2020.03.002.

[13] Feng L S, Wang Y M, Liu H, et al. Hyperactivity in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: an invisible killer for anxiety and/or depression in coronary atherosclerotic heart disease[J]. *J Integr Neurosci*, 2024, 23(12): 222. doi: 10.31083/j.jin2312222.

[14] Almeida Á M A N, Santos C C D, Takahashi D, et al. The biflavonoid agathisflavone regulates microglial and astrocytic inflammatory profiles via glucocorticoid receptor[J]. *Molecules*, 2025, 30(5): 1014. doi: 10.3390/molecules30051014.