

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 μg/mL)组、LPS(1 μg/mL) + CORT(50 nmol/L)组、LPS(1 μg/mL) + CORT(50 nmol/L) + Bio A(5 μmol/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 μg/mL) 和 Bio A(5 μmol/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 μg/mL)组比较, CORT(50 nmol/L) + LPS(1 μg/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 μg/mL)组比较, CORT(50 nmol/L) + LPS(1 μg/mL) + Bio A(5 μmol/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 **文章编号** 1000-1492(2025)09-1712-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.09.019

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 mind 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。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, 该研究旨在观察 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

2025-06-16 接收

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: yinyan-yan5678@126.com

氮(nitric oxide, NO)检测试剂盒、青-链霉素溶液(江苏碧云天生物技术有限公司,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、兔抗白细胞介素-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、兔抗白细胞介素-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: CX23LEDRF(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(型号:ChemiQ 4600)购自上海欧翔科学仪器有限公司;全波长酶标仪购自美国 Molecular Device 公司(型号:Spectra-Max190);Countstar 自动细胞计数仪购自上海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),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(5 mg/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。除对照组与 LPS 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。除对照组与 LPS 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 °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 °C 培养箱培养 24 h。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 为差异有统计学意义。

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 所示,与 0 $\mu\text{g/mL}$ 相比,当 LPS 的浓度从 0.01 ~ 1 $\mu\text{g/mL}$,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 $\mu\text{g/mL}$ 时,实验组的 MTT 检测值较对照组降低($t = 2.83, 4.44, P < 0.05$)。提示实验所需的适宜 LPS 造模浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 。此外,为了寻找合适的 Bio A 剂量,用 2.5 ~ 40 $\mu\text{mol/L}$ Bio A 处理 BV2 细胞。如图 1B 所示,与 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较,当 Bio A 的浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 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 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞的活力明显下降($t = 2.82, P < 0.05$)。而浓度在 5

$\mu\text{mol/L}$ Bio A 对 BV2 细胞基本没有损伤,故选择 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 Bio A 作为实验剂量。

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 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞上清液的 NO 含量明显增加,差异有统计学意义($t = 10.29, P < 0.01$);与 LPS 组相比较,LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) + 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 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) + 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。

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,结果如图 3 所示,与 Control 组比较,LPS 组的 DCF 荧光强度明显增加

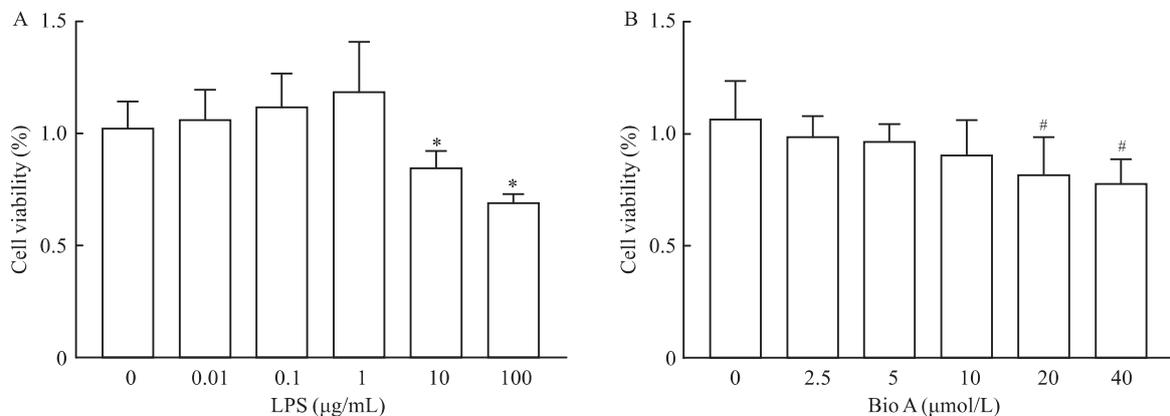


图1 不同浓度的 LPS 和 Bio A 对 BV2 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

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 $\mu\text{g/mL}$ LPS; # $P < 0.05$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$ Bio A.

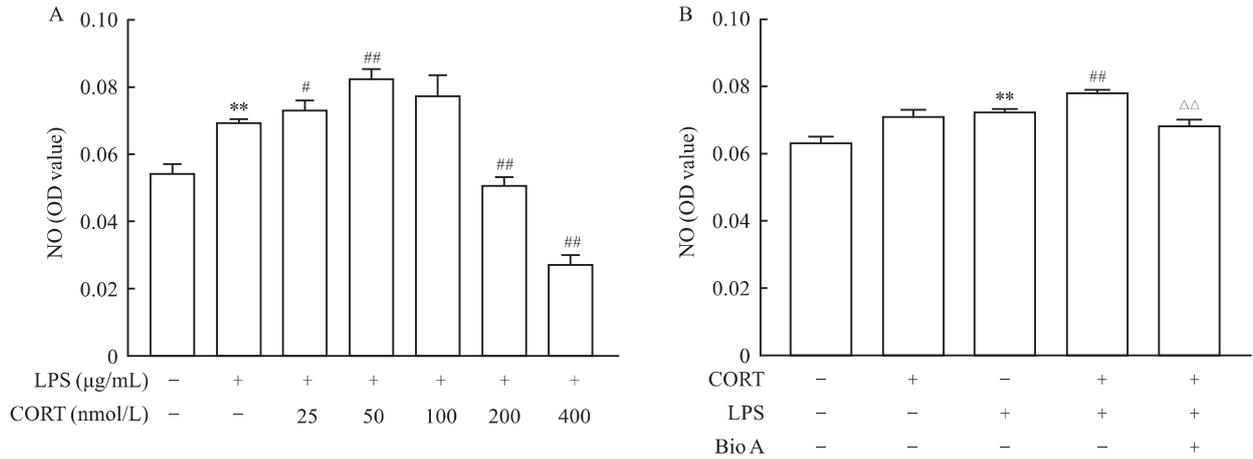


图2 Bio A 对 LPS 诱导的 BV2 细胞产生 NO 的影响和对 CORT + LPS 诱导的 BV2 细胞产生 NO 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

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.

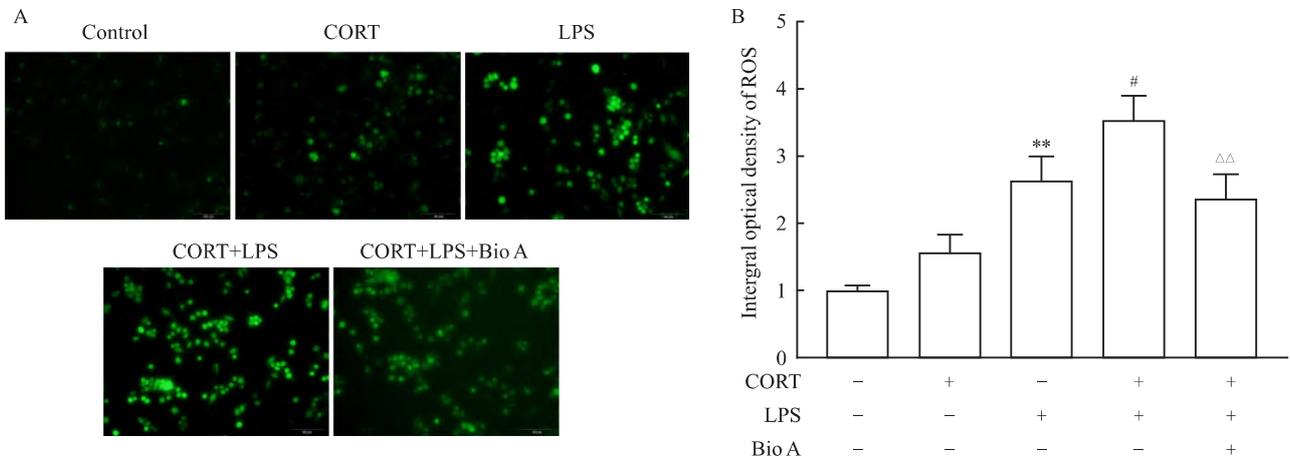


图3 Bio A 对 CORT 和 LPS 联合激活的 BV2 细胞中 ROS 影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

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; △△ $P < 0.01$ vs CORT + LPS group.

($t = 7.94, P < 0.01$)。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($t = 4.07, P < 0.01$)。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。

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 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($t = 13.20, P < 0.01$)。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。

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。

2.6 Bio A 对 CORT 和 LPS 联合激活的 BV2 细

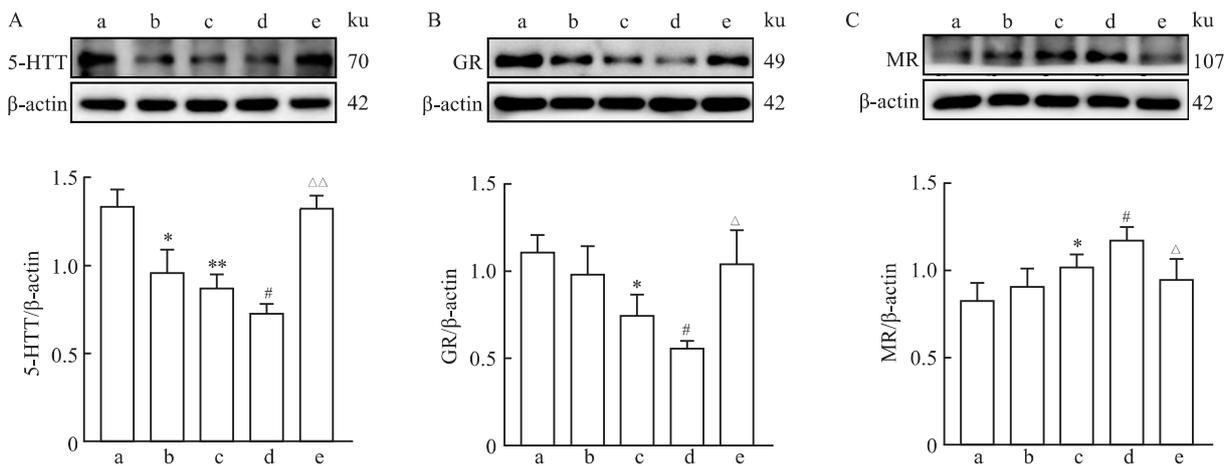


图 4 Bio A 对 CORT 和 LPS 联合激活的 BV2 细胞中 5-HTT、GR 和 MR 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$) group; d: CORT (50 nmol/L) + LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) group; e: CORT (50 nmol/L) + LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + Bio A (5 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 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.

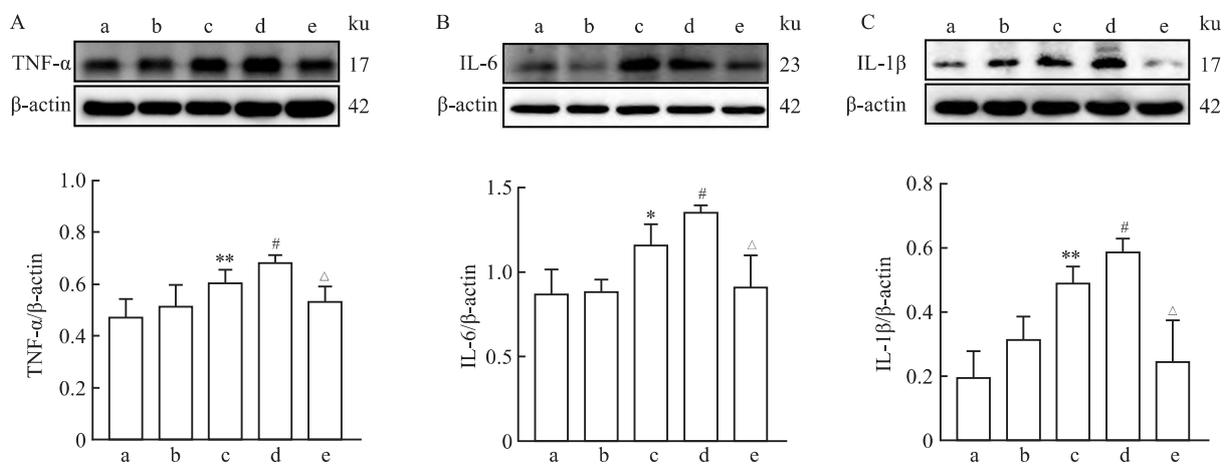


图 5 Bio A 对 CORT 和 LPS 联合激活的 BV2 细胞中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$) group; d: CORT (50 nmol/L) + LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) group; e: CORT (50 nmol/L) + LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + Bio A (5 $\mu\text{mol}/\text{L}$) group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs LPS group; $\Delta P < 0.05$ vs CORT + LPS group.

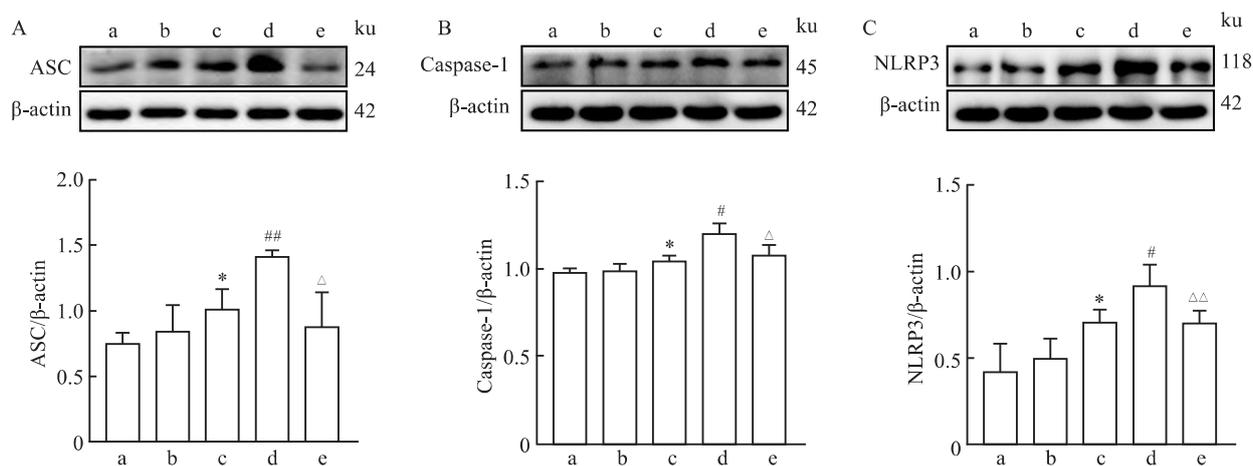


图6 Bio A对CORT和LPS联合激活的BV2细胞中ASC、Caspase-1和NLRP3蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

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 μg/mL) group; d: CORT (50 nmol/L) + LPS (1 μg/mL) group; e: CORT (50 nmol/L) + LPS (1 μg/mL) + Bio A (5 μmol/L) group; * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs LPS group; Δ $P < 0.05$, ΔΔ $P < 0.01$ vs CORT + LPS group.

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。

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]显示抑郁症可先于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。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。

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 Biochanin 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. doi: 10.3969/j.issn.1001-1978.2020.08.016.
- [5] Han J H, Yang L, Yu Y G, et al. Biochanin A inhibits Ang II-induced microglial activation and its mechanism [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2020, 36(8): 1117–23. doi: 10.3969/j.issn.1001-1978.2020.08.016.
- [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 ú 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.

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, School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Warwick Medical School, Coventry CV4 7AL, Britain)

Abstract Objective To investigate the regulatory effect of corticosterone (CORT) pretreatment on the activation

(下转第 1729 页)

(PGT-M) in families with hereditary epilepsy. **Methods** Whole-exome sequencing (WES) and familial co-segregation analysis were performed to validate the pathogenicity of variants (*PCDH19* c.1031C>G and *LGII* c.856T>G) in two monogenic epilepsy families. A clinical PGT-M pathway was implemented, and reproductive outcomes were tracked. **Results** In Family 1 (*PCDH19* likely pathogenic variant), 13 blastocysts were biopsied over two ovarian stimulation cycles, yielding 3 unaffected euploid embryos (23.1%). After the third frozen embryo transfer, a healthy male infant was successfully delivered. Prenatal diagnosis confirmed that the fetus did not carry the pathogenic variant *PCDH19*. Family 2 (*LGII* variant of uncertain significance, VUS) screened 14 blastocysts, identifying 2 unaffected euploid embryos (14.3%), with the first transfer unsuccessful. A clinical pregnancy was currently ongoing following the second frozen-thawed embryo transfer (FET). **Conclusion** PGT-M can precisely block the vertical transmission of monogenic epileptic pathogenic variants, offering an effective reproductive intervention strategy for families with hereditary epilepsy.

Key words hereditary epilepsy; whole-exome sequencing; *PCDH19* gene; *LGII* gene; preimplantation genetic testing for monogenic disorders; pedigree study

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82401922); National Key Research and Development Program of China (No. 2021YFC2700600)

Corresponding author Cao Yunxia, E-mail: caoyunxia6@126.com

(上接第 1718 页)

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$) group, LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + CORT (50 nmol/L) group, and LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + CORT (50 nmol/L) + Bio A (5 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and BioA (5 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$) groups, cells in the CORT (50 nmol/L) + LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$) group, the CORT (50 nmol/L) + LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + Bio A (5 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 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. 2021zhyc-C18); Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 1908085MH270)

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