

# 黄芩素抑制小胶质细胞活化及保护 SH-SY5Y 神经细胞的机制

尹梦霞<sup>1</sup>, 欧阳竞锋<sup>1\*</sup>, 崔拓拓<sup>2</sup>, 刘鑫<sup>2</sup>, 孙梦菲<sup>1</sup>, 荆志伟<sup>3</sup>

- (1. 中国中医科学院医学实验中心 中医药防治重大疾病基础研究北京市重点实验室, 北京 100700;
2. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078;
3. 中国中医科学院中医临床基础医学研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的:探讨黄芩素(BAI)对脂多糖(LPS)激活的BV-2细胞条件培养基下SH-SY5Y细胞损伤的干预作用及机制。方法:用LPS  $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 激活BV-2细胞建立LPS组条件培养基,同时设置空白组、BAI低、中、高浓度组( $4, 8, 16\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),使用各组条件培养基培养SH-SY5Y细胞。通过细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒测定干预后各组BV-2细胞的细胞活力,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测各组BV-2细胞上清液中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素- $1\beta$ (IL- $1\beta$ )含量;采用免疫组化(IHC)观察SH-SY5Y细胞中 $\alpha$ -突触核蛋白( $\alpha$ -syn)、酪氨酸羟化酶(TH)蛋白表达情况,免疫荧光(IF)法观察SH-SY5Y细胞中核转录因子- $\kappa$ B p65蛋白(NF- $\kappa$ B p65,以下简称p65)核转移情况,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测SH-SY5Y细胞Toll样受体4(TLR4)、p65、磷酸化(p)-p65、髓样分化因子88(MyD88)蛋白表达情况。结果:与空白组比较,LPS组中BV-2细胞活力显著降低( $P<0.01$ ),细胞上清液中TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL- $1\beta$ 含量均显著升高( $P<0.01$ );与LPS组比较,BAI低、中、高浓度组细胞活力显著升高( $P<0.01$ ),细胞上清液中TNF- $\alpha$ 均显著降低( $P<0.01$ ),BAI高浓度( $16\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )组细胞上清液中IL-6含量明显降低( $P<0.05$ ),BAI中、高浓度组细胞上清液中IL- $1\beta$ 含量显著降低( $P<0.01$ )。条件培养基处理SH-SY5Y细胞的结果显示,与空白组比较,LPS组SH-SY5Y细胞中p65蛋白表达向核内聚集,TH蛋白表达显著下降( $P<0.01$ ), $\alpha$ -syn、TLR4、MyD88、p-p65蛋白表达均明显升高( $P<0.05, P<0.01$ );与LPS组比较,BAI低、中、高浓度组SH-SY5Y细胞中p65蛋白表达逐渐分散至细胞质中,TH蛋白表达均显著升高( $P<0.01$ ), $\alpha$ -syn蛋白表达均显著降低( $P<0.01$ ),BAI高浓度组TLR4、MyD88、p-p65蛋白表达明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ),BAI中浓度组p-p65和MyD88蛋白表达均明显降低( $P<0.05$ ),BAI低浓度组MyD88蛋白表达明显降低( $P<0.05$ )。各组p65蛋白表达差异无统计学意义。结论:BAI能够抑制BV-2细胞激活,从而抑制LPS造成的炎症反应,进而进一步抑制炎症对SH-SY5Y细胞的损伤,其作用机制可能在于调节TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B信号通路,减轻炎症反应,发挥神经保护作用。

**[关键词]** 帕金森病; 脂多糖(LPS); 黄芩素(BAI); Toll样受体4(TLR4)

**[中图分类号]** R2-0;R22;R33;R289;R742 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)10-0093-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20230237

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.r.20230131.1447.007.html>

**[网络出版日期]** 2023-02-01 10:38:48

## Mechanism of Baicalein in Inhibiting Microglial Activation and Protecting SH-SY5Y Nerve Cells

YIN Mengxia<sup>1</sup>, OUYANG Jingfeng<sup>1\*</sup>, CUI Tuotuo<sup>2</sup>, LIU Xin<sup>2</sup>, SUN Mengfei<sup>1</sup>, JING Zhiwei<sup>3</sup>

- (1. Beijing Key Laboratory of Research of Chinese Medicine on Prevention and Treatment for Major Diseases, Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China;
3. Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[收稿日期]** 2022-09-06

**[基金项目]** 国家中医药管理局全国中医药创新骨干人才培养项目(ZX2020003)

**[第一作者]** 尹梦霞,在读硕士,从事中医药防治神经退行性疾病的研究,E-mail:yinmengxia1996@163.com

**[通信作者]** \* 欧阳竞锋,博士,研究员,硕士生导师,从事中医药防治神经退行性疾病的研究,E-mail:springeltics@163.com

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of baicalein (BAI) on SH-SY5Y cell injury in lipopolysaccharide (LPS)-activated BV-2 cells conditioned medium and its mechanism. **Method:** The BV-2 cells were activated with  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  of LPS to establish the conditioned medium of the LPS group, and a blank group and groups of BAI with low, medium, and high concentrations ( $4, 8, 16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) were established. SH-SY5Y cells were cultured with the conditioned medium of each group. The cell viability of BV-2 cells in each group after the intervention was determined by cell counting kit-8 (CCK-8). The content of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in the supernatant of BV-2 cells in each group was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The protein expression of  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn) and tyrosine hydroxylase (TH) in SH-SY5Y cells was observed by immunohistochemical (IHC) staining, and the nuclear transfer of nuclear factor kappa-B p65 protein (NF- $\kappa$ B p65, p65) in SH-SY5Y cells was observed by immunofluorescence (IF). The protein expression of Toll-like receptor 4 (TLR4), p65, phosphorylated p65 (p-p65), and Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) in SH-SY5Y cells was observed by Western blot. **Result:** As compared with the blank group, the viability of BV-2 cells in the LPS group was significantly decreased ( $P < 0.01$ ), and the content of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$  in the cell supernatant was significantly increased ( $P < 0.01$ ). As compared with the LPS group, the cell viability was significantly increased in groups of BAI with low, medium, and high concentrations ( $P < 0.01$ ), and TNF- $\alpha$  in the cell supernatant was significantly decreased ( $P < 0.01$ ). The content of IL-6 in the cell supernatant was decreased in the BAI group with high concentration ( $P < 0.05$ ), and the content of IL-1 $\beta$  in the cell supernatant was significantly decreased in the BAI groups with medium and high concentrations ( $P < 0.01$ ). The results of conditioned medium cultured SH-SY5Y cells showed that as compared with the blank group, the protein expression of p65 in the LPS group entered into the nucleus and accumulated, and the protein expression of TH was significantly decreased ( $P < 0.01$ ), while that of  $\alpha$ -syn, TLR4, MyD88, and p-p65 was increased ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). Compared with the LPS group, the protein expression of p65 in SH-SY5Y cells in BAI groups with low, medium, and high concentrations gradually dispersed into the cytoplasm and had the enhanced protein expression of TH ( $P < 0.01$ ) but the lowered protein expression of  $\alpha$ -syn ( $P < 0.01$ ). The protein expression of TLR4, MyD88, and p-p65 was decreased in the BAI group with high concentration ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), the protein expression of p-p65 and MyD88 was decreased in the BAI group with medium concentration, and the protein expression of MyD88 was decreased in the BAI group with low concentration ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the protein expression of p65 among groups. **Conclusion:** BAI can inhibit the activation of BV-2 cells, thereby inhibiting the inflammatory response caused by LPS and further inhibiting the damage of inflammation to SH-SY5Y cells. The mechanism may be related to the regulation of the TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway and reduction of the inflammatory response, thus playing a neuroprotective role.

**[Keywords]** Parkinson's disease; lipopolysaccharide (LPS); baicalein (BAI); Toll-like receptor 4 (TLR4)

帕金森病(PD)是一种常见的进行性神经系统变性疾病,主要的病理特征为黑质致密部多巴胺能神经元的丧失和路易小体的形成<sup>[1-2]</sup>。目前,PD尚无有效的治疗手段,现代医学多以对症治疗为主,通过补充多巴胺能制剂为基础治疗运动症状,辅以非多巴胺能制剂和运动康复治疗非运动症状<sup>[3]</sup>。然而长期服用多巴胺能制剂,会产生运动障碍、精神类障碍及自主神经症状等不良反应<sup>[4]</sup>。神经炎症是PD的一个重要致病因素,炎症因子持续存在和免疫

细胞应答可加剧神经炎症,并造成神经元损伤<sup>[5]</sup>。本课题组前期研究发现,柴胡加龙骨牡蛎汤能够通过调节腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路,激活自噬途径,促进异常 $\alpha$ -突触核蛋白( $\alpha$ -syn)清除,保护PD模型大鼠中脑多巴胺能神经元,缓解模型大鼠PD伴抑郁症状<sup>[6]</sup>。黄芩是柴胡加龙骨牡蛎汤的重要组成部分之一,黄芩素(BAI)是其中含量最多的黄酮类化合物。研究发现BAI能够有效缓解1-甲基-4-苯基-1,2,3,

6-四氢吡啶(MPTP)对大鼠造成的神经炎症<sup>[7]</sup>。小胶质细胞是中枢神经系统的重要免疫细胞,激活状态的小胶质细胞表现为M1促炎型,能够释放多种促炎因子,如肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素- $1\beta$ (IL- $1\beta$ )等,且研究发现脂多糖(LPS)激活的小胶质细胞条件培养基能够诱导大鼠多巴胺能神经元凋亡<sup>[8-11]</sup>。本课题前期调查发现BAI可以抑制活性氧(ROS)生成,降低环氧化酶-2(COX-2)及核转录因子- $\kappa$ B p65(NF- $\kappa$ B p65,以下简称p65)表达,改善LPS所造成的小胶质细胞炎症反应<sup>[12]</sup>。本研究观察了不同浓度的BAI对LPS激活的BV-2细胞条件培养基处理的SH-SY5Y细胞的保护作用及机制。

## 1 材料

**1.1 细胞** 小鼠小胶质细胞BV-2细胞购于武汉普诺赛生命科技有限公司,目录号CL-0493,已传至第5代。人神经母瘤细胞SH-SY5Y细胞购于中国科学院上海生命科学研究院中国科学院细胞库,目录号SCSP-5014,已传至第10代。

**1.2 药品和试剂** BAI(新西兰Bepure公司,批号RMT12400);LPS(美国Sigma公司,批号028M4094V);MEM培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号PM150410);胎牛血清(FBS,美国Gibco公司,批号1315148);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(北仁化工科技有限公司,批号CK18);BCA蛋白浓度测定试剂盒、5 $\times$ 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)兔单克隆抗体、Alexa Fluor 488标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(H+L)(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为P0010、P0015L、AF5003、A0423);兔单克隆p65抗体、磷酸化p65(p-p65)兔单克隆抗体、髓样分化因子88(MyD88)山羊多克隆抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab32536、ab76302、ab28763); $\alpha$ -syn小鼠单克隆抗体、酪氨酸羟化酶(TH)兔多克隆抗体、Toll样受体4(TLR4)小鼠单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠IgG(H+L)、HRP标记山羊抗兔IgG(H+L)、HRP标记兔抗山羊IgG(H+L)、超敏ECL化学发光检测试剂盒(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为66412-1-Ig、25859-1-AP、66350-1-Ig、SA00001-1、SA00001-2、SA00001-4、PK10003);DAB显色试剂盒、小鼠二步法检测试剂盒、兔二步法检测试剂盒(北京中杉金桥生物有限公司,批号分别为ZLI-9019、PV-9002、PV-9001);小鼠白细胞介素-6(IL-6)、TNF- $\alpha$ 、IL- $1\beta$ 酶联免疫吸附测定法(ELISA)试

剂盒(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号分别为9680029110522、9681026100122、9680034120522)。

**1.3 仪器** VS120-S6-W型数字切片扫描系统(日本Olympus公司);Synergy H1型全自动酶标仪(美国BioTek公司);AE2000型倒置显微镜(厦门麦克奥迪光学仪器有限公司);SC-3612型低速水平离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);SW-CJ-2FD型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);Chemidoc多功能呈像系统、MP Tetra型蛋白电泳仪(美国Bio-Rad公司);BIOCEN22R型冷冻型微量离心机(德国维根思公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** BV-2细胞、SH-SY5Y细胞分别培养于含10% FBS、1%抗生素(青霉素100 U $\cdot$ mL<sup>-1</sup>,链霉素100 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>)、1% L-谷氨酰胺的MEM培养基中。培养条件为37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>,每2~3 d传代1次。

**2.2 药物制备** 取BAI 25 mg,使用二甲基亚砜(DMSO)9.26 mL溶解,配置成10 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>的原液,分装后置于-20 $^{\circ}$ C避光保存。使用时用完全培养基稀释至所需浓度。

**2.3 不同浓度的BAI对LPS激活的BV-2细胞形态的影响** 对数生长期BV-2细胞以6 $\times$ 10<sup>4</sup>个/mL的密度接种于96孔板中,培养24 h,取出96孔板,镜下观察细胞,细胞贴壁。将细胞分为空白组、LPS组、BAI低、中、高浓度组。空白组及LPS组给予完全培养基,BAI低、中、高浓度组分别给予终浓度为4、8、16  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>的BAI,每组设置3个复孔,继续置于恒温恒湿培养箱中预处理。4 h后,取出96孔板,除空白组外,其余组均给予LPS,使其终浓度1 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>,共同培养继续培养24 h。24 h后,取出96孔板,观察细胞形态。

**2.4 CCK-8试剂盒检测不同浓度的BAI对LPS激活的BV-2细胞活力的影响** 取对数期BV-2细胞按2.3项中接种、培养及干预方式培养。48 h后,取出96孔板,PBS漂洗细胞3次。每孔加入基础培养基100  $\mu$ L+CCK-8溶液10  $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C避光孵育1.5 h后,酶标仪450 nm下测定吸光度A。细胞活力计算公式:(A<sub>实验孔</sub>-A<sub>空白孔</sub>)/(A<sub>对照孔</sub>-A<sub>空白孔</sub>) $\times$ 100%,其中对照孔为空白组。

**2.5 ELISA检测BV-2细胞上清液中TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL- $1\beta$ 含量** 对数期BV-2细胞按2.3项中方式进行相同培养,48 h后收集细胞上清,根据ELISA说明书步骤检测各组细胞上清液中TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL- $1\beta$ 含量。

**2.6 不同浓度BAI处理的LPS激活的BV-2细胞条件培养基对SH-SY5Y细胞形态的影响** 将对数期BV-2细胞按2.3项中接种密度接种于24孔板中,并进行培养及干预,48 h后收集细胞上清。同时取对数期SH-SY5Y细胞以 $5 \times 10^4$ 个/mL的密度接种于24孔板,培养24 h后,取出24孔板,镜下观察细胞形态正常,贴壁生长。将细胞分为空白组、LPS组、BAI低、中、高浓度(4、8、16  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )组,弃去原培养基,分别更换BV-2细胞各组细胞上清,并按1:1比例补充新鲜完全培养基,继续培养。12 h后,取出细胞,观察SH-SY5Y细胞形态。

**2.7 免疫组化(IHC)法检测SH-SY5Y细胞TH、 $\alpha$ -syn蛋白表达的影响** 将对数期BV-2细胞和SH-SY5Y细胞按2.6项中接种浓度分别接种于24孔板中,并进行培养及干预。培养完成后,取出细胞,弃去上清,加入PBS漂洗3次,每孔加入细胞组织固定液1 mL,固定。20 min后进行IHC染色, $\alpha$ -syn(1:1 000)、TH(1:800)一抗,DAB显色,中性树脂封片。最后于数字切片扫描系统观察各组细胞着色情况并拍照。

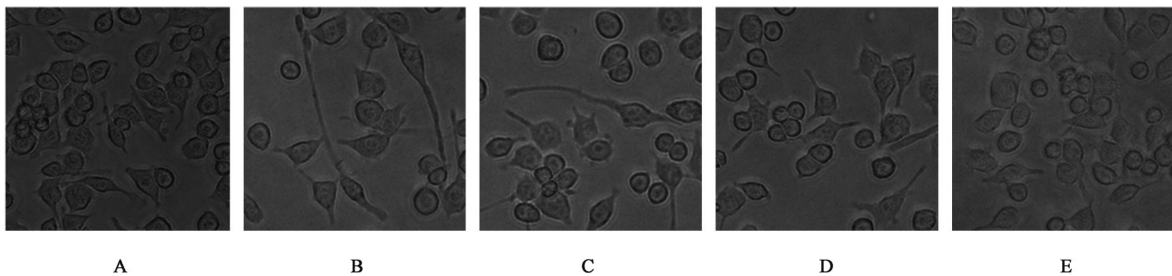
**2.8 免疫荧光(IF)法检测SH-SY5Y细胞p65蛋白核转移的影响** 将对数期BV-2细胞和SH-SY5Y细胞按2.6项中接种浓度分别接种于24孔板中,并进行培养及干预。培养完成后,取出细胞,弃上清,加入PBS漂洗3次,每孔加入细胞组织固定液1 mL。固定20 min后进行IF染色,p65(1:800)4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜。之后使用Alexa Fluor 488标记山羊抗兔IgG荧光二抗(1:250)室温避光孵育1 h,TBS洗涤,DAPI复染细胞核,封片,荧光显微镜下观察并拍照。

**2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测SH-SY5Y细胞TLR4、p65、p-p65、MyD88蛋白表达** 将对数期BV-2细胞和SH-SY5Y细胞按2.6项中接种密度分别接种于24孔板中,进行培养及干预。培养完成后,PBS漂洗3次。每孔加入RIPA裂解液100  $\mu\text{L}$ ,4  $^{\circ}\text{C}$ 、10 000  $\times g$ 离心10 min(离心半径9.49 cm),提取细胞总蛋白,BCA法蛋白定量。加入SDS-PAGE蛋白上样缓冲液,沸水加热变性。取各组制备好的蛋白样本15  $\mu\text{g}$ 上样进行SDS-PAGE凝胶电泳,转膜至PVDF膜,快速封闭液室温封闭1 h;4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育一抗( $\beta$ -actin、p65、p-p65、TLR4、MyD88,稀释比例分别为1:2 500、1:1 000、1:1 000、1:5 000、1:1 000)摇床过夜孵育;TBST洗膜3次,5 min/次;室温1 h摇床孵育二抗(1:5 000);TBST洗膜3次,5 min/次;ECL显影;Image J软件分析目的蛋白条带灰度值。

**2.10 统计学分析** 所有数据采用GraphPad Prism 8.0.2统计软件进行分析,计量资料数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组样品比较采用独立样本 $t$ 检验,组间显著性差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 不同浓度的BAI对LPS激活的BV-2细胞形态的影响** 正常培养条件下BV-2细胞半悬浮、半贴壁生长,多成圆形或者梭形,细胞突起少且短。与空白组比较,LPS组细胞胞体变大,圆形细胞减少,部分细胞分枝增多、变长且细胞数减少;与LPS组比较,BAI各浓度组中圆形细胞逐渐变多,细胞分枝逐渐减少、变短。见图1。



注:A.空白组;B.LPS组;C.BAI低浓度组;D.BAI中浓度组;E.BAI高浓度组(图2-图6同)

图1 不同浓度的BAI对LPS激活的BV-2细胞形态的影响(倒置显微镜, $\times 200$ )

Fig. 1 Effect of different concentrations of BAI on morphology of LPS-activated BV-2 cells (inverted microscope,  $\times 200$ )

**3.2 不同浓度的BAI对LPS激活的BV-2细胞活力的影响** CCK-8结果显示,与空白组比较,LPS组BV-2细胞活力显著降低( $P < 0.01$ );与LPS组比较,BAI低、中、高浓度组BV-2细胞活力均显著增高( $P < 0.01$ )。见表1。

**3.3 不同浓度的BAI对LPS激活的BV-2细胞的上清液中TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 含量的影响** ELISA法结果显示,与空白组比较,LPS组BV-2细胞上清液中TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 含量均显著升高( $P < 0.01$ );与LPS组比较,BAI低、中、高浓度组细胞上清液中

表1 不同浓度的BAI对LPS激活的BV-2细胞活力的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 1 Effect of different concentrations of BAI on viability of LPS activated BV-2 cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	浓度	细胞活性/%
空白组		100.00±0.00
LPS组	1 mg·L <sup>-1</sup>	78.98±0.96 <sup>1)</sup>
BAI低浓度组	1 mg·L <sup>-1</sup> +4 μmol·L <sup>-1</sup>	98.11±3.87 <sup>2)</sup>
BAI中浓度组	1 mg·L <sup>-1</sup> +8 μmol·L <sup>-1</sup>	92.83±1.61 <sup>2)</sup>
BAI高浓度组	1 mg·L <sup>-1</sup> +16 μmol·L <sup>-1</sup>	95.29±2.16 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.01;与LPS组比较<sup>2)</sup>P<0.01(表3同)

表2 不同浓度的BAI对LPS激活的BV-2细胞的上清液中TNF-α、IL-6、IL-1β含量的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of different concentrations of BAI on contents of TNF-α, IL-6 and IL-1β in supernatant of LPS activated BV-2 cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	浓度	TNF-α	IL-6	IL-1β
空白组		117.6±0.8	85.83±10.6	27.1±1.7
LPS组	1 mg·L <sup>-1</sup>	5 039.0±291.5 <sup>1)</sup>	6 421.0±1 486.0 <sup>1)</sup>	39.2±0.8 <sup>1)</sup>
BAI低浓度组	1 mg·L <sup>-1</sup> +4 μmol·L <sup>-1</sup>	3 948.0±139.7 <sup>3)</sup>	4 341.0±998.2	34.9±2.5
BAI中浓度组	1 mg·L <sup>-1</sup> +8 μmol·L <sup>-1</sup>	3 275.0±434.2 <sup>3)</sup>	4 178.0±1 025.0	29.2±3.1 <sup>3)</sup>
BAI高浓度组	1 mg·L <sup>-1</sup> +16 μmol·L <sup>-1</sup>	1 842.0±489.0 <sup>3)</sup>	3 717.0±449.0 <sup>2)</sup>	28.0±2.2 <sup>3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.01;与LPS组比较<sup>2)</sup>P<0.05,<sup>3)</sup>P<0.01

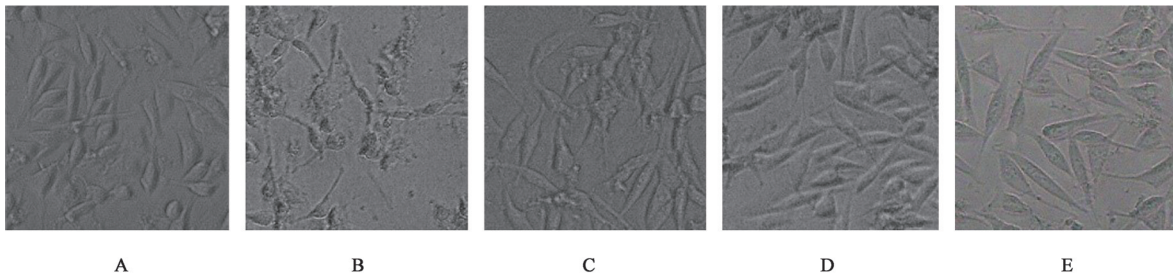


图2 不同浓度的BAI处理的LPS激活BV-2细胞条件培养基对SH-SY5Y细胞形态的影响(倒置显微镜,×200)

Fig. 2 Effect of different concentrations of BAI on morphology of SH-SY5Y cells activated by LPS activated BV-2 cell conditioned medium (inverted microscope, ×200)

3.5 不同浓度的BAI对LPS激活的BV-2细胞条件培养基处理的SH-SY5Y细胞中TH、α-syn蛋白表达的影响 与空白组比较,LPS组SH-SY5Y细胞胞质中TH蛋白表达显著下降( $P<0.01$ ),α-syn蛋白表达显著升高( $P<0.01$ );与LPS组比较,BAI低、中、高浓度组SH-SY5Y细胞胞质中TH蛋白表达均显著升高( $P<0.01$ ),但无浓度依赖性;与LPS组比较,BAI低、中、高浓度组SH-SY5Y细胞胞质中α-syn蛋白表达显著降低( $P<0.01$ ),且呈浓度依赖性。见图3、图4和表3。

3.6 不同浓度的BAI对LPS激活的BV-2细胞条件培养基处理的SH-SY5Y细胞中p65蛋白核转移的影响 与空白组比较,LPS组SH-SY5Y细胞p65蛋

白表达向核内聚集;与LPS组比较,BAI低、中、高浓度组SH-SY5Y细胞p65蛋白表达逐渐分散至细胞质中,其中以BAI高浓度组最为明显。见图5。

3.4 不同浓度BAI处理的LPS激活的BV-2细胞条件培养基对SH-SY5Y细胞形态的影响 正常组SH-SY5Y细胞贴壁生长,多成梭形,边界清楚;LPS组SH-SY5Y细胞多成团生长且皱缩、破裂,细胞损伤严重;BAI各浓度组随着BAI浓度升高,细胞形态逐渐恢复梭形,损伤减小,边界清晰。见图2。

3.7 不同浓度的BAI对LPS激活的BV-2细胞条件培养基处理的SH-SY5Y细胞中TLR4、p65、p-p65、MyD88蛋白表达的影响 与空白组比较,LPS组SH-SY5Y细胞中TLR4蛋白表达明显升高( $P<0.05$ ),且MyD88蛋白、p-p65蛋白表达均显著升高( $P<0.01$ );与LPS组比较,BAI高浓度组TLR4蛋白、p-p65蛋白表达明显降低( $P<0.05$ ),MyD88蛋白表达显著降低( $P<0.01$ ),BAI中浓度组p-p65蛋白和MyD88蛋白表达明显降低( $P<0.05$ ),BAI低浓度组MyD88蛋白表达明显降低( $P<0.05$ )。与空白组比

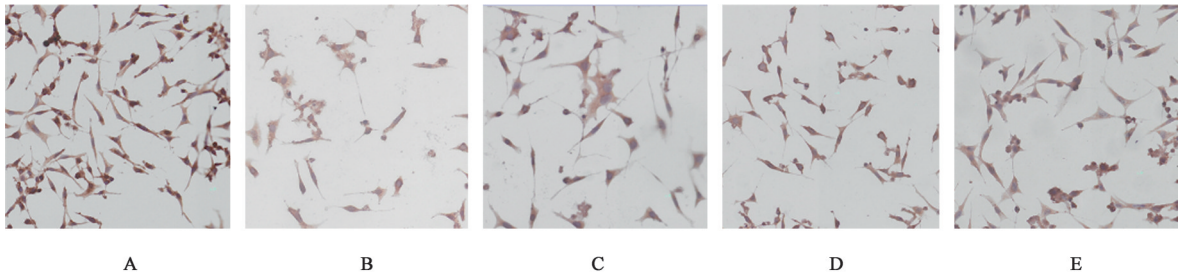


图3 不同浓度的BAI对LPS激活的BV-2细胞条件培养基处理的SH-SY5Y细胞TH蛋白表达(免疫组化,×200)

Fig. 3 Effect of different concentrations of BAI on TH protein expression in SH-SY5Y cells treated with conditioned medium of LPS activated BV-2 cells(IHC,×200)

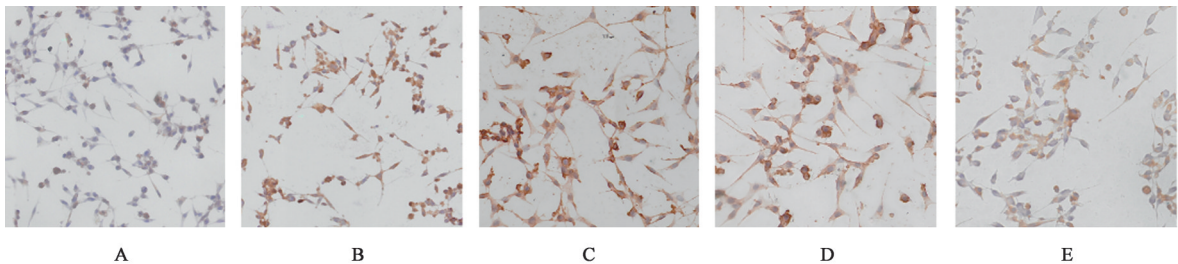


图4 不同浓度的BAI对LPS激活的BV-2细胞条件培养基处理的SH-SY5Y细胞α-syn蛋白表达(免疫组化,×200)

Fig. 4 Effect of different concentrations of BAI on expression of α-syn protein in SH-SY5Y cells treated with conditioned medium of LPS activated BV-2 cells (IHC,×200)

表3 不同浓度的BAI对LPS激活的BV-2细胞条件培养基处理的SH-SY5Y细胞TH、α-syn蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of different concentrations of BAI on TH and α-syn protein expression in SH-SY5Y cells treated with conditioned medium of LPS activated BV-2 cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	浓度	TH	α-syn
空白组		0.367±0.018	0.135±0.007
LPS组	1 mg·L <sup>-1</sup>	0.187±0.019 <sup>1)</sup>	0.289±0.033 <sup>1)</sup>
BAI低浓度组	1 mg·L <sup>-1</sup> +4 μmol·L <sup>-1</sup>	0.249±0.016 <sup>2)</sup>	0.218±0.006 <sup>2)</sup>
BAI中浓度组	1 mg·L <sup>-1</sup> +8 μmol·L <sup>-1</sup>	0.301±0.030 <sup>2)</sup>	0.206±0.013 <sup>2)</sup>
BAI高浓度组	1 mg·L <sup>-1</sup> +16 μmol·L <sup>-1</sup>	0.280±0.010 <sup>2)</sup>	0.146±0.015 <sup>2)</sup>

较, LPS组中SH-SY5Y细胞p65蛋白表达升高,但差异无统计学意义;与模型组比较,BAI中、高浓度组SH-SY5Y细胞中p65蛋白表达降低,但差异无统计学意义。见图6、表4。

#### 4 讨论

PD是一种与年龄相关的,复杂的神经退行性疾病,60至90岁PD发病率可增长5~10倍<sup>[13]</sup>。PD的病因及发病机制尚不明确,主要发病机制包括α-syn的错误折叠和聚集、线粒体功能障碍、泛素-蛋白酶体和自噬-溶酶体系统缺陷、神经炎症和氧化应激<sup>[14]</sup>。

神经炎症是PD的一个重要发病机制,多参与散发性PD的发病和疾病进展,炎症小体介导促炎因子的分泌及炎症的进展与PD的发生密切相关

关<sup>[15-17]</sup>。研究认为伴随脑内小胶质细胞激活,细胞炎症因子的分泌,ROS及一氧化氮(NO)的产生将直接造成了多巴胺神经元的损伤<sup>[18]</sup>。Toll样受体(TLRs)是神经炎症反应中的关键受体,该信号通路包括MyD88依赖途径和MyD88非依赖途径。MyD88与TLRs上的TIR结构域相关,在受刺激时,MyD88通过将IL-1受体相关激酶(IRAK)招募到TLRs上,使得IRAK发生磷酸化而激活,最终刺激NF-κB向核内转移,从而产生炎症因子<sup>[19-21]</sup>。因此TLR4/MyD88/NF-κB是炎症反应中至关重要的信号通路<sup>[22-23]</sup>。

体内外实验发现BAI能有效改善神经炎症。BAI能够有效抑制NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)炎症小体通路,减轻MPTP造成的大鼠神经炎症,缓解大鼠PD症状,同时BAI也可以增加脑源性神经营养因子(BDNF)分泌,激活酪氨酸激酶受体B(TrkB)和环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB),缓解鱼藤酮造成的PD模型大鼠抑郁症状<sup>[7,24]</sup>。并且BAI可以逆转由MPTP造成的SH-SY5Y细胞氧化应激,减少丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)的表达,同时改善MPTP诱导的小鼠运动损伤,抑制铁和脂质过氧化物的积累,保护神经元<sup>[25]</sup>。

本研究使用质量浓度为1 mg·L<sup>-1</sup>的LPS刺激BV-2细胞形成条件培养基作用于SH-SY5Y细胞建

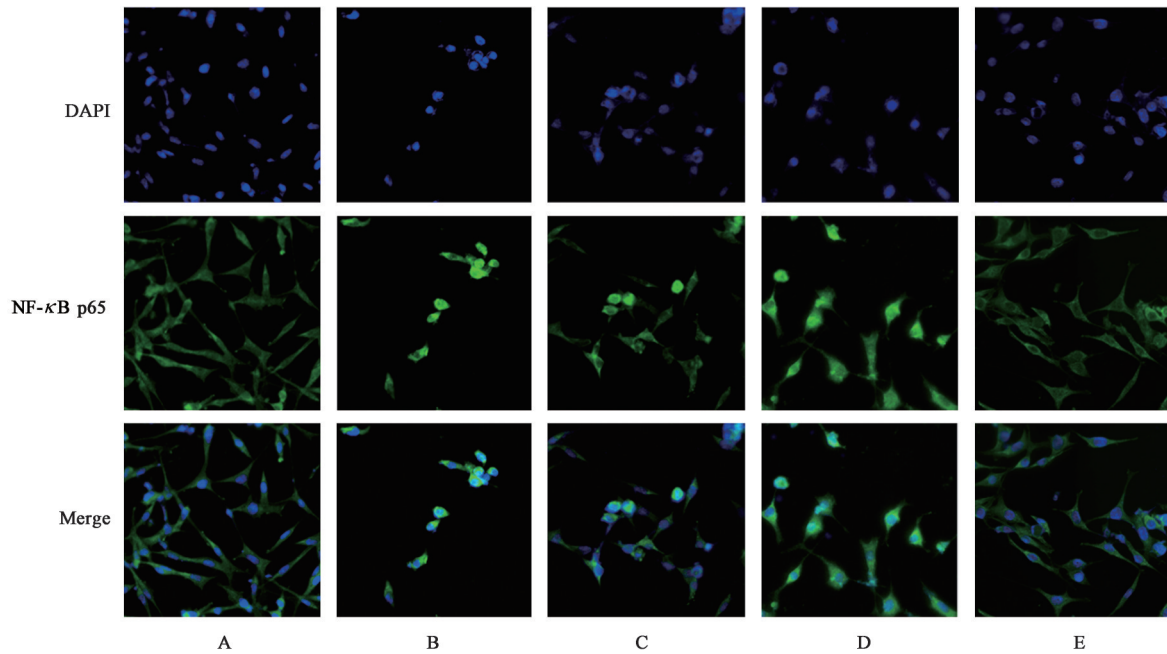


图5 不同浓度的BAI对LPS激活的BV-2细胞条件培养基处理的SH-SY5Y细胞p65蛋白核转移的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 5 Effect of different concentrations of BAI on nuclear transfer of p65 protein in SH-SY5Y cells treated with conditioned medium of LPS activated BV-2 cells (IF, ×200)

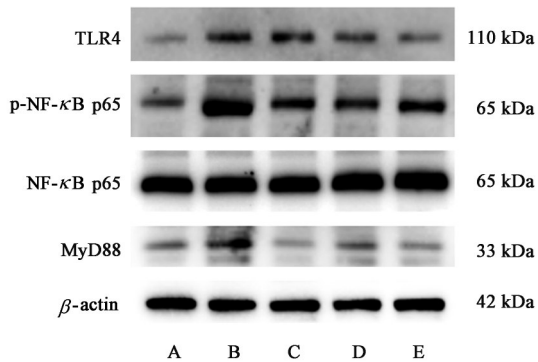


图6 LPS激活的BV-2细胞条件培养基处理的SH-SY5Y细胞TLR4、NF-κB p65、p-NF-κB p65、MyD88蛋白表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of TLR4, NF-κB p65, p-NF-κB p65 and MyD88 proteins in SH-SY5Y cells cultured with different concentrations in LPS-activated BV-2 cells

立PD炎症相关体外模型,研究BAI对PD炎症相关体外模型的保护作用。结果显示,模型组中BV-2细

胞胞体变大,圆形细胞减少、分枝增多且变长,细胞活力明显降低,BAI低、中、高浓度组细胞分枝减少、变短且细胞活力升高;对LPS处理的BV-2细胞条件培养基进行检测,LPS组中TNF-α、IL-6、IL-1β均明显升高,而BAI低、中、高浓度组中各炎症因子含量均降低,说明BAI能够有效抑制BV-2细胞激活,减轻炎症反应,减少炎症因子的释放。将处理过的BV-2细胞条件培养基作用于SH-SY5Y细胞,结果显示,LPS组细胞中α-syn蛋白表达量升高,TH蛋白表达量降低,同时p65蛋白核转移明显;而BAI低、中、高浓度组α-syn蛋白表达量降低,TH蛋白表达量升高,同时p65蛋白分布于细胞质中,趋向于空白组。此外,本研究还发现,LPS激活的条件培养基中SH-SY5Y细胞的TLR4、MyD88和p-p65蛋白表达量较空白组均升高;而BAI低、中、高浓度组蛋白表

表4 不同浓度的BAI对LPS激活的BV-2细胞条件培养基处理的SH-SY5Y细胞TLR4、p65、p-p65、MyD88蛋白表达的影响(̄x±s,n=3)

Table 4 Effect of different concentrations of BAI on protein expression of TLR4, p65, p-p65 and MyD88 in SH-SY5Y cells treated with conditioned medium of LPS activated BV-2 cells (̄x±s,n=3)

组别	浓度	TLR4/β-actin	p-p65/β-actin	p65/β-actin	MyD88/β-actin
空白组		0.08±0.03	0.26±0.07	1.30±0.17	0.19±0.02
LPS组	1 mg·L <sup>-1</sup>	0.41±0.13 <sup>1)</sup>	0.76±0.10 <sup>2)</sup>	1.59±0.03	0.49±0.07 <sup>2)</sup>
BAI低浓度组	1 mg·L <sup>-1</sup> +4 μmol·L <sup>-1</sup>	0.32±0.11	0.51±0.09	1.68±0.33	0.27±0.13 <sup>3)</sup>
BAI中浓度组	1 mg·L <sup>-1</sup> +8 μmol·L <sup>-1</sup>	0.25±0.12	0.39±0.17 <sup>3)</sup>	1.56±0.32	0.27±0.04 <sup>3)</sup>
BAI高浓度组	1 mg·L <sup>-1</sup> +16 μmol·L <sup>-1</sup>	0.15±0.06 <sup>3)</sup>	0.39±0.18 <sup>3)</sup>	1.47±0.13	0.22±0.07 <sup>4)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.05,<sup>2)</sup>P<0.05;与LPS组比较<sup>3)</sup>P<0.05,<sup>4)</sup>P<0.01

达均明显下调。研究认为激活小胶质细胞所释放的多种炎症因子的持续存在可促进神经元 $\alpha$ -syn表达,增强 $\alpha$ -syn的神经毒性,加速神经元的变性;同时 $\alpha$ -syn的聚集进一步激活神经炎症,两者相互促进,形成恶性循环,最终造成多巴胺神经元损伤<sup>[26-29]</sup>。本研究中BV-2激活后炎症因子升高,其条件培养基处理SH-SY5Y细胞后,促进SH-SY5Y细胞中TLR4蛋白表达,活化MyD88,促进p65磷酸化,从而引起SH-SY5Y细胞发生炎症反应,产生“炎症风暴”,同时炎症的产生也导致SH-SY5Y细胞中 $\alpha$ -syn表达增强及聚集,在炎症反应和 $\alpha$ -syn蛋白的双重损伤下,最终造成SH-SY5Y细胞损伤、死亡;而BAI干预后抑制小胶质细胞的激活,炎症因子分泌减少,从而抑制TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B信号通路活化,减轻SH-SY5Y细胞的炎症反应,同时促进 $\alpha$ -syn蛋白的降解,最终对SH-SY5Y细胞产生明显保护作用。

综上所述,BAI能够抑制BV-2细胞激活,从而抑制LPS造成的炎症反应,进而进一步抑制炎症细胞因子关联下SH-SY5Y细胞的炎症反应,减轻体系下“炎症风暴”,进而促进 $\alpha$ -syn降解及TH的表达,抑制由炎症造成的神经细胞自噬及凋亡,保护神经元。其作用机制可能在于BAI能够调节TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B信号通路,减少炎症相关蛋白表达,减轻炎症反应,发挥神经保护作用。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] BALESTRINO R, SCHAPIRA A. Parkinson disease [J]. *Eur J Neurol*, 2020, 27(1): 27-42.

[2] HAYES M T. Parkinson's disease and Parkinsonism [J]. *Am J Med*, 2019, 132(7): 802-807.

[3] ARMSTRONG M J, OKUN M S. Diagnosis and treatment of Parkinson disease: A review [J]. *JAMA*, 2020, 323(6): 548-560.

[4] BASTIDE M F, MEISSNER W G, PICCONI B, et al. Pathophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease [J]. *Prog Neurobiol*, 2015, 132: 96-168.

[5] TANSEY M G, WALLINGS R L, HOUSER M C, et al. Inflammation and immune dysfunction in Parkinson disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2022, 22(11): 657-673.

[6] 刘蔚, 曹俊岭, 荆志伟, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对帕金森病伴发抑郁模型大鼠的神经保护作用及对AMPK/mTOR信号通路的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(8): 21-29.

[7] RUI W, LI S, XIAO H, et al. Baicalein attenuates neuroinflammation by inhibiting NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway in MPTP induced mice model of Parkinson's disease [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2020, 23(11): 762-773.

[8] LONG-SMITH C M, COLLINS L, TOULOUSE A, et al. Interleukin-1 $\beta$  contributes to dopaminergic neuronal death induced by lipopolysaccharide-stimulated rat glia *in vitro* [J]. *J Neuroimmunol*, 2010, 226(1/2): 20-26.

[9] PAJARES M, ROJO I A, MANDA G, et al. Inflammation in Parkinson's disease: Mechanisms and therapeutic implications [J]. *Cells*, 2020, doi: 10.3390/cells9071687.

[10] RAMIREZ A I, DE HOZ R, SALOBRAR-GARCIA E, et al. The role of microglia in retinal neurodegeneration: Alzheimer's disease, Parkinson, and Glaucoma [J]. *Front Aging Neurosci*, 2017, 9: 214.

[11] HUANG B, HE D, CHEN G, et al.  $\alpha$ -Cyperone inhibits LPS-induced inflammation in BV-2 cells through activation of Akt/Nrf2/HO-1 and suppression of the NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Food Funct*, 2018, 9(5): 2735-2743.

[12] YAN J J, DU G H, QIN X M, et al. Baicalein attenuates the neuroinflammation in LPS-activated BV-2 microglial cells through suppression of pro-inflammatory cytokines, COX2/NF- $\kappa$ B expressions and regulation of metabolic abnormality [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 79: 106092.

[13] SIMON D K, TANNER C M, BRUNDIN P. Parkinson disease epidemiology, pathology, genetics, and pathophysiology [J]. *Clin Geriatr Med*, 2020, 36(1): 1-12.

[14] JANKOVIC J, TAN E K. Parkinson's disease: Etiopathogenesis and treatment [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2020, 91(8): 795-808.

[15] LÜNEMANN J D, MALHOTRA S, SHINOHARA M L, et al. Targeting inflammasomes to treat neurological diseases [J]. *Ann Neurol*, 2021, 90(2): 177-188.

[16] ARIGA H, TAKAHASHI-NIKI K, KATO I, et al. Neuroprotective function of DJ-1 in Parkinson's disease [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 2013: 683920.

[17] SAITO Y. Oxidized DJ-1 as a possible biomarker of Parkinson's disease [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2014, 54(3): 138-144.

[18] DEXTER D T, JENNER P. Parkinson disease: From pathology to molecular disease mechanisms [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 62: 132-144.

[19] RAHIMIFARD M, MAQBOOL F, MOEINI-NODEH

- S, et al. Targeting the TLR4 signaling pathway by polyphenols: A novel therapeutic strategy for neuroinflammation [J]. *Ageing Res Rev*, 2017, 36: 11-19.
- [20] TAKEDA K, AKIRA S. TLR signaling pathways [J]. *Semin Immunol*, 2004, 16(1):3-9.
- [21] 张娟, 尚德静. Toll样受体4(TLR4)信号通路及其靶向药物的研究进展[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2021, 37(7):657-662.
- [22] 尹华华. PTEN调控LPS活化TLR4信号通路的作用及机制研究[D]. 重庆:第三军医大学, 2007.
- [23] 谷有全, 王天红, 陈军, 等. Toll样受体4及小胶质细胞在帕金森病中的作用[J]. *临床神经病学杂志*, 2019, 32(1):54-57.
- [24] ZHAO X, KONG D, ZHOU Q, et al. Baicalein alleviates depression-like behavior in rotenone-induced Parkinson's disease model in mice through activating the BDNF/TrkB/CREB pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 140: 111556.
- [25] SONG Q, PENG S, ZHU X. Baicalein protects against MPP<sup>+</sup>/MPTP-induced neurotoxicity by ameliorating oxidative stress in SH-SY5Y cells and mouse model of Parkinson's disease [J]. *Neurotoxicology*, 2021, 87: 188-194.
- [26] KIM C, LEE H J, MASLIAH E, et al. Non-cell-autonomous Neurotoxicity of  $\alpha$ -synuclein through microglial Toll-like receptor 2 [J]. *Exp Neurol*, 2016, 25(3): 113-119.
- [27] LA VITOLA P, BALDUCCI C, BARONI M, et al. Peripheral inflammation exacerbates  $\alpha$ -synuclein toxicity and neuropathology in Parkinson's models [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2021, 47(1): 43-60.
- [28] FERRARI C C, POTT GODOY M C, TARELLI R, et al. Progressive neurodegeneration and motor disabilities induced by chronic expression of IL-1beta in the substantia nigra [J]. *Neurobiol Dis*, 2006, 24(1): 183-193.
- [29] TILVE S, DIFATO F, CHEREGATTI E. Cofilin 1 activation prevents the defects in axon elongation and guidance induced by extracellular alpha-synuclein [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16524.

[责任编辑 孙丛丛]