DOI:10.16016/j.2097-0927.202302113

丁酸钠通过 TLR4/NF-κB 信号通路调控脂多糖诱导的 BV2 小胶质细胞表型极化

王琳杰[1,2],张安仁[3],张 鑫[2],刘建成[2],杨 娅[2],庞日朝[2],呼永河[1] 610031 成都,西南交通大学医学院临床医学系[1];610083 成都,中国人民解放军西部战区总医院康复医学科[2];200434 上海,同济大学附属上海市第四人民医院康复医学科[3]

[摘要] **目的** 研究丁酸钠(sodium butyrate,NaB)对脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)诱导 BV2 小胶质细胞炎症表型的调控作用和分子机制。**方法** 不同浓度 NaB 单独及联合 LPS 干预 BV2 细胞,采用 CCK-8 法检测 BV2 细胞活力的变化,根据结果选择实验浓度。将 BV2 小胶质细胞分为对照(Control)组、LPS 组、LPS+NaB 低剂量组(0.125 mmol/L)和 LPS+NaB 高剂量组(0.25 mmol/L);NaB 预处理过夜(17 h)后,采用 LPS 继续孵育 24 h 诱导 BV2 小胶质细胞炎症模型;GRIESS 法检测细胞 NO 释放量,ELISA 检测细胞培养液中细胞因子 IL-1β、TNF-α 和 IL-10 的含量;RT-qPCR 检测细胞 iNOS 和 CD206 mRNA 水平;免疫荧光染色法检测细胞 iNOS 和 CD206 的平均荧光强度;Western blot 检测细胞中 TLR4、NF-κB p65、IKB-α 和 p-IKB-α 表达水平,分离胞浆和胞核蛋白,检测 NF-κB p65 的核转位。**结果** GRIESS 结果显示,高、低剂量 NaB 组的 NO 分泌水平较 LPS 组低($P<0.05$);ELISA 结果显示,高、低剂量 NaB 组中的 IL-1β 和 TNF-α 分泌水平较 LPS 组低($P<0.05$),IL-10 分泌水平较 LPS 组高($P<0.05$);RT-qPCR 结果显示,高、低剂量 NaB 显著下调了 iNOS mRNA 的表达($P<0.05$),促进了 CD206 mRNA 的表达($P<0.05$);免疫荧光结果显示,高、低剂量 NaB 可显著减少 BV2 细胞 M1 表型标志物 iNOS 的表达,促进 M2 表型标志物 CD206 的表达($P<0.05$);Western blot 结果显示,与 LPS 组相比,高、低剂量 NaB 显著抑制了 TLR4、NF-κB p65 和 p-IKB-α 的蛋白表达,同时抑制了 NF-κB p65 的核转位($P<0.05$)。**结论** NaB 显著减轻 LPS 诱导的 BV2 细胞炎症反应,其机制可能与 NaB 抑制 TLR4/NF-κB 信号通路、促进 BV2 细胞由 M1 表型向 M2 表型极化有关。

[关键词] 丁酸钠;小胶质细胞;炎症;极化;TLR4/NF-κB 信号通路
[中图法分类号] R322.8;R364.5;R977.4 [文献标志码] A

Sodium butyrate regulates phenotypic polarization of BV2 microglia through TLR4/NF-κB signaling pathway

WANG Linjie[1,2], ZHANG Anren[3], ZHANG Xin[2], LIU Jiancheng[2], YANG Ya[2], PANG Rizhao[2], HU Yonghe[1]
[1]Faculty of Clinical Medicine, College of Medicine, Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan Province, 610031; [2]Department of Rehabilitation Medicine, General Hospital of Western Theater Command, Chengdu, Sichuan Province, 610083; [3]Department of Rehabilitation Medicine, Shanghai Fourth People's Hospital, School of Medicine, Tongji University, Shanghai, 200434, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the regulatory role and molecular mechanism of sodium butyrate (NaB) in lipopolysaccharide (LPS) induced inflammatory phenotype in BV2 microglia cells and the molecular mechanism. **Methods** BV2 cells were treated with different concentrations of NaB alone or

[基金项目] 四川省科技厅重点研发项目(2021YFS0133);四川省自然科学基金青年科学基金(2022NSFSC1423)
[通信作者] 庞日朝,E-mail:przprz17@126.com
呼永河,E-mail:huyonghezyy@163.com

2097-0927/Copyright © 2023, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

combined with LPS. CCK8 assay was used to detect the change of cell viability and to screen the optimal concentration of the drug. Then the BV2 cells were divided into control, LPS group, low- and high-dose NaB groups (0.125 and 0.25 mmol/L). An inflammatory model of BV2 cells were established by pretreatment with NaB for 17 h followed by LPS treatment for 24 h. Griess assay was used to measure the NO content in the supernatant, and ELISA was employed to determine the contents of IL-1β, TNF-α and IL-10 in culture medium. The mRNA levels of iNOS and CD206 were detected by RT-qPCR. Immunofluorescence staining was used to observe the expression of iNOS and CD206. The protein levels of TLR4, NF-κB p65m, IKB-α and p-IKB-α were detected by Western blotting. Cytoplasmic and nuclear proteins were isolated to detect the nuclear translocation of NF-κB p65. **Results** Griess assay showed that the secretion of NO in the high- and low-dose NaB groups were lower than that in the LPS group ($P<0.05$). ELISA results indicated that the high- and low-dose NaB groups had lower secretion levels of IL-1β and TNF-α, but high secretion level of IL-10 than the LPS model group (all $P<0.05$). RT-qPCR revealed that high- and low-dose NaB treatment significantly decreased the mRNA expression of iNOS (M1 phenotypic marker) and promoted that of CD206 (M2 phenotypic marker) (both $P<0.05$). Immunofluorescence staining presented similar results as RT-qPCR ($P<0.05$). Western blot results displayed that high- and low-dose NaB resulted in significantly inhibited protein expression of TLR4, NF-κB p65 and p-IKB-α as well as nuclear translocation of NF-κB p65 when compared with the LPS group ($P<0.05$). **Conclusion** NaB significantly reduces LPS-induced neuroinflammatory responses in BV2 cells, which might be associated with its inhibition of TLR4/NF-κB signaling pathway and promotion of BV2 cells shifting from M1 to M2 phenotype.

[**Key words**] sodium butyrate; microglia; inflammation; polarization; TLR4/NF-κB signaling pathway

Supported by the Key Project of Sichuan Provincial Department of Science and Technology (2021YFS0133) and the Natural Science Foundation for Young Scholars of Sichuan Province (2022NSFSC1423). Corresponding author: PANG Rizhao, E-mail: przprz17@126.com; HU Yonghe, E-mail: huyonghezyy@163.com

炎症反应是中枢神经系统(central nervous system, CNS)退行性病变和创伤性损伤的重要病理特点[1]。小胶质细胞作为CNS常驻的巨噬细胞,占所有CNS特异性细胞的5%~12%,在CNS炎症反应中起主要作用[2-3]。当感染、创伤或缺血性卒中等疾病发生后小胶质细胞迅速激活,最终极化为M1或M2两种功能相反的细胞群[4]。M1表型小胶质细胞释放促炎细胞因子加剧神经损伤;M2表型小胶质细胞则通过分泌抗炎细胞因子促进损伤修复,发挥神经保护作用[5]。因此调节小胶质细胞M1/M2极化,可能是治疗CNS炎症反应的潜在策略[6-7]。

丁酸钠(sodium butyrate, NaB)是内源性丁酸的钠盐形式,由益生菌在结肠中发酵膳食纤维形成[8]。随着肠-脑轴理论研究深入,NaB逐渐被发现能跨越血脑屏障作用于CNS,在脑卒中、癫痫、帕金森等动物模型实验研究中均能起到良好的治疗成效,其机制可能与病理过程中的炎症反应被抑制有关[9-12]。目前有关NaB在CNS的抗炎机制研究较少,NaB是否通过调节小胶质细胞M1/M2极化发挥抗炎作用的机制尚未完全清楚。本研究通过观察NaB对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导BV2细胞表型极化的调节作用,从TLR4/NF-κB信号通路探讨其可能的抗炎机制,探索肠-脑轴理论中肠道菌群代谢物在调控CNS炎症性疾病的价值。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞培养与分组 小鼠BV2小胶质细胞(CL-0439)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。采用DMEM培养基,加入10%胎牛血清和1%双抗;置于37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。细胞生长至对数期进行1∶3传代或铺板[13]。本实验分为4组:①对照(Control)组,正常完全培养基培养,不做任何处理;②LPS组,BV2细胞培养至对数期后,以100 ng/mL的LPS处理24 h;③LPS+NaB低剂量(LPS+NaB-L)组,依据CCK-8实验结果和既往研究,0.125 mmol/L NaB预处理过夜(17 h)后再以100 ng/mL的LPS继续孵育24 h[14-16];④LPS+NaB高剂量(LPS+NaB-H)组,

0.25 mmol/L NaB 预处理过夜(17 h)后再以 100 ng/mL 的 LPS 继续孵育 24 h。

1.1.2 主要试剂 NaB(B5887)和 LPS(L2880)购自 Sigma 公司;DMEM 培养基、胎牛血清和双抗购自 Gibco 公司;全蛋白提取试剂盒(BC3710)和核浆蛋白抽提试剂盒(R0050)购自北京索莱宝科技有限公司;CCK-8 试剂盒购自 Beyotime 公司;NO 试剂盒购自南京建成生物工程研究所;IL-1β(E-EL-M0037c)、TNF-α(E-EL-M3063)、IL-10(E-EL-M0046c)ELISA 试剂盒购自 Elabscience 公司;PrimeScript™ RT Master Mix Kit 和 SYBR® Primix Ex TagTM Kit 购自日本 TaKaRa 公司;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;CD206 兔多克隆抗体(ab64693)和 iNOS 兔单克隆抗体(ab178945)购自 Abcam 公司;Alexa Fluor 488 标记的山羊抗兔(GB25303)和抗荧光淬灭封片剂(G1401)购自 Servicebio 公司;TLR4 鼠单克隆抗体(66350-1-Ig)购自 Proteintech 公司;NF-κB(P65)兔多克隆抗体(GTX107678)购自 GeneTex 公司;磷酸化 IKB-α 兔单克隆抗体(AP0707)购自 ABclonal 公司;IKB-α 鼠单克隆抗体(4814S)购自 Cell Signaling Technology 公司;PCNA 抗体(200947-2E1)购自成都正能生物技术有限责任公司。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8 法筛选药物浓度 取对数生长期的 BV2 细胞制备细胞悬液(5×10^4/mL),按 100 μL/孔接种于 96 孔板。设置对照组(仅加入培养液)和不同浓度 NaB 组(0、0.125、0.250、0.500、1.000 mmol/L)筛选药物浓度范围。设置对照组和不同浓度 NaB 组以及 NaB 与 LPS 联合作用(NaB 预处理过夜,再使用 100 ng/mL LPS 作用 24 h)测定药物对炎症刺激后 BV2 细胞活力的影响,每组 5 个复孔。所有干预结束后,按照 CCK-8 试剂盒说明书操作,计算细胞活力。

1.2.2 GRIESS 法检测各组细胞上清液中 NO 水平 细胞悬液制备同 1.2.1,接种于 6 孔板,每孔 2 mL。按分组给予药物处理,结束后收集各组细胞培养上清,4 ℃、2 000 r/min 离心 10 min。根据 NO 试剂盒说明书于 550 nm 处测定各孔光密度值[D(550)],计算各组细胞 NO 分泌水平。

NO 含量=[实验组 D(550)值-空白组 D(550)值)/(NO 标准品组 D(550)值-空白组 D(550)值]×标准品浓度×稀释倍数

1.2.3 ELISA 检测 BV2 细胞上清液 IL-1β、TNF-α 和 IL-10 分泌水平 细胞上清收集方法同 1.2.2。按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作,绘制标准曲线,计算各组细胞 IL-1β、TNF-α 和 IL-10 的分泌水平。

1.2.4 RT-qPCR 法检测 iNOS 和 CD206 mRNA 的表达 细胞悬液制备同 1.2.1,每孔 2 mL,贴壁后按分组给予药物处理。干预完毕后弃上清,PBS 洗涤,按每孔 1 mL TRIzol 提取细胞总 RNA,分析检测 RNA 纯度与浓度。根据 TaKaRa 的试剂盒说明书操作,以逆转录合成的 cDNA 为模板进行反转录和 PCR 反应,预变性 95 ℃ 30 s,PCR 反应 95 ℃ 5 s,60 ℃ 1 min 共进行 40 个循环。以 GAPDH 为参照,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因 mRNA 的相对表达量。引物序列:iNOS 上游 5′-GGCTTGCCCCTGGAAGTTT-3′,下游 5′-TGCAAGTGAAATCCGATGTGG-3′;CD206 上游 5′-TTCAGCTATTGGACGCGAGG-3′,下游 5′-GAATCTGACACCCAGCGGAA-3′;GAPDH 上游 5′-GGTTGTCTCCTGCGACTTCA-3′,下游 5′-TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC-3′。

1.2.5 免疫细胞化学染色法检测 iNOS 和 CD206 的荧光强度 细胞悬液制备同 1.2.1,6 孔板底部放置细胞爬片,每孔 2 mL,贴壁按细胞分组给予药物处理。干预完毕后弃上清,PBS 洗涤,4%多聚甲醛室温固定;破膜工作液室温孵育 20 min;3%BSA 室温封闭 30 min;孵育抗 CD206(1∶200)和 iNOS(1∶250)抗体置于湿盒内 4 ℃过夜;用 Alexa Fluor 488 标记的山羊抗兔(1∶400)室温孵育 50 min;DAPI 复染细胞核;封片;镜检拍照;细胞核呈蓝色,CD206、iNOS 呈绿色;用 Image J 计算平均荧光强度,反映 BV2 小胶质细胞表型极化情况。

1.2.6 Western blot 检测 BV2 小胶质细胞各蛋白的相对表达 收集各组细胞,按蛋白提取试剂盒说明书分别提取总蛋白、分离胞浆蛋白和胞核蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度。制胶后按等量总蛋白上样,电泳、转膜、封闭后加入一抗(TLR4、NF-κB p65、IKB-α、p-IKB-α、GAPDH、PCNA)于 4 ℃孵育过夜,室温孵育二抗 1 h,TBST 洗涤后,使用 ECL 显影液进行蛋白印迹曝光,Image J 软件分析蛋白灰度值。

1.3 统计学分析

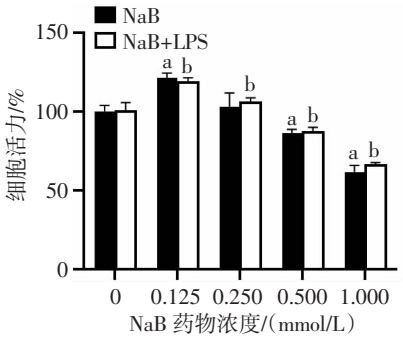
所有实验至少重复 3 次,采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,2 组间差异比较采用 LSD-t 检验,多组间差异比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NaB 对 LPS 诱导的 BV-2 细胞活力的影响

无论是 NaB 单独处理还是 NaB 与 LPS(100 ng/mL)

联合处理,CCK-8 结果均显示 BV2 细胞的活力先上升,后下降。NaB 单独处理的 CCK-8 结果显示:当 NaB 作用浓度达到 0.500 mmol/L 时细胞活力受到明显抑制,差异有统计学意义($P<0.05$,图 1);当作用浓度达到 1.000 mmol/L 时,细胞活力明显降低,约为正常组的 2/3。NaB 与 LPS 联合处理的 CCK-8 结果显示:0.125 和 0.250 mmol/L 剂量的 NaB 能显著提高 BV2 细胞活力($P<0.05$,图 1)。因此,0.125、0.250 mmol/L 分别作为 NaB 低剂量和高剂量用于后续实验。



a:$P<0.05$,与 NaB 0 mmol/L 比较;b:$P<0.05$,与 NaB+LPS 0 mmol/L 比较

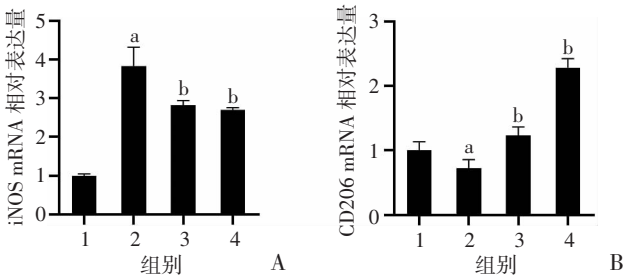
图 1　CCK-8 法检测不同浓度 NaB 以及联合 LPS 对 BV2 细胞活力的影响($n=5,\bar{x}\pm s$)

2.2　NaB 对 LPS 诱导的 BV2 细胞 NO、IL-1β、TNF-α 和 IL-10 的影响

与对照组相比,LPS 刺激后 NO、IL-1β 和 TNF-α 含量显著增加($P<0.05$,图 2A~C);IL-10 含量显著降低($P<0.05$,图 2D)。与 LPS 模型组相比,高、低剂量 NaB 组 NO、IL-1β 和 TNF-α 含量减少,IL-10 含量增加,差异有统计学意义($P<0.05$,图 2)。表明 NaB 可抑制 LPS 诱导的 BV2 细胞神经炎症反应,且呈剂量依赖性地抑制 NO、IL-1β 和 TNF-α 分泌,促进 IL-10 分泌。

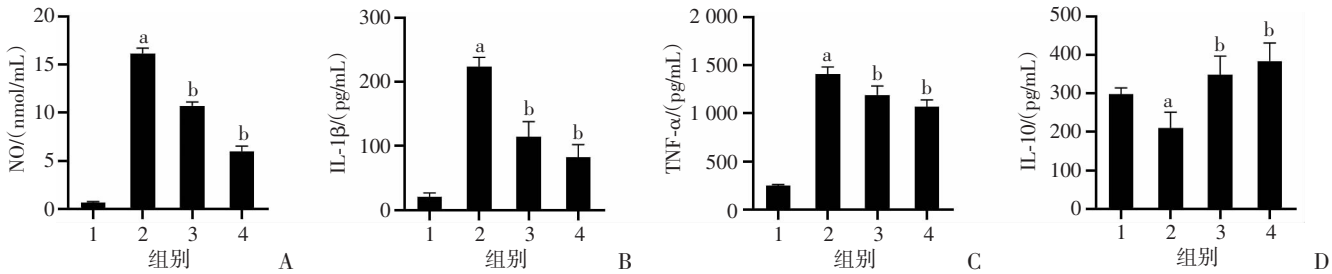
2.3　NaB 对 LPS 诱导的 BV2 细胞 M1/M2 表型极化的影响

为了确定 NaB 抑制 BV2 细胞炎症反应是否与表型极化有关,使用 RT-qPCR 检测 BV2 细胞 M1 表型标志物 iNOS 和 M2 表型标志物 CD206 的 mRNA 的表达,使用免疫荧光细胞化学染色法观察 iNOS 和 CD206 蛋白的表达。RT-qPCR 结果表明,与对照组相比,LPS 刺激后 iNOS mRNA 表达显著升高($P<0.05$,图 3A),CD206 mRNA 表达显著下降($P<0.05$,图 3B);高、低剂量 NaB 组与 LPS 模型组相比,iNOS mRNA 表达显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$,图 3A),CD206 mRNA 表达显著上升,差异有统计学意义($P<0.05$,图 3B)。免疫荧光结果显示,与正常对照组相比,LPS 干预组 iNOS 蛋白表达明显上升,差异有统计学意义($P<0.05$,图 4A、B),CD206 蛋白表达下降,差异有统计学意义($P<0.05$,图 4C、D)。而高、低剂量 NaB 组与 LPS 干预组相比 iNOS 蛋白表达明显下调,差异有统计学意义($P<0.05$,图 4A、B),CD206 蛋白表达明显上升,差异有统计学意义($P<0.05$,图 4C、D)。这些结果均表明 NaB 可促进 LPS 诱导的 BV2 细胞由 M1 表型向 M2 表型转化。



1:Control;2:LPS;3:LPS+NaB-L;4:LPS+NaB-H;a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 组比较

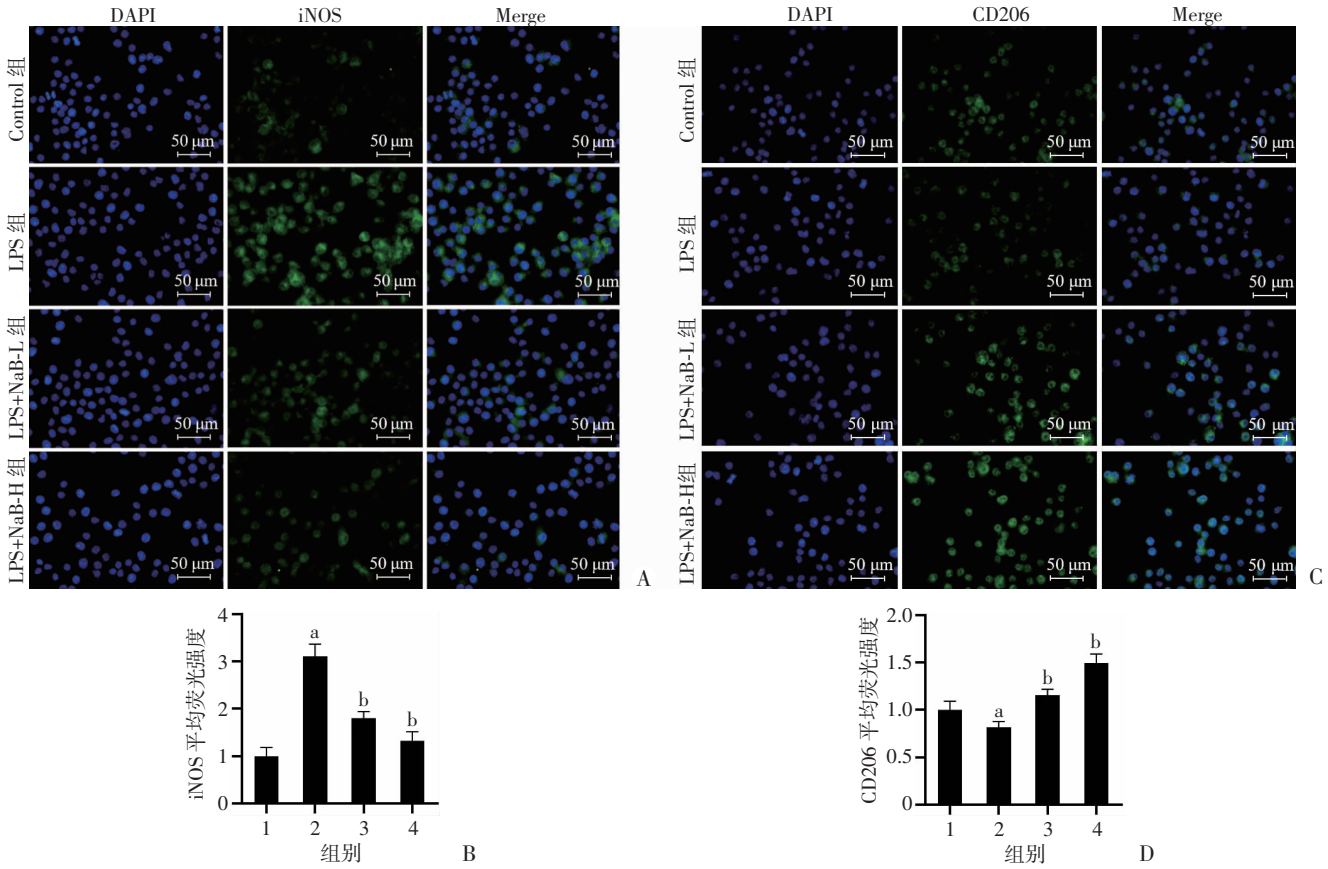
图 3　RT-qPCR 检测各组 BV2 细胞 iNOS(A)和 CD206(B) mRNA 表达水平($n=3,\bar{x}\pm s$)



1:Control;2:LPS;3:LPS+NaB-L;4:LPS+NaB-H;a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 组比较

A:GRIESS 法检测 NO 分泌水平;B:ELISA 检测 IL-1β 分泌水平;C:ELISA 检测 TNF-α 分泌水平;D:ELISA 检测 IL-10 分泌水平

图 2　GRIESS 法和 ELISA 分别检测各组 BV2 细胞 NO、IL-1β、TNF-α 和 IL-10 分泌水平($n=3,\bar{x}\pm s$)



1:Control;2:LPS;3:LPS+NaB-L;4:LPS+NaB-H;a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 组比较

A:免疫荧光检测 iNOS 蛋白表达;B:半定量分析 iNOS 蛋白平均荧光强度;C:免疫荧光检测 CD206 蛋白表达;D:半定量分析 CD206 蛋白平均荧光强度

图 4 免疫荧光检测各组 BV2 细胞 iNOS 和 CD206 蛋白表达水平($n=3,\bar{x}\pm s$)

2.4 NaB 对 LPS 诱导的 BV2 细胞 TLR4/NF-κB 信号通路的影响

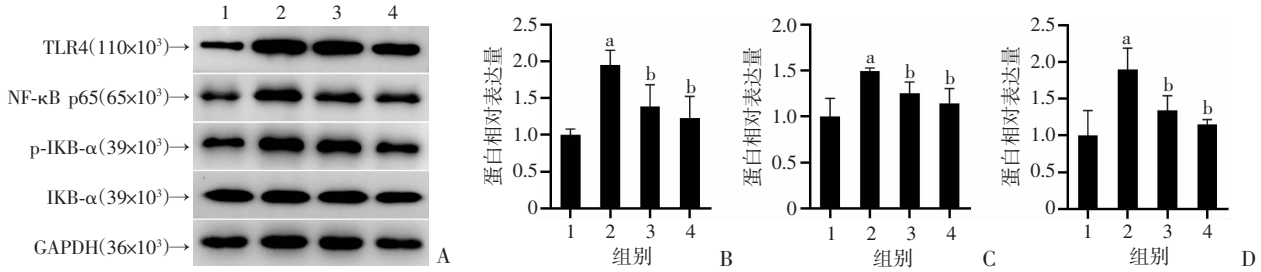
提取各组细胞全蛋白,采用 Western blot 检测 TLR4、NF-κB p65、IKB-α 和 p-IKB-α 的表达。与 Control 组相比,LPS 刺激后各组 TLR4 和 NF-κB p65 的蛋白表达显著上升,差异有统计学意义($P<0.05$,图 5A~C);与 LPS 组相比,高、低剂量 NaB 组 TLR4 表达均受到抑制,差异有统计学意义($P<0.05$,图 5A、B);与 LPS 组相比,高、低剂量 NF-κB p65 表达均受到抑制,差异有统计学意义($P<0.05$,图 5A、C)。同时测定了 IKB-α 蛋白的磷酸化程度,结果显示,与正常对照组相比,LPS 刺激后 p-IKB-α 蛋白表达显著提高,差异有统计学意义($P<0.05$,图 5A、D);与 LPS 组相比,高、低剂量 NaB 组抑制了 BV2 细胞内 IKB-α 的磷酸化,差异有统计学意义($P<0.05$,图 5A、D)。由此可见,NaB 抑制 LPS 诱导的 BV2 细胞炎症反应可能是通过 TLR4/ NF-κB 信号通路实现的。

2.5 NaB 对 LPS 诱导的 BV2 细胞 NF-κB p65 核转位的影响

分离胞浆和胞核蛋白,采用 Western blot 检测 NF-κB p65 的核转位情况。与 Control 组相比,LPS 刺激后各组 NF-κB p65 核转位明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$);与 LPS 组相比,高、低剂量 NaB 组 NF-κB p65 核蛋白表达明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$,图 6)。由此可见,NaB 抑制了 LPS 诱导的 BV2 细胞 NF-κB p65 的核转位。

3 讨论

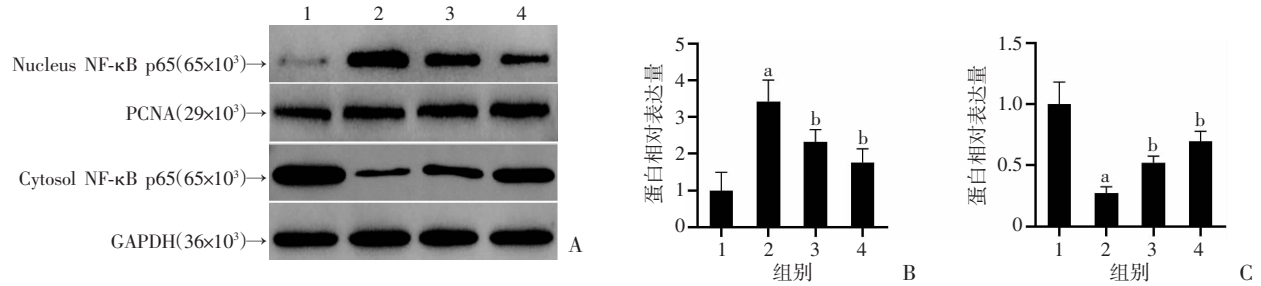
神经炎症对缺血性卒中、创伤性脊髓损伤和阿尔茨海默病等 CNS 疾病过程的多个阶段的发生和发展具有重要影响[17-18]。过度神经炎症可加剧神经细胞和组织损害,使得病理状况恶化,这些都与神经元损伤程度和功能障碍预后密切相关。因此,长期以来如何控制神经炎症都是CNS退行性病变和创伤性损伤疾病



1:Control;2:LPS;3:LPS+NaB-L;4:LPS+NaB-H;a:$P<0.05$,与 Control 比较;b:$P<0.05$,与 LPS 组比较

A: Western blot 检测 TLR4、NF-κB p65 和 p-IKB-α 蛋白表达;B~D: 分别为 TLR4、NF-κB p65 和 p-IKB-α 蛋白半定量分析

图 5 Western blot 检测各组 BV2 细胞 TLR4/NF-κB 信号通路蛋白表达($n=3,\bar{x}\pm s$)



1:Control;2:LPS;3:LPS+NaB-L;4:LPS+NaB-H;a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 组比较

A: Western blot 检测胞浆和胞质 NF-κB p65 蛋白表达;B、C: 分别为胞核和胞浆 NF-κB p65 蛋白半定量分析

图 6 Western blot 检测各组 BV2 细胞 NF-κB p65 核转位的水平($n=3,\bar{x}\pm s$)

的治疗重点[19]。小胶质细胞作为 CNS 的常驻免疫细胞,是神经炎症的关键参与者[20]。M1 表型小胶质细胞分泌如 NO、IL-1β 和 TNF-α 等促炎细胞因子,加剧炎症反应;而 M2 型可分泌 IL-4、IL-10 等抗炎细胞因子,减轻神经炎症反应。因此,调控小胶质细胞向 M2 型转化可能是抑制神经炎症的潜在治疗策略。

胃肠道作为人体内最大的免疫器官,约含 10^{14} 个细菌,数量与人体细胞总数相当[21]。肠道菌群因此也被认为是"第二基因组",在机体的病理生理过程中发挥着重要作用[22-24]。随着宏基因组学与代谢组学的发展,肠脑轴作为连接胃肠道和 CNS 的双向交流通道,其内在机制不断被揭示。研究表明,脑卒中、阿尔茨海默病和多发性硬化等 CNS 疾病的发生通常伴有肠道菌群失调,而紊乱的肠道菌群又参与疾病的炎症反应,加重原发性损伤[25-27]。通过药物或粪菌移植等方式重塑紊乱的肠道菌群则可改善上述的疾病转归,其恢复程度可能与肠道菌群重塑后短链脂肪酸的含量相关[16,28-30]。此外,YU 等[31]发现胸段完全性脊髓损伤患者肠道产短链脂肪酸的拟杆菌门水平降低。在脊髓损伤小鼠粪便中发现的丁酸含量较假手术组下降了 58.6%,而粪菌移植后丁酸含量上调了 46.7%,较其他短链脂肪酸的含量变化最大,且与运动功能的恢复程度呈正相关[32]。这些研究提示 NaB 可能是胃肠道与 CNS"串话"的关键介质,直接穿过血脑屏障调节 CNS 的发育和功能[11,33]。但 NaB 能否作用于 CNS 的小胶质细胞发挥抗炎作用尚不清楚。

本研究首先使用 CCK-8 筛选 NaB 药物浓度范围,以确定用于 BV2 细胞的适宜浓度。CCK-8 结果显示,0.125 mmol/L 的 NaB 增加了 BV2 细胞活力,这可能归因于 NaB 作为去乙酰化酶抑制剂上调了 BV2 细胞存活和增殖相关的基因,或促进了 BV2 细胞自噬以加速其重组再生提高了细胞活力[34-35]。LPS 来源于革兰阴性菌,是炎症和免疫反应的强刺激剂,同时 LPS 诱导的 BV2 细胞是研究小胶质细胞 M1/M2 表型转化的常用细胞模型[36]。本研究通过 LPS 刺激 BV2 细胞建立神经炎症模型,证实 NaB 显著降低了 BV2 细胞 NO、IL-1β 和 TNF-α 的分泌水平,增加了 IL-10 的分泌水平。基因的变化往往伴随着相应的蛋白变化,本研究结果表明,NaB 可抑制 M1 表型标志物 iNOS 蛋白和基因的表达,增加 M2 型标志物 CD206 蛋白和基因的表达,促进 LPS 诱导的 BV2 细胞由 M1 表型向 M2 表型转化。其中 iNOS 作为 BV2 细胞内 NO 合成酶与 NO 的分泌密切相关,正常的生理条件下 NO 是 CNS 重要的第二信使,在神经系统的细胞内通讯和细胞内信号传导中起着至关重要的作用;而过量的 NO 生成会直接导致轴突变性,激活环氧合酶来加剧 CNS 疾病的神经炎症[4]。因此,NaB 的抗炎作用可能与 LPS 诱导后的 BV2 细胞 M1/M2 的表型调控相关。

研究表明,LPS 诱导激活 Toll 样受体(TLR4),其实质上是激活 NF-κB 信号通路,加快了炎症基因的转录[37]。正常状态下 NF-κB 处于非活性形式,与细胞质内的抑制剂 IKB-α 结合形成二聚体;而受到炎症刺激后,IKB-α 蛋白发生磷酸化和降解,释放出 NF-κB 转移至细胞核内,参与 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 等几种炎症因子的表达。同时,这些炎症因子又参与调节 TLR-4/NF-κB 信号通路,从而形成反馈环,共同参与神经炎症的病理学[38]。实验结果表明,LPS 刺激 BV2 细胞后 TLR4、NF-κB 的转录水平、IKB-α 蛋白的磷酸化水平均显著上升;同时促进了 BV2 细胞 NF-κB p65 核转位,激活 NF-κB 下游炎症通路。而 NaB 能够显著抑制 IKB-α 蛋白的磷酸化,降低 TLR4 和 NF-κB 的转录水平,抑制 LPS 诱导的 BV2 细胞 NF-κB p65 核转位,以此实现对 NF-κB 下游信号通路的抑制。

综上所述,NaB 能促进 LPS 诱导的 BV2 细胞由 M1 表型向 M2 表型极化,抑制细胞炎症因子释放,减轻神经炎症反应,其具体分子机制可能与 TLR4/NF-κB 信号通路被抑制有关。表明 NaB 在细胞水平上具有神经保护作用,对 BV2 细胞介导的神经炎症具有潜在价值;该研究丰富了肠-脑轴理论研究中肠道代谢物调控 CNS 疾病的理论依据,为肠道菌群代谢产物治疗 CNS 疾病的深入研究和临床应用提供参考。但本研究仍具有一定的局限性,如仅在细胞层面探讨 NaB 的抗炎作用,尚未明确 NaB 在体内实验中是否也能通过调控小胶质细胞表型极化来发挥抗炎功效,以及 NaB 对 CNS 其他神经细胞是否也具有一致的抗炎作用。未来将在动物体内进一步探索 NaB 对神经炎症的调控作用和机制。

参考文献:

[1] WANG X L, CHEN F, SHI H, *et al*. Oxymatrine inhibits neuroinflammation by regulating M1/M2 polarization in N9 microglia through the TLR4/NF-κB pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 100: 108139. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.108139.

[2] NAYAK D, ROTH T L, MCGAVERN D B. Microglia development and function[J]. Annu Rev Immunol, 2014, 32: 367-402. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120240.

[3] SANJAY, PARK M, LEE H J. Roles of fatty acids in microglial polarization: evidence from *in vitro* and *in vivo* studies on neurodegenerative diseases[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(13): 7300. DOI: 10.3390/ijms23137300.

[4] LANG G P, LI C, HAN Y Y. Rutin pretreatment promotes microglial M1 to M2 phenotype polarization [J]. Neural Regen Res, 2021, 16(12): 2499-2504. DOI: 10.4103/1673-5374.313050.

[5] ZHANG H, LU M Y, ZHANG X F, *et al*. Isosteviol sodium protects against ischemic stroke by modulating microglia/macrophage polarization *via* disruption of GAS5/miR-146a-5p sponge[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 12221. DOI: 10.1038/s41598-019-48759-0.

[6] GAO Y Y, TAO T, WU D, *et al*. MFG-E8 attenuates inflammation in subarachnoid hemorrhage by driving microglial M2 polarization [J]. Exp Neurol, 2021, 336: 113532. DOI: 10.1016/j.expneurol.2020.113532.

[7] HU H, LU X, HUANG L, *et al*. Castor1 overexpression regulates microglia M1/M2 polarization *via* inhibiting mTOR pathway[J]. Metab Brain Dis, 2022, 38(2): 699-708. DOI:10.1007/s11011-022-01135-w.

[8] ROSHANRAVAN N, ALAMDARI N M, JAFARABADI M A, *et al*. Effects of oral butyrate and inulin supplementation on inflammation-induced pyroptosis pathway in type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. Cytokine, 2020, 131: 155101. DOI: 10.1016/j.cyto.2020.155101.

[9] BLACHER E, LEVY M, TATIROVSKY E, *et al*. Microbiome-modulated metabolites at the interface of host immunity[J]. J Immunol, 2017, 198(2): 572-580. DOI: 10.4049/jimmunol.1601247.

[10] HOU Y C, LI X Q, LIU C, *et al*. Neuroprotective effects of short-chain fatty acids in MPTP induced mice model of Parkinson's disease [J]. Exp Gerontol, 2021, 150: 111376. DOI: 10.1016/j.exger.2021.111376.

[11] ROOKS M G, GARRETT W S. Gut microbiota, metabolites and host immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2016, 16(6): 341-352. DOI: 10.1038/nri.2016.42.

[12] ZHOU Z H, XU N B, MATEI N, *et al*. Sodium butyrate attenuated neuronal apoptosis *via* GPR41/Gβγ/PI3K/Akt pathway after MCAO in rats[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2021, 41(2): 267-281. DOI: 10.1177/0271678X20910533.

[13] IM H, JU I G, KIM J H, *et al*. Trichosanthis Semen and zingiberis rhizoma mixture ameliorates lipopolysaccharide-induced memory dysfunction by inhibiting neuroinflammation [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(22): 14015. DOI: 10.3390/ijms232214015.

[14] HUUSKONEN J, SUURONEN T, NUUTINEN T, *et al*. Regulation of microglial inflammatory response by sodium butyrate and short-chain fatty acids[J]. Br J Pharmacol, 2004, 141(5): 874-880. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705682.

[15] 王正东, 黄娜, 陈婧娴, 等. 丁酸钠抑制氟中毒可诱导小胶质细胞活化及炎症因子表达增多[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(7): 1075-1080. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2175.
WANG Z D, HUANG N, CHEN J X, *et al*. Inhibitory effects of sodium butyrate on microglial activation and expression of inflammatory factors induced by fluorosis[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2021, 25(7): 1075-1080. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2175.

[16] HE N, SHEN G R, JIN X Q, *et al*. Resveratrol suppresses microglial activation and promotes functional recovery of traumatic spinal cord *via* improving intestinal microbiota[J]. Pharmacol Res, 2022, 183: 106377. DOI: 10.1016/j.

phrs. 2022. 106377.
[17] MENG H L, LI X X, CHEN Y T, *et al*. Neuronal soluble fas ligand drives M1-microglia polarization after cerebral ischemia[J]. CNS Neurosci Ther, 2016, 22(9): 771-781. DOI: 10.1111/cns.12575.
[18] 杨二万, 田志成, 张卓媛, 等. PSD-95/nNOS/CAPON 复合体在重复轻型颅脑损伤致神经退行性变中的作用[J]. 空军军医大学学报, 2022(8): 957-962.
YANG E W, TIAN Z C, ZHANG Z Y, *et al*. Role of PSD-95/nNOS/CAPON complex in neurodegeneration induced by repeated mild traumatic brain injury[J]. J Air Force Med Univ, 2022(8): 957-962.
[19] VOET S, SRINIVASAN S, LAMKANFI M, *et al*. Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases[J]. EMBO Mol Med, 2019, 11(6): e10248. DOI: 10.15252/emmm.201810248.
[20] 井紫薇, 樊钊, 李光耀, 等. miR-125a-5p 通过靶向 HIF1AN 调控 HIF-1α 参与小胶质细胞活化[J]. 空军军医大学学报, 2023(4): 311-316, 322.
JING Z W, FAN Z, LI G Y, *et al*. miR-125a-5p is involved in microglial activation by regulating HIF-1αthrough targeting HIF1AN[J]. J Air Force Med Univ, 2023(4): 311-316, 322.
[21] BOESCH M, BATY F, ROTHSCHILD S I, *et al*. Tumour neoantigen mimicry by microbial species in cancer immunotherapy[J]. Br J Cancer, 2021, 125(3): 313-323. DOI: 10.1038/s41416-021-01365-2.
[22] LIU B Y, CHEN B W, YI J, *et al*. Liuwei Dihuang Decoction alleviates cognitive dysfunction in mice with D-galactose-induced aging by regulating lipid metabolism and oxidative stress *via* the microbiota-gut-brain axis[J]. Front Neurosci, 2022, 16: 949298. DOI: 10.3389/fnins.2022.949298.
[23] PENG J E, LU X R, XIE K L, *et al*. Dynamic alterations in the gut microbiota of collagen-induced arthritis rats following the prolonged administration of total glucosides of paeony[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9: 204. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00204.
[24] QIN J J, LI R Q, RAES J, *et al*. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing[J]. Nature, 2010, 464(7285): 59-65. DOI: 10.1038/nature08821.
[25] BORSOM E M, CONN K, KEEFE C R, *et al*. Predicting neurodegenerative disease using prepathology gut microbiota composition: a longitudinal study in mice modeling Alzheimer's disease pathologies[J]. Microbiol Spectr, 2023: e0345822. DOI: 10.1128/spectrum.03458-22.
[26] LIAN Z S, XU Y, WANG C, *et al*. Gut microbiota-derived melatonin from Puerariae Lobatae Radix-resistant starch supplementation attenuates ischemic stroke injury *via* a positive microbial co-occurrence pattern[J]. Pharmacol Res, 2023, 190: 106714. DOI: 10.1016/j.phrs.2023.106714.
[27] THIRION F, SELLEBJERG F, FAN Y, *et al*. The gut microbiota in multiple sclerosis varies with disease activity[J]. Genome Med, 2023, 15(1): 1. DOI: 10.1186/s13073-022-01148-1.
[28] LIU J F, ZHANG T H, WANG Y Y, *et al*. Baicalin ameliorates neuropathology in repeated cerebral ischemia-reperfusion injury model mice by remodeling the gut microbiota[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(4): 3791-3806. DOI: 10.18632/aging.102846.
[29] ZHANG P P, ZHANG X J, HUANG Y X, *et al*. Atorvastatin alleviates microglia-mediated neuroinflammation *via* modulating the microbial composition and the intestinal barrier function in ischemic stroke mice[J]. Free Radic Biol Med, 2021, 162: 104-117. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.11.032.
[30] ZHAO W B, WANG J H, LATTA M, *et al*. Rhizoma gastrodiae water extract modulates the gut microbiota and pathological changes of P-Tau^{Thr231} to protect against cognitive impairment in mice[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 903659. DOI: 10.3389/fphar.2022.903659.
[31] YU B B, QIU H D, CHENG S P, *et al*. Profile of gut microbiota in patients with traumatic thoracic spinal cord injury and its clinical implications: a case-control study in a rehabilitation setting[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 4489-4499. DOI: 10.1080/21655979.2021.1955543.
[32] JING Y L, YU Y, BAI F, *et al*. Effect of fecal microbiota transplantation on neurological restoration in a spinal cord injury mouse model: involvement of brain-gut axis[J]. Microbiome, 2021, 9(1): 59. DOI: 10.1186/s40168-021-01007-y.
[33] DALILE B, VAN OUDENHOVE L, VERVLIET B, *et al*. The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(8): 461-478. DOI: 10.1038/s41575-019-0157-3.
[34] LUO S L, LI Z Y, MAO L Z, *et al*. Sodium butyrate induces autophagy in colorectal cancer cells through LKB1/AMPK signaling[J]. J Physiol Biochem, 2019, 75(1): 53-63. DOI: 10.1007/s13105-018-0651-z.
[35] PARK J, THOMAS S, MUNSTER P N. Epigenetic modulation with histone deacetylase inhibitors in combination with immunotherapy[J]. Epigenomics, 2015, 7(4): 641-652. DOI: 10.2217/epi.15.16.
[36] LI J P, DAI X P, ZHOU L Y, *et al*. Edaravone plays protective effects on LPS-induced microglia by switching M1/M2 phenotypes and regulating NLRP3 inflammasome activation[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 691773. DOI: 10.3389/fphar.2021.691773.
[37] JANPAIJIT S, LERTPATIPANPONG P, SILLAPACHAIYAPORN C, *et al*. Anti-neuroinflammatory effects of Cleistocalyx nervosum var. paniala berry-seed extract in BV-2 microglial cells *via* inhibition of MAPKs/NF-κB signaling pathway[J]. Heliyon, 2022, 8(11): e11869. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e11869.
[38] NAPETSCHNIG J, WU H. Molecular basis of NF-kappaB signaling[J]. Annu Rev Biophys, 2013,42:443-468. DOI: 10.1146/annurev-biophys-083012-130338.

(收稿:2023-02-21;修回:2023-03-16)
(编辑 吴培红)