doi:10.11659/jjssx.11E016032

二肽基肽酶抑制剂类似物对 LPS 诱导的小胶质细胞炎症反应的抑制作用

刘颖菊[1],王 松[2],刘海林[2],周春巧[2],彭红梅[2],文 君[2],陈 宇[2],黄冬梅[3],范治国[2] (1.重庆医科大学药学院药理学研究室,重庆 400016;2.重庆两江新区第一人民医院药剂科,重庆 401121;3.重庆两江新区第一人民医院检验科,重庆 401121)

[摘 要] **目的** 探讨二肽基肽酶抑制剂类似物对脂多糖(LPS)诱导的小胶质细胞炎症反应的抑制作用及机制。**方法** 取新生 SD 大鼠进行小胶质细胞的原代培养并分离纯化。本研究分为空白组、阴性对照组、LPS 组、药物组(每组平行测定 3 次),药物提前 48 h 预处理。使用 MTT 法筛选 LPS 诱导小胶质细胞增殖的最佳浓度,观察不同浓度下二肽基肽酶抑制剂类似物对 LPS 刺激小胶质细胞的作用。使用 ELISA 检测细胞上清液中白细胞介素 1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)的含量,Western blotting 法检测 Toll 样受体 4(TLR-4)蛋白的表达,RT-PCR 法检测 NF-κB mRNA 的表达。**结果** 经 LPS 刺激后,SD 大鼠小胶质细胞生长迅速,并可检测到大量炎性因子释放。与空白组相比,加入二肽基肽酶抑制剂类似物后,LPS 诱导的小胶质细胞增殖被明显抑制,处理 48 h后对小胶质细胞的 IC50 为 1.014×10^{-2} μmol/L。二肽基肽酶抑制剂类似物能明显抑制小胶质细胞 TNF-α 和 IL-1β 的释放($P<0.01$),并降低小胶质细胞 TLR-4 和 NF-κB 的表达。**结论** 二肽基肽酶抑制剂类似物对 LPS 刺激的小胶质细胞增殖及炎症反应具有抑制作用,可能与抑制小胶质细胞 TLR-4、NF-κB 表达有关。

[关键词] 二肽基肽酶抑制剂类似物;小胶质细胞;脂多糖;TLR-4;NF-κB
[中图分类号] R965.1 [文献标识码] A [收稿日期] 2016-10-23

Inhibitory effect of dipeptide peptidase inhibitors analogues on LPS-induced inflammatory response on microglia

LIU Ying-Jun[1], WANG Song[2], LIU Hai-lin[2], ZHOU Chun-qiao[2], PENG Hong-mei[2], WEN Jun[2], CHEN Yu[2], HUANG Dong-mei[3], FAN Zhi-guo[2] (1. Department of Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Department of Pharmacy, First People's Hospital of Chongqing Liangjiang New District, Chongqing 401121, China; 3. Clinical Laboratory Department, First People's Hospital of Chongqing Liangjiang New District, Chongqing 401121, China)

Abstract: Objective To study the inhibitory effect and mechanism of dipeptide peptidase inhibitors analogues on LPS-induced inflammatory response on microglia. **Methods** Microglia cells were cultured, isolated and purified from the neonatal Sprague-Dawley rats. Divided them into blank group, negative control, LPS group and medicine group (parallel determination for 3 times each group) after pharmacological preconditioning for 48 hours. The optimal concentration of microglia proliferation induced by LPS were measured by MTT assay. Observed the role of dipeptide peptidase inhibitors analogues on LPS-induced microglia in different concentrations. The interleukin1β (IL-1β), tumor necrosis factor alpha (TNF-α) were assayed by enzyme-linked immunorrbent assay (ELISA). The expression of TLR-4 was detected by Western blotting and the expression of NF-κB was detected by RT-PCR. **Results** LPS induced the proliferation of microglia and significantly increased the release of inflammatory cytokines in LPS-stimulated primary microglia. Compared with the blank group, dipeptide peptidase inhibitors analogues could inhibit this effect and the IC50 values was 1.014×10^{-2} mol/L to MG after pretreatment for 48 hours. Dipeptide peptidase inhibitors analogues could inhibit the release of TNF-α and IL-1 significantly ($P<0.01$), and it decreased the expression of TLR4 and NF-κB significantly ($P<0.01$). **Conclusion** This research suggests that dipeptide peptidase inhibitors analogues restrain cell proliferation and inflammatory response of LPS-stimulated microglia, and the possible mechanism may be related to the inhibition of the expression of TLR-4 and NF-κB.

Keywords: dipeptide peptidase inhibitors analogues; microglia; lipopolysaccharide; TLR-4; NF-κB

近年来,大量研究表明脑内的慢性炎症反应与多种急慢性神经系统退行性疾病如阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森病(Parkinson's disease, PD)等的发生、发展密切相关[1-2]。过去有学者认为,人体存在血脑屏障,免疫系统不能很好识别外来抗原,逃避免疫监控[3],但最新研究发现,许多神经系统退行性疾病患者脑内也有强烈的局灶性炎症反应发生,对神经元造成伤害,诱发或加重神经系统退行性病变[4]。小胶质细胞(microglia, MG)作为参与中枢神经系统炎症主要效应细胞逐渐成为人们研究的焦点。小胶质细胞为神经胶质细胞,其体积较小,广泛分布于大脑和脊髓中,约占胶质细胞总数的 10%~20%,具有巨噬细胞的特征,是脑内主要的免疫细胞[5]。当小胶质细胞在各种因素下增殖活化时,可以释放大量的活性氧自由基及致炎细胞因子如白细胞介素-1β (IL-1β)、肿瘤坏死因子-α (TNF-α)等诱发中枢神经系统的炎症反应[6]。神经炎症一方面有利于神经系统损伤的修复,另一方面可诱发、加重神经系统的退行性病变,是 PD、

[基金项目] 重庆市卫生计生委医学科研基金面上项目(20142223)
[通信作者] 范治国,E-mail:fzg716716@yeah.net

AD 等疾病发生与发展的重要因素之一[7]。最新研究表明,PD、AD 患者神经元损伤部位均发现大量激活的小胶质细胞,表明 PD、AD 等急慢性中枢神经退行性疾病的发生、发展与小胶质细胞激活引起的慢性神经炎症反应具有很大相关性[8]。

二肽基肽酶Ⅳ(DPP-Ⅳ)抑制剂为近年来应用于临床治疗 2 型糖尿病的新型药物,主要代表药物有西他格利汀、维达格利汀等,二肽基肽酶抑制剂类似物为新合成的结构与二肽基肽酶Ⅳ(DPP-Ⅳ)抑制剂相近金刚烷磺酰胺类化合物,能明显抑制脂多糖(Li-popolysaccharide,LPS)诱导的小胶质细胞增殖及炎性因子释放,我们推测该化合物可能抑制了神经系统退行性疾病的慢性炎症反应。本实验拟通过探讨二肽基肽酶抑制剂类似物对 LPS 诱导的小胶质细胞炎症反应的抑制作用,为中枢神经系统退行性疾病的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂与仪器

二肽基肽酶抑制剂类似物(重庆医科大学药物化学教研室提供,国家专利号 201610818842.7);胎牛血清、DMEM/F12 培养基、二甲基亚砜(DMSO)、LPS、L-多聚赖氨酸、青霉素与链霉素混合液、0.25% 胰蛋白酶液(北京鼎国生物技术公司);MTT 及 PBS 磷酸盐缓冲液(美国 sigma);小胶质细胞 OX-42 抗体(Santa),TNF-α 及 IL-1β ELISA 试剂盒(欣博盛生物科技有限公司),酶标仪、PCR 仪(Bio-Rad);FACS Calibar 流式细胞仪(Becton-Dickins)。PE 标记的 TLR4 抗体(Bioss),SYBR® Premix Ex Taq™(TaKaRa)。超净工作台(北京昌平长城空气净化工程公司);二氧化碳培养箱(ThermoForma);多管架自动平衡离心机 TD5A-WS(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);倒置荧光显微镜(Nikon)。

1.2 实验方法

1.2.1 小胶质细胞的原代培养 取新生的 SD 大鼠(1~2 d),颈椎脱臼后,75% 酒精浸泡消毒,无菌培养皿中剪开颅骨,取出脑皮质和髓质,弃脑干,用 D-Hanks液反复冲洗后置于盛有冰冷 D-Hanks 液的培养皿中,仔细去除脑组织表面血管和脑膜。剪碎后于西林瓶中加入3 mL 的0.125%的胰蛋白酶,静置 10~15 min。然后加入3 mL 包含有 10% 胎牛血清,100 u/mL 青霉素及 100 μg/mL 链霉素的 DMEM/F12 高糖培养基终止消化,并反复吹打制成细胞悬液,200 目细胞筛过滤后,滤液 1 000 r/min 离心 10 min,所得沉淀物加入高糖培养基制成细胞悬液,接种在包被有 L-多聚赖氨酸的培养瓶中,于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育,并在倒置显微镜下密切观察细胞的生长情况。

1.2.2 小胶质细胞的分离纯化与纯度鉴定 原代细胞培养至 10 d 时,可观察到混合细胞分层生长,恒温振荡(37 ℃,260 r/min)5 h 后,收集上清液,加入适量的血清培养液重悬,然后转移到用 L-多聚赖氨酸提前包被好的培养瓶中,37 ℃、5% CO_2 培养箱静置约 1 h,振荡培养瓶去除贴壁不牢的细胞,加入新鲜培养基继续培养。1 周后,可进行第 2 次振荡分离。再继续培养 5~7 d 可进行第 3 次振荡分离。3 次培养收集的细胞采用流式细胞术进行纯度鉴定并用于后续实验。

1.2.3 MTT 法检测二肽基肽酶抑制剂类似物对 LPS 刺激后小胶质细胞增殖的影响 将实验分为空白组、LPS 组、药物组、阴性对照组(每组平行测定 3 次),药物提前 48 h 预处理,LPS 刺激 MG 的最佳浓度为 1×10^{-6} mol/L,LPS 作用时间为 24 h[9]。MG 以每孔 1×10^{5} mol/L 细胞悬液接种于 96 孔板中,24 h 后给药。用细胞培养液将二肽基肽酶抑制剂类似物存储液(0.1 mol/L)稀释成不同浓度(1×10^{-6}、3×10^{-7}、1×10^{-7}、3×10^{-8}、1×10^{-8}、3×10^{-9} mol/L)的药物工作液,每孔加入 MTT 培养 4 h 后,再加入150 μL DMSO,振摇 10 min 后,于酶标仪 490 nm 波长处测定 OD 值。计算其抑制率 IR,并通过 SPSS 软件分析并计算 IC50。

1.2.4 ELISA 法检测二肽基肽酶抑制剂类似物对 LPS 诱导小胶质细胞 TNF-α 和 IL-1β 的影响 实验分为空白对照组、LPS 组、药物(1×10^{-6}、3×10^{-7}、1×10^{-7}、3×10^{-8}、1×10^{-8} mol/L)组,将 MG 以细胞数 5×10^{5}/孔接种于 6 孔板中(每组平行测定 3 次),LPS 刺激 3、6、12、24 h 后收集细胞上清液,根据 ElISA 试剂盒说明书测定上清液中 TNF-α 和 IL-1β 的浓度。

1.2.5 Western blotting 检测小胶质细胞 TLR-4 表达 取对数生长期的小胶质细胞,接种于培养皿中,细胞分组依次为空白组、LPS 组、阴性对照组、药物组(二肽基肽酶抑制剂类似物浓度为 1×10^{-6} mol/L),于 37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养,裂解细胞后提取总蛋白。根据 BCA 试剂盒操作说明测定样本蛋白浓度后,以每组 20 μg 蛋白量,计算上样体积,微量针上样,电泳,待电泳条带清晰、完全后移至转膜液中,并用 5% 脱脂奶封闭后加入 TLR-4 抗体及 β-actin。2 h 后用 TBST 液洗膜 3 次,每次 10 min,完成后加入二抗孵育 1.5 h,TBST 洗膜 5 次后,用镊子夹出膜带,加入显色剂,BIO-RAD 系统测定各组条带灰度比值。

1.2.6 RT-PCR 法检测 NF-κB 的表达 取对数生长的小胶质细胞,以 5×10^{5}/孔接种于 6 孔板中,细胞分组依次为空白组、LPS 组、阴性对照组、药物组(二肽

基肽酶抑制剂类似物浓度为 1×10^{-6} mol/L)。37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养 6 h 后,Trizol 试剂提取细胞总 RNA,并将其逆转录成 cDNA;以 cDNA 进行 PCR 反应。小鼠 NF-κB 引物序列:上游引物为 5'-GGAGAAGGCTGGAGAAGATG-3',下游引物为 5'-GCTCATACGGTTTCCCATTT-3'。PCR 反应条件:94 ℃预变性 4 min;94 ℃ 30 s,62 ℃ 30 s,72 ℃ 2 min,共 35 个循环;72 ℃延伸 10 min;Bio-Rad iQ5 软件进行分析处理,通过 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算 NF-κB mRNA 与内参基因循环阈值的差值△Ct。

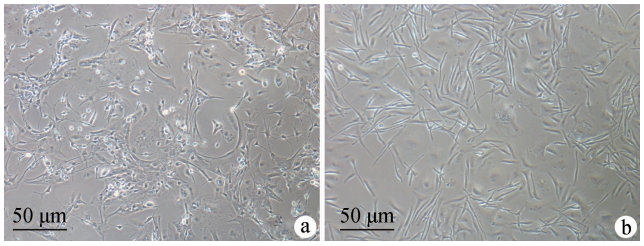
1.3 统计学处理

应用统计学软件 SPSS 17.0 进行统计学分析。各组数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析法,两样本之间均数比较采用 t 检验,$P<0.05$为差异有统计学意义,$P<0.01$ 为差异具有极显著性统计学意义。

2 结果

2.1 小胶质细胞原代培养结果

倒置显微镜下可见:培养至第 10 天左右可以观察到大量圆形或者椭圆形、折光性强的小胶质细胞附着生长于星型胶质细胞表面(图 1a),分离纯化后的小胶质细胞见图 1b。



a:培养 10 d 混合细胞形态;b:纯化后小胶质细胞形态

图 1 显微镜下小胶质细胞形态

2.2 小胶质细胞纯度鉴定结果

流式细胞术检测结果显示 MG 分离纯化后的纯度为 98.91%,细胞纯度超过 95%(图 2),可继续后续的实验。

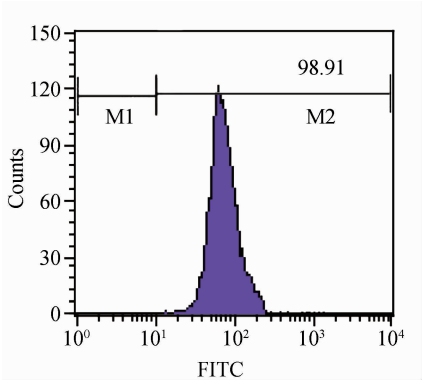


图 2 流式细胞术(FCM)检测小胶质细胞纯度

2.3 二肽基肽酶抑制剂类似物对小胶质细胞增殖的影响

与空白对照组比较,LPS 组小胶质细胞大量增殖;不同浓度的二肽基肽酶抑制剂类似物作用于小胶质细胞后均有明显的抑制增殖作用,且呈剂量依赖性。使用 SPSS 软件求得抑制率及 IC50 为 1.014×10^{-2} μmol/L,见图 3。

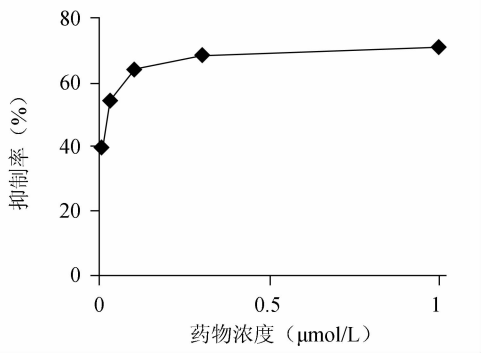


图 3 不同浓度二肽基肽酶抑制剂类似物对小胶质细胞的生长抑制率

2.4 二肽基肽酶抑制剂类似物对小胶质细胞炎症因子(TNF-α 和 IL-1β)的影响

与空白组比较,LPS(10 μg/mL)组的 TNF-α 和 IL-1β 水平明显上升($P<0.01$),且炎性因子释放水平随刺激时间延长而显著提高;而加入二肽基肽酶抑制剂类似物后,药物组(1×10^{-6} mol/L)的 TNF-α 和 IL-1β 水平与 LPS 组相比均明显下降($P<0.01$),见表 1、2 及图 4、5。

表 1 不同时间点二肽基肽酶抑制剂类似物对小胶质细胞炎性因子分泌的影响

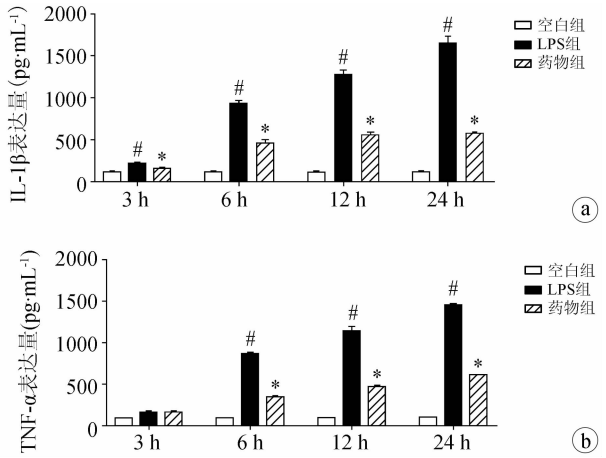
组别	LPS 刺激时间(h)	TNF-α(pg/mL)	IL-1β(pg/mL)
空白组	3	95.6±1.9	116.1±2.3
	6	99.3±3.3	119.7±3.0
	12	101.2±2.7	120.1±2.6
	24	105.7±2.8	122.3±2.4
LPS 组(10 μg/mL)	3	153.2±21.3#	146.9±11.7
	6	867.7±24.7#	884.9±23.4#
	12	1 132.6±27.4#	1 247.8±31.6#
	24	1 435.7±34.6#	1 659.7±29.7#
药物组(1×10^{-6} mol/L)	3	167.8±4.5	153.8±8.6
	6	374.2±11.7*	402.4±9.4*
	12	453.6±19.6*	482.5±18.3*
	24	482.9±18.4*	505.2±21.8*

*:与 LPS 组比较,$P<0.01$;#:与空白组比较,$P<0.01$

2.5 二肽基肽酶抑制剂类似物对小胶质 TLR4 表达的影响

Western blotting 结果可见:药物组与空白对照组 TLR4 表达无明显区别($P>0.05$),而 LPS 组与空白对

照组比较 TLR4 表达明显增加($P<0.01$)。经药物作用后与 LPS 组比较,TLR4 表达明显降低($P<0.01$),见图 6。



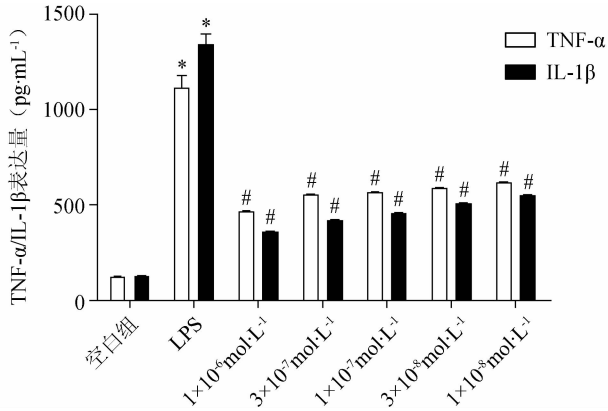
*:与 LPS 组比较,$P<0.01$;#:与空白组比较,$P<0.01$

图 4 不同时间点二肽基肽酶抑制剂类似物对小胶质细胞炎性因子分泌的影响

表 2 同一时间点(24 h)不同波段二肽基肽酶抑制剂类似物对小胶质细胞炎性因子分泌的影响

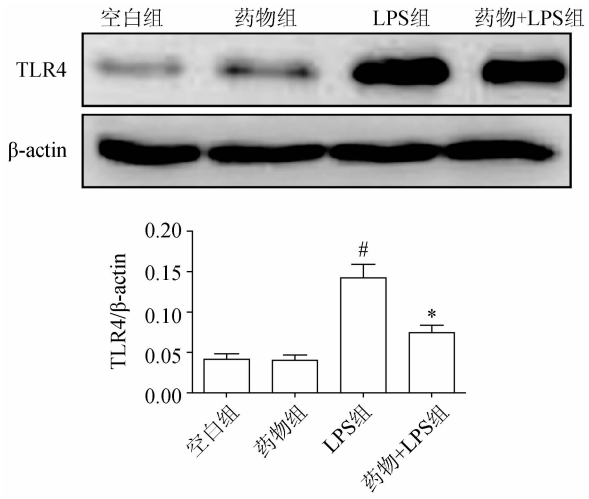
组别	TNF-α (pg/mL)	IL-1β (pg/mL)
空白组	123.2 ± 2.6	119.8 ± 3.7
LPS 组(10 μg · mL^{-1})	1 094.32 ± 42.6*	1 373.4 ± 28.3*
药物 + LPS 组(1 × 10^{-6} mol · L^{-1})	397.3 ± 19.5#	358.2 ± 22.7#
药物组(3 × 10^{-7} mol · L^{-1})	436.9 ± 21.4#	418.5 ± 18.5#
药物组(1 × 10^{-7} mol · L^{-1})	453.6 ± 27.1#	451.3 ± 22.7#
药物组(3 × 10^{-8} mol · L^{-1})	502.6 ± 26.9#	499.6 ± 24.4#
药物组(1 × 10^{-8} mol · L^{-1})	542.7 ± 24.8#	555.8 ± 27.5#

*:与空白组比较,$P<0.01$;#:与 LPS 组比较,$P<0.01$



*:与空白组比较,$P<0.01$;#:与 LPS 组比较,$P<0.01$

图 5 同一时间点(24 h)不同浓度二肽基肽酶抑制剂类似物对小胶质细胞炎性因子分泌的影响

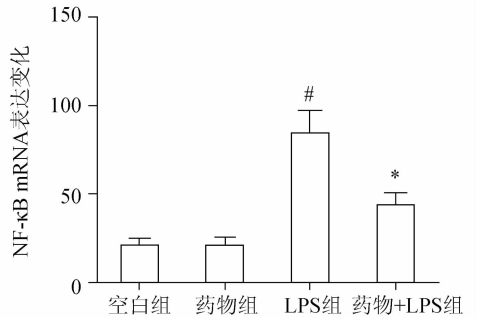


*:与 LPS 组比较,$P<0.01$;#:与空白组比较,$P<0.01$

图 6 Western blotting 测定二肽基肽酶抑制剂类似物对小胶质细胞 TLR-4 表达的影响

2.6 二肽基肽酶抑制剂类似物对小胶质细胞 NF-κB mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示,空白对照组与药物组之间无明显差异,LPS 组与空白对照组相比,NF-κB 的表达明显增加($P<0.01$)。药物 + LPS 组与 LPS 组相比,NF-κB 表达则显著降低($P<0.05$),见图 7。



*:与 LPS 组比较,$P<0.01$;#:与空白组比较,$P<0.01$

图 7 RT-PCR 测定二肽基肽酶抑制剂类似物对小胶质细胞 NF-κB 表达的影响

3 讨论

小胶质细胞作为脑内的免疫细胞参与吞噬及抗原呈递等功能,过度激活的小胶质细胞与慢性退行性疾病的发生、发展有密切关系[10-11]。Mizuno 等[12]报道了在内毒素诱导的小胶质细胞中,尼麦角林能显著抑制 TNF-α、IL-1β 等炎症因子的表达而起到中枢保护作用。Wang 等[13]报道了尿皮素能通过减少 TNF-α 的表达降低多巴胺神经元的损害。可见 LPS 刺激激活小胶质细胞并上调各种细胞因子及炎症因子,一氧化氮、TNF-α 及 IL-1β 等的表达是导致神经毒性损伤重要机制。研究表明,抑制小胶质细胞的增殖活化可能对中

枢神经系统有保护作用[14]。本研究结果证实二肽基肽酶抑制剂类似物能明显抑制 LPS 诱导的体外培养的小胶质细胞增殖,作用 48 h 后的 IC50 为 1.014×10^{-2} μmol/L。二肽基肽酶抑制剂类似物能使小胶质细胞炎症因子 IL-1β、TNF-α 水平明显降低。综上表明二肽基肽酶抑制剂类似物能明显抑制 LPS 诱导的小胶质细胞的增殖、活化及炎症反应。

TOLL 样受体 4(TLR4)是一种能识别包括 LPS 在内的多种配体 I 型跨膜受体蛋白。其结构包括:胞外区域、跨膜区域、胞内区域。与 LPS 等相应配体结合后,可进一步通过激活核因子 κB(nuclear factor-κB, NF-κB)和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)信号通路进行信号转导,激活各种炎性细胞因子的基因表达,促使炎性因子产生、释放,产生放大效应;同时诱导转录激活因子蛋白 1(activator protein-1, AP-1),调节细胞增殖、转化及凋亡[15-16]。Willis[17]的研究显示,当 TLR4 受体有基因缺陷时,小胶质细胞对 LPS 的刺激反应性明显降低,并最终减少小胶质细胞释放炎症因子。这与 Lehnard 等[18]的研究结果相似,敲除 TLR4 基因的小鼠在乙醇诱导后,未发生小胶质细胞的活化。由此可见,TLR4 在小胶质细胞的活化中发挥着不可或缺的作用。在中枢神经系统中,TLR-4 和 NF-κB 主要表达于小胶质细胞中,抑制 TLR4 介导的小胶质细胞增殖与活化及 NF-κB 表达可以明显减轻中枢炎症反应[19]。本研究结果表明,LPS 诱导后,TLR4 和 NF-κB 在小胶质细胞的表达增加,而二肽基肽酶抑制剂类似物可显著降低 TLR4 和 NF-κB 的表达。提示该药物发挥抗炎作用的中心环节可能是通过抑制 TLR4 和 NF-κB 表达。

综上所述,二肽基肽酶抑制剂类似物可能通过抑制 TLR4 和 NF-κB 的表达,抑制细胞增殖,减少炎性因子的释放发挥抗炎作用。其更广泛的作用及进一步的作用机制有待后续研究。

[参考文献]

[1] Tufekci KU, Meuwissen R, Genc S, et al. Chapter four-Inflammation in Parkinson's disease[J]. Adv Protein Chem Struct Biol, 2012, 88: 69 – 132.

[2] Block ML, Zecca L, Hong JS, et al. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms[J]. Nat Rev Neurosci, 2007, 8(1): 57 – 69.

[3] Zhao W, Xie W, Xiao Q, et al. Protective effects of an anti-inflammatory cytokine, interleukin-4, on motoneuron toxicity induced by activated microglia[J]. J Neurochem, 2006, 99(4): 1176 – 1187.

[4] Morgan BP, Harris CL. Complement, a target for therapy in inflammatory and degenerative diseases[J]. Nat Rev Drug Discov, 2015, 14(12): 857 – 877. doi: 10.1038/nrd4657.

[5] Saura J, Tusell JM, Serratosa J. High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization[J]. Glia, 2003, 44(3): 183 – 189.

[6] Varnum MM, Ikezu T. The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease brain[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2012, 60(4): 251 – 266. doi: 10.1007/s00005 – 012 – 0181 – 2.

[7] Toscano-Tejeida D, Ibarra A, Phillips-Farfán BV, et al. ACAID as a potential therapeutic approach to modulate inflammation in neurodegenerative diseases[J]. Med Hypotheses, 2016, 88: 38 – 45. doi: 10.1016/j.mehy.2016.01.006.

[8] López González I, Garcia-Esparcia P, Llorens F, et al. Genetic and transcriptomic profiles of inflammation in neurodegenerative diseases: Alzheimer, Parkinson, Creutzfeldt-Jakob and Tauopathies[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(2): 206. doi: 10.3390/ijms17020206.

[9] 张思思,蔡江晖,万敬员,等. 羟基积雪草苷对 LPS 诱导小胶质细胞增殖的抑制作用及机制研究[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(3): 428 – 434. doi: 10.3969/j.issn.1000 – 4718.2015.03.008.

[10] Li Z, Zheng Z, Ruan J, et al. Chronic inflammation links cancer and Parkinson's disease[J]. Front Aging Neurosci, 2016, 8: 126. doi: 10.3389/fnagi.2016.00126.

[11] Tang Y, Le W. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases[J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(2): 1181 – 1194. doi: 10.1007/s12035 – 014 – 9070 – 5.

[12] Mizuno T, Kuno R, Nitta A, et al. Protective effects of nicergoline against neuronal cell death induced by activated microglia and astrocytes[J]. Brain Res, 2005, 1066(1 – 2): 78 – 85.

[13] Wang MJ, Lin SZ, Kuo JS, et al. Urocortin modulates inflammatory response and neurotoxicity induced by microglial activation[J]. J Immunol, 2007, 179(9): 6204 – 6214.

[14] Burguillos MA, Deierborg T, Kavanagh E, et al. Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity[J]. Nature, 2011, 472(7343): 319 – 324. doi: 10.1038/nature09788.

[15] Qian Y, Deng J, Xie H, et al. Regulation of TLR4-induced IL-6 response in bladder cancer cells by opposing actions of MAPK and PI3K signaling[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135(3): 379 – 386. doi: 10.1007/s00432 – 008 – 0478 – z.

[16] Zeuner MT, Krüger CL, Volk K, et al. Biased signalling is an essential feature of TLR4 in glioma cells[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1863(12): 3084 – 3095. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.09.016.

[17] Willis CL. Glia-induced reversible disruption of blood-brain barrier integrity and neuropathological response of the neurovascular unit[J]. Toxicol Pathol, 2011, 39(1): 172 – 185. doi: 10.1177/0192623310385830.

[18] Lehnardt S, Massillon L, Follett P, et al. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(14): 8514 – 8519.

[19] Ko HM, Koppula S, Kim BW, et al. Inflexin attenuates proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB activation in LPS-treated microglia[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 633(1 – 3): 98 – 106. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.02.011.

(编辑:杨 颖)