

地黄醇提物含药血清调控BV2小胶质细胞极化干预神经炎症的机制^Δ

田萍^{1*}, 安鸿志¹, 费千², 梁瑞峰¹, 杨丹¹, 张雪侠¹, 葛文静¹, 刘一菲¹, 李红伟², 韩德恩^{2#}[1. 河南省中西医结合医院(河南省中医药研究院)中心实验室, 郑州 450004; 2. 河南中医药大学药学院, 郑州 450046]

中图分类号 R965; R285

文献标志码 A

文章编号 1001-0408(2026)15-1979-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.15.08



摘要 **目的** 研究地黄醇提物含药血清(RG)调控脂多糖(LPS)诱导的BV2小胶质细胞极化干预神经炎症的作用机制。**方法** 采用LPS诱导BV2细胞建立体外神经炎症模型。将细胞分为对照组、LPS组、10%RG组、20%RG组、BAY 11-7082[核因子 κ B(NF- κ B)抑制剂]组、20%RG+BAY 11-7082组,除control组外,其余各组细胞先加入相应药液预处理12 h,再加入LPS刺激24 h。观察各组细胞形态,检测离子钙结合适配分子1(Iba-1)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、分化簇206(CD206)荧光强度,肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)、IL-1 β 、iNOS、IL-4、IL-10、转化生长因子 β (TGF- β)、精氨酸酶1(Arg-1) mRNA表达以及Toll样受体4(TLR4)/NF- κ B/NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)信号通路相关蛋白表达。**结果** 与对照组比较,LPS组细胞形态发生明显改变,呈典型M1型活化形态;Iba-1、iNOS荧光强度,TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、iNOS mRNA相对表达量,TLR4、NLRP3、胱天蛋白酶1 p20、IL-1 β p17蛋白相对表达量及NF- κ B p65、NF- κ B抑制蛋白 α 磷酸化水平均显著升高($P<0.05$);CD206荧光强度和IL-4、IL-10、TGF- β 、Arg-1 mRNA相对表达量均显著降低($P<0.05$)。与LPS组比较,10%RG组、20%RG组、BAY 11-7082组和20%RG+BAY 11-7082组细胞中上述指标变化均显著逆转($P<0.05$),且后3组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** RG可有效抑制小胶质细胞的整体活化并纠正其M1/M2极化失衡,其机制可能与抑制TLR4/NF- κ B/NLRP3信号通路的过度激活相关。**关键词** 地黄醇提物;含药血清;小胶质细胞;神经炎症;TLR4/NF- κ B/NLRP3信号通路;抑郁症

Mechanism of *Rehmannia glutinosa*-medicated serum regulating BV2 microglia polarization to interfere with neuroinflammation

TIAN Ping¹, AN Hongzhi¹, FEI Qian², LIANG Ruifeng¹, YANG Dan¹, ZHANG Xuexia¹, GE Wenjing¹, LIU Yifei¹, LI Hongwei², HAN Deen²[1. Central Laboratory, Henan Integrative Medicine Hospital (Henan Academy of Chinese Medicine), Zhengzhou 450004, China; 2. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China]

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study the mechanism of action of *Rehmannia glutinosa*-medicated serum (RG) in regulating lipopolysaccharide (LPS)-induced polarization of BV2 microglia to interfere with neuroinflammation. **METHODS** An *in vitro* neuroinflammation model of BV2 cells induced by LPS was established. Cells were divided into control group, LPS group, 10%RG group, 20%RG group, BAY 11-7082 [nuclear factor kappa B (NF- κ B) inhibitor] group, and 20%RG+BAY 11-7082 group. Except for the control group, cells in all other groups were pretreated with corresponding drugs for 12 h and then stimulated with LPS for 24 h. The morphology of cells in each group was observed, and the fluorescence intensity of ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba-1), inducible nitric oxide synthase (iNOS), CD206, the mRNA expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), IL-1 β , iNOS, IL-4, IL-10, transforming growth factor- β (TGF- β), arginase-1 (Arg-1), and the Toll-like receptor 4 (TLR4)/NF- κ B/NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3) signaling pathway-related protein expression were detected. **RESULTS** Compared with the control group, the LPS group showed significant changes in cell morphology, exhibiting a typical M1 activated morphology. The fluorescence intensity of Iba-1 and iNOS, the relative expression levels of TNF- α , IL-6, IL-1 β , iNOS mRNA, the relative expression levels of TLR4, NLRP3, caspase-1 p20, IL-1 β p17 protein, and the phosphorylation levels of NF- κ B p65 and inhibitor of nuclear factor kappa B α were significantly increased ($P<0.05$). The fluorescence intensity of CD206 and the relative expression levels of IL-4, IL-10, TGF- β , and Arg-1 mRNA were significantly reduced ($P<0.05$). Compared with the LPS group, the changes in the above indicators in the cells of the 10%RG group, 20%RG group, BAY 11-7082 group, and 20%RG+BAY 11-7082 group were significantly reversed

^Δ基金项目 河南省科技攻关项目(No. 232102311214);河南省中医药科研专项课题(No. 2022ZY1150)

* 第一作者 助理研究员, 硕士。研究方向: 中药药效物质基础。
E-mail: tianping082@163.com

通信作者 讲师, 博士。研究方向: 药代动力学、代谢组学。
E-mail: handn@163.com

($P < 0.05$), and there was no statistically significant difference in the comparison of the last three groups ($P > 0.05$).

CONCLUSIONS RG can effectively inhibit the overall activation of microglia and correct their M1/M2 polarization imbalance, and its mechanism may be closely related to the inhibition of excessive activation of the TLR4/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway.

KEYWORDS *Rehmannia glutinosa*; medicated serum; microglia; neuroinflammation; TLR4/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway; depression

神经炎症是抑郁症发生发展的关键病理环节,主要以神经胶质细胞异常激活和促炎因子释放为特征^[1]。小胶质细胞作为中枢常驻免疫细胞,具有形态与功能可塑性:在正常状态下参与维持脑内稳态;在病理状态下可从静息态极化为经典活化的M1表型[释放肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)等促炎因子,加剧神经损伤]或选择性活化的M2表型(分泌抗炎因子,促进组织的重塑与修复)^[2]。已有研究证实,抑郁症患者体内炎症标志物水平显著升高,其中小胶质细胞介导的神经炎症过程尤为重要,M1/M2表型平衡与小胶质细胞的炎症调控功能密切相关,在抑郁症病理过程中起重要作用^[2-4]。小胶质细胞的极化过程受多种信号通路调控,其中Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)/核因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)/NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)信号通路尤为关键^[5]。TLR4激活后可启动NF- κ B信号通路,从而促进促炎因子基因转录,推动小胶质细胞向M1表型极化^[6];NLRP3炎症小体在此过程中被激活,进一步放大炎症信号,形成正反馈调节环路^[5,7]。由此可见,TLR4/NF- κ B/NLRP3信号通路是小胶质细胞介导神经炎症的核心通路,亦是抗抑郁药物研究的重要靶点。

地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根,具有清热凉血、滋阴补肾、益精填髓之功,是中医治疗情志疾病(如抑郁、焦虑)的常用药物^[8-9]。现代药理学研究证实,地黄富含多种生物活性成分,其中以梓醇、毛蕊花糖苷、地黄苷D为代表的环烯醚萜苷类和苯乙醇苷类化合物,已被证实具有显著的抗炎、抗氧化及神经保护作用^[10-11]。地黄醇提物可通过调节5-羟色胺的合成、转运与代谢,显著改善大鼠的抑郁样行为^[12]。本课题组前期系统分析了地黄醇提物含药血清(下文简称“RG”),共鉴定出24个原型成分和29个代谢产物,并建立了梓醇、毛蕊花糖苷、地黄苷D、地黄苦苷在正常及CUMS抑郁模型大鼠体内的药代动力学分析方法^[10-11]。在上述研究基础上,本研究以脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导BV2小胶质细胞活化构建体外神经炎症模型,探讨RG通过TLR4/NF- κ B/NLRP3信号通路调控小胶质细胞极化干预神经炎症的分子机制,从神经免疫角度揭示地黄的抗抑郁作用机制,以期为地黄的临床应用提供更系统的科学依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括LightCycler 96型实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)系统(瑞士Roche公司)、AU2700型全自动生化分析仪(美国Beckman Coulter公司)、CKX53型倒置显微镜(日本Olympus公司)、ELX800型多功能酶标仪(美国BioTek公司)、HF160W型CO₂细胞培养箱(上海力申科学仪器有限公司)、2K15型高速冷冻离心机(德国Sigma公司)等。

1.2 主要药材、药品与试剂

地黄药材采自河南省焦作市温县,经河南中医药大学药学院陈随清教授鉴定,确认为*R. glutinosa*的干燥块根。胎牛血清(批号G800)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;CCK-8细胞活力检测试剂盒(批号G021-1-21)购自南京建成生物工程研究所;一氧化氮(NO)检测试剂盒(批号S0021)购自上海碧云天生物技术有限公司;BAY 11-7082(NF- κ B抑制剂,批号19542-67-7)购自美国MedChemExpress公司;LPS、磷酸盐缓冲液(PBS)、胰蛋白酶消化液、BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号分别为L8880、P1020、T1350、PC0020)均购自北京索莱宝科技有限公司;鼠源NF- κ B抑制蛋白 α (inhibitor of nuclear factor kappa B α , I κ B α)单克隆抗体和兔源离子钙结合适配分子1(ionized calcium binding adaptor molecule 1, Iba-1)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、分化簇206(CD206)、TLR4、NF- κ B p65、磷酸化NF- κ B p65(phosphorylated NF- κ B p65, p-NF- κ B p65)、磷酸化I κ B α (phosphorylated I κ B α , p-I κ B α)、NLRP3、IL-1 β p17单克隆抗体(批号分别为4814T、7198S、13120S、24595S、14358S、8242T、3033T、2859T、13158S、12703S)均购自美国CST公司;兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、胱天蛋白酶1 p20(caspase-1 p20)单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔、羊抗鼠二抗(批号分别为81640-5-RR、22915-1-AP、SA00001-2、SA00001-1)均购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 实验动物与细胞株

SPF级雄性SD大鼠20只,体重(200 $\pm$ 20)g,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,动物生产许可证号为SCXK(鲁)20220006。动物实验经河南省中西医结合医院实验动物福利伦理审查委员会审核批准(批准编号为HNTCMDW-20240603)。BV2小胶质细胞购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

2 方法

2.1 地黄醇提物的制备

基于本课题组前期建立的研究方法^[12],将地黄干燥块根粉碎成粗粉;取400 g地黄粗粉,加入3.2 L的80%乙醇,回流提取3次,每次1 h;以4 000 r/min离心15 min,合并上清液减压浓缩至无醇味,制备成质量浓度为0.8 g/mL(以生药量计)的地黄醇提物。

2.2 空白血清和RG的制备

将20只大鼠适应性饲养1周后,随机分为空白组(生理盐水)与地黄醇提物组(7.2 g/kg,相当于临床等效剂量的4倍^[12]),每组10只。各组大鼠灌胃生理盐水或相应药液,给药体积为10 mL/kg,每日1次,连续7 d。于末次给药后1 h,麻醉大鼠,腹主动脉采血,室温静置2 h;以3 000 r/min离心10 min,分离血清。将血清置于56 °C水浴灭活30 min,经0.22 μm微孔滤膜过滤除菌、分装,即得空白血清和RG,于-80 °C下低温冻存。

2.3 细胞的培养

将冻存的BV2细胞复苏,利用含10%胎牛血清、1%青霉素(100 U/mL)-链霉素(100 μg/mL)双抗的高糖DMEM培养基,于37 °C、5%CO₂培养箱中常规培养。待细胞融合度为80%~90%时进行传代。选取生长状态良好、融合度为60%~70%的细胞进行实验。

2.4 RG干预条件的筛选

取对数生长期的BV2细胞,以 1.0×10^5 个/孔接种于96孔板(用于CCK-8法检测)或12孔板(用于NO检测和RNA提取)中,每组设置6个复孔,实验独立重复3次。

2.4.1 RG对BV2细胞增殖的影响

分别使用不同体积分数(0、1.25%、2.5%、5%、10%、20%、40%)的RG处理BV2细胞12、24、48 h,按CCK-8细胞活力检测试剂盒说明书操作,检测细胞活力。

2.4.2 RG预处理对LPS刺激下BV2细胞增殖的影响

分别使用不同体积分数(0、1.25%、2.5%、5%、10%、20%、40%)的RG预处理BV2细胞4、8、12 h(根据“2.4.1”项下检测结果设置),再加入终浓度为1 μg/mL的LPS刺激细胞24 h(LPS的刺激浓度和时间依据相关文献^[13]及前期预实验结果设定),同法设置不加RG和LPS的细胞作为对照组,按CCK-8细胞活力检测试剂盒说明书操作,检测细胞活力。

2.4.3 RG预处理对LPS刺激下BV2细胞释放NO的影响

分别使用不同体积分数(0、1.25%、2.5%、5%、10%、20%、40%)的RG预处理BV2细胞4 h(根据“2.4.2”项下检测结果设置),再加入终浓度为1 μg/mL的LPS刺激细胞24 h,同法设置不加RG和LPS的细胞作为对照组,收集培养基上清液,按NO检测试剂盒说明书操作,检测细胞上清液中NO水平。

分别使用不同体积分数(0、5%、10%、20%,根据“2.4.2”项下检测结果设置)的RG预处理BV2细胞6、8、12、24 h,再加入终浓度为1 μg/mL的LPS刺激细胞24 h,同法设置不加RG和LPS的细胞作为对照组,收集培养基上清液,按NO检测试剂盒说明书操作,检测细胞上清液中NO水平。

以无明显细胞毒性作为安全标准,NO释放显著下降作为抗炎判定依据,筛选RG最佳干预浓度与时长,以此参数开展后续实验。

2.5 细胞分组与干预方案

将BV2细胞以 3×10^5 个/孔接种于6孔板中的细胞爬片上,待细胞贴壁后,分为6组:(1)对照(control)组,以10%空白血清处理;(2)LPS组,以10%空白血清+LPS(1 μg/mL)处理;(3)10%RG组,以10%RG+LPS(1 μg/mL)处理;(4)20%RG组,以20%RG+LPS(1 μg/mL)处理;(5)BAY 11-7082组,以10%空白血清+BAY 11-7082(5.0 μmol/L)+LPS(1 μg/mL)处理;(6)20%RG+BAY 11-7082组,以20%RG+BAY 11-7082(5.0 μmol/L)+LPS(1 μg/mL)处理。除control组外,其余各组细胞先加入相应药液预处理12 h后再加入LPS刺激24 h,按实验需求收集样本用于后续检测。每组设置6个复孔,实验独立重复3次。

2.6 细胞形态观察

按照“2.5”项下分组与干预方案处理BV2细胞,直接将培养板置于倒置显微镜下观察各组活细胞形态变化。每组随机选取5个视野,记录细胞胞体大小、突起变化、边缘轮廓清晰度等形态变化。

2.7 细胞中Iba-1、iNOS、CD206荧光强度检测

按照“2.5”项下分组与干预方案处理BV2细胞,弃培养基,用4 °C预冷的PBS清洗细胞3次,加入4%多聚甲醛,室温固定细胞20 min,以0.5% Triton X-100室温通透15 min,封闭液室温封闭1 h。分别加入Iba-1、iNOS、CD206一抗(稀释比例分别为1:100、1:200、1:200),于4 °C下孵育过夜;PBS洗涤后加入相应的荧光二抗(稀释比例为1:200),室温避光孵育1 h。经DAPI染核后,用淬灭剂封片,在荧光显微镜下采集图像,目的蛋白阳性荧光呈红色,DAPI标记细胞核呈蓝色,运用ImageJ软件分析Iba-1、iNOS、CD206的荧光强度。

2.8 细胞中炎症相关基因表达检测

采用实时荧光定量PCR法进行检测。按照“2.5”项下分组与干预方案处理BV2细胞,采用TRIzol法提取细胞总RNA,测定RNA浓度与纯度。取1 μg总RNA,逆转录合成cDNA,以cDNA为模板进行PCR扩增。反应体系(20 μL)包括TB Green Premix 10 μL,正、反向引物(10 μmol/L)各0.8 μL,cDNA模板2 μL,无酶水6.4 μL。

扩增反应条件:95℃预变性5 min;93℃变性10 s,60℃退火延伸40 s,共40个循环。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、iNOS、IL-4、IL-10、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)、精氨酸酶1(arginase-1, Arg-1) mRNA的相对表达量。所用引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列与产物大小见表1。

表1 引物序列与产物大小

基因	引物序列(5'-3')	产物大小/bp
TNF- α	正向:ACTGAACCTCGGGGTGATCG	107
	反向:CCACTTGGTGGTTTGTGAGT	
IL-6	正向:TGGTCTTCTGGAGTACCATA	139
	反向:GTGACTCCAGCTTATCTCTG	
IL-1 β	正向:CCACCTTTTGACAGTGATGA	185
	反向:AGCTTCTCCACAGCCACAAT	
iNOS	正向:GCGCAAAACATTCTCTGGGA	128
	反向:CCAGGGATTCTGGAACATTC	
IL-4	正向:TCACAGCAACGAAGACACA	155
	反向:ATCGAAAAGCCGAAAGATC	
IL-10	正向:ACCTGGTAGAAGTGATGCCC	196
	反向:TAGACACCTTGGTCTTGGAG	
TGF- β	正向:CTGCCATAACCGCACTGTCA	147
	反向:AGCAGTGGTAAACCTGATCC	
Arg-1	正向:CTTTCTCAAAAGGACAGCCT	179
	反向:CACAGACCGTGGGTTCTTCA	
GAPDH	正向:GAAGGGCTCATGACCACAGT	114
	反向:TGCAGGGATGATGTTCTGGG	

2.9 细胞中TLR4/NF- κ B/NLRP3信号通路相关蛋白表达检测

采用免疫印迹法进行检测。按照“2.5”项下分组与干预方案处理BV2细胞,弃培养基,用预冷的PBS漂洗细胞3次,加入含苯甲基磺酰氟的RIPA裂解液,冰上裂解0.5 h,匀浆后以12 000 r/min离心5 min,取上清蛋白。采用BCA法检测蛋白浓度,经上样、电泳后,将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜上,用5%脱脂奶粉室温封闭2 h,

分别加入TLR4、NLRP3、caspase-1 p20、IL-1 β p17、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、I κ B α 、p-I κ B α 、GAPDH一抗(除TLR4一抗的稀释比例为1:800外,其他一抗稀释比例均为1:1 000),于4℃下孵育过夜;加入相应二抗(稀释比例为1:5 000),于37℃下孵育1.5 h。用ECL化学发光底物检测蛋白,用ImageJ软件分析各蛋白条带的灰度值,以目的蛋白与内参蛋白(GAPDH)的灰度值比值作为目的蛋白的相对表达量,以p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、p-I κ B α /I κ B α 比值表示NF- κ B p65、I κ B α 蛋白磷酸化水平。

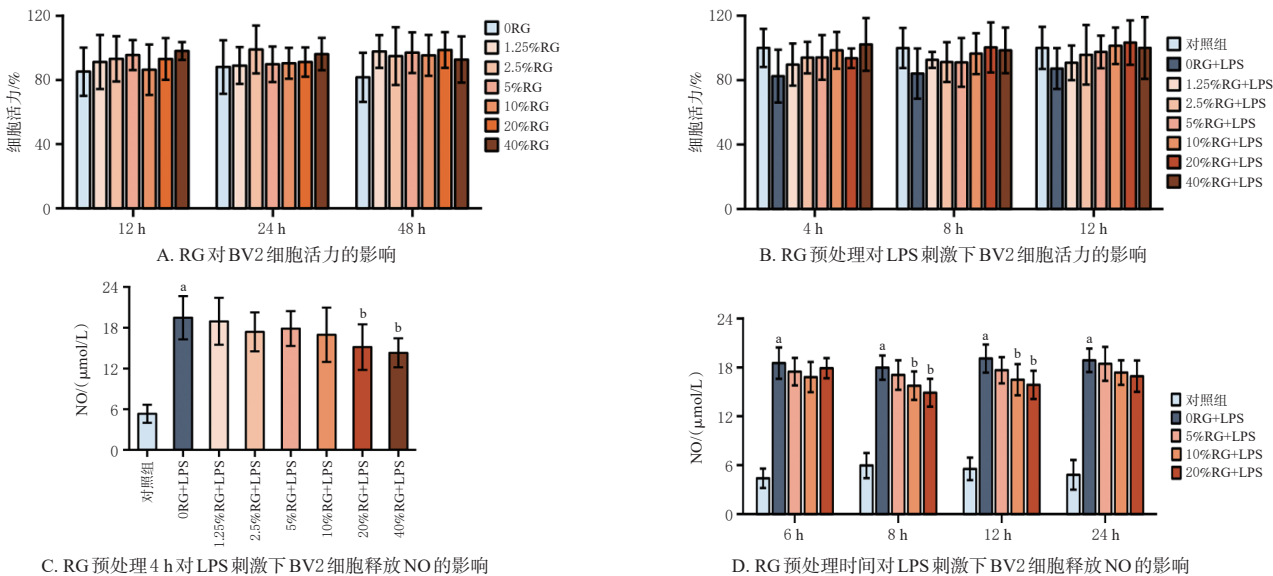
2.10 统计处理

采用SPSS 24.0软件进行统计分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步组间两两比较采用LSD- t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 RG干预条件筛选结果

1.25%~40%的RG处理BV2细胞12、24、48 h的细胞活力均在80%以上,表明RG在上述条件下对BV2细胞无明显毒性作用(图1A)。1.25%~40%的RG预处理细胞4、8、12 h后,在LPS刺激下,各组细胞活力与对照组比较差异均无统计学意义($P>0.05$),表明RG在上述条件下不影响细胞增殖(图1B)。NO检测结果显示,与对照组比较,LPS刺激可显著促进细胞释放NO($P<0.01$),20%和40%RG预处理4 h可显著降低LPS刺激的NO释放($P<0.05$)(图1C);RG不同预处理时间比较结果显示,与对照组比较,LPS刺激6、8、12、24 h均可显著促进细胞释放NO($P<0.01$),10%和20%RG预处理8、12 h均可显著降低LPS刺激的NO释放($P<0.05$)(图1D)。本研究选择10%和20%RG预处理12 h作为后续实验的条件。



a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与LPS组比较, $P<0.05$ 。

图1 RG的细胞毒性及对NO释放的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.2 RG对LPS刺激下BV2细胞形态的影响

control组细胞多呈圆形或椭圆形,表面光滑,胞体较暗,少数可见细长突起。与control组比较,LPS组细胞形态发生明显改变,胞体增大、边缘模糊,并伸出不规则或阿米巴样伪足,整体亮度增加,呈典型M1型活化形态。与LPS组比较,10%RG组、20%RG组、BAY 11-7082组和20%RG+BAY 11-7082组细胞上述形态变化均有不同程度改善。与20%RG组或BAY 11-7082组比较,20%RG+BAY 11-7082组细胞形态未见进一步改善,提示二者无协同效应。结果见图2。

3.3 RG对LPS刺激下BV2细胞中Iba-1、iNOS、CD206荧光强度的影响

与control组比较,LPS组细胞中Iba-1、iNOS荧光强度均显著升高,CD206荧光强度显著降低($P<0.05$)。与LPS组比较,10%RG组、20%RG组、BAY 11-7082组和20%RG+BAY 11-7082组细胞中Iba-1、iNOS荧光强度均显著降低,CD206荧光强度均显著升高($P<0.05$),且后3组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。结果见图3(iNOS和CD206的图略)和表2。

3.4 RG对LPS刺激下BV2细胞中炎症相关基因表达的影响

与control组比较,LPS组细胞中促炎指标TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、iNOS mRNA相对表达量均显著升高($P<0.05$),抗炎指标IL-4、IL-10、TGF- β 、Arg-1 mRNA相对表达量均显著降低($P<0.05$)。与LPS组比较,10%RG组、20%RG组、BAY 11-7082组和20%RG+BAY 11-7082组细胞中上述指标变化均显著逆转($P<0.05$),且

后3组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。结果见表3。

3.5 RG对LPS刺激下BV2细胞中TLR4/NF- κ B/NLRP3信号通路相关蛋白表达的影响

与control组比较,LPS组细胞中TLR4、NLRP3、caspase-1 p20、IL-1 β p17蛋白相对表达量及NF- κ B p65、I κ B α 蛋白磷酸化水平均显著升高($P<0.05$)。与LPS组比较,10%RG组、20%RG组、BAY 11-7082组和20%RG+BAY 11-7082组细胞中上述指标变化均显著逆转($P<0.05$),且后3组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。结果见图4和表4。

4 讨论

神经炎症是连接外周免疫激活与中枢神经系统功能障碍的关键病理环节,而小胶质细胞的异常活化及其功能失调被认为是启动神经炎症级联反应的重要始动因素^[14-15]。本研究通过形态学观察及Iba-1(小胶质细胞特异性活化标志物)表达水平的检测^[7,13],证实了LPS能够有效诱导BV2细胞从静息态向活化态转变,而RG预处理能显著抑制这一活化过程。

小胶质细胞的功能并非单一,其活化状态呈现出高度的可塑性,主要分为促炎性的M1表型和抗炎/修复性的M2表型^[16-17]。M1/M2极化失衡,特别是向M1表型的过度偏移,被认为是慢性神经炎症持续存在并导致神经元损伤的核心机制^[2,4]。本研究结果显示,LPS刺激可上调BV2细胞中M1表型标志物iNOS的表达,下调M2表型标志物CD206的表达,同时提高TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等促炎因子的mRNA相对表达量,降低IL-4、IL-10、

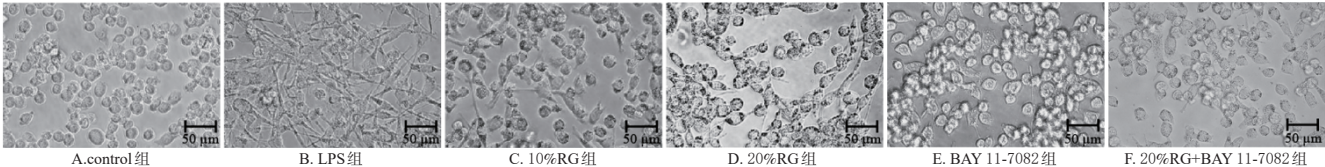


图2 各组细胞形态的显微镜

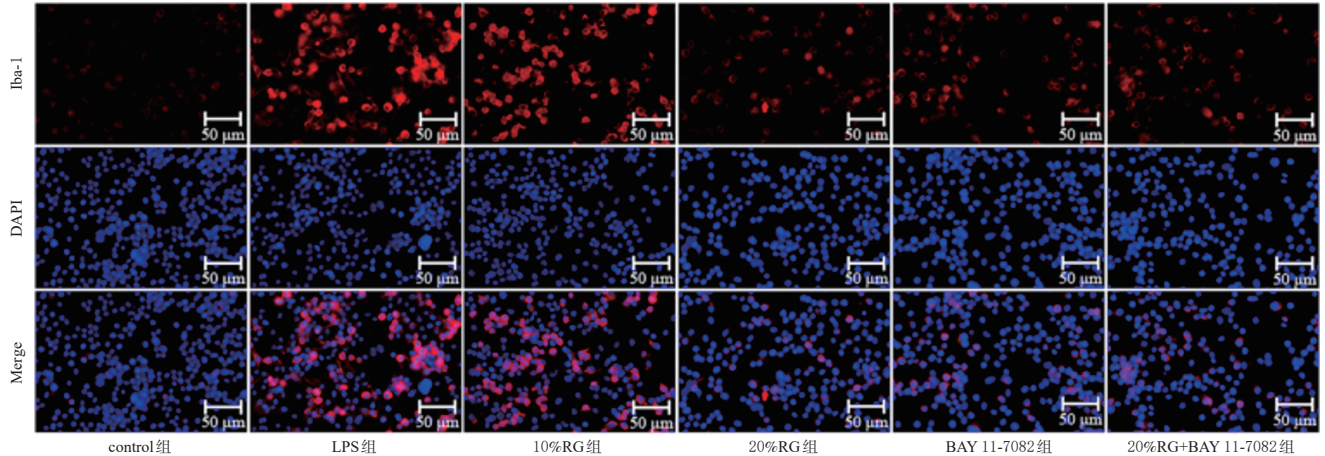


图3 各组细胞中Iba-1免疫荧光染色图

表2 各组细胞中Iba-1、iNOS、CD206 荧光强度比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Iba-1	iNOS	CD206
control组	0.999±0.097	1.001±0.041	1.000±0.124
LPS组	2.639±0.362 ^a	1.886±0.112 ^a	0.471±0.038 ^a
10%RG组	2.064±0.277 ^b	1.522±0.082 ^b	0.597±0.046 ^b
20%RG组	1.636±0.116 ^b	1.416±0.078 ^b	0.733±0.053 ^b
BAY 11-7082组	1.704±0.174 ^b	1.423±0.070 ^b	0.697±0.044 ^b
20%RG+BAY 11-7082组	1.585±0.188 ^b	1.396±0.079 ^b	0.770±0.067 ^b

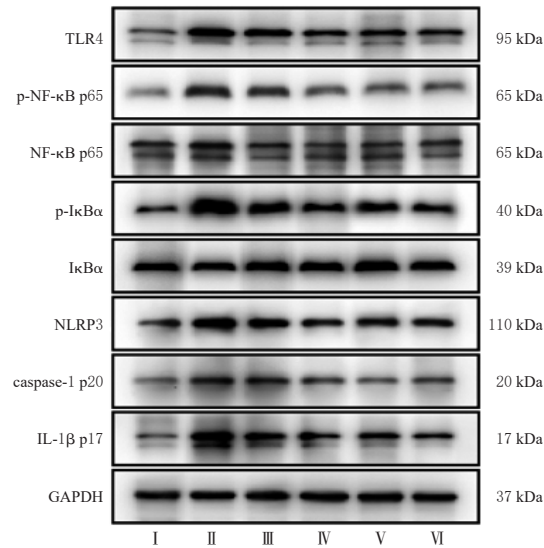
a: 与control组比较, $P<0.05$; b: 与LPS组比较, $P<0.05$ 。

表3 各组细胞中炎症相关基因表达比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	TNF- α mRNA	IL-6 mRNA	IL-1 β mRNA	IL-4 mRNA
control组	1.003±0.085	1.002±0.060	0.999±0.076	1.001±0.079
LPS组	4.755±0.384 ^a	7.518±0.602 ^a	30.063±1.731 ^a	0.548±0.046 ^a
10%RG组	4.133±0.326 ^b	6.164±0.873 ^b	27.179±1.454 ^b	0.638±0.055 ^b
20%RG组	3.022±0.233 ^b	5.086±0.448 ^b	20.588±0.969 ^b	0.796±0.078 ^b
BAY 11-7082组	3.212±0.308 ^b	5.222±1.038 ^b	21.262±1.089 ^b	0.755±0.087 ^b
20%RG+BAY 11-7082组	2.898±0.243 ^b	4.787±0.470 ^b	19.961±1.069 ^b	0.840±0.048 ^b

组别	IL-10 mRNA	TGF- β mRNA	Arg-1 mRNA	iNOS mRNA
control组	1.001±0.092	1.000±0.047	1.002±0.066	1.002±0.071
LPS组	0.456±0.037 ^a	0.632±0.054 ^a	0.251±0.024 ^a	12.993±0.874 ^a
10%RG组	0.542±0.060 ^b	0.737±0.062 ^b	0.301±0.039 ^b	10.388±0.866 ^b
20%RG组	0.591±0.067 ^b	0.864±0.075 ^b	0.402±0.042 ^b	8.839±0.744 ^b
BAY 11-7082组	0.615±0.063 ^b	0.801±0.065 ^b	0.383±0.049 ^b	9.132±0.915 ^b
20%RG+BAY 11-7082组	0.663±0.070 ^b	0.877±0.084 ^b	0.435±0.039 ^b	8.326±0.760 ^b

a: 与control组比较, $P<0.05$; b: 与LPS组比较, $P<0.05$ 。



I : control 组; II : LPS 组; III : 10%RG 组; IV : 20%RG 组; V : BAY 11-7082 组; VI : 20%RG+BAY 11-7082 组。

图4 各组细胞中TLR4/NF-κB/NLRP3 信号通路相关蛋白表达的电泳图

TGF- β 等抗炎因子的 mRNA 相对表达量。这种双向调控的失衡共同构成了神经炎症微环境。而 RG 干预能够有效逆转这一失衡状态,提示 RG 对小胶质细胞极化具有双向调控作用,既可抑制促炎性 M1 表型,又可促进修复性 M2 表型,从而构建有利于神经元存活的内环境,发挥神经保护作用。

TLR4/NF- κ B 通路是连接病原体识别(如 LPS)与炎

表4 各组细胞中TLR4/NF-κB/NLRP3 信号通路相关蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	TLR4/ GAPDH	p-NF- κ B p65/ NF- κ B p65	p-I κ B α /I κ B α	NLRP3/ GAPDH	caspase-1 p20/ GAPDH	IL-1 β p17/ GAPDH
control组	0.562±0.036	0.512±0.041	0.444±0.036	0.579±0.047	0.561±0.041	0.384±0.032
LPS组	1.245±0.074 ^a	1.103±0.065 ^a	1.475±0.098 ^a	1.144±0.078 ^a	1.095±0.096 ^a	1.131±0.085 ^a
10%RG组	0.988±0.086 ^b	0.959±0.085 ^b	0.789±0.072 ^b	0.822±0.070 ^b	0.737±0.070 ^b	0.913±0.083 ^b
20%RG组	0.775±0.055 ^b	0.710±0.042 ^b	0.701±0.073 ^b	0.628±0.054 ^b	0.538±0.044 ^b	0.679±0.083 ^b
BAY 11-7082组	0.850±0.064 ^b	0.795±0.067 ^b	0.676±0.060 ^b	0.637±0.056 ^b	0.493±0.045 ^b	0.597±0.049 ^b
20%RG+BAY 11-7082组	0.819±0.077 ^b	0.771±0.078 ^b	0.648±0.052 ^b	0.612±0.047 ^b	0.489±0.048 ^b	0.636±0.051 ^b

a: 与control组比较, $P<0.05$; b: 与LPS组比较, $P<0.05$ 。

症小体激活的经典级联反应通路,在小胶质细胞介导的神经炎症中处于枢纽地位^[5,7]。LPS 作为 TLR4 的强效配体,二者结合后可触发髓样分化因子 88 依赖性信号传导,进而激活 I κ B 激酶(I κ B kinase, IKK)。活化的 IKK 能够磷酸化 I κ B α ,促使其泛素化降解,从而释放 NF- κ B 二聚体;NF- κ B 随即入核并启动 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、NLRP3 等促炎因子转录^[18]。本研究结果显示,LPS 刺激后, BV2 细胞中 I κ B α 、NF- κ B p65 蛋白磷酸化水平和 TLR4、NLRP3 蛋白相对表达量均明显升高,提示该通路被有效激活。此外,下游 NLRP3 炎症小体的组装与活化亦被触发,表现为 caspase-1 p20 及其切割产物 IL-1 β p17 蛋白相对表达量均显著升高,提示炎症信号进一步放大,形成正反馈调节环路。而 RG 可显著抑制上述级联反应通路的激活。无论是上游 TLR4 受体的表达,中游 NF- κ B 的磷酸化及核转位,还是下游 NLRP3 炎症小体的组装及其效应分子 caspase-1 p20 和 IL-1 β p17 的生成,均受到 RG 的显著抑制,提示 RG 对 TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路具有多靶点调控作用。为进一步探究 NF- κ B 通路在 RG 抗炎效应中的作用,本研究采用 NF- κ B 抑制剂 BAY 11-7082 进行机制验证。结果显示, RG 与 BAY 11-7082 联合干预后,各项炎症指标的改善程度与单用 RG 或 BAY 11-7082 相比差异均无统计学意义,未观察到二者具有协同效应。该结果提示,NF- κ B 通路可能介导了 RG 的主要药理作用,二者作用靶点存在重叠, RG 的抗神经炎症效应可能依赖于对 NF- κ B 激活的抑制,即 RG 可能通过靶向阻断 NF- κ B 信号活化,进而抑制整个 TLR4/NF- κ B/NLRP3 通路的级联放大,最终调节小胶质细胞 M1/M2 极化平衡。

综上所述, RG 可有效抑制小胶质细胞的整体活化并纠正其 M1/M2 极化失衡,进而发挥抗神经炎症作用,其机制可能与抑制 TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路的过度激活相关。本研究仍存在一定局限性,如尚未明确血清中梓醇、毛蕊花糖苷等关键活性成分的浓度及其与生物效应间的精确剂量-效应关系。未来研究可结合药代动力学与药效学关联分析,进一步揭示地黄发挥神经保护作用的物质基础与作用规律。

参考文献

- [1] Sălcudean A, Popovici R A, Pitic D E, et al. Unraveling the complex interplay between neuroinflammation and depression: a comprehensive review[J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(4):1645.
- [2] Wang Y F, Chen C Y, Lei L, et al. Regulation of the microglial polarization for alleviating neuroinflammation in the pathogenesis and therapeutics of major depressive disorder[J]. *Life Sci*, 2025, 362:123373.
- [3] 王咪咪,冯永岗,韩云,等. 黄芩甲苷对神经炎症的改善作用及机制研究[J]. *中国药房*, 2026, 37(1):30-35.
- [4] 杨云方,张悦,彭景,等. 五味子基于miR-124调控TLR4通路介导小胶质细胞表型转化机制[J]. *药学报*, 2023, 58(2):377-385.
- [5] Wang L, Li H R, Zhao Y J, et al. Artemisinin alleviates chronic social defeat stress-induced depressive-like behavior by inhibiting neuroinflammation via the TLR4/MyD88/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway[J]. *Phytother Res*, 2025, 39(11):5263-5281.
- [6] 徐丹丹,曾永长,梁少瑜,等. 开心散改善阿尔茨海默病神经炎症的机制预测与验证[J]. *中国药房*, 2025, 36(12):1476-1482.
- [7] 贾思玮,苏琴,郭敏芳,等. 枸杞多糖通过TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路抑制LPS诱导的BV2细胞NLRP3炎症小体介导的炎症反应[J]. *中国免疫学杂志*, 2025, 41(11):2657-2662.
- [8] 张月月,武占娟,王君明,等. 地黄及其传统复方防治抑郁症研究[J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(12):137-140.
- [9] 赵洪庆,刘检,孟盼,等. 百合地黄汤对焦虑性抑郁症模型大鼠海马突触可塑性的影响[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(5):1205-1210.
- [10] 费千,安鸿志,田萍,等. 地黄乙醇提取物中4个特征成分在正常与抑郁模型大鼠体内药代动力学研究[J]. *中国中药杂志*, 2026, 51(7):2062-2069.
- [11] 苗金歌,田萍,韩德恩,等. 基于多元统计分析方法研究地黄在慢性不可预知温和应激抑郁模型大鼠的入血成分及其代谢产物[J]. *中国医院药学杂志*, 2024, 44(15):1759-1765.
- [12] 田萍,张薇,李开言,等. 地黄对慢性不可预知温和应激模型大鼠抑郁样行为及海马单胺类神经递质的影响[J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(17):4691-4697.
- [13] 王艳军,戴国梁,陈佩瑶,等. 延胡索乙素通过作用于 α 7nAChR介导BV2小胶质细胞的炎症反应与极化调控[J]. *中国中药杂志*, 2025, 50(11):3117-3126.
- [14] Shen S Y, Liang L F, Shi T L, et al. Microglia-derived interleukin-6 triggers astrocyte apoptosis in the hippocampus and mediates depression-like behavior[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2025, 12(11):e2412556.
- [15] Li P, Zhang F C, Huang C Y, et al. Exosomes derived from DPA-treated UCMSCs attenuated depression-like behaviors and neuroinflammation in a model of depression induced by chronic stress[J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2024, 19(1):55.
- [16] Lu R R, Zhang L, Wang H H, et al. Echinacoside exerts antidepressant-like effects through enhancing BDNF-CREB pathway and inhibiting neuroinflammation via regulating microglia M1/M2 polarization and JAK1/STAT3 pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13:993483.
- [17] Zhang Y Y, Wang D Y, Liu J M, et al. Structural characterization and antidepressant-like effects of *Polygonum sibiricum* polysaccharides on regulating microglial polarization in chronic unpredictable mild stress-induced zebrafish[J]. *IJMS*, 2024, 25(4):2005.
- [18] Zuo C C, Cao H, Feng F, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation exerts anti-inflammatory effects via modulating glial activation in mice with chronic unpredictable mild stress-induced depression[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 109:108788.

(收稿日期:2026-04-28 修回日期:2026-07-23)

(本文责编:邹丽娟)