

米诺环素对活化小胶质细胞 M1/M2 极化的影响

向彬, 申婷, 肖纯, 李秀芳*

(云南中医学院, 云南 昆明 650500)

摘要: 探讨米诺环素对活化的小胶质细胞 M1/M2 表型变化的影响。采用脂多糖 (LPS) 刺激 BV-2 小胶质细胞, 复制小胶质细胞活化模型, 造模 24 h 后, 酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 测定细胞上清液中 M1 型小胶质细胞产物一氧化氮 (NO)、前列腺素 E₂ (PGE₂)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6 (IL-6) 和白介素-1 β (IL-1 β), 及 M2 型小胶质细胞产物白介素-10 (IL-10) 和转化生长因子- β (TGF- β), 流式细胞仪检测 M1 型小胶质细胞标志物膜蛋白 CD16/32 及 M2 型小胶质细胞标志物膜蛋白 CD206 的表达, 评价米诺环素对活化小胶质细胞 M1/M2 型极化的影响; 通过检测米诺环素对小胶质细胞活化后, toll 样受体 4 (TLR4) 介导的髓样分化因子 88 (MyD88) 依赖性通路下游有丝分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路和核因子 κ B (NF- κ B) 信号通路的影响, 探讨米诺环素的作用环节。结果显示, 米诺环素能显著降低 NO、PGE₂、TNF- α 和 IL-6 的含量, 提高 IL-10 和 TGF- β 的含量, 下调膜蛋白 CD16/32 的表达, 上调膜蛋白 CD206 的表达, 提示米诺环素可抑制活化小胶质细胞向 M1 型即促炎表型极化, 并或促进其向 M2 型即抗炎表型转化, 其作用与下调 p38 MAPK 和 p-NF- κ B p65 信号通路有关。

关键词: 米诺环素; 小胶质细胞; 表型; 缺血性脑卒中; 炎症

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 08-1255-07

Effect of minocycline on activation of microglia M1/M2 phenotypes

XIANG Bin, SHEN Ting, XIAO Chun, LI Xiu-fang*

(Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

Abstract: This study was designed to investigate the effect of minocycline on microglia activation of M1/M2 phenotypes. The model was induced by lipopolysaccharide (LPS) in BV-2 microglia cells, and was used to evaluate the effect and mechanism of minocycline. We measured nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 beta (IL-1 β) in M1 type microglia, and interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor beta (TGF- β) in M2 type microglia through enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). We used flow cytometry to detect the expression of M1 marker CD16/32 and M2 marker CD206 in order to evaluate the influence of minocycline on microglia activation of M1/M2 polarization. Finally, we explored the mechanism of minocycline through detection of the protein expression in response to activation of toll like receptor 4 (TLR4)-mediated myeloid differentiation factor 88 (MyD88) dependent pathway, mitogen activated protein kinase (MAPK) signaling and nuclear factor- κ B (NF- κ B). The results suggest that minocycline obviously inhibited the production of NO, PGE₂, TNF- α and IL-6, and increased the production of IL-10, TGF- β in LPS-stimulated BV-2 cells. Minocycline significantly down-

收稿日期: 2017-02-10; 修回日期: 2017-04-18.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81303263); 云南省应用基础研究-中医联合专项 (2015FB205(019)); 云南省应用基础研究计划项目-重点项目 (2016FA035).

*通讯作者 Tel: 86-871-65918014, E-mail: sofinelxf@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0120

regulated the expression of M1 marker CD16/32 and up-regulated the expression of M2 marker CD206. These results suggest that minocycline can inhibit the activation of microglia to M1 phenotype and promote the transformation of M2 phenotype through down-regulation of p38 and NF- κ B signaling pathways.

Key words: minocycline; microglia; phenotype; ischemic stroke; inflammation

缺血性脑卒中 (ischemic stroke, IS) 是临床最常见的脑血管疾病之一^[1, 2], 也是中老年人致死的第二大病因。IS 的病理损伤机制极为复杂, 涉及多个环节, 其中, IS 后的神经炎症级联反应更是使缺血后脑损伤程度远超过缺血本身, 因此, 减轻神经炎症损伤被认为是 IS 治疗的有效策略^[3]。小胶质细胞作为脑内常驻的免疫细胞, 在 IS 发生后快速活化, 通过其表型的变化, 发挥促炎和抗炎的双刃剑作用^[4, 5]。正常情况下, 小胶质细胞的主要功能为清除死亡的神经细胞, 恢复神经功能, 在缺血性卒中的病理过程中, 缺血可诱导小胶质细胞活化, 并产生表型的变化, 活化小胶质细胞具有 M1 型和 M2 型两种表型变化, M1 型即为经典活化型, 由干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ) 或脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 等诱导, 可分泌一氧化氮 (NO)、白介素 (IL)-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等促炎因子, 损伤神经细胞、破坏血脑屏障并影响神经再生, 被认为是脑内炎症反应的主要发动和参与者; M2 型即选择性活化型, 由 IL-4 或 IL-13 等诱导, 可分泌抗炎因子如 IL-10 和转化生长因子- β (TGF- β) 等, 发挥抑制免疫炎症反应和促进组织修复等作用^[6]。实验研究表明, 调控 IS 后小胶质细胞的表型变化, 抑制小胶质细胞向促炎的 M1 型活化和诱导促炎的 M1 型小胶质细胞向抗炎的 M2 转化均有助于减轻 IS 后的炎症反应从而减轻神经元的损伤^[7, 8]。

米诺环素 (minocycline hydrochloride, MINO) 是二代半合成四环素类广谱抗菌药物, 具有较强的抗菌作用, 近年来不断有研究证实其在 IS 等疾病中具有重要的神经保护作用^[9], 可特异性抑制脑内小胶质细胞的活化^[10, 11]。

本研究从活化小胶质细胞 M1/M2 表型极化的角度, 对米诺环素的作用进行了研究, 并探讨其作用环节。

材料与方法

药物与试剂 盐酸米诺环素 (批号: WXBB4793V)、LPS (批号: 025M4040V) 购自美国 Sigma 公司; RPMI medium 1640、胎牛血清、青链霉素双抗、0.25%

trypsin-EDTA, 均购自美国 Gibco 公司; 一氧化氮一步法试剂盒、小鼠 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、PGE₂、TGF- β 和 IL-10 ELISA 试剂盒, 均购自南京建成生物工程研究所; CD16/32、CD206、NF- κ B p65 抗体, 均购自 Abcam 公司; PE rat anti-mouse IgG1, 购自美国 BD Biosciences 公司; p-NF- κ B p65、p38 MAPK、p-p38 MAPK、JNK、p-JNK、ERK、p-ERK 抗体, 均购自美国 Cell Signaling 公司; beta tubulin、beta actin、GAPDH 抗体, 均购自 Proteintech 公司。

细胞 BV-2 小鼠小胶质细胞株, 购自中国科学院典型培养物保藏中心昆明细胞库, 编号: KCB200770YJ。细胞培养于 10% 胎牛血清的 RPMI medium 1640 培养液中, 于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 细胞单层生长达到 80% 左右时进行传代。

仪器 酶标仪 (Infinite M200 PRO), 瑞士 Tecan 公司; CO₂ 细胞培养箱, 美国 Thermo Scientific 公司; 生物安全柜 (BSC-1300II A2), 苏州安泰空气技术有限公司; 倒置相差显微镜 (Ti-S), 日本尼康。

MTS 法 取对数生长期的 BV-2 小胶质细胞制成细胞悬液, 接种于 96 孔培养板 (每毫升 0.5×10^4 个), 每孔 180 μ L。48 h 后加入不同浓度的含药且不含血清的培养基, 实验细胞设为空白组 (只加培养基, 不加细胞)、正常组 (正常培养细胞)、米诺环素组 (浓度分别为 0.001、0.01、0.1、1、10 和 100 μ mol·L⁻¹), 每组设置 6 个复孔, 将 96 孔培养板放入 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h, 每孔中加入 MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) 溶液至终质量浓度 317 μ g·mL⁻¹, 放入培养箱孵育 2 h 后, 选择 490 nm 波长, 在酶标仪上测定各孔吸光度 (OD) 值, 计算细胞相对存活率, 公式如下:

$$\text{细胞存活率 (\%)} = (\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) / (\text{OD}_{\text{正常组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

ELISA 法 取对数生长期的 BV-2 小胶质细胞制成细胞悬液, 接种于 6 孔培养板 (每毫升 1×10^4 个), 每孔 1.8 mL。48 h 后加入不同浓度的米诺环素 (0.1、1 和 10 μ mol·L⁻¹), 正常对照组和模型组给予不含血清的培养基, 继续培养 24 h, 给药组和模型组加入终

质量浓度为 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS 刺激 24 h, 收集细胞上清液, 一氧化氮一步法试剂盒检测细胞上清液中 NO 的含量, ELISA 试剂盒检测细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、PGE₂、IL-10 和 TGF- β 含量。

流式细胞法 细胞培养、给药、造模方法同“ELISA 法”, 给药组增设了 IL-4 组 ($10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 造模后, 收集细胞, $1500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 冷 PBA 离心洗涤, 计数, 流式检测的各组细胞浓度调整为每毫升 1×10^6 个。采用细胞表面直接免疫荧光染色方法, 加入用 PBA 稀释的荧光素标记 CD16/32 于 4°C 孵育 1 h, PBS 洗涤 1 次, 将细胞重新悬浮于 $500 \mu\text{L}$ PBS 中, 混匀, 置流式管中, 4°C 避光保存, 用流式细胞仪检测细胞膜蛋白 CD16/32 的表达。采用细胞表面间接免疫荧光染色方法, 加入用 PBA 稀释的 CD206 于 4°C 孵育 2 h, PBS 洗涤 1 次。加 PBA 稀释的荧光素标记的二抗 4°C 孵育 30 min, PBS 洗涤 1 次, 将细胞重新悬浮于 $500 \mu\text{L}$ PBS 中, 混匀, 置流式管中, 4°C 避光保存, 用流式细胞仪检测细胞膜蛋白 CD206 的表达。

Western blot 法 细胞培养、给药、造模方法同“ELISA 法”, 米诺环素的给药浓度为 $0.01 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 造模后, 吸去上清液, 每孔以冷 PBS 洗 1 次, 每孔加裂解液 $100 \mu\text{L}$ 冰上裂解 10 min, 收集细胞裂解液 $14000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清测蛋白浓度, 每 $13 \mu\text{L}$ 蛋白样品加入 4 倍上样缓冲液 $5 \mu\text{L}$ 和 DTT $2 \mu\text{L}$, 密封煮沸 10 min, 分装, -80°C 保存。每 $30 \mu\text{g}$ 蛋白样品用 SDS-PAGE 分离胶 (p-NF- κB p65 和 NF- κB p65 蛋白用 8% 分离胶, 其余蛋白均用 10% 分离胶) 电泳, 20 V 半干转膜 30 min, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 一抗封闭 4°C 过夜, TBST 洗 4 次, 二抗封闭室温 1 h, TBST 洗 4 次, 加 ECL 显色液显色, 用 Quantity One 处理条带得到灰度值。

统计学方法 数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析法处理, 方差齐者采用 LSD 法检验, 方差不齐者采用 Tamhane's 法检验, $P<0.05$ 有统计学意义。

Table 2 Effect of minocycline on the release of inflammatory cytokines (NO, TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE₂) from LPS-stimulated BV-2 cells. $n=3$, $\bar{x}\pm s$. $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ vs control group; $**P<0.01$ vs model group. IL-6, Interleukin-6; IL-1 β , Interleukin-1 beta; NO, Nitric oxide; PGE₂, Prostaglandin E₂; TNF- α , Tumor necrosis factor alpha

Group	Concentration/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	NO/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	TNF- α / $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	IL-1 β / $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	IL-6/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	PGE ₂ / $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$
Control	-	2 ± 0	66 ± 1	20 ± 0	15 ± 1	175 ± 4
Model	-	$13\pm 0^{\Delta\Delta}$	$72\pm 2^{\Delta}$	$23\pm 1^{\Delta\Delta}$	$25\pm 1^{\Delta\Delta}$	$207\pm 2^{\Delta\Delta}$
MINO	0.1	$10\pm 1^{**}$	68 ± 1	22 ± 1	23 ± 2	$186\pm 6^{**}$
	1	$11\pm 1^{**}$	$64\pm 5^{**}$	23 ± 1	$10\pm 1^{**}$	$186\pm 3^{**}$
	10	$9\pm 1^{**}$	$59\pm 3^{**}$	23 ± 1	23 ± 4	$181\pm 6^{**}$

结果

1 米诺环素对 BV-2 小胶质细胞增殖作用的影响

米诺环素在 $0.001\sim 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内干预 BV-2 小胶质细胞 24 h 对 BV-2 小胶质细胞增殖无明显影响, 超过 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度时对 BV-2 小胶质细胞增殖有一定的抑制作用 ($P<0.01$)。结果见表 1。

Table 1 Effect on the survival rate of BV-2 cells by minocycline (MINO). $n=6$, $\bar{x}\pm s$. $\Delta\Delta P<0.01$ vs control group

Group	Concentration/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Survival rate/%
Control	-	100 ± 17
MINO	100	$13\pm 1^{\Delta\Delta}$
	10	108 ± 10
	1	92 ± 11
	0.1	98 ± 19
	0.01	104 ± 12
	0.001	96 ± 4

2 米诺环素对 BV-2 小胶质细胞活化后 M1 表型极化的影响

2.1 米诺环素对 LPS 致 BV-2 小胶质细胞活化释放 NO、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 PGE₂ 的影响 LPS 刺激后, BV-2 小胶质细胞异常活化, 产生大量炎症因子, 模型组 NO、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 PGE₂ 的含量均比正常组明显升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); 给予米诺环素干预后, 可显著降低炎症因子 NO、TNF- α 、IL-6 和 PGE₂ 的释放, 与模型组相比, 差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。结果见表 2。

2.2 米诺环素对 LPS 致 BV-2 小胶质细胞活化后膜蛋白 CD16/32 表达的影响 IL-4 ($10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和米诺环素 (0.1 、 1 和 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 均可下调 LPS 致 BV-2 小胶质细胞活化后膜蛋白 CD16/32 的表达, 差异有统计学意义 ($P<0.01$), 详见图 1 和表 3。

3 米诺环素对 BV-2 小胶质细胞活化后 M2 表型极化的影响

3.1 米诺环素对正常 BV-2 小胶质细胞释放 IL-10 和 TGF- β 的影响 IL-4 ($10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 可促进正常 BV-2

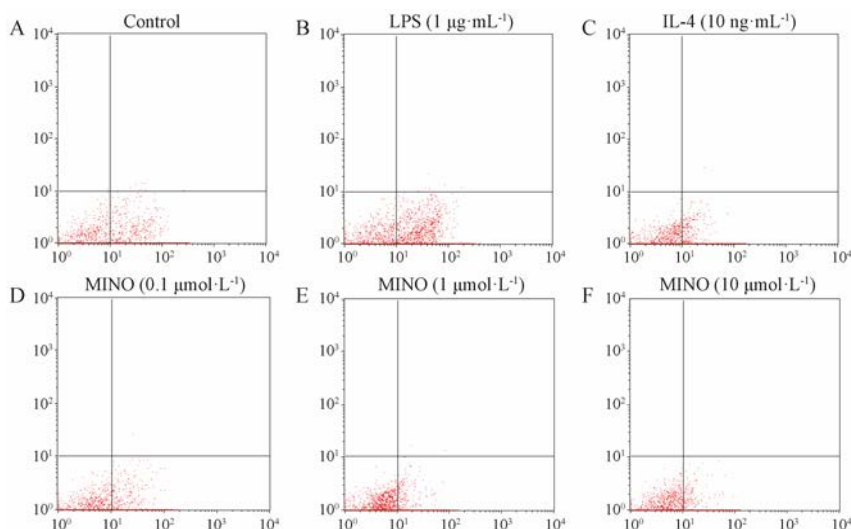


Figure 1 Effect of minocycline on protein expression of CD16/32 in LPS-stimulated BV-2 cells

小胶质细胞释放 TGF-β 和 IL-10, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 0.1、1 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 米诺环素均能促进正常 BV-2 小胶质细胞释放 IL-10, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 0.1 和 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 米诺环素均能促进正常 BV-2 小胶质细胞释放 TGF-β, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果见表 4。

3.2 米诺环素对 LPS 致 BV-2 小胶质细胞活化释放 IL-10 和 TGF-β 的影响 IL-4 (10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 可促进 LPS 致 BV-2 小胶质细胞活化后释放 TGF-β, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 米诺环素 (0.1、1 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对 LPS 致 BV-2 小胶质细胞活化释放 IL-10 和 TGF-β

的影响, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但有升高趋势。结果见表 5。

3.3 米诺环素对 LPS 致 BV-2 小胶质细胞活化膜蛋白 CD206 表达的影响 IL-4 (10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和米诺环素 (0.1、1 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 均可上调 LPS 致 BV-2 小胶质细胞活化后膜蛋白 CD206 的表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果详见表 6 和图 2。

4 米诺环素对 LPS 致 BV-2 小胶质细胞活化后 MyD88 蛋白表达的影响

LPS 刺激 24 h 后, MyD88 蛋白表达有升高趋势,

Table 3 Effect of minocycline on protein expression of CD16/32 in LPS-stimulated BV-2 cells. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs model group

Group	Concentration/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	CD16/32/%
Control	-	60 ± 1
Model	-	63 ± 2
IL-4	10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	46 ± 3**
MINO	0.1	41 ± 1**
	1	41 ± 3**
	10	51 ± 1**

Table 4 Effect of minocycline on the release of inflammatory cytokines (IL-10, TGF-β) from BV-2 cells. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs control group

Group	Concentration/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	TGF-β/ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$	IL-10/ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$
Control	-	36 ± 3	144 ± 2
IL-4	10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	50 ± 4 $\Delta\Delta$	165 ± 4 $\Delta\Delta$
MINO	0.1	42 ± 4 Δ	152 ± 0 $\Delta\Delta$
	1	43 ± 6 Δ	178 ± 3 $\Delta\Delta$
	10	40 ± 4	163 ± 3 $\Delta\Delta$

Table 5 Effect of minocycline on the release of inflammatory cytokines (IL-10, TGF-β) from LPS stimulated BV-2 cells. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs model group

Group	Concentration/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	TGF-β/ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$	IL-10/ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$
Control	-	69 ± 2	197 ± 26
Model	-	62 ± 5	191 ± 22
IL-4	10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	84 ± 2**	202 ± 20
MINO	0.1	76 ± 2	232 ± 22
	1	80 ± 13	204 ± 19
	10	70 ± 4	205 ± 25

Table 6 Effect of minocycline on protein expression of CD206 in LPS-stimulated BV-2 cells. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs model group

Group	Concentration/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	CD206/%
Control	-	8 ± 1
Model	-	10 ± 1
IL-4	10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	19 ± 1**
MINO	0.1	16 ± 1**
	1	26 ± 1**
	10	25 ± 1**

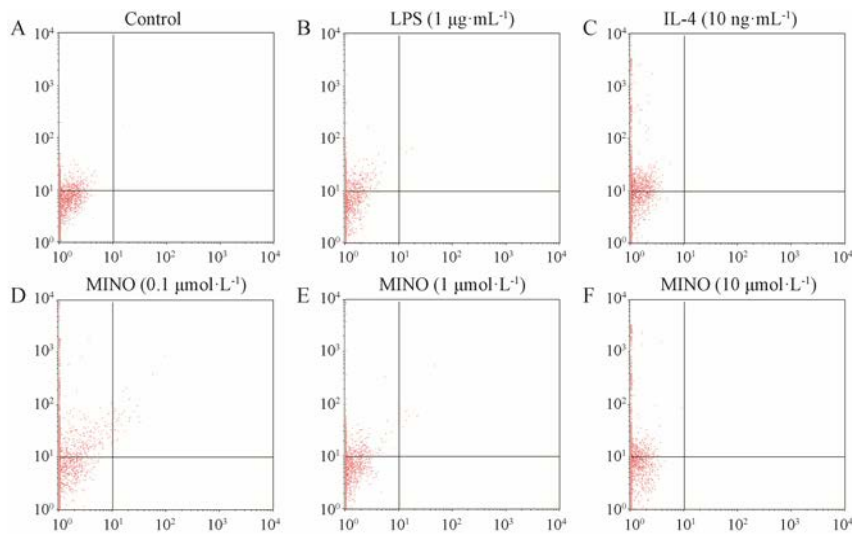


Figure 2 Effect of minocycline on protein expression of CD206 in LPS-stimulated BV-2 cells

但与正常组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); $0.01 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 米诺环素能对 LPS 致 BV-2 小胶质细胞活化后 MyD88 蛋白表达有下调趋势, 但与模型组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果见图 3。

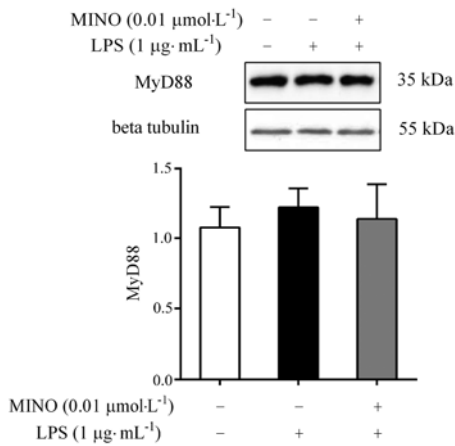


Figure 3 Effect of minocycline on protein expression of MyD88 in LPS-stimulated BV-2 cells. $n=6$, $\bar{x} \pm s$

5 米诺环素对 LPS 致 BV-2 小胶质细胞活化后 MAPK 信号通路和 NF- κ B 信号通路的影响

$0.01 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 米诺环素能下调 LPS 致 BV-2 小胶质细胞活化后蛋白 p-p38 MAPK 和 p-NF- κ B p65 的表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果见图 4。

讨论

近年来的研究表明, 炎症反应在 IS 的病理过程中显示了双刃剑的作用, 一方面, 持续的炎症反应增强了 IS 后神经元的继发性损伤; 另一方面, 其又在神

经修复中发挥了潜在的推动作用^[12]。因此, 调控 IS 后脑内的炎症反应被认为是该病治疗的有效策略之一^[13]。大量研究证实, 米诺环素具有显著的减轻脑缺血后脑内神经炎症作用, 其作用与抑制脑内小胶质细胞的异常活化有关^[10, 11]。本实验从活化小胶质细胞 M1/M2 极化的角度, 对米诺环素的作用进行了研究。采用 LPS 致 BV-2 小胶质细胞异常活化的神经炎症模型, 考察米诺环素的作用, 结果显示, 米诺环素可显著抑制 M1 型小胶质细胞释放炎症介质 NO、TNF- α 、IL-6 和 PGE₂, 而促进正常及活化的小胶质细胞释放 M2 型标志物 TGF- β 和 IL-10, 提示米诺环素可抑制小胶质细胞向 M1 型的极化, 而促进小胶质细胞向 M2 型的转化, 本实验设置的米诺环素浓度对部分小胶质细胞的细胞因子 (如 NO、IL-6 和 TGF- β) 的药效缺乏剂量依赖关系, 其原因可能是药物浓度设置比例不当, 或是米诺环素对这些细胞因子的释放有特殊的影响, 其更深入的作用机制有待进一步研究。流式细胞仪检测 M1 型小胶质细胞膜表面标志物 CD16/32 和 M2 型小胶质细胞膜表面标志物 CD206 的结果也证实, 米诺环素可下调异常活化的小胶质细胞膜蛋白 CD16/32 的表达和上调异常活化的小胶质细胞膜蛋白 CD206 的表达, 提示其可抑制小胶质细胞向促炎型 M1 型的转化而促进其向抗炎型 M2 型的转化。

本研究结果与 Kobayashi 等^[14]采用米诺环素干预小鼠原代小胶质细胞的研究结果相吻合。在本实验中, 增加了反映 M1 型的炎症因子 IL-6、PGE₂、膜蛋白 CD16/32 以及反映 M2 型的细胞因子 TGF- β 的考察, 进一步证实了米诺环素调节小胶质细胞 M1/M2

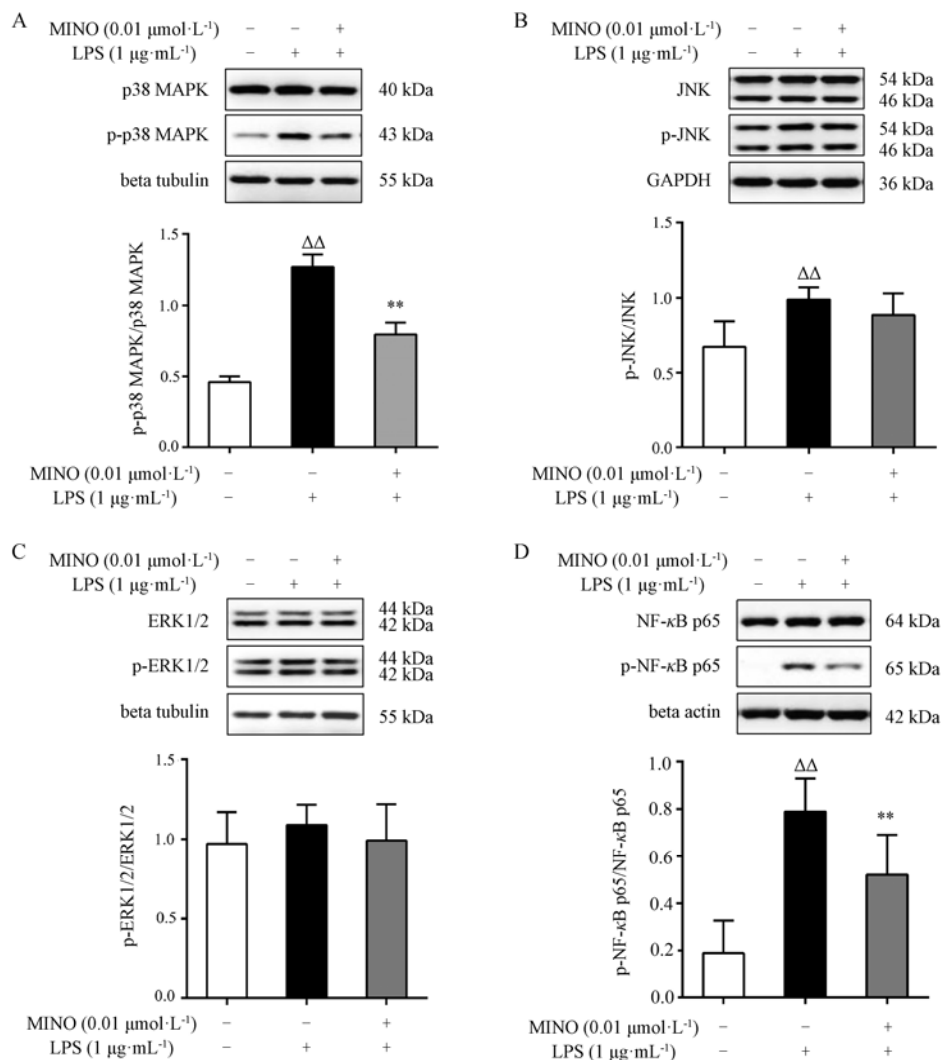


Figure 4 Effect of minocycline on protein expression of p-p38 MAPK, p38 MAPK (A), p-JNK, JNK (B), p-ERK1/2, ERK1/2 (C), p-NF-κB p65 and NF-κB p65 (D) in LPS-stimulated BV-2 cells. $n=6$, $\bar{x} \pm s$. $\Delta\Delta P < 0.01$ vs control group; $**P < 0.01$ vs model group

型表型变化的作用，同时再一次证明 BV-2 细胞对药物的反应与原代小胶质细胞具有较高的一致性，另外，本研究为考察米诺环素减轻神经炎症的作用环节，重点对 LPS 刺激小胶质细胞异常活化后，米诺环素对 toll 样受体 4 介导的依赖 MyD88 信号转导通路的影响进行了研究。

小胶质细胞在 LPS 刺激时发生异常活化，多条信号通路参与其过程，在 toll 样受体 4 介导的依赖 MyD88 信号转导途径下游，MAPK 信号通路和 NF-κB 信号通路被激活，参与炎症因子的表达^[15-18]。本研究对 MAPK 信号通路和 NF-κB 信号通路进行了研究，结果显示，米诺环素在设置浓度下对异常活化的小胶质细胞蛋白 MyD88 的表达无明显影响，仅有下降趋势；但米诺环素能下调异常活化的小胶质细胞蛋白 p-p38 MAPK 和 p-NF-κB p65 的表达，提示 p38

MAPK 和 NF-κB p65 信号通路可能是米诺环素发挥减轻神经炎症作用的主要途径，其更深入的机制有待进一步研究。

References

- [1] Macrez R, Ali C, Toutirais O, et al. Stroke and the immune system: from pathophysiology to new therapeutic strategies [J]. *Lancet Neurol*, 2011, 10: 471–480.
- [2] Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2014, 129: 399–410.
- [3] Lakhani SE, Kirchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches [J]. *J Transl Med*, 2009, 7: 97.
- [4] Kitamura Y, Yanagisawa D, Inden M, et al. Recovery of focal

- brain ischemia-induced behavioral dysfunction by intracerebroventricular injection of microglia [J]. *J Pharmacol Sci*, 2005, 97: 289–293.
- [5] Imai F, Suzuki H, Oda J, et al. Neuroprotective effect of exogenous microglia in global brain ischemia [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27: 488–500.
- [6] Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11: 723–737.
- [7] Pan J, Jin JL, Ge HM, et al. Malibatol A regulates microglia M1/M2 polarization in experimental stroke in a PPAR γ -dependent manner [J]. *J Neuroinflammation*, 2015, 12: 51.
- [8] Hu X, Li P, Guo Y, et al. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2012, 43: 3063–3070.
- [9] Garrido-Mesa N, Zarzuelo A, Galvez J. Minocycline: far beyond an antibiotic [J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 169: 337–352.
- [10] Yrjänheikki J, Keinänen R, Pellikka M, et al. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: 15769–15774.
- [11] Wang N, Mi X, Gao B, et al. Minocycline inhibits brain inflammation and attenuates spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus [J]. *Neuroscience*, 2015, 287: 144–156.
- [12] Lee Y, Lee SR, Choi SS, et al. Therapeutically targeting neuroinflammation and microglia after acute ischemic stroke [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 297241.
- [13] Grønberg NV, Johansen FF, Kristiansen U, et al. Leukocyte infiltration in experimental stroke [J]. *J Neuroinflammation*, 2013, 10: 115.
- [14] Kobayashi K, Imagama S, Ohgomori T, et al. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e525.
- [15] Okun E, Griffioen KJ, Lathia JD, et al. Toll-like receptors in neurodegeneration [J]. *Brain Res Rev*, 2009, 59: 278–292.
- [16] Suzuki N, Suzuki S, Duncan GS, et al. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4 [J]. *Nature*, 2002, 416: 750–756.
- [17] Sun P, Zhang Q, Han J, et al. TLR4 signaling induced TLR2 expression in the process of mimic cerebral ischemia/reperfusion *in vitro* [J]. *Sci China Life Sci*, 2010, 53: 223–228.
- [18] Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signaling cascades [J]. *Nature*, 2001, 410: 37–40.