

## 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

杨云方, 张悦, 彭景, 吴博, 贾英, 颜廷旭\*

(沈阳药科大学功能食品与葡萄酒学院, 辽宁 沈阳 110016)

**摘要:** 探讨五味子基于 microRNA-124 (miR-124) 调控 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 通路介导小胶质细胞表型转化的作用机制。利用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激 BV2 细胞建立模型, 不同剂量五味子提取物 (*Schisandra Chinensis* extract, SCE) 处理细胞; miR-124 抑制剂 (miR-124 inhibitor) 和阴性对照序列 (NC inhibitor) 转染至 BV2 细胞后用 SCE 处理细胞。MTT 法检测细胞活性; NO 试剂盒检测 NO 释放量; ELISA 检测白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 含量; 免疫荧光染色法检测小胶质细胞标志物离子钙结合接头分子-1 (ionized calcium binding adapter molecule-1, IBA-1)、精氨酸酶-1 (arginase-1, Arg-1) 及下游核转录因子  $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B) 核移位的影响; Western blot 检测 NF- $\kappa$ B p65、IBA-1、Arg-1、TLR4、骨髓分化蛋白 88 (myeloid differentiation primary factor 88, MyD88)、核因子抑制蛋白- $\alpha$  (nuclear factor inhibitor protein- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\alpha$ )、I $\kappa$ B 激酶- $\alpha$  (inhibitor of nuclear factor-kappa B kinases- $\alpha$ , IKK- $\alpha$ )、IL-10、TNF- $\alpha$  等蛋白的表达。质量浓度为 31.25~250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 SCE 对于细胞活性无明显影响; SCE 作用后, NO 释放受到抑制 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ), IL-10 释放水平升高 ( $P < 0.05$ ), 而 TNF- $\alpha$  释放水平降低 ( $P < 0.001$ ), 同时抑制 TNF- $\alpha$ 、IBA-1、TLR4、MyD88 蛋白的表达 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), 升高 IL-10、Arg-1、NF- $\kappa$ B p65、IKK- $\alpha$  蛋白表达 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), SCE 还能够促进 miR-124 的表达 ( $P < 0.01$ ); 转染 miR-124 inhibitor 后, TNF- $\alpha$  释放量升高 ( $P < 0.001$ ), IL-10 释放量减少 ( $P < 0.05$ ), TNF- $\alpha$ 、IBA-1 的 mRNA 和蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), IL-10、Arg-1 mRNA 和蛋白表达降低 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ), 同时抑制 TLR4、MyD88 的激活作用减弱。SCE 可能通过上调 miR-124 抑制 TLR4 信号通路的激活从而抑制小胶质细胞 M1 极化, 促进小胶质细胞 M2 极化。

**关键词:** 五味子提取物; miR-124; 脂多糖; BV2 细胞; TLR4 通路; 小胶质细胞表型转化

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)02-0377-09

## Mechanism of *Schisandra Chinensis*-mediated microglia phenotypic transformation by regulation of the TLR4 pathway based on miR-124

YANG Yun-fang, ZHANG Yue, PENG Jing, WU Bo, JIA Ying, YAN Ting-xu\*

(College of Functional Food and Wine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**Abstract:** To investigate the mechanism by which *Schisandra Chinensis* mediates the phenotypic transformation of microglia via microRNA-124 (miR-124)-based regulation of the Toll-like receptor 4 (TLR4) pathway, a model was established using lipopolysaccharide (LPS) stimulation of BV2 cells. Cells were treated with different doses of *Schisandra Chinensis* extract (SCE). MiR-124 inhibitors and negative control sequences (NC inhibitor) were transfected into LPS-induced BV2 cells and treated with SCE. The MTT assay was used for cell activity detection; an NO kit was used to measure NO release; ELISA kits were used to measure the levels of interleukin-10

收稿日期: 2022-04-04; 修回日期: 2022-05-07.

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (82173961).

\*通讯作者 Tel: 18842411904, E-mail: ytksyphu@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0392

(IL-10) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Microglia markers, including ionized calcium binding adapter molecule-1 (IBA-1) and arginase-1 (Arg-1), and the nuclear translocation of nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) were evaluated by immunofluorescent staining. NF- $\kappa$ B p65, IBA-1, Arg-1, TLR4, myeloid differentiation primary factor 88 (MyD88), inhibitor of nuclear factor-kappa B kinases- $\alpha$  (IKK- $\alpha$ ), IL-10, TNF- $\alpha$  were detected by immunoblot. SCE at concentrations ranging from 31.25 to 250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  had no significant effect on cell activity. SCE treatment significantly inhibited NO release induced by LPS ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ), increased the level of IL-10 ( $P < 0.05$ ), and decreased the level of TNF- $\alpha$  ( $P < 0.001$ ). In addition, SCE significantly reduced the expression of TNF- $\alpha$ , IBA-1, TLR4, and MyD88 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ) and elevated the expression of IL-10, Arg-1, NF- $\kappa$ B P65 and IKK- $\alpha$  ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ). SCE treatment could also promote the expression of miR-124 ( $P < 0.01$ ). However, transfection with the miR-124 inhibitor increased TNF- $\alpha$  ( $P < 0.001$ ), decreased the level of IL-10 ( $P < 0.05$ ), increased the mRNA level and the protein expression of TNF- $\alpha$  and IBA-1 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), and decreased the mRNA level and protein expression of IL-10 and Arg-1 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ). In addition, the inhibition of TLR4 and MyD88 was attenuated. In conclusion, SCE appears to inhibit the activation of TLR4 signaling pathway by upregulating miR-124 so as to inhibit microglia M1 polarization and promote microglia M2 polarization.

**Key words:** *Schisandra Chinensis* extract; miR-124; lipopolysaccharide; BV2 cell; Toll-like receptor 4 pathway; microglia phenotype conversion

小胶质细胞是神经系统的重要组成部分,是参与神经系统炎症反应的主要细胞。小胶质细胞存在两种功能不同的激活状态, M1 促炎型和 M2 抗炎型<sup>[1]</sup>。M1 型小胶质细胞具有较强的吞噬能力,能产生多种促炎因子,包括白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )<sup>[2]</sup>。M2 型小胶质细胞具有神经保护作用,通过促进抗炎因子的释放而产生抗炎作用<sup>[3]</sup>。根据研究,神经炎症中的小胶质细胞激活状态可能需要通过同时降低 M1 表型和促进 M2 表型反应来进行特异性治疗<sup>[4]</sup>。所以,抑制小胶质细胞 M1 表型极化,促进小胶质细胞向 M2 表型的极化对于抑制神经炎症有着重要的意义。

MicroRNA-124 (miR-124) 是一种在小胶质细胞中高度表达的脑特异性 miRNA,在神经退行性病变过程中具有公认的功能。已证明 miR-124 的下调使小胶质细胞极化向 M1 表型进行<sup>[5]</sup>,而 miR-124 的上调使小胶质细胞极化为 M2 表型进行<sup>[6,7]</sup>。Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 在小胶质细胞上表达,并介导神经炎症疾病,骨髓分化蛋白 88 (myeloid differentiation primary factor 88, MyD88) 是一种 TLR4 的关键衔接蛋白,导致下游核转录因子  $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B) 的激活,并随后产生与神经毒性相关的促炎细胞因子<sup>[8]</sup>。反过来,升高的 miR-124 通过直接靶向 Toll 样受体信号级联的多种成分<sup>[9]</sup>。因此 miR-124 与 TLR4 信号的关系在小胶质细胞表型极化中有重要的作用。

五味子为木兰科植物 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实,味酸、甘,性温,具有收敛固涩、

益气生津、补肾宁心的功效<sup>[10]</sup>。现代药理研究表明,其具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎等作用<sup>[11]</sup>。五味子抑制神经炎症的作用成为了近几年的研究热点并被广泛研究。

## 材料与方 法

**药材与试剂** 五味子购于辽宁省本溪五味子药材基地,经沈阳药科大学功能食品与葡萄酒学院贾英教授鉴定为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实;脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、DMEM 培养基 (含双抗)、trypsin-EDTA、0.25% 超敏 ECL 发光剂、DAPI 抗荧光衰减剂、PMSF、蛋白定量 (BCA) 试剂盒、SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒 (大连美仑生物技术有限公司); TNF- $\alpha$  抗体、白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10) 抗体、NF- $\kappa$ B 抗体、I $\kappa$ B 激酶- $\alpha$  (inhibitor of nuclear factor-kappa B kinases- $\alpha$ , IKK- $\alpha$ ) 抗体、核因子抑制蛋白- $\alpha$  (nuclear factor inhibitor protein- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\alpha$ ) 抗体、TLR4 抗体、MyD88 抗体、FITC 标记山羊抗兔二抗、标志物离子钙结合接头分子-1 (ionized calcium binding adapter molecule-1, IBA-1) 抗体、精氨酸酶-1 (arginase-1, Arg-1) 抗体、 $\beta$ -actin 抗体 (Cell Signaling Technology 公司); ELISA (IL-10) 试剂盒、ELISA (TNF- $\alpha$ ) 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司); NO 检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); Ribonuclease inhibitor、dNTP、Taq Plus DNA polymerase、DL2000 DNA marker、random primer (N6) (天根生化科技有限公司); HiScript reverse transcriptase (RNase H)、5 $\times$ HiScript buffer、SYBR Green Master Mix (VAZYME 公司); 引物合成 (北京擎科生物科技有限公司)。

**五味子提取物 (Schisandra Chinensis extract, SCE)**  
**样品制备** 取五味子粗粉加入 75% 乙醇加热回流 3 次, 每次 2 h, 料液比 1:10, 8 层纱布过滤, 合并滤液, 减压回收至干燥, 得 SCE 干燥浸膏。配制成  $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的储备液存于  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  供实验使用。

**BV2 细胞培养** 以高糖 DMEM 为基础培养基中加入 1% 青霉素和链霉素, 10% 的胎牛血清配制成完全培养基, 于  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中进行细胞培养, 待小胶质细胞贴壁生长至 90%, 传至第 3 代进行后续实验。

**MTT 活力测定** 将对数生长期的 BV2 细胞按照每孔  $1 \times 10^4$  个接种于 96 孔板内, 于  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h 后取出弃去培养基, 加入含有不同药物浓度的新鲜培养基作用 3 h 后, 除空白孔外, 每孔加入  $1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  LPS 作用 24 h, 每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTT 溶液, 3 h 后加入 100  $\mu\text{L}$  三联液, 放入  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育过夜, 于波长 570 nm 下测定每孔的吸光度 (A) 值。每组设置 3 个复孔。

**NO 含量测定** 将对数生长期的 BV2 细胞每孔  $2 \times 10^4$  个接种于 96 孔板内, 于  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h 后弃去培养基, 加入含有不同药物浓度的新鲜培养基, 药物作用 3 h 后, 除 3 个空白孔外, 每孔加入  $1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  LPS, 作用 24 h 后收集上清液。具体操作见试剂盒说明书, 根据标准曲线计算出各个组 NO 释放的含量。

**转染** 100  $\mu\text{L}$  无血清 opti-MEM 稀释 10  $\mu\text{L}$  NC inhibitor ( $20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和 miR-124 inhibitor ( $20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 室温静置 5 min, 再用无血清 opti-MEM 稀释 5  $\mu\text{L}$  Lipo, 室温静置 5 min, 将含有 Lipo 和 NC inhibitor 和 miR-124 inhibitor 的稀释液混匀室温静置 20 min, 在 6 孔板每孔加入 200  $\mu\text{L}$  的混合液, 放入培养箱内培养 6 h 后更换正常培养基培养 24 h。

**ELISA 检测** 采用 ELISA 测定 SCE 作用后和下调 miR-124 后 BV2 小胶质细胞释放的 IL-10、TNF- $\alpha$  两种炎症因子的含量。将对数生长期的 BV2 细胞每孔  $5 \times 10^5$  个接种于 6 孔板内, 于  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h 后弃去培养基, 加入含有不同药物浓度的新鲜培养基, 药物作用 3 h 后, 除空白孔外, 每孔加入  $1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  LPS, 作用 24 h 后收集上清液。具体操作见试剂盒说明书, 根据标准曲线计算出各个组 TNF- $\alpha$ 、IL-10 释放的含量。

**免疫荧光法** 采用免疫荧光染色的方法考察 SCE 作用以及 miR-124 下调后对 BV2 小胶质细胞 IBA-1、Arg-1 及 NF- $\kappa\text{B}$  p65 核移位的影响。将对数生长期的 BV2 细胞接种于 6 孔板内, 加入细胞爬片, 于  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h 后取出弃去培养基, 加入含

有不同药物浓度的新鲜培养基, 药物作用 3 h, 待药物作用结束后, 除空白孔外, 每孔加入 LPS 使其质量浓度为  $1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 作用 24 h 后从培养箱中取出 6 孔板。抗体稀释比例: IBA-1 (1:300)、Arg-1 (1:400)、NF- $\kappa\text{B}$  p65 (1:400)。

**免疫印迹法** 采用免疫印迹的方法考察 BV2 小胶质细胞中及 miR-124 下调后的 NF- $\kappa\text{B}$  p65 (1:1 000)、IBA-1 (1:750)、Arg-1 (1:1 000)、TLR4 (1:1 000)、MyD88 (1:1 000)、I $\kappa\text{B}$ - $\alpha$  (1:1 000)、IKK- $\alpha$  (1:1 000)、IL-10 (1:750)、TNF- $\alpha$  (1:1 000) 等蛋白的表达,  $\beta$ -actin 为参比蛋白。

**qRT-PCR 检测 miR-124 表达水平** 利用 Trizol 法提取 RNA, 按照试剂盒操作, 进行 qRT-PCR 分析。逆转录反应体系: RNA 3.56  $\mu\text{g}$ , Oligo(dT)18/miRNA loop (10  $\mu\text{mol}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , dNTP (2.5 mmol) 4  $\mu\text{L}$ , 5 $\times$ Hiscrypt buffer 4  $\mu\text{L}$ , Hiscrypt reverse transcriptase 1  $\mu\text{L}$ , ribonuclease inhibitor 0.5  $\mu\text{L}$ , RNase-free ddH<sub>2</sub>O 补充至 20  $\mu\text{L}$ 。反应条件  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5 min,  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、15 min,  $85 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5 min,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、10 min。RT 逆转录成 cDNA, cDNA 4  $\mu\text{L}$  进行 qRT-PCR 实验, 配制反应体系: forward primer (10  $\mu\text{mol}$ ) 0.4  $\mu\text{L}$ , reverse primer (10  $\mu\text{mol}$ ) 0.4  $\mu\text{L}$ , SYBR Green Master Mix 10  $\mu\text{L}$ , 50 $\times$  ROX reference dye 0.4  $\mu\text{L}$ , H<sub>2</sub>O 4.8  $\mu\text{L}$ 。反应条件: ①  $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min; ②  $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 15 s; ③  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  退火延伸 60 s,  $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$  退火延伸 15 s, ②~③共 40 个循环; ④ 溶解曲线采集  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  60 s,  $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$  15 s。以 GAPDH 和 U6 为内参基因, 进行实时荧光 PCR 检测。基因检测引物序列见表 1、2。

**Table 1** Gene detection use primer sequence

Gene	Primer	Sequence (5'-3')
U6	Forward	CGCTTCGGCAGCACATATAC
	Reverse	AAATATGGAACGCTTCACGA
miR-124	Forward	GCGCTAAGGCACGCGGTGA
	Reverse	ATTCGCACTGGATACGACGGCATTCA

**统计学分析** 用 GraphPad Prism 8.3.0 软件分析, 结果用平均值 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间均数用 one-way ANOVA 方法进行方差齐性分析。  $P < 0.05$  表示具有显著性差异。

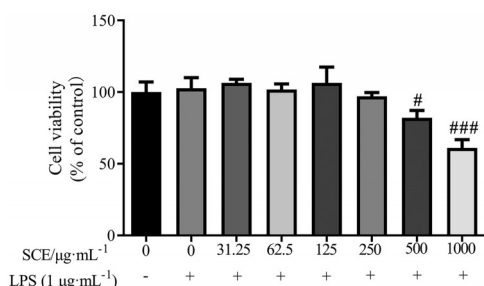
## 结果

### 1 SCE 对 LPS 激活的 BV2 细胞存活率的影响

结果如图 1 所示, 与空白组细胞活力相比, 500、1 000  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  SCE 与 LPS 共同作用后 BV2 细胞活力显著下降 ( $P < 0.05$ 、 $P < 0.001$ ), 因此选择 31.25~250  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 SCE 进行后续研究。

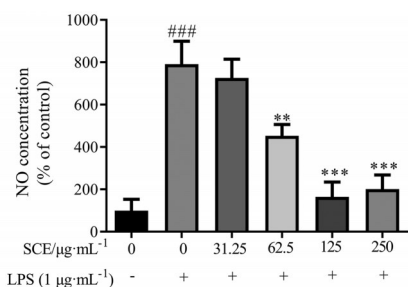
**Table 2** Primer sequences for qRT-PCR. TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; IL-10: Interleukin-10; IBA-1: Ionized calcium binding adapter molecule-1; Arg-1: Arginase-1

Gene	Primer sequence	Primer length/bp	T <sub>m</sub> /°C	Location
TNF- $\alpha$ F	CAGGCGGTGCCTATGTCTC	19	62.2	81-99
TNF- $\alpha$ R	CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG	22	62.1	169-148
IL-10 F	CTTACTGACTGGCATGAGGATCA	23	61.4	33-55
IL-10 R	GCAGCTCTAGGAGCATGTGG	20	62.4	133-114
IBA-1 F	CTTGAAGCGAATGCTGGAGAA	21	60.6	207-227
IBA-1 R	GGCAGCTCGGAGATAGCTTT	20	61.7	440-421
Arg-1 F	CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG	22	60.0	6-27
Arg-1 R	GGAGCTGTCATTAGGGACATCA	22	61.2	189-168
GAPDH F	AGGTCGGTGTGAACGGATTG	21	62.6	8-18
GAPDH R	GGGGTCGTTGATGGCAACA	19	62.6	102-84

**Figure 1** Effects of *Schisandra Chinensis* extract (SCE) on the survival of BV2 microglial cells.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ .  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{###}P < 0.001$ , vs control group. LPS: Lipopolysaccharide

## 2 SCE对NO释放的影响

与空白组相比,模型组NO含量明显升高 ( $P < 0.001$ ),SCE作用后,NO释放水平得到明显抑制 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ),结果见图2。

**Figure 2** Effects of SCE on the production of NO induced by LPS in BV2 microglial cells.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ .  $^{###}P < 0.001$  vs control group;  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$  vs model group (LPS group)

## 3 SCE对BV2细胞TNF- $\alpha$ 、IL-10、IBA-1、Arg-1的释放及蛋白表达的影响

结果如图3所示,模型组较空白组TNF- $\alpha$ 释放显著增多 ( $P < 0.001$ ),IL-10释放显著降低 ( $P < 0.001$ ),TNF- $\alpha$ 、IBA-1表达水平显著升高 ( $P < 0.001$ ),而IL-10、Arg-1表达显著降低 ( $P < 0.001$ )。SCE作用后,TNF- $\alpha$ 的释放受到抑制 ( $P < 0.001$ ),而IL-10释放增多 ( $P < 0.05$ ),相应的TNF- $\alpha$ 、IBA-1表达显著降低 ( $P < 0.001$ ,

$P < 0.01$ ),IL-10、Arg-1表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ )。

## 4 SCE对BV2细胞TLR4-MyD88通路及相关蛋白表达的影响

结果如图4所示,模型组较空白组TLR4和MyD88的蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.001$ ),SCE能显著抑制TLR4和MyD88蛋白的表达 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ )。

## 5 SCE对BV2细胞NF- $\kappa$ B核移位及信号通路的调节作用

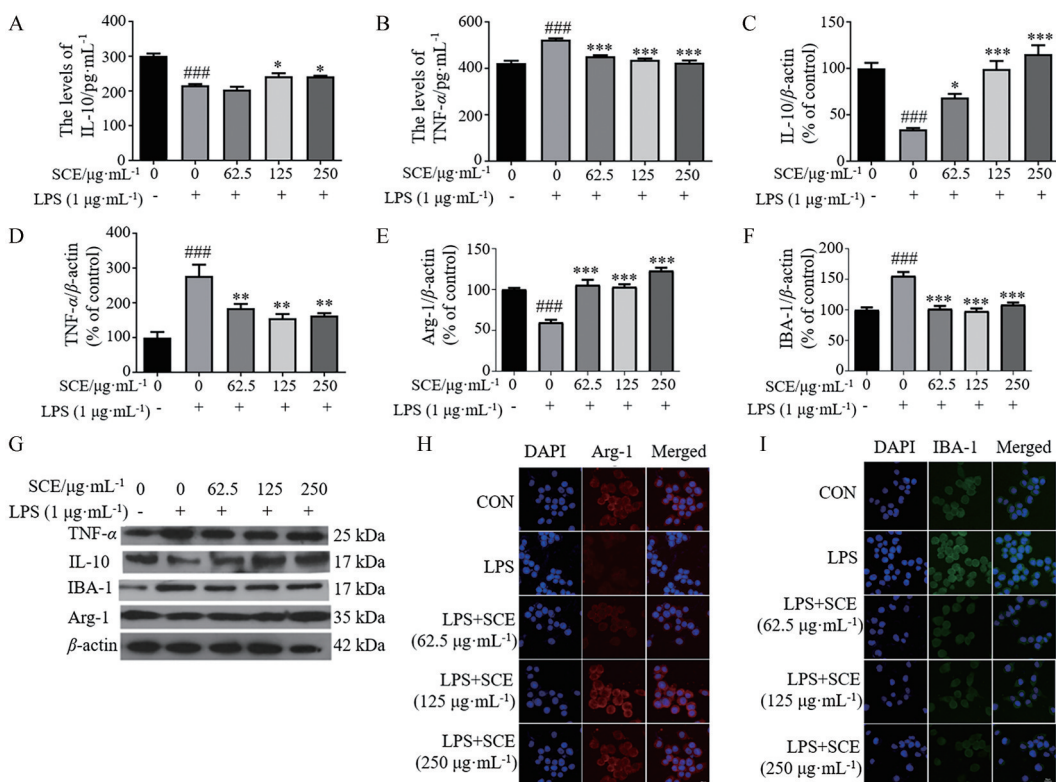
结果如图5所示,未经LPS激活的小胶质细胞中NF- $\kappa$ B p65主要位于胞浆内,核内绿色荧光较弱。BV2细胞经LPS激活后,NF- $\kappa$ B p65会进入到细胞核内,核内会呈现较强的绿色荧光。免疫荧光结果显示,空白组中胞浆内绿色荧光强,核内荧光弱,模型组核内呈现强大的绿色荧光,SCE作用后,核内绿色荧光逐渐减弱。经过Western blot考察,模型组中NF- $\kappa$ B p65、IKK- $\alpha$ 蛋白表达水平均升高 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ),I $\kappa$ B- $\alpha$ 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$ ),而SCE作用后,可以阻止I $\kappa$ B- $\alpha$ 的降解和NF- $\kappa$ B p65蛋白表达的升高 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),IKK- $\alpha$ 的蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ )。这些结果表明,SCE可以通过抑制TLR4进一步抑制NF- $\kappa$ B信号通路的激活。

## 6 SCE提高miR-124的表达

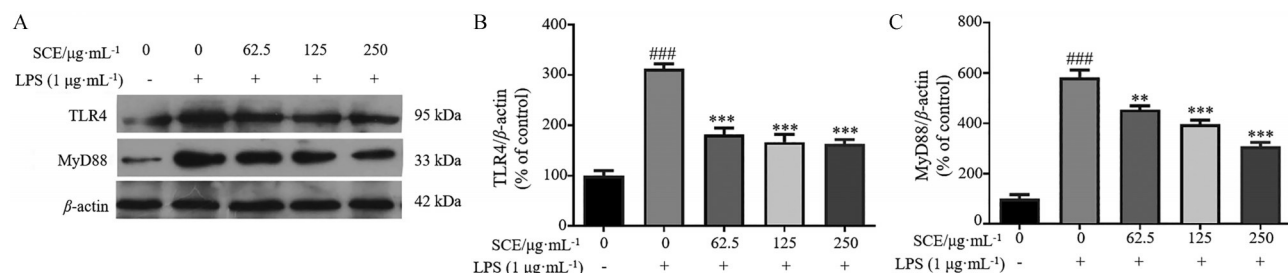
结果如图6A所示,模型组较空白组miR-124表达显著降低 ( $P < 0.01$ ),而SCE促进了miR-124的表达 ( $P < 0.05$ )。转染miR-124 inhibitor下调了miR-124的表达,结果如图6B所示,NC inhibitor与空白组相比,miR-124的表达无显著性差异。而miR-124 inhibitor组与NC inhibitor组相比,则显著下调miR-124的表达 ( $P < 0.01$ )。结果表明,miR-124 inhibitor在BV2小胶质细胞中表达,并可以显著下调miR-124的表达。

## 7 下调miR-124对TNF- $\alpha$ 、IL-10、IBA-1、Arg-1的影响

结果如图7A,空白组与模型组结果与前面一致,



**Figure 3** Effects of SCE on the release and protein expression of TNF- $\alpha$ , IL-10, IBA-1 and Arg-1 in BV2 cells. A, B: The production of IL-10 and TNF- $\alpha$  were examined by ELISA; C-G: The expression of IL-10, TNF- $\alpha$ , Arg-1 and IBA-1 were examined by Western blot; H, I: The fluorescence intensity of Arg-1 and IBA-1 were detected by immunofluorescence (200 $\times$ ).  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . ### $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs model group



**Figure 4** Effects of SCE on the expression of TLR4-MyD88 pathway and related proteins in BV2 cells. A-C: The expression of TLR4 and MyD88 were detected by Western blot.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . ### $P < 0.001$  vs control group; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs model group. TLR4: Toll-like receptor 4; MyD88: Myeloid differentiation primary factor 88

miR-124 inhibitor 组与 NC inhibitor 组相比, TNF- $\alpha$  释放量显著升高 ( $P < 0.001$ ), IL-10 释放量显著降低 ( $P < 0.05$ )。

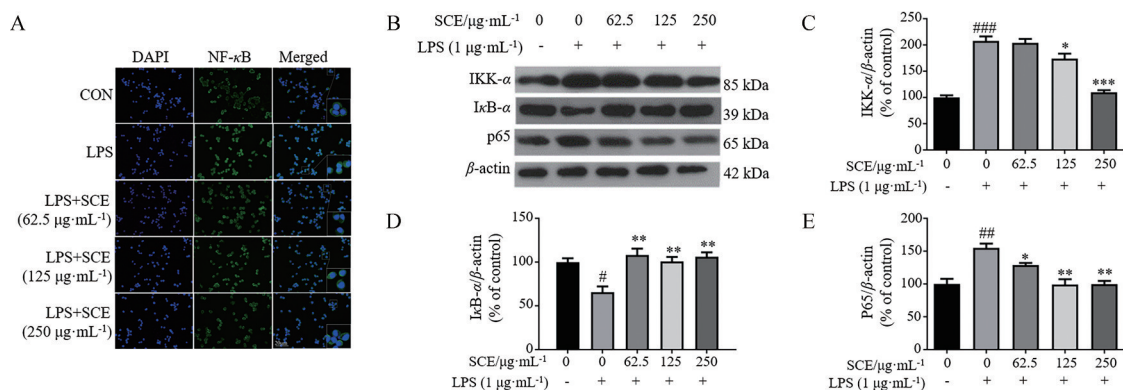
结果如图 7B~D, 空白组与模型组结果与前面一致, miR-124 inhibitor 组与 NC inhibitor 组相比, TNF- $\alpha$ 、IBA-1 蛋白表达水平升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), IL-10、Arg-1 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.01, P < 0.001$ )。

结果如图 7E、F, 模型组较空白组 TNF- $\alpha$ 、IBA-1 的 mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.001$ ), IL-10、Arg-1 的 mRNA 表达水平显著降低 ( $P < 0.001$ )。SCE 作用后则逆

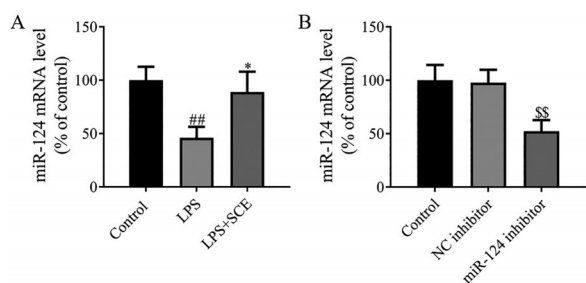
转了这种趋势。miR-124 inhibitor 组与 NC inhibitor 组相比, TNF- $\alpha$ 、IBA-1 mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.001$ ), IL-10、Arg-1 mRNA 表达水平显著降低 ( $P < 0.01, P < 0.001$ )。

### 8 下调 miR-124 对 BV2 细胞 TLR4、MyD88 与 NF- $\kappa$ B 信号通路蛋白的影响

Western blot 结果如图 8 所示, 模型组与空白组的结果与前面一致。miR-124 inhibitor 组与 NC inhibitor 组相比, SCE 抑制 TLR4、MyD88 的激活作用减弱 ( $P < 0.01, P < 0.001$ )。以上结果说明, SCE 通过上调 miR-



**Figure 5** Regulation of nuclear translocation and signaling pathway of NF-κB in BV2 cells by SCE. A: The fluorescence intensity of NF-κB nuclear was detected by immunofluorescence (200×); B-E: The expression of IKK-α, IκB-α and NF-κB p65 were detected by Western blot.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs model group. NF-κB: Nuclear factor-kappa B; IκB-α: Nuclear factor inhibitor protein-α; IKK-α: Inhibitor of nuclear factor-kappa B kinases-α



**Figure 6** Effect of SCE on miR-124 expression after transfection. A: The expression of miR-124 was determined by qRT-PCR; B: The level of miR-124 was determined by qRT-PCR after the transfection of miR-124 inhibitor and NC inhibitor.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . ### $P < 0.01$  vs control group; \* $P < 0.01$  vs model group; \*\* $P < 0.01$  vs NC inhibitor

124抑制TLR4、MyD88, 进一步阻止NF-κB信号通路的激活。

### 讨论

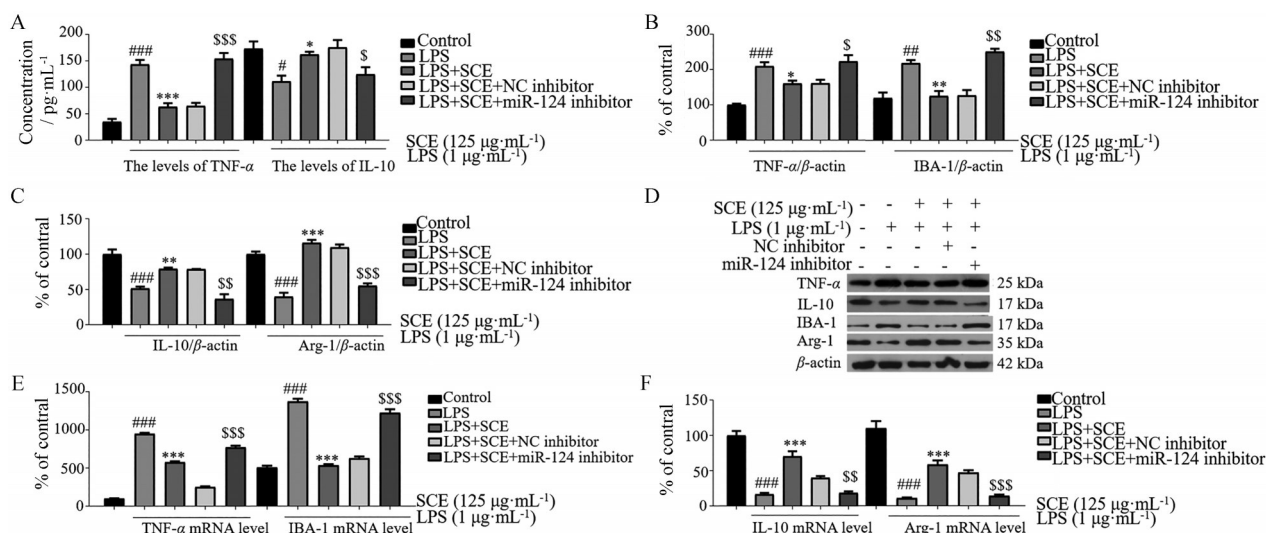
LPS不仅使小胶质细胞极化为M1促炎表型, 而且还诱导炎症反应并降低了M2抗炎标志物的表达<sup>[12]</sup>。因此, 本研究利用LPS刺激的BV2小胶质细胞, 通过探讨SCE对BV2小胶质细胞极化的调控作用, 深入研究SCE发挥抗炎作用的机制。

研究表明, 过量的NO会导致神经元损伤, 降低NO水平可以控制神经系统疾病<sup>[13]</sup>。且M1型小胶质细胞可能会产生细胞毒性因子NO, 因此, 本研究检测了存在LPS的情况下BV2小胶质细胞中NO的释放, IBA-1是小胶质细胞激活的M1标志物, 结果显示SCE可以抑制IBA-1的表达, 综上, SCE可以减少LPS刺激的小胶质细胞产生NO, 从而抑制M1型表型。同时, 结果显示给予SCE治疗后M2标志物Arg-1的表达增

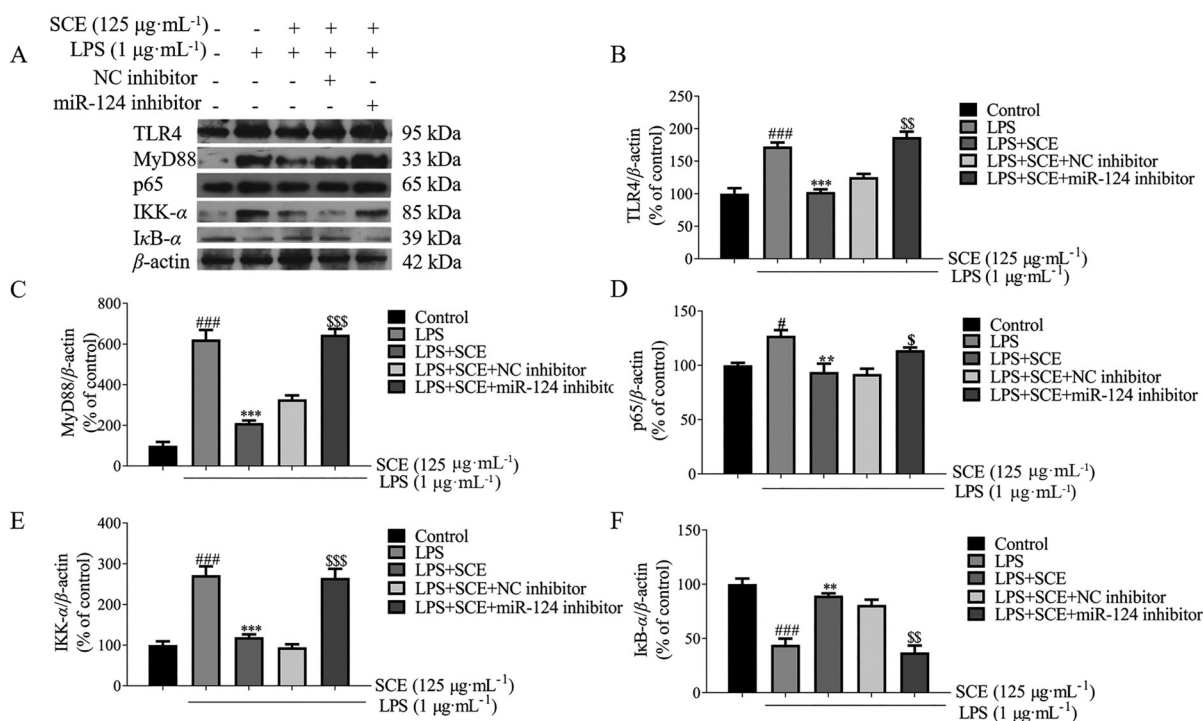
加, 表明SCE可以促进小胶质细胞向M2表型转化。

LPS可以激活TLR4, TLR4与细胞表面的骨髓分化因子2 (MD2) 形成TLR4/MD2复合物, 当LPS激活TLR4后, LPS促进TLR4/MD-2复合物的“M”形二聚体的形成<sup>[14-17]</sup>。受体复合物的二聚化诱导TLR4的TIR结构域通过特异的接头蛋白MAL与MyD88桥接, 这样TLR4就招募到更多的MyD88蛋白。一方面, TLR4和MyD88信号转导通路可激活下游IKK复合物, 并激活NF-κB通路, 从而表达多种天然免疫和炎症因子, 而NF-κB几乎在所有细胞中都有表达, 并在M1小胶质细胞表型的激活中发挥重要作用<sup>[18]</sup>; 另一方面, TLR4在小胶质细胞中表达, 与小胶质细胞活动密切相关, TLR4过度表达会增加TNF-α等促炎因子的生成。使用特异性抑制剂处理TLR4后发现M2标志蛋白有所增加, 这可能与MyD88/NF-κB信号通路相关<sup>[19,20]</sup>。静止时, IκB-α与NF-κB的p50和p65亚单位结合。一旦小胶质细胞被激活, IκB-α被降解, NF-κB的p50和p65异二聚体从细胞质转移到细胞核内, 导致炎症因子的转录和表达<sup>[21,22]</sup>。在本研究结果中给予SCE后M1标志物TNF-α、IBA-1的表达降低, M2标志物IL-10、Arg-1表达增加, TLR4及下游NF-κB等蛋白表达量也降低, 所以SCE抑制LPS诱导小胶质细胞向M1表型极化产生的炎症反应, 促进小胶质细胞向M2表型极化, 而这一过程可能与TLR4相关。

miR-124是中枢神经系统中表达最丰富的microRNA, 同时在中枢神经系统中高表达, 在生理和病理条件下均能调节小胶质细胞的功能, 也有研究表明miR-124可维持小胶质细胞的静止, 并促进小胶质细胞向M2 (抗炎) 型极化<sup>[23]</sup>, 所以选择miR-124作靶点。本研究考察了下调miR-124后SCE对LPS激活的



**Figure 7** Effects of SCE on TNF- $\alpha$ , IL-10, IBA-1 and Arg-1 after down-regulation of miR-124. A: The production of TNF- $\alpha$  and IL-10 were detected by ELISA; B-D: The expression of TNF- $\alpha$ , IBA-1, IL-10 and Arg-1 were detected by Western blot; E, F: The relative mRNA level of TNF- $\alpha$ , IBA-1, IL-10 and Arg-1 were detected by qRT-PCR;  $n = 3, \bar{x} \pm s$ .  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{###}P < 0.01$ ,  $^{####}P < 0.001$  vs control group;  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$  vs model group;  $^{\$}P < 0.05$ ,  $^{SS}P < 0.01$ ,  $^{SSS}P < 0.001$  vs LPS+SCE+NC inhibitor



**Figure 8** Effects of down-regulation of miR-124 on TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ B signaling pathway proteins in BV2 cells. A-F: Western blot indicate the expression of TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65, IKK- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\alpha$ .  $n = 3, \bar{x} \pm s$ .  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{###}P < 0.001$  vs control group;  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$  vs model group;  $^{\$}P < 0.05$ ,  $^{SS}P < 0.01$ ,  $^{SSS}P < 0.001$  vs LPS+SCE+NC inhibitor

小胶质细胞的影响。结果表明, SCE抑制M1型小胶质细胞的作用减弱,同时, SCE促进Arg-1和IL-10表达的作用减弱。说明SCE通过上调miR-124抑制BV2小胶质细胞的M1表型并促进其向M2表型转化。

TLR4信号通路在小胶质细胞的极化过程中起着

关键作用, miR-124通过调节TLR4促进小胶质细胞的M1/M2极化。已有研究表明miR-124通过与MyD88等多个分子的3'-UTR区域结合进而负调节TLR4信号传导<sup>[24]</sup>。结合本研究结果发现, SCE通过上调miR-124,抑制LPS诱导小胶质细胞M1表型极化产生的炎症反

应,促进小胶质细胞向M2型极化,所以推测TLR4通路可能参与了这一过程。本研究接着通过Western blot检测了转染miR-124 inhibitor的BV2细胞中TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B p65、IKK- $\alpha$ 、I $\kappa$ B- $\alpha$ 蛋白水平的表达,结果表明TLR4及其下游分子MyD88、NF- $\kappa$ B p65、IKK- $\alpha$ 蛋白表达均升高,I $\kappa$ B- $\alpha$ 蛋白表达显著降低,说明miR-124下调后TLR4信号通路又重新被激活,进一步引起NF- $\kappa$ B信号通路的激活。这些结果均说明SCE通过上调miR-124,促进TLR4下游蛋白MyD88等的表达,抑制TLR4信号通路,阻止NF- $\kappa$ B入核,减少炎症因子的表达。

综上所述,本研究探讨SCE通过上调miR-124对M1/M2极化的影响,并进一步探讨了TLR4介导的下游通路NF- $\kappa$ B在这一过程中的作用。结果表明,SCE通过上调miR-124抑制LPS诱导的BV2小胶质细胞M1极化,促进小胶质细胞M2极化,进一步改善神经炎症,其可能是通过抑制TLR4信号通路,阻止NF- $\kappa$ B入核。总之,本研究提供了SCE通过上调miR-124来调节小胶质细胞表型转化而减轻LPS诱导的BV2细胞神经炎症的证据。

**作者贡献:** 颜廷旭实验设计、论文修改;杨云方完成论文初稿的写作、修改;张悦、彭景帮助论文初稿的完成;吴博、贾英提供了方法理论支持和建议。

**利益冲突:** 本文作者声明没有利益冲突。

## References

- [1] Liu X, Wen S, Yan F, et al. Salidroside provides neuroprotection by modulating microglial polarization after cerebral ischemia [J]. *Neuroinflammation*, 2018, 15: 39.
- [2] Zhang JW, Zheng YL, Luo Y, et al. Curcumin inhibits LPS-induced neuroinflammation by promoting microglial M2 polarization via TREM2/TLR4/NF- $\kappa$ B pathways in BV2 cells [J]. *Mol Immunol*, 2019, 116: 29-37.
- [3] Li C, Chao Z, Zhou H, et al. Inhibitory effects of betulinic acid on LPS-induced neuroinflammation involve M2 microglial polarization via CaMKK $\beta$ -dependent AMPK activation [J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11: 98.
- [4] Hu XM, Leak RK, Shi YJ, et al. Microglial and macrophage polarization-new prospects for brain repair [J]. *Nat Rev Neurol*, 2015, 11: 56-64.
- [5] Zha Z, Gao YF, Ji J, et al. Bu Shen Yi Sui capsule alleviates neuroinflammation and demyelination by promoting microglia toward M2 polarization, which correlates with changes in miR-124 and miR-155 in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 5521503.
- [6] Ning R, Venkat P, Chopp M, et al. D-4F increases microRNA-124a and reduces neuroinflammation in diabetic stroke rats [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 95481-95494.
- [7] Yu A, Zhang T, Duan H, et al. MiR-124 contributes to M2 polarization of microglia and confers brain inflammatory protection via the C/EBP- $\alpha$  pathway in intracerebral hemorrhage [J]. *Immunol Lett*, 2017, 182: 1-11.
- [8] Wang L, Yang JW, Lin LT, et al. Acupuncture attenuates inflammation in microglia of vascular dementia rats by inhibiting miR-93-mediated TLR4/MyD88/NF-kappaB signaling pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 8253904.
- [9] Ma C, Li Y, Li M, et al. microRNA-124 negatively regulates TLR signaling in alveolar macrophages in response to mycobacterial infection [J]. *Mol Immunol*, 2014, 62: 150-158.
- [10] State Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Vol 1. Beijing: China Medical Science Press, 2020.
- [11] Zhou Y, Men L, Sun Y, et al. Pharmacodynamic effects and molecular mechanisms of lignans from *Schisandra chinensis* Turcz. (Baill.), a current review [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 892: 173796.
- [12] Zhang W, Zhang Y, He Y, et al. Lipopolysaccharide mediates time-dependent macrophage M1/M2 polarization through the Tim-3/galectin-9 signalling pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2019, 376: 124-132.
- [13] Gibbons HM, Dragunow M. Microglia induce neural cell death via a proximity-dependent mechanism involving nitric oxide [J]. *Brain Res*, 2006, 1084: 1-15.
- [14] Park BS, Dong HS, Kim HM, et al. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex [J]. *Nature*, 2009, 458: 1191-1195.
- [15] Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, et al. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution [J]. *Nat Immunol*, 2002, 3: 667-672.
- [16] Ohto U, Fukase K, Miyake K, et al. Crystal structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid IVa [J]. *Science*, 2007, 316: 1632-1634.
- [17] Resman N, Vasl J, Oblak A, et al. Essential roles of hydrophobic residues in both MD-2 and Toll-like receptor 4 in activation by endotoxin [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 15052-15060.
- [18] Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF- $\kappa$ B transcription factors in the immune system [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 693-733.
- [19] Zhou L, Liu Z, Wang Z, et al. Astragalus polysaccharides exerts immunomodulatory effects via TLR4-mediated MyD88-dependent signaling pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 44822.
- [20] Cui W, Sun C, Ma Y, et al. Inhibition of TLR4 induces M2 microglial polarization and provides neuroprotection via the NLRP3 inflammasome in Alzheimer's disease [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 444.

- [21] Jiao YF, Min L, Zhao YP, et al. N-Methylcytisine ameliorates dextran-sulfate-sodium-induced colitis in mice by inhibiting the inflammatory response [J]. *Molecules*, 2018, 23: 510.
- [22] Shi H, Wang XL, Quan HF, et al. Effects of betaine on LPS-stimulated activation of microglial M1/M2 phenotypes by suppressing TLR4/NF- $\kappa$ B pathways in N9 cells [J]. *Molecules*, 2019, 24: 367.
- [23] Yang Y, Ye Y, Kong C, et al. miR-124 enriched exosomes promoted the M2 polarization of microglia and enhanced hippocampus neurogenesis after traumatic brain injury by inhibiting TLR4 pathway [J]. *Neurochem Res*, 2019, 44: 811-828.
- [24] Periyasamy P, Liao K, Kook YH, et al. Cocaine-mediated down-regulation of miR-124 activates microglia by targeting KLF4 and TLR4 signaling [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55: 3196-3210.