

竹节参总提物对 LPS 诱导 BV2 小胶质细胞炎症反应的保护作用

郑杰, 赵晴晴, 望金欣, 王瑞, 张续蓝, 王婷, 周志勇

(三峡大学医学院, 湖北宜昌 443002)

摘要: 本文研究了竹节参总提物对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激所致的 BV2 小胶质细胞炎症反应的保护作用及其机制。MTT 筛选不同浓度竹节参总提取对小胶质细胞增殖影响; 一氧化氮试剂盒检测 NO 表达水平; PCR 检测 IL-1 β 、TNF- α 和 iNOS 的 mRNA 表达; 免疫荧光检测 NF- κ B 表达及定位。竹节参总提物在 3.125~50 mg/L 对正常状态及 LPS 1 μ g/mL 诱导的炎症状态下小胶质细胞生长均无明显影响; 与正常组比较, 模型组 NO 释放量是其 11.82 倍, TNF- α 、IL-1 β 和 iNOS 的 mRNA 表达量分别是正常组的 1.35、1.78 和 2.50 倍, 并且 NF- κ B 核移位明显; 与模型组比较, 竹节参总提物在 3.125~50 mg/L 均能不同程度抑制 NO 释放量, 并减少 IL-1 β 、TNF- α 和 iNOS 的 mRNA 表达水平; 25、50 mg/L 竹节参总提物有效抑制了小胶质细胞中 NF- κ B 的核移位。竹节参总提物可减轻 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞炎症反应, 其主要机制为抑制 NF- κ B 的核移位, 进而降低了炎症因子的分泌。

关键词: 竹节参总提物; 小胶质细胞; 神经炎症; 脂多糖

文章编号: 1673-9078(2019)12-8-13

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.12.002

The Effects of Total Extract of *Panacis japonici* Rhizoma on LPS Induced BV2 Microglia Inflammation

ZHENG Jie, ZHAO Qing-qing, WANG Jin-xin, WANG Rui, ZHANG Xu-lan, WANG Ting, ZHOU Zhi-yong

(Medical College of China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

Abstract: To investigate the protective effects of total extract of *Panacis japonici* Rhizoma on lipopolysaccharide-induced inflammation in BV2 cells and its underlying mechanisms. The viability of BV2 cells was detected by MTT. Nitric oxide (NO) levels were measured by Griess. The mRNA expression of TNF- α , IL-1 β and iNOS were evaluated by PCR. Immunofluorescence was performed to detect the expression and location of NF- κ B. MTT results showed that different concentrations of total extract of *Panacis japonici* Rhizoma (3.125~50 mg/L) have no effect on the growth of microglia, regardless of normal state or LPS (1 μ g/L)-induced inflammatory condition. Compared with the normal group, the release of NO in the model group was 11.82 times, and the mRNA expressions of TNF- α , IL-1 β and iNOS in the model group were 1.35 times, 1.78 times and 2.50 times, respectively. There was an obvious nuclear shift of NF- κ B after LPS induction. After administration of total extract of *Panacis japonici* Rhizoma (3.125~50 mg/L), over-expression of IL-1 β , TNF- α , iNOS and NO induced by LPS were effectively reversed. Moreover, total extract of *Panacis japonici* Rhizoma (25, 50 mg/L) can effectively inhibit nuclear translocation of NF- κ B. Total extract of *Panacis japonici* Rhizoma can effectively improve LPS-induced inflammatory response in BV2 microglia. The underlying mechanism is mainly to inhibit nuclear translocation of NF- κ B and thereby reducing the secretion of inflammatory factors.

Key words: total extract of *Panacis japonici* Rhizoma; microglia; neuroinflammation; LPS

神经炎症被认为是引起神经退行性疾病的关键因素之一^[1]。大量研究证实, 小胶质细胞作为中枢神经系统中主要的免疫监视巨噬细胞, 在响应外部刺激以

收稿日期: 2019-07-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81673778)

作者简介: 郑杰 (1994-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药基础药理研究

通讯作者: 周志勇 (1982-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 与衰老相关中枢神经退行性病变的机制研究

及维持细胞稳态, 免疫和修复方面发挥着重要作用^[2]。如在阿尔茨海默病 (AD) 患者大脑中, 小胶质细胞表现出促炎性形态学变化 (细胞体膨大、突起缩短), 并释放大量的促炎物质 (CD36、IL-1、IL-6 和 TNF) ^[3]。另外, 在帕金森病动物模型的黑质致密带和纹状体中发现大量促炎因子和激活状态的小胶质细胞^[4]。

LPS 为革兰氏阴性菌细胞壁的多糖成分, 可与 Toll 样受体 4 结合, 激活 NF- κ B 信号途径。相关研究报道, 1 μ g/ml LPS 刺激 BV2 小胶质细胞 24 h 后, 会

使 BV2 产生大量的 NO、TNF- α 和 IL-6^[5]。另外, 雄性小鼠持续 1 周腹腔注射 0.25 mg/kg 的 LPS 后, Amjad K 等发现小鼠皮层和海马中突触数量减少, 学习记忆能力明显降低, 小胶质细胞大量激活, 细胞促炎因子 TNF- α 、COX-2 和 NOS-2 表达量明显上升^[6]。以上研究表明, LPS 能够激活胶质细胞, 引起神经炎症, 导致神经退行性病变。

现代生物医学研究发现植物中含有的部分化学成分具有潜在的神经保护作用。竹节参(*Panax japonici Rhizoma*) 为我国传统中药, 在我国西南地区土家族苗族聚集地被誉为“草药之王”。研究发现竹节参提取物(醇提物与水蒸气蒸馏液的混合物)、细胞培养竹节参粉末混悬液、竹节参总皂苷混悬液灌胃给药均可显著改善二甲苯所致小鼠耳廓肿胀, 作用呈剂量依赖性^[7,8]。竹节参水、醇提物可通过下调 IL-1 β 和 IL-6 等炎症介质的表达, 继而改善慢性酒精性肝损伤^[9]。近期, 我们发现竹节参总皂苷通过抑制丝裂原活化蛋白激酶和 NF- κ B 信号通路, 减轻衰老大鼠皮层和海马中小胶质细胞激活引起的神经炎症^[10]。但竹节参总提物是否能够抑制 LPS 诱导的小胶质细胞炎症反应尚不明确。本研究旨在探讨竹节参总提物能否改善 LPS 诱导 BV2 小胶质细胞的炎症反应, 以期竹节参的临床应用提供一定的实验依据及理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株

小鼠 BV2 小胶质细胞, 购自北京协和细胞资源中心。

1.1.2 药物与试剂

竹节参药材采购自湖北恩施州椿木营, 经三峡大学生药专家何毓敏博士鉴定为竹节参五加科人参属植物竹节参。DMEM 高糖培养基(Gibco, 1815951); 胎牛血清(ScienCell, 23248); 0.25%胰蛋白酶(杭州吉诺生物医药技术有限公司, GNM27250); 脂多糖(Sigma, #044M4004V); MTT(武汉博士德生物公司, AR1156); NO 试剂盒(碧云天生物公司, S0021); Trizol 试剂(美国 invitrogen 公司); PrimeScript RT reagent Kit 逆转录试剂盒(Takara, AHG1551A); IL-1 β 、TNF- α 、iNOS、 β -actin 引物(上海生工生物工程有限公司); NF- κ B antibody (CST, #6956); Alexa Fluor594 Donkey Anti-Mouse IgG(H+L) (Jackson Immuno Research, 127802)。

1.1.3 主要仪器

SW-4T-2F 洁净工作台, 上海博讯实业公司医疗设备厂; NU-4750E 型二氧化碳培养箱, 美国 NuAire; CKX41 型光学倒置显微镜, 日本 Olympus; TYPE 1500-458 全波长酶标仪, 美国 Thermo Electron; TDZ5-WS 多管架自动平衡离心机, 湖南湘仪离心机仪器有限公司; Centrifuge 5424 R 型高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf; HAV-85 型高压灭菌锅, 日本 Hirayama; NANODROP 2000 微量核酸蛋白检测仪, 美国 Thermo Scientific; Applied Biosystems AB 9902 PCR 扩增仪, 美国 Life Technologies; DYY-6C 型电泳仪, 北京市六一仪器厂; GEL 212 PRO 凝胶成像系统, 广州云星科学仪器有限公司; Nikon A1R+共聚焦显微镜, 日本 Nikon; JA 2003 电子分析天平, 上海天平仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 竹节参总提物的制备

取竹节参饮片 1 kg 粉碎, 加入 20 倍量的双蒸水, 回流提取 3 次, 每次 2 h, 温度 100 $^{\circ}$ C, 合并 3 次提取液, 浓缩干燥得竹节参总提物。实验时用 DMSO 溶解稀释。

1.2.2 细胞培养

BV2 小胶质细胞用含有 10%胎牛血清和 1%双抗(青霉素与链霉素)的 DMEM 高糖培养基培养于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中。

1.2.3 MTT 法检测 BV2 细胞增殖活性

将处于对数生长期的 BV2 细胞悬浮液以 5×10^4 /mL 的细胞量接种于 96 孔板, 每孔加入 100 μ L, 设立正常对照组、模型组(1 μ g/mL LPS)、溶剂对照组(0.1% DMSO)、单独用药组(3.125、6.25、12.5、25 和 50 mg/L)和药物预保护处理组(药物预处理 12 h 后, 1 μ g/mL LPS 刺激 12 h), 每组 4 个复孔, 培养 24 h 后每孔避光加入 10 μ L MTT (5 mg/mL), 置于培养箱中继续孵育 4 h, 弃上清, 立即加入 150 μ L DMSO 溶解结晶, 摇床上低速震荡 10 min。在酶标仪 490 nm 光径测量各孔吸光度, 以正常对照组吸光度为 100%, 计算出细胞活力, 筛选出无细胞毒性的浓度范围。

$$\text{细胞存活率}/\% = A_i/A_0 \times 100\%$$

其中: A_i 表示加入药物后 490 nm 处的吸光度值; A_0 正常对照组在 490 nm 处的吸光度值。

1.2.4 测定 BV2 细胞上清 NO 的含量

BV2 细胞悬浮液以 5×10^4 /mL 的细胞量接种于 96 孔板, 待细胞贴壁后, 弃上清, 加入竹节参总提物预保护 12 h, LPS 刺激 12 h, 每组设立 3 个复孔。按 Griess 法测定上清液中 NO 含量, 540 nm 光径测定吸光度。

NO 含量=77.33X-5.1255 (当 OD 值 X<0.11 时);
NO 含量=76.413X-8.6376 (当 OD 值 X>0.11 时)。

1.2.5 免疫荧光检测 NF-κB 的表达及定位

提前将圆形盖玻片泡在 75%乙醇中消毒 30 min, 取出放入超净台中打开紫外灯照射灭菌 30 min。将玻片放入 24 孔板中, 并将细胞按照 5×10⁴ 个/mL, 每孔 500 μL 接种到 24 孔板圆形无菌玻片上, 设立正常对照组、模型组 (1 μg/mL LPS) 和药物预保护处理组 (药物预处理 12 h 后, 1 μg/mL LPS 刺激 12 h)。培养 24 h 后弃掉上清, 每孔加入 500 μL PBS 洗涤细胞, 吸净 PBS, 每孔加入 200 μL 4%多聚甲醛固定细胞 30 min,

再用 PBS 洗涤细胞 3 次, 每次 3~5 min, 用 0.1% Triton X-100 室温打孔 15 min, 然后 PBS 洗涤细胞 3 次。最后用 1% BSA 于室温下封闭 1 h, 弃掉封闭液后, 每孔加入 200 μL NF-κB 抗体 (1:200), 4 °C 孵育过夜。次日, 25 °C 复温 30 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 3~5 min, 每孔加入 200 μL 荧光二抗 (1:400) 在 37 °C 下避光孵育 1 h, 用 PBS 洗涤细胞, 加 200 μL DAPI (0.5 μg/mL) 避光孵育 5 min, PBS 洗涤细胞 3 次, 抗荧光淬灭剂封片, 激光共聚焦荧光显微镜下观察取图。

1.2.6 RT-PCR 检测 IL-1β、TNF-α、iNOS mRNA 的表达

表 1 引物序列

Table 1 Primer information		
基因	上游	下游
β-actin	5-GAGACCTTCAACACCCAGCC-3'	5-GGCCATCTCTTGCTCGAAGTC-3'
iNOS	5'-GCCCTGCTTTGTGCGAAG-3'	5'-GCCCTTTGTGCTGGGAGTC-3'
IL-1β	5'-TGTCCTGTGTAATGAAAGACGGC-3'	5'-GCTTGTGCTGCTTGTGAGG-3'
TNF-α	5'-AGAGAGGTGGTCCCAACCCA-3'	5'-ACTCCTTCCAGCGTGTGCG-3'

取处于对数生长期的 BV2 细胞悬液 (10⁵/mL) 接种于 6 孔板, 待细胞贴壁, 药物预保护 12 h 后, LPS 刺激 12 h。吸去上清, 每孔加入 1 ml PBS 洗涤细胞后, 每组加入 1 mL Trizol 裂解液, 提取总 RNA, 检测其完整性, 核酸仪测定其浓度, 按逆转录试剂盒说明书进行逆转录得 cDNA, 以 β-actin 为内参, 通过 RT-PCR 反应扩增目的基因, 引物序列见表一。RT-PCR 的反应体系为 25 μL 体系, 分别为灭菌双蒸水 10.5 μL, 2×PCR Master mix 12.5 μL, IL-1β、TNF-α、iNOS 引物 1 μL (引物为原液稀释 10 倍), cDNA 1 μL。扩增条件为 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环, 72 °C 5 min, 琼脂糖凝胶电泳检测各指标的 mRNA 表达情况。

1.2.7 统计分析

RT-PCR 结果采用 ImageJ 1.42 q 软件分析, Graph Pad Prism 5.0 软件对数据统计处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 单因素方差分析检验各组间差异的显著性, $p < 0.05$ 表示差异具有统计学意义, $\bar{x}$ 代表各组整体数值计算倍率关系。

2 结果与讨论

2.1 竹节参总提取物对 BV2 小胶质细胞活力的影响

不同浓度 (3.125~50 mg/L) 的竹节参总提取物对 BV2 细胞活性无明显影响, 细胞活率均在 100%左右。

因此选择 ≤50 mg/L 的 5 个竹节参总提取物梯度浓度进一步研究其对 LPS 诱导 BV2 细胞炎症反应的预保护作用。1 μg/mL LPS 处理 12 h 所造成的细胞炎症模型中, 不同浓度竹节参总提取物对 BV2 细胞的预保护作用无明显差异。因此选择 ≤50 mg/L 的 5 个竹节参总提取物梯度浓度进行后续实验。结果如图 1 所示。

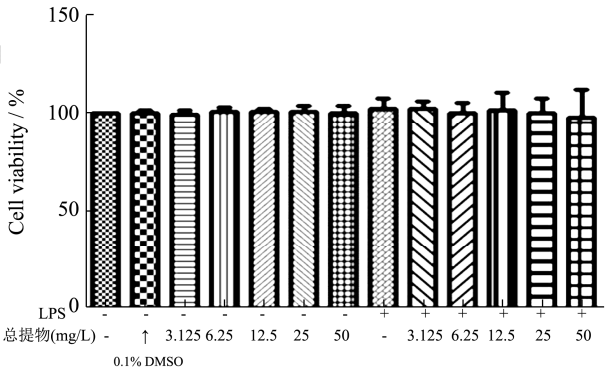


图 1 总提取物对 BV2 小胶质细胞活力的影响

Fig.1 Effect of total extract of *Panacis japonici* Rhizoma on viability of BV2 cells

2.2 竹节参总提取物对 TNF-α、IL-1β 和 iNOS mRNA 表达及 NO 释放量的影响

神经炎症在许多神经疾病的发病机制中起着至关重要的作用^[11]。正常情况下, 小胶质细胞参与维持中枢神经系统的稳态, 清除受损的神经元和病原体^[12]。然而异常激活的小胶质细胞分泌大量的神经毒性物质 (如: NO、PGE₂) 和炎症细胞因子 (包括: IL-1β、TNF-α、

iNOS)会引起神经细胞的损伤,最终导致神经退行性病变^[13]。Xin 等^[14]在 AD 动物模型 APP/PS1 小鼠体内发现 A β 沉积周围存在活化的小胶质细胞,海马部位含有大量的促炎细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 并且神经细胞凋亡明显增加,伴随小鼠学习记忆能力明显降低。如图 2,与正常组比较,模型组 TNF- α 、IL-1 β 和 iNOS 的 mRNA 表达量分别是正常组的 1.35、1.78 和 2.50 倍,竹节参总提物预处理 12 h, LPS 再刺激 12 h 后, TNF- α 、IL-1 β 和 iNOS 的 mRNA 的表达水平降低, 25 mg/L 作用最明显,分别降低了 55.60%、69.10%和 50.80%。

NO 是机体产生的一种重要活性物质,参与中枢神经系统中的信息传递,并能够介导细胞免疫和炎症毒性^[15]。巨噬细胞受到外界刺激处于应激状态时,细胞内的 iNOS 基因被诱导表达,催化精氨酸产生大量 NO^[16]。在高浓度条件下,NO 激活 NF- κ B,诱导促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 等的产生, TNF- α 的产生又可激活 iNOS,促进机体产生更多的 NO,从而形成正反馈循环,使炎症细胞因子的分泌及 NO 自身的表达得以持续,致使炎症反应更持久、剧烈,进而对细胞产生毒性作用^[17]。体外实验研究表明, LPS 能够诱导 RAW 264.7 细胞中 iNOS mRNA 的大量表达,并且 NO 释放量明显增加^[18]。另外, LPS 不仅能够诱导 BV2 细胞中 iNOS mRNA 的大量表达,而且对应的 iNOS 蛋白含量也明显增加,此外细胞上清液中检测到大量的 NO^[19]。本次实验,与正常组比较,模型组 NO 的含量是其 11.82 倍;与模型组比较,竹节参总提物预处理 12 h 能明显降低 NO 的释放量,且呈明显的剂量依赖性,分别降低了 13.2%、24.03%、36.07%、51.50% 和 75.88%。结果见图 3。

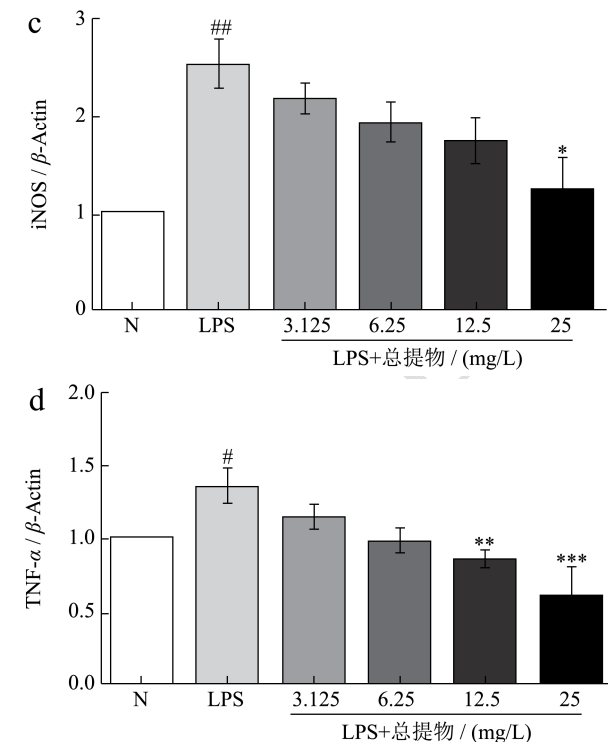
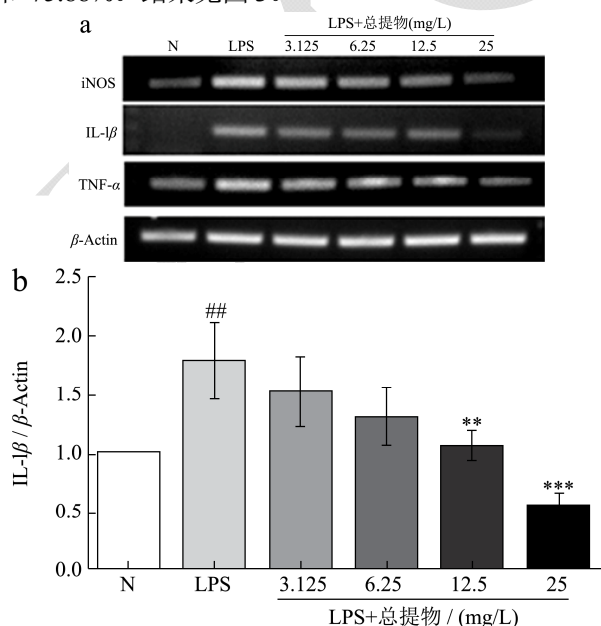


图2 总提物对LPS诱导小胶质细胞产生 IL-1 β 、TNF- α 和 iNOS 的 mRNA 表达水平的影响

Fig.2 Total extract of *Panacis japonici* Rhizoma suppresses the LPS-induced mRNA levels of IL-1 β , TNF- α and iNOS in BV2 cells (n=3, x $\pm$ s)

注: # p <0.05, ## p <0.01 vs control; * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 vs LPS group。

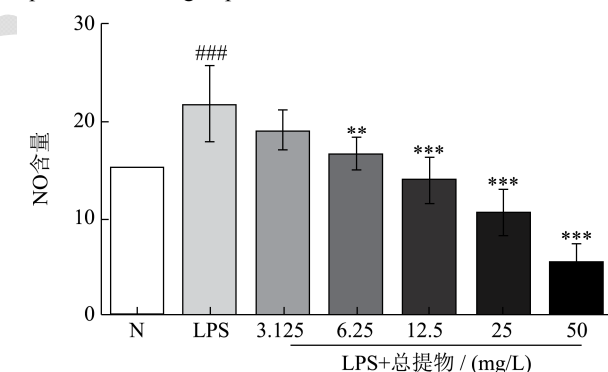


图3 总提物干预后对LPS刺激的小胶质细胞NO释放量的影响

Fig.3 Total extract of *Panacis japonici* Rhizoma suppresses the LPS-induced over-expression of NO in BV2 cells (n=3, X $\pm$ S)

注: ### p <0.001 vs control; ** p <0.01, *** p <0.001 vs LPS group。

2.3 竹节参总提物对 NF- κ B 活性的影响

NF- κ B 的激活在炎症相关基因的转录中起着重要作用,正常情况下 NF- κ B 与 I κ B 以复合物形式存在细胞质中, LPS 刺激下, I κ B 解离, NF- κ B 移位入细胞核,激活的 NF- κ B 诱使炎症细胞因子和相关炎症酶

基因的转录和翻译,从而导致神经炎症的发生和发展^[20]。研究发现,LPS刺激BV2细胞24 h后,其p-I κ B α 和NF- κ B p65表达量明显增加,并且促炎细胞因子,iNOS和COX-2表达量也有明显增加^[21]。在本实验中,免疫荧光结果显示模型组NF- κ B主要集中在胞核表达,提示NF- κ B信号通路已被激活,结合3.1,可以表明LPS通过NF- κ B信号途径诱导BV2细胞产生炎症反应。而经过竹节参总提物预保护12 h后,可以看出胞核中荧光强度明显减弱,提示胞质中存在大量未入核的NF- κ B,竹节参总提物可以抑制LPS激活BV2细胞中NF- κ B信号途径继而引起的炎症反应。

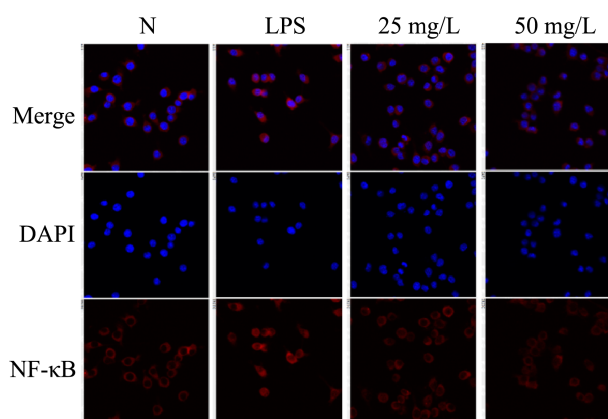


图4 总提物对LPS刺激小胶质细胞中NF- κ B定位的影响

Fig.4 Total extract of *Panax japonicus* Rhizoma suppresses the LPS-induced nuclear translocation of NF- κ B in BV2 cells

竹节参作为我国传统中药,具有广泛的民间应用基础。前期,我们对竹节参总皂苷不同提取工艺的比较研究中发现,水提醇沉法和泡沫分离法都可以得到竹节参总皂苷,其中泡沫分离法的率高,为99.31%^[22]。为了进一步比较不同工艺提取的竹节参皂苷粗提物的毒性及抗炎效果,我们采用不同工艺分别制备竹节参皂苷粗提物,然后用不同工艺、不同浓度的样品处理RAW 264.7细胞,发现泡沫分离法提取的竹节参皂苷粗提物毒性最小,抗炎效果最好^[23]。由此,以竹节参皂苷为主要成分的竹节参总提物理应有竹节参皂苷的抗炎活性,另外,张海滨等^[24]用产自湖北省恩施州椿木营的竹节参药材提取竹节参总皂苷,发现竹节参皂苷IVa为总皂苷中的主要成分,但竹节参皂苷IVa是否能够抑制小胶质细胞的炎症反应仍需进一步的研究。

3 结论

综上所述,竹节参总提物能够抑制小胶质细胞的炎症反应,其主要机制为抑制了NF- κ B的核移位,继而减少促炎细胞因子TNF- α 、IL-1 β 和iNOS的表达量和炎症效应分子NO的产生。

参考文献

- [1] Amor S, Puentes F, Baker D, et al. Inflammation in neurodegenerative diseases [J]. Immunology, 2010, 129: 154-169
- [2] Kim Y S, Joh T H. Microglia, major player in the brain inflammation: Their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease [J]. Exp Mol Med, 2006, 38: 333-347
- [3] Heneka Michael T, Carson Monica J, El Khoury Joseph, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease [J]. Lancet Neurol, 2015, 14: 388-405
- [4] Wang Q, Liu Ying-jun, Zhou Jia-wei. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target [J]. Translational Neurodegeneration, 2015, 4(1): 19
- [5] Zhang Hang, Zhong Jing, Zhang Qian, et al. Structural elucidation and bioactivities of a novel arabinogalactan from *Coreopsis tinctoria* [J]. Carbohydr Polym, 2019, 219: 219-228
- [6] Khan Amjad, Ali Tahir, Rehman Shafiq Ur, et al. Neuroprotective effect of quercetin against the detrimental effects of LPS in the adult mouse brain [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 1383
- [7] 陈龙全,刘小琴,张金红.竹节参提取液抗风湿作用的实验研究[J].湖北民族学院学报(医学版),2008,25(3):15-17,21
CHEN Long-quan, LIU Xiao-qin, ZHANG Jin-hong. Experimental studies on antirheumatic effects of the extraction solution from rhizoma of *Panax japonicus* [J]. Journal of Hubei Minzu University (Medical Edition), 2008, 25(3): 15-17, 21
- [8] 刘玉萍,王金萍,郭志刚,等.天然与细胞培养竹节参的抗炎、镇痛作用研究[J].华北国防医药,2008,20(3):65-66
LIU Yu-ping, WANG Jin-ping, GUO Zhi-gang, et al. A study of natural and cell culture *Panax japonicus* on anti-inflammatory and analgesia [J]. Medical & Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2008, 20(3): 65-66
- [9] 何志刚,汪洋鹏,刘磊,等.竹节参提取物对慢性酒精性肝损伤模型小鼠血清生化指标及炎症因子水平的影响[J].浙江中西医结合杂志,2018,28(1):21-24
HE Zhi-gang, WANG Yang-peng, LIU Lei, et al. Effects of *Panax japonicus* extractions on serum biochemical indices and inflammatory factors in mice with alcoholic liver injury [J]. Zhejiang Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2018, 28(1): 21-24

- [10] Deng Li-li, Yuan Ding, Zhou Zhi-yong, et al. Saponins from *Panax japonicus* attenuate age-related neuroinflammation via regulation of the mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappa B signaling pathways [J]. Neural Regeneration Research, 2017, 12(11): 1877-1884
- [11] Muhammad T, Ikram M, Ullah R, et al. Hesperetin, a citrus flavonoid, attenuates lps-induced neuroinflammation, apoptosis and memory impairments by modulating TLR4/NF- κ B signaling [J]. Nutrients, 2019, 11
- [12] Gehrmann J, Matsumoto Y, Kreutzberg G W. Microglia: intrinsic immunoeffector cell of the brain [J]. Brain Res Brain Res Rev, 1995, 20(3): 269-287
- [13] Nolan T J, Gadsby N J, Hellyer T P, et al. Low-pathogenicity Mycoplasma spp. alter human monocyte and macrophage function and are highly prevalent among patients with ventilator-acquired pneumonia [J]. Thorax 2016, 71: 594-600
- [14] Jin Xin, Liu Ming-yan, Zhang Dong-fang, et al. Baicalin mitigates cognitive impairment and protects neurons from microglia-mediated neuroinflammation via suppressing NLRP3 inflammasomes and TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. CNS Neuroscience & Therapeutics, 2019, 25(5): 575-590
- [15] Moncada S, Palmer R M, Higgs E C A, Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology [J]. Pharmacol Rev, 1991, 43: 109-142
- [16] Csaba Szabó. Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system [J]. Brain Research Bulletin, 1996, 41(3): 131-141
- [17] 吕红君,温桃群,罗杰,等.荆芥挥发油抗内毒素中毒小鼠 NLRP3 炎症小体通路的机制研究[J].中国药理学通报, 2019,35(3):371-376
LYU Hong-jun, WEN Tao-qun, LUO Jie, et al. Study on mechanism of essential oils of *Schizonepeta tenuifolia* Briq. in endotoxin poisoning mice via NLRP3 inflammasome pathway [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2019, 35(3): 371-376
- [18] 李晓红,齐云,蔡润兰,等.芦荟大黄素对LPS诱导的RAW 264.7细胞NO生成及iNOS表达的影响[J].中国药理学通报,2010,26(4):488-492
- LI Xiao-hong, QI Yun, CAI Run-lan, et al. Effect of lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitricoxide synthase by aloe-emodin in RAW264.7 cells [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2010, 26(4): 488-492
- [19] Lv Run-xiao, Du Li-li, Liu Xue-yong, et al. Polydatin alleviates traumatic spinal cord injury by reducing microglial inflammation via regulation of iNOS and NLRP3 inflammasome pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 70: 28-36
- [20] Zhou Yi-le, Yan Yong-ming, Li Si-yi, et al. 6-O-angeloylplenolin exerts neuroprotection against lipopolysaccharide-induced neuroinflammation *in vitro* and *in vivo* [J]. Acta Pharmacol Sin, 2019, 27(18): 1-12
- [21] Xie Qing, Wu Guo-zhen, Yang Niao, et al. Delavatine A, an unusual isoquinoline alkaloid exerts anti-inflammation on LPS-induced proinflammatory cytokines production by suppressing NF- κ B activation in BV-2 microglia [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 502: 202-208
- [22] 张海滨,张长城,何毓敏,等.竹节参总皂苷不同提取工艺的比较研究[J].现代生物医学进展,2013,13(18):3457-3460
ZHANG Hai-bin, ZHANG Chang-cheng, HE Yu-min, et al. Comparative study on total saponins from *Panax japonicus* in different extraction technology [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13(18): 3457-3460
- [23] 代艳文,袁丁,张海滨,等.不同工艺提取的竹节参皂苷粗提物毒性及其抗炎作用初步研究[J].中国中医药信息杂志, 2014,21(1):50-53
DAI Yan-wen, YUAN Ding, ZHANG Hai-bin, et al. Toxicity and anti-inflammatory effect of total saponins from *Panax japonicus* by different extraction technology [J]. Chinese Journal of Information on TCM, 2014, 21(1): 50-53
- [24] 张海滨,张长城,关乔中,等.竹节参总皂苷提取物质质量控制方法研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(18):68-70
ZHANG Hai-bin, ZHANG Chang-cheng, GUAN Qiao-zhong et al. Quality control methods for total saponins extract of *Panax japonicas* [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2013, 19(18): 68-70