

美满霉素抑制脂多糖诱导的小胶质细胞诱导型一氧化氮合酶的表达及其相关机制

顾昊¹, 沈伟^{1*}, 孙圣刚²

(¹南京医科大学附属脑科医院神经内科, 江苏 南京 210029; ²华中科技大学附属协和医院神经内科, 湖北 武汉 430074)

[摘要] 目的: 探讨美满霉素(minocycline, MC)对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的小胶质细胞一氧化氮(NO)生成和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达的影响及其相关分子机制。方法: LPS 或联合 MC 刺激 BV-2 细胞, 酶联免疫法检测培养上清中 NO 水平, 免疫细胞化学观察 iNOS 的蛋白含量, RT-PCR 技术评价 iNOS 的 mRNA 表达, 免疫印迹研究 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)的蛋白水平和磷酸化变化。结果: LPS(100 ng/ml)组 NO 含量显著升高($P < 0.05$), 且伴随 iNOS 蛋白和 mRNA 水平的明显上调, 与对照组相比有显著性差异($P < 0.01$)。MC(10 $\mu\text{mol/L}$)预处理(MC+LPS 组)能明显抑制上述变化, NO 含量、iNOS 蛋白和 mRNA 水平较 LPS 组均显著下调(P 均 < 0.01), 但明显高于对照组(P 均 < 0.05)。LPS 也能诱导 p38MAPK 磷酸化, 与对照组相比差异显著($P < 0.01$), 而 MC 预处理(MC+LPS 组)能拮抗 p38MAPK 的磷酸化, 较 LPS 组显著下调($P < 0.01$), 同时实验各组 p38MAPK 蛋白水平保持基本一致。结论: 美满霉素能通过下调 p38MAPK 信号途径, 抑制脂多糖刺激的小胶质细胞 iNOS 基因表达及 NO 生成, 对脂多糖诱导的小胶质细胞损伤有明显保护作用。

[关键词] 美满霉素; 脂多糖; 小胶质细胞; 一氧化氮; 诱导型一氧化氮合酶; p38 丝裂原活化蛋白激酶

[中图分类号] R392.12

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)02-188-06

Inhibitory role of minocycline on lipopolysaccharide-induced iNOS expression in microglial cells and its underlying mechanisms

GU Hao¹, SHEN Wei^{1*}, SUN Sheng-gang²

(¹Department of Neurology, Brain Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Neurology, Union Hospital of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the inhibitory effect of minocycline (MC) on lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide(NO) and expression of induced nitric oxide synthase (iNOS) in BV-2 microglial cells and its molecular mechanisms. **Methods:** The BV-2 microglial cells were treated with LPS (100 ng/ml) or various concentrations of minocycline (0, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{mol/L}$). Accumulated NO was measured in the cell supernatant by enzyme method, iNOS protein and mRNA were examined by immunohistochemistry staining and RT-PCR technique, respectively. p38MAPK protein was examined by Western blot in BV-2 cells. **Results:** The NO production and iNOS protein and mRNA levels were significantly increased in LPS group than those of the control group ($P < 0.05$, 0.01, 0.01, respectively). The pre-treatment of MC(10 $\mu\text{mol/L}$) significantly inhibited the NO production and the increments of iNOS protein and mRNA induced by LPS. The NO contents and the levels of iNOS protein and mRNA in MC+LPS group were significantly lower than those of the LPS groups (all $P < 0.01$), but still significantly higher than those of the control group (all $P < 0.05$). There was not significant differences of total p38MAPK protein expression in all groups, but no phospho-p38MAPK proteins were detected in the control group and MC group. The level of phospho-p38MAPK in the control group was significantly lower than that of the LPS group ($P < 0.01$), in which the increased phospho-p38MAPK level was reversed by MC ($P < 0.01$). **Conclusion:** The pre-treatment of MC could significantly inhibit the NO production and the increase of iNOS protein and mRNA induced by LPS through inhibiting the p38MAPK pathway in microglial cell.

[Key words] minocycline; microglia; lipopolysaccharide; nitric oxide; iNOS; p38MAPK

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(2): 188-193]

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金项目(07NJMUM033)

*通讯作者, E-mail: shenwei1971@126.com

近年来的研究表明:炎症反应(小胶质细胞的异常激活)和氧化应激是诱导帕金森病(Parkinson's disease, PD)发生和恶化的重要因素^[1]。其中,诱导型一氧化氮合酶(induced nitric oxide synthase, iNOS)的异常上调伴随其病理发展过程,导致多巴胺能神经元变性失活^[2]。国外最新研究证实,美满霉素(minocycline, MC)可抑制小胶质细胞的异常激活,保护多巴胺能神经元,但其调节机制尚未完全阐明。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是一种强力炎症诱导剂,能激活小胶质细胞,释放多种致炎细胞因子和一系列活性物,对神经元产生毒性作用^[3]。本研究通过观察 MC 对 LPS 诱导小胶质细胞 (BV-2 细胞系) iNOS 表达、一氧化氮(NO)水平及 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)表达的作用,探讨 MC 对多巴胺能神经细胞保护作用的潜在调节机制。

1 材料和方法

1.1 材料

MC、LPS(*Escherichia coli*, serotype 026:B6)购自美国 Sigma 公司;BV-2 细胞株由中国医学科学院协和医科大学基础细胞中心提供;DMEM 高糖培养基、胎牛血清来源于美国 Gibco 公司;大鼠抗小鼠 iNOS 抗体是美国 Labvision 生物公司产品;SP 免疫组织化学试剂盒购于武汉凌飞科技有限公司;一氧化氮酶法试剂盒、TRIzol、M-MLV 逆转录酶和 Taq 酶为晶美生物工程公司产品。

1.2 方法

1.2.1 BV-2 细胞的培养及处理

BV-2 细胞株培养于含 10%胎牛血清和双抗(青霉素和链霉素)的 DMEM 高糖培养液。隔天更换 1 次培养液,细胞丰度达 70%~80%时传代 1 次,每次实验前均在含有 10 g/L 牛血清白蛋白的 DMEM 培养液中培养 48 h,使细胞处于同步化阶段^[5]。

LPS 处理组:含相应浓度 LPS 的培养液培养 BV-2 细胞 24 h。MC+LPS 处理组:含相应浓度 MC 的培养液培养 BV-2 细胞 1 h,吸去培养液,清洗 2 次,再加入含相应浓度 LPS 的培养液,继续培养 24 h。MC 处理组:含相应浓度 MC 的培养液培养 BV-2 细胞 1 h,吸去培养液,清洗 2 次,加入含与 LPS 体积相同 PBS 液的培养基,继续培养 24 h。空白对照组:操作方法如 MC+LPS 处理组,但用 PBS 替代 MC 和 LPS。

1.2.2 酶联免疫法检测培养上清 NO 的含量变化

取对数生长期 BV-2 细胞接种于 24 孔板,调节细胞密度为 5×10^5 个/ml,继续培养 24 h 左右,更

换培养液,每孔加新培养液 1 ml。分为空白对照组、LPS(100 ng/ml)处理组、不同浓度的 MC(0.1、1.0、10.0 及 100.0 $\mu\text{mol/L}$)预处理 1 h+LPS(100 ng/ml)处理 24 h 组和 MC(100 $\mu\text{mol/L}$)处理组,每组 5 孔。药物处理结束后,收集细胞培养上清,取 0.1 ml 按试剂盒具体操作步骤测定细胞培养上清中 NO 的变化。

1.2.3 免疫细胞化学观察 iNOS 蛋白的表达

在 24 孔板中制作 BV-2 细胞爬片,分为空白对照组、LPS(100 ng/ml)处理 24 h 组、MC(10 $\mu\text{mol/L}$)预处理 1 h+LPS(100 ng/ml)处理 24 h 组和 MC(10 $\mu\text{mol/L}$)处理组,每组 5 孔。处理完成后,丙酮与无水酒精固定。顺序滴加一抗(大鼠抗小鼠 iNOS 单抗)、生物素结合的二抗(羊抗大鼠)及辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉卵白素工作液,DAB 显色。梯度脱水、透明、中性树胶封片,光镜下观察。图像分析:显微镜下观察以 BV-2 细胞胞浆出现棕黄色颗粒为阳性信号。随机采集 10 个高倍镜视野,HPAS-1000 全自动医学彩色图像分析系统进行图像分析检测阳性细胞内表达产物的平均光密度值(OD),对 iNOS 表达产物进行半定量。

1.2.4 RT-PCR 技术分析 iNOS 的 mRNA 水平变化

取对数生长期 BV-2 细胞接种于 6 孔板中,调节细胞密度为 1×10^6 个/ml,继续培养 24 h 左右,更换培养基,每孔加新培养液 2.5 ml。分为空白对照组、LPS 组、MC+LPS 组和 MC 组,每组 5 孔。使用 TRIzol 剂提取实验各组细胞总 RNA,逆转录。iNOS 和内参 β -actin PCR 反应:iNOS:上游引物 5'-TGAGCGAGGAGCAGGTGGAA-3',下游引物 5'-GTAGGGTGGAGGAGGGGGA-3'(变性 94 $^{\circ}\text{C}$,45 s,退火 62 $^{\circ}\text{C}$,45 s,延伸 72 $^{\circ}\text{C}$,45 s,35 个循环,产物 256 bp)。内参 β -actin:上游引物 5'-GAGCACCTGTGCTGCTCACCGAGG-3',下游引物 5'-GTGGTG-TGAAGCTGTAGCCACGCT-3'(变性 94 $^{\circ}\text{C}$,45 s,退火 64 $^{\circ}\text{C}$,45 s,延伸 72 $^{\circ}\text{C}$,45 s,35 个循环,产物 300 bp)。取 RT-PCR 产物 10 μl ,2%琼脂糖电泳分离。紫外分析仪图像分析,测定各组 iNOS 与 β -actin 的灰度比值。

1.2.5 免疫印迹测定 p38MAPK 蛋白含量及磷酸化水平

取对数生长期 BV-2 细胞接种于 6 孔板,调节细胞密度为 2.5×10^6 个/ml,继续培养 24 h 左右,更换培养液,每孔加新培养液 2.5 ml。分为空白对照组、LPS(100 ng/ml)处理 24 h 组、MC(10 $\mu\text{mol/L}$)

预处理 1 h+LPS(100 ng/ml)处理 24 h 组和 MC(10 μmol/L)处理组,每组 5 孔。提取各组 BV-2 细胞总蛋白。配制 5%浓缩胶和 12%分离胶,灌胶。每孔上样 25 μg 细胞总蛋白。电泳后,将蛋白质从 SDS-PAGE 凝胶转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。加入适当稀释的一抗(兔抗小鼠 p38MAPK 多克隆抗体、小鼠抗小鼠 p-p38 MAPK 单克隆抗体、羊抗小鼠 β-actin 单克隆抗体,均 1:200 稀释),4℃过夜。充分洗涤后滴加 HRP 标记的二抗(鼠抗羊单克隆抗体、羊抗兔单克隆抗体、大鼠抗小鼠单克隆抗体,均 1:5 000 稀释),37℃孵育 1 h。充分洗涤后,在暗室中进行化学发光法显影,高敏感胶片摄片。采用 HIPAS-1000 全自动医学彩色图像分析系统进行图像分析,计算 Western blot 蛋白条带光密度值(OD),并分别计算各组 p38MAPK/β-actin 蛋白条带光密度比值。

1.3 统计学方法

所有数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 SPSS11.0 统计学软件分析,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两组间比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MC 和(或)LPS 处理后 BV-2 细胞培养上清中 NO 的变化

首先采用酶联免疫 NO 试剂盒检测 BV-2 细胞培养上清中 NO 含量(图 1),空白对照组 NO 含量为 $(6.62 \pm 0.84)\mu\text{mol/L}$ 。LPS 处理组为 $(51.33 \pm 8.63)\mu\text{mol/L}$,与空白对照组比有显著性差异($P < 0.01$)。而 MC(100 μmol/L)处理组 NO 浓度为 $(5.90 \pm 1.29)\mu\text{mol/L}$,与空白对照组比无明显差异($P > 0.05$)。各 MC 浓度组(0.1、1.0、10.0、100.0 μmol/L)预处理 1 h+LPS(100 ng/ml)组 NO 含量分别为 (52.09 ± 10.45) 、 (50.38 ± 7.16) 、 (25.81 ± 1.77) 和 $(26.91 \pm 0.89)\mu\text{mol/L}$,前 2 组与 LPS 组比无显著差异($P > 0.05$),而后 2 组明显低于 LPS 组($P < 0.01$),但仍显著高于空白对照组($P < 0.01$)。

LPS 处理 24 h 能诱导 BV-2 细胞 NO 浓度显著上升,随着预处理 MC 浓度的升高,上清中 NO 的含量逐渐下降,存在明显的量效关系,当 MC 预处理浓度 $> 10 \mu\text{mol/L}$ 时达到平台期。因此,本研究选择 $10 \mu\text{mol/L}$ 为后续实验 MC 预处理浓度。

2.2 MC 和(或)LPS 处理 BV-2 细胞 iNOS 蛋白水平变化

光学显微镜观察表明(图 1):正常 BV-2 细胞在传代后 4 h 即贴壁,生长迅速,细胞形态呈上皮细胞样,每个细胞有 2~3 个突起,突起较细长,细胞核较小。空白对照组、MC(10 μmol/L)处理 1 h 后 BV-2 细胞形态与正常 BV-2 细胞形态变化不大。而 MC(10 μmol/L)+LPS(100 ng/ml)组和 LPS(100 ng/ml)组细胞形态相似,与空白对照组有较大差异,均具有 BV-2 细胞激活后形态特征,即多数细胞聚集成团,大部分胞体肥大、饱满,细胞核大而圆,核仁明显,胞体突起短小。这种细胞形态的变化在 LPS 作用后 1 h 即可观察到,并持续 24 h 左右。

随后采用免疫细胞化学研究发现(图 2):iNOS 蛋白主要在 BV-2 细胞的胞浆、核仁中表达。其中空白对照组、MC 处理组(10 μmol/L)胞浆和核仁中未见 iNOS 蛋白阳性反应棕黄色颗粒,平均光密度值极低,分别为 4.28 ± 0.67 、 4.04 ± 0.94 ,且无显著性差异($P > 0.05$)。而 LPS 处理组胞浆、核仁中均可见大量 iNOS 蛋白阳性反应颗粒,光密度值达到 56.79 ± 1.53 ,较空白对照组有显著性差异($P < 0.01$)。MC(10 μmol/L)+LPS(100 ng/ml)组光密度值为 15.94 ± 1.05 ,显著低于 LPS 处理组($P < 0.01$),但仍显著高于空白对照组($P < 0.01$)。由此可见,MC 预处理可显著降低 LPS 诱导的 BV-2 细胞 iNOS 蛋白的表达。

2.3 MC 和(或)LPS 处理后 BV-2 细胞 iNOS mRNA 的表达

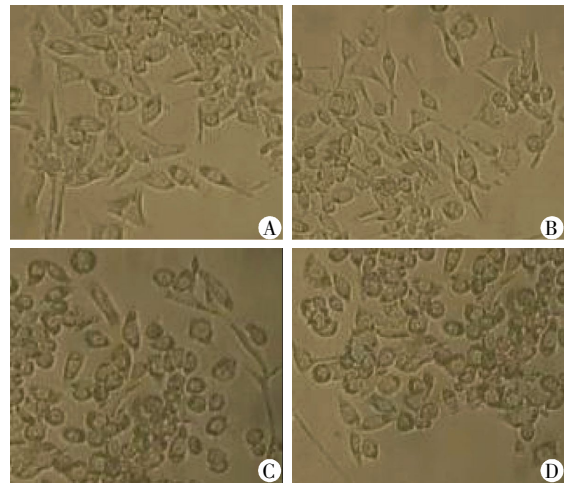
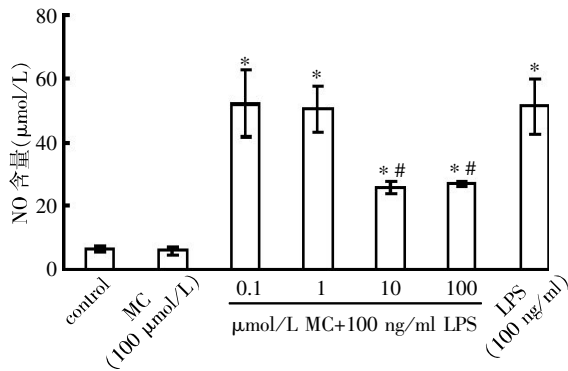
采用 RT-PCR 检测了 iNOS 的 mRNA 水平变化,发现空白对照组和 MC 处理组中 iNOS mRNA 表达水平较低(0.27 ± 0.02 , 0.25 ± 0.01),且无显著性差异($P > 0.05$)。LPS 处理组明显增加(0.73 ± 0.02 , $P < 0.01$)。MC+LPS 组 iNOS 的 mRNA 水平显著低于 LPS 组($P < 0.01$),但较空白对照组仍有显著性差异($P < 0.01$,图 3)。因而,MC 预处理可显著降低 LPS 诱导的 BV-2 细胞 iNOS mRNA 的表达。

2.4 MC 对 LPS 诱导的 BV-2 细胞 p38MAPK 蛋白表达的影响

采用免疫印迹技术观察了 BV-2 细胞 p38MAPK 蛋白水平和磷酸化变化(图 4)。各实验组均可见 p38MAPK 蛋白的表达,p38MAPK/β-actin 蛋白条带光密度比值分别为 1.09 ± 0.04 、 1.12 ± 0.04 、 1.09 ± 0.10 和 1.08 ± 0.05 ,无显著性差异($P < 0.05$)。磷酸化抗体检测发现,空白对照组、MC 处理组未见 p38MAPK 的磷酸化。LPS 处理能明显诱导其磷酸化

水平增加(1.09 ± 0.11),与空白对照组相比有显著差异($P < 0.01$)。且 MC+LPS 组 p-p38MAPK 蛋白表

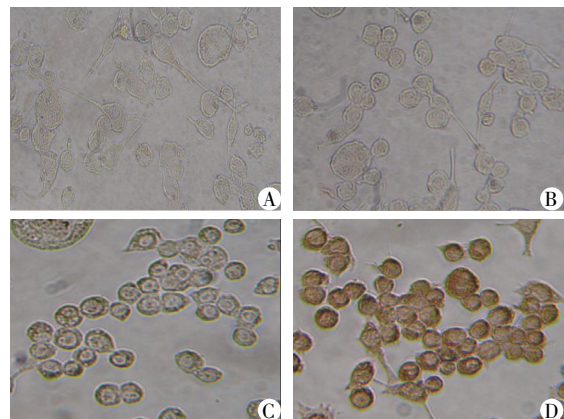
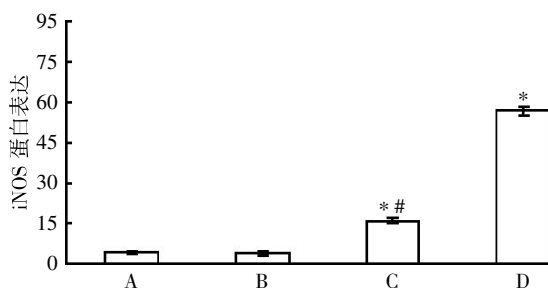
达量较空白对照组显著增高($P < 0.01$),但仍明显低于 LPS(100 ng/ml)组($P < 0.01$)。



与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与 100 ng/ml LPS 组比较, # $P < 0.01$ ($n=5$)。A: 空白对照组; B: MC(10 μmol/L)处理组; C: MC(10 μmol/L)+LPS(100 ng/ml)组; D: LPS(100 ng/ml)组。

图 1 MC 和(或)LPS 处理前后 BV-2 细胞 NO 含量及其形态变化($\times 200$)

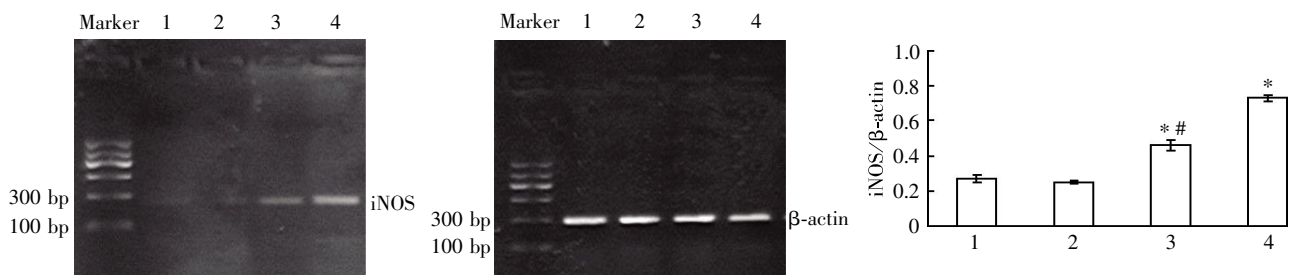
Figure 1 The NO concentration detection in BV-2 and morphological comparison of the cells before and after treatment($\times 200$)



A: 空白对照组; B: MC(10 μmol/L)处理组; C: MC(10 μmol/L)+LPS(100 ng/ml)组; D: LPS(100 ng/ml)组。与空白对照组(A)比较, * $P < 0.01$; 与 LPS 组(D)比较, # $P < 0.01$ ($n=5$)。

图 2 BV-2 细胞 iNOS 蛋白表达变化($\times 400$)

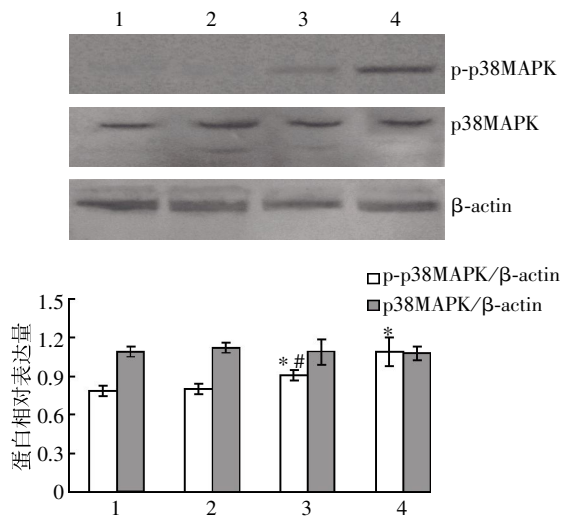
Figure 2 The iNOS protein expression detected by Western blotting in BV-2 cells with different treatment



1: 空白对照组; 2: MC(10 μmol/L)组; 3: MC(10 μmol/L)+LPS(100 ng/ml)组; 4: LPS(100 ng/ml)组。与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与 LPS 组比较, # $P < 0.01$ ($n = 5$)。

图 3 BV-2 细胞 β-actin 基因、iNOS 基因 mRNA 水平变化

Figure 3 The iNOS mRNA detected in BV-2 cells with different treatment



1: 空白对照组; 2: MC (10 μmol/L) 组; 3: MC (10 μmol/L) + LPS (100 ng/ml) 组; 4: LPS (100 ng/ml) 组。与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与 LPS 组比较, # $P < 0.01$ ($n = 5$)。

图 4 BV-2 细胞 p-p38MAPK、p38MAPK 的表达变化

Figure 4 The changes of p-p38MAPK expression in BV-2 cells with different treatment

3 讨论

小胶质细胞在 PD 神经元变性中扮演重要的角色,因此探寻抑制小胶质细胞激活的药物,调节炎症反应介导的神经元损伤,成为当前 PD 研究的重要方向。MC 是半合成的第二代四环素类抗生素,能透过血脑屏障,直接作用脑内神经细胞。研究发现 MC 具有抑制小胶质细胞活性、抗凋亡和抗氧化的特性,且这些特性与 MC 的抗菌作用无关^[6]。近期的研究揭示 MC 对多巴胺能神经元有保护作用^[7],但其作用机制尚未完全阐明。

实验表明 NO 的大量生成是诱导 PD 发病的重要因素^[8]。其中,iNOS 的诱导表达,能持续生成大量的 NO,继而与超氧化物反应产生 ONOO⁻,发挥强的氧化作用^[9],因而,iNOS 与 PD 关系的研究一直受到关注。通过尸检,Hunot 等^[10]发现黑质中表达 iNOS 的胶质细胞密度与正常对照组相比明显增高;Ryu 等^[11]使用 GT1b(trisialogangloside,GT1b)注射入黑质,采用免疫印迹和免疫荧光发现 iNOS 蛋白在注射 GT1b 后 8 h 达高峰,7 d 后基本消失,而且 iNOS 仅位于小胶质细胞,iNOS 的增高先于多巴胺能神经元变性;同时 Choi 等^[12]使用凝血酶注入大鼠黑质证实,iNOS 的表达在 12 h 达高峰且主要表达于小胶质细胞,而非星型胶质细胞,使用 NOS 抑制剂 N-硝基-L-精氨酸甲酯 (L-NAME) 50 mg/kg 腹腔注射可以部分保护凝血酶导致的多巴胺能神经元的缺失,

提示 iNOS 的上调参与了凝血酶对多巴胺能神经元的神经毒性作用。上述证据揭示小胶质细胞 iNOS 上调介导的大量 NO 毒性产物的生成,能增加黑质氧化应激水平,在 PD 发病中发挥重要的致病作用。

LPS 是一种以氨基甙为组成单位的磷脂,是革兰氏阴性杆菌细胞壁的主要成分,可诱导机体表达和释放多种细胞因子和细胞毒性物质如 NO 等。本研究发现 LPS 处理 BV-2 细胞 24 h,能诱导其释放大量的 NO,iNOS 的 mRNA 和蛋白水平显著升高,这与 Jyoti 等^[13]研究结果基本一致,说明 LPS 对小胶质细胞有显著的激活作用。同时本研究也发现在 NO 和 iNOS 水平显著升高的同时,伴随 BV-2 细胞形态显著改变,这与在体研究报道的活化后小胶质细胞产生“灌木丛”样形态相似^[14]。采用免疫组化实验也证实 iNOS 蛋白主要在活化 BV-2 细胞的胞浆及核仁中表达,而静息状态下的 BV-2 细胞几乎不表达,进一步揭示了 iNOS 表达是小胶质细胞激活的主要因素,该实验也进一步支持了 Possel 等^[15]的研究结论。同时深入的研究证实 LPS 能显著上调 p38MAPK 的活性(磷酸化)而不是其基因表达,说明 p38MAPK 信号途径的激活参与了 LPS 对 BV-2 细胞活化的调控。

而用 MC 预处理 BV-2 细胞表明,MC 可部分抑制 LPS 诱导的 NO 释放,同时 MC 也部分下调 iNOS 基因表达,阻断 p38MAPK 信号通路的激活,且这种抑制作用存在量效关系,当 MC 浓度 $\geq 10 \mu\text{mol/L}$ 时效果显著,但 MC 对活化的 BV-2 细胞形态无明显影响。本研究的结果与前人的研究结论相一致,如 Kim 等^[16]利用 Griess 法、Western blot 方法证实,使用较低浓度的 MC (12.5 μmol/L) 即可有效抑制 LPS 诱导的 BV-2 细胞 NO 释放、iNOS 蛋白的表达。此外,Kyoung 等^[17]证实 MC 可显著抑制缺氧诱导的 BV-2 细胞 NO 释放及 iNOS 的表达,并下调 p38MAPK 活性,继而抑制小胶质细胞活化。

综上所述,本研究表明 MC 可通过抑制 p38MAPK 信号途径的激活抑制小胶质细胞的活化、下调 iNOS 的表达及延缓 NO 释放,拮抗 LPS 炎症毒性,阻止多巴胺能神经元变性坏死,对缓解 PD 进展有显著作用。

[参考文献]

[1] Liu B,Gao HM,Wang JY,et al. Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration [J]. Ann NY Acad Sci,2002,962(1):256-253
 [2] Okuno T,Nakatsuji Y,Kumanogoh A,et al. Loss of

- dopaminergic neurons by the induction of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 via CD 40; relevance to Parkinson's disease [J]. *J Neurosci Res*, 2005, 81(6):874-882
- [3] Shen W, Sun SG, Cao XB. Minocycline Protects the Apoptosis of PC12 Cells Induced by 1-Methyl-4-Phenylpyridinium[J]. *JNMU*, 2005, 19(5):247-250
- [4] Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, et al. Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus[J]. *J Neuroimmunol*, 1990, 27(2-3):229-237
- [5] 黄红伟, 沈伟. 脂多糖对 BV-2 细胞的形态及肿瘤坏死因子- α 表达的影响[J]. *临床神经病学杂志*, 2011, 24(5):365-367
- [6] Thomas M, Le WD, Jankovic J. Minocycline and other tetracycline derivatives: a neuroprotective strategy in parkinson's disease and huntington's disease [J]. *Clin Neuropharmacol*, 2003, 26(1):18-23
- [7] Yang LC, Sugama S, Chirichigno JW, et al. Minocycline enhances MPTP toxicity to dopaminergic neurons [J]. *J Neurosci Res*, 2003, 74(2):278-285
- [8] L'Episcopo F, Tirola C, Caniglia S, et al. Combining nitric oxide release with anti-inflammatory activity preserves nigrostriatal dopaminergic innervation and prevents motor impairment in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease [J]. *J Neuroinflammation*, 2010, 7(11):83
- [9] Grisham MB, Jourdain D, Wink DA. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites; implications in inflammation [J]. *Am J Physiol*, 1999, 276 (2 pt 1):G315-321
- [10] Hunot S, Dugas N, Faucheux B, et al. FcEpsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induced, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glia cells[J]. *J Neurosci*, 1999, 19(1):3440-3447
- [11] Ryu JK, Dhin WH, Kim J, et al. Trisialoganglioside GT1b induces *in vivo* degeneration of nigral dopaminergic neurons: role of microglia[J]. *Glia*, 2002, 38(1):15-23
- [12] Choi SH, Joe EH, Kim SU, et al. Thrombin-induced microglia activation products degeneration of nigral dopaminergic neurons in vivo [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(1):5877-5886
- [13] Jyoti JW, Julie AS, Zachary AP, et al. A differential role for mitogen-activated protein kinases in lipopolysaccharide signaling[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(11):9077-9087
- [14] He Y, Appel S, Le W. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum [J]. *Brain Res*, 2001, 909(1-2):187-193
- [15] Possel H, Noack H, Putzke J, et al. Selective upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by lipopolysaccharide (LPS) and cytokines in microglia: in vitro and in vivo studies[J]. *Glia*, 2000, 32(1):51-59
- [16] Kim SS, Kong PJ, Kim BS, et al. Inhibitory action of minocycline on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide and prostaglandin E2 in BV2 microglial cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2004, 27(3):314-318
- [17] Kyoungso S. Minocycline suppresses hypoxic activation of rodent microglia in culture [J]. *Neurosci Lett*, 2002, 366(2):167-171

[收稿日期] 2011-10-14