

## CIC-3 氯通道调节氧糖剥夺所诱导的小胶质细胞的表型转化

董银凤\*,邢青青,常瑶,秦雪,张华

(南京中医药大学护理学院内科护理教研室,江苏 南京 210023)

**[摘要]** **目的:**研究 CIC-3 氯通道在氧糖剥夺所致小胶质细胞表型转化中的作用。**方法:**应用小胶质细胞株(BV-2)制备氧糖剥夺模型,分别给予氯通道阻断剂 DIDS 和 NPPB 预处理 BV-2 细胞。通过 MTT 活性测定确定 BV-2 细胞损伤及药物的有效浓度;通过实时荧光定量 PCR 法测定细胞表型相关分子,如 M1 型相关分子[肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白介素-1 $\beta$ (interleukin 1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、CD86]和 M2 型相关分子[转化生长因子  $\beta$ (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ )、CD206]mRNA 水平的表达;通过 RNA 干扰的方法下调 CIC-3 的表达,再给予氯通道阻断剂 DIDS 和 NPPB 干预,进一步检测细胞的 MTT 活性,观察药物作用效果。**结果:**预先给予 DIDS(1 和 10  $\mu\text{mol/L}$ )和 NPPB(1  $\mu\text{mol/L}$ )能够改善氧糖剥夺所诱导的 BV-2 细胞 MTT 活性下降,抑制 M1 型相关分子如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 CD86 的表达并促进 M2 型相关分子(TGF- $\beta$  和 CD206)的表达;通过 RNA 干扰下调 CIC-3 的表达,能够消除 DIDS 和 NPPB 的作用。**结论:**CIC-3 氯通道参与调控氧糖剥夺所致小胶质细胞的表型转化,阻断 CIC-3 氯通道抑制氧糖剥夺诱导小胶质细胞向 M1 型转化。

**[关键词]** CIC-3 氯通道;氧糖剥夺;小胶质细胞

**[中图分类号]** R743

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)10-1192-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20161009

## CIC-3 chloride channel regulated microglial phenotypic transformation induced by oxygen-glucose deprivation

Dong Yinfeng\*, Xing Qingqing, Chang Yao, Qin Xue, Zhang Hua

(Department of Internal Medicine, Nursing School of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the roles of CIC-3 chloride channel played in the microglial phenotypic transformation induced by oxygen-glucose deprivation. **Methods:** Microglia (BV-2 cell line) was applied to establish the oxygen-glucose deprivation (OGD) model, and then respectively pretreated with different concentrations of chloride channel blockers, including DIDS and NPPB. Cell damage and the effective concentration of drugs were determined by MTT activity. The mRNA level of cell phenotypic factors, such as M1 markers including tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and CD86, M2 markers containing transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and cell surface molecule CD206 were detected by real-time fluorescent quantitative PCR. Expression of CIC-3 was downregulated by small RNA interference, and then pretreated with chloride channels blockers-DIDS and NPPB. Finally, the effects of blockers were observed by the MTT activity. **Results:** Pretreatment with DIDS (1, 10  $\mu\text{mol/L}$ ) and NPPB (1  $\mu\text{mol/L}$ ) could partially reverse the decrease of BV-2 cells viability induced by OGD. DIDS (1  $\mu\text{mol/L}$ ) and NPPB (1  $\mu\text{mol/L}$ ) pretreatment could reduce the mRNA level of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CD86, they could also promote expression of TGF- $\beta$  mRNA. However, the reversal effect of DIDS and NPPB could be abolished by the down-regulation of CIC-3 expression. **Conclusion:** CIC-3 chloride channel is essential for the phenotypic transformation of microglia caused by OGD. Blocking CIC-3 chloride channel could inhibit its transformation into M1 phenotype.

**[Key words]** CIC-3 chloride channel; oxygen-glucose deprivation; microglia

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(10): 1192-1197]

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金 (81402906); 江苏省自然科学基金 (BK20151566); 江苏省高校自然面上项目 (14KJB310010); 江苏省大学生创新训练计划省级指导项目 (2016-84)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: dongyf@njucm.edu.cn

脑卒中是威胁人类健康的重大疾病之一,其病理机制复杂,目前临床尚缺乏理想有效的治疗药物,深入阐明脑卒中的病理机制对脑卒中的药物研发至关重要。研究认为,脑内小胶质细胞所介导的神经炎症反应是影响脑卒中发生、发展以及后期神经再生与修复的重要因素<sup>[1-3]</sup>。小胶质细胞在脑卒中后数小时即可被激活,并产生大量的致炎因子如白介素-1 $\beta$  (interleukin 1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )以及少量的抑炎因子如转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ ),可维持数天甚至数月<sup>[4]</sup>。持续存在的炎症反应是加速缺血性脑损伤所致神经元死亡的重要因素<sup>[5]</sup>。调节小胶质细胞的炎症反应,对脑卒中的病理机制研究及药物研发具有重要意义。氯通道-3 (chloride channel 3, CIC-3) 作为电压门控性氯离子通道的家族成员之一,广泛分布于哺乳动物脑内,在脑内的神经元、胶质细胞、血管内皮细胞和血管平滑肌细胞中均有表达<sup>[6-10]</sup>。研究发现 CIC-3 氯通道通过调节脑内神经递质的传递、氧化应激反应以及机体的炎症反应等过程,从而影响神经元的死亡及胶质细胞的增殖、分化、迁移等<sup>[6-7,10-12]</sup>。CIC-3 氯通道在脑缺血所致神经损伤中作用的研究甚少,且机制不明。因此,本研究通过离体实验揭示 CIC-3 氯通道对氧糖剥夺所致小胶质细胞炎症反应的影响,阐明 CIC-3 氯通道在小胶质细胞功能调节中的重要作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

BV-2 细胞株来自武汉大学中国典型培养物保藏中心细胞库,是小鼠源性永生化的小胶质细胞。细胞培养于正常含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) DMEM 的完全培养基中。

氯通道阻断剂 NPPB 和 DIDS (Tocris 公司,英国),胎牛血清和 DMEM (Gibco 公司,美国),细胞培养板 (Corning 公司,德国),MTT (Sigma 公司,美国),二甲基亚砜 (上海凌峰化学试剂有限公司),转染试剂 (Invitrogen 公司,美国),蛋白提取试剂盒 (南京凯基生物有限公司),蛋白定量试剂盒 (上海碧云天生物研究所),大鼠抗 CD11b、兔抗 CIC-3 (稀释比为 1:800, Abcam 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 分组与给药

将 BV-2 细胞接种于细胞培养板中,随机分为正常对照组、氧糖剥夺组 (OGD 组)、OGD+氯通道阻

断剂 (DIDS 或 NPPB) 干预组。给药方法如下:氧糖剥夺前给予不同浓度 (DIDS 或 NPPB) 预处理,氧糖剥夺完成后,换正常培养基,并继续给予氯通道阻断剂孵育 24 h。

#### 1.2.2 氧糖剥夺模型的建立

将 BV-2 细胞按  $2 \times 10^5$  个/cm<sup>2</sup> 密度接种于 6 孔细胞培养板中,培养 10 h 后,给予不同浓度的氯通道阻断剂 (DIDS 或 NPPB) 孵育 1 h,所有需要制备 OGD 模型组的细胞在弃除正常培养基后,用无菌的 D-Hank's 缓冲液清洗细胞 3 次,再将细胞换成无糖无血清 DMEM 培养基,将细胞培养板放入厌氧盒 (三菱公司,日本)中,厌氧盒内放置耗氧试剂与 pH 指示带 (三菱公司,日本),待 pH 指示带颜色改变,显示缺氧成功后,记录时间,取出细胞培养板并将培养基换成正常 10% 胎牛血清的完全培养基,加入药物继续孵育 24 h。

#### 1.2.3 MTT 活性的测定

参考文献方法,先将正常培养基弃除,再将 96 孔板的每孔加入 180  $\mu$ L 无血清的 DMEM 培养基和 20  $\mu$ L MTT (50 mg/mL),继续培养 4 h。弃上清,每孔加入 200  $\mu$ L 二甲基亚砜,室温振荡 5 min,于自动酶标仪上 (波长 490 nm) 测定吸光值的大小。

#### 1.2.4 实时荧光定量 PCR

应用 TRIzol 裂解法提取总 RNA。6 孔细胞培养板中加入 TRIzol (Invitrogen 公司,美国) 500  $\mu$ L/孔,将细胞收集于 1.5 mL EP 管中,每管加入 100  $\mu$ L 氯仿,颠倒混匀,室温静置 10 min,4 $^{\circ}$ C 离心,吸取上层透明液 (约 300  $\mu$ L) 至另外的 1.5 mL EP 管中,再加入等体积 (300  $\mu$ L) 的异丙醇混匀,室温静置 10 min,4 $^{\circ}$ C 离心,75% 乙醇清洗 3 次,弃除上清,室温风干后每管加入 10  $\mu$ L DEPC 水溶解。逆转录体系含总 RNA 为 500  $\mu$ g 的体积,逆转录酶 2  $\mu$ L,DEPC 水补足总体积至 10  $\mu$ L,逆转录反应条件为:42 $^{\circ}$ C 15 min,87 $^{\circ}$ C 5 s,4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增的体系为 20  $\mu$ L (cDNA 1  $\mu$ L,上、下游引物各 1  $\mu$ L,ROX 7  $\mu$ L,DEPC 水 10  $\mu$ L),PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 10 min,95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 60 s,40 个循环。RT-PCR 引物由南京金斯瑞生物有限公司合成,CIC-3 siRNA 质粒由上海吉玛生物医药有限公司合成,序列见表 1。

#### 1.2.5 CIC-3 siRNA 质粒转染

取 DEPC 水将 siRNA 冻干粉溶解成 25  $\mu$ mol/L 的贮存液。将 BV-2 细胞按  $2 \times 10^5$  个/cm<sup>2</sup> 密度接种于 6 孔细胞培养板中,待细胞生长至 80% 融合时进行转染,取 8  $\mu$ L Lipofectamine 2000 溶于 400  $\mu$ L op-

表 1 本研究涉及的所有引物的序列  
Table 1 Primer sequences used in this study

基因名称	上游 (5'→3')	下游 (5'→3')
GAPDH	CATGGCCTTCCGTGTTCCCTA	CCTGCTTCACCACCTTCTTGAT
TNF- $\alpha$	ACCACGCTCTTCTGTCTACT	GTTTGTGAGTGTGAGGGTCTG
IL-1 $\beta$	GAGGACATGAGCACCTTCTTT	GCCTGTAGTGCAGTTGTCTAA
TGF- $\beta$	TGCGCTTGCAGAGATTAATA	CGTCAAAAAGACAGCCACTCA
CD32	AATCCTGCCGTTCTACTGATC	GTGTCACCGTGTCTTCTTGAG
CIC-3 siRNA	GCCUAGCGCUCAUUAUUAATT	UUAAUAUGAGCGCUAGGCTT

ti-MEM 涡旋混匀, 室温静置 5 min。取 16  $\mu$ L CIC-3 siRNA 的贮存液加入 400  $\mu$ L opti-MEM 中涡旋混匀, 再将其与稀释的 Lipofectamine2000 溶液混匀, 室温孵育 20 min, 形成混合物。将细胞换以新鲜培养基, 并将不同的混合物加入相应孔内, 混匀, 继续培养 8 h 后, 将培养液换为完全新鲜培养液, 继续孵育 48 h。

### 1.3 统计学方法

结果以均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理分析。多组样本均数间比较采用单因素方差分析法, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验法。  $P \leq 0.05$  表示差异有统计学意义。

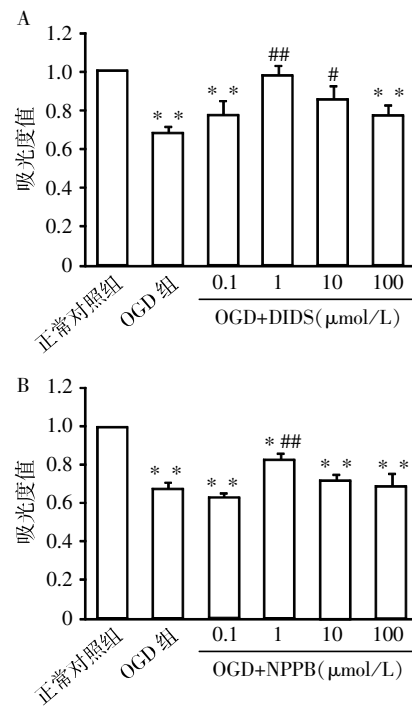
## 2 结果

### 2.1 阻断 CIC-3 氯通道抑制 OGD 所诱导的小胶质细胞活力降低

如图 1 所示, OGD 引起 BV-2 细胞活力降低约 32%; 分别给予不同浓度 (0.1、1.0、10.0 和 100.0  $\mu$ mol/L) 的 CIC-3 氯通道阻断剂 (DIDS 和 NPPB) 预处理后, 均能部分逆转 OGD 引起的细胞活力降低。其中, DIDS 的有效药物浓度为 1.0 和 10.0  $\mu$ mol/L, 以 1.0  $\mu$ mol/L 浓度的作用最佳 (图 1A); 而 NPPB 仅 1.0  $\mu$ mol/L 的浓度显示有较好的保护作用 (图 1B)。结果提示, 阻断 CIC-3 氯通道能够减轻 OGD 引起的小胶质细胞损伤。

### 2.2 阻断 CIC-3 氯通道改善 OGD 引起的小胶质细胞形态改变

正常状态下 (图 2A), BV-2 细胞的胞体呈梭形, 透光度好, 突起细而长, 细胞立体感较强。OGD 导致 BV-2 细胞激活, 细胞立体感变差, 胞体增大、变圆, 突起缩短、增多 (图 2B)。分别给予 DIDS 1.0  $\mu$ mol/L (图 2C) 或 NPPB 1.0  $\mu$ mol/L (图 2D) 预处理后, 能够改善 OGD 引起的细胞形态变化, 表现为部分细胞的胞体增大、变圆或椭圆, 仍有部分细长的突起, 细胞透光性较好。此结果进一步证明阻断 CIC-3 氯通



A: DIDS 对 BV-2 细胞活力的影响; B: NPPB 对 BV-2 细胞活力的影响。与正常对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与 OGD 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,  $n=5$ 。

图 1 CIC-3 氯通道阻断剂对 OGD 所致 BV-2 细胞活力的影响

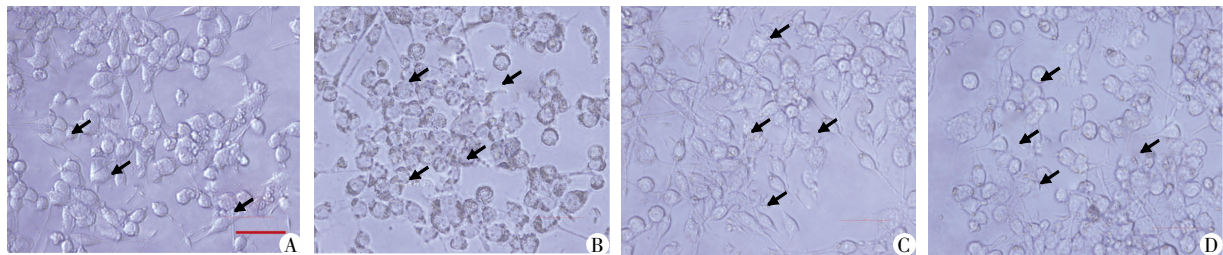
Figure 1 Effects of CIC-3 chloride channel blockers on the cell viability of BV-2 cell line by OGD

道抑制了 OGD 引起的小胶质细胞激活。

### 2.3 siRNA 干扰下调 CIC-3 的表达能够消除 CIC-3 氯通道阻断剂的保护作用

为了进一步验证 CIC-3 氯通道的保护作用, 研究通过 siRNA 技术抑制 CIC-3 的表达, 再分别给予 CIC-3 氯通道阻断剂 (DIDS 和 NPPB) 预处理 BV-2 细胞, 并检测细胞活力的变化。结果如图 3 所示, DIDS 和 NPPB 能够抑制 OGD 诱导的 BV-2 细胞活力的降低, 而干扰 CIC-3 分子的表达后, 该保护作用消失, 并且反而促进细胞活力的降低。结果显示 CIC-3 氯通道参与调节 OGD 所致的小胶质细胞损伤。

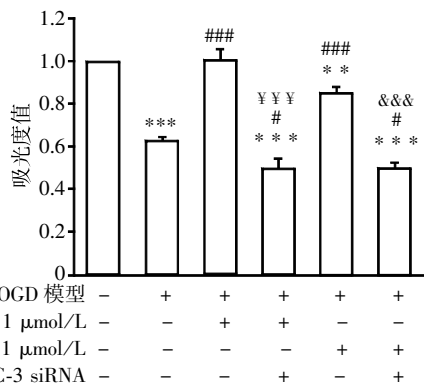
### 2.4 siRNA 干扰下调 CIC-3 的表达可抑制小胶质细



A: 正常对照组;B: OGD 组;C: OGD+DIDS(1 μmol/L)干预组;D: OGD+NPPB(1 μmol/L)干预组(× 400)。

图 2 光学显微镜下观察 CIC-3 氯通道阻断剂及 OGD 对 BV-2 细胞形态变化的影响

Figure 2 Effects of CIC-3 chloride channel blockers and OGD on the changes of BV-2 cell morphology



与正常对照组比较, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; 与 OGD 组比较, \* $P < 0.05$ , ### $P < 0.001$ ; 与 OGD+DIDS 组比较, ¥¥¥ $P < 0.001$ ; 与 OGD+NPPB 组比较, &&& $P < 0.001$ ;  $n=4$ 。

图 3 CIC-3 氯通道参与调节 OGD 引起的 BV-2 细胞损伤  
Figure 3 CIC-3 chloride channel is essential for regulating BV-2 cell injury caused by OGD

### 胞向 M1 型转换

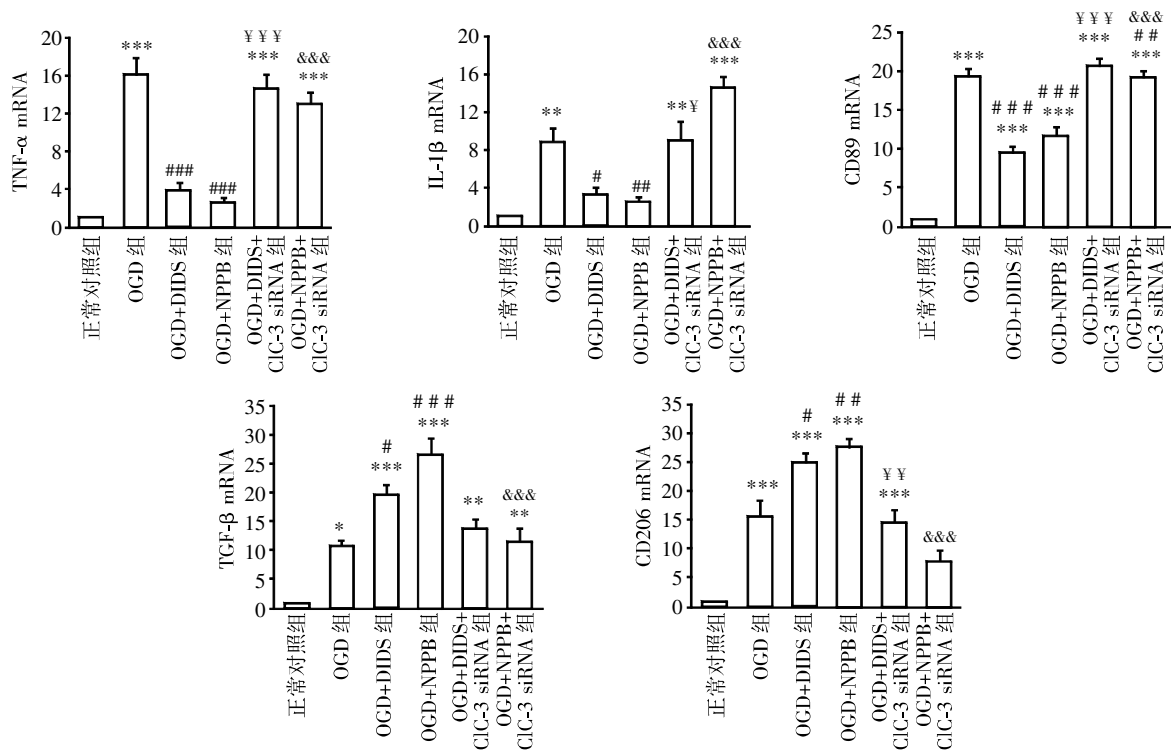
为阐明 CIC-3 氯通道对小胶质细胞功能变化的调节作用,检测了小胶质细胞两种表型 M1 和 M2 型的主要标记物。研究发现,OGD 诱导小胶质细胞 M1 型主要标记物(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 CD86)和 M2 型主要标记物(TGF- $\beta$  和 CD206)的表达上调;分别给予 CIC-3 氯通道阻断剂(DIDS 或 NPPB)预处理,显著抑制 M1 型标记分子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 CD86)的表达上调,促进 M2 型标记分子(TGF- $\beta$  和 CD206)的表达上调;通过 siRNA 干扰 CIC-3 分子的表达,能够部分逆转 CIC-3 氯通道阻断剂的作用(图 4)。提示 CIC-3 氯通道对 OGD 所致小胶质细胞的表型转化有重要调节作用。

### 3 讨论

本研究结果显示,预给氯通道阻断剂(DIDS 和 NPPB)能够减轻 OGD 所引起的小胶质细胞活力下降,抑制致炎因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ )和细胞表面分子 CD32 转录水平的表达增高及抑炎因子(TGF- $\beta$ )的

表达降低,抑制 CIC-3 的表达能够消除 DIDS 和 NPPB 的保护作用,本研究提示 CIC-3 氯通道在 OGD 所致小胶质细胞功能变化中有重要作用。

小胶质细胞是脑内固有的免疫细胞,正常情况下呈静息状态,维持脑内神经元的分化并清除衰老而凋亡的细胞,对大脑的免疫监视与防御发挥重要调控作用<sup>[13-14]</sup>。在外来应激或损伤情况下,小胶质细胞被迅速激活,进入活化状态,活化的小胶质细胞根据功能状态的不同分为 M1 型和 M2 型<sup>[15]</sup>。其中, M1 型活化的小胶质细胞主要释放大量的致炎因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6,引起细胞表面分子 CD32、CD86 等的表达增多<sup>[16-18]</sup>;而 M2 型主要释放抑炎因子如 IL-4、IL-10 和 TGF- $\beta$  等,细胞表面分子主要是 CD206<sup>[19-20]</sup>。小胶质细胞的活化状态决定着其功能。本研究结果显示,OGD 引起小胶质细胞活力降低,诱导致炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和表面分子 CD86 的高表达,对 TGF- $\beta$  和 CD206 的表达也有一定的促进作用,提示 OGD 能够诱导小胶质细胞向 M1 型转化。细胞的代谢状态与其功能密切相关。OGD 导致细胞能量代谢障碍,能够产生大量的活性氧簇、细胞内外离子浓度失衡、乳酸脱氢酶等酸性物质释放至胞外,这些物质均可激活小胶质细胞,使其进入致炎状态<sup>[21]</sup>。在体研究证明脑缺血诱导 M1 型小胶质细胞形成后,能产生并释放大量的致炎因子,加速神经元凋亡,从而加重脑缺血损伤。因此,脑卒中后的神经炎症与脑卒中之间关系密切<sup>[22]</sup>。实际上,机体内的炎症反应根据表现形式不同,可分为经典炎症反应和非经典炎症反应,前者是由于机体防御损伤刺激时发生的一种应激;后者是机体内一种慢性、低反应的炎症状态,也称代谢型炎症,参与机体的老化、代谢综合征的形成等。非经典炎症反应影响脑卒中的发生,而经典的炎症主要影响脑卒中发生后的病理进程,对脑卒中的发展及转归均产生重要的影响。阐明小胶质细胞介导的神经炎症机制对缺



与正常对照组比较, \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; 与 OGD 组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ ; 与 OGD+DIDS 组比较, ¥ $P < 0.05$ , ¥¥ $P < 0.01$ , ¥¥¥ $P < 0.001$ ; 与 OGD+NPPB 组比较, &&& $P < 0.001$ 。n=4。

图 4 CIC-3 氯通道参与调控 OGD 诱导的 BV-2 细胞向 M1 型的转化

Figure 4 CIC-3 chloride channel regulated OGD-induced the transformation of BV-2 cell into M1 phenotype

血性脑损伤的保护作用研究至关重要。

CIC-3 氯通道在体内广泛分布, 并参与细胞多种生理功能与疾病的调节。近年, 众多研究发现, CIC-3 氯通道与炎症之间的关系非常密切。CIC-3 氯通道参与低渗应激诱导的外周巨噬细胞吞噬作用增强<sup>[23]</sup>; CIC-3 氯通道介导的细胞内氯离子外流是介导血管内皮细胞的炎症反应的重要因素<sup>[10]</sup>; 此外, CIC-3 氯通道直接参与炎症性肠病的调节<sup>[12]</sup>。本研究表明, CIC-3 氯通道阻断剂能够减轻 OGD 诱导的小胶质细胞损伤, 抑制小胶质细胞向 M1 型转化; 下调 CIC-3 表达取消了阻断剂的保护作用。本研究提示 CIC-3 氯通道也参与神经炎症的调节。CIC-3 氯通道调节细胞炎症反应的过程, 一方面, 可能由于外界应激引起细胞内外环境的变化, 如 H<sup>+</sup>的大量转运引起细胞内外 Cl<sup>-</sup>浓度的变化及胞内 Cl<sup>-</sup>的重分布, 有利于激活 CIC-3 氯通道<sup>[23]</sup>; 另一方面, 胞外的低 Cl<sup>-</sup>浓度促进炎症信号相关的重要分子—核转录因子 kappa B (nuclear factor kappa B, NF-κB) 的核转位, 从而介导炎症反应<sup>[10]</sup>。此外, 还有报道可能与溶酶体的功能相关<sup>[23]</sup>。本研究涉及的 CIC-3 氯通道调节 OGD 诱导的小胶质细胞的神经炎症的机制尚不明确。但已有研究证实, OGD 模型下, 细胞处于酸性

状态, 且细胞内外有离子分布的改变。

综上所述, 本研究发现 CIC-3 氯通道在 OGD 诱导的小胶质细胞 M1/M2 表型转化中的重要作用, 为小胶质细胞的功能调控及脑卒中后神经炎症的调节提供潜在的重要靶点, 有望为脑卒中的病理机制研究及药物研发的新突破提供实验证据。

【参考文献】

- [1] Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology [J]. Acta Neuropathol, 2010, 119(1): 7-35
- [2] Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation [J]. Trends Neurosci, 2009, 32(12): 638-647
- [3] Gebara E, Sultan S, Kocher-Braissant J, et al. Adult hippocampal neurogenesis inversely correlates with microglia in conditions of voluntary running and aging [J]. Front Neurosci, 2013, 7: 145
- [4] Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation [J]. Nat Med, 2011, 17(7): 796-808
- [5] Jin R, Yang G, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells [J]. J Leukoc Biol, 2010, 87(5): 779-789
- [6] Wang XQ, Deriy LV, Foss S, et al. CLC-3 channels modu-

- late excitatory synaptic transmission in hippocampal neurons[J]. *Neuron*,2006,52(2):321-333
- [7] Riazanski V,Deriy LV,Shevchenko PD,et al. Presynaptic CLC-3 determines quantal size of inhibitory transmission in the hippocampus[J]. *Nat Neurosci*,2011,14(4):487-494
- [8] Lui VC,Lung SS,Pu JK,et al. Invasion of human glioma cells is regulated by multiple chloride channels including CLC-3[J]. *Anticancer Res*,2010,30(11):4515-4524
- [9] Ganapathi SB,Wei SG,Zaremba A,et al. Functional regulation of CLC-3 in the migration of vascular smooth muscle cells[J]. *Hypertension*,2013,61(1):174-179
- [10] Yang H,Huang LY,Zeng DY,et al. Decrease of intracellular chloride concentration promotes endothelial cell inflammation by activating nuclear factor- $\kappa$ B pathway [J]. *Hypertension*,2012,60(5):1287-1293
- [11] Al Ghouleh I,Pagano PJ. Endosomal CLC-3 and Nox1: moving marksmen of redox signaling? [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2011,31(2):240-242
- [12] Huang LY,He Q,Liang SJ,et al. CLC-3 chloride channel/antiporter defect contributes to inflammatory bowel disease in humans and mice[J]. *Gut*,2014,63(10):1587-1595
- [13] Nimmerjahn A,Kirchhoff F,Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma *in vivo* [J]. *Science*,2005,308(5726):1314-1318
- [14] Ransohoff RM,Cardona AE. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma [J]. *Nature*,2010,468(7321):253-262
- [15] Orihuela R,Mcpherson CA,Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states[J]. *Br J Pharmacol*,2016,173(4):649-665
- [16] Ransohoff RM,Brown MA. Innate immunity in the central nervous system [J]. *J Clin Invest*,2012,122(4):1164-1171
- [17] Boche D,Perry VH,Nicoll JA. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*,2013,39(1):3-18
- [18] Chhor V,Le Charpentier T,Lebon S,et al. Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia *in vitro* [J]. *Brain Behav Immun*,2013,32:70-85
- [19] Cherry JD,Olschowka JA,O'banion MK. Neuroinflammation and M2 microglia:the good,the bad,and the inflamed [J]. *J Neuroinflammation*,2014,11:98
- [20] Cherry JD,Olschowka JA. O'banion Mk.are'resting'microglia more'm2'? [J].*Front Immunol*,2014b,18(5):594
- [21] Duong CN,Kim JY. Exposure to electromagnetic field attenuates oxygen-glucose deprivation-induced microglial cell death by reducing intracellular Ca(2+) and ROS[J]. *Int J Radiat Biol*,2016,92(4):195-201
- [22] Wake H,Moorhouse AJ,Miyamoto A,et al. Microglia:actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function[J]. *Trends Neurosci*,2013,36(4):209-217
- [23] Yan Y,Ding Y,Ming B,et al. Increase in hypotonic stress-induced endocytic activity in macrophages via CLC-3 [J]. *Mol Cells*,2014,37(5):418-425

[收稿日期] 2016-05-26

(上接第 1191 页)

- ciated with clonorchis sinensis infection [J]. *PLoS One*,2012,7(8):e42471
- [10] 王三贵,乔 铁,刘衍民,等. 以外科手术为主的 3 种不同方式治疗胆囊结石的疗效对比分析[J]. *中国内镜杂志*,2012,18(12):1285-1288
- [11] 袁 芳. 牛磺熊去氧胆酸治疗单发胆囊结石疗效观察 [J]. *现代预防医学*,2012,39(16):4310-4311,4313
- [12] 范培云,罗 玮,姚勇利. 阿托伐他汀对糖尿病合并胆囊结石者脂代谢的影响 [J]. *现代预防医学*,2011,38(4):767-768,770
- [13] 王 磊,李 峨,莫爵飞,等. 中药治疗早期胆囊结石保胆取石术后患者临床观察 [J]. *北京中医药*,2013,32(1):56-57
- [14] 中华中医药学会脾胃病分会. 胆囊炎中医诊疗共识意见(2011 年,海南)[J]. *中国中西医结合杂志*,2012,32(11):1461-1465
- [15] 刘京山,周东海,赵期康,等. 钬激光对胆囊结石体内碎石效果的临床研究 [J]. *中华外科杂志*,2012,50(9):854-855
- [16] 王长洪,杨 卓,麻树人,等. 鼻胆管注入溶石中药治疗胆总管较大结石疗效观察[J]. *中国中西医结合消化杂志*,2007,15(4):234-236
- [17] 朱方石. 对胆囊结石溶石疗法方药、作用及研究思路的研讨[J]. *江苏中医药*,2003,24(10):1-3
- [18] 罗 正,胡文平,朱 虹,等. 鼻胆管注入加减化石利胆汤对胆总管巨大结石疗效的临床对照研究[J]. *中国中西医结合消化杂志*,2015,23(1):8-13

[收稿日期] 2016-08-03