

• 基础科研论著 •

小胶质细胞在 Tourette 综合征中活化及作用机制研究

张小玲¹, 刘秀梅²

1. 解放军联勤保障部队第 900 医院儿科, 福建 福州 350025; 2. 福建省儿童医院发育行为科

摘要: **目的** 探讨小胶质细胞(MG)在 3,3'-亚氨基二丙腈(IDPN)诱导的 Tourette 综合征(TS)大鼠中的活化及作用机制。**方法** 雄性 Sprague-Dawley 大鼠 36 只,随机分为 TS 组和假用药组(Sham 组),每组 18 只,TS 组腹腔注射 IDPN[300mg/(kg·d),7d],Sham 组腹腔注射生理盐水[5mL/(kg·d),7d]。使用免疫荧光双染检测大鼠纹状体组织 M1 型 MG 标记蛋白诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达及与 MG 活化特异性标记物离子钙接头蛋白-1(Iba-1)共定位的情况,M2 型 MG 标记蛋白精氨酸酶-1(Arg-1)表达及与 Iba-1 共定位的情况;使用酶联免疫吸附法(ELISA)、实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)对大鼠纹状体组织中 iNOS、Arg-1 的表达水平进行定量,同时检测炎症因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)的表达水平。**结果** 大鼠纹状体组织免疫荧光双染显示,相比 Sham 组,TS 组大鼠纹状体组织中 Iba-1、iNOS 的阳性表达均有所增强且呈现共定位,Arg-1 的阳性表达有所降低且与 Iba-1 呈现共定位。ELISA 结果显示,相比 Sham 组,TS 组 M1 型 MG 标记蛋白 iNOS 含量显著升高($t=5.796, P<0.001$),M2 型 MG 标记蛋白 Arg-1 含量显著降低($t=4.348, P<0.01$),炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-10 含量均显著升高($t=5.654, 5.748, 8.231, P<0.001$);qRT-PCR 结果显示,与 Sham 组相比,TS 组 M1 型 MG 标记蛋白 iNOS 的 mRNA 表达水平显著升高($t=9.914, P<0.001$),M2 型 MG 标记蛋白 Arg-1 的 mRNA 表达水平显著降低($t=4.390, P<0.01$),炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-10 的 mRNA 表达水平均显著升高($t=12.056, 14.147, 13.350, P<0.001$)。**结论** IDPN 诱导的 TS 大鼠存在 MG 活化,且 M1 型 MG 上调,M2 型 MG 下调,介导神经炎症。

关键词: Tourette 综合征; 小胶质细胞; 神经免疫; 炎症因子

中图分类号:R749.94 文献标识码:A 文章编号:1008-6579(2024)12-1316-06 doi:10.11852/zgetbjzz2023-1161

Activation and mechanism of microglia in Tourette syndrome

ZHANG Xiaoling¹, LIU Xiumei²

1. Department of Pediatrics, The 900th Hospital of Joint Logistic Support Force, Fuzhou, Fujian 350025, China;

2. Department of Developmental and Behavioral Pediatrics, Fujian Children's Hospital

Corresponding author: LIU Xiumei, E-mail: xmlu0615@126.com

Abstract: **Objective** To investigate the activation and mechanism of microglia (MG) in Tourette syndrome (TS) rats induced by 3,3'-aminodipropionitrile (IDPN). **Methods** Thirty six male Sprague Dawley rats were randomly divided into a TS group and a Sham group (Sham group), with 18 rats in each group. The TS group received intraperitoneal injection of IDPN for 7 days, with the dose of 300mg/(kg·d), while the Sham group received intraperitoneal injection of physiological saline for 7 days, with the dose of 5mL/(kg·d). Double immunofluorescence staining was used to detect the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), a marker protein of M1 type microglia, and its co-localization with Iba-1 (a specific marker for microglial activation) in rat striatum, as well as the expression of arginase 1 (Arg-1) and its co-location with Iba-1 in M2 microglia. The expression levels of iNOS, Arg-1 in rat striatal tissues were quantified by enzyme-linked immunosorbent measurement (ELISA), real-time PCR (qRT-PCR), meanwhile the expression levels of inflammatory cytokines tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-10 (IL-10) were detected. **Results** Immunofluorescence double staining showed that the positive expressions of Iba-1 and iNOS in striatum of TS group were enhanced and co-located compared with Sham group, while the positive expression of Iba-1 and Arg-1 in striatum of TS group decreased and showed co-localization. The ELISA results showed that compared with the Sham group, the TS group had a significant increase in the content of M1 type MG marker protein iNOS ($t=5.796, P<0.001$), a significant decrease in the content of M2 type MG marker protein Arg-1 ($t=4.348, P<0.01$), and a significant increase in inflammatory factors, including TNF- α , IL-6 and IL-10 ($t=5.654, 5.748, 8.231, P<0.001$). The qRT-PCR results showed that compared

基金项目:福建省自然科学基金面上项目(2021J01424)

作者简介:张小玲(1990-),女,硕士研究生,主要研究方向为抽动障碍。

通信作者:刘秀梅, E-mail: xmlu0615@126.com

with the Sham group, the mRNA expression level of iNOS, a M1 type MG marker protein, was significantly increased in the TS group ($t = 9.914, P < 0.001$), while the mRNA expression level of Arg-1, a M2 type MG marker protein, was significantly reduced ($t = 4.390, P < 0.01$), and the mRNA expression levels of inflammatory factors in the TS group, including TNF- α , IL-6 and IL-10 were significantly increased ($t = 12.056, 14.147, 13.350, P < 0.001$). **Conclusion** TS rats induced by IDPN exhibit MG activation, with M1 type MG upregulated and M2 type MG downregulated, thereby mediating neuroinflammation.

Keywords: Tourette syndrome; microglia; neuroimmunity; inflammatory factor

Tourette 综合征(Tourette syndrome, TS)是起病于儿童期的一种常见慢性神经精神障碍,患病率约为 1%^[1]。TS 常常共患一种或多种其他神经发育障碍及神经精神障碍,包括注意缺陷/多动障碍、强迫症、暴怒发作、睡眠问题等,加上其症状多变,病情起伏不定,可导致患儿日常生活和社会功能受损,甚至导致终身疾患,给家庭和社会造成负担^[2]。

TS 的确切病因和发病机制至今不明。越来越多的研究表明,神经免疫失调是 TS 的主要病理生理因素之一^[3-4]。小胶质细胞(microglia, MG)是中枢神经系统的主要免疫细胞,能够不断巡视局部微环境,并通过改变自身基因表达、分泌内容和运动形态,由静息状态转化为活化状态,对有害刺激做出快速反应,在正常大脑发育、健康大脑功能和大脑疾病中发挥重要作用^[5-6]。活化的 MG 可以简单地分为两类,包括 M1 表型和 M2 表型^[7],M1 型 MG 高表达 iNOS 等标记蛋白,M2 型 MG 高表达 Arg1 等标记蛋白。活化的 MG 还可分泌 TNF- α 、IL-6 等促炎细胞因子及 IL-10、IL-12 等炎症抑制因子^[8-9]。研究表明,TS 中枢神经系统中存在持续性炎症改变且 MG 活化异常^[10]。与健康对照组相比,TS 患者基底神经节 MG 相关的转录因子表达上调^[11];另外正电子发射断层成像技术也证实了 TS 患者的 MG 活化比例增加^[12]。这些研究结果表明,MG 活化与 TS 的发生密切相关。然而,TS 中 MG 具体活化情况及作用未见文献报道。本研究通过建立 3,3'-亚氨基二丙腈(3,3'-iminodipropionitrile, IDPN)诱导的 TS 大鼠模型,检测评估 MG 具体活化情况及炎症因子表达水平,探讨 TS 中 MG 活化及作用机制。

1 对象和方法

1.1 TS 动物模型建立 雄性 Sprague-Dawley 大鼠 36 只[购自常州卡文斯实验动物有限公司,实验动物许可证号:SCXK(苏)2016-0010],6~8 周龄,体重(200 $\pm$ 10)g,随机分为 TS 组和 Sham 组,每组 18 只。TS 组大鼠腹腔注射 IDPN[美国 Sigma-

Aldrich,317306,300mg/(kg·d)],Sham 组大鼠腹腔注射生理盐水[300mg/(kg·d)],1 次/d,连续注射 7d。按照文献中的大鼠刻板行为评分方法^[13],用药 7d 后出现头部上下运动和侧摆运动共同频繁出现,伴随频繁而连续的旋转等行为,其中头部抽动的刻板行为明显、易分辨,且抽动频率高,作为 TS 大鼠建模成功的标准。行为学观察结束后,处死所有动物,收集脑组织标本,一部分于 4%多聚甲醛固定;从剩余部分脑组织中分离纹状体组织,-80℃冰箱保存。以上动物实验经福建省妇幼保健院伦理委员会批准(审批号 2021KD)。

1.2 免疫荧光双染观察大鼠 M1 型 MG、M2 型 MG 表达及定位情况 取 TS 组、Sham 组大鼠各取 6 只,将各组大鼠纹状体组织病理切片通过抗原加热修复、封闭内源性过氧化物酶后,先进行 Iba-1 荧光染色(先后加入 Iba-1 抗体、Alexa Fluor® 555 山羊抗兔抗体),再分别进行 iNOS、Arg-1 免疫荧光双染(分别加入 iNOS 抗体、Arg-1 抗体),最后进行细胞核染色,封片后使用荧光显微镜观察、拍照。

1.3 大鼠纹状体 M1 型 MG、M2 型 MG 及炎症因子表达水平检测

1.3.1 ELISA 检测 TS 组、Sham 组大鼠纹状体组织 iNOS、Arg-1、TNF- α 、IL-6、IL-10 表达水平 取 TS 组、Sham 组大鼠各 6 只,处死后,将各组大鼠纹状体组织加入适量生理盐水捣碎,离心 10min(3 000 转/min,离心半径 10cm)取上清作为待测样品。然后分别按照 iNOS、Arg-1、TNF- α 、IL-6、IL-10 试剂盒说明,每孔标准品梯度稀释后加入 50 μ L 的待测样品。在 Excel 工作表中,以标准品浓度作横坐标,对应 OD 值作纵坐标,绘制出标准品线性回归曲线,按曲线方程计算各样本浓度值。

1.3.2 qRT-PCR 检测 TS 组、Sham 组大鼠纹状体组织 iNOS、Arg-1、TNF- α 、IL-6、IL-10 表达水平 取 TS 组、Sham 组大鼠各 6 只,采用 Trizol 试剂提取各组大鼠纹状体组织的总 RNA,根据 TAKARA PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试

剂盒操作步骤去除基因组 DNA 和逆转录反应, SYBR Green 法行 qRT-PCR 反应,反应结束后,由熔解曲线判断 PCR 反应的特异性。所得各样品 Ct 值利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 iNOS、Arg-1、TNF- α 、IL-6、IL-10 mRNA 的相对表达水平,引物序列见表 1。

表 1 iNOS、Arg-1、TNF- α 、IL-6、IL-10 引物序列
Tab. 1 Sequences of primers for iNOS, Arg-1, TNF- α ,

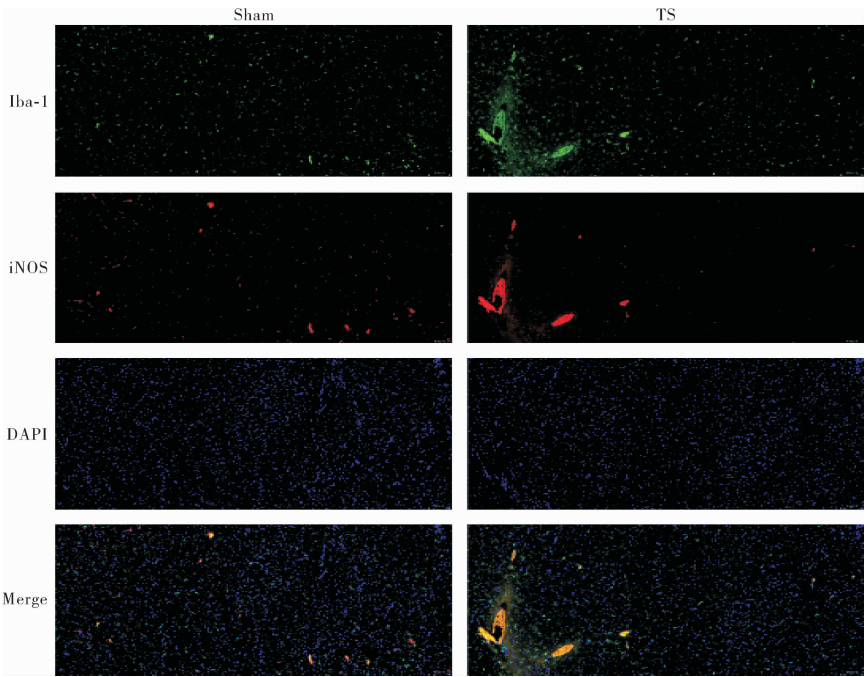
		IL-6, IL and IL-10	
基因名称		引物序列(5'-3')	
TNF- α	F	AACTCGAGTGACAAGCCCGTAG	
	R	GTACCACCAAGTTGGTTGTCTTTGA	
IL-6	F	CCTATTCACAAGTCGGAGGCTTA	
	R	GTGCATCATCGCTGTTTCATACAATC	
IL-10	F	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	
	R	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG	
iNOS	R	ACAGTCTGGGTGAAAGCG	
	F	TGTTGTTGAAGGCGTAGC	
Arg-1	R	AAGAAAAGGCCGATTACCT	
	F	CACCTCCTCTGCTGTCTTCC	
GAPDH(内参)	F	GGGCTTTATTGACAAGATTGCT	
	R	TCGGTAGTCTGACTGAGTGGC	

1.4 统计学方法 所有定量数据均使用 GraphPad Prism8 处理及统计分析。定量数据均为连续量化数据,各组间样本量均相等。两组样本均值间比较采用 t 检验(方差齐的正态分布,采用常规 student's t -test,方差不齐的正态分布,采用 Welch's t -test)。 $P<0.05$ (双侧)为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TS 组、Sham 组大鼠 M1 型 MG、M2 型 MG 表达及定位情况 TS 组、Sham 组大鼠纹状体组织 Iba-1 分别与 iNOS、Arg-1 免疫荧光双染的结果见图 1、图 2。免疫荧光双染显示,与 Sham 组相比,TS 组大鼠纹状体组织中 Iba-1 及 M1 型 MG 标记蛋白 iNOS 的阳性表达均有所增强且呈现共定位,M2 型 MG 标记蛋白 Arg-1 的阳性表达均有所降低且与 Iba-1 呈现共定位,提示 TS 大鼠 M1 型 MG 增多,M2 型 MG 减少。

2.2 TS 组、Sham 组大鼠纹状体 M1 型 MG、M2 型 MG 及炎症因子表达水平



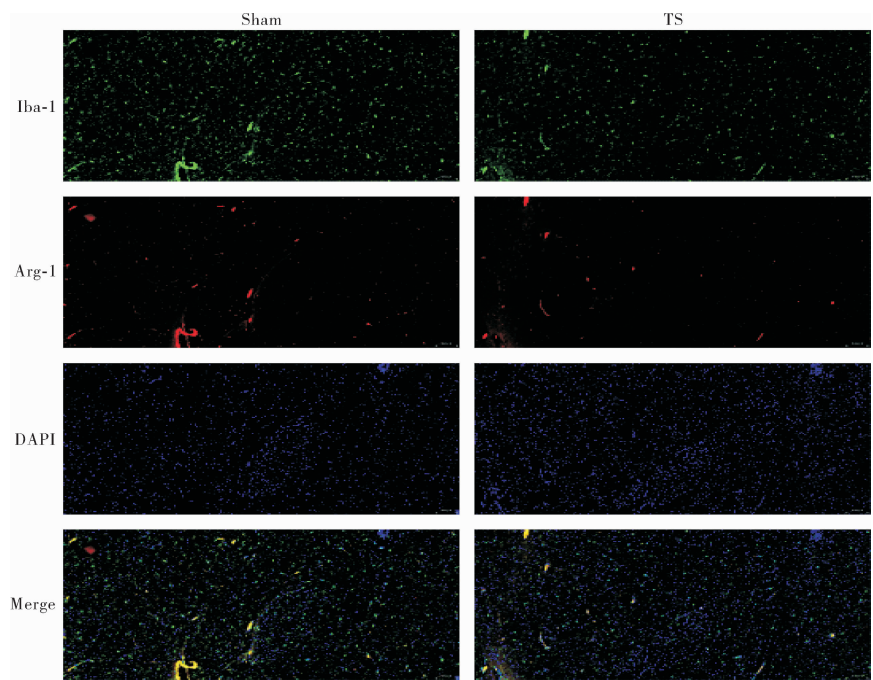
注:绿色的荧光系 Iba-1 阳性表达;红色的荧光系 iNOS 阳性表达;蓝色的荧光系细胞核(DAPI 染色);橙色的荧光系 Iba-1 与 iNOS 阳性表达的共定位呈现(Merge 荧光图片)。

图 1 TS 组、Sham 组大鼠纹状体组织 Iba-1、iNOS 免疫荧光双染结果

Fig. 1 Immunofluorescence of iNOS immunofluorescence of rats in TS and Sham groups

2.2.1 ELISA 检测 TS 组、Sham 组大鼠纹状体组织 MG 标记蛋白及炎症因子水平结果 与 Sham 组相比,TS 组 M1 型 MG 标记蛋白 iNOS 的含量显著

升高($P<0.001$),M2 型 MG 标记蛋白 Arg-1 的含量显著降低($P<0.01$),炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-10 的表达水平均显著增高($P<0.001$)。见表 2。



注:绿色的荧光系 Iba-1 阳性表达;红色的荧光系 Arg-1 阳性表达;蓝色的荧光系细胞核(DAPI 染色);黄色的荧光系 Iba-1 与 Arg-1 阳性表达的共定位呈现(Merge 荧光图片)。

图 2 TS 组、Sham 组大鼠纹状体组织 Iba-1、Arg-1 免疫荧光双染结果

Fig. 2 Immunofluorescence double staining results of Iba-1 and Arg-1 in striatal tissues of TS and Sham groups

表 2 ELISA 检测两组大鼠 M1 型 MG、M2 型 MG 及炎症因子表达水平($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Expression levels of M1 type MG, M2 type MG and inflammatory factors measured by ELISA ($\bar{x} \pm s$)

分组	只数	iNOS(ng/mL)	Arg-1(ng/mL)	IL-6(pg/mL)	IL-10(pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
TS 组	6	62.59 $\pm$ 7.25	18.20 $\pm$ 3.88	58.64 $\pm$ 10.25	40.71 $\pm$ 8.11	91.29 $\pm$ 12.40
Sham 组	6	38.71 $\pm$ 7.01	31.50 $\pm$ 6.41	29.76 $\pm$ 6.81	11.90 $\pm$ 2.80	55.25 $\pm$ 9.49
<i>t</i> 值		5.796	4.348	5.748	8.231	5.654
<i>P</i> 值		<0.001	<0.01	<0.001	<0.001	<0.001

2.2.2 qRT-PCR 检测 TS 组、Sham 组大鼠纹状体组织 MG 标记蛋白及炎症因子水平结果 与 Sham 组相比,TS 组大鼠纹状体中 TNF- α 、IL-6、IL-10、iNOS 的 mRNA 表达水平均显著升高($P<0.001$),

Arg-1 的 mRNA 表达水平显著降低($P<0.01$)。以上研究结果表明,TS 大鼠存在 MG 活化,且 M1 型 MG 增多,M2 型 MG 减少,神经炎症水平增高。见表 3。

表 3 qRT-PCR 检测两组大鼠 M1 型 MG、M2 型 MG 及炎症因子表达水平(Ct 值, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Expression levels of M1 type MG, M2 type MG and inflammatory factors in both rats measured by qRT-PCR(Ct, $\bar{x} \pm s$)

分组	只数	iNOS	Arg-1	IL-6	IL-10	TNF- α
TS 组	6	2.11 $\pm$ 0.20	0.66 $\pm$ 0.12	3.25 $\pm$ 0.32	3.44 $\pm$ 0.38	3.21 $\pm$ 0.39
Sham 组	6	1.04 $\pm$ 0.17	1.09 $\pm$ 0.21	1.15 $\pm$ 0.18	1.15 $\pm$ 0.18	1.16 $\pm$ 0.14
<i>t</i> 值		9.914	4.390	14.147	13.350	12.056
<i>P</i> 值		<0.001	<0.01	<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论

TS 是一种神经发育性运动障碍,被认为是最常见的儿童运动障碍之一,其具体病因和病理生理机制至今不明,给临床治疗带来困难。对 TS 的常见治疗方法如心理行为治疗、药物、物理治疗等主要是

通过对症治疗减轻患儿的抽动症状^[14-16],无法从根本上改善 TS 的预后。TS 的发生机制及治疗问题始终是临床及科研研究的重点和难点。基因遗传、环境暴露、神经递质失衡和免疫异常等因素均被认为与 TS 的发生相关^[3,17-18]。研究表明,MG 介导的神经免疫反应参与 TS 的发生^[11-12]。然而,在 TS

中, MG 具体活化情况及其对神经炎症的影响, 未见文献报道。本研究发现, TS 大鼠纹状体组织中 M1 型 MG 标记蛋白 iNOS 的含量显著升高, M2 型 MG 标记蛋白 Arg-1 的含量显著降低, 炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-10 均显著升高。以上研究结果提示, TS 大鼠 M1 型 MG 增多, M2 型 MG 减少, 神经炎症水平增高。

3.1 TS 中 M1 型 MG、M2 型 MG 活化失衡 MG 是起源于造血巨噬细胞系祖细胞, 是大脑中的常驻免疫细胞。MG 表面表达多种模式识别受体, 能够与病原体相关分子模式及损伤相关分子模式(如 LPS、IL-4、细菌 DNA、病毒 RNA 等)相结合, 从而活化先天免疫系统, 引起一系列细胞内级联反应, 并通过表达细胞因子、趋化因子及产生多巴胺、5-羟色胺等传统神经递质等来调节先天和获得性免疫反应, 进而调控与大脑网络控制相关的行为反应^[19]。MG 活化介导的神经炎症被认为是神经精神障碍相关异常行为发生的大脑生物学基础^[20]。正常情况下 MG 处于静息状态, 通过其细胞体延伸出来的细小突起不断巡视周围环境, 感知中枢神经系统微环境的变化, 参与神经细胞之间的相互作用, 维持中枢神经系统免疫动态平衡^[21]。在局部缺血、感染或神经毒素作用等情况下 MG 可被迅速活化, 形成以 M1 型 MG 和 M2 型 MG 为主的具有不同功能的极化状态。M1 型 MG 高表达 iNOS、CD86 等标记蛋白, 同时可以通过大量表达 TNF- α 、IL-6 等促炎细胞因子, 促进神经炎症及损伤神经元。M2 型 MG 高表达 Arg-1、CD206 等标记蛋白, 同时可以通过大量表达 IL-12、IL-10 等炎症抑制因子及神经营养因子, 抑制神经炎症的同时促进损伤神经再生与修复^[8-9]。研究表明, MG 介导的神经免疫反应参与 TS 的发生, 在 TS 中枢神经系统中存在 MG 活化异常及持续的炎症改变^[10]。然而, 尚无研究描述 TS 中 MG 的具体活化情况及作用。本研究发现 TS 组大鼠纹状体组织 MG 活化特异性标记物 Iba-1 的阳性表达增多且与 iNOS、Arg-1 的阳性表达呈现共定位, iNOS 的含量显著增加, Arg-1 的含量显著降低。iNOS 为 M1 型 MG 特异性表型标志蛋白, Arg-1 为 M2 型 MG 主要表型标记蛋白^[22]。Arg-1 可以与 iNOS 竞争性地结合底物精氨酸, 修复和重塑损伤后的组织, 因此, iNOS 和 Arg-1 可以直接作为衡量 M1/M2 平衡的标记蛋白^[23]。本研究结果表明 TS 大鼠存在 MG 活化, 且 M1 型 MG 增多, M2 型 MG 减少。

3.2 TS 中 MG 相关神经炎症因子表达增加 本研

究同时发现 TS 组大鼠纹状体组织 TNF- α 、IL-6、IL-10 表达水平均显著升高。刘艳艳等^[24]发现 IDPN 构建的抽动障碍大鼠脑组织 IL-6 及 TNF- α 表达水平明显升高且与抽动的严重程度呈正相关, 与本研究结果相似。尽管中枢神经系统中炎症因子的来源包括 MG、星形胶质细胞及多种神经元, 然而, 就诱导神经病变的能力而言, 星形胶质细胞及其他神经元的作用可能比 MG 小的多, 因为由活化的星形胶质细胞及其他神经元产生的炎症因子种类和数量是有限的, 而活化的 MG 具有产生大量炎症因子的潜在特质^[25]。因此, 活化的 MG 是中枢神经系统炎症因子的主要来源。本研究结果表明 TS 大鼠存在 MG 介导的神经炎症反应。早有研究分析了 TS 患者大脑炎症因子表达水平, Hong 等^[26]对 3 例 TS 患者的大脑进行基因转录切割发现壳核 IL-2 受体 β 基因表达显著增加; Morer 等^[27]采用微阵列转录组方法对 TS 患者死后大脑样本进行研究, 发现与健康对照组相比, TS 患者基底神经节 IL-2 基因转录水平较正常人升高 2.3 倍, 同时慢性炎症因子单核细胞趋化因子-1 增加了 6.5 倍。此外, 研究发现 IDPN 诱导的 TS 大鼠脾脏 Treg 细胞比例降低, Th1 和 Th2 增加, 且血浆 IL-4、IL-10、IL-12、 γ -干扰素和 TNF- α 水平升高^[28]。同样, 在 TS 患者外周血中也发现了炎症因子的异常表达。Leckman 等^[29]发现, 与健康对照组相比, TS 患者 TNF- α 和 IL-12 基线水平升高, 且抽动严重程度与 TNF- α 表达水平呈正相关。Gabbay 等^[30]报道共患强迫症的 TS 患者外周血中 IL-2 和 IL-12 水平升高。Cheng 等^[31]还发现了 TS 患者血浆中 IL-6、IL-1 β 和 IL-17 浓度高于健康对照组。这些外周免疫反应和神经炎症提示, 在 TS 中外周免疫系统和中枢神经系统之间存在协调反应。研究表明, 外周免疫系统的激活可以刺激与调节疾病行为症状有关的中枢神经系统炎症因子的分泌。外周免疫系统激活可以通过多种神经和体液途径与神经血管内皮细胞、脑干和脑室周围器官进行通信, 这些免疫衍生信号一旦到达大脑, 就可以通过刺激血管周围巨噬细胞和 MG 产生大量炎症因子进行级联传导^[32-33], 这些炎症因子和次级信号在中枢神经系统产生的级联反应可以导致异常生理和行为反应, 包括刻板行为和社交障碍^[34-35]。这提示 TS 的发生可能与外周免疫反应与神经炎症之间复杂而协调的相互作用有关。

综上, MG 活化且 M1 型 MG 上调 M2 型 MG 下调介导的神经炎症可能直接参与 TS 的发生。

参考文献

- [1] Eapen V, Usherwood T. Tourette syndrome in children[J].

- Aust J Gen Pract, 2021(50):120-125.
- [2] Set KK, Warner JN. Tourette syndrome in children: An update[J]. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 2021(51): 101032.
- [3] Martino D, Johnson I, Leckman JF. What does immunology have to do with normal brain development and the pathophysiology underlying Tourette syndrome and related neuropsychiatric disorders? [J]. *Front Neurol*, 2020(11): 567407.
- [4] Hsu Chia-Jui, Wong Lee-Chin, Lee Wang-Tso. Immunological dysfunction in Tourette syndrome and related disorders [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2); doi: 853.
- [5] Eyo UB, Wu LJ. Microglia: Lifelong patrolling immune cells of the brain[J]. *Prog Neurobiol*, 2019(179): 101614.
- [6] Tay TL, Savage JC, Hui CW, et al. Microglia across the lifespan: From origin to function in brain development, plasticity and cognition[J]. *J Physiol*, 2017(595): 1929-1945.
- [7] Ransohoff RM. A polarizing question: Do M1 and M2 microglia exist? [J]. *Nat Neurosci*, 2016(19): 987-991.
- [8] Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states[J]. *Br J Pharmacol*, 2016(173): 649-665.
- [9] Kumar JM, Won-Ha L, Kyoungso S. Functional polarization of neuroglia: Implications in neuroinflammation and neurological disorders[J]. *Biochem Pharmacol*, 2016(103): 1-16.
- [10] Martino D, Zis P, Buttiglione M. The role of immune mechanisms in Tourette syndrome[J]. *Brain Res*, 2015(1617): 126-143.
- [11] Lenington JB, Coppola G, Kataoka-Sasaki Y, et al. Transcriptome analysis of the human striatum in Tourette syndrome[J]. *Biol Psychiatry*, 2016(79): 372-382.
- [12] Kumar A, Williams MT, Chugani HT. Evaluation of basal ganglia and thalamic inflammation in children with pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infection and Tourette syndrome: A positron emission tomographic (PET) study using ¹¹C-[R]-PK11195[J]. *J Child Neurol*, 2015(30): 749-756.
- [13] Diamond BI, Reyes MG, Borison R. A new animal model for Tourette syndrome[J]. *Adv Neurol*, 1982(35): 221-225.
- [14] Chou CY, Agin-Lieb J, Sheng-Han K, et al. Emerging therapies and recent advances for Tourette syndrome[J]. *Helvion*, 2023(9): e12874.
- [15] Gong H, Du X, Su A, et al. Pharmacological treatment of Tourette's syndrome: From the past to the future[J]. *Neurol Sci*, 2024(45): 941-962.
- [16] Khan K, Hollis C, Murphy T, et al. Digital and remote behavioral therapies for treating tic disorders: Recent advances and next steps [J]. *Front Psychiatry*, 2022(13): 928487.
- [17] Lin WD, Tsai FJ, Chou IC. Current understanding of the genetics of Tourette syndrome[J]. *Biomed J*, 2022, 45(2): 271-279.
- [18] Maia TV, Conceição VA. Dopaminergic disturbances in Tourette syndrome: An integrative account[J]. *Biol Psychiatry*, 2018(84): 332-344.
- [19] Dwyer JB, Ross DA. Modern microglia: Novel targets in psychiatric neuroscience[J]. *Biol Psychiatry*, 2016(80): e47-49.
- [20] Wohleb ES, Delpech JC. Dynamic cross-talk between microglia and peripheral monocytes underlies stress-induced neuroinflammation and behavioral consequences[J]. *Prog Neuro-Psychoph*, 2017, 79(Pt A): 40-48.
- [21] Umpierre AD, Wu LJ. How microglia sense and regulate neuronal activity[J]. *Glia*, 2021(69): 1637-1653.
- [22] Chhor V, Le Charpentier T, Lebon S, et al. Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarized primary microglia in vitro[J]. *Brain Behav Immun*, 2013(32): 70-85.
- [23] Büttner P, Werner S, Baskal S, et al. Arginine metabolism and nitric oxide turnover in the ZSF1 animal model for heart failure with preserved ejection fraction[J]. *Sci Rep*, 2021(11): 20684.
- [24] 刘艳艳, 陈燕惠. 亚氨基二丙腈构建的抽动障碍大鼠脑组织 IL-6 及 TNF- α 变化及意义[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2014, 21(5): 340-343.
- Liu YY, Chen YH. Changes and significance of IL-6 and TNF- α in brain tissue of rats with tic disorder induced by iminodipropionitrile[J]. *Chinese Journal of Neuroimmunology and Neurology*, 2014, 21(5): 340-343. (in Chinese)
- [25] Salvador AF, de Lima KA, Kipnis J. Neuromodulation by the immune system: A focus on cytokines[J]. *Nat Rev Immunol*, 2021(21): 526-541.
- [26] Hong JJ, Loiseleur CR, Yoon DY, et al. Microarray analysis in Tourette syndrome postmortem putamen[J]. *J Neurol Sci*, 2004(225): 57-64.
- [27] Morer A, Chae W, Henegariu O, et al. Elevated expression of MCP-1, IL-2 and PTPN-22 in basal ganglia of Tourette syndrome cases [J]. *Brain Behav Immun*, 2010(24): 1069-1073.
- [28] Liu X, Wang X, Cao A, et al. Immune function changes of the IDPN-induced Tourette syndrome rat model[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2021(81): 159-166.
- [29] Leckman JF, Katsoyich L, Kawikova I, et al. Increased serum levels of interleukin-12 and tumor necrosis factor- α in Tourette's syndrome[J]. *Biol Psychiatry*, 2005(57): 667-673.
- [30] Gabbay V, Coffey BJ, Guttman LE, et al. A cytokine study in children and adolescents with Tourette's disorder[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2009(33): 967-971.
- [31] Cheng YH, Zheng Y, He F, et al. Detection of autoantibodies and increased concentrations of interleukins in plasma from patients with Tourette's syndrome[J]. *J Mol Neurosci*, 2012(48): 219-224.
- [32] Gosselin D, Rivest S. MyD88 signaling in brain endothelial cells is essential for the neuronal activity and glucocorticoid release during systemic inflammation[J]. *Molecular psychiatry*, 2008(13): 480-497.
- [33] Serrats J, Schiltz JC, Garcia-Bueno B, et al. Dual roles for perivascular macrophages in immune-to-brain signaling[J]. *Neuron*, 2010(65): 94-106.
- [34] Dantzer R. Cytokine-induced sickness behavior: Mechanisms and implications[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2001(933): 222-234.
- [35] Wohleb ES, Powell ND, Godbout JP, et al. Stress-induced recruitment of bone marrow-derived monocytes to the brain promotes anxiety-like behavior[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2013(33): 13820-13833.