

胸腺素β4抑制BV2小胶质细胞焦亡及其机制研究

李叶璇^{1,2} 陈纯玲² 郑淑丹² 赖可欣² 杨正² 邓医宇³ 郭予雄^{1,2}

[1.广东省心血管病研究所, 广东省人民医院, 广东省医学科学院, 广东广州 510080; 2.南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)儿科重症监护室, 广东广州 510080; 3.南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)重症医学科, 广东广州 510080]

[摘要] **目的** 探究胸腺素β4 (thymosin beta 4, Tβ4) 对BV2小胶质细胞焦亡的保护作用及分子机制。**方法** 将BV2细胞分为对照组(不作任何处理)、焦亡组[1 μg/mL脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激12 h后, 给予10 μmol/L尼日利亚菌素(Nigericin, Nig)处理1 h]、Tβ4处理组(同步给予LPS、Nig后, 1 μg/mL Tβ4处理1 h)。通过LPS联合Nig处理BV2小胶质细胞, 构建脓毒症相关性脑病体外模型。采用CCK-8法检测Tβ4对BV2细胞的细胞活力, 反转录实时荧光定量PCR法检测白细胞介素(interleukin, IL)-1β、干扰素诱导蛋白四肽重复序列1、β干扰素mRNA表达水平, 酶联免疫吸附试验检测细胞上清液中IL-1β水平, Western blot法检测NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3、消皮素D N端片段、切割型胱天蛋白酶1、磷酸化干扰素基因刺激因子、磷酸化干扰素调节因子3蛋白表达水平, 流式细胞术结合碘化丙啶染色检测细胞死亡率, MitoSOX荧光指示剂检测细胞线粒体活性氧水平。**结果** 与焦亡模型组比较, Tβ4处理组BV2细胞焦亡形态损伤减轻, 细胞内IL-1β、干扰素诱导蛋白四肽重复序列1、β干扰素mRNA表达与细胞上清IL-1β含量、NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3、消皮素D N端片段、切割型胱天蛋白酶1、磷酸化干扰素基因刺激因子、磷酸化干扰素调节因子3蛋白表达及细胞死亡率、线粒体活性氧水平降低($P<0.05$)。**结论** Tβ4可改善LPS+Nig诱导的BV2小胶质细胞焦亡损伤, 抑制氧化应激与炎症反应, 其机制可能与cGAS-STING信号通路有关。

[中国当代儿科杂志, 2026, 28 (7): 877-884]

[关键词] 胸腺素β4; 细胞焦亡; 炎症; cGAS-STING信号通路; 小胶质细胞

Thymosin β4 inhibits pyroptosis in BV2 microglial cells: a mechanistic study *in vitro*

LI Ye-Xuan, CHEN Chun-Ling, ZHENG Shu-Dan, LAI Ke-Xin, YANG Zheng, DENG Yi-Yu, GUO Yu-Xiong. Guangdong Cardiovascular Institute, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China (Guo Y-X, Email: guoyuxiong@gdph.org.cn)

Abstract: Objective To investigate the protective effects and molecular mechanisms of thymosin β4 (Tβ4) on pyroptosis in BV2 microglial cells. **Methods** BV2 cells were divided into three groups: control group (no treatment), pyroptosis group [stimulated with 1 μg/mL lipopolysaccharide (LPS) for 12 hours, followed by 10 μmol/L nigericin (Nig) treatment for 1 hour], and Tβ4 treatment group (co-incubated with LPS and Nig, then treated with 1 μg/mL Tβ4 for 1 hour). An *in vitro* sepsis-associated encephalopathy model was established by LPS and Nig co-treatment. Viability of BV2 cells was assessed by CCK-8 assay. RT-qPCR was performed to detect mRNA expression of interleukin (IL)-1β, interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 (IFIT1), and interferon-β (IFN-β). IL-1β levels in cell supernatants were measured by ELISA. Protein expression of NLRP3, GSDMD-N, cleaved caspase-1, phosphorylated stimulator of interferon genes (p-STING), and phosphorylated interferon regulatory factor 3 (p-IRF3) was analyzed by Western blot. Cell death rate and mitochondrial reactive oxygen species (ROS) levels were detected by flow cytometry using propidium iodide staining and MitoSOX indicator, respectively. **Results** Compared with the pyroptosis group, Tβ4 treatment alleviated morphological damage caused by pyroptosis in BV2 cells. Intracellular mRNA expression of IL-

[收稿日期] 2025-12-23; [接受日期] 2026-06-01

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82272189)。

[作者简介] 李叶璇, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 郭予雄, 男, 主任医师。Email: guoyuxiong@gdph.org.cn。

IL-1 β , IFIT1, and IFN- β ; IL-1 β concentration in supernatant; protein expression of NLRP3, GSDMD-N, cleaved caspase-1, p-STING, and p-IRF3; cell death rate; and mitochondrial ROS levels were significantly decreased ($P<0.05$).

Conclusions T β 4 protects BV2 microglial cells against LPS and Nig-induced pyroptosis by inhibiting oxidative stress and inflammatory responses, potentially through regulation of the cGAS-STING signaling pathway.

[Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2026, 28(7): 877-884]

Key words: Thymosin β 4; Pyroptosis; Inflammation; cGAS-STING signaling pathway; Microglia

脓毒症相关性脑病 (sepsis-associated encephalopathy, SAE) 是脓毒症引起的严重中枢神经系统并发症, 以认知功能障碍、意识状态改变为核心临床表现, 严重影响脓毒症患者预后并显著增加病死率^[1-2]。现有研究证实, 神经炎症是调控SAE发生发展的核心因素^[3]。该病理进程中, 小胶质细胞异常活化是触发炎症级联反应的关键环节^[4]。过度活化引发的炎症反应可诱导小胶质细胞发生强促炎特性的程序性细胞死亡——细胞焦亡, 发生焦亡的小胶质细胞持续释放大量促炎细胞因子^[5], 形成“炎症-焦亡-炎症放大”的恶性循环, 在SAE中发挥决定性作用^[6]。例如, Huang等^[7]发现敲低小鼠 *TRIM45* 基因可显著抑制 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3) / 胱天蛋白酶 1 (cysteine aspartic acid specific protease-1, caspase-1) 通路介导的小胶质细胞焦亡, 减少促炎因子释放, 进而缓解神经损伤和认知功能障碍。Jing等^[8]的研究表明, 过表达含 OTU 结构域去泛素化酶 1 可通过调控 HK2/NLRP3 信号轴促进小胶质细胞焦亡, 进而诱发神经元损伤与认知功能障碍; *OTUD1* 基因缺失可有效抑制焦亡通路, 减轻神经功能缺损。Zeng等^[9]发现, 应用焦亡抑制剂富马酸二甲酯可显著抑制盲肠结扎穿孔术构建的脓毒症小鼠模型中小胶质细胞焦亡, 下调海马组织白细胞介素 (interleukin, IL) -1 β 等促炎因子水平, 提升小鼠存活率并改善认知功能。综上, 无论是病理机制层面的干预验证, 还是治疗方案的初步探索, 靶向抑制小胶质细胞焦亡均表现出良好的神经保护效应。同时, cGAS-STING 通路是 NLRP3 炎症小体介导细胞焦亡的关键上游启动信号^[10]。活化的干扰素基因刺激因子 (stimulator of interferon genes, STING) 可磷酸化干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3), 促进 IRF3 入核并激活 NLRP3 转录, 为细胞焦亡的发生提供必需的分子基础。因此, 以小胶质细胞过度炎症反应及其介导的细胞焦亡为研究切入点, 有望为 SAE 的治疗提供新的理论依据。

胸腺素 β 4 (thymosin β 4, T β 4) 是内源性多功能多肽, 为胸腺素家族在哺乳动物细胞内高丰度表达的关键成员, 在胸腺、脑、心脏及巨噬细胞等多种组织与细胞中均维持较高浓度^[11]。既往研究表明, T β 4 可在抑制炎症反应^[12]、细胞凋亡^[13]及氧化应激损伤^[14]等多种生理病理过程中发挥重要调节作用。另有研究显示, 在人原代巨噬细胞与肝星状细胞模型中, T β 4 可显著下调脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) / 三磷酸腺苷诱导的 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白质及 caspase-1 蛋白表达, 并减少 IL-1 β 释放^[15]。此外, 在大鼠脊髓损伤等中枢神经损伤模型中, T β 4 干预可显著减少 ED-1⁺ 小胶质细胞/巨噬细胞的浸润, 降低促炎细胞因子水平, 同时上调抗炎因子 IL-10 表达^[16]。上述研究结果为 T β 4 作为 SAE 潜在治疗靶点提供了直接理论依据。基于此, 本研究拟阐明 T β 4 对小胶质细胞焦亡的抑制作用及其分子机制, 为探索 SAE 的新型治疗策略提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

BV2 细胞购自赛百慷 (上海) 生物技术股份有限公司; T β 4 冻干粉剂购自上海易恩化学技术有限公司; 大肠杆菌来源 LPS 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 尼日利亚菌素 (Nigericin, Nig) 购自北京拜尔迪生物技术有限公司; 小鼠 IL-1 β 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂盒购自杭州联科生物技术股份有限公司; 反转录试剂预混液、SYBR 预混型 qPCR 试剂盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司; NLRP3、消皮素 D N 端片段 (gasdermin D N-terminal fragment, GSDMD-N)、切割型胱天蛋白酶 1 (cleaved caspase-1) 抗体购自英国 Abcam 公司; 磷酸化 STING (phosphorylated STING, p-STING)、磷酸化 IRF3 (phosphorylated IRF3, p-IRF3) 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司; GAPDH 抗体及二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司; CCK-8 试剂盒购自北京兰杰柯科技有限公司; 碘化丙啶

(propidium iodide, PI) 荧光染料购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司; MitoSOX 超氧化物指示剂、DMEM 培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 细胞培养与实验分组

将 BV2 细胞系培养于含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素双抗的 DMEM 培养基中, 培养瓶置于 5% CO₂、37 ℃ 的细胞培养箱中培养。取对数生长期的 BV2 细胞, 将 BV2 细胞接种至 6 孔板中, 待细胞长至 80% 后, 分为以下 3 组: 对照组(不作任何处理)、焦亡组(1 μg/mL LPS 刺激 12 h 后, 给予 10 μmol/L Nig 处理 1 h)、Tβ4 处理组(同步给予 LPS、Nig 后, 1 μg/mL Tβ4 处理 1 h)。

1.3 ELISA 检测

按 1.2 分组处理细胞, 刺激结束后收集细胞上清至 2 mL 离心管。4 ℃、1 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液。按试剂盒说明书配液和操作, 显色后 0.5 h 内上机测定吸光度; 根据标准品浓度与对应吸光度值绘制标准曲线, 计算样本蛋白浓度并统计分析。实验独立重复 3 次。

1.4 Western blot 检测

按 1.2 分组处理细胞, 收集细胞后加入 RIPA 裂解缓冲液提取总蛋白, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品 95 ℃ 变性 5 min, 经凝胶电泳后转印至聚偏二氟乙烯膜。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入 NLRP3、GSDMD-N、cleaved caspase-1、p-STING、p-IRF3、GAPDH (均按 1:1 000 稀释) 一抗工作液, 4 ℃ 孵育过夜; 加入

二抗(按 1:10 000 稀释), 室温孵育 2 h。滴加特超敏 ECL 化学发光试剂显影成像, 以 GAPDH 为内参, Image J 软件分析条带的灰度值。实验独立重复 3 次。

1.5 CCK-8 检测

取对数生长期 BV2 细胞, 以 5×10^3 个细胞/孔的密度接种于 96 孔板, 置于培养箱内培养 12 h。随后按以下分组干预。(1) 浓度梯度组: 弃去原培养基, 每孔加入 100 μL 含不同浓度 Tβ4 (0、0.25、0.5、1、2、4 μg/mL) 的完全培养基处理 24 h。(2) 时间梯度组: 采用终浓度 1 μg/mL 的 Tβ4 分别孵育 0、12、24、48、72 h。各组均设 6 个复孔与无细胞空白对照孔。处理结束后, 弃去孔内培养基, 每孔加入 100 μL 含 10% CCK-8 试剂的基础培养基继续孵育 1.5 h。采用酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度。上述实验均独立重复 3 次。

1.6 反转录实时荧光定量 PCR 检测

按 1.2 分组处理细胞, 参照试剂盒说明书提取总 RNA, 配制反转录体系, 采用 SYBR Green I 法行 qPCR 检测。反应体系 (20 μL): 2×SYBR Green Pro Taq HS Premix 10 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL, 无酶水 9 μL, 每样本设 3 复孔。反应条件: 95 ℃ 预变性 2 min; 95 ℃ 变性 30 s, 65 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环; 扩增后熔解曲线验证扩增特异性。以 GAPDH 为内参, 2^{-ΔΔCt} 法计算目标基因相对表达量。实验独立重复 3 次。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	上游引物序列 (5'→3')	下游引物序列 (5'→3')
<i>IL-1β</i>	TGCCACCTTTTGACAGTGATG	TGATGTGCTGCTGCCAGATT
<i>IFIT1</i>	GGTTTCCAAGAAGAAACATGGC	GGCTTCTGGGTACATACCTGA
<i>IFN-β</i>	TCCAACCTCTCCTACTACACCAG	GGCTCAGGGATGAACCTCTCTC
<i>GAPDH</i>	TGGAGCCAAAAGGCTCATCA	ATGAGCCCTTCCACAATGCC

1.7 PI 染色流式细胞检测

调整 BV2 细胞密度至 2×10^5 个细胞/mL, 接种于 12 孔板培养 12 h。按 1.2 分组处理细胞, 干预完成后收集细胞至离心管。配置 5 μg/mL 的 PI, 每管加入 0.5 mL PI 染液重悬细胞, 转移至流式专用 EP 管, 冰上静置待上机检测。采用流式细胞仪 PE-A 通道检测细胞荧光强度, FlowJo 软件定量荧光数据, GraphPad Prism 软件完成拟合与统计分析。实

验独立重复 3 次。

1.8 线粒体活性氧流式检测

调整 BV2 细胞密度至 2×10^5 个细胞/mL, 接种于 12 孔板培养 12 h。按 1.2 分组处理细胞, 干预完成后弃培养基。以无血清 DMEM 稀释 MitoSOX 荧光染料, 每孔加入 0.3 mL 染液, 37 ℃ 避光孵育 30 min。收集细胞至流式专用 EP 管, 冰上静置待上机检测。采用流式细胞仪 PE-A 通道检测细胞荧

光强度，FlowJo 软件定量荧光数据，GraphPad Prism 软件完成拟合与统计分析，以平均荧光强度（mean fluorescence intensity, MFI）表示线粒体活性氧（mitochondrial reactive oxygen species, mtROS）相对水平。实验独立重复 3 次。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件、GraphPad Prism 10 软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，两组比较采用两样本 *t* 检验；多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 Tukey's HSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

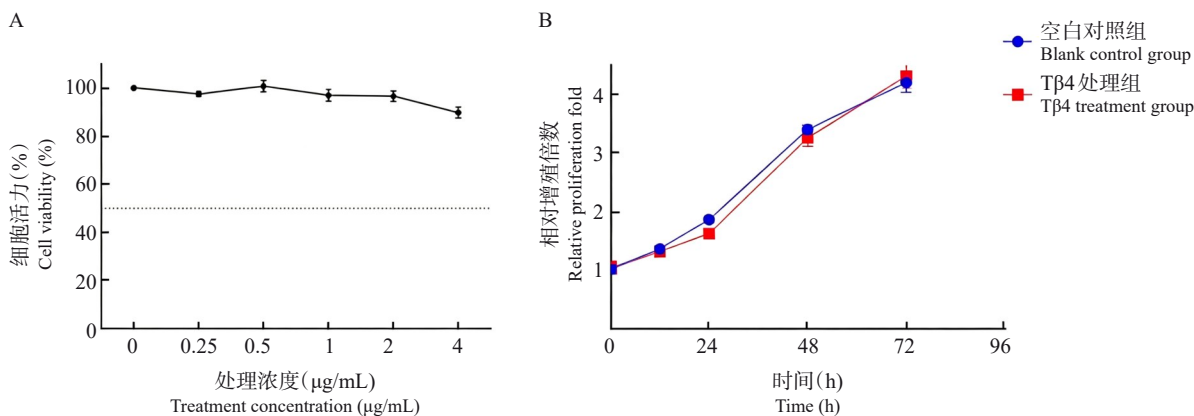


图1 Tβ4对BV2细胞活力与增殖的影响 A: 不同浓度Tβ4处理24 h后对BV2细胞活力的影响; B: 1 μg/mL Tβ4干预不同时间对BV2细胞增殖的影响。

2.2 Tβ4对BV2细胞炎症反应的影响

反转录实时荧光定量PCR和ELISA检测结果显示，与对照组相比，焦亡组IL-1β、β干扰素（interferon-β, IFN-β）、干扰素诱导蛋白含四肽重复序列1（interferon-induced protein with tetratricopeptide

2 结果

2.1 Tβ4对BV2细胞活力与增殖的影响

CCK-8 检测结果显示，与空白对照组（100% $\pm$ 0%）比较，0.25~2 μg/mL不同浓度Tβ4组细胞活力比较差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）；4 μg/mL Tβ4组细胞活力（89.8% $\pm$ 2.3%）与空白对照组比较差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ），后续实验采用1 μg/mL Tβ4干预处理（图1A）。0~72 h各时间点Tβ4处理组细胞相对增殖倍数与空白对照组比较差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）（图1B）。提示1 μg/mL Tβ4作用72 h内对BV2细胞增殖无明显细胞毒性。

repeats 1, IFIT1) mRNA 表达及细胞上清液中IL-1β含量升高（ $P < 0.05$ ）；与焦亡组相比，Tβ4处理组IL-1β、IFN-β、IFIT1 mRNA表达及细胞上清液中IL-1β含量降低（ $P < 0.05$ ）。见表2。

表2 各组IL-1β、IFN-β、IFIT1 mRNA相对表达量和细胞上清液中IL-1β水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	IL-1β mRNA	IFN-β mRNA	IFIT1 mRNA	IL-1β (pg/mL)
对照组	1.030 $\pm$ 0.022	1.010 $\pm$ 0.013	1.03 $\pm$ 0.08	0.72 $\pm$ 0.18
焦亡组	47.440 $\pm$ 2.471 ^a	1.851 $\pm$ 0.084 ^a	15.33 $\pm$ 0.90 ^a	11.73 $\pm$ 1.76 ^a
Tβ4处理组	21.730 $\pm$ 2.185 ^{a,b}	1.529 $\pm$ 0.042 ^{a,b}	10.56 $\pm$ 1.02 ^{a,b}	2.43 $\pm$ 0.39 ^{a,b}
<i>F</i> 值	446.91	61.14	253.82	96.26
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：a 示与对照组比较， $P < 0.05$ ；b 示与焦亡组比较， $P < 0.05$ 。[Tβ4] 胸腺素 β4；[IL-1β] 白细胞介素 1β；[IFN-β] β干扰素；[IFIT1] 干扰素诱导蛋白含四肽重复序列 1。

2.3 Tβ4对BV2细胞cGAS-STING信号通路相关蛋白的影响

Western blot 检测结果显示，与对照组相比，

p-IRF3、p-STING蛋白表达水平上升（ $P < 0.05$ ）；与焦亡组相比，Tβ4处理组p-STING、p-IRF3蛋白表达水平降低（ $P < 0.05$ ）。见图2、表3。

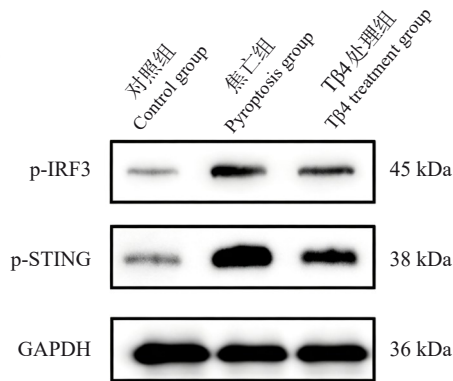


图 2 Western blot 检测各组 cGAS-STING 通路相关蛋白表达条带图

2.4 Tβ4 对 BV2 细胞焦亡的保护作用

光学显微镜观察 BV2 细胞形态结果显示，与对照组比较，焦亡组细胞体积明显肿胀，出现空泡样改变，部分细胞膜完整性被破坏，可见胞质外泄、细胞轮廓模糊等焦亡特征性形态学变化，视野内漂浮的死亡细胞数量明显增加；与焦亡组比较，Tβ4 处理组细胞焦亡形态损伤明显减轻，多数细胞维持良好贴壁状态，细胞形态趋于规整，

表 3 各组 p-IRF3、p-STING 蛋白表达水平比较

($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	p-IRF3	p-STING
对照组	0.241 ± 0.020	0.11 ± 0.03
焦亡组	0.743 ± 0.112 ^a	0.56 ± 0.08 ^a
Tβ4 处理组	0.304 ± 0.040 ^{a,b}	0.30 ± 0.04 ^{a,b}
<i>F</i> 值	23.85	58.97
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001

注：a 示与对照组比较， $P<0.05$ ；b 示与焦亡组比较， $P<0.05$ 。
[Tβ4] 胸腺素 β4；[p-IRF3] 磷酸化干扰素调节因子 3；
[p-STING] 磷酸化干扰素基因刺激因子。

仅少量细胞出现轻度肿胀（图 3）。Western blot 检测结果显示，与对照组比较，焦亡组细胞焦亡相关蛋白 NLRP3、GSDMD-N 及 cleaved caspase-1 表达水平升高（ $P<0.05$ ）；与焦亡组比较，Tβ4 处理组 NLRP3、GSDMD-N、cleaved caspase-1 表达水平降低（ $P<0.05$ ）（表 4、图 4）。流式细胞术 PI 染色结果显示，与对照组（0.29% ± 0.06%）比较，焦亡组（21.52% ± 0.54%）细胞死亡率升高（ $P<0.05$ ）；与焦亡组比较，Tβ4 处理组（5.29% ± 0.49%）细胞死亡率降低（ $P<0.05$ ）（图 5）。

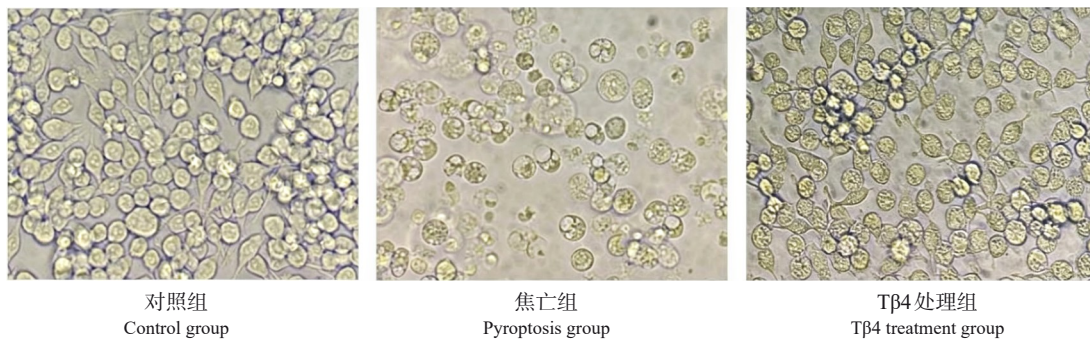


图 3 光学显微镜观察各组 BV2 小胶质细胞形态（100×） 对照组 BV2 细胞呈正常圆形或梭形，形态规整；焦亡模型组细胞体积明显肿胀，可见空泡样改变；Tβ4 处理组细胞形态较焦亡组明显改善。

表 4 各组 NLRP3、GSDMD-N、cleaved caspase-1 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	NLRP3	GSDMD-N	cleaved caspase-1
对照组	0.162 ± 0.024	0.15 ± 0.06	0.25 ± 0.17
焦亡组	0.901 ± 0.030 ^a	0.64 ± 0.06 ^a	0.91 ± 0.07 ^a
Tβ4 处理组	0.663 ± 0.051 ^{a,b}	0.48 ± 0.05 ^{a,b}	0.77 ± 0.15 ^{a,b}
<i>F</i> 值	294.42	55.73	19.96
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001

注：a 示与对照组比较， $P<0.05$ ；b 示与焦亡组比较， $P<0.05$ 。
[Tβ4] 胸腺素 β4；[NLRP3] NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3；[GSDMD-N] 消皮素 D N 端片段；[cleaved caspase-1] 切割型胱天蛋白酶 1。

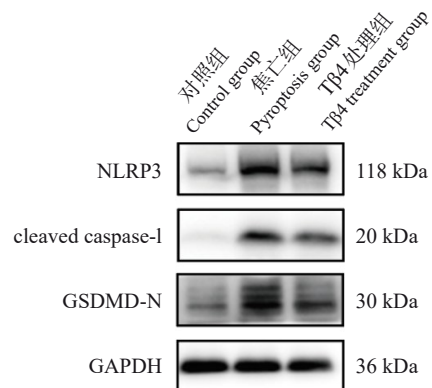


图 4 Western blot 检测各组焦亡通路相关蛋白表达条带图

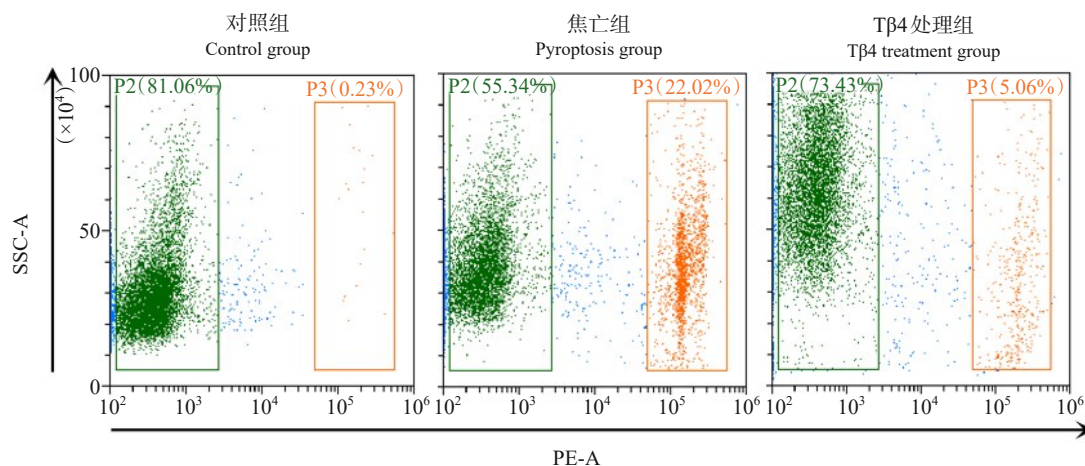


图5 PI染色流式细胞术检测各组BV2细胞死亡率 PE-A为采集PI荧光信号的荧光通道面积积分信号; SSC-A为侧向散射光面积积分信号; P2圈门(绿色)为PI阴性活细胞, P3圈门(橙色)为阳性死细胞。

2.5 Tβ4对焦亡状态下BV2细胞mtROS生成的影响

流式细胞术检测mtROS水平结果显示, 焦亡

组 ($43\,288 \pm 2\,717$) MFI 高于对照组 ($18\,324 \pm 1\,816$) ($P < 0.05$); Tβ4处理组 ($32\,660 \pm 1\,927$) MFI 低于焦亡组 ($P < 0.05$)。见图6。

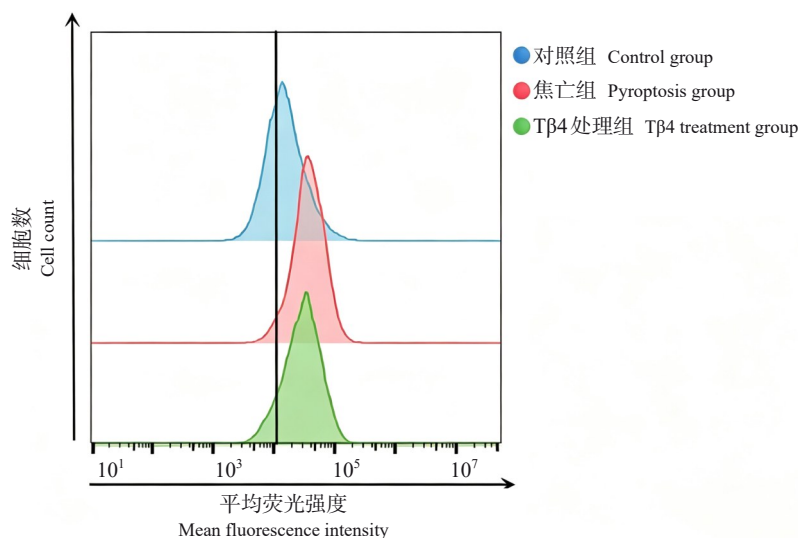


图6 MitoSOX染色检测各组mtROS水平 焦亡组平均荧光强度高于对照组, Tβ4处理组平均荧光强度低于焦亡组。

3 讨论

SAE是严重脓毒症常见的神经系统并发症^[1]。目前针对SAE尚无特效药物与针对性治疗手段, 因此筛选具有抗炎、神经保护作用的靶向生物活性分子, 是目前亟待解决的研究重点。

SAE发病机制复杂^[17], 其中神经炎症是调控SAE发生发展的关键。SAE发病过程中, 严重应激与病理因素可损伤各类神经细胞^[18]。小胶质细胞作为中枢神经系统固有免疫细胞, 对维持脑内稳

态、调控神经炎症至关重要^[19]。近年研究发现, 细胞焦亡在这一过程中起了决定性作用^[6]。经典焦亡通路依赖NLRP3等炎症小体识别细胞内外危险信号。NLRP3活化后可激活caspase-1并切割下游GSDMD-N蛋白, 引发炎症性细胞焦亡并大量释放IL-1β、IL-18等细胞因子, 破坏细胞膜结构, 胞质内容物渗漏, 持续放大炎症并加重组织损伤^[20]。研究发现, 干预炎症小体及相关促炎通路可缓解SAE模型动物的认知功能损伤^[21]; 大麻素2型受体特异性激动剂HU308可通过抑制小胶质细胞活化

和神经元焦亡对SAE发挥保护作用^[22]。上述研究不仅证实小胶质细胞焦亡是放大SAE病理损伤的核心介质,也说明靶向小胶质细胞活化与焦亡通路具备治疗SAE的潜在价值。

Tβ4为内源性多功能肽,可通过调控NF-κB通路抑制炎症,下调内毒素休克相关炎症介质、降低模型动物病死率^[23];在神经系统损伤模型中,Tβ4可抑制小胶质细胞活化、减少促炎因子释放,发挥神经保护作用^[24]。因此,Tβ4多靶点作用特性使其可有效干预神经炎症、减轻神经元损伤,提示其在SAE治疗中具备研究及临床应用价值。

本研究结果显示,在0.25~2 μg/mL浓度范围内,Tβ4对BV2细胞增殖与活性无明显抑制作用;当Tβ4浓度为4 μg/mL时,细胞活力较对照组下降。该结果与既往研究^[10]一致,证实内源性多肽Tβ4无明显细胞毒性。后续采用LPS联合Nig刺激构建BV2细胞焦亡模型,模拟SAE病理状态下小胶质细胞的焦亡特征。经LPS+Nig诱导后,光学显微镜下可见BV2细胞出现典型焦亡形态改变^[25];经Tβ4干预后,细胞焦亡形态明显缓解,多数细胞贴壁良好,细胞形态趋于规整;且流式PI染色检测结果提示细胞死亡比例较焦亡组显著降低。Western blot结果显示,Tβ4可下调NLRP3、GSDMD-N、cleaved caspase-1蛋白表达;反转录实时荧光定量PCR和ELISA检测结果显示,IL-1β转录与分泌水平降低。上述结果提示,Tβ4对LPS+Nig诱导的小胶质细胞焦亡具有明显抑制作用。

此外,中枢神经系统损伤可导致STING信号通路异常激活^[26],该通路激活不仅诱发炎症反应与I型干扰素应答,还可促进细胞死亡,是介导多种神经系统疾病发生发展的重要机制^[27]。本研究结果显示,Tβ4干预可下调p-IRF3、p-STING蛋白水平,同时降低IFIT1和IFN-β mRNA表达,提示Tβ4可能通过抑制STING通路活化发挥抗炎效应;流式检测mtROS结果显示,Tβ4干预可显著减少焦亡状态下mtROS生成,说明其除抗炎作用外,还可保护线粒体功能,维持小胶质细胞能量代谢稳定。

综上,LPS+Nig联合诱导的BV2细胞模型可有效模拟SAE病理状态下小胶质细胞焦亡特征。本研究证实,Tβ4可显著抑制LPS+Nig诱导的小胶质细胞焦亡,并减轻细胞炎症反应,减少mtROS生成,其作用机制可能与下调焦亡通路、STING通路相关蛋白表达有关。以上提示Tβ4具备成为SAE治疗候选药物的潜力,但其调控小胶质细胞焦亡、保护线粒体功能的具体分子机制及临床转化价值,

仍有待进一步深入探究。

作者贡献声明:李叶璇、郭予雄负责构建课题思路及设计实验方案;李叶璇、陈纯玲负责开展实验研究;李叶璇、陈纯玲、郑淑丹、赖可欣、杨正负责分析实验数据及文献检索;李叶璇、陈纯玲负责撰写并修改论文;郭予雄、邓医宇负责论文指导、审阅及经费支持。

利益冲突声明:所有作者声明不存在利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] Wilson JX, Young GB. Progress in clinical neurosciences: sepsis-associated encephalopathy: evolving concepts[J]. *Can J Neurol Sci*, 2003, 30(2): 98-105. PMID: 12774948. DOI: 10.1017/s031716710005335x.
- [2] Fan TH, Premraj L, Roberts J, et al. In-hospital neurologic complications, neuromonitoring, and long-term neurologic outcomes in patients with sepsis: a systematic review and meta-analysis[J]. *Crit Care Med*, 2024, 52(3): 452-463. PMID: 37921513. PMCID: PMC10923122. DOI: 10.1097/CCM.0000000000006096.
- [3] Nedel W, Deutschendorf C, Portela LVC. Sepsis-induced mitochondrial dysfunction: a narrative review[J]. *World J Crit Care Med*, 2023, 12(3): 139-152. PMID: 37397587. PMCID: PMC10308342. DOI: 10.5492/wjccm.v12.i3.139.
- [4] Michels M, Vieira AS, Vuolo F, et al. The role of microglia activation in the development of sepsis-induced long-term cognitive impairment[J]. *Brain Behav Immun*, 2015, 43: 54-59. PMID: 25019583. DOI: 10.1016/j.bbi.2014.07.002.
- [5] Hecht F, McCaw BK, Lanzkowsky P, et al. Neurofibromatosis and malignancy[J]. *J Pediatr*, 1979, 94(6): 1010. PMID: 109595. DOI: 10.1016/s0022-3476(79)80252-8.
- [6] Dal-Pizzol F, Tomasi CD, Ritter C. Septic encephalopathy: does inflammation drive the brain crazy?[J]. *Braz J Psychiatry*, 2014, 36(3): 251-258. PMID: 24918523. DOI: 10.1590/1516-4446-2013-1233.
- [7] Huang X, Ye C, Zhao X, et al. TRIM45 aggravates microglia pyroptosis via Atg5/NLRP3 axis in septic encephalopathy[J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20(1): 284. PMID: 38037161. PMCID: PMC10688018. DOI: 10.1186/s12974-023-02959-8.
- [8] Jing G, Gong H, Wang H, et al. OTUD1 exacerbates sepsis-associated encephalopathy by promoting HK2 mitochondrial release to drive microglia pyroptosis[J]. *J Neuroinflammation*, 2025, 22(1): 154. PMID: 40500776. PMCID: PMC12153095. DOI: 10.1186/s12974-025-03480-w.
- [9] Zeng QQ, Qi Y, Yu H, et al. Pharmacological inhibition of the cGAS-STING pathway suppresses microglia pyroptosis in sepsis-associated encephalopathy[J]. *J Neuroinflammation*,

- 2025, 22(1): 176. PMID: 40634978. PMCID: PMC12243338. DOI: 10.1186/s12974-025-03507-2.
- [10] Liu J, Zhou J, Luan Y, et al. cGAS-STING, inflammasomes and pyroptosis: an overview of crosstalk mechanism of activation and regulation[J]. *Cell Commun Signal*, 2024, 22(1): 22. PMID: 38195584. PMCID: PMC10775518. DOI: 10.1186/s12964-023-01466-w.
- [11] Maar K, Hetenyi R, Maar S, et al. Utilizing developmentally essential secreted peptides such as thymosin beta-4 to remind the adult organs of their embryonic state: new directions in anti-aging regenerative therapies[J]. *Cells*, 2021, 10(6): 1343. PMID: 34071596. PMCID: PMC8228050. DOI: 10.3390/cells10061343.
- [12] Evans MA, Smart N, Dubé KN, et al. Thymosin β 4-sulfoxide attenuates inflammatory cell infiltration and promotes cardiac wound healing[J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2081. PMID: 23820300. PMCID: PMC3797509. DOI: 10.1038/ncomms3081.
- [13] Wei C, Kumar S, Kim IK, et al. Thymosin beta 4 protects cardiomyocytes from oxidative stress by targeting anti-oxidative enzymes and anti-apoptotic genes[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42586. PMID: 22880044. PMCID: PMC3411836. DOI: 10.1371/journal.pone.0042586.
- [14] Kumar S, Gupta S. Thymosin beta 4 prevents oxidative stress by targeting antioxidant and anti-apoptotic genes in cardiac fibroblasts[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26912. PMID: 22046407. PMCID: PMC3201979. DOI: 10.1371/journal.pone.0026912.
- [15] Choi J, Cho Y, Choi H, et al. Thymosin beta 4 inhibits LPS and ATP-induced hepatic stellate cells via the regulation of multiple signaling pathways[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 3439. PMID: 36834849. PMCID: PMC9959661. DOI: 10.3390/ijms24043439.
- [16] Cheng P, Kuang F, Zhang H, et al. Beneficial effects of thymosin β 4 on spinal cord injury in the rat[J]. *Neuropharmacology*, 2014, 85: 408-416. PMID: 24937047. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2014.06.004.
- [17] Ren C, Yao R Q, Zhang H, et al. Sepsis-associated encephalopathy: a vicious cycle of immunosuppression[J]. *Neuroinflammation*, 2020, 17(1):14. PMID: 31924221. PMCID: PMC6953314. DOI: 10.1186/s12974-020-1701-3.
- [18] Liao Y, Cheng J, Kong X, et al. HDAC3 inhibition ameliorates ischemia/reperfusion-induced brain injury by regulating the microglial cGAS-STING pathway[J]. *Theranostics*, 2020, 10(21): 9644-9662. PMID: 32863951. PMCID: PMC7449914. DOI: 10.7150/thno.47651.
- [19] Manfredini A, Constantino L, Pinto M C, et al. Mitochondrial dysfunction is associated with long-term cognitive impairment in an animal sepsis model[J]. *Clinical Science*, 2019, 133(18): 1993-2004. PMID: 31527095. DOI: 10.4161/viru.26907.
- [20] Zhong H, Liu T, Shang Y, et al. Breaking the vicious cycle: targeting the NLRP3 inflammasome for treating sepsis-associated encephalopathy[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 177: 117042. PMID: 39004064. DOI: 10.1016/j.biopha.2024.117042.
- [21] Yan X, Yang K, Xiao Q, et al. Central role of microglia in sepsis-associated encephalopathy: from mechanism to therapy[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 929316. PMID: 35958583. PMCID: PMC9361477. DOI: 10.3389/fimmu.2022.929316.
- [22] Yang L, Li Z, Xu Z, et al. Protective effects of cannabinoid type 2 receptor activation against microglia overactivation and neuronal pyroptosis in sepsis-associated encephalopathy[J]. *Neuroscience*, 2022, 493: 99-108. PMID: 35460837. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2022.04.011.
- [23] Belsky J B, Rivers E P, Filbin M R, et al. Thymosin beta 4 regulation of actin in sepsis[J]. *Expert opinion on biological therapy*, 2018, 18(sup1): 193-197. PMID: 29508629. PMCID: PMC6556887. DOI: 10.1080/14712598.2018.1448381.
- [24] Morris D C, Chopp M, Zhang L, et al. Thymosin β 4: a candidate for treatment of stroke?[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010, 1194(1): 112-117. PMID: 20536457. PMCID: PMC3146053. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05469.x.
- [25] Man SM, Karki R, Kanneganti TD. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases[J]. *Immunol Rev*, 2017, 277(1): 61-75. PMID: 28462526. PMCID: PMC5416822. DOI: 10.1111/imr.12534.
- [26] Wang Y, Gao W, Shi X, et al. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin[J]. *Nature*, 2017, 547(7661): 99-103. PMID: 28459430. DOI: 10.1038/nature22393.
- [27] Hu X, Zhang H, Zhang Q, et al. Emerging role of STING signalling in CNS injury: inflammation, autophagy, necroptosis, ferroptosis and pyroptosis[J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 242. PMID: 36195926. PMCID: PMC9531511. DOI: 10.1186/s12974-022-02602-y.

(本文编辑: 杨丹)

(©《中国当代儿科杂志》编辑部, 开放获取CC BY-NC-ND 4.0协议)
(© Editorial Office of Chinese Journal of Contemporary Pediatrics. OA under CC BY-NC-ND 4.0 license)