

临床细胞生物学

ZnCl₂阻断电压门控质子通道对缺氧后小胶质细胞产生活性氧及促炎因子的影响

余颖 喻志源 谢敏杰 王伟 骆翔*

(华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科, 武汉 430030)

摘要 为明确电压门控质子通道(voltage-gated proton channel, Hv1)对小胶质细胞的影响, 研究了Hv1在正常、激活及抑制后对小胶质细胞活性氧、促炎因子产生的影响及机制, 该研究使用原代培养的小胶质细胞, 利用免疫荧光染色明确Hv1表达。用Hv1非特异性抑制剂ZnCl₂阻断该通道, 用DCFH-DA染色、Real-time PCR观察糖氧剥夺(oxygen glucose deprivation, OGD)处理后小胶质细胞产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)水平的变化。采用Western blot检测Hv1和Nox2蛋白质水平。实验结果显示, 小鼠脑部小胶质细胞可检测到Hv1通道的表达; 单纯ODG组缺氧后小胶质细胞ROS、TNF- α 、IL-1 β 的产生明显增加; 而ODG加ZnCl₂干预组, 小胶质细胞ROS、TNF- α 、IL-1 β 的产生较单纯ODG组显著降低; Western blot显示, OGD导致小胶质细胞中Hv1和Nox2蛋白质水平显著增加。以上结果表明, 小鼠脑部小胶质细胞存在Hv1通道蛋白质, ZnCl₂阻断该通道可降低ODG诱导的小胶质细胞ROS和TNF- α 、IL-1 β 的产生, 该抑制作用可能与其抑制NADPH氧化酶的作用相关。

关键词 小胶质细胞; 电压门控质子通道; 活性氧; 促炎因子

The Effect of Blocking Voltage Gated Proton Channel Hv1 by ZnCl₂ on Production of ROS and Inflammatory Factors in Microglia

Yu Ying, Yu Zhiyuan, Xie Minjie, Wang Wei, Luo Xiang*

(Department of Neurology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract To identify the expression of voltage-gated proton channel (Hv1) in microglia, and the effect of blocking Hv1 on production of ROS and inflammatory factors in microglia, we used immunofluorescent staining to identify the protein level of Hv1 in microglia. DCFH-DA and Real-time PCR were used to detect the production of ROS and inflammatory factors in microglia after OGD and Hv1 blocking. Western blot was used to analyse the protein levels of Hv1 and Nox2. The results showed that Hv1 was detected in the microglia of C57BL/6 mice. The

收稿日期: 2016-01-07 接收日期: 2016-05-19

国家自然科学基金(批准号: 81471200、91332108)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15387076155, E-mail: tjhfile@tjh.tjmu.edu.cn

Received: January 7, 2016 Accepted: May 19, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81471200, 91332108)

*Corresponding author. Tel: +86-15387076155, E-mail: tjhfile@tjh.tjmu.edu.cn

网络出版时间: 2016-08-01 11:11:07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160801.1111.002.html>

production of ROS and inflammatory factors were increased after OGD and reduced when Hv1 was blocked by ZnCl_2 . The protein levels of Hv1 and Nox2 were upregulated after OGD. Taken together, our results suggested that the Hv1 protein existed in microglia. Blocking Hv1 could reduce the production of ROS and inflammatory factors in microglia after OGD. This effect might be due to the inhibition of NADPH oxidase.

Keywords microglia; voltage gated proton channel; ROS; inflammatory factors

小胶质细胞是大脑内的原位髓样细胞(myeloid cells), 它和骨髓前体细胞(bone-marrow precursors)、循环系统单核细胞(circulating monocytes)和组织原位巨噬细胞(tissue-resident macrophages)一起隶属于单核巨噬细胞系(mononuclear phagocyte system)^[1]。小胶质细胞在大脑中的数量众多, 约占脑内细胞总数的10%。并且在几乎所有脑区内, 包括灰质和白质都有分布^[2]。在正常和病理状况下的中枢神经系统中, 小胶质细胞始终处于复杂多样的环境刺激, 展示着本身独特的分子和形态学特征。作为高度动态的内源性免疫细胞, 它具备强大的趋化性、吞噬、抗原呈递、细胞因子分泌等多种功能^[3]。

电压门控质子通道(voltage-gated proton channel, Hv1)是广泛表达于各种可兴奋细胞及不可兴奋细胞中的一种特殊的离子通道^[4]。它由4个跨膜片段组成一个电压感受结构域, 但却缺乏其他电压门控离子通道具有的另外2个跨膜片段, 即缺乏孔道形成结构域^[5]。电压门控质子通道主要介导外向的 H^+ 流, 这种转运并不消耗ATP, 而只能顺着电化学梯度, 所以是一种被动运输。但它是pH敏感和电压依赖的, 并且对于质子有绝对的选择性^[6]。

目前已知质子通道表达于数十种细胞中, 如中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、小胶质细胞、气道上皮细胞、精子细胞等^[4]。已有研究证明, Hv1与吞噬细胞中NADPH氧化酶存在偶联, Hv1介导的质子外流极好地复衡了NADPH氧化酶介导的活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生中出现的细胞膜内外的电压与pH变化^[7-9]。但小胶质细胞中, Hv1的表达情况以及在缺血、缺氧刺激下所起到的作用尚存在争议, 本研究拟采用Hv1非特异性抑制剂 Zn^{2+} 对原代培养的小胶质细胞进行干预, 观察其对糖氧剥夺(oxygen glucose deprivation, OGD)处理后, 小胶质细胞在活性氧产生以及炎性因子分泌等方面的影响, 以探讨Hv1在小胶质细胞中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

C57BL/6小鼠乳鼠来自华中科技大学同济医学院。DMEM/高糖培养基、胎牛血清购自Hyclone公司; 胰蛋白酶购自GIBCO公司; LDH试剂盒购自南京建成生物研究所; 多聚赖氨酸、DCFH-DA、 ZnCl_2 和DAPI购自Sigma公司; 引物由Invitrogen公司合成; 兔来源单克隆抗体Hv1购自Novus公司; 兔来源单克隆抗体Iba-1购自Wako公司; 大鼠来源单克隆抗体CD11b购自BD公司; FITC标记羊抗大鼠和CY3标记的羊抗兔IgG购自Jackson公司。

1.2 小鼠小胶质细胞原代培养及分离纯化

出生3 d内的C57BL/6小鼠在75%酒精中浸泡消毒, 依次剪开皮肤、颅骨, 取脑, 浸入预冷的PBS溶液清洗2次。用显微镊仔细剥除脑膜和血管, 剪碎, 于0.125%含EDTA的胰蛋白酶中37 °C消化10 min, 血清终止消化, 70 μm 孔径滤网过滤, 取滤液离心, 800 r/min离心8 min。弃上清, 用含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基重悬, 细胞计数后调整浓度, 将 1×10^6 个细胞接种于多聚赖氨酸预包被过的T75培养瓶中, 48 h后全量换液为含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基。细胞培养至7~9 d时可铺满瓶底, 为混合胶质细胞。将培养瓶封口后, 置于37 °C恒温摇床上震荡2 h, 于200 r/min离心5 min, 收集上清, 离心, 重悬, 种于6孔板中或放置有多聚赖氨酸预包被爬片的24孔板中, 20 min后换液, 以去除延迟贴壁的细胞如少突胶质细胞等。

1.3 实验分组

调整小胶质细胞悬液的细胞密度为 $5 \times 10^6/\text{mL}$, 接种于预包被多聚赖氨酸爬片的24孔板中及6孔板中, 在37 °C、5% CO_2 培养箱中进行培养, 24 h后进行干预。将每组实验分为4组, 即对照组(不含胎牛血清的高糖培养基+常规正常氧浓度)、OGD组(不含胎牛血清的无糖培养基+1%氧浓度)、OGD+低浓度 ZnCl_2 组(不含胎牛血清的无糖培养基+1%氧浓

度+100 $\mu\text{mol/L}$ ZnCl_2)、OGD+高浓度 ZnCl_2 组(不含胎牛血清的无糖培养基+1%氧浓度+1 000 $\mu\text{mol/L}$ ZnCl_2)。对照组在常规培养箱中培养, 其余各组在缺氧培养箱中培养, 6 h后收集各实验组细胞。重复进行3次相同的独立实验。

1.4 免疫荧光染色

将上述种于24孔板中的小胶质细胞用4%多聚甲醛室温固定15 min, PBS清洗3遍, 每次5 min, 用含0.2% Triton X-100的PBS破膜, BSA封闭后加入相应一抗(Hv1、CD11b), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS清洗后加入相应二抗(FITC标记羊抗大鼠和CY3标记的羊抗兔IgG), 室温孵育1 h, DAPI染细胞核, PBS清洗后50%甘油封片, 共聚焦显微镜观察。

1.5 LDH法检测细胞培养基中LDH浓度

LDH法检测OGD处理6 h后, OGD+低浓度 ZnCl_2 与OGD+高浓度 ZnCl_2 组于原代小胶质细胞后培养基内LDH的含量, 以检测各中处理对原代小胶质细胞的细胞毒性作用。严格按照试剂盒说明书要求操作, 反应结束至室温5 min后, 用450 nm波长测定各孔吸光度。绘制标准曲线, 依据标准曲线计算各孔相应的LDH浓度。

1.6 DCFH-DA检测ROS产量

DCFH-DA是一种非极性化合物, 它可以自由弥散至细胞内, 被水解成DCFH并无法再逸出细胞。而如果DCFH在细胞中被进一步氧化, 则会变成可以发出荧光的DCF。向各实验组细胞中加入100 $\mu\text{mol/L}$ 终浓度的DCFH-DA, 避光孵育1 h后用PBS清洗2次, 采用荧光酶标仪检测每组的荧光强度(激发波长488 nm、发射波长530 nm)。

1.7 Real-time PCR检测TNF- α 和IL-1 β mRNA水平

采用Trizol试剂盒说明书操作提取6孔板中TNF- α 、IL-1 β RNA。所提RNA用DEPC水溶解, 按照逆转录试剂盒操作进行cDNA扩增, 以上述cDNA为模板进行PCR扩增。其中, TNF- α 的上下游引物分别为: 5'-TCT TCC CTG AGG TGC AAT GC-3'和5'-GCT CCG TTT TCA CAG AAA AGA TCT-3'; IL-1 β 的上下游引物分别为: 5'-GGA GCT CCC TTT TCG TGA ATG-3'和5'-AGG TAA GTG GTT GCC CAT CAG A-3'; GAPDH的上下游引物分别为: 5'-TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC-3'和5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA-3'; PCR循环条件为:

94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 1个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 54 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 0.5 min, 进行30个循环反应; 最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延长5 min。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算TNF- α 、IL-1 β mRNA相对表达量, ΔC_t =目的基因 C_t 值-内参基因 C_t 值, 即 $\Delta\Delta C_t=\Delta C_t(\text{处理组})-\Delta C_t(\text{对照组})$ 。

1.8 免疫印迹法检测Hv1和Nox2蛋白质水平

收集6孔板中细胞, 在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下用RIPA组织裂解液提取蛋白质。使用BCA试剂盒测量蛋白质浓度后将蛋白质提取液煮沸变性, 用10% SDS-PAGE凝胶电泳, 转膜, 5%脱脂牛奶室温封闭1 h。用抗体稀释液稀释一抗Hv1(1:1 000)、Nox2(1:1 000)、 β -actin(1:1 000), 将膜于4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBS-T溶液清洗3次后加入相应的HRP偶联的二抗, 室温孵育1 h。使用ECL试剂盒显色, 用BIO-RAD凝胶成像分析仪检测条带灰度。以检测蛋白条带光密度与内参 β -actin的光密度比值表示待测蛋白质水平。

1.9 统计学处理

实验数据使用SPSS 17.0软件进行处理, 组间比较采用One-Way ANOVA检验, 数据使用均数 $\pm$ 标准差表示, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小胶质细胞的特异性染色鉴定

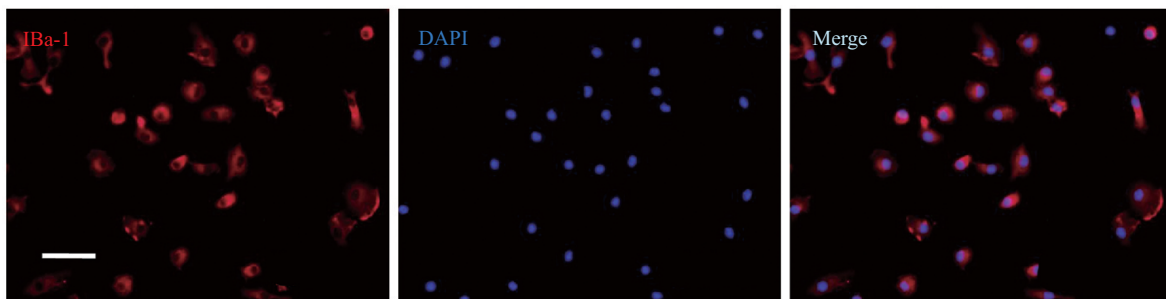
原代培养的小胶质细胞在分离纯化24 h后, 胞体较小, 可见长短不一的细胞突起, 突起多呈不对称分别, 或呈单极状、双极状, 且此类单极和双极细胞的突起一般较长。用Iba-1对小胶质细胞进行免疫荧光染色, 证明原代培养的小胶质细胞表达特异性抗原Iba-1, 且纯度 $>95\%$ (图1)。

2.2 小胶质细胞表达Hv1

对原代培养的小胶质细胞进行Hv1和CD11b的免疫荧光染色, 观察到两种荧光具有良好的共定位关系, 证明小胶质细胞上确实存在电压门控质子通道Hv1的表达(图2)。

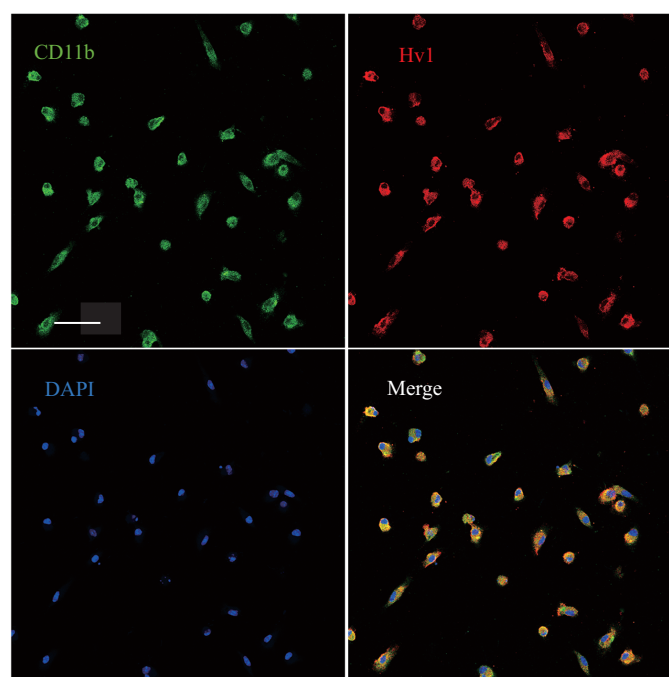
2.3 各实验组小胶质细胞分泌LDH比较

对照组、OGD组、OGD+低浓度 ZnCl_2 组以及OGD+高浓度 ZnCl_2 组的LDH分泌均无明显差异(对照组值为 $1.199 5\pm 0.032 8$ 、OGD组值为 $1.201 1\pm 0.039 9$ 、OGD+低浓度 ZnCl_2 组值为 $1.232 0\pm 0.048 7$ 、OGD+高浓度 ZnCl_2 组值为 $1.294 3\pm 0.062 6$)(图3)。



原代培养的小胶质细胞95%以上表达小胶质细胞特异性抗原Iba-1; 红色荧光为Iba-1阳性染色, 蓝色荧光为细胞核DAPI染色(标尺=25 μm)。
Representative confocal images of Iba-1⁺ labelling microglia; doubleimmunofluorescent staining of Iba-1 (red) and DAPI (blue) (scale bar=25 μm).

图1 小胶质细胞特异性鉴定
Fig.1 Identification of microglia



红色荧光为Hv1阳性染色, 绿色荧光为CD11b阳性染色, 蓝色荧光为细胞核DAPI染色(标尺=25 μm)。
Immunofluorescent staining of Hv1 (red)、CD11b (green) and DAPI (blue) (scale bar=25 μm).

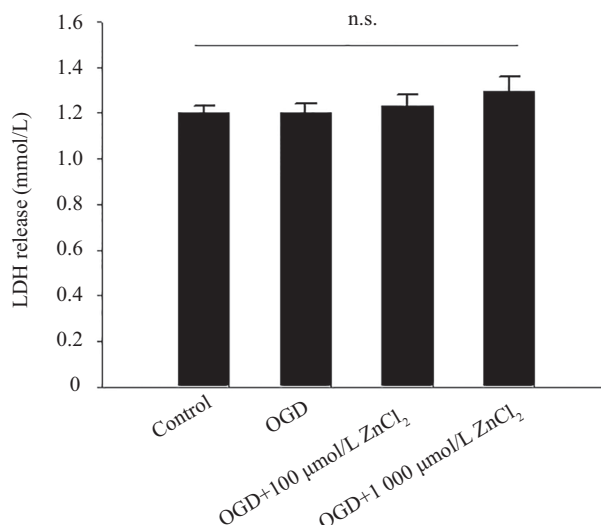
图2 观察小胶质细胞上Hv1的表达
Fig.2 Hv1 observed in microglia

2.4 小胶质细胞产生活性氧ROS的改变

对照组小胶质细胞活性氧产生水平值为 58.27 ± 5.25 , 小胶质细胞进行OGD处理后, 发现活性氧ROS的产量明显增加(87.35 ± 11.96), 而利用Hv1的非特异性抑制剂 ZnCl_2 阻断电压门控质子通道后, 在不同的阻滞浓度均可以有效减少小胶质细胞活性氧的产量(OGD+低浓度 ZnCl_2 组值为 67.63 ± 9.39 、OGD+高浓度 ZnCl_2 组值为 57.33 ± 11.24 , $P < 0.05$)(图4)。

2.5 小胶质细胞产生炎症因子 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\beta$ 的改变

OGD处理可增加小胶质细胞产生炎症因子 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\beta$ (对照组 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\beta$ 分别为 $0.970 0 \pm 0.056 1$ 和 $1.037 5 \pm 0.071 8$ 、OGD组 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\beta$ 分别为 $2.142 5 \pm 0.171 2$ 和 $2.422 5 \pm 0.153 6$), 而加入 ZnCl_2 阻断电压门控质子通道后, 小胶质细胞炎症因子 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\beta$ mRNA水平有显著下降(OGD+低浓度 ZnCl_2 组 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\beta$ 分别为 $1.312 3 \pm 0.151 3$ 和

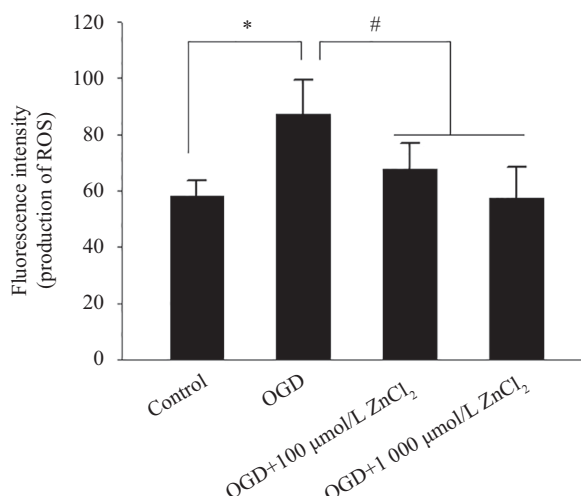


OGD处理6 h后, LDH法检测各实验组小胶质细胞产生LDH情况(n.s.: 无显著性差异)。

Production of LDH in microglia were determined by LDH kit (n.s. means no significance).

图3 各实验组生成LDH比较

Fig.3 LDH production in different groups



OGD处理6 h后, DCFH-DA检测各实验组小胶质细胞中ROS的产生量。* $P<0.05$, # $P<0.05$ 。

Production of ROS in microglia were determined by DCFH-DA after OGD for 6 h. * $P<0.05$, # $P<0.05$.

图4 各实验组产生ROS情况

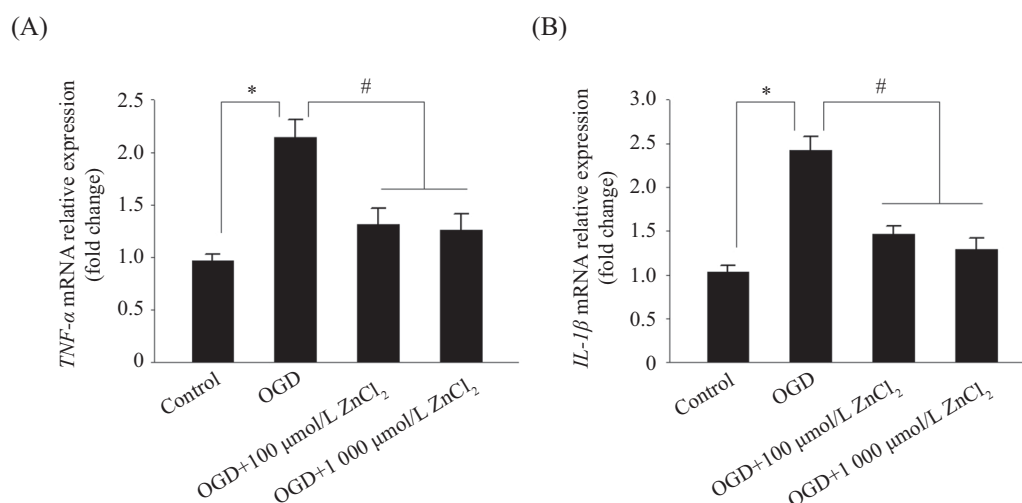
Fig.4 ROS production in different groups

1.470 0±0.090 6、而OGD+高浓度ZnCl₂组TNF-α和IL-1β分别为1.262 5±0.154 5和1.290 0±0.126 6($P<0.05$) (图5)。

2.6 小胶质细胞Hv1和Nox2蛋白质水平的改变

进行OGD处理后, 小胶质细胞中Hv1与Nox2蛋白质水平均上调(对照组Hv1和Nox2分别为0.430±

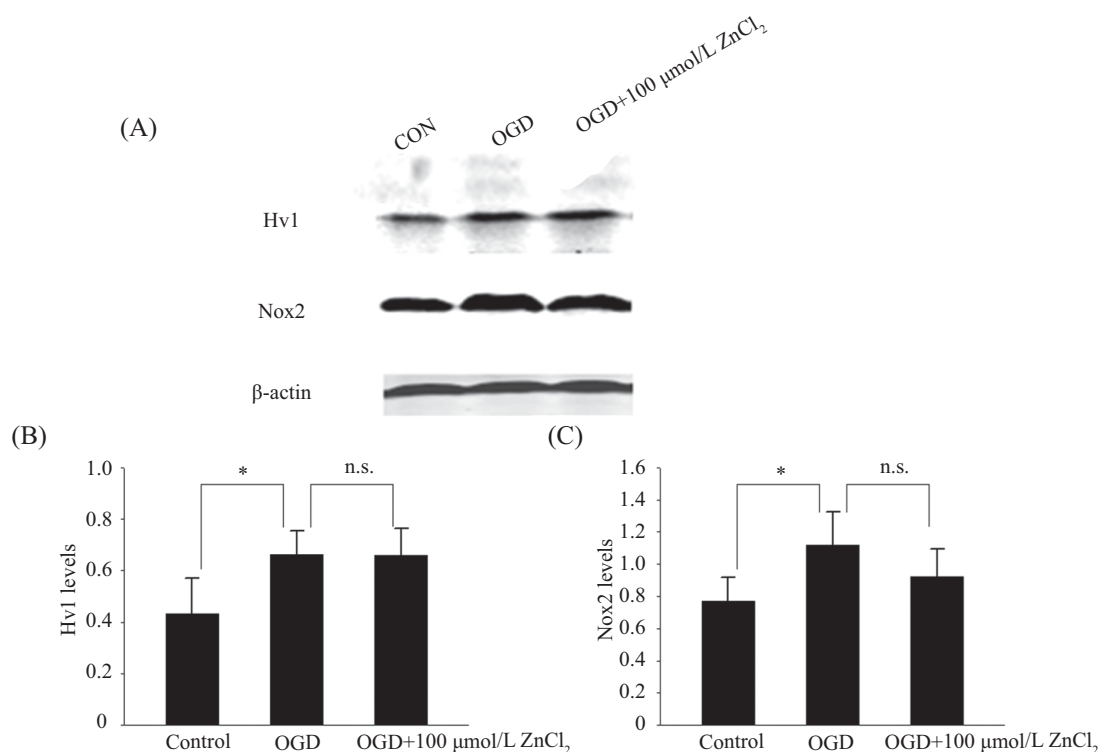
0.136和0.770±0.150、OGD组Hv1和Nox2分别为0.660±0.092和1.120±0.207), 且该数值的变化具有统计学意义($P<0.05$)。但加入100 μmol/L ZnCl₂之后, 2种蛋白质水平并没有出现有统计学意义的变化(Hv1和Nox2分别为0.660±0.105和2.0920±0.172, $P>0.05$) (图6)。



A: OGD处理6 h后, Real-time PCR检测*TNF-α* mRNA表达量; B: OGD处理6 h后, Real-time PCR检测*IL-1β* mRNA表达。* $P < 0.05$, # $P < 0.05$ 。

A: mRNA level of *TNF-α* in microglia were measured by Real-time PCR after OGD for 6 h; B: mRNA level of *IL-1β* in microglia were measured by Real-time PCR after OGD for 6 h. * $P < 0.05$, # $P < 0.05$ 。

图5 各实验组促炎因子*TNF-α*和*IL-1β* mRNA水平
Fig.5 mRNA level of *TNF-α* and *IL-1β* in different groups



A: OGD处理6 h后Western blot检测Hv1、Nox2蛋白质水平。B、C: 3次独立Western blot实验的相对定量结果, 纵坐标表示Hv1、Nox2和β-actin灰度分析的比值(* $P < 0.05$, n.s.: 无显著性差异)。

A: Hv1 and Nox2 levels in microglia determined by Western blot, β-actin is an internal control. B, C: Western blot results were scanned and quantified. Values are expressed as mean±S.E.M. (* $P < 0.05$, n.s. means no significance).

图6 各实验组Hv1、Nox2蛋白质水平
Fig.6 Hv1 and Nox2 protein levels in different groups

3 讨论

小胶质细胞是大脑中主要的原位免疫细胞, 在

生理和病理状况下都对脑功能的维持和改变具有重要作用^[1,10]。在缺血性卒中发生时, 小胶质细胞是最

早发生反应的细胞之一,随后才是循环系统中的各类免疫细胞^[11]。小胶质细胞活化后可产生大量氧自由基ROS,它与脂质、蛋白质、辅酶因子和DNA等产生反应,进而激活凋亡细胞相关的信号通路,导致神经细胞或胶质细胞损伤和死亡^[12-13]。此外,活化的小胶质细胞还可以释放各类促炎因子,这些促炎因子是导致神经细胞二次损伤的罪魁祸首,其中最主要的是TNF- α 和IL-1 β ^[14]。

Hv1是一种近期发现的、主要表达在免疫细胞中的特殊离子通道,它最重要的功能就是维持内源性免疫细胞上Nox的活性。在脑组织中,Hv1高度选择性地表达于小胶质细胞中,它可以帮助调节细胞内的pH以及促进Nox依赖的ROS的产生^[15]。目前对于质子通道功能研究主要集中在参与白细胞中的吞噬及细菌杀伤过程^[16],而针对小胶质细胞中Hv1的表达以功能研究尚处于初步探索阶段,且主要集中于NADPH氧化酶活性和ROS的产生。

本研究结果发现,C57小鼠的小胶质细胞上确实存在丰富的Hv1蛋白质,且经过OGD处理后Hv1和其偶联的Nox2均发生了显著性的上调。利用非特异性阻滞剂ZnCl₂阻断Hv1后,不仅可以减少OGD刺激后小胶质细胞ROS的产生,并且下调促炎因子TNF- α 和IL-1 β 的mRNA水平。但ZnCl₂并没有降低Hv1和Nox2的蛋白质水平,这可能是因为ZnCl₂的作用主要是通过阻断电压门控质子通道来实现的,而并不影响质子通道和NADPH氧化酶的蛋白表达。而加入ZnCl₂阻断Hv1后,对促炎因子TNF- α 和IL-1 β 的mRNA的表达量的影响机制,目前尚不明确,推测可能与阻断Hv1后影响小胶质细胞极化分型相关。对于这一假设还需进一步实验验证研究。

综上所述,本研究结果提示,电压门控质子通道Hv1在小胶质细胞活化后的ROS产生和促炎因子分泌中发挥了重要作用,利用Hv1的阻滞剂来抑制该质子通道的功能可能会减少小胶质细胞活化后ROS和促炎因子的产生,进而减少中枢神经系统的损伤。Hv1或许可以成为缺血性卒中等一系列中枢神经系统损伤过程中的治疗靶点,为减少损伤和增

强修复提供另一个治疗切入点。

参考文献 (References)

- 1 Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev* 2011; 91(2): 461-553.
- 2 Chew LJ, Takanohashi A, Bell M. Microglia and inflammation: Impact on developmental brain injuries. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2006; 12(2): 105-12.
- 3 Michell-Robinson MA, Touil H, Healy LM, Owen DR, Durafourt BA, Bar-Or A, *et al.* Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain* 2015; 138(Pt 5): 1138-59.
- 4 Decoursey TE. Voltage-gated proton channels and other proton transfer pathways. *Physiol Rev* 2003; 83(2): 475-579.
- 5 Ramsey IS, Moran MM, Chong JHA, Clapham DE. A voltage-gated proton-selective channel lacking the pore domain. *Nature* 2006; 440(7088): 1213-6.
- 6 de Coursey TE. Voltage-gated proton channels: What's next? *J Physiol-London* 2008; 586(22): 5305-24.
- 7 Henderson LM, Chappell JB, Jones OT. The superoxide-generating NADPH oxidase of human neutrophils is electrogenic and associated with an H⁺ channel. *Biochem J* 1987; 246(2): 325-9.
- 8 de Coursey TE, Morgan D, Cherny VV. The voltage dependence of NADPH oxidase reveals why phagocytes need proton channels. *Nature* 2003; 422(6931): 531-4.
- 9 Liu J, Tian D, Murugan M, Eyo UB, Dreyfus CF, Wang W, *et al.* Microglial Hv1 proton channel promotes cuprizone-induced demyelination through oxidative damage. *J Neurochem* 2015; 135(2): 347-56.
- 10 Ransohoff RM, Perry VH. Microglial physiology: Unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 119-45.
- 11 Yenari MA, Kauppinen TM, Swanson RA. Microglial activation in stroke: Therapeutic targets. *Neurotherapeutics* 2010; 7(4): 378-91.
- 12 Nathan C, Ding A. Snap shot: Reactive oxygen intermediates (ROI). *Cell* 2010; 140(6): 951.e2.
- 13 Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4(5): 399-415.
- 14 Lai AY, Todd KG. Microglia in cerebral ischemia: Molecular actions and interactions. *Can J Physiol Pharmacol* 2006; 84(1): 49-59.
- 15 Wu LJ. Microglial voltage-gated proton channel Hv1 in ischemic stroke. *Transl Stroke Res* 2014; 5(1): 99-108.
- 16 Ramsey IS, Ruchti E, Kaczmarek JS, Clapham DE. Hv1 proton channels are required for high-level NADPH oxidase-dependent superoxide production during the phagocyte respiratory burst. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(18): 7642-7.