



电子、语音版

·论著·

褪黑素通过抑制NLRP3减轻MPP⁺诱导的HT22 细胞焦亡/炎性损害

姬丽娅¹, 柴佳林², 饶维³, 王彦刚⁴, 程俊凯⁴, 王凯⁴, 王利⁴

1. 陕西省西安市第三医院, 陕西 西安 710032
2. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046
3. 中国人民解放军总医院第一医学中心神经外科医学部, 北京 100048
4. 中国人民解放军空军军医大学第一附属医院神经外科, 陕西 西安 710032

摘要:目的 研究褪黑素(MT)预处理抑制NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)水平,减轻神经细胞焦亡,改善帕金森病症状的作用及分子机制。方法 正常培养的HT22细胞记为空白对照组(Sham组);细胞进行10 mmol/L 1-甲基-4-苯基-吡啶离子(MPP⁺)处理24 h,制成帕金森病细胞模型后,记为MPP⁺组;先用5 μmol/L MT预处理6 h后,再造模后,记为MPP⁺+MT组;各组细胞处理后经培养24 h后取材。采用CCK8检测细胞死亡变化;采用荧光免疫组化法和Western-blotting方法检测NLRP3分布和表达变化;使用标准ELISA试剂盒检测IL-1β和IL-18表达变化。结果 与Sham组相比,MPP⁺组神经细胞大量死亡,NLRP3在存活细胞的胞膜和胞浆中高表达,相应的炎症因子IL-1β和IL-18也大量释放,两组间差异有统计学意义($P<0.05$)。相较于MPP⁺组,MPP⁺+MT组细胞存活率升高,细胞中NLRP3染色阳性率降低,表达量也降低,相应的IL-1β和IL-18表达量也降低,两组间差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 MT可有效抑制NLRP3表达和炎症因子的释放,减轻神经细胞焦亡,从而减轻MPP⁺造成的HT22细胞损伤。

[国际神经病学神经外科学杂志, 2022, 49(2): 1-5.]

关键词:帕金森病;褪黑素;NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3;白介素-1β;白介素-18

中图分类号:R742.5

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2022.02.001

Melatonin alleviates MPP⁺-induced pyroptosis/inflammatory damage of HT22 cells by inhibiting NOD-like receptor protein 3

Ji Li-Ya¹, Chai Jia-Lin², Rao Wei³, Wang Yang-Gang⁴, Cheng Jun-Kai⁴, Wang Kai⁴, Wang Li⁴

1. Neurological Department, Xi'an Third Hospital, Xi'an, Shaanxi 710032, China
2. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi 712046, China
3. Senior Department of Neurosurgery, The First Medical Center, General Hospital of PLA, Beijing 100048, China
4. Department of Neurosurgery, Xijing Hospital, Air Force Medical University of PLA, Xi'an, Shaanxi 710032, China

Corresponding author: WANG Li, Email: 534007233@qq.com

Abstract: Objective To investigate the role and molecular mechanism of melatonin (MT) pretreatment in inhibiting the level of NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), reducing neuronal pyroptosis, and improving Parkinson's disease. **Methods** Normally cultured HT22 cells were established as blank control group (sham group); the cells were treated with 10 mmol/L MPP⁺ for 24 hours to establish a cell model of Parkinson's disease (MPP⁺ group); the cells pretreated with 5 μmol/L MT for 6 hours before modeling were established as MPP⁺+MT group; samples were collected after the cells were cultured for 24 hours after treatment. CCK8 assay was used to measure the change in cell death; fluorescence immunohisto-

基金项目:国家自然科学基金青年项目资助(81801165);陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2017JM8073; 2020JM-338);西安市卫健委青年培育科研项目(2022qn02);空军军医大学第一附属医院学科助推计划(XJZT19Z23)。

收稿日期:2021-12-01; **修回日期:**2022-03-03

通信作者:王利, Email: 534007233@qq.com。

chemistry and Western blotting were used to measure the changes in the distribution and expression of NLRP3; a standard ELISA kit was used to measure the changes in the expression of interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-18 (IL-18). **Results** Compared with the sham group, the MPP⁺ group had the death of a large number of nerve cells, a high expression level of NLRP3 in the membrane and cytoplasm of the surviving cells, and the secretion of large amounts of the corresponding inflammatory factors IL-1 β and IL-18 ($P < 0.05$). Compared with the MPP⁺ group, the MPP⁺+MT group had a significant increase in cell viability and significant reductions in the positive rate of NLRP3 staining and the expression levels of NLRP3, IL-1 β , and IL-18 ($P < 0.05$). **Conclusions** MT can effectively inhibit the expression of NLRP3 and the release of inflammatory factors, reduce nerve cell pyroptosis, and thus improve the damage of HT22 cells caused by MPP⁺.

[Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2022, 49(2): 1-5.]

Keywords: Parkinson's disease; melatonin; Nod-like receptor family pyrin domain containing 3; interleukin-1 β ; interleukin-18

近年来,在细胞固有免疫系统发现一种不同于凋亡和坏死的细胞死亡模式的新程序性死亡方式——焦亡,主要以NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶1(cysteine aspartic protease 1, Caspase1)和ASC(近几年新发现的蛋白质,炎症时,在中性粒细胞中表达增多)组成的炎性小体,进而刺激细胞分泌大量白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和白介素-18(interleukin-18, IL-18)为特征,在肿瘤、肾性疾病和中枢神经系统退行性疾病中发挥重要作用^[1-2]。越来越多文献提示,帕金森病(Parkinson's disease, PD)主要病理改变是含色素的神经元变性、缺失及小胶质细胞炎性激活^[3-4]。新近研究发现,活化的胶质细胞释放肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、IL-1 β 、IL-6等炎性细胞因子,造成自身或神经元死亡(包括焦亡)^[5],但神经元自身是否直接发生焦亡,是否可以以NLRP3作为临床上治疗PD的新靶点,少见文献报道。褪黑素(melatonin, MT)是由脑松果体合成和分泌的一种神经内分泌激素,具有调节睡眠、清除毒性蛋白、抗氧化、抗炎等功能,在临床上可治疗睡眠障碍、衰老、癌症和中枢神经系统退行性疾病等^[6-7]。因此,本研究尝试利用MT治疗由1-甲基-4-苯基-吡啶离子(1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP⁺)诱导的HT22细胞PD模型,研究MT预处理调控NLRP3表达改善PD症状的作用和分子机制,为MT的神经损伤保护作用提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 HT22细胞株购自上海吉凯基因有限公司。

1.1.2 仪器 小型台式高速离心机(美国Beckman公司);小型高速冷冻离心机(美国Beckman公司);超速离心机(美国Beckman公司);激光共聚焦显微镜(日本Olympus株式会社);电子天平(德国Sartorius公司);生物

安全柜(苏州苏洁医疗器械有限公司);超低温-80 $^{\circ}$ C冰箱(美国Thermo Fisher公司);超净工作台(苏州苏洁医疗器械有限公司);全自动凝胶成像系统(上海嘉鹏科技有限公司);CO₂细胞恒温培养箱(美国Thermo Fisher公司);移液器(德国Eppendorf公司);制冰机(日本Sanyo公司);蛋白电泳PowerPac TM基础电泳仪(美国Bio-Rad公司)等。

1.1.3 试剂 褪黑素、MPP⁺(美国Sigma公司);兔抗大鼠NLRP3单克隆抗体(美国AdipoGen公司);兔抗大鼠 β -Actin单克隆抗体(美国Cell Signaling公司);山羊抗兔IgG/辣根酶标记(中杉金桥生物技术有限公司);IL-1 β 和IL-18 ELISA试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);CCK-8分析试剂盒(日本Dojindo公司);链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶免疫组化试剂盒(北京中山生物技术有限公司)等。

1.2 神经细胞培养

HT22细胞在37 $^{\circ}$ C水浴锅中解冻,离心、培养和扩增后,诱导其向交感神经元样细胞分化:取对数生长期的HT22细胞,经胰酶消化分散后,制成5 \times 10⁵/mL细胞悬液,接种于塑料培养皿中,置于培养箱内进行培养。每3 d更换新鲜培养液,每次更换一半新鲜培养液。

1.3 体外培养神经元PD模型制作、MT预处理及分组

准备6孔板,将HT22细胞悬液均匀铺种于孔板中,将孔板放置于37 $^{\circ}$ C,5% CO₂孵箱中进行培养24 h,随机分为Sham组、MPP⁺组和MPP⁺+MT组。根据预实验摸索药物浓度结果,MPP⁺+MT组提前给予MT药物5 μ mol/L培养6 h后加入10 mmol/L的MPP⁺,继续培养24 h后收集细胞。MPP⁺组直接加入10 mmol/L的MPP⁺,继续培养24 h后收集细胞。

1.4 CCK-8细胞增殖实验

按照CCK-8分析试剂盒确定细胞活力。将10 μ L CCK-8溶液添加到96孔板的每个孔中。温育3 h后,通过酶标仪在450 nm处检测细胞吸收。各组均采用此流程。

1.5 免疫荧光检测NLRP3空间表达

HT22细胞经4%多聚甲醛固定后,驴血清封闭30 min,加入一抗抗体(NLRP3 1:50)4℃过夜,PBS洗涤3遍,加入驴抗兔荧光二抗抗体(1:1 000)室温孵育3 h,PBS洗涤5遍,Hoechst染料染核5 min,PBS洗涤5遍,镜检。

1.6 Western blotting检测NLRP3表达变化

收集各组处理过的HT22细胞,提取细胞总蛋白,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离蛋白后转移到硝酸纤维素膜上,与NLRP3(1:500)、 β -actin(1:2 000)抗体结合,然后与辣根过氧化物酶标记的二抗结合,电化发光法显色后照相。最后用凝胶成像系统(Image master VDS)摄影,图像分析软件(Image J)行灰度扫描分析。以目的蛋白与 β -actin的蛋白产物条带灰度值之比作为其蛋白水平的相对量。并进行扫描图像分析仪计算蛋白条带的表达。

1.7 标准ELISA试剂盒检测IL-1 β 和IL-18表达变化

将HT22细胞接种于96孔板中,同体外培养细胞缺血再灌注损伤的制作、PTE预处理及分组,按照ELISA试剂盒流程进行IL-1 β 和IL-18表达变化的检测。

1.8 统计学方法

应用GraphPad软件对数据进行处理。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间均数比较采用单因素方差分析(one way ANOVA),组间两两比较采用Dunnett-*t*检验进行统计分析。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MT预处理后神经细胞死亡水平

利用CCK8试剂盒检测发现,与Sham组比较,MPP⁺导致神经细胞(0.384 \pm 0.017)活性降低,即HT22细胞凋亡水平增加($P<0.01$);而MT预处理后HT22细胞(0.504 \pm 0.015)损伤减轻,神经细胞凋亡水平下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 MT预处理后神经细胞NLRP3的表达水平

采用Western blotting检测发现,3组HT22细胞中NLRP3相对表达量水平间比较均有差异($F=1412.124$; $P=0.000$)。与Sham组比较(0.902 \pm 0.031),MPP⁺组中因MPP⁺损伤了HT22细胞,导致NLRP3表达水平急剧升高(2.899 \pm 0.038),差异具有统计学意义($P<0.01$);而MPP⁺+MT组中因MT挽救了HT22细胞,使其得以存活,降低了NLRP3的表达水平(1.905 \pm 0.034),差异有统计学意义($P<0.05$)。见图1。

2.3 MT预处理后神经细胞NLRP3空间表达情况

采用免疫荧光组化方法检测发现,NLRP3染色阳性颗粒主要分布在细胞膜、细胞浆和突起中。与Sham组比较,MPP⁺损伤HT22细胞,并导致其死亡增多,但存活的HT22细胞中NLRP3的染色阳性率高;与MPP⁺组比较,MT预处理不仅挽救HT22细胞,还降低了细胞中的NLRP3蛋白表达。见图2。

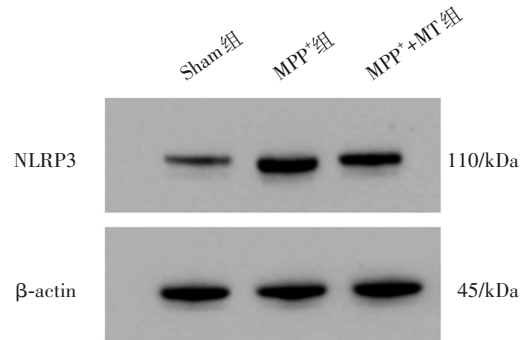


图1 3组HT22细胞中NLRP3蛋白表达水平对比

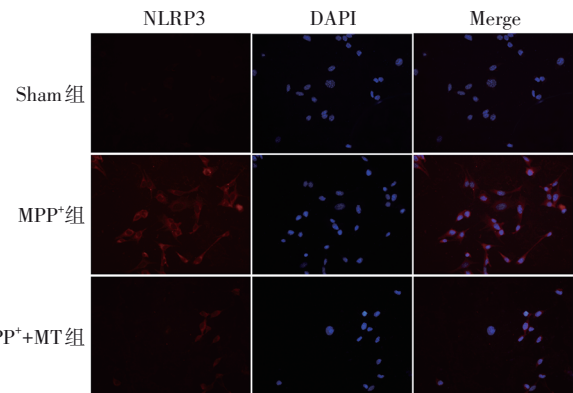


图2 3组HT22细胞中NLRP3空间表达水平(免疫荧光染色, $\times 400$)

2.4 MT预处理后神经细胞IL-1 β 和IL-18的表达水平

采用CCK8试剂盒检测发现,3组HT22细胞中炎症因子IL-1 β 和IL-18水平间比较均有差异($P<0.05$)。与Sham组比较,MPP⁺组和MPP⁺+MT组中IL-1 β 和IL-18表达水平增加,差异具有统计学意义($P<0.01$);与MPP⁺组比较,MPP⁺+MT组中IL-1 β 和IL-18表达水平降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

PD的主要临床表现是肢体静止性震颤,行动迟缓,肌张力增高和姿势平衡障碍等,部分患者伴有记忆力、智力障碍等。导致这些症状的病理机制包括:①遗传因素:SNCA、LRRK2、VPS35、EIF4G1、DNAJC13、CHCHD2等显性致病基因;②氧化应激反应:多巴胺自氧化产生毒性产物等;③毒性蛋白堆积: α -突触核蛋白及泛素蛋白堆积形成路易小体,诱发神经元变性;④神经炎症反应^[3-4]。以往大量文献报道,PD神经元变性常伴随神经炎症,主要是小胶质细胞的激活、星形胶质细胞增生、淋巴细胞浸润等,特别是小胶质细胞激活后大量分泌一系列炎症介质,如TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-1 β 、环氧合酶2等,造成自身或神经元损伤及死亡^[5, 8-9]。新近国内外研究发现,PD患者的黑质及脑脊液中上述炎症介质大量增加。Haque等^[10]

研究发现,神经毒素和 α -突触核蛋白的聚集、线粒体活性氧种类以及线粒体破坏是小胶质细胞NLRP3炎症小体激活和IL-18、IL-1 β 释放的关键调节因子。Han等^[11]的研究和Wang等^[12]的综述提示,小胶质细胞活化产生的NLRP3炎症小体与PD患者和动物模型疾病进展有关,利用NLRP3炎症抑制剂,可通过抑制神经炎症,延缓PD的进展。与文献结果类似,本研究利用拟神经元的HT22细胞构建PD模型后,发现大量NLRP3阳性颗粒表达于存活的HT22细胞胞质和胞膜上,而且免疫印迹的结果提示HT22细胞内NLRP3蛋白水平显著升高,同时,IL-1 β 和IL-18等炎症因子也大量释放,提示除小胶质细胞,神经元也可表达NLRP3炎症小体,并促进其自身释放大炎症因子,导致焦亡发生,并在PD的发生发展中发挥调控细胞转归的重要作用,直接影响患者的预后。因此,寻找高效、抑制焦亡的抗PD药物成为科学家急需解决的问题。

国内外研究显示,MT,即N-乙酰基-5-甲氧基色胺,因其是松果体分泌的吲哚类激素,又称松果体素,具有镇静催眠、调节睡眠觉醒周期、抗氧化、抗谷氨酸兴奋毒性和抗炎性反应的作用,主要用于防止神经细胞凋亡,对阿尔海默茨病和PD具有较高的治疗价值^[6-7]。也有研究显示,褪黑素对SD大鼠脑缺血再灌注损伤后c-fos表达具有影响^[13],且可调节DNA甲基化相关酶,从而减轻大鼠脑缺血再灌注损伤^[14]。Videnovic等^[15]在一项临床横断面研究发现,PD药物治疗可减少体内MT释放,相较于无嗜睡的PD患者,合并嗜睡的PD患者体内MT水平低,提示MT在PD患者的睡眠调节中发挥作用,但机制不清楚。然而,外源性MT对嗜睡无改善作用。2020年1篇综述显示^[16],MT通过抑制细胞凋亡、自噬、氧化应激、炎症、 α -突触核蛋白聚集和多巴胺损失等病理机制,改善PD患者的某些非运动症状,但是未见MT与焦亡的机制研究。本研究利用MPP⁺诱导PD模型,发现MT不仅显著降低NLRP3的表达水平,还明显抑制炎症因子IL-1 β 和IL-18释放,减轻炎症反应,降低神经细胞焦亡。结合文献,上述结果提示,在PD发生发展过程中,包括小胶质细胞和神经元在内的神经细胞受到损伤后,会激活NLRP3炎症小体,促进焦亡的发生;而利用MT等抗炎药物,可打断炎症反应通路,减少神经细胞焦亡,从而发挥保护受损神经元的作用。

之前的研究发现,褪黑素受体激活可减轻PD鼠脑内炎症瀑布级联反应、加强线粒体自噬、发挥抗淀粉样变的作用。我们的研究结果表明,褪黑素预处理可有效减少MPP⁺诱导的神经元细胞凋亡,发挥神经保护作用。褪黑素被发现在多种疾病中可抑制炎症小体NLRP3,继而发挥保护作用。而炎症小体NLRP3被认为在PD的病理生

理发展中发挥重要的作用,我们的实验结果显示,炎症小体NLRP3在MPP⁺诱导后的神经元细胞内表达明显升高,而褪黑素预处理可有效降低NLRP3的表达水平,提示MT预处理可能通过减少NLRP3炎症小体的生成发挥抗PD的作用。此外,研究发现,在椎间盘变性中,MT通过抑制炎症小体NLRP3进而抑制IL-1通路,发挥抗炎保护作用,然而在PD中,MT发挥作用的分子机制仍不明确。本实验发现,MT预处理可有效减少IL-1 β 和IL-18的表达水平,提示NLRP3-I、L1 β /IL18可能是MT在PD中发挥保护作用的可能机制。

尽管我们的研究提供了一种新的可能机制,但我们的研究也有局限性:①本实验只用了细胞;②没有反向验证。

综上,MT这种天然抗氧化剂,可抑制NLRP3炎症小体的表达,减轻炎症反应,进而减少神经细胞焦亡,为其在PD的临床治疗提供了可靠的实验证据和理论依据。

参 考 文 献

- [1] WANG YP, GAO WQ, SHI XY, et al. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin[J]. *Nature*, 2017, 547(7661): 99-103.
- [2] 朱光,陈丽艳,林贞花. 细胞焦亡与肿瘤治疗研究进展[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2018, 34(10): 1126-1130.
- [3] SAMPSON TR, DEBELIUS JW, THRON T, et al. Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease[J]. *Cell*, 2016, 167(6): 1469-1480.e12.
- [4] 张诗敏,胡玉英,韦晓芸,等. 中医药治疗帕金森病的研究进展[J]. *广西医学*, 2020, 42(10): 1303-1305.
- [5] HO MS. Microglia in Parkinson's disease[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1175: 335-353.
- [6] FANG N, HU CY, SUN WQ, et al. Identification of a novel melatonin-binding nuclear receptor: vitamin D receptor[J]. *J Pineal Res*, 2020, 68(1): e12618.
- [7] 张海洋,陆翔宇,张家华,等. 褪黑素对LPS致大鼠海马炎性损伤的保护作用[J]. *畜牧兽医学报*, 2021, 52(1): 218-226.
- [8] 李南欣,刘娅,周红利. 小胶质细胞在神经退行性疾病中的作用研究进展[J]. *成都医学院学报*, 2020, 15(5): 677-680.
- [9] BARTELS T, DE SCHEPPER S, HONG S. Microglia modulate neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases[J]. *Science*, 2020, 370(6512): 66-69.
- [10] HAQUE ME, AKTHER M, JAKARIA M, et al. Targeting the microglial NLRP3 inflammasome and its role in Parkinson's disease[J]. *Mov Disord*, 2020, 35(1): 20-33.
- [11] HAN XJ, SUN SF, SUN YM, et al. Small molecule-driven NLRP3 inflammation inhibition via interplay between ubiquitination and autophagy: implications for Parkinson disease[J]. *Autophagy*, 2019, 15(11): 1860-1881.
- [12] WANG S, YUAN YH, CHEN NH, et al. The mechanisms of NL-

- RP3 inflammasome/pyroptosis activation and their role in Parkinson's disease[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 67: 458-464.
- [13] 王雨,杨凯,胡治平. 褪黑素对SD大鼠脑缺血再灌注损伤后c-fos表达的影响[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2021, 48(1): 63-68.
- [14] 李光祖,马瑜徽,张新月,等. 褪黑素调节DNA甲基化相关酶减轻大鼠脑缺血再灌注损伤[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2021, 48(4): 333-338.
- [15] VIDENOVIC A, NOBLE C, REID KJ, et al. Circadian melatonin rhythm and excessive daytime sleepiness in Parkinson disease [J]. *JAMA Neurol*, 2014, 71(4): 463-469.
- [16] TAMTAJI OR, REITER RJ, ALIPOOR R, et al. Melatonin and Parkinson disease: current status and future perspectives for molecular mechanisms[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2020, 40(1): 15-23.

责任编辑:龚学民