

· 基础研究 ·

## 原花青素对LPS/ATP诱导的NLRP3炎症小体激活及NF-κBp65磷酸化的抑制作用

卢晓星, 张小强\*, 苗歆雨, 季倩倩, 李 琪, 陶一凡

东南大学公共卫生学院, 环境医学工程教育部重点实验室, 江苏 南京 210009

**[摘要]** 目的: 研究原花青素对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)与腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)联合诱导的小鼠小胶质细胞BV2 NOD样受体蛋白3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3)炎症小体激活及核因子(nuclear factor, NF)-κBp65磷酸化的抑制作用。方法: 以1.0 μg/mL LPS、2.5 μmol/L ATP诱导BV2细胞炎症损伤模型, 用不同浓度原花青素(0.1、1.0、2.5、5.0 μg/mL)干预细胞。采用噻唑蓝(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)法检测细胞存活率; 比色法检测一氧化氮(nitric oxide, NO)释放水平; 微量酶标法测乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活力; ELISA法检测白细胞介素(interleukin, IL)-1β、IL-18的分泌水平; Western blot法检测NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspase)-1、pro-caspase-1、p-NF-κBp65、NF-κBp65蛋白表达水平。结果: 不同浓度的原花青素对BV2细胞存活率的影响与对照组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与对照组相比, LPS/ATP诱导可增加BV2细胞NO、IL-1β、IL-18水平以及LDH活力( $P < 0.05$ ), 增加NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1、p-NF-κBp65蛋白表达水平( $P < 0.05$ )。与LPS/ATP组相比, 原花青素能降低BV2细胞NO、IL-1β、IL-18水平以及LDH活力( $P < 0.05$ ); 原花青素(1.0、2.5、5.0 μg/mL)降低NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1蛋白表达水平( $P < 0.05$ ); NF-κB抑制剂BAY11-7082(5.0 μmol/L)降低NF-κBp65磷酸化及NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1蛋白表达水平( $P < 0.05$ )。结论: 原花青素可以抑制LPS/ATP诱导的BV2细胞炎症因子分泌及NLRP3炎症小体激活, 该作用与原花青素抑制LPS/ATP诱导条件下NF-κBp65磷酸化密切相关。

**[关键词]** 原花青素; 炎症因子; NLRP3炎症小体; 脂多糖; 腺嘌呤核苷三磷酸

**[中图分类号]** Q254

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2020)08-1111-08

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20200806

## Inhibitory effects of proanthocyanidin on LPS/ATP induced activation of NLRP3 inflammasome and phosphorylation of NF-κBp65

LU Xiaoxing, ZHANG Xiaoqiang\*, MIAO Xinyu, JI Qianqian, LI Qi, TAO Yifan

School of Public Health, Key Laboratory of Environmental Medicine Engineering of Ministry of Education, Southeast University, Nanjing 210009, China

**[Abstract]** **Objective:** To observe the inhibitory effects of proanthocyanidin on activation of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome and phosphorylation of nuclear factor (NF)-κBp65 induced by lipopolysaccharide (LPS) and adenine nucleoside triphosphate (ATP) in mouse microglia (BV2). **Methods:** BV2 cells were stimulated with 1.0 μg/mL LPS and 2.5 μmol/L ATP, and treated with different concentrations of proanthocyanidin (0.1, 1.0, 2.5, 5.0 μg/mL). Cell viability was determined by thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay. Nitric oxide (NO) release was detected by colorimetry. The activity of lactate dehydrogenase (LDH) was measured by microenzyme labeling method. The secretion of interleukin (IL)-1β and IL-18 were determined by ELISA. Expression of NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), caspase-1, pro-caspase-1, p-NF-κBp65, NF-κBp65 were detected by Western blot. **Results:** The effect of different concentrations of proanthocyanidin on the survival rate of BV2 cells was not statistically significant compared with the control group ( $P > 0.05$ ).

**[基金项目]** 中央高校基本科研业务费专项资金; 江苏省普通高校研究生科研创新计划(SJZZ16\_0034)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhangxq7843@126.com

Compared with the control group, LPS/ATP increased the secretions of NO, IL-1 $\beta$ , IL-18 and LDH activity ( $P < 0.05$ ), and the expressions of NLRP3, ASC, pro-caspase-1, caspase-1, p-NF- $\kappa$ Bp65 ( $P < 0.05$ ). Compared with the LPS/ATP group, proanthocyanidin reduced the secretions of NO, IL-1 $\beta$ , IL-18 and LDH activity of BV2 cells ( $P < 0.05$ ). In addition, proanthocyanidin (1.0, 2.5, 5.0  $\mu$ g/mL) decreased the expressions of NLRP3, ASC, pro-caspase-1 and caspase-1 ( $P < 0.05$ ). Similarly, NF- $\kappa$ B inhibitor BAY11-7082 (5.0  $\mu$ mol/L) reduced NF- $\kappa$ Bp65 phosphorylation and the expressions of NLRP3, ASC, pro-caspase-1, and caspase-1 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Proanthocyanidin can inhibit secretion of inflammatory factor and activation of NLRP3 inflammasome induced by LPS/ATP, which is closely related to the inhibition of phosphorylation of NF- $\kappa$ Bp65 by proanthocyanidin in LPS/ATP induced status.

[Key words] proanthocyanidin; inflammatory factors; NLRP3 inflammasome; lipopolysaccharide; adenine nucleoside triphosphate

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(08): 1111-1118]

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种典型的神经退行性疾病,已成为继阿尔茨海默症之后的全球第二大神经退行性疾病。PD的主要特征性病理改变是黑质致密部多巴胺能神经元的变性、逐渐丢失,继而导致纹状体多巴胺水平的急剧下降,胞浆内出现 $\alpha$ -突触核蛋白形成的路易小体,伴随着慢性神经炎症,线粒体功能障碍等,从而导致PD的主要症状,如震颤、肌肉僵硬、平衡障碍和运动迟缓<sup>[1-3]</sup>。PD的发病机制错综复杂,其发展是多种因素综合作用的结果。

近年来,炎症因子介导的神经炎症引起的神经元死亡及其在PD发生发展中的作用正在被广泛研究<sup>[4-5]</sup>。炎症小体的活化是PD神经炎症的主要来源之一。炎症小体是小胶质细胞胞浆内的一种多蛋白复合物,根据不同的分子组合可分为不同亚型。NOD样受体蛋白3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3)炎症小体是研究最广泛的一种,主要由NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspase)-1前体组成。可识别损伤相关分子模式(damage-associated molecular pattern molecules, DAMPs)和病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs),且可触发并激活caspase-1,介导白细胞介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 和IL-18等炎症因子的前体形式转变为活化形式,使其成为成熟的炎症因子IL-1 $\beta$ 和IL-18被释放到胞外,促进炎症发展<sup>[6]</sup>。

原花青素是一类黄烷醇单体及其聚合体形成的多酚类化合物<sup>[7-8]</sup>,广泛存在于水果、种子、花和树皮中。已有研究发现原花青素具有抗炎活性,在脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的人内皮细胞炎

症模型中,原花青素B2可以减少活性氧形成,抑制炎症小体活化<sup>[9]</sup>。还有研究表明原花青素B2能够抑制小鼠炎症小体活化,降低了肾和血清IL-1 $\beta$ 和IL-18水平,防止小鼠狼疮性肾炎的发生<sup>[10]</sup>。然而,目前有关原花青素影响炎症小体激活从而延缓神经退行性疾病发生发展的研究国内外尚未见明确报道。本研究采用LPS/腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)双信号诱导BV2细胞炎症损伤,原花青素进行干预,探讨原花青素对LPS/ATP诱导BV2细胞炎症因子的分泌和NLRP3炎症小体激活及核因子(nuclear factor, NF)- $\kappa$ Bp65磷酸化的影响,分析原花青素对神经系统炎性损伤的抑制作用及其可能的相关机制,旨在为神经退行性疾病的预防提供新的思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

BV2细胞株(中国医学科学院基础医学研究所细胞中心);原花青素(纯度 $\geq 95\%$ )(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);LPS、ATP、噻唑蓝(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)、二甲基亚砷(dimethylsulphoxide, DMSO)(Sigma公司,美国);DMEM培养基(HyClone公司,美国);胎牛血清(Clarkbio公司,美国);一氧化氮(nitric oxide, NO)检测试剂盒、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);IL-1 $\beta$ 、IL-18 ELISA试剂盒(上海酶联生物科技有限公司);NLRP3、pro-caspase-1、caspase-1抗体(Abcam公司,英国);ASC、 $\beta$ -actin抗体以及二抗(Santa Cruz公司,美国)。

Olympus IX51倒置相差显微镜(Olympus公司,

日本); Esco 二氧化碳培养箱(Esco 公司, 新加坡); RT-6000 酶标分析仪(Rayto 公司, 美国); 5417R 高速冷冻离心机(Eppendorf 公司, 德国); Mini-Protein 3 小型垂直电泳槽(Bio-Rad 公司, 美国); DYCZ-40D 转印电泳槽(北京六一仪器厂); Tanon 5200 化学发光成像系统(上海天能科技有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细胞培养

BV2 细胞培养于 DMEM 高糖完全培养基(含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素与 100  $\mu$ g/mL 链霉素), 置于 37  $^{\circ}$ C、CO<sub>2</sub> 体积分数为 5% 的细胞培养箱中培养。每天换液, 隔天传代 1 次。待细胞培养至对数生长期进行实验。

### 1.2.2 比色法测 NO 释放水平

BV2 细胞以  $1 \times 10^5$  个/mL 的密度接种于 24 孔板, 每孔 500  $\mu$ L。待细胞贴壁后, 设立对照组、LPS (0.1、1.0、10.0 和 20.0  $\mu$ g/mL) 组, 每组 3 个平行孔。干预 24 h 后收集细胞上清, 按试剂盒说明书操作, 测定 550 nm 处光密度(optical density, OD) 值。绘制标准曲线, 由此计算各组细胞上清 NO 含量。

### 1.2.3 MTT 法测细胞活力

BV2 细胞以  $5 \times 10^3$  个/mL 的密度接种于 96 孔板, 每孔 100  $\mu$ L。待细胞至对数生长期进行实验, 设立调零组、对照组、LPS (1.0  $\mu$ g/mL)/ATP (0.1、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0 和 20.0  $\mu$ mol/L) 组、不同浓度原花青素 (0.1、1.0、2.5、5.0  $\mu$ g/mL) 组、LPS/ATP+不同浓度原花青素 (0.1、1.0、2.5、5.0  $\mu$ g/mL) 组, 原花青素预先 1 h 加入, LPS 干预 24 h, ATP 干预 30 min, 每组 5 个平行孔。干预完成, 每孔加入 MTT (5.0 mg/mL) 10  $\mu$ L, 继续培养 4 h, 弃培养液上清。每孔加入 150  $\mu$ L DMSO 液, 震荡 5 min, 使蓝紫色结晶充分溶解。酶标仪测定 490 nm 处吸光度值, 计算细胞存活率。细胞存活率 (%) = (实验组 OD 值 - 调零组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 调零组 OD 值)  $\times$  100%。

### 1.2.4 微量酶标法测 LDH 活力

BV2 细胞以  $1 \times 10^5$  个/mL 的密度接种于 24 孔板, 每孔 500  $\mu$ L。待细胞贴壁后, 设立对照组、LPS/ATP 组、LPS/ATP+不同浓度原花青素 (0.1、1.0、2.5、5.0  $\mu$ g/mL) 组, 每组 3 个平行孔。原花青素预先 1 h 加入, LPS 干预 12 h, ATP 干预 30 min。收集细胞培养液, 离心后取上清, 用 LDH 试剂盒检测。按试剂盒说明操作, 酶标仪测定 450 nm 处 OD 值。LDH 活力 = (测定组 OD 值 - 测定空白组 OD 值) / (标准组 OD 值 - 标准空白组 OD 值)  $\times$  标准品浓度  $\times$  1 000。

### 1.2.5 ELISA 法检测 IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平

细胞分组同 1.2.4。收集细胞培养液, 3 000 r/min 离心 20 min 后取上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书进行, 操作完毕后用酶标仪测定 450 nm 处 OD 值。根据标准曲线分别确定样品中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平。

### 1.2.6 Western blot 法检测相关蛋白表达水平

BV2 细胞以  $1 \times 10^6$  个接种于 6 cm 培养皿中, 分组同 1.2.4。干预后, 弃掉培养上清, 加入裂解液, 于冰上裂解细胞, 收集蛋白。高速低温离心机 4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 用 BCA 蛋白浓度试剂盒对蛋白含量进行测定。取适量蛋白进行凝胶电泳、转膜、封闭, 一抗 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗膜 8 次, 每次 5 min。二抗室温孵育 2 h, TBST 再次洗膜 8 次, 每次 5 min。然后加入免疫印迹化学发光剂进行显影、定影, 并用 Image J 软件对成像结果进行分析。

## 1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 实验结果以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组比较采用方差齐性检验和单因素方差分析 (one-way ANOVA)。组间两两比较时, 若方差齐, 采用 LSD 检验; 若方差不齐, 采用 Dunnett's T3 检验。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 LPS 对 BV2 细胞释放 NO 的影响

与对照组比较, 不同浓度 LPS (0.1、1.0、10.0、20.0  $\mu$ g/mL) 均可使 BV2 细胞 NO 水平升高, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 1), 且随 LPS 浓度增大而增加。根据实验结果确定后续实验 LPS 作用浓度为 1.0  $\mu$ g/mL。

### 2.2 原花青素及 LPS/ATP 对 BV2 细胞存活率的影响

与对照组比较, 不同浓度原花青素 (0.1、1.0、2.5、5.0  $\mu$ g/mL) 对细胞存活率无明显影响, 差异无统

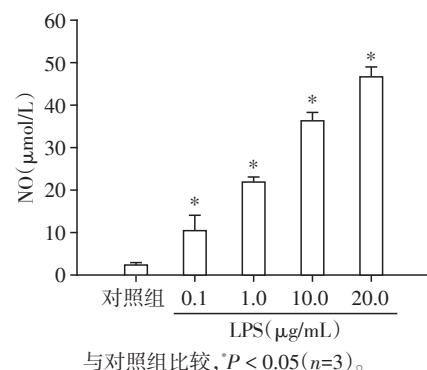
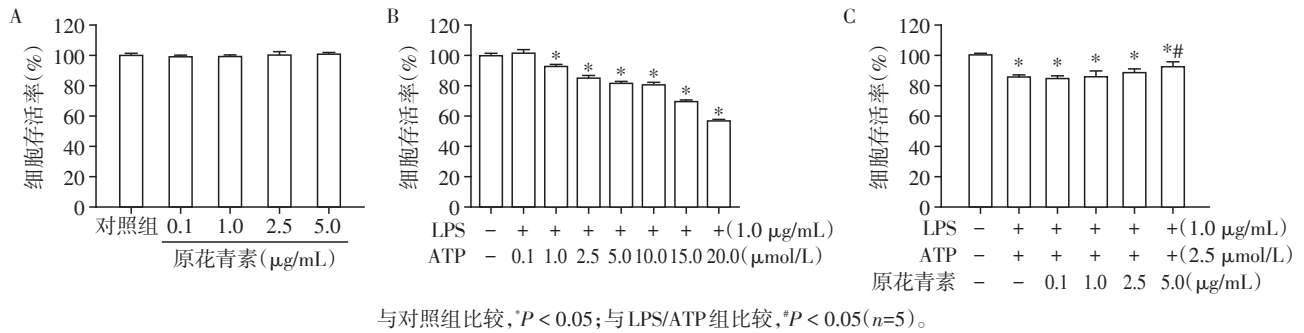


图1 LPS 对 BV2 细胞释放 NO 的影响

Figure 1 Effect of LPS on NO release in BV2 cells

计学意义( $P > 0.05$ ,图2A)。与对照组比较,除LPS(1.0  $\mu\text{g/mL}$ )/ATP(0.1  $\mu\text{mol/L}$ )染毒组,其余各组细胞存活率均下降,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,图2B),根据实验结果确定ATP作用浓度为2.5  $\mu\text{mol/L}$ 。

与LPS/ATP组比较,LPS/ATP+原花青素(5.0  $\mu\text{g/mL}$ )组细胞存活率升高,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ,图2C),说明原花青素可以提高LPS/ATP诱导的BV2细胞存活率。



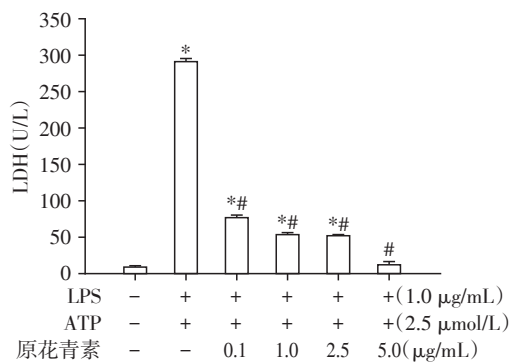
与对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与LPS/ATP组比较,\*\* $P < 0.05$ ( $n=5$ )。

图2 原花青素及LPS/ATP对BV2细胞存活率的影响

Figure 2 Effects of proanthocyanidin and LPS/ATP on the cell viability of BV2 cells

### 2.3 原花青素对LDH活力的影响

给予LPS(1.0  $\mu\text{g/mL}$ )/ATP(2.5  $\mu\text{mol/L}$ )刺激BV2细胞,不同浓度原花青素(0.1、1.0、2.5、5.0  $\mu\text{g/mL}$ )预处理细胞,用微量酶标法检测细胞培养上清液中LDH活力。结果显示,与对照组比较,LPS/ATP组细胞上清LDH活力明显升高,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ,图3),说明LPS/ATP可以改变细胞膜完整性,导致细胞损伤。与LPS/ATP组比较,不同浓度原花青素(0.1、1.0、2.5、5.0  $\mu\text{g/mL}$ )预处理均可降低BV2细胞LDH活力,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,图3)。由此可见,原花青素可以对LPS/ATP诱导的BV2细胞损伤起到一定保护作用。



与对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与LPS/ATP组比较,\*\* $P < 0.05$ ( $n=3$ )。

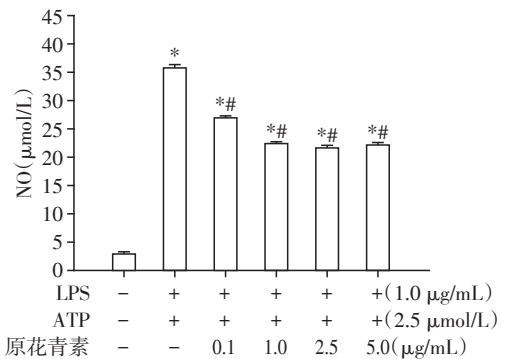
图3 原花青素对BV2细胞LDH活力的影响

Figure 3 Effect of proanthocyanidin on LDH activity in BV2 cells

### 2.4 原花青素对BV2细胞NO释放水平的影响

采用比色法间接检测BV2细胞培养上清NO释放水平,结果显示,与对照组比较,LPS/ATP组NO释放水平明显升高,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ,图

4)。与LPS/ATP组比较,不同浓度原花青素(0.1、1.0、2.5、5.0  $\mu\text{g/mL}$ )干预均可降低BV2细胞NO释放水平,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ,图4)。说明原花青素可以一定程度上抑制BV2细胞NO释放水平。



与对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与LPS/ATP组比较,\*\* $P < 0.05$ ( $n=3$ )。

图4 原花青素对BV2细胞NO释放水平的影响

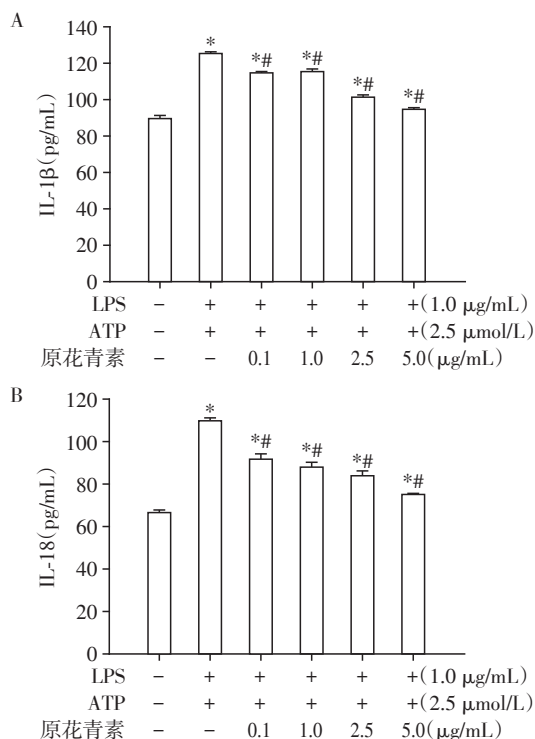
Figure 4 Effect of proanthocyanidin on NO release level in BV2 cells

### 2.5 原花青素对BV2细胞炎症因子IL-1 $\beta$ 、IL-18水平的影响

ELISA法检测BV2细胞培养上清中IL-1 $\beta$ 、IL-18水平,结果显示,与对照组比较,LPS/ATP组细胞炎症因子IL-1 $\beta$ 、IL-18释放水平明显升高,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ,图5)。与LPS/ATP组比较,不同浓度原花青素(0.1、1.0、2.5、5.0  $\mu\text{g/mL}$ )预处理细胞,均使BV2细胞炎症因子IL-1 $\beta$ 、IL-18水平下降,且随着原花青素浓度增加而降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,图5)。结果表明,原花青素可以抑制LPS/ATP诱导BV2细胞炎症因子IL-1 $\beta$ 、IL-18的分泌。

## 2.6 原花青素对BV2细胞NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1蛋白表达的影响

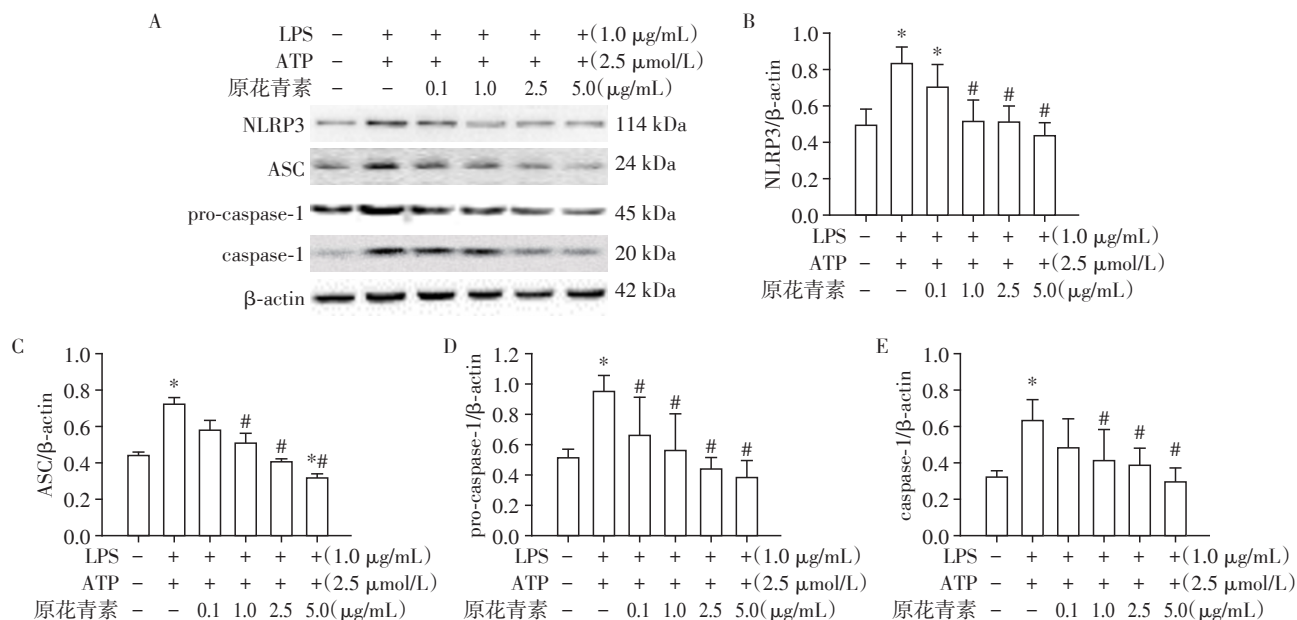
给予LPS(1.0 μg/mL)/ATP(2.5 μmol/L)刺激BV2



与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与LPS/ATP组比较, # $P < 0.05$  ( $n=3$ )。

图5 原花青素对BV2细胞炎症因子IL-1β(A)、IL-18(B)水平的影响

Figure 5 Effects of proanthocyanidin on the secretion of IL-1β(A) and IL-18(B) in BV2 cells



A: Western blot 实验结果; B~E: 蛋白表达定量分析。与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与LPS/ATP组比较, # $P < 0.05$  ( $n=3$ )。

图6 原花青素对BV2细胞NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1蛋白表达的影响

Figure 6 Effects of proanthocyanidin on expression of NLRP3, ASC, pro-caspase-1, caspase-1 in BV2 cells

细胞, 采用不同浓度原花青素(0.1、1.0、2.5、5.0 μg/mL)预处理细胞。由Western blot实验条带图可见, LPS/ATP组NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1蛋白表达增加, 而不同浓度原花青素(0.1、1.0、2.5、5.0 μg/mL)预处理可以使上述蛋白表达减少(图6A)。用ImageJ软件对Western blot实验条带图进行灰度值分析, 结果显示, 与对照组比较, 给予LPS/ATP刺激后NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1灰度值比值升高, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ , 图6B~E), 说明LPS/ATP诱导NLRP3炎症小体活化。与LPS/ATP组比较, 不同浓度原花青素(1.0、2.5、5.0 μg/mL)预处理后NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1灰度值比值下降, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); 0.1 μg/mL原花青素仅pro-caspase-1蛋白表达的灰度值比值降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。上述结果表明原花青素可抑制LPS/ATP诱导条件下NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1蛋白表达水平, 对NLRP3炎症小体激活具有抑制作用。

## 2.7 原花青素通过NF-κB信号通路抑制LPS/ATP诱导的BV2细胞NLRP3炎症小体激活

采用NF-κB通路抑制剂BAY11-7082(5.0 μmol/L)或者原花青素(5.0 μg/mL)预处理LPS/ATP联合诱导BV2细胞。Western blot实验条带图显示, LPS/ATP+BAY11-7082组和LPS/ATP+原花青素组可以降低p-NF-κBp65蛋白表达水平, 同时可以降低NL-

RP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1 蛋白表达水平(图7A)。用ImageJ软件对Western blot实验条带图进行灰度值分析,分析结果见图7B~F。与对照组比较,LPS/ATP联合诱导组 NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1、p-NF-κBp65 灰度值比值升高,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),说明 LPS/ATP 激活了 NF-κB 信号通路和 NLRP3 炎症小体。与 LPS/ATP 组比

较,LPS/ATP+BAY11-7082 组以及 LPS/ATP+原花青素组 NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1、p-NF-κBp65 灰度值比值降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),表明原花青素可以抑制 LPS/ATP 诱导的 BV2 细胞 NLRP3 炎症小体激活及 NF-κBp65 磷酸化水平,说明该条件下原花青素通过 NF-κB 信号通路实现对 NLRP3 炎症小体激活的抑制作用。

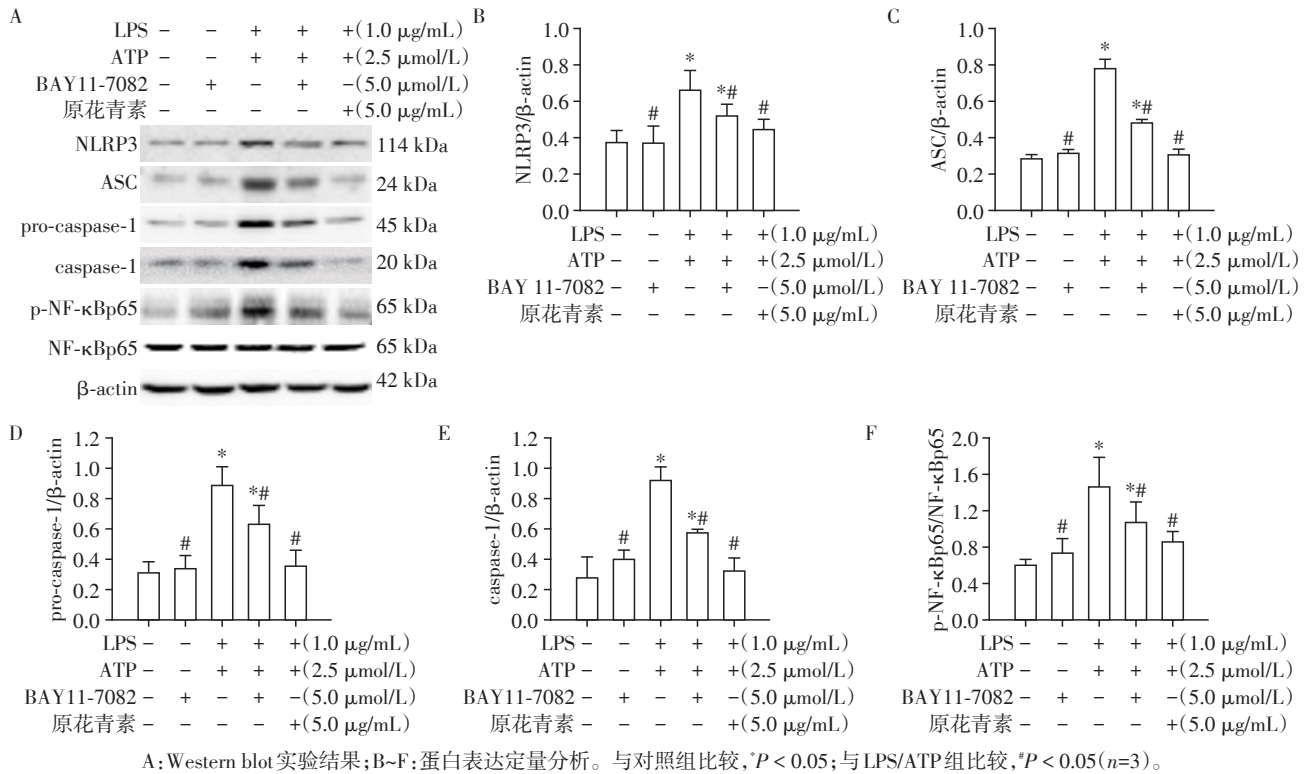


图7 原花青素通过NF-κB信号通路抑制LPS/ATP诱导的BV2细胞NLRP3炎症小体激活

Figure 7 Proanthocyanidin inhibited LPS / ATP-induced activation of NLRP3 inflammasome through the NF-κB signaling pathway in BV2 cells

### 3 讨论

小胶质细胞介导的神经炎症,在PD的早期出现,逐渐促进疾病的进展,在PD发生发展过程中发挥重要作用<sup>[11-14]</sup>。小胶质细胞是中枢神经系统的一类免疫细胞,在正常条件下,呈静息状态,但活化的小胶质细胞会持续释放TNF-α、IL-1β、IL-6、NO等炎症介质,这些炎症因子累积可引发神经炎症,损伤周围神经元<sup>[15]</sup>。与健康对照组相比,PD患者的血清样本中IL-1β水平显著升高并伴有NLRP3炎症小体的激活<sup>[16]</sup>。此外,在PD患者死后脑黑质中发现大量活化的小胶质细胞<sup>[17]</sup>。PD患者脑黑质小胶质细胞中NLRP3炎症小体及其组成成分,包括NLRP3、ASC和caspase-1均上调<sup>[18]</sup>。NLRP3炎症小体激活

需要双重信号:第一信号也称为启动信号,由大量PAMPs组成,如LPS与Toll样受体结合,激活NF-κB信号通路,促进NLRP3和pro-IL-1β的表达,这个过程被称为启动过程;第二信号又称为激活信号,来自于多种激活因子,如外源性ATP、细菌毒素、某些晶体以及线粒体DNA<sup>[19-20]</sup>。当NLRP3受到激活信号时可通过ASC招募pro-caspase-1使其发生水解,产生具有酶活性的caspase-1,促使pro-IL-1β和pro-IL-18裂解<sup>[21]</sup>。此外,一些颗粒物及α-突触核蛋白也可以激活NLRP3炎症小体<sup>[16,22-23]</sup>。激活BV2细胞建立细胞模型可以替代原代小胶质细胞或动物模型用于研究脑部炎症<sup>[24]</sup>。本研究采用LPS/ATP双重信号共同刺激BV2细胞观察NLRP3炎症小体的激活状态,并采用ELISA法检测BV2细胞IL-1β、IL-18分

泌水平,结果证实LPS/ATP双信号诱导可以激活小胶质细胞NLRP3炎症小体激活。

近年来,NLRP3炎症小体通路作为炎症性疾病的治疗靶点已得到广泛的认识和关注。一些化合物通过影响NLRP3炎症小体激活来发挥抗炎作用。研究表明,银杏酮酯预处理后可以明显抑制LPS/ATP诱导原代小胶质细胞NLRP3炎症小体相关蛋白表达、NLRP3炎症小体聚集以及炎性因子的释放<sup>[25]</sup>。南蛇藤醇可降低LPS与ATP对永生化小鼠小胶质细胞的毒性作用,抑制凋亡相关蛋白,抑制相关炎症因子的释放,并且可以抑制体外和体内p-NF- $\kappa$ Bp65的表达<sup>[26]</sup>。消退素D1可以改善小胶质细胞线粒体代谢紊乱,抑制NLRP3炎症小体激活,从而抑制神经炎症<sup>[27]</sup>。这些研究提示,可以通过抑制NLRP3炎症小体激活发挥抗神经炎症作用。研究发现,可生物利用的多酚代谢物可以跨血脑屏障并保护脑内皮细胞和神经元细胞并减少神经炎症<sup>[28]</sup>。原花青素可能通过NF- $\kappa$ B通路降低炎症因子释放、抑制脑部炎症和抑郁样行为<sup>[29-30]</sup>。本研究发现,原花青素可以发挥抗神经炎症作用,抑制LPS/ATP双信号诱导的BV2细胞NLRP3炎症小体激活,降低炎症因子的分泌水平。

NF- $\kappa$ B信号通路参与NLRP3炎症小体启动过程。NF- $\kappa$ B信号通路是介导炎症的经典通路,常以p65和p50异二聚体形式存在。正常状态下在胞浆中与其抑制因子(inhibitor of NF- $\kappa$ B,I $\kappa$ B) $\alpha$ 结合形成无活性复合物,当大脑出现免疫炎症反应,NF- $\kappa$ B信号通路被激活,I $\kappa$ B $\alpha$ 被I $\kappa$ B激酶复合体(IKK)磷酸化释放NF- $\kappa$ B二聚体进入细胞核,与DNA上特异性位点结合,启动炎症因子的基因转录<sup>[31-32]</sup>。为了进一步研究原花青素抑制BV2细胞NLRP3炎症小体激活的可能机制,本研究以原花青素和NF- $\kappa$ B通路抑制剂BAY11-7082分别预处理LPS/ATP刺激的BV2细胞,结果发现原花青素和BAY11-7082均降低NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1蛋白表达水平,同时NF- $\kappa$ B磷酸化蛋白的表达水平也降低,研究结果预示原花青素可能通过抑制NF- $\kappa$ B信号通路影响NLRP3炎症小体启动过程,进而影响NLRP3炎症小体组装、活化。

本研究发现实验剂量范围内原花青素对BV2细胞没有明显毒性作用,可以降低BV2细胞LDH活力,减少炎症介质NO、IL-1 $\beta$ 、IL-18分泌水平,减轻LPS/ATP诱导的细胞炎症损伤,并且可以抑制NF- $\kappa$ B信号通路,下调NLRP3炎症小体相关蛋白表达,

抑制NLRP3炎症小体激活,发挥抗神经炎症作用。研究结果提示原花青素可能通过NF- $\kappa$ B信号通路抑制NLRP3炎症小体激活,有望对PD的预防和控制提供新的策略。

#### [参考文献]

- [1] MISHRA A K, RASHEED M S U, SHUKLA S, et al. Aberrant autophagy and Parkinsonism: does correction rescue from disease progression? [J]. *Mol Neurobiol*, 2014, 51(3):893-908
- [2] SVEINBJORNSDOTTIR S. The clinical symptoms of Parkinson's disease [J]. *J Neurochem*, 2016, 139(Suppl 1): 318-324
- [3] KALIA L V, LANG A E. Parkinson's disease [J]. *Lancet*, 2015, 386(9996):896-912
- [4] 臧彩霞,鲍秀琦,孙 华,等.神经炎症调控靶点在帕金森病治疗中的作用[J]. *药学学报*, 2016, 51(5):677-683
- [5] KAUR K, GILL J S, BANSAL P K, et al. Neuroinflammation - a major cause for striatal dopaminergic degeneration in Parkinson's disease [J]. *J Neurol Sci*, 2017, 381: 308-314
- [6] MARTINON F, BURNS K, TSCHOPP J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro-IL-beta [J]. *Mol Cell*, 2002, 10(2):417-426
- [7] YAMAKOSHI J, SAITO M, KATAOKA S, et al. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds [J]. *Food Chem Toxicol*, 2002, 40(5):599-607
- [8] SANO A. Safety assessment of 4-week oral intake of proanthocyanidin-rich grape seed extract in healthy subjects [J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 108(Pt B):519-523
- [9] YANG H, XIAO L, YUAN Y, et al. Procyanidin B2 inhibits NLRP3 inflammasome activation in human vascular endothelial cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 92(4): 599-606
- [10] HE J, SUN M, TIAN S. Procyanidin B2 prevents lupus nephritis development in mice by inhibiting NLRP3 inflammasome activation [J]. *Innate Immun*, 2018, 24(5): 307-315
- [11] TANSEY M G, ROMERO-RAMOS M. Immune system responses in Parkinson's disease: early and dynamic [J]. *Eur J Neurosci*, 2018, 49(3):364-383
- [12] KAMINSKA B, MOTA M, PIZZI M. Signal transduction and epigenetic mechanisms in the control of microglia activation during neuroinflammation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1862(3):339-351
- [13] KIM Y S, JOH T H. Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease [J]. *Exp Mol Med*, 2006, 38(4):333-347

- [14] LECOURS C, BORDELEAU M, CANTIN L, et al. Microglial implication in Parkinson's disease: loss of beneficial physiological roles or gain of inflammatory functions? [J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 282
- [15] GOMEZ-NICOLA D, PERRY V H. Microglial dynamics and role in the healthy and diseased brain: a paradigm of functional plasticity [J]. *Neuroscientist*, 2015, 21 (2) : 169-184
- [16] ZHOU Y, LU M, DU R H, et al. MicroRNA-7 targets Nod-like receptor protein 3 inflammasome to modulate neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease [J]. *Mol Neurodegener*, 2016, 11(1): 28-43
- [17] MCGEER P L, ITAGAKI S, BOYES B E, et al. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains [J]. *Neurology*, 1988, 38(8): 1285-1291
- [18] GORDON R, ALBORNOZ E A, CHRISTIE D C, et al. Inflammasome inhibition prevents  $\alpha$ -synuclein pathology and dopaminergic neurodegeneration in mice [J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(465): eah4066
- [19] SHARMA D, KANNEGANTI T D. The cell biology of inflammasomes: mechanisms of inflammasome activation and regulation [J]. *J Cell Biol*, 2016, 213(6): 617-629
- [20] JIANG D, CHEN S, SUN R, et al. The NLRP3 inflammasome: role in metabolic disorders and regulation by metabolic pathways [J]. *Cancer Lett*, 2018, 419: 8-19
- [21] SHI J, GAO W, FENG S. Pyroptosis: gasdermin-mediated programmed necrotic cell death [J]. *Trends Biochem Sci*, 2017, 42(4): 245-254
- [22] 李小燕, 孙浩, 李晓波, 等. 纳米级炭黑颗粒通过激活 NLRP3 炎症小体诱导小鼠急性肺炎反应 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(5): 643-647
- [23] CODOLO G, PLOTTEGHER N, POZZOBON T, et al. Triggering of inflammasome by aggregated  $\alpha$ -synuclein, an inflammatory response in synucleinopathies [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e55375
- [24] HENN A, LUND S, HEDTJÄRN M, et al. The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation [J]. *ALTEX*, 2009, 26(2): 83-94
- [25] 刘富群, 高崎, 王丹丹, 等. 银杏酮酯抑制 LPS/AT 诱导原代小胶质细胞 NLRP3 炎症小体的激活机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(16): 3346-3352
- [26] DAI W, WANG X, TENG H, et al. Celestrol inhibits microglial pyroptosis and attenuates inflammatory reaction in acute spinal cord injury rats [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 66: 215-223
- [27] 张本峥, 张蒙, 任怡稚, 等. 消退素 D1 通过影响小胶质细胞代谢抑制神经炎症改善阿尔茨海默病认知功能 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(5): 629-635
- [28] FIGUEIRA I, GARCIA G, PIMPÃO R C, et al. Polyphenols journey through blood-brain barrier towards neuronal protection [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 11456
- [29] JIANG X, LIU J, LIN Q, et al. Proanthocyanidin prevents lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice via neuroinflammatory pathway [J]. *Brain Res Bull*, 2017, 135: 40-46
- [30] TANG Y, XIONG R, WU A G, et al. Polyphenols derived from lychee seed suppress A $\beta$ (1-42)-induced neuroinflammation [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7): 2109
- [31] SHI Z M, HAN Y W, HAN X H, et al. Upstream regulators and downstream effectors of NF- $\kappa$ B in Alzheimer's disease [J]. *Neurol Sci*, 2016, 366: 127-134
- [32] SHIH R H, WANG C Y, YANG C M. NF-kappaB signaling pathways in neurological inflammation: a mini review [J]. *Front Mol Neurosci*, 2015, 8: 77

[收稿日期] 2019-12-25