神经科学·论著

甲基莲心碱通过抑制ROS/NLRP3/Caspase-1通路减少小胶质细胞焦亡并改善帕金森病神经炎症

刘纷纷[1],冯 丹[1],刘 韵[1],左方娅[1],郭修红[2],刘钰淇[1],陈兰兰[3],王玉洁[1],田锦勇[4] [1]贵州中医药大学研究生院,贵州贵阳;[2]清镇市第一人民医院重症医学科,贵州贵阳;[3]遵义医科大学研究生院,贵州遵义;[4]贵州省人民医院全科医学科,贵州贵阳

[摘要] **目的** 证实甲基莲心碱(neferine,Nef)通过抑制活性氧(reactive oxygen species,ROS)/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)/Caspase-1通路介导的小胶质细胞焦亡,从而改善帕金森病(Parkinson's disease,PD)症状。**方法** 将小鼠小胶质细胞BV2分为对照组、脂多糖(lipopolysaccharides,LPS)-三磷酸腺苷(adenosine triphosphate,ATP)组、LPS-ATP+Nef组,采用1 μg/mL LPS联合5 mmol/L ATP诱导小胶质细胞焦亡,对LPS-ATP诱导的小胶质细胞给予2 μmol/L Nef预处理。取18只10~12周龄C57BL/6雄性小鼠(体质量22~25 g),采用计算机随机数生成法将小鼠分为:对照组(n=6)、1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine,MPTP)组(n=6)、MPTP+Nef组(n=6)。采用流式细胞仪检测细胞焦亡,CCK-8检测细胞活力,2′,7′-二氯荧光素二乙酸酯(2′,7′-Dichlorodihydrofluorescein diacetate,DCFH-DA)探针表征ROS,试剂盒检测丙二醛(malondialdehyde,MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、谷胱甘肽(glutathione,GSH)。应用ELISA法及Western blot检测白介素1β(interleukin-1β,IL-1β)及白介素18(interleukin-18,IL-18),免疫荧光及免疫组化检测NLRP3及Caspase-1表达,免疫组化检测酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase,TH)蛋白表达。采用苏木素-伊红染色试剂盒观察脑组织病理学变化。采用小鼠神经功能缺损评分(modified neurological severity score,mNSS)评价小鼠神经功能损伤。**结果** LPS-ATP组与对照组相比,细胞活力降低(P=0.002),细胞焦亡增加(P<0.001),ROS(P<0.001)、MDA(P<0.001)、IL-1β(P<0.001)、IL-18(P<0.001)水平升高,NLRP3(P<0.001)和Caspase-1(P<0.001)表达上调,GSH水平(P<0.001)和SOD活性(P<0.001)降低。LPS-ATP+Nef组与LPS-ATP组比较,细胞活力增强(P=0.047),细胞焦亡减少(P<0.001),ROS(P=0.002)、MDA(P<0.001)、IL-1β(P<0.001)、IL-18(P=0.004)水平降低,NLRP3(P<0.001)及Caspase-1(P<0.001)表达下调,GSH水平(P<0.001)及SOD活性(P<0.001)升高。小鼠实验表明:MPTP组与对照组相比,mNSS得分(P<0.001)及组织ROS水平(P<0.001)增加,TH蛋白下调(P<0.001),NLRP3(P<0.001)及Caspase-1(P<0.001)表达上调,而Nef处理可明显抑制上述MPTP对小鼠的影响(P<0.05)。在组织病理学方面,对照组小鼠海马神经元分布均匀,细胞核结构清晰,MPTP组表现为部分神经元肿胀,出现间质水肿、核萎缩,而MPTP+Nef组神经元损伤有所改善。**结论** Nef通过ROS/NLRP3/Caspase-1通路抑制小胶质细胞焦亡,从而有效改善PD神经炎症及组织损伤。

[关键词] 帕金森病;细胞焦亡;小胶质细胞;甲基莲心碱

[中图法分类号] R285.5;R322.81;R742.5 [文献标志码] A

[基金项目] 贵州省中医药管理局中医药民族医药科学技术研究课题(QZYY-2021-011);贵州省科技厅基础研究重大项目(黔科合基础[2020]1Z059)

[通信作者] 田锦勇,E-mail:tjy8877@163.com

2097-0927/Copyright © 2025,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:刘纷纷,冯丹,刘韵,等. 甲基莲心碱通过抑制ROS/NLRP3/Caspase-1通路减少小胶质细胞焦亡并改善帕金森病神经炎症[J]. 陆军军医大学学报,2025,47(23):2933-2942. DOI:10.16016/j.2097-0927.202509003.

Citation:LIU F F,FENG D,LIU Y,*et al*. Neferine attenuates parkinson's disease *via* modulating microglial pyroptosis mediated by ROS/NLRP3/Caspase-1 signaling pathway[J]. J Army Med Univ,2025,47(23):2933-2942. DOI:10.16016/j.2097-0927.202509003.

Neferine attenuates parkinson's disease *via* modulating microglial pyroptosis mediated by ROS/NLRP3/Caspase-1 signaling pathway

LIU Fenfen[1], FENG Dan[1], LIU Yun[1], ZUO Fangya[1], GUO Xiuhong[2], LIU Yuqi[1], CHEN Lanlan[3], WANG Yujie[1], TIAN Jinyong[4] [1]Graduate School, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou; [2]Department of Critical Care Medicine, the First People's Hospital of Qingzhen City, Guiyang, Guizhou; [3]Graduate School, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou; [4]Department of General Practice, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou, China

[**Abstract**] Objective To demonstrate that neferine (Nef) alleviates Parkinson's disease (PD) by inhibiting microglial pyroptosis mediated through the reactive oxygen species (ROS)/NOD-like receptor protein 3 (NLRP3)/Caspase-1 pathway. Methods BV2 microglial cells were divided into: control group, lipopolysaccharides (LPS)-adenosine triphosphate (ATP) group, and LPS-ATP+Nef group. Pyroptosis was induced by 1 μg/mL LPS + 5 mmol/L ATP, with 2 mmol/L Nef pretreatment. Eighteen 10-12-week-old male C57BL/6 mice (22~25 g) were randomly assigned to: control (n=6), 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) (n=6), and MPTP+Nef (n=6) groups. Detection methods included: flow cytometry for pyroptosis, Cell Counting Kit-8 (CCK-8) for viability, 2′,7′-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) for ROS, commercial kits for malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), ELISA/Western blot for interleukin-1β (IL-1β)/IL-18, immunofluorescence/immunohistochemistry for NLRP3/Caspase-1, tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemistry, hematoxylin-eosin staining for neuropathology, and modified neurological severity score (mNSS). Results Versus control, LPS-ATP group showed decreased viability (P=0.002), increased pyroptosis (P<0.001), elevated ROS (P<0.001)/MDA (P<0.001)/IL-1β (P<0.001)/IL-18 (P<0.001), upregulated NLRP3 (P<0.001)/Caspase-1 (P<0.001), and reduced GSH (P<0.001)/SOD (P<0.001). Nef treatment reversed these effects (all P<0.05). According to the results of murine studies, compared with the control group, the MPTP group had increased mNSS (P<0.001)/tissue ROS (P<0.001), downregulated TH (P<0.001), upregulated NLRP3 (P<0.001)/Caspase-1 (P<0.001). Nef treatment significantly attenuated the MPTP-induced deleterious effects (P<0.05). Histopathological analysis revealed that control group exhibited uniformly distributed hippocampal neurons with distinct nuclear morphology; MPTP group showed neuronal swelling, interstitial edema, and nuclear atrophy; MPTP+Nef group demonstrated ameliorated neuronal damage. Conclusion Nef inhibits microglial pyroptosis *via* ROS/NLRP3/Caspase-1 axis, ameliorating PD neuroinflammation and pathology.

[**Key words**] Parkinson's disease; pyroptosis; microglia; neferine

Supported by the Guizhou Provincial Ethnic Medicine & Traditional Chinese Medicine Research Project (QZYY-2021-011) and the Guizhou Provincial Major Basic Research Project (QKH Foundation [2020] 1Z059). Corresponding author: TIAN Jinyong, E-mail: tjy8877@163.com

帕金森病(Parkinson's disease,PD)是第二大神经退行性疾病,其临床特征主要表现为进行性运动功能障碍[1-3]。据统计,全球约1 000万人受PD影响,且其患病率随年龄增长而升高[4]。临床资料显示,近30年来PD发病率呈上升趋势[5]。因此,深入研究PD的发病机制并探索有效的治疗策略具有重要临床意义。

细胞焦亡是一种由gasdermin介导的细胞程序性死亡方式,典型的细胞焦亡途径由炎性小体介导,炎性小体在结构上通常包含Nod样受体(Nod-like receptor,NLR)或AIM2样受体蛋白(AIM2-like receptor,ALR)、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD,ASC)、Caspase-1前体蛋白[6-9]。在焦亡过程中,炎性小体促进Caspase-1前体蛋白裂解为活化型Caspase-1,后者可进一步切割gasdermin以裂解为N端gasdermin(N-GSDMD)及C端gasdermin(C-GSDMD),N-GSDMD可在细胞膜上形成非选择性膜孔,从而促进水流入及细胞裂解;同时Caspase-1催化白介素1β(interleukin-1β,IL-1β)及白介

素18(interleukin-18,IL-18)的前体裂解为成熟形式,并通过N-GSDMD膜孔释放至胞外,诱发细胞焦亡[10-12]。

小胶质细胞作为中枢神经系统中的常驻巨噬细胞,在清除病原体和维持脑内稳态中发挥关键作用[13-16]。小胶质细胞焦亡在PD发病过程中具有重要意义。在PD动物模型和细胞模型中均观察到小胶质细胞焦亡的激活,抑制该过程可减轻神经炎症反应,并逆转多巴胺能神经元丢失和运动行为缺陷[15-17]。此外,小胶质细胞焦亡受活性氧(reactive oxygen species,ROS)/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)/Caspase-1通路正向调控,而抑制ROS/NLRP3/Caspase-1通路可有效干扰小胶质细胞焦亡的发生[18-20]。因此,ROS/NLRP3/Caspase-1通路有望成为抑制小胶质细胞焦亡并改善PD症状的重要靶点。

甲基莲心碱(neferine,Nef)是荷花绿色胚芽的主要成分,具有抗炎、抗氧化、抗血小板等生物活性,在癌症、心血管疾病、睡眠不足等疾病的治疗中发挥重要作用[21-23]。动物模型显示,Nef可有效抑制神经退行性疾病突变蛋白表达,改善模型小鼠的运动缺陷[24]。然而,目前仍不明确Nef对PD的治疗作用及确切机制。既往证据指出,Nef可通过ROS/NLRP3/Caspase-1通路抑制内皮细胞氧化应激及细胞焦亡[25],提示ROS/NLRP3/Caspase-1通路可能是Nef发挥抗炎及抗氧化作用的关键靶点。同时,鉴于ROS/NLRP3/Caspase-1通路对小胶质细胞焦亡的重要影响,本研究推测在PD中ROS/NLRP3/Caspase-1通路介导Nef对小胶质细胞焦亡的抑制作用。

鉴于此,本研究拟采用脂多糖(lipopolysaccharides,LPS)联合三磷酸腺苷(adenosine triphosphate,ATP)诱导的小胶质细胞模型,以及1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine,MPTP)诱导的小鼠PD模型,探讨Nef对PD的治疗作用,并着重探究其在调控小胶质细胞焦亡中的作用,以期明确Nef的作用靶点,为PD治疗提供新的机制见解和候选药物。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠小胶质细胞BV2细胞购自中国普诺赛公司;10~12周龄C57BL/6雄性小鼠购自中国维通利华(北京)公司;胎牛血清购自美国Gibco公司;青-链霉素混合液及杜氏改良Eagle培养基(dulbecco's modified eagle medium,DMEM)高糖培养基、ATP购自中国生工生物公司;MPTP购自美国Sigma Aldrich公司。LPS及Nef购自美国MedChemExprss公司;聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜购自中国索莱宝生物公司;FAM-FLICA Caspase-1(YVAD)检测试剂盒及碘化丙锭染剂购自美国ImmunoChemistry Technologies公司;CCK-8试剂盒、小鼠IL-1β ELISA试剂盒、小鼠IL-18 ELISA试剂盒、丙二醛(MDA)检测试剂盒、GSH检测试剂盒、SOD活性检测试剂盒(WST-8法)、免疫染色封闭液、DCFH-DA探针、DAPI染色液、苏木素伊红(HE)染色试剂盒、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)检测试剂盒、Western blot封闭液、增强型化学发光底物(enhanced chemilumines-cence,ECL)显色试剂均购自中国碧云天生物公司;4%多聚甲醛、荧光素偶联的山羊抗兔抗体、柠檬酸盐修复液、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)交联的Boost免疫组化检测试剂(山羊抗兔)、HRP交联的二抗、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)抗体均购自美国Cell signaling公司;NLRP3、Caspase-1抗体、IL-1β抗体、IL-18抗体均购自美国Arigobio公司;5-溴-2'-脱氧尿苷(5-bromo-2′-deoxyuridine,BrdU)抗体及神经元细胞核抗原(neuronal nuclei,NeuN)抗体购自美国Abcam公司;酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase,TH)抗体购自中国三鹰生物公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理 细胞培养基配置如下:10%胎牛血清+1%青-链霉素混合液+DMEM高糖培养基。小鼠小胶质细胞BV2细胞培养于细胞培养基中,孵育箱环境条件设置为37 ℃、5%CO_2。取生长状况良好的BV2细胞,分为对照组、LPS-ATP组、LPS-ATP+Nef组。对照组细胞正常培养,不接受LPS-ATP诱导及Nef给药。LPS-ATP组采用LPS联合ATP诱导细胞焦亡,使用1 μg/mL LPS联合5 mmol/L ATP诱导24 h。LPS-ATP+Nef组预先给予2 μmol/L Nef处理4 h,后采用LPS联合ATP诱导细胞焦亡。

1.2.2 CCK-8法检测细胞活力 取BV2细胞并接种于96孔板,进行实验分组及处理。然后,每孔加入CCK-8溶液,37 ℃孵育1 h。采用酶标仪检测450 nm处光密度[D(450)]值,计算细胞活力。

1.2.3 流式细胞术检测细胞焦亡 消化、收集细胞后,PBS溶液重悬细胞,1 000×g离心细胞5 min,移除上清液,采用FAM-FLICA Caspase-1(YVAD)检测试剂盒标记焦亡细胞。加入碘化丙锭染剂,室温避光复染5 min,使用流式细胞仪表征细胞焦亡。

1.2.4 ELISA法检测IL-1β及IL-18水平 采用ELISA检测细胞培养上清液中IL-1β及IL-18含量。收集细胞培养基,100×*g*离心5 min,取上清,使用小鼠IL-1β ELISA试剂盒或小鼠IL-18 ELISA试剂盒检测,检测步骤严格遵循产品使用说明书。

1.2.5 细胞氧化应激指标水平检测 为评估细胞的氧化应激水平,本研究收集各组细胞样品,并检测丙二醛(malondialdehyde,MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、谷胱甘肽(glutathione,GSH),所用试剂盒包括MDA检测试剂盒、SOD活性检测试剂盒、GSH检测试剂盒,操作步骤严格遵循产品使用指南。

1.2.6 免疫荧光法检测蛋白水平 为检测细胞中的NLRP3及Caspase-1蛋白,取细胞样品,去除培养基,4%多聚甲醛室温固定细胞15 min。移除固定液并洗涤细胞。为表征海马组织中的NLRP3及Caspase-1蛋白,取海马CA1区石蜡组织切片,脱蜡水化后置于柠檬酸钠缓冲液(pH=6.0)中,使用微波炉加热20 min,冷却至室温后使用0.1% Triton X-100进行通透处理。

加入含5%正常羊血清的封闭液封闭1 h。移除封闭液并洗涤后,加入NLRP3(稀释度1∶100)或Caspase-1抗体(1∶100)或BrdU抗体(稀释度1∶300)或NeuN(稀释度1∶100),4 ℃孵育过夜。移除一抗并洗涤。加入荧光素偶联的山羊抗兔抗体(稀释度1∶400),室温避光孵育1 h。DAPI染色液复染细胞核,中性树胶封片。荧光显微镜下观察荧光成像。

1.2.7 PD小鼠模型构建 本研究以C57BL/6雄性小鼠(体质量22~25 g,10~12周龄)为PD造模对象。小鼠自由饮食饮水,饲养湿度为(60±1)%,温度为(22±1)℃,12 h光暗交替循环。小鼠经适应性饲养1周后进行实验处理。采用计算机随机数生成法将小鼠为对照组、MPTP组、MPTP+Nef组(*n*=6)。MPTP组:腹腔注射25 mg/kg MPTP,每天1次,连续注射7 d。MPTP+Nef组:腹腔注射25 mg/kg MPTP,连续注射7 d,最后1次MPTP注射1.5 h后进行Nef腹腔注射,20 mg/kg,持续5 d。对照组:腹腔注射与MPTP等量的生理盐水,持续7 d,后连续腹腔注射与Nef等量的生理盐水,持续5 d。

1.2.8 小鼠神经功能缺损评分(Modified Neurological Severity Score,mNSS) 本研究采用改良mNSS对小鼠的神经损伤进行量化。评分在造模后24 h于安静环境下进行,由不知分组的研究人员通过观察小鼠的自发运动、行走姿态及前爪伸展等行为进行判定。具体标准如下:0分(无异常),1分(对侧前爪无法伸展),2分(爬行时向对侧转圈),3分(行走时向对侧倾倒),4分(无法行走或意识丧失)。得分越高,表明神经功能损伤越严重。

1.2.9 细胞/组织ROS检测 本研究使用活性氧检测试剂盒(DCFH-DA探针)检测细胞及组织样品中的ROS含量,DCFH-DA探针溶于无血清培养基,最终浓度为10 μmol/L。取各组小胶质细胞样品,去除细胞培养基,加入DCFH-DA探针,37 ℃孵育细胞20 min。激光共聚焦显微镜观察荧光成像,表征荧光强度,计算ROS相对变化。为检测海马组织中的ROS含量,取小鼠海马组织,匀浆,离心后弃上清,加入DCFH-DA探针溶液重悬沉淀,37 ℃孵育20 min。激光共聚焦显微镜检测,激发波长488 nm,发射波长525 nm。

1.2.10 海马组织病理学染色 收集小鼠海马体组织CA1区,脱水、石蜡包埋、切片。取石蜡组织切片,脱蜡、水化,采用苏木素伊红染色试剂盒进行组织病理学染色,染色步骤严格遵循产品说明书。染色结束后采用中性树胶封片,显微镜下观察组织病理学变化。

1.2.11 免疫组化检测NLRP3、Caspase-1、TH 为评估海马组织中的炎症小体活性,采用免疫组化检测海马CA1区NLRP3、Caspase-1蛋白;为检测黑质区多巴胺能神经元的变化,采用免疫组化检测黑质区冠状位脑切片中的TH蛋白。取小鼠相应脑片的石蜡切片,脱蜡水化后置于柠檬酸钠缓冲液(pH6.0)中,使用微波炉高火加热至沸腾后转为中低火保持微沸20 min。自然冷却至室温后加入用PBS配制的3%过氧化氢溶液,室温孵育10 min。PBS冲洗3次,每次5 min。加入含5%正常羊血清的封闭液,室温封闭1 h。封闭结束后,加入NLRP3抗体(稀释度1∶100)或Caspase-1抗体(稀释度1∶100)或TH抗体(稀释度1∶500),4 ℃孵育过夜。PBS冲洗3次,每次5 min。加入HRP交联的Boost免疫组化检测试剂,室温孵育30 min。DAB试剂显色,显色完成后立即将切片放入蒸馏水中终止反应。用苏木精染液复染细胞核,流水冲洗返蓝。脱水和中性树胶封片后,于显微镜下观察。

1.2.12 Western blot检测IL-1β及IL-18蛋白水平 取细胞或海马组织样品,使用RIPA裂解液进行裂解。待充分裂解后4 ℃下以12 000×*g*离心10 min,取上清液。BCA检测试剂盒用于上清液中蛋白浓度检测。取蛋白样品,并加入上样缓冲液,混匀后95 ℃下加热蛋白10 min,后通过SDS-PAGE凝胶电泳系统进行蛋白分离,湿式转膜仪进行蛋白冰转。待蛋白转移至PVDF膜后,加入封闭液,室温摇床振荡1 h。封闭结束后,加入一抗,4 ℃孵育过夜。一抗孵育结束

后,加入二抗(稀释度1∶10 000),室温孵育1 h。采用ECL显色试剂进行显色处理。上机,获取蛋白条带图像。以GAPDH为内参,计算蛋白相对水平。一抗产品信息及稀释度如下:IL-1β抗体(稀释度1∶1 000)、IL-18抗体(稀释度1∶1 000)、GAPDH抗体(稀释度1∶1 000)。

1.3　统计学分析

使用GraphPad Prism 9.0软件进行数据绘图,使用SPSS 23.0软件进行统计学分析。实验数据以$\bar{x}\pm s$表示。采用单因素方差分析进行组间比较,事后两两比较为Tukey检验。统计学分析均为双尾检验。$P<0.05$表明差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　Nef抑制LPS-ATP诱导的小胶质细胞焦亡

为探究Nef对LPS-ATP诱导小胶质细胞损伤的影响,本研究采用CCK-8检测细胞活力,采用流式细胞仪检测细胞焦亡率。CCK-8实验显示,对照组[(100.92±4.62)%]、LPS-ATP组[(67.07±6.45)%]、LPS-ATP+Nef组[(83.23±7.65)%]的细胞活力差异存在统计学意义($F=21.250$,$P<0.01$),其中LPS-ATP组细胞活力低于对照组($P=0.002$),LPS-ATP+Nef组细胞活力高于LPS-ATP组($P=0.047$)。细胞焦亡检测结果显示,LPS-ATP组焦亡率高于对照组($P<0.001$),LPS-ATP+Nef组焦亡率低于LPS-ATP组($P<0.001$)。结果提示Nef抑制LPS-ATP诱导的小胶质细胞焦亡(图1)。

2.2　Nef抑制LPS-ATP诱导的小胶质细胞氧化应激及炎症反应

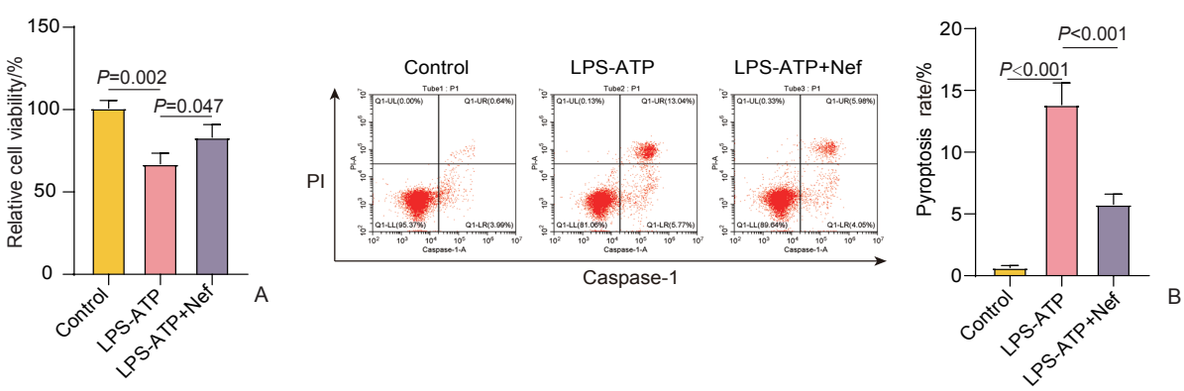
为进一步探究Nef对LPS-ATP诱导小胶质细胞氧化损伤和炎症反应的影响,本研究采用DCFH-DA荧光探针标记细胞内ROS,应用ELISA检测MDA、SOD、GSH、IL-1β、IL-18。DCFH-DA探针荧光结果显示,LPS-ATP组DCFH探针荧光强度较对照组增加($P<0.001$),LPS-ATP+Nef组与LPS-ATP组相比,DCFH探针荧光强度降低($P=0.002$,图2A)。LPS-ATP组与对照组相比,MDA升高($P<0.001$),SOD($P<0.001$)及GSH($P<0.001$)降低。LPS-ATP+Nef组与LPS-ATP组相比,MDA降低($P<0.001$),SOD($P<0.001$)及GSH($P<0.001$)升高,差异具有统计学意义($P<0.001$,图2B~D)。ELISA实验结果显示,LPS-ATP组与对照组相比,IL-1β($P<0.001$)及IL-18升高($P<0.001$),LPS-ATP+Nef组与LPS-ATP组相比,IL-1β($P<0.001$)及IL-18($P<0.001$,图2E)降低。以上结果提示Nef抑制LPS-ATP诱导的小胶质细胞氧化应激及炎症反应。

2.3　Nef抑制LPS-ATP诱导的焦亡相关蛋白表达

为探究Nef对LPS-ATP诱导的焦亡相关蛋白表达的影响,本研究采用免疫荧光检测NLRP3、Caspase-1表达,并使用Western blot检测IL-1β、IL-18表达。免疫荧光结果显示,LPS-ATP组NLRP3及Caspase-1表达多于对照组($P<0.001$),LPS-ATP+Nef组NLRP3及Caspase-1表达少于LPS-ATP组($P<0.001$,图3A、B)。Western blot结果表明,LPS-ATP组IL-1β($P<0.001$)及IL-18($P<0.001$)的相对表达量显著高于对照组,LPS-ATP+Nef组IL-1β($P<0.001$)及IL-18($P=0.004$)的相对表达量显著低于LPS-ATP组(图3C)。以上结果提示Nef抑制LPS-ATP诱导的焦亡相关蛋白表达。

2.4　Nef缓解MPTP诱导的小鼠PD症状

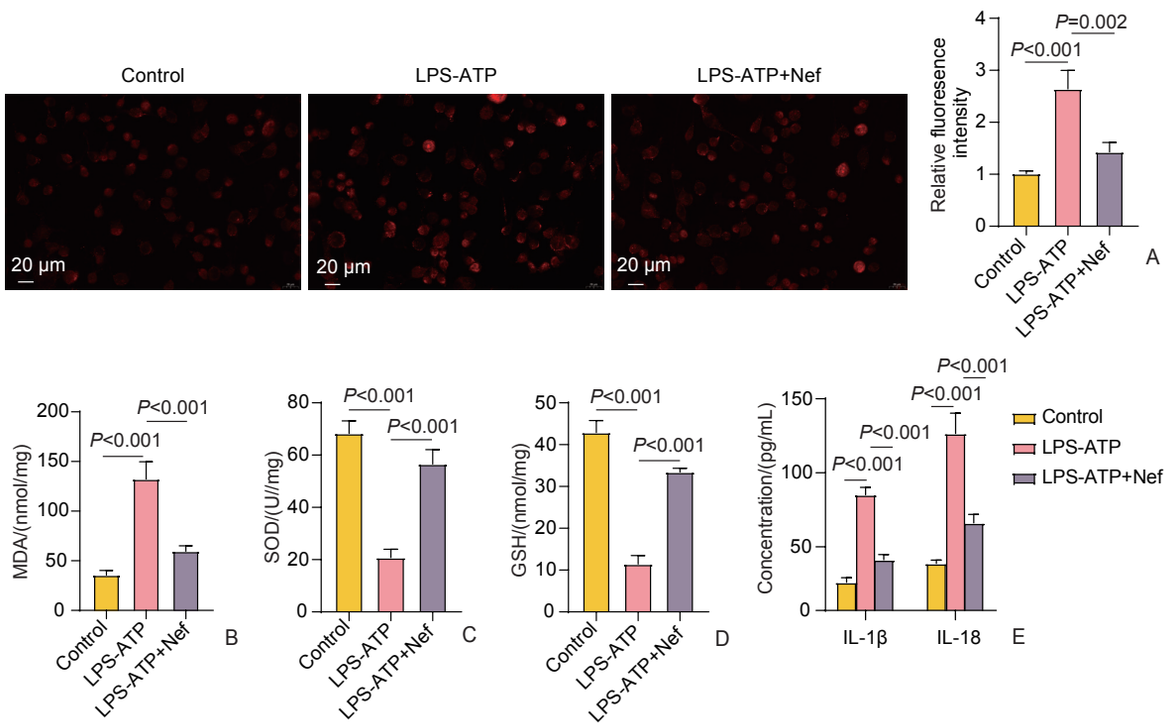
为探究Nef对PD小鼠的影响,本研究使用mNSS



A: Cell viability detected by CCK-8 assay; B: Pyroptosis rate detected by flow cytometry. LPS: lipopolysaccharides; ATP: adenosine triphosphate; Nef: neferine

图1　Nef抑制LPS-ATP诱导的小胶质细胞焦亡

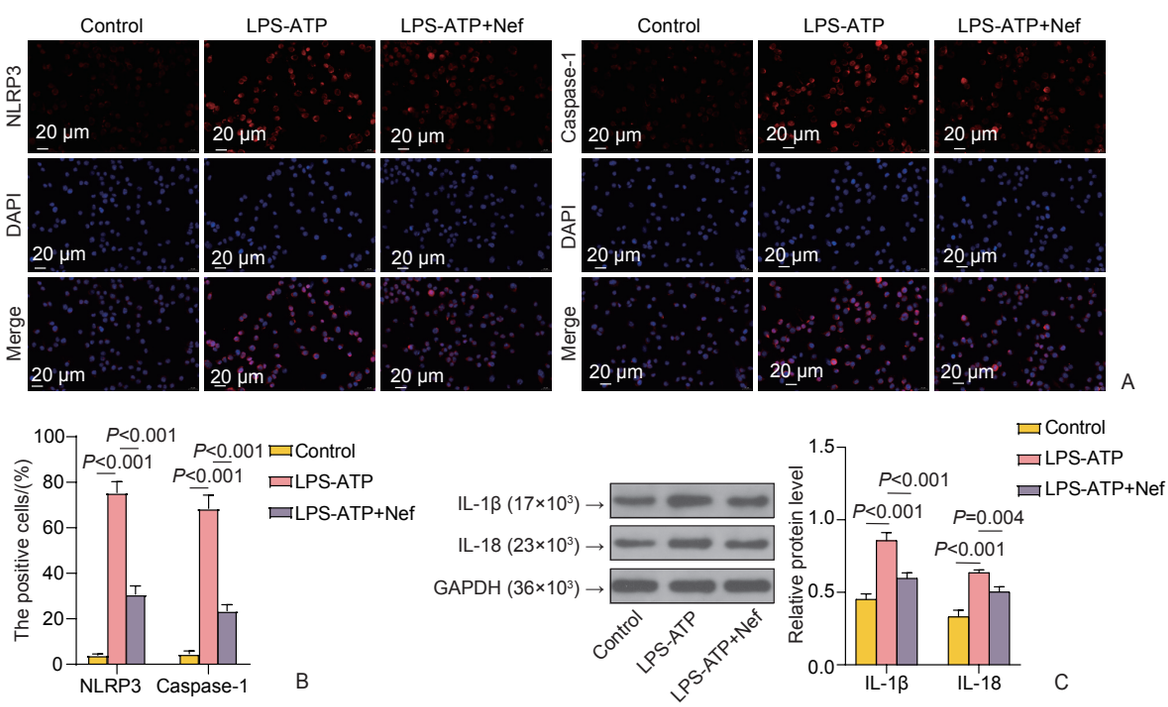
Figure 1　Nef inhibited LPS-ATP-induced pyroptosis in microglia cells



A: ROS detected by DCF; B: MDA content; C: SOD viability; D: GSH content; E: Concentrations of IL-1β and IL-18. ROS:reactive oxygen species; MDA: malondialdehyde; SOD: superoxide dismutase; GSH: glutathione; LPS: lipopolysaccharides; ATP: adenosine triphosphate; Nef: neferine; DCF: 2′,7′-Dichlorofluorescein; IL-1β: interleukin-1β; IL-18: interleukin-18

图2 Nef抑制LPS-ATP诱导的小胶质细胞氧化应激及炎症反应

Figure 2 Nef inhibited LPS-ATP-induced oxidative stress and inflammatory response



A: NLRP3 and Caspase-1 detected by immunocytochemistry; B: The bar graph of the immunofluorescence results; C: IL-1β and IL-18 detected by Western blotting. NLRP3: nod-like receptor thermal protein domain associated protein 3; IL-1β: interleukin-1β; IL-18: interleukin-18; LPS: lipopolysaccharides; ATP: adenosine triphosphate; Nef: neferine

图3 Nef抑制LPS-ATP诱导的焦亡相关蛋白表达

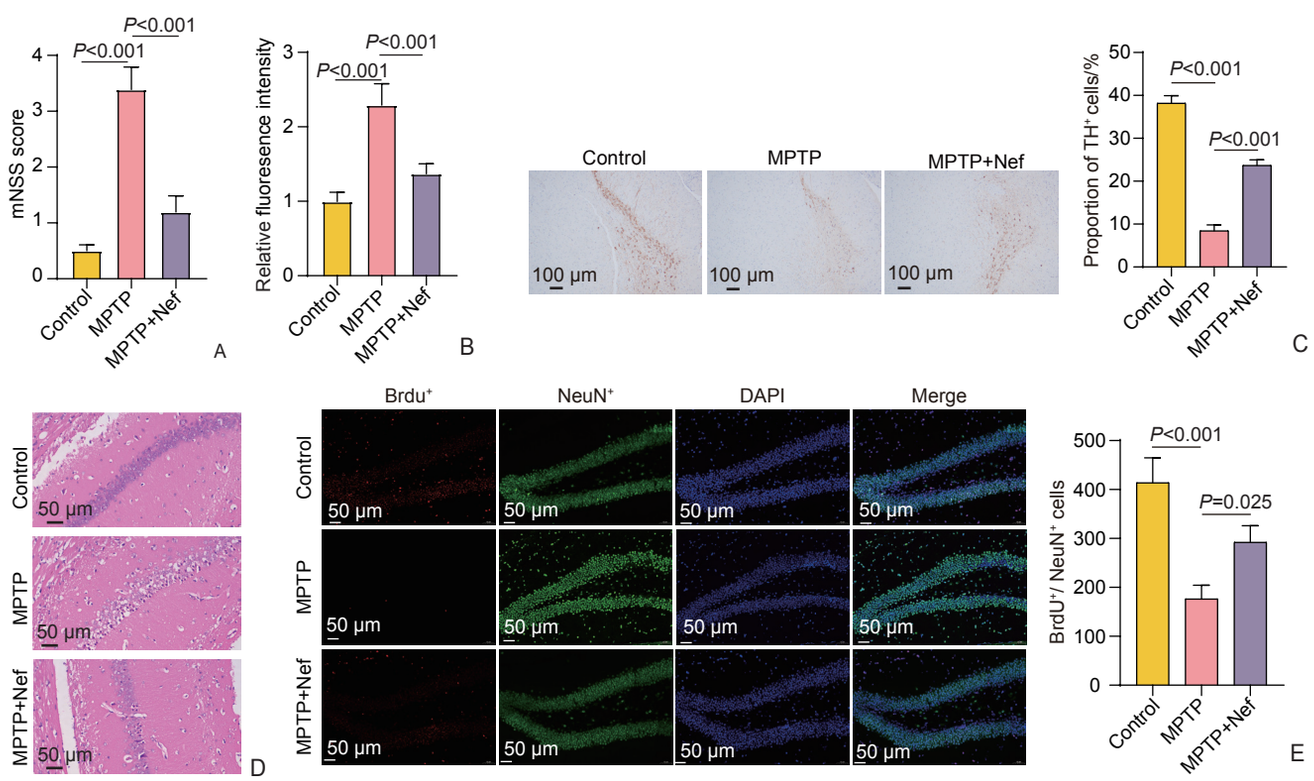
Figure 3 Nef suppressed the expression of LPS-ATP-induced pyroptosis-related proteins.

评分评估神经功能损伤,采用免疫组化检测TH蛋白、HE染色观察海马组织病理学变化、免疫荧光检测海马组织中的BrdU及NeuN蛋白。mNSS评分结果显示,MPTP组神经损伤得分高于对照组(P<0.001),MPTP+Nef组神经损伤得分低于MPTP组(P<0.001,图4A)。DCFH-DA检测脑组织ROS结果表明,MPTP组ROS相对量较对照组升高(P<0.001),MPTP+Nef组与MPTP组相比ROS相对量(P<0.001,图4B)降低。由此可见,对照组ROS生成低于MPTP组,MPTP+Nef组ROS生成低于MPTP组。

此外,本研究使用免疫组化检测黑质区TH的表达。结果显示,MPTP组脑黑质中TH表达显著低于对照组(P<0.001),MPTP+Nef组脑黑质中TH表达高于MPTP组(P<0.001,图4C)。组织病理学染色结果显示,对照组海马CA1区神经元分布均匀,胞核结构清晰,MPTP组海马组织CA1区中神经元肿胀,且伴随有间质水肿及核萎缩,MPTP+Nef组海马组织CA1区神经元损伤较MPTP组有所改善(图4D)。本研究应用$NeuN^+$标记神经元,并检测与NeuN共定位的增殖标记物BrdU,以评估神经元生长情况。MPTP组$BrdU^+NeuN^+$细胞显著少于对照组(P<0.001),而MPTP+Nef组$BrdU^+NeuN^+$细胞多于MPTP组(P=0.025,图4E)。以上结果提示Nef缓解MPTP诱导的小鼠PD症状。

2.5　Nef抑制MPTP诱导的PD小鼠焦亡通路激活

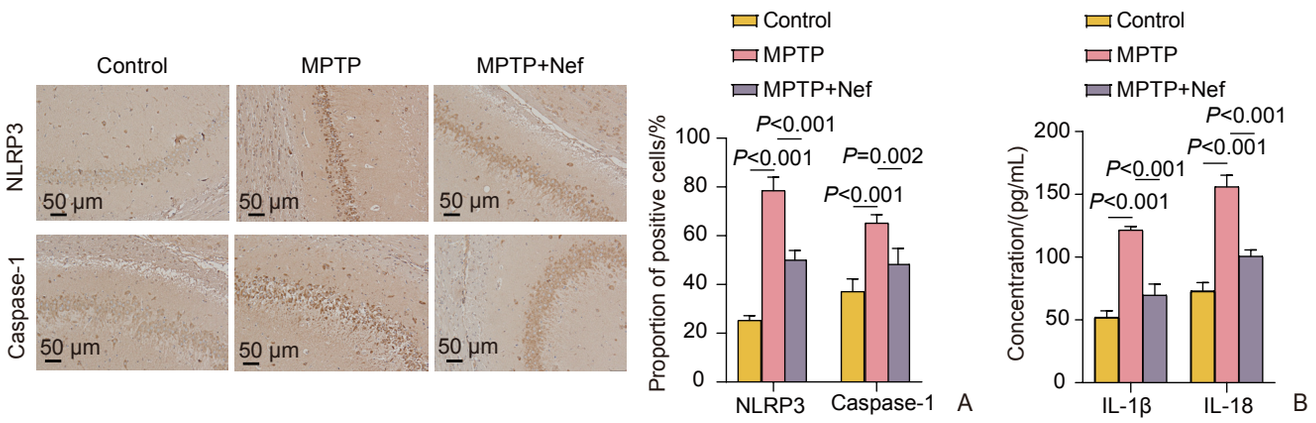
为进一步验证Nef是否通过抑制焦亡缓解PD,本研究采用免疫组化检测NLRP3、Caspase-1表达,采用ELISA检测IL-1β、IL-18含量。免疫组化结果显示,MPTP组海马体组织CA1区中NLRP3及Caspase-1表达高于对照组(P<0.001),MPTP+Nef组海马体组织CA1区中NLRP3及Caspase-1表达低于MPTP组(P<0.001,P=0.002,图5A)。ELISA结果显示,MPTP组IL-1β及IL-18含量高于对照组,MPTP+Nef组IL-1β及IL-18含量低于MPTP组(P<0.001,图5B)。以上结果提示Nef抑制MPTP诱导的PD小鼠焦亡通路激活。



A: Neurological scores evaluated by mNSS; B: ROS detected by DCF; C: TH protein in the substantia nigra detected by immunohistochemistry; D: Histopathlogical change in the hippocampus analyzed by hematoxylin and eosin staining; E: BrdU+/NeuN+ cells labeled by immunofluorescence staining. mNSS: modified neurological severity score; ROS: reactive oxygen species; Nef: neferine; DCF: 2′,7′-Dichlorofluorescein; IL-1β: interleukin-1β; IL-18: interleukin-18; MPTP: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; BrdU: 5-bromo-2′-deoxyuridine; NeuN: neuronal nuclei; TH: tyrosine hydroxylase

图4　Nef缓解MPTP诱导的小鼠PD症状

Figure 4　Nef alleviated MPTP-induced PD symptoms in mice



A: NLRP3 and Caspase-1 in the hippocampus detected by immunohistochemistry; B: Concentrations of IL-1β and IL-18 in brain tissues; MPTP: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; Nef: neferine; NLRP3: nod-like receptor thermal protein domain associated protein 3; IL-1β: interleukin-1β; IL-18: interleukin-18

图5 Nef抑制MPTP诱导的PD小鼠焦亡通路激活

Figure 5 Nef inhibited the activation of pyroptosis-related pathway in MPTP-induced PD mice

3 讨论

3.1 Nef通过抑制小胶质细胞焦亡改善PD神经炎症

Nef作为一种主要的双苄基异奎林生物碱,在神经退行性变疾病中表现出神经保护潜力。YIN等[26]研究证实,Nef可通过减轻脑组织中的炎症反应和氧化应激水平,改善神经退行性病理变化。LIN等[27]研究显示,Nef处理可抑制小胶质细胞中促炎因子的形成及释放。本研究在此基础上,进一步证实Nef可抑制LPS-ATP诱导的小胶质细胞焦亡,并表现出明显的抗炎活性。小胶质细胞焦亡在PD发病机制中具有重要作用。一方面,小胶质细胞发生细胞焦亡,引起促炎细胞因子向胞外释放并引发神经炎症;另一方面,小胶质细胞焦亡也导致小胶质细胞的吞噬作用受限,加剧神经损伤[28]。本研究动物实验显示,Nef治疗能减轻PD小鼠的多巴胺能神经元的损伤,并降低脑组织中的促炎细胞因子水平及ROS含量。上述结果表明,Nef可能通过减少小胶质细胞焦亡抑制神经炎症,进而改善PD症状。

3.2 Nef通过抑制ROS/NLRP3/Caspase-1通路减轻小胶质细胞焦亡

ROS/NLRP3/Caspase-1通路是调控细胞焦亡的关键机制之一。ROS可促进NLRP3炎性小体的组装及Caspase-1的活化。目前观点认为,ROS通过促进NLRP3炎性小体形成而诱导活化型Caspase-1产生,后者可切割gasdermin、IL-18、IL-1β的前体,从而触发细胞焦亡[29-30]。Nef作为一种抗氧化剂,能够直接与ROS反应并清除ROS,抑制其生成与积累。YIN等[26]研究表明,Nef可显著降低神经退行性疾病模型大鼠脑组织中的ROS水平。本研究动物及细胞实验进一步证实,Nef能抑制ROS/NLRP3/Caspase-1信号通路。以上结果表明,Nef在神经退行性疾病中可能通过清除ROS,发挥抗氧化及抗炎作用。因此,Nef可能通过抑制ROS的生成,干扰下游NLRP3炎性小体组装及Caspase-1前体的切割,从而抑制小胶质细胞焦亡。

本研究基于动物及细胞模型,揭示了Nef在PD中的神经保护潜力,但尚未深入探讨Nef调控ROS生成的具体机制,为当前研究的局限性。有证据表明,线粒体ROS与NAPDH氧化酶的相互作用可导致ROS升高,而Nef预处理能预防线粒体功能障碍,并抑制NADPH氧化酶表达[31],这一研究提示Nef的抗氧化机制与线粒体功能障碍相关,因此,后续研究可重点探究Nef是否通过调节线粒体功能进而抑制ROS的生成与积累,从而为Nef治疗PD提供充分的理论依据。

综上所述,本研究证明Nef可能通过ROS/NLRPS/Caspase-1通路抑制小胶质细胞焦亡,进而缓解PD相关的神经炎症和组织损伤。该发现为阐释Nef在PD治疗中的潜在作用机制提供了理论支持,并为其进一步临床应用奠定了基础。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] HARIZ M, BLOMSTEDT P. Deep brain stimulation for Parkinson's disease[J]. J Intern Med, 2022, 292(5): 764-

778. DOI:10.1111/joim.13541.

[2] COSTA H N, ESTEVES A R, EMPADINHAS N, *et al*. Parkinson's disease: a multisystem disorder[J]. Neurosci Bull, 2023, 39(1): 113-124. DOI: 10.1007/s12264-022-00934-6.

[3] MIRZAEI H, SEDIGHI S, KOUCHAKI E, *et al*. Probiotics and the treatment of Parkinson's disease: an update[J]. Cell Mol Neurobiol, 2022, 42(8): 2449-2457. DOI: 10.1007/s10571-021-01128-w.

[4] WEINTRAUB D, AARSLAND D, CHAUDHURI K R, *et al*. The neuropsychiatry of Parkinson's disease: advances and challenges[J]. Lancet Neurol, 2022, 21(1): 89-102. DOI: 10.1016/s1474-4422(21)00330-6.

[5] OU Z J, PAN J, TANG S H, *et al*. Global trends in the incidence, prevalence, and years lived with disability of Parkinson's disease in 204 countries/territories from 1990 to 2019[J]. Front Public Health, 2021, 9: 776847. DOI: 10.3389/fpubh.2021.776847.

[6] DU T T, GAO J, LI P L, *et al*. Pyroptosis, metabolism, and tumor immune microenvironment[J]. Clin & Translat Med, 2021, 11(8): e492. DOI:10.1002/ctm2.492.

[7] ELIAS E E, LYONS B, MURUVE D A. Gasdermins and pyroptosis in the kidney[J]. Nat Rev Nephrol, 2023, 19(5): 337-350. DOI:10.1038/s41581-022-00662-0.

[8] YIN J, YIN Z Y, LAI P, *et al*. Pyroptosis in periprosthetic osteolysis[J]. Biomolecules, 2022, 12(12): 1733. DOI: 10.3390/biom12121733.

[9] NIU X, CHEN L J, LI Y, *et al*. Ferroptosis, necroptosis, and pyroptosis in the tumor microenvironment: perspectives for immunotherapy of SCLC[J]. Semin Cancer Biol, 2022, 86: 273-285. DOI:10.1016/j.semcancer.2022.03.009.

[10] BERTHELOOT D, LATZ E, FRANKLIN B S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death[J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(5): 1106-1121. DOI: 10.1038/s41423-020-00630-3.

[11] YU P, ZHANG X, LIU N, *et al*. Pyroptosis: mechanisms and diseases[J]. Sig Transduct Target Ther, 2021, 6: 128. DOI:10.1038/s41392-021-00507-5.

[12] 窦赫, 马爽, 郗月, 等. 细胞焦亡的生物学机制及其在乳腺癌中的研究进展[J]. 肿瘤防治研究, 2022, 49(11): 1175-1179. DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2022.22.0485.
DOU H, MA S, ZHU Y, *et al*. Biological mechanism of pyroptosis and its research progress in breast cancer[J]. Cancer Res Prev Treat, 2022, 49(11): 1175-1179. DOI: 10.3971/j.issn.1000-8578.2022.22.0485.

[13] KENT S A, MIRON V E. Microglia regulation of central nervous system myelin health and regeneration[J]. Nat Rev Immunol, 2024, 24(1): 49-63. DOI:10.1038/s41577-023-00907-4.

[14] ZHENG Y Q, GRAEBER M B. Microglia and brain macrophages as drivers of glioma progression[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(24): 15612. DOI:10.3390/ijms232415612.

[15] PENG L, HU G Q, YAO Q F, *et al*. Microglia autophagy in ischemic stroke: a double-edged sword[J]. Front Immunol, 2022, 13: 1013311. DOI:10.3389/fimmu.2022.1013311.

[16] 刘玥滢, 杜天舒, 刘玚, 等. 小胶质细胞介导的吞噬作用在神经退行性疾病中的研究进展[J]. 生理学报, 2022, 74(2): 283-293. DOI:10.13294/j.aps.2022.0031.
LIU Y Y, DU T S, LIU Y, *et al*. Phagocytosis of microglia in neurodegenerative diseases[J]. Acta Physiol Sin, 2022, 74(2): 283-293. DOI:10.13294/j.aps.2022.0031.

[17] JIANG Z Y, YIN X, WANG M, *et al*. β-Hydroxybutyrate alleviates pyroptosis in MPP+/MPTP-induced Parkinson's disease models *via* inhibiting STAT3/NLRP3/GSDMD pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2022, 113: 109451. DOI:10.1016/j.intimp.2022.109451.

[18] KOU L, CHI X S, SUN Y D, *et al*. The circadian clock protein Rev-erbα provides neuroprotection and attenuates neuroinflammation against Parkinson's disease *via* the microglial NLRP3 inflammasome[J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 133. DOI:10.1186/s12974-022-02494-y.

[19] ZHENG R, RUAN Y, YAN Y Q, *et al*. Melatonin attenuates neuroinflammation by down-regulating NLRP3 inflammasome *via* a SIRT1-dependent pathway in MPTP-induced models of Parkinson's disease[J]. J Inflamm Res, 2021, 14: 3063-3075. DOI:10.2147/jir.s317672.

[20] ZHOU Y F, ZHANG Y T, WANG H W, *et al*. Microglial pyroptosis in hippocampus mediates sevolfurane-induced cognitive impairment in aged mice *via* ROS-NLRP3 inflammasome pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 116: 109725. DOI:10.1016/j.intimp.2023.109725.

[21] BHARATHI PRIYA L, HUANG C Y, HU R M, *et al*. An updated review on pharmacological properties of neferine: a bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Nelumbo nucifera*[J]. J Food Biochem, 2021, 45(12): e13986. DOI: 10.1111/jfbc.13986.

[22] AMSSAYEF A, EDDOUKS M. Alkaloids as vasodilator agents: a review[J]. Curr Pharm Des, 2023, 29(24): 1886-1895. DOI:10.2174/1381612829666230809094313.

[23] WANG ming-yue, ZHANG S S, AN meng-fei, *et al*. Neferine ameliorates nonalcoholic steatohepatitis through regulating AMPK pathway[J]. Phytomedicine, 2023, 114: 154798. DOI:10.1016/j.phymed.2023.154798.

[24] TANG B, ZENG W, SONG L L, *et al*. Extracellular vesicle

delivery of neferine for the attenuation of neurodegenerative disease proteins and motor deficit in an Alzheimer's disease mouse model[J]. Pharmaceuticals, 2022, 15(1): 83. DOI: 10.3390/ph15010083.

[25] TANG Y S, ZHAO Y H, ZHONG Y, *et al*. Neferine inhibits LPS-ATP-induced endothelial cell pyroptosis *via* regulation of ROS/NLRP3/Caspase-1 signaling pathway[J]. Inflamm Res, 2019, 68(9): 727-738. DOI: 10.1007/s00011-019-01256-6.

[26] YIN S Z, RAN Q, YANG J, *et al*. Nootropic effect of neferine on aluminium chloride-induced Alzheimer's disease in experimental models[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2020, 34(2): e22429. DOI:10.1002/jbt.22429.

[27] LIN T Y, HUNG C Y, CHIU K M, *et al*. Neferine, an alkaloid from *Lotus* Seed embryos, exerts antiseizure and neuroprotective effects in a kainic acid-induced seizure model in rats[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(8): 4130. DOI: 10.3390/ijms23084130.

[28] WU X, WAN T, GAO X Y, *et al*. Microglia pyroptosis: a candidate target for neurological diseases treatment[J]. Front Neurosci, 2022, 16: 922331. DOI: 10.3389/fnins.2022.922331.

[29] ZHENG D D, LIU J, PIAO H L, *et al*. ROS-triggered endothelial cell death mechanisms: focus on pyroptosis, parthanatos, and ferroptosis[J]. Front Immunol, 2022, 13: 1039241. DOI:10.3389/fimmu.2022.1039241.

[30] WANG F H, LIANG Q Q, MA Y X, *et al*. Silica nanoparticles induce pyroptosis and cardiac hypertrophy *via* ROS/NLRP3/Caspase-1 pathway[J]. Free Radic Biol Med, 2022, 182: 171-181. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.02.027.

[31] PRIYA L B, BASKARAN R, HUANG C Y, *et al*. Neferine ameliorates cardiomyoblast apoptosis induced by doxorubicin: possible role in modulating NADPH oxidase/ROS-mediated NFκB redox signaling cascade[J]. Sci Rep, 2017, 7: 12283. DOI:10.1038/s41598-017-12060-9.yi.

(收稿:2025-09-01;修回:2025-11-17)

(编辑 严 涵)