

9 钟佳琳, 郑立, 贺花, 等. PI3K/Akt 信号通路相关的生物学调控机制研究进展 (J). 基因组学与应用生物学, 2019; 38(1): 143-7.

(2019-07-06 修回)
(编辑 李男)

褪黑素基于 JAK-STAT 通路对 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞炎性损伤的影响

马一闻¹ 陈超¹ 毕素贞¹ 庄文欣² 付文玉³ 吕娥³

(潍坊医学院 1 生物科学与技术学院, 山东 潍坊 261053; 2 医学研究实验中心; 3 组织学与胚胎学教研室)

摘要 目的 研究褪黑素(MT)通过调节 Janus 激酶/信号转导和转录激活因子(JAK-STAT)通路对神经毒素 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶脱氢物(MPP⁺)诱导的 PC12 细胞炎性损伤的影响。方法 将嗜铬细胞瘤(PC12)分为四组:对照组、模型组(MPP⁺ 200 μmol/L)、治疗组(MPP⁺ 200 μmol/L + MT 800 μmol/L)、MT 组(MT 800 μmol/L)。观察不同时间点细胞生长、形态变化, CCK-8 法检测细胞活力, 免疫细胞化学染色法或 Western 印迹检测白细胞介素(IL)-17A、IL-1β、IL-6、p-STAT1、p-STAT3、STAT1 和 STAT3 的表达。结果 对照组细胞为梭形, 给予 MPP⁺ 细胞呈椭圆形, 细胞聚集且胞体内出现空泡, 部分细胞折光性增强, 且细胞数量显著减少; 而治疗组细胞状态有所好转。模型组细胞活力显著低于对照组($P < 0.05$), 而 MT 可明显缓解 MPP⁺ 损伤所致的细胞活力下降($P < 0.05$)。给予 MPP⁺ 细胞内 IL-17A、IL-1β、IL-6、p-STAT1 和 p-STAT3 表达明显升高($P < 0.05$), MT 干预后上述指标表达显著降低($P < 0.05$), 各组间 STAT1、STAT3 表达差异无显著性。MT 组与对照组相比, 各项检测无显著性差异。结论 MT 可明显抑制 MPP⁺ 所致 PC12 的 IL-1β、IL-6、IL-17A 的上升, 其机制可能与通过抑制 JAK-STATs 信号通路中 p-STAT1 和 p-STAT3 的激活有关。

关键词 褪黑素; Janus 激酶/信号转导和转录激活因子(JAK-STAT)通路; 神经炎症; 帕金森病; PC12 细胞

(中图分类号) R742.5 (文献标识码) A (文章编号) 1005-9202(2020)13-2856-05; doi: 10.3969/j.issn.1005-9202.2020.13.055

帕金森病(PD)是广泛存在于中老年群体的神经退行性疾病, PD 的确切发病机制是医学界的一大难题, 目前已经确定 PD 的病理症状以不能运动, 休息震颤和多巴胺(DA)能神经元的丧失为特征⁽¹⁾。已有大量研究表明由胶质细胞激活触发的神经炎症在 PD 的发病机制中起着重要作用。活化的细胞产生促炎因子等炎症介质, 又反向刺激于这些细胞来表达炎性因子⁽²⁾。Janus 激酶/信号转导和转录激活因子(JAK/STAT)途径普遍存在由干扰素和细胞因子激活的信号转导, 在免疫应答的起始和调节中起关键作用。JAK/STAT 途径的异常激活在诸如 PD 和多发性硬化的神经炎症疾病中非常明显⁽³⁾。白细胞介素(IL)-6 是 JAK/STAT 途径中最有效的激活剂之一, PD 中明显升高, 且与 PD 的患病风险密

切相关⁽⁴⁾。

褪黑素(MT)是一内源性神经激素, 且具有多靶点生物活性的小分子物质⁽⁵⁾。本课题组发现, MT 对 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)所致的 PD 小鼠模型上有较好的抗炎效果, 而 MT 抑制神经炎症反应的机制不明。结合 JAK-STATs 信号通路的特性和 MT 多靶点治疗研究进展, 本研究拟采用 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶脱氢物(MPP⁺)损伤 PC12 细胞的 PD 模型, 探讨 MT 的抗神经炎症作用及利用 JAK/STAT 通路改善神经炎症的可能性, 从而为 MT 防治神经退行性疾病的研究提供可靠的理论基础。

1 材料和方法

1.1 细胞、试剂和仪器 小鼠嗜铬细胞瘤(PC)12 细胞(上海中国科学院细胞库); MT、MPP⁺、细胞裂解液(RIPA)(均 Sigma 公司); 胎牛血清和 RPMI-1640(均 HyClone 公司); 细胞毒性/增殖检测试剂盒 CCK-8(YEASEN 公司); 胰蛋白酶(Solarbio 公司); 兔抗多克隆抗体磷酸化的(p)-STAT1、p-STAT3、STAT1、STAT3(均 Immunoway 公司); 兔抗多克隆抗体 IL-17A、IL-1β 和 IL-6(均 Bioss 公司); 化学发光液(Thermo 公司)。Multiskan FC 型酶标仪(Thermo

基金项目: 山东省中医药科技发展计划项目(2017-214); 山东省大学生创新训练项目(s201910438027); 潍坊医学院博士启动基金(2017BSQD26); 潍坊医学院大学生科技创新基金(KX2018053)

通信作者: 吕娥(1976-), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事帕金森病发病机制及治疗研究。

付文玉(1964-), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事帕金森病发病机制及治疗研究。

第一作者: 马一闻(1998-), 男, 本科在读, 主要从事生物技术研究。

Fisher 公司); Western 印迹高电流电泳仪(BIO-RAD 公司); 化学发光凝胶成像系统(爱博科技贸易公司)。

1.2 细胞分组及处理 细胞培养基为 10% 胎牛血清加 1% 青链霉素混合液(青链霉素浓度均为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 培养于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中。传至 4 代后, 胰蛋白酶消化(0. 25%) 处于对数期且状态良好的细胞, 并制成细胞悬液调配到适宜浓度后接种于孔板中, 并分为如下四组: 对照组; 模型组: 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 MPP⁺ 干预 36 h(预实验中检测不同浓度 MPP⁺ 的损伤效果, 其中 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 最佳); 治疗组: 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 MPP⁺ 处理 12 h 后, 再加入 800 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 MT 处理 24 h(预实验中采用不同药物浓度进行筛选, 发现 800 $\mu\text{mol}/\text{L}$ MT 修复效果最佳, 后续实验采用此浓度给予干预); MT 组: 加入 800 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 MT 处理 24 h(与治疗组加入 MT 的时间相同)。

1.3 显微镜观察细胞形态 将各组细胞混悬液滴加到 6 孔板中, 接种各孔剂量 1 ml 浓度为 3×10^5 个/ml, 12 h 后将细胞分组及药物干预, 每隔 12 h 观察细胞并拍照。

1.4 CCK-8 法检测细胞活性 将制好的细胞混悬液以 4×10^3 个/ml 浓度每孔 100 μl 的剂量滴加到 96 孔板中, 细胞分组并给予 MPP⁺ 及 MT 干预, 吸去原有培养基, 加入 CCK-8 培养基混合液 100 μl 并置于培养箱中培养 3 h 后, 酶标仪检测各孔 450 nm 的吸光度值。

1.5 免疫细胞化学法检测 IL-1 β 、IL-6 的含量 将 PC12 细胞浓度为 1×10^5 个/ml 的悬液以 400 μl 每孔的剂量滴加到 24 孔板中进行爬片, 培养 12 h 后分组并加药干预。吸除各孔中培养基, 依照刘金城等^[6] 方法步骤进行细胞处理和后续细胞免疫组织化学流程, 一抗为兔抗 IL-1 β (1:200)、IL-6(1:200) 抗体(30 $\mu\text{l}/\text{孔}$), 结果采用 Image Pro Plus5. 1 软件进行平均光密度值(MOD) 分析。

1.6 Western 印迹法检测 IL-17A、IL-6、p-STAT1、p-STAT3、STAT1 和 STAT3 的蛋白表达 将 3×10^5 个/ml PC12 细胞悬液接种至 6 孔板中每孔 1 ml, 细胞分组给予药物, 蛋白提取、浓度检测、Western 印迹的详细步骤及显影参照刘飞等^[7] 的实验方法, 实验中滴加一抗, 分别为兔抗多克隆抗体

IL-17A(1:1 500)、IL-6(1:1 500)、p-STAT1(1:800)、p-STAT3(1:800)、STAT1(1:1 000)、STAT3(1:1 000) 和小鼠抗 GAPDH(1:1 000) 抗体。实验结果采用 Image J 软件分析各组条带的吸光度(AA), 目的蛋白 AA 与 GAPDH 蛋白 AA 比值表示各目的蛋白的相对表达值。

1.7 统计学分析 采用 SPSS17. 0 软件行 *t* 检验。

2 结果

2.1 MT 可修复 MPP⁺ 对 PC12 细胞的损伤 对照组细胞分布均匀, 胞体发出不规则突起; 模型组漂浮细胞大量出现, 细胞内有空泡, 细胞出现聚集, 折光性升高, 胞体萎缩变圆颜色发暗; 而给予 MT 后, 治疗组细胞状态有所好转, 贴壁细胞数量增多, 聚集现象及萎缩的胞体较少, 细胞折光性降低; MT 组细胞分布状态、外形结构、生长状态及后续各项检测与对照组相比, 均无显著性差异。见图 1。

2.2 MT 可阻止 MPP⁺ 导致的 PC12 细胞活力的下降 与对照组(0.66 ± 0.04) 相比, 模型组细胞活力(0.40 ± 0.07) 明显变弱; 与模型组比较, 给予 MT 后治疗组细胞活力明显好转(0.58 ± 0.09 , $P < 0.05$), MT 组细胞活力(0.69 ± 0.04) 与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 MT 可降低 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞的神经炎症反应 与对照组相比, 模型组 IL-1 β 、IL-6 MOD 及 IL-17A、IL-6 蛋白表达显著增加($P < 0.05$), 与模型组比较, 治疗组 IL-1 β 、IL-6 MOD 及 IL-17A、IL-6 蛋白表达明显减少($P < 0.05$)。MT 组 IL-1 β 、IL-6 MOD 及 IL-17A、IL-6 蛋白表达与对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1, 图 2。对照组细胞形态良好, 染色较淡; 而模型组部分细胞内存在空泡, 且存在聚集现象, 阳性细胞染色加深; 与模型组比较, 治疗组细胞状态较好, 细胞空泡较少, 染色变淡。见图 3。

2.4 MT 可抑制 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞的 JAK-STATs 信号通路的激活 与对照组比较, 模型组 p-STAT1、p-STAT3 表达均明显增高(均 $P < 0.05$), 与模型组比较, 治疗组 p-STAT1、p-STAT3 明显降低(均 $P < 0.05$)。各组 STAT1、STAT3 无明显变化。MT 组各指标与对照组均无统计学差异($P > 0.05$)。见图 4、表 2。

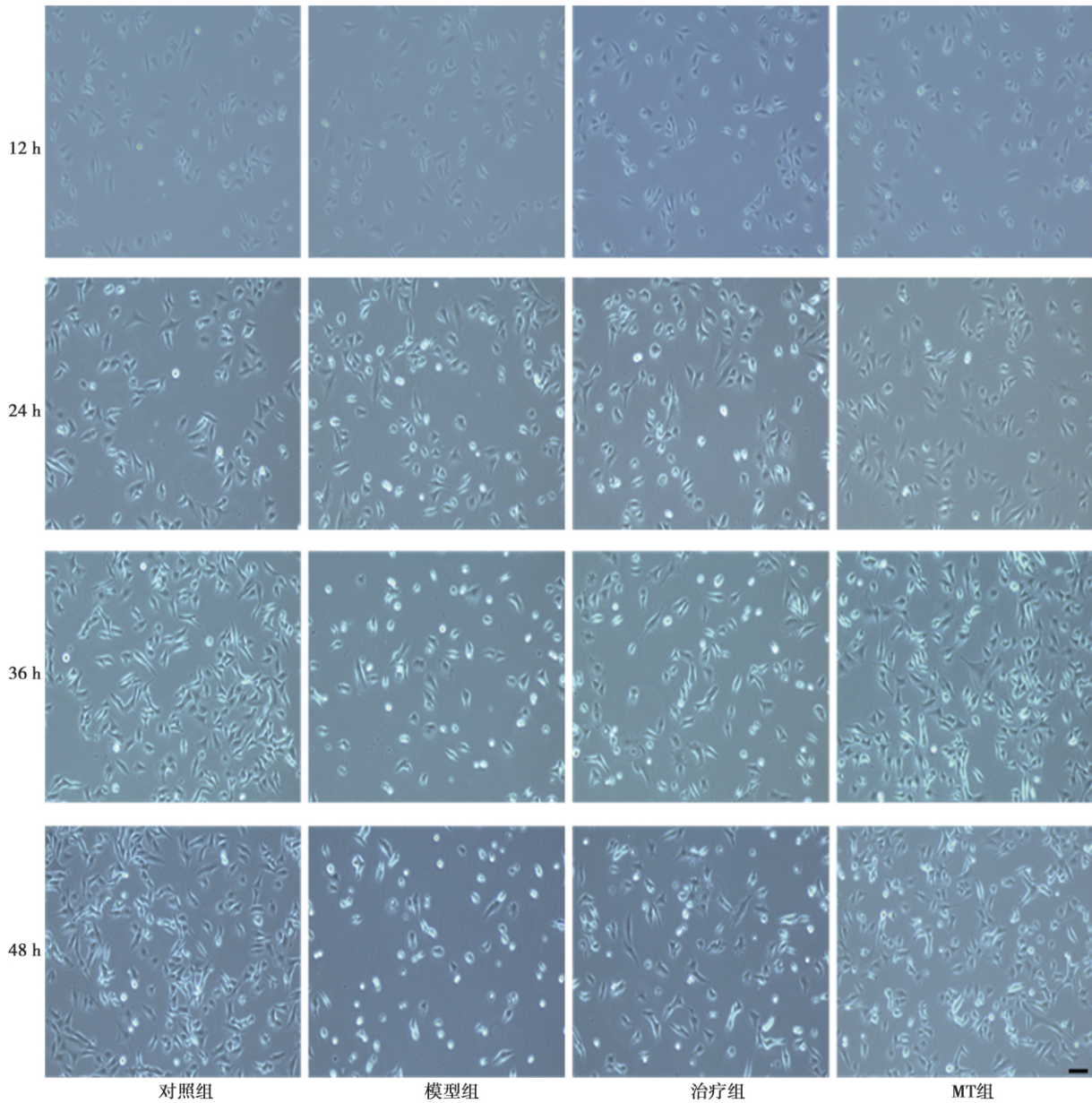


图 1 培养不同时间 PC12 细胞形态(×100)

表 1 各组 PC12 细胞 IL-1β 和 IL-6MOD、IL-17A 和 IL-6 蛋白表达($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

组别	IL-1β	IL-6	IL-17A	IL-6
对照组	0.22±0.03	0.13±0.03	0.75±0.03	0.53±0.04
模型组	0.50±0.13 ¹⁾	0.39±0.04 ¹⁾	1.40±0.13 ¹⁾	1.70±0.15 ¹⁾
治疗组	0.34±0.15 ²⁾	0.26±0.08	0.97±0.11 ²⁾	1.30±0.17 ²⁾
MT 组	0.19±0.06	0.14±0.04	0.73±0.06	0.51±0.08

与对照组比较: 1) $P < 0.05$; 与模型组比较: 2) $P < 0.05$; 下表同

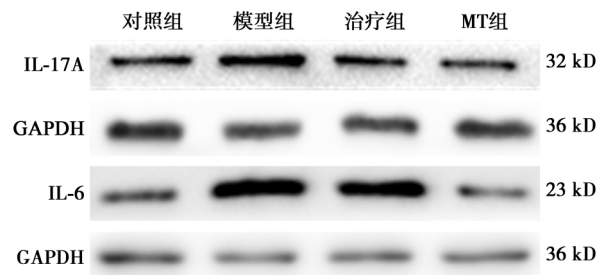


图 2 IL-17A 和 IL-6 蛋白在各组 PC12 细胞的相对表达

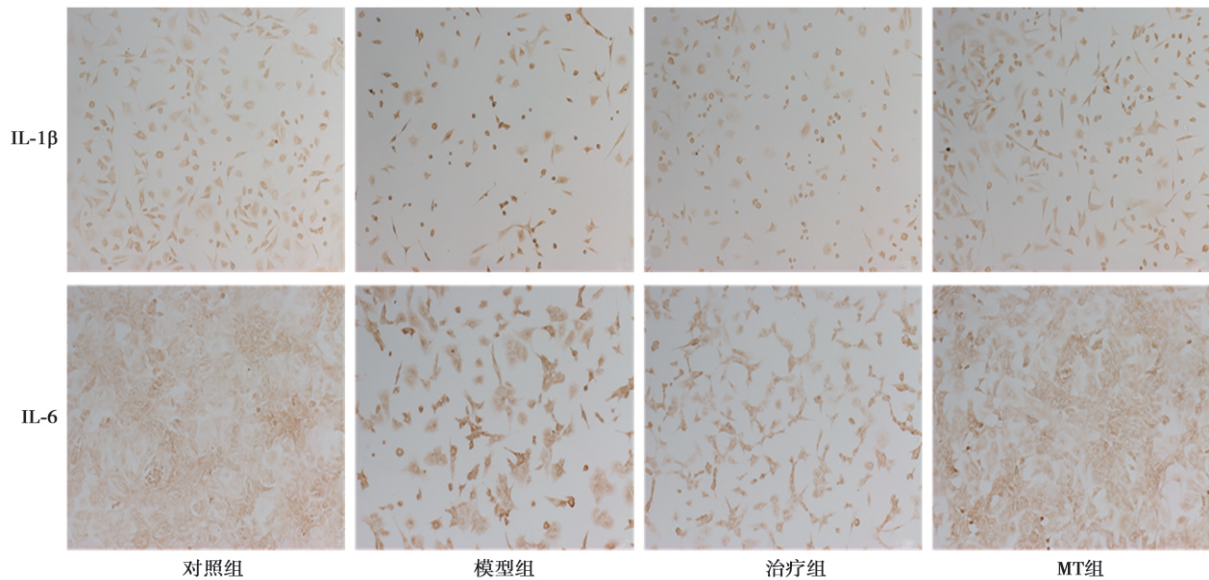


图 3 IL-1β 和 IL-6 在各组 PC12 细胞中的表达 (DAB ×200)

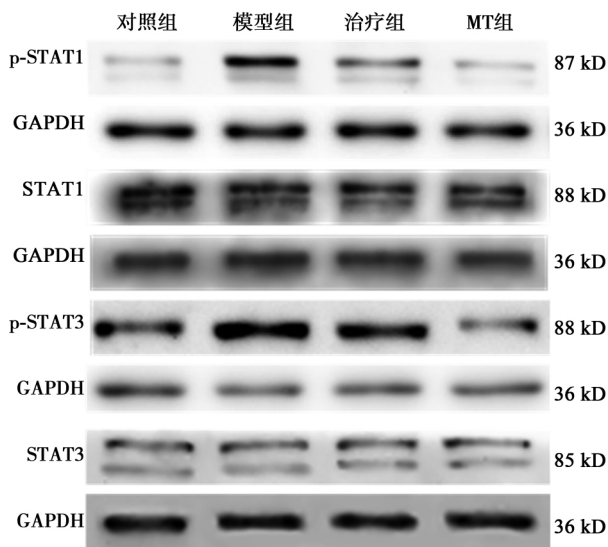


图 4 p-STAT1、STAT1、p-STAT3 和 STAT3 蛋白在各组 PC12 细胞的相对表达

表 2 各组 PC12 细胞 p-STAT1、STAT1、p-STAT3 和 STAT3 蛋白表达相对值 ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

组别	p-STAT1	STAT1	p-STAT3	STAT3
对照组	0.20±0.02	1.04±0.05	0.70±0.06	0.32±0.02
模型组	1.04±0.07 ¹⁾	1.02±0.07	1.30±0.14 ¹⁾	0.32±0.10
治疗组	0.57±0.09 ²⁾	1.03±0.10	0.99±0.12 ²⁾	0.32±0.07
MT 组	0.17±0.05	1.05±0.07	0.63±0.08	0.32±0.09

3 讨论

全基因组关联研究表明,强调了中枢神经系统疾病(包括 PD)的发病机制或调节与免疫系统基因的关联,认为神经炎症反应和促炎介质释放的调节可能会影响症状和严重程度⁽⁸⁾。临床研究发现伴

有震颤的 PD 患者在脑脊液和血清中 IL-6 水平显著增强⁽⁹⁾。本实验发现,在给予 MPP⁺ 处理后,细胞状态呈现显著恶化,细胞活力明显降低,促炎因子 IL-17A、IL-1β 和 IL-6 表达显著上升。

先天性免疫反应在神经炎症中具有致病和保护作用,这取决于疾病的发病机制和中枢神经系统所处的微环境,小胶质细胞、T 细胞等是参与监测该微环境的主要细胞⁽¹⁰⁾,而 JAK/STAT 途径的激活可加重致病性神经炎症的进展。Zhu 等⁽¹¹⁾用特异性 JAK 抑制剂预处理可减少 STAT3 的磷酸化并阻断抗炎因子 IL-10 介导的针对脂多糖(LPS)损伤的腹侧中脑原代神经元的保护作用。用聚集的 α-突触核蛋白(SYN)刺激小胶质细胞系或原代小胶质细胞可导致主要组织相容性复合因子(MHC) II 类的表达和一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子(TNF)-α 和 IL-1β 产生,通过 JAK1/2 抑制剂 AZD1480 可抑制 JAK/STAT 途径的激活⁽¹²⁾。Przanowski 等⁽¹³⁾在 LPS 导致的模型上发现,p-STAT1、p-STAT3、p-STAT5 可诱发产生促炎因子。本研究发现给予 MPP⁺可诱发 PC12 细胞 p-STAT1、p-STAT3 表达上升。

MT 是由松果体分泌的一种具有睡眠调节、增强免疫、抗癌活性、抗炎抗氧化特性和神经保护等强大功能的吲哚类激素⁽¹⁴⁾,可通过质膜上的特定细胞受体或其他非受体依赖性途径发挥其作用。MT 可调节自身免疫性脊髓炎小鼠模型的少突胶质细胞的功能,减少促炎因子(IL-1β 和 TNF-α)和增加抗炎因子(IL-4 和 IL-10)来减轻炎症,降低神经功能障碍评分并增强髓鞘再生⁽¹⁵⁾。MT 对 6-羟基多巴(OHDA)诱导的偏侧 PD 大鼠模型具有抗氧化和神

经保护作用⁽¹⁶⁾,可对表达 PD 相关表型基因 parkin/PINK1/DJ-1/MUL1 的斑马鱼胚胎发挥挽救作用⁽¹⁷⁾。本实验发现,MT 可有效减轻 MPP⁺ 诱导 PC12 细胞所产生的炎症反应并抑制 p-STAT1 和 p-STAT3 表达。

综上,MT 可降低 MPP⁺ 诱导的炎症反应,并通过进一步探讨发现 MT 可抑制 JAK-STATs 信号通路中 p-STAT1 和 p-STAT3 表达来降低 IL-1 β 、IL-6、IL-17A 等促炎因子的表达,进而参与神经保护作用,为 MT 在 PD 的临床治疗提供了可靠的实验和理论依据。

4 参考文献

- 1 L'Episcopo F ,Tirolo C ,Serapide MF ,et al. Microglia polarization , gene-environment interactions and Wnt/ β -catenin signaling: emerging roles of glia-neuron and glia-stem/neuroprogenitor crosstalk for dopaminergic neurorestoration in aged parkinsonian brain (J).Front Aging Neurosci 2018; 10: 12.
- 2 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) : 1469-80.
- 3 Yan Z ,Gibson SA ,Buckley JA ,et al. Role of the JAK/STAT signaling pathway in regulation of innate immunity in neuroinflammatory diseases (J).Clin Immunol 2018; 189: 4-13.
- 4 Yeung YT ,Aziz F ,Guerrero-Castilla A ,et al. Signaling pathways in inflammation and anti-inflammatory therapies (J).Curr Pharm Des , 2018; 24(14) : 1449-84.
- 5 隋勇 ,施建斌 ,蔡沙 等 . 褪黑素生理功能研究进展 (J).湖北农业科学 2018; 57(2) : 9-13.
- 6 刘金城 ,庄文欣 ,李锋杰 等 . 香橼子多酚提取物对 6-OHDA 诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用 (J).神经解剖学杂志 ,2016; 32 (1) : 31-6.
- 7 刘飞 ,费学超 ,李侃 等 . 香橼子多酚通过 p38 MAPK 通路抑制 6-

- OHDA 诱导的神经炎症反应 (J).神经解剖学杂志 ,2017; 33(6) : 665-71.
- 8 Altmann DM. Neuroimmunology and neuroinflammation in autoimmune ,neurodegenerative and psychiatric disease (J). Immunology , 2018; 154(2) : 167-8.
- 9 Lian TH ,Guo P ,Zuo LJ ,et al. Tremor-dominant in Parkinson disease: the relevance to iron metabolism and inflammation (J).Front Neurosci 2019; 27(13) : 255.
- 10 Louveau A ,Harris TH ,Kipnis J. Revisiting the mechanisms of CNS immune privilege (J).Trends Immunol 2015; 36(10) : 569-77.
- 11 Zhu Y ,Liu Z ,Peng YP ,et al. Interleukin-10 inhibits neuroinflammation-mediated apoptosis of ventral mesencephalic neurons via JAK-STAT3 pathway (J).Int Immunopharmacol 2017; 50: 353-60.
- 12 Qin H ,Buckley JA ,Li X ,et al. Inhibition of the JAK/STAT pathway protects against α -synuclein-induced neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration (J).J Neurosci 2016; 36: 5144-59.
- 13 Przanowski P ,Dabrowski M ,Ellert-Miklaszewska A ,et al. The signal transducers Stat1 and Stat3 and their novel target Jmjd3 drive the expression of inflammatory genes in microglial (J).J Mol Med (Berl) , 2014; 92(3) : 239-54.
- 14 胡莹莹 ,汪锡金 . 帕金森病与褪黑素相关性的研究进展 (J).中国医药导报 2018; 15(21) : 23-6.
- 15 Ghareghani M ,Scavo L ,Jand Y ,et al. Melatonin therapy modulates cerebral metabolism and enhances remyelination by increasing PDK4 in a mouse model of multiple sclerosis (J).Front Pharmacol 2019; 10: 147.
- 16 Ozsoy O ,Yildirim FB ,Ogut E ,et al. Melatonin is protective against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress in a hemiparkinsonian rat model (J).Free Radical Res 2015; 49(8) : 1004-14.
- 17 Díaz-Casado ME ,Lima E ,García JA ,et al. Melatonin rescues zebrafish embryos from the parkinsonian phenotype restoring the parkin/PINK1/DJ-1/MUL1 network (J).J Pineal Res ,2016; 61(1) : 96-107.

(2019-10-12 修回)

(编辑 杜娟)

《中国老年学杂志》被国际数家数据库、检索性期刊检索机构收录情况

根据国际检索机构给中国科学技术期刊编辑学会国际交流工作委员会、中国高等学校自然科学学报研究会对外联络委员会发来的电子邮件及其附件统计整理,《中国老年学杂志》2009 年又被 5 种国际重要检索系统列为来源期刊:

- 1) 美国化学文摘(CA) ,CODEN ZLZHAO ,http://www.lib.dlut.edu.cn/layersec.asp;
- 2) 波兰《哥白尼索引》(IC , Index of Copernicus) ,http://journals.indexcopernicus.com/karta.Php;
- 3) 日本《科学技术社(中国文献数据库)》(JST , Japan Science & Technology Agency) (Chinese Bibliographic Database) ;
- 4) 美国《乌利希期刊指南》(UPD ,Ulrich's Periodicals Directory) ,http://www.ulrichsweb.com/ulrichsweb/;
- 5) 美国《剑桥科学文摘:生物科学》(CSA: BS) 。