

网络出版时间:2024-04-12 12:11:18 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20240410.1007.002

非诺多泮抑制小鼠胸主动脉瘤的实验研究

周莹^{1,2}, 武栗妃^{1,2,3}, 杜文静⁴, 曹济民^{1,2}

摘要 目的 探讨多巴胺一型受体激动剂非诺多泮(FNDP)是否对小鼠胸主动脉瘤(TAA)具有保护作用。方法 对3周龄的雄性C57BL/6J小鼠采用β-氨基丙腈(BAPN)复制TAA模型。25只小鼠分为三组:对照组、BAPN组、BAPN + FNDP组(腹腔注射FNDP)。统计TAA的发生率和生存率,观察胸主动脉的大体变化,弹力蛋白(Elastin)染色观察形态学改变。免疫组化法检测基质金属酶2(MMP2)、基质金属酶9(MMP9)和白细胞分化抗原68(CD68)的变化。明胶酶谱法检测MMP2和MMP9的活性。反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)法检测多巴胺受体1(D1DR)、多巴胺受体2(D2DR)、多巴胺受体3(D3DR)、多巴胺受体5(D5DR)、白介素-1β(IL-1β)、白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)及平滑肌蛋白22α(SM22α)的mRNA表达情况。结果 与对照组相比,BAPN组有明显的TAA形成,胸主动脉壁弹力纤维紊乱与断裂,且D1DR和D5DR的mRNA水平均显著下降。与BAPN组相比,BAPN + FNDP组小鼠TAA的形成率和动脉瘤破裂率明显降低;胸主动脉壁的弹力纤维紊乱与断裂明显改善;胸主动脉壁内MMP2和MMP9的表达水平均显著下降,血清中MMP2的酶活性显著降低;胸主动脉壁中巨噬细胞浸润显著降低,且IL-1β、IL-6、TNF-α和MCP-1的mRNA水平均显著下降;α-SMA和SM22α mRNA表达水平无显著差异。结论 FNDP可抑制小鼠TAA的进展,有可能成为治疗TAA的一个潜在药物。

关键词 胸主动脉瘤;多巴胺受体;非诺多泮;巨噬细胞;炎

症;基质降解

中图分类号 R 543.1+6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)04-0569-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.002

胸主动脉瘤(thoracic aortic aneurysm, TAA)为胸主动脉直径是正常动脉直径的1.5倍以上,与基质降解、弹力板断裂、平滑肌表型转换、炎症浸润等密切相关^[1]。TAA易并发破裂,死亡率极高,目前无有效药物^[2],因此寻找治疗TAA的药物迫在眉睫。

多巴胺受体根据其生物活性和药理学性质可以分为一型受体和二型受体,一型受体包括多巴胺受体1(dopamine receptor D1, D1DR)和多巴胺受体5(dopamine receptor D5, D5DR);二型受体包括多巴胺受体2(dopamine receptor D2, D2DR)、多巴胺受体3(dopamine receptor D3, D3DR)和多巴胺受体4(dopamine receptor D4, D4DR)^[3]。有研究显示激活多巴胺一型受体可通过其下游的环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)抑制NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3, NLRP3)炎症小体的活化,从而抑制炎症反应^[3-4];直接抑制NLRP3也可减轻主动脉瘤^[5-6]。此外,激动多巴胺一型受体也可以抑制平滑肌细胞的增殖^[7]。因此,激活多巴胺一型受体可能在TAA中具有保护作用。该研究采用多巴胺一型受体激动剂非诺多泮(fenoldopam, FNDP)探究其在TAA中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性3周龄C57BL/6J小鼠25只,体质量9~10g,购自山西医科大学实验动物中心[SCXK(晋)2019-0004]。小鼠购买后常规饲养3d后开始正式实验(饲养环境为SPF级)。在实验过程中,遵循3R原则的指导,给予实验动物以人道主义关怀,伦理批准编号为SYDL2023020。

1.2 主要试剂 FNDP(SML0198)和β-氨基丙腈(β-aminopropionitrile, BAPN)(A3134)购自美国Sig-

2024-02-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82170523、81670313、U22A6008);山西省教育厅“1331工程”提质增效建设计划项目(编号:1331KFC);山西省基础研究计划项目(编号:20210302124412)

作者单位:¹山西医科大学细胞生理学教育部重点实验室,太原 030000

山西医科大学² 生理学系、³ 病理生理学系,太原 030000

⁴ 中国医学科学院基础医学研究所细胞生物学系医学分子生物学国家重点实验室,北京 100000

作者简介:周莹,女,硕士研究生;

武栗妃,女,讲师,责任作者,E-mail: lifeiwu891002@sxmu.edu.cn;

杜文静,女,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wenjingdu@ibms.pumc.edu.cn;

曹济民,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: caojimin@sxmu.edu.cn

ma 公司;抗白细胞分化抗原 68(cluster of differentiation 68, CD68)单克隆抗体(ab283654)、抗基质金属酶 2(matrix metalloproteinase 2, MMP2)单克隆抗体(ab86607)和抗基质金属酶 9(matrix metalloproteinase 9, MMP9)单克隆抗体(ab228402)购自美国 Abcam 公司;兔超敏二步法试剂盒(PV9001)及 DAB 显色试剂盒(ZLI-9019)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;弹力蛋白(Elastin)染色试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司;明胶酶谱电泳试剂盒购自南京信帆生物技术有限公司;TRIzol 购自美国 Ambion 公司;RNA 反转录试剂盒购自日本 Takara 公司;荧光定量试剂盒购自中国聚合美生物技术有限公司;RNA 引物购自上海生工生物工程技术有限公司;PCR 仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.3 小鼠分组及 TAA 模型的建立 将 25 只小鼠分为三组:对照组($n = 5$), 饮用无菌水;BAPN 组($n = 10$), 饮用含有 BAPN[1.0 g/(kg · d)]的无菌水;BAPN + FNBP 组($n = 10$), 在饮用含有 BAPN[1.0 g/(kg · d)]的无菌水基础上, 第 14 天开始每隔 1 d 腹腔注射 FNBP(10 mg/kg), 共注射 7 次;对照组和 BAPN 组注射等体积的生理盐水。

1.4 胸主动脉组织取材及处理 28 d 造模结束后, 用 3% 异氟烷对小鼠进行麻醉, 打开胸腔, 从心尖部灌注生理盐水将心腔及主动脉内血液冲洗掉, 将心脏及主动脉及连通的肾脏取下进行拍照;然后将胸主动脉用 4% 多聚甲醛固定, 逐级乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片, 并将切片贴敷于载玻片上。

1.5 Elastin 染色 对制备好的石蜡切片进行烤片(65 °C, 2 h)、二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水、PBS 清洗, 再用碘液孵育切片 5 min, PBS 清洗;将硫代硫酸钠溶液滴于切片上, 5 min 后用流水冲洗;用醛品红染色 2 min 后再用水洗;用碘橙黄 G 染液滴染后, 水洗, 二甲苯透明, 中性树脂封片, 拍照。

1.6 免疫组化染色 烘烤组织切片(65 °C, 2 h), 然后脱蜡、复水、蒸馏水清洗;将切片置于 100 °C 的 1 × 柠檬酸钠溶液中 20 min 进行抗原修复;用无菌水清洗切片, 再用内源性过氧化物酶抑制剂室温孵育切片 20 min, 无菌水清洗, 用血清室温封闭切片 20 min, 甩干, 滴加一抗抗体, 4 °C 湿盒过夜;次日将切片在室温下平衡 30 min, PBS 清洗;滴加辣根过氧化物酶标记二抗抗体, 室温孵育 30 min, PBS 清洗;DAB 显色;之后进行苏木精染色, 盐酸分化、脱水、透明、封片。

1.7 明胶酶谱 用明胶酶谱法测定血清中的 MMP2 和 MMP9 的活性。收集小鼠血液, 离心(1 000 r/min, 10 min), 获得上层血清。采用非还原上样缓冲液对血清进行制样, 在含有 0.2% 明胶的分离胶和浓缩胶中进行电泳;胶体用 A 液室温摇床孵育 48 h;B 液 37 °C 孵育 5 h;考马斯亮蓝染色, 脱色液脱色直到条带清晰, 之后采图。

1.8 RT-PCR 将获取的小鼠胸主动脉组织用 TRIzol 方法提取总 RNA, 按照反转录试剂盒方法将 mRNA 反转录为 cDNA, 之后用荧光定量 PCR 试剂盒进行 cDNA 扩增。所用引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')
mouse β -actin	F:CCACACCCGCCACCAGTTCG R:TACAGCCCGGGGAGCATCGT
mouse IL-6	F:AGTTGCCTTCTGGGACTGA R:TCCACGATTTCCAGAGAAC
mouse IL-1 β	F:ACCTTCCAGGATGAGGACATGA R:AACGTCACACACCAGCAGGTTA
mouse TNF- α	F:CCCTCACACTCAGATCATCTTCT R:GCTACGACGTGGGCTACAG
mouse MCP-1	F:TAAAAACCTGGATCGGAACCAAA R:GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT
mouse α -SMA	F:GGGAGCAGAGTATCATCGCC R:ATCCGGAACCCCTGCATTAGC
mouse SM22 α	F:GCCTCAACATGGCCAACAAG R:ATCCGGAACCCCTGCATTAGC
mouse D1DR	F:GCTCCTGATGGAACACCATT R:GCTTAGCCCTCACGTTCTTG
mouse D2DR	F:TGCCATFTGTTCTTGGTGTGT R:GTGAAGGCGCTGTAGAGGAC
mouse D3DR	F:CCCTCAGCAGTCTTCTCTGTC R:AGTCTCTCCACTTGGCTCA
mouse D5DR	F:ACCAAGACACGGTCTTCCAC R:CCTCCTCTCACAGTCAAGC

1.9 统计学处理 应用 GraphPad Prism 9.0 统计软件对数据进行统计分析。符合正态分布的数据以均数 \pm 标准差表示, 两组间比较采用两独立样本 t 检验, 多组间比较采用方差分析; $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TAA 中多巴胺受体转录水平的变化 与对照组相比, 给予 BAPN 28 d 后, 小鼠胸主动脉形成瘤体, Elastin 染色可见胸主动脉弹力纤维出现紊乱, 见图 1A、1B, 提示造模成功。与对照组相比, BAPN 组的 D1DR、D5DR 及 D3DR 的 mRNA 表达水平显著降

低(D1DR: $P < 0.05$; D5DR: $P < 0.01$; D3DR: $P < 0.01$);但D2DR的mRNA表达水平显著升高($P < 0.01$),见图1C-1F。

2.2 FNDP对小鼠TAA进展的抑制作用 与对照组相比,BAPN组小鼠胸主动脉肉眼可见膨大,见图2A箭头所示,而BAPN+FNDP组小鼠的胸主动脉膨大程度较BAPN组小鼠明显减轻,见图2A。BAPN组10只小鼠有7只形成动脉瘤,TAA发生率为70%,7只发生死亡,其中3只因动脉瘤破裂而死亡,破裂率为30%;而在BAPN+FNDP组,10只小鼠仅有3只形成动脉瘤,TAA发生率为30%,且仅有2只死亡,其中1只因动脉瘤破裂发生死亡,破裂率为10%。对照组5只小鼠全部存活,且血管形态

无异常,见图2B、2C。与BAPN组相比,BAPN+FNDP组小鼠生存率显著增高($P < 0.01$),见图2C。提示FNDP具有抑制TAA进展、降低TAA发生率和提高TAA生存率的作用。

2.3 FNDP对弹力纤维断裂和基质降解的改善作用 弹力纤维染色结果显示,与BAPN组小鼠相比,BAPN+FNDP组小鼠的胸主动脉弹力纤维紊乱情况明显减轻,见图3A。免疫组化结果显示,各组小鼠胸主动脉组织内的MMP2(图3B、3D)和MMP9(图3C、3D)的阳性信号差异有统计学意义(MMP2: $F = 26.9580, P < 0.01$; MMP9: $F = 21.0414, P < 0.01$)。与对照组相比,BAPN组MMP2和MMP9表达增加(MMP2: $P < 0.01$; MMP9: $P < 0.01$);而相对

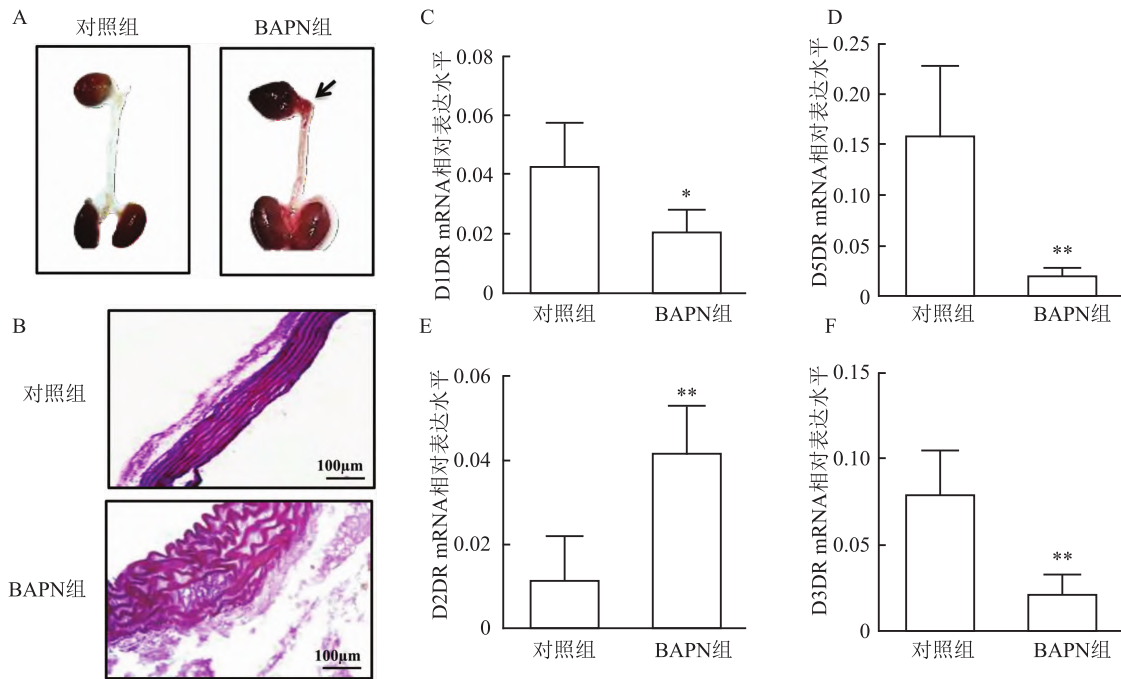


图1 TAA造模及其组织中多巴胺受体的转录水平变化

A:对照组和BAPN组主动脉大体图;箭头:TAA的形成;B:对照组和BAPN组Elastin染色图;C:TAA中D1DR mRNA表达水平;D:TAA中D5DR mRNA表达水平;E:TAA中D2DR mRNA表达水平;F:TAA中D3DR mRNA表达水平;与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

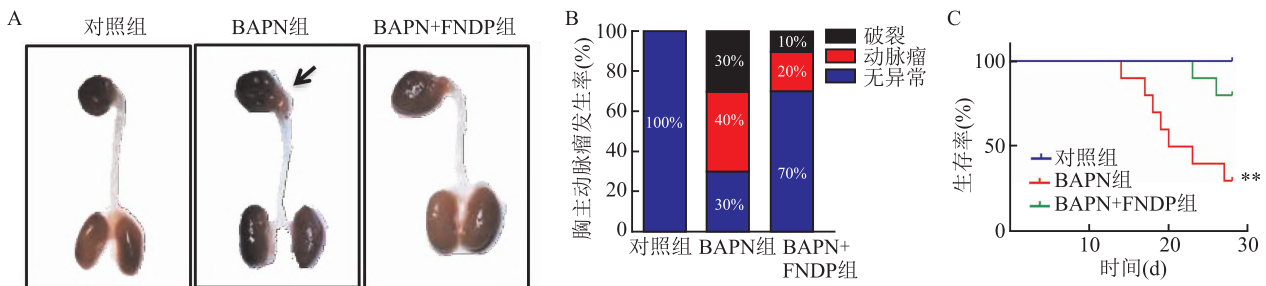


图2 FNDP对小鼠TAA进展的抑制作用

A:各组小鼠TAA的形成情况;箭头:TAA的形成;B:各组小鼠TAA发生率和破裂率的统计图;C:各组小鼠的生存曲线;与对照组比较: ** $P < 0.01$

于 BAPN 组, BAPN + FNDP 组的 MMP2 和 MMP9 表达减少 (MMP2: $P < 0.01$; MMP9: $P < 0.01$)。小鼠血清中的 MMP2 的活性检测结果显示, BAPN + FNDP 组血清 MMP2 的活性显著低于 BAPN 组 ($P < 0.05$), 但血清 MMP9 (图 3E、3F) 活性无显著差异 ($P = 0.1475$)。

2.4 FNDP 对巨噬细胞浸润和炎症因子表达的抑制作用 免疫组化结果显示, 各组小鼠动脉组织中巨噬细胞标志物 CD68 的表达 (图 4A、4B) 差异有统计学意义 ($F = 43.3171, P < 0.01$)。相比于对照组, BAPN 组 CD68 表达增加 ($P < 0.01$); 而相较于 BAPN 组, BAPN + FNDP 组 CD68 表达明显降低 ($P < 0.01$)。

RT-PCR 结果显示, 各组小鼠动脉组织中炎症因子的表达 (图 4C - 4F) 差异有统计学意义 (MCP-1: $F = 17.7575, P < 0.01$; IL-6: $F = 102.0460, P <$

0.01 ; TNF- α : $F = 13.6323, P < 0.01$; IL-1 β : $F = 30.1394, P < 0.01$)。与对照组相比, BAPN 组小鼠动脉炎症因子 MCP-1、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平明显增加 (MCP-1: $P < 0.01$; IL-6: $P < 0.01$; TNF- α : $P < 0.01$; IL-1 β : $P < 0.01$); 而与 BAPN 组相比, BAPN + FNDP 组小鼠动脉炎症因子 MCP-1、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 的水平下降 (MCP-1: $P < 0.05$; IL-6: $P < 0.05$; TNF- α : $P < 0.01$; IL-1 β : $P < 0.01$)。

2.5 FNDP 对 TAA 平滑肌细胞收缩表型的影响 动脉平滑肌细胞在正常功能状态下表达收缩蛋白, 如 α -SMA 和 SM22 α 。RT-PCR 结果显示 (图 5), 各组小鼠动脉组织中 α -SMA 的表达差异有统计学意义 ($F = 10.7564, P < 0.01$), 然而 SM22 α 表达差异无统计学意义 ($F = 3.3523, P = 0.0876$)。相比于对照组, BAPN 组 α -SMA 和 SM22 α 的表达显著下降 (α -SMA: $P < 0.01$; SM22 α : $P < 0.05$); 然而, 相较于于

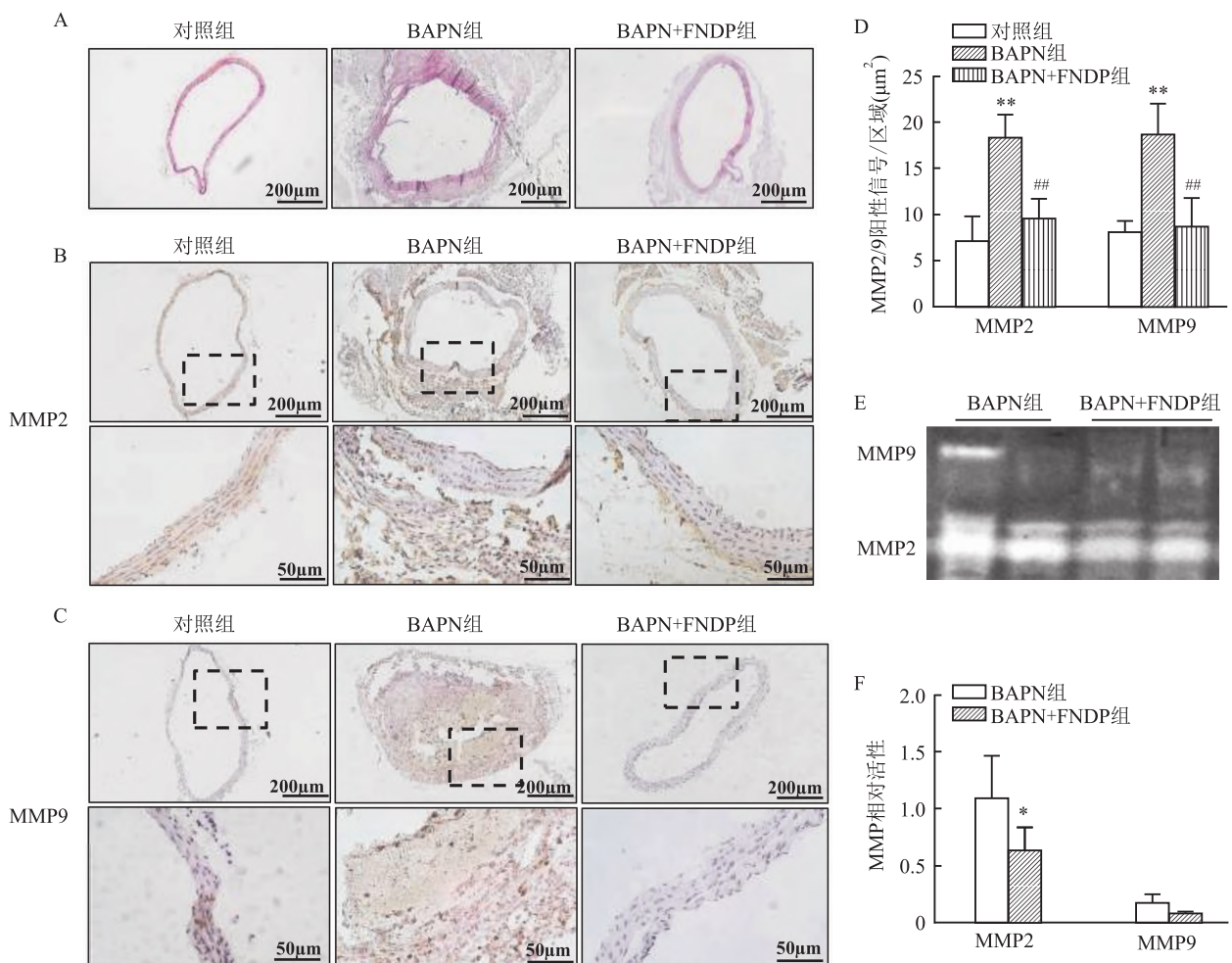


图3 FNDP对弹性纤维断裂和基质降解的改善作用

A: 各组小鼠主动脉组织切片 Elastin 染色图; B: 各组小鼠主动脉组织切片 MMP2 免疫组化图; C: 各组小鼠主动脉组织切片 MMP9 免疫组化图; D: 各组小鼠主动脉组织切片 MMP2 和 MMP9 免疫组化统计图; E: 各组小鼠血清 MMP2 和 MMP9 明胶酶谱活性图; F: 各组小鼠血清 MMP2 和 MMP9 明胶酶谱活性统计图; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 BAPN 组比较: ## $P < 0.01$

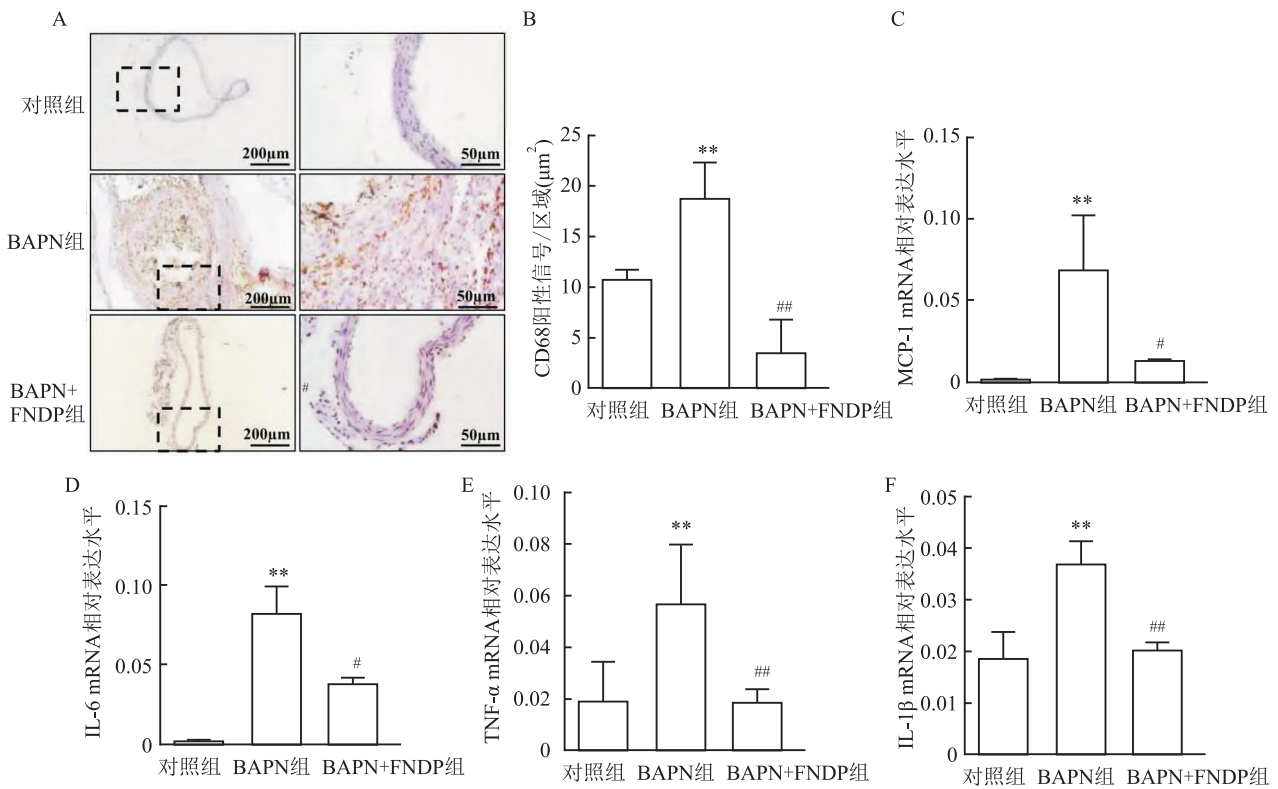


图4 FNDP对巨噬细胞浸润和炎症因子表达的抑制作用

A:各组小鼠主动脉组织切片CD68免疫组化图;B:各组小鼠主动脉组织切片CD68免疫组化统计图;C-F:MCP-1、IL-6、TNF-α、IL-1β mRNA表达水平;与对照组比较:** $P < 0.01$;与BAPN组比较:# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

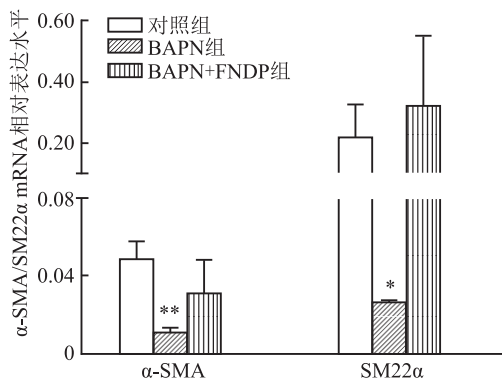


图5 α-SMA和SM22α的mRNA相对表达水平
与对照组比较:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

BAPN组,FNDP + BAPN组中α-SMA和SM22α的表达无显著差异(α-SMA; $P = 0.1285$;SM22α; $P = 0.0943$)。

3 讨论

FNDP在不同的疾病中均表现出抗炎作用。Joseph et al^[8]发现腹腔注射FNDP可减轻糖尿病内毒素小鼠的高血糖和全身炎症反应;Amatya et al^[9]发现FNDP可降低肾脏细胞内的氧化应激和炎症反

应;之前的研究^[10]也显示FNDP可激动巨噬细胞膜上的多巴胺一型受体,使胞内cAMP生成增多,继而抑制巨噬细胞的炎症因子表达,缓解心衰小鼠心肌早期炎症。在本研究中,FNDP抑制了TAA管壁巨噬细胞的浸润,降低了炎症因子的产生,而炎症反应是TAA的一个重要病理特征,这提示FNDP可能通过减轻炎症反应从而减缓TAA的进展,但对于减缓TAA是否通过cAMP及其下游信号分子仍待进一步研究。

细胞外基质成分包括蛋白聚糖、糖蛋白、层粘连蛋白、胶原蛋白和弹性板等,这些蛋白共同维持着血管壁的弹性^[11]。MMP2和MMP9可以降解细胞外基质,炎症细胞释放的炎性因子会刺激动脉壁使得MMP9的表达量增加^[11]。此外,有研究^[12]显示可通过D5DR调节多巴胺信号转导通路使得脑肿瘤中MMP9表达降低。在本研究中,小鼠腹腔注射FNDP后,细胞外基质降解减缓可能与炎症反应的减轻有关,也可能与FNDP激活多巴胺一型受体信号通路密切相关,这可能是FNDP在TAA中具有保护作用的机制。

平滑肌细胞可以在收缩表型和合成表型之间转

换。收缩型平滑肌细胞会表达高水平的收缩蛋白,包括 α -SMA 和 SM22 α 等;平滑肌细胞在受到刺激的情况下会转换为合成表型。在 TAA 中,平滑肌细胞会由收缩表型转化为合成表型,这意味着平滑肌细胞收缩蛋白的表达减少,对于主动脉壁强度和正常收缩功能的维持不利^[1, 13]。本研究在 BAPN 诱导的 TAA 中,主动脉平滑肌细胞收缩蛋白 α -SMA 和 SM22 α 显著降低,与文献^[14]报道一致。过往研究^[7, 15]显示激动多巴胺一型受体可以通过硫化氢影响小鼠平滑肌细胞的增殖,本研究表明 FNDP 对平滑肌收缩蛋白 α -SMA 和 SM22 α 无显著影响。这提示 FNDP 对 TAA 进展的减缓可能与平滑肌细胞向收缩表型转化无关。

参考文献

- [1] Gao J, Cao H, Hu G, et al. The mechanism and therapy of aortic aneurysms [J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 55.
- [2] Hameed I, Cifu A S, Vallabhajosyula P. Management of thoracic aortic dissection [J]. JAMA, 2023, 329(9): 756 - 7.
- [3] Feng Y, Lu Y. Immunomodulatory effects of dopamine in inflammatory diseases [J]. Front Immunol, 2021, 12: 663102.
- [4] Yan Y, Jiang W, Liu L, et al. Dopamine controls systemic inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome [J]. Cell, 2015, 160(1 - 2): 62 - 73.
- [5] Ren P, Wu D, Appel R, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome with inhibitor MCC950 prevents aortic aneurysms and dissections in mice [J]. J Am Heart Assoc, 2020, 9(7): e014044.
- [6] Le S, Zhang H, Huang X, et al. PKM2 activator TEPP-46 attenuates thoracic aortic aneurysm and dissection by inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β secretion [J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2020, 25(4): 364 - 76.
- [7] Xi Y, Wen X, Zhang Y, et al. DR1 activation inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells through increasing endogenous H(2)S in diabetes [J]. Aging Dis, 2022, 13(3): 910 - 26.
- [8] Joseph B, Shimojo G, Li Z, et al. Glucose activates vagal control of hyperglycemia and inflammation in fasted mice [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 1012.
- [9] Amatya B, Yang S, Yu P, et al. Peroxiredoxin-4 and dopamine D5 receptor interact to reduce oxidative stress and inflammation in the kidney [J]. Antioxid Redox Signal, 2023, 38(16 - 18): 1150 - 66.
- [10] 武栗妃, 马友才, 王霞, 等. 多巴胺 1 类受体活化减轻心力衰竭早期炎症反应的实验研究 [J]. 山西医科大学学报, 2021, 52(9): 1128 - 34.
- [11] Jana S, Hu M, Shen M, et al. Extracellular matrix, regional heterogeneity of the aorta, and aortic aneurysm [J]. Exp Mol Med, 2019, 51(12): 1 - 15.
- [12] Fan Y, Zha R, Sano T, et al. Mechanical tibial loading remotely suppresses brain tumors by dopamine-mediated downregulation of CCN4 [J]. Bone Res, 2021, 9(1): 26.
- [13] Shi J, Yang Y, Cheng A, et al. Metabolism of vascular smooth muscle cells in vascular diseases [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2020, 319(3): H613 - 31.
- [14] Rombouts K B, van Merriënboer T A R, Ket J C F, et al. The role of vascular smooth muscle cells in the development of aortic aneurysms and dissections [J]. Eur J Clin Invest, 2022, 52(4): e13697.
- [15] 陈锦花, 陈志武. 硫化氢对大鼠基底动脉血管平滑肌细胞迁移、增殖及舒张作用的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(10): 1510 - 4.

The repressing effect of fenoldopam on the development of thoracic aortic aneurysm in mice

Zhou Ying^{1,2}, Wu Lifei^{1,2,3}, Du Wenjing⁴, Cao Jimin^{1,2}

(¹Key Laboratory of Cellular Physiology at Shanxi Medical University, Ministry of Education, Taiyuan 030000; ²Dept of Physiology, ³Dept of Pathophysiology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030000; ⁴State Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Dept of Cell Biology, Institute of Basic Medical Sciences Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medicine Peking Union Medical College, Beijing 100000)

Abstract Objective To investigate whether fenoldopam (FNDP) (an agonist of type 1 dopamine receptor) has a protective effect on thoracic aortic aneurysm (TAA) in mice. **Methods** Three-week-old male C57BL/6J mice were treated with β -aminopropionitrile (BAPN) to induce TAA. The mice were divided into three groups: the control group, the BAPN group, and the BAPN + FNDP group (FNDP injected intraperitoneally). The incidence and survival rate of TAA were recorded. Gross anatomy of the whole aortae was observed. Elastin staining was performed to assess morphological change, while immunohistochemistry was employed to evaluate the expressions of matrix metalloproteinase 2 (MMP2), matrix metalloproteinase 9 (MMP9) and cluster of differentiation 68 (CD68) respectively. Gelatin zymography was conducted to assess MMP2 and MMP9 activity. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to measure the mRNA expression levels of dopamine receptor D1

网络出版时间:2024-04-12 11:31:23 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20240410.1008.003

α -倒捻子素通过 NF- κ B 途径抑制 LPS/ATP 诱导的小胶质细胞中 NLRP3 炎症小体的激活

陈敏,陶静,朱慧艳

摘要 目的 探究 α -倒捻子素 (α -mangostin) 在脊髓损伤后小胶质细胞炎症模型中作用及相关机制。方法 体外培养小鼠小胶质细胞系 BV-2 细胞,利用脂多糖和三磷酸腺苷 (LPS/ATP) 联合诱导的方式建立 BV-2 炎症模型。CCK-8 法检测不同浓度 (0、10、20、40、80 μ mol/L) 的 α -mangostin 对 LPS/ATP 刺激下的细胞增殖活力影响以筛选适宜的 α -mangostin 浓度范围;将 BV-2 细胞分为 Ctrl 组、LPS/ATP 组、40 μ mol/L α -mangostin 组和不同浓度 (10、20、40 μ mol/L) 的 α -mangostin 干预组 (分别记为 LPS/ATP + 10 μ mol/L α -mangostin 组、LPS/ATP + 20 μ mol/L α -mangostin 组与 LPS/ATP + 40 μ mol/L α -mangostin 组)。ELISA 实验检测各组 BV-2 细胞上清液中促炎因子白介素-6/1 β /18 (IL-6、IL-1 β 、IL-18) 和肿瘤坏死因子 (TNF- α) 含量,Western blot 检测各组细胞中 NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体相关蛋白 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (ASC)、裂解型半胱氨酸蛋白酶 1 (cleaved caspase-1) 和白介素 1 β (IL-1 β) 表达及核因子

κ B (NF- κ B) 途径中 p65 的磷酸化水平 (p-p65/p65) 和 BV-2 细胞核中 p65 的表达。结果 与 Ctrl 组相比,LPS/ATP 组细胞增殖活力明显降低 ($P < 0.05$),但低浓度 (10、20、40 μ mol/L) 的 α -mangostin 可显著改善 LPS/ATP 对小胶质细胞增殖活力的抑制作用 ($P < 0.05$),但高浓度 (80 μ mol/L) α -mangostin 可促进 LPS/ATP 对小胶质细胞的损伤 ($P < 0.05$)。与 Ctrl 组相比,40 μ mol/L α -mangostin 组小胶质细胞上清液中炎症因子 IL-6、IL-1 β 、IL-18、TNF- α 含量和细胞中 NLRP3、ASC、cleaved caspase-1、IL-1 β 和 p-p65/p65 比值及细胞核中 p65 蛋白均无明显改变 ($P > 0.05$),而 LPS/ATP 组均显著增加 ($P < 0.05$);与 LPS/ATP 组相比,不同浓度 α -mangostin 干预组中 IL-6、IL-1 β 、IL-18、TNF- α 含量和 BV-2 细胞中 NLRP3、ASC、cleaved caspase-1、IL-1 β 和 p-p65/p65 比值及细胞核中 p65 蛋白表达随 α -mangostin 浓度的增加而依次降低,其中以 LPS/ATP + 40 μ mol/L α -mangostin 组的降低程度最为明显 ($P < 0.01$)。结论 α -mangostin 可通过 NF- κ B 途径抑制 BV-2 细胞中 NLRP3 炎症小体活化所介导的神经炎症反应。

关键词 脊髓损伤; α -倒捻子素;脂多糖;小胶质细胞;NLRP3 炎症小体;NF- κ B 途径

中图分类号 R 744;R 285

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)04-0575-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.003

2024-02-19 接收

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(编号:2022D01C112)

作者单位:新疆维吾尔自治区人民医院康复医学科,乌鲁木齐 830001

作者简介:陈敏,女,硕士,主治医师;

陶静,女,副主任医师,责任作者,E-mail:721529182@qq.com

(D1DR), dopamine receptor d2 (D2DR), dopamine receptor d3 (D3DR), dopamine receptor d5 (D5DR), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumour necrosis factor- α (TNF- α), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), alpha-smooth muscle actin (α -SMA) and smooth muscle protein 22-alpha (SM22 α). **Results** Compared to the control group, the BAPN group exhibited significant formation of TAA. Elastic fiber disruption was also observed in the thoracic aortic wall, along with a significant decrease in the mRNA levels of D1DR and D5DR. The BAPN + FNDP group showed a significant reduction in the incidence of TAA formation and the rate of aneurysm rupture compared to the BAPN group. The disruption and rupture of elastic fibers in the thoracic aortic wall were significantly improved in the BAPN + FNDP group. The levels of MMP2 and MMP9 in the thoracic aortic wall significantly decreased, and the enzymatic activity of MMP2 in the serum was significantly reduced. Moreover, macrophage infiltration in the thoracic aortic wall was significantly reduced and the mRNA levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α and MCP-1 also significantly decreased after FNDP treatment. There was no statistically significant difference in the mRNA levels of α -SMA and SM22 α . **Conclusion** FNDP shows an inhibitory effect on TAA progression in mice, suggesting a potential of FNDP as a therapeutic agent for TAA.

Key words thoracic aortic aneurysm; dopamine receptors; fenoldopam; macrophages; inflammation; extracellular matrix degradation