

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.03.004

CUL1 基因对 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞存活 和 NLRP3 炎症体通路的影响 *

张莹 高砚丽 康黎 祝松涛 任引刚[△]

(空军军医大学第二附属医院老年医学科 西安 陕西 710038)

摘要 目的:探究 Cullin1(CUL1)基因对 1-甲基-4-苯基吡啶离子(MPP⁺)诱导的 SH-SY5Y 细胞存活和核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3(NLRP3)炎症体通路的影响。**方法:**(1)将 SH-SY5Y 细胞分为 NC 组、NC-sh 组、CUL1-sh 组、NC-OE 组和 CUL1-OE 组。使用 Lipofectamine 2000 试剂对细胞转染相应的慢病毒。(2)将 SH-SY5Y 细胞分为 Control 组、MPP⁺ 组和 MPP⁺+CUL1-OE 组。MPP⁺ 组和 MPP⁺+CUL1-OE 组细胞使用 1 mmol/L 的 MPP⁺ 处理 48 h, Control 组细胞正常培养。通过 MTT 法检测细胞增殖,通过 Annexin V-FITC/PI 双染色法和 TUNEL 染色法检测细胞凋亡,通过 qRT-PCR 检测 CUL1 的 mRNA 水平,通过 Western blot 检测 CUL1、NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、cleaved caspase-1、白细胞介素(IL)-1 β 和 IL-18 蛋白水平。通过 ELISA 法检测细胞培养上清液中 IL-1 β 和 IL-18 水平。**结果:**(1)与 NC 组和 NC-sh 组比较,CUL1-sh 组 CUL1 的 mRNA 和蛋白相对表达量降低,相对细胞活力降低,Annexin V-FITC/PI 阳性率和 TUNEL 阳性率升高,NLRP3、ASC、cleaved caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 蛋白相对表达量以及细胞培养上清液中 IL-1 β 和 IL-18 水平升高($P<0.05$)。与 NC 组和 NC-OE 组比较,CUL1-OE 组 CUL1 的 mRNA 和蛋白相对表达量升高,相对细胞活力升高,Annexin V-FITC/PI 阳性率和 TUNEL 阳性率降低,NLRP3、ASC、cleaved caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 蛋白相对表达量以及细胞培养上清液中 IL-1 β 和 IL-18 水平降低($P<0.05$)。(2)与 Control 组比较,MPP⁺ 组 CUL1 的 mRNA 和蛋白相对表达量降低,相对细胞活力降低,Annexin V-FITC/PI 阳性率和 TUNEL 阳性率升高,NLRP3、ASC、cleaved caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 蛋白相对表达量以及细胞培养上清液中 IL-1 β 和 IL-18 水平升高($P<0.05$)。与 MPP⁺ 组比较,MPP⁺+CUL1-OE 组 CUL1 的 mRNA 和蛋白相对表达量升高,相对细胞活力升高,Annexin V-FITC/PI 阳性率和 TUNEL 阳性率降低,NLRP3、ASC、cleaved caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 蛋白相对表达量以及细胞培养上清液中 IL-1 β 和 IL-18 水平降低($P<0.05$)。**结论:**CUL1 可能通过抑制 NLRP3 炎症体激活促进 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞存活。

关键词:帕金森病;Cullin1;1-甲基-4-苯基吡啶离子;SH-SY5Y 细胞;NLRP3 炎症体

中图分类号:R-33;R742.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2024)03-415-08

Effects of CUL1 Gene on MPP⁺-induced SH-SY5Y Cell Survival and NLRP3 Inflammasome Pathway*

ZHANG Ying, GAO Yan-li, KANG Li, ZHU Song-tao, REN Yin-gang[△]

(Department of Geriatrics, The Second Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To reveal the effect of Cullin1 (CUL1) gene on 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺)-induced SH-SY5Y cell survival and NLR family, pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflammasome pathway. **Methods:** (1) SH-SY5Y cells were divided into NC group, NC-sh group, CUL1-sh group, NC-OE group and CUL1-OE group. The cells were transfected with the corresponding lentivirus using Lipofectamine 2000 reagent. (2) SH-SY5Y cells were divided into control group, MPP⁺ group and MPP⁺+CUL1-OE group. The MPP⁺ group and MPP⁺+CUL1-OE group cells were treated with 1 mmol/L MPP⁺ for 48 hours, while the control group cells were cultured normally. Cell proliferation was detected by MTT method. Apoptosis was detected by Annexin V-FITC/PI double staining and TUNEL staining. The level of CUL1 mRNA was detected by qRT-PCR. The protein levels of CUL1, NLRP3, apoptosis-related spot-like protein (ASC), cleaved caspase-1, interleukin (IL)-1 β and IL-18 were detected by Western blot. The levels of IL-1 β and IL-18 in cell culture supernatant were detected by ELISA. **Results:** (1) Compared with NC group and NC-sh group, the relative expression of CUL1 mRNA and protein decreased, the relative cell viability decreased, the Annexin V-FITC/PI positive rate and the positive rate of TUNEL increased, the relative expression of NLRP3, ASC, cleaved caspase-1, IL-1 β and IL-18 protein and IL-1 β and IL-18 levels in cell culture supernatant increased in CUL1-sh group ($P<0.05$). Compared with NC group and NC-OE group, the relative expression of CUL1 mRNA and protein increased, the relative cell viability increased, the Annexin V-FITC/PI positive rate and the positive rate of TUNEL decreased, the relative expression of NLRP3, ASC, cleaved caspase-1, IL-1 β and IL-18 protein and IL-1 β and IL-18

* 基金项目:陕西省重点研发计划项目(2019SF-202)

作者简介:张莹(1985-),女,硕士,副主任医师,主要研究方向:老年神经系统疾病,E-mail: ZhangYin1901@163.com

[△] 通讯作者:任引刚(1978-),男,副主任医师,主要研究方向:冠心病、心力衰竭,E-mail: YingangR937@163.com

(收稿日期:2023-07-29 接受日期:2023-08-29)

levels in cell culture supernatant decreased in CUL1-OE group ($P<0.05$). (2) Compared with control group, the relative expression of CUL1 mRNA and protein decreased, the relative cell viability decreased, the Annexin V-FITC/PI positive rate and the positive rate of TUNEL increased, the relative expression of NLRP3, ASC, cleaved caspase-1, IL-1 β and IL-18 protein and IL-1 β and IL-18 levels in cell culture supernatant increased in MPP+ group ($P<0.05$). Compared with MPP+ group, the relative expression of CUL1 mRNA and protein increased, the relative cell viability increased, the Annexin V-FITC/PI positive rate and the positive rate of TUNEL decreased, the relative expression of NLRP3, ASC, cleaved caspase-1, IL-1 β and IL-18 protein and IL-1 β and IL-18 levels in cell culture supernatant decreased in MPP++CUL1-OE group ($P<0.05$). **Conclusion:** CUL1 may promote the survival of SH-SY5Y cells induced by MPP+ by inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome.

Key words: Parkinson's disease; Cullin1; 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion; SH-SY5Y cell; NLRP3 inflammasome

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R742.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)03-415-08

前言

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见的神经退行性疾病,主要临床表现为运动功能障碍、震颤和黑质致密部多巴胺能神经元丢失。学者普遍认为 PD 是由遗传因素和环境因素共同作用的结果^[1,2]。虽然 PD 的病因尚不清楚,但神经细胞死亡信号紊乱与 PD 的发生密切相关^[3]。泛素-蛋白酶系统在细胞内稳态、生长和分化中发挥重要作用^[4]。蛋白质泛素化由 E1、E2 和 E3 泛素连接酶调控^[5]。Skp1-Cullin1-F-box(SCF)泛素连接酶复合物属于 E3 泛素连接酶,与 PD 的发生发展密切相关,PD 患者脑内 SCF 复合物组分 Skp1 表达降低,并且与神经元存活有关^[6,7]。

清选蛋白 1(Cullin1, CUL1)是 Cullin 家族成员之一,也是 SCF 复合物的核心支架蛋白。CUL1 控制树突和轴突的修剪,调节神经元的存活^[8]。CUL1 的缺失可导致早期胚胎死亡^[9],而 CUL1 的过度表达与癌症进展有关^[10,11]。近年来,神经炎症介导的神经元死亡机制备受关注。神经炎症是正常机体中枢神经系统的一种先天免疫反应,通过清除受损组织和病原体,帮助大脑和脊髓抵抗病原体的侵袭,促进神经组织的修复。但在一定病理条件下,中枢神经系统炎症反应过度激活可导致神经元损伤,进一步加重疾病的发展。核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 (Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 炎性体在包括 PD 在内的多种神经退行性疾病相关神经炎症中发挥关键作用, NLRP3 炎性体主要由 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC) 和 caspase-1 组成。激活的 NLRP3 炎性体可促进白细胞介素 -1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β) 的分泌,诱导细胞焦亡^[12]。细胞焦亡又称细胞炎性坏死,是一种程序性细胞死亡。在 PD 发病过程中 NLRP3 炎性体被激活,并诱导了细胞焦亡^[13]。研究表明 CUL1 通过其 C 末端与 NLRP3 的 PYD 结构域结合并促进 NLRP3 泛素化,从而抑制 NLRP3 炎性体激活^[14]。目前,多项文献表明 CUL1 在 PD 中异常表达,并且可能参与 PD 的进展^[15,16]。然而, CUL1 在 PD 中的具体作用尚不明确。

MPP+ 已被证明可以抑制线粒体复合物 I 的活性,导致 ATP 合成不足、线粒体膜极性丧失和严重的线粒体损伤^[17,18]。用 1-甲基-4-苯基吡啶离子(1-methyl-4-phenylpyridine, MPP+)处理 SH-SY5Y 细胞常用药构建 PD 体外细胞模型。因此,本研究旨在探讨 CUL1 基因对 MPP+ 诱导的 SH-SY5Y 细胞存活的影响及机制,以期 PD 的治疗提供更多的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞系(货号:SCSP-5014)购自中国科学院细胞库。

1.1.2 实验材料 阴性对照 shRNA 慢病毒(NC-sh)、CUL1 shRNA 慢病毒(CUL1-sh)、阴性对照过表达慢病毒(NC-OE)和 CUL1 过表达慢病毒(CUL1-OE)委托吉玛基因合成。SH-SY5Y 完全培养液(货号:SCSP-666)购自中国科学院细胞库。Lipofectamine 2000(货号:11668-019)购自美国 Invitrogen 公司。MPP+(货号:D048)购自美国 Sigma-Aldrich 公司。MTT 试剂盒(货号:M1020)、Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(货号:CA1020)、IL-1 β ELISA 试剂盒(货号:SEKH-0002)和 IL-18 ELISA 试剂盒(货号:SEKH-0028)购自北京索莱宝科技有限公司。TUNEL 试剂盒(货号:C1088)、Trizol(货号:R0016)、RIPA 裂解液(货号:P0013D)和 BCA 蛋白测试盒(货号:P0012)、NLRP3 一抗(货号:AF2155)购自碧云天生物技术研究所。RT reagent Kit with gDNA Eraser(货号:RR047Q)和 TB Green Premix Ex Taq II(货号:RR820B)购自日本 Takara 公司。ASC 一抗(货号:ab283684)购自英国 Abcam 公司。CUL1 一抗(货号:AF0140)、cleaved caspase-1 一抗(货号:AF4022)、IL-1 β 一抗(货号:AF5103)、IL-18 一抗(货号:DF6252)和 GAPDH 一抗(货号:AF7021)购自美国 Affinity 公司。IgG H&L(HRP)二抗(ab6721)购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.1.3 实验仪器 NanoDrop 2000 超微量分光光度计购自美国 Thermo Scientific 公司。ELX800 酶标仪购自美国 BIO-TEK 公司。IX71 荧光倒置显微镜购自日本奥林巴斯公司。FACSCalibur 流式细胞仪购自美国 BD 公司。CFX96 荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 SH-SY5Y 细胞在 SH-SY5Y 完全培养液(含 44.5% MEM 培养基、44.5% Ham's F-12 培养基、10%胎牛血清和 1%非必需氨基酸溶液)中培养,环境条件:37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂。

1.2.2 SH-SY5Y 细胞分组和转染 将 SH-SY5Y 细胞分为 NC 组、NC-sh 组、CUL1-sh 组、NC-OE 组和 CUL1-OE 组。将对数生长期的 SH-SY5Y 细胞按 2×10^5 个细胞/孔的密度接种于 6 孔板,达 60%汇合后,使用 Lipofectamine 2000 试剂将 NC-sh、CUL1-sh、NC-OE 和 CUL1-OE 分别转染至 NC-sh 组、CUL1-sh 组、NC-OE 组和 CUL1-OE 组细胞中,转染时间为 48 h。NC 组

SH-SY5Y 细胞不进行转染。采用 RT-qPCR 和 Western blot 验证转染效率。

1.2.3 MTT 法检测 SH-SY5Y 细胞增殖 SH-SY5Y 细胞转染 48 h 后,将 SH-SY5Y 细胞(5×10^3 个细胞 / 孔,180 μ L)接种至 96 孔板中,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 48 h。弃上清,依次加入 90 μ L 新鲜培养液和 10 μ L 的 MTT,孵育 4 h 后,弃上清,加入 110 μ L 的 Formazan 溶解液,振荡 10 min,酶标仪检测 490 nm 处光密度值(OD)。

1.2.4 Annexin V-FITC/PI 双染色法检测 SH-SY5Y 细胞凋亡 SH-SY5Y 细胞转染 48 h 后,用不含 EDTA 的胰酶消化细胞,4 $^{\circ}$ C、1000 r/min 离心 5 min,弃上清,PBS 重悬细胞,再次离心弃上清,用 1 \times 结合缓冲液重悬细胞。取 100 μ L 细胞悬液(1×10^6 个细胞 / mL)与 5 μ L 的 Annexin V-FITC 室温避光孵育 5 min。然后加入 5 μ L 的 PI 和 400 μ L 对的 PBS 溶液,立即进行流式细胞仪检测。

1.2.5 TUNEL 染色检测细胞凋亡 SH-SY5Y 细胞转染 48 h 后,用 4%多聚甲醛固定 SH-SY5Y 细胞 20 min,3% H₂O₂ 孵育 10 min 阻断内源性过氧化物酶,然后用 0.1%的 Triton X-100 通透处理 15 min。随后,将细胞与 TUNEL 反应混合物室温避光孵育 1 h,DAPI 染核 5 min,在荧光显微镜下对 TUNEL 阳性细胞进行计数。

1.2.6 MPP+ 诱导 SH-SY5Y 细胞实验 将 SH-SY5Y 细胞分为 Control 组、MPP+ 组和 MPP++CUL1-OE 组。将对数生长期的 SH-SY5Y 细胞(5×10^3 个细胞 / 孔,180 μ L)接种到 96 孔板中,MPP+ 组和 MPP++CUL1-OE 组细胞使用 1 mmol/L 的 MPP+ 处理 48 h,Control 组细胞正常培养。然后按照 1.2.3、1.2.4 和 1.2.5 部分所描述的方法检测细胞增殖和凋亡。

1.2.7 qRT-PCR 检测 CUL1 的 mRNA 表达 TRIzol 试剂提取 SH-SY5Y 细胞总 RNA,分光光度计测定总 RNA 浓度和纯度,然后使用 RT reagent Kit with gDNA Eraser 进行逆转录,在 PCR 系统上使用 TB Green Premix Ex Taq II 进行扩增,扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 5 min,95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 15 s,40 个循环。引物序列如下:CUL1(正向:5'-TTGCAAAGGCCCTACGTT-3',反向:5'-CGTTGTTCTCAAGCAGACG-3');GAPDH(正向:5'-GCCTGCTTCACCACCTTCT-3',反向:5'-GAACGGGAA-

GCTCACTGG-3')。通过 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 方法计算基因相对表达量。GAPDH 作为内参基因。

1.2.8 Western blot 检测 CUL1、NLRP3、ASC、cleaved caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 蛋白表达 RIPA 裂解液提取 SH-SY5Y 细胞总蛋白,BCA 法检测总蛋白浓度,总蛋白在 10% SDS-PAGE 上电泳并转移到 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶封闭 1 h,然后将膜与 CUL1 (1:1000)、NLRP3 (1:1000)、ASC (1:1000)、cleaved caspase-1 (1:1000)、IL-1 β (1:1000)、IL-18 (1:1000) 和 GAPDH (1:2000) 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。然后将膜与 HRP 标记的二抗(1:1000)室温孵育 2 h。ECL 显影。ImageJ 软件定量条带灰度值,GAPDH 作为内参蛋白。

1.2.9 ELISA 法检测细胞培养上清液中 IL-1 β 和 IL-18 的水平 收集 SH-SY5Y 细胞培养上清液,按照试剂盒说明通过 ELISA 法检测 IL-1 β 和 IL-18,测量 450 nm 波长吸光度,根据标准曲线计算各样本中的 IL-1 β 和 IL-18 的水平。

1.3 统计学分析

SPSS22.0 软件用于数据分析,本研究中的分组大于两组,首先通过单因素方差分析比较整体差异,然后通过 LSD 检验进行事后两两比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CUL1 对 SH-SY5Y 细胞增殖和凋亡的影响

与 NC 组和 NC-sh 组比较,CUL1-sh 组细胞中 CUL1 的 mRNA 和蛋白相对表达量均降低($P < 0.05$);与 NC 组和 NC-OE 组比较,CUL1-OE 组细胞中 CUL1 的 mRNA 和蛋白相对表达量升高($P < 0.05$)。各组 SH-SY5Y 细胞的相对细胞活力差异有统计学意义($F = 198.986, P < 0.001$)。与 NC 组和 NC-sh 组比较,CUL1-sh 组的相对细胞活力降低($P < 0.05$);与 NC 组和 NC-OE 组比较,CUL1-OE 组的相对细胞活力升高($P < 0.05$)。见图 1。

各组 SH-SY5Y 细胞的 Annexin V-FITC/PI 阳性率和 TUNEL 阳性率差异有统计学意义($F = 773.583, P < 0.001; F = 638.580, P < 0.001$)。与 NC 组和 NC-sh 组比较,CUL1-sh 组的 Annexin V-FITC/PI 阳性率和 TUNEL 阳性率均升高($P < 0.05$);与 NC 组和 NC-OE 组比较,CUL1-OE 组的 Annexin V-FITC/PI 阳性率和 TUNEL 阳性率均降低($P < 0.05$)。见图 2。

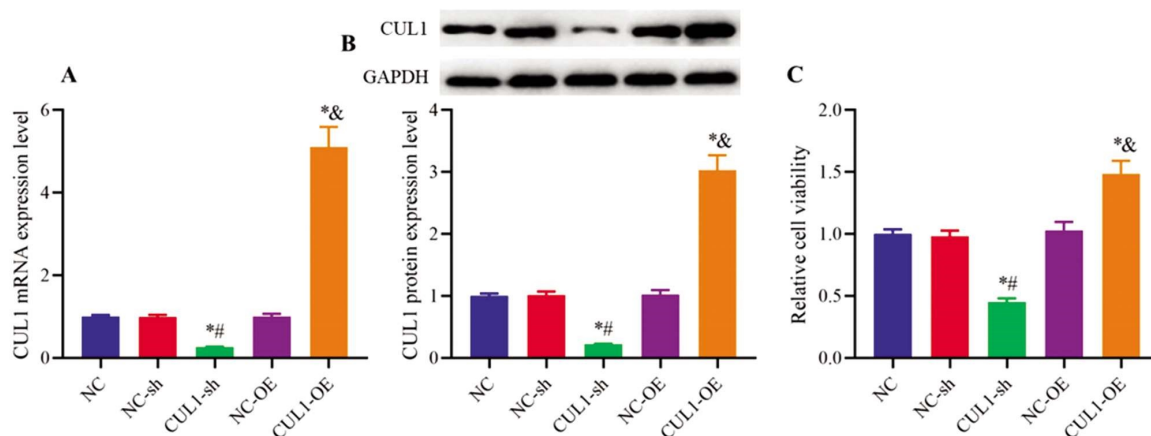


图 1 CUL1 对 SH-SY5Y 细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of CUL1 on SH-SY5Y cell proliferation

Note: A and B: CUL1 mRNA and protein relative expression levels of SH-SY5Y cells in different treatment groups; C: Relative cell viability of SH-SY5Y cells in different treatment groups; Compared with NC group, $*P < 0.05$; Compared with NC-sh group, $^{\#}P < 0.05$; Compared with NC-OE group, $^{\&}P < 0.05$.

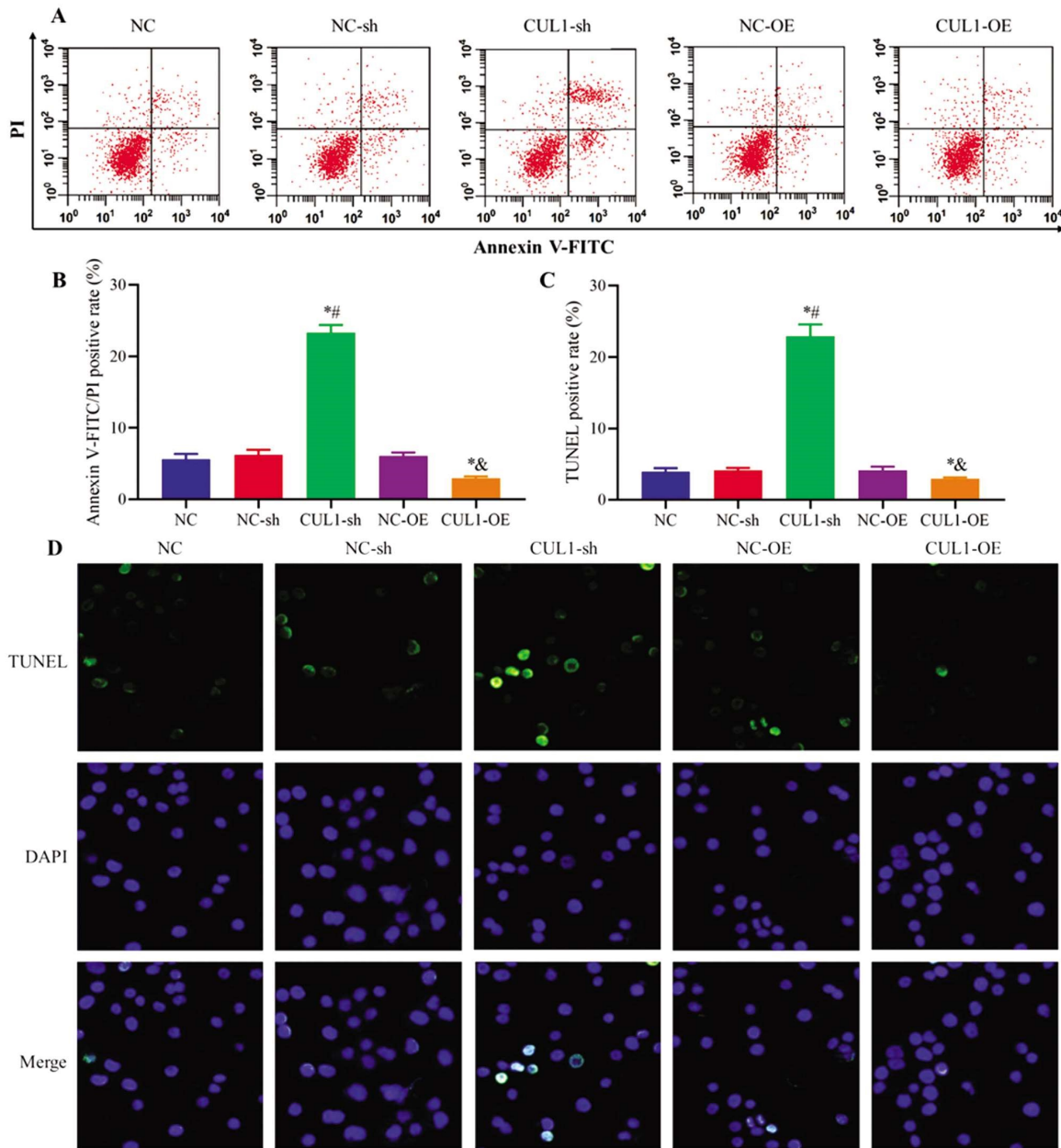


图 2 CUL1 对 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

Fig.2 Effect of CUL1 on apoptosis of SH-SY5Y cells

Note: A and B: Typical flow cytometry and Annexin V-FITC/PI positive rate of SH-SY5Y cells in different treatment groups; C and D: TUNEL staining pattern ($\times 400$) and TUNEL positive rate of SH-SY5Y cells in different treatment groups; Compared with NC group, $*P<0.05$; Compared with NC-sh group, $\#P<0.05$; Compared with NC-OE group, $\&P<0.05$.

2.2 CUL1 对 SH-SY5Y 细胞 NLRP3 炎症体通路的影响

与 NC 组和 NC-sh 组比较,CUL1-sh 组细胞中 NLRP3、ASC、cleaved caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 蛋白相对表达量以及细胞培养上清液中 IL-1 β 和 IL-18 水平升高($P<0.05$);与 NC 组和 NC-OE 组比较,CUL1-OE 组细胞中 NLRP3、ASC、cleaved caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 蛋白相对表达量以及细胞培养上清液中 IL-1 β 和 IL-18 水平降低($P<0.05$)。见图 3 和图 4。

2.3 CUL1 对 MPP+ 诱导的 SH-SY5Y 细胞增殖和凋亡的影响

与 Control 组比较,MPP+ 组细胞中 CUL1 的 mRNA 和蛋白相对表达量降低 ($P<0.05$); 与 MPP+ 组比较, MPP++CUL1-OE 组细胞中 CUL1 的 mRNA 和蛋白相对表达量升高($P<0.05$)。各组 SH-SY5Y 细胞的相对细胞活力差异有

统计学意义($F=446.762, P<0.001$)。与 Control 组比较,MPP+ 组的相对细胞活力降低 ($P<0.05$); 与 MPP+ 组比较, MPP++CUL1-OE 组的相对细胞活力升高($P<0.05$)。见图 5。

各组 SH-SY5Y 细胞的 Annexin V-FITC/PI 阳性率和 TUNEL 阳性率差异有统计学意义($F=315.602, P<0.001; F=189.412, P<0.001$)。与 Control 组比较,MPP+ 组的 Annexin V-FITC/PI 阳性率和 TUNEL 阳性率升高($P<0.05$);与 MPP+ 组比较,MPP++CUL1-OE 组的 Annexin V-FITC/PI 阳性率和 TUNEL 阳性率降低($P<0.05$)。见图 6。

2.4 CUL1 对 MPP+ 诱导的 SH-SY5Y 细胞 NLRP3 炎症体通路的影响

与 Control 组比较,MPP+ 组细胞中 NLRP3、ASC、cleaved

caspace-1、IL-1 β 和 IL-18 蛋白相对表达量以及细胞培养上清液中 IL-1 β 和 IL-18 水平升高 ($P<0.05$)；与 MPP+ 组比较，MPP++CUL1-OE 组细胞中 NLRP3、ASC、cleaved caspase-1、

IL-1 β 和 IL-18 蛋白相对表达量以及细胞培养上清液中 IL-1 β 和 IL-18 水平降低 ($P<0.05$)。见图 7 和图 8。

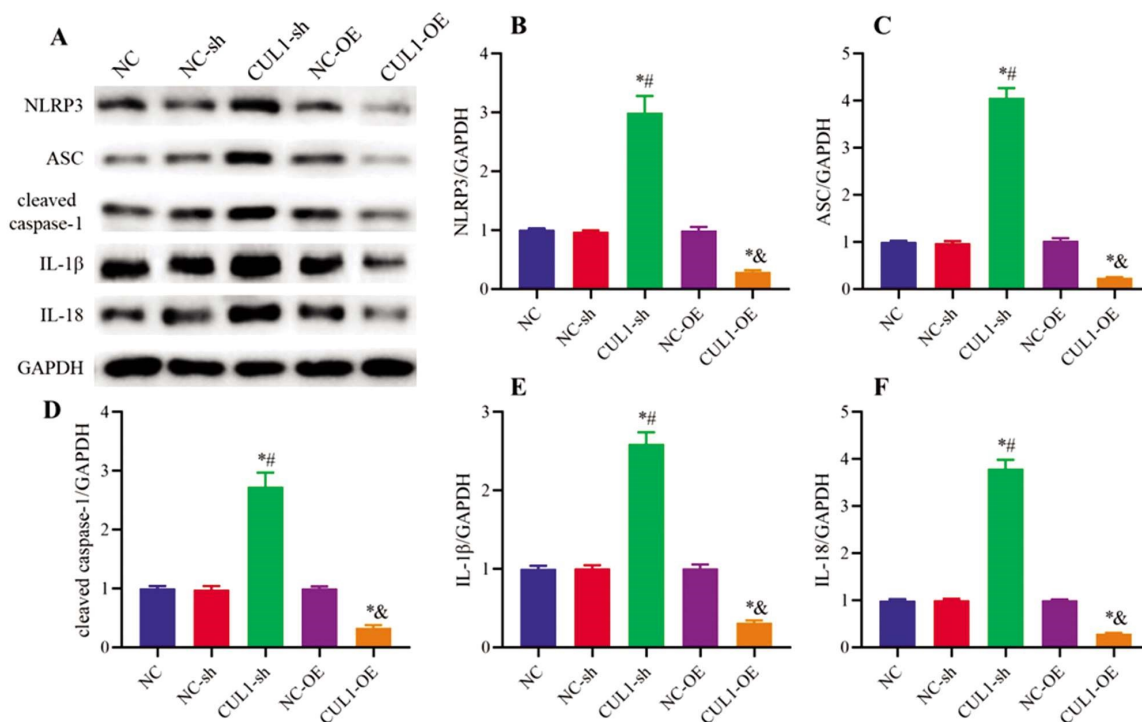


图 3 CUL1 对 SH-SY5Y 细胞 NLRP3 炎症体通路的影响

Fig.3 Effect of CUL1 on NLRP3 inflammatory pathway in SH-SY5Y cells

Note: A: Results of Western blot; B-F: Relative expression levels of NLRP3, ASC, cleaved caspase-1, IL-1 β , and IL-18 in SH-SY5Y cells in different treatment groups; Compared with NC group, $*P<0.05$; Compared with NC-sh group, $^{\#}P<0.05$; Compared with NC-OE group, $^{\&}P<0.05$.

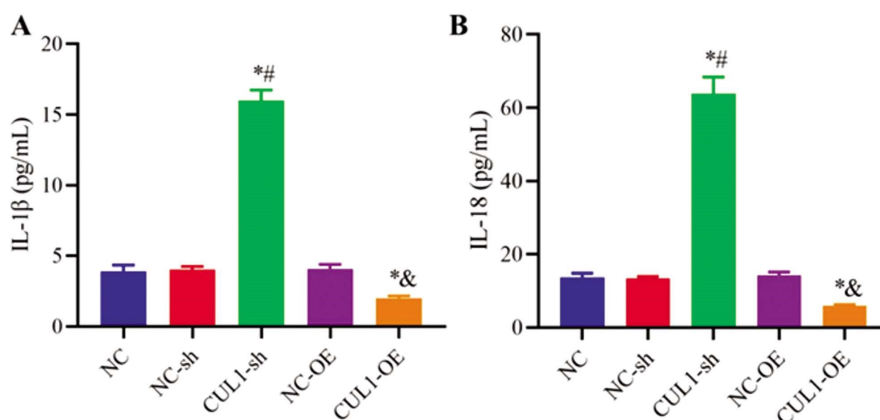


图 4 CUL1 对 SH-SY5Y 细胞培养上清液中 IL-1 β 和 IL-18 水平的影响

Fig. 4 Effect of CUL1 on IL-1 β and IL-18 levels in the supernatant of SH-SY5Y cell medium

Note: A: IL-1 β level; B: IL-18 level; Compared with NC group, $*P<0.05$; Compared with NC-sh group, $^{\#}P<0.05$; Compared with NC-OE group, $^{\&}P<0.05$.

3 讨论

SCF 泛素连接酶复合物与 PD 的发生发展密切相关,研究表明 PD 患者脑内 SCF 复合物组分 Skp1 表达降低,并且与神经元的存活有关^[67]。CUL1 是 SCF 复合物的核心支架蛋白,不仅调节神经元的存活^[8],而且调节胚胎发育^[9],CUL1 的缺失可导致神经元死亡和胚胎发育受限。另外,CUL1 也调节癌症进展,在大多数癌症中高表达^[10,11]。目前,虽然有学者研究表明 CUL1 在 PD 中异常表达^[15,16],但 CUL1 与 PD 进展的关系尚不

明确。SH-SY5Y 细胞是 PD 多巴胺能神经元的体外模型细胞^[19,20],本研究结果显示下调 CUL1 抑制 SH-SY5Y 细胞增殖,并促进细胞凋亡,而上调 CUL1 则促进 SH-SY5Y 细胞增殖,抑制细胞凋亡,提示 CUL1 对神经元存活具有促进作用。

目前,PD 中的神经炎症引起的神经元死亡正在被广泛研究。在 PD 发病过程中,NLRP3 炎性体被激活,并诱导了细胞焦亡^[13]。因此,抑制 NLRP3 炎性体的激活被认为是治疗 PD 的一种潜在策略^[21]。Wan 等的研究显示在体外培养的人单核细胞系巨噬细胞中,CUL1 的 C 末端与 NLRP3 的 PYD 结构域相互作用

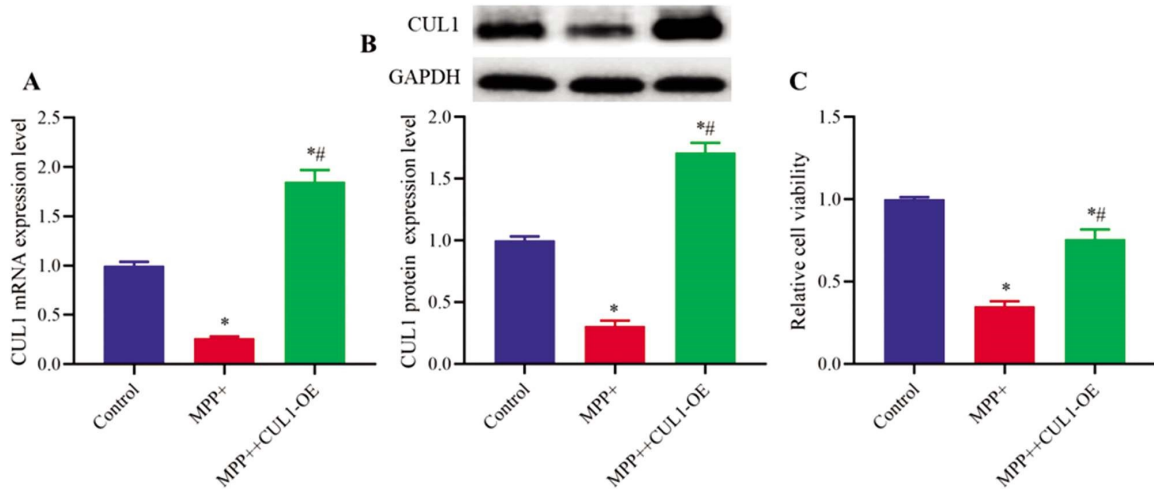


图 5 CUL1 对 MPP+ 诱导的 SH-SY5Y 细胞增殖的影响

Fig.5 Effect of CUL1 on the proliferation of SH-SY5Y cells induced by MPP+

Note: A and B: CUL1 mRNA and protein relative expression levels of SH-SY5Y cells in different treatment groups; C: Relative cell viability of SH-SY5Y cells in different treatment groups; Compared with Control group, * $P < 0.05$; Compared with MPP+ group, # $P < 0.05$.

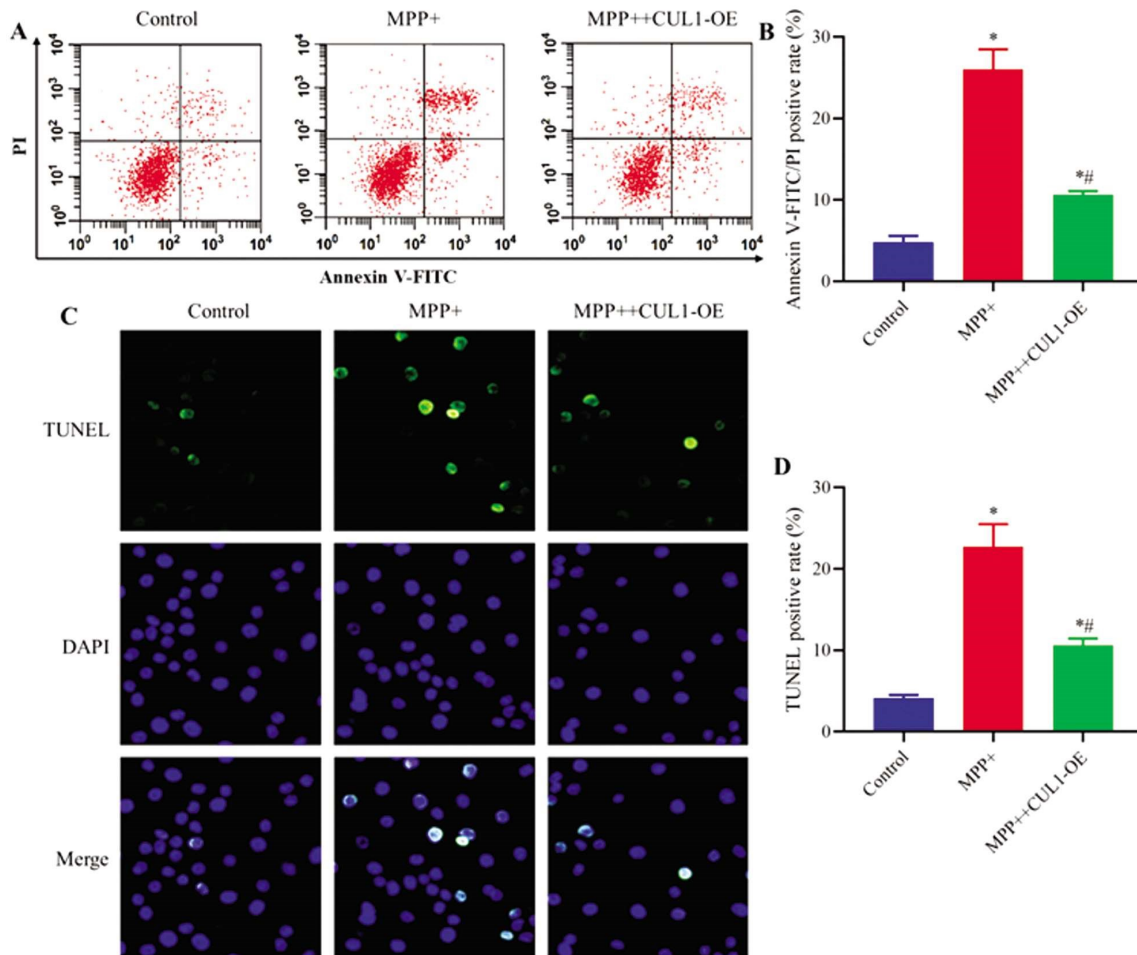


图 6 CUL1 对 MPP+ 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

Fig.6 Effect of CUL1 on apoptosis of SH-SY5Y cells induced by MPP+

Note: A and B: Typical flow cytometry and Annexin V-FITC/PI positive rate of SH-SY5Y cells in different treatment groups; C and D: TUNEL staining pattern ($\times 400$) and TUNEL positive rate of SH-SY5Y cells in different treatment groups; Compared with Control group, * $P < 0.05$; Compared with MPP+ group, # $P < 0.05$.

用,通过与 ASC 竞争破坏炎症体的组装,从而抑制 NLRP3 炎症体的激活。在炎症刺激下,CUL1 与 NLRP3 分离,释放对 NLRP3 炎症体的抑制^[14]。本研究结果表明下调 CUL1 导致

NLRP3 炎症体通路被激活,而上调 CUL1 则抑制了 NLRP3 炎症体通路的激活,提示 CUL1 负性调控 NLRP3 炎症体通路的激活。

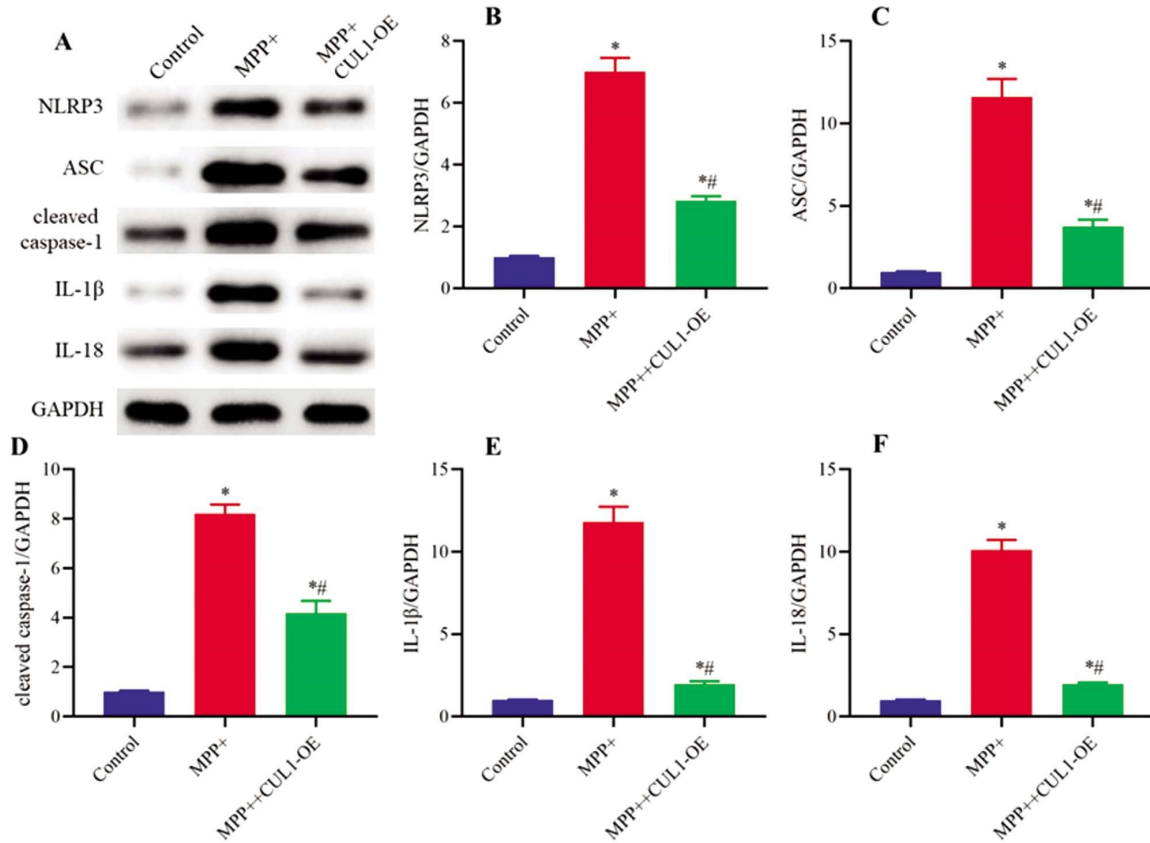


图 7 CUL1 对 MPP+ 诱导的 SH-SY5Y 细胞 NLRP3 炎症体通路的影响

Fig.7 The effect of CUL1 on the NLRP3 inflammatory pathway in SH-SY5Y cells induced by MPP+

Note: A: Results of Western blot; B-F: Relative expression levels of NLRP3, ASC, cleaved caspase-1, IL-1β, and IL-18 in SH-SY5Y cells in different treatment groups; Compared with Control group, * $P < 0.05$; Compared with MPP+ group, ## $P < 0.05$.

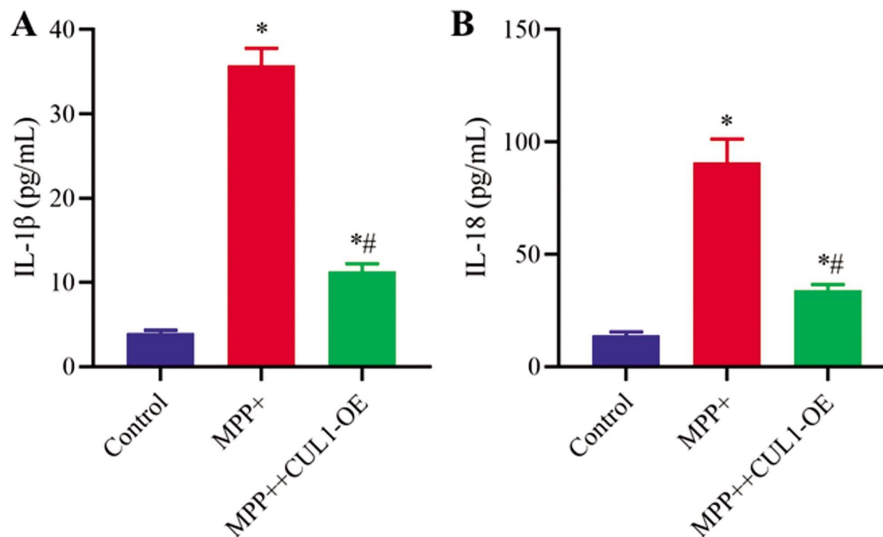


图 8 CUL1 对 MPP+ 诱导的 SH-SY5Y 细胞培养上清液中 IL-1β 和 IL-18 水平的影响

Fig.8 Effect of CUL1 on IL-1β and IL-18 levels in MPP+ -induced SH-SY5Y cell culture medium

Note: A: IL-1β level; B: IL-18 level; Compared with Control group, * $P < 0.05$; Compared with MPP+ group, ## $P < 0.05$.

MPP+ 诱导体外培养的 SH-SY5Y 细胞是公认的 PD 体外细胞模型^[17,18]。为了考察 CUL1 在 PD 发生发展中的作用及机制,本研究进一步建立了 MPP+ 诱导的 SH-SY5Y 细胞模型。结果显示 MPP+ 处理可减少 SH-SY5Y 细胞中 CUL1 的转录和表达,并抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡。研究表明 PD 患者的多巴胺神经元丢失部位的 NLRP3 炎症体明显激活^[22]。在 PD 小鼠

模型中,敲除 NLRP3 可以抑制 PD 的进展^[23,24]。在 PD 中,NLRP3 炎症体的激活促进了炎症细胞因子 IL-1β 和 IL-18 的分泌,并诱导细胞焦亡^[21]。本研究结果显示 MPP+ 处理激活 SH-SY5Y 细胞中的 NLRP3 炎症体通路,过表达 CUL1 促进了 MPP+ 诱导的 SH-SY5Y 细胞的增殖,抑制了细胞凋亡和 NLRP3 炎症体通路,表明 CUL1 的表达缺失可能通过激活 NLRP3

炎症体通路参与了 PD 的发生发展。其原因可能是在正常状态下, CUL1 与 NLRP3 相互作用来破坏 NLRP3 炎症体的组装, 从而抑制 NLRP3 炎症体的激活。然而, 在 PD 进展过程中, CUL1 表达缺失并引起 CUL1 与 NLRP3 的解离, 从而解除了 CUL1 对 NLRP3 炎症体组装的抑制, 导致 NLRP3 炎症体激活。

综上所述, 本研究表明 CUL1 可能通过抑制 NLRP3 炎症体活化促进 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞存活, CUL1 基因可能作为 PD 的潜在治疗靶点。

参考文献(References)

- [1] Mustapha M, Mat Taib CN. MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease: A promising direction of therapeutic strategies [J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2021, 21(4): 422-433.
- [2] Subramaniam SR, Chesselet MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease [J]. *Prog Neurobiol*, 2013, 106-107: 17-32.
- [3] Liu J, Liu W, Yang H. Balancing apoptosis and autophagy for Parkinson's disease therapy: targeting BCL-2 [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10(2): 792-802.
- [4] Finley D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome [J]. *Annu Rev Biochem*, 2009, 78: 477-513.
- [5] Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction [J]. *Physiol Rev*, 2002, 82(2): 373-428.
- [6] Mandel SA, Fishman-Jacob T, Youdim MB. Modeling sporadic Parkinson's disease by silencing the ubiquitin E3 ligase component, SKP1A[J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2009, 15 Suppl 3: S148-151.
- [7] Mandel SA, Fishman-Jacob T, Youdim MB. Targeting SKP1, an ubiquitin E3 ligase component found decreased in sporadic Parkinson's disease[J]. *Neurodegener Dis*, 2012, 10(1-4): 220-223.
- [8] Wong JJ, Li S, Lim EK, et al. A Cullin1-based SCF E3 ubiquitin ligase targets the InR/PI3K/TOR pathway to regulate neuronal pruning[J]. *PLoS Biol*, 2013, 11(9): e1001657.
- [9] Dealy MJ, Nguyen KV, Lo J, et al. Loss of Cull1 results in early embryonic lethality and dysregulation of cyclin E [J]. *Nat Genet*, 1999, 23(2): 245-248.
- [10] Huang YF, Zhang Z, Zhang M, et al. CUL1 promotes breast cancer metastasis through regulating EZH2-induced the autocrine expression of the cytokines CXCL8 and IL11[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 10(1): 2.
- [11] Wang H, Lu Y, Wang M, et al. Roles of E3 ubiquitin ligases in gastric cancer carcinogenesis and their effects on cisplatin resistance [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2021, 99(2): 193-212.
- [12] Jin C, Flavell RA. Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation[J]. *J Clin Immunol*, 2010, 30(5): 628-631.
- [13] von Herrmann KM, Salas LA, Martinez EM, et al. NLRP3 expression in mesencephalic neurons and characterization of a rare NLRP3 polymorphism associated with decreased risk of Parkinson's disease [J]. *NPJ Parkinsons Dis*, 2018, 4: 24.
- [14] Wan P, Zhang Q, Liu W, et al. Cullin1 binds and promotes NLRP3 ubiquitination to repress systematic inflammasome activation [J]. *Faseb j*, 2019, 33(4): 5793-5807.
- [15] 陈光乐. 帕金森病相关基因的筛选及生物信息学分析 [D]. 广州: 南方医科大学, 2015.
- [16] 陈光乐, 郑文岭, 马文丽. LRRK2 基因 G2019S 突变帕金森病相关基因的生物信息学分析[J]. *解剖学报*, 2015, 46(3): 304-309.
- [17] Kurnik-Lucka M, Latacz G, Goryl J, et al. Salsolinol protects SH-SY5Y Cells Against MPP⁺ damage and increases enteric S100-immunoreactivity in wistar rats [J]. *Neurochem Res*, 2023, 48(5): 1347-1359.
- [18] Zhu S, Xu N, Han Y, et al. MTERF3 contributes to MPP⁺-induced mitochondrial dysfunction in SH-SY5Y cells [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2022, 54(8): 1113-1121.
- [19] Xicoy H, Wieringa B, Martens GJ. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review [J]. *Mol Neurodegener*, 2017, 12(1): 10.
- [20] Xie HR, Hu LS, Li GY. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2010, 123(8): 1086-1092.
- [21] Wang S, Yuan YH, Chen NH, et al. The mechanisms of NLRP3 inflammasome/pyroptosis activation and their role in Parkinson's disease[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 67: 458-464.
- [22] Gordon R, Albornoz EA, Christie DC, et al. Inflammasome inhibition prevents α -synuclein pathology and dopaminergic neurodegeneration in mice[J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(465): eaah4066.
- [23] 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.
- [24] 程芯育, 钟海凤, 王俊锋, 等. 含 pyrin 结构域核苷酸结合寡聚结构域样受体家族 3(NLRP3)炎症体与帕金森病关系的研究进展[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2020, 36(6): 565-568.