

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.09.007
文章编号: 1005-8982 (2023) 09-0041-10

实验研究·论著

乳铁蛋白对MPP⁺诱导的帕金森病细胞模型 炎症损伤的保护作用及机制研究*

汪晓语¹, 单树方¹, 吕嘉琦¹, 赵儒花¹, 周嗣全¹, 成果¹, 张伶俐², 张林¹

(1. 四川大学华西第二医院西部妇幼医学研究院 出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室, 四川 成都 610041; 2. 四川大学华西第二医院药学部, 四川 成都 610041)

摘要: **目的** 探讨外源性乳铁蛋白对1-甲基-4-苯基吡啶(MPP⁺)诱导的小鼠神经母细胞瘤N2a细胞帕金森病(PD)模型炎症损伤的保护作用及其机制。**方法** 以250 μmol/L的MPP⁺诱导N2a细胞损伤构建PD细胞模型, 将模型随机分为对照组、乳铁蛋白组、MPP⁺组和乳铁蛋白+MPP⁺组。采用CCK-8法检测细胞存活率; Annexin FITC/PI双染法检测细胞凋亡率; Hoechst33342染色检测细胞早期凋亡情况; 检测各组的谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性和丙二醛(MDA)水平; 采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测细胞IL-4、IL-6、IL-13、IL-1β、TNF-α mRNA的表达; Western blotting检测不同浓度MPP⁺(0、100、250、500、1 000 μmol/L) N2a细胞的酪氨酸羟化酶(TH)和多巴胺转运体(DAT)蛋白的表达, 检测各组的Bcl-2、Bax、Caspase-3、Cleaved Caspase-3、p38、p-p38、JNK、p-JNK、ERK、p-ERK蛋白的表达。**结果** MPP⁺组细胞凋亡率较对照组上升($P < 0.05$), 乳铁蛋白+MPP⁺组细胞凋亡率较MPP⁺组下降($P < 0.05$); MPP⁺组细胞核亮染阳性数目较对照组增加($P < 0.05$), 而乳铁蛋白+MPP⁺组亮染阳性数目较MPP⁺组减少($P < 0.05$); 与对照组比较, MPP⁺组Bax蛋白相对表达量升高($P < 0.05$), Bcl-2蛋白相对表达量减少($P < 0.05$), Cleaved Caspase-3/Caspase-3相对表达量升高($P < 0.05$); 与MPP⁺组比较, 乳铁蛋白+MPP⁺组Bax蛋白相对表达量降低($P < 0.05$), Bcl-2蛋白相对表达量升高($P < 0.05$), Cleaved Caspase-3/Caspase-3相对表达量降低($P < 0.05$)。与MPP⁺组比较, 乳铁蛋白+MPP⁺组TH和DAT蛋白相对表达量升高($P < 0.05$), GSH-Px活性升高, MDA水平下降($P < 0.05$)。与MPP⁺组比较, 乳铁蛋白+MPP⁺组促炎因子IL-6、IL-1β、TNF-α mRNA相对表达量降低, 抑炎因子IL-4、IL-13 mRNA相对表达量升高($P < 0.05$)。与对照组比较, MPP⁺组p-p38、p-JNK和p-ERK蛋白相对表达量升高, p-p38/p38、p-JNK/JNK、p-ERK/ERK比值增加($P < 0.05$); 与MPP⁺组比较, 乳铁蛋白+MPP⁺组p-p38、p-JNK和p-ERK蛋白相对表达量降低, p-p38/p38、p-JNK/JNK、p-ERK/ERK比值降低($P < 0.05$)。**结论** 乳铁蛋白可能抑制MAPKs信号通路的活化, 以及该通路活化所诱导的炎症反应, 从而改善MPP⁺所致N2a细胞的炎症损伤。

关键词: 帕金森病; 乳铁蛋白; 1-甲基-4-苯基吡啶; 炎症损伤

中图分类号: R742.5

文献标识码: A

Ameliorative effect of lactoferrin on inflammatory injury in MPP⁺ induced cell model for Parkinson's disease and its mechanism*

Wang Xiao-yu¹, Shan Shu-fang¹, Lü Jia-qi¹, Zhao Ru-hua¹, Zhou Si-quan¹,
Cheng Guo¹, Zhang Ling-li², Zhang Lin¹

[1. Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children (Sichuan University),
Ministry of Education, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan

收稿日期: 2022-08-18

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No: 82173512); 国家重点研发计划(No: 2020YFC2006300); 四川省科技厅应用基础项目(No: 2021YJ0156)

[通信作者] 成果, E-mail: gcheng@scu.edu.cn

610041, China; 2. Department of Pharmacy, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China]

Abstract: Objective To investigate the ameliorative impact and explore the underlying mechanism of exogenous lactoferrin (Lf) on inflammatory injury in the N2a cell model for Parkinson's disease (PD) induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺). **Methods** N2a cell model for PD was established with 250 μmol/L MPP⁺. Cells were treated with medium (control group), Lf (Lf group), MPP⁺ (model group) as well as Lf and MPP⁺ (Lf pretreatment group). The cell survival rate and apoptosis rate were assessed by cell counting kit-8 (CCK-8) method and Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC)/ Propidium Iodide (PI) double staining, respectively. Hoechst33342 staining was used to examine early apoptosis of cells. Glutathione peroxidase (GSH-Px) activity and malondialdehyde (MDA) level were assessed using detection kits. Meanwhile, the mRNA and protein expression of inflammatory cytokines were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blotting. **Results** Lf pretreatment reduced the apoptosis rate ($P < 0.05$) and nuclear damage rate ($P < 0.05$), up-regulated Bcl-2 protein expression ($P < 0.05$), down-regulated Bax protein ($P < 0.05$), and activated Caspase-3 expression ($P < 0.05$) of N2a cells induced by MPP⁺. Compared with model group, the expressions of tyrosine hydroxylase (TH) and dopamine transporter (DAT) protein and GSH-Px activity in Lf pretreatment group were up-regulated ($P < 0.05$), but MDA level was decreased ($P < 0.05$). Compared to model group, cells in Lf pretreatment group had decreased mRNA expression levels of proinflammatory cytokines IL-6, IL-1β, and TNF-α, and increased mRNA expressions of anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-13 ($P < 0.05$). The phosphorylation levels of p38, c-JNK N-terminal kinase (JNK), and extracellular signal-regulated kinase (ERK) in Lf pretreatment group were lower than that in model group ($P < 0.05$). **Conclusions** Lf may ameliorate the inflammatory damage to N2a cells induced by MPP⁺, through inhibiting the activation of mitogen-activated protein kinase (MAPKs) signaling pathway and the subsequent inflammatory response.

Keywords: Parkinson's disease; lactoferrin; 1-methyl-4-phenylpyridinium; inflammatory injury

帕金森病 (Parkinson disease, PD) 是一种常见的神经退行性疾病, 以多巴胺能神经元坏死、多巴胺神经递质减少和 α-突触核蛋白错误折叠并聚集为主要病理特征, 导致静止性震颤、姿势平衡障碍和自主神经功能障碍等临床症状^[1]。随着我国人口老龄化的加剧和人均寿命的延长, PD 发病率逐年升高。随着 PD 的进展, 患者的神经和运动症状进行性加重, 致残率较高, 严重降低患者的生存质量, 由此带来的社会和医疗压力伴随我国人口老龄化加剧而不断递增^[2]。PD 的病因和发病机制复杂, 有研究表明, 持续性炎症反应介导的细胞凋亡和突触丢失是导致多巴胺能神经元退行性病变的主要诱因之一, 一些控制炎症基因表达的细胞内信号通路可能成为 PD 预防和临床治疗的靶点^[3]。

乳铁蛋白是一种非血红素铁结合糖蛋白, 在人和牛乳汁中含量丰富, 具有抑菌和杀菌作用, 可促进铁吸收, 刺激细胞增殖和分化, 是哺乳动物先天免疫系统的重要组成部分^[4]。有研究表明^[5], 乳铁蛋白可能作为一种抗炎神经保护剂在多种神经退行性疾病中发挥作用, 其 80 kD 的分子量可穿

过血脑屏障。有研究显示, PD 患者大脑多巴胺能神经元内乳铁蛋白和炎症因子水平均较高^[6]; 动物实验表明, 外源性补充乳铁蛋白能够改善 PD 小鼠模型的运动症状, 并有效缓解小鼠的认知和感觉障碍^[7]。据此推测, 乳铁蛋白的抗炎和免疫调节活性可能参与 PD 神经元炎症损伤的保护机制。

本研究利用神经毒素 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶 (MPTP) 活性代谢产物 1-甲基-4-苯基吡啶 (MPP⁺) 构建 PD 细胞模型^[8], 旨在观察乳铁蛋白对该 PD 细胞模型炎症损伤的神经保护作用, 并探讨其相关机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株和试剂

小鼠神经母细胞瘤 N2a 细胞购自中国科学院上海细胞库。乳铁蛋白和 MPP⁺ 购自美国 Sigma Aldrich 公司, MEM 培养基、PBS、0.25% 胰酶和青-链霉素双抗、胎牛血清购自美国 Thermo Scientific 公司, CCK-8 试剂盒购自美国 Med Chem Express 公司, RIPA 细胞裂解液和 ECL 显影液购自中国碧云天生

物技术有限公司, Tris、甘氨酸、SDS购自德国Biofrox公司, PAGE凝胶制备试剂盒、无蛋白快速封闭液购自上海雅酶生物医药科技有限公司, 蛋白Marker购自美国Thermo Scientific公司, TBS、BCA检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司, 细胞总RNA提取及逆转录试剂盒购自成都福际生物技术有限公司, SYBR Green supermix试剂盒购自日本QIAGEN公司, AnnexinV-FITC凋亡检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司, 抗体JNK、p-JNK、ERK、p-ERK、 β -actin、酪氨酸羟化酶(TH)、二抗购自江苏亲科生物研究中心有限公司, Bcl-2、Bax、Caspase-3、Cleaved Caspase-3购自美国Cell Signaling Technology公司, p38和p-p38购自杭州华安生物技术有限公司, 多巴胺转运体(DAT)购自英国Abcam公司。

1.2 仪器

恒温二氧化碳细胞培养箱、化学发光成像系统、核酸蛋白检测仪及多功能酶标仪购自美国Thermo Scientific公司, 台式高速冷冻离心机购自德国Eppendorf公司, 实时荧光定量PCR仪、Western blotting高电流电泳仪购自美国Bio-Rad公司, 倒置显微镜、倒置荧光显微镜购自日本Nikon公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 N2a细胞采用含10%胎牛血清和1%双抗的MEM培养基, 置于5%二氧化碳、37℃恒温培养箱中培养。

1.3.2 CCK-8检测细胞活力 为构建PD细胞模型, 首先按照浓度梯度0、100、250、500、1 000、2 500、5 000、8 000 $\mu\text{mol/L}$ 的MPP⁺分别处理N2a细胞12、24、48和72 h。将生长状态良好的N2a细胞接种于96孔板中, 细胞密度为 5×10^3 个/孔, 每组设置6个重复孔, 待细胞贴壁后按照浓度梯度的MPP⁺ 0、100、250、500、1 000、2 500、5 000、8 000 $\mu\text{mol/L}$ 或乳铁蛋白0、2.5、5.0、10、20、40、80、160、320、640 $\mu\text{g/mL}$ 进行干预。干预时间达到后去除原有培养基, 每孔按照CCK-8与培养基1:9的体积比加入混合溶液, 避光孵育2 h后于450 nm波长处测定各孔吸光度值。

1.3.3 实验分组 本实验根据CCK-8结果筛选药物最佳干预浓度。实验设计共分4组: ①对照组, 正常培养基培养, 不予任何干预处理; ②乳铁蛋

白组, 以40 $\mu\text{g/mL}$ 的乳铁蛋白处理N2a细胞24 h; ③MPP⁺组, 以250 $\mu\text{mol/L}$ 的MPP⁺处理N2a细胞24 h; ④乳铁蛋白+MPP⁺组(乳铁蛋白预处理), 以40 $\mu\text{g/mL}$ 的乳铁蛋白预处理N2a细胞24 h后, 再加用250 $\mu\text{mol/L}$ 的MPP⁺继续处理24 h。

1.3.4 流式细胞术检测细胞凋亡 胰酶消化并收集经干预处理后的对照组、乳铁蛋白组、MPP⁺组、乳铁蛋白+MPP⁺组细胞, 按照Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒说明书进行操作, 流式细胞仪检测细胞凋亡, 并计算细胞凋亡率, 每个样本重复3次。

1.3.5 Hoechst33342染色 取对数生长期细胞接种于6孔板, 细胞贴壁后给予相应处理, 每孔加入1 mL Hoechst 33342染色液于室温孵育30 min, 倒置荧光显微镜下观察, 每孔随机各选择3个视野拍照保存。

1.3.6 细胞内GSH-Px活性及MDA水平检测 取对数生长期细胞接种于6孔板中培养过夜, 对照组、乳铁蛋白组、MPP⁺组、乳铁蛋白+MPP⁺组经药物处理后, 按照试剂盒说明书操作, 分别于酶标仪340 nm和532 nm波长处检测并计算谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性及丙二醛(MDA)水平。

1.3.7 qRT-PCR检测IL-4、IL-6、IL-13、IL-1 β 、TNF- α 的mRNA相对表达量 对照组、乳铁蛋白组、MPP⁺组、乳铁蛋白+MPP⁺组细胞提取总RNA, 测定其浓度后, 将其逆转录为cDNA, 反应条件: 37℃、15 min、85℃、5 s, cDNA稀释5~10倍后进行PCR扩增, 扩增条件: 95℃预变性2 min、95℃变性5 s、60℃退火10 s, 共40个循环。以GAPDH为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算IL-4、IL-6、IL-13、IL-1 β 、TNF- α mRNA相对表达量, 每个样本重复检测3次。引物序列见表1。

1.3.8 Western blotting检测相关蛋白表达 取对数生长期细胞接种于6孔板, 各组经药物干预后提取总蛋白并测定其浓度, 以每组40 μg 的蛋白上样量进行SDS-PAGE电泳, 电泳后将蛋白转移到PVDF膜上, 室温封闭1 h; 4℃过夜孵育一抗(1:1 000), 次日室温孵育二抗(1:3 000)1 h, 采用ECL发光液于化学发光成像系统进行显影曝光, 采用Image J软件计算灰度值。Western blotting检测0、100、250、500、1 000 $\mu\text{mol/L}$ MPP⁺ N2a细胞的TH和DAT蛋白相对表达量, β -actin为内参; Western blotting

表 1 引物序列

基因	引物序列	长度/ bp
IL-4	正向: 5'-AGTTGTCATCCTGCTCTTCTTTCTC-3'	25
	反向: 5'-CGACTAATCCATTTGCATGATG-3'	22
IL-6	正向: 5'-TAGTCCTTCTACCCGAATTTC-3'	23
	反向: 5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3'	21
IL-13	正向: 5'-AGCATGGTATGGAGTGTGGACCTG-3'	24
	反向: 5'-CAGTTGCTTTGTGTAGCTGAGCAG-3'	24
IL-1β	正向: 5'-GCAACTGTTCTGAACCTCAACT-3'	22
	反向: 5'-ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT-3'	21
TNF-α	正向: 5'-CCCTCACACTCAGATCATCTTCT-3'	23
	反向: 5'-GCTACGACGTGGCTACAG-3'	19
GAPDH	正向: 5'-GGATTGCTCGTATTGGG-3'	18
	反向: 5'-TCGCTCTGGAAGATGG-3'	17

检测各组 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Cleaved Caspase-3、p38、p-p38、JNK、p-JNK、ERK、p-ERK 蛋白相对表达量，β-actin 为内参。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 25.0、GraphPad 8 和 Photoshop CC 2018 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，比较用方差分析，两两比较用 SNK-*t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MPP⁺对 N2a 细胞存活率的影响

CCK-8 结果显示 (见图 1)，随着 MPP⁺ 干预浓度及干预时间的增加，N2a 细胞存活率逐渐降低，不同浓度 MPP⁺ 干预 24 h 时，其存活率平稳下降，并且浓度为 2 500 μmol/L 时，N2a 细胞存活率仍大于 50%。表明干预 24 h MPP⁺ 对 N2a 细胞的活力影响最平稳，不会导致细胞产生急性毒性。因此，本研究采用 MPP⁺ 构建 PD 细胞模型时间为 24 h。

2.2 MPP⁺对 PD 相关蛋白表达的影响

不同浓度 MPP⁺ N2a 细胞的 TH 和 DAT 蛋白相对表达量比较，差异有统计学意义 (P < 0.05)，TH 和 DAT 蛋白相对表达量随 MPP⁺ 浓度的增加呈剂量依赖性降低，且各不同浓度与 0 μmol/L 比较，差异有统计学意义 (P < 0.05) (见表 2 和图 2)。当 MPP⁺ 浓度为 250 μmol/L 时，细胞存活率达 80% 左右，且 TH 和 DAT 蛋白表达量显著降低。因此，本研究选择浓度为 250 μmol/L 的 MPP⁺ 进行后续实验。

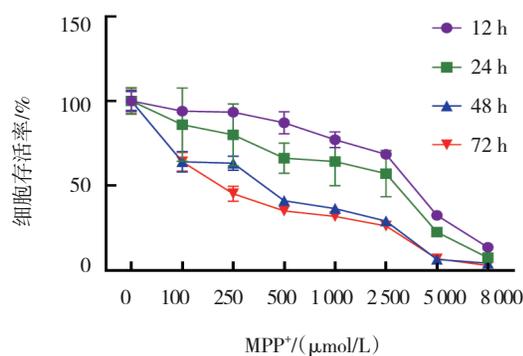
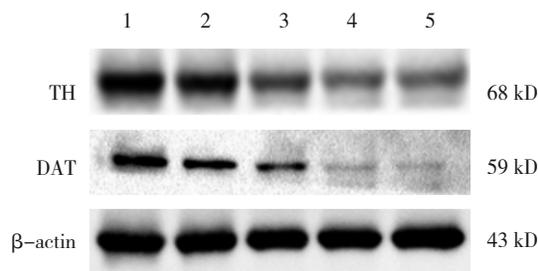


图 1 不同浓度 MPP⁺对 N2a 细胞存活率的影响

表 2 不同浓度 MPP⁺ N2a 细胞的 TH 和 DAT 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TH 蛋白	DAT 蛋白
MPP ⁺ 0 μmol/L	0.89 ± 0.08	0.87 ± 0.05
MPP ⁺ 100 μmol/L	0.72 ± 0.04 [†]	0.82 ± 0.03 [†]
MPP ⁺ 250 μmol/L	0.69 ± 0.04 [†]	0.71 ± 0.04 [†]
MPP ⁺ 500 μmol/L	0.56 ± 0.03 [†]	0.53 ± 0.09 [†]
MPP ⁺ 1 000 μmol/L	0.48 ± 0.02 [†]	0.49 ± 0.02 [†]
F 值	43.420	42.890
P 值	0.000	0.000

注：† 与 MPP⁺ 0 μmol/L 比较，P < 0.05。



1: MPP⁺ 0 μmol/L; 2: MPP⁺ 100 μmol/L; 3: MPP⁺ 250 μmol/L; 4: MPP⁺ 500 μmol/L; 5: MPP⁺ 1 000 μmol/L。

图 2 不同浓度 MPP⁺ N2a 细胞 TH 和 DAT 蛋白的表达

2.3 乳铁蛋白对 PD 细胞模型细胞活力的影响

当干预时间为 6 和 12 h 时，细胞活力随乳铁蛋白浓度增加而呈现平直波动或缓慢下降趋势，但较 0 μg/mL 差异无统计学意义 (P > 0.05)。当干预时间为 72 h 时，细胞活力随乳铁蛋白浓度增加而呈现逐渐下降趋势 (P < 0.05) (见图 3A)。当干预时间为 24 和 48 h 时，随着乳铁蛋白干预浓度的增加，细胞活力呈现出先上升后下降的趋势，且这种趋势在干预时间为 24 h 时更加明显 (P < 0.05)，提示乳铁蛋白对细胞活力的最佳作用时间为 24 h。

为进一步明确乳铁蛋白对PD细胞模型的最佳干预浓度,预先使用乳铁蛋白干预24 h后再使用250 μmol/L的MPP⁺继续处理24 h,结果表明,随着乳铁蛋白干预浓度的增加,细胞活力先升高后降低,在乳铁蛋白干预浓度为40 μg/mL时细胞活力达最佳,且与0 μg/mL比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)(见图3B)。因此,本研究选用40 μg/mL的乳铁蛋白预先干预24 h,再使用250 μmol/L的MPP⁺继续处理24 h,作为后续研究的药物干预手段。

2.4 乳铁蛋白对PD模型细胞凋亡的影响

2.4.1 乳铁蛋白对细胞凋亡的影响 对照组、乳铁蛋白组、MPP⁺组、乳铁蛋白+MPP⁺组的N2a细胞凋亡率分别为(6.4 ± 0.18)%、(5.4 ± 0.12)%、(16.1 ± 0.29)%、(9.8 ± 0.34)% , 4组比较,经方差分析,差异有统计学意义($F = 1521.98, P = 0.000$);进一步两两比较结果:对照组和乳铁蛋白组细胞凋亡率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),MPP⁺组细胞凋亡率较对照组上升($P < 0.05$),乳铁蛋白+MPP⁺组细胞凋亡率较MPP⁺组下降($P < 0.05$)。见图4。

2.4.2 乳铁蛋白对细胞核的影响 Hoechst33342核染色结果显示,对照组和乳铁蛋白组细胞核亮染阳性数目基本一致,均呈现微弱均匀的蓝色荧光;MPP⁺组细胞核呈致密蓝色亮染;而乳铁蛋白+MPP⁺组细胞核破碎和染色质聚集程度改善(见图5)。对照组、乳铁蛋白组、MPP⁺组、乳铁蛋白+MPP⁺组

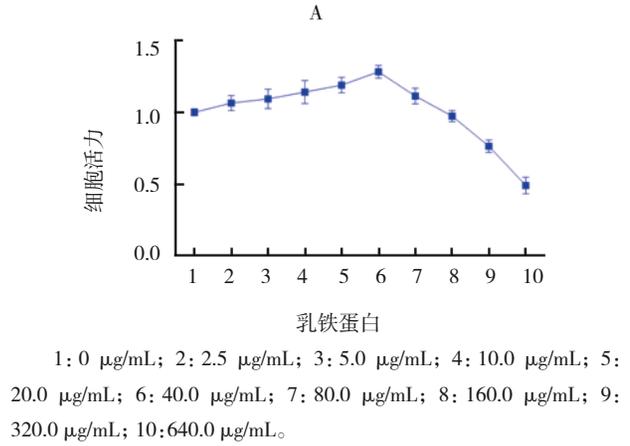
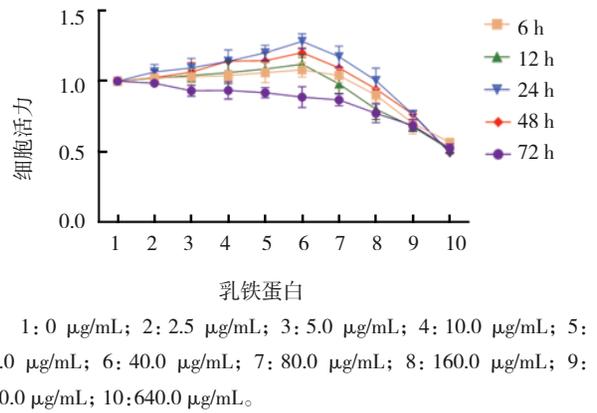


图3 不同浓度乳铁蛋白处理不同时间后对细胞活力的影响

N2a细胞核的亮染阳性数目分别为(3.05 ± 0.70)、(3.67 ± 1.08)、(15.67 ± 1.47)、(7.67 ± 1.08)个,4组比较,经方差分析,差异有统计学意义($P <$

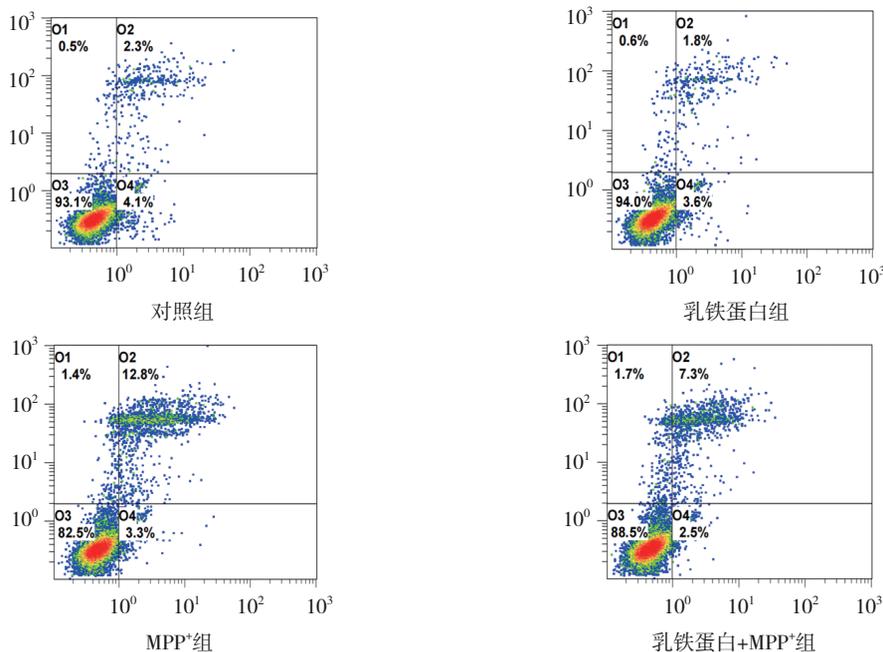


图4 各组N2a细胞凋亡的流式细胞图

0.05)。进一步两两比较结果：对照组和乳铁蛋白组细胞核亮染阳性数目比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，MPP⁺组细胞核亮染阳性数目较对照组增加 ($P < 0.05$)，而乳铁蛋白+MPP⁺组亮染阳性数目较MPP⁺组减少 ($P < 0.05$)。

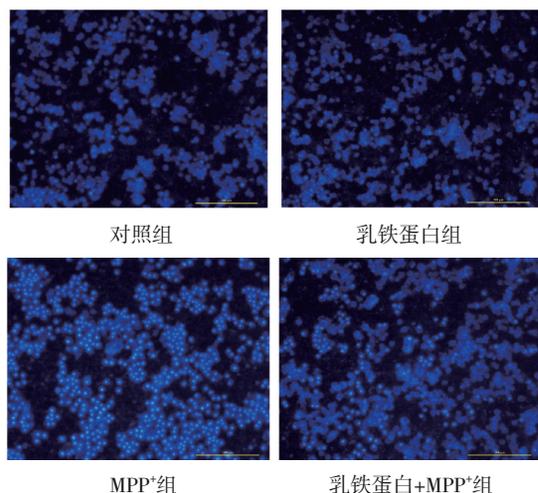


图5 各组Hoechst33342核染色结果 (×100)

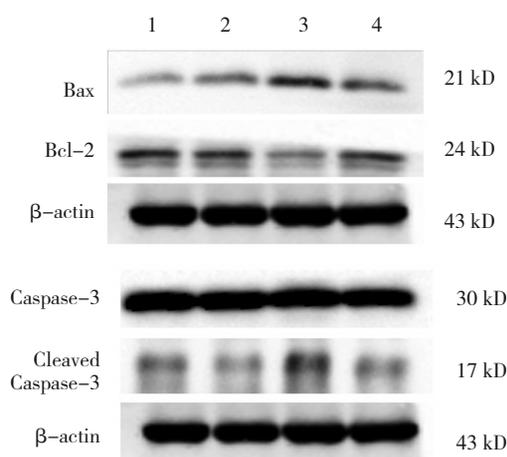
2.4.3 乳铁蛋白对凋亡相关蛋白表达的影响 对照组、乳铁蛋白组、MPP⁺组、乳铁蛋白+MPP⁺组 Bax、Bcl-2、Cleaved Caspase-3/Caspase-3 蛋白相对表达量比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果：与对照组比较，MPP⁺组 Bax 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$)，Bcl-2 蛋白相对表达量减少 ($P < 0.05$)，Cleaved Caspase-3/Caspase-3 相对表达量升高 ($P < 0.05$)；与 MPP⁺组比较，乳铁蛋白+MPP⁺组 Bax 蛋白相对表达量降低 ($P < 0.05$)，Bcl-2 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$)，Cleaved Caspase-3/Caspase-3 相对表达量降低 ($P < 0.05$)。见图6和表3。

2.5 乳铁蛋白对PD细胞模型TH和DAT蛋白表达的影响

对照组、乳铁蛋白组、MPP⁺组、乳铁蛋白+MPP⁺组 TH 和 DAT 蛋白相对表达量比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果：与对照组比较，MPP⁺组 TH 和 DAT 蛋白相对表达量下降 ($P < 0.05$)；与 MPP⁺组比较，乳铁蛋白+MPP⁺组 TH 和 DAT 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$)。见图7和表4。

2.6 乳铁蛋白对PD细胞模型氧化应激水平的影响

对照组、乳铁蛋白组、MPP⁺组、乳铁蛋白



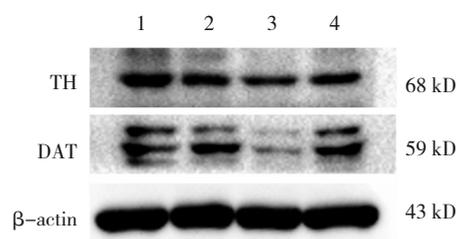
1:对照组; 2:乳铁蛋白组; 3:MPP⁺组; 4:乳铁蛋白+MPP⁺组。

图6 各组Bax、Bcl-2、Cleaved Caspase-3/Caspase-3蛋白的表达

表3 各组Bax、Bcl-2、Cleaved Caspase-3/Caspase-3蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bax 蛋白	Bcl-2 蛋白	Cleaved Caspase-3/Caspase-3
对照组	0.31 ± 0.01	0.87 ± 0.04	0.78 ± 0.03
乳铁蛋白组	0.42 ± 0.02	0.81 ± 0.09	0.74 ± 0.02
MPP ⁺ 组	1.03 ± 0.01 ^①	0.55 ± 0.06 ^①	1.13 ± 0.02 ^①
乳铁蛋白+MPP ⁺ 组	0.79 ± 0.01 ^②	0.85 ± 0.05 ^②	0.68 ± 0.06 ^②
F 值	3620.190	24.040	142.193
P 值	0.000	0.000	0.000

注：①与对照组比较， $P < 0.05$ ；②与MPP⁺组比较， $P < 0.05$ 。



1:对照组; 2:乳铁蛋白组; 3:MPP⁺组; 4:乳铁蛋白+MPP⁺组。

图7 各组TH和DAT蛋白的表达

+MPP⁺组 N2a 细胞 GSH-Px 活性、MDA 水平比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果：与对照组比较，MPP⁺组 GSH-Px 活性降低，MDA 水平升高 ($P < 0.05$)；与 MPP⁺组比较，乳铁蛋白+MPP⁺组 GSH-Px 活性升高，MDA 水平降低 ($P < 0.05$)。见表5。

表 4 各组 TH 和 DAT 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TH 蛋白	DAT 蛋白
对照组	0.88 ± 0.01	0.67 ± 0.04
乳铁蛋白组	0.69 ± 0.03	0.64 ± 0.02
MPP ⁺ 组	0.50 ± 0.05 ^①	0.25 ± 0.01 ^①
乳铁蛋白+MPP ⁺ 组	0.62 ± 0.03 ^②	0.70 ± 0.03 ^②
F 值	90.770	243.060
P 值	0.000	0.000

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与 MPP⁺组比较, $P < 0.05$ 。

2.7 乳铁蛋白对 PD 细胞模型炎症因子的影响

对照组、乳铁蛋白组、MPP⁺组、乳铁蛋白+MPP⁺组 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-4、IL-13 mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果: 与对照组比较, MPP⁺组细胞促炎因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA 相对表达量升

表 5 各组 GSH-Px 活性、MDA 水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	GSH-Px/ mU/mg	MDA/ nmol/10 ⁴ cell
对照组	57.53 ± 4.68	0.000 7 ± 0.000 02
乳铁蛋白组	51.06 ± 0.48	0.000 4 ± 0.000 01
MPP ⁺ 组	40.56 ± 1.09 ^①	0.000 8 ± 0.000 02 ^①
乳铁蛋白+MPP ⁺ 组	59.15 ± 1.67 ^②	0.000 5 ± 0.000 01 ^②
F 值	43.680	469.390
P 值	0.000	0.000

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与 MPP⁺组比较, $P < 0.05$ 。

高 ($P < 0.05$), 抑炎因子 IL-4、IL-13 mRNA 相对表达量降低 ($P < 0.05$); 与 MPP⁺组比较, 乳铁蛋白+MPP⁺组 TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA 相对表达量降低 ($P < 0.05$), IL-4、IL-13 mRNA 相对表达量升高 ($P < 0.05$)。见表 6。

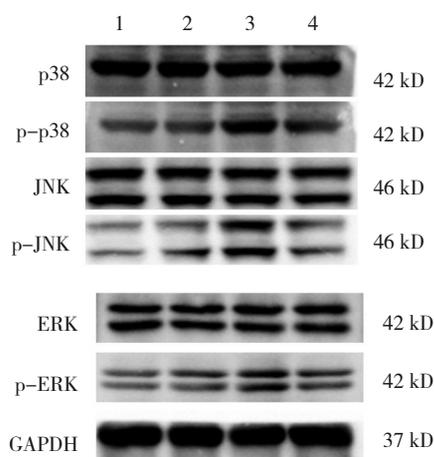
表 6 各组 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-4、IL-13 mRNA 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α mRNA	IL-6 mRNA	IL-1 β mRNA	IL-4 mRNA	IL-13 mRNA
对照组	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.01
乳铁蛋白组	0.90 ± 0.03	1.01 ± 0.05	0.88 ± 0.07	1.02 ± 0.03	1.03 ± 0.03
MPP ⁺ 组	1.29 ± 0.03 ^①	1.50 ± 0.05 ^①	1.33 ± 0.02 ^①	0.53 ± 0.04 ^①	0.76 ± 0.02 ^①
乳铁蛋白+MPP ⁺ 组	1.09 ± 0.03 ^②	1.12 ± 0.07 ^②	1.08 ± 0.04 ^②	0.73 ± 0.03 ^②	0.96 ± 0.03 ^②
F 值	134.510	45.710	77.120	232.870	102.970
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与 MPP⁺组比较, $P < 0.05$ 。

2.8 乳铁蛋白对 PD 细胞模型 MAPKs 信号通路活化的影响

对照组、乳铁蛋白组、MPP⁺组、乳铁蛋白+MPP⁺组 p38、JNK 和 ERK 蛋白相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), p-p38、p-JNK 和 p-ERK 蛋白相对表达量, p-p38/p38、p-JNK/JNK、p-ERK/ERK 比值比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果: 与对照组比较, MPP⁺组 p-p38、p-JNK 和 p-ERK 蛋白相对表达量升高, p-p38/p38、p-JNK/JNK、p-ERK/ERK 比值显著增加 ($P < 0.05$); 与 MPP⁺组比较, 乳铁蛋白+MPP⁺组 p-p38、p-JNK 和 p-ERK 蛋白相对表达量降低, p-p38/p38、p-JNK/JNK、p-ERK/ERK 比值降低 ($P < 0.05$)。见图 8 和表 7。



1: 对照组; 2: 乳铁蛋白组; 3: MPP⁺组; 4: 乳铁蛋白+MPP⁺组。

图 8 各组 MAPKs 家族蛋白的表达

表 7 各组 MAPKs 家族蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	p38 蛋白	JNK 蛋白	ERK 蛋白	p-p38 蛋白	p-JNK 蛋白	p-ERK 蛋白	p-p38/p38 比值	p-JNK/JNK 比值	p-ERK/ERK 比值
对照组	0.61 ± 0.07	1.45 ± 0.03	1.44 ± 0.04	0.41 ± 0.03	1.72 ± 0.04	1.03 ± 0.02	0.68 ± 0.01	1.18 ± 0.01	0.72 ± 0.01
乳铁蛋白组	0.67 ± 0.09	1.49 ± 0.06	1.41 ± 0.03	0.45 ± 0.05	1.70 ± 0.05	1.06 ± 0.03	0.67 ± 0.01	1.14 ± 0.01	0.75 ± 0.02
MPP ⁺ 组	0.59 ± 0.08	1.42 ± 0.04	1.35 ± 0.07	0.69 ± 0.09 ^①	2.66 ± 0.03 ^①	1.58 ± 0.09 ^①	1.18 ± 0.01 ^①	1.88 ± 0.03 ^①	1.17 ± 0.02 ^①
乳铁蛋白+MPP ⁺ 组	0.59 ± 0.06	1.46 ± 0.03	1.37 ± 0.06	0.52 ± 0.05 ^②	1.86 ± 0.03 ^②	1.36 ± 0.04 ^②	0.89 ± 0.01 ^②	1.27 ± 0.02 ^②	0.99 ± 0.04 ^②
F 值	1.020	2.430	2.060	14.720	395.550	83.070	2 055.780	1 384.610	351.590
P 值	0.417	0.116	0.160	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注：①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与 MPP⁺组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

神经元慢性炎症损伤和免疫应答失衡在 PD 病变进展过程中发挥重要作用^[3]。乳铁蛋白是一种天然免疫调节剂, 其抗炎和免疫调节活性有助于减轻细胞炎症损伤和维持细胞内环境稳态^[9]。乳铁蛋白介导的抗炎活性一方面可归因于其表面正电荷能够中和细胞表面的负电基团, 从而激活细胞生理抗炎反应信号通路^[10]; 另一方面, 乳铁蛋白的铁螯合作用可能通过减轻细胞内铁介导的自由基损伤从而发挥抗炎的免疫调节作用^[11-12]。有证据表明, PD 患者大脑炎症病变区域存在乳铁蛋白聚集现象, 其多巴胺能神经元中乳铁蛋白水平则更高^[13]; LIU 等^[14]研究表明, 乳铁蛋白显著改善 MPTP 诱导的 PD 模型小鼠帕金森病样运动功能障碍, 减轻脑组织病理改变, 提示乳铁蛋白在抑制 PD 神经元炎症、缓解炎症损伤和改善神经元功能方面颇具潜力。

MPTP 是一种多巴胺能神经元特异性神经毒素, 其活性代谢产物 MPP⁺通过抑制氧化呼吸链的正常运输并诱导 ROS 生成, 导致氧化应激和慢性炎症等多种效应^[15]。N2a 细胞能够表达 TH 和 DAT 等, 具有类似多巴胺能神经元的特性, 且相较于其他细胞系对 MPP⁺所致神经毒性更加敏感^[15], 故采用 MPP⁺处理 N2a 细胞模拟 PD 模型下的细胞炎症状态。本研究选择对细胞产生明显毒性效应即细胞存活率为 80% 时对应的 MPP⁺浓度 (250 $\mu\text{mol/L}$) 和时间 (24 h) 构建 PD 细胞模型。TH 作为多巴胺合成的限速酶, 其功能缺失或表达不足直接影响多巴胺的合成与分泌^[16-17]。DAT 位于多巴胺能神经元

突触前膜, 其功能是将释放至突出间隙的多巴胺主动转运回突触前, 对维持突触的正常生理功能至关重要。本研究发现 MPP⁺可剂量依赖性地下调 TH 和 DAT 蛋白表达, 表明该模型在一定程度上可模拟 PD 损伤神经元特征。

本研究根据前期探索, 以 40 $\mu\text{g/mL}$ 乳铁蛋白干预 N2a 细胞, 预处理 24 h 后再予 250 $\mu\text{mol/L}$ 的 MPP⁺。结果表明乳铁蛋白能够缓解 MPP⁺所致 N2a 细胞凋亡率的升高, 改善染色质聚集和细胞核破碎程度, 同时上调 TH 和 DAT 蛋白表达水平, 显示乳铁蛋白对该 PD 细胞模型具有凋亡抑制和多巴胺能神经保护作用。线粒体介导细胞凋亡途径的异常激活是 PD 神经元退行性变的病理生理基础, Bcl-2/Bax 途径通过控制线粒体外膜通透性来调节细胞凋亡进程^[18-19], Caspase-3 作为凋亡关键执行因子, 其活化可诱发瀑布式凋亡级联反应, 此时细胞凋亡结局将不可逆转^[20]。Western blotting 检测结果结合流式细胞凋亡检测结果表明, MPP⁺作为凋亡刺激因素可参与 Bcl-2/Bax 通路的调节, 通过线粒体介导的凋亡途径诱导细胞凋亡; 而乳铁蛋白可能通过调节线粒体 Bcl-2/Bax 途径, 抑制 MPP⁺诱导的 N2a 细胞凋亡。

为明确乳铁蛋白的细胞保护作用是否与炎症调节有关, 本研究检测各组细胞炎症因子 mRNA 的表达, 发现 MPP⁺可显著上调促炎因子 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的基因表达, 下调抑炎因子 IL-4、IL-13 的基因表达, 从而加重 N2a 细胞炎症反应; 而乳铁蛋白预处理可明显下调 MPP⁺所致上述促炎因子的表达, 同时上调抑炎因子的表达, 表明乳铁蛋白通过参与调控多种炎症因子的基因表达从而抑制

MPP⁺所致N2a细胞炎症反应。细胞炎症反应常伴随氧化损伤加剧,这种协同效应随着疾病的进展而增强。通过对细胞内抗氧化酶GSH-Px活性及氧化应激产物MDA水平的检测,本研究发现乳铁蛋白可抑制MPP⁺诱导N2a细胞的氧化应激水平,与其抑制炎症反应的效应协同增强对PD神经元的保护作用。

丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)家族介导细胞周期、增殖、分化和衰老等细胞基本生命过程,并参与调节不同应激信号下多种炎症因子的分泌,在细胞炎症调节过程中发挥至关重要的作用^[21]。MAPKs主要包括细胞外信号调节激酶ERK、p38和c-Jun NH2末端激酶(JNK)亚家族成员,各种不良刺激因素可导致MAPKs通路激活,表现为p38、ERK和JNK的磷酸化^[22]。HU等^[23]发现乳铁蛋白通过抑制MAPKs途径维持肠上皮细胞完整性并减轻细胞氧化应激反应,从而抑制脂多糖诱导的细胞炎症。有研究表明,MAPKs激活可诱导小胶质细胞释放IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、Cox-2和iNOS等多种促炎介质^[24-25],从而促进大脑慢性神经炎症和免疫应答紊乱,是多种神经退行性疾病的重要发病机制之一。为明确乳铁蛋白对该PD细胞模型炎症因子基因表达的调控是否与MAPKs途径有关,本研究对各组MAPKs蛋白磷酸化水平进行评估,发现MPP⁺可提高p38、ERK和JNK的磷酸化水平,结合多种促炎因子转录水平上调的结果,提示MPP⁺可能激活MAPKs通路;而乳铁蛋白预处理下调MPP⁺所致p38、ERK和JNK的高磷酸化水平,同时多种促炎因子的mRNA表达降低,提示MAPKs通路可能被抑制。结果表明乳铁蛋白可能通过抑制MAPKs信号通路,以及该通路激活所致的炎症反应,从而改善MPP⁺诱导的N2a细胞炎症损伤。

综上所述,本研究通过观察乳铁蛋白对MPP⁺诱导N2a细胞凋亡、氧化应激、炎症因子表达及经典炎症信号通路MAPKs家族蛋白表达的影响,表明外源性乳铁蛋白能够减轻MPP⁺诱导的N2a细胞炎症损伤,其机制可能与下调MAPKs信号通路有关,提示乳铁蛋白具有作为营养补充剂改善PD神经元炎症损伤的潜在应用价值。

参考文献:

[1] POEWE W, SEPPI K, TANNER C M, et al. Parkinson disease[J].

Nat Rev Dis Primers, 2017, 3: 17013.

- [2] 陈方政,刘军.帕金森病的诊断[J].中华神经科杂志,2021,54(9):957-962.
- [3] PAJARES M, I ROJO A, MANDA G, et al. Inflammation in Parkinson's disease: mechanisms and therapeutic implications[J]. Cells, 2020, 9(7): 1687.
- [4] MAYEUR S, SPAHIS S, POULIOT Y, et al. Lactoferrin, a pleiotropic protein in health and disease[J]. Antioxid Redox Signal, 2016, 24(14): 813-836.
- [5] 陈镜羽,单毓娟,杜明,等.乳铁蛋白对铁代谢的影响及其在神经退行性疾病中的应用[J].现代生物医学进展,2013,13(3):564-566.
- [6] BI C C, WANG A P, CHU Y C, et al. Intranasal delivery of rotigotine to the brain with lactoferrin-modified PEG-PLGA nanoparticles for Parkinson's disease treatment[J]. Int J Nanomedicine, 2016, 11: 6547-6559.
- [7] XU S F, ZHANG Y H, WANG S, et al. Lactoferrin ameliorates dopaminergic neurodegeneration and motor deficits in MPTP-treated mice[J]. Redox Biol, 2019, 21: 101090.
- [8] JAVITCH J A, D'AMATO R J, STRITTMATTER S M, et al. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82(7): 2173-2177.
- [9] HAO L Y, SHAN Q, WEI J Y, et al. Lactoferrin: major physiological functions and applications[J]. Curr Protein Pept Sci, 2019, 20(2): 139-144.
- [10] LEGRAND D. Overview of lactoferrin as a natural immune modulator[J]. J Pediatr, 2016, 173 Suppl: S10-S15.
- [11] ASHIDA K, SASAKI H, SUZUKI Y A, et al. Cellular internalization of lactoferrin in intestinal epithelial cells[J]. Biometals, 2004, 17(3): 311-315.
- [12] BERTUCCINI L, COSTANZO M, IOSI F, et al. Lactoferrin prevents invasion and inflammatory response following *E. coli* strain LF82 infection in experimental model of Crohn's disease[J]. Dig Liver Dis, 2014, 46(6): 496-504.
- [13] FILLEBEEN C, MITCHELL V, DEXTER D, et al. Lactoferrin is synthesized by mouse brain tissue and its expression is enhanced after MPTP treatment[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1999, 72(2): 183-194.
- [14] LIU H Y, WU H, ZHU N, et al. Lactoferrin protects against iron dysregulation, oxidative stress, and apoptosis in 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced Parkinson's disease in mice[J]. J Neurochem, 2020, 152(3): 397-415.
- [15] NOTTER M F, IRWIN I, LANGSTON J W, et al. Neurotoxicity of MPTP and MPP⁺ *in vitro*: characterization using specific cell lines[J]. Brain Res, 1988, 456(2): 254-262.
- [16] JAUBERT A, DRUTEL G, LESTE-LASSERRE T, et al. Tyrosine hydroxylase and dopamine transporter expression in lactotrophs from postlactating rats: involvement in dopamine-

- induced apoptosis[J]. *Endocrinology*, 2007, 148(6): 2698-2707.
- [17] SIVASUBRAMANIAN M, KANAGARAJ N, DHEEN S T, et al. Sphingosine kinase 2 and sphingosine-1-phosphate promotes mitochondrial function in dopaminergic neurons of mouse model of Parkinson's disease and in MPP⁺-treated MN9D cells *in vitro*[J]. *Neuroscience*, 2015, 290: 636-648.
- [18] STRASSER A, VAUX D L. Viewing BCL2 and cell death control from an evolutionary perspective[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(1): 13-20.
- [19] OUYANG Y B, LU Y, YUE S B, et al. miR-181 targets multiple Bcl-2 family members and influences apoptosis and mitochondrial function in astrocytes[J]. *Mitochondrion*, 2012, 12(2): 213-219.
- [20] BERSOKE L, van den WYNGAERT T, STROOBANTS S, et al. Molecular imaging of apoptosis: the case of caspase-3 radiotracers[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8): 3948.
- [21] KAMINSKA B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1754(1-2): 253-262.
- [22] JAYARAJ R L, AZIMULLAH S, BEIRAM R, et al. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke[J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 142.
- [23] HU P, ZHAO F Z, WANG J, et al. Lactoferrin attenuates lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses and barrier impairment through the modulation of NF- κ B/MAPK/Nrf2 pathways in IPEC-J2 cells[J]. *Food Funct*, 2020, 11(10): 8516-8526.
- [24] OH Y C, JEONG Y H, LI W, et al. Angelicae gigantis radix regulates LPS-Induced neuroinflammation in BV2 microglia by inhibiting NF- κ B and MAPK activity and inducing Nrf-2 activity[J]. *Molecules*, 2019, 24(20): 3755.
- [25] 黄蒙, 郭洁洁. MAPK 信号转导通路在神经退行性疾病中的研究进展[J]. *现代实用医学*, 2020, 32(1): 134-137.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 汪晓语, 单树方, 吕嘉琦, 等. 乳铁蛋白对MPP⁺诱导的帕金森病细胞模型炎症损伤的保护作用及机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(9): 41-50.

Cite this article as: WANG X Y, SHAN S F, LÜ J Q, et al. Ameliorative effect of lactoferrin on inflammatory injury in MPP⁺ induced cell model for Parkinson's disease and its mechanism[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(9): 41-50.