

## 摘要

### 研究背景:

随着肥胖患者日渐增多,肥胖现已成为一个非常严重的世界性健康问题。外周神经系统神经节内的神经元通常被卫星胶质细胞(Satellite glial cells, SGCs)完全包围着,肥胖状态下,激活的SGCs会释放细胞因子,如白介素-1 $\beta$ (Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ),这些炎性因子由SGCs释放后能扩散到SGCs邻近的神经元,增加神经元的兴奋性,进而传递伤害性信号。P2X4受体在星状神经节和背根神经节(Dorsal root ganglion, DRG)的卫星胶质细胞中广泛存在,并参与损伤性信号的传递。欧前胡素(Imperatorin, IMP)是一种呋喃香豆素,已被证明具有多种药理学作用,例如抗炎、心脏保护作用。我们实验室前期研究发现欧前胡素可以通过下调肥胖大鼠星状神经节中SGCs上的P2X4受体的表达来改善肥胖诱导的心交感神经病理损伤。但目前欧前胡素对离体培养高脂诱导的SGCs损伤的保护作用及其可能的机制尚不清楚,还需深入研究。

### 目的:

本实验通过高脂共培养背根神经节SGCs建立细胞损伤模型开展研究,在细胞水平上研究P2X4受体介导高脂引发的SGCs损伤的机制,并观察欧前胡素对P2X4受体介导高脂诱导的SGCs损伤的影响及可能机制,为肥胖及相关代谢综合症的防治探索新方法。

### 方法:

实验分组: SGCs正常对照组(Ctrl组);欧前胡素处理组(IMP组);高脂处理组(HF组);高脂+欧前胡素处理组(HF+IMP组);高脂+P2X4 shRNA处理细胞组(HF+P2X4 shRNA组);高脂+NC shRNA处理组(HF+NC shRNA组)。

### 实验内容:

(1) 免疫荧光法检测培养细胞SGCs胶质纤维酸性蛋白(Glial fibrillary acidic protein, GFAP)表达情况以及原代卫星胶质细胞纯度鉴定。

(2) 高脂浓度筛选: 通过 CCK-8 法检测不同高脂浓度处理组 (0.2 mM、0.4 mM、0.6 mM、0.8 mM、1.0 mM) 以及细胞处理时间分别为 24 h 和 48 h 对细胞存活率的影响并筛选出最合适的建模浓度。

(3) 欧前胡素浓度筛选: 通过 CCK-8 法检测不同欧前胡素浓度 (1  $\mu$ M、10  $\mu$ M、100  $\mu$ M、1000  $\mu$ M) 处理 24 h 对细胞存活率的影响, 筛选出欧前胡素的给药浓度范围; 然后以筛选出的高脂浓度为模型设置欧前胡素浓度梯度 (0  $\mu$ M、10  $\mu$ M、20  $\mu$ M、40  $\mu$ M、80  $\mu$ M、160  $\mu$ M), 通过 CCK-8 法筛选出欧前胡素的给药浓度。

(4) CCK-8 法检测欧前胡素对高脂诱导的 SGCs 存活率的影响 (Ctrl 组、HF 组、HF+IMP 组)。

(5) Real-time PCR 法、蛋白印迹法 (Western Blot, WB) 检测 SGCs 中 P2X4 mRNA 和蛋白的表达变化。免疫荧光双标法检测各组 SGCs 中 P2X4 和胶质纤维酸性蛋白 (Glial fibrillary acidic protein, GFAP) 共表达情况。

(6) 流式细胞技术检测各组 SGCs 细胞凋亡情况。

(7) BBCellProbe<sup>®</sup> F03 荧光探针法检测各组 SGCs 内 Ca<sup>2+</sup>浓度的变化。

(8) 荧光法检测各组 SGCs 内 ROS 含量的变化。

(9) 酶联免疫吸附实验 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测各组 SGCs 上清液以及 Transwell 小室共培养系统中下室神经元上清液中白细胞介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 18 (IL-18) 释放量的变化。

(10) WB 检测 SGCs 中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、NOD 样受体蛋白 3(Recombinant NLR Family, Pyrin Domain Containing Protein 3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1 (Caspase-1)、GSDMD (Gasdermin-D)、IL-18、p38 MAPK 以及 p-p38 MAPK 蛋白表达变化。

## 结果:

(1) SGCs 纯度鉴定: 通过免疫荧光法对原代 SGCs 进行纯度鉴定。结果显示, 所用卫星胶质细胞纯度在 95%以上, 符合后期实验要求。

(2) 高脂浓度筛选: CCK-8 检测结果显示, 作用 24 h 后, 与 Ctrl 组相比, 浓度为 0.4 mM 的高脂处理细胞存活率在 90%左右, 而浓度为 0.6 mM 的高脂处理细胞存活率降至 75%左右 ( $p < 0.01$ ), 浓度为 0.8 mM 的高脂处理细胞存活率

降至 65%左右 ( $p<0.01$ )。作用 48 h 后, 与 Ctrl 组相比, 浓度为 0.4 mM 的高脂处理细胞存活率在 85%左右, 而浓度为 0.6 mM 的高脂处理细胞存活率降至 65%左右 ( $p<0.01$ ), 浓度为 0.8 mM 的高脂处理细胞存活率降至 60%左右 ( $p<0.01$ )。因此, 本研究最终选用 HF 浓度 0.6 mM、处理时间 24 h 为建立高脂诱导 SGCs 细胞损伤模型的条件。

(3) 欧前胡素浓度筛选: CCK-8 检测结果显示, 1  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$  以及 100  $\mu\text{M}$  欧前胡素处理组与 Ctrl 组相比, 各组细胞存活率无明显差异 ( $p>0.05$ ), 而 1000  $\mu\text{M}$  欧前胡素处理组与 Ctrl 组相比, 细胞存活率明显下降, 降至 60%左右 ( $p<0.01$ )。因此, 我们以 0.6 mM 的 HF 为模型在 0  $\mu\text{M}$  ~ 160  $\mu\text{M}$  之间设置欧前胡素浓度梯度 (0  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$ 、20  $\mu\text{M}$ 、40  $\mu\text{M}$ 、80  $\mu\text{M}$ 、160  $\mu\text{M}$ ) 来确定欧前胡素的给药浓度。结果显示, 20  $\mu\text{M}$  的欧前胡素开始对细胞活性产生影响, 与 Ctrl 组相比有统计学差异 ( $p<0.05$ ), 40  $\mu\text{M}$  的欧前胡素处理组与 Ctrl 组相比有显著性差异 ( $p<0.01$ ); 而 80  $\mu\text{M}$  的欧前胡素处理组开始表现出细胞毒性。因此, 我们选用 40 $\mu\text{M}$  的浓度作为欧前胡素的给药浓度。然后以 0.6 mM 的 HF 浓度建立细胞损伤模型, 用浓度为 40  $\mu\text{M}$  的欧前胡素处理 24 h 后, 结果显示, HF 组细胞存活率相比 Ctrl 组显著下降 ( $p<0.01$ ); 与 HF 组相比, HF+IMP 组细胞存活率明显升高 ( $p<0.05$ ), 提示 IMP 对 HF 所致 SGCs 损伤有一定的保护作用。

(4) P2X4 受体表达的变化: HF 组中 P2X4 mRNA 和 P2X4 蛋白表达水平明显高于 Ctrl 组 ( $p<0.001$ ); 而欧前胡素以及 P2X4 shRNA 能显著降低 P2X4 的表达 ( $p<0.001$ ); HF+NC shRNA 组与 HF 组比较无明显差异 ( $p>0.05$ )。SGCs 中 P2X4 与 GFAP 存在共表达; HF 组 P2X4 与 GFAP 共表达水平较 Ctrl 组明显增加 ( $p<0.001$ ); 而欧前胡素以及 P2X4 shRNA 能显著降低 P2X4 与 GFAP 的共表达 ( $p<0.001$ ); HF+NC shRNA 组与 HF 组比较无明显差异 ( $p>0.05$ )。

(5) 炎症因子水平的变化: 蛋白印迹和 ELISA 检测结果均表明高脂处理组 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-18 表达水平较正常对照组明显增加 ( $p<0.01$ ), 而欧前胡素以及 P2X4 shRNA 均可抑制 SGCs 中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-18 的表达 ( $p<0.01$ ), HF+NC shRNA 组与 HF 组比较无明显差异 ( $p>0.05$ )。

(6) 流式细胞技术结果显示: 与对照组相比, 高脂能明显提高 SGCs 细胞凋亡率 ( $p<0.01$ ); 而欧前胡素以及 P2X4 shRNA 均可降低 SGCs 细胞凋亡率 ( $p<0.01$ ); HF+NC shRNA 组与 HF 组比较无明显差异 ( $p>0.05$ )。

(7) 细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度结果显示: 与 Ctrl 组相比, HF 组细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度明显增加 ( $p < 0.01$ ); 而欧前胡素和 P2X4 shRNA 均可降低细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度 ( $p < 0.01$ ); HF+NC shRNA 组与 HF 组比较无明显差异 ( $p > 0.05$ )。

(8) 细胞内 ROS 含量结果显示: 与 Ctrl 组相比, HF 组细胞内 ROS 含量明显增加 ( $p < 0.01$ ); 而欧前胡素和 P2X4 shRNA 均可降低细胞内 ROS 含量 ( $p < 0.01$ ); HF+NC shRNA 组与 HF 组比较无明显差异 ( $p > 0.05$ )。

(9) 细胞通路结果显示: HF 组中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD、p38 MAPK 蛋白表达水平较 Ctrl 组明显增加 ( $p < 0.01$ ), 而欧前胡素以及 P2X4 shRNA 均可抑制上述蛋白表达 ( $p < 0.01$ ), HF+NC shRNA 组与 HF 组比较无明显差异 ( $p > 0.05$ )。

#### 结论:

P2X4 受体可以介导由高脂诱导的 SGCs 细胞损伤, 引起炎症因子释放, ROS 含量增加, 细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高, 细胞凋亡加重, 激活 NLRP3/Caspase-1 通路促进细胞焦亡, p38 MAPK 蛋白磷酸化增强, 最终导致细胞损伤; 欧前胡素干预可以逆转以上改变, 可以改善高脂诱导的 SGCs 细胞损伤, 其机制可能是通过下调 P2X4 受体表达, 缓解炎症因子水平, 抑制 NLRP3/Caspase-1 通路减少细胞焦亡。因此, P2X4 受体有望成为治疗肥胖及相关代谢综合征的治疗靶点, 而欧前胡素也有望成为肥胖的潜在治疗药物。

**关键词:** 卫星胶质细胞; P2X4 受体; 欧前胡素; 肥胖; 细胞焦亡

## ABSTRACT

### **Background:**

The increasing number of obese patients has become an increasingly serious worldwide health problem. The neurons in the ganglia of the peripheral nervous system are usually completely surrounded by satellite glial cells (SGCs) In the obese state, activated SGCs release cytokines such as interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), which can easily spread to neighboring neurons and increase their excitability, thereby transmitting nociceptive signals. P2X4 receptors are widely expressed in SGCs of stellate ganglion and dorsal root ganglion (DRG) and are involved in the transmission of noxious signals. Imperatorin (IMP) is a furanocoumarin that has been shown to have a variety of pharmacological effects, such as anti-inflammatory, cardioprotective effects. Our laboratory previous studies have found that IMP can down-regulate the expression of P2X4 receptors on SGCs in stellate ganglion of obese rats and improve obesity-induced pathologic injury of cardiac sympathetic nerve. However, the protective effect of IMP on SGCs in vitro culture from the cytotoxicity induced by high fat and its possible mechanism remain unclear and require further study.

### **Objective:**

In this experiment, we investigated the mechanism of P2X4 receptor-mediated high-fat-induced injury in SGCs by co-culturing SGCs of dorsal root ganglia with high-fat (HF) at the cellular level, and observed the effect and possible mechanism of imperatorin on P2X4 receptor-mediated high-fat-induced injury in SGCs to explore new methods for the prevention and treatment of obesity and metabolic syndrome.

### **Methods:**

The experimental groups were divided: SGCs normal control group ( Ctrl group ) ; imperatorin treatment group ( IMP group ) ; high fat treatment group ( HF group ) ; high fat + imperatorin treatment group ( HF + IMP group ) ; high fat + P2X4

shRNA treatment group ( HF + P2X4 shRNA group ) ; high fat + NC shRNA treatment group ( HF + NC shRNA group ).

Experiment content :

(1) The expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in cultured SGCs was detected by immunofluorescence and the purity of primary satellite glial cells was identified.

(2) Screening of HF concentration : The effects of different HF concentration treatment groups ( 0.2 mM, 0.4 mM, 0.6 mM, 0.8 mM, 1.0 mM ) and treatment time of 24 h and 48 h on cell survival were detected by CCK-8 method, and the most suitable modeling concentration was selected.

(3) Screening of imperatorin concentration : CCK-8 method was used to detect the effect of imperatorin concentration ( 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, 1000 $\mu$ M ) on cell survival for 24 h, and the concentration range of imperatorin was screened out. Then, the concentration gradient of imperatorin ( 0  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 80  $\mu$ M, 160  $\mu$ M ) was set up with the selected HF concentration as the model, and the concentration of imperatorin was screened by CCK-8 method.

(4) The effects of imperatorin on the survival rate of SGCs induced by HF were detected by CCK-8 method ( Ctrl group, high fat group, high fat + imperatorin group ).

(5) Real-time PCR and protein blotting (Western Blot, WB) were used to detect changes in the expression of P2X4 mRNA and protein in SGCs. The co-expression of P2X4 and Glial fibrillary acidic protein (GFAP) was detected by immunofluorescence double-labeling method in SGCs of each group.

(6) Flow cytometry was used to detect the apoptosis of SGCs in each group.

(7) BBCellProbe®F03 fluorescent probe method was used to detect the changes of Ca<sup>2+</sup> concentration in SGCs of each group.

(8) The changes of ROS content in SGCs were detected by fluorescence method.

(9) Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to measure the changes of interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and interleukin 18 (IL-18) release in the supernatant of SGCs in each group and in the supernatant of neuronal cells in the lower chamber of the Transwell co-culture system.

(10) WB detection of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), cysteine aspartate protein hydrolase-1 (Caspase-1), GSDMD (Gasdermin-D), IL-18, p38 MAPK and p-p38 MAPK protein expression changes in SGCs.

**Results:**

(1) Purity identification of SGCs : The purity of primary SGCs was identified by immunofluorescence. The results showed that the purity of satellite glial cells was more than 95%, which met the requirements of later experiments.

(2) Screening of HF concentration : CCK-8 test results showed that after 24 hours of action, compared with the Ctrl group, the survival rate of HF treated cells at a concentration of 0.4 mM was about 90%, while the survival rate of HF treated cells at a concentration of 0.6 mM decreased to about 75% ( $p<0.01$ ), and the survival rate of HF treated cells at a concentration of 0.8 mM decreased to about 65% ( $p<0.01$ ). After 48h, compared with Ctrl group, the survival rate of cells treated with 0.4mM HF was about 85%, while the survival rate of cells treated with 0.6mM HF was about 65% ( $p<0.01$ ), and the survival rate of cells treated with 0.8mM HF was about 60% ( $p<0.01$ ). Therefore, we used 0.6mM HF to treat SGCs for 24 h to establish a high-fat cell injury model.

( 3 ) Screening of imperatorin concentration : The results of CCK-8 showed that there was no significant difference in cell viability between 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M and 100 $\mu$ M imperatorin treatment groups and Ctrl group (  $p>0.05$  ). Compared with Ctrl group, the cell survival rate of 1000 $\mu$ M imperatorin treatment group decreased to about 60% ( $p<0.01$ ). Therefore, we used 0.6mM HF as a model to set a concentration gradient ( 0 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M, 40 $\mu$ M, 80 $\mu$ M, 160 $\mu$ M ) between 0 $\mu$ M and 160 $\mu$ M to determine the concentration of imperatorin. The results showed that 20 $\mu$ M imperatorin began to affect cell activity, which was statistically different from the Ctrl group ( $p<0.05$ ), and 40 $\mu$ M imperatorin treatment group was significantly different from the Ctrl group ( $p<0.01$ ). The 80 $\mu$ M imperatorin treatment group began to show cytotoxicity. Therefore, we selected the concentration of 40 $\mu$ M as the concentration of imperatorin.

(4) Changes in P2X4 receptor expression: P2X4 mRNA and P2X4 protein expression levels were significantly higher in the HF group than in the Ctrl group

( $p < 0.001$ ); while IMP treatment and P2X4 shRNA treatment both significantly reduced P2X4 expression ( $p < 0.001$ ); there was no significant difference between the HF+NC shRNA group and the HF group ( $p > 0.05$ ). P2X4 was co-expressed with GFAP in SGCs; the co-expression level of P2X4 and GFAP was significantly increased in HF group compared with Ctrl group ( $p < 0.001$ ); while IMP treatment and P2X4 shRNA treatment both significantly decreased the co-expression of P2X4 and GFAP ( $p < 0.001$ ); there was no significant difference in HF+NC shRNA group compared with HF group ( $p > 0.05$ ).

(5) Changes in inflammatory factor levels: both protein blotting and ELISA results showed that the expression levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-18 were significantly increased in the high-fat-treated group compared with the normal control group ( $p < 0.01$ ), while IMP treatment and P2X4 shRNA treatment both inhibited the expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-18 in SGCs ( $p < 0.01$ ). There was no significant difference in the HF+NC shRNA group compared with the HF group ( $p > 0.05$ ).

(6) The results of flow cytometry showed that high lipid significantly increased the apoptosis rate of SGCs compared with the control group ( $p < 0.01$ ); while IMP treatment and P2X4 shRNA treatment both decreased the apoptosis rate of SGCs ( $p < 0.01$ ); there was no significant difference between HF+NC shRNA group and HF group ( $p > 0.05$ ).

(7) The results of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration showed that the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration was significantly increased in the HF group compared with the Ctrl group ( $p < 0.01$ ), while IMP treatment and P2X4 shRNA treatment both reduced intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration ( $p < 0.01$ ); there was no significant difference between the HF+NC shRNA group and the HF group ( $p > 0.05$ ).

(8) The results of intracellular ROS content showed that the intracellular ROS content was significantly increased in HF group compared with Ctrl group ( $p < 0.01$ ); while IMP treatment and P2X4 shRNA treatment reduced the intracellular ROS content ( $p < 0.01$ ); there was no significant difference between HF+NC shRNA group and HF group ( $p > 0.05$ ).

(9) Cellular pathway results showed that the expression levels of NLRP3, Caspase-1, GSDMD, and p38 MAPK proteins were significantly increased in the HF



group compared with the Ctrl group ( $p<0.01$ ), while IMP treatment and P2X4 shRNA treatment both inhibited the expression of the above proteins ( $p<0.01$ ), and there was no significant difference between the HF+NC shRNA group and the HF group ( $p>0.05$ ).

**Conclusion:**

P2X4 receptor can mediate the cell injury of SGCs induced by high fat, cause the release of inflammatory factors, increase ROS content, increase intracellular  $Ca^{2+}$  concentration, increase apoptosis, activate of NLRP3/Caspase-1 pathway to promote cell pyroptosis, and enhance phosphorylation of p38 MAPK protein, and ultimately lead to cell injury; IMP intervention can reverse the above changes and ameliorate the cell injury of SGCs induced by high fat, probably by downregulating P2X4 receptor expression, alleviating the level of inflammatory factors, and inhibiting NLRP3/Caspase-1 pathway to reduce cell pyroptosis. Therefore, P2X4 receptor is expected to be a therapeutic target for the treatment of obesity and metabolic syndrome, and IMP is also expected to be a potential therapeutic agent for obesity.

**Key words :** Satellite glial cells; P2X4 receptor; Imperatorin; Obesity; Pyroptosis

## 目 录

第 1 章 引言 .....	1
第 2 章 材料与方法 .....	4
2.1 实验材料 .....	4
2.1.1 实验细胞 .....	4
2.1.2 实验试剂 .....	4
2.1.3 实验仪器 .....	6
2.1.4 溶液配制 .....	7
2.2 实验方法 .....	9
2.2.1 原代SGCs培养 .....	9
2.2.2 实验分组 .....	9
2.2.3 建立卫星胶质细胞和神经元的共培养体系 .....	10
2.2.4 CCK-8检测细胞活性 .....	10
2.2.5 实时荧光定量PCR .....	10
2.2.6 蛋白印迹 (WB) .....	12
2.2.7 免疫荧光双标 .....	13
2.2.8 酶联免疫吸附实验 (ELISA) .....	14
2.2.9 细胞内Ca <sup>2+</sup> 浓度检测 .....	15
2.2.10 细胞内ROS含量检测 .....	15
2.2.11 Annexin V-FITC / PI 细胞凋亡检测 .....	16
2.3 实验数据分析 .....	16
第 3 章 实验结果 .....	17
3.1 原代培养背根神经节SGCs纯度鉴定 .....	17
3.2 高脂浓度筛选 .....	17
3.3 欧前胡素浓度筛选 .....	18
3.3.1 CCK-8检测欧前胡素各浓度对SGCs存活的影响 .....	18
3.3.2 欧前胡素处理对高脂诱导的SGCs损伤的存活率的影响 .....	19
3.4 欧前胡素对高脂诱导的SGCs损伤模型中P2X4受体表达的影响 .....	20
3.4.1 Real-time PCR法检测SGCs中P2X4 mRNA表达结果 .....	20
3.4.2 蛋白印迹法检测SGCs中P2X4蛋白表达结果 .....	20
3.4.3 免疫荧光双标法检测SGCs中P2X4和GFAP共表达结果 .....	21

3.5 欧前胡素对高脂诱导的SGCs损伤模型中炎性因子表达的影响 .....	23
3.5.1 蛋白印迹法检测SGCs中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 蛋白表达结果 .....	23
3.5.2 ELISA检测SGCs上清液中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 释放水平 .....	24
3.6 欧前胡素对高脂诱导的SGCs损伤模型中Ca <sup>2+</sup> 浓度的影响 .....	24
3.7 欧前胡素对高脂诱导的SGCs损伤模型中ROS含量的影响 .....	25
3.8 欧前胡素对高脂诱导的SGCs损伤模型中NLRP3/Caspase-1细胞焦亡信号通路的影响 .....	26
3.8.1 蛋白印迹法检测SGCs中NLRP3、Caspase-1、GSDMD蛋白表达结果 .....	26
3.8.2 蛋白印迹法检测SGCs中IL-18表达结果 .....	27
3.8.2 ELISA检测SGCs中IL-18表达结果 .....	28
3.9 欧前胡素对高脂诱导的SGCs损伤模型中细胞凋亡的影响 .....	29
3.10 欧前胡素对高脂诱导的SGCs损伤模型中p38 MAPK磷酸化的影响 .....	30
3.11 Transwell小室系统共培养DRG神经元和卫星胶质细胞 .....	31
3.11.1 蛋白印迹法检测神经元中NLRP3、IL-18蛋白表达结果 .....	31
3.11.2 ELISA检测神经元上清液中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 释放水平 .....	32
第4章 讨论 .....	34
第5章 结论与展望 .....	38
致谢 .....	39
参考文献 .....	40
攻读学位期间的研究成果 .....	44
综述 .....	45

## 中英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
IMP	Imperatorin	欧前胡素
SGCs	Satellite glial cells	卫星胶质细胞
DRG	Dorsal root ganglion	背根神经节
MS	Metabolic syndromes	代谢综合征
IR	Insulin resistance	胰岛素抵抗
ATP	Adenosine triphosphate	三磷酸腺苷
HF	High fat	高脂
FFA	free fatty acid	游离脂肪酸
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor	脑源性神经营养因子
P2X4	Purinergic P2X4 receptor	嘌呤 2X4 受体
NLRP3	Recombinant NLR Family, Pyrin Domain Containing Protein 3	含 NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3
AP	Ammonium persulfate	过硫酸铵
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
TEMED	Tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺
shRNA	Short hairpin Ribonucleic Acid	短发夹 RNA
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$	肿瘤坏死因子- $\alpha$
TBST	Triethanolamine-buffered saline-tween	吐温三乙醇胺缓冲生理盐水
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
WB	Western blot	蛋白印迹
IL-18	Interleukin-18	白细胞介素-18
ROS	Reactive oxygen species	活性氧
Oligo-dT	Oligonucleotides	寡脱氧胸腺苷酸
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$	白细胞介素-1 $\beta$
RQ	Relative quantity	相对表达量

## 中英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
RI	RNase inhibitor	核糖核酸酶抑制剂
RT	Reverse-transcriptase	逆转录酶
NC	Negative control	阴性对照
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution	Hanks 平衡盐溶液
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸缓冲盐溶液
BSA	Bull Serum Albumin	胎牛血清蛋白
PFA	Paraformaldehyde	多聚甲醛
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏氟乙烯
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid	互补脱氧核糖核酸
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	胶质纤维酸性蛋白
IOD	Integrated optical density	积分光密度
mRNA	Messenger ribonucleic acid	信使核糖核酸

## 第1章 引言

当今社会人们生活水平不断提高，肥胖患者也日益增多，已经成为一个世界范围内的健康问题。肥胖不仅使患者的生活质量降低、损害患者的身体和心理健康，也给家庭和社会带来巨大的经济负担。除了肥胖本身带来的危害，肥胖还会促进甚至直接导致其他疾病的发生，例如高脂血症、代谢综合征以及心血管系统疾病，已有研究证明肥胖可以诱发多种心血管疾病<sup>[1-3]</sup>。生理状态下，人体血浆中游离脂肪酸（Free fatty acid, FFA）的含量很低，肥胖时机体抑制脂质合成并加速脂肪分解，血浆中游离脂肪酸含量明显增加，炎症细胞因子分泌增加，机体的炎症信号通路被激活，从而使机体处于慢性炎症状态<sup>[4-6]</sup>。代谢综合征时机体处于低度炎症状态，炎症细胞因子分泌异常，炎症信号通路异常激活<sup>[7]</sup>。

嘌呤信号转导受体分为 P1 受体和 P2 受体<sup>[8]</sup>，P2 受体又分为两大类，分别为配体门控离子通道型受体（P2X 受体，包括 P2X1-7）和 G 蛋白偶联型受体（P2Y 受体）<sup>[9,10]</sup>。P2X 受体是非选择性阳离子通道，Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>和 Ca<sup>2+</sup>均可通过此通道。当机体受到外界刺激后 ATP 释放增多，ATP 与 P2X 受体结合时，受体通道孔迅速打开，主要表现为 Na<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>内流和 K<sup>+</sup>外流<sup>[11,12]</sup>，以细胞内 Ca<sup>2+</sup>浓度升高为主，使细胞膜发生去极化。生理条件下，P2X 受体处于失活状态，且细胞外 ATP 浓度较低，但当机体处于炎症、免疫低下等病理状态时，ATP 释放增多，细胞外的 ATP 浓度急剧升高，激活 P2X 嘌呤能受体，参与疾病的反应过程<sup>[13-15]</sup>。P2X4 受体与其他 P2X 嘌呤能受体的不同之处在于对 Ca<sup>2+</sup>具有更大的通透性<sup>[13]</sup>。有研究证明，P2X 受体参与神经调节、神经传递以及神经元与神经胶质细胞之间的相互作用<sup>[16]</sup>。研究表明，小胶质细胞的 P2X4 受体可以刺激脑源性神经营养因子(Brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的合成和释放，而 BDNF 是维持小胶质细胞与神经元之间信息传递的重要化学介质<sup>[17]</sup>。有研究发现，P2X4 受体能间接调节肿瘤细胞的进展是因为可以通过调节机体微环境中的炎症反应和免疫细胞，从而能够促进肿瘤的侵袭与转移<sup>[18,19]</sup>。有研究报道，往小胶质细胞的培养基中加入 ATP，小胶质细胞会被激活，而同时细胞表面的 P2X4 受体也会明显上调，进一步研究发现向鞘内注射此类由 ATP 激活的小胶质细胞后可诱导异常性疼痛的发生<sup>[20,21]</sup>；而能够下调 P2X4 受体的物质如 P2X4

拮抗剂可以抑制小胶质细胞激活，从而能够减少伤害感受性分子的释放，并减少伤害性信号传递<sup>[22]</sup>。另有研究发现突触前 DRG 神经元中枢端 P2X 受体激活后会释放炎性物质，并致使脊髓背角小胶质细胞活化释放 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 等多种炎性物质以及神经活性物质，从而参与慢性炎性疼痛的产生和维持<sup>[23]</sup>。以上研究提示，P2X4 受体可能成为慢性炎症病变治疗的重要靶点。

外周神经系统神经节内胶质细胞的主要类型为卫星胶质细胞（SGCs），它们通常完全包围着单个神经节神经元<sup>[24]</sup>。近年来，神经元-SGCs 之间的通讯方式引起了人们的极大兴趣。由于神经元胞体之间缺乏突触联系，而神经元与周围 SGCs 之间有紧密联系，提示 SGCs-神经元之间的双向通讯可能在信息传导过程中发挥重要作用<sup>[25]</sup>。在感觉神经节中，激活的 SGCs 会释放细胞因子，如 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ ，这些细胞因子可以很容易地扩散到邻近的神经元，增加它们的兴奋性，从而传递伤害性信号<sup>[26-28]</sup>，说明神经元和 SGCs 之间的通信不仅参与炎症或病理性疼痛，还参与伤害性信号的传递<sup>[29]</sup>。P2X4 受体在 DRG 的 SGCs 中广泛表达，并参与伤害性信号的传递<sup>[30]</sup>。多数肥胖人群存在心脏结构、功能的改变，肥胖患者心肌细胞脂质代谢异常，随之可能引发“脂毒性心脏病”，继而引发严重后果如心肌细胞功能紊乱甚至死亡<sup>[31]</sup>。研究发现 P2X4 shRNA 可通过抑制背根神经节传入减少由 P2X4 介导的伤害性信号，从而减轻心肌梗死引起的异常交感活动<sup>[32]</sup>。我们实验室前期研究发现肥胖大鼠星状神经节中 SGCs 上的 P2X4 受体的表达升高促进肥胖诱导的心交感神经病理损伤<sup>[33]</sup>。以上研究提示，星状神经节和背根神经节卫星胶质细胞 P2X4 受体可能参与肥胖及低度的系统性慢性炎症反应引发的病理损伤性信息传递过程。

近年来，随着国内外对于细胞凋亡的研究越来越多，一种不同于细胞凋亡的新的细胞死亡方式—细胞焦亡被发现。细胞焦亡是一种坏死性和炎症性的细胞程序性死亡，由炎症性半胱天冬酶（Caspase）诱导，最显著的特点是细胞膜结构破坏以及细胞内物质会释放到细胞外<sup>[34]</sup>。细胞焦亡分为经典途径和非经典途径，本课题研究的依赖于 Caspase-1 的死亡方式称为细胞焦亡经典途径，经典途径中 Caspase-1 的激活可由多种炎症小体介导，而其中 NLRP3（Recombinant NLR Family, Pyrin Domain Containing Protein 3）炎症小体是研究最为广泛的<sup>[6]</sup>。细胞焦亡可引起 IL-1 $\beta$ 和 IL-18 的释放<sup>[35]</sup>，两者为炎症小体激活的炎性标志。有报道称，代谢性疾病时机体表达更多的 NLRP3 炎症小体，且 NLRP3 炎症小体在痛风、糖尿病等多种非感染性炎症性疾病中起着重要作用<sup>[36]</sup>。

另外有研究表明 caspase-1 或 NLRP3 缺陷的小鼠炎症反应减弱，并且在高脂饮食情况下，胰岛素抵抗有所改善，肥胖发病率也有所下降<sup>[37, 38]</sup>。

欧前胡素 (Imperatorin, IMP) 是一种天然存在的呋喃香豆素，具有多种药理学作用并在中药中广泛使用<sup>[39]</sup>。有报道称欧前胡素具有一定的抗炎作用<sup>[40]</sup>和心脏保护作用<sup>[41]</sup>。有研究表明欧前胡素可以抑制 TNF- $\alpha$  诱导的活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 生成，通过抑制 ROS 介导的 PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B 通路的激活来减少炎性因子分泌，从而减轻炎症反应，为欧前胡素作为一种潜在的抗炎药物提供了临床前证据<sup>[42]</sup>。实验室前期研究表明，分子对接结果显示欧前胡素可与 P2X4 受体蛋白质晶体结构内的部位结合，欧前胡素可以作用于星状神经节 SGCs 的 P2X4 受体，减少炎性因子的释放，降低神经细胞的病理性兴奋，改善肥胖及代谢综合征引发的星状神经节的病理变化<sup>[33]</sup>。本实验通过构建高脂共培养背根神经节 SGCs 来进行相关通路的研究，观察欧前胡素对 P2X4 受体介导高脂诱导的 SGCs 细胞损伤的影响。希望通过本项目的研究工作，拓宽和深化对肥胖及相关代谢综合征的病理机理认识，找出预防和治疗的新药物靶点，为肥胖及相关代谢综合征的防治探索新方法。



## 第2章 材料与方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 实验细胞

原代培养的卫星胶质细胞 (SGCs) 取自出生 3 天之内的 SD 新生乳鼠背根神经节, SD 大鼠由湖南省长沙天勤生物公司提供。所用的大鼠背根神经节神经元购自湖南丰晖生物科技有限公司。

#### 2.1.2 实验试剂

试剂名称	生产或购置公司
兔源性 P2X4 抗体	Alomone labs company
鼠源性 GFAP 抗体	Invitrogen 公司
兔源性 TNF- $\alpha$ 抗体	武汉博士德生物公司
兔源性 p38 MAPK 抗体	Cell Signaling Technology
兔源性 p-p38 MAPK 抗体	Cell Signaling Technology
兔源性 IL-1 $\beta$ 抗体	武汉博士德生物公司
兔源性 Caspase-1 抗体	Novus Biologicals
兔源性 GSDMD 抗体	Novus Biologicals
兔源性 NLRP3 多克隆抗体	Bioworld Technology
兔源性 IL-18 多克隆抗体	Abcam company
小鼠源性 $\beta$ -actin 抗体	北京中杉金桥生物有限公司
质粒提取试剂盒	美国 Omega
RNA 提取试剂盒 (TransGen)	北京全式金生物有限公司
$\beta$ -actin、P2X4 引物	上海生工生物工程有限公司
RNA 逆转录试剂盒 (TransGen)	北京全式金生物有限公司
Real-time PCR 试剂盒	TaKaRa 生物公司
RIPA 裂解液	北京普利莱生物技术有限公司
TransZolTM UP	北京全式金生物有限公司
蛋白酶、蛋白磷酸酶抑制剂	美国 GlpBio

## 第 2 章 材料与amp;方法

---

山羊血清封闭液	北京中杉金桥生物有限公司
6×Loading Buffer	北京全式金生物有限公司
1.0 mol/L Tris HCL (PH 6.8)	Solarbio company
1.5 mol/L Tris HCL (PH 8.8)	Solarbio company
十二烷基硫酸钠 (SDS)	Solarbio company
过硫酸铵 (AP)	Solarbio company
转染试剂盒 (TransGen)	北京全式金生物有限公司
30%丙烯酰胺溶液	Solarbio company
PVDF 膜	Solarbio company
脱脂奶粉	Solarbio company
山羊抗兔 FITC-IgG	北京中杉金桥生物有限公司
羊抗兔 IgG-HRP	北京中杉金桥生物有限公司
抗荧光淬灭封片剂	Solarbio company
DAPI 染色液	武汉博士德生物公司
4%多聚甲醛固定液 (PFA)	Biosharp 公司
羊抗小鼠 IgG-HRP	北京中杉金桥生物有限公司
Tritron X-100	Solarbio company
山羊抗小鼠 TRITC-IgG	北京中杉金桥生物有限公司
牛血清蛋白 V (BSA)	Solarbio company
10×TBST	Solarbio company
5×电泳液	Solarbio company
10×转膜液	Solarbio company
IL-18、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ Elisa 试剂盒	武汉申科有限公司
CCK-8 试剂	美国 GIpBio
欧前胡素	四川成都植标化纯生物技术公司
油酸	美国 GIpBio
棕榈酸	美国 GIpBio
DMEM 培养基	Pricella
0.25%胰酶消化液	北京全式金生物有限公司
DMEM/F12 培养基	Pricella
无菌 PBS	Solarbio company

---

胎牛血清 (FBS)	依科赛生物科技有限公司
D-Hanks 缓冲液	Solarbio company
质粒转染试剂	北京全式金生物有限公司
ROS 检测试剂盒	Elabscience
Ca <sup>2+</sup> 检测试剂盒	贝博生物
细胞凋亡检测试剂盒	江苏凯基

### 2.1.3 实验仪器

仪器名称	生产或购置公司
细胞超净工作台	上海博讯实业有限公司
倒置光学显微镜	日本 Olympus 公司
电热鼓风干燥箱	上海一恒科学仪器有限公司
超低温冰箱	美国赛默飞公司
CO <sub>2</sub> 细胞培养箱	益世科生物
医用冰箱	海尔公司
电动离心机	金坛区西城新瑞仪器厂
酶标仪	Perkin ELmer 公司
小型冷冻离心机	Eppendorf 中国有限公司
PCR 基因扩增仪	BIO-RAD company
微量核酸蛋白浓度测定仪	美国 Thermo Fisher
内排式高压灭菌锅	日本 TOMY 公司
实时荧光定量 PCR 仪	BIO-RAD company
恒温水浴锅	江苏环宇科学仪器厂
微型振荡器	Ink Shaker 公司
全自动雪花制冰机	雪科电器有限公司
SDS-PAGE 电泳系统	北京六一生物科技有限公司
自动双重纯水蒸馏器	易普易达公司
水平摇床	北京六一仪器厂
凝胶成像分析系统	BIO-RAD company
荧光倒置显微镜	日本奥林巴斯公司
脱色摇床 TS-1000 型	其林贝尔仪器公司
激光扫描共聚焦显微镜	莱卡显微系统有限公司

## 2.1.4 溶液配制

### 2.1.4.1 细胞培养所用试剂

#### (1) 细胞培养液 (50ml)

试剂	剂量
DMEM/F12	44.5ml
FBS	5ml
青霉素/链霉素	0.5ml

#### (2) 游离脂肪酸溶液 (FFA)

试剂	剂量
无菌水	5ml
BSA	10g
DMEM/F12 培养基	45ml
油酸	152.2mg
棕榈酸	139.2mg

先取两支 50 ml 的无菌离心管，分别加入 5 g 牛血清白蛋白 (BSA)，再用 DMEM/F12 定容至 22.5 ml；再取两支 4 ml 无菌离心管，称取上述剂量油酸 (OA) 和棕榈酸 (PA)，分别往 OA 和 PA 中加入 2.5 ml 无菌水，然后将两支离心管置于 60°C 水浴锅中使其充分溶解，往两管溶解好的 BSA 溶液中缓慢加入溶解后的油酸和棕榈酸；然后按照 OA:PA=2:1 的体积比将油酸溶液和棕榈酸溶液混合，两者充分混匀后即得到浓度为 20 mM 的游离脂肪酸母液 (FFA)，过滤除菌，置于 -20°C 冰箱保存。

### 2.1.4.2 蛋白印迹所用试剂

#### (1) 10%SDS

试剂	剂量
纯水	10ml
过硫酸铵	1g

充分溶解后置于 -20°C 避光保存。

## (2) 10%过硫酸铵 (AP)

试剂	剂量
过硫酸铵	1g
纯水	10ml

充分溶解后置于-20℃避光保存。

## (3) 1×电泳液

试剂	剂量
5×电泳液	100ml
纯水	400ml

## (4) 1×电转液

试剂	剂量
10×电转液	50ml
甲醇	100ml
纯水	350ml

## (5) 1×TBST

试剂	剂量
Tris	50ml
NaCl	8g
KCl	0.2g
Tween20	0.5ml
纯水	定容至 1L

## (6) 封闭液

试剂	剂量
脱脂奶粉	0.5g
1×TBST	10ml

## 2.1.4.3 4%多聚甲醛 (PFA)

试剂	剂量
多聚甲醛	4g
0.1M PBS 溶液	100ml

置于 60℃水浴锅溶解

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 原代SGCs培养

方法：取出生 3 天之内的 SD 新生乳鼠，置于容器内，用酒精麻醉并杀菌消毒，断头后剪下脊柱部分置于预冷的 D-hanks 缓冲液中；用眼科剪将脊柱从正中剖开，脊柱被剪成两半，将脊髓暴露出来，然后去除脊髓，充分暴露背根神经节，将神经节取出后置于预冷的 DMEM/F12 培养基中；用灭菌的巴氏吸管将分离出来的背根神经节及 DMEM/F12 培养基移至 15 ml 的无菌离心管中，将离心管放入离心机中，转速 1500 rpm，离心 5 min；离心后弃去上清，然后在离心管中加入 1 ml 0.25% 胰消化酶，轻轻吹打混匀后置于 37℃ 细胞培养箱中消化 20 min，消化期间每隔 5 min 拿出来轻轻摇匀，使神经节与消化液充分接触；消化后加入含 2 ml DMEM/F12 完全培养基，轻轻混匀终止消化；将离心管放入离心机中，转速 1500 rpm，离心 5 min，离心后弃去上清；加入适量细胞培养基（DMEM/F12+10% FBS+1% 双抗），缓慢充分吹打，当背根神经节变为絮状物后，静置 1 min，在 50 ml 离心管上放置一个孔径为 70  $\mu\text{m}$  的细胞筛，将吹打混匀好的液体过滤至离心管中，弃去细胞筛，在 12 孔板或 6 孔板中均匀接种细胞悬液，轻轻晃动孔板，使细胞均匀分布于孔内，将培养板置于 37℃ 细胞培养箱中，后续观察细胞生长情况。

### 2.2.2 实验分组

（1）高脂浓度筛选分组：随机将 SGCs 分为正常组（Ctrl）和不同高脂浓度处理组（0.2 mM、0.4 mM、0.6 mM、0.8 mM、1.0 mM），处理时间为 24 h 和 48 h，通过 CCK-8 法筛选出高脂建模浓度及作用时间。

（2）欧前胡素浓度筛选分组：随机将 SGCs 分为正常组（Ctrl）和不同欧前胡素浓度处理组（1  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$ 、1000  $\mu\text{M}$ ），药物处理时间为 24 h，通过 CCK-8 法筛选欧前胡素的用药浓度范围；结合欧前胡素的用药浓度范围筛选结果，以筛选出的高脂浓度为模型设置欧前胡素浓度梯度（0  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$ 、20  $\mu\text{M}$ 、40  $\mu\text{M}$ 、80  $\mu\text{M}$ 、160  $\mu\text{M}$ ），通过 CCK-8 法筛选出欧前胡素的给药浓度；结合上述得出的欧前胡素浓度筛选结果，然后以筛选出的高脂浓度为细胞损伤模型，用 CCK-8 法检测各组 SGCs（Ctrl 组、HF 组、HF+IMP 组）细胞存活率观察欧前胡素对高脂诱导的 SGCs 细胞损伤存活率的影响。

(3) 观察欧前胡素对高脂诱导的 SGCs 损伤模型中 P2X<sub>4</sub>、炎性因子、NLRP3/Caspase-1 细胞焦亡通路、p38MAPK 等影响的分组：随机将 SGCs 分为正常组 (Ctrl)；欧前胡素处理组 (IMP)；高脂处理组 (HF)；高脂加欧前胡素处理组 (HF+IMP)；高脂加 P2X<sub>4</sub> shRNA 处理组 (HF+P2X<sub>4</sub> shRNA)；高脂加 NC shRNA 处理组 (HF+NC shRNA)。

### 2.2.3 建立卫星胶质细胞和神经元的共培养体系

复苏大鼠背根神经节神经元(湖南丰辉生物科技有限公司, 中国), 然后在含 10% FBS 的 DMEM 培养基中培养, 待用。将原代培养的 SGCs 接种在 Transwell 上室中, 并在含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基中培养, 当 SGCs 长至 70% 左右时, 对每组细胞进行相应处理。将神经元接种于 Transwell 的下室, 与 SGCs 共培养 24 h 之后, 收集下室神经元用于后续实验。

### 2.2.4 CCK-8检测细胞活性

使用美国 GIpBio 公司的 CCK-8 试剂盒检测卫星胶质细胞活性。将卫星胶质细胞均匀接种至 96 孔板中, 除了实验孔同时还要设置空白孔和对照孔, 空白孔中不接种细胞只含有培养基, 对照孔中的细胞用不含药物的正常培养基培养, 剩余的实验孔用不同浓度的高脂和欧前胡素处理细胞 24 h。培养 24 h 后, 向每个孔中加 10  $\mu$ l CCK-8 试剂, 将 96 孔板置于 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中培养 1~4 h, 培养后用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度, 结合空白孔和对照孔的吸光度计算出每个实验组的细胞存活率。计算公式为: 细胞存活率=[(实验孔-空白孔)/(对照孔-空白孔)] $\times$ 100%

### 2.2.5 实时荧光定量PCR

采用实时荧光定量 PCR 法检测各组 SGCs 中 P2X<sub>4</sub> mRNA 的表达变化。

(1) 总 RNA 的提取: 将 SGCs 均匀接种于 12 孔板中, 待细胞贴壁长至 70% 左右, 进行质粒转染, 转染 4~6 h 后将原有培养基弃去, 更换为含药培养基, 更换好培养基后将孔板置于 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱继续培养 24 h, 24 h 后按照试剂盒说明书进行总 RNA 提取:

a. 将孔板内的培养基弃去, 用 PBS 将细胞洗一遍, 每孔加 200  $\mu$ l TransZol Up, 放置片刻后使用移液枪吹打细胞使其脱落, 将细胞裂解液转移至 1.5 ml 无核酶离心管中, 静置 5 min。

- b. 往每管离心管中加 40  $\mu\text{l}$  氯仿，加好后将离心管用力摇晃 30 s，使其充分混匀，然后室温静置 3 min。
- c. 静置后将离心管置于 4 $^{\circ}\text{C}$  离心机中，转速 12000 rpm，离心 5 min。
- d. 离心后将管中无色的上层水相转移至新的无核酶离心管中，根据上层水相的体积，加入等体积的无水乙醇，将离心管轻轻颠倒，使两者充分混匀。
- e. 将加好无水乙醇的溶液转移至无核酶离心柱中，将离心柱置于新的离心管中，转速 12000 rpm，离心 30 s，离心后弃去流出液。
- f. 弃去流出液后往每个离心柱中加 500  $\mu\text{l}$  CB9 溶液，置于离心机中，转速 12000 rpm，离心 30 s，离心后弃去流出液。
- g. 重复步骤 f 一次。
- h. 每个离心柱中加 500  $\mu\text{l}$  WB9 溶液，转速 12000 rpm，离心 30 s，离心后弃去流出液，将离心柱重新置于离心管中。
- i. 重复步骤 h 一次。
- j. 室温 12000 $\times$ g 离心 2 min，弃去流出液。
- k. 将离心柱放于新的无核酶离心管中，用移液枪往离心柱中央加入 50  $\mu\text{l}$  无核酶水，加好后静置 1 min，转速 12000 rpm，离心 1 min，洗脱 RNA。
- l. 将 RNA 置于 -80 $^{\circ}\text{C}$  保存。

(2) RNA 逆转录：使用全式金逆转录试剂盒以及伯乐基因扩增仪进行逆转录，逆转录体系如下：

Component	Volume
Random Primer(N9)(0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$
EasyScript RT/RI Enzyme Mix	1 $\mu\text{l}$
gDNA Remover	1 $\mu\text{l}$
2 $\times$ ES Reaction Mix	10 $\mu\text{l}$
Total RNA	7 $\mu\text{l}$
Total volume	20 $\mu\text{l}$

(3) 引物设计：本实验过程中用到的引物序列均由上海生工生物工程有限公司合成，引物序列如下：

引物名称	Real time-PCR 引物序列 (5'-3')
------	----------------------------



$\beta$ -actin	Forward: AAGATCCTGACCGAGCGTGG Reverse: CAGCACTGTGTTGGCATAGAGG
P2X4	Forward: AAGGTGTGGCTGTGACCAAC Reverse: AGGAATCTCTGGACAGGTGC

(4) Real-time PCR 反应: 采用 TaKaRa TB Green<sup>®</sup> 嵌合荧光法, 使用伯乐 PCR 仪进行检测, 反应体系如下:

试剂	使用量
Forward Primer (10 $\mu$ M)	0.75 $\mu$ l
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	0.75 $\mu$ l
TB Green	10 $\mu$ l
无核酶水	7.5 $\mu$ l
cDNA	1 $\mu$ l
Total volume	20 $\mu$ l

PCR 程序运行条件: Step1: 95 $^{\circ}$ C 反应 30 s; Step2: 95 $^{\circ}$ C 反应 5 s, 60 $^{\circ}$ C 反应 30 s (40 个循环); Step3: 溶解曲线。

### 2.2.6 蛋白印迹 (WB)

采用蛋白印迹法 (WB) 检测 P2X4、NLRP-3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-18、p38 MAPK 以及 p-p38 MAPK 的蛋白表达变化。

(1) 蛋白的提取: 将卫星胶质细胞均匀接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁长至 70% 左右, 进行质粒转染, 转染 4~6 h 后将原有培养基弃去, 更换为含药培养基, 更换好培养基后将孔板置于 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱继续培养 24 h, 24 h 后进行蛋白提取:

a. 将孔板内原有培养基弃去, 用 PBS 洗 2 遍细胞, 配置细胞裂解液 (RIPA 裂解液: 蛋白酶抑制剂: 蛋白磷酸酶抑制剂=100:1:1), 每孔加入 300  $\mu$ l 配好的细胞裂解液, 置于冰上裂解 5 min。

b. 裂解后使用细胞刮将细胞脱落, 用移液枪将细胞裂解液转移至 1.5 ml 离心管中。

c. 12000 rpm 4 $^{\circ}$ C, 离心 15 min, 将离心后的上清液转移至新的 1.5 ml 离心管中。

d. 根据上清液的体积加入 1/5 量的 6×Loading Buffer，混匀，用沸水煮 5 min，煮好后立即将蛋白放在冰上使其冷却，冷却后分装，放在-20℃冰箱保存。

(2) 配胶：配置 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺分离胶和压缩胶。

(3) 上样：往电泳槽中加满 1×电泳缓冲液，用移液枪往孔中加入蛋白样品，加入前应充分混匀。蛋白样品孔的两侧分别加入 3 μl 蛋白 Marker。

(4) 电泳：初始电泳恒定电压设置为 90 V，半小时后将电压调至 120 V。

(5) 转膜：剪好相应大小的 PVDF 膜，用甲醇将膜活化，根据目的蛋白分子量大小，切下相应大小的凝胶。将膜与凝胶贴合好后放入转膜架，倒入 1×电转液，将电转槽置于冰水中，将电流设置为 300 mA，目的蛋白分子量不同，转膜时间也不同，根据蛋白分子量而定。

(6) 封闭：转膜结束后将膜取出，放于 5%脱脂牛奶中，放在慢摇床上室温封闭 2 小时。

(7) 一抗孵育：弃去封闭液，用 1×TBST 洗膜 3 次，15 min/次。加入用抗体稀释液配制好的一抗置于 4℃孵育过夜。β-actin (1:1000)，P2X4 (1:800)，NLRP3 (1:800)，Caspase-1 (1:400)，GSDMD (1:400)，IL-1β (1:400)，TNF-α (1:400)，IL-18 (1:400)、p38 MAPK (1:800)，p-p38 MAPK (1:800)。

(8) 二抗孵育：1×TBST 洗膜 3 次，每次 15 min。加入用抗体稀释液配制好的二抗，室温孵育 2 h。山羊抗兔 (1:2000)，山羊抗小鼠 (1:2000)。孵育后回收二抗，用 1×TBST 洗膜 3 次，15 min/次。

(9) 曝光：将发光液按 1:1 配制，混匀。将 PVDF 膜正面朝上放置于凝胶成像系统上，在膜上均匀滴加发光液，置于凝胶成像仪中，曝光，完成操作后保存蛋白条带图。

(10) 图像分析：采用 Image J 软件分析蛋白条带的 IOD 值，再分析相应目的蛋白的内参条带的 IOD 值，最终得到目的蛋白与相应内参的 IOD 比值。

### 2.2.7 免疫荧光双标

采用免疫荧光双标法检测卫星胶质细胞 P2X4 与 GFAP 的共定位表达情况。

(1) 细胞培养：将无菌爬片置于 24 孔板内，提前用多聚赖氨酸 (PLL) 包被爬片 10 min，用 PBS 洗 3 遍，将 SGCs 均匀接种于包被好的细胞爬片上，待细胞贴壁长至 70%左右，进行质粒转染，转染 4~6 h 后将原有培养基弃去，更换为含药培养基，更换好培养基后将孔板置于 37℃细胞培养箱继续培养 24 h。

(2) 固定：先用 PBS 洗 2 次，再用 4% PFA 固定 20 min。固定之后用 PBS 洗片，3 次，5 min/次。

(3) 细胞通透：往每个细胞爬片加 500  $\mu$ l 0.5% Triton X-100 通透液透膜处理 10 min，打孔之后用 PBS 洗片，3 次，5 min/次。

(4) 封闭：往每个细胞爬片上滴加封闭液（山羊血清），置于 37°C 水浴封闭 1 h。

(5) 一抗孵育：吸水纸吸掉封闭液，不洗。往细胞爬片上滴加新配制的一抗，一抗用 PBS 稀释，稀释比例如下：兔源性 P2X4 (1: 100)，鼠源性 GFAP (1: 100)。加完一抗后放于 4°C 冰箱的暗盒中，孵育过夜。

(6) 二抗孵育：一抗孵育完后，PBS 洗 3 次，每次 5 min。吸水纸吸尽多余液体后往细胞爬片上滴加新配制的二抗，二抗用 PBS 稀释，稀释比例如下：羊抗兔 TRITC (1: 200)，羊抗鼠 FITC (1: 200)。加完二抗后放于湿盒中，37°C 避光孵育 1 h。

(7) 染核：PBS 洗片，3 次，5 min/次。吸水纸吸尽多余液体后往细胞爬片上滴加 DAPI 染核液，室温避光孵育 5 min。

(8) 封片：PBS 洗片，3 次，5 min/次，用吸水纸吸尽爬片上多余液体。在载玻片上滴加少量防荧光淬灭剂，轻轻将爬片倒扣在载玻片上，可在爬片边缘涂少量指甲油防止爬片移动。

(9) 拍片：使用共聚焦显微镜拍片，荧光强度用 Image-Pro Plus 软件分析。

### 2.2.8 酶联免疫吸附实验 (ELISA)

采用酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测各组 SGCs 上清液以及 Transwell 小室共培养系统中下室神经元细胞上清液中的炎症因子 (TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-18) 的表达情况。将 SGCs 均匀接种于 12 孔板中，待细胞增长至 70%，进行质粒转染，转染 4~6 h 后将原有培养基弃去，更换为含药培养基，更换好培养基后将孔板置于 37°C 细胞培养箱继续培养 24 h，24 h 后收集上清液于离心管中，4000 rpm，离心 5 min，去除细胞碎片和杂质。先将标准品倍比稀释成五个浓度梯度，加样后用封板膜封板，37°C 水浴 30 min。弃去液体、甩干，洗涤液洗涤 5 次。往每孔加入 50  $\mu$ l 酶标试剂，37°C 水浴 30 min，孵育后弃取液体，甩干，用洗涤液洗涤 5 次，每次 30 s。每孔加显色剂 A 液和 B 液，避光反应 10 min，最后加终止液终止反应。立即用酶标仪测量 450 nm 处各孔的 OD 值，分析结果。

### 2.2.9 细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度检测

采用 BBCellProbe<sup>®</sup> F03 法（贝博生物）检测各组 SGCs 内 Ca<sup>2+</sup>浓度。将 SGCs 均匀接种于 24 孔板中，待细胞增长至 70%，进行质粒转染，转染 4~6 h 后将原有培养基弃去，更换为含药培养基，更换好培养基后将孔板置于 37°C 细胞培养箱继续培养 24 h。用 Hank's 平衡盐溶液（HBSS）将 BBCellProbe<sup>®</sup> F03 溶液稀释 1000 倍，配制成 BBCellProbe<sup>®</sup> F03 染色工作液。用 HBSS 将培养好的 SGCs 洗 3 次，每孔加入配置好的工作液，覆盖细胞即可，置于细胞培养箱孵育 30 min，孵育完用 HBSS 洗涤细胞两次加入 HBSS 覆盖细胞，继续在细胞培养箱孵育 30 min。使用酶标仪进行荧光钙离子检测，激发波长为 488 nm，发射波长为 516 nm。

### 2.2.10 细胞内ROS含量检测

采用活性氧（ROS）荧光法试剂盒检测各组 SGCs 内 ROS 含量。将 SGCs 均匀接种于 6 孔板中，待细胞增长至 70%，进行质粒转染，转染 4~6 h 后将原有培养基弃去，更换为含药培养基，更换好培养基后将孔板置于 37°C 细胞培养箱继续培养 24 h。按照 Elabscience 公司的活性氧（ROS）荧光法测试盒说明书进行操作，方法简述如下：

（1）配制工作液：

- a. 试剂三工作液：按纯水：试剂三=9：1 的比例稀释，混匀。
- b. 试剂一工作液：按试剂一：试剂三工作液=1：1000 的比例稀释，混匀。
- c. 试剂二工作液：按试剂二：试剂三工作液=1：200 的比例稀释，混匀

（2）设置阳性对照孔（加试剂二工作液）和阴性对照孔。

（3）将孔板内原有培养基弃去，用配制好的试剂三工作液洗涤细胞。

（4）往每孔中加入适量试剂一工作液，37°C 水浴 30 min，该过程应避光。

（5）孵育后将细胞吹落，并转移至新的 1.5 ml 离心管中，离心后弃去上清，用试剂三工作液洗涤细胞，离心后用试剂三工作液重悬细胞。

（6）将细胞悬液充分混匀后，用移液枪转移至 96 孔板中，每孔 100  $\mu$ l 细胞悬液。

（7）将 96 孔板置于酶标仪中进行检测，设置激发波长为 500 nm，发射波长为 525 nm。根据 OD 值分析结果。

### 2.2.11 Annexin V-FITC / PI 细胞凋亡检测

采用 Annexin V-FITC / PI 细胞凋亡检测试剂盒检测各组 SGCs 细胞凋亡情况。将 SGCs 均匀接种于 6 孔板中，待细胞增长至 70%，进行质粒转染，转染 4~6 h 后将原有培养基弃去，更换为含药培养基，更换好培养基后将孔板置于 37°C 细胞培养箱继续培养 24 h。根据细胞凋亡检测说明书进行操作：

- (1) 消化收集细胞，用 PBS 洗涤细胞 2 次，2000 rpm 离心 5 min。
- (2) 离心后弃去上清，加入 500  $\mu$ l Binding Buffer，轻轻吹打重悬细胞。
- (3) 重悬细胞后，每管加 5  $\mu$ l Annexin V-FITC，混匀，再加入 5  $\mu$ l Propidium iodide，混匀，避光反应 15 min。
- (4) 用流式细胞仪进行检测。
- (5) 数据分析。

## 2.3 实验数据分析

实验数据的统计分析采用 SPSS 21.0 软件，制作统计分析图用 Graphpad Prism 软件。采用单因素方差分析 (ANOVA) 进行多组间的结果比较，然后用最小显著性差异法 (Least-significant difference, LSD) 进行两两比较。实验数据用平均数 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SEM) 表示， $p < 0.05$  代表结果有统计学意义。

## 第3章 实验结果

### 3.1 原代培养背根神经节SGCs纯度鉴定

原代培养的背根神经节卫星胶质细胞通过免疫荧光法进行纯度鉴定，使用的标记物为胶质纤维酸性蛋白（GFAP），GFAP 是卫星胶质细胞特异性标志物。结果显示，本研究所用 SGCs 纯度在 95%以上，可以用于后期实验。

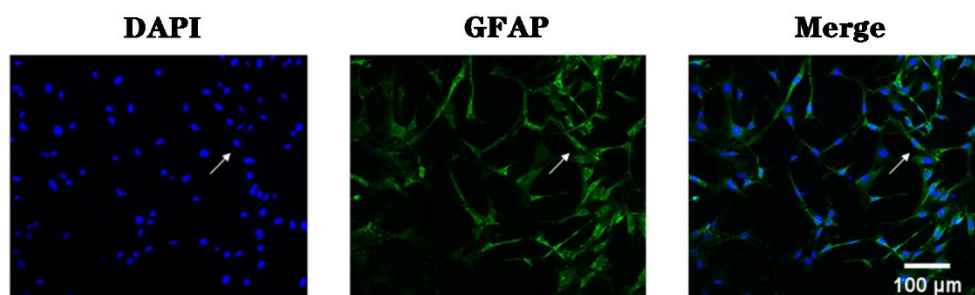


图 1 免疫荧光法鉴定卫星胶质细胞的纯度

**Fig.1 Purity of satellite glial cells purified by immunofluorescence.** The blue signal indicates nuclear staining with DAPI. The green signal represents GFAP staining with FITC. Scale bar: 100 μm

### 3.2 高脂浓度筛选

经过不同浓度梯度的高脂分别处理 24 h 和 48 h 后，分析发现，作用 24 h 后，与 Ctrl 组相比，浓度为 0.4 mM 的高脂处理细胞存活率在 90%左右，而浓度为 0.6 mM 的高脂处理细胞存活率降至 75%左右 ( $p<0.01$ )，浓度为 0.8 mM 的高脂处理细胞存活率降至 65%左右 ( $p<0.01$ )。作用 48 h 后，与 Ctrl 组相比，浓度为 0.4 mM、0.6 mM、0.8 mM 的高脂处理细胞存活率分别降至 85%、65%、60%左右 ( $p<0.01$ )，说明一定浓度的高脂对细胞存活状态有影响，且浓度越高对细胞存活率的影响越大。上述结果显示不同高脂浓度中 0.6 mM 浓度的高脂处理 24 h 对 SGCs 活性有一定影响，但损伤程度没这么大。因此，本研究最终选用高脂浓度 0.6 mM、培养时间 24 h 作为建立高脂细胞损伤模型的条件。

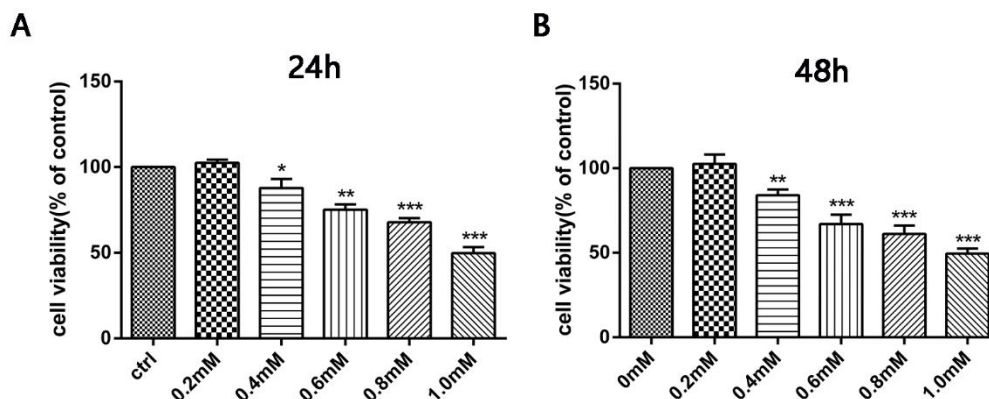


图2 不同高脂浓度对 SGCs 存活的影响

**Fig.2 Effect of different concentrations of HF on SGCs survival rates.** Cell viability of SGCs after treatment with different concentrations of HF for 24h (A) and 48h (B). Data were expressed as Mean±SEM (n=6). \* $p < 0.05$  vs. Ctrl group; \*\* $p < 0.01$  vs. Ctrl group; \*\*\* $p < 0.001$  vs. Ctrl group.

### 3.3 欧前胡素浓度筛选

#### 3.3.1 CCK-8检测欧前胡素各浓度对SGCs存活的影响

经过不同浓度的欧前胡素处理 24 h 后，分析发现，1  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$  以及 100  $\mu\text{M}$  欧前胡素处理组与 Ctrl 组相比，各组细胞存活率无明显差异 ( $p > 0.05$ )，而 1000  $\mu\text{M}$  欧前胡素处理组与 Ctrl 组相比，细胞存活率降至 60% 左右 ( $p < 0.01$ )。因此，我们以筛选出来的 HF 浓度 (0.6 mM) 为模型在 0  $\mu\text{M}$ ~160  $\mu\text{M}$  之间设置浓度梯度来筛选欧前胡素的用药浓度。在 0  $\mu\text{M}$ ~160  $\mu\text{M}$  之间设置 6 个欧前胡素浓度梯度分别为：0  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$ 、20  $\mu\text{M}$ 、40  $\mu\text{M}$ 、80  $\mu\text{M}$ 、160  $\mu\text{M}$ 。经过不同浓度梯度的欧前胡素处理 24 h 后，分析发现，20  $\mu\text{M}$  的欧前胡素开始对细胞活性产生影响，与 Ctrl 组相比有统计学差异 ( $p < 0.05$ )，40  $\mu\text{M}$  的欧前胡素处理组与 Ctrl 组相比有显著性差异 ( $p < 0.01$ )；而 80  $\mu\text{M}$  的欧前胡素处理组对细胞活性影响较大。因此，我们选用 40  $\mu\text{M}$  的浓度作为欧前胡素的用药浓度。

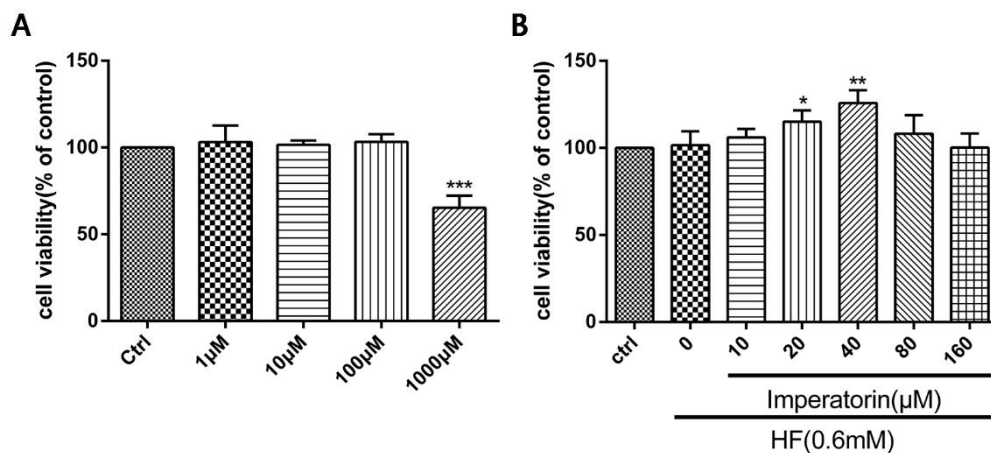


图3 不同欧前胡素浓度对 SGCs 存活的影响

**Fig.3 Effect of different concentrations of IMP on SGCs survival rates.** A. SGCs survival rate under different concentrations of IMP. B. SGCs survival rate under different concentrations of IMP and 0.6mM HF. Data were expressed as Mean±SEM (n=6) . \* $p < 0.05$  vs. Ctrl group; \*\* $p < 0.01$  vs. Ctrl group; \*\*\* $p < 0.001$  vs. Ctrl group.

### 3.3.2 欧前胡素处理对高脂诱导的SGCs损伤的存活率的影响

以 0.6 mM 的 HF 浓度建立细胞损伤模型，浓度为 40 µM 的 IMP 处理 24 h 后，用 CCK-8 法检测 Ctrl 组、HF 组、HF+IMP 组的 OD 值。分析发现，与 Ctrl 组相比，HF 能显著降低 SGCs 存活率 ( $p < 0.01$ )，提示 HF 对 SGCs 有一定的损伤作用；与 HF 组相比，用 IMP 处理细胞后 SGCs 存活率有所上升 ( $p < 0.05$ )，提示 IMP 对 HF 所致 SGCs 损伤有一定的保护作用。

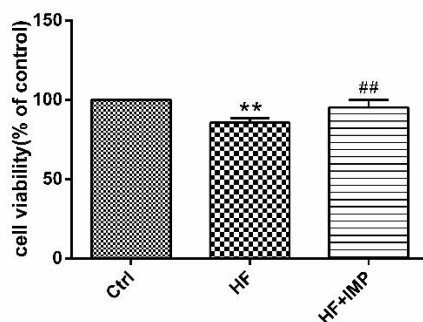


图4 各处理组对 SGCs 活性的影响

**Fig.4 Effect of treatment groups on SGCs activity.** Data were expressed as Mean±SEM (n=6) . \*\* $p < 0.01$  vs. Ctrl group; ## $p < 0.01$  vs. HF group.



### 3.4 欧前胡素对高脂诱导的SGCs损伤模型中P2X4受体表达的影响

#### 3.4.1 Real-time PCR法检测SGCs中P2X4 mRNA表达结果

各组细胞药物处理 24 h 后提取总 RNA，用 Real-time PCR 法检测 SGCs 中 P2X4 mRNA 的相对表达情况。结果显示：与 Ctrl 组相比，HF 能明显提高 P2X4 mRNA 表达水平 ( $p < 0.001$ )；经欧前胡素或 P2X4 shRNA 处理后，P2X4 mRNA 的表达水平与 HF 组相比较明显下降 ( $p < 0.001$ )，而细胞转染 NC shRNA 对 P2X4 mRNA 的表达水平无明显影响 ( $p > 0.05$ )。

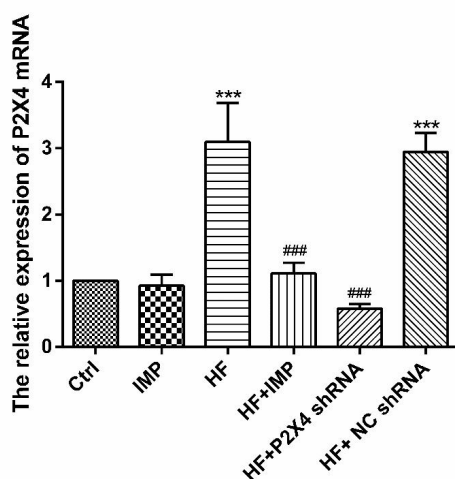


图 5 Real-time PCR 检测各组 SGCs 中 P2X4 mRNA 的表达

Fig.5 The expression of P2X4 mRNA in SGCs was measured by Real-time PCR. Data were expressed as Mean±SEM (n=6).\*\*\* $p < 0.001$  vs. Ctrl group;### $p < 0.001$  vs. HF group.

#### 3.4.2 蛋白印迹法检测SGCs中P2X4蛋白表达结果

各组细胞药物处理 24 h 后提取蛋白，用 Western Blot 检测 SGCs 中 P2X4 蛋白的相对表达情况。实验结果表明：与 Ctrl 组相比，HF 能明显上调 P2X4 蛋白表达水平 ( $p < 0.001$ )；HF+IMP 组中 P2X4 蛋白的表达水平与 HF 组相比较明显下降 ( $p < 0.001$ )；同时，HF+P2X4 shRNA 组中 P2X4 蛋白的表达水平与 HF 组相比较显著下降 ( $p < 0.001$ )，而细胞转染 NC shRNA 对 P2X4 蛋白表达水平无明显影响 ( $p > 0.05$ )。

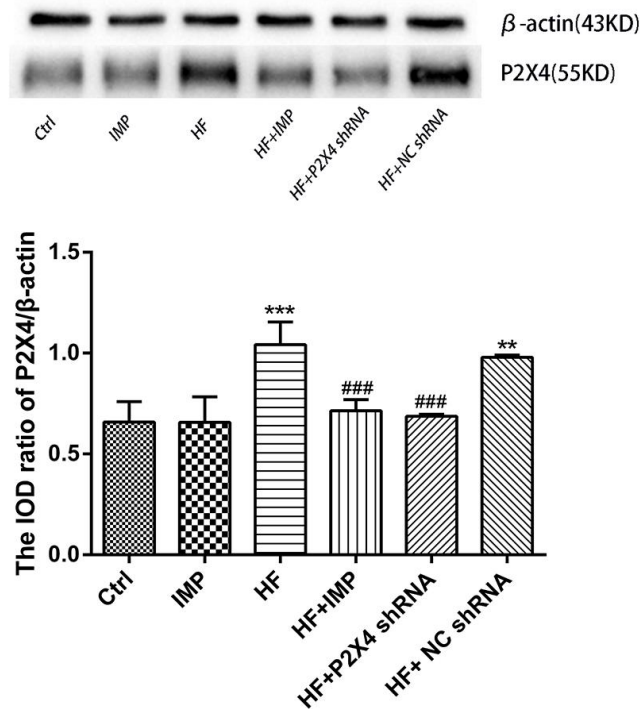


图6 蛋白印迹法检测各组 SGCs 中 P2X4 蛋白的表达

**Fig.6** The expression of P2X4 protein in SGCs was measured by Western blot. Data were expressed as Mean±SEM (n=6). \*\*\* $p < 0.001$  vs. Ctrl group; \*\* $p < 0.01$  vs. Ctrl group; ### $p < 0.001$  vs. HF group.

### 3.4.3 免疫荧光双标法检测SGCs中P2X4和GFAP共表达结果

用免疫荧光双标法检测 SGCs 中 P2X4 和胶质纤维酸性蛋白 (GFAP, 卫星胶质细胞标记物) 共表达情况。结果显示: SGCs 中 P2X4 与 GFAP 存在共表达情况; 在 HF 组中 P2X4 与 GFAP 的共表达水平显著高于 Ctrl 组 ( $p < 0.001$ ); HF+NC shRNA 组中 P2X4 与 GFAP 的共表达水平与 HF 组比较无明显差异 ( $p > 0.05$ ); HF+IMP 组中 P2X4 与 GFAP 的共表达水平与 HF 组相比较明显下降 ( $p < 0.001$ ); 同时, HF+P2X4 shRNA 组中 P2X4 与 GFAP 的共表达水平与 HF 组相比较显著下降 ( $p < 0.001$ )。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/955344222012011044>