

芒果苷激活 Nrf2/HO-1 信号通路在 hSOD1^{G93A} 诱导的小鼠 NSC-34 细胞焦亡中的作用

苏博洋^{1,2}, 何正卿³, 刘静⁴, 李懋^{1,2}, 黄旭升^{1,2*}

¹解放军医学院, 北京 100853; ²解放军总医院第一医学中心神经内科, 北京 100853; ³首都医科大学附属北京友谊医院神经内科, 北京 100050; ⁴解放军总医院第二医学中心老年医学研究所/国家老年疾病临床医学研究中心, 北京 100853

[中图分类号] R744.8 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.1207.2024.1227

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 苏博洋, 何正卿, 刘静, 等. 芒果苷激活 Nrf2/HO-1 信号通路在 hSOD1^{G93A} 诱导的小鼠 NSC-34 细胞焦亡中的作用[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(4): 475-482.

[收稿日期] 2024-08-06 [录用日期] 2024-10-23 [上线日期] 2024-12-27

[摘要] **目的** 探究芒果苷(MF)调控核因子E2相关因子2/血红素氧合酶-1(Nrf2/HO-1)信号通路对肌萎缩性侧索硬化(ALS)细胞模型焦亡的影响。**方法** (1)转染 hSOD1^{WT}质粒和 hSOD1^{G93A}质粒的 NSC-34 细胞系, 随机分为空白组、模型组、MF(100 μmol/L)组、MF(200 μmol/L)组; 采用 MF 处理细胞 24 h。使用 CCK-8 法检测细胞活力; 乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测试剂盒检测 LDH 释放量; ELISA 法检测培养上清液中白细胞介素(IL)-1β 和 IL-18 的含量; Western blotting 检测 Nrf2、HO-1、NADPH 醌氧化还原酶(NQO-1)、NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)、gasdermin D(GSDMD)-N、胱天蛋白酶-1(caspase-1)的表达水平。(2)小鼠 hSOD1^{G93A} NSC-34 细胞随机分为模型组、MF(200 μmol/L)组、Nrf2-siRNA 组、Nrf2-siRNA+MF(200 μmol/L)组, 采用 LipofectamineTM 3000 瞬时转染 Nrf2-siRNA, Western blotting 检测 Nrf2、HO-1、NQO-1、NLRP3、caspase-1 和 GSDMD-N 蛋白的表达水平。**结果** (1)CCK-8 法检测结果显示, 300 μmol/L 及以下浓度 MF 处理 24 h 后, hSOD1^{G93A} NSC-34 细胞活力无明显变化($P>0.05$)。与空白组比较, 模型组细胞培养上清液中 LDH 释放量及 IL-1β 和 IL-18 含量增加($P<0.001$), Nrf2、HO-1 和 NQO-1 蛋白表达水平下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$), NLRP3、caspase-1 和 GSDMD-N 蛋白表达水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$ 或 $P<0.001$)。与模型组比较, MF(100 μmol/L)组和 MF(200 μmol/L)组细胞培养上清液中 LDH 释放量、IL-18 和 IL-1β 含量减少($P<0.001$), NLRP3、caspase-1、GSDMD-N 蛋白表达水平降低($P<0.05$ 或 $P<0.001$), Nrf2、HO-1 和 NQO-1 蛋白表达水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。(2)与模型组比较, MF(200 μmol/L)组小鼠 hSOD1^{G93A} NSC-34 细胞中 Nrf2、HO-1 和 NQO-1 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.001$), NLRP3、caspase-1 和 GSDMD-N 蛋白表达水平明显降低($P<0.001$); Nrf2-siRNA 组细胞中 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平降低($P<0.01$ 或 $P<0.001$), 而 NLRP3、caspase-1 和 GSDMD-N 蛋白表达水平升高($P<0.001$)。与 Nrf2-siRNA 组比较, Nrf2-siRNA+MF(200 μmol/L)组细胞中 Nrf2、HO-1 和 NQO-1 蛋白表达水平升高($P<0.01$ 或 $P<0.001$), NLRP3、caspase-1 和 GSDMD-N 蛋白表达水平降低($P<0.001$)。**结论** MF 可通过 Nrf2/HO-1 信号通路抑制 ALS 细胞模型焦亡, 发挥细胞保护作用。

[关键词] 肌萎缩侧索硬化; 芒果苷; 核因子E2相关因子2; 细胞焦亡; 信号通路

Effect of mangiferin on hSOD1^{G93A}-induced pyroptosis in mice *via* activating Nrf2/HO-1 signaling pathway

Su Bo-Yang^{1,2}, He Zheng-Qing³, Liu Jing⁴, Li Mao^{1,2}, Huang Xu-Sheng^{1,2*}

¹Medical School of Chinese PLA, Beijing 100853, China

²Department of Neurology, the First Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

³Department of Neurology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

⁴Institute of Geriatrics/National Clinical Research Center of Geriatrics Disease, the Second Medical Center of Chinese PLA General

[作者简介] 苏博洋, 医学硕士, 主要从事肌萎缩侧索硬化方面的研究

[通信作者] 黄旭升, E-mail: lewish301@sina.com

Hospital, Beijing 100853, China

*Corresponding author, E-mail: lewish301@sina.com

[Abstract] Objective To explore the effect of mangiferin (MF) on pyroptosis in an amyotrophic lateral sclerosis (ALS) cell model by regulating the nuclear factor erythroid 2-related factor 2/heme oxygenase-1 (Nrf2/HO-1) signaling pathway. **Methods** (1) Mouse NSC-34 cell lines transfected with hSOD1^{WT} and hSOD1^{G93A} plasmids were randomly divided into blank group, model group, MF (100 μmol/L) group, MF (200 μmol/L) group. MF was added into the culture plate for 24 hours. Cell viability was assessed using CCK-8 kit. Lactate dehydrogenase (LDH) release was measured using LDH cytotoxicity detection kit. Levels of inflammatory factors interleukin (IL)-1β and IL-18 in cell supernatant were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of Nrf2, HO-1, NADPH quinone oxidoreductase-1 (NQO-1), NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), gasdermin D (GSDMD)-N and caspase-1 was detected by Western blotting. (2) Mouse hSOD1^{G93A} NSC-34 cells were randomly divided into model group, MF(200 μmol/L) group, Nrf2-siRNA group and Nrf2-siRNA+MF(200 μmol/L) group. The cells were transiently transfected with Nrf2-siRNA using Lipofectamine™ 3000. Western blotting was used to detect the protein expression levels of Nrf2, HO-1, NQO-1, NLRP3, caspase-1 and GSDMD-N. **Results** (1) The results of the CCK-8 assay showed that after the hSOD1^{G93A} NSC-34 cells were treated with MF at concentrations of 300 μmol/L and below for 24 hours, the changes in cell viability were not significant ($P>0.05$). Compared with blank group, the release of LDH, the contents of IL-1β and IL-18 in the cell culture supernatant of model group were increased ($P<0.001$); the protein expression levels of Nrf2, HO-1, and NQO-1 were decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$); the protein expression levels of NLRP3, caspase-1, and GSDMD-N were increased ($P<0.05$ or $P<0.01$ or $P<0.001$). Compared with model group, the release of LDH, the contents of IL-18 and IL-1β in the culture supernatant in MF(100 μmol/L) and MF(200 μmol/L) groups were decreased ($P<0.001$); the protein expression levels of NLRP3, caspase-1 and GSDMD-N were decreased ($P<0.05$ or $P<0.001$), and the expression levels of Nrf2, HO-1 and NQO-1 were increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). (2) Compared with model group, the protein expression levels of Nrf2, NO-1 and NQO-1 were increased ($P<0.05$ or $P<0.001$) in MF(200 μmol/L) group, while the protein expression levels of NLRP3, caspase-1 and GSDMD-N were decreased ($P<0.001$); the protein expression levels of Nrf2 and HO-1 were decreased in Nrf2-siRNA group ($P<0.01$ or $P<0.001$), while the protein expression levels of NLRP3, caspase-1 and GSDMD-N were increased ($P<0.001$). Compared with Nrf2-siRNA group, the protein expression levels of Nrf2, HO-1 and NQO-1 in Nrf2-siRNA+MF(200 μmol/L) group were increased ($P<0.01$ or $P<0.001$), and the protein expression levels of NLRP3, caspase-1 and GSDMD-N were decreased ($P<0.001$). **Conclusion** MF can inhibit pyroptosis in the ALS cell model through Nrf2/HO-1 signaling pathway, playing a protective role.

[Key words] amyotrophic lateral sclerosis; mangiferin; nuclear factor E2 related factor; pyroptosis; signaling pathway

肌萎缩性侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)是一种同时累及上下运动神经元的神经退行性疾病, 主要临床表现为肌无力、肌萎缩、肌束颤等^[1]。ALS预后不良, 患者多于发病后3~5年死于呼吸衰竭或肺部感染, 其发病机制尚不明确^[2]。14%~20%的家族性ALS和1%~7%的散发性ALS是由Cu²⁺/Zn²⁺超氧化物歧化酶(SOD1)基因突变所致^[3]。人SOD1基因突变已被广泛用于构建ALS细胞模型和动物模型^[4-5]。细胞焦亡是一种近年发现的程序性细胞死亡途径^[6]。在神经退行性疾病发病过程中, 错误折叠的蛋白质可诱导NOD样受体蛋白3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)炎症小体激活并使其蛋白构象发生改变, 进而活化胱天蛋白酶-1(caspase-1)^[7]; 活化的caspase-1切割gasdermin D(GSDMD)蛋白, 释放出其N端活性域肽段, 诱导细胞膜穿孔破裂、细胞死亡^[7-8]。此外, 活化的caspase-1可介导白细胞介素(interleukin, IL)-1β和IL-18的释放, 参与炎症反应。这种导致质膜破裂以及IL-1β和IL-18释放到细胞外诱导细胞死亡的过程称为细胞焦亡^[6]。已发现在SOD1^{G93A}转基因小鼠和ALS患者的中枢神经系统

中IL-1β水平升高和caspase-1激活^[7]。在散发性和C9orf72基因突变的ALS患者死后的脊髓和大脑皮质组织中观察到NLRP3炎症小体以及caspase-1、GSDMD激活^[9], 提示焦亡可能是导致皮质和脊髓神经元死亡的原因之一, 在ALS发病机制中起一定作用。

芒果苷(mangiferin, MF)是一种广泛存在于植物中的多酚类化合物, 具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等作用^[10]。研究显示, MF可激活核因子E2相关因子2(nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2)^[11-12], 在氧化应激和炎症的调节中发挥重要作用, 可抑制NLRP3激活, 从而发挥抗焦亡作用^[13]。在SOD1^{G93A}转基因ALS小鼠模型中, Nrf2表达下降, NLRP3表达升高^[14]。激活Nrf2信号通路可缓解ALS模型小鼠的运动障碍, 减少运动神经元丢失, 延长小鼠生存期^[15]。MF在ALS中的作用目前尚不清楚。本研究探讨了MF调控Nrf2/血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)信号通路对ALS模型细胞焦亡的影响, 旨在为ALS的治疗研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞系 小鼠 NSC-34 细胞系以及采用慢病毒转染 hSOD1 野生型(hSOD1^{WT})质粒和 hSOD1 突变型(hSOD1^{G93A})质粒的 NSC-34 细胞,均由哈尔滨医科大学附属第一医院丰宏林教授团队提供。

1.2 实验材料 MF(HY-N0290, 美国 MCE 公司); DMEM 培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素溶液、胰蛋白酶、Trizol 试剂和 LipofectamineTM 3000 转染试剂(11965092、A5669701、15070063、25200056、15596018CN、L3000008, 美国赛默飞世尔科技有限公司); RIPA 裂解液(R0010, 北京索莱宝科技有限公司); 5× 蛋白变性上样液(LT101, 上海雅酶生物科技有限公司); IL-1 β 和 IL-18 ELISA 试剂盒(JL8442、JL20253, 上海江莱生物科技有限公司); CCK-8 试剂、ECL 显影液、BCA 试剂盒、HiScript III RT SuperMix、Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix(A311-01、E423、E112、R323、Q712, 南京诺唯赞生物科技有限公司); 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒(C0016, 上海碧云天生物技术股份有限公司); 抗 Nrf2、HO-1、NADPH 醌氧化还原酶-1(NADPH quinone oxidoreductase-1, NQO-1)、NLRP3、胱天蛋白酶-1(caspase-1)、增殖细胞核抗原(PCNA)抗体和 HRP 标记的山羊抗兔 IgG、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG(16396-1-AP、10701-1-AP、67240-1-Ig、19771-1-AP、31020-1-AP、60097-1-Ig、SA00001-2、SA00001-1, 武汉三鹰生物技术有限公司); 抗 GSDMD-N、GAPDH 抗体(ab219800、ab8245, 英国 Abcam 公司); Nrf2-siRNA 和基因引物序列(北京擎科生物科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞分组 为探究 MF 是否通过 Nrf2 信号通路抑制细胞焦亡, (1)将小鼠 NSC-34 细胞随机分为 4 组: 空白组、模型组、MF(100 μ mol/L)组、MF(200 μ mol/L)组。空白组采用 hSOD1^{WT} NSC-34 细胞, 其他各组均采用 hSOD1^{G93A} NSC-34 细胞。观察 MF 对小鼠 NSC-34 细胞活力、LDH 释放量, 炎性因子 IL-1 β 、IL-18、Nrf2、HO-1、NQO-1、NLRP3、caspase-1、GSDMD-N 蛋白表达水平的影响。(2)将小鼠 hSOD1^{G93A} NSC-34 细胞随机分为 4 组: 模型组、MF(100 μ mol/L)组、Nrf2-siRNA 组、Nrf2-siRNA+MF(200 μ mol/L)组采用 LipofectamineTM 3000 瞬时转染 Nrf2-siRNA。观察 MF 对敲低 Nrf2 表达的小鼠 NSC-34 细胞 Nrf2、HO-1、NQO-1、NLRP3、GSDMD-N、caspase-1 蛋白表达的影响。

1.3.2 细胞培养 使用完全培养基(90%DMEM, 10%胎牛血清, 1%青霉素-链霉素溶液)培养细胞,

置于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中, 每隔 2 d 更换一次新鲜培养基。

1.3.3 CCK-8 法检测细胞活力 将 hSOD1^{G93A} NSC-34 细胞以 1×10^4 个/孔接种到 96 孔板, 置于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 的细胞培养箱中培养, 待细胞贴壁后加入不同浓度的 MF 进行预处理, 浓度梯度为 0、50、100、200、300、400 μ mol/L。24 h 后弃去培养基, 每孔加入 100 μ l CCK-8 检测液, 置于细胞培养箱中孵育 2 h 后使用酶联免疫检测仪(美国赛默飞世尔科技有限公司)在 450 nm 处检测吸光度。

1.3.4 LDH 释放量测定 取各组细胞培养上清液, 按照 LDH 细胞毒性检测试剂盒说明书进行操作, 使用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长处检测吸光度, 并计算各组 LDH 释放量。

1.3.5 ELISA 法检测炎性因子 IL-1 β 和 IL-18 的含量 取各组细胞培养上清液, 1000 r/min 离心 5 min 后取上清, 按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 使用酶联免疫检测仪在 450 nm 处检测吸光度, 并根据标准曲线计算炎性因子含量。

1.3.6 实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)检测 mRNA 水平 在细胞转染小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)24 h 后检测靶 mRNA 的水平。使用 Trizol 试剂从细胞中提取总 RNA。通过紫外生物光度计(德国 Eppendorf 公司)检测总 RNA 浓度。根据制造商说明书, 使用 HiScript III RT SuperMix 进行反转录得到 cDNA, 使用 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 进行 PCR 扩增, 引物序列见表 1。

1.3.7 Western blotting 检测 Nrf2、HO-1、NQO-1、NLRP3、GSDMD-N、caspase-1 蛋白表达水平 各组细胞培养至密度为 80%~90% 时加入含蛋白抑制剂的 RAPI 裂解液(6 孔板, 120 μ l/孔), 置于冰上裂解 5 min。将样品在 4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 用 BCA 试剂盒进行蛋白浓度测定, 剩余上清液加入 5× 蛋白变性上样液, 在沸水中煮 15 min。取蛋白样品行 SDS-PAGE 凝胶电泳(100 V 20 min; 160 V 30 min), 随后转到 PVDF 膜上(220 mA, 80 min), 使用 TBST 溶液配制的 5% 脱脂奶粉封闭 100 min, 分别加入抗 Nrf2(1:3000)、HO-1(1:3000)、NQO-1(1:3000)、GAPDH(1:5000)、NLRP3(1:3000)、GSDMD-N(1:1000)、caspase-1(1:3000)、PCNA(1:5000)抗体在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜, TBST 洗涤 3 次 \times 10 min, 然后在室温下分别加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:2000)和 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG(1:1000)二抗孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次。按照 1:1 的比例配制 ECL 显影液, 并置于显影仪中曝光拍照。

1.3.8 细胞转染 将 hSOD1^{G93A} NSC-34 细胞均匀铺

于6孔板中(8×10^5 个细胞/孔),待细胞密度达70%~80%后,每孔加入2 ml不含抗生素的细胞培养液,根据Lipofectamine™ 3000转染试剂说明书配制转染

溶液,随后将溶液逐滴加入到每孔中,按十字方向轻摇混匀,5% CO₂、37 °C培养箱中孵育6 h,更新细胞培养液。*Nrf2*-siRNA引物序列见表1。

表1 PCR引物序列

Tab.1 Primer sequences for PCR

| 基因 | 上游(5'-3') | 下游(5'-3') |
|---------------------|-----------------------|-------------------------|
| <i>Nrf2</i> -siRNA1 | GACCUCCUUAGACUCAAAU | AUUUGAGUCUAAGGAGGUC |
| <i>Nrf2</i> -siRNA2 | CCGAAUUACAGUGUCUUA | UUAAGACACUGUAAUUCGG |
| <i>Nrf2</i> -siRNA3 | CUCGCAUUGAUCCGAGAU | UAUCUCGGAUCAAUGCGAG |
| GAPDH | AGGTCGGTGTGAACGGATTTG | TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA |

Nrf2. 核因子E2相关因子2; GAPDH. 磷酸甘油醛脱氢酶

1.4 统计学处理 采用GraphPad Prism 8.0.2软件进行统计分析。所有数据均为计量资料,且均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验。实验独立重复3次。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MF对hSOD1^{G93A} NSC-34细胞活力的影响 MF的化学结构如图1所示。用300 μmol/L及以下浓度MF处理24 h后,hSOD1^{G93A} NSC-34细胞存活率未发生明显变化($P > 0.05$,图2)。因此,选取100 μmol/L和200 μmol/L MF用于后续干预实验。

分子式: C₁₉H₁₈O₁₁
分子量: 422.34

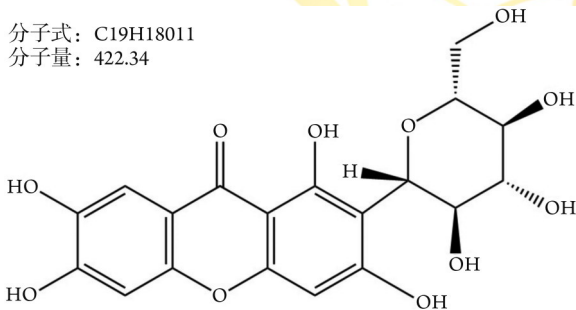
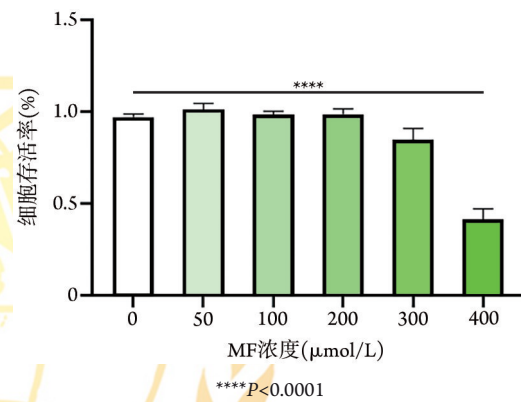
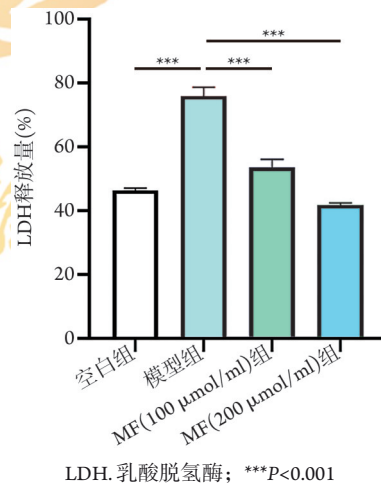


图1 芒果苷(MF)分子结构式

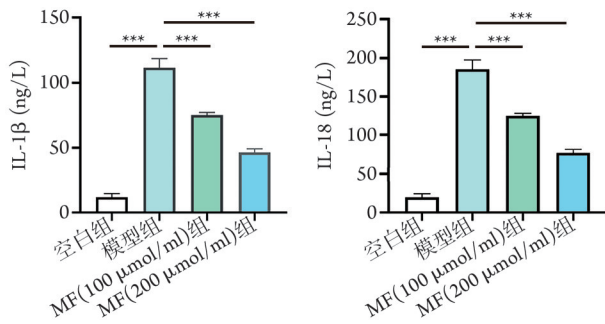
Fig.1 The molecular structural formula of mangiferin (MF)

2.2 MF对hSOD1^{G93A} NSC-34细胞培养上清液中LDH释放量的影响 与空白组比较,模型组细胞培养上清液中LDH释放量明显增加($P < 0.001$);与模型组比较, MF(100 μmol/L)组和MF(200 μmol/L)组细胞培养上清液中LDH释放量均明显减少($P < 0.001$,图3)。

2.3 MF对hSOD1^{G93A} NSC-34细胞培养上清液中炎症因子IL-1β和IL-18含量的影响 与空白组比较,模型组细胞培养上清液中IL-1β和IL-18含量明显增加($P < 0.001$);与模型组比较, MF(100 μmol/L)组和MF(200 μmol/L)组细胞培养上清液中IL-18和IL-1β含量均明显减少($P < 0.001$,图4)。

图2 芒果苷(MF)对hSOD1^{G93A} NSC-34细胞存活率的影响(CCK-8法)Fig.2 Effects of mangiferin (MF) on the viability of hSOD1^{G93A} NSC-34 cells (CCK-8 method)图3 芒果苷(MF)对hSOD1^{G93A} NSC-34细胞培养上清液中LDH释放量的影响Fig.3 Effect of mangiferin (MF) on LDH release amount from hSOD1^{G93A} NSC-34 cells

2.4 MF对hSOD1^{G93A} NSC-34细胞中Nrf2/HO-1信号通路的影响 与空白组比较,模型组细胞Nrf2、HO-1和NQO-1蛋白表达水平均明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较, MF(100 μmol/L)组和MF



IL-1β. 白细胞介素-1β; IL-18. 白细胞介素-18; ***P<0.001

图4 芒果苷(MF)对hSOD1^{G93A} NSC-34细胞培养上清液中IL-1β和IL-18含量的影响

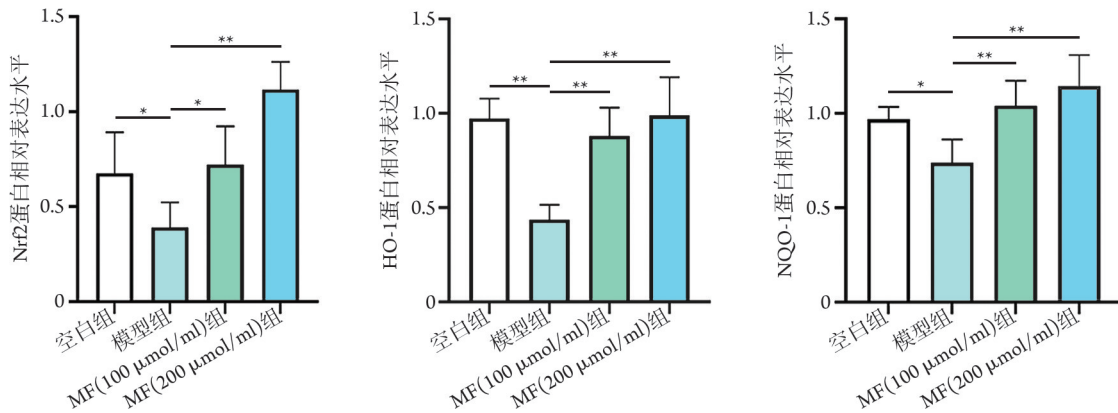
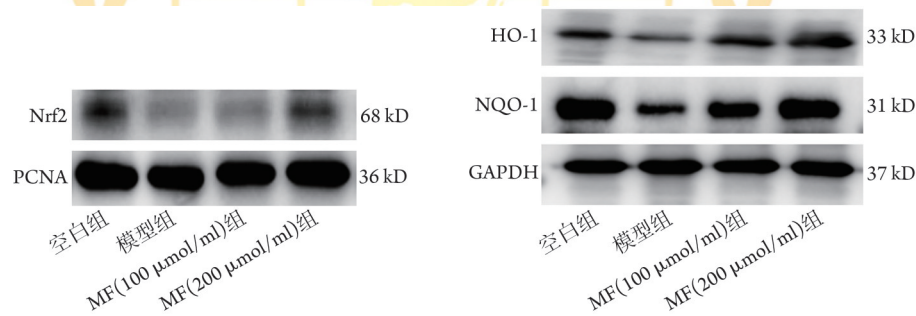
Fig. 4 Effects of mangiferin (MF) on IL-1β and IL-18 release from hSOD1^{G93A} NSC-34 cells

(200 μmol/L)组细胞Nrf2、HO-1、NQO-1蛋白表达水平均明显升高(P<0.05或P<0.01, 图5)。

2.5 MF对hSOD1^{G93A} NSC-34细胞NLRP3/caspase-1/GSDMD通路的影响 与空白组比较, 模型组细胞NLRP3、caspase-1和GSDMD-N蛋白表达水平明显升高(P<0.01或P<0.001); 与模型组比较, MF(100 μmol/L)

组和MF(200 μmol/L)组细胞NLRP3、caspase-1和GSDMD-N蛋白表达水平明显降低(P<0.05或P<0.001, 图6)。

2.6 MF对hSOD1^{G93A} NSC-34细胞Nrf2/HO-1信号通路和细胞焦亡的影响 使用3种不同Nrf2-siRNA瞬时转染入小鼠hSOD1^{G93A} NSC-34细胞中, qPCR检测结果显示, Nrf2-siRNA2抑制效果最佳, 用于后续实验(图7)。与模型组比较, MF(200 μmol/L)组小鼠hSOD1^{G93A} NSC-34细胞Nrf2、HO-1、NQO-1蛋白表达水平明显升高(P<0.05或P<0.001), NLRP3、GSDMD-N和caspase-1蛋白表达水平明显降低(P<0.001); Nrf2-siRNA组细胞Nrf2、HO-1蛋白表达水平明显降低(P<0.01或P<0.001), 而NLRP3、GSDMD-N和caspase-1蛋白表达水平明显升高(P<0.001)。与Nrf2-siRNA组比较, Nrf2-siRNA+MF(200 μmol/L)组细胞Nrf2、HO-1和NQO-1蛋白表达水平明显升高(P<0.01或P<0.001), NLRP3、GSDMD-N和caspase-1蛋白表达水平明显下降(P<0.001, 图8)。



Nrf2. 核因子E2相关因子2; PCNA. 增殖细胞核抗原; HO-1. 血红素氧合酶-1; NQO-1. NADPH醌氧化还原酶-1; *P<0.05, **P<0.01

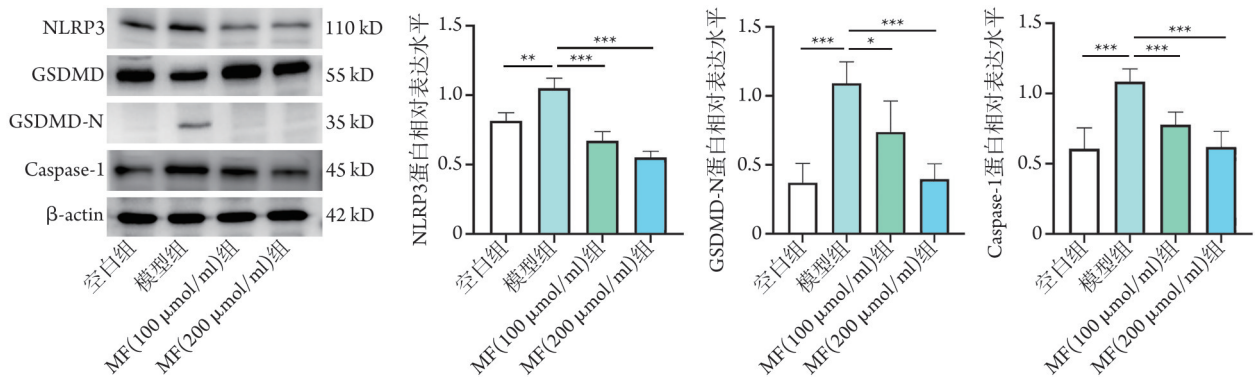
图5 芒果苷(MF)对hSOD1^{G93A} NSC-34细胞中Nrf2、HO-1、NQO-1蛋白的影响(Western blotting)

Fig. 5 Effects of mangiferin (MF) on the expression of Nrf2, HO-1, and NQO-1 proteins in hSOD1^{G93A} NSC-34 cells (Western blotting)

3 讨论

经典的细胞焦亡途径主要依靠NLRP3炎症小体激活caspase-1蛋白, 使其切割GSDMD而释放N端, 在细胞膜形成孔洞, 导致细胞膜破裂^[7,16]。Zhang

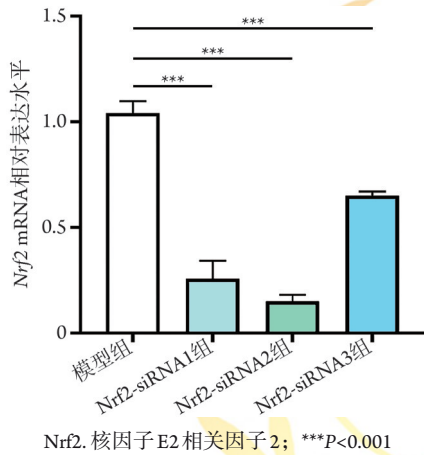
等^[17]发现, 在症状前阶段SOD1^{G93A}转基因小鼠的脊髓运动神经元中可检测到NLRP3, 疾病晚期脊髓中星形胶质细胞和小胶质细胞中NLRP3表达增加。在SOD1^{G93A}转基因小鼠腰髓中可检测到NLRP3炎症小体活化及切割的GSDMD表达增加^[18]。近期研究发



NLRP3. NOD 样受体蛋白 3; GSDMD-N. Gasdermin D 蛋白 N 端片段; caspase-1. 胱天蛋白酶-1; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

图 6 芒果苷(MF)对 hSOD1^{G93A} NSC-34 细胞中 NLRP3/caspase-1/GSDMD 通路的影响(Western blotting)

Fig.6 Effect of mangiferin (MF) on the NLRP3/caspase-1/GSDMD pathway in hSOD1^{G93A} NSC-34 cells (Western blotting)



Nrf2. 核因子 E2 相关因子 2; *** $P<0.001$

图 7 Nrf2-siRNA 瞬时转染 hSOD1^{G93A} NSC-34 细胞后 Nrf2 mRNA 的表达水平

Fig. 7 Expression of Nrf2 mRNA after transfection of Nrf2-siRNA into hSOD1^{G93A} NSC-34 cells

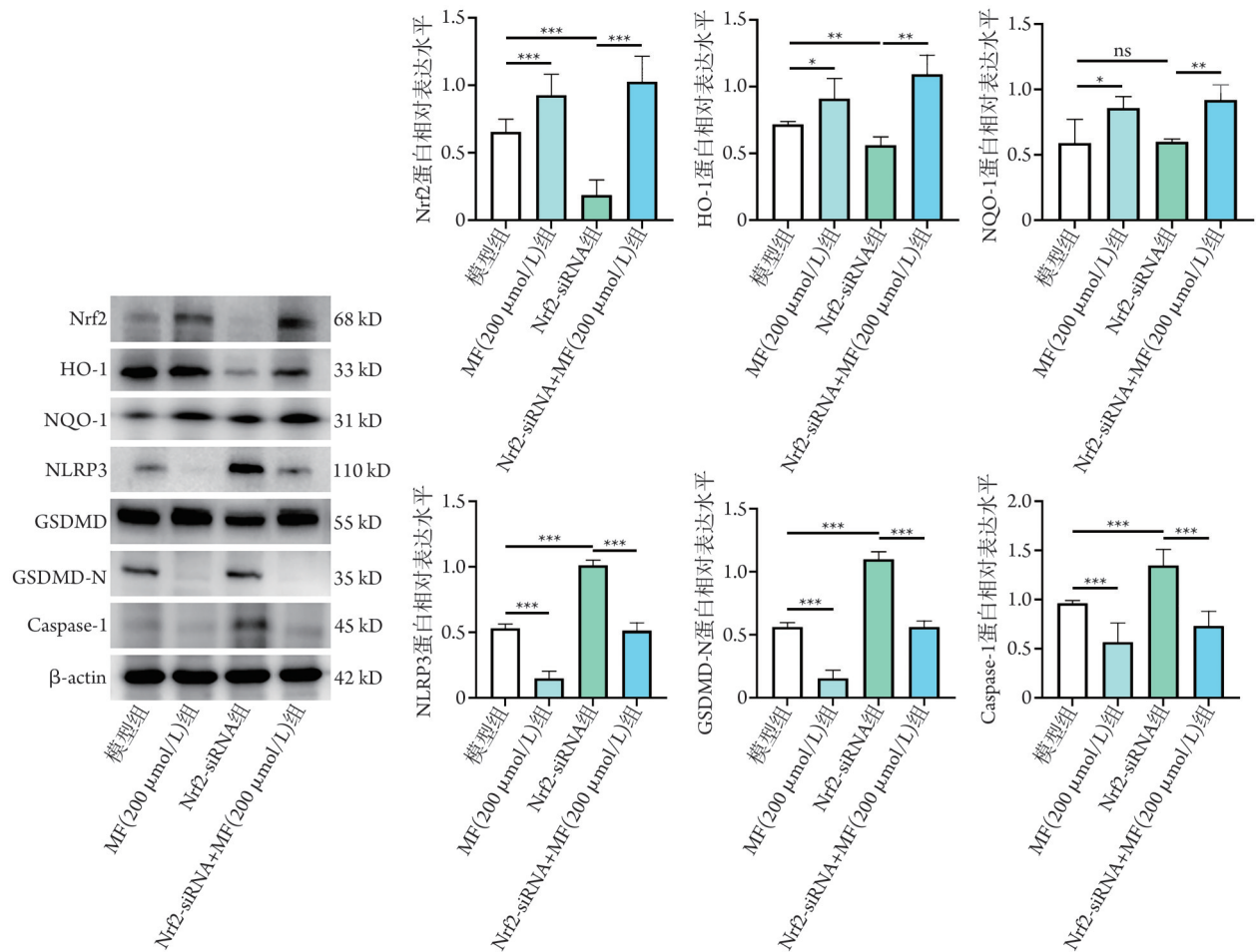
现, *Vps54* 点突变的 ALS 小鼠模型颈髓组织神经元中 NLRP3、caspase-1 和 GSDMD 蛋白表达水平上调, 提示 NLRP3 炎症小体激活和细胞焦亡参与了 ALS 小鼠模型的运动神经元变性和神经炎症^[19]。本研究中, 与空白组比较, SOD1^{G93A} 诱导的 NSC-34 细胞中 NLRP3、GSDMD-N、caspase-1 蛋白表达水平均明显升高。

细胞焦亡包括非经典焦亡和不完全焦亡途径^[20]。非经典焦亡途径依赖 caspase-4/5/11, 这些炎性 caspases 可直接裂解 GSDMD 并启动细胞焦亡^[20-21]。此外, 在缺少 caspase-1/11 的巨噬细胞中, NLRP3 炎症小体能够活化 caspase-3/8, 进而切割 GSDME 释放 N 端, 引起不完全焦亡^[7,22]。在 ALS 中以上两种焦亡途径的相关研究较少。仅一项研究报道在 SOD1^{G93A} 小鼠腰髓组织及 TDP-43 转染的原代小鼠皮质神经元中发现 GSDME-N 水平增高, 敲除 GSDME 后小鼠运动功能有明显改善, 寿命延长, 提示 ALS 中存在不完全焦亡^[23]。

MF 可通过抑制 NF- κ B 通路而抑制细胞焦亡级联

反应, 减少脂多糖诱导的小鼠骨髓源性巨噬细胞中 GSDMD 释放 N 端, 对细胞焦亡发挥调节作用^[24-25]。此外, MF 可通过 TLR4/PI3K/Akt 信号通路抑制 NLRP3 炎症小体的激活, 从而降低下游 caspase-1 的表达, 抑制 GSDMD 介导的细胞焦亡, 发挥缓解关节炎症和骨侵蚀的作用^[26]。本研究结果显示, 100 μ mol/L 和 200 μ mol/L MF 能够有效抑制 ALS 细胞模型的焦亡, 而超过 300 μ mol/L 的 MF 对 ALS 细胞模型的细胞活力产生了明显的抑制作用。LDH 是一种稳定的胞质酶, 广泛存在于人体细胞中, 当细胞膜损伤时其会快速释放到细胞培养液中。本研究检测到 ALS 细胞模型释放的 LDH 增多, 而加入 MF 处理后, LDH 释放量减少。此外, MF 可明显降低 NLRP3、caspase-1 和 GSDMD-N 蛋白的表达水平, 以及细胞上清液中炎症因子 IL-18 和 IL-1 β 的含量, 提示 MF 可减轻炎症反应并抑制细胞焦亡, 从而起到细胞保护作用。

Nrf2 信号通路在调节细胞应激和氧化还原平衡等方面发挥关键作用^[27]。近年研究显示, Nrf2 与细胞焦亡信号通路密切相关, Nrf2 表达量增加可抑制 NLRP3 及人黑素瘤缺乏因子 2(absent in melanoma 2, AIM2) 炎性小体, 减弱炎症反应, 进而抑制焦亡^[28-29]。在神经系统中, Nrf2 可抑制 GSDMD 介导的小胶质细胞焦亡并促进脊髓损伤修复^[30]。在 AD 小鼠模型(APP/PS1 小鼠)和细胞模型(HT22 细胞系)中, 1,7-二苯基-4-庚烷-3-酮可通过激活 Nrf2 途径抑制焦亡, 减轻小鼠脑中 β -淀粉样蛋白的沉积^[31]。已有研究显示, MF 可激活 Nrf2 信号通路^[32]。本研究结果显示, MF 可促进 Nrf2 易位入细胞核并激活 Nrf2, 从而增加其下游抗氧化酶 HO-1 和 NQO-1 的表达; 此外, 使用 Nrf2-siRNA 敲低 Nrf2 的表达后, 观察到细胞焦亡增加; 在此基础上给予 MF 处理可增加 Nrf2 蛋白的表达并抑制 NLRP3、caspase-1 和 GSDMD-N 蛋白的



Nrf2. 核因子E2相关因子2; HO-1. 血红素氧合酶-1; NQO-1. NADPH 醌氧化还原酶-1; NLRP3. NOD样受体蛋白3; GSDMD-N. Gasdermin D蛋白N端片段; caspase-1. 胱天蛋白酶-1; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图8 芒果苷(MF)对Nrf2/HO-1信号通路和hSOD1^{G93A} NSC-34细胞焦亡的影响(Western blotting)

Fig.8 Effects of mangiferin (MF) on Nrf2/HO-1 signaling pathway and the pyroptosis of hSOD1^{G93A} NSC-34 cells (Western blotting)

表达。

本研究仍存在一定的不足之处。首先, 虽然报告了ALS中存在细胞焦亡这种细胞程序性死亡方式, 与既往研究结果^[14-16]一致, 但未探究细胞焦亡参与ALS的具体病理生理机制及其在发病机制中所占的比重; 其次, 本研究未设置阳性对照组, 无法确定MF对ALS的疗效。目前经美国FDA批准治疗ALS的上市药品包括利鲁唑、依达拉奉和Tofersen, 尚无研究表明这3种药物可通过调控细胞焦亡而发挥作用, 可在后续动物实验中设置阳性对照组探究MF对ALS动物模型运动功能、寿命等的影响。

综上所述, 本研究结果显示, MF可在ALS细胞模型中通过激活Nrf2/HO-1信号通路抑制经典的细胞焦亡途径, 但其用于ALS的治疗效果有待进一步验证。

【参考文献】

[1] van Es MA, Hardiman O, Chio A, et al. Amyotrophic lateral sclerosis

[J]. Lancet, 2017, 390(10107): 2084-2098.

[2] Mejzini R, Flynn LL, Pitout IL, et al. ALS genetics, mechanisms, and therapeutics: where are we now? [J]. Front Neurosci, 2019, 13: 1310.

[3] Andersen PM, Al-Chalabi A. Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? [J]. Nat Rev Neurol, 2011, 7(11): 603-615.

[4] Zhang C, Yang Y, Liang W, et al. Neuroprotection by urate on the mutant hSOD1-related cellular and Drosophila models of amyotrophic lateral sclerosis: implication for GSH synthesis via activating Akt/GSK3β/Nrf2/GCLC pathways [J]. Brain Res Bull, 2019, 146: 287-301.

[5] Lu J, He AX, Jin ZY, et al. Desloratadine alleviates ALS-like pathology in hSOD1(G93A) mice via targeting SHTR(2A) on activated spinal astrocytes [J]. Acta Pharmacol Sin, 2024, 45(5): 926-944.

[6] Vasudevan SO, Behl B, Rathinam VA. Pyroptosis-induced inflammation and tissue damage [J]. Semin Immunol, 2023, 69: 101781.

[7] Kovacs SB, Miao EA. Gasdermins: effectors of pyroptosis [J]. Trends Cell Biol, 2017, 27(9): 673-684.

[8] Shi J, Gao W, Shao F. Pyroptosis: gasdermin-mediated programmed

- necrotic cell death[J]. Trends Biochem Sci, 2017, 42(4): 245-254.
- [9] van Schoor E, Ospitalieri S, Moonen S, *et al.* Increased pyroptosis activation in white matter microglia is associated with neuronal loss in ALS motor cortex[J]. Acta Neuropathol, 2022, 144(3): 393-411.
- [10] Walia V, Chaudhary SK, Kumar Sethiya N. Therapeutic potential of mangiferin in the treatment of various neuropsychiatric and neurodegenerative disorders[J]. Neurochem Int, 2021, 143: 104939.
- [11] Deng X, Lin B, Wang F, *et al.* Mangiferin attenuates osteoporosis by inhibiting osteoblastic ferroptosis through Keap1/Nrf2/SLC7A11/GPX4 pathway[J]. Phytomedicine, 2024, 124: 155282.
- [12] Jayasuriya R, Ramkumar KM. Mangiferin alleviates hyperglycemia-induced endothelial impairment *via* Nrf2 signaling pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2022, 936: 175359.
- [13] Tastan B, Arioz BI, Genc S. Targeting NLRP3 inflammasome with Nrf2 inducers in central nervous system disorders[J]. Front Immunol, 2022, 13: 865772.
- [14] Zhang C, Wang H, Liang W, *et al.* Diphenyl diselenide protects motor neurons through inhibition of microglia-mediated inflammatory injury in amyotrophic lateral sclerosis[J]. Pharmacol Res, 2021, 165: 105457.
- [15] Arslanbaeva L, Bisaglia M. Activation of the Nrf2 pathway as a therapeutic strategy for ALS treatment[J]. Molecules, 2022, 27(5): 1471.
- [16] Coll RC, Schroder K, Pelegrin P. NLRP3 and pyroptosis blockers for treating inflammatory diseases[J]. Trends Pharmacol Sci, 2022, 43(8): 653-668.
- [17] Zhang H, Li H, Huang B, *et al.* Spatiotemporal evolution of pyroptosis and canonical inflammasome pathway in hSOD1^{G93A} ALS mouse model[J]. BMC Neurosci, 2022, 23(1): 50.
- [18] Johann S, Heitzer M, Kanagaratnam M, *et al.* NLRP3 inflammasome is expressed by astrocytes in the SOD1 mouse model of ALS and in human sporadic ALS patients[J]. Glia, 2015, 63(12): 2260-2273.
- [19] Cihankaya H, Bader V, Winklhofer KF, *et al.* Elevated NLRP3 inflammasome activation is associated with motor neuron degeneration in ALS[J]. Cells, 2024, 13(12): 995.
- [20] Zhou J, Qiu J, Song Y, *et al.* Pyroptosis and degenerative diseases of the elderly[J]. Cell Death Dis, 2023, 14(2): 94.
- [21] Li W, Sun J, Zhou X, *et al.* Mini-review: GSDME-mediated pyroptosis in diabetic nephropathy[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 780790.
- [22] Wang D, Wan X. Progress in the study of molecular mechanisms of cell pyroptosis in tumor therapy[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 118: 110143.
- [23] Neel DV, Basu H, Gunner G, *et al.* Gasdermin-E mediates mitochondrial damage in axons and neurodegeneration[J]. Neuron, 2023, 111(8): 1222-1240.e1229.
- [24] Mei S, Perumal M, Battino M, *et al.* Mangiferin: a review of dietary sources, absorption, metabolism, bioavailability, and safety[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2023, 63(18): 3046-3064.
- [25] Feng M, Wei S, Zhang S, *et al.* Anti-inflammation and anti-pyroptosis activities of mangiferin *via* suppressing NF- κ B/NLRP3/GSDMD signaling cascades[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(17): 10124.
- [26] Li W, Wang K, Liu Y, *et al.* A novel drug combination of mangiferin and cinnamic acid alleviates rheumatoid arthritis by inhibiting TLR4/NF- κ B/NLRP3 activation-induced pyroptosis[J]. Front Immunol, 2022, 13: 912933.
- [27] Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, *et al.* Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism[J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(17): 3221-3247.
- [28] Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, *et al.* Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription[J]. Nat Commun, 2016, 7: 11624.
- [29] Xiao L, Dai Z, Tang W, *et al.* Astragaloside IV alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury through NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis inhibition *via* activating Nrf2[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 9925561.
- [30] Zhang D, Mao F, Wang S, *et al.* Role of transcription factor Nrf2 in pyroptosis in spinal cord injury by regulating GSDMD[J]. Neurochem Res, 2023, 48(1): 172-187.
- [31] Shi YS, Zhang Y, Luo X, *et al.* 1, 7-diphenyl-4-hepten-3-one mitigates Alzheimer's-like pathology by inhibiting pyroptosis *via* activating the Nrf2 pathway[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2024, 397(5): 3065-3075.
- [32] Saha S, Sadhukhan P, Sil PC. Mangiferin: a xanthonoid with multipotent anti-inflammatory potential[J]. Biofactors, 2016, 42(5): 459-474.

(责任编辑: 蒋铭敏)