

樟芝多糖抑制 6-OHDA 诱导的多巴胺能神经元细胞炎症反应的作用机制研究

韩晨阳, 官俏兵*, 郭丽, 杨毅(嘉兴市第二医院, 浙江 嘉兴 314001)

摘要: 目的 探究樟芝多糖通过抑制 ROS-NLRP3-caspase-1 途径调节 6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)诱导的多巴胺能神经元(dopaminergic neurons, DAN)细胞炎症反应的作用。方法 分离小鼠中脑 DAN 细胞, 采用 6-OHDA 体外构建帕金森病细胞模型, 将细胞分为正常组、模型组、对照组、实验组。正常组为常规培养的 DAN 细胞, 模型组为 6-OHDA 处理的 DAN 细胞, 对照组为 ROS 抑制剂乙酰半胱氨酸(NAC)+6-OHDA 处理的 DAN 细胞, 实验组为 6-OHDA+樟芝多糖处理的 DAN 细胞。采用 CCK-8 法检测细胞活力, 流式细胞术和免疫荧光染色法检测 ROS 的水平, 流式细胞术检测细胞凋亡水平, Hoechst 33342 染色活细胞, 蛋白免疫印迹(Western-blot)法检测细胞中 NLRP3、caspase-1、pro-caspase-1 的表达水平, 酶联免疫吸附(ELISA)法检测上清中 IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 的分泌水平。结果 模型组中 6-OHDA 可以诱导 DAN 细胞炎症反应, ROS 表达增高, NLRP3-caspase-1 炎性小体水平增高, 细胞凋亡率增高, 相比正常组具有显著性差异($P<0.05$)。樟芝多糖干预后, ROS 的水平下调, NLRP3-caspase-1 炎性小体水平降低, 细胞凋亡率下调, 相比模型组具有显著性差异($P<0.05$)。结论 樟芝多糖可以通过抑制 ROS-NLRP3-caspase-1 途径调节 6-OHDA 诱导 DAN 炎症反应, 这可能是樟芝多糖在帕金森病炎症反应中的作用机制之一。

关键词: 樟芝多糖; 多巴胺能神经元; 6-羟基多巴胺; 炎症反应

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)02-0172-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.02.009

引用本文: 韩晨阳, 官俏兵, 郭丽, 等. 樟芝多糖抑制 6-OHDA 诱导的多巴胺能神经元细胞炎症反应的作用机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(2): 172-177.

Study on Mechanism of *Antrodia Camphorata* Polysaccharide Inhibits Inflammatory Response of Dopaminergic Neurons Cells Induced by 6-OHDA

HAN Chenyang, GUAN Qiaobin*, GUO Li, YANG Yi(The Second Hospital of Jiaxing, Jiaxing 314001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effect of *Antrodia camphorata* polysaccharide on the inflammatory response of dopaminergic neurons (DAN) cells induced by 6-OHDA through inhibiting ROS-NLRP3-caspase-1 pathway. **METHODS** To isolate the DAN from midbrain. Parkinson cell model was constructed *in vitro* by 6-OHDA. The cells were divided into normal group, model group, control group and experimental group. In the normal group, the DAN cells were cultured; in model group the DAN cells treated by 6-OHDA; in control group the DAN cells treated by ROS inhibitor NAC+6-OHDA; in experimental group, the DAN cells treated by 6-OHDA+*Antrodia camphorata* polysaccharide. Cell viability was detected by CCK-8 assay, ROS level was detected by flow cytometry and immunofluorescence staining, cell apoptosis was detected by flow cytometry. Hoechst 33342 staining of living cells, the expression of NLRP3, caspase-1 and pro-caspase-1 in cells was detected by protein immunoblotting (Western-blot), and the secretion level of IL-1 β , IL-6 and IL-18 in the supernatant was detected by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA). **RESULTS** In the model group, 6-OHDA could induce the inflammatory response of DAN cells, the expression of ROS increased, the level of NLRP3-caspase-1 inflammatory corpuscle increased and the rate of apoptosis increased, which was significantly different from that of the normal group($P<0.05$). After the *Antrodia camphorata* polysaccharide intervention, the level of ROS was down regulated, the level of NLRP3-caspase-1 inflammatory corpuscle was decreased, and the rate of apoptosis was down regulated, which was significantly different from that of the model group($P<0.05$). **CONCLUSION** *Antrodia camphorata* polysaccharide can regulate the inflammatory response of DAN cells by inhibiting the regulation of 6-OHDA in ROS-NLRP3-caspase-1 pathway, which is one of the mechanisms of *Antrodia camphorata* polysaccharide in the inflammatory response of Parkinson disease.

KEYWORDS: *Antrodia camphorata* polysaccharide; dopaminergic neurons; 6-hydroxydopamine; inflammatory response

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LYY19H280003)

作者简介: 韩晨阳, 男, 硕士, 药师 Tel: 13736496736 E-mail: 691513770@qq.com *通信作者: 官俏兵, 女, 主任医师 Tel: 13757373957 E-mail: qbguan@126.com

帕金森病(Parkinson disease, PD)是一种中枢神经退行性疾病,主要发病原因是多巴胺能神经元(dopaminergic neurons, DAN)细胞的过度凋亡,导致多巴胺分泌减少,临床表现为静止性震颤、肌肉僵直等^[1]。目前PD的具体致病原因尚未明确,遗传因素、环境因素、应激反应等在PD的发生发展中均有重要的作用^[2]。神经炎症主要表现为脑内吞噬细胞及周围血管实质细胞的炎症反应,通过旁分泌诱导神经元细胞的损伤,PD黑质致密部存在大量的反应性人类白细胞抗原HLA-DA阳性小胶质细胞,而胶质细胞的激活伴随多种炎症因子的释放,进一步造成神经元细胞的损伤,所以PD中神经元的损伤和神经炎症密切相关。内源性和外源性的创伤、感染、抗原等均可以引起神经炎症反应^[3-4]。NLRP3是诱导炎症反应级联放大的关键炎症小体,在IL-1 β 等炎症因子介导小胶质细胞炎症反应,诱导DAN的凋亡中起到了重要的作用^[5]。而神经炎症中的炎症因子可以促进活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的积累,ROS作为NLRP3小体的激活因子之一,可以通过自噬来调节NLRP3小体的活化,构成ROS-NLRP3轴调控神经炎症反应。本课题组前期的研究表明,樟芝多糖可以通过降低中枢NLRP3-caspase-1的表达改善PD小鼠行为^[6-7],但是对于DAN的作用尚未有研究。本研究以小鼠原代DAN为对象,研究樟芝多糖通过抑制ROS-NLRP3-caspase-1途径调节6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)诱导DAN细胞炎症反应机制。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂

10只SPF级的ICR小鼠,♂,体质量(20 $\pm$ 5)g,购于浙江中医药大学动物实验中心,实验动物许可证号:SCXK(浙)2013-0184,小鼠分笼饲养,每笼5只。动物实验室温度为20~25℃,湿度为(70 $\pm$ 5)%,依据国家标准啮齿类动物干燥饲料喂养,小鼠活动自由、摄食自由。

樟芝粉末(杭州众芝康股份有限公司,批号:20160214),过50目筛。乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC, 货号:1009005)、DCFH-DA探针(货号:D6883)均来自美国Sigma公司;Annexin-FITC/PI细胞凋亡试剂盒(美国BD公司,货号:556547);CCK-8试剂盒(货号:C0037)、Hoechst 33342染色试剂盒(货号:C0003)均来自碧

云天生物技术有限公司;NLRP3、caspase-1、pro-caspase-1的一抗及HRP标记的二抗(cell signaling technology, 货号:15101, 3866, 67314);IL-1 β 、IL-6和IL-18的Elisa试剂盒(南京建成生物技术有限公司, 货号:H002, H007, H015)。

1.2 仪器

ME204E电子分析天平(梅特勒-托里多仪器有限公司);DP11显微镜(日本奥林巴斯公司);BS97MyCycler PCR仪、Western-Blot电泳仪、ChemiDoc MP凝胶成像分析系统均来自美国Bio-Rad公司;FACS Canto II流式细胞仪(美国BD公司)。

1.3 方法

1.3.1 樟芝多糖的提取 100 g樟芝粉末加入500 mL双蒸水,80℃回流提取2次,每次2 h。合并滤液后浓缩至150 mL,加入3倍体积的乙醇混匀后于4℃条件下静置12 h。抽滤获得的沉淀溶于100 mL热水,采用Sevag方法脱蛋白5次,调节乙醇浓度为90%,4℃条件下静置12 h,获得的樟芝多糖按照上述水提醇沉方法提取2次。采用硫酸-蒽酮法测定总多糖,BCA法测定总蛋白含量,结果显示樟芝多糖含量>90%,蛋白含量8.5 mg·g⁻¹。

1.3.2 DAN的分离 以小鼠为实验对象,所有手术器具消毒干燥后使用。将小鼠断颈处死后解剖剪断头,并移入玻璃器皿中,沿中间骨缝将头骨剪开(头骨外侧下沿也剪开),然后剥开头骨暴露大脑半球,去脑膜,沿中线将大脑半球往外翻开,暴露内侧面半月状的海马组织。用弯头镊子轻轻夹起,放入解剖液内(培养皿可置于冰袋上)。待数只小鼠均解剖后,将培养皿内的海马组织移至解剖镜下,仔细去除血管、膜及非海马结构,再移至小培养皿中,加数滴D1-SGH液,并用虹膜剪剪碎。将消化好的细胞碎片移入2 mL的离心管中,吸去剩余的解剖液,加入含血清的全培养液2 mL终止解剖液中胰酶的作用,约10 min后,再更换一次全培养液以洗净解剖液(全培养液成分为80%DMEM、10%胎牛血清、10%马血清或小牛血清,胎牛血清有助于细胞贴壁)。用口径较小的、在火焰上光滑过的玻璃吸管吸取细胞团,移入另一离心管,加入2 mL培养液并吹打20次。将离心管斜放,让细胞碎片下沉5~10 min后,吸取上层细胞溶液约1 mL。离心管中再加入培养液

1 mL, 同上吹打并吸取细胞, 与第 1 次吸取的细胞混合一起后计数。在 5%CO₂ 培养箱, 培养 1 d 后可用无血清培养液, 1 周换液 2 次。

1.3.3 细胞实验操作 将提取的 DAN 细胞适应性培养后, 随机分为正常组、模型组、对照组、实验组。正常组为使用 DMEM 完全培养基培养的 DAN 细胞, 模型组细胞使用 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 6-OHDA 干预的 DAN 细胞(构建 PD 类型损伤细胞), 对照组使用 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 6-OHDA+10 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NAC 干预(NAC 用于阻断 ROS, 作为阴性对照), 实验组使用 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 6-OHDA+10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 樟芝多糖干预。

1.3.4 检测指标 ①CCK-8 法检测细胞活力: 按“1.3.3”项下方法进行细胞分组和干预, 分别在干预后的 6, 12, 24, 36, 48 h 检测细胞活力, 每组细胞重复 3 次, 绘图。②流式细胞术检测细胞凋亡水平: 在培养 24 h 后, 弃去培养基收集细胞, 使用乙醇固定后分别加入 Annexin-FITC 和 PI 染色, PBS 洗后, 上机检测。③流式细胞法检测 ROS 的表达: 细胞培养 24 h 后, 弃去培养基, 加入终浓度为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DCFH-DA 探针, 继续孵育 0.5 h 后用 PBS 洗 2 次, 在激发光 188 nm、发射光 525 nm 处检测 ROS 的表达。④免疫荧光法检测 ROS 的表达: 按照上述染色方法进行 DAN 细胞 DCFH-DA 的染色后, 荧光显微镜下观察 ROS 的产生。⑤Hoechst 33342 染色活细胞: 将细胞培养 24 h 后, 弃去培养基, 使用乙醇固定细胞后, PBS 洗 2 次, 加入 Hoechst 33342 染色液染色 15 min, PBS 洗 2 次后用甘油水溶液封片, 荧光显微镜下观察, 细胞核有荧光。⑥细胞中 NLRP3、caspase-1、pro-caspase-1 的表达水平: 将细胞培养 24 h, 收集细胞后, 采用 NP-40 裂解液冰上裂解 30 min, 待无颗粒状后收集裂解液, 离心, 取上清液, BCA 试剂盒进行蛋白定量, 调整蛋白浓度后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, PVDF 转膜后使用封闭液封闭, 加入一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜, TBST 洗 2 次后, 二抗孵育, 经过化学发光 ECL 试剂盒反应后显影, 适应 Image J 软件进行灰度值分析。⑦Elisa 法检测培养基中 IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 的表达水平: 细胞培养 24 h, 收集培养基, 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min 后取上清液, 使用 BCA 试剂盒进行蛋白定量, 调整蛋白浓度后, 参照 ELISA 试剂盒说明书操作检测 IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 的水平。

1.3.5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 进行统计学处理。实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 对组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 并用 Bonferoni 校正的 t 检验进行组间两两比较。以 $P<0.05$ 视为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞活力的检测结果

模型组细胞在 6~48 h 内细胞活力显著下调, 相比正常组具有显著性差异($P<0.05$)。对照组中阻断 ROS 表达后, 细胞活力显著高于模型组($P<0.05$), 实验组中细胞活力相比模型组也显著升高($P<0.05$)。说明樟芝多糖可以改善 DAN 细胞活力, 结果见图 1。

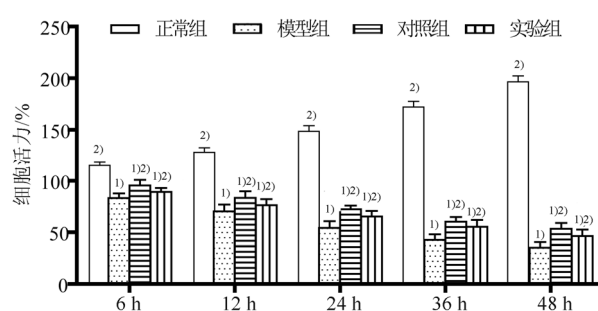


图 1 细胞活力的检测结果($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

与正常组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 1 Results of cell viability test($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$.

2.2 细胞凋亡水平检测结果

正常组细胞的凋亡率为(4.85 $\pm$ 0.58)%、模型组细胞的凋亡率为(56.32 $\pm$ 2.15)%、对照组细胞凋亡率为(28.65 $\pm$ 2.54)%、实验组细胞凋亡率为(35.68 $\pm$ 3.18)%。模型组相比正常组具有显著性差异($P<0.05$), 而对照组抑制 ROS 后细胞凋亡率显著下调, 相比模型组具有显著性差异($P<0.05$), 实验组的细胞凋亡率相比模型组也具有显著性差异($P<0.05$)。结果见图 2。

2.3 细胞 ROS 表达的结果

正常组细胞 ROS 荧光强度为(100.8 $\pm$ 5.12)%、模型组为(412.8 $\pm$ 6.54)%、对照组为(108.5 $\pm$ 4.35)%、实验组为(289.6 $\pm$ 6.21)%。结果显示, 模型组细胞 ROS 荧光强度显著高于正常组, ROS 阻断后, 对照组 ROS 荧光强度显著低于模型组, 实验组也显著低于模型组($P<0.05$), 免疫荧光也显示模型组 ROS 荧光强度高于正常组, 对照组和实验组 ROS 荧光强度低于模型组。结果见图 3~4。

2.4 Hoechst 33342 染色活细胞结果

视野下模型组细胞的凋亡 $[(59.52 \pm 8.3)\text{个}]$ 显著高于正常组 $[(0.0 \pm 0.0)\text{个}]$ ，而对照组细胞凋亡 $[(19.65 \pm 5.64)\text{个}]$ 和实验组 $[(32.52 \pm 6.78)\text{个}]$ 相比模型组凋亡水平显著降低 $(P < 0.05)$ 。结果见图 5。

2.5 细胞中 NLRP3、caspase-1、pro-caspase-1 的表达水平

模型组中 NLRP3、caspase-1、pro-caspase-1

的表达水平相比正常组显著升高，具有显著性差异 $(P < 0.05)$ ，而对照组和实验组中 NLRP3、caspase-1、pro-caspase-1 的表达水平相比模型组显著下调 $(P < 0.05)$ 。这说明，6-OHDA 可以诱导 ROS 产生并进一步促进 NLRP3 活化，促进炎症反应。樟芝多糖可以通过抑制 ROS 的表达间接降低 NLRP3 小体的活化，抑制炎症反应。结果见图 6。

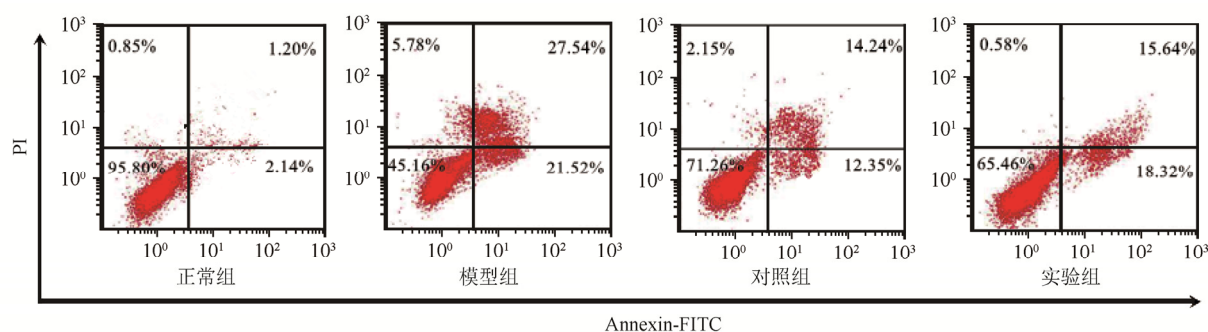


图 2 细胞凋亡检测结果

Fig. 2 Result of cells apoptosis

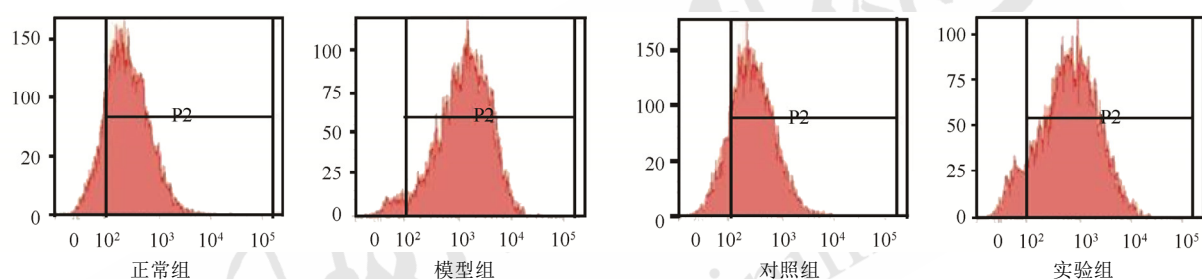


图 3 流式细胞术检测 ROS 荧光强度的结果

Fig. 3 Fluorescence intensity of ROS detected by flow cytometry

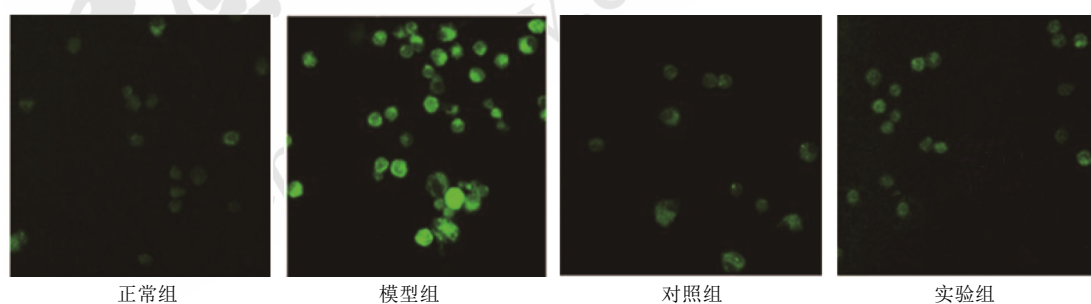


图 4 ROS 免疫荧光结果(400×)

Fig. 4 Results of ROS immunofluorescence(400×)

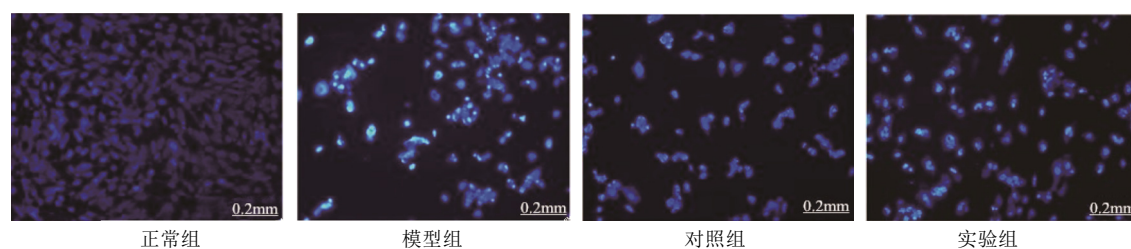


图 5 Hoechst 33342 染色结果

Fig. 5 Staining results of Hoechst 33342

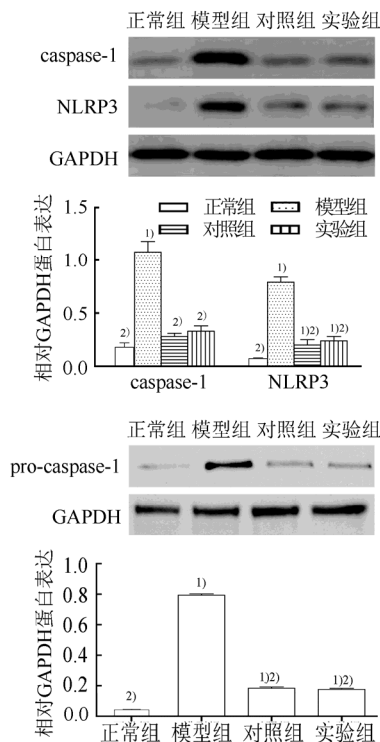


图6 细胞中 NLRP3、caspase-1、pro-caspase-1 的表达水平($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

与正常组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 6 Expression level of NLRP3, caspase-1 and pro-caspase-1 in cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$.

2.6 培养基中 IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 的表达水平

模型组中炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 的表达水平显著高于正常组($P<0.05$), 而对照组和实验组中 IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 的表达水平显著低于模型组($P<0.05$)。结果见图 7。

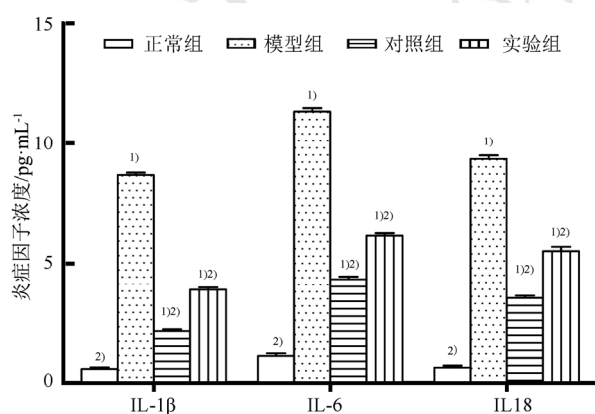


图7 IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 的表达水平($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

与正常组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 7 The expression level of IL-1 β , IL-6 and IL-18($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$.

3 讨论

PD 临床以震颤、肌肉僵直、运动迟缓、姿势步态异常等为特征, 还伴有嗅觉障碍、焦虑、抑郁、痴呆等非运动症状, 目前对于 PD 的发病机制尚未完全揭示, 但是对 PD 患者尸检结果发现线粒体功能障碍、氧化应激损伤、炎症反应等均参与 PD 的发生发展, 神经炎症介导的神经毒性在 PD 患者神经元死亡级联过程中具有重要的意义^[8-9]。炎性小体是一种蛋白复合物, 通过识别病原体编码的病原相关分子模式和损伤相关分子模式的不同刺激信号, 通过多个信号通路诱导免疫和炎症基因的表达^[10-11], 在 PD 的研究中发现, 肿瘤坏死因子、IL-1 β 、IFN- γ 等的高表达导致了炎症反应^[12], IL-1 β 作为 NLRP3 下游调控的关键信号因子, 起了炎症反应级联放大的作用, 一方面 IL-1 β 释放加速神经元细胞的损伤和死亡, 另一方面受损的神经元细胞可以进一步促进小胶质细胞炎症反应^[13], Godolo 等^[14]研究发现死亡的神经元细胞释放的突触核蛋白可以激活外周血单个核细胞中 NLRP3 的活化, Lu 等^[15]的研究发现 1-甲基-4-苯基吡啶离子(MPP⁺)刺激星形胶质细胞可以激活 NLRP3 炎性小体, 说明 NLRP3 参与了 MPP⁺诱导 PD 的进程。而 NLRP3 的激活中 ROS 也起到了重要的上游信号作用, ROS 激活 NLRP3 的机制研究中发现^[16-17]: NLRP3 炎性小体激活剂可以诱导产生 ROS, 并且 ROS 的抑制剂可以抑制 NLRP3 的激活, ROS 的过度产生还可以进一步诱导硫氧 HUAN 蛋白作用蛋白(TXNIP)的产生, TXNIP 与 NLRP3 结合后, 引起 NLRP3 的活化诱发炎症。Mcgeer 等^[18]通过尸检发现, PD 患者的中脑 SNc 区存在炎症, NF- κ B 激活后可以促进促炎因子 IL-1 β 、IL-18 和 TNF- α 释放, 放大炎症级联反应, 而其中 IL-1 β 作为不可或缺的促炎因子, 需要由 caspase-1 剪切 Pro-IL-1 β 才具有活性。

在课题组以往的研究中已经发现了樟芝多糖对于 PD 小鼠行为学改善和炎症反应的抑制有关^[6], 而进一步的研究还发现樟芝多糖可以下调 PD 小鼠脑组织中 NLRP3-caspase-1 的表达^[7], 而本研究以脑 DAN 细胞为对象, 因为 PD 中 DAN 是主要的损伤细胞, 其大量的凋亡直接导致 PD 的发生。本研究发现 6-OHDA 可以诱导 DAN 中 ROS 的大量产生, 进一步诱导 NLRP3 小体的活化, 导致 caspase-1 和 IL-1 β 的表达, 诱导 DAN 细胞的凋亡,

而使用 NAC 干预 ROS 时, 细胞凋亡率显著下调, NLRP3、caspase-1 和 IL-1 β 的表达也显著下调, 这说明在 6-OHDA 诱导的 DAN 细胞损伤中, ROS-NLRP3-caspase-1 途径起到了关键的作用。樟芝多糖干预后, 可以显著减少 ROS 的产生, 进一步抑制下游 NLRP3-caspase-1 的表达以及相关炎症因子的活化。IL-18 也是 NLRP3 介导的下游炎症因子, 本实验发现樟芝多糖抑制 NLRP3 的表达后, IL-18 的表达也显著下调。

综上, 在 6-OHDA 诱导的 DAN 细胞损伤中, ROS-NLRP3-caspase-1 途径起到了重要的作用, 樟芝多糖可以通过抑制该途径抵抗 DAN 细胞的凋亡。

REFERENCES

- [1] DESMURGET M, GAVEAU V, VINDRAS P, et al. On-line motor control in patients with Parkinson's disease [J]. *Brain A J Neurol*, 2017, 127(8): 1755-1773.
- [2] SEGARRA A B, BANEGAS I, PRIETO I, et al. Brain asymmetry and dopamine: beyond motor implications in Parkinson's disease and experimental hemiparkinsonism [J]. *Rev Neurol*, 2016, 63(9): 415-421.
- [3] SAMPSON T R, DEBELIUS J W, THRON T, et al. Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease [J]. *Cell*, 2016, 167(6): 1469-1480.
- [4] PAL R, TIWARI P C, NATH R, et al. Role of neuroinflammation and latent transcription factors in pathogenesis of Parkinson's disease [J]. *Neurol Res*, 2016, 38(12): 1-12.
- [5] KAUSHIK D K, GUPTA M, KUMAWAT K L, et al. NLRP3 inflammasome: Key mediator of neuroinflammation in murine Japanese encephalitis [J]. *Plos One*, 2012, 7(2): e32270.
- [6] YANG Y, ZHANG X L, WANG Y P, et al. Antioxidation and anti-inflammatory effects of *Antrodia camphorata* polysaccharide on Parkinsonian mice induced by 6-OHDA [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2017, 34(7): 969-972.
- [7] YANG Y, GUAN Q B, GUO L, et al. *Antrodia camphorata* polysaccharide improved neurobehavioral function in Parkinson mice via reducing the expression of NLRP3-Caspase1 inflammatory body [J]. *Chin J Clin Pharmacol Therap*(中国临床药理学与治疗学), 2018, 23(4): 406-412.
- [8] NAGATSU T, SAWADA M. Cellular and molecular mechanisms of Parkinson's disease: neurotoxins, causative genes, and inflammatory cytokines [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2006, 26(4-6): 779-800.
- [9] MAHER N E, CURRIE L J, LAZZARINI A M, et al. Segregation analysis of Parkinson disease revealing evidence for a major causative gene [J]. *Am J Med Genet*, 2002, 109(3): 191-197.
- [10] QIN X Y, ZHANG S P, CAO C, et al. Aberrations in peripheral inflammatory cytokine levels in Parkinson disease: A systematic review and meta-analysis [J]. *Jama Neurol*, 2016, 73(11): 1316-1324.
- [11] LIN J C, LIN C S, HSU C W, et al. Association between Parkinson's disease and inflammatory bowel disease: a nationwide taiwanese retrospective cohort study [J]. *Inflam Bowel Dis*, 2016, 22(5): 1049.
- [12] SAGHAZADEH A, FERRARI C C, REZAEI N. Deciphering variability in the role of interleukin-1 β in Parkinson's disease [J]. *Rev Neurosci*, 2016, 27(6): 635-650.
- [13] KARMAKAR M, KATSNELSON M A, DUBYAK G R, et al. Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in response to ATP [J]. *Nat Commun*, 2016(7): 10555. Doi: 10.1038/ncomms10555.
- [14] CODOLO G, PLOTTEGHER N, POZZOBON T, et al. Triggering of inflammasome by aggregated α -synuclein, an inflammatory response in synucleinopathies [J]. *Plos One*, 2013, 8(1): e55375.
- [15] LU M, SUN X L, QIAO C, et al. Uncoupling protein 2 deficiency aggravates astrocytic endoplasmic reticulum stress and nod-like receptor protein 3 inflammasome activation [J]. *Neurobiol Aging*, 2014, 35(2): 421-430.
- [16] LETTERIA M, DOMENICO P, MARIAGRAZIA R, et al. ROS-mediated NLRP3 inflammasome activation in brain, heart, kidney, and testis ischemia/reperfusion injury: [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016(8): 2183026.
- [17] FENG H, GU J, GOU F, et al. High glucose and lipopolysaccharide prime NLRP3 inflammasome via ROS/TXNIP pathway in mesangial cells [J]. *J Diabet Res*, 2016(6): 6973175.
- [18] MCGEER P L, MCGEER E G. Enzymes associated with the metabolism of catecholamines, acetylcholine and gaba in human controls and patients with Parkinson's disease and Huntington's chorea [J]. *J Neurochem*, 1976, 26(1): 65-76.

收稿日期: 2018-04-20

(本文责编: 曹粤锋)