

# 米诺环素调控 MCPIP1/NLRP3 通路抑制糖尿病视网膜病变细胞凋亡

田青青, 曹岐新\*, 卢玉燕(浙江中医药大学附属湖州市中医院眼科, 浙江 湖州 313000)

**摘要:** 目的 探讨米诺环素调控 MCPIP1/NLRP3 通路抑制糖尿病视网膜病变细胞凋亡的作用及其机制。方法 通过一次性腹腔注射链脲佐菌素的方法制备糖尿病小鼠模型, 将模型小鼠分为模型组和米诺环素组, 另设空白对照组。首先利用视网膜电图检测小鼠视网膜电位情况, 再利用 Western blotting 检测小鼠视网膜中 MCPIP1、NLRP3、ASC 的表达水平, 另利用 TUNEL 法对视网膜细胞的凋亡数目进行统计, 以此检测米诺环素对糖尿病小鼠视网膜细胞的保护作用; 而后以高糖培养的人视网膜上皮细胞为实验工具, 利用 RT-PCR 检测用米诺环素处理后再敲低表达 MCPIP1 后 NLRP3、ASC、IL-1 $\beta$ 、IL-18、caspase-1 的表达变化。**结果** 与模型组比较, 米诺环素处理后, 糖尿病小鼠视网膜电位振幅提升; MCPIP1 的表达上调, NLRP3 及 ASC 的表达受抑制; 视网膜细胞凋亡数下降。米诺环素可以促进在高糖培养的人视网膜上皮细胞中 MCPIP1 的表达, 而敲低表达 MCPIP1 可逆转米诺环素对 NLRP3、ASC、IL-1 $\beta$ 、caspase-1、IL-18 的抑制作用。**结论** 米诺环素可通过上调 MCPIP1 以抑制 NLRP3, 从而对糖尿病视网膜病变起到抑制或延缓作用。

**关键词:** 米诺环素; 糖尿病视网膜病变; 凋亡; MCPIP1; NLRP3

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2020)17-2081-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.17.006

引用本文: 田青青, 曹岐新, 卢玉燕. 米诺环素调控 MCPIP1/NLRP3 通路抑制糖尿病视网膜病变细胞凋亡[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(17): 2081-2085.

## Minocycline Regulates MCPIP1/NLRP3 Pathway and Inhibits Apoptosis in Diabetic Retinopathy

TIAN Qingqing, CAO Qixin\*, LU Yuyan(*Ophthalmology Department of Huzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Huzhou 313000, China*)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the effect of minocycline on MCPIP1/NLRP3 pathway in inhibiting apoptosis of diabetic retinopathy cells and its mechanism. **METHODS** Diabetic retinopathy(DR) mice models were prepared by intraperitoneal injection of streptozotocin, and then divided into model group and minocycline group, and set blank control group with no treatment. The retinal potential of mice was detected by electroretinogram(ERG). The expression levels of MCPIP1, NLRP3 and ASC in the retina of mice were detected by Western blotting. The number of apoptotic retinal cells was counted by TUNEL. Then the expression of NLRP3, ASC, IL-1 $\beta$ , IL-18 and caspase-1 treatment with minocycline and knockdown of MCPIP1 was detected by RT-PCR using high-sugar cultured human retinal pigment epithelium(RPE). **RESULTS** Compared with model group, following minocycline treatment, the amplitude of retinal potential in DR mice increased; the expression of MCPIP1 in the retina of DR mice was up-regulated, while the expression of NLRP3 and ASC was inhibited; the number of apoptotic retinal cells in DR mice decreased. Minocycline could promote the expression of MCPIP1 in RPE cultured with high glucose. Down-regulation of MCPIP1 reversed the inhibitory effects of minocycline on NLRP3, ASC, IL-1 $\beta$ , caspase-1, IL-18. **CONCLUSION** Minocycline can inhibit NLRP3 by up-regulating MCPIP1, thus inhibiting or delaying diabetic retinopathy.

**KEYWORDS:** minocycline; diabetic retinopathy; apoptosis; MCPIP1; NLRP3

近些年来, 糖尿病发病率不断升高, 成为一种全球性的慢性疾病, 其可以并发多种病症, 其中, 糖尿病性视网膜病变(diabetic retinopathy, DR) 是一种极其严重的并发症<sup>[1]</sup>。目前中国人口老龄化日渐上升, DR 已然成为 50 岁以上人群致盲的主要原因之一, 不仅使患者遭受极大的痛苦, 也给患者家庭和社会带来了沉重的负担<sup>[2]</sup>。但目前为

止, DR 的发病机制还没有定论, 其中 NLRP3 所介导的慢性炎症反应在其中占有重要地位<sup>[3-4]</sup>。

单核细胞趋化蛋白质 1 诱导蛋白(MCP1-induced protein, MCPIP1)与多条炎症相关的信号通路(如 NLRP3 介导的信号通路)相关, 其在负反馈调控炎症反应中担当了重要的角色。在免疫领域备受关注<sup>[5-7]</sup>。目前为止, 尚无 MCPIP1 蛋白在

基金项目: 湖州市公益性技术应用研究项目(2018GYB06)

作者简介: 田青青, 女, 技师 Tel: 13567228811 E-mail: gracejx123@163.com \*通信作者: 曹岐新, 男, 副主任医师 Tel: (0572)2770791 E-mail: 2785105925@qq.com

DR 中发挥作用的报道。鉴于 MCPIP1 在先天性免疫系统中发挥如此显著的控制炎症作用, 研究其在 DR 发病过程中的作用非常必要。

米诺环素是一种第二代半合成的四环素衍生物, 具有抗炎的特性, 该特性已经越来越受重视。目前在临床上, 米诺环素已被用于治疗多种炎症性疾病, 如炎症性肠炎、类风湿性关节炎、视神经炎等<sup>[8-10]</sup>。然而, 米诺环素针对糖尿病引起的视网膜炎症性反应是否有作用至今未见报道。本实验主要通过小鼠 DR 模型及高糖培养的人视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelium, RPE)模型, 研究米诺环素对 DR 的治疗效果及可能的机制, 希望为开发治疗 DR 的药物提供新的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

SPF 级 C57BL/6J 小鼠, ♂, 12 周龄, 体质量 30~35 g, 购于上海南方模式生物科技股份有限公司(合格证号: 312024300000732)。

### 1.2 试剂

米诺环素(美国 Sigma 公司, 批号: M9511); 高糖高脂饲料(北京博泰宏达生物技术有限公司, 批号: HD001); 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, 美国 Sigma 公司, 批号: S0130); TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物技术公司, 批号: C1086)。兔抗鼠 MCPIP1 抗体(批号: 25009-1-AP)、兔抗鼠 NLRP3 抗体(批号: Ag26289)、兔抗鼠 ASC 抗体(批号: 17870-1-AP)和鼠抗鼠 GAPDH 抗体(批号: 60004-1-Ig)均购自美国 Proteintech 公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 动物模型** 将小鼠随机分为 3 组: 空白对照组、模型组及米诺环素组, 各 12 只。模型组和米诺环素组给予高糖高脂饮食 1 月, 禁食 12 h 后腹腔注射 STZ 溶液( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 连续注射 5 d, 1 周后检测空腹血糖,  $>13.9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  证明造模成功; 空白对照组给予柠檬酸钠溶液腹腔注射。而后, 米诺环素组给予米诺环素口服  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ <sup>[11]</sup>, 其他 2 组给予同等剂量的生理盐水。

**1.3.2 视网膜电图(electroretinogram, ERG)** 小鼠先暗适应 30 min, 腹腔注射麻醉。1%托吡卡胺扩张瞳孔, 角膜表面麻醉。将小鼠置于约  $37.5 \text{ }^\circ\text{C}$  的保温板上。将参考电极置于前额皮下, 将接地电极放置于右耳。将记录电极置于角膜表面。另一侧的

眼睛由一块黑布覆盖。采用 UTAS-E 2000 电生理记录分析系统, 小鼠眼进行全 FELD 频闪白光刺激, 通带为 75~300 Hz, 刺激强度持续时间为  $10 \mu\text{s}$ , 每一次间隔持续 1 s。计算双眼电信号幅度的平均值。

**1.3.3 免疫印迹** 小鼠麻醉处死后取眼球, 在显微镜下分离出视网膜, 加入蛋白裂解液, 冰上超声破碎并静置 30 min 后,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$   $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 25 min, 取上清。BCA 法测定蛋白浓度后制样。经过聚丙烯酰胺凝胶电泳(80 V)分离, 电转入 PVDF 膜, 脱脂牛奶室温封闭 2 h。孵以特定的稀释比例的一抗,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  摇床过夜。接着二抗室温摇床 2 h。暗房滴加 ECL 显色。结果以 GAPDH 为内参校正后进行比较。

**1.3.4 TUNEL 染色** 小鼠麻醉处死, 取下眼球, 即刻放入 4%PFA 中固定至少 12 h, 将固定好的眼球梯度乙醇脱水, 在无水乙醇脱水时去除晶状体, 二甲苯中透明, 石蜡中浸蜡 2 h 后包埋切片。根据说明书将切片在二甲苯中脱蜡, 乙醇复水后滴加  $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  不含 DNase 的蛋白酶 K, 并用 PBS 洗涤 3 次。而后滴加配好的 TUNEL 溶液, 并在激光共聚焦显微镜下观察计数。

**1.3.5 细胞模型** 取生长状态良好的 RPE(D407)消化传代分为 3 组: 空白组、米诺环素组(米诺环素  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、shMCPIP1 组(米诺环素+慢病毒 LentiV-shMCPIP1), 并高糖培养( $4.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )。

**1.3.6 病毒转染** 针对 MCPIP1 基因 mRNA 设计合成干扰序列, 并将干扰序列构建到慢病毒载体中形成 LentiV-shMCPIP1 慢病毒载体。干扰序列的合成及慢病毒载体的构建由上海吉玛公司完成。同时在上海吉玛公司购买阴性对照 shRNA-Ctrl 作为实验对照。对细胞分别侵染 LentiV-shMCPIP1 慢病毒、shRNA-Ctrl 慢病毒。72 h 后验证细胞中 MCPIP1 的干扰效率。

**1.3.7 RT-PCR** 使用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 逆转录成 cDNA, 将引物浓度稀释至  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 按照  $2 \times \text{SYBR Green Master } 5 \mu\text{L}$ ; Forward primer ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $0.3 \mu\text{L}$ ; Reverse primer ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $0.3 \mu\text{L}$ ; cDNA Template  $10 \text{ ng}$ ; Nuclease-free Water up to  $10 \mu\text{L}$  进行混合。将反应板置于 Light Cycler 480 荧光定量 PCR 仪中, 最后用  $2^{-\Delta\Delta\text{C}_t}$  方法进行数据分析。

**1.3.8 统计学方法** 统计结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 以 SPSS 22.0 统计软件进行处理, 由 *T*-test 和方差分

析进行检验。 $P < 0.05$  表示差异存在统计学意义, $P < 0.01$  表示差异具有显著统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 米诺环素对 DR 小鼠视网膜电位振幅的影响

相对于空白对照组, DR 小鼠视网膜电位振幅明显下降( $P < 0.01$ ), 而经米诺环素处理过后, DR 小鼠的视网膜电位振幅得到提高, 但仍然低于正常值( $P < 0.05$ ), 提示糖尿病病变可抑制视网膜电位振幅, 但米诺环素可逆转这种改变, 见图 1。

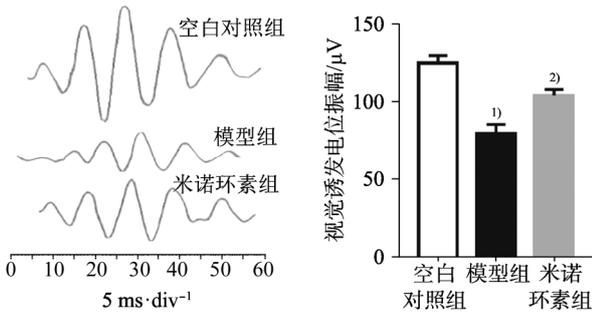


图 1 米诺环素处理后, 糖尿病小鼠视网膜电位振幅提升与空白对照组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ , <sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

**Fig. 1** Following minocycline treatment, the OP amplitude increased

Compared with the blank control group, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ , <sup>2)</sup> $P < 0.05$ .

### 2.2 米诺环素对视网膜中 MCPIP1、NLRP3 和 ASC 表达的影响

Western blotting 显示相对于空白对照组, DR 小鼠视网膜中 MCPIP1 表达下调, 而与炎症相关的 NLRP3 及 ASC 表达上调( $P < 0.01$ )。提示糖尿病病理生理变化抑制 MCPIP1 的表达, 并促进 NLRP3 及 ASC 相关的炎症反应, 结果存在明显的统计学差异。而米诺环素处理过后, 糖尿病小鼠视网膜中的 MCPIP1 表达受抑制的情况得到逆转, 而 NLRP3 及 ASC 的表达受到抑制( $P < 0.05$ )。提示米诺环素可促进 MCPIP1 的表达, 并抑制 NLRP3 及 ASC 相关的炎症反应, 结果存在统计学差异, 见图 2。

### 2.3 米诺环素对视网膜细胞凋亡的影响

应用 TUNEL 染色的方法检测小鼠视网膜细胞的凋亡水平, 发现相对于空白对照组, DR 小鼠视网膜细胞中 TUNEL 阳性的细胞数要远高于空白对照组( $P < 0.01$ ), 而经米诺环素处理过后, DR 视网膜细胞中 TUNEL 阳性的细胞数虽高于空白对照组, 但却低于模型组( $P < 0.05$ ), 差异有统计学意义。说明米诺环素可抑制糖尿病引起的视网膜细胞凋亡, 结果见图 3。

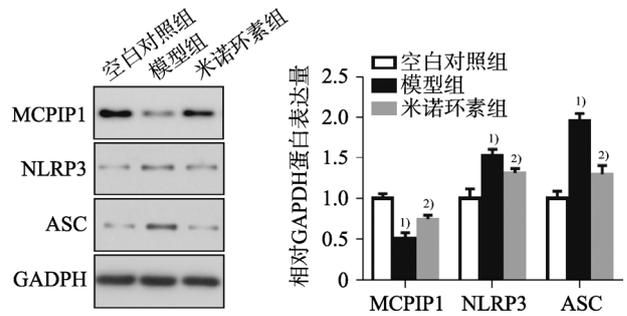


图 2 糖尿病促使视网膜中 MCPIP1 的表达下调, NLRP3 及 ASC 的表达则上调, 米诺环素能抑制这种变化与空白对照组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ , <sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

**Fig. 2** Expression of MCPIP1 in retina was down-regulated by diabetes mellitus, while that of NLRP3 and ASC was up-regulated, minocycline could inhibit this change Compared with the blank control group, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ , <sup>2)</sup> $P < 0.05$ .

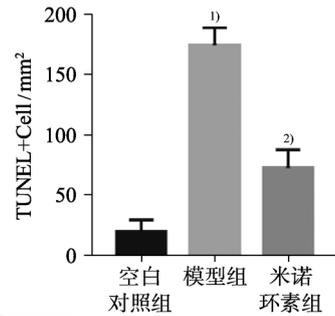
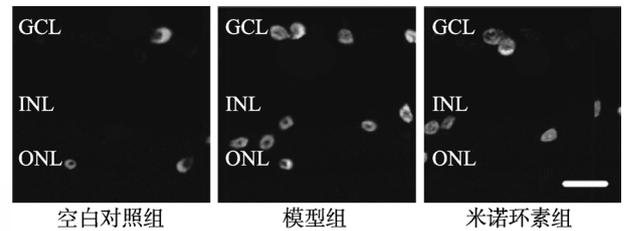


图 3 米诺环素处理后, 糖尿病小鼠视网膜细胞凋亡数量下降

GCL-神经节细胞层; INL-内核层; ONL-外核层; 与空白对照组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ , <sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

**Fig. 3** Following minocycline treatment, the number of apoptotic retinal cells in diabetic mice decreased GCL-ganglion cell layers; INL-inner nuclear layers; ONL-outer nuclear layers; compared with the blank control group, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ , <sup>2)</sup> $P < 0.05$ .

### 2.4 敲低表达 MCPIP1, 可逆转米诺环素对高糖所致炎症反应的抑制作用

将人 RPE 细胞以高糖进行培养( $4.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 笔者以慢病毒 LentiV-shMCPIP1 为工具进行研究, 首先验证其效能, 证实该病毒可以使 MCPIP1 的表达水平下调 50%左右, 见图 4。接着在由米诺环素处理过的 RPE 细胞中敲低表达 MCPIP1。由结果可以看出, 米诺环素可以促进 MCPIP1 的表达, 而且敲低表达 MCPIP1 可以逆转米诺环素的炎症抑制效果——抑制 NLRP3、ASC、IL-1 $\beta$ 、IL-18、caspase-1 等炎症反应因子, 结果见图 5。

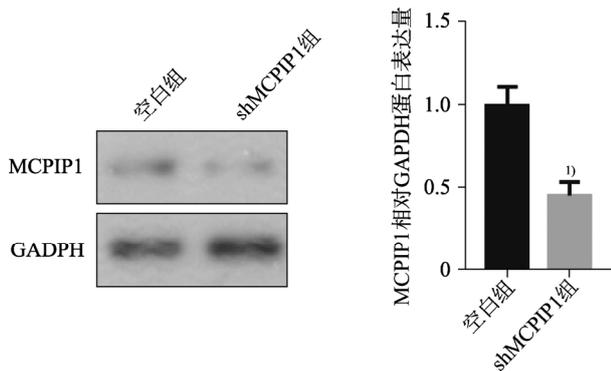


图4 LentiV-shMCPIP1的敲减效率与空白组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ 。

Fig. 4 Efficiency of LentiV-shMCPIP1 Compared with the blank group, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ .

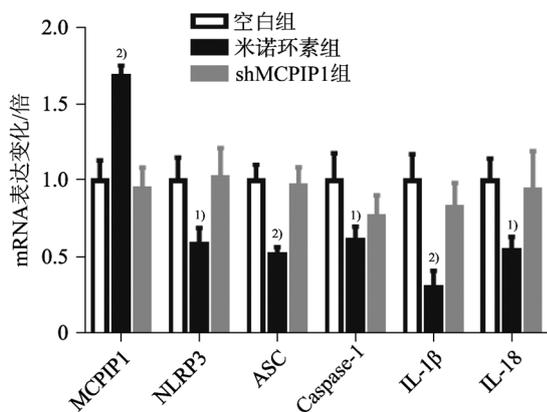


图5 敲低表达MCPIP1,可逆转米诺环素的抗炎作用与空白组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ , <sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

Fig. 5 Knockdown the expression of MCPIP1 can reverse the anti-inflammatory effect of minocycline Compared with the blank group, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ , <sup>2)</sup> $P < 0.05$ .

### 3 讨论

目前已有研究表明, DR 由多种发病机制参与致病, 其中固有免疫所驱动的慢性低度的炎症反应在 DR 的发生与发展中起重要作用, 而炎症小体家族则在其中起促进作用<sup>[12]</sup>。目前研究炎症小体的热点是核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(NLRP3)。NLRP3 炎症小体由 NL-RP3、细胞凋亡相关的斑点样蛋白质(ASC)与 caspase-1 组成。当受到激活后, NLRP3 与 ASC 结合, 活化 pro-caspase-1, 进一步激活 NLRP3 炎症小体, 促进 IL-1β、IL-18 等炎症因子活化与释放, 损害细胞器的功能、细胞膜的通透性等, 最终使视网膜细胞走向凋亡<sup>[13]</sup>。本实验也证实, 相对于空白对照组小鼠, 糖尿病小鼠视网膜电位振幅明显变小(图 1), 说明高血糖环境已经引起小鼠视网膜功能的减退, 另外不管是在糖尿病小鼠模型(图 2)还是

在高糖培养的细胞模型中(图 4), 视网膜细胞中 NLRP3、ASC、IL-1β、IL-18、caspase-1 表达均上调, 提示高糖环境下可激活视网膜细胞中的炎症小体, 进而诱导细胞凋亡(图 3)。

近几年来, MCPIP1 因为其在免疫调节及抑制炎症方面的显著作用而备受关注<sup>[7]</sup>。笔者在实验中发现, 不管是在糖尿病小鼠模型还是在高糖培养的细胞模型中, 视网膜细胞中 MCPIP1 的表达量均下降(图 2, 4)。因此, 笔者考虑高糖引起的炎症小体激活是否与 MCPIP1 的表达下调有关, 若促进 MCPIP1 表达, 或者提高 MCPIP1 的水平是否能抑制高糖引起的炎症小体激活。另有研究发现米诺环素除了有抗菌抑菌的功能的同时, 还兼有抗炎的能力<sup>[14]</sup>, 更有研究证实, 其可促进 MCPIP1 的表达<sup>[15]</sup>。因此笔者猜测, 米诺环素调控 MCPIP1/NLRP3 通路抑制糖尿病视网膜病变细胞凋亡。

笔者在接下来的实验中发现, 在 DR 小鼠以米诺环素处理后, 相对于 DR 小鼠, 其视网膜电位振幅明显提高(图 1), 视网膜中凋亡的细胞数(TUNEL 阳性的细胞)明显下降(图 3), 说明米诺环素可延缓高血糖对小鼠视网膜功能的损害。另外, 在 Western blotting 的数据结果中发现, DR 小鼠经过米诺环素处理后, 视网膜中 MCPIP1 表达上调, 并且抑制了 NLRP3、ASC 的表达。提示米诺环素可能促进 MCPIP1 的表达进而抑制 DR 引起的炎症反应。

为了进一步探究“MCPIP1”“DR”及“NLRP3 相关性炎症”这三者之间的关系。本研究将高糖培养的 RPE 作为细胞模型, 以慢病毒(LentiV-MCPIP1)为工具, 研究敲低表达 MCPIP1 是否可逆转米诺环素对 DR 的抗炎作用。结果发现, 在细胞模型中经米诺环素处理后, 再敲低表达 MCPIP1, NLRP3、ASC、IL-1β、IL-18、caspase-1 表达并没有受到抑制。这说明米诺环素对 DR 的治疗作用是通过促进 MCPIP1 的表达, 从而抑制 NLRP3 相关性炎症与炎症通路的激活进而对视网膜起到保护作用。

综上, 米诺环素可通过上调 MCPIP1 抑制 NLRP3 炎症小体, 从而对 DR 起到抑制或延缓作用。本实验为米诺环素临床应用于治疗 DR 提供实验依据。

### REFERENCES

- [1] ANTONETTI D A, KLEIN R, GARDNER T W. Diabetic retinopathy [J]. N Engl J Med, 2012, 366(13): 1227-1239.

- [2] CHEUNG N, MITCHELL P, WONG T Y. Diabetic retinopathy [J]. *Lancet*, 2010, 376(9735): 124-136.
- [3] WANG M, WANG Y, XIE T H, et al. Prostaglandin E<sub>2</sub>/EP<sub>2</sub> receptor signalling pathway promotes diabetic retinopathy in a rat model of diabetes [J]. *Diabetologia*, 2019, 62(2): 335-348.
- [4] ZHANG Y, LV X, HU Z, et al. Protection of Mcc950 against high-glucose-induced human retinal endothelial cell dysfunction [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(7): e2941.
- [5] UEHATA T, IWASAKI H, VANDENBON A, et al. Malt1-induced cleavage of regnase-1 in CD4<sup>+</sup> helper T cells regulates immune activation [J]. *Cell*, 2013, 153(5): 1036-1049.
- [6] GARG A V, AMATYA N, CHEN K, et al. MCP1<sub>1</sub> endoribonuclease activity negatively regulates interleukin-17-mediated signaling and inflammation [J]. *Immunity*, 2015, 43(3): 475-487.
- [7] LIANG J, SAAD Y, LEI T H, et al. MCP-induced protein 1 deubiquitinates TRAF proteins and negatively regulates JNK and NF- $\kappa$ B signaling [J]. *J Exp Med*, 2010, 207(13): 2959-2973.
- [8] ZHOU Y Q, LIU D Q, CHEN S P, et al. Minocycline as a promising therapeutic strategy for chronic pain [J]. *Pharmacol Res*, 2018(134): 305-310.
- [9] PAPA S, CARON I, ERBA E, et al. Early modulation of pro-inflammatory microglia by minocycline loaded nanoparticles confers long lasting protection after spinal cord injury [J]. *Biomaterials*, 2016(75): 13-24.
- [10] YAN P, ZHU A, LIAO F, et al. Minocycline reduces spontaneous hemorrhage in mouse models of cerebral amyloid angiopathy [J]. *Stroke*, 2015, 46(6): 1633-1640.
- [11] WU Y, CHEN Y D, WU Q, et al. Minocycline inhibits PARP-1 expression and decreases apoptosis in diabetic retinopathy [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(4): 4887-4894.
- [12] CHEN H, ZHANG X Z, LIAO N Y, et al. Enhanced expression of NLRP3 inflammasome-related inflammation in diabetic retinopathy [J]. *Investig Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59(2): 978-985.
- [13] WANG W Y, ZHANG X D. The role and research progress of NLRP3 inflammasome in diabetic retinopathy [J]. *Recent Adv Ophthalmol(眼科新进展)*, 2018, 38(6): 587-591.
- [14] CHEN W, ZHAO M J, ZHAO S Z, et al. Activation of the TXNIP/NLRP3 inflammasome pathway contributes to inflammation in diabetic retinopathy: A novel inhibitory effect of minocycline [J]. *Inflamm Res*, 2017, 66(2): 157-166.
- [15] YI Q, TAN F H, TAN J A, et al. Minocycline protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats by upregulating MCP1 to inhibit NF- $\kappa$ B activation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019. Doi: 10.1038/s41401-019-0214-z.

收稿日期: 2019-06-12

(本文责编: 曹粤锋)