

• 临床研究 •

卡马西平减轻 HT22 细胞炎症损伤及机制研究

杨凌凯,戴伯坚,李响,黄国永,陈鑫亮,蔡子耀,程朗朗,赵飞飞

【摘要】目的 探究卡马西平减轻脂多糖(LPS)诱导小鼠海马神经元(HT22)细胞炎症损伤的作用效果及机制。**方法** 以 HT22 细胞为研究对象,体外传代培养,以 10、20、50 $\mu\text{g/ml}$ LPS 进行试验,确定 LPS 对 HT22 细胞作用最佳浓度;将 HT22 细胞分为对照组(NC 组,正常培养),LPS 组(加入 20 $\mu\text{g/ml}$ LPS 进行培养),LPS+卡马西平组(加入 20 $\mu\text{g/ml}$ LPS 和 50 $\mu\text{g/ml}$ 卡马西平进培养)3 组,以 CCK-8 实验、DAPI 染色法检测 HT22 增殖抑制率及凋亡率;采用 H2DCFH-DA 试剂盒检测细胞内活性氧(ROS)含量,酶联免疫吸附(ELISA)法检测 HT22 细胞上清液白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素-8(IL-8)及白细胞介素-17(IL-17)水平,Western blot 法检测 HT22 细胞 NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)信号通路相关蛋白表达。**结果** 20 $\mu\text{g/ml}$ LPS 作用于 HT22 细胞 48 h,细胞增殖抑制率接近于 50%。LPS 组、LPS+卡马西平组细胞活性均低于 NC 组(均 $P < 0.05$),LPS+卡马西平组细胞活性高于 LPS 组($P < 0.05$)。LPS 组、LPS+卡马西平组细胞凋亡率均高于 NC 组(均 $P < 0.05$),LPS+卡马西平组细胞凋亡率低于 LPS 组($P < 0.05$)。3 组 ROS 差异有统计学意义($P < 0.05$),LPS 组 $>$ LPS+卡马西平组 $>$ NC 组(均 $P < 0.05$)。LPS 组、LPS+卡马西平组 HT22 细胞上清液 IL-1 β 、TNF- α 、IL-8 及 IL-17 水平均高于 NC 组(均 $P < 0.05$),而 LPS+卡马西平组上述因子水平均低于 LPS 组(均 $P < 0.05$)。Western blot 结果显示:与 NC 组相比,LPS 组、LPS+卡马西平组 HT22 细胞中 NLRP3、IL-1 β 、凋亡相关微粒蛋白(ASC)及 pro-caspase1 表达均显著上调(均 $P < 0.05$),而与 LPS 组相比,LPS+卡马西平组上述因子的表达均显著下调(均 $P < 0.05$)。**结论** 卡马西平可通过介导 NLRP3 信号通路来调节细胞活性和细胞凋亡的平衡,进而减轻 LPS 诱导的 HT22 细胞的炎症损伤。

【关键词】 卡马西平;脂多糖;小鼠海马神经元细胞;炎症损伤;NLRP3 信号通路

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.06.012

【中图分类号】 R749.4 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2024)06-0746-05

抑郁症是一种常见的精神障碍,主要以显著且持续的心境低落为临床症状^[1]。炎症反应是抑郁症发生发展的关键病理机制,而 NOD 样受体蛋白 3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)途径介导的炎症反应激活可能是连接应激和抑郁症的关键途径^[2-3]。卡马西平是常见的精神类药物,可用于预防和治疗躁狂发作和抑郁发作,其主要是通过降低神经元膜上的钠、钙通透性,降低细胞的兴奋性,延长不应期,缓解患者临床症状^[4]。卡马西平已被广泛应用临床治疗情感性精神障碍,特别是双相情感障碍^[5],但目前关于卡马西平缓解抑郁症的研究仍少见报道。本研究旨在探讨卡马西平与海马神经元细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)过程,细胞增殖、凋亡的关系,以及可

能的作用机制,为抑郁症的药物开发提供新策略,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 材料 细胞株:小鼠海马神经元细胞(HT22 细胞)由蚌埠医学院科研中心冻存。药品与试剂:细胞计数试剂盒(CCK-8)、H2DCFH-DA 溶液、BCA 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;DAPI 试剂盒购自 Thermo fisher 公司;NLRP3、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、凋亡相关微粒蛋白(ASC)、pro-caspase1 及 GAPDH 抗体购自 abcam 公司;卡马西平购自 Sigma 公司,由于卡马西平难溶于水,将其与增溶剂乙型肝炎核心(HBC)(抗原)混合后溶于水;胎牛血清购自 Gemini 公司;脂多糖(LPS)溶液购自 Sigma-Aldrich 公司;DMEM 高汤培养基、胰蛋白酶及细胞培养用混合液购自 Hyclone 公司;IL-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素-8(IL-8)及白细胞介素-17(IL-17)试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物公司。

基金项目:温州市科研项目(Y2023853)

作者单位:325000 浙江省温州,温州市第七人民医院

通信作者:杨凌凯,Email: yanglingkai@163.com

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将HT22细胞置于含10%胎牛血清的DMEM培养箱中培养,同时在培养箱中加入100 U/ml青霉素和0.1 g/L链霉素,传代培养时以胰蛋白酶溶液体积分数0.25%进行消化传代,比例为1:3。

1.2.2 LPS作用浓度筛选 取对数生长期HT22细胞接种于96孔板,每孔加入100 μl细胞悬液,密度为 5×10^4 ml,培养条件为37℃、体积分数5%CO₂饱和湿度,培养时间为16~18 h,在细胞贴壁生长后弃上清液,加入完全培养基配制的LPS溶液至最终浓度为10、20、50 μg/ml,而后在同条件下继续培养12~60 h,在孔板中加入10 μl CCK-8试剂后继续孵育2 h,以酶标仪测定450 nm波长的吸光度,计算HT22细胞增殖抑制率。每个浓度设置9复孔。

1.2.3 实验分组 取对数生长期HT22细胞,分为3组进行培养,对照组(NC组)正常培养,LPS组加入20 μg/ml LPS进行培养,LPS+卡马西平组添加20 μg/ml LPS和50 μg/ml卡马西平进培养。

1.2.4 细胞存活率检测 于96孔板中种植HT22细胞,每孔加入10 μl CCK-8溶液,随后放入培养箱培养30 min,读取酶标仪上450 nm处的吸光度。设置9复孔。

1.2.5 细胞凋亡水平检测 于96孔板中种植HT22细胞,随后依次加入培养基预处理2 h后,20 μg/ml LPS作用8 h,在显微镜下观察细胞凋亡情况。而后在每孔中添加200 μl 4%多聚甲醛,在孵育30 min后吸除多聚甲醛,以磷酸缓冲液(PBS)冲洗2遍后,在孔板中加入100 μl DAPI溶液,避光孵育10 min,吸除DAPI溶液,然后以荧光显微镜拍摄图片以观察染色情况。

1.2.6 ROS含量及上清液炎症因子水平检测 以H2DCFH-DA试剂盒(上海懋康生物科技有限公司)检测细胞内ROS含量,在分组培养后吸除药物,以无血清培养液清洗细胞2次,然后在无血清培养基稀释至10 μmol/L的500 μl H2DCFH-DA溶液,放置

在培养箱里30 min,用无血清培养液清洗细胞2次,随后以荧光显微镜进行拍摄。以ELISA法检测HT22细胞上清液IL-1β、TNF-α、IL-8及IL-17水平。

1.2.7 NLRP3信号通路表达检测 以胰蛋白酶溶液消化所收集细胞,离心后弃去上清液,添加进去合适体积的RIAP裂解液在冰上裂解30 min,离心后提取细胞总蛋白,采用BCA试剂盒,用酶标仪测定570 nm处的吸光度,然后进一步蛋白定量上清液。根据蛋白分子量配制不同浓度的分离胶,随后通过SDS-PAGE分离蛋白样品,在甲醇激活PVDF膜后将蛋白样品转换至PVDF膜上,封闭液处理30 min后,数遍洗涤后,添加NLRP3、IL-1β、ASC、pro-caspase1及GAPDH抗体(按比例配制至所需浓度),4℃过夜,数遍洗涤后,加入二抗(按比例配制至所需浓度)并且在室温放置2 h 30 min,以ECL法使PVDF膜显影曝光,以GAPDH为内参基因,应用Image J软件进行灰度分析。每组设置9复孔。

1.3 统计方法 使用SPSS 22.0统计软件进行处理,计量资料用均数±标准差表示,两组比较采用t检验,多组比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS作用浓度确定 不同浓度LPS作用后HT22增殖抑制率差异有统计学意义($P < 0.05$),其中20 μg/ml LPS作用于HT22细胞48 h,细胞增殖抑制率接近于50%,见表1,故选择该浓度作为后续实验的最佳浓度。

2.2 3组HT22细胞活性比较 LPS+卡马西平组、LPS组及NC组HT22细胞活性分别为(12.71±1.85)%、(8.95±1.36)%及(51.74±5.02)%,3组间差异有统计学意义($F=165.81, P < 0.05$);LPS组、LPS+卡马西平组细胞活性均低于NC组($t=24.68, 21.89$,均 $P < 0.05$),LPS+卡马西平组细胞活性高于LPS组($t=4.91, P < 0.05$),见图1。

表1 不同浓度LPS作用后HT22细胞增殖活性比较($n=9$)

LPS浓度	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h
10 μg/ml	-11.57±2.16	-18.62±3.58	-20.17±3.41	-14.50±2.16	-29.69±5.17
20 μg/ml	-4.61±0.27	-7.25±1.19	19.39±2.02	47.62±4.31	51.74±5.02
50 μg/ml	45.19±3.86	71.65±5.72	75.27±4.09	79.02±5.17	82.33±2.45

注: $F_{浓度}=82.203, F_{时间}=7.075, F_{交互}=9.981$,均 $P < 0.05$

2.3 3组 HT22 细胞凋亡情况比较 3组细胞凋亡率差异有统计学意义($F=125.90, P < 0.05$), LPS 组、LPS+卡马西平组细胞凋亡率高于 NC 组, LPS+卡马西平组细胞凋亡率低于 LPS 组(均 $P < 0.05$), 见图 2。

2.4 3组 HT22 细胞内 ROS 水平比较 3组 ROS 差异有统计学意义($F=153.16, P < 0.05$), LPS 组、LPS+卡马西平组细胞内 ROS 水平均高于 NC 组, LPS+卡马西平组 HT22 细胞内 ROS 水平低于 LPS 组(均 $P < 0.05$), 见图 3。

2.5 3组炎症因子水平比较 3组 IL-1 β 、TNF- α 、IL-8 及 IL-17 水平差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), LPS 组、LPS+卡马西平组 IL-1 β 、TNF- α 、IL-8

及 IL-17 水平均高于 NC 组(均 $P < 0.05$), 而 LPS+卡马西平组上述因子水平均低于 LPS 组(均 $P < 0.05$), 见表 2。

2.6 3组 NLRP3 信号通路调节炎症因子水平比较 LPS 组、LPS+卡马西平组 HT22 细胞中 NLRP3、IL-1 β 、ASC 及 pro-caspase1 表达均高于 NC 组(均 $P < 0.05$), LPS+卡马西平组上述因子的表达又均低于 LPS 组(均 $P < 0.05$), 见图 4。

3 讨论

HT22 细胞是一种永生化的小鼠海马神经元细胞, 具有典型神经元形态及特征, 被广泛应用于研究

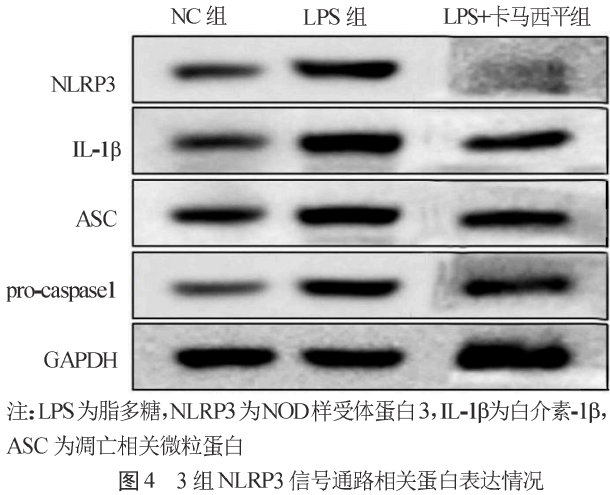
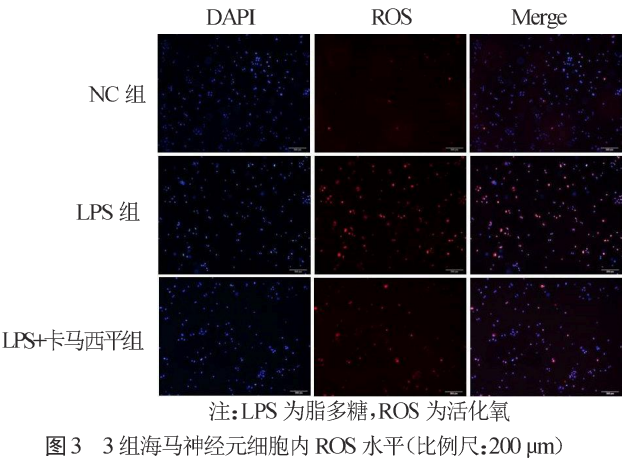
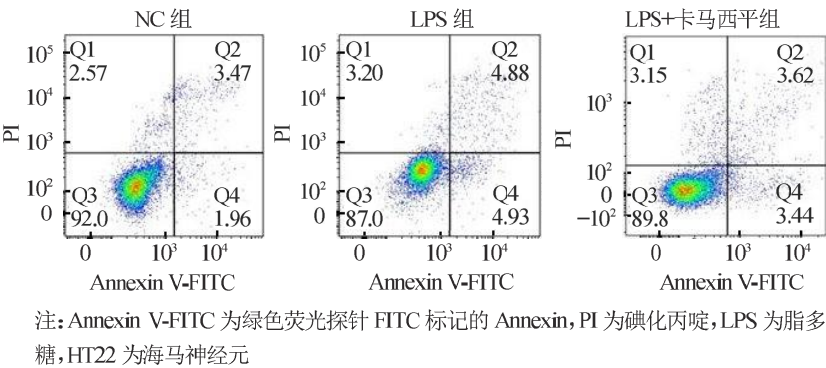
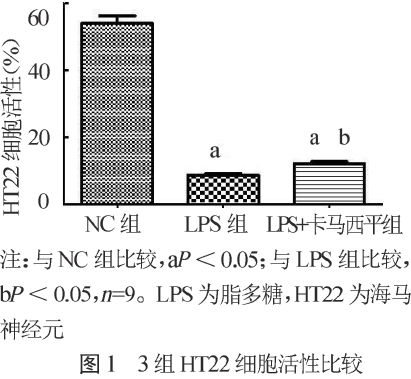


表 2 3 组血清炎症因子水平比较				
组别	IL-1 β	TNF- α	IL-8	IL-17
NC 组($n=9$)	31.49 $\pm$ 5.24	22.37 $\pm$ 4.02	79.71 $\pm$ 15.69	46.05 $\pm$ 7.53
LPS 组($n=9$)	154.03 $\pm$ 26.79 ^a	342.19 $\pm$ 53.54 ^a	513.58 $\pm$ 91.03 ^a	305.24 $\pm$ 57.31 ^a
LPS+卡马西平组($n=9$)	58.52 $\pm$ 5.98 ^{ab}	39.04 $\pm$ 5.43 ^{ab}	86.37 $\pm$ 5.02 ^{ab}	54.59 $\pm$ 5.13 ^{ab}
F 值	143.31	300.49	194.98	173.83
P 值	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

注: 与 NC 组比较, a $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, b $P < 0.05$ 。LPS 为脂多糖, IL-1 β 为白介素-1 β , TNF- α 为肿瘤坏死因子- α , IL-8 为白介素-8, IL-17 为白介素-17

神经元损伤及神经退行性疾病^[6]。LPS 在临床上可作为氧化损伤模型的诱导剂,如小鼠脑损伤、大鼠肝损伤及 RAW264.7 小鼠巨噬细胞炎症模型等^[7-9]。本研究通过比较 3 种浓度 LPS 对 HT22 细胞增殖的影响,发现低剂量 LPS 可促进 HT22 细胞增殖,而高剂量 LPS 可促进细胞凋亡,其中 20 $\mu\text{g/ml}$ LPS 作用于 HT22 细胞 48h 时,细胞增殖抑制率接近于 50%,故本研究选用 20 $\mu\text{g/ml}$ LPS 诱导 HT22 细胞氧化损伤模型。

卡马西平作为治疗精神运动性癫痫首选药物,能够减轻患者的精神异常症状。卡马西平可用于治疗轻躁狂、躁狂发作、快速循环型双相情感障碍等疾病,能有效缓解患者临床症状^[4-5]。本研究探索卡马西平对 LPS 诱导后的 HT22 细胞活力、细胞凋亡及炎症因子的影响,并分析其可能的作用机制。

组织中细胞活性和细胞凋亡的平衡有利于维持细胞数量和组织结构完整^[10],一旦平衡被破坏,将会导致糖尿病、癌症等疾病发生。本研究发现卡马西平可逆转 LPS 诱导的 HT22 细胞活性降低和凋亡增强。这说明卡马西平可通过介导 HT22 细胞活性和凋亡来改善 LPS 对细胞的损伤。这可能是因为卡马西平属于抗癫痫药物,其可调节神经细胞膜对钠离子和钙离子的通透性,进而介导细胞的兴奋性,参与细胞的活性调节和凋亡活动。此外,本研究还发现卡马西平可有效抑制 LPS 诱导的 HT22 细胞内 ROS 水平上调。这进一步验证了卡马西平可通过参与 HT22 细胞凋亡来改善 LPS 诱导的组织损伤。这是因为 ROS 介导的氧化损伤途径可调控细胞凋亡,且细胞内 ROS 水平与细胞凋亡呈正相关性^[11]。

IL-1 β 、TNF- α 、IL-8 及 IL-17 均属于促炎因子,其水平上升与炎症风暴相关^[12-14]。本研究结果显示卡马西平可有效改善 LPS 诱导的 IL-1 β 、TNF- α 、IL-8 及 IL-17 等炎症因子水平上升,提示卡马西平可有效改善 LPS 诱导的炎症反应。从炎症发生的机制上分析,LPS 是革兰阴性菌的表面抗原物质,作为一种强有力的免疫系统刺激因子,侵入机体后,通过结合 LPS 结合蛋白,被运送至巨噬细胞的膜表面,再与膜表面的 CD14 蛋白相结合,被转运至 Toll 样受体 4 及髓样分化蛋白 2 形成复合体,启动免疫防御反应,进而激活 IL-1 β 、TNF- α 、IL-8 及 IL-17 等炎症因子表

达,促进神经炎症的发生。而卡马西平可增强脑内抑制性神经递质 γ -氨基丁酸的作用,抑制突触前膜去极化,阻断电压敏感性钙通道,减少神经冲动的传递,进而发挥抗炎作用,降低炎症因子水平。

既往研究指出,炎症反应是抑郁症发生发展的关键病理机制,且 NLRP3 途径介导的炎症反应激活可能是连接应激和抑郁症的关键途径^[15]。本研究发现与 NC 组相比,LPS 组 HT22 细胞中 NLRP3、ASC 及 pro-caspase1 表达均显著上调,而给予卡马西平后,NLRP3、IL-1 β 、ASC 及 pro-caspase1 表达均下调。这提示卡马西平可能通过 NLRP3 信号通路调节炎症因子水平。动物实验亦显示,应激可显著上调 NLRP3 信号通路的相关蛋白,导致小鼠抑郁样行为的产生,而干预该信号通路可发挥有效的抗抑郁作用^[16-17]。NLRP3 炎症小体形成后可促进 IL-1 β 和 IL-18 的剪切及成熟,导致炎症介质大量释放及 DNA 损伤,使细胞发生渗透性崩解,进而导致诱导免疫/炎症反应激活,关键区域神经元损伤,抑郁症等精神疾病发生^[18-19]。而卡马西平可逆转 LPS 诱导的 NLRP3 信号通路相关蛋白的表达,提示卡马西平的抗炎作用可能与 NLRP3 信号通路相关。这可能是因为卡马西平的化学结构与三环类抗抑郁药相似,具有情绪稳定作用、抗胆碱作用、抗抑郁作用,而且能抑制神经肌肉接头处的传递,进而下调 NLRP3 信号通路相关蛋白的表达,改善细胞内炎症反应。

综上所述,卡马西平可能通过介导 NLRP3 信号通路来调节细胞活性与细胞凋亡的平衡,进而改善 LPS 诱导的炎症损伤。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 杨凌凯、戴伯坚:实验操作、论文撰写;李响、陈鑫亮、蔡子耀、赵飞飞:数据整理、统计学分析;黄国永、程朗朗:研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

- [1] KUNUGI H, TIKHONOVA M. Recent advances in understanding depressive disorder: possible relevance to brain stimulation therapies[J]. Prog Brain Res, 2022, 270(1): 123-147.
- [2] ZHOU J, WANG F X, JIA L N, et al. 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid induces ROS activation in NLRP3 inflammatory body-induced autophagy disorder in microglia and the protective effect of Lycium barbarum polysaccharide[J]. Environ Toxicol, 2022, 37(5): 1136-1151.
- [3] WEI Y C, HU Y H, QI K M, et al. Dihydromyricetin improves LPS-induced sickness and depressive-like behaviors in mice by

- inhibiting the TLR4/Akt/HIF1 α /NLRP3 pathway[J]. Behav Brain Res, 2022, 423: 113775.
- [4] 李淑敏,施荣富,王克玲,等.卡马西平、左乙拉西坦对伴中央-颞区棘波的良性癫痫患儿脑电图的影响[J].河北医药,2008,30(12):1884-1885.
- [5] 刘英,付勇,黄泗霖.氟桂利嗪联合卡马西平治疗偏头痛的疗效及作用机制[J].现代中西医结合杂志,2015,24(15):1609-1611,1617.
- [6] 李娜,蔡珂沁,李文欣,等.丙酮酸钠对小鼠海马神经HT22 细胞神经保护作用[J].中国药理学通报,2023,39(8):1522-1526.
- [7] 谢一激,杨乃彬,王丽萍,等.姜黄素通过激活肝细胞自噬减轻脂多糖/D-氨基半乳糖诱导的大鼠急性肝损伤[J].中国病理生理杂志,2020,36(5):860-864.
- [8] 郭民,张瑞虎,景志杰,等.冬凌草甲素抑制脂多糖诱导小鼠肺泡巨噬细胞炎症反应[J].石河子大学学报(自然科学版),2023,41(2):252-257.
- [9] 黄菊,吴灵君,李佳琳,等.基于网络药理学和分子对接探讨积雪草酸抑制炎症巨噬细胞铁死亡的作用机制及初步验证 [J]. 广西医科大学学报,2023,40(5):859-865.
- [10] MORELLO G, VILLARI A, SPAMPINATO A G, et al. Transcriptional Profiles of Cell Fate Transitions Reveal Early Drivers of Neuronal Apoptosis and Survival[J]. Cells, 2021, 10(11):3238.
- [11] LIU J, LIU Q, HAN J, et al. N-Acetylcysteine Inhibits Patulin-Induced Apoptosis by Affecting ROS-Mediated Oxidative Damage Pathway[J]. Toxins (Basel), 2021, 13(9):595.
- [12] AN Z, LI J, YU J, et al. Neutrophil extracellular traps induced by IL-8 aggravate atherosclerosis via activation NF- κ B signaling in macrophages[J]. Cell Cycle, 2019, 18(21):2928-2938.
- [13] VAN LOOG, BERTRAND MJM. Death by TNF: a road to inflammation[J]. Nat Rev Immunol, 2023, 23(5):289-303.
- [14] KUMAR R, THEISS A L, VENUPRASAD K. ROR γ t protein modifications and IL-17-mediated inflammation[J]. Trends Immunol, 2021, 42(11):1037-1050.
- [15] 陈可琢,陈实,任洁怡,等.茯苓酸性多糖抗抑郁作用及其调节神经递质和 NLRP3 通路机制研究[J]. 中国中药杂志,2021,46(19):5088-5095.
- [16] 赵文婕,杨晨,韩慰,等.NLRP3/GSDMD/IL-1 β 通路在发育期大鼠癫痫后抑郁行为中的作用及其干预方法[J].解放军医学杂志,2020,45(9):929-934.
- [17] 刘雨佳,张秀森,邓亚洁,等.首发重性抑郁障碍血 NLRP3 炎症小体及炎症因子水平研究[J]. 中国神经精神疾病杂志,2021,47(6):367-371.
- [18] 杨建波,姜伟玲,张力三.脂多糖激活 NMDARs 诱导小鼠抑郁样行为的机制研究[J].重庆医学,2020,49(1):23-28.
- [19] 杨琴,任昊阳,朱寒雨,等.白杨素通过抑制 NLRP3 炎症小体信号通路对围绝经期抑郁症模型大鼠产生保护作用 [J]. 中国药理学通报,2020,36(7):1006-1011.

收稿日期:2024-03-04

(本文编辑:孙海儿)