

Trx1通过抑制ROS缓解6-OHDA诱导的SH-SY5Y 细胞炎性损伤

杨沛淞 张博熙 夏雨欣 吕红明 徐彬 李士泽*

(黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 大庆 163319)

摘要 该文探讨了过表达硫氧化还原蛋白1(thioredoxin 1, Trx1)对多巴胺羟基衍生物6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)诱导的SH-SY5Y细胞损伤的影响。将*Trx1*过表达腺病毒转染至SH-SY5Y细胞以构建*Trx1*过表达模型。实验分组为对照组(Ad-GFP)、*Trx1*过表达组(Ad-*Trx1*)、6-OHDA组(Ad-GFP+6-OHDA)、*Trx1*过表达+6-OHDA组(Ad-*Trx1*+6-OHDA)。使用Western blot、qRT-PCR评估过表达模型构建效果并检测炎症因子表达情况; CCK-8法测定细胞活力; 试剂盒检测LDH释放情况; 荧光染色检测细胞中ROS含量以及晚期细胞凋亡和细胞坏死情况。结果显示, 与对照组相比, Ad-*Trx1*组*Trx1* mRNA丰度极显著升高; Trx1蛋白表达水平显著增加; 荧光显微镜下显示Ad-*Trx1*组呈绿色荧光, 表明*Trx1*过表达模型构建成功。CCK-8和LDH检测结果显示, 过表达*Trx1*能极显著地改善6-OHDA诱导的SH-SY5Y细胞活力下降并抑制由6-OHDA诱导的SH-SY5Y细胞LDH释放增加。荧光染色结果显示, 过表达*Trx1*能够减少6-OHDA诱导的SH-SY5Y细胞中ROS的累积并减轻6-OHDA诱导的SH-SY5Y细胞晚期细胞凋亡和细胞坏死情况。qRT-PCR和Western blot结果显示, 过表达*Trx1*能够抑制由6-OHDA诱导的SH-SY5Y细胞炎症因子表达增加。总之, 过表达*Trx1*通过减少ROS的积累并抑制细胞凋亡、坏死从而缓解6-OHDA诱导的SH-SY5Y细胞炎性损伤。

关键词 硫氧化蛋白1; 人神经母细胞瘤细胞系; 神经元损伤; 氧化应激; 炎症因子

Trx1 Alleviates 6-OHDA-Induced Inflammatory Injury in SH-SY5Y Cells by Suppressing ROS

YANG Peisong, ZHANG Boxi, XIA Yuxin, LÜ Hongming, XU Bin, LI Shize*

(College of Animal Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural Reclamation University, Daqing 163319, China)

Abstract This study investigated the protective effects of Trx1(thioredoxin 1) overexpression against 6-OHDA (6-hydroxydopamine)-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells. An adenoviral vector carrying the *Trx1* gene (Ad-*Trx1*) was transfected into SH-SY5Y cells to establish a *Trx1* overexpression model. Experimental groups included: control (Ad-GFP), *Trx1* overexpression (Ad-*Trx1*), 6-OHDA treatment (Ad-GFP+6-OHDA), and *Trx1* overexpression+6-OHDA treatment (Ad-*Trx1*+6-OHDA). Western blot and qRT-PCR were employed to validate *Trx1* overexpression and assess inflammatory factor expression. Cell viability was measured via CCK-8 assay, LDH (lactate dehydrogenase) release was quantified using commercial kits, and ROS (reactive oxygen species) levels,

收稿日期: 2025-02-19 接受日期: 2025-04-17

国家自然科学基金(批准号: 31972637)和科技创新2030-重大项目“优质猪新品种设计与培育”(批准号: 2023ZD0404606-1)资助的课题

*通信作者。Tel: 15214611935, E-mail: byndlsz@163.com

Received: February 19, 2025

Accepted: April 17, 2025

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31972637) and the Science and Technology Innovation 2030-Major Project “Design and Breeding of New High-Quality Pig Breeds” (Grant No.2023ZD0404606-1)

*Corresponding author. Tel: +86-15214611935, E-mail: byndlsz@163.com

late apoptosis, and necrosis were evaluated via fluorescence staining. Results demonstrated that *Trx1* mRNA abundance and Trx1 protein expression were significantly elevated in the Ad-*Trx1* group compared to controls, with green fluorescence confirming successful transfection. Overexpression of *Trx1* markedly attenuated 6-OHDA-induced reductions in cell viability and suppressed LDH release. Fluorescence staining revealed that *Trx1* overexpression reduced ROS accumulation and mitigated late apoptosis and necrosis in 6-OHDA-treated cells. Furthermore, qRT-PCR and Western blot indicated that Trx1 overexpression downregulated 6-OHDA-induced inflammatory cytokine expression. These findings suggest that *Trx1* overexpression alleviates 6-OHDA-induced inflammatory injury in SH-SY5Y cells by reducing ROS accumulation and inhibiting apoptotic/necrotic pathways.

Keywords thioredoxin 1; human neuroblastoma cell line; neuronal injury; oxidative stress; inflammatory factors

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见的神经退行性疾病,其主要的病理特征为中脑黑质致密部的多巴胺能神经元退变^[1]。研究显示PD致病的主要生化过程与氧化应激和神经炎症有关^[2]。氧化应激是指体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)等自由基的产生与清除失衡,导致氧化与抗氧化系统失调,进而引发细胞和组织损伤的过程。有研究发现,在大鼠脊髓损伤模型中,晚期氧化蛋白产物(advance oxidation protein produces, AOPPs)通过激活NADPH氧化酶可促进ROS的过量产生导致神经元损伤,在清除ROS后,炎症因子的表达和分泌都受到了抑制^[3]。那么在神经退行性疾病中,ROS和神经炎症存在着怎样的联系?

多巴胺(dopamine, DA)是大脑中含量最丰富的儿茶酚胺类神经递质,调控中枢神经系统的多种生理功能^[4]。但在某些病理或应激条件下,细胞内外多巴胺水平的增加可能导致脑损伤。6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)是天然神经递质多巴胺的羟基类似物^[5],作为最常见的神经毒素之一,常用于体内体外构建神经元损伤模型^[6]。

Trx1是一种主要定位于细胞质中,大小为12 kDa的多功能蛋白^[7]。20世纪60年代,它首次被发现作为酵母酶的氢供体^[8]。Trx1在多种细胞功能(如增殖、氧化还原稳态维持、DNA合成以及细胞凋亡等)中起着关键作用^[9-10]。脑组织高耗能的特性导致其容易发生氧化应激^[11],而Trx1在神经细胞中可能发挥保护作用。有研究表明,过表达*Trx1*可以改善1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1,2,3,6-tetrahydro-1-methyl-4-phenyl-pyridin, MPTP)刺激小鼠引起的神经元细胞减少^[12]; Trx1可减弱1-甲基-4-苯基碘化吡啶诱导的PC12细胞神经毒性,并在MPTP刺激的小鼠中抑制多巴胺造成的

神经元细胞的凋亡^[13]。那么Trx1是如何在6-OHDA诱导的神经细胞损伤中起到保护作用的呢?本研究通过体外构建Trx1过表达模型以探究Trx1在6-OHDA诱导的SH-SY5Y细胞炎性损伤中发挥的作用及机制。

1 材料和方法

1.1 实验细胞

人神经母细胞瘤细胞系(SH-SY5Y)购自中国科学院上海细胞库。

1.2 主要试剂

Trizol购自美国ThermoFisher Scientific公司;氯仿购自美国Sigma-Aldrich公司;DEPC水、RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型)、SDS-PAGE凝胶快速配制试剂盒、青/链霉素溶液、CCK-8试剂盒、乳酸脱氢酶检测试剂盒、细胞凋亡与坏死检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司;SYBR[®] Green Premix Ex Taq[™]、反转录试剂盒、购自日本TaKaRa公司;增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)显影液购自美国Millipore公司;DMEM高糖培养基、胰蛋白酶、胎牛血清购自美国Gibco公司;DMSO溶液、活性氧检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;6-羟基多巴胺购自美国Merck公司;山羊抗小鼠IgG、山羊抗兔IgG、 β -actin抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司;iNOS抗体、HMGB1抗体购自武汉爱博泰克生物技术有限公司;IL-6抗体、TNF- α 抗体购自成都正能生物技术有限公司。其他生化试剂均为进口分装或国产分析纯。所用引物序列见表1。

1.3 主要方法

1.3.1 细胞培养与处理 使用含10%胎牛血清和1%青/链霉素溶液的DMEM高糖培养基,在37 °C、

表1 qRT-PCR引物序列
Table 1 qRT-PCR primer sequence

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequences
<i>GAPDH</i>	Forward primer: 5'-AGA AGG CTG GGG CTC ATT TG-3' Reverse primer: 5'-AGG GGC CAT CCA CAG TCT TC-3'
<i>Trx1</i>	Forward primer: 5'-GTG GTG TGG GCC TTG CAA AAT G-3' Reverse primer: 5'-ACA CTC TGA AGC AAC ATC CTG ACA G-3'
<i>IL-6</i>	Forward primer: 5'-ACC TGT CTA TAC CAC TTC ACA AGT-3' Reverse primer: 5'-AGA ATT GCC ATT GCA CAA CTC T-3'
<i>TNF-α</i>	Forward primer: 5'-CCT CTC ATG CAC CAC CAT CA-3' Reverse primer: 5'-GCA TTG CAC CTC AGG GAA GA-3'
<i>iNOS</i>	Forward primer: 5'-GGC CAT CCT TTC CCA AGT GA-3' Reverse primer: 5'-GTT GAC GTG GGG TGG GTA AT-3'
<i>HMGB1</i>	Forward primer: 5'-ATG GGC AAA GGA GAT CCT AAG-3' Reverse primer: 5'-TTA TTC ATC ATC ATC ATC TTC TTC T-3'

5% CO₂的条件下对SH-SY5Y细胞进行培养。

1.3.2 *Trx1*过表达腺病毒模型的构建 *Trx1*过表达腺病毒构建于苏州吉玛基因股份有限公司, *Trx1*过表达腺病毒命名为Ad-*Trx1*, 阴性对照使用带有GFP标签的空载体, 命名为Ad-GFP。 *Trx1*过表达模型构建方法: (1) 将SH-SY5Y细胞以1.5×10⁵个/孔的密度接种于6孔板中, 当细胞贴壁稳定生长约24 h后, 更换新的完全培养基; (2) 分别加入感染复数(multiplicity of infection, MOI)值为200的Ad-GFP或Ad-*Trx1*, 24 h后更换新培养基, 37 °C、5% CO₂条件下继续培养24 h后, 用荧光显微镜观察腺病毒转染情况。

1.3.3 CCK-8细胞活力检测 将*Trx1*过表达后的细胞以5×10³个/孔的密度接种于96孔板中, 每组设置5个重复。当细胞贴壁稳定生长约24 h后, 更换新培养基, 实验组使用200 μmol/L的6-OHDA进行造模。置于37 °C培养箱中18 h后取出, 更换为无血清无双抗的空培养基, 避光加入10%的CCK-8工作液, 避光置于37 °C培养箱中3 h后取出, 用酶标仪在450 nm波长处测定吸光度(D)值, 根据说明书计算各组细胞数变化情况。实验分组情况: 对照组(正常培养的SH-SY5Y细胞)、6-OHDA组(SH-SY5Y细胞添加200 μmol/L的6-OHDA)、Ad-GFP组(SH-SY5Y细胞中转染Ad-GFP)、Ad-GFP+6-OHDA组(SH-SY5Y细胞中转染Ad-GFP并添加200 μmol/L的6-OHDA)、*Trx1*过表达组(SH-SY5Y细胞中转染Ad-*Trx1*)和*Trx1*过表达+6-OHDA组(SH-SY5Y细胞中转染Ad-*Trx1*并添加200 μmol/L的6-OHDA组)。

1.3.4 乳酸脱氢酶释放情况的检测 *Trx1*过表达处

理后, 按照乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)细胞毒性检测试剂盒说明书步骤进行下一步操作, 用酶标仪在490 nm波长处测定吸光度值, 并计算LDH释放量的变化。实验分组情况: Ad-GFP转染组(Ad-GFP)、Ad-GFP转染并添加200 μmol/L的6-OHDA组(Ad-GFP+6-OHDA)、Ad-*Trx1*转染组(Ad-*Trx1*)和Ad-*Trx1*转染并添加200 μmol/L的6-OHDA组(Ad-*Trx1*+6-OHDA)。

1.3.5 免疫印迹实验 将细胞以1×10⁶个/孔的密度接种于6孔板中, 当细胞贴壁稳定生长约24 h后, 更换新培养基, 加入200 μmol/L 6-OHDA刺激18 h, 处理结束后, 提取总蛋白, 根据BCA试剂盒说明书测定总蛋白浓度。根据试剂盒说明书配制SDS-PAGE凝胶, 将凝胶与电泳槽安装后, 加入1×电泳液, 拔出梳子, 在孔道内加入各组蛋白样品和Marker; 电泳条件: 80 V、30 min, 电泳条带进入分离胶后, 调整为120 V、40 min。电泳结束后, 将分离胶部分转移至1×转膜缓冲液中; 使用PVDF膜进行转膜, 条件为100 V恒压电转, 根据蛋白大小调整时间。转膜完成后将PVDF膜, 放入含5%脱脂奶粉的封闭液中, 室温孵育1 h。用1×TBST洗膜3次后将PVDF膜放入对应的一抗(稀释比例为1:1 000)中, 然后于4 °C摇床上孵育过夜, 用1×TBST洗膜3次, 将PVDF膜转移至对应的二抗(稀释比例为1:1 000)中, 室温孵育1 h; 最后用1×TBST洗膜5次。使用蛋白成像系统进行曝光并定量分析。

1.3.6 qRT-PCR实验 细胞处理结束后, 每孔加入

1 mL Trizol试剂, 混匀后移至不含RNase和DNase的1.5 mL离心管中; 每管中加入200 μ L氯仿, 冰上静置5 min; 12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C离心10 min; 吸取上层至新管中, 加入等体积异丙醇, 冰上静置10 min, 12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C离心5 min; 弃上清, 每管加入1 mL的75%乙醇, 12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C离心5 min; 弃上清, 等待晾干; 每管加入DEPC水, 吹吸混匀, 测RNA浓度, 并通过RNA浓度检测数值将各组RNA浓度值调成一致。根据说明书操作反转录反应, 反应结束后将cDNA放入-20 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。按说明书配制PCR反应液。实时荧光定量PCR反应程序第一阶段为95 $^{\circ}$ C预变性30 s; 第二阶段为95 $^{\circ}$ C变性5 s, 60 $^{\circ}$ C退火30 s, 循环次数为40; 第三阶段为95 $^{\circ}$ C延伸10 s, 65 $^{\circ}$ C延伸5 s, 复温到95 $^{\circ}$ C后以0.5 $^{\circ}$ C/s的速率进行降温。反应程序结束后采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析。

1.3.7 ROS探针荧光染色 向构建完成的*Trx1*过表达细胞中加入200 μ mol/L的6-OHDA。置于37 $^{\circ}$ C培养箱中3 h后取出, 严格按照活性氧检测试剂盒说明书装载探针后, 使用PBS缓冲液轻轻冲洗3次, 使用荧光显微镜分别观察视野中绿色染色情况。

1.3.8 Hoechst 33342和PI染色 向构建完成的*Trx1*过表达细胞中加入200 μ mol/L的6-OHDA。置于37 $^{\circ}$ C培养箱中3 h后取出, 每孔培养液更换为1 mL PBS缓冲液, 每孔加入5 μ L Hoechst 33342染色液和5 μ L PI染色液, 4 $^{\circ}$ C避光孵育30 min后, 使用PBS缓冲液轻轻冲洗2次。使用荧光显微镜分别观察视野中蓝色和红色染色情况。

1.4 统计学处理

所有数据使用Graph Pad Prism 8.0软件进行分析, 用平均值 \pm 标准误(mean \pm SEM)表示。多组间比较使用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 两组间比较采用*t*检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 构建SH-SY5Y细胞*Trx1*过表达模型

为评估*Trx1*过表达模型构建情况, 使用qRT-PCR方法检测*Trx1*基因mRNA丰度, Western blot方法检测*Trx1*的蛋白表达情况, 荧光显微镜下观察*Trx1*腺病毒转染效果。qRT-PCR结果如图1A所示, 与对照组(Ad-GFP)相比, Ad-*Trx1*组*Trx1* mRNA丰度极显

著升高($P<0.001$), Ad-GFP+6-OHDA组*Trx1* mRNA丰度极显著降低($P<0.01$); 与Ad-GFP+6-OHDA组相比, Ad-*Trx1*+6-OHDA组*Trx1* mRNA丰度极显著升高($P<0.001$), 且高于对照组(Ad-GFP)。Trx1的Western blot结果如图1B和图1C所示, 与对照组(Ad-GFP)相比, Ad-*Trx1*组Trx1蛋白表达水平显著增加($P<0.05$)。荧光显微镜下显示Ad-*Trx1*组呈绿色荧光。以上结果表明, *Trx1*过表达模型构建成功。

2.2 过表达*Trx1*后6-OHDA对神经元细胞活力的影响

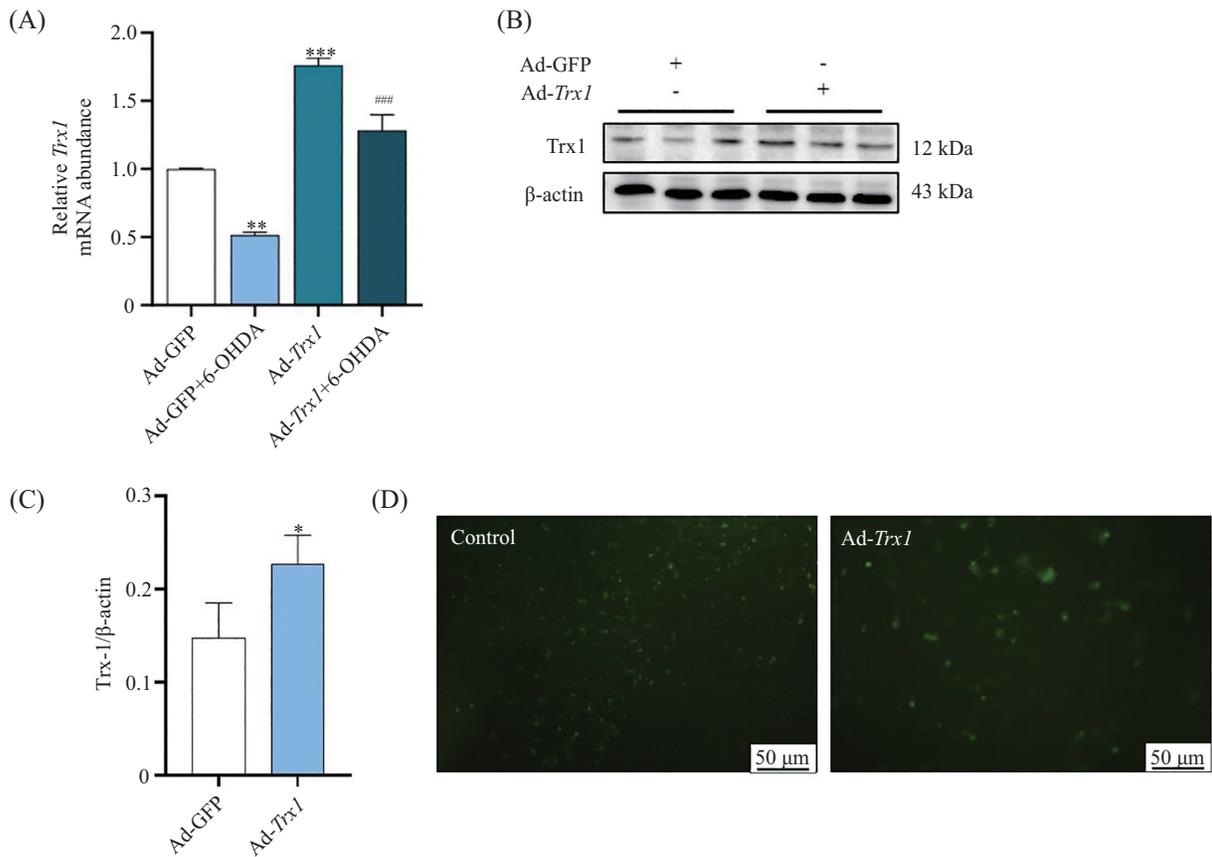
为探究Trx1在6-OHDA诱导的SH-SY5Y细胞活力下降中的作用, 使用CCK-8法检测细胞活力的变化情况。CCK-8结果如图2所示, 6-OHDA可以极显著降低SH-SY5Y细胞活力($P<0.01$), 6-OHDA可以极显著降低Ad-GFP组的细胞活力($P<0.01$), 6-OHDA显著降低Ad-*Trx1*转染后的SH-SY5Y细胞活力($P<0.05$), 说明6-OHDA能够损伤正常、Ad-GFP转染后和Ad-*Trx1*转染后的SH-SY5Y细胞, 神经元细胞损伤模型构建成功; 与正常SH-SY5Y细胞组相比, Ad-GFP组细胞活力差异不显著, 与6-OHDA组相比, Ad-GFP+6-OHDA组细胞活力差异不显著, 说明Ad-GFP的转染不会对正常SH-SY5Y细胞和6-OHDA刺激后的SH-SY5Y细胞活力造成显著影响; 与Ad-GFP+6-OHDA组相比, Ad-*Trx1*+6-OHDA组细胞活力极显著升高($P<0.01$)。以上结果说明, 过表达*Trx1*能极显著地改善6-OHDA诱导的SH-SY5Y细胞活力下降。

2.3 过表达*Trx1*后6-OHDA对神经元细胞LDH释放的影响

为探究Trx1在6-OHDA诱导的SH-SY5Y细胞LDH释放中的作用, 使用试剂盒检测LDH的释放情况。结果如图3所示, 与对照组(Ad-GFP)相比, Ad-*Trx1*组LDH释放无显著差异, Ad-GFP+6-OHDA组LDH释放极显著增加($P<0.001$), 说明过表达*Trx1*不会影响正常SH-SY5Y细胞LDH的释放, 而6-OHDA会促进LDH的释放; 与Ad-GFP+6-OHDA组相比, Ad-*Trx1*+6-OHDA组LDH释放极显著降低($P<0.001$)。以上结果说明, 过表达*Trx1*能抑制由6-OHDA诱导的SH-SY5Y细胞LDH释放增加。

2.4 过表达*Trx1*后6-OHDA对神经元细胞中细胞凋亡、坏死和氧化应激状态的影响

为探究过表达*Trx1*后, 6-OHDA对SH-SY5Y细

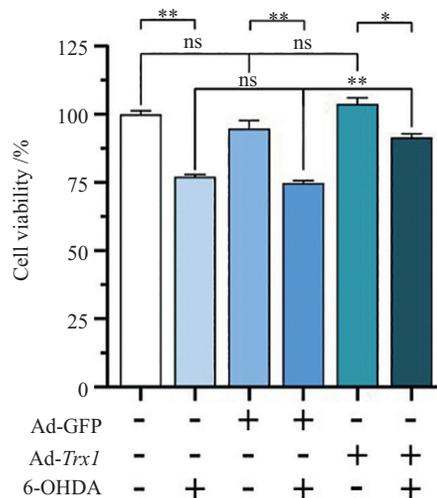


A: 过表达 *Trx1* 后, qRT-PCR 法检测 6-OHDA 影响 SH-SY5Y 细胞 *Trx1* mRNA 丰度的结果; B、C: Western blot 法检测 SH-SY5Y 细胞 Trx1 蛋白表达的结果; D: 荧光显微镜下观察 *Trx1* 过表达腺病毒在 SH-SY5Y 细胞中的转染效果。数据表示为平均值±标准误, $n=3$ 。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与 Ad-GFP 组相比较; ### $P<0.001$, 与 Ad-GFP+6-OHDA 组相比较。

A: results of qRT-PCR detecting the mRNA abundance of *Trx1* gene in SH-SY5Y cells treated with 6-OHDA after *Trx1* overexpression; B,C: results of Western blot analysis detecting Trx1 protein expression in SH-SY5Y cells; D: fluorescence microscopy images showing the transfection efficiency of *Trx1*-overexpressing adenovirus in SH-SY5Y cells. Data are presented as mean±SEM, $n=3$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with Ad-GFP group; ### $P<0.001$ compared with Ad-GFP+6-OHDA group.

图1 成功构建SH-SY5Y细胞*Trx1*过表达模型

Fig.1 The *Trx1* overexpression model in SH-SY5Y cells has been successfully established

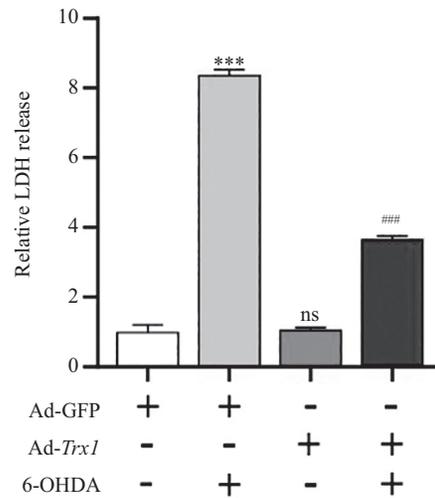


数据表示为平均值±标准误, $n=5$ 。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, $^{ns}P>0.05$ 。

Data are presented as mean±SEM, $n=5$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, $^{ns}P>0.05$.

图2 CCK-8法检测6-OHDA影响SH-SY5Y细胞活力的结果

Fig.2 The results of CCK-8 assay to detect the effect of 6-OHDA on the viability of SH-SY5Y cells



数据表示为平均值±标准误, $n=5$ 。*** $P<0.001$, $^{ns}P>0.05$, 与Ad-GFP组相比较; ### $P<0.001$, 与Ad-GFP+6-OHDA组相比较。

Data are presented as mean±SEM, $n=5$. *** $P<0.001$, $^{ns}P>0.05$ compared with Ad-GFP group; ### $P<0.001$ compared with Ad-GFP+6-OHDA group.

图3 试剂盒检测6-OHDA影响SH-SY5Y细胞LDH释放的结果

Fig.3 The kit was used to detect the effect of 6-OHDA on LDH release in SH-SY5Y cells

胞中ROS含量、细胞凋亡和坏死情况的影响,用荧光显微镜观察ROS探针染色后ROS含量的变化;Hoechst 33342染色观察细胞凋亡情况,PI染色观察细胞坏死情况。结果显示,与对照组(Ad-GFP)相比,Ad-Trx1组无显著变化,Ad-GFP+6-OHDA组ROS染色荧光强度显著增加;Hoechst 33342染色后Ad-GFP+6-OHDA组细胞核呈致密浓染加深,PI染色后Ad-GFP+6-OHDA组红色荧光强度增加;与相同染色的Ad-GFP+6-OHDA组相比,Ad-Trx1+6-OHDA组能显著逆转这些现象。以上结果说明,过表达Trx1能够减少6-OHDA诱导的SH-SY5Y细胞中ROS的累积并减轻6-OHDA诱导的SH-SY5Y细胞晚期细胞凋亡和细胞坏死的情况。

2.5 过表达Trx1后6-OHDA对神经元细胞中炎症相关基因表达的影响

为探究过表达Trx1后,6-OHDA对SH-SY5Y细胞中炎症相关基因丰度的影响,采用qRT-PCR方法检测*iNOS*、*IL-6*、*TNF- α* 、*HMGB1*基因的表达水平。结果如图5所示,qRT-PCR结果显示,与对照组(Ad-GFP)相比,Ad-Trx1组*iNOS*、*IL-6*、*TNF- α* 和*HMGB1*基因mRNA丰度无显著变化,Ad-GFP+6-OHDA组*iNOS*、*IL-6*、*TNF- α* 和*HMGB1*基因mRNA丰度均极显著增加($P<0.001$ 或 $P<0.01$);与Ad-GFP+6-OHDA组相比,Ad-Trx1+6-OHDA组*HMGB1*基因mRNA丰度显著降低($P<0.05$);*iNOS*、*IL-6*和*TNF- α* 基因mRNA丰度极显著降低($P<0.001$ 或

$P<0.01$)。以上结果说明,过表达Trx1能够抑制由6-OHDA诱导的SH-SY5Y细胞炎症相关基因mRNA丰度增加。

2.6 过表达Trx1后6-OHDA对神经元细胞中炎症相关蛋白表达的影响

为探究过表达Trx1后,6-OHDA对SH-SY5Y细胞中炎症相关蛋白表达情况的影响,采用Western blot方法检测*iNOS*、*IL-6*、*TNF- α* 和*HMGB1*蛋白的表达水平。结果如图6所示,与对照组(Ad-GFP)相比,Ad-Trx1组*iNOS*、*IL-6*、*TNF- α* 和*HMGB1*蛋白的表达水平无显著变化,Ad-GFP+6-OHDA组*iNOS*、*IL-6*、*TNF- α* 和*HMGB1*蛋白的表达水平均极显著增加($P<0.001$ 或 $P<0.01$);与Ad-GFP+6-OHDA组相比,Ad-Trx1+6-OHDA组*iNOS*、*IL-6*、*TNF- α* 和*HMGB1*蛋白的表达水平极显著降低($P<0.001$)。以上结果说明,过表达Trx1能够抑制由6-OHDA诱导的SH-SY5Y细胞炎症相关蛋白表达水平增加。

3 讨论

PD是最常见的神经退行性疾病之一。为探究治疗PD的有效靶点,本研究以SH-SY5Y细胞为研究对象,使用6-OHDA构建神经元细胞损伤模型,并转染Trx1过表达腺病毒,以期为神经系统相关疾病的治疗提供帮助。

硫氧还蛋白系统对于维持细胞稳态的平衡至关重要,它广泛参与细胞增殖分化、炎症反应、氧化还

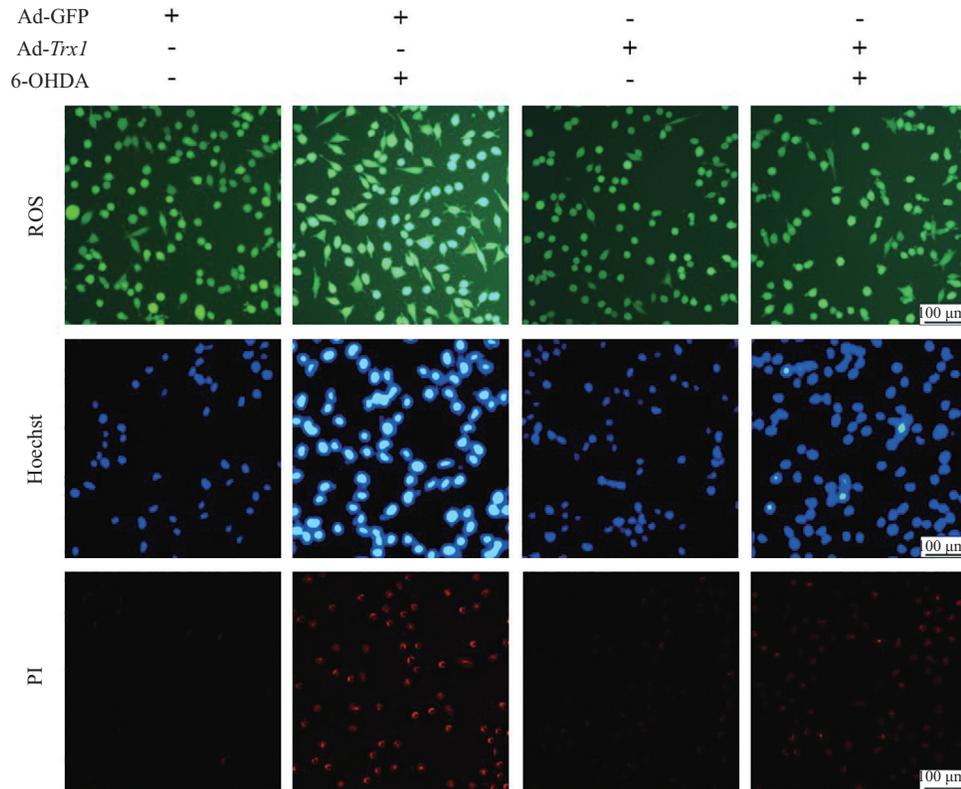
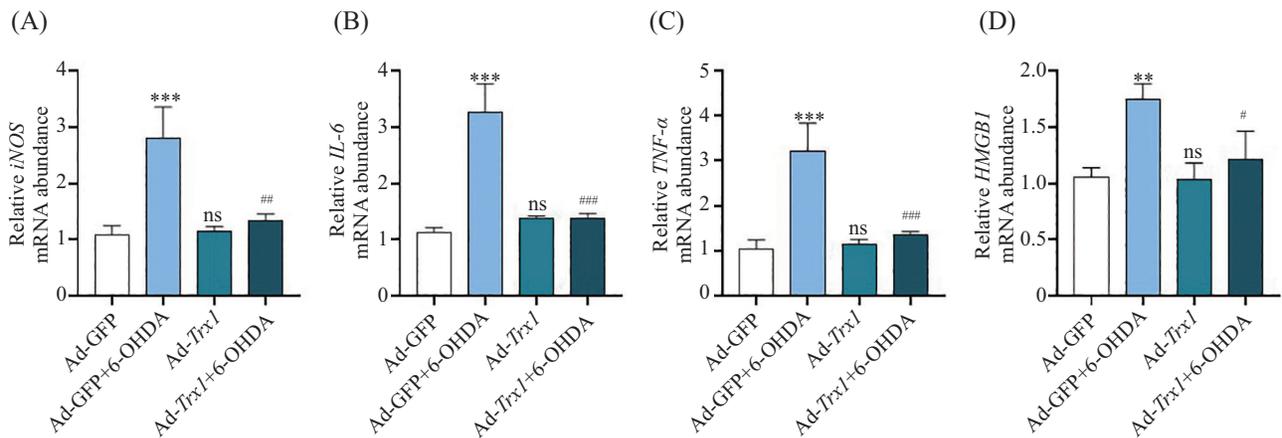


图4 6-OHDA影响SH-SY5Y细胞ROS染色荧光强度、细胞凋亡和坏死的结果

Fig.4 Effects of 6-OHDA on ROS fluorescence intensity, apoptosis, and necrosis in SH-SY5Y cells



A~D: *iNOS*, *IL-6*, *TNF-α*, *HMGB1*的mRNA丰度分析结果。数据表示为平均值±标准误, $n=3$ 。** $P<0.01$, *** $P<0.001$, $^{ns}P>0.05$, 与Ad-GFP组相比较; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$, 与Ad-GFP+6-OHDA组相比较。

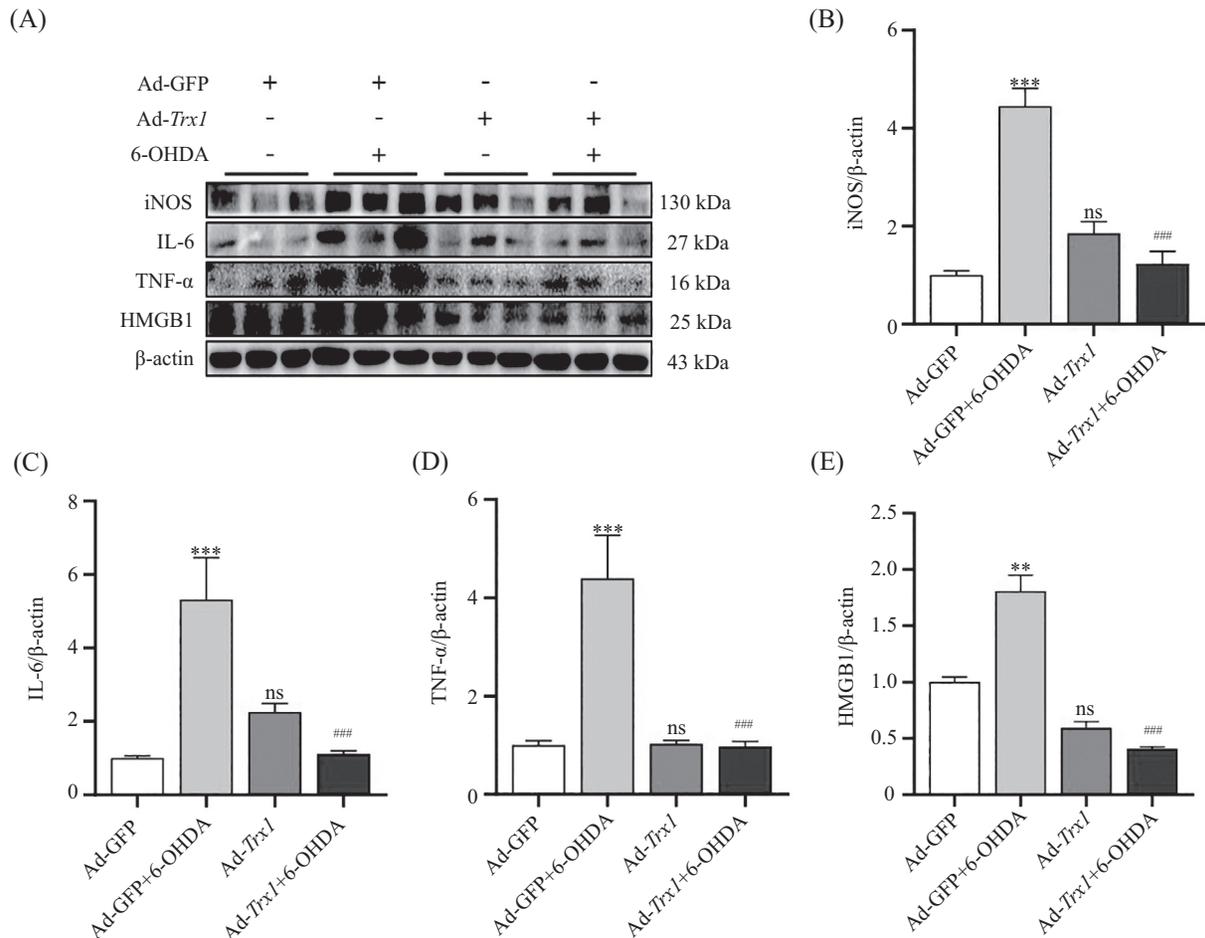
A-D: qRT-PCR results of *iNOS*, *IL-6*, *TNF-α* and *HMGB1*. Data are presented as mean±SEM, $n=3$. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, $^{ns}P>0.05$ compared with Ad-GFP group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ compared with Ad-GFP+6-OHDA group.

图5 qRT-PCR法检测6-OHDA影响SH-SY5Y细胞炎症相关基因丰度的结果

Fig.5 The results of detecting the abundance of inflammation-related genes in SH-SY5Y cells affected by 6-OHDA using qRT-PCR

原反应、细胞凋亡和自噬等关键调节机制^[14,18-19,24]。此外, Trx1对哺乳动物的发育至关重要, 因为 *Trx1* 或 *Trx2* 的缺失在小鼠胚胎中是致死的^[15-16]。作为一种普遍存在的多功能蛋白质, Trx1在所有生命形式中都有表达, 其既可作为主要的二硫键还原酶, 从而维持

细胞硫醇氧化还原稳态, 又可作为转录因子和激酶的调节剂, 以氧化还原依赖性方式调节它们的活性^[17]。LDH是一种广泛存在于生物体内的氧化还原酶, 参与糖酵解和乳酸发酵过程。当细胞受损或膜破裂时, LDH会释放溢出, 其水平常用于提示细胞坏死情况。



A: iNOS、IL-6、TNF- α 、HMGB1和 β -actin的Western blot结果; B~E: iNOS/ β -actin、IL-6/ β -actin、TNF- α / β -actin和HMGB1/ β -actin的蛋白表达分析结果。数据表示为平均值 \pm 标准误, $n=3$ 。 ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, $^{ns}P>0.05$, 与Ad-GFP组相比较; ### $P<0.001$, 与Ad-GFP+6-OHDA组相比较。

A: Western blot results of iNOS, IL-6, TNF- α , HMGB1 and β -actin; B-E: the results of protein expression analysis of iNOS/ β -actin, IL-6/ β -actin, TNF- α / β -actin and HMGB1/ β -actin. Data are presented as mean \pm SEM, $n=3$. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, $^{ns}P>0.05$ compared with Ad-GFP group; ### $P<0.001$ compared with Ad-GFP+6-OHDA group.

图6 Western blot法检测6-OHDA影响SH-SY5Y细胞炎症相关蛋白表达的结果

Fig.6 The results of Western blot to detect the effect of 6-OHDA on the expression of inflammation-related protein in SH-SY5Y cells

本研究结果表明 *Trx1* 过表达后, 6-OHDA 诱导的细胞活力降低被改善, 降低了 6-OHDA 的细胞毒性并抑制了 LDH 释放的增加。这说明 *Trx1* 在 6-OHDA 造成的 SH-SY5Y 细胞损伤中具有保护作用。

ROS 作为氧化应激中的关键介质, 具有促进炎症介质表达、引发细胞损伤的作用, 会加剧细胞凋亡、坏死等程序性死亡过程。本研究发现, 在 6-OHDA 的影响下, SH-SY5Y 细胞中的 ROS 含量明显增加, 细胞凋亡和坏死的水平也明显上升, 而过表达 *Trx1* 有效缓解了以上情况。PARK^[26] 的研究显示过表达 *Trx1* 通过降低 ROS 水平, 缓解过氧化氢诱导的血管平滑肌细胞死亡; LI 等^[27] 的研究发现葛根素通过上调 *Trx1* 的表达, 从而抑制细胞 ROS 的产生, 减少动脉粥样硬化形成过程中巨噬细胞中的脂

质积累; LI 等^[21] 发现氢气能够增加小鼠脊髓细胞中 *Trx1* 的表达水平, 进而通过抑制凋亡信号调节激酶 1 (apoptosis signal regulating kinase-1, ASK-1) 的表达降低基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP-9) 的活性, 最终缓解神经炎症并抑制疼痛信号的传递。还有研究表明, 使用 *Trx1* 抑制剂后, 细胞生长受抑制, ROS 水平升高, 细胞凋亡水平升高^[25]。结合以上结果可以明确过表达 *Trx1* 通过降低 SH-SY5Y 细胞内 ROS 含量并抑制细胞凋亡和坏死, 从而缓解 6-OHDA 造成的细胞损伤。

细胞损伤往往伴随着促炎因子的过度表达, 本研究检测了 iNOS、IL-6、TNF- α 、HMGB1 这几种经典的促炎因子, 以评估 6-OHDA 对 SH-SY5Y 细胞造成的炎症损伤和过表达 *Trx1* 的治疗效果。有研究

表明,在LPS诱导的小鼠急性肺损伤模型中,一种化合物SIN(sinensetin)可以通过降低肺脏组织中ROS的水平,进而抑制IL-6、TNF- α 等促炎因子的表达以及在巨噬细胞中的分泌^[20]。另一份研究表明,在低氧环境下,使用儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)预处理的微胶质细胞ROS生成明显减少,并且IL-6、iNOS的表达也被抑制^[22]。另外,抑制Trx1表达后,IL-1 β 和IL-18的表达水平显著升高,加剧了脑缺血再灌注模型的损伤^[23]。在本研究中,过表达Trx1从基因和蛋白水平上不同程度抑制了6-OHDA诱导的iNOS、IL-6、TNF- α 和HMGB1的进一步释放,缓解了炎性损伤,这些保护作用本质上是通过抑制细胞内ROS的过度积累,从而维持细胞内氧化还原稳态来实现的。本文仅在体外探讨了Trx1在神经炎症中的保护机制,未涉及体内探讨Trx1的作用,在后续的研究中,我们计划使用动物模型,通过构建基因敲除小鼠,来深入探究Trx1的神经保护作用,以期为神经系统疾病的治疗提供新的治疗靶点。

综合以上结果说明,在6-OHDA诱导的SH-SY5Y细胞损伤模型中,过表达Trx1通过降低细胞内ROS的含量,维持细胞内氧化还原稳态,进而抑制细胞凋亡和坏死以及炎症介质的积累,最终缓解6-OHDA诱导的SH-SY5Y细胞炎性损伤。

参考文献 (References)

- [1] CHEN C L, KUO M C, WU W C, et al. Advanced brain aging in multiple system atrophy compared to Parkinson's disease [J]. *Neuroimage Clin*, 2022, 34: 102997.
- [2] KOLODKIN A N, SHARMA R P, COLANGELO A M, et al. ROS networks: designs, aging, Parkinson's disease and precision therapies [J]. *NPJ Syst Biol Appl*, 2020, 6: 34.
- [3] LIU Z Y, YAO X Q, JIANG W S, et al. Advanced oxidation protein products induce microglia-mediated neuroinflammation via MAPKs-NF- κ B signaling pathway and pyroptosis after secondary spinal cord injury [J]. *Neuroinflammation*, 2020, 17: 90.
- [4] LI M A, ZHOU L, SUN X H, et al. Dopamine, a co-regulatory component, bridges the central nervous system and the immune system [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 145: 112458.
- [5] VARESLIJA D, TIPTON K F, DAVEY G P, et al. 6-hydroxydopamine: a far from simple neurotoxin [J]. *Neural Transm*, 2020, 127: 213-30.
- [6] SENOH S, CREVELING C R, WITKOP B. Chemical, enzymatic and metabolic studies on the mechanism of oxidation of dopamine [J]. *Am Chem Soc*, 1959, 81: 6236-40.
- [7] LU J, HOLMGREN A. The thioredoxin antioxidant system [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 66: 75-87.
- [8] WILSON L G, ASAHI T, BANDURSKI R S. Yeast sulfate-reducing system. I. Reduction of sulfate to sulfite [J]. *Biol Chem*, 1961, 236: 1822-9.
- [9] YANG B, LIN Y, HUANG Y, et al. Thioredoxin (Trx): a redox target and modulator of cellular senescence and aging-related diseases [J]. *Redox Biol*, 2024, 70: 103032.
- [10] CUI C, SHU P, SADEGHIAN T, et al. Inhibitory peptide of soluble guanylyl cyclase/Trx1 interface blunts the dual redox signaling functions of the complex [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(4): 906.
- [11] ANDOH T, CHOCK P B, CHIUEH C C. The roles of thioredoxin in protection against oxidative stress-induced apoptosis in SH-SY5Y cells [J]. *Biol Chem*, 2002, 277: 9655-60.
- [12] 任鹏. 硫氧还蛋白1改善帕金森病小鼠嗅觉功能障碍的作用及机制研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2023.
- [13] BAI J, NAKAMURA H, KWON Y W, et al. Does thioredoxin-1 prevent mitochondria and endoplasmic reticulum-mediated neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl 1-1,2,3,6-tetrahydropyridine [J]? *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9: 603-8.
- [14] COUCHIE D, VAISMAN B, ABDERRAZAK A, et al. Human plasma thioredoxin-80 increases with age and in apoE mice induces inflammation, angiogenesis, and atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2017, 136: 464-75.
- [15] MATSUI M, OSHIMA M, OSHIMA H, et al. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene [J]. *Dev Biol*, 1996, 178(1): 179-85.
- [16] NONN L, WILLIAMS R R, ERICKSON R P, et al. The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23: 916-22.
- [17] SHAO D, OKA S I, LIU T, et al. A redox-dependent mechanism for regulation of AMPK activation by thioredoxin1 during energy starvation [J]. *Cell Meta*, 2014, 19: 232-45.
- [18] WU A H, FANG D Q, LIU Y Y, et al. Nuclear translocation of thioredoxin-1 promotes colorectal cancer development via modulation of the IL-6/STAT3 signaling axis through interaction with STAT3 [J]. *Theranostics*, 2023, 13(14): 4730-44.
- [19] YANG Q, CAI W, JIN H, et al. Downregulation of inflammatory response via Nrf2/Trx1/TXNIP axis in oxidative stress-induced ARPE-19 cells and mouse model of AMD [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022: 1497813.
- [20] XU Z B, HU H Y, WANG K Y, et al. Sinensetin, a polymethoxyflavone from citrus fruits, ameliorates LPS-induced acute lung injury by suppressing Txnip/NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling-mediated inflammatory responses and pyroptosis [J]. *Food Funct*, 2024, 15: 7592-604.
- [21] LI J, RUAN S R, JIA J H, et al. Hydrogen attenuates postoperative pain through Trx1/ASK1/MMP9 signaling pathway [J]. *Neuroinflammation*, 2023, 20(1): 22.
- [22] KIM S R, SEONG K J, KIM W J, et al. Epigallocatechin gallate protects against hypoxia-induced inflammation in microglia via NF- κ B suppression and Nrf2/HO-1 activation [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(7): 4004.
- [23] HOU Y H, WANG Y T, HE Q, et al. Nrf2 inhibits NLRP3 inflammasome activation through regulating Trx1/TXNIP complex in

- cerebral ischemia reperfusion injury [J]. *Behav Brain Res*, 2018, 336: 32-9.
- [24] YU W D, LUO J, ZHANG A K, et al. Berberine alleviates pulmonary hypertension through Trx1 and β -catenin signaling pathways in pulmonary artery smooth muscle cells [J]. *Exp Cell Res*, 2020, 390(1): 111910.
- [25] LI G Z, LIANG H F, LIAO B, et al. PX-12 inhibits the growth of hepatocellular carcinoma by inducing S-phase arrest, ROS-dependent apoptosis and enhances 5-FU cytotoxicity [J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7: 1528-40.
- [26] PARK W H. Upregulated thioredoxin and its reductase prevent HO-induced growth inhibition and death in human pulmonary artery smooth muscle cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2019, 61: 104590.
- [27] LI W C, XU X T, DONG D D, et al. Up-regulation of thioredoxin system by puerarin inhibits lipid uptake in macrophages [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 162: 542-54.