

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.23.005

NLRP3 与 NOD2 受体激活对下游炎症因子表达的影响*

韩浩贤¹,王虹艳^{2△},曲 鹏²,田云朋³

(1. 天津医科大学护理学院,天津 300070;2. 大连医科大学附属第二医院心内科,大连 116027;
3. 天津市第一中心医院心内科,天津 300070)

[摘要] 目的 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)与核苷酸结合寡聚化结构域 2(NOD2)受体被其特异性配体激活后对下游炎症因子表达的影响。方法 实验分为 4 组:空白对照组、T_{ATP} 组、T_{MDP}、T_{MDP+ATP} 组。用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定白细胞介素(IL)-1β 及 IL-18 的表达,逆转录 PCR 测定 NLRP3、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1(Caspase-1)的表达情况。结果 T_{MDP}组、T_{ATP}组、T_{MDP+ATP}组的 IL-1β 和 IL-18 水平均高于空白对照组($P<0.05$),且 T_{MDP+ATP} 组水平增高更显著。T_{MDP}组、T_{ATP}组、T_{MDP+ATP} 组的 NLRP3 和 Caspase-1 表达均高于空白对照组($P<0.05$),且 T_{MDP+ATP} 组水平增高更显著($P<0.05$)。结论 NOD2 的特异性配体胞壁酰二肽, NLRP3 的特异性配体腺苷三磷酸单独刺激 THP-1 后 NLRP3 及下游炎症因子的表达很弱或无表达,联合刺激后可显著增强 NLRP3 及下游炎症因子的表达,二者之间存在相互促进及协同作用。

[关键词] 白细胞介素-18;白细胞介素-1β;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1; NLRP3
[中图分类号] R541.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)23-3182-03

Affect of NLRP3 and NOD2 activated on the downstream inflammatory cytokines*
Han Haoxian¹,Wang Hongyan^{2△},Qu Peng²,Tian YunPeng³

(1. the School of Nursing, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Cardiovascular Internal Medicine, the Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116027, China;
3. Cardiovascular Internal Medicine, the First Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300070, China)

[Abstract] **Objective** To explore the affect of NLRP3 and NOD2 activated on the downstream inflammatory cytokines. **Methods** The cases were divided into 4 groups: blank control group, T_{MDP} group, T_{ATP} group and T_{MDP+ATP} group. The expression of IL-1β and IL-18 were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the expression of NLRP3 and Caspase-1 were tested by real-time PCR. **Results** The levels of IL-1β and IL-18 in T_{MDP} group, T_{ATP} group and T_{MDP+ATP} group were higher than that of blank control group($P<0.05$), and the group of T_{MDP+ATP} levels increased more significantly($P<0.05$). The expression of NLRP3 and Caspase-1 in T_{MDP} group, T_{ATP} group and T_{MDP+ATP} group were higher than that of blank control group($P<0.05$), and the levels of T_{MDP+ATP} group increased more significantly($P<0.05$). **Conclusion** The expression of NLRP3 and downstream inflammatory factors are weak or no expressions occur when MDP (specific ligand of NOD2) and ATP (specific ligand of NOD2) independently stimulate THP-1. However, the expression is enhanced significantly after the joint stimulation, which means that MDP and ATP have synergistic and promoting relationship.

[Key words] IL-18; IL-1β; Caspase-1; NLRP3

随着经济水平的提高,我国冠心病的发病率和病死率也逐年升高,并呈年轻化趋势,造成冠状动脉狭窄或阻塞的最常见原因是动脉粥样硬化。近年研究表明,细胞膜表面的 Toll 样受体和细胞质内的核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3)样受体是介导先天免疫系统和动脉粥样硬化的桥梁^[1],目前核苷酸结合寡聚化结构域(NOD)参与形成动脉粥样硬化的研究逐渐受到重视。Duewell 等^[2]研究证实 NLRP3 炎症小体可能参与了动脉粥样硬化的发生和发展。白细胞介素 1β(IL-1β)和白细胞介素 18(IL-18)等炎症因子介导的免疫机制参与了冠心病动脉粥样硬化形成的早期阶段,促进了微血栓的形成及不稳定斑块的破裂。胞质受体 NLRP3 和 NOD2 恰是以此形式来启动机体的免疫和炎症反应,从而在动脉粥样硬化的形成及发展过程中发挥了重要作用^[3]。NOD2 和 NLRP3 是先天免疫模式识别受体最具有代表性的 2 个成员,目前关于二者的特异性配体胞壁酰二肽(MDP)、腺苷三磷酸

(ATP)联合刺激细胞后是否可以引起 NLRP3 及下游炎症因子表达显著增加的报道较少。本实验旨在探讨 NLRP3 与 NOD2 这两个胞内受体的激活对其下游炎症因子表达的影响, 以为动脉粥样硬化的治疗提供新的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞株 单核细胞株(THP-1)购自中科院上海生命科学研究院。
1.1.2 主要试剂、实验设备和仪器 MDP(Sigma 公司);ATP (Sigma 公司);IL-1β、IL-18 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(Bioscience 公司);NLRP3 抗体(100 μL, Sigma 公司);半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1(Caspase-1)抗体(100 μL, Sigma 公司);CO₂ 孵箱(Thermo Forma, 美国);电泳仪(六一仪器厂, 北京);逆转录 PCR(RT-PCR)仪(Bio-Rad iQ5, 美国);倒置显微镜 CK40-F200 型(Olympus 公司, 日本)。

* 基金项目:辽宁省自然科学基金(2013023025)。 作者简介:韩浩贤(1983—),实验师,硕士,主要从事心血管病方面研究。 △ 通讯作者, E-mail: hongyanwang1967@aliyun.com。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 空白对照组:加入磷酸盐缓冲液(PBS)100 μ L后放入孵箱恒温孵育 24 h;T_{MDP}组:加入 25 μ L MDP,使其浓度至 10 μ mol/L,放入孵箱恒温孵育 24 h^[5];T_{ATP}组:加入 256 μ L ATP,使其浓度至 100 μ mol/L,放入孵箱恒温孵育 24 h^[6];T_{MDP+ATP}组:加入 25 μ L MDP,使其浓度至 10 μ mol/L,放入孵箱恒温孵育 2 h 进行 MDP 的预处理,再加入 256 μ L ATP,使其浓度至 100 μ mol/L,最后再置孵箱恒温孵育 24 h。

1.2.2 用 ELISA 测定细胞培养物 IL-1 β 及 IL-18 的水平 严格按照试剂盒说明书步骤进行显色,用酶标仪在 450 nm 测定光密度(OD)值,绘制标准曲线,根据标准曲线,求得样本水平浓度。

1.2.3 单核细胞 RNA 提取及 RT-PCR Trizol 法提取细胞 RNA,并进行 RNA 水平的测定。PCR 引物由天津赛尔生物技术有限公司合成(表 1)。逆转录反应体系严格按照试剂盒说明书操作。运用 SYBR Premix Ex TaqTM(TaKaRa)进行 RT-PCR 反应。反应条件:SYBR Green Mix(2x)10.0 μ L;ROX Reference Dye II 0.4 μ L;Primer 1(5 pmol/ μ L)1.0 μ L;Primer 1(5 pmol/ μ L)1.0 μ L;Primer 1(5 pmol/ μ L)1.0 μ L;Primer 2(5 pmol/ μ L)1.0 μ L;Template 0.5 μ L;双蒸水 ddH₂O 7.1 μ L;每孔 20.0 μ L。热循环:94 $^{\circ}$ C 4 min;94 $^{\circ}$ C 30 s;56 $^{\circ}$ C 60 s;72 $^{\circ}$ C 40 s;40 个循环。

表 1 目的基因和内参 β -actin 的引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')	引物长度(bp)
NLRP3	上游 CTTCTTTTCCAGTTTGCTGC	212
	下游 TCTCGCAGTCCACTTCCTTT	212
Caspase-1	上游 GCCAAGTTTGAAGACAAA	588
	下游 GGTGTGGAAGAGCAGCAGAAAGC	588
β -actin	上游 CGTGACATTAAGGAGAAGCTG	708
	下游 CTAGAAGCATTTGCGGTGGAC	708

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,采用 q 检验和 T 检验(LSD 法)进行两两比较,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MDP、ATP 单独刺激及联合刺激 THP-1 后对 IL-1 β 和 IL-18 表达的影响 MDP、ATP 及 MDP+ATP 对单核细胞株分泌 IL-1 β 、IL-18 的影响:MDP、ATP 及 MDP+ATP 作用于单核细胞株 24 h 后,上清液中 IL-1 β 、IL-18 的水平升高($P<0.05$),而 T_{MDP+ATP}组所致的 IL-1 β 、IL-18 水平与 T_{MDP}组、T_{ATP}组比较显著升高($P<0.05$),见表 2。

表 2 MDP、ATP 及 MDP+ATP 对单核细胞株分泌 IL-1 β 、IL-18 的影响($\bar{x}\pm s$,pg/mL)

项目	空白对照组	T _{MDP} 组	T _{ATP} 组	T _{MDP+ATP} 组
IL-1 β	0.2 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1 ^a	1.0 $\pm$ 0.2 ^a	31.1 $\pm$ 6.5 ^{abc}
IL-18	15.0 $\pm$ 0.1	38.9 $\pm$ 8.1 ^a	32.3 $\pm$ 7.5 ^a	58.9 $\pm$ 11.4 ^{abc}

^a: $P<0.05$,与空白对照组比较;^b: $P<0.05$,与 T_{MDP}组比较;^c: $P<0.05$,与 T_{ATP}组比较。

2.2 RNA 总电泳图 RNA 提取浓度 0.5~2.0 μ g/ μ L,OD₂₆₀/OD₂₈₀1.8~2.0,RNA 提取纯度可满足本实验要求;所有标本在凝胶电泳图上均可见清晰 28、18、5 s 3 条带,其中 28 s 条带的亮度达到 18 s 亮度的两倍以上,符合本实验要求,

见图 1。

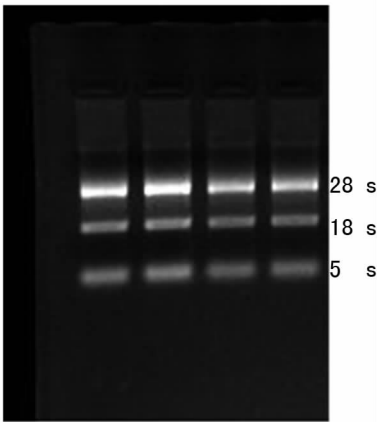


图 1 RNA 总电泳图

2.3 MDP、ATP 单独刺激及联合刺激 THP-1 后对 NLRP3、Caspase-1 mRNA 表达的影响 所有标本均重复检测 3 次取均值,MDP、ATP 及 MDP+ATP 均可增加单核细胞株 NLRP3、Caspase-1 mRNA 的表达($P<0.05$),但 T_{MDP+ATP}组可以明显增加上述炎症因子的表达($P<0.05$),见表 3、4。

表 3 各组对单核细胞株 NLRP3 mRNA 的表达

组别	Mean Ct	β -actin	$\Delta C(t)$	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
空白对照组	19.51	20.84	-1.33	0	1.00
T _{MDP} 组	18.87	20.67	-1.80	-0.47	1.39 ^a
T _{ATP} 组	18.71	20.69	-1.98	-0.65	1.57 ^a
T _{MDP+ATP} 组	18.38	21.11	-2.73	-1.40	2.64 ^{abc}

^a: $P<0.05$,与空白对照组比较;^b: $P<0.05$,与 T_{MDP}组比较;^c:与 T_{ATP}组比较, $P<0.05$,与 T_{ATP}组比较。

表 4 各组对单核细胞株 Caspase-1 mRNA 的表达的影响

组别	Mean Ct	β -actin	$\Delta C(t)$	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
空白对照组	21.32	20.84	0.48	0	11.00
T _{MDP} 组	21.05	20.67	0.38	-0.10	1.07 ^a
T _{ATP} 组	20.93	20.69	0.24	-0.24	1.19 ^a
T _{MDP+ATP} 组	18.90	21.11	-2.21	-2.69	6.45 ^{abc}

^a: $P<0.05$,与空白对照组比较;^b: $P<0.05$,与 T_{MDP}组比较;^c: $P<0.05$,与 T_{ATP}组比较。

3 讨 论

研究表明 ATP 是 NLRP3 的特异性配体,无活性的 NLRP3 必须通过 ATP 聚合最终产生有活性的 NLRP3 来切割 Caspase-1 前体(Pro-caspase-1)并使其活化,活化后的 Caspase-1 再次切割 IL-1 β 、IL-18 等底物,诱发少量 IL-1 β 和 IL-18 的成熟和泌出^[4]。本实验 ELISA 结果与既往的研究结果相符^[5-6]。特异性配体 MDP 与 NOD2 结合后可启动核因子 κ B(NF- κ B)经典信号通路,活化的 NF- κ B 可增强 NOD2 的基因表达,彼此形成一个正反馈环路,增强了 IL-1 β 、IL-18 前体的转录,最终加快了促炎症因子的产生和泌出,从而参与炎症反应,并具有调控炎症反应的功能^[7-8]。有研究证实 NOD2 可通过激活 NALP1 最终致使 Caspase-1 活化,并分泌少量炎症因子^[9]。至此可知活化的 NOD2 和 NLRP3 均可以激活 Caspase-1。由此猜想 NOD2 和 NLRP3 在产生 IL-1 β 和 IL-18 的过程中也有

一定的交互关系。本研究单独 MDP、ATP 刺激单核细胞后, IL-1 β 、IL-18 的水平比较微弱表达,但与空白对照组相比较差异有统计学意义。MDP 预处理后的单核细胞中加入 ATP, ELISA 测试后发现 IL-1 β 、IL-18 的水平显著高于空白对照组,较二者单独刺激后有明显差异。但 IL-1 β 差异较显著,这可能与它自身特性有关,胞外的 IL-1 β 与胞内的核因子 κ B(NF- κ B)、胞内的 NF- κ B 与细胞质内的 NOD2 构成两对正反馈环路,从而放大最初的炎症信号,导致机体损伤及微循环障碍加重^[10]。

由 Real-time PCR 结果猜想可能与以下因素有关:(1)采纳的 MDP 预处理时间与 NF- κ B 达到峰值的时间相符;(2)MDP 所致 NF- κ B 信号通路的活化,为大量炎症前体基因的转录提供了前提条件。Caspase-1 的活化不仅是 ATP 激活 NLRP3 的结果,而且是 MDP 激活 NLRP1 的结果,Caspase-1 是二者联合刺激后产生效应的关键点^[11];(3)MDP 的预刺激既提供了大量无活性的 NLRP3 蛋白寡聚体又加强了 NLRP3 对 ATP 的敏感性,从而导致更多 Caspase-1 的自身激活^[12];(4)MDP 激活 NOD2 后促使正反馈环路形成,大量的 NOD2 凭借 NLRP1 这条途径切割 Pro-Caspase-1,诱发大量 IL-1 β 、IL-18 分泌到细胞外,而细胞外 IL-1 β 的增多又促进了其上游因子间正反馈环路的构成。

综上,MDP、ATP 单独刺激单核细胞后 NLRP3 及下游炎症因子的表达很微弱,MDP 联合 ATP 刺激细胞后可促进 NLRP3 及下游炎症因子的表达显著增加,二者之间存在促进及协同作用,但产生协同效应的具体机制及信号途径的具体位点尚不清楚,有待于进一步研究去证实。NLRP3 及炎症因子参与了动脉粥样硬化的形成与发展,干预其下游因子及调控其信号通路将为治疗动脉粥样硬化的形成提供新的方向。

参考文献

- [1] Fukata M, Vamadevan AS, Abreu MT. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders[J]. *Semin Immunol*, 2009, 21(4): 242-253.
- [2] Duewell P, Kono H, Rayner KJ, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals[J]. *Nature*, 2010, 464(7293): 1357-1361.
- [3] Wang L, Qu P, Zhao J, et al. NLRP3 and downstream cytokine expression elevated in the monocytes of patients with coronary artery disease[J]. *Arch Med Sci*, 2014, 10(4): 791-800.
- [4] Mayor A, Martinon F, De Smedt T, et al. A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses[J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(5): 497-503.
- [5] Wang L, Qu P, Zhao J, et al. NLRP3 and down-stream cytokine expression elevated in the monocytes of patients with coronary artery disease[J]. *Arch Med Sci*, 2014(10): 791-800.
- [6] Hoegen T, Tremel N, Klein M, et al. The NLRP3 inflammasome contributes to brain injury in pneumococcal meningitis and is activated through ATP-dependent lysosomal cathepsin B release[J]. *J Immunol*, 2011, 187(10): 5440-5451.
- [7] Park JH, Kim YG, McDonald C, et al. RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs[J]. *J Immunol*, 2007, 178(4): 2380-2386.
- [8] Strober W, Murray PJ, Kitani A, et al. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2[J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(1): 9-20.
- [9] Franchi L, Eigenbrod T, Núñez G. Cutting edge: TNF- α mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation[J]. *J Immunol*, 2009, 183(2): 792-796.
- [10] Dinarello CA. A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation[J]. *Eur J Immunol*, 2011, 41(5): 1203-1217.
- [11] Hsu LC, Ali SR, McGillivray S, et al. A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1 β secretion in response to *Bacillus anthracis* infection and muramyl dipeptide[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(22): 7803-7808.
- [12] Jarry A, Vallette G, Cassagnau E, et al. Interleukin 1 and interleukin 1 β converting enzyme (caspase 1) expression in the human colonic epithelial barrier. Caspase 1 downregulation in colon cancer[J]. *Gut*, 1999, 45(2): 246-251.

(收稿日期:2016-04-01 修回日期:2016-06-23)

(上接第 3181 页)

- and chemotherapy resistance; a promising therapeutic target for cancer treatment[J]. *Cell Death Dis*, 2013(4): e838.
- [11] White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(6): 401-410.
 - [12] Mathew R, White E. Autophagy in tumorigenesis and energy metabolism: friend by day, foe by night[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2011, 21(1): 113-119.
 - [13] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy[J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 445(1): 77-88.
 - [14] Kuma A, Matsui M, Mizushima N. Aggregates independ-

ent of autophagy; caution in the interpretation of LC3 localization[J]. *Autophagy*, 2007, 3(4): 323-328.

- [15] Blander JM. A long-awaited merger of the pathways mediating host defence and programmed cell death[J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(9): 601-618.
- [16] Yang ZF, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22(2): 124-131.
- [17] Baehrecke EH. Autophagy: dual roles in life and death? [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(6): 505-510.

(收稿日期:2016-04-16 修回日期:2016-06-21)