

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.12.008

高氧抑制 LPS/ATP 诱导的骨髓源性巨噬细胞的焦亡*

阴弯弯¹ 李项瑞¹ 闫晋琪¹ 李楠¹ 张二飞¹
涂可¹ 闫汝虎¹ 张莉¹ 侯立朝^{1Δ} 雷迎峰^{2Δ}

(1 第四军医大学附属西京医院麻醉科 陕西 西安 710032; 2 第四军医大学微生物学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:研究不同浓度的氧气在 LPS/ATP 诱导的骨髓源性巨噬细胞焦亡中的作用。**方法:**提取 C57BL/6 小鼠的骨髓源性巨噬细胞,用 1 μg/ml 脂多糖(LPS)刺激细胞 24 h,用 5 mM 三磷酸腺苷(ATP)刺激细胞 4 h,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测细胞培养上清液中 IL-1β 水平的变化。用 5 mM ATP 刺激细胞后,给予细胞 40 %、60 %和 100 %的氧气处理 1.5 h,ELISA 检测细胞培养上清液中 IL-1β 水平的变化。**结果:**1 μg/mL LPS 和 5 mM ATP 先后刺激下,骨髓源性巨噬细胞培养上清液中 IL-1β 的水平明显升高(P<0.001),用 caspase-1 特异性抑制剂 AC-YVAD-CMK 刺激骨髓源性巨噬细胞后 IL-1β 水平明显降低(P<0.001)。5 mM ATP 刺激之后给予细胞不同浓度的氧气干预 1.5 h 后,细胞培养上清液中 IL-1β 的水平明显下降。**结论:**高氧抑制 LPS/ATP 诱导的骨髓源性巨噬细胞的焦亡。

关键词:氧气;骨髓源性巨噬细胞;白细胞介素-1β;焦亡

中图分类号:R-33;R631.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)12-2232-04

Hyperoxia Inhibits LPS/ATP-Induced Pyroptosis of Bone Marrow Derived Macrophages*

YIN Wan-wan¹, LI Xiang-rui¹, YAN Jin-qi¹, LI Nan¹, ZHANG Er-fei¹, TU Ke¹, YAN Ru-hu¹, ZHANG Li¹, HOU Li-chao^{1Δ}, LEI Ying-feng^{2Δ}

(1 Department of Anesthesiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Microbiology, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect of different concentrations of oxygen in LPS/ATP induced pyroptosis of bone marrow derived macrophages. **Methods:** To extract the bone marrow derived macrophages of C57BL/6 mice and cells were primed with 1 μg/ml LPS for 24 h, and then treated with 5 mM ATP for 4 h. IL-1β levels in the cell supernatants were determined using a commercially available mouse IL-1β ELISA kit. Give cells 40 %, 60 % or 100 % oxygen inhalation after 5 mM ATP stimulation and determine the IL-1β levels in the cell supernatants. **Results:** ELISA test showed IL-1β levels in the bone marrow derived macrophages supernatants were greatly increased after the stimulation of 1 μg/ml LPS and 5 mM ATP (P<0.001) and were declined after the stimulation of caspase-1 inhibitor AC-YVAD-CMK (P<0.001). ELISA test also showed IL-1β levels in the bone marrow derived macrophages supernatants were notably declined after the 1.5 hours stimulation of 40 %, 60 % and 100 % oxygen inhalation followed the stimulation of 5 mM ATP. **Conclusions:** Hyperoxia inhibits the pyroptosis of bone marrow derived macrophages.

Key words: Oxygen; Bone marrow derived macrophages; IL-1β; Pyroptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R631.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)12-2232-04

前言

焦亡是近年来发现的一种新的程序性细胞死亡方式,特征为依赖于半胱天冬酶 1(caspase-1),巨噬细胞和树突状细胞在发生细菌感染的情况下会发生焦亡^[1]。焦亡发生后,细胞快速产生一些促炎因子,如 IL-1β 和 IL-18,并分泌到细胞外^[1,2]。IL-1β 是一种经典的促炎因子,能够刺激细胞在局部和全身循环中发生各种免疫炎症反应,在脓毒症的发展中还能与其他炎症因子协同作用造成组织损伤^[3,4]。近年有研究显示在重度脓毒症休克

动物模型中,给予吸入 100%氧气能提高生存率,改善器官功能而不影响肺功能,不引起氧化应激和氮化应激反应^[5]。这说明高浓度的氧气可能对脓毒症休克动物有保护作用。本研究通过用 LPS 和 ATP 刺激骨髓源性巨噬细胞使其发生焦亡,之后给予细胞 40 %、60 %和 100 %氧气,观察其对骨髓源性巨噬细胞焦亡的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81171839)

作者简介:阴弯弯(1991-),硕士研究生,研究方向:重症机制及防治研究,E-mail: 740351344@qq.com

Δ 通讯作者:侯立朝,博士生导师,教授,E-mail: 45278436@qq.com;

雷迎峰,副教授,E-mail: yflei@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2016-10-23 接受日期:2016-11-07)

实验小鼠所用皆来自第四军医大学实验动物中心,皆为 SPF 级,8 周雄性 C57BL/6 小鼠,18-20 g。1 周前,领取动物适应实验室环境,保持室温 20~25 °C,以 12 h 为光照黑暗周期,动物自由获取食物和水。动物实验遵循第四军医大学实验动物管理和使用委员会批准有关规定。培养细胞用 RPMI-1640 和青链霉素双抗均购自美国 Hyclone 公司,胎牛血清购自 Gibco 公司,脂多糖购自美国 Sigma 公司(货号 L2630),三磷酸腺苷购自美国 Sigma 公司(货号 34369-07-8),ELISA 试剂盒购自美国 RD 公司,AC-YVAD-CMK 购自德国 Cayman Chemical 公司(货号 10014),小鼠巨噬细胞集落刺激因子 M-CSF 购自北京义翘神州生物技术有限公司(货号 51112-MNAH),红细胞裂解液购自北京康为世纪生物科技有限公司,MIC-101 细胞密闭孵育装置购自美国的 Billups-rothenberg 公司。

1.2 方法

1.2.1 骨髓源性巨噬细胞的提取与培养 取 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠,脱颈法处死后浸泡于 75 %酒精中进行消毒 10 min。取小鼠的股骨和胫骨,用镊子和剪刀将皮毛肌肉和筋膜一起剔除,将骨头浸泡于无菌冰 PBS 中,之后移入 DMEM 完全培养基内,剪去两端的骨髓,用 1 mL 注射器吸取培养基之后吹打骨髓腔,将骨髓细胞冲出,用滤器收集细胞后,移入 15 mL 离心管,1000 rpm,5 min,弃去上清液。加入预温过的红细胞裂解液,吹匀细胞后,静置 2 min,1200 rpm,5 min,弃上清。加入无菌 PBS,吹匀细胞,1000 rpm,5 min,弃去上清液,用含 10 %胎牛血清的 DMEM 完全培养基重悬细胞,以 1×10^6 /mL 的密度接种细胞于 10 cm 直径的细胞培养皿中,放入 37 °C 5 %CO₂ 培养箱中培养。24 h 后弃去贴壁的细胞,将悬浮细胞接种于 6 孔板中,加入 10 ng/mL M-CSF 于培养基中。三天后,进行半量换液,补充 M-CSF 使其浓度保持为 10 ng/mL,三天后收集 6 孔板中的贴壁细胞即获得成熟的骨髓来源巨噬细胞(BMDMs)。

1.2.2 细胞焦亡模型的建立 细胞换液后,用 1 μ g/mL LPS 刺激细胞 24 h,用 5 mM ATP 刺激细胞 4 h,收集细胞培养上清液,ELISA 检测细胞因子 IL-1 β 的水平。

1.2.3 细胞焦亡模型的验证 细胞换液后,用 1 μ g/mL LPS 刺激细胞 24 h,用 5 mM ATP 刺激细胞 4 h,加入 ATP 之前 30 min 加入 20 μ M AC-YVAD-CMK(caspase-1 特异性抑制剂)。收集细胞培养上清液,检测细胞因子 IL-1 β 的水平。

1.2.4 氧气干预细胞焦亡 细胞换液后,用 1 μ g/mL LPS 刺激细胞 24 h,用 5 mM ATP 刺激细胞 4 h,加入 ATP 后 0.5 h,立即给与细胞吸入 40 %,60 %和 100 %不同浓度的氧气 1.5 h,之后将细胞再次放入 37 °C 5 %CO₂ 培养箱中培养。收集细胞培养上清液,检测细胞因子 IL-1 β 的水平。

1.2.5 ELISA 法检测细胞培养上清液中 IL-1 β 的水平 将试剂盒中的标准品稀释成 5、10、20、40、80 ng/L,按照说明书设置空白孔,标准品孔,待测样品孔,盖上封板膜,混匀,37 °C 温育 60 min,之后弃去液体,甩干,洗涤 5 次,加入显色剂 A 液和 B 液,加入终止液,空白孔调零,读出 OD 值,计算出标准曲线的回归方程后代入样本 OD 值计算出 IL-1 β 的浓度。

1.3 统计学分析

所有定量数据均以均数 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SD) 表示,

Graphpad Prism 5.0 组图,SPSS22.0(中文版)数据分析(以 $P < 0.05$ 为有统计学意义),多组间差异比较采用单因素方差 (One-way ANOVA)分析,两组间细胞因子 IL-1 β 表达水平比较采用 Tukey 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 骨髓源性巨噬细胞培养成熟

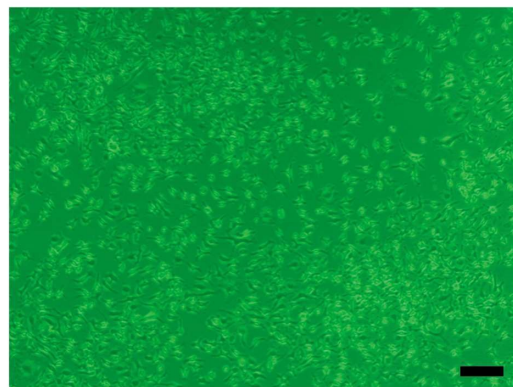


图 1 成熟的骨髓源性巨噬细胞(图中标尺为 50 μ m)

Fig.1 The mature bone marrow derived macrophages. Horizontal bar=50 μ m

2.2 LPS 和 ATP 诱导骨髓源性巨噬细胞产生大量的 IL-1 β

收集成熟的骨髓源性巨噬细胞,分为 4 组(Control、LPS、ATP、LPS/ATP),收集细胞培养上清液,ELISA 法检测细胞因子 IL-1 β 表达水平的变化。结果显示:与 Control 组相比,LPS 和 ATP 组 IL-1 β 表达水平稍有升高,但无统计学意义($P > 0.05$),LPS/ATP 组 IL-1 β 水平明显增高($P < 0.001$)。

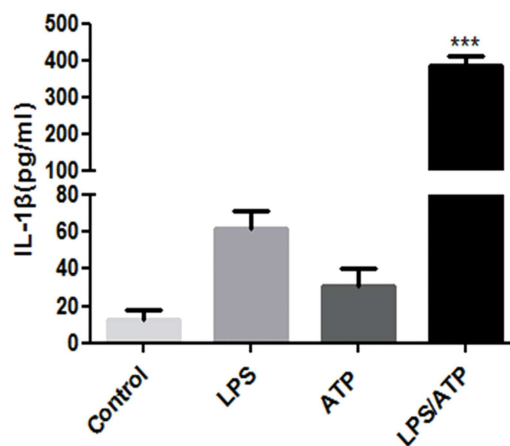


图 2 ELISA 检测 LPS 和 ATP 刺激下骨髓源性巨噬细胞培养上清液中 IL-1 β 表达水平的变化

Fig.2 Change of serum IL-1 β level in the cell culture supernatant in bone marrow derived macrophages induced by LPS and ATP detected by ELISA

Note: *** $P < 0.001$, compared with Control group.

2.3 LPS 和 ATP 诱导骨髓源性巨噬细胞产生大量的 IL-1 β 依赖于 caspase-1 的活化

收集成熟的骨髓源性巨噬细胞,分为 6 组(Control、LPS、ATP、LPS/ATP、LPS/ATP+AC-YVAD-CMK、LPS/ATP+DM-

SO),收集细胞培养上清液,ELISA 法检测细胞因子 IL-1 β 表达水平的变化。结果显示:与 Control 组相比,LPS 和 ATP 组 IL-1 β 表达水平稍有升高,但无统计学意义($P>0.05$),LPS/ATP 组 IL-1 β 水平明显增高($P<0.001$),加入 caspase-1 特异性抑制剂 AC-YVAD-CMK 组 IL-1 β 水平明显降低 ($P<0.001$)。与 AC-YVAD-CMK 组相比,AC-YVAD-CMK 溶剂对照组 DMSO 组 IL-1 β 水平明显升高($P<0.001$)。

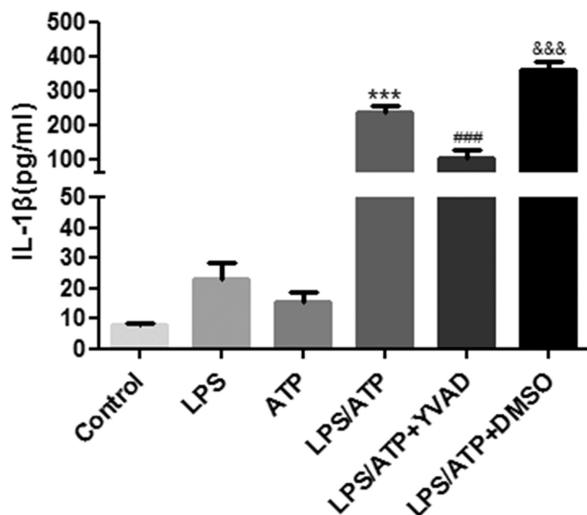


图 3 ELISA 检测 caspase-1 抑制剂 AC-YVAD-CMK 刺激下骨髓源性巨噬细胞培养上清液中 IL-1 β 表达水平的变化

Fig.3 Change of serum IL-1 β level in the cell culture supernatant in bone marrow derived macrophages induced by LPS, ATP and caspase-1 inhibitor AC-YVAD-CMK detected by ELISA

Note: *** $P<0.001$, compared with Control group; ### $P<0.001$, compared with LPS/ATP group; $P<0.001$, compared with LPS/ATP+YVAD group.

2.4 不同浓度氧气对 LPS 和 ATP 诱导骨髓源性巨噬细胞产生 IL-1 β 水平的影响

收集成熟的骨髓源性巨噬细胞,分为 6 组(Control、LPS、ATP、LPS/ATP、LPS/ATP+40%、LPS/ATP+60%、LPS/ATP+100%),收集细胞培养上清液,ELISA 法检测细胞因子 IL-1 β 表达水平的变化。结果显示:与 Control 组相比,LPS 和 ATP 组 IL-1 β 表达水平稍有升高,但无统计学意义($P>0.05$),LPS/ATP 组 IL-1 β 水平明显增高($P<0.001$),LPS/ATP+40%组 IL-1 β 水平无明显变化 ($P>0.05$),LPS/ATP+60%组 IL-1 β 水平明显降低 ($P<0.001$),LPS/ATP+100%组 IL-1 β 水平明显降低($P<0.001$)。

3 讨论

在脓毒症的发生发展过程中,促炎因子大量释放、免疫炎症反应的失调造成多器官功能衰竭^[6,7]。近年来,由于脓毒症发生发展与宿主细胞死亡机制有关,并且造成免疫炎症反应的失调,对于脓毒症的治疗越来越关注宿主细胞死亡机制^[8-10]。IL-1 β 的产生和释放主要由 caspase-1 调控,caspase-1 能诱导细胞死亡^[2]。更重要的是,在脓毒症小鼠模型上进行 caspase-1 基因敲除后具有保护作用^[11,12]。小鼠血浆中 IL-1 β 水平显著被抑制,说明 caspase-1 在脓毒症的发生发展中具有不可忽视的作用^[13,14]。

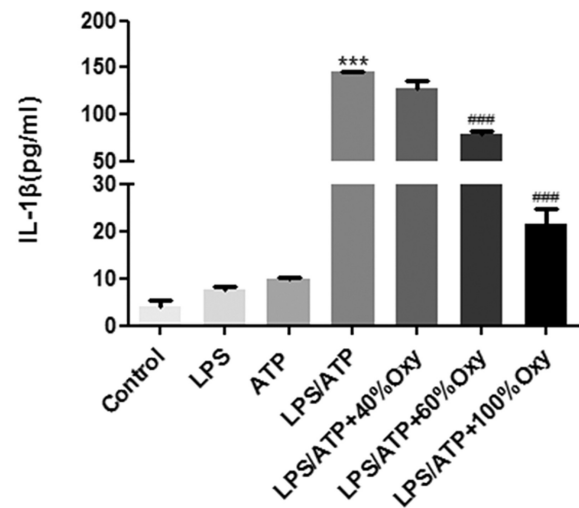


图 4 ELISA 检测 40%、60%和 100%不同浓度的氧气干预下细胞培养上清液中 IL-1 β 表达水平的变化

Fig.4 ELISA test for the cytokine IL-1 β variation in the cell culture supernatant with 40%,60% and 100% oxygen intervention

Note: *** $P<0.001$, compared with Control group; ### $P<0.001$, compared with LPS/ATP group.

诱导焦亡发生需要两个不同的刺激物。第一,微生物病原体相关分子模式,比如核酸、脂蛋白、脂多糖(LPS);第二,内源性损伤相关分子模式,比如尿酸、三磷酸腺苷(ATP)^[15]。脂多糖是革兰阴性菌外膜的主要组成成分,诱导体内的单核细胞和巨噬细胞产生强烈的促炎反应,在革兰阴性菌诱导的脓毒症的病理发生发展中被视为一个关键分子^[16]。脂多糖通过结合至膜受体 CD14/TLR4 从而激活巨噬细胞^[16,17]。因此,被 ATP 诱导的 LPS 预刺激过的巨噬细胞会发生焦亡,ATP 在活细胞内大量的积聚,细胞死亡后释放到细胞外^[18]。ATP 激活嘌呤核苷酸受体 P2X7 从而诱导 NLRP3 炎性小体的形成,NLRP3 炎性小体由 NLRP3、ASC(包含 CARD 凋亡相关微粒蛋白)和 caspase-1 组成^[19,20]。本实验用 LPS 和 ATP 单独刺激骨髓源性巨噬细胞,并没有引起显著的 IL-1 β 水平的升高,而先给与 LPS 刺激细胞再给与 ATP 刺激会引起显著的 IL-1 β 水平的升高,这是因为 LPS 预刺激细胞后,细胞会产生 IL-1 β 的前体形式 (pro-IL-1 β),当 ATP 刺激之后,激活 NLRP3 炎性小体,从而活化 caspase-1,释放出 P10 片段,caspase-1 促使 pro-IL-1 β 活化成成熟形式 IL-1 β 从而分泌到细胞外^[18]。在给予 ATP 刺激之后 0.5 h,给予细胞不同浓度氧气处理 1.5 h 后,IL-1 β 水平显著降低,可能是抑制了 NLRP3 炎性小体的活化从而发挥作用,具体机制还需进一步探究。而在 ATP 刺激之前,加入 caspase-1 特异性抑制剂,IL-1 β 水平显著降低,表明此模型依赖于 caspase-1,溶剂对照组 DMSO 本身就有细胞毒性,细胞发生剧烈的毒性反应,IL-1 β 水平显著升高。

脓毒症导致多器官功能障碍以严重免疫功能紊乱和分解代谢障碍为特点^[21]。Barth 等首先采用猪腹膜炎模型证实早期高氧吸入可以明显改善组织器官功能障碍,减少组织细胞凋亡,但并不会影响动物的肺功能或者造成体内氧化应激^[22]。我们前期研究发现高氧可明显降低酵母多糖所致脓毒症小鼠的死亡率,且其最佳作用时间为造模后的 4、12 h 给予高浓度氧

处理 2 h 或 3 h 的治疗,机制可能与氧自由基、肾上腺素能抗炎通路、胆碱能抗炎通路有关^[23,24]。

本研究采用 LPS 和 ATP 刺激骨髓源性巨噬细胞使细胞发生焦亡,又给予细胞吸入 40 %、60 %和 100 %不同浓度的氧气,发现焦亡相关细胞因子 IL-1 β 水平降低,说明高氧可以抑制骨髓源性巨噬细胞的焦亡,高氧可能成为临床上治疗脓毒症的一种重要手段。

参考文献(References)

- [1] Eichholz K, Bru T, Tran TT, et al. Immune-Complexed Adenovirus Induced AIM2-Mediated Pyroptosis in Human Dendritic Cells [J]. PLoS Pathog, 2016, 12(9): e100587
- [2] Jorgensen I, Lopez JP, Laufer SA, et al. IL-1 β , IL-18, and eicosanoids promote neutrophil recruitment to pore-induced intracellular traps following pyroptosis[J]. Eur J Immunol, 2016 Sep 28 [Epub ahead of print]
- [3] Sui DM, Xie Q, Yi WJ, et al. Resveratrol Protects against Sepsis-Associated Encephalopathy and Inhibits the NLRP3/IL-1 β Axis in Microglia[J]. Mediators Inflamm, 2016, 1045657
- [4] Wang J, Wang H, Zhu R, et al. Anti-inflammatory activity of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles in IL-1 β transgenic mice subjected to the lipopolysaccharide-induced sepsis [J]. Biomaterials, 2015, 53: 475-83
- [5] Hou Li, Xie K, Li N, et al. 100% oxygen inhalation protects against zymosan-induced sterile sepsis in mice: the roles of inflammatory cytokines and antioxidant enzymes[J]. Shock, 2009, 32(4): 451-461
- [6] Lobo LA, Benjamim CF, Oliveira AC. The interplay between microbiota and inflammation: lessons from peritonitis and sepsis[J]. Clin Transl Immunology, 2016, 5(7)
- [7] Cogger VC, Le Couteur DG, Ishii I, et al. Cystathionine-Gamma-Lyase Gene Deletion Protects Mice against Inflammation and Liver Injury following Polymicrobial Sepsis[J]. PLoS One, 2016, 11(8)
- [8] Napier BA, Brubaker SW, Sweeney TE, et al. Complement pathway amplifies caspase-11-dependent cell death and endotoxin-induced sepsis severity[J]. J Exp Med, 2016, 3
- [9] Matsuda A, Jacob A, Wu R, et al. Novel therapeutic targets for sepsis: regulation of exaggerated inflammatory responses [J]. J Nippon Med Sch, 2012, 79(1): 4-18
- [10] Zou L, Chen HH, Li D, et al. Imaging Lymphoid Cell Death In Vivo During Polymicrobial Sepsis[J]. Crit Care Med, 2015, 43(11): 2303-2312
- [11] Sarkar A, Hall MW, Exline M, et al. Caspase-1 regulates Escherichia coli sepsis and splenic B cell apoptosis independently of interleukin-1 β and interleukin-18 [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2006, 174(9): 1003-1010
- [12] Li P, Allen H, Banerjee S, et al. Mice deficient in IL-1 β -converting enzyme are defective in production of mature IL-1 β and resistant to endotoxic shock[J]. Cell, 1995, 80(3): 401-411
- [13] Bryant C, Fitzgerald KA. Molecular mechanisms involved in inflammasome activation[J]. Trends Cell Biol, 2009, 19(9): 455-464
- [14] Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes[J]. Nature, 1992, 356(6372): 768-774
- [15] Hu Z, Murakami T, Suzuki K, et al. Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 inhibits the LPS/ATP-induced pyroptosis of macrophages by dual mechanism[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e85765
- [16] Gil M, Kim YK, Hong SB, et al. Naringin Decreases TNF- α and HMGB1 Release from LPS-Stimulated Macrophages and Improves Survival in a CLP-Induced Sepsis Mice[J]. PLoS One, 2016, 11(10)
- [17] Wu J, Zhou J, Chen X, et al. Attenuation of LPS-induced inflammation by ICT, a derivative of icariin, via inhibition of the CD14/TLR4 signaling pathway in human monocytes [J]. Int Immunopharmacol, 2012, 12(1): 74-79
- [18] Mezzasoma L, Antognelli C, Talesa VN. Atrial natriuretic peptide down-regulates LPS/ATP-mediated IL-1 β release by inhibiting NF- κ B, NLRP3 inflammasome and caspase-1 activation in THP-1 cells[J]. Immunol Res, 2016, 64(1): 303-312
- [19] Naji A, Muzemba BA, Yagyu K, et al. Endocytosis of indium-tin-oxide nanoparticles by macrophages provokes pyroptosis requiring NLRP3-ASC-Caspase1 axis that can be prevented by mesenchymal stem cells[J]. Sci Rep, 2016, 6: 26162
- [20] Nuvolone M, Sorce S, Schwarz P, et al. Prion pathogenesis in the absence of NLRP3/ASC inflammasomes[J]. PLoS One, 2015, 10(2)
- [21] Gotts JE, Matthay MA. Sepsis: pathophysiology and clinical management[J]. BMJ, 2016, 353: i1585
- [22] Barth E, Bassi G, Maybauer DM, et al. Crit Care Med. Effects of ventilation with 100% oxygen during early hyperdynamic porcine fecal peritonitis[J]. Crit Care Med, 2008, 36(2): 495-503
- [23] Pei Y, Bai X, Dong H, et al. β 2-adrenergic receptor antagonist butoxamine partly abolishes the protection of 100% oxygen treatment against zymosan-induced generalized inflammation in mice[J]. Shock, 2011, 36(3): 272-278
- [24] Zhang Z, Bai X, Du K, et al. Activation of cholinergic anti-inflammatory pathway contributes to the protective effects of 100% oxygen inhalation on zymosan-induced generalized inflammation in mice[J]. J Surg Res, 2012, 174(2): e75-83
- [18] Tsuji T, Chiba K, Imabayashi H, et al. Age-related changes in expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 associated with transition from the notochordal nucleus pulposus to the fibrocartilaginous nucleus pulposus in rabbit intervertebral disc [J]. Spine, 2007, 32(8): 849-856
- [19] Yao Z, Nie L, Zhao Y, et al. Salubrin Suppresses IL-17-Induced Upregulation of MMP-13 and Extracellular Matrix Degradation Through the NF- κ B Pathway in Human Nucleus Pulposus Cells [J]. Inflammation, 2016, 39(6): 1997-2007

(上接第 2222 页)