

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.23.003

NLRP3-Caspase-1 通路在小胶质细胞与 H37Ra 共培养模型中的作用及钾离子对其的影响 *

谢 瑱¹ 曹冰清¹ 雷 琦¹ 费裕朗¹ 惠 浩^{2Δ}

(1 陕西省人民医院 神经内二科 陕西 西安 710068;

2 西安交通大学医学部附属西安市红会医院 脊柱外科 颈椎病区 陕西 西安 710054)

摘要 目的:在小胶质细胞与 H37Ra 结核菌株共培养模型中,探讨 NLRP3-Caspase-1 通路是否参与到小胶质细胞的损伤过程中,并观察钾离子对该过程的影响。**方法:**将 H37Ra 菌株与大鼠小胶质细胞共培养以模拟结核杆菌中枢神经系统感染造成的损伤,并通过 real-time PCR, Western blot, ELISA, MTT 等相关方法评估该过程中 Caspase-1, NLRP3, IL-1 β , IL-18 等的基因转录及蛋白表达、分泌的变化规律;随后给予细胞外高钾干预,观察其对该模型中 NLRP3-Caspase-1 相关通路的影响。**结果:**通过小胶质细胞与 H37Ra 共培养:(1)小胶质细胞中 NLRP3, Caspase-1, IL-1 β 及 IL-18 等的转录,表达及活化较前明显增加;(2)在应用细胞外高钾干预后,小胶质细胞中活性 Caspase-1 明显减少,同时其下游的活性 IL-1 β 、IL-18 产生及分泌也明显减少。**结论:**小胶质细胞与 H37Ra 共培养后,NLRP3-Caspase-1 信号通路被激活,而通过细胞外高钾的干预能够抑制该过程中 Caspase-1 的活化,以及下游的 IL-1 β 、IL-18 的产生及分泌。

关键词:H37Ra;小胶质细胞;细胞焦亡;细胞外高钾

中图分类号:R-33;R529.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)23-4409-07

Role of NLRP3-Caspase-1 Pathway in Microglia-H37Ra Co-Culture Model and Effect of Potassium on It*

XIE Zhen¹, CAO Bing-qing¹, LEI Qi¹, FEI Yu-lang¹, HUI Hao^{2Δ}

(1 Department 2 of Neurology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China;

2 Department of Spine Surgery, Hong-Hui Hospital, Xi'an Jiaotong University College of Medicine, Xi'an, Shaanxi, 710054, China)

ABSTRACT Objective: To investigate whether NLRP3-Caspase-1 pathway is involved in the process of microglial injury in microglia-H37Ra co-culture model and to observe the effect of potassium in this process. **Methods:** The H37Ra strain was co-cultured with rat microglia to simulate damage caused by Mycobacterium tuberculosis in central nervous system infection. Real-time PCR, Western blot, ELISA, MTT and other related methods were used to evaluate the changes of gene transcription, protein expression and secretion of Caspase-1, NLRP3, IL-1 β , and IL-18 during this process; Extracellular high potassium intervention was applied to observe the influence on NLRP3-Caspase-1 pathway in this model. **Results:** In microglia-H37Ra co-culture model: (1) The transcription, expression and activation of NLRP3, Caspase-1, IL-1 β and IL-18 in microglia were significantly increased than before; (2) In the application of extracellular potassium, the activity of Caspase-1 in microglia was significantly reduced, and the production and secretion of active IL-1 β and IL-18 in its downstream were also significantly reduced. **Conclusion:** In the microglia-H37Ra co-culture model, the NLRP3-Caspase-1 signaling pathway is activated, and intervention of extracellular high potassium can inhibit Caspase-1 activation and the production and secretion of IL-1 β and IL-18 in its downstream.

Key words: H37Ra; Microglia; Pyroptosis; Extracellular high potassium

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R529.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)23-4409-07

前言

中枢神经系统结核约占肺外结核的 5-15%^[1],是一种虽然少见,但却十分严重的结核感染形式,包括颅内的结核瘤,结核性脑膜或脊髓结核^[2]等,其中,结核性脑膜炎是最常见的,也

是进展最快的一种感染形式。在宿主与结核杆菌相互作用造成组织坏死的过程中,除了细胞坏死,细胞凋亡外,也存在着细胞焦亡。细胞焦亡是近年来新发现的细胞死亡方式。在细胞焦亡过程中,一种称为炎症小体的大分子复合物受到炎症相关细胞及蛋白酶等的激活,促使 Caspase-1 前体(pro-Caspase-1)活化,

* 基金项目:陕西省社会发展科技公关项目(2014K11-03-02-07)

作者简介:谢瑱(1987-),博士,主治医师,研究方向:神经系统疾病,电话:18591952800, E-mail: xiezhenhh@163.com

Δ 通讯作者:惠浩,博士,主治医师,研究方向:脊柱病变, E-mail: gjhitfk@163.com

(收稿日期:2018-05-28 接受日期:2018-06-23)

后者进一步诱导产生了大量特征性的促炎因子,IL-1 β 及 IL-18^[3],引起了一系列炎症反应^[4],导致了类似于细胞凋亡的形态学变化,出现细胞核固缩,DNA 断裂及 TUNEL 染色阳性等特征,但是与凋亡不同,焦亡的细胞失去了细胞膜的完整性,其胞膜上形成了 1-2 nm 的微孔和囊泡,造成了钾离子外流,细胞内外离子失衡,细胞肿胀破裂,促炎因子分泌,从而引起炎症反应以及进一步的细胞死亡^[5]。NLRP3 炎症小体是一种典型的能够对多种细胞内外的危险信号做出应答的炎症小体^[6],在诸多等神经系统疾病中发挥了重要的作用^[7-14]。细胞内钾离子浓度的降低是造成 NLRP3 炎症小体激活的常见通路,很多 NLRP3 的活化信号,包括细菌毒素,颗粒物的吞噬作用等,均是通过该通路发挥作用^[15]。许多 NLRP3 的活化信号能够诱导线粒体 ROS 产生以及细胞内钾离子外流,它们能够一起诱导 NLRP3 炎症小体的活化,造成 Caspase-1 的激活以及 IL-1 β ,IL-18 的成熟活化。

在 CNS 实质中,小胶质细胞是产生神经炎症的主要细胞之一^[14,16],广泛参与多种神经系统疾病中^[17-22]。小胶质细胞的适度活化对于 CNS 具有保护作用^[23],而过度活化的小胶质细胞可导致神经炎症,氧化应激和神经元功能障碍^[24,25]。CNS-TB 中,小胶质细胞是感染的首要目标之一^[26]。在结核性脑膜炎

(TMB) 患者的脑脊液中,能够检测到 IL-1 β ,TNF- α ,IL-8,CCL-2 等的升高^[27]。最近的研究发现,在应用巨噬细胞与结核杆菌共培养的上清液作用于小胶质细胞后,会引起 NLRP3,Caspase-1 等细胞焦亡相关分子的改变^[28]。因此,进一步的明确中枢神经系统结核感染过程中,小胶质细胞中 NLRP3-Caspase-1 相关通路的作用及其调控机制就非常重要。本实验中,我们探讨了小胶质细胞在 H37Ra 共培养过程中,NLRP3-Caspase-1 相关通路的改变及钾离子对其的影响,为进一步明确中枢神经系统结核感染的机制及其治疗方案提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验采用购自第四军医大学实验动物中心的新生 24 小时内清洁级 SD 大鼠幼仔进行小胶质细胞的原代培养。H37Ra 菌株属于结核分枝杆菌的弱毒株,购自上海康朗生物科技有限公司。本实验中所用的引物由 Takara 公司进行设计及合成。具体见表 1。

表 1 引物设计
Table 1 Primer design

Name	Primer sequence	
caspase-1	F:ACTCGTACACGTCTTGCCCTCA	NM_012762.2
	R:CTGGGCAGGCAGCAAATTC	
nlrp3	F:CAGCGATCAACAGGCGAGAC	NM_001079821
	R:AGAGATATCCCAGCAAACCTATCCA	
il-1 β	F:CCCTGAACTCAACTGTGAAATAGCA	NM_031512.2
	R:CCCAAGTCAAGGGCTTGAA	
il-18	F:GACTGGCTGTGACCCTATCTGTGA	NM_019165.1
	R:TTGTGTCCTGGCACACGTTTC	
acting	F:CTAAGGCCAACCGTGAAAAGATG	
	R:ACCGCTCGTTGCCAATAGTGATG	

1.2 方法

1.2.1 实验分组 根据实验设计分为三组:1. 对照组,Control (C);2. 小胶质细胞与 H37Ra 共培养组,Microglia+H37Ra (MH);3. 小胶质细胞与 H37Ra 共培养并细胞外高钾干预组,Microglia+H37Ra+K⁺(MHK)。

1.2.2 小胶质细胞原代培养 新生 SD 大鼠(必须出生 24 小时内)数只,消毒后在无菌及低温条件下迅速取出脑组织,尽量除去脑组织的脑膜、血管以及灰质部分后,将脑组织用小剪刀充分剪碎并制成单细胞悬液,离心并去除杂质后将其接种在 50 mL 的培养瓶中进行培养。当混合细胞在培养了 18 d-20 d 左右后,应用胰酶将小胶质细胞从所贴附的星形胶质细胞上脱离下来,随后将分离的小胶质细胞从新制成单细胞悬液后,将其接种于预先放置有盖玻片的 12 孔培养板中进行培养,当传代培养 5-8 代后细胞的状态达到最佳,可应用于后续实验。

1.2.3 H37Ra 共培养模型制备 将 H37Ra 干粉以培养液稀释,配成浓度约 1g/L 悬液(含活菌数 1×10^7 CFU/mL),将培养好的小胶质细胞(50 mL 培养瓶)中原有的培养液定量至 5 mL 后,加入 H37Ra 悬液 2000 μ L,使得小胶质细胞与 H37Ra 的比例为 1:10。将两者共培养 24 小时后,分别收集细胞及上清液,标记并进行后续实验。细胞外高钾干预时,在共培养液中加入钾离子溶液,并调整其浓度为 150 mM。

1.2.4 Real-Time PCR 将培养的小胶质细胞按照 RNA 提取的步骤提取 RNA 后,进行 RNA 纯度测定。随后进行 cDNA 的合成,即总 RNA 的反转录过程。采用 Takara 公司的 Prime-Script RT reagent Kit 试剂盒合成 cDNA 的第一链。Real-time PCR 定量检测依据 Takara 公司的 SYBR Premix Ex Taq TM II (Perfect Real Time) 试剂盒进行,总反应体系 25 μ L。随后对 mRNA 进行定量分析。

1.2.5 Western Blot 按小胶质细胞密度加入适量的蛋白裂解液离心,收集上清液为细胞全蛋白提取物。随后依 BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天)进行蛋白浓度测。蛋白定量完成后,即可配制凝胶,并进行凝胶电泳,转膜,一抗、二抗的孵育。最后,以同一条带上的内参蛋白为依据,用 Gelpro32 凝胶分析软件分析显影结果。将目的蛋白与内参的 IOD 值相比以标准化蛋白含量,进行定量分析。

1.2.6 酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 将共培养后的细胞上清液分别收集标记,应用 IL-18 及 IL-1 β ELISA 试剂盒(上海研鑫生物科技有限公司),在 450 nm 波长处测量各孔的吸光度(OD 值),根据 OD 值分析各上清液中的物质含量。

1.2.7 细胞活性检测(MTT) 在 96 孔板中将共培养的细胞给予相应的处理后应用 MTT 试剂盒(上海晶抗生物工程有限公司)进行检测,在 490 nm 处测定 OD 值,并依据 OD 值计算细胞活性。

1.3 统计学分析

所有的实验结果均在进行了至少 3 次以上相同的实验后得出。选择 SPSS20.0 作为统计分析软件,并以 one-way ANOVA 进行统计分析,采用 $\bar{x} \pm s$ 的方式表示所得结果和数据,当 $P < 0.05$ 时我们认为得到的结果具有显著性差异。

2 结果

2.1 小胶质细胞与 H37Ra 共培养后能够促进 NLRP3 的产生及活化,但细胞外高钾干预对该过程并无明显的影响

我们将传代培养 5-8 代的小胶质细胞与 H37Ra 菌株共培养 24 小时后,分别收集小胶质细胞 RNA 及蛋白,在细胞转录水平以及蛋白表达水平观察小胶质细胞中 NLRP3 的变化。在细胞转录水平,real-time PCR 结果提示在小胶质细胞与 H37Ra 共培养后,促进了 nlrp3 的转录,而在应用了细胞外高钾进行干预后,nlrp3 的转录较共培养组未见明显变化,如图 1(A)所示,共培养组(MH)与对照组(C)相比,nlrp3 明显升高, $*P < 0.05$,而共培养组(MH)与细胞外高钾(MHK)干预组相比,nlrp3 并未出现明显的变化($*P > 0.05$)。

而在蛋白表达水平,我们通过 western blot 对 NLRP3 的蛋白表达进行的检测,结果提示,与 H37Ra 共培养后,小胶质细胞中 NLRP3 的表达明显增加,而在应用了细胞外高钾进行干预后,NLRP3 的表达较前并未出现明显的变化,如图 1(B-C)所示,对照组(C)与共培养组(MH)相比,NLRP3 明显升高, ($*P < 0.05$),而共培养组(MH)与细胞外高钾(MHK)干预组相比,NLRP3 并未出现明显的变化($*P > 0.05$)。提示,小胶质细胞与 H37Ra 共培养能够促进 NLRP3 的转录及表达过程,而细胞外高钾对该过程无明显的抑制作用。

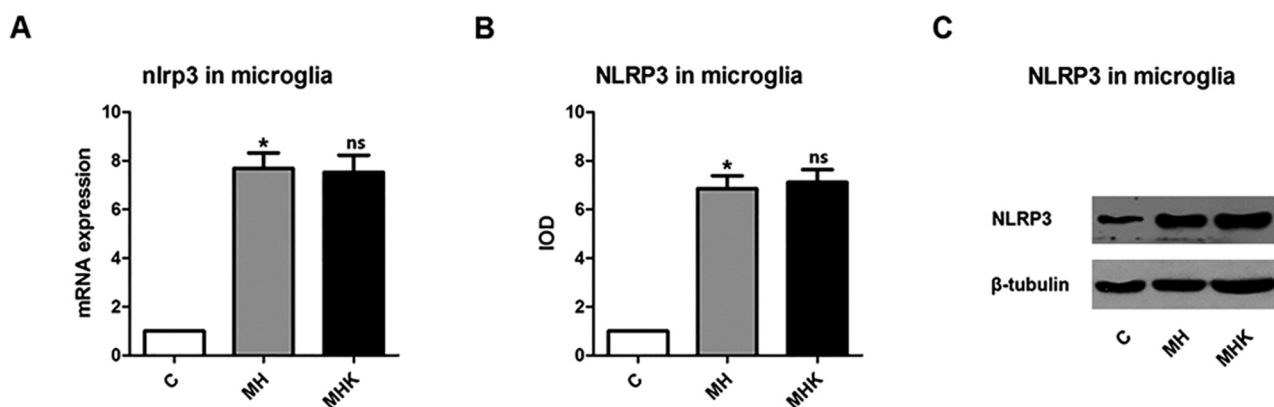


图1 小胶质细胞与 H37Ra 共培养及应用细胞外高钾干预,对小胶质细胞中 NLRP3 的影响

Fig.1 Effect of co-culture of microglia with H37Ra and extracellular high potassium intervention on NLRP3 in microglia

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=5$. $*P < 0.05$, compared with control group(C); $*P > 0.05$, compared with co-culture group(MH).

2.2 小胶质细胞与 H37Ra 共培养后能够促进 Caspase-1 的产生及活化,而细胞外高钾的能够抑制 pro-Caspase-1 的活化过程

我们将传代培养 5-8 代的小胶质细胞与 H37Ra 菌株共培养 24 小时后,分别收集小胶质细胞 RNA 及蛋白,以在细胞转录水平以及蛋白表达水平检测小胶质细胞中 Caspase-1 的变化。在细胞转录水平,real-time PCR 结果提示在小胶质细胞与 H37Ra 共培养后,促进了 caspase-1 的基因转录,而在应用了细胞外高钾干预后,caspase-1 的基因转录较前并未出现明显的变化,如图 2(A)所示,对照组(C)与共培养组(MH)相比,caspase-1 明显增加($*P < 0.05$),而共培养组(MH)与细胞外高钾干预组(MHK)相比,caspase-1 并未出现明显的变化($*P > 0.05$)。

而在蛋白表达水平,我们通过 western blot 对 Caspase-1 的

蛋白表达进行的检测,结果提示,与 H37Ra 共培养后,小胶质细胞中 Caspase-1 前体 Caspase-1 (P45), pro-Caspase-1 及活化 Caspase-1 (Caspase-1 (P10)) 的表达均明显增加;在应用了细胞外高钾进行干预后,Caspase-1 (P45) 的表达较前并未发生明显变化,但 Caspase-1 (P10) 含量较前明显减少。如图 2(B-D)所示,共培养组(MH)与对照组(C)相比 Caspase-1 (P45) 及 Caspase-1 (P10) 均明显增加($*P < 0.05$);共培养组(MH)与细胞外高钾(MHK)干预组相比 Caspase-1 (P45) 并未出现明显的变化($*P > 0.05$),但 Caspase-1 (P10) 的含量在细胞外高钾的干预下均出现了明显的下降($*P < 0.05$)。提示,在共培养模型中,细胞外高钾能对小胶质细胞 Caspase-1 前体向活性的 Caspase-1 转化的过程起到抑制作用。

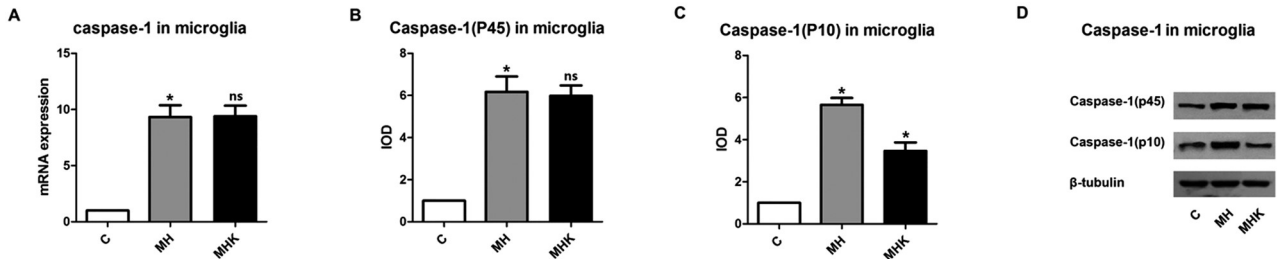


图2 小胶质细胞与 H37Ra 共培养及应用细胞外高钾干预,对小胶质细胞中 Caspase-1 的影响

Fig.2 Co-culture of microglia with H37Ra and application of extracellular high potassium to interfere with Caspase-1 in microglial cells

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=5$. * $P<0.05$, compared with control group(C) (A-C) and co-culture group(MH) (C); $nsP>0.05$, compared with co-culture group(MH) (A-B).

2.3 小胶质细胞与 H37Ra 共培养后能够促进 IL-1 β 及 IL-18 的产生、活化及分泌,而细胞外高钾干预能够抑制其活化过程

我们将传代培养 5-8 代的小胶质细胞与 H37Ra 菌株共培养 24 小时后,分别收集小胶质细胞 RNA、蛋白以及共培养上清液,在细胞转录水平、蛋白表达水平以及蛋白分泌水平分别检测小胶质细胞中 IL-1 β 及 IL-18 的变化。在细胞转录水平, real-time PCR 结果提示在小胶质细胞与 H37Ra 共培养后,促进了 il-1 β 及 il-18 的基因转录,而应用细胞外高钾干预,并不能对 il-1 β 及 il-18 基因转录明显的影响。如图 3 图 4(A)所示,共培养组(MH)与相比对照组(C),il-1 β 及 il-18 明显增高,(* $P<0.05$);细胞外高钾(MHK)与共培养组(MH)相比,并未出现明显的改变($nsP>0.05$)。

而在蛋白表达水平,我们通过 western blot 对 IL-1 β 及 IL-18 的蛋白表达进行的检测,结果提示,与 H37Ra 共培养后,小胶质细胞中 IL-1 β 、IL-18 前体(pro-IL-1 β 及 pro-IL-18)及活化 IL-1 β 、IL-18 的蛋白表达均明显增加;在细胞外高钾干预下,pro-IL-1 β 及 pro-IL-18 较共培养组并未出现明显的变化,但活

化的 IL-1 β 及 IL-18 出现了下降。如图 3 图 4(B-C-E)所示,共培养组(MH)与对照组(C)相比,pro-IL-1 β 、pro-IL-18 及活化 IL-1 β 、IL-18 均明显增加(* $P<0.05$);细胞外高钾(MHK)干预组与共培养组(MH)相比,只有活化 IL-1 β 及 IL-18 水平出现了下降(* $P<0.05$),pro-IL-1 β 及 pro-IL-18 并未出现明显的变化(* $P>0.05$)。

同时,在蛋白分泌水平,我们通过 ELISA 检测分泌共培养上清液中的活化 IL-1 β 及 IL-18 的含量。结果提示,在小胶质细胞与 H37Ra 共培养后,上清液中活化 IL-1 β 及 IL-18 的含量明显增加,应用细胞外高钾干预能够使上清液中活化 IL-1 β 及 IL-18 的含量降低。如图 3 图 4(D)所示,共培养组(MH)与对照组(C)相比,上清液中的 IL-1 β 及 IL-18 明显增加(* $P<0.05$),而细胞外高钾组(MHK)与共培养组(MH)相比,上清液中 IL-1 β 及 IL-18 的含量明显降低(* $P<0.05$)。提示小胶质细胞与 H37Ra 共培养后能够促进 IL-1 β 及 IL-18 的基因转录,蛋白表达及分泌,该作用中 pro-IL-1 β 及 pro-IL-18 向 IL-1 β 及 IL-18 的转化过程能够被细胞外高钾抑制。

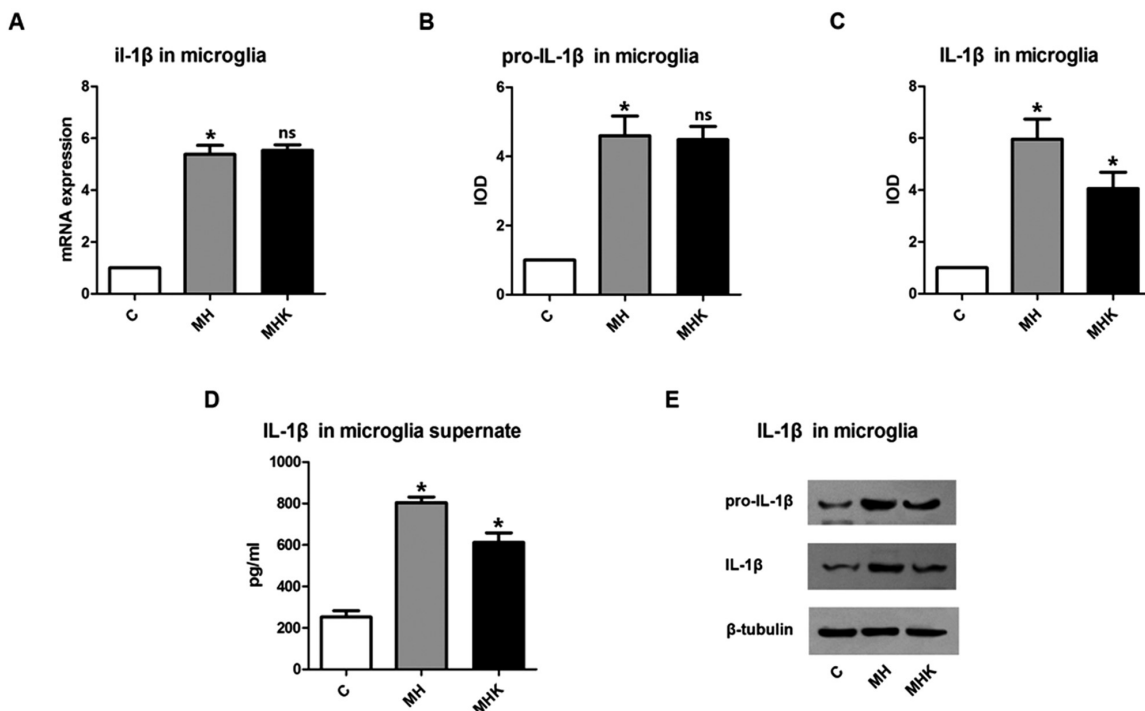


图3 小胶质细胞与 H37Ra 共培养及应用细胞外高钾干预,对小胶质细胞中 IL-1 β 的影响

Fig.3 Effect of co-culture of microglia with H37Ra and application of extracellular high potassium on IL-1 β in microglial cells

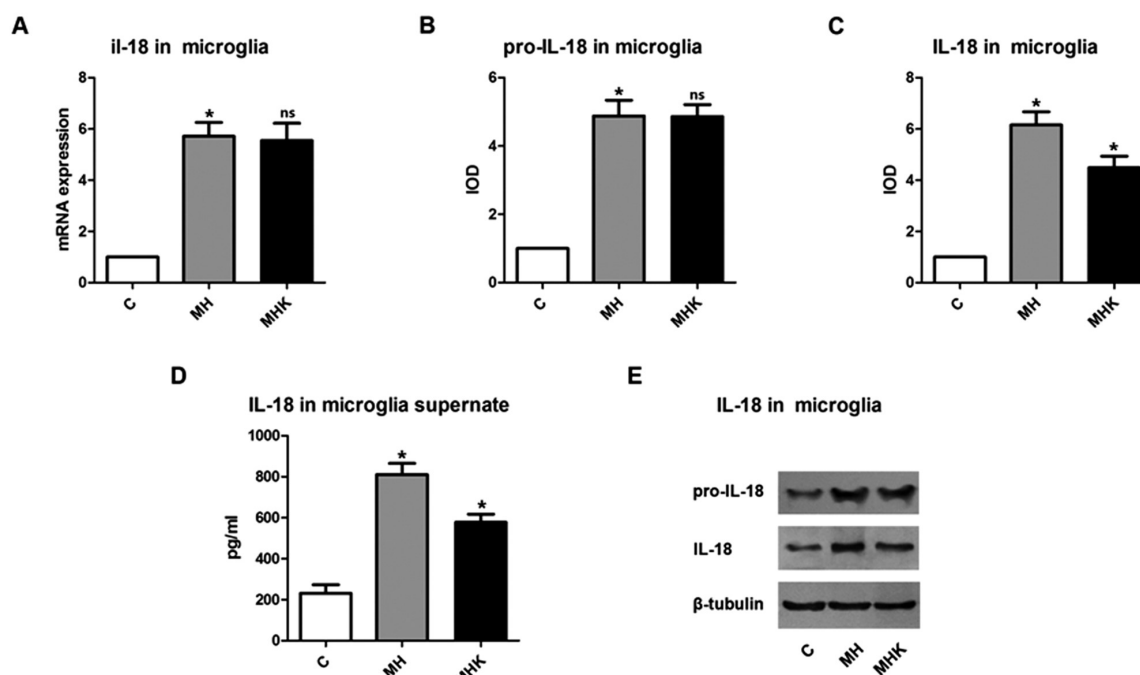


图4 小胶质细胞与 H37Ra 共培养及应用细胞外高钾干预,对小胶质细胞中 IL-18 的影响

Fig.4 Effect of co-culture of microglia with H37Ra and application of extracellular high potassium on IL-18 in microglial cells

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=5$. * $P<0.05$, compared with control group(C) (Fig.3-4 A-D) and co-culture group(MH) (Fig.3-4 C-D);

$^{ns}P>0.05$, compared with co-culture group(MH) (Fig.3-4 A-B).

2.4 小胶质细胞与 H37Ra 共培养后存活率明显下降,而细胞外高钾可改善细胞存活率

在 H37Ra 与小胶质细胞共培养后,小胶质细胞的存活率明显下降,而在应用细胞外高钾干预后,其存活率明显改善。如图 5 所示,共培养组(MH)与对照组(C)相比,小胶质细胞的存活率明显下降(* $P<0.05$),细胞外高钾组(MHK)与共培养组(MH)相比,小胶质细胞的存活率显著改善(* $P<0.05$),提示细胞外高钾对于小胶质细胞的存活具有促进作用。

3 讨论

NLRP3 炎症小体是常见的与感染等多种中枢神经系统疾病相关的炎症小体,在受到包括细胞穿孔素,细胞外 ATP,尿酸盐结晶,病毒相关 DNA、RNA,紫外线等多种因素的刺激后,能够连接 ASC 并激活 Caspase-1,并进一步活化 IL-1 β 及 IL-18,引起细胞焦亡。Caspase-1,即 IL-1 β 转化酶,最初合成的 pro-Caspase-1 并不具有生物学活性,它的相对分子量为 45000,随后,在细胞内炎症小体的帮助下,Pro-Caspase-1 前体被加工成异源二聚体,进而形成具有生物学活性的四聚体 Caspase-1^[29]。在活化的 Caspase-1 作用下,pro-IL-1 β 及 pro-IL-18 裂解为具有活性的 IL-1 β 及 IL-18,IL-1 β 和 IL-18 作用于其受体 IL-1R 及 IL-18R,触发 NF- κ B 依赖的基因转录等一系列级联效应^[30],造成炎症反应扩大^[29],并产生细胞膜的完整性丧失,胞膜微孔形成,胞内容物释放,细胞渗透性溶解,炎症反应发生等一系列细胞焦亡相关过程^[29]。

NLRP3 的激活主要需要两种信号,其一是通常所说的始动信号,是通过由 TLRs 或如 TNF- α 等细胞因子所识别的微生物配体所介导,可以激活 NF- κ B 通路,造成 pro-IL-1 β 及 NL-

RP3 表达水平的增高^[31];其二是通过数种 PAMP 或 DAMP 介导,促进了 NLRP3,ASC 以及 pro-Caspase-1 的组装,导致 NLRP3 炎症小体的活化。而 IL-1 β ,IL-18 通过 2 种途径进行调控,其一是前体的 pro-IL-1 β 及 pro-IL-18 的产生(Signal 1),其二是 IL-1 β 及 IL-18 的成熟(Signal 2),但是在不同的细胞中,对炎症的小体的激活方式也不一样^[32]。

survival rate in microglia

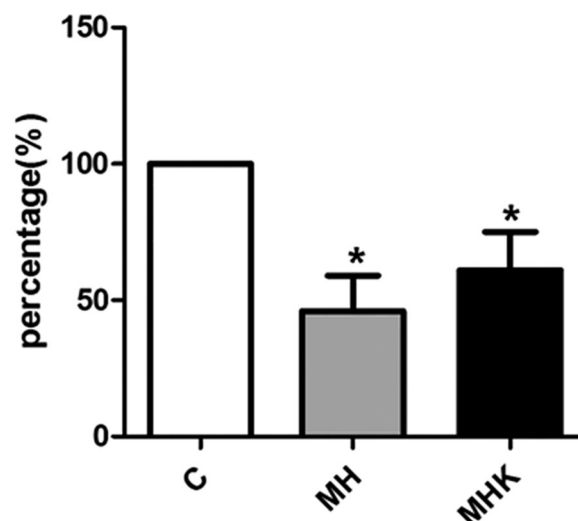


图5 小胶质细胞与 H37Ra 共培养及应用细胞外高钾干预,对小胶质细胞存活率的影响

Fig.5 Co-culture of microglia with H37Ra and the effect of extracellular high potassium on the survival rate of microglial cells

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=5$. * $P<0.05$, compared with control group(C) and co-culture group(MH).

NLRP3-Caspase-1 相关通路及其下游的炎症因子的产生受到多种因素的影响, 可以通过多种转录及转录后途径进行调控。现在细胞内钾离子浓度的降低被认为是 NLRP3 炎症小体激活的常见通路, 很多 NLRP3 的活化信号, 包括细菌毒素, 颗粒物的吞噬作用等, 均是通过该通路发挥作用^[15]。在没有炎症的情况下, 细胞外的 ATP 以及 K^+ 外流能够通过 P2X7 受体, 泛连接蛋白 1 介导 NLRP3 炎症小体的组装及活化^[33]。许多 NLRP3 的活化信号能够诱导细胞内钾离子外流, 从而促进 NLRP3 炎症小体的组装, 造成 Caspase-1 的激活以及 IL-1 β , IL-18 的成熟, 而抑制 K^+ 的外流后, NLRP3 及 Pro-Caspase-1、pro-IL-1 β 的活化也会受到抑制^[34]。

CNS-TB 感染过程中, 小胶质细胞是首要的感染目标^[26], 小胶质细胞能够通过表达模式识别受体 (PRR) 来激活炎症小体, 在结核性脑膜炎 (TBM) 患者的脑脊液中, 能够检测到 IL-1 β , IL-18, TNF- α 等多种炎症因子的升高^[27]。同时, 此前研究表明, 在结核感染的过程中 K^+ 的外流对于巨噬细胞中结核分枝杆菌以及非结核分枝杆菌引起的炎症小体的激活是必须的^[28], 而中枢神经系统感染过程中, 小胶质细胞中 NLRP3-Caspase-1 通路的作用及 K^+ 对其的影响尚不明确。

在本实验中, 我们通过将小胶质细胞与结核 H37Ra 菌株共培养, 以模拟中枢神经系统感染过程中小胶质细胞与结核杆菌的相互作用过程, 同时应用与 NLRP3-Caspase-1 通路密切相关的钾离子作为干预因素, 以细胞外高钾抑制细胞内钾离子的外流, 分别从转录水平, 蛋白表达水平及蛋白分泌水平对细胞焦亡相关因子进行检测。实验表明, 在小胶质细胞与 H37Ra 共培养后, 小胶质细胞中 NLRP3, Caspase-1, IL-1 β 及 IL-18 的转录及表达均出现了上调, 同时 Caspase-1, IL-1 β 及 IL-18 的活化也较前明显增加, 此外, 细胞培养上清液中分泌的 IL-1 β 及 IL-18 也出现了明显的增加。表明在小胶质细胞在与 H37Ra 共培养后, 出现了 NLRP3 炎症小体所介导的 Caspase-1 的活化, 继而促进了 IL-1 β 及 IL-18 等相关因子的产生、成熟及分泌, 表明 NLRP3-Caspase-1 相关通路参与小胶质细胞对于 H37Ra 的免疫应答过程中。

在应用细胞外高钾干预后, 抑制小胶质细胞钾离子的外流, 对于 NLRP3, Caspase-1, IL-1 β 及 IL-18 的转录及表达过程并未产生明显的影响, 但是活化的 Caspase-1 明显降低, 同时其下游的活化及分泌的 IL-1 β , IL-18 也明显减少, 提示细胞外高钾对小胶质细胞中 NLRP3-Caspase-1 通路的影响主要在于干预了 pro-Caspase-1 的激活过程从而进一步影响了其下游的 pro-IL-1 β 及 pro-IL-18 向活性 IL-1 β , IL-18 的转化及分泌。最终, 从细胞的存活率而言, H37Ra 与小胶质细胞共培养后, 小胶质细胞的存活率明显的下降, 而在应用了细胞外高钾干预后, 其存活率得到了一定的改善, 提示细胞存活率的改善有可能与抑制了 NLRP3-Caspase-1 通路有关。

通过本实验, 第一次证明了在结核杆菌 H37Ra 菌株与小胶质细胞共培养模型中, NLRP3, Caspase-1, IL-1 β , IL-18 等参与小胶质细胞对于结核的免疫应答中, 同时细胞外高钾可以对该过程产生抑制, 该研究结果对于进一步明确结核感染过程中小胶质细胞涉及的细胞焦亡机制, 进一步明确中枢神经系统结核感染及损伤的机制, 以及进一步明确中枢神经系统结核感

染的治疗方案也具有积极的指导意义。但是 H37Ra 对小胶质细胞 NLRP3 炎症小体的具体的激活过程是通过何种途径完成的仍需要进一步探讨; 同时, 细胞外高钾对于 NLRP3-Caspase-1 通路的调控是如何作用于 pro-Caspase-1 的活化过程的, 仍需进一步研究明确; 此外, 细胞外高钾对 pro-IL-1 β 及 pro-IL-18 向 IL-1 β , IL-18 的转化过程的干预是否经由除 Caspase-1 外的其他通路进行, 也需要进一步的深入研究。

参考文献 (References)

- [1] R Hernandez Pando. Modelling of Cerebral Tuberculosis: Hope for Continuous Research in Solving the Enigma of the Bottom Billion's Disease[J]. The Malaysian journal of medical sciences: MJMS, 2011, 18(1): 12-15
- [2] S Gul, G Celebi, M Kalayci, et al. Syringomyelia and intradural extramedullary tuberculoma of the spinal cord as a late complication of tuberculous meningitis[J]. Turkish neurosurgery, 2010, 20(4): 561-565
- [3] M A Brennan, B T Cookson. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis [J]. Molecular microbiology, 2000, 38 (1): 31-40
- [4] M Lamkanfi, V M Dixit. Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity[J]. Immunological reviews, 2009, 227(1): 95-105
- [5] S L Fink, B T Cookson. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages [J]. Cellular microbiology, 2006, 8(11): 1812-1825
- [6] S L Cassel, S Joly, F S Sutterwala. The NLRP3 inflammasome: a sensor of immune danger signals [J]. Seminars in immunology, 2009, 21 (4): 194-198
- [7] D Y Fann, S Y Lee, S Manzanero, et al. Intravenous immunoglobulin suppresses NLRP1 and NLRP3 inflammasome-mediated neuronal death in ischemic stroke[J]. Cell death & disease, 2013, 5(4): e790
- [8] M T Heneka, M P Kummer, A Stutz, et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice[J]. Nature, 2013, 493(7434): 674-678
- [9] S Johann, M Heitzer, M Kanagaratnam, et al. NLRP3 inflammasome is expressed by astrocytes in the SOD1 mouse model of ALS and in human sporadic ALS patients[J]. Glia, 2015, 63(12): 2260-2273
- [10] S Thonnings, J D Knudsen, H C Schonheyder, et al. Antibiotic treatment and mortality in patients with *Listeria monocytogenes* meningitis or bacteraemia[J]. Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2016, 22(8): 725-730
- [11] A Pinar, J K Dowling, NJ Bitto, et al. PB1-F2 Peptide Derived from Avian Influenza A Virus H7N9 Induces Inflammation via Activation of the NLRP3 Inflammasome[J]. The Journal of biological chemistry, 2017, 292(3): 826-836
- [12] MD Tate, J D Ong, J K Dowling, et al. Reassessing the role of the NLRP3 inflammasome during pathogenic influenza A virus infection via temporal inhibition[J]. Scientific reports, 2016, 6: 27912
- [13] M K Mamik, E Hui, W G Branton, et al. HIV-1 Viral Protein R Activates NLRP3 Inflammasome in Microglia: implications for HIV-1 Associated Neuroinflammation [J]. Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology, 2017, 12(2): 233-248

- [14] W Barclay, M L. Shinohara, Inflammasome activation in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) [J]. Brain pathology, 2017, 27(2): 213-219
- [15] R Munoz-Planillo, P Kuffa, G Martinez-Colon, et al. K (+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter[J]. Immunity, 2013, 38(6): 1142-1153
- [16] S K Shrivastava, E Dalko, D Delcroix-Genete, et al. Uptake of parasite-derived vesicles by astrocytes and microglial phagocytosis of infected erythrocytes may drive neuroinflammation in cerebral malaria [J]. Glia, 2017, 65(1): 75-92
- [17] L Fellner, R Irschick, K Schanda, et al. Toll-like receptor 4 is required for alpha-synuclein dependent activation of microglia and astroglia[J]. Glia, 2013, 61(3): 349-360
- [18] M R Elmore, M D Burton, M S Conrad, et al. Respiratory viral infection in neonatal piglets causes marked microglia activation in the hippocampus and deficits in spatial learning[J]. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 2013, 34(6): 2120-2129
- [19] X Liu, Z Zhang, J Ruan, et al. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores [J]. Nature, 2016, 535 (7610): 153-158
- [20] A Kumar, J P Barrett, D M Alvarez-Croda, et al. NOX2 drives M1-like microglial/macrophage activation and neurodegeneration following experimental traumatic brain injury [J]. Brain, behavior, and immunity, 2016, 58: 291-309
- [21] D Li, C Wang, Y Yao, et al. mTORC1 pathway disruption ameliorates brain inflammation following stroke via a shift in microglia phenotype from M1 type to M2 type[J]. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2016, 30(10): 3388-3399
- [22] W Xian, Y Wu, W Xiong, et al. The pro-resolving lipid mediator Maresin 1 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by attenuating the pro-inflammatory response [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2016, 472(1): 175-181
- [23] R B Rock, M Olin, C A Baker, et al. Central nervous system tuberculosis: pathogenesis and clinical aspects [J]. Clinical microbiology reviews, 2008, 21(2): 243-261
- [24] M T Heneka, M J Carson, J El Khoury, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease[J]. The Lancet. Neurology, 2015, 14(4): 388-405
- [25] D Nayak, T L Roth, D B McGavern, Microglia development and function[J]. Annual review of immunology, 2014, 32: 367-402
- [26] R B Rock, G Gekker, S Hu, et al. Role of microglia in central nervous system infections [J]. Clinical microbiology reviews, 2004, 17 (4): 942-964
- [27] D A Drevets, P J Leenen, R.A. Greenfield, Invasion of the central nervous system by intracellular bacteria [J]. Clinical microbiology reviews, 2004, 17(2): 323-347
- [28] H M Lee, J Kang, S J Lee, et al. Microglial activation of the NLRP3 inflammasome by the priming signals derived from macrophages infected with mycobacteria[J]. Glia, 2013, 61(3): 441-452
- [29] A S Yazdi, G Guarda, M C D'Ombrian, et al. Inflammatory caspases in innate immunity and inflammation[J]. Journal of innate immunity, 2010, 2(3): 228-237
- [30] S Alboni, D Cervia, S Sugama, et al. Interleukin 18 in the CNS[J]. Journal of neuroinflammation, 2010, 7: 9
- [31] G Guarda, M Zenger, A S Yazdi, et al. Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells [J]. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2011, 186(4): 2529-2534
- [32] M G Netea, A Simon, F van de Veerdonk, et al. IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes [J]. PLoS pathogens, 2010, 6(2): e1000661
- [33] V Petrilli, S Papin, C Dostert, et al. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration[J]. Cell death and differentiation, 2007, 14(9): 1583-1589
- [34] D Pietrella, N Pandey, E Gabrielli, et al. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans* activate the NLRP3 inflammasome [J]. European journal of immunology, 2013, 43(3): 679-692

(上接第 4492 页)

- [27] 胡全福, 欧阳绍基, 姚榕威, 等. 曲安奈德联合盐酸氨溴索治疗分泌性中耳炎患者的临床疗效及对机体炎症因子、细胞免疫指标的影响[J]. 海南医学院学报, 2016, 22(23): 2897-2900
- Hu Quan-fu, Ou-yang Shao-ji, Yao Rong-wei, et al. Clinical effects of triamcinolone acetone ammonia bromine joint hydrochloric acid on patients with secretory otitis media and their influences on the body's inflammatory factor and cellular immunologic parameters[J]. Journal of Hainan Medical University, 2016, 22(23): 2897-2900
- [28] Walia MK. Oral Dexamethasone versus Oral Prednisolone in Acute

Asthma: A New Randomized Controlled Trial and Updated Meta-analysis: Pediatric Pulmonologist's Viewpoint [J]. Indian Pediatr, 2018, 55(2): 159

- [29] Ding LZ, Teng X, Zhang ZB, et al. Mangiferin inhibits apoptosis and oxidative stress via BMP2/Smad-1 signaling in dexamethasone-induced MC3T3-E1 cells[J]. Int J Mol Med, 2018, 41(5): 2517-2526
- [30] Faralli JA, Dimeo KD, Trane RM, et al. Absence of a secondary glucocorticoid response in C57BL/6J mice treated with topical dexamethasone[J]. PLoS One, 2018, 13(3): e0192665