

• 龋病学研究 •

粪肠球菌 LTA 通过促进 ROS 的高表达活化 NLRP3 炎性体

王丽娜 叶丹丹 王娇娇 牛卫东*

(大连医科大学口腔医学院牙体牙髓科 辽宁大连 116044)

[摘要] 目的:检测粪肠球菌脂磷壁酸 LTA 能否通过激活活性氧而活化 NLRP3 炎性体。方法:粪肠球菌 LTA 作用于小鼠巨噬细胞 RAW264.7,运用 Western blot、ELISA 及 Real-time qPCR 法检测 NLRP3 炎性体蛋白及 mRNA 的表达。还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸酶氧化酶抑制剂 DPI 抑制活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生,荧光染色及流式细胞仪检测 ROS 的表达。结果:LTA 作用于 RAW264.7 细胞 24 小时后,NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白及 mRNA 的表达量均明显高于阴性对照组($P < 0.05$)。DPI 可有效抑制 ROS 的产生,ROS 表达被抑制后,NLRP3 炎性体蛋白及 mRNA 的表达亦明显降低。结论:LTA 是粪肠球菌活化 NLRP3 炎性体的毒力因子,主要借助于 ROS 的产生。

[关键词] NLRP3 炎性体 粪肠球菌 LTA ROS

[中图分类号] R781 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-7651(2018)02-0112-05

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2018.02.002

Enterococcus Faecalis LTA Activates NLRP3 Inflammasome by Promoting High Expression of ROS. WANG Li-na, YE Dan-dan, WANG Jiao-jiao, NIU Wei-dong*. Department of Endodontics, School of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116044, China.

[Abstract] **Objective:** To detect whether Enterococcus faecalis LTA activates NLRP3 inflammasome by promoting reactive oxygen species expression. **Methods:** Mouse macrophages RAW264.7 cells were stimulated with Enterococcus faecalis LTA, and the expressions of NLRP3 protein and mRNA were detected by Western blot, ELISA, and real-time qPCR. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphatase oxidase inhibitor DPI inhibited the production of reactive oxygen species (ROS), which was detected by fluorescence staining and flow cytometry. **Results:** After LTA was applied to RAW264.7 cells for 24 hours, the expressions of protein and mRNA of NLRP3, Caspase-1, and IL-1 β were significantly higher than those of negative control group ($P < 0.05$). The DPI could effectively inhibit the production of ROS. When ROS expression was inhibited, the expressions of NLRP3 inflammatory protein and mRNA were significantly reduced. **Conclusion:** LTA is the virulence factor of Enterococcus faecalis activating NLRP3 inflammasome, mainly by the production of ROS.

[Key words] NLRP3 inflammasome Enterococcus faecalis LTA ROS

目前的研究多认为根尖周病是细菌感染为主的免疫炎症反应^[1],其中粪肠球菌是继发性和持续性牙髓根尖周感染中常见致病菌。粪肠球菌具有多种毒力因子^[2,3],包括脂磷壁酸(lipoteichoic acid, LTA)、粘附蛋白、细胞溶解素、明胶酶等。其中 LTA 是粪肠球菌主要致病因子之一,具有较强的免疫原性^[4]。E. faecalis LTA 可以上调人牙周膜成纤维细胞 RANKL/OPG (nuclear factor- κ B ligand/

osteoprotegerin) 的表达^[5],以及抑制人成骨细胞样细胞 MG63 的分化及凋亡^[6],提示其在促进牙槽骨破坏过程中可能起着重要作用。NLRP3 炎性体作为 NOD 样受体的重要信号通路,在宿主低于外来微生物的第一道防线中发挥着关键作用,包括 NLRP3 蛋白、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、半胱氨酸蛋白酶 1(Caspase-1)及 IL-1 β , NLRP3 炎性小体包括 NLRP3 蛋白、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)及半胱氨酸蛋白酶 1(caspase-1)。在受到外界刺激后,NLRP3 通过寡聚化,聚集大量 pro-Caspase-1,从而形成 NLRP3 炎性体并使 Caspase-1 活化,进而在天然免疫防御中促进 pro-IL-1 β 的切割成

基金项目 国家自然科学基金(81171538)

作者简介 王丽娜(1981~),女,辽宁锦州人,博士,讲师,主要从事牙体牙髓病学病因学与治疗学研究。

* 通讯作者 牛卫东, E-mail: 13840886663@139.com

熟,IL-1 β 是 NLRP3 炎症体活化的标志,进而引发一系列的炎症反应。

以往的研究表明,在大鼠根尖周炎中,NLRP3 炎症体呈高表达^[7,8],粪肠球菌 LTA 可通过 NF- κ B 信号通路活化 RAW264.7 细胞的 NLRP3 炎症体^[9]。亦有研究表明还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸酶(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶等可通过诱导活性氧(Reactive oxygen species, ROS)产生进而激活 NLRP3 炎症体。

因此,本研究用粪肠球菌主要毒力因子脂磷壁酸 LTA 作用于小鼠巨噬细胞系 RAW264.7,探讨 LTA 能否通过活化 ROS 进而活化 NLRP3 炎症体,进一步研究 NLRP3 炎症体在根尖周炎中的活化机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂 粪肠球菌 LTA、二苯碘 DPI、QuantiProTM BCA Assay Kit (Sigma-Aldrich, 美国); NLRP3 多克隆抗体、Caspase-1 多克隆抗体、羊抗兔二抗、IL-1 β ELISA 试剂盒(abcam, 美国);总 RNA 提取试剂盒(生工生物工程股份有限公司);SYBR[®] Premix ExTaqM II、PrimeScriptTM RT reagent kit with gDNA Eraser(宝生物工程股份有限公司)

1.2 细胞培养 实验所用细胞为小鼠巨噬细胞系 RAW264.7,由武汉大学口腔生物医学重点实验室馈赠。细胞培养于含 10% 胎牛血清,1% 双抗的高糖 DMEM 培养基中,置于 37 °C,5% CO₂ 的培养箱培养。细胞传代后,取生长状态比较好的第 3~4 代细胞用于实验。

1.3 免疫荧光及流式细胞仪检测 ROS 的表达 细胞数量为 5 \times 10⁵ cells/孔接种于 24 孔板,培养 24 h 后,10 μ mol/L 的 NADPH 氧化酶抑制剂 DPI(Diphenyleneiodonium chloride)提前处理细胞 1 h 后,10 mg/L LTA 或 LTA 直接刺激细胞 1 h 后收集细胞进行荧光显微照相和流式细胞仪检测。用新鲜的高糖 DMEM 培养基稀释活性氧 ROS 荧光探针—二氢乙啶(Dihydroethidium, DHE)探针至 10 μ mol/L,稀释好的 DHE 工作液重悬细胞,37 °C,避光孵育 30 min 后,将 20 μ L 细胞滴于显微载玻片上,盖上盖玻片,倒置荧光显微镜下,红光激发,观察和拍摄各不同实验组细胞绿色发射图像,ROS 阳性细胞在整个核区被染成绿色。DHE 重悬细胞避光孵育 30 min 后,细胞离心去上清,预冷的 PBS 缓冲

液洗涤细胞去除残余的探针,消除背景。使用流式细胞仪设置 F1 荧光通道检测 ROS 的表达情况,采用合适的激发波长和发射波长,将细胞分成 2 个亚群,圈门后得到相应的峰图,保存并分析图片,总结数据。

1.3 Real-time qPCR 检测 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 的 mRNA 表达情况 细胞常规消化后,吹打成单细胞悬液,细胞数量为 5 \times 10⁵ cells/孔接种于 6 孔板,培养 24 h 后,LTA 组加入 10 mg/L LTA,LTA+DPI 组加入 10 mg/L LTA+10 μ mol/L DPI,24 h 后收集细胞,检测 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 的 mRNA 表达情况。细胞总 RNA 提取依据 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒的说明书进行,按照 PrimeScriptTM RT reagent kit with gDNA Eraser(TaKaRa)说明书去除基因组 DNA 及反转录为 cDNA 反应,SYBR[®] Premix ExTaqTM II(TliRNaseH Plus)试剂盒说明书进行实验反应。其中小鼠的 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 及内参基因 GAPDH 的引物委托上海生工生物工程股份有限公司合成,引物序列如表 1 所示。

表 1 小鼠 NLRP3 炎症体相关基因引物序列

Table 1 Primer sequence for mice NLRP3 inflammasome

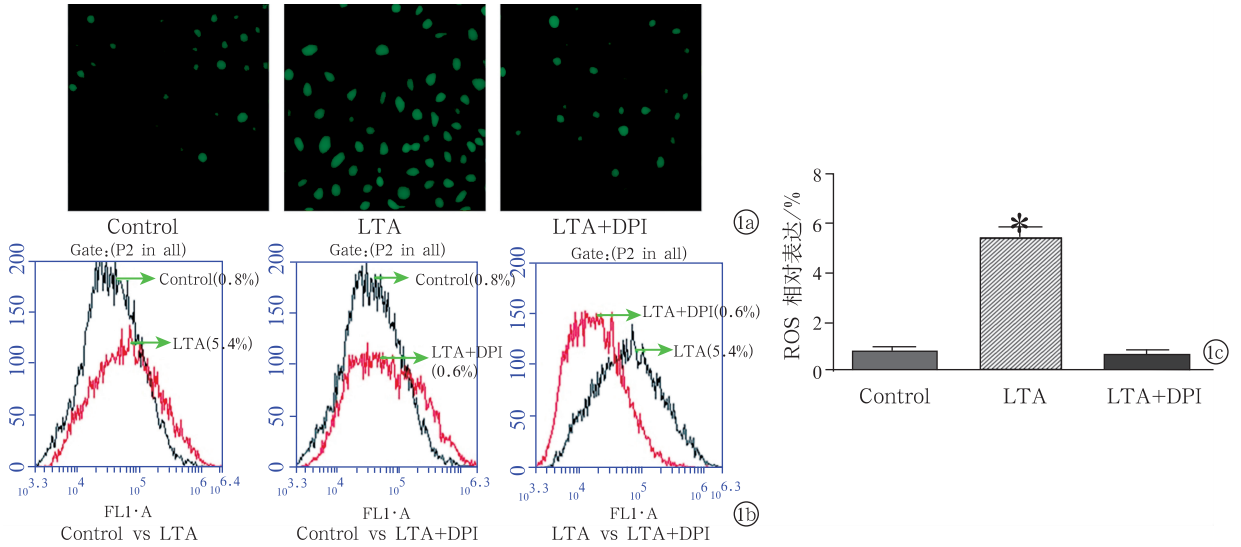
Primer	Sequences
NLRP3 F	ACCAGCCAGAGTGGAAATGAC
NLRP3 R	ATGGAGATGCGGGAGAGATA
Caspase-1 F	GTATTACAGCCCTGTTGGA
Caspase-1 R	GCTTCTCTTTGCCCTCA
IL-1 β F	CTCACAAGCAGAGCACAAAGC
IL-1 β R	TCCAGCCCATACTTTAGGAAGA
GAPDH F	AAATGGTGAAGGTCGGTGTG
GAPDH R	TGAAGGGGTCGTTGATGG

1.4 Western blot 及 ELISA 法检测 NLRP3、Caspase-1 及 IL-1 β 蛋白的表达 细胞数量为 2 \times 10⁶ cells/孔接种于 60 mm 细胞培养皿中,培养 24 h 后,LTA+DPI 组加入 10 μ mol/L DPI+10 mg/L LTA,LTA 组直接加入 10 mg/L LTA,Control 组不做任何处理。药物作用 24 h 后收集细胞用 Western blot 法检测细胞 NLRP3 与 Caspase-1 蛋白表达情况,同时收集细胞悬液,用 ELISA 法检测分泌至细胞外的 IL-1 β 的表达情况。细胞总蛋白的提取按照全蛋白提取试剂盒的说明书进行,蛋白变性后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)实验,其中抗体稀释比例如下:Vinculin 单克隆抗体稀释比例为 1:1 000,NLRP3 多克隆抗体稀释比例为 1:400,Caspase-1 多克隆抗体稀释比例为 1:

7 500,所有抗体均用 TBST(TBS 缓冲液 500 mL, TWEEN-20 0.5 mL)稀释,抗原抗体反应结束后,将 PVDF 膜放入凝胶成像系统 BIO-RAD 暗箱内,加入 ECL 发光液发光,采用全自动 Image lab 专业成像系统成像并进行图像输出。成像后的条带利用 Image lab 4.0.1 分析软件对图像进行分析,以目的蛋白与内参蛋白的比值作为每组样本蛋白的相对表达量。收集好后的细胞悬液按照 ELISA 试剂盒说明书检测分泌至胞外的 IL-1 β 蛋白的表达,反应结束后,利用酶标仪检测 A₄₅₀ 值,打印检测结果绘

制标准曲线,根据数据计算样本的浓度并分析。

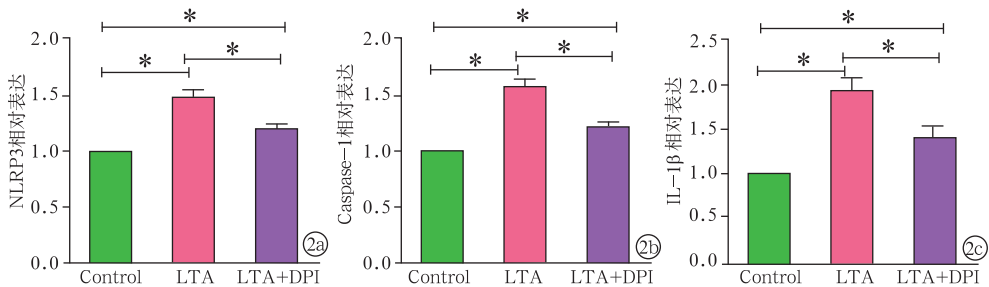
1.5 统计学分析 所有细胞实验均选用不同批次的细胞重复 3 次。采用 SPSS 13.0 For Windows 软件对相关数据进行统计学分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 来表示,若数据符合正态分布、方差齐,组间均数比较采用单因素方差分析,多个样本均数间两两比较采用 Student-Newman-Keuls-q 检验,否则采用 Tamhane's T2 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。



10 $\mu\text{mol/L}$ NADPH 氧化酶抑制剂 DPI 提前处理细胞 1 h, 10 mg/L LTA 刺激细胞 1 h 或 LTA 直接刺激细胞 1 h 后,检测 ROS 的表达情况。1a: ROS 荧光探针标记细胞后,荧光显微镜下 ROS 表达阳性的细胞呈绿色($\times 200$)。1b: 流式细胞仪检测不同处理组中 ROS 表达情况的结果图。1c: ROS 在各组表达的统计学分析, * $P < 0.05$, 与其他组相比,差异有统计学意义

图 1 不同处理组 ROS 的表达情况

Fig. 1 ROS expression in different treatment groups.



10 $\mu\text{mol/L}$ DPI 与 LTA 共同作用于 RAW 264.7 细胞,或直接加入 LTA 刺激 24 h 后,NLRP3、Caspase-1、IL-1 β mRNA 相对表达量的统计学结果。* $P < 0.05$, 与其它两组相比,差异有统计学意义

图 2 不同处理组 NLRP3 炎性体 mRNA 的表达情况

Fig. 2 Expression of NLRP3 inflammasome mRNA in different treatment groups.

2 结果

2.1 各个实验组中 ROS 的表达情况 用 ROS 荧光探针 DHE 标记不同处理条件下的细胞,荧光显微镜下观察发现,细胞的胞浆或胞核有绿色的激发光即 ROS 表达呈阳性。图 1 的结果显示不同处理

组中 ROS 的表达情况,LTA 作用 RAW 264.7 细胞 1 h 后,ROS 的表达量为 5.4%,明显高于阴性组及抑制剂组($P < 0.05$)。阴性组的表达仅为 0.8%,NADPH 氧化酶抑制剂 DPI 组的 ROS 表达量低于阴性对照组,为 0.6%,但二者的表达并无统计学差

异 ($P > 0.05$), 如图 1c 所示。

2.2 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β mRNA 的表达情况 如图 2 所示, LTA 作用于 RAW264.7 细胞 24 h 后, NLRP3、Caspase-1、IL-1 β mRNA 的表达

量均明显高于阴性对照组 ($P < 0.05$), 而当 LTA 与 NADPH 酶氧化抑制剂 DPI 共同作用于细胞 24 h 后, 上述因子的表达量均明显降低 ($P < 0.05$), 但表达仍高于正常对照组 ($P < 0.05$)。

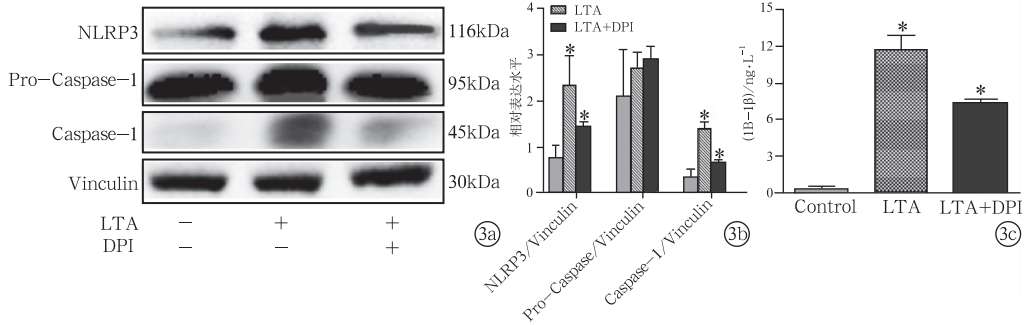


图 3 不同处理组 NLRP3 炎性体蛋白的表达情况

Fig. 3 Expression of NLRP3 inflammasome protein in different treatment groups.

10 μ mol/L DPI 与 LTA 共同作用于 RAW 264.7 细胞, 或直接加入 LTA 刺激 24 h 后, NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 炎性体的蛋白表达情况。3a: Western blot 结果显示细胞内 NLRP3 与 Caspase-1 的蛋白表达条带。3b: NLRP3 及 Caspase-1 蛋白相对表达量的统计学分析, * $P < 0.05$, 不同处理组同一个蛋白相对表达量与其它两组相比, 差异有统计学意义。3c: ELISA 检测胞外 IL-1 β 蛋白表达的统计学分析, * $P < 0.05$, 与其他组相比差异有统计学意义

2.3 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白的表达情况

Western blot 的结果显示, LTA 作用于 RAW 264.7 细胞 24 h 后, NLRP3、Caspase-1 表达量均明显高于阴性对照组 ($P < 0.05$), 无活性的 Pro-caspase-1 的表达与阴性对照组无统计学差异, NADPH 酶氧化抑制剂 DPI 可明显抑制 LTA 促进炎性体高表达这一作用, 除 Pro-caspase-1 的表达无明显变化外, NLRP3、Caspase-1 的表达均明显降低 ($P < 0.05$), 但仍高于正常对照组 ($P > 0.05$)。ELISA 法检测分泌至胞外的 IL-1 β 的表达情况, 结果显示 LTA 组的表达明显高于 LTA+DPI 组 ($P < 0.05$), 但 LTA+DPI 组的表达仍高于正常对照组 ($P < 0.05$)。上述因子蛋白的表达趋势与 mRNA 一致, 结果如图 3 所示。

3 讨论

当机体受到外源性物质的刺激后通过氧化应激反应而产生的 ROS 是造成机体免疫炎症性反应的诱因之一, 近年来的研究亦表明, 牙髓根尖周病亦与机体的免疫炎症反应相关, 而 NLRP3 炎性体的异常激活与多种自身免疫性疾病相关。故本研究进一步探讨 ROS 与 NLRP3 炎性体在根尖周病中的作用。目前的研究表明 NLRP3 炎性体可受到多种来自于胞外环境和胞浆内的病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 以及来自于宿主的危险相关分子模式 (danger associated molecular patterns, DAMPs) 激活^[10-11]。几乎所有的 NLRP3 炎性体激活物都是线粒体 ROS 的激动剂, ROS 的产生途径有多种^[12], 例如, 饱和脂肪酸棕榈酸通过线粒体 ROS 依赖的方式激活 NLRP3 炎性体并释放出活化的 IL-1 β ^[13], 其中通过 NADPH 氧化酶的途径诱导活性氧 ROS 的产生进而激活炎性体是 NLRP3 炎性体活化的经典方式。而多种研究也表明, 革兰氏阳性菌脂磷壁酸 LTA 可以通过 NADPH 氧化酶产生 ROS^[14,15]。

NADPH 氧化酶抑制剂 DPI 已广泛应用于多种氧化酶的阻断实验, 其阻断作用明确, 故本研究选用 DPI 作为 ROS 的阻断剂, 研究 ROS 在 LTA 作用下对 NLRP3 炎性体的作用。通过研究结果证实粪肠球菌 LTA 可以促进 ROS 的高表达, 当加入 NADPH 氧化酶抑制剂后, LTA 促使的 ROS 的高

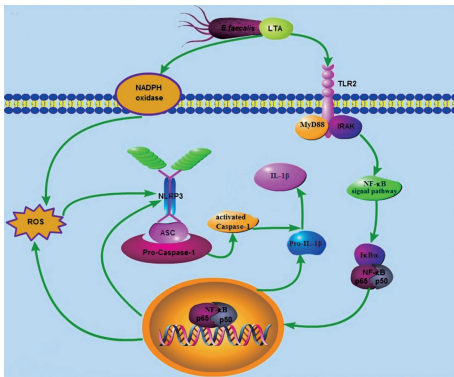


图 4 粪肠球菌 LTA 活化 NLRP3 信号通路图

Fig. 4 Signaling pathway of Enterococcus faecalis LTA-activated NLRP3.

表达明显被抑制,而此时相应的 NLRP3 炎性体相关因子的蛋白及 mRNA 的表达也全部下降,但仍高于对照组。该结果也说明粪肠球菌 LTA 对 NLRP3 的激活需要 ROS 的参与,但是 ROS 并不是唯一的因素。粪肠球菌 LTA 可以通过 NF- κ B 信号通路活化 NLRP3 炎性体^[9],说明 LTA 可以直接活化 NLRP3 炎性体需借助 NF- κ B 信号通路及 ROS 的产生。相关信号通路图如图 4 所示,一条途径是粪肠球菌 LTA 与细胞膜上的 TLR2 相互作用,通过活化髓样分化因子 88(myD88)后激活丝氨酸/苏氨酸家族 IRAK 信号通路,继而 NF- κ B 信号通路被活化,释放出促炎因子 IL-1 β ,同时激活 NLRP3,进而活化 Caspase-1,最终促进更多的 IL-1 β 分泌至胞外,造成机体的多种损伤。另一条途径是粪肠球菌 LTA 促使细胞膜上的 NADPH 氧化酶活化后释放活性氧 ROS,ROS 进一步促进 NLRP3 炎性体的活化。

综上所述,本文的研究结果表明粪肠球菌 LTA 可以通过促进 ROS 的产生而活化 NLRP3 炎性体。但本文对粪肠球菌活化 NLRP3 炎性体的研究是单一的致病因素对单一的巨噬细胞的作用,信号通路相对简单明了。而当多种细菌及细菌的多种毒力因子相互作用时,其作用机制会更复杂,有益菌可能变成有害菌,反之亦然。

参考文献

- [1] Provenzano JC, Antunes HS, Alves FR, et al. Host-bacterial interactions in post-treatment periodontitis: a metaproteome analysis[J]. J Endod, 2016, 42(6) : 880-885
- [2] Ferrari PH, Cai S, Bombana AC. Effect of endodontic procedures on enterococcal bacteria and yeasts in primary endodontic infections[J]. IntEndod J, 2005, 38(6) : 372-380
- [3] Wang L, Dong M, Song Q, et al. Relationship of biofilm formation and gelE gene expression in Enterococcus faecalis recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment[J]. J Endod, 2011, 37(5) : 631-636
- [4] Han SH, Kim JH, Seo HS, et al. Lipoteichoic acid-induced nitric oxide production depends on the activation of platelet-activating factor receptor and Jak2[J]. J Immunol, 2006, 176(1) : 573-579
- [5] Zhao L, Chen J, Cheng L, et al. Effects of Enterococcus faecalis lipoteichoic acid on receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin expression in periodontal ligament fibroblasts[J]. IntEndod J, 2014, 47(2) : 163-172
- [6] Tian YG, Zhang XL, Zhang K, et al. Effect of enterococcus faecalis lipoteichoic acid on apoptosis in human osteoblast-like cells[J]. J Endod, 2013, 39(5) : 632-637
- [7] 刘生波,刘元元. NLRP3 在大鼠实验性根尖周炎中的表达[J]. 口腔医学研究, 2013, 29(11) : 1002-1004
- [8] 王娇娇,王丽娜,叶丹丹,等. NLRP3/Caspase-1 炎性体通路在大鼠根尖周炎中表达的研究[J]. 口腔医学研究, 2016, 32(6) : 549-553
- [9] Wang L, Jin H, Ye D, et al. Enterococcus faecalis lipoteichoic acid-induced NLRP3 inflammasome via the activation of the nuclear factor kappa B pathway[J]. J Endod, 2016, 42(7) : 1093-1100.
- [10] Franchi L, Muñoz-Planillo R, Nunez G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes[J]. Nat Immunol, 2012, 13(4) : 325-332
- [11] Koizumi Y, Toma C, Higa N, Nohara T, et al. Inflammasome activation via intracellular NLRs triggered by bacterial infection[J]. Cell Microbiol, 2012, 14(2) : 149-154
- [12] Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology[J]. Physiol Rev, 2007, 87(1) : 245-313
- [13] Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling[J]. Nat Immunol, 2011, 12(5) : 408-415
- [14] Dai L, DeFee MR, Cao Y, et al. Lipoteichoic acid (LTA) and lipopolysaccharides (LPS) from periodontal pathogenic bacteria facilitate oncogenic herpesvirus infection within primary oral cells[J]. PLoS One, 2014, 9(6) : 1-11
- [15] Traore K, Zirkin B, Thimmulappa RK, et al. Upregulation of TLR1, TLR2, TLR4, and IRAK-2 expression during ML-1 cell differentiation to macrophages: role in the potentiation of cellular responses to LPS and LTA[J]. ISRN Oncol, 2012(10) : 641246

[收稿日期:2017-10-12]

(本文编辑 汪喻忠)