

右美托咪定通过 c-Fos/NLRP3/caspase-1 级联抑制 LPS 诱发的小胶质细胞炎症反应

邴海龙 张希晓 王朋飞 储勤军

【摘要】 目的 探讨右美托咪定通过 c-Fos/NLRP3/caspase-1 级联抑制脂多糖(LPS)诱发的小胶质细胞炎症反应。方法 选取新生的 SD 大鼠,取其小胶质细胞进行原代培养及分离纯化。采用 LPS 诱导建立小胶质细胞炎症模型。采用 MTT 法选取右美托咪定抑制 LPS 诱导小胶质细胞炎症反应的最适宜浓度。将细胞分为三组:对照组、LPS 组和右美托咪定治疗组(D 组)。采用实时定量 PCR 法测定细胞中 IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 表达量;采用 ELISA 法检测细胞上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 的含量;采用 Western blot 法检测原癌基因 c-Fos、NLRP3 和 caspase-1 的蛋白含量。结果与对照组比较,LPS 组小胶质细胞中炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 表达量均明显升高($P < 0.05$);D 组 IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 表达量明显低于 LPS 组($P < 0.05$)。与对照组比较,LPS 组中小胶质细胞中炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 的含量均明显增加($P < 0.05$);而 D 组 IL-1 β 和 TNF- α 的含量明显低于 LPS 组($P < 0.05$)。与对照组比较,LPS 组小胶质细胞中 c-Fos、NLRP3 和 caspase-1 的蛋白含量均明显增加($P < 0.01$);而 D 组 c-Fos、NLRP3 和 caspase-1 的蛋白含量明显低于 LPS 组($P < 0.05$)。结论 右美托咪定可抑制 LPS 诱发的小胶质细胞中炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 表达量及蛋白含量,推测其作用机制可能与抑制 c-Fos/NLRP3/caspase-1 级联反应有关。

【关键词】 右美托咪定;脂多糖;c-Fos;NLRP3 蛋白;caspase-1;炎症反应;小胶质细胞

Dexmedetomidine inhibits LPS-induced microglial inflammatory response via c-Fos/NLRP3/caspase-1 cascade BING Hailong, ZHANG Xiyao, WANG Pengfei, CHU Qinjun. Department of Anesthesiology, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China
Corresponding author: BING Hailong, Email: 89509489@qq.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the inhibition of LPS-induced microglial inflammatory response by dexmedetomidine (DEX) via c-Fos/NLRP3/caspase-1 cascade. **Methods** Newborn SD rats were selected and their microglia was cultured and purified. Microglia was induced by 5 $\mu\text{g/ml}$ LPS to establish a microglial inflammation model. The optimal concentration of DEX to inhibit LPS-induced microglial inflammatory response was determined by MTT method. The cells were divided into three groups: control group, LPS group and DEX group. Real-time quantitative PCR was used to determine the mRNA expression levels of inflammatory factors interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in cells; cell supernatant was detected by ELISA. The secretion of IL-1 β and TNF- α in the liquid; the proto-oncogene c-Fos and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) and caspase-1 protein expression levels were detected by Western blot. **Results** Real-time quantitative PCR showed that compared with the control group, the inflammatory factors IL-1 β and TNF- α in the microglia of the LPS group were significantly higher ($P < 0.05$). The mRNA expression levels of inflammatory factors IL-1 β and TNF- α in the DEX group and cells were significantly lower than those in the LPS group ($P < 0.05$). The results of ELISA showed that compared with the control group, the secretion of IL-1 β and TNF- α in LPS group were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with that of LPS group, the secretion of IL-1 β and TNF- α was significantly lower ($P < 0.05$). The results of Western Blot showed that compared with the control group, the protein expression levels of c-Fos, NLRP3 and caspase-1 in glial cells in the LPS group were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with those in LPS group, the protein expression levels of c-Fos, NLRP3 and caspase-1 in cells were significantly lower than those in the DEX group ($P < 0.05$). **Conclusion** Dexmedetomidine can inhibit the mRNA expression and protein secretion of inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α in LPS-induced microglia. The mechanism may be related to the inhibi-

DOI:10.12089/jca.2019.08.017

作者单位:450000 郑州大学附属郑州中心医院麻醉科(邴海龙、王朋飞、储勤军);北京大学国际医院麻醉科(张希晓)

通信作者:邴海龙,Email:89509489@qq.com

tion of c-Fos/NLRP3/caspase-1 cascade.

【Key words】 Dexmedetomidine; Lipopolysaccharide; c-Fos; NLRP3 protein; Caspase-1; Inflammatory response; Microglia

右美托咪定是一种 α_2 肾上腺素能受体 (α_2 -adrenergic receptor, α_2 -AR) 激动药, 在重症监护病房中用作镇痛和镇静药, 具有抗炎作用^[1]。右美托咪定激活 α_2 受体并抑制神经元放电, 右美托咪定通过 α_2 -AR 产生其神经保护作用^[2]。核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3) 在小胶质细胞中炎性体介导的炎症起始中起关键作用。小胶质细胞产生过量的促炎细胞因子, 如 TNF- α 和 IL-1 β 能够抑制神经发生和诱导神经细胞凋亡的活性氧^[3]。小胶质细胞衍生的 TNF- α 可通过半胱天冬酶和 Bcl2 家族介导的细胞凋亡调节神经元细胞死亡, 并且在神经炎症中活化的小胶质细胞增加^[4-5]。抑制由 LPS 促进的 c-Fos 核蛋白水平的右美托咪定阻断 NLRP3 的上调^[6-7]。本研究探讨右美托咪定通过 c-Fos/NLRP3/caspase-1 级联抑制 LPS 诱发的小胶质细胞炎症反应, 为临床诊治提供新的治疗靶点。

材料与方法

实验动物与分组 选取新生的 SD 大鼠, 取其小胶质细胞进行原代培养及分离纯化。所有实验程序均在动物保护和伦理委员会批准的方案下进行, 并根据实验动物护理和使用指南进行实验。选取 LPS 5 μ g/ml 诱导小胶质细胞, 建立小胶质细胞炎症模型。采用 MTT 法选取右美托咪定抑制 LPS 诱导小胶质细胞炎症反应的最适宜浓度。实验随机分为 3 组: 对照组, 正常培养原代小胶质细胞, 不做任何处理; LPS 组, LPS 100 ng/ml, 在原代细胞培养 24 h 建立诱导模型细胞; 右美托咪定治疗组 (D 组), 右美托咪定 500 ng/ml 对 LPS 诱导的小胶质细胞的抑制效果最显著, 选取 500 ng/ml 的右美托咪定作用于 LPS 诱导的小胶质细胞。

原代小胶质细胞培养 为了培养原代小胶质细胞, 将混合的胶质细胞培养物从 P1 生长到 P2 Sprague-Dawley 大鼠皮质 (Charles River)。大鼠被麻醉并通过快速斩首处死。提取大脑并将皮质解剖到冰上的 Hanks 平衡盐溶液 (HBSS) 中并切成小块。将细胞用 1% DNase I 和 2.5% 胰蛋白酶在 HBSS 中解离, 同时在 37 $^{\circ}$ C 水浴中振荡。将细胞悬浮液通过 70 μ m 尼龙细胞过滤器过滤, 计数并在补充有 10% FBS 的 Minimal Essential Medium Eagle (MEM)

中以每瓶约 9×10^6 个细胞铺板, 3% 葡萄糖, 1 mmol/L 丙酮酸钠, 1% Glutamax 和 1% Pen/Strep。在解剖后约 5 d 和每 3 天后在烧瓶中更换培养基。通过在体外 11~14 d 振荡从混合的胶质细胞培养物中分离原代小胶质细胞。然后将它们以所需密度接种在星形胶质细胞条件培养基上的盖玻片或培养皿中。

不同浓度右美托咪定细胞培养 人小胶质细胞克隆 3 细胞系 (HMC3) 购自美国模式培养物集存库。HMC3 细胞在 Eagle's Minimum Essential Media 中培养, 补充有 10% 胎牛血清和 100 U/ml 青霉素/链霉素, 并在 37 $^{\circ}$ C 下在潮湿环境 (5% CO₂) 中孵育。在用药理学物质处理之前, 将细胞以每孔 2×10^5 个细胞接种在 24 孔板中至少 24 h。通过在培养基中用脂多糖培养 24 h 并用三磷酸腺苷培养 HMC3 细胞 30 min。为了确定右美托咪定在 HMC3 细胞中的抗炎作用, 当暴露于 LPS/ATP 时, 用不同浓度的右美托咪定处理这些细胞。

炎症因子 mRNA 表达量测定 使用 CellLytic 和 NuCLEAR 提取试剂盒提取 HMC3 细胞中的核蛋白, 并在 4 $^{\circ}$ C 下孵育 c-Fos 一抗 (1:500 稀释) 60 min, 轻轻搅拌。随后, 加入 20 μ l 蛋白 A/G Plus-琼脂糖珠, 然后在 4 $^{\circ}$ C 温育过夜。将混合物在 4 $^{\circ}$ C 下以 500 g 离心 5 min。弃去上清液, 用 PBS 洗涤 Co-IP 产物 3 次。最后 1 次洗涤后, 将沉淀物重新悬浮在 40 μ l 样品缓冲液中并通过 PCR 检测以定量基因表达。使用 iQ5 Multicolor 实时定量 PCR 检测系统和 SYBR Premix Ex Taq II 进行 PCR。用于 PCR 反应的引物见表 1。

细胞活力测定 通过 MTT 测定法分析细胞活力。将 HMC3 细胞接种到 96 孔微板的每个孔中。处理后, 将 MTT 溶液加入到细胞中, 终浓度为 1 mg/ml, 并将混合物在 37 $^{\circ}$ C 下孵育约 4 h。除去上清液, 然后将沉淀物溶于二甲基亚砜中。使用 ELx-800uv 读数器通过分光光度法在 570 nm 下测量吸光度。通过 TUNEL 法对培养细胞进行阳性细胞检测。

IL-1 β 和 TNF- α 蛋白含量测定 收集培养物上清液并储存在 -20 $^{\circ}$ C 直至分析。使用 ELISA 试剂盒根据说明书测量细胞培养上清液中 IL-1 β 和 IL-18 细胞因子的浓度。收集样本上清液。然后将样品

表 1 实时定量 PCR 引物序列

基因	上游引物	下游引物
IL-1 β	5'-TCATCCCAAACAGATCTCG-3'	5'-AGTGCACCTCCATGTCA-3'
TNF- α	5'-TGCCACCGATAATTTTCC-3'	5'-GCGTGACACTAATGTCTG-3'
NLRP3	5'-GCTGGTCTTGAATTCCTCA-3'	5'-GGCACACGGATGAGTCTTT-3'
c-Fos	5'-GACTTTTGCAATGGTGGCA-3'	5'-ATGGATGCAGTCTGGGATT-3'
caspase-1	5'-ACCCTGATGTTCCCATC-3'	5'-TGGTACGTGGGTGCTTAGTTC-3'
β -actin	5'-GTAGTGTAAGTTGACGTAGT-3'	5'-TAAGTCGATCCCTAGTGACAA-3'

加于酶标板底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀,加入样品时间控制在 15 min 内。然后进行室温温育、洗涤。加入底物后定时观察反应孔的颜色变化,避免反应过强从而影响酶标仪光密度读数。利用试剂盒检测三组培养细胞中 IL-1 β 和 TNF- α 的含量,通过标准曲线的回归分析计算浓度。

c-Fos、caspase-1 和 NLRP3 蛋白相对含量测定

用 RIPA 缓冲液裂解原代小胶质细胞培养物并补充蛋白酶抑制剂混合物,磷酸酶抑制剂混合物,10 mmol/L β -甘油磷酸盐,10 mmol/L NaF,10 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT)和 10 mmol/L 苯基甲基磺酰氟(PMSF)。将裂解的细胞在冰上孵育 10 min,并在 4 $^{\circ}$ C 下以 13 000 g 离心 10 min。将 30 μ g 澄清的裂解物在 10% SDS-PAGE 凝胶上电泳并转移至 PVDF 膜。用四种 Par1/MARK 家族成员中的三种探测一次抗体的印迹: Par1a/MARK3, Par1b/MARK2 和 Par1c/MARK1。辣根过氧化物酶缀合的山羊抗兔和山羊抗小鼠抗体以 1:5 000 使用。使用 Syngene G;Box/iChemi-XR 和 GeneSnap 软件通过增强的化学发光进行印迹成像。

统计分析 采用 Prism 4.0 版进行统计学分析。正态分布计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,使用 Tukey 多重比较作为事后检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

细胞活力 与对照组(1.01 \pm 0.02)比较,LPS 组细胞活力(0.32 \pm 0.15)明显降低($P<0.05$)。与 LPS 组比较,D 组细胞活力(0.98 \pm 0.11)明显升高($P<0.05$)(图 1)。

IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达量 与对照组比较,LPS 组中的 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达量明显升高($P<0.05$)。与 LPS 组比较,D 组 IL-1 β 和 TNF- α 表达量 mRNA 明显降低($P<0.05$)(图 2)。

IL-1 β 和 TNF- α 蛋白含量 与对照组比较,LPS 组 IL-1 β 和 TNF- α 上清液含量明显升高($P<0.05$)。与 LPS 组比较,D 组 IL-1 β 和 TNF- α 蛋白含量明显降低($P<0.05$)(图 3)。

c-Fos、caspase-1 和 NLRP3 蛋白相对含量 与对照组比较,LPS 组中的 c-Fos、caspase-1、NLRP3 蛋白相对表达明显升高($P<0.05$)。与 LPS 组比较,D 组 c-Fos、caspase-1、NLRP3 蛋白相对表达明显降低($P<0.05$)(图 4)。

c-Fos、caspase-1 和 NLRP3 的 mRNA 表达量 与对照组比较,LPS 组 c-Fos、caspase-1 和 NLRP3 mRNA 表达量明显升高($P<0.05$)。与 LPS 组比较,D 组 c-Fos、caspase-1、NLRP3 mRNA 表达量明显降低($P<0.05$)(图 5)。

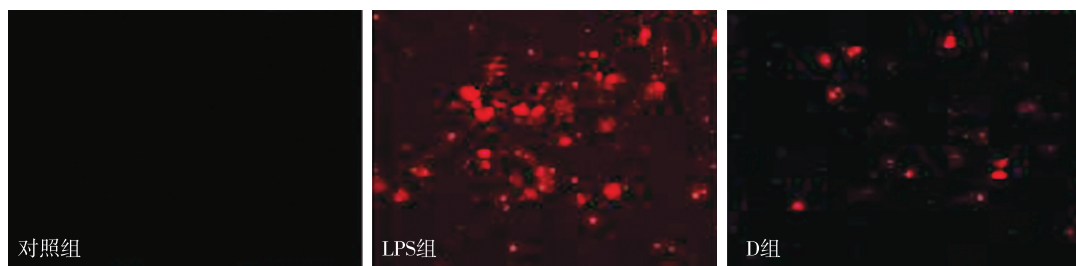
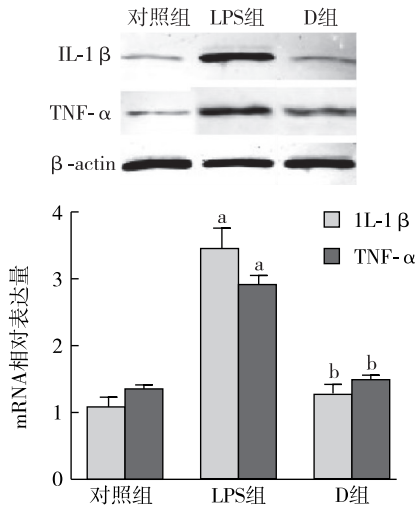
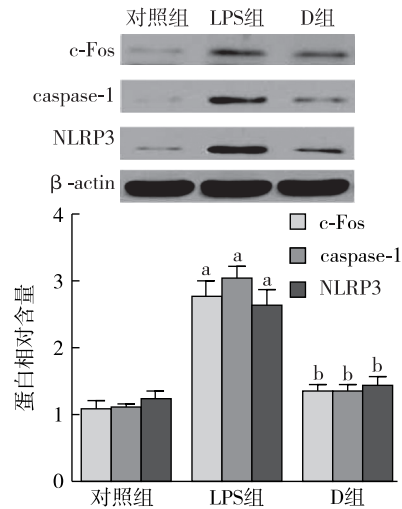


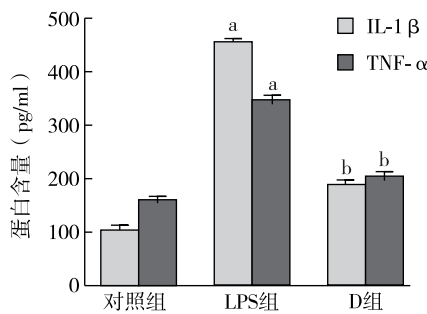
图 1 三组小胶质原代培养细胞凋亡电镜图



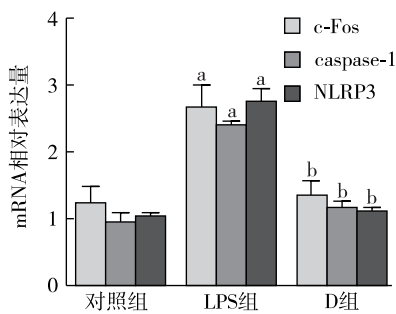
注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与LPS组比较,^b $P < 0.05$
图 2 三组小胶质细胞 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 相对表达量的比较



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与LPS组比较,^b $P < 0.05$
图 5 三组相关因子蛋白相对含量的比较



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与LPS组比较,^b $P < 0.05$
图 3 三组小胶质细胞上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 含量的比较



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与LPS组比较,^b $P < 0.05$
图 4 三组相关因子 mRNA 表达量的比较

讨 论

NLRP3 在小胶质细胞中炎性体介导的神经炎症的起始中起重要作用^[8]。NLR 促进称为炎性体大型多蛋白复合物的组装,并引发前 caspase-1 裂解

成其活性和成熟形式的 caspase-1^[9]。IL-1 β 可被胱天蛋白酶-1 切割成其成熟和活性形式^[10]。我们发现右美托咪定有效促进 LPS 诱导的神经炎症和疾病行为的恢复。右美托咪定处理抑制 LPS 诱导的小胶质细胞激活。通过右美托咪定处理减少 LPS 诱导的炎性细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 表达。右美托咪定还影响 LPS 炎症中的凋亡相关蛋白 caspase-1。右美托咪定通过减少细胞因子 TNF- α 和 MCP-1 的产生来保护脓毒症急性肾损伤^[11]。在本研究中,右美托咪定减少细胞因子的产生并改善 LPS 处理小胶质细胞原代培养细胞的炎症反应。来自小胶质细胞的炎症介质如 TNF- α 、IL-1 β 和 caspase-1 参与神经变性和神经细胞死亡。来自活化的小胶质细胞的衍生的 TNF- α 通过 Bcl-2 家族蛋白 Bax 诱导神经前体细胞凋亡。慢性小胶质细胞增生在神经退行性疾病(如帕金森病)中发现的神经炎症过程中起着重要作用^[12]。活化的小胶质细胞通过释放促炎细胞因子, TNF- α 和 IL-1 β 介导神经细胞炎症并促进神经毒性。右美托咪定是一种中枢选择性 α_2 肾上腺素能受体激动剂,作为抗焦虑药,镇静剂和镇痛药表现良好^[13]。右美托咪定通过小胶质细胞和星形胶质细胞直接或间接作用于神经元,发挥其神经保护作用^[14]。它具有抗氧化,抗炎和抗凋亡作用,并已被证明可以减轻衰老大鼠中异氟醚引起的认知功能障碍。LPS 是一种从革兰氏阴性细菌中分离出来的内毒素,可以诱导炎症反应,淀粉样蛋白形成和神经元损伤,从而加速神经退行性疾病的进展。LPS 已被广泛用于进行小胶质细胞激活的实验

模型。施用于脑中的 LPS 诱导小胶质细胞活化,并导致 A β 在大脑皮层和海马中的积累^[15]。LPS 增加淀粉样蛋白前体蛋白表达,增强 β -分泌酶和 γ -分泌酶活性,促进淀粉样蛋白生成。

LPS 和刺激已显示激活 NLRP3/caspase-1 级联反应,从而增加巨噬细胞中 IL-1 β 和 IL-18 的产生。暴露于 LPS 还增加人小胶质细胞 NLRP3 和胱天蛋白酶-1 表达。然而用 DEX 治疗消除了 NLRP3 和胱天蛋白酶-1 表达的增加。以前的报道表明,DEX 对 LPS 诱导的炎症反应的影响与 NF- κ B 的抑制有关^[1]。已经认识到 LPS 与 Toll 样受体相互作用并随后激活 NF- κ B。NF- κ B 调节大多数炎性因子的表达,例如 IL-1 β 和 IL-18。但是,最初产生的 IL-1 β 和 IL-18 被灭活并依赖于 NLRP3/caspase-1 级联的进一步加工来进行成熟。

综上所述,小胶质细胞原代培养系中右美托咪定可以抑制 NLRP3/caspase-1 级联反应,降低 LPS 诱导的炎症反应。

参 考 文 献

- [1] Li H, Zhang X, Chen M, et al. Dexmedetomidine inhibits inflammation in microglia cells under stimulation of LPS and ATP by c-Fos/NLRP3/caspase-1 cascades. *EXCLI J*, 2018, 17: 302-311.
- [2] Kong W, Kang K, Gao Y, et al. Dexmedetomidine alleviates LPS-induced septic cardiomyopathy via the cholinergic anti-inflammatory pathway in mice. *Am J Transl Res*, 2017, 9(11): 5040-5047.
- [3] Yin X, Zhou L, Han F, et al. Beta-adrenoceptor activation by norepinephrine enhances lipopolysaccharide-induced matrix metalloproteinase-9 expression through the ERK/JNK-c-Fos pathway in human THP-1 cells. *J Atherosclero Thrombo*, 2017, 24(1): 55-67.
- [4] Pokhrel NK, Kim YG, Kim JY, et al. Fluvastatin inhibits osteoclast differentiation and P. gingivalis lipopolysaccharide-Induced alveolar bone erosion in mice. *J Periodontol*, 2017, 88(4): 1-14.
- [5] Chen X, Li L, Hu J, et al. Anti-inflammatory effect of dexmedetomidine combined with hypothermia on acute respiratory distress syndrome in rats. *J Surg Res*, 2017, 216: 179-184.
- [6] Yi YS, Kim MY, Cho JY. JS-III-49, a hydroquinone derivative, exerts anti-inflammatory activity by targeting Akt and p38. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2017, 21(3): 345-352.
- [7] Li Z, Chao C, Zhu X, et al. Glycyrrhizin Suppresses RANKL-Induced osteoclastogenesis and oxidative stress through inhibiting NF- κ B and MAPK and activating AMPK/Nrf2. *Calcif Tissue Int*, 2018(12): 1-14.
- [8] Cao J, Lu Q, Liu N, et al. Sciadopitysin suppresses RANKL-mediated osteoclastogenesis and prevents bone loss in LPS-treated mice. *Int Immunopharmacol*, 2017, 49: 109-117.
- [9] Villéga F, Delpech JC, Griton M, et al. Circulating bacterial lipopolysaccharide-induced inflammation reduces flow in brain-irrigating arteries independently from cerebrovascular prostaglandin production. *Neuroscience*, 2017, 346: 160-172.
- [10] Khurmi N, Patel P, Kraus M, et al. Pharmacologic considerations for pediatric sedation and anesthesia outside the operating room: a review for anesthesia and non-Anesthesia Providers. *Paediatr Drugs*, 2017, 19(5): 435-446.
- [11] Li X, Chen CJ, Tan F, et al. Effect of dexmedetomidine for attenuation of propofol injection pain in electroconvulsive therapy: a randomized controlled study. *J Anesth*, 2018, 32(1): 70-76.
- [12] Kurhekar P, Vinod K, Rajarathinam B, et al. Randomized comparison between dexmedetomidine and midazolam for prevention of emergence agitation after nasal surgeries. *Saudi J Anaesth*, 2018, 12(1): 61-66.
- [13] Cappuccio E, Thung AK, Tobias JD. General anesthesia with dexmedetomidine and remifentanyl in a neonate during oracotomy and resection of a congenital cystic adenomatoid malformation. *J Pediatr Pharmacol Ther*, 2018, 23(3): 215-218.
- [14] Gupta N, Kumar A, Jain A, et al. A randomized controlled trial to compare the efficacy of intravenous dexmedetomidine and clonidine as adjuvants to low dose opioid in attenuation of hemodynamic response to laryngoscopy and tracheal Intubation. *Myensingh Med J*, 2018, 27(2): 389-396.
- [15] Singh S, Chouhan RS, Bindra A, et al. Comparison of effect of dexmedetomidine and lidocaine on intracranial and systemic hemodynamic response to chest physiotherapy and tracheal suctioning in patients with severe traumatic brain injury. *J Anesth*, 2018, 32: 1-6.

(收稿日期:2018-08-06)