

ATP/P2X7 轴介导的 K⁺ 外排 促进 NDV 感染的 ECA109 细胞中 NLRP3 炎性小体激活

曹旭,武彩霞,兰金苹,王静,贾朝霞,刘浩,刘开扬

摘要 目的 探究新城疫病毒(NDV)感染食管癌 ECA109 细胞后,NLRP3 炎性小体是否激活、其激活是否与 K⁺ 外排有关及 ATP/P2X7 轴对 NLRP3 炎性小体激活的影响。**方法**

Western blot 检测 NLRP3 和 IL-1 β 表达情况;ELISA 检测上清液中 IL-1 β 含量;荧光免疫技术检测 ASC 斑点的形成情况;荧光探针技术检测细胞内 K⁺ 浓度变化;使用 ATP 酶、ATP 及 P2X7 受体抑制剂进行干预,研究其在 NLRP3 炎性小体激活中的作用。**结果** 与 control 组比较,NDV F3 感染细胞后,细胞内 NLRP3、IL-1 β 和 ASC 蛋白表达上调;胞内钾离子浓度随感染时间延长而降低($P < 0.05$)。P2X7 受体抑制剂干预后,胞内 K⁺ 外流受阻,随抑制剂浓度的增加,K⁺ 外流在 10 mol/L 处受最大抑制($P < 0.05$)。ATP 酶及 ATP 干预结果显示,ATP 酶抑制 K⁺ 外流,ATP 促进 K⁺ 外流。Western blot 结果显示,与 control 组比较,抑制 P2X7 受体,NLRP3 和 IL-1 β 蛋白表达下调;ATP 酶干预细胞后,NLRP3 和 IL-1 β 表达降低;ATP 干预细胞后,NLRP3、IL-1 β 蛋白表达上调($P < 0.05$)。**结论** NDV F3 感染 ECA109 细胞能激活 NLRP3 炎性小体,其机制可能与 ATP/P2X7 轴有关。

关键词 新城疫病毒;ATP;P2X7;K⁺;NLRP3 炎性小体;ECA109 细胞

中图分类号 R 737.33

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)01-0042-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.01.008

新城疫病毒(newcastle disease virus,NDV)是家禽传染性疾病新城疫(newcastle disease,ND)的病原体^[1]。NDV 是一种单股负链 RNA 病毒,感染人肿瘤细胞后能选择性杀伤肿瘤细胞,而对正常细胞几乎不产生作用^[2-3]。有文献^[4-5]报道,NDV 感染的某些肿瘤细胞中,存在 NLRP3 炎性小体的激活,以及 IL-1 β 等炎性细胞因子的分泌,参与机体的抗肿

瘤免疫。已知 NLRP3 炎性小体的激活由两种信号介导:①由 TLR-NF- κ B 通路上调包含 NLRP3、IL-1 β 和 IL-18 在内的物质的转录;②由 ATP、尼日利亚菌素、细菌孔隙毒素和晶体及颗粒诱导发生^[6-7]。另有报道^[8]称,P2X7 受体(P2X7 receptor,P2X7R)作为一种由细胞外 ATP 直接激活的质膜通道对 NLRP3 炎性小体的激活至关重要。当 P2X7R 与 ATP 结合后,会促使细胞膜上临近的双向整流钾通道打开并诱导 K⁺ 外排,此条件成为激活 NLRP3 炎性小体的关键触发因素^[9]。然而,这种调节机制在 NDV 感染的 ECA109 细胞激活 NLRP3 炎性小体中尚不清楚,因此该研究利用食管癌细胞 ECA109 为研究对象,分析 NDV 活化 NLRP3 炎性小体的作用,探讨这种作用是否依赖于 ATP/P2X7。

1 材料与方法

1.1 主要材料 食管癌 ECA109 细胞及 NDV F3 株由河北北方学院生命科学研究 P2 实验室保存。RPMI1640 基础培养基购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自上海 ExCellBio 公司;Matrigel 胶购自美国 BD 公司;anti-NLRP3、anti-P2X7、anti-IL-1 β 、anti-PYCARD 购自美国 Affinity 公司;GAPDH 抗体购自武汉 ABclonal 公司;辣根过氧化物酶标记的二抗购自北京博奥森公司;Alexa Fluor™ 488 标记的荧光二抗购自美国 invitrogen 公司;考马斯亮蓝-R250 购自北京索莱宝科技有限公司;A-740003 和三磷酸腺苷双磷酸酶购自美国 sigma 公司;PBFI-AM 购自上海懋康生物公司。

1.2 方法

1.2.1 食管癌 ECA109 细胞培养 用含 10% 胎牛血清和 1% 双抗(青霉素和链霉素)的 RPMI1640 培养基在 37℃、体积分数 5% CO₂、饱和温度条件下常规培养,取处于对数生长期的细胞进行实验。NDV F3 原液复感染指数(multiplicity of infection,MOI)值为 100,用 RPMI-1640 无血清培养基稀释 NDV F3 使 MOI=0.1。

1.2.2 实验分组 首先使用 NDV F3 感染 ECA109

2022-09-31 接收

基金项目:河北省自然科学基金(编号:H2018405044);河北北方学院省属高校基本科研业务费青年基金(编号:301010300105219);张家口市重点研发计划项目(编号:1921013D)

作者单位:河北北方学院生命科学研究 P2 实验室,张家口 075000

作者简介:曹旭,女,硕士研究生;

刘开扬,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: kaiyang1999@126.com

细胞,分为3组:control组、NDV F3感染6 h和12 h组,检测细胞内NLRP3、ASC和IL-1 β 的蛋白表达;细胞上清液中IL-1 β 的分泌量;细胞内K⁺浓度变化。接下来使用ATP和P2X7R抑制剂A-740003分别干预NDV感染的ECA109细胞,ATP干预分为5组:control组(NDV F3单独处理组)、NDV F3 + ATP处理组、NDV F3 + 10 mol/L ATP酶处理组,其中ATP浓度分别为1、3、5 mmol/L。A-740003干预分为4组:control组(NDV F3单独处理组)、NDV F3 + A-740003处理组,其中A-740003浓度分别为1、10、100 mol/L。对ATP和P2X7R干预的细胞检测K⁺浓度变化;NLRP3和IL-1 β 的蛋白表达。

1.2.3 Western blot 检测细胞内 NLRP3 和 IL-1 β 的表达 收集细胞并提取蛋白。十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后转膜;5%脱脂奶粉室温封闭1 h;一抗4℃孵育过夜;二抗在室温孵育2 h。GAPDH作为内参。DAB显色液显色,Al600上机检测条带,用Image J分析并计算灰度值。

1.2.4 荧光免疫技术检测 ASC 斑点形成 取对数生长期的细胞,胰酶消化后制成细胞悬液,接种于24孔板爬片,置于CO₂培养箱中培养,待细胞生长融合至50%左右,加入NDV F3感染不同时间。随后用4%多聚甲醛固定15 min,PBS洗3次,每次5 min;加入0.5% Triton X-100室温通透20 min,PBS洗3次,每次5 min;加5% BSA封闭液,室温封闭1 h后,PBS洗3次,每次5 min;加入一抗稀释液稀释的一抗后,放置4℃冰箱过夜。根据一抗加入相应稀释好的荧光二抗,后续操作需避光处理,室温孵育1~2 h。吸掉多余的二抗稀释液,PBS洗3次,每次5 min;加入DAPI染液染10 min,PBS洗3次,每次5 min;取载玻片,滴加抗荧光淬灭封片剂封片,荧光显微镜摄片。

1.2.5 ELISA 测定 IL-1 β 的分泌 细胞接种于12孔板,待细胞长至80%左右,收集培养液于无菌管中,2 500 r/min离心20 min,收集细胞上清液。根据ELISA检测试剂盒说明要求设置标准品孔和样本孔和空白孔。每个孔做3个重复。随后按试剂说明进行试剂加样。测定时,以空白孔调零,450 nm波长测定各孔吸光度。以标准品测出的吸光度做标准曲线,算出各样本IL-1 β 的浓度值。

1.2.6 荧光探针技术检测胞内 K⁺ 浓度 取对数生长期的细胞进行胰酶消化处理,随后调整细胞浓度为1×10⁴个/ml,将其接种于黑色透明底的96孔板中培养,每孔200 μ l。待细胞生长至密度为70%

~80%左右,96孔板内每孔200 μ l,设3个重复。感染后丢弃细胞培养液,使用无菌PBS反复冲洗3次,加入无血清培养基稀释的K⁺探针试剂PBF1-AM(浓度为6 mol/L),至培养箱中避光加载1.5 h,随后弃掉含有探针的培养基,换PBS反复清洗3次,加入无血清无探针的培养基于CO₂培养箱避光加载40 min,最后使用SpectraMax M5/M5e多功能酶标仪分别检测340、380 nm处的值,两波长处的比值即为胞内K⁺浓度。

1.3 统计学处理 使用SPSS 23.0软件对实验数据进行分析处理,正态分布资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有实验均独立重复进行3次。

2 结果

2.1 NDV F3 感染 ECA109 细胞 NLRP3、IL-1 β 、ASC 表达上调 Western blot结果显示,与control组比较,感染NDV F3的ECA109细胞,NLRP3和IL-1 β 的蛋白表达上调($P < 0.05$)。见表1。荧光免疫技术检测NDV F3感染ECA109细胞ASC聚合物的形成情况,随着病毒感染时间的延长,ASC表达升高,ASC聚合物形成加快($P < 0.05$)。对于细胞因子IL-1 β ,ELISA法测定结果与Western blot法检测结果一致,差异均有统计学意义。见图1。表明NDV F3感染ECA109细胞后激活NLRP3炎性小体。

表1 各组细胞中NLRP3和IL-1 β 表达水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	NLRP3	IL-1 β
control	0.59 $\pm$ 0.04	0.74 $\pm$ 0.05
NDV F3 6 h	0.96 $\pm$ 0.03 *	0.87 $\pm$ 0.06 *
NDV F3 12 h	1.31 $\pm$ 0.04 **	1.32 $\pm$ 0.03 **
F 值	204.167	105.187
P 值	<0.001	<0.001

与control组比较: * $P < 0.05$; 与NDV F3 6 h组比较: ** $P < 0.05$

2.2 NDV F3 感染 ECA109 细胞后促使 K⁺ 外排 与control组比较,NDV F3感染细胞后,胞内K⁺浓度随感染时间的增加而降低($P < 0.05$),见图2。表明NDV F3感染ECA109细胞后促进胞内K⁺外流。

2.3 NDV F3 感染 ECA109 细胞通过 ATP/P2X7 轴影响胞内 K⁺ 浓度 与control组比较,NDV F3单独处理组胞内K⁺浓度降低($P < 0.05$);而NDV F3 + 10 mol/L A-740003处理组,胞内K⁺浓度差异无统计学意义。与NDV F3单独处理组比较,NDV F3

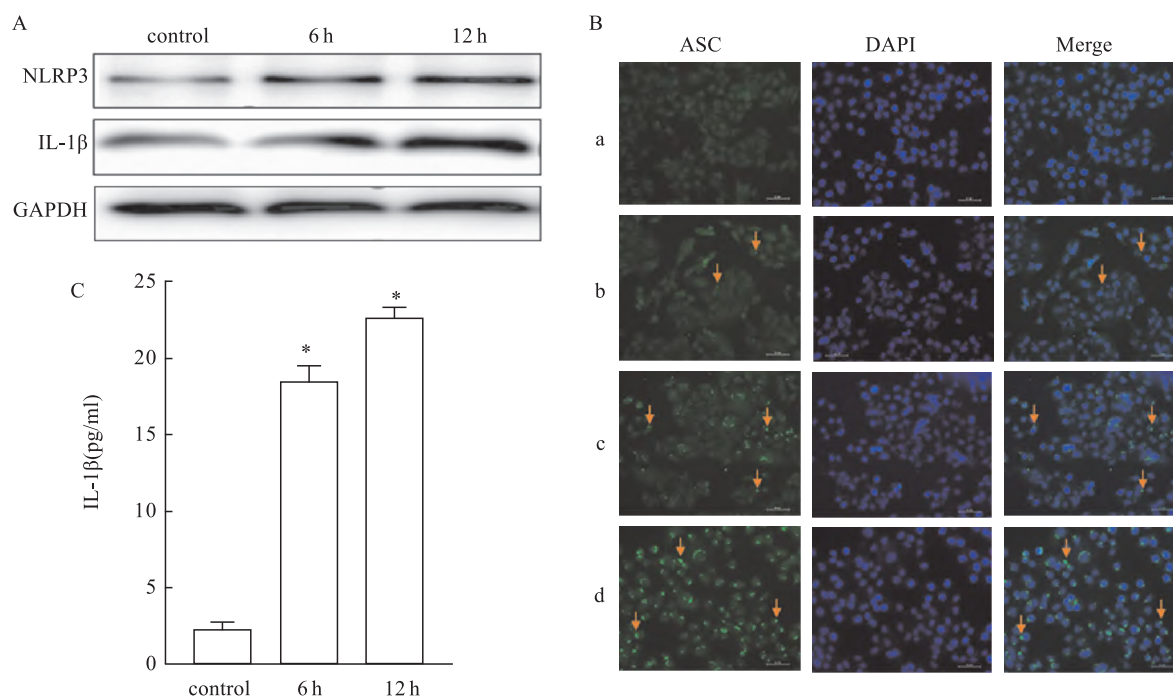


图1 NDV F3 感染 ECA109 细胞 NLRP3、IL-1 β 、ASC 表达上调

A: NDV F3 对 ECA109 细胞 NLRP3、IL-1 β 表达的影响; B: NDV F3 促进 ECA109 细胞中 ASC 聚合物的形成 ASC 聚合物荧光染色 $\times 200$; C: ELISA 法检测细胞上清液中的 IL-1 β 水平; a: control 组; b、c、d: NDV F3 感染 ECA109 细胞 6、12、24 h; 与 control 组比较: * $P < 0.05$

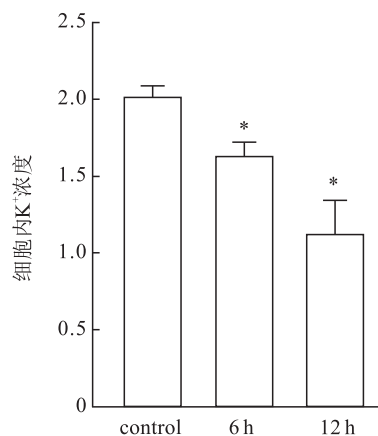


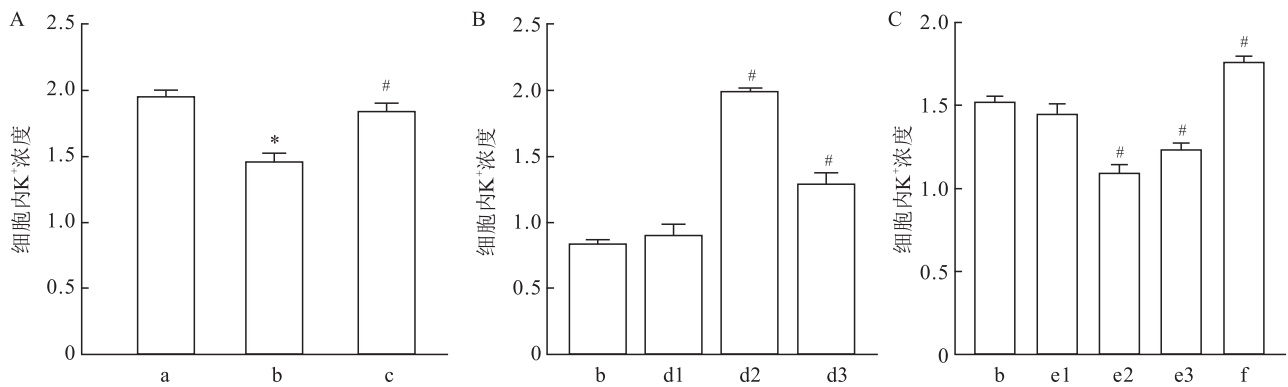
图2 NDV F3 感染 ECA109 细胞对胞内 K⁺ 浓度的影响
与 control 组比较: * $P < 0.05$

+ 10 mol/L A-740003 处理组的细胞, 胞内 K⁺ 浓度升高 ($P < 0.05$), 见图 3A。图 3B 显示, 与 control 组比较, 除 A-740003 浓度为 1 mol/L 时, 差异无统计学意义, 其他两组胞内 K⁺ 浓度均升高 ($P < 0.05$)。在 10 mol/L 时, 胞内 K⁺ 浓度达峰值。表明 P2X7 受体参与 NDV F3 感染的 ECA109 细胞 K⁺ 外流过程。

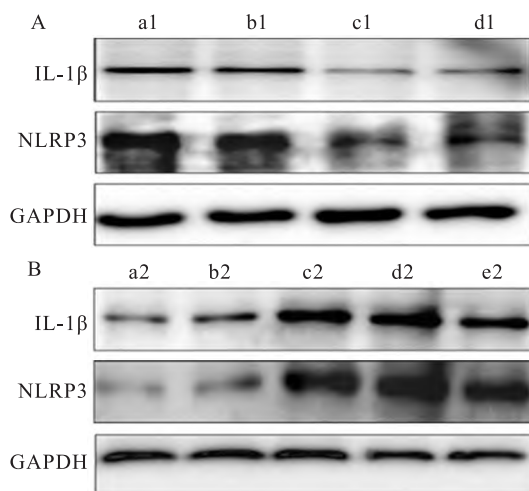
图 3C 显示, 与 control 组比较, NDV F3 + ATP 酶处理组细胞的胞内 K⁺ 浓度升高; 而 NDV F3 + ATP

处理组细胞的胞内 K⁺ 浓度降低 ($P < 0.05$); ATP 浓度为 1 mmol/L 时, K⁺ 浓度虽有所降低, 但差异无统计学意义; ATP 浓度为 3 mmol/L 时, 胞内 K⁺ 浓度达最低值。表明胞外 ATP 参与 NDV F3 感染的 ECA109 细胞 K⁺ 外流过程。

2.4 ATP/P2X7 轴参与 NDV F3 感染的 ECA109 细胞 NLRP3、IL-1 β 的表达 Western blot 结果显示, 与 control 组比较, NDV F3 + A-740003 处理组细胞的 NLRP3 和 IL-1 β 蛋白表达下调; A-740003 浓度为 1 mol/L 时, NLRP3 和 IL-1 β 蛋白表达虽有所下降, 但差异无统计学意义; A-740003 浓度为 10 和 100 mol/L 时, NLRP3 和 IL-1 β 蛋白表达均下降 ($P < 0.05$), 见图 4A、表 2。与 control 组比较, NDV F3 + ATP 处理组细胞的 NLRP3 和 IL-1 β 蛋白表达上调; ATP 浓度为 1 mmol/L 时, NLRP3 和 IL-1 β 蛋白表达虽有所下降, 但差异无统计学意义; ATP 浓度为 3 和 5 mol/L 时, NLRP3 和 IL-1 β 蛋白表达均升高, 其表达峰值在 ATP 浓度为 3 mmol/L; NDV + ATP 酶处理组细胞 NLRP3 和 IL-1 β 表达降低 ($P < 0.05$), 见图 4B、表 3。表明 ATP/P2X7 轴影响 NDV F3 感染的 ECA109 细胞 NLRP3、IL-1 β 的表达。

图3 NDV F3 感染 ECA109 细胞通过 ATP/P2X7 影响 K⁺ 外流

A: P2X7 抑制剂对细胞内 K⁺ 的影响; B: 不同浓度的 P2X7 抑制剂对细胞内 K⁺ 浓度的影响; C: ATP 对细胞内 K⁺ 浓度的影响; a: control 组; b: NDV F3 单独处理组; c: NDV F3 + 10 mol/L A-740003 处理组; d1 ~ d3: NDV F3 + A-740003 处理组, A-740003 浓度分别为 1、10、100 mol/L; e1 ~ e3: NDV F3 + ATP 处理组, ATP 浓度分别为 1、3、5 mmol/L; f: NDV F3 + 10 mol/L ATP 酶处理组; 与 control 组比较: * $P < 0.05$; 与 NDV F3 单独处理组比较: # $P < 0.05$

图4 ATP 及 P2X7 对 NDV F3 感染的 ECA109 细胞 NLRP3 和 IL-1 β 表达的影响

A: 抑制 P2X7 受体可阻碍 NLRP3 和 IL-1 β 表达; B: ATP 使 NDV F3 感染的细胞 NLRP3 和 IL-1 β 表达上调; a1: control 组 (NDV F3 单独处理组); b1 ~ d1: NDV F3 + A-740003 处理组, A-740003 浓度分别为 1、10、100 mol/L; a2: NDV F3 + 10 mol/L ATP 酶处理组; b2: control 组 (NDV F3 单独处理组); c2 ~ e2: NDV F3 + ATP 处理组, ATP 浓度分别为 1、3、5 mmol/L

表2 各组细胞中 NLRP3 和 IL-1 β 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	NLRP3	IL-1 β
control (NDV F3)	1.00 $\pm$ 0.04	0.80 $\pm$ 0.02
NDV F3 + 1 mol/L A-74000-3	0.96 $\pm$ 0.03	0.75 $\pm$ 0.03
NDV F3 + 10 mol/L A-74000-3	0.44 $\pm$ 0.02 *	0.27 $\pm$ 0.07 *
NDV F3 + 100 mol/L A-74000-3	0.73 $\pm$ 0.05 *	0.58 $\pm$ 0.04 *
F 值	119.440	71.759
P 值	<0.001	<0.001

与 control 组比较: * $P < 0.05$

表3 各组细胞中 NLRP3 和 IL-1 β 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	NLRP3	IL-1 β
control (NDV F3)	1.00 $\pm$ 0.02	1.03 $\pm$ 0.05
NDV F3 + 1 mmol/L ATP	1.07 $\pm$ 0.04	1.09 $\pm$ 0.08
NDV F3 + 3 mmol/L ATP	1.65 $\pm$ 0.05 *	1.82 $\pm$ 0.04 *
NDV F3 + 5 mmol/L ATP	1.35 $\pm$ 0.01 *	1.32 $\pm$ 0.05 *
NDV F3 + 10 mol/L ATP 酶	0.44 $\pm$ 0.03 *	0.32 $\pm$ 0.01 *
F 值	388.997	277.474
P 值	<0.001	<0.001

与 control 组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

NLRP3 炎性小体由 NLRP3 蛋白、凋亡相关斑点样蛋白 (ASC) 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1 (caspase-1) 组成^[10]。细胞静息状态时, NLRP3 炎性小体的各组分处于极低水平且未被激活, 当宿主受到刺激 (内源性刺激或外源性刺激) 后, NLRP3 炎性小体各组分通过相关信号通路上调其表达量, 随后组装激活。NLRP3 炎性小体活化后能促使细胞释放 IL-1 β 等炎性因子^[11]。本研究中 NDV 感染 ECA109 细胞后, 通过 Western blot 检测 NLRP3、ASC 和 IL-1 β 的蛋白表达, 结果显示 NDV F3 感染的 ECA109 细胞中, NLRP3、ASC 和 IL-1 β 的表达上调。由此证实 NDV F3 感染 ECA109 细胞后, 能够活化 NLRP3 炎性小体。

众所周知, K⁺ 外排是激活 NLRP3 炎性小体的必要条件^[12]。本研究中, 通过对 NDV F3 感染的 ECA109 细胞 K⁺ 浓度进行检测, 结果显示, 感染 NDV F3 的细胞, 胞内 K⁺ 浓度降低, 且随着感染时间的延长逐渐降低。NDV F3 感染细胞 12 h 时, NL-

RP3、ASC 和 IL-1 β 蛋白表达较 6 h 继续上调,而胞内 K⁺ 浓度较 6 h 继续下降,表明 NDV 活化 NLRP3 炎性小体的作用与胞内低 K⁺ 环境有关。

而引起细胞内低 K⁺ 的机制,有文献^[13] 报道称,依赖 ATP/P2X7 开放钾离子通道,导致钾离子外流增加。当 ATP 与 P2X7 受体结合后,阳离子选择性通道能在几毫秒内迅速打开,该孔道允许分子量达 900 ku 的分子通过,继而导致 K⁺ 外流。P2X7R 在不同细胞类型中均有表达^[14]。本实验通过对胞外 ATP 的浓度以及 P2X7R 进行干预,继而观察 K⁺ 外排的情况以及对 NLRP3 炎性小体的影响。结果显示,增加胞外 ATP 浓度,胞内 K⁺ 浓度降低,使用 3 mmol/L ATP 干预 NDV F3 感染的细胞,显示胞内 K⁺ 浓度降幅最大。表明胞外 ATP 浓度变化影响 K⁺ 外排。使用 P2X7R 抑制剂 A-74000-3 干预 NDV F3 感染的细胞,结果显示抑制 P2X7R 能阻碍胞内 K⁺ 外流。表明 ATP/P2X7 在 NDV 感染的 ECA109 细胞 K⁺ 外流过程中发挥了关键作用。通过 Western blot 检测 ATP、A-74000-3 干预 NDV F3 感染的 ECA109 细胞 NLRP3 和 IL-1 β 蛋白的表达,结果显示增加 ATP 浓度,NLRP3 和 IL-1 β 蛋白表达上调,而 P2X7R 受抑制后 NLRP3 和 IL-1 β 蛋白表达下调。表明 NDV F3 活化 NLRP3 炎性小体与 ATP/P2X7 信号通路有关。

综上所述,NDV F3 感染 ECA109 细胞后能激活 NLRP3 炎性小体,而 NLRP3 炎性小体活化与胞内低 K⁺ 环境有关。同时本实验也证实了引起细胞内低 K⁺ 的机制为依赖 ATP/P2X7 而开放钾离子通道,导致钾离子外流增加。

参考文献

- [1] Xu L, Qin Z, Qiao L, et al. Characterization of thermostable Newcastle disease virus recombinants expressing the hemagglutinin of H5N1 avian influenza virus as bivalent vaccine candidates[J]. *Vaccine*, 2020, 38(7): 1690–9.
- [2] Burman B, Pesci G, Zamarin D. Newcastle disease virus at the forefront of cancer immunotherapy[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(12): 3552.
- [3] 庞敏红, 卢志红, 刘开扬. 新城疫病毒特异性杀伤肿瘤细胞的机制[J]. *山东医药*, 2014, 54(13): 85–7.
- [4] Liu Y, Zhang Y, Cheng R, et al. Radiomics analysis of apparent diffusion coefficient in cervical cancer: A preliminary study on histological grade evaluation[J]. *J Magn Reson Imaging*, 2019, 49(1): 280–90.
- [5] Briard B, Fontaine T, Samir P, et al. Galactosaminogalactan activates the inflammasome to provide host protection[J]. *Nature*, 2020, 588(7839): 688–92.
- [6] Li Q, Tan Y, Chen S, et al. Irisin alleviates LPS-induced liver injury and inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome and NF- κ B signaling[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2021, 41(3): 294–303.
- [7] Abd El-Twab S M, Hussein O E, Hozayen W G, et al. Chicoric acid prevents methotrexate-induced kidney injury by suppressing NF- κ B/NLRP3 inflammasome activation and up-regulating Nrf2/ARE/HO-1 signaling[J]. *Inflamm Res*, 2019, 68(6): 511–23.
- [8] Wu D, Zhong P, Wang J, et al. Exogenous hydrogen sulfide mitigates LPS + ATP-induced inflammation by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and promoting autophagy in L02 cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 457(1–2): 145–56.
- [9] Graziano F, Vicenzi E, Poli G. The ATP/P2X7 axis in human immunodeficiency virus infection of macrophages[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2019, 47: 46–52.
- [10] Yang S R, Hua K F, Chu L J, et al. Xenon blunts NF- κ B/NLRP3 inflammasome activation and improves acute onset of accelerated and severe lupus nephritis in mice[J]. *Kidney Int*, 2020, 98(2): 378–90.
- [11] Yang Z, Liang C, Wang T, et al. NLRP3 inflammasome activation promotes the development of allergic rhinitis via epithelium pyroptosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 522(1): 61–7.
- [12] Negash A A, Ramos H J, Crochet N, et al. IL-1 β production through the NLRP3 inflammasome by hepatic macrophages links hepatitis C virus infection with liver inflammation and disease[J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(4): e1003330.
- [13] Rossato M, Di Vincenzo A, Pagano C, et al. The P2X7 receptor and NLRP3 axis in non-alcoholic fatty liver disease: A brief review[J]. *Cells*, 2020, 9(4): 1047.
- [14] Silva P A R, Lima D S, Luiz J, et al. Inflammatory effect of Bothropstoxin-I from the Bothrops jararacussu venom mediated by NLRP3 inflammasome involves ATP and P2X7 receptor[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2021, 135(5): 687–701.

The ATP/P2X7 axis-mediated K⁺ efflux promotes NLRP3 inflammasome activation in NDV-infected ECA109 cells

Cao Xu, Wu Caixia, Lan Jinping, Wang Jing, Jia Zhaoxia, Liu Hao, Liu Kaiyang
(Life Science Research Center of Hebei North University, Zhangjiakou 075000)

Abstract Objective To explore whether the NLRP3 inflammasome is activated after Newcastle disease virus

网络出版时间:2022-12-26 17:05:58 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail//34.1065.R.20221226.1522.009.html

低氧下沉默 HLA-G 对 JEG-3 细胞、EPAS1 表达及其生物学行为的影响

孙春蕾^{1,2*}, 杨娟^{2*}, 谢莹莹^{1,2}, 许文宇^{1,2}, 雷娟^{1,2}, 刘朵朵^{1,2}

摘要 目的 探讨在低氧条件下,沉默绒毛膜滋养细胞系 JEG-3 细胞的人类白细胞相关抗原-G (HLA-G) 表达对 JEG-3 细胞生物学功能的影响和通过内皮 PAS1 区域蛋白 1 (EPAS1) 低氧反应通路参与高原低氧条件下子痫前期发病的分子机制。方法 通过转染小干扰 RNA (siRNA) 抑制 JEG-3 细胞中 HLA-G 的表达,将转染后的 JEG-3 细胞分为 4 组:常氧对照组、低氧对照组、常氧抑制组、低氧抑制组。采用 CCK-8 实验及体外侵袭实验法检测 4 组细胞的增殖及侵袭能力;用流式细胞术检测 4 组细胞凋亡和细胞周期的影响;通过 qPCR 技术及 Western blot 法检测 4 组细胞中 HLA-G 和 EPAS1 mRNA 及蛋白的表达水平。结果 ①与常氧对照组相比,低氧对照组及常氧、低氧抑制组均可使 JEG-3 细胞的增殖活性、侵袭能力降低,使得细胞凋亡率显著升高,低

氧对照组与低氧抑制组产生了明显的坏死细胞群。低氧条件下,降低 HLA-G 的表达会提高细胞坏死率。无论在常氧还是低氧下,抑制 HLA-G 表达均使细胞被阻滞在 G1 期。②与常氧对照组相比,低氧对照组及常氧、低氧抑制组均降低 HLA-G 蛋白表达,且低氧和抑制 HLA-G 蛋白表达二者有协同作用,均可增加缺氧诱导因子-2 α (HIF-2 α)、血管内皮生长因子 (VEGF) 及内皮素-1 (ET-1) 蛋白表达,抑制 HLA-G 则降低诱导型一氧化氮合成酶 (NOS2) 的表达。结论 低氧环境下,沉默 HLA-G 可能通过 EPAS1 低氧反应通路影响滋养细胞生物学行为,参与了子痫前期的发生发展。

关键词 子痫前期;低氧;人类白细胞抗原 G;内皮 PAS1 区域蛋白 1;高海拔

中图分类号 R 714.252

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)01-0047-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.01.009

2022-09-25 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81760276)

作者单位:¹ 青海大学研究生院,西宁 810000

² 青海大学附属医院产科,西宁 810000

作者简介:孙春蕾,女,硕士研究生;

谢莹莹,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: xyy09001@163.com

* 对本文具有同等贡献

妊娠期高血压疾病是孕产妇和围产儿死亡的主要原因之一,我国妊娠期高血压疾病的发病率约为 5%~12%,而高原地区的发病率为 24.6%^[1]。青海地区地处青藏高原,有低氧、低压、低湿、寒冷等特

(NDV) exposure to esophageal cancer ECA109 cells, whether its activation is related to K⁺ efflux, and the effect of ATP/P2X7 axis on the activation of NLRP3 inflammasome. **Methods** The expression of NLRP3 and IL-1 β was detected by Western blot; the content of IL-1 β in the supernatant was detected by ELISA; the formation of ASC spots was detected by fluorescence immunoassay; the change of intracellular K⁺ concentration was detected by fluorescent probe technology; Interventions with ATPase, ATP and P2X7 receptor inhibitors were used to investigate their role in NLRP3 inflammasome activation. **Results** Compared with the control group, the expression of NLRP3, IL-1 β and ASC protein in cells was up-regulated after NDV F3 infection; the intracellular potassium concentration decreased with the prolongation of infection time ($P < 0.05$). After the intervention of P2X7 receptor inhibitor, the efflux of intracellular K⁺ was blocked. With the increase of inhibitor concentration, the efflux of K⁺ was maximally inhibited at 10 μ mol/L ($P < 0.05$). The results of ATPase and ATP intervention showed that ATPase inhibited K⁺ efflux, while ATP promoted K⁺ efflux. Western blot results showed that compared with the control group, P2X7 receptor was inhibited, and the expressions of NLRP3 and IL-1 β were down-regulated; after ATPase intervened cells, the expressions of NLRP3 and IL-1 β decreased; After ATP intervention in cells, the protein expressions of NLRP3 and IL-1 β were up-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** NDV F3 infection of ECA109 cells can activate the NLRP3 inflammasome, the mechanism may be related to the ATP/P2X7 axis.

Key words newcastle disease virus; ATP; P2X7; K⁺; NLRP3 inflammasome; ECA109 cells