

半乳糖凝集素-1 对 LTA 诱导巨噬细胞 NLRP3 炎症小体的抑制及机制探讨

陈方方, 王木子, 吕允相, 刘荣玉

摘要 目的 研究半乳糖凝集素-1 (Gal-1) 对金黄色葡萄球菌脂磷壁酸 (LTA) 诱导 Raw264.7 细胞 NLRP3 炎症小体活化的影响及初步机制。方法 采用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色 (MTT) 法检测不同浓度重组小鼠源半乳糖凝集素-1 (rmGal-1) 对细胞活力的影响; 建立 LTA 诱导的小鼠巨噬细胞系 Raw264.7 炎症模型, 分别用 rmGal-1 和 NF- κ B 抑制剂 JSH-23 预处理 Raw264.7 细胞。激光共聚焦显微镜观察细胞内 P-p65 及 NLRP3 的表达; Western blot 法进一步检测细胞中 p65、P-p65、NLRP3、ASC、Caspase-1 和 Pro-Caspase-1 的蛋白表达水平。结果 rmGal-1 浓度 0.04 μ g/ml ~ 0.4 μ g/ml 时对 Raw264.7 细胞活力无明显影响; 在 LTA 刺激的 Raw264.7 巨噬细胞中, 内源性 Gal-1 和 NLRP3 的蛋白表达水平呈时间性依赖增加, 并在 3 h 到达高峰; rmGal-1 预处理后显著抑制 P-p65、NLRP3、ASC 及 Caspase-1 表达。同样地, 作为阳性对照, JSH-23 预处理后, P-p65、NLRP3、ASC 及 Caspase-1 的表达水平显著下调。结论 Gal-1 可能通过 NF- κ B-NLRP3 信号通路抑制 LTA 诱导的巨噬细胞炎症。

关键词 LTA; NLRP3 炎症小体; Gal-1; NF- κ B; 巨噬细胞

中图分类号 R 392.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)12-1870-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.12.007

2019-07-31 接收

基金项目: 安徽省重点实验室计划项目 (编号: 1206c0805028); 国家临床重点专科建设项目 (编号: 卫办医政函[2012]649号)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院老年呼吸内科, 合肥 230022

作者简介: 陈方方, 女, 硕士研究生;

刘荣玉, 女, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: RongyuLiu@163.com

炎症小体是细胞在感染或应激情况参与机体先天免疫防御的一种分子平台, 在协助机体抵御病原体感染和组织损伤中发挥重要作用^[1]。目前已发现的炎症小体主要有 4 种, 即 NLRP1、NLRP3、IPAF 和 AIM2。研究^[1]认为 NLRP3 炎症小体是目前最具有特征的炎症小体, 是由 NLRP3、ASC (PYCARD) 和 Caspase-1 组成。NLRP3 炎症小体通过识别病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) 或者宿主来源的危险信号分子模式 (damage associated molecular patterns, DAMP) 招募和激活促炎症蛋白酶 Caspase-1; 活化的 Caspase-1 切割 IL-1 β 和 IL-18 的前体, 产生相应的成熟细胞因子 IL-1 β 和 IL-18, 诱导炎症发生。因此, 基于 NLRP3 炎症小体的抗炎药物开发及作用机制的研究对于炎症相关疾病的防治具有重要意义。

半乳糖凝集素-1 (galectin-1, Gal-1) 是动物半乳糖凝集素家族中的一员, 可通过识别 β -半乳糖来发挥广泛的抗炎及免疫调节作用^[2], 近年来研究^[3]发现在先天性免疫反应中, Gal-1 通过抑制促炎症细胞因子的合成, 抑制中性粒细胞运输, 靶向抑制嗜酸性粒细胞迁移并促进其凋亡, 抑制肥大细胞脱颗粒, 并且可以通过控制 L-精氨酸的代谢及减少 NO 的产生诱导骨髓巨噬细胞向 M2 型分化, 从而发挥抗炎作用。Gal-1 在巨噬细胞炎症中具有广泛的抗炎作用, 但具体的分子机制仍不明了。因此, 该研究拟通过探讨重组鼠源性半乳糖凝集素-1 (recomblant mouse galectin-1, rmGal-1) 干预对金黄色葡萄球菌脂

that the cell proliferation rate of the TMEM88 overexpressed group (0.71 ± 0.04) significantly lower than that in control group (0.94 ± 0.06) ($F = 21.55$, $P < 0.01$) after 48 hours of transfection. The results of flow cytometry showed that the apoptosis rate of TMEM88 overexpressed cells group (11.52 ± 1.43)% was significantly higher than that in control group (7.78 ± 1.67)% ($F = 10.07$, $P < 0.05$). ELISA results showed that the expressions of IL-6 and TNF- α in RAW264.7 cells transfected with pEGFP-C1-TMEM88 plasmid was higher than that in normal group. **Conclusion** TMEM88 can significantly inhibit the proliferation and promote the apoptosis of RAW264.7 cells. Moreover, TMEM88 promotes the expression of inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α in RAW264.7 cells, laying a foundation for further understanding the function of TMEM88.

Key words pEGFP-C1-TMEM88; RAW264.7; proliferation; apoptosis; interleukin 6; tumor necrosis factor- α

磷壁酸(lipoteichoic acid ,LTA) 刺激 Raw264.7 巨噬细胞炎症反应模型的影响,研究外源性 Gal-1 对 NLRP3 炎症小体活化的调节和相关机制,为进一步了解其药理学机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 小鼠单核巨噬细胞系 Raw264.7 购于上海细胞库。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM 培养基、胎牛血清、小牛血清购于美国 Invitrogen 公司;LTA 购于美国 Sigma 公司;rmGal-1 试剂购于北京 sino biological 公司;P-p65、p65 和 NLRP3 单克隆抗体购于美国 Cell Signaling 公司;ASC、Galectin-1、Caspase-1 单克隆抗体购于美国 Santa Cruz Biotechnology 公司;JSH-23 (NF- κ B) 购于美国 MedChemExpress 公司;辣根过氧化物酶(HRP) 标记的 GAPDH 一抗购于四川康城公司;HRP 标记的羊抗兔和兔抗鼠二抗购于美国 Santa Cruz Biotechnology 公司;细胞培养箱购于美国 Thermo 公司;细胞培养板购于美国 Corning 公司;LSM510 激光共聚焦显微镜购于德国 ZEISS 公司;蛋白电泳转移系统购于美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Raw264.7 细胞用含 5% 胎牛血清、5% 小牛血清、100 U/L 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内,观察细胞整体情况 1~2 d 根据细胞数目、形态及培养基颜色进行细胞换液,当细胞汇合度达到 90% 时,用胰蛋白酶消化传代培养,取对数生长期细胞进行试验。

1.2.2 四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色 [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] 法检测 rmGal-1 作用下 Raw 264.7 细胞活力 取对数生长期 Raw264.7 细胞,调节细胞悬液的浓度为 5×10^4 个/ml,接种于 96 孔板内(100 μ l/孔),恒温培养箱中孵育 24 h 后,待细胞完全贴壁,分别加入 0、0.04、0.4、4 μ g/ml 的 rmGal-1 (100 μ l/孔) 处理 72 h,每个浓度设 5 个复孔,在终止前 4 h,每孔加 10 μ l MTT,MTT 干预结束后去上清液,再加 100 μ l 二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO),震荡混匀 10 min,用酶标仪在 490 nm 处测定吸光度(optical density, OD) 值,计算细胞存活率 = $(OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{实验对照组}}) / OD_{\text{对照}} \times 100\%$ 。

1.2.3 建立 LTA 刺激巨噬细胞的炎症反应模型

将对数生长期的 Raw264.7 按 1×10^6 /ml 的密度分别接种 12 孔板,培养过夜至 24 h。设置时间梯度 0、1、3、6 h,每组设置 3 个复孔,用 LTA (2.5 μ g/ml) 干预细胞 3 h 后提取细胞蛋白。

1.2.4 rmGal-1 干预 LTA 刺激下的巨噬细胞 同样将对数生长期的 Raw264.7 按 1×10^6 /ml 的密度分别接种 12 孔板中。将实验分为四组;即空白对照组(Control 组)、炎症模型组(LTA 组)、药物对照组(rmGal-1 组)、干预组(LTA + rmGal-1 组)。预先用 rmGal-1 (0.4 μ g/ml) 预处理 72 h,再加入 LTA 共孵育 3 h 后提取细胞蛋白。

1.2.5 JSH-23 干预 LTA 刺激下的巨噬细胞 将对数生长期的 Raw264.7 按 1×10^6 /ml 的密度接种于 12 孔板,培养过夜至 24 h。将实验分为四组:即空白对照组(Control 组)、炎症模型组(LTA 组)、药物对照组(JSH-23 组)、干预组(LTA + JSH-23 组),每组设置 3 个复孔。加入 30 μ mol/mL JSH-23 预处理 1 h 后加入 LTA 共孵育 3 h 后提取细胞蛋白。

1.2.6 激光共聚焦观察 P-p65 及 NLRP3 炎症小体的表达水平 用洗洁精处理过的玻片放入超声仪内超声,再用超纯水冲洗,放在 75% 酒精里浸泡,使用时拿出酒精内的玻片过火灼烧,放入板内,多聚赖氨酸包被过夜,再用 PBS 洗 3 次,放入温箱 3~4 h,玻片烘干。将对数生长期的 Raw264.7 按 1×10^6 /ml 的密度接种于 12 孔板,培养过夜至 24 h,分别加入 rmGal-1 (0.4 μ g/ml) 预处理 72 h 或 JSH-23 预处理 (30 μ mol/ml) 1 h,再加入 LTA 共处理 3 h。4% 多聚甲醛固定 30 min 后,羊血清封闭 30 min,吸弃血清后一抗 37 $^{\circ}$ C 室温孵育 1 h 后 4 $^{\circ}$ C 过夜,加入荧光二抗室温孵育 1 h 后 4,6-联脒-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染核 15 min,甘油封片,透明指甲油固定封片的四角,4 $^{\circ}$ C 冰箱保存用于拍照。激光共聚焦显微镜下取 6 个视野拍照,观察细胞形态及胞内荧光强度。

1.2.7 蛋白提取和 Western blot 法检测相关蛋白表达 收获细胞,提取蛋白后电泳、转膜,5% 脱脂牛奶室温封闭,相应的一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜(稀释比例为 P-p65:1:1 000; p65:1:1 000; NLRP3:1:2 000; ASC:1:200; Caspase-1:1:200; Gal-1:1:100; Pro-Caspase-1:1:500),洗涤后室温孵育 HRP 标记二抗 1 h,最后 ECL 试剂盒中 A 液和 B 液等体积混匀后均匀加至膜上,化学发光成像 ChemiScope 显影,Image J 软件分析条带灰度值。

1.3 统计学处理 所有试验均独立重复 3 次,所有

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。组间均数比较用单因素方差分析后,若方差齐,则用 LSD 检验,否则使用 Tamhane's T2 检验。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 rmGal-1 对 Raw264.7 细胞活力的影响

0、0.04、0.4、4 $\mu\text{g/ml}$ 终浓度的 rmGal-1 与 Raw264.7 细胞共孵育 72 h,MTT 法测得各组细胞活力相对百分比,结果均用 (%) 表示。在 0 $\mu\text{g/ml}$ 时,细胞活力是 (97.23 ± 3.07) ;浓度为 0.04 $\mu\text{g/ml}$ 时,检测细胞活力结果是 (81.76 ± 9.10) ;0.4 $\mu\text{g/ml}$ 浓度梯度时,细胞活力是 (80.89 ± 7.63) ;浓度为 4 $\mu\text{g/ml}$ 时,细胞活力下降到 (20.06 ± 5.26) ;与对照组 (0 $\mu\text{g/ml}$) 相比,rmGal-1 浓度在 0.04 $\mu\text{g/ml}$ 及 0.4 $\mu\text{g/ml}$ 对细胞活力无明显影响,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),而在 4 $\mu\text{g/ml}$ 时显著影响细胞活力 ($F = 112.78, P < 0.01$)。rmGal-1 是一种重组鼠源性蛋白,在不明显影响 Raw264.7 细胞活力的情况下,根据 MTT 法测得的实验结果,选择 0.4 $\mu\text{g/ml}$ 为实验浓度。

2.2 LTA 诱导 Raw264.7 巨噬细胞中 NF- κ B-NLRP3 通路活化并促进内源性 Gal-1 高表达

LTA (2.5 $\mu\text{g/ml}$) 刺激巨噬细胞 1、3、6 h,Western blot 法分析 P-p65、NLRP3、Gal-1 分子的蛋白表达水平。结果显示,LTA 刺激 Raw264.7 巨噬细胞活化 NF- κ B-NLRP3 通路呈时间依赖性。在 LTA 刺激下,随时间延长,内源性 Gal-1 的表达水平显著增高 ($F = 3.56, P < 0.05$),且 P-p65、NLRP3 及 Gal-1 的表达水平在刺激 3 h 后达到高峰 (图 1)。因此,后续实验 LTA 刺激 Raw264.7 的最佳时间为 3 h。

2.3 rmGal-1 和 JSH-23 预处理后对 Raw264.7 巨噬细胞中 NF- κ B 及 NLRP3 炎症小体表达的影响

免疫荧光结果显示,LTA 刺激 Raw264.7 细胞 3 h 后,细胞质内绿色荧光 NLRP3 及 P-p65 表达水平较对照组明显增强 (图 2)。为了进一步验证该结果,该实验采用 Western blot 对细胞内 NLRP3 和 P-p65 蛋白表达水平进行了检测。结果表明:与对照组相比,LTA 组细胞内 NLRP3 及 P-p65 表达水平显著升高,差异具有显著的统计学意义 ($P < 0.01$) (图 3)。此外,用 rmGal-1 预处理 72 h 后,与 LTA 共孵育 3 h,免疫荧光结果显示 LTA 和 rmGal-1 共孵育组绿色荧光 NLRP3 及 P-p65 的表达明显低于 LTA 组 (图 2)。这表明 rmGal-1 抑制了 NLRP3 及 P-p65 在细胞

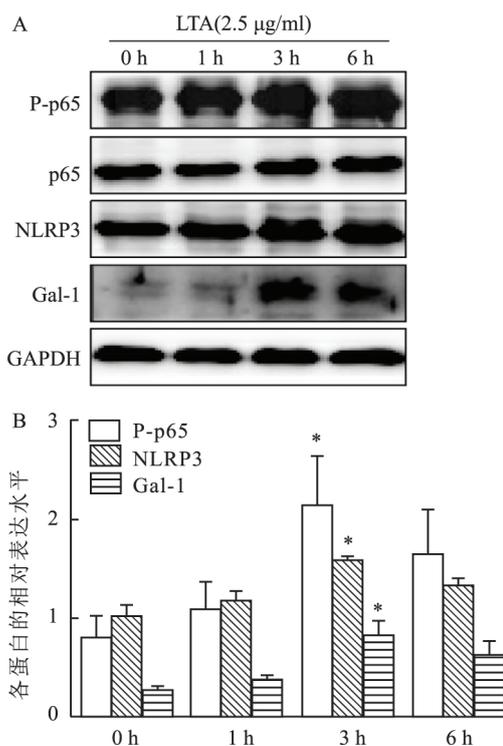


图 1 LTA 刺激 Raw264.7 巨噬细胞后细胞内 P-p65、NLRP3 和 Gal-1 的蛋白表达及蛋白水平的半定量分析

A:各蛋白的蛋白表达;B:各蛋白的蛋白半定量分析;与空白对照组比较:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

内的表达。Western blot 检测结果显示,与 LTA 组相比,LTA + rmGal-1 组细胞内 NLRP3 及 P-p65 的表达水平显著降低。差异具有统计学意义 ($F = 8.37, P < 0.05$ 或 $F = 4.77, P < 0.01$) (图 3)。这进一步证明了 rmGal-1 可以抑制 NLRP3 及 P-p65 在细胞内的表达。与此同时,该实验用 NF- κ B 抑制剂 (JSH-23) 预处理 1 h 后,与 LTA 共孵育 3 h 作为阳性对照,免疫荧光和 Western blot 结果一致,显示与 LTA 组相比,JSH-23 + LTA 组细胞内 NLRP3 及 P-p65 的表达水平显著降低,差异具有统计学意义 ($F = 8.15, P < 0.01$; $F = 5.69, P < 0.01$) (图 2、3)。NF- κ B 抑制剂阳性对照处理结果同 rmGal-1 处理后一致。

3 讨论

该实验把小鼠巨噬细胞系 Raw264.7 作为研究对象,分别用 rmGal-1 和 NF- κ B 抑制剂 JSH-23 干预金黄色葡萄球菌 LTA 刺激 Raw264.7 细胞的炎症模型。研究结果显示,在 LTA 刺激 Raw264.7 细胞 3 h 后,内源性 Gal-1 及 NLRP3 炎症小体表达显著上调;rmGal-1 预处理后显著抑制 P-p65、NLRP3、ASC 及

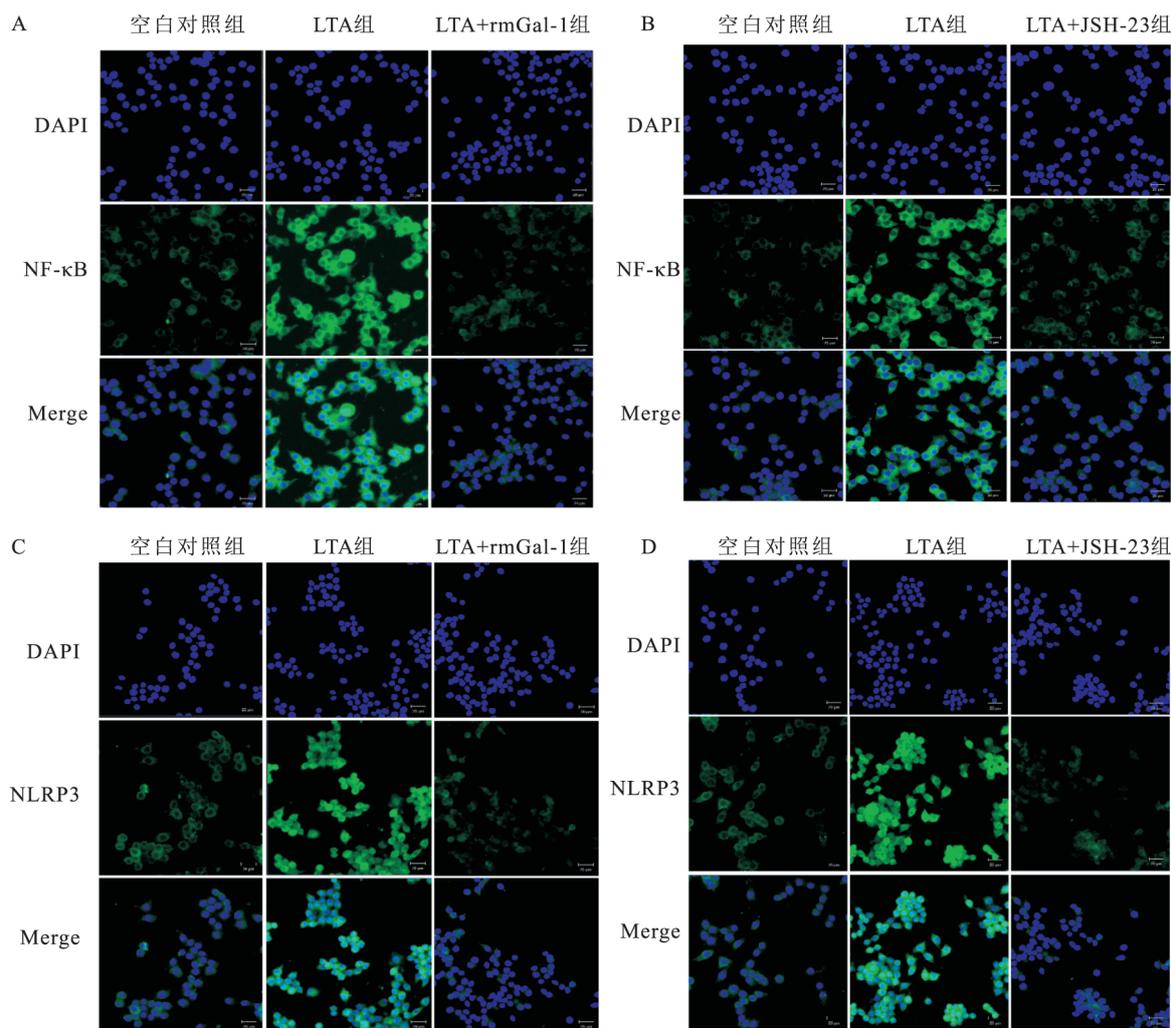


图2 免疫荧光法测 rmGal-1 和 JSH-23 处理后各组 Raw264.7 细胞中 P-p65 及 NLRP3 炎症小体的表达 ×200

A: 加 rmGal-1 处理后各组 P-p65 表达; B: 加抑制剂 (JSH-23) 处理后各组 P-p65 表达; C: 加药 (rmGal-1) 处理后各组 NLRP3 表达; D: 加抑制剂 (JSH-23) 处理后 NLRP3 表达; DAPI 所染的细胞核呈蓝色, 绿色荧光为 P-p65 和 NLRP3 在细胞内的表达

Caspase-1 表达。同样地, JSH-23 预处理后, P-p65、NLRP3、ASC 及 Caspase-1 的表达水平显著下调。

巨噬细胞作为主要的固有免疫细胞, 具有抗原提呈、清除病原体和促进细胞凋亡的功能^[4]。研究^[4-5]表明, 轻度哮喘患者肺泡巨噬细胞数量明显增多, 吞噬功能增强, 提示肺泡巨噬细胞可能参与哮喘的发病。金黄色葡萄球菌作为常见的人类定植细菌, 与哮喘等过敏性疾病的发病有关^[6]; LTA 作为金黄色葡萄球菌的主要成份, 可以被巨噬细胞表面 Toll 样受体 2 (Toll like receptor-1, TLR2) 识别诱导炎症发生^[7]。研究^[8]表明在大肠杆菌感染的小鼠脓毒血症的动物模型中 NLRP3 炎症小体表达上调, 此外还有研究^[9]显示 LTA 可激活牛乳腺泡细胞

TLR2/NF- κ B/NLRP3 信号通路诱发乳腺炎。粪肠球菌 LTA 刺激巨噬细胞系 Raw264.7 建立的牙周炎模型里显示^[10], LTA 可诱导 Raw264.7 细胞内 NLRP3 炎症小体的活化, 而且该作用可能与 ROS 和 NF- κ B 信号通路激活有关。与之前的研究结果相一致, 该研究表明金黄色葡萄球菌 LTA 刺激 Raw264.7 细胞后, 细胞内 NLRP3、ASC 及 Caspase-1 的表达水平显著升高。这表明 LTA 激活了 Raw264.7 细胞内 NLRP3 炎症小体的表达和组装。该研究也证明, LTA 刺激 Raw264.7 细胞后, 细胞内 P-p65 表达水平也显著升高, 这表明 LTA 同时激活了 NF- κ B 信号通路。这进一步证实了 LTA 可能通过激活 NF- κ B 来上调 NLRP3 的表达^[9-10]。

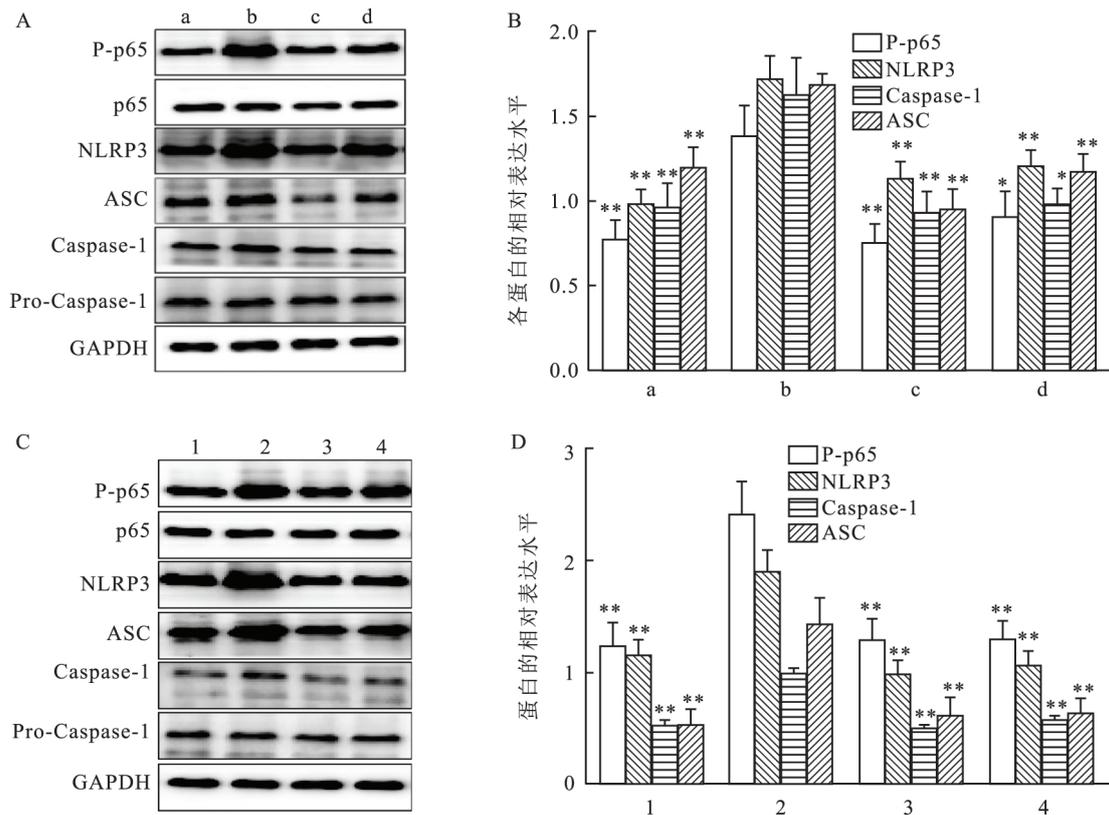


图3 rmGal-1 和 JSH-23 处理后对 NF-κB/NLRP3 炎症小体通路蛋白表达的影响及蛋白水平半定量分析

A: 加 rmGal-1 后各蛋白的表达; B: 各蛋白的蛋白半定量分析; C: 加抑制剂 (JSH-23) 后各蛋白的表达; D: 各蛋白的蛋白半定量分析; a: 空白对照组; b: LTA 组; c: rmGal-1 组; d: LTA + rmGal-1 组; 1: 空白对照组; 2: LTA 组; 3: JSH-23 组; 4: LTA + JSH-23 组; 与 LTA 组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

Gal-1 是一种碳水化合物结合蛋白,在细胞外, Gal-1 能够与各种免疫细胞表面的二价或多价聚糖相互识别而发挥免疫调节作用;在细胞内, Gal-1 可参与细胞信号转导,并调节一系列病理生理反应^[11]。有研究^[12]表明,克氏锥形虫感染巨噬细胞后,内源性 Gal-1 表达升高,外源性加入 Gal-1 可以显著抑制克氏锥形虫刺激巨噬细胞后炎症因子的产生,明确了外源性 Gal-1 的体外抗炎作用^[13]。这些研究与该实验研究结果一致。该研究采用 LTA 刺激巨噬细胞 Raw264.7 后,内源性 Gal-1 表达水平明显升高。同时,该实验用外源性 rmGal-1 作用于 Raw264.7 细胞后表明,LTA 诱导的巨噬细胞 NLRP3 炎症小体表达水平显著下降。这进一步证实了外源性 Gal-1 在体外的抗炎作用。有研究^[14]显示内源性 Gal-1 可以通过与 NF-κB 相互作用而调节细胞炎症反应。该研究显示,LTA 刺激 Raw264.7 细胞后,细胞内 P-p65、Caspase-1、ASC 和 NLRP3 表达水平显著升高,这表明 LTA 刺激巨噬细胞激活了 NF-κB/NLRP3 信号通路,给予外源性 Gal-1 后,显著抑制了巨

噬细胞内 P-p65、Caspase-1、ASC 和 NLRP3 表达水平。这表明,rmGal-1 可能通过抑制 NF-κB/NLRP3 信号通路来调节巨噬细胞炎症反应。为了进一步证实以上推论,该实验给予 NF-κB 抑制剂预处理 Raw264.7 细胞作为阳性对照,在 LTA 刺激巨噬细胞后显示,细胞内 P-p65、Caspase-1、ASC 和 NLRP3 表达水平显著下调。这一作用与 rmGal-1 作用效果相一致。

综上,该研究证实了金黄色葡萄球菌 LTA 刺激 Raw264.7 巨噬细胞可活化 NLRP3 炎症小体,诱导内源性 Gal-1 的表达升高,rmGal-1 干预可显著抑制 LTA 刺激巨噬细胞炎症反应,可能与 rmGal-1 抑制 NF-κB/NLRP3 信号通路有关,这为哮喘等炎症相关疾病的治疗提供了新的依据。但 rmGal-1 对 NLRP3 炎症小体调控作用除通过 NF-κB 通路外,还可能与其影响其他调控炎症因子表达的途径有关,这些炎症通路间是否有一定的交互调控,仍需进一步的探究。

参考文献

- [1] Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes [J]. *Cell* 2010, 140(6): 821–32.
- [2] Baronides S H, Castronovo V, Cooper D N, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins [J]. *Cell* 1994, 76(4): 597–8.
- [3] Sundblad V, Morosi L G, Geffner J R, et al. Galectin-1: a jack-of-all-trades in the resolution of acute and chronic inflammation [J]. *J Immunol* 2017, 199(11): 3721–30.
- [4] Kulkarni N, Kantar A, Costella S, et al. Macrophage phagocytosis and allergen avoidance in children with asthma [J]. *Front Pediatr*, 2018, 6:206.
- [5] Cayrol C, Girard J P. Innate lymphoid cells in asthmatic patients [J]. *J Allergy Clin Immunol* 2019, 143(5): 1739–41.
- [6] Kim Y C, Won H K, Lee J W, et al. Staphylococcus aureus nasal colonization and asthma in adults: systematic review and meta-analysis [J]. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2019, 7(2): 606–15.
- [7] Li C, Li H, Jiang Z, et al. Interleukin-33 increases antibacterial defense by activation of inducible nitric oxide synthase in skin [J]. *PLoS Pathog* 2014, 10(2): e1003918.
- [8] 朱梦梦, 周树生, 刘宝. NLRP3 炎症小体在大肠杆菌血流感染免疫反应机制中的作用 [J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(6), 860–7.
- [9] Wang X, Zhang M, Jiang N, et al. Sodium phenylbutyrate ameliorates inflammatory response induced by staphylococcus aureus lipoteichoic acid via suppressing TLR2/NF- κ B/NLRP3 pathways in MAC-T cells [J]. *Molecules* 2018, 23(12): 3056.
- [10] 王丽娜, 叶丹丹, 王娇娇, 等. 粪肠球菌 LTA 通过促进 ROS 的高表达活化 NLRP3 炎症小体 [J]. 口腔医学研究, 2018, 34(2): 112–6.
- [11] Liu F T, Rabinovich G A. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation [J]. *Ann N Y Acad Sci* 2010, 1183: 158–82.
- [12] Zúñiga E, Gruppi A, Hirabayashi J, et al. Regulated expression and effect of galectin-1 on trypanosoma cruzi-infected macrophages: modulation of microbicidal activity and survival [J]. *Infect Immun* 2001, 69(11): 6804–12.
- [13] Gaudet A D, Sweet D R, Polinski N K, et al. Galectin-1 in injured rat spinal cord: implications for macrophage phagocytosis and neural repair [J]. *Mol Cell Neurosci* 2015, 64: 84–94.
- [14] Toscano M A, Campagna L, Molinero L L, et al. Nuclear factor (NF)- κ B controls expression of the immunoregulatory glycan-binding protein galectin-1 [J]. *Mol Immunol* 2011, 48(15–16): 1940–9.

Inhibitory effect and mechanism of galectin-1 on the activation of NLRP3 in LTA-induced macrophages

Chen Fangfang, Wang Muzi, Lv Yunxiang, et al

(Dept of Geriatrics Respiratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effect of galectin-1 (Gal-1) on the expression of NLRP3 in Lipoteichoic acid (LTA)-induced Raw264.7 cells. **Methods** 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was used to detect the effects of different concentrations of recombinant mouse galectin-1 (rmGal-1) on cell viability; LTA-induced mouse macrophage cell line Raw264.7 inflammation model was established and Raw264.7 cells were pretreated with rmGal-1 or NF- κ B inhibitor JSH-23. The expression levels of P-p65 and NLRP3 in cells were observed by confocal laser microscopy; The protein expression levels of p65, P-p65, NLRP3, ASC, Caspase-1 and Pro-Caspase-1 were further detected by Western blot. **Results** The viability of Raw264.7 cells were not significantly affected by rmGal-1 in the concentration range of 0.04 ~ 0.4 μ g/ml; The endogenous Gal-1 and NLRP3 were increased in a time-dependent manner and peaked at 3 hours in LTA-induced Raw264.7 cells; Pretreated with rmGal-1 significantly inhibited the expression levels of P-p65, NLRP3, ASC and Caspase-1. Similarly as a positive control, the expression levels of P-p65, NLRP3, ASC and Caspase-1 were significantly down-regulated after JSH-23 pretreatment. **Conclusion** Gal-1 may inhibit LTA-induced macrophage inflammation through the NF- κ B-NLRP3 signaling pathway.

Key words LTA; NLRP3 inflammasome; Gal-1; NF- κ B; macrophages