

丙咪嗪经酸性鞘磷脂酶/神经酰胺通路抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NLRP3 炎症小体的激活

蒋建军¹ 杨进¹ 金永梅¹ 操基玉² 陆友金¹

摘要 目的 研究丙咪嗪对脂多糖(LPS)诱导的小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7) NLRP3 炎症小体激活的影响并探讨其可能的作用机制。方法 CCK-8 检测丙咪嗪对 RAW264.7 细胞活性的影响;用不同浓度丙咪嗪预先处理 RAW264.7 细胞 2 h 后再用 LPS 处理细胞 8 h,Western blot 法检测酸性鞘磷脂酶(ASM)、NLRP3、caspase-1、白细胞介素(IL)-1 β 和 IL-18 的蛋白表达水平;细胞免疫荧光法检测神经酰胺(Cer)的含量变化;ELISA 法检测炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 的释放水平。结果 与对照组相比,LPS(1 mg/L)能增加 RAW264.7 细胞 ASM 的蛋白表达和 Cer 的含量($P < 0.01$);上调细胞中 NLRP3、caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 的蛋白表达水平以及细胞上清液 IL-1 β 和 IL-18 的释放水平($P < 0.01$)。而经丙咪嗪预先处理能够显著抑制 LPS 所致 ASM 和 Cer 的改变($P < 0.01$);可明显抑制细胞中 NLRP3、caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 的蛋白表达以及细胞上清液中 IL-1 β 和 IL-18 的释放($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 丙咪嗪可通过调控 ASM/Cer 通路,抑制 NLRP3 炎症小体的激活从而发挥抗炎活性。

关键词 丙咪嗪;酸性鞘磷脂酶;神经酰胺;NLRP3 炎症小体;炎症;巨噬细胞

中图分类号 R 3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)07-1042-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.07.008

炎症反应是病理情况下的局部保护过程,在机体受到外界刺激时,炎症在先天免疫反应中起关键作用;然而,过度的炎症反应通常导致组织损伤和功能障碍,如败血症、炎症性肠病、牛皮癣等^[1-2]。目前临床上使用的大部分抗炎药物都存在不容忽视的不良反应。因此,探索副作用更小且更加有效的抗炎药物仍是该领域的迫切任务。NLRP3(NOD-like

receptor family, pyrin domain-containing 3)炎症小体是先天免疫系统中主要的细胞内炎症途径^[3],NLRP3 炎症小体的过度激活引发白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和 IL-18 的过度释放,进而促进过度的炎症反应在多种炎症相关疾病中被证实^[4]。因此,NLRP3 炎症小体可以作为相关疾病预防和治疗新靶点。

丙咪嗪是临床上常见的三环类抗抑郁药,具有抗炎、抗凋亡等药理学作用^[5]。已知丙咪嗪可显著抑制酸性鞘磷脂酶(acid sphingomyelinase, ASM)的活性,ASM 是水解鞘磷脂产生神经酰胺(ceramide, Cer)的调控关键酶^[6]。本课题组前期研究^[5]显示,在脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的小鼠急性肺损伤中,使用丙咪嗪可显著改善小鼠肺部炎症反应,并提高小鼠存活率。然而,丙咪嗪是否通过对 ASM/Cer 通路的调控进而抑制 NLRP3 炎症小体的激活并起到抗炎作用,目前仍不清楚。该研究采用 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞作为体外炎症模型,从 NLRP3 炎症小体途径研究丙咪嗪对炎症反应的抑制作用,并探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 由安徽医科大学公共卫生学院惠赠。

1.1.2 主要药品与试剂 LPS、丙咪嗪(美国 sigma 公司);DMEM 高糖培养基(美国 Hyclone 公司);BI 胎牛血清(以色列 Biological Industries 公司);青霉素、链霉素、胰蛋白酶(江苏碧云天生物技术有限公司);CCK-8 细胞活性测定试剂(合肥白鲨生物科技有限公司);抗 NLRP3 抗体、抗 caspase-1 抗体、抗 IL-1 β 抗体、抗 IL-18 抗体、抗 ASM 抗体(美国 abcam 公司);抗 Cer 抗体(美国 ENZO 公司);辣根过氧化物酶标记二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);小鼠 IL-1 β 、IL-18 ELISA 试剂盒(杭州联科生物技术有限公司)。

1.1.3 仪器 CO₂ 培养箱、酶标仪(美国 Thermo

2019-02-18 接收

基金项目 国家自然科学基金(编号:81400058);安徽省科技攻关计划项目(编号:1401045016)

作者单位:¹ 安徽医科大学第二附属医院呼吸内科,合肥 230601

² 安徽医科大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学系,合肥 230032

作者简介:蒋建军,男,硕士研究生;

陆友金,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: luyougold@163.com

Scientific 公司); VE-480 电泳仪、VE-486 转膜仪、凝胶成像仪(上海天能技术有限公司); 荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、炎症模型的构建 小鼠 RAW264.7 细胞为贴壁细胞, 培养于含 10% BI 胎牛血清和 1% 抗生素(100 mg/L 链霉素和 100 mg/L 青霉素)的 DMEM 培养基中, 置于条件为 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中进行培养。待细胞处于对数生长期时, 将 LPS 加入至培养液中致 LPS 的最终浓度为 1 mg/L, 使细胞成多角形形态以及伪足数量增加, 建立成熟的炎症模型。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞活性 将密度为 1×10^8 /L 的 RAW264.7 细胞悬液加入至 96 孔板, 每孔 100 μ l。设置空白组(空白组不加细胞, 仅加入 100 μ l 培养液)、对照组、丙咪嗪组(给药浓度为 20、40、60、80、100 μ mol/L), 每组设置 3 个复孔。培养 24 h 后每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液, 继续培养 2.5 h 后, 用酶标仪在 450 nm 处测量各孔的吸光度, 并计算细胞存活率。

1.2.3 Western blot 法检测 ASM、NLRP3、caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 的蛋白表达 RAW264.7 细胞按分组处理 8 h 后, 提取各组细胞总蛋白, 通过 BCA 法检测蛋白浓度。蛋白经凝胶电泳法分离后, 再转至 PVDF 膜上, 在 5% 脱脂奶粉于室温封闭 2 h TBS 漂洗 3 次, 每次 10 min; 加入说明书中指示的相应稀释浓度的一抗, 于 4 °C 孵育过夜。次日 TBST 漂洗 4 次, 每次 10 min, 然后加入二抗, 室温孵育 1 h。TBST 漂洗 4 次, 每次 10 min, ECL 法显影, 使用 Tanon 图像分析系统进行分析。

1.2.4 ELISA 法测定 RAW264.7 细胞上清液中 IL-1 β 和 IL-18 含量 将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞接种于 24 孔板, 培养至细胞密度为 80% 左右, 随机设置空白对照组、LPS 组(1 mg/L)、LPS + 丙咪嗪组(20、40、60 μ mol/L 丙咪嗪预先处理 RAW264.7 细胞 2 h 后与 1 mg/L LPS 共同作用)。培养 8 h 后吸取上清液。根据 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 检测细胞上清液中 IL-1 β 和 IL-18 的含量。

1.2.5 免疫荧光技术检测 Cer 表达 取对数生长期的 RAW264.7 细胞消化离心后, 制成细胞悬液, 调整细胞密度为 5×10^7 /L。于 12 孔板中各放入一个细胞爬片, 取 50 μ l 细胞悬液均匀抹于爬片上, 贴壁 2 h 后加入 1 ml 培养液, 培养 24 h 后吸取培养

液。分别向各孔中加入终浓度为 0、1 mg/L LPS、20 μ mol/L 丙咪嗪 + 1 mg/L LPS、60 μ mol/L 丙咪嗪 + 1 mg/L LPS(丙咪嗪预先处理 RAW264.7 细胞 2 h 后与 1 mg/L LPS 共同作用)的培养液 1 ml, 作用 8 h。吸去培养液, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.4% TritonX-100 破膜 20 min, 0.1% 的胎牛血清蛋白(BSA)封闭 1 h。吸去封闭液后, 加入 PBS 稀释的 Cer 抗体(1:50), 4 °C 孵育过夜。次日回收一抗, PBS 清洗后加入由 PBS 稀释的荧光二抗(1:200)。避光室温孵育 1 h, 吸去二抗, PBS 清洗, DAPI 染核, 甘油封固, 荧光显微镜下观察并拍片。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 16.0 软件进行分析, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间均数的比较采用单因素方差分析, 组间两两比较应用 LSD-t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丙咪嗪对 RAW264.7 细胞活性的影响 丙咪嗪在浓度为 0 ~ 60 μ mol/L 范围内对 RAW264.7 细胞无明显毒性, 其细胞活力与空白对照组相比差异无统计学意义, 见图 1。

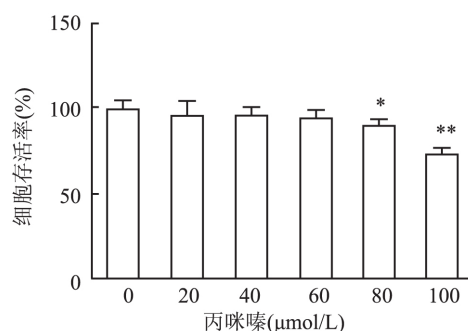


图1 丙咪嗪对 RAW264.7 细胞活性的影响
与对照组(丙咪嗪 0 μ mol/L)比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 丙咪嗪对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 NLRP3、caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 蛋白表达的影响 与对照组比较, LPS 明显增加了细胞中 NLRP3、caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 的蛋白表达($P < 0.01$); 然而, 给予丙咪嗪预处理可显著抑制细胞中 NLRP3($F = 33.86$, $P < 0.01$)、caspase-1($F = 96.05$, $P < 0.01$)、IL-1 β ($F = 55.74$, $P < 0.01$) 和 IL-18($F = 165.42$, $P < 0.01$) 的蛋白表达, 差异均有统计学意义, 见图 2、3。

2.3 丙咪嗪对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 IL-1 β 和 IL-18 的影响 与对照组相比, LPS 明显增加了细胞上清液中 IL-1 β (35.43 ± 5.38) 和 IL-18

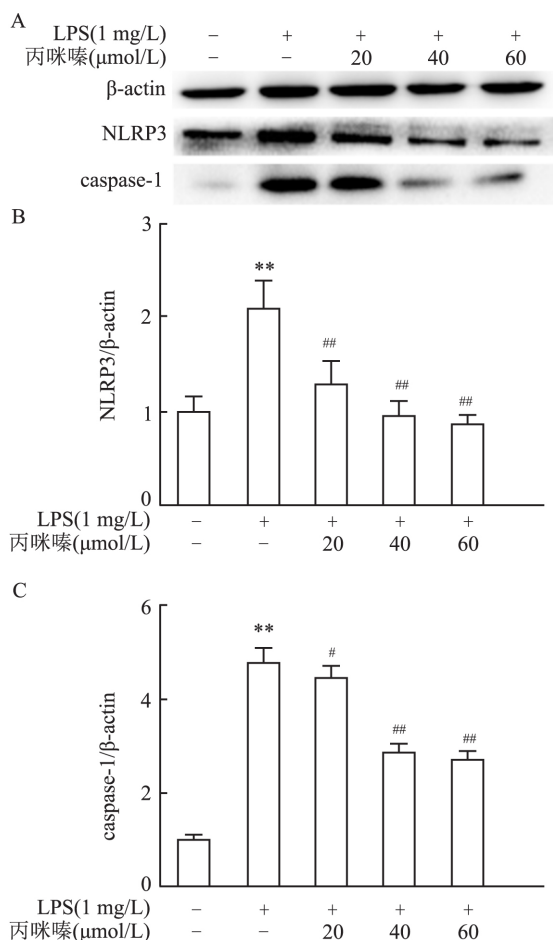


图2 丙咪唑对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞中 NLRP3 和 caspase-1 蛋白表达的影响

A: Western blot 检测 NLRP3、caspase-1 蛋白表达; B、C: NLRP3、caspase-1 蛋白相对表达量; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 LPS 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

(63.86 ± 6.54) 的含量 ($P < 0.01$); 然而, 给予丙咪唑预处理可显著抑制细胞上清液中 IL-1 β 和 IL-18 的释放, 差异均有统计学意义 ($F = 29.52$, $P < 0.01$)、($F = 42.95$, $P < 0.01$); 抑制的程度与其浓度有关, 在丙咪唑浓度为 $60 \mu\text{mol/L}$ 时, IL-1 β (17.41 ± 2.51) 和 IL-18 (38.42 ± 3.86) 的释放抑制最明显, 见图 4。

2.4 丙咪唑对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 ASM 蛋白表达和 Cer 含量的影响 与对照组相比, LPS 显著增加了细胞中 ASM 的蛋白表达 ($P < 0.01$); 然而, ASM 抑制剂丙咪唑可使其恢复至正常水平, 差异有统计学意义 ($F = 72.66$, $P < 0.01$) (图 5)。细胞免疫荧光检测结果显示, 与对照组相比, LPS 显著增加了细胞中 Cer 的含量 ($P < 0.01$); 而丙咪唑可显著抑制 LPS 所致 Cer 改变, 差异有统计学意义 ($F = 201.16$, $P < 0.01$) (图 6)。

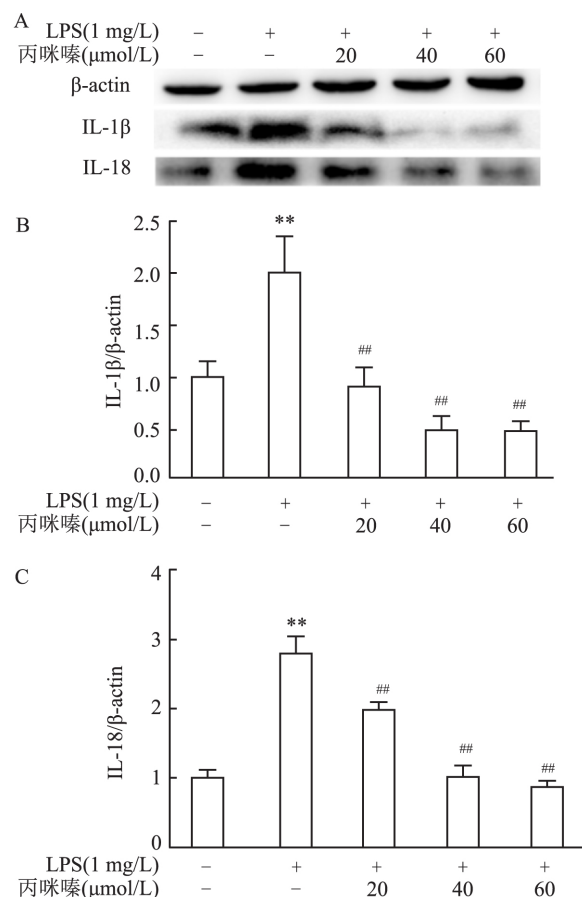


图3 丙咪唑对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞中 IL-1 β 和 IL-18 蛋白表达的影响

A: Western blot 检测 IL-1 β 、IL-18 蛋白表达; B、C: IL-1 β 、IL-18 蛋白相对表达量; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 LPS 组比较: ## $P < 0.01$

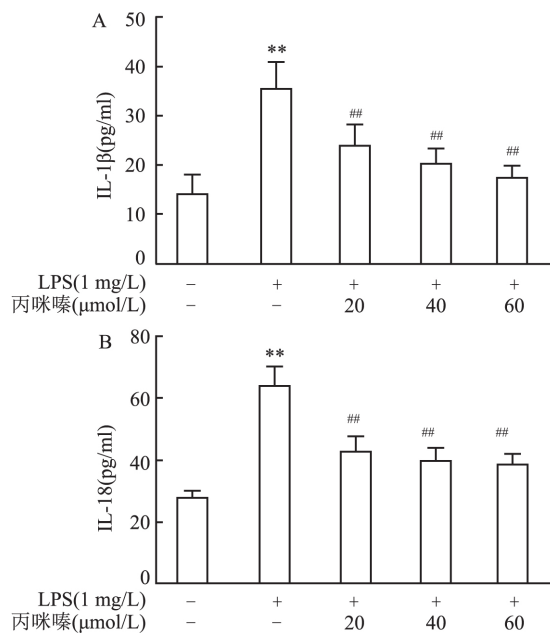


图4 丙咪唑对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞中 IL-1 β 、IL-18 释放量的影响

A: IL-1 β ; B: IL-18; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 LPS 组比较: ## $P < 0.01$

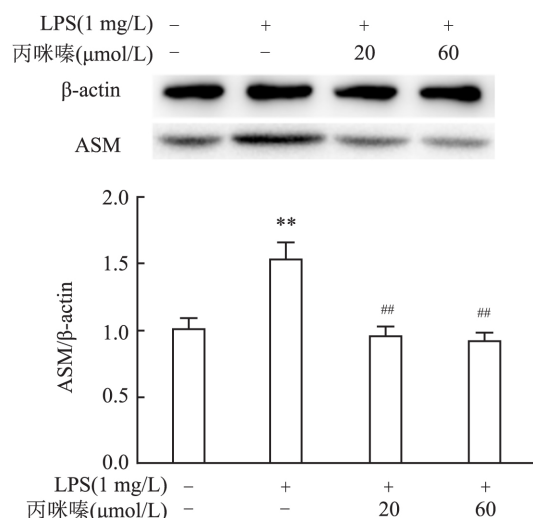


图5 丙咪唑对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞中 ASM 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)
与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 LPS 组比较: ## $P < 0.01$

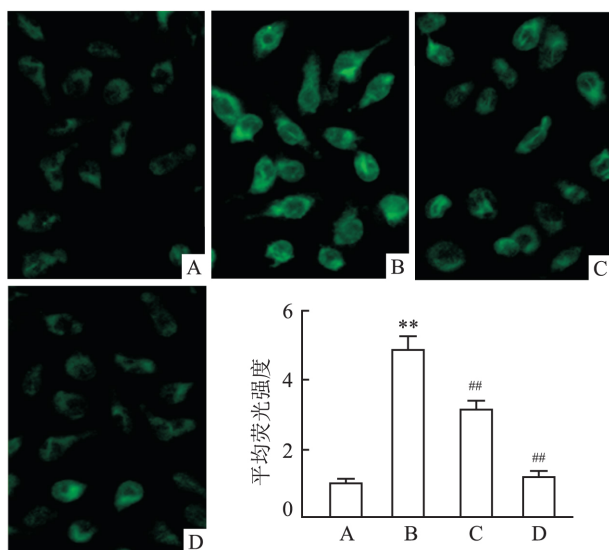


图6 丙咪唑对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞中 Cer 生成的影响 免疫荧光染色 $\times 200$

A: 对照组; B: LPS 组 (1 mg/L); C: LPS (1 mg/L) + 丙咪唑组 (20 μmol/L); D: LPS (1 mg/L) + 丙咪唑组 (60 μmol/L); 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 LPS 组比较: ## $P < 0.01$

3 讨论

本研究结果表明,丙咪唑通过对 ASM/Cer 通路的调控进而抑制 NLRP3 炎症小体的激活并起到抗炎作用。该研究结果首次证明了丙咪唑经 NLRP3 炎症小体途径起到抗炎作用,并且进一步揭示了 ASM/Cer 通路在 NLRP3 炎症小体激活中的关键作用。

NLRP3 炎症小体在先天免疫系统中发挥着重

要作用,大量研究^[7]表明,NLRP3 炎症小体的激活与多种炎症相关的疾病密切相关。因此,了解 NLRP3 炎症小体激活的分子机制为炎症性疾病提供新的诊疗思路具有重要意义。然而,大量研究^[8]表明 Cer 在不同的病理条件下启动 NLRP3 炎症小体的形成和活化,包括胰岛素抵抗、肥胖和急性肺损伤。Cer 可通过鞘磷脂酶催化膜鞘磷脂的分解生成,或通过 Cer 合成酶从头合成释放^[9]。在机体应激反应中,鞘磷脂被催化分解是最重要、最直接以及最快生成 Cer 的途径,鞘磷脂酶是此途径的调控关键酶。鞘磷脂酶包括三种同工酶: ASM、中性鞘磷脂酶 (Mg^{2+} dependent neutral sphingomyelinase, NSMase) 和碱性鞘磷脂酶。其中 ASM 是被人们研究和认识最广泛的,且 ASM 的生物活性占鞘磷脂酶总活性的 90%,其对内源性 Cer 的生成具有重要作用^[10]。丙咪唑是临床上常见的三环类抗抑郁药,也是细胞动物实验中常用的 ASM 抑制剂。课题组前期研究^[5]发现,丙咪唑可显著改善由 LPS 诱导的小鼠急性肺损伤的肺部炎症反应。然而,丙咪唑是否通过对 ASM/Cer 通路的调控进而抑制 NLRP3 炎症小体的激活并起到抗炎作用,目前仍不清楚。研究显示,在 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症反应中,ASM 的蛋白表达以及神经酰胺的含量明显升高;然而,在给予 ASM 抑制剂丙咪唑预先处理后,ASM 的蛋白表达以及 Cer 的含量被显著抑制。这一结果提示在 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 Cer 的累积主要源于 ASM 的激活。进一步研究了丙咪唑对 NLRP3 炎症小体激活的影响,结果显示,丙咪唑显著抑制了由 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 NLRP3、caspase-1 的蛋白表达。因此,可以认为丙咪唑作为 ASM 的抑制剂可通过对 ASM/Cer 通路的调控进而抑制 NLRP3 炎症小体的激活。

IL-1 β 和 IL-18 是两种非常重要的促炎因子,在炎症反应中发挥重要作用,限制炎症因子的表达便可实现抗炎作用。已经证实 IL-1 β 和 IL-18 的分泌需要 NLRP3 炎症小体的参与^[7]。因此,本研究进一步检测了由 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 IL-1 β 和 IL-18 的蛋白表达以及细胞上清液中两者的分泌水平。正如所预期的,在 LPS 刺激 RAW264.7 细胞后,细胞中 IL-1 β 和 IL-18 的蛋白表达以及细胞上清液中两者的分泌水平都显著升高;然而,在给予丙咪唑预先处理后,显著抑制了两者在细胞中的蛋白表达以及细胞上清液中两者的分泌水平。这一结果表明丙咪唑通过限制 NLRP3 炎症小体的激活从而抑

制 IL-1 β 和 IL-18 的表达。

综上所述,本研究表明 ASM/Cer 通路在 NLRP3 炎症小体形成和活化中起关键作用,丙咪嗪作为 ASM 的抑制剂可通过对 ASM/Cer 通路的调控进而抑制 NLRP3 炎症小体的激活并起到抗炎作用。然而,丙咪嗪对于 LPS 诱导炎症反应的保护作用可能涉及其他机制,有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Maslove D M, Wong H R. Gene expression profiling in sepsis: timing, tissue, and translational considerations [J]. *Trends Mol Med*, 2014, 20(4): 204–13.
- [2] Lu N, Wang L, Cao H, et al. Activation of the epidermal growth factor receptor in macrophages regulates cytokine production and experimental colitis [J]. *J Immunol*, 2015, 192(3): 1013–23.
- [3] Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, et al. Inflammasomes in health and disease [J]. *Nature*, 2012, 481(7381): 278–86.
- [4] 胡波, 张晓刚, 李德才. miR-22 靶向抑制 NLRP3 基因对冠心病
- 心病内皮细胞炎症损伤的保护作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(5): 668–75.
- [5] Yang J, Qu J M, Summah H, et al. Protective effects of imipramine in murine endotoxin-induced acute lung injury [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 638(1–3): 128–33.
- [6] Laura L, Montserrat M, Carmen G R, et al. Critical role of acidic sphingomyelinase in murine hepatic ischemia-reperfusion injury [J]. *Hepatology*, 2010, 44(3): 561–72.
- [7] Guo H, Callaway J B, Ting J P. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics [J]. *Nat Med*, 2015, 21(7): 677–87.
- [8] Vandanmagsar B, Youm Y H, Ravussin A, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance [J]. *Nat Med*, 2011, 17(2): 179–88.
- [9] Tibboel J, Reiss I, de Jongste J C, et al. Ceramides: a potential therapeutic target in pulmonary emphysema [J]. *Respir Res*, 2013, 14(1): 1–12.
- [10] Yang Y, Uhlig S. The role of sphingolipids in respiratory disease [J]. *Ther Adv Respir Dis*, 2011, 5(5): 325–44.

Imipramine inhibits LPS – induced NLRP3 inflammasome activation through Cer/ASM pathway in RAW264.7 macrophages

Jiang Jianjun, Yang Jin, Jin Yongmei, et al

(Dept of Respiratory Medicine, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the protective effect and possible mechanism of imipramine on LPS-induced NLRP3 inflammasome activation in RAW264.7 macrophages. **Methods** The effect of imipramine on RAW264.7 cells viability were detected by CCK-8 method. RAW264.7 cells were pretreated with different concentrations of imipramine for 2 hours and then treated with LPS for 8 hours. The protein expression of acid sphingomyelinase (ASM), NLRP3, caspase-1, interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-18 were determined by Western blot; the content of ceramide (Cer) was detected by the method of cell immunofluorescence; the release levels of inflammatory cytokine IL-1 β and IL-18 were measured by ELISA. **Results** Compared with the control group, LPS (1 mg/L) significantly increased ASM protein expression and the content of Cer in RAW264.7 cells ($P < 0.01$); LPS (1 mg/L) significantly up-regulated the protein expression levels of NLRP3, caspase-1, IL-1 β and IL-18 as well as the release levels of IL-1 β and IL-18 in the supernatants ($P < 0.01$). However, pretreatment with imipramine significantly inhibited ASM and Cer changes induced by LPS ($P < 0.01$); It significantly inhibited the protein expression levels of NLRP3, caspase-1, IL-1 β and IL-18 as well as the release levels of IL-1 β and IL-18 in the supernatants ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Imipramine exerts anti-inflammatory activity by inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome through the regulation of ASM/Cer pathway.

Key words imipramine; acid sphingomyelinase; ceramide; NLRP3 inflammasome; inflammation; macrophages