

炎症小体在肠神经胶质细胞激活中的表达及短双歧杆菌的干预作用研究^{*}

恩施土家族苗族自治州中心医院 杨艳华 向兴朝^{*},恩施 445000

摘要 目的:观察炎症小体 NALP3 在脂多糖(LPS)激活的肠神经胶质细胞(EGCs)中的作用以及短双歧杆菌的干预作用。方法:采用 LPS 激活肠神经胶质细胞为肠神经胶质细胞的体外肠道炎症模型,造模后采用短双歧杆菌上清液干预。实验分组:空白组、炎症模型组(LPS 干预组 5 mg/孔)、短双歧杆菌干预组(MOI 1:40 = 上清液 105 μ L/5 $\times 10^5$ cells),采用免疫荧光检测胶质纤维酸性蛋白(GFAP)及炎症小体 NALP3 的表达,PCR 及 Western blot 分别检测 NALP3,含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase-1),白介素 1 β (IL-1 β),转录因子(NF- κ B)的 RNA 和蛋白的变化。结果:免疫荧光显示肠神经胶质细胞在 LPS 激活后表达 GFAP、NALP3,而空白组仅表达 GFAP;RT-PCR 及 Western blot 显示肠神经胶质细胞在 LPS 激活后较空白组高表达 NALP3、Caspase-1、IL-1 β 、NF- κ B RNA 和蛋白,而短双歧杆菌干预组较肠神经胶质细胞 LPS 刺激炎症模型组明显下调 NALP3、Caspase-1、IL-1 β 、NF- κ B RNA 和蛋白的表达。结论:肠神经胶质细胞在 LPS 刺激后 NALP3 高表达,Caspase-1、IL-1 β 、NF- κ B 高表达,而短双歧则下调上述炎性因子的表达。

关键词 肠神经胶质细胞;炎症小体;短双歧杆菌;NF- κ B

中图分类号 R574

文献标识码 A

DOI 10.11768/nkjwzzzz20190422

炎症、感染或外科肠道操作、创伤引起的肠胶质细胞的改变可能导致肠道的功能紊乱,其共同特点是胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)、钙结合蛋白(calcium-binding protein S100B)的表达改变,肠神经胶质细胞网络可能参与炎症性肠病(inflammatory bowel diseases, IBD)的发病机制^[1]。IBD 分为克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)。有研究认为 CD 和 UC 的特点是肠道内促炎细胞因子显著增加,触发和支持炎症过程^[2]。炎症小体是由胞浆内模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)参与组装的多蛋白复合物,其中,炎性体 NLRP 3(inflammasome 3, NLRP 3)是炎症小体的重要组成部分,与凋亡相关的斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing, ASC)相互作用,从而激活炎症性含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteine aspartate specific proteinase, caspase-1)释放炎性细胞因子(interleukine- β , IL-1 β)^[3]。肠道中含有许多种类的细菌(微生物),它们能维持黏膜屏障并帮助消化。由饮食、抗生素使用或疾病改变引起的细菌种类失调可能通过破坏免疫耐受而参与 IBD 的发病过程^[4,5]。鉴于肠神经胶质细胞网络的改变

对 IBD 的影响、NLRP 3 及肠道菌群改变的潜在意义,我们设计这项研究来验证 NLRP 3 在 LPS 激活的肠神经胶质细胞模拟的炎性模型中可能的改变,以及短双歧杆菌在其中的调节作用^[6]。

材料与方法

细胞 肠神经胶质细胞(enteric glial cells, EGCs)购自于美国模式培养物保藏所大鼠回肠肌间胶质细胞系,EGCs 使用含 10% 胎牛血清的 RPMI (roswell park memorial institute)1640 培养基培养于六孔板中,于 37℃ 恒温培养箱中培养,隔天换液,2~3 天传代,实验采用对数期生长细胞。

细菌溶液制备 ①致病性大肠杆菌内毒素溶液(lipopolysaccharides, LPS)配制:瞬时离心 LPS(sigma O127 :B8)粉末,使用无菌磷酸缓冲盐(phosphate buffer saline, PBS)溶液调节浓度为 5 mg/mL,分装于无菌玻璃小瓶内, -20℃ 保存。②短双歧杆菌上清液(B. b)由中国普通微生物菌种保藏管理中心提供配制(No: NCIMB 702258),将短双歧杆菌(浓度)培养上清液离心,过滤,分装, -80℃ 冰箱保存。

试剂与仪器 鼠抗 NALP3 抗体(批号: ab205680),兔抗 GFAP 抗体(批号: ab7260),兔抗 caspase-1 抗体(批号: ab1872),兔抗 NF- κ B p65 抗体(批号: ab16502), Anti-IL-1 β 抗体(批号: ab9787)均

^{*}基金项目:恩施州科技计划项目(No: E20180001)

^{*}通信作者:向兴朝, E-mail: xhnc777@139.com

购于 abcam。实时荧光液量 PCR 仪购自 Life TechnologyUSA,凝胶成像系统购于 Alpha Innotech, USA 激光共聚焦显微镜成像系统购自于 Thermo Fisher, Thermo Fisher。免疫荧光 (immun of fluorescence, IF)-激光共聚焦扫描显微镜 (laser scanning confocal microscope, LSCM) 购自于 THORLABS, USA。

造模、分组、给药方法 将 EGCs 分为 3 组:空白组 (未干预的 EGCs), LPS 干预组 (EGCs + LPS), 短双歧杆菌干预组 (EGCs + LPS + B. b)。空白组:将 EGCs 培养到对数生长期时,以每孔 5×10^5 细胞数收集细胞, -80°C 封存。EGCs + LPS 干预组:将 EGCs 培养到对数生长期时,加入 LPS 5mg 刺激 EGCs 12 h 后 (预实验获得时间干预点),收集细胞 -80°C 封存。EGCs + LPS + B. b 干预组:将 EGCs 培养到对数生长期时,同时加入 LPS 5 mg 以及短双歧杆菌上清液 MOI 1:40 = 上清液 $105 \mu\text{L}/5 \times 10^5$ cells) (感染复数:预实验测得数据) EGCs 干预 12 h 后,收集细胞,分别处理后 -80°C 封存^[7]。

标本取材及检测方法 去除各组培养板各孔细胞培养液上清,用 PBS 缓冲液常温润洗各孔细胞。

1. RNA 标本取材及检测方法:每孔细胞分别加入 Trizol、氯仿、异丙醇处理各孔细胞,测定 RNA 浓度,随后进行逆转录,PCR 扩增,RNA 提取。所用引物由武汉安特捷生物有限公司合成。定量分析以 GAPDH 为内参,采用相对定量的方法,得到 Ct 值为原始数据,采用相对定量 ($\Delta\Delta\text{Ct}$) 进行定量分析,以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 处理数据及作图。扩增引物及序列见表 1。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列
GFAP	上游 CGCTCCGTGAAGATCAACAAG 下游 CGGAAGAGCCGATTGAAAGTG
NF- κB	上游 GCTCCTTTTCTCAAGCCGATGT 下游 CGTAGGTCCTTTTGCYYYYYC
NALP3	上游 TTCCGAGGAAATGATGACGA 下游 ACAGTAGACGATGCGGTTGC
IL-1 β	上游 TGTCAAACGGGAGATGAATGGT 下游 CATGAGGTCCACCACCCTGTT
Caspase-1	上游 GTGAACCAGGAAGAGATGGATACA 下游 GCCACCTTCTTTGTTTCAGTTTTTC
GAPDH	上游 TTCCTACCCCAATGTATCCG 下游 CATGAGGTCCACCACCCTGTT

2. 蛋白标本取材方法:每孔细胞加入细胞蛋白裂解液,测定蛋白浓度后加入蛋白上样缓冲液,进一步使蛋白后变性提取各组总蛋白,放入 -80°C 冰箱中保存。采用 western blot 法检测 GFAP, NALP3,

Caspase-1, IL-1 β , NF- κB 蛋白的表达。以 GAPDH 为内参,采用 ImageQuant 图像处理软件分析蛋白条带,比较相对灰度值。

3. 细胞爬片:细胞种植于已铺好细胞爬片的孔板内,用多聚甲醛固定爬片,用 Triton x - 100 室温通透细胞,然后加驴血清封闭液室温封闭,最后加入 GFAP, NALP3 的一抗、二抗孵育后,挑出爬片,将爬片贴于涂有淬灭剂的载玻片上,放入湿盒中避光,采用激光共聚焦显微镜下进行扫描成像系统采集图像。

统计学处理 采用 SPSS 21.0 统计学软件,计数资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,每一次测定一式三份,组间比较用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

EGCs 在 LPS 刺激后 GFAP 及 NALP3 的表达 免疫荧光染色显示 EGCs 在 LPS 5 mg 干预后较未干预处理的 EGCs 高表达 GFAP (红色)、NALP3 (绿色) 分子,见图 1。

3 组 NALP3, Caspase-1, IL-1 β , NF- κB RNA 及蛋白的表达

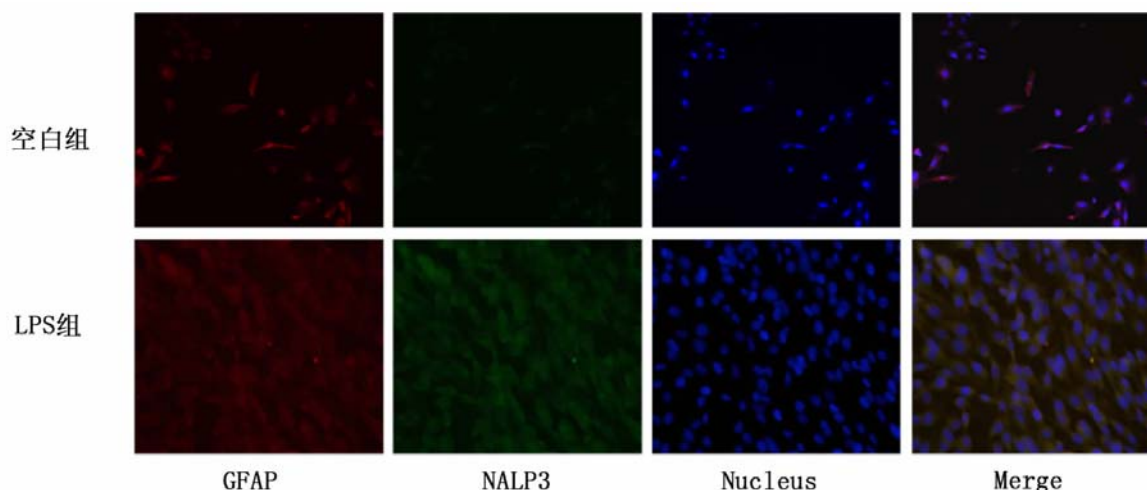
1. EGCs 在 LPS 刺激后 NALP3、Caspase-1、IL-1 β 、NF- κB RNA 表达上调 ($P < 0.05$), 短双歧杆菌干预后 NALP3、Caspase-1、IL-1 β 、NF- κB RNA 表达明显下调 ($P < 0.05$), 见表 2。

2. EGCs 在 LPS 刺激后 NALP3、Caspase-1、IL-1 β 、NF- κB 蛋白表达上调 ($P < 0.05$), 短双歧杆菌干预后 NALP3、Caspase-1、IL-1 β 、NF- κB 蛋白表达明显下调 ($P < 0.05$), 见图 2 ~ 5。

讨 论

肠胶质细胞是一类独特的外周胶质细胞,与肠道神经系统中的神经元形成一个广泛而丰富的网络,分布于胃肠壁的各个层次,在肠反射中起调节肠道的运动和分泌,影响上皮屏障,调节神经炎症。肠胶质细胞表达分子标记,如 GFAP 和 S 100 β ,为肠道神经元提供营养和保护的支持。肠胶质细胞在肠道炎症和免疫反应中,分泌细胞因子和免疫调节信号相互作用,这些细胞因子和免疫调节信号有助于改变致病性信号^[8]。然而,肠道胶质细胞在肠道炎症性疾病如何影响天然免疫系统的重要成分——炎症小体,目前还不清楚。

NALP 3 炎症小体是一种多蛋白复合体,是天然免疫系统的组成部分,由 NALP 3、凋亡相关斑点样蛋白 (Asc) 和 caspase-1 (caspase-1) 组成^[9,10]。NALP3



注:GFAP(红) Nucleus(蓝) NALP3(绿)

图1 EGCs 经 LPS 刺激后 GFAP、NALP3 的表达

表2 3组中 NALP3, Caspase-1, IL-1 β , NF- κ B 分子的 RNA 表达

($\bar{x} \pm s$)

组别	NALP3	Caspase-1	IL-1 β	NF- κ B
空白组	0.86 $\pm$ 0.10	0.22 $\pm$ 0.03	0.57 $\pm$ 0.07	0.90 $\pm$ 0.10
LPS 干预组	2.46 $\pm$ 0.35 *	0.51 $\pm$ 0.07 *	1.26 $\pm$ 0.07 *	2.43 $\pm$ 0.32 *
短双歧杆菌干预组	1.06 $\pm$ 0.20 #	0.24 $\pm$ 0.04 #	0.83 $\pm$ 0.03 #	1.13 $\pm$ 0.11 #

注:与空白组比较, * $P < 0.05$; 与 LPS 干预组比较, # $P < 0.05$

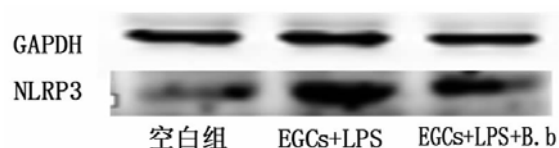


图2 3组中 NALP3 蛋白的表达

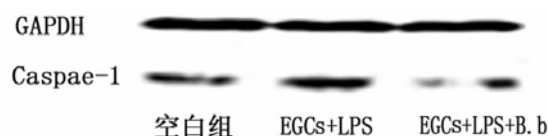


图3 3组中 Caspase-1 蛋白的表达

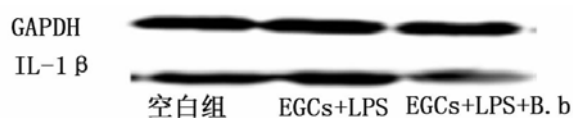


图4 3组中 IL-1 β 蛋白的表达

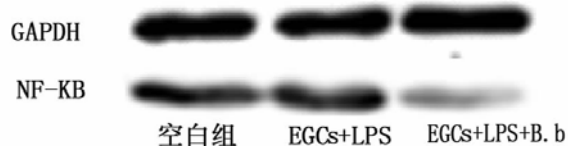


图5 3组中 NF- κ B 蛋白的表达

炎症小体被多种刺激物激活,负责释放促炎症细胞因子^[11]。一旦 NALP 3 炎症体被激活,促天冬氨酸酶-1 转变为活性 caspase-1,并进一步将白介素-1 β (pro-IL-1 β) 前体转化为常见的促炎细胞因子 IL-

1 β , NLRP 3 炎症小体的激活可诱导免疫细胞产生促炎细胞因子,参与天然免疫和炎症反应^[12]。

在本实验中,采用免疫荧光检测 EGCs 在 LPS 刺激后高表达 GFAP 及 NALP3,而未被刺激的 EGCs 仅表达 GFAP(EGCs 经典标记物),未表达 NALP3,提示炎性刺激激活 EGCs 的同时,也激活 NALP3 的表达。采用 PCR 及 Western blot 检测 EGCs 不同分组 NALP3 以及促炎症蛋白酶 Caspase-1,白介素因子 IL-1 β , NF- κ B 信号通路的表达。LPS 激活的 EGCs 与未予以炎性刺激的 EGCs 比较,上调 NALP3, Caspase-1, IL-1 β , NF- κ B 的表达,显示在被活化的 EGCs 网络,炎症小体 NALP3 被激活,并招募和激活促炎症蛋白酶 Caspase-1。活化的 Caspase-1 切割 IL-1 β 前体,产生相应的成熟细胞因子。同时激活 NF- κ B 信号通路。从而启动促炎基因的表达,产生促炎介质,并启动炎症过程。本研究证实炎性刺激激活炎症小体在活化的 EGCs,激活 NF- κ B 信号通路,介导肠道免疫,参与了肠道炎症性疾病的发展过程。

近年来肠道微生物在治疗肠道炎症性疾病,^[13,14]。如使用益生菌治疗肠道炎症性疾病已得到广泛认可^[15~17]。本研究采用短双歧杆菌干预 EGCs,显示短双歧杆菌通过 NF- κ B 信号通路,抑制炎症小体活性,从而在肠道炎症性疾病发挥了拮抗作用^[18~22]。

(下转第 341 页)

- 26 Herzog D, Poellinger A, Doellinger F, et al. Modifying post-operative medical care after EBV implant may reduce pneumothorax incidence [J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0128097.
- 27 Emery RW, Graif JL, Hale K, et al. Treatment of end-stage chronic obstructive pulmonary disease with double lung transplantation [J]. Chest, 1991, 99(3): 533-537.
- 28 Benito Bernáldez C, Almadana Pacheco V. Spontaneous regression of pulmonary emphysematous bulla [J]. Arch Bronconeumol, 2017, 53(6): 347-348.
- 29 Ding M, Gao YD, Dai L, et al. Endobronchial valves to treat a recurrent giant emphysematous bulla after bullectomy [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2016, 20(9): 1277-1278.
- 30 Topalovic M, Helsen T, Troosters T, et al. Unexpected improvements of lung function in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Respir Med Case Rep, 2016, 18: 81-84.
- 31 Gompelmann D, Herth FJ, Slebos DJ, et al. Pneumothorax following endobronchial valve therapy and its impact on clinical outcomes in severe emphysema [J]. Respiration, 2014, 87(6): 485-491.
- 32 Valipour A, Herth FJ, Burghuber OC, et al. Target lobe volume reduction and COPD outcome measures after endobronchial valve therapy [J]. Eur Respir J, 2014, 43(2): 387-396.
- 33 Argula RG, Strange C, Ramakrishnan V, et al. Baseline regional perfusion impacts exercise response to endobronchial valve therapy in advanced pulmonary emphysema [J]. Chest, 2013, 144(5): 1578-1586.
- 34 Herth FJ, Noppen M, Valipour A, et al. Efficacy predictors of lung volume reduction with Zephyr valves in a European cohort [J]. Eur Respir J, 2012, 39(6): 1334-1342.
- 35 Sciurba FC, Ernst A, Herth FJ, et al. A randomized study of endobronchial valves for advanced emphysema [J]. N Engl J Med, 2010, 363(13): 1233-1244.

(2017-08-11 收稿 2018-10-23 修回)

(上接第 337 页)

参考文献

- 1 Lié ñ án-Rico A, Turco F, Ochoa-Cortes F, et al. Molecular signaling and dysfunction of the human reactive enteric glial cell phenotype [J]. Inflamm Bowel Dis, 2016, 22(8): 1812-1834.
- 2 Sairenji T, Collins KL, Evans DV. An update on inflammatory bowel disease [J]. Prim Care, 2017, 44(4): 673-692.
- 3 Wang H, Bi C, Wang Y, et al. Selenium ameliorates Staphylococcus aureus-induced inflammation in bovine mammary epithelial cells by inhibiting activation of TLR2, NF-κB and MAPK signaling pathways [J]. BMC Vet Res, 2018, 14(1): 197.
- 4 Aschard H, Laville V, Tchetgen ET, et al. Genetic effects on the commensal microbiota in inflammatory bowel disease patients [J]. PLoS Genet, 2019, 15(3): e1008018.
- 5 Matsuoka K, Uemura Y, Kanai T, et al. Efficacy of bifidobacterium breve fermented milk in maintaining remission of ulcerative colitis [J]. Dig Dis Sci, 2018, 63(7): 1910-1919.
- 6 Ebrahimi T, Rust M, Kaiser SN et al. α1-antitrypsin mitigates NLRP3-inflammasome activation in amyloid β1-42-stimulated murine astrocytes [J]. J Neuroinflammation, 2018, 15(1): 282.
- 7 Lin R, Jiang Y, Zhao XY, et al. Four types of bifidobacteria trigger autophagy response in intestinal epithelial cells [J]. J Dig Dis, 2014, 15(11): 597-605.
- 8 Morales-Soto W, Gulbransen BD. Enteric glia: a new player in abdominal pain [J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2019, 7(2): 433-445.
- 9 Kong F, Ye B, Cao J, et al. Curcumin represses NLRP3 inflammasome activation via TLR4/MyD88/NF-κB and P2X7R signaling in PMA-induced macrophages [J]. Front Pharmacol, 2016, 10(7): 369.
- 10 Deng Y, Han X, Yao Z, et al. PPARα agonist stimulated angiogenesis by improving endothelial precursor cell function via a NLRP3 inflammasome pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(6): 2255-2266.
- 11 Lai M, Yao H, Shah SZA et al. The NLRP3-Caspase 1 inflammasome negatively regulates autophagy via TLR4-TRIF in prion peptide-infected microglia [J]. Front Aging Neurosci, 2018, 10: 116.
- 12 Cao Z, Fang Y, Lu Y. Melatonin alleviates cadmium-induced liver injury by inhibiting the TXNIP-NLRP3 inflammasome. [J]. J Pineal Res, 2017, 62(3): Epub.
- 13 Matsuoka K, Uemura Y, Kanai T, et al. Efficacy of bifidobacterium breve fermented milk in maintaining remission of ulcerative colitis [J]. Dig Dis Sci, 2018, 63(7): 1910-1919.
- 14 Kivit SD, Kostadinova AI, Kerperien JA, et al. Dietary, nondigestible oligosaccharides and bifidobacterium breve M-16V suppress allergic inflammation in intestine via targeting dendritic cell maturation [J]. J Leukoc Biol, 2017, 102(1): 105-115.
- 15 Quin C, Estaki M, Vollman DM, et al. Probiotic supplementation and associated infant gut microbiome and health: a cautionary retrospective clinical comparison [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 8283.
- 16 Shen NT, Maw A, Tmanova LL, et al. Timely use of probiotics in hospitalized adults prevents clostridium difficile infection: a systematic review with meta-regression analysis [J]. Gastroenterology, 2017, 152(8): 1889-1900.
- 17 Kurose Y, Minami J, Sen A, et al. Bioactive factors secreted by bifidobacterium breve B-3 enhance barrier function in human intestinal Caco-2 cells [J]. Benef Microbes, 2019, 10(1): 89-100.
- 18 Álvarez-Mercado AI, Navarro-Oliveros M, Robles-Sánchez C, et al. Microbial population changes and their relationship with human health and disease [J]. Microorganisms, 2019, 7(3): pii: E68.
- 19 Ganji-Arjenaki M, Rafieian-Kopaei M. Probiotics are a good choice in remission of inflammatory bowel diseases: A meta analysis and systematic review [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(3): 2091-2103.
- 20 Abraham BP, Quigley EMM. Probiotics in inflammatory bowel disease [J]. Gastroenterol Clin North Am, 2017, 46(4): 769-782.
- 21 Coqueiro AY, Raizel R, Bonvini A, et al. Probiotics for inflammatory bowel diseases: a promising adjuvant treatment [J]. Int J Food Sci Nutr, 2019, 70(1): 20-29.
- 22 Yang J, Yang H. Effect of bifidobacterium breve in combination with different antibiotics on clostridium difficile [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 2953.

(2019-04-03 收稿 2019-07-20 修回)