

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.13.004
文章编号: 1005-8982 (2019) 13-0018-07

降钙素相关基因肽在小鼠巨噬细胞 炎症调控中的作用研究

肖美芳, 林樟萍, 陆喆, 刘乾坤

(海南省妇幼保健院 检验科, 海南 海口 570206)

摘要: **目的** 探讨降钙素相关基因肽 (CGRP) 在炎症调控中的作用, 验证 CGRP 可通过活性氧簇-核苷酸结合低聚体结构域样受体 3 (ROS-NLRP3) 信号通路抑制小鼠巨噬细胞炎症因子的分泌。**方法** 实验分为对照组、脂多糖 (LPS) 100 ng/ml 组 (LPS 组)、CGRP 10 ng/ml 组 (CGRP 10 组)、CGRP 30 ng/ml 组 (CGRP 30 组)、CGRP 100 ng/ml 组 (CGRP 100 组) 及 CGRP 30 ng/ml+LPS 100 ng/ml 组 (CGRP 30+LPS 组)。作用 12 h 后, 分别收集各组细胞的培养上清, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测上清液中白细胞介素-1 β (IL-1 β) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的蛋白表达。同时收集各组细胞, 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 和炎症复合体 NLRP3 mRNA 的表达水平。流式细胞术检测各组细胞内活性氧簇 (ROS) 水平, Western blotting 检测 ROS-NLRP3 信号通路相关蛋白 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 及 TNF- α 的蛋白表达。**结果** 与对照组比较, LPS 组细胞中 IL-1 β 、TNF- α 及 NLRP3 mRNA 表达水平升高, 培养上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 的蛋白表达水平升高, 细胞内 ROS 水平升高, 且细胞内 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 及 TNF- α 的蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$); 与 LPS 组比较, CGRP 10 组、CGRP 30 组、CGRP 100 组、CGRP 30+LPS 组细胞中 IL-1 β 、TNF- α 及 NLRP3 mRNA 表达水平降低, 培养上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 蛋白表达水平降低, 细胞内 ROS 水平降低, 且细胞内 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 及 TNF- α 蛋白表达水平也降低, 所有指标中 CGRP 30 组降低最明显 ($P < 0.05$)。**结论** CGRP 可降低巨噬细胞内 ROS 和 NLRP3 的表达, 使炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 的释放减少, CGRP 可能在减弱局部炎症反应中发挥重要的调控作用。

关键词: 降钙素相关基因肽; 活性氧簇-核苷酸结合低聚体结构域样受体 3; 小鼠; 巨噬细胞; 炎症因子

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Role of CGRP in regulating inflammatory response of murine macrophages

Mei-fang Xiao, Zhang-ping Lin, Zhe Lu, Qian-kun Liu

(Department of Laboratory Medicine, Hainan Maternal and Child Health Care Hospital,
Haikou, Hainan 570206, China)

Abstract: Objective To investigate the role of calcitonin gene related peptide (CGRP) in inflammation regulation in mouse macrophages. **Methods** Mice were divided into control group, lipopolysaccharide (LPS) (100 ng/ml group, LPS group), CGRP (10 ng/ml group, CGRP 10 group), CGPR (30 ng/ml group, CGPR 30 group), CGRP (100 ng/ml, CGRP 100 group) and CGRP 30 ng/ml + LPS 100 ng/ml group (CGRP 30 + LPS group). After 12 h, cells and supernatants were collected. Expression of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Expression levels of IL-1 β , TNF- α and NLRP3

mRNA were detected by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). The levels of ROS in each group were detected by flow cytometry. The expression of ROS-NLRP3 signaling pathway associated protein NLRP3, Caspase-1, IL-1 β and TNF- α were detected by Western blotting. **Results** Compared with the control group, LPS group experienced increased levels of IL-1 β , TNF- α , NLRP3 mRNA, and ROS in cells, upregulated levels of IL-1 β and TNF- α protein in the cell supernatant, and enhanced levels of NLRP3, caspase-1, IL-1 β and TNF- α protein in cells, which were reversed with treatment of CGRP. Mice in CGRP30 group exerted the least levels of the mentioned markers. **Conclusions** CGRP inhibits the expressions of ROS and NLRP3 in macrophages, reducing the release of inflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α .

Key words: CGRP; ROS-NLRP3; mouse; macrophages; inflammatory factors

降钙素相关基因肽 (calcitonin gene related peptide, CGRP) 是由感觉神经元释放的一种肽类物质^[1]。已有研究证实 CGRP 具有显著的抗炎效果^[2-3], 其通过抑制 T 淋巴细胞的增殖, 并且抑制巨噬细胞产生促炎因子, 从而调节炎症反应^[4]。核苷酸结合低聚体结构域样受体 3 (nucleotides binding oligomer domain like receptors 3, NLRP3) 作为炎症反应中的炎症小体^[5], 主要在外周单核巨噬细胞和脑内小胶质细胞中表达^[6]。活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 被认为是最重要的激活炎症小体 NLRP3 的因素^[7-8]。NLRP3 炎症小体在 ROS 激活后能够活化半胱氨酸蛋白酶 -1 (Caspase-1), 使炎症因子成熟并释放到胞外以发挥作用^[9]。因此可推测 CGRP 可能作为调控者通过 ROS 使 NLRP3 活性降低, 从而减少局部炎症反应。基于此, 本研究对该推测进行验证。

1 材料与方法

1.1 实验试剂及仪器

大肠杆菌 0111:B4 的脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) (美国 Sigma 公司), CGRP (南京肽业生物科技有限公司), 兔抗 NLRP3、Caspase-1、白细胞介素 -1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 及肿瘤坏死因子 - α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 抗体 (美国 Santa 公司), 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (武汉博士德生物科技有限公司), Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司), Taq Man 逆转录试剂盒 (美国 Life Technologies 公司), 小鼠源性 IL-1 β 和 TNF- α 的酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂盒 (美国 EXCEL 公司), 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR) 试剂盒 (美国 Gene Copoeia 公司), Bio Rad IQTM 5 Multicolor 实时荧光定量系统 (美国 Bio Rad 公司), 紫外可见分光光度计 (美国 Thermo 公

司, 型号 Nanodrop 2000), Multiskan MK 3 酶标仪 (美国 Thermo), FACS Canto II 流式细胞仪 (美国 BD), 倒置荧光显微镜 Nikon IX71, Image-Pro Plus 7.0 成像系统 (日本 Olympus 公司)。

1.2 细胞培养、分组及处理方法

RAW264.7 巨噬细胞 (中国科学院上海细胞库), 所用培养液为含 10% FBS (杭州四季青生物材料有限公司), 含 100 u/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的双抗 α -MEM 培养基 (美国 Gibco 公司), 于 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳 CO₂ 培养箱中常规培养。当细胞生长至汇合度为 80% ~ 90% 时换 1 次液, 此时显微镜下观察到巨噬细胞生长形态正常, 呈梭形, 半贴壁生长 (见图 1)。实验分为对照组、脂多糖 (LPS) 100 ng/ml 组 (LPS 组)、CGRP 10 ng/ml 组 (CGRP 10 组)、CGRP 30 ng/ml 组 (CGRP 30 组)、CGRP 100 ng/ml 组 (CGRP 100 组) 和 CGRP 30 ng/ml+LPS 100 ng/ml 组 (CGRP 30+LPS 组), 加 LPS 或 CGRP 处理前将 FBS 含量降至 0.5%。每组设 3 个平行样, 重复 3 次。RAW264.7 巨噬细胞以 5×10^4 个/ml, 接种于 10 cm 细胞培养皿中 (总体积为 10 ml), 培养 24 h, 经 LPS 和 CGRP 刺激后, 收集细胞及培养上清液用于后续实验。

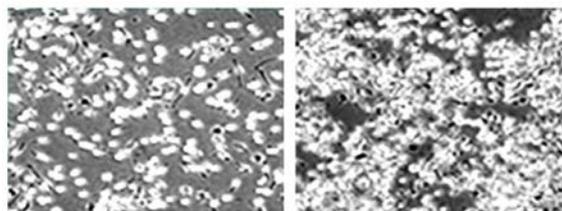


图 1 巨噬细胞的生长形态 (倒置荧光显微镜 $\times 100$)

1.3 RNA 提取和 qRT-PCR 检测

各加 100 μ l Trizol 裂解液到 6 孔板中, 常温静置后加入氯仿 140 μ l, 剧烈摇晃 15 s, 12 000 r/min 低温离心 15 min。取上层液体置于干净 EP 管中, 加入异

丙醇,混匀后室温放置 10 min。继以转速 7 500 r/min, 4℃离心 5 min 去上清。采用 1 ml 75% 乙醇洗涤沉淀,干燥后溶于 30 μl 无酶水,检测 RNA 浓度,剩余 RNA 放入冰箱保存备用。采用紫外可见分光光度计测定 A260/A280 比值,当比值在 1.8 ~ 2.0 时表示所提取的 RNA 可用于后续实验。以提取的细胞总 RNA 为模板,逆转录生成 cDNA,以 cDNA 为模板,根据基因数据库应用引物表达-2 软件设计引物序列,CGRP(M34090)正向引物:5'-GAGGCAGCTACAAGGTTTCAGG-3',反向引物:5'-AGGTGTTGGTGCTGGACACA-3'。管家基因 GAPDH 为内参,正向引物:5'-GGCCTCCGTGTC-CTACC-3',反向引物:5'-CGGCATGTCAGATCCACAAC-3'。PCR 反应体系 10 μl,反应条件:50℃预变性 3 min,95℃变性 10 s、60℃退火 30 s、72℃延伸 30 s,共循环 40 次,反应结束后采用分离曲线法确定反应产物的特异性。实验数据分析采用实时定量 PCR 循环阈值 Ct (cycle threshold, Ct) 比较法,以管家基因 GAPDH 的 Ct 为内参,mRNA 相对表达量为同一个样本 CGRP mRNA 的 Ct 值与 GAPDH mRNA 的 Ct 值之比。经实时荧光定量系统检测并记录实验结果。所有引物均由美国 Invitrogen 公司合成,其中 GAPDH 为内参, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 用于计算相对表达量, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{基因}} - Ct_{\text{GAPDH}})_{\text{目的基因}} - (Ct_{\text{基因}} - Ct_{\text{GAPDH}})_{\text{内参基因}}$ 。每个样品设置 3 个复孔,反应体系为 20 μl。

1.4 ELISA 检测

收集细胞培养上清液,根据 ELISA 检测试剂盒的说明书检测上清液中 IL-1β 和 TNF-α 的表达。按说明书的要求准备样品并将其加入试剂盒配套的 96 孔板中,随后加 IL-1β 和 TNF-α 抗体孵育。用洗涤液洗净,加显色底物及酶结合工作液、加终止液并混匀。最后在酶标仪上检测 450 nm 处的吸光度值并记录。据此绘制标准曲线,根据标准曲线计算并记录样品中 IL-1β 和 TNF-α 的浓度。

1.5 蛋白提取和 Western blotting

提取各组细胞总蛋白,采用 PBS 缓冲液冲洗 2 次,加入 1 ml RIPA 蛋白裂解液,充分接触后刮下细胞,摇动 30 min 使细胞完全裂解,12 000 r/min 离心 5 min 后收集上清液,BCA 法检测各组细胞的蛋白浓度。分别取 30 μg 样本进行 SDS-PAGE 凝胶电泳实验,将蛋白转移至 PVDF 膜上,5% BSA 室温封闭 1 ~ 2 h,加入 1 : 10 000 的兔抗人 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、

TNF-α 及 1 : 1 000 兔抗人 β-actin 抗体,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入 1 : 1 000 的羊抗兔二抗,室温孵育 1 h。加入 ECL 发光剂后保存条带图片。以目的蛋白条带的灰度值和内参 β-actin 蛋白条带的灰度值比值来确定目的蛋白的相对表达水平,每组实验设置 3 个复孔。

1.6 流式细胞术检测 ROS 水平

将 RAW264.7 巨噬细胞接种于 24 孔细胞培养板中,按实验分组分别给予不同浓度的 CGRP 或 LPS 处理。在无血清培养基中培养 24 h 后去除培养基,消化离心收集细胞放入 EP 管,PBS 洗 1 次,用无血清培养液按 1 000 : 1 配制 DCFH-DA,每个样本加 1 ml 工作液重悬。将 EP 管放入培养箱,孵育 30 min,每隔 3 ~ 5 min 颠倒混匀 1 次,离心收集细胞,PBS 洗 3 次,弃上清,1 ml PBS 重悬后上机检测(美国 FACScan 公司,BD)(激发光为氩离子激光,488 nm)。最后在流式细胞仪检测、FlowJo 软件(Tree Star)分析并绘制曲线。各组所检测的活细胞数均 $\geq \times 10^4$ 个。

1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,均通过正态性检验,组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 IL-1β、TNF-α 和 NLRP3 mRNA 的表达水平比较

6 组 IL-1β、TNF-α、NLRP3 mRNA 表达水平比较,差异有统计学意义($F = 26.649$ 、 11.439 和 17.502 ,均 $P = 0.000$)。与对照组比较,LPS 组 IL-1β、TNF-α、NLRP3 mRNA 的表达水平升高,差异有统计学意义($t = 4.675$ 、 2.631 和 3.121 , $P = 0.001$ 、 0.022 和 0.009);与 LPS 组比较,CGRP 10 组、CGRP 30 组、CGRP 100 组、CGRP 30+LPS 组的 IL-1β、TNF-α 和 NLRP3 的 mRNA 表达水平均降低(IL-1β: $t = 8.483$ 、 10.591 、 7.363 和 6.335 ,均 $P = 0.000$;TNF-α: $t = 4.369$ 、 6.767 、 5.726 和 3.955 , $P = 0.001$ 、 0.000 、 0.000 和 0.002 ;NLRP3: $t = 6.374$ 、 8.640 、 5.546 和 4.335 , $P = 0.000$ 、 0.000 、 0.000 和 0.001),且 CGRP 30 组最低。见表 1 和图 2。

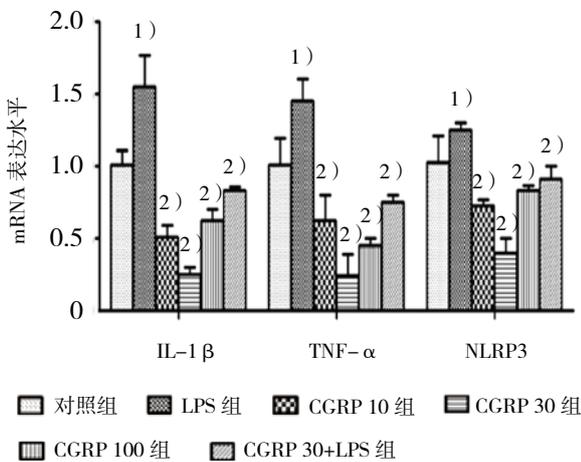
2.2 各组 IL-1β 和 TNF-α 的蛋白表达水平比较

6 组 IL-1β 和 TNF-α 蛋白表达水平比较,

表 1 各组 IL-1 β 、TNF- α 和 NLRP3 mRNA 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β	TNF- α	NLRP3
对照组	1.00 \pm 0.15	1.01 \pm 0.29	1.00 \pm 0.20
LPS 组	1.62 \pm 0.32 ¹⁾	1.46 \pm 0.19 ¹⁾	1.29 \pm 0.05 ¹⁾
CGRP10 组	0.50 \pm 0.10 ²⁾	0.71 \pm 0.25 ²⁾	0.71 \pm 0.05 ²⁾
CGRP30 组	0.22 \pm 0.05 ²⁾	0.30 \pm 0.24 ²⁾	0.50 \pm 0.14 ²⁾
CGRP100 组	0.65 \pm 0.11 ²⁾	0.48 \pm 0.10 ²⁾	0.78 \pm 0.01 ²⁾
CGRP30+LPS 组	0.78 \pm 0.10 ²⁾	0.78 \pm 0.11 ²⁾	0.89 \pm 0.10 ²⁾
F 值	26.649	11.439	17.502
P 值	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 LPS 组比较, $P < 0.05$



1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 LPS 组比较, $P < 0.05$

图 2 CGRP 对细胞中 IL-1 β 、TNF- α 和 NLRP3 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

差异有统计学意义 ($F = 14.564$ 和 30.796 , 均 $P = 0.000$)。LPS 组 IL-1 β 和 TNF- α 的蛋白表达水平与对照组比较, 差异有统计学意义 ($t = 5.351$ 和 7.886 , 均 $P = 0.000$), LPS 组 IL-1 β 和 TNF- α 的蛋白表达水平升高。CGRP10 组、CGRP30 组、CGRP100 组、CGRP30+LPS 组 IL-1 β 和 TNF- α 的蛋白表达水平与 LPS 组比较, 差异有统计学意义 (IL-1 β : $t = 6.464$ 、 7.172 、 5.495 和 2.642 , $P = 0.000$ 、 0.000 、 0.000 和 0.021 ; TNF- α : $t = 9.563$ 、 10.542 、 8.133 和 4.315 , $P = 0.000$ 、 0.000 、 0.000 和 0.001), CGRP10 组、CGRP30 组、CGRP100 组、CGRP30+LPS 组 IL-1 β 和 TNF- α 的蛋白表达水平均降低, 且 CGRP30 组最低。见表 2 和图 3。

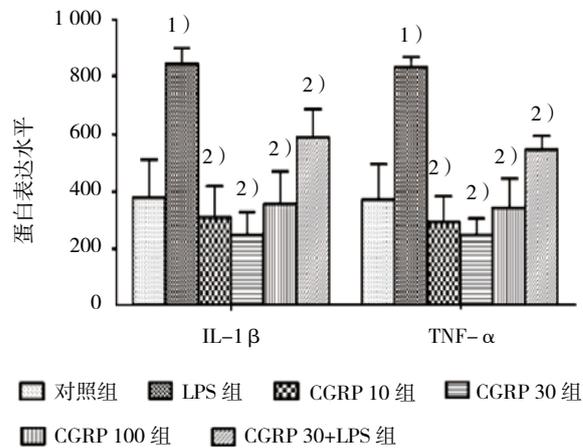
2.3 各组细胞的 ROS 水平比较

6 组 ROS 水平比较, 差异有统计学意义 ($F =$

表 2 各组 IL-1 β 和 TNF- α 的蛋白表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β	TNF- α
对照组	389.82 \pm 157.83	384.29 \pm 132.61
LPS 组	812.98 \pm 51.01 ¹⁾	811.61 \pm 32.11 ¹⁾
CGRP10 组	300.76 \pm 95.10 ²⁾	294.77 \pm 59.86 ²⁾
CGRP30 组	241.40 \pm 83.73 ²⁾	240.76 \pm 30.52 ²⁾
CGRP100 组	375.29 \pm 97.38 ²⁾	369.85 \pm 59.27 ²⁾
CGRP30+LPS 组	606.46 \pm 73.05 ²⁾	581 \pm 24.31 ²⁾
F 值	14.564	30.796
P 值	0.000	0.000

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 LPS 组比较, $P < 0.05$



1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 LPS 组比较, $P < 0.05$

图 3 CGRP 对细胞培养上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

52.623, $P = 0.000$)。LPS 组 ROS 水平与对照组比较, 差异有统计学意义 ($t = 5.368$, $P = 0.000$), LPS 组 ROS 水平升高。CGRP 10 组、CGRP 30 组、CGRP 100 组、CGRP 30+LPS 组 ROS 水平与 LPS 组比较, 差异均有统计学意义 ($t = 8.496$ 、 14.197 、 6.741 和 5.593 , 均 $P = 0.000$), CGRP 10 组、CGRP 30 组、CGRP 100 组、CGRP 30+LPS 组 ROS 水平均降低, 且 CGRP30 组最低。见表 3 和图 4。

2.4 各组 ROS-NLRP3 信号通路相关蛋白的表达

6 组 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 和 TNF- α 的蛋白表达水平比较, 差异有统计学意义 ($F = 58.374$ 、 62.779 、 127.711 和 114.531 , 均 $P = 0.000$)。与对照组 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 和 TNF- α 的蛋白表达水平比较, LPS 组的 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 和

表 3 各组 ROS 水平的比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	ROS
对照组	33.24 ± 1.81
LPS 组	37.80 ± 1.99 ¹⁾
CGRP10 组	21.91 ± 2.93 ²⁾
CGRP30 组	11.25 ± 1.98 ²⁾
CGRP100 组	25.19 ± 3.24 ²⁾
CGRP30+LPS 组	27.34 ± 1.13 ²⁾
F 值	52.623
P 值	0.000

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 LPS 组比较, $P < 0.05$

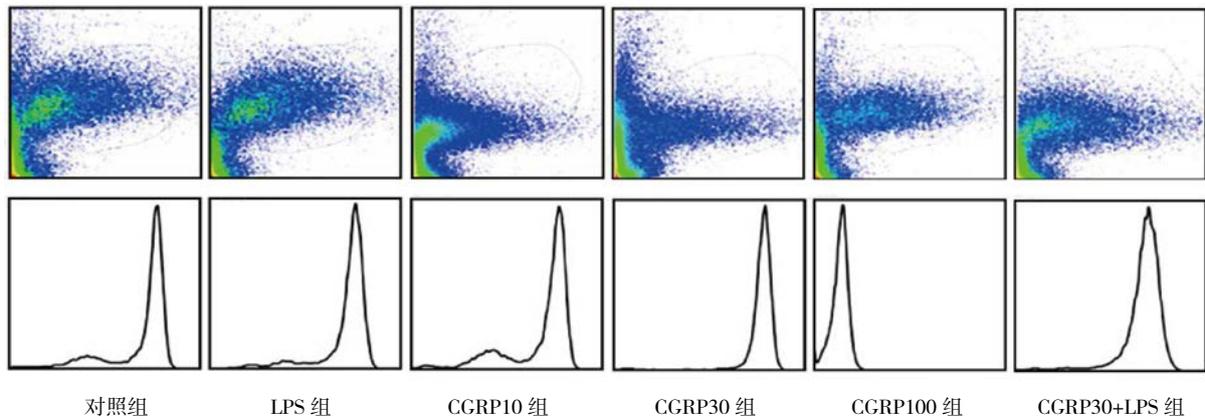


图 4 CGRP 对细胞内 ROS 水平的影响

表 4 各组 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 和 TNF- α 蛋白表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

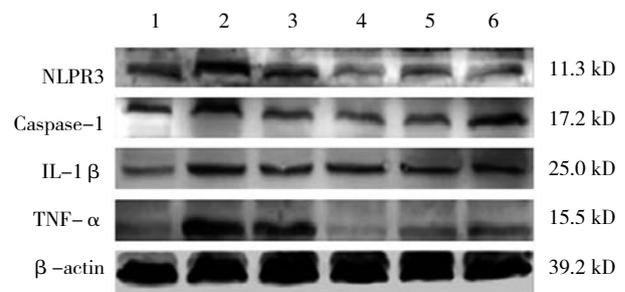
组别	NLRP3	Caspase-1	IL-1 β	TNF- α
对照组	0.62 ± 0.10	0.90 ± 0.08	0.61 ± 0.15	0.41 ± 0.12
LPS 组	2.12 ± 0.20 ¹⁾	2.00 ± 0.12 ¹⁾	3.21 ± 0.08 ¹⁾	3.03 ± 0.29 ¹⁾
CGRP10 组	1.10 ± 0.15 ²⁾	1.20 ± 0.09 ²⁾	2.10 ± 0.14 ²⁾	1.50 ± 0.22 ²⁾
CGRP30 组	0.50 ± 0.08 ²⁾	0.81 ± 0.12 ²⁾	1.58 ± 0.19 ²⁾	0.30 ± 0.08 ²⁾
CGRP100 组	0.71 ± 0.15 ²⁾	0.89 ± 0.08 ²⁾	2.21 ± 0.12 ²⁾	0.50 ± 0.11 ²⁾
CGRP30+LPS 组	0.80 ± 0.08 ²⁾	1.01 ± 0.08 ²⁾	2.41 ± 0.08 ²⁾	0.63 ± 0.10 ²⁾
F 值	58.374	62.779	127.711	114.531
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 LPS 组比较, $P < 0.05$

3 讨论

炎症反应常常是由抗原或异物的入侵、感染等引起的, 该过程中会释放多种生物活性物质^[10]。脑损伤时巨噬细胞和中性粒细胞常在发生损伤的部位聚

TNF- α 的蛋白表达水平均升高 ($t = 13.557$ 、 13.815 、 23.863 和 18.779 , 均 $P = 0.000$), 与 LPS 组比较, CGRP 10 组、CGRP 30 组、CGRP 100 组、CGRP 30+LPS 组的 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 和 TNF- α 的蛋白表达水平均降低 (NLRP3: $t = 9.164$ 、 14.692 、 12.729 和 11.964 , 均 $P = 0.000$; Caspase-1: $t = 10.047$ 、 15.045 、 13.952 和 12.454 , 均 $P = 0.000$; IL-1 β : $t = 10.173$ 、 14.920 、 9.185 和 7.321 , 均 $P = 0.000$; TNF- α : $t = 10.958$ 、 19.548 、 18.140 和 17.222 , 均 $P = 0.000$), 且 CGRP30 组最低。见表 4 和图 5。



1: 对照组; 2: LPS 组; 3: CGRP10 组; 4: CGRP30 组; 5: CGRP100 组; 6: CGRP30+LPS 组

图 5 细胞内 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 和 TNF- α 蛋白的表达

集, 另外血浆蛋白也会在损伤部位产生免疫反应^[11]。炎症反应也可引发多种包括无病原体感染的肥胖、心血管疾病、糖尿病或癌症等。炎症反应可产生于机体各组织、器官的常见临床病理过程, 是机体与致炎因子进行抗争的规律反应^[12]。以炎症反应常发生的骨折愈合过程为例, 在骨折愈合的血肿机化期, 大量炎症细胞浸润, 开始吞噬和清除坏死组织, 同时骨折处的

骨外膜增殖分化成骨细胞使血肿机化^[13]。巨噬细胞是主要免疫细胞之一, NLRP3 是感病病原体 and 危险信号的多蛋白复合物。免疫细胞中的 NLRP3 活化可激活 Caspase-1, 进一步诱导 IL-1 β 和 TNF- α 等下游炎症因子的加工与释放。而 T 细胞、NF- κ B 和 MAPK 等信号通路均可被成熟的 IL-1 β 活化, 启动先天性免疫应答, 从而清除病原体。即在宿主先天性免疫反应中 NLRP3 活化发挥极其重要的作用^[14-15]。

NLRP3 炎症复合体能被多种激活剂激活, 而活性氧 ROS 则是激活 NLRP3 的关键。已有研究表明线粒体内 ROS 是调控 NLRP3 活化的关键, ROS 生成过程若发生自吞噬抑制, 则 NLRP3 激活被抑制, 自吞噬过程被抑制或发生障碍则 NLRP3 被激活。此外, 炎症细胞同时分泌大量的细胞因子, 如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 和 TNF- β 等, 刺激成纤维细胞增殖分化、胶原蛋白及血管生成^[16]。而促炎因子如 IL-1 β 、TNF- α 的过表达可显著延长炎症期及创面愈合的时间^[17]。因此寻找抑制 ROS-NLRP3 通路的分子将可能抑制促炎因子 IL-1 β 和 TNF- α 等的释放, 从而为临床各种炎症反应的治疗提供新的思路。

CGRP 为典型的神经肽类, 在加速骨折愈合中扮演着关键的角色, 其对骨细胞有促进作用^[18]。本研究分别以不同浓度的 CGRP 处理小鼠来源的巨噬细胞 RAW264.7, 检测 CGRP 对 NLRP3 炎症复合体及其下游通路相关的炎症因子活化的影响。通过与对照组或 LPS 组的比较, 反映出细胞或培养上清中 NLRP3、IL-1 β 、TNF- α 或 ROS 水平的变化, 验证 CGRP 可抑制细胞内及细胞上清中炎症复合体 NLRP3 mRNA 及蛋白表达水平, 以及抑制 ROS-NLRP3 通路下游相关的炎症因子或蛋白 IL-1 β 、TNF- α 和 Caspase-1 的 mRNA 和蛋白表达, 且参与抑制细胞内 ROS 水平的变化过程。以上研究结果与 AUBDOOL^[19] 和李翔等^[20] 的研究相一致, 即巨噬细胞中 CGRP 也可通过调控细胞内 ROS 使 NLRP3 的活性降低, 从而使 ROS-NLRP3 信号通路下游的 IL-1 β 和 TNF- α 等炎症因子的释放减少, 下游通路相关蛋白 Caspase-1 的表达降低, 从而可能在减少局部炎症反应中起到重要作用。

综上所述, 本研究初步阐明 CGRP 对 NLRP3 炎症小体及下游炎症因子激活的调节作用, 该研究可能为如何减少炎症反应(如加快骨折愈合、伤口愈合等)提供新的临床治疗思路。

参 考 文 献:

- [1] IYENGAR S, OSSIPOV M H, JOHNSON K W. The role of calcitonin gene-related peptide in peripheral and central pain mechanisms including migraine[J]. *Pain*, 2017, 158(4): 543-559.
- [2] 刘丽辉, 石亮, 王岩, 等. CGRP 对 UUO 小鼠肾组织间质纤维化与炎症因子表达的干预作用[J]. *河北医药*, 2017, 39(4): 540-544.
- [3] NOORI N M, TEIMOURI A, SHAHRAMIAN I. Comparison between brain natriuretic peptide and calcitonin gene-related peptide in children with dilated cardiomyopathy and controls[J]. *Niger Med J*, 2017, 58(1): 37-43.
- [4] 王芳, 周祥群, 付洁. 降钙素基因相关肽对脂多糖诱导血管平滑肌细胞 TLR4/NF- κ B 及炎症因子表达的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2017, 27(21): 12-17.
- [5] LEBRETON F, BERISHVILI E, PARNAUD G, et al. NLRP3 inflammasome is expressed and regulated in human islets[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(7): 726.
- [6] LANG T, LEE J P W, ELGASS K, et al. Macrophage migration inhibitory factor is required for NLRP3 inflammasome activation[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2223.
- [7] ZOU H H, YANG P P, HUANG T L, et al. Author correction: PLK2 plays an essential role in high D-Glucose-induced apoptosis, ROS generation and inflammation in podocytes[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 4237.
- [8] 郑健豪, 钟继红, 曹海军, 等. 雷公藤多苷通过 NOXs-ROS-NLRP3 炎症小体信号通路抑制结肠炎症[J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(9): 1653-1659.
- [9] 黄晨恺, 甘达凯, 张望, 等. 熊果酸对肝纤维化大鼠 NOX2/ROS/NLRP3 炎症小体活化的影响[J]. *基础医学与临床*, 2018, 38(4): 485-491.
- [10] ATTAR A, MARZBAN P, MOAREF A, et al. The association of plasma high-sensitivity C-reactive protein level with rheumatic heart disease: the possible role of inflammation[J]. *Indian Heart J*, 2018, 70(3): 346-349.
- [11] ERTÜRK A, MENTZ S, STOUT E E, et al. Interfering with the chronic immune response rescues chronic degeneration after traumatic brain injury[J]. *J Neurosci*, 2016, 36(38): 9962-9975.
- [12] 解晓蕊, 李晓莉, 杨朴, 等. 尼可地尔联合阿托伐他汀对冠状动脉慢血流患者炎症反应, 血管内皮功能的影响及安全性分析[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(34): 6705-6708.
- [13] SCHNEIDER P S, SANDMAN E, MARTINEAU P A. Osteoimmunology: effects of standard orthopaedic interventions on inflammatory response and early fracture healing[J]. *J Am Acad Orthop Surg*, 2018, 26(10): 343-352.
- [14] TANG P, ZHU R, JI W P, et al. The NLRP3/Caspase-1/Interleukin-1 β axis is active in human lumbar cartilaginous endplate degeneration[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2016, 474(8): 1818-1826.
- [15] WANG Z, MENG S, CAO L, et al. Critical role of NLRP3-caspase-1 pathway in age-dependent isoflurane-induced microglial inflammatory response and cognitive impairment[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 109.

- [16] 张涵, 马晶, 张云凌, 等. 肺炎支原体经 ROS 激活 NLRP3 炎性体诱导 RAW264.7 细胞分泌 IL-1 β [J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(12): 2244-2248.
- [17] CHO N, RAZIPOUR S E, MCCAIN M L. Featured article: TGF- β 1 dominates extracellular matrix rigidity for inducing differentiation of human cardiac fibroblasts to myofibroblasts[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2018, 243(7): 601-612.
- [18] TANG P, DUAN C, WANG Z, et al. NPY and CGRP inhibitor influence on ERK pathway and macrophage aggregation during fracture healing[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(4): 1457-1467.
- [19] AUBDOOL A A, THAKORE P, ARGUNHAN F, et al. A novel α -calcitonin gene-related peptide analogue protects against end-organ damage in experimental hypertension, cardiac hypertrophy, and heart failure[J]. *Circulation*, 2017, 136(4): 367-383.
- [20] 李翔, 何跃平, 刘胜, 等. 幽门螺杆菌经 ROS 通路激活 NLRP3 炎症复合体诱导 THP-1 细胞分泌 IL-1 β 和 IL-18[J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(3): 308-313.

(张西倩 编辑)