

网络出版时间:2022-12-26 17:42:14 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail//34.1065.r.20221226.1523.021.html

## NLRP3 炎症小体介导的巨噬细胞极化在 ITP 中的作用

宋传龙, 海力其古丽·努日丁, 焦红杰, 王学梅, 严 媚

**摘要** 目的 探讨在免疫性血小板减少症(ITP)中 NLRP3 炎症小体的活化水平及抑制 NLRP3 介导的炎症小体活化对 M1 型巨噬细胞极化与免疫功能的影响。方法 RT-qPCR 法检测 ITP 患者(ITP 组)和健康对照组(Control 组)外周血单个核细胞(PBMC)与 CD14<sup>+</sup> 单核细胞中 NLRP3 mRNA 的表达;ELISA 法检测两组血清中 IL-1 $\beta$  与 IL-18 的含量;Pearson 相关系数分析 NLRP3、IL-1 $\beta$  与 IL-18 表达水平与血小板计数的相关性;将 ITP 患者来源的 M0 型巨噬细胞(MDMs)分为 4 组:IgG 对照组(IgG 组),MCC950 处理组(MCC950 组),LPS、IFN- $\gamma$  与 IgG 处理组(LPS + IFN- $\gamma$  + IgG 组)和 LPS、IFN- $\gamma$  与 MCC950 处理组(LPS + IFN- $\gamma$  + MCC950 组);RT-qPCR 与 Western blot 检测 4 组 MDMs 中 M1 型巨噬细胞标志物 CD86、iNOS、MCP-1 mRNA 与蛋白水平;Western blot 检测各组 MDMs 中 NLRP3 炎症小体相关蛋白 NLRP3、ASC、cleaved caspase-1 与 IL- $\beta$  的表达;流式细胞术检测各组 MDMs 对血小板的吞噬能力,CFSE 法检测各组 MDMs 对 CD4<sup>+</sup>T 与 CD8<sup>+</sup>T 的增殖影响。结果 与 Control 组相比,

ITP 组 NLRP3 mRNA 水平和 IL-1 $\beta$  与 IL-18 含量均升高( $P < 0.05$ );ITP 患者中血小板计数与 NLRP3、IL-1 $\beta$  和 IL-18 呈负相关关系( $P < 0.05$ )。与 IgG 组相比,LPS + IFN- $\gamma$  + IgG 组与 LPS + IFN- $\gamma$  + MCC950 组细胞中 CD86、iNOS、MCP-1 的 mRNA 与蛋白表达水平增加( $P < 0.05$ ),NLRP3、ASC、cleaved caspase-1、IL- $\beta$  蛋白表达与血小板吞噬能力和对 CD4<sup>+</sup>T 与 CD8<sup>+</sup>T 细胞的增殖促进能力升高( $P < 0.05$ ),而与 LPS + IFN- $\gamma$  + IgG 组相比,LPS + IFN- $\gamma$  + MCC950 组细胞中上述检测指标均降低( $P < 0.05$ )。结论 在 ITP 中 NLRP3 炎症小体活化水平升高,且与 MDMs 的过度 M1 型极化相关,而抑制 NLRP3 介导的炎症小体活化可改善巨噬细胞的 M1 型极化与免疫功能。

**关键词** 免疫性血小板减少症;NLRP3 炎症小体;M1 型巨噬细胞

**中图分类号** R 725.5

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2023)01-0132-08  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.01.022

2022-09-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82160031)

作者单位:新疆医科大学第一附属医院儿内一科,乌鲁木齐 830054

作者简介:宋传龙,男,住院医师,博士研究生;

严 媚,女,主任医师,教授,博士,责任作者,E-mail:

yan10mei25@163.com

免疫性血小板减少症(immune thrombocytopenia, ITP)是一种儿童常见的自身免疫性疾病<sup>[1]</sup>。巨噬细胞既是效应细胞,吞噬血小板,又是抗原递呈细胞,可刺激 B 细胞产生针对血小板的自身抗体<sup>[2]</sup>。而在 ITP 中,研究<sup>[3]</sup>证实,巨噬细胞具有向促

**Methods** The growth state of bacteria was investigated under an inverted microscope; Their morphological characteristics were analyzed by Gram and auramine O staining as well as electron microscopy; 16S rDNA gene sequencing was used to analyze bacterial species; Drug sensitivity test was used to screen antibiotics against the bacteria; Cryopreserved SH-SY5Y cells were resuscitated by cell culture supernatant of RAW264 cells. **Results** Inverted microscopic real-time observations showed that black dot-like substances had two growth states: static and moving. They were negative for Gram staining while positive for auramine O staining. Electron microscopy revealed that they were short rod-shaped bacteria with a polar flagellum during moving phase. 16S rDNA gene sequencing showed that these bacteria were *phenylobacterium zucineum* HLK1. Ceftriaxone, carboxycillin and imipenem were screened by drug sensitivity test to have inhibitory effects on the bacteria, but cell culture experiments showed that they could not remove the bacteria from SH-SY5Y cells. Contaminated cells could not be cryopreserved for a long time, but resuscitation with RAW264.7 cell culture supernatant significantly improved the survival rate of cells. **Conclusion** The black dot-like contaminants in cell cultures are a special type of oligotrophic bacterium with strong viability that can invade the cells and cannot be cleared with antibiotic treatment. RAW264.7 cell culture supernatant seems contain some substances against bacteria, and resuscitating frozen cells with RAW264.7 cell culture supernatant may significantly improve the survival rate of cells.

**Key words** SH-SY5Y cells; cell culture; monocyte-macrophage system; bacterial contamination

炎作用的经典激活巨噬细胞(classically activated macrophages, M1)型异常极化的现象,且患者体内单核细胞来源的巨噬细胞(monocyte-derived macrophages, MDMs)的免疫反应显著增强。炎症复合体被认为在ITP的免疫紊乱中发挥着关键作用,其中NOD样受体蛋白3(NOD-like receptor pyrin domain-containing protein 3, NLRP3)炎症小体的研究最为广泛<sup>[4]</sup>。作为模式识别受体家族成员的NLRP3则主要表达于巨噬细胞中,且与巨噬细胞表型极化密切相关<sup>[5]</sup>。因此,该研究探索了抑制NLRP3在ITP中对巨噬细胞M1型极化与其免疫功能的影响,以期进一步阐明ITP患者体内免疫紊乱的发生机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病例资料** 收集自2019年1月至2021年10月至我院就诊的活动性ITP患儿37例(ITP组),其中男性15例,女性22例,年龄范围3个月~14岁( $8.12 \pm 0.49$ )岁,血小板范围 $27 \times 10^9/L \sim 80 \times 10^9/L$ ,中位血小板计数为 $38.91 \times 10^9/L$ 。另选同时期年龄、性别相匹配的健康体检儿童37例为正常对照组(Control组),血小板范围 $161 \times 10^9/L \sim 381 \times 10^9/L$ ,中位计数为 $252.9 \times 10^9/L$ 。纳入标准:①ITP的诊断标准符合2011年美国血液学会指南推荐的ITP临床诊断标准<sup>[6]</sup>;②ITP患者在4周内未接受相关治疗;③所有受试者1个月内未使用激素或免疫抑制剂等药物治疗;④排除合并肝、肾、心、肺、血液系统、内分泌系统、急慢性感染及免疫相关疾病的受试者。本研究经我院医学伦理委员会批准,所有患儿家属及监护人均签署书面知情同意书。

**1.1.2 主要试剂与仪器** RPMI-1640培养基(美国Hyclone公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(美国Gibco公司);重组人巨噬细胞集落刺激因子(recombinant human macrophage colony stimulating factor, h-M-CSF)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、干扰素- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , INF- $\gamma$ )、荧光染料羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯(Hydroxyfluorescein diacetate succinimide ester, CFSE)(美国Sigma公司)、NLRP3抑制剂MCC950(美国Peptrotech公司);人IgG(美国R&D公司);APC标记的CD14与CD42抗体、PE/Cy7标记的CD8抗体(美国Biolegend公司);小鼠抗CD86、MCP-1、cleaved caspase-1、iNOS、CD41抗体(美国Abcam公司);小鼠抗NLRP3、凋亡相关点样蛋白(apoptosis-associated point-like pro-

teins, ASC)、白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、GAPDH抗体(美国Cell Signaling Technology公司);RIPA细胞裂解液、蛋白酶抑制剂、兔抗小鼠IgG、加强型化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂盒(北京索莱宝科技公司);辣根过氧化物酶标记的二抗(上海碧云天生物科技公司);IL-1 $\beta$ 与IL-18的ELISA检测试剂盒(武汉博士德生物技术有限公司);DNA染色剂LDS-751、TRIzol试剂、BCA蛋白定量试剂盒(美国Invitrogen公司);包被CD14、CD4与CD8抗体的磁珠分选试剂盒、磁力架、磁珠分选柱(德国Miltenyi Biotec公司);反转录试剂盒,SYBR Green Real-time PCR(日本Takara公司);RT-qPCR引物设计与合成(上海生工);凝胶成像系统、RT-qPCR仪(美国Bio-Rad公司);流式细胞仪FACS-Calibur(美国Thermo公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 外周血单个核细胞、CD14<sup>+</sup>单核细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞与CD8<sup>+</sup>T细胞的分选** 使用含EDTA的真空抗凝管收集Control组与ITP组患者肘静脉血7 ml, 1 500 r/min离心10 min,吸取上层血浆置于-80℃冰箱保存,取底层细胞沉淀,利用Ficoll-Hypaque密度梯度离心法进行分离外周血中的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。按操作说明书方法分别使用CD14、CD4、CD8抗体包被的免疫磁珠分选试剂盒,分选上述收集的PBMC中的CD14<sup>+</sup>单核细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞与CD8<sup>+</sup>T细胞,并使用流式细胞术检测分离后的细胞的纯度。

#### 1.2.2 ELISA检测外周血中IL-1 $\beta$ 与IL-18的表达

取方法1.2.1中收集的血浆样本,按试剂盒说明书方法检测两组受试者外周血中IL-1 $\beta$ 、IL-18的表达水平。实验单独重复3次。

**1.2.3 CD14<sup>+</sup>单核细胞的处理与分组** 取方法1.2.1中收集的ITP患者的CD14<sup>+</sup>单核细胞,计数后按 $5 \times 10^5$ 个/ml接种至12孔板中,使用含100 ng/ml的h-M-CSF与10% FBS的RPMI-1640培养基,并置于37℃、5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱中进行培养。隔天更换培养液,连续培养6 d以诱导细胞向单核细胞来源的M0型巨噬细胞(monocyte-derived macrophages, MDMs)分化。按处理的不同将上述MDMs分为4组:使用含20 ng/ml的人IgG处理的对照组(IgG组);按参考文献<sup>[7]</sup>方法使用20 ng/ml的NLRP3抑制剂MCC950处理的MCC950组;按参考文献<sup>[8]</sup>方法使用100 ng/ml的LPS与20 ng/ml的IFN- $\gamma$ 进行联合诱导MDMs向M1型巨噬细胞分化,

并给予 20 ng/ml 人 IgG 处理的 LPS + IFN- $\gamma$  + IgG 组;使用 100 ng/ml 的 LPS、20 ng/ml 的 IFN- $\gamma$  与 20 ng/ml 的 NLRP3 抑制剂 MCC950 处理的 LPS + IFN- $\gamma$  + MCC950 组。上述各组 MDMs 细胞置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养 24 h 后用于后续实验。

**1.2.4 RT-qPCR 实验** 使用 TRIzol 试剂提取待测细胞中的总 RNA,并根据反转录试剂盒说明书将其逆转录为 cDNA。按照 SYBR Green Real-time PCR 试剂盒使用方法在 RT-qPCR 仪上进行检测目的基因的 mRNA 表达量。RT-qPCR 的反应流程为:95 °C 预变性 60 s,95 °C 变性 10 s,60 °C 退火/延伸 20 s,40 个循环周期。RT-qPCR 引物序列见表 1。以 GAPDH 为内参,按  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算分析目标基因 mRNA 的相对表达水平。

表 1 RT-qPCR 的引物序列

| 基因    | 引物序列(5'-3')                                            |
|-------|--------------------------------------------------------|
| NLRP3 | F:TCTGAAGAAGCTCTGCTTGGT<br>R:GTCTGCTCAGGGAATGGCTC      |
| CD86  | F:TCAATGGGACTGCATATCTGCC<br>R:GCCAAAATACTACCAGCTCACT   |
| iNOS  | F:ACATCGACCCGTCCACAGTAT<br>R:CAGAGGGTAGGCTTGTCTC       |
| MCP-1 | F:TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA<br>R:GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT |
| GAPDH | F:AGGTCGGTGTGAACGGATTTC<br>R:GGGTCGTTGATGGCAACA        |

**1.2.5 血小板的分离与处理** 按参考文献<sup>[9]</sup>使用荧光染料 CMFDA 标记从 Control 组受试者外周血中分离的血小板,简述如下:取 Control 组受试者的抗凝血外周血,1 500 r/min 离心 10 min,取上层富含血小板的血浆组织,3 500 r/min 离心 5 min,底层沉淀即为所需血小板组织。加入 5  $\mu$ mol/L 的前列腺素 E1 以抑制血小板的聚集,并调整血小板密度至  $1 \times 10^9$ /ml 后加入 10  $\mu$ mol/L 的 CMFDA 荧光染料,37 °C 避光孵育 30 min 后,PBS 进行离心洗涤。随后,在上述 CMFDA 标记的血小板中加入终浓度为 10  $\mu$ g/ml 的小鼠抗人 CD41 抗体以更好地促进 MDMs 的吞噬能力,室温下避光孵育 30 min 后用于后续的吞噬实验。

**1.2.6 MNMs 吞噬实验** 参考文献方法<sup>[10]</sup>进行检测 MDMs 对血小板的吞噬能力。具体如下:将上述 CMFDA 荧光染料标记的血小板与各组 MDMs 按 5 : 1 进行混合,室温下 1 500 r/min 离心 1 min 以充分混匀,置于 37 °C 孵育反应 1 h 后,再加入含 0.5

mmol/L EDTA 与 0.05% 胰蛋白酶的 PBS 溶液室温下孵育 5 min 以去除游离的血小板,随后使用含 5 mmol/L EDTA 的 PBS 溶液收集各组 MDMs,0.1% 的台盼蓝淬灭细胞外荧光后,4 °C 下 1 500 r/min 离心 10 min,收集底层细胞,并加入 DNA 染色剂 LDS-751 进行染核。离心洗涤并重悬细胞后上机分析 MDMs 中的血小板荧光,以吞噬指数(phagocytic index, PHI)代表各组 MNMs 的吞噬能力,PHI = 100 个 MDMs 吞噬的血小板数量/100。实验单独重复 3 次。

**1.2.7 T 细胞增殖检测** 按方法 1.2.3 进行处理来源于 ITP 患者的 CD14<sup>+</sup> 单核细胞 24 h 后,分别加入 CFSE 荧光染料标记的 CD4<sup>+</sup> T 细胞与 CD8<sup>+</sup> T 细胞,并置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中进行共培养,隔天更换含 10% FBS 的 RPMI-1640 的培养基 1 次,连续培养 6 d 后,收集各组细胞,分别加入 APC 标记的 CD4 与 PE/Cy7 标记的 CD8 抗体进行流式分析。上述实验单独重复 3 次。

**1.2.8 Western blot 实验** 取待测细胞,联合使用 RIPA 裂解液与蛋白酶抑制剂提取细胞中总蛋白,BCA 法进行蛋白定量后,SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离蛋白条带,湿转法进行转膜,5% 脱脂奶粉抗体封闭后,就加入一抗:CD86(1 : 1 000)、iNOS(1 : 1 000)、MCP-1(1 : 1 000)、NLRP3(1 : 1 000)、ASC(1 : 800)、cleaved caspase-1(1 : 500)与 IL- $\beta$ (1 : 800),GAPDH(1 : 2 000),4 °C 孵育过夜后,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1 : 5 000),室温孵育 1 h 后,滴加 ECL 试剂使蛋白条带在凝胶成像系统中显影。使用 ImageJ 软件,以 GAPDH 为内参进行目的蛋白的半定量分析。实验单独重复 3 次。

**1.3 统计学处理** 使用 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 5.0 进行统计分析,数据使用  $\bar{x} \pm s$  或四分位数范围的中位数表示。两组间比较采用独立样本 *t* 检验,3 组及 3 组以上比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较使用 LSD-*t* 事后检验。相关分析使用 Pearson 相关检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 ITP 患者中 NLRP3 表达水平升高** RT-qPCR 检测两组受试者 PBMC 中 NLRP3 mRNA 表达的结果显示,与 Control 组相比,ITP 组中 NLRP3 mRNA 表达水平升高(*P* < 0.01,图 1A);免疫磁珠分选 CD14<sup>+</sup> 单核细胞群,流式细胞术检测结果显示,分选后的 CD14<sup>+</sup> 单核细胞纯度达 90% 以上,可满足后续

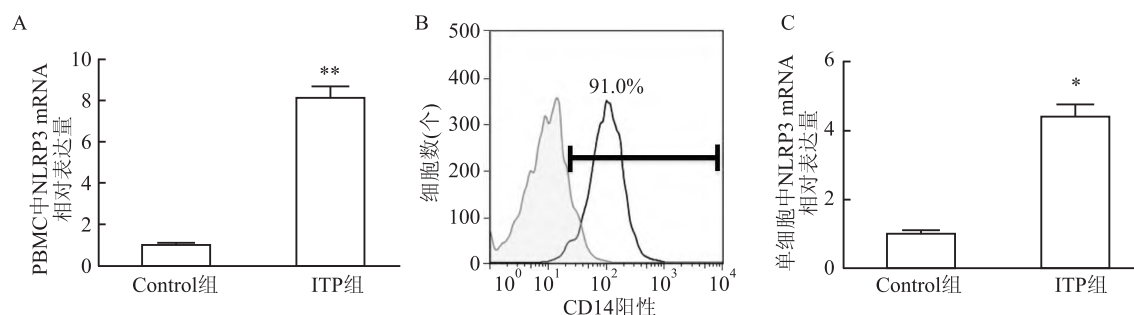


图1 RT-qPCR 检测 NLRP3 mRNA 在 ITP 患者中的表达水平

A: RT-qPCR 检测 NLRP3 mRNA 在 ITP 患者 PBMC 中的表达水平; B: 流式细胞术检测 CD14<sup>+</sup> 单核细胞的纯度; C: RT-qPCR 检测 NLRP3 mRNA 在 ITP 患者 CD14<sup>+</sup> 单核细胞中的表达水平; 与 Control 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

实验要求(图1B)。同时, RT-qPCR 检测该细胞群中 NLRP3 mRNA 表达的结果表明, ITP 组中 NLRP3 mRNA 表达水平亦较 Control 组升高( $P < 0.05$ , 图1C)。

**2.2 IL-1 $\beta$  与 IL-18 在 ITP 患者血清中的表达水平升高** ELISA 检测两组受试者血清中 IL-1 $\beta$  与 IL-18 的表达水平, 结果显示, 与 Control 组相比, IL-1 $\beta$  与 IL-18 在 ITP 患者中的表达均升高( $P < 0.01$ )。见表2。

表2 ELISA 检测 IL-1 $\beta$  与 IL-18 在两组受试者血清中的表达水平( $n = 37$ , pg/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别         | IL-1 $\beta$     | IL-18              |
|------------|------------------|--------------------|
| Control    | 5.13 $\pm$ 0.67  | 81.42 $\pm$ 26.15  |
| ITP        | 14.67 $\pm$ 3.92 | 135.61 $\pm$ 49.11 |
| <i>t</i> 值 | 11.231           | 19.086             |
| <i>P</i> 值 | <0.01            | <0.01              |

**2.3 ITP 患者中 NLRP3、IL-1 $\beta$  与 IL-18 表达与血小板计数的相关性分析** Pearson 相关系数分析 ITP 与 Control 组患者中 NLRP3、IL-1 $\beta$  与 IL-18 表达与血小板计数的相关性, 结果显示, ITP 患者血小板计数分别与 CD14<sup>+</sup> 单核细胞群中 NLRP3 mRNA 表达水平( $r = -0.55$ ,  $P < 0.05$ )、血清中 IL-1 $\beta$ ( $r = -0.41$ ,  $P < 0.01$ )与 IL-18( $r = -0.72$ ,  $P < 0.01$ )表达量呈负相关关系(见图2A、B、C);但在 Control 组中, Pearson 相关系数分析结果显示, 患者血小板计数与 CD14<sup>+</sup> 单核细胞群中 NLRP3 mRNA 表达水平( $r = 0.83$ ,  $P = 0.71$ )、血清中 IL-1 $\beta$ ( $r = 0.65$ ,  $P = 0.084$ )与 IL-18( $r = -0.44$ ,  $P = 0.59$ )表达无明显相关性(见图2D、E、F)。

**2.4 NLRP3 抑制剂 MCC950 可通过 NLRP3 炎症小体途径抑制 ITP 患者来源 MDMs 的 M1 型巨噬**

**细胞分化** RT-qPCR 与 Western blot 实验检测结果显示, 与 IgG 组 MDMs 相比, LPS + IFN- $\gamma$  + IgG 组与 LPS + IFN- $\gamma$  + MCC950 组细胞中 M1 型巨噬细胞标志物 CD86、iNOS、MCP-1 的 mRNA 与蛋白表达均增加( $P < 0.05$ ), MCC950 组无显著差异(图3A、B);与 LPS + IFN- $\gamma$  + IgG 组相比, LPS + IFN- $\gamma$  + MCC950 组细胞中 M1 型巨噬细胞标志物 CD86、iNOS、MCP-1 的 mRNA 与蛋白表达均降低( $P < 0.05$ )。Western blot 实验检测各组 MDMs 中 NLRP3 炎症小体途径相关蛋白 NLRP3、ASC、cleaved caspase-1 与 IL- $\beta$  表达的结果显示, 与 IgG 组 MDMs 相比, LPS + IFN- $\gamma$  + IgG 组与 LPS + IFN- $\gamma$  + MCC950 组细胞中 NLRP3、ASC、cleaved caspase-1 与 IL- $\beta$  蛋白表达升高( $P < 0.05$ ), MCC950 组中上述蛋白均降低( $P < 0.05$ );与 LPS + IFN- $\gamma$  + IgG 组相比, LPS + IFN- $\gamma$  + MCC950 组细胞中 NLRP3、ASC、cleaved caspase-1 与 IL- $\beta$  蛋白表达降低( $P < 0.05$ )(图3C)。

**2.5 NLRP3 抑制剂 MCC950 削弱巨噬细胞对血小板的吞噬功能** 流式细胞术检测各组 MDMs 吞噬能力的结果显示, 与 IgG 组相比, LPS + IFN- $\gamma$  + IgG 组与 LPS + IFN- $\gamma$  + MCC950 组细胞吞噬血小板的能力增加( $P < 0.05$ ), MCC950 组无明显改变;而与 LPS + IFN- $\gamma$  + IgG 组相比, LPS + IFN- $\gamma$  + MCC950 组的吞噬能力则减弱( $P < 0.05$ )。见图4。

**2.6 NLRP3 抑制剂 MCC950 下调巨噬细胞对 T 细胞的增殖促进作用** CFSE 标记法检测各组 MDMs 对 CD4<sup>+</sup> T 与 CD8<sup>+</sup> T 的增殖影响的结果显示, 与 IgG 组相比, LPS + IFN- $\gamma$  + IgG 组与 LPS + IFN- $\gamma$  + MCC950 组细胞能促进 CD4<sup>+</sup> T 与 CD8<sup>+</sup> T 的增殖能力( $P < 0.05$ ), MCC950 组无明显改变;但与 LPS + IFN- $\gamma$  + IgG 组相比, LPS + IFN- $\gamma$  + MCC950 组 MDMs 对 CD4<sup>+</sup> T 与 CD8<sup>+</sup> T 的促增殖能力减弱

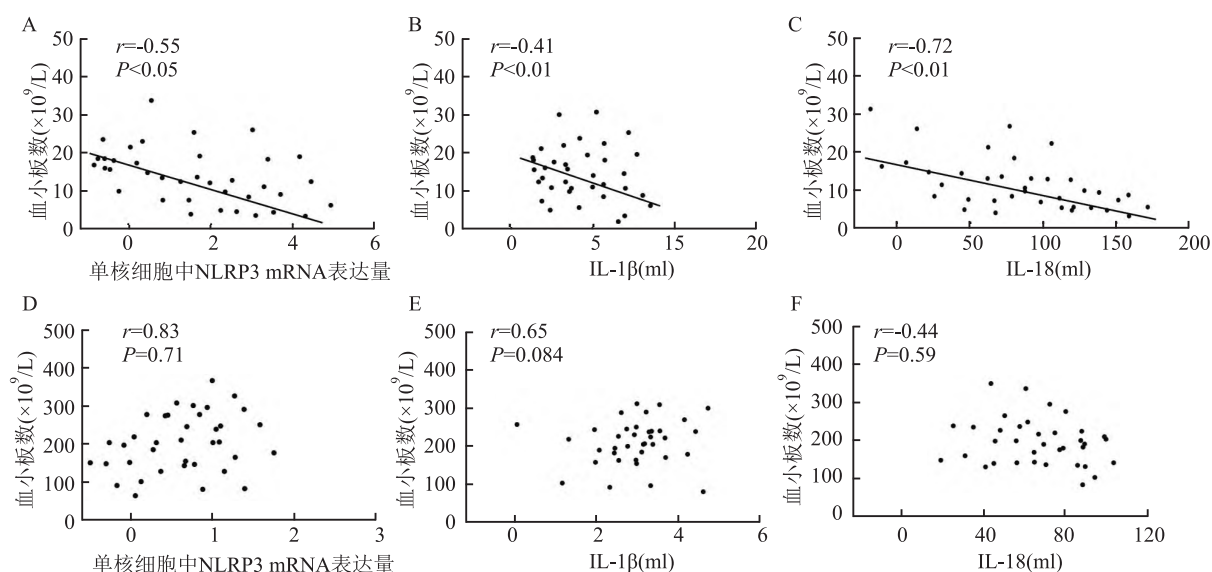


图2 Pearson 相关系数分析 ITP 与 Control 组患者中 NLRP3、IL-1β 与 IL-18 表达与血小板计数的相关性

A~C: ITP 患者血小板计数分别与 CD14<sup>+</sup> 单核细胞群中 NLRP3 mRNA 表达水平、血清中 IL-1β 与 IL-18 表达量的 Pearson 相关系数分析; D~F: Control 患者血小板计数分别与 CD14<sup>+</sup> 单核细胞群中 NLRP3 mRNA 表达水平、血清中 IL-1β 与 IL-18 表达量的 Pearson 相关系数分析

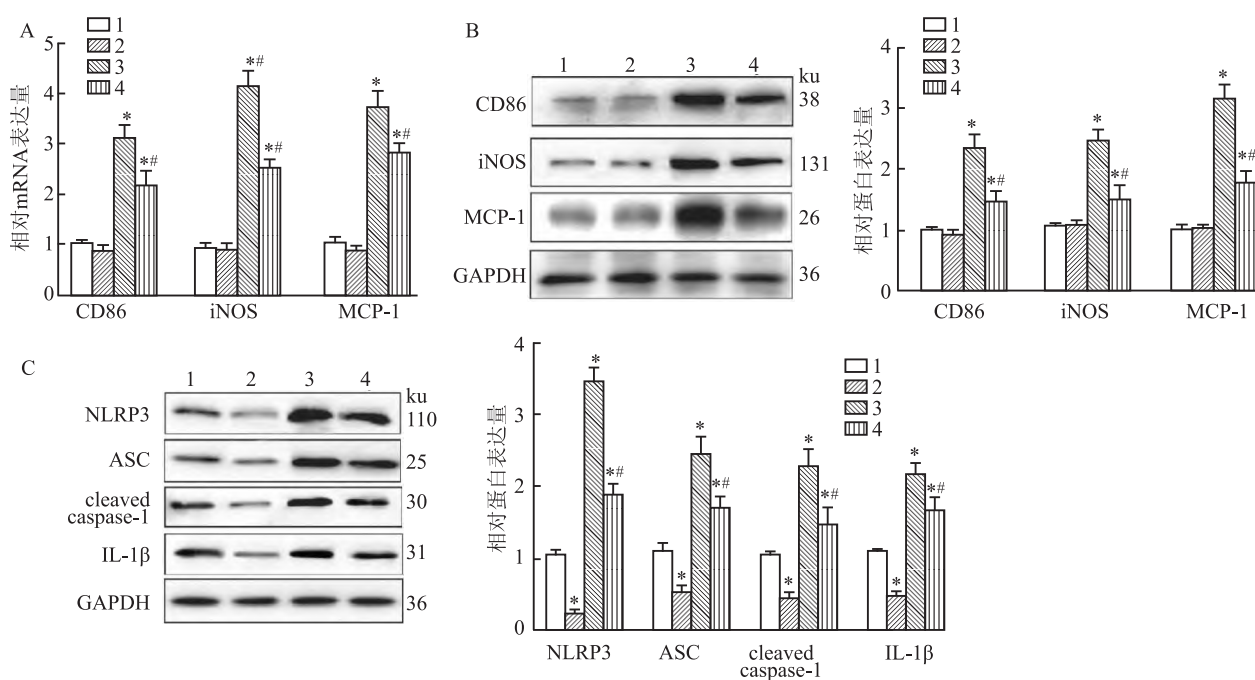


图3 MCC950 抑制 M1 型巨噬细胞的分化

A: RT-qPCR 实验检测各组 MDMs 中 M1 型巨噬细胞标志物 CD86、iNOS、MCP-1 的 mRNA 表达; B: Western blot 实验检测各组 MDMs 中 M1 型巨噬细胞标志物 CD86、iNOS、MCP-1 的蛋白表达; C: Western blot 实验检测各组 MDMs 的 NLRP3 炎症小体途径中 NLRP3、ASC、cleaved caspase-1、IL-1β 蛋白表达; 1: IgG 组; 2: MCC950 组; 3: LPS + IFN-γ + IgG 组; 4: LPS + IFN-γ + MCC950 组; 与 IgG 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 LPS + IFN-γ + IgG 组比较: #  $P < 0.05$

( $P < 0.05$ )。见图 5。

### 3 讨论

ITP 是一种免疫介导的血小板严重破坏的自身

免疫性疾病,患儿的免疫系统受损,主要表现为 M1 型巨噬细胞盛行和 Th1/Th2 比值升高<sup>[11]</sup>。而高水平的 Th1 细胞则能进一步激活巨噬细胞的促炎反应<sup>[1]</sup>。巨噬细胞可分为 M1 型与 M2 型,其中, M1

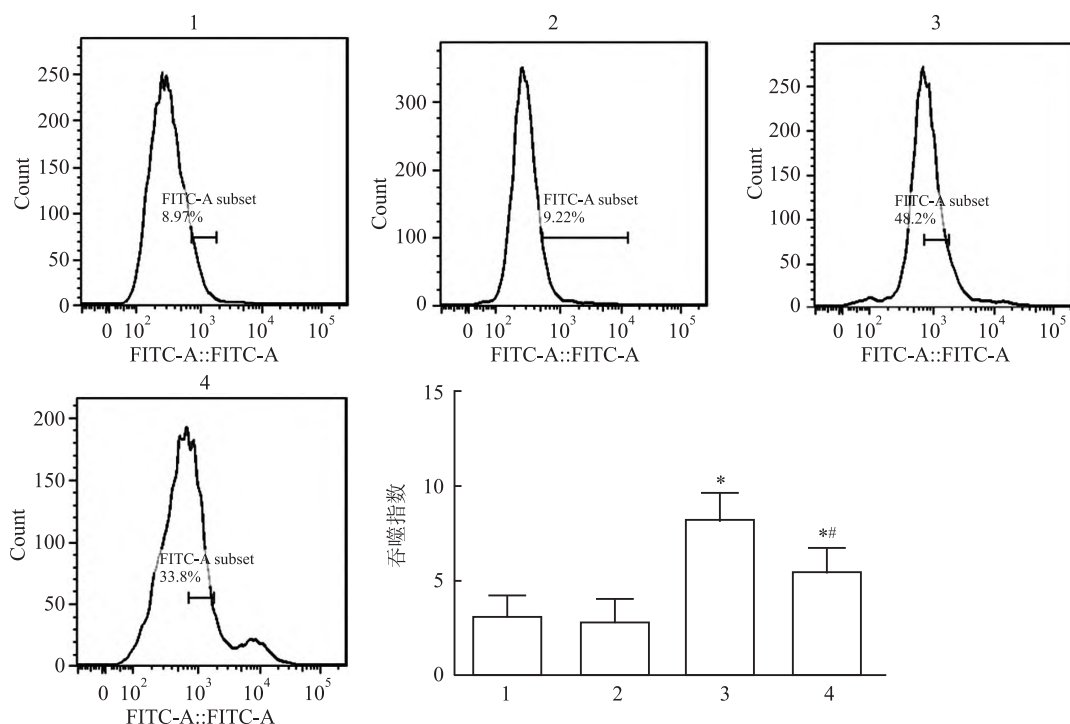
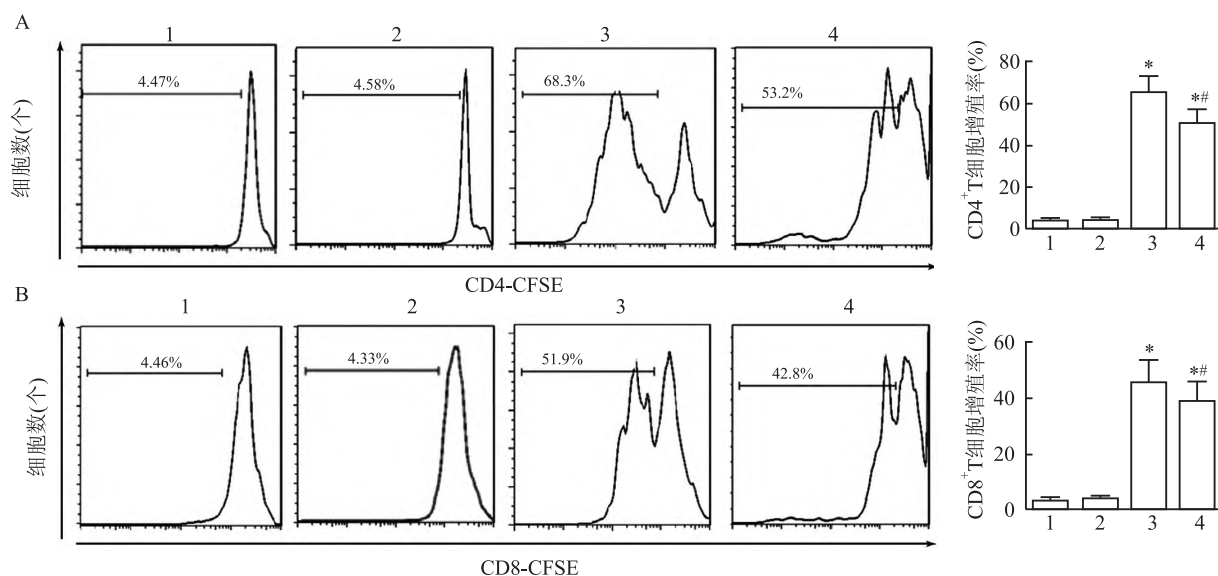


图4 流式细胞术检测 MCC950 对 MDMs 吞噬功能的影响

1: IgG 组; 2: MCC950 组; 3: LPS + IFN- $\gamma$  + IgG 组; 4: LPS + IFN- $\gamma$  + MCC950 组; 与 IgG 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 LPS + IFN- $\gamma$  + IgG 组比较: #  $P < 0.05$

图5 CFSE 标记法检测 MCC950 作用下 MDMs 对 CD4<sup>+</sup>T 与 CD8<sup>+</sup>T 细胞增殖的影响

A: CFSE 标记法检测 MCC950 作用下 MDMs 对 CD4<sup>+</sup>T 细胞增殖的影响; B: CFSE 标记法检测 MCC950 作用下 MDMs 对 CD8<sup>+</sup>T 细胞增殖的影响; 1: IgG 组; 2: MCC950 组; 3: LPS + IFN- $\gamma$  + IgG 组; 4: LPS + IFN- $\gamma$  + MCC950 组; 与 IgG 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 LPS + IFN- $\gamma$  + IgG 组比较: #  $P < 0.05$

型具有促炎、抗肿瘤与抗病原微生物等生物特性,并能释放促炎因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 等;而 M2 型则具有抗炎和免疫抑制等功能,可释放抗炎因子如 IL-10、TGF- $\beta$  等,发挥免疫抑制作用<sup>[3]</sup>。在 ITP 中,

M1 型巨噬细胞的盛行与疾病的发生、进展以及炎症和免疫反应的损伤密切相关<sup>[4]</sup>。

炎症小体包括核苷酸结合寡聚化结构域 (NOD) 样受体家族、含有 1 (NLRP1) 的 pyrin 结构

域、NLRP3、NLRP6、含有 4 (NLRC4) 的 CARD 结构域,以及黑色素瘤中不存在的蛋白质 2 (AIM2) 已被确定通过 caspase-1 依赖性途径激活 pro-IL-1 $\beta$  和 pro-IL-18<sup>[12]</sup>。已有研究<sup>[5]</sup>证实,NLRP3 炎症小体在多种自身免疫性疾病的发病机制中起着至关重要的作用。促炎细胞因子在 ITP 发病机制中的重要作用。与健康个体和缓解的 ITP 患者相比,活动性 ITP 患者的 IL-18 水平增加,炎症小体激活在 ITP 进展过程中参与免疫炎症反应。这与 Qiao et al<sup>[13]</sup>团队的研究结果一致,均提示 NLRP3 炎症小体的激活可能参与影响 ITP 疾病的发生发展。本实验结果表明,NLRP3 与 IL-1 $\beta$ 、IL-18 在 ITP 患者体内的表达水平较对照人群升高,同时升高的 IL-1 $\beta$ 、IL-18 和 CD14<sup>+</sup>单核细胞中 NLRP3 mRNA 水平与患者的血小板计数呈负相关,而在对照人群中尚未发现这种相关性。NLRP3 炎症小体的激活可能参与影响 ITP 疾病的发生发展。

近年来,随着人们对 NLRP3 炎症小体研究的深入,大量数据证实其在巨噬细胞的极化过程中发挥着关键作用。在急性结肠炎中,L-岩藻糖可使 NLRP3 炎症小体失活来抑制 M1 型巨噬细胞的极化,减少小鼠模型体内促炎因子的释放,从而改善疾病的进展<sup>[14]</sup>;在非酒精性脂肪肝患者中,G 蛋白偶联胆汁酸受体 1 表达的缺乏可通过促进 NLRP3 炎症小体激活和 caspase-1 的裂解而促进 M1 巨噬细胞极化,而促进该基因的表达则能抑制 NLRP3 炎症小体所介导 M1 巨噬细胞极化,改善肝脏脂肪变性和炎症反应<sup>[15]</sup>。如在椎间盘退化的研究中,木兰碱可通过抑制椎间盘髓核细胞中 NLRP3 炎症小体的活性,减轻巨噬细胞 M1 极化所介导的髓核细胞损伤,减缓椎间盘退化的进展<sup>[16]</sup>。在牙周组织中,受外力刺激的人牙周膜成纤维细胞可通过激活巨噬细胞中的 NLRP3 炎症小体,促进其 M1 极化,并增加 IL-1 $\beta$  的产生与释放,从而引发牙根吸收的发生<sup>[17]</sup>。而在 ITP 中,国内学者于洁<sup>[18]</sup>研究报道,NLRP3 炎症小体在 ITP 患者外周血单个核细胞中的活化水平较健康对照组明显升高,进一步的研究表明,升高的 NLRP3 炎症小体活化水平可能与患者体内失衡的 Th 细胞亚群相关,但并未探究其与巨噬细胞极化的相关性。结合之前实验结果,课题组分离了 ITP 患者外周血中的 CD14<sup>+</sup>单核细胞进一步探究 NLRP3 炎症小体在 ITP 中作用机制,结果显示,在体外条件下可成功诱导 MDMs 的 M1 型极化,且极化后的 M1 细胞中 NLRP3 炎症小体途径中 NLRP3、ASC、cleaved

caspase-1 与 IL- $\beta$  蛋白表达水平均升高,而 NLRP3 特异性抑制剂 MCC950 的应用则能降低 M1 型巨噬细胞的极化水平和 NLRP3 炎症小体的活化程度。这提示,抑制 NLRP3 介导的炎症小体活化可改善 ITP 中 M1 型巨噬细胞过度极化的现象。ITP 患者外周血单个核细胞中活化水平升高,NLRP3 炎症小体可参与调控巨噬细胞的 M1 型分化。

众所周知,M1 型巨噬细胞具有抗原递呈,吞噬与促进 T 细胞增殖等上调免疫活性的功能。在 ITP 患者中,冯琦<sup>[3]</sup>研究显示,ITP 患者体内异常极化的 M1 型巨噬细胞的免疫活性显著增强。在本研究中,课题组对 NLRP3 炎症小体是否参与影响 ITP 患者 MDMs 的 M1 型的免疫功能进行探究,结果同样表明,体外条件下诱导来源于 ITP 患者 MDMs 的 M1 型巨噬细胞对血小板的吞噬能力增强,且能促进 CD4<sup>+</sup>与 CD8<sup>+</sup>T 细胞的增殖,而 NLRP3 抑制剂 MCC950 的应用则能削弱 M1 型巨噬细胞的上述免疫功能。这提示 NLRP3 介导炎症小体可能参与影响 M1 型巨噬细胞的免疫活化功能。

## 参考文献

- [1] Terrell D R, Neunert C E, Cooper N, et al. Immune thrombocytopenia (ITP): Current limitations in patient management[J]. Medicina (Kaunas), 2020, 56(12): 667.
- [2] Yunna C, Mengru H, Lei W, et al. Macrophage M1/M2 polarization[J]. Eur J Pharmacol, 2020, 19(877): 173090.
- [3] 冯琦. 巨噬细胞极化和 HLA-G 异常在 ITP 中的作用和调控研究[D]. 济南: 山东大学, 2017
- [4] Li Z, Guo J, Bi L. Role of the NLRP3 inflammasome in autoimmune diseases[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 19(130): 110542.
- [5] Zhuang Y, Wang H, Su J, et al. A narrative review of positive regulation of NLRP3 inflammasome in rheumatoid arthritis[J]. Ann Palliat Med, 2021, 10(12): 12877-85.
- [6] Neunert C, Lim W, Crowther M, et al. The American society of hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia[J]. Blood, 2011, 117(16): 4190-207.
- [7] Zhang J, Liu X, Wan C, et al. NLRP3 inflammasome mediates M1 macrophage polarization and IL-1 $\beta$  production in inflammatory root resorption[J]. J Clin Periodontol, 2020, 47(4): 451-60.
- [8] Huangfu N, Zheng W, Xu Z, et al. RBM4 regulates M1 macrophages polarization through targeting STAT1-mediated glycolysis[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 6(83): 106432.
- [9] Liu X G, Liu S, Feng Q, et al. Thrombopoietin receptor agonists shift the balance of Fc $\gamma$  receptors toward inhibitory receptor IIb on monocytes in ITP[J]. Blood, 2016, 128(6): 852-61.
- [10] Liu X G, Ma S H, Sun J Z, et al. High-dose dexamethasone shifts the balance of stimulatory and inhibitory Fc $\gamma$  receptors on

- monocytes in patients with primary immune thrombocytopenia[J]. *Blood*, 2011, 117(6): 2061–9.
- [11] 倪蔚文, 储金华, 杨林海, 等. 儿童初诊原发性免疫性血小板减少症患者细胞及体液免疫功能分析[J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(10): 1628–31.
- [12] Davis B K, Wen H, Ting J P. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases[J]. *Annu Rev Immunol*, 2011, 11(29): 707–35.
- [13] Qiao J L, Liu Y, Li X Q, et al. Elevated expression of NLRP3 in patients with immune thrombocytopenia[J]. *Immunol Res*, 2016, 64(2): 431–7.
- [14] He R, Li Y, Han C, et al. L-Fucose ameliorates DSS-induced acute colitis *via* inhibiting macrophage M1 polarization and inhibiting NLRP3 inflammasome and NF- $\kappa$ B activation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 11(73): 379–88.
- [15] Shi Y, Su W, Zhang L, et al. TGR5 regulates macrophage inflammation in nonalcoholic steatohepatitis by modulating NLRP3 inflammasome activation[J]. *Front Immunol*, 2021, 11(107): 609060.
- [16] Zhao F, Guo Z, Hou F, et al. Magnoflorine alleviates “M1” polarized macrophage-induced intervertebral disc degeneration through repressing the HMGB1/Myd88/NF- $\kappa$ B pathway and NLRP3 inflammasome[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12(113): 701087.
- [17] Zhang J, Liu X, Wan C, et al. NLRP3 inflammasome mediates M1 macrophage polarization and IL-1 $\beta$  production in inflammatory root resorption[J]. *J Clin Periodontol*, 2020, 47(4): 451–60.
- [18] 于洁. NLRP3 炎症小体在原发免疫性血小板减少症中的遗传学改变及利用机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2018.

## NLRP3 inflammasome mediated macrophage polarization in ITP

Song Chuanlong, Hailiqiguli · Nuridin, Jiao Hongjie, Wang Xuemei, Yan Mei

(Dept of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054)

**Abstract Objective** To investigate the activation level of NLRP3 inflammasome in immune thrombocytopenia (ITP) and the effect of inhibiting NLRP3 mediated inflammasome activation on polarization and immune function of M1 macrophages. **Methods** The expression of NLRP3 mRNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and CD14<sup>+</sup> monocytes of ITP patients (ITP group) and Control group (Control group) was detected by RT-qPCR. The levels of IL-1 $\beta$  and IL-18 in serum of the two groups were determined by ELISA. M0 macrophages (MDMs) from ITP group were divided into 4 groups: IgG control group (IgG group), MCC950 treatment group (MCC950 group), LPS, IFN- $\gamma$  and IgG treatment group (LPS + IFN- $\gamma$  + IgG group) and LPS, IFN- $\gamma$  and MCC950 treatment group (LPS + IFN- $\gamma$  + MCC950 group); mRNA and protein levels of M1 macrophage markers CD86, iNOS and MCP-1 were detected by RT-qPCR and Western blot. Western blot was used to detect the expression of NLRP3 inflammasome associated protein, ASC, Cleaved caspase-1 and IL- $\beta$ . Flow cytometry was used to detect the phagocytosis of MDMs on platelets in each group, and CFSE was used to detect the proliferation of CD4<sup>+</sup>T and CD8<sup>+</sup>T. **Results** Compared with the control group, the expression of NLRP3 mRNA in PBMC and CD14<sup>+</sup> monocytes, and the concentration of IL-1 $\beta$  and IL-18 in serum of ITP group increased significantly ( $P < 0.05$ ). Platelet counts were negative correlated with NLRP3 mRNA expression in CD14<sup>+</sup> monocyte and the concentration of IL-1 $\beta$ , IL-18 in serum in patients with ITP ( $P < 0.05$ ). Compared with IgG group, the mRNA and protein expressions of M1 macrophage markers CD86, iNOS, MCP-1, and the protein expression level of NLRP3, ASC, cleaved caspase-1 and IL- $\beta$ , the platelet phagocytosis and the proliferation promoting ability of CD4<sup>+</sup>T and CD8<sup>+</sup>T cells significantly increased in LPS + IFN- $\gamma$  + IgG group and LPS + IFN- $\gamma$  + MCC950 group (all  $P < 0.05$ ). Compared with LPS + IFN- $\gamma$  + IgG group, the above indexes significantly decreased in LPS + IFN- $\gamma$  + MCC950 group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The activation level of NLRP3 inflammasome in ITP is abnormally elevated, which was related to the excessive M1 polarization of MDMs. Inhibiting NLRP3 mediated inflammasome activation could attenuate the M1 polarization and immune function of macrophages.

**Key words** immune thrombocytopenia; NLRP3 inflammasome; M1 macrophages