

TNF- α 处理人滑膜肉瘤细胞株SW982细胞中典型炎症小体的表达及意义

陈祝明¹, 宗治贤¹, 黄 帅², 吕贵何¹, 楚佳奇³, 魏 波^{1*} (广东医科大学附属第一医院 1. 骨科中心; 2. 消化内科; 3. 干细胞研发与细胞治疗中心, 广东湛江 524001)

摘要:目的 探讨TNF- α 处理人滑膜肉瘤细胞株SW982中典型炎症小体的表达及意义。方法 SW982细胞用10 $\mu\text{g/L}$ TNF- α 处理不同时间后, 采用qRT-PCR、Western blot、免疫荧光染色检测NLRP1、NLRP3、NLRC4、AIM2、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、IL-1 β 、IL-18表达。结果 qRT-PCR显示SW982细胞经TNF- α 处理12 h后NLRP1、NLRP3、AIM2、IL-1 β mRNA表达增加($P < 0.01$ 或 0.05), 24 h后逐渐减少, 而NLRC4、IL-18表达下调($P < 0.01$)。Western blot发现NLRP3、AIM2蛋白表达在处理早期呈时间依赖性上调、24 h后下调, 而NLRC4表达无明显变化。免疫荧光染色显示TNF- α 处理24 h后细胞中AIM2和ASC定位于胞浆。**结论** TNF- α 可能同时激活SW982细胞中NLRP3、AIM2炎症小体。

关键词: 肿瘤坏死因子- α ; SW982细胞; 炎症小体

中图分类号: R 684.3

文献标识码: A

文章编号: 2096-3610(2017)06-0601-05

Expression and significance of classical inflammasomes in TNF- α -treated human synovial sarcoma SW982 cells

CHEN Zhu-ming¹, ZONG Zhi-xian¹, HUANG Shuai², LV Gui-he¹, CHU Jia-qi³, WEI Bo^{1*} (1. Department of Orthopedic Center; 2. Department of Gastroenterology; 3. Stem Cell Research and Therapy Center, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and significance of classical inflammasomes in TNF- α -treated human synovial sarcoma SW982 cells. Methods SW982 cells were treated with 10 $\mu\text{g/L}$ TNF- α for different times, and then their expression of NLRP1, NLRP3, NLRC4, AIM2, ASC, IL-1 β and IL-18 was determined by qRT-PCR, Western blot and immunofluorescence. Results qRT-PCR revealed that levels of NLRP1, NLRP3, AIM2 and IL-1 β mRNA in SW982 cells were increased 12 h ($P < 0.01$ or 0.05) and decreased 24 h after TNF- α treatment, while NLRC4 and IL-18 expression was downregulated ($P < 0.01$). Western blot showed that AIM2 and NLRP3 expression was time-dependently upregulated at the early stage of treatment and down-regulated 24 h later, while NLRC4 content was unchanged. Immunofluorescence staining uncovered that both AIM2 and ASC were co-located in the cytoplasm of SW982 cells 24 h after TNF- α treatment. Conclusion TNF- α can simultaneously activate NLRP3 and AIM2 inflammasomes in SW982 cells.

Key words: TNF- α ; SW982 cell; inflammasome

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节滑膜炎、滑膜组织异常增生及关节软骨进行性破坏为主要特征的慢性系统性疾病^[1]。迄今, RA的发病机制尚未完全阐明, 炎症程度受炎性介质的影响较大, 其主要的炎性介质有炎症小体、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、前列腺素、白细胞介素-1(IL-1)等。有研究表明, RA患者滑膜组织和滑膜液中存在多种免疫细胞(T细胞、树突状细胞、肥大细胞等)及

细胞因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-17、IL-18等), 其中TNF- α 在RA发病中起重要作用^[2]。小鼠实验表明, 过表达TNF- α 可导致严重关节炎, 阻断TNF- α 可明显改善RA临床症状^[3-4]。炎症小体为胞质内多蛋白复合体, 目前报道的典型炎症小体包括核苷酸结合寡聚化结构域受体(NOD-like receptor, NLR)家族蛋白中的NOD样受体蛋白1(NLRP1)和3(NLRP3)、NOD样受体的CARD结构域4(NLRC4), 以及HIN200家

基金项目: 国家自然科学基金项目(No.81771612), 广东医科大学附属第一医院博士启动项目(No.BJ201508), 广东医科大学大学生创新实验项目立项项目(No.2017FZZY001)

收稿日期: 2017-10-29; **修订日期:** 2017-12-14

作者简介: 陈祝明(1990-), 男, 在读硕士研究生, 住院医师。

***通信作者:** 魏 波, 男, 博士, 主任医师, E-mail: webjxmc@163.com。

族蛋白(The inter-feron IFN-inducible p200-protein, HIN200)中的人黑素瘤细胞缺失蛋白2 (absent in melanoma 2, AIM2)和热蛋白炎症小体, 激活的炎症小体引起半胱天冬酶-1(Caspase-1)活化, 随之裂解下游效应分子, 进而诱导细胞焦亡, 促进成熟IL-1 β 和IL-18释放^[5]。已有研究证明, 尿酸钠晶体可诱导滑膜成纤维细胞NLRP3炎症小体激活并介导IL-1 β 大量分泌, 但TNF- α 是否激活典型炎症小体尚未明了^[6]。本研究拟建立TNF- α 刺激滑膜肉瘤细胞株SW982细胞模型, 检测细胞内典型炎症小体基因及蛋白表达水平, 探讨TNF- α 与炎症小体在RA中的作用。

1 材料和方法

1.1 主要材料与试剂

人滑膜肉瘤细胞株SW982购于中国科学院上海细胞库, 胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶、100 \times 青/链霉素和高糖DMEM培养基(Gibco, 美国), TNF- α (R&D Systems Bio-Techne, 美国), PRO-PREP Protein Extraction Solution (iNtRON Biotechnology, 韩国); 一抗稀释液、二抗稀释液(上海碧云天生物技术有限公司, 中国), PVDF膜(Millipore, 美国), 兔抗NLRP1、AIM2(Abcam, 美国)、AIM2、NLRP3、NLRC4、 β -actin(Cell Signaling Technology, 美国)及羊抗兔二抗(Santa Cruz, 美国), Trizol、荧光兔抗(Life technology, 美国), cDNA反转录试剂盒、SYBR Green Premix荧光定量试剂盒均购自宝生物(大连)科技公司, 实时荧光定量PCR (qRT-PCR)检测上述典型炎症小体相关引物序列如表1所示, 由生物工程(上海)股份有限公司合成。

表1 典型炎症小体相关引物序列

目的基因		序列(5'-3')	产物/bp	GenBank序列号
NLRP1	上游	ATACGAAGCCTTTGGGGACT	119	NM_014922.4
	下游	ACAAAGCAGAGACCCGTGTT		
NLRP3	上游	AAAGGAAGTGGACTGCGAGA	129	XM_011544055.2
	下游	TTCAAACGACTCCCTGGAAC		
NLRC4	上游	GGAAAGTGCAAGGCTCTGAC	129	XM_017004619.1
	下游	TGTCTGCTTCTGATTGTGC		
AIM2	上游	AGCCTGAACAGAAACAGATGG	120	NM_004833.2
	下游	CTTCTTGGGTCTCAAACGTGA		
IL-1 β	上游	CCACAGACCTCCAGGAGAA	121	XM_017003988.1
	下游	GTGATCGTACAGGTGCATCG		
IL-18	上游	TGCATCAACTTTGTGGCAAT	169	XM_011542806.2
	下游	ATAGAGGCCGATTTCCCTTGG		
GAPDH	上游	GGAATCATGACCACAGTCCAT	109	NM_000194.2
	下游	CAGGGATGATGTTCTGGAGAG		

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将SW982细胞接种于10 cm²培养皿, 用含10%FBS、100 U/mL青霉素、100 g/L链霉素H-DMEM培养基, 置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂环境下培养, 每3天更换培养基, 待细胞融合度达到80%~90%, 用含0.25%EDTA胰蛋白酶消化、传代。

1.2.2 qRT-PCR 处理终点收集细胞, 采用Trizol提取细胞总RNA, 定量后利用cDNA合成试剂盒进行反转录, 用ABI ViiATM7实时荧光定量PCR系统进行扩增, 以hGAPDH为内参, 采用2^{- $\Delta\Delta$ CT}方法分析基因表达差异。以10 μ g/L TNF- α 处理SW982细胞不同时间

间(0、12、24、48、72 h), qRT-PCR检测细胞中典型炎症小体相关基因的转录水平。

1.2.3 Western blot 处理终点收集细胞, 用Proprep蛋白裂解液裂解样本, 提取细胞蛋白, 进行SDS-PAGE凝胶电泳, 将蛋白电转至PVDF膜。5%脱脂奶粉封闭液孵育2 h, 一抗孵育过夜, 二抗室温孵育2 h。曝光后扫描保存图像, β -actin为内参。以10 μ g/L的TNF- α 处理SW982细胞不同时间(0、0.5、1、2、4、8、12、24、36、72 h), Western-blot检测NLRP1、NLRP3、AIM2、NLRC4、(poly ADP-ribose polymerase)PARP/Cleaved PARP蛋白表达。

1.2.4 细胞免疫荧光染色 将SW982细胞接种于预置盖玻片的12孔板中制作细胞爬片(7.0×10^4 个/孔),待细胞完全贴壁后,用终质量浓度为 $10 \mu\text{g/L}$ 的TNF- α 处理细胞,于不同时间点收集爬片,固定后用0.1% Triton X-100/PBS摇床透化10 min,封闭30 min后一抗 4°C 孵育过夜,二抗室温避光孵育2 h。用DAPI复染细胞核并封片,倒置荧光显微镜采集图像。以 $10 \mu\text{g/L}$ TNF- α 处理SW982细胞不同时间(0、12、24、48、72 h)后,免疫荧光染色观察AIM2、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、IL-1 β 在细胞中的表达及定位。

1.3 统计学处理

采用Graphpad Prism 7.0软件进行数据分析, 2^{*}

表2 qRT-PCR检测TNF- α 处理SW982细胞典型炎症小体相关基因mRNA表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

时间/h	NLRP1	NLRP3	NLRC4	AIM2	IL-1 β	IL-18
0	1.00 \pm 0.02	1.00 \pm 0.02				
12	4.70 \pm 0.13 ^b	4.78 \pm 0.35 ^b	0.10 \pm 0.02 ^b	6.28 \pm 0.23 ^b	599.04 \pm 46.30 ^b	0.02 \pm 0.01 ^b
24	3.79 \pm 0.52 ^b	3.43 \pm 0.11 ^b	0.06 \pm 0.01 ^b	8.55 \pm 0.29 ^b	440.67 \pm 8.60 ^b	0.06 \pm 0.01 ^b
48	1.62 \pm 0.18	0.75 \pm 0.06	0.07 \pm 0.01 ^b	1.31 \pm 0.03	72.13 \pm 7.80 ^b	0.04 \pm 0.00 ^b
72	1.32 \pm 0.16	0.55 \pm 0.05 ^a	0.10 \pm 0.01 ^b	0.50 \pm 0.03 ^a	53.58 \pm 6.58 ^b	0.06 \pm 0.01 ^b

与0 h比较: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

2.2 TNF- α 处理SW982细胞中典型炎症小体蛋白的表达情况

AIM2、NLRP3蛋白表达在处理早期呈时间依赖性上调, 24 h后下调, 而NLRC4表达无明显变化(图2)。且各处理时间点均未检测到NLRP1蛋白。

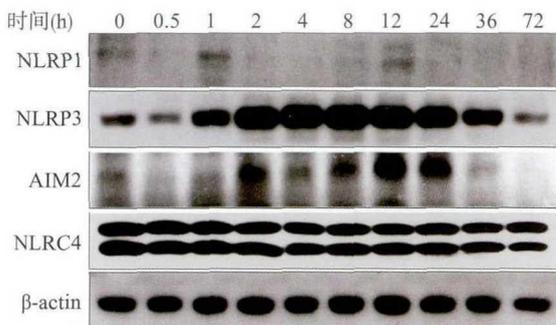


图1 Western-blot检测TNF- α 处理SW982细胞中典型炎症小体蛋白的表达水平

2.3 免疫荧光染色观察TNF- α 处理SW982细胞中AIM2、ASC、IL-1 β 的表达情况

处理24 h后细胞中明显表达AIM2和ASC且定位于胞浆(图2A)。TNF- α 处理早期(0~24 h)IL-1 β 表达量上升, 而后下调(图2B)。

2.4 TNF- α 处理SW982细胞中凋亡蛋白PARP的表达情况

$\Delta\Delta\text{CT}$ 法计算基因相对表达量, 各时间点基因表达差异比较采用单因素方差分析及Dunnnett检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TNF- α 对SW982细胞NLRP1、AIM2、NLRP3、NLRC4、IL-1 β 、IL-18 mRNA表达的影响

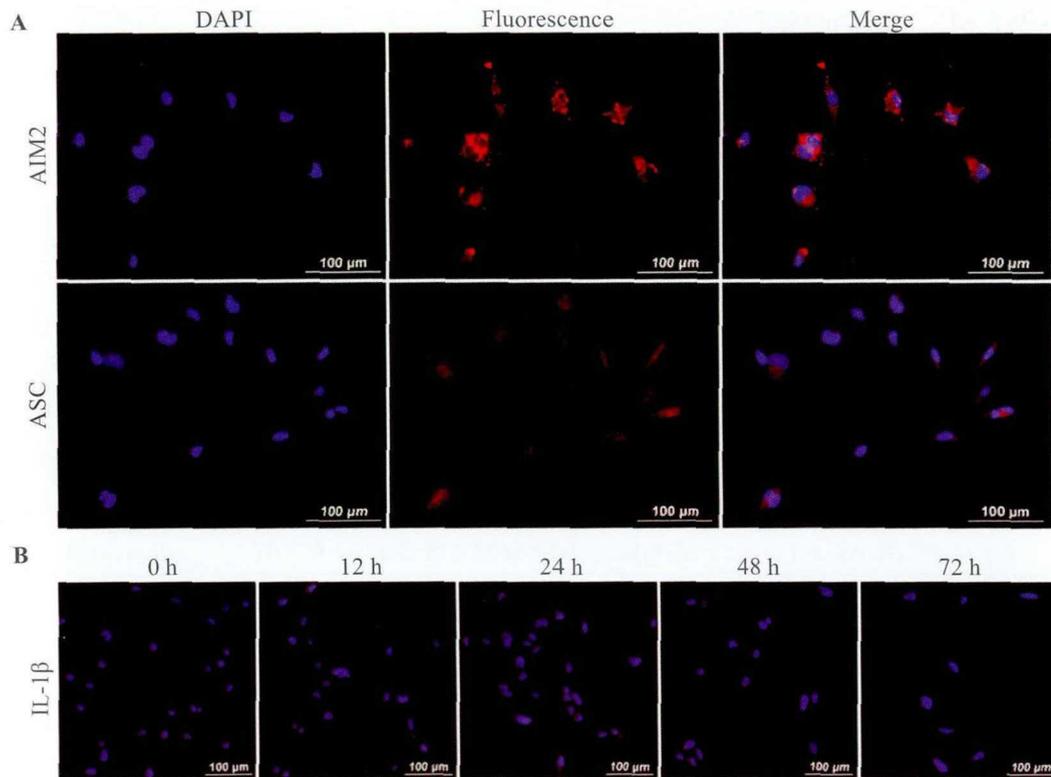
NLRP1、AIM2、NLRP3、IL-1 β 基因转录水平在处理早期呈时间依赖性上调($P < 0.01$ 或 0.05), 24 h后逐渐下降。而实验过程中NLRC4和IL-18基因几乎未表达($P < 0.01$)。详见表2。

PARP蛋白表达无明显变化, 而Cleaved-PARP蛋白在处理36 h后表达量有所上调(图3)。

3 讨论

在RA的发生、发展过程中, 伴随着多种免疫细胞活化和细胞因子、炎症介质的参与。大量研究表明, RA患者关节滑膜中NLRP3炎症小体激活介导IL-1 β 释放, 在RA发病中起重要作用^[7], 但滑膜中NLRP3炎症小体激活的主要细胞类型尚不明确, 而且是否存在其他典型炎症小体激活情况也不清楚。本研究通过建立TNF- α 处理SW982细胞模型, 检测细胞中典型炎症小体相关基因mRNA和蛋白表达水平。了解有潜在激活可能的炎症小体, 并探讨其在RA发病中的作用。

TNF- α 诱导的信号通路在炎症和损伤的细胞中起重要作用, 是免疫系统发育和稳态的中心环节, 持续过量产生TNF- α 可通过诱导慢性炎症反应而对组织产生有害作用。据报道, TNF- α 与早期RA关节肿胀密切相关, 同时参与慢性关节炎并导致软骨和骨侵蚀性变化^[8]。有研究表明, 通过过表达TNF- α 可建立转基因小鼠RA模型, TNF可诱导人滑膜成纤维细胞表达分泌大量炎症因子IL-1 β 、趋化因子、软



A. TNF- α 处理SW982细胞24 h时AIM2和ASC表达; B. TNF- α 处理SW982细胞不同时间(0、12、24、48、72 h) IL-1 β 表达。红色代表目的蛋白(AIM2、ASC、IL-1 β),蓝色代表细胞核。

图2 免疫荧光染色观察TNF- α 处理SW982细胞中AIM2、ASC、IL-1 β 的表达

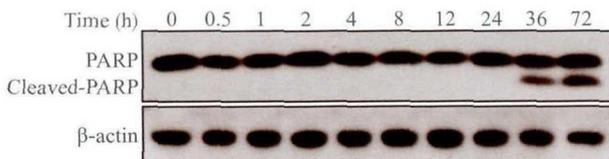


图3 Western-blot检测TNF- α 处理SW982细胞中凋亡相关蛋白PARP的表达

骨基质金属蛋白酶及破骨相关细胞因子等,提示TNF- α 及其下游产物在RA的发生、发展过程中起重要作用^[9]。

目前普遍认为典型炎症小体包括3种NLR家族炎症小体(NLRP1、NLRP3和NLRC4)、AIM2和热蛋白炎症小体,其中NLRP3炎症小体研究最为广泛深入。有研究发现在RA中能观察到NLRP3炎症小体的激活,NLRP3和Caspase-1缺失在A20myel-KO小鼠中具有显著的抗RA相关软骨侵蚀作用^[10]。近期有研究显示尿酸钠晶体可通过激活人原代滑膜成纤维细胞NLRP3炎症小体介导IL-1 β 分泌,提示人滑膜成纤维细胞具有炎症小体激活的分子基础,并可能参与调控RA发病^[6]。本研究中我们通过qRT-PCR检测发现,经TNF- α 处理的人滑膜肉瘤细胞SW982中NLRP1、NLRP3、AIM2基因转录水平上调,但Western-blot和细胞免疫荧光染色检测结果显示只有

NLRP3和AIM2蛋白在处理早期有所上调,24 h后表达则逐渐下降,提示TNF- α 可能同时诱导SW982细胞中NLRP3和AIM2炎症小体激活。AIM2由C端HIN200和N端热蛋白结构域(PYD)组成,其中HIN200直接与dsDNA结合,而PYD招募ASC和Caspase-1前体,从而形成AIM2炎症小体^[11]。AIM2炎症小体激活的主要诱导因素为微生物(细菌、病毒、曲霉、疟原虫)和宿主自身dsDNA。而我们的实验结果提示TNF- α 诱导的信号通路也可能激活滑膜成纤维细胞中AIM2炎症小体,但具体机制有待进一步深入研究。

IL-1 β 是RA的主要介质,由激活的巨噬细胞和滑膜细胞产生。IL-1 β 可诱导滑膜细胞和软骨细胞合成并释放胶原酶,并且抑制软骨细胞合成蛋白多糖^[12]。因此,IL-1 β 是促进RA关节软骨破坏的关键细胞因子之一。本研究结果表明TNF- α 可能通过激活SW982细胞中NLRP3和AIM2炎症小体介导IL-1 β 大量释放,推测释放的IL-1 β 在RA患者关节内进一步参与破坏关节软骨。此外,我们还发现TNF- α 可诱导SW982细胞中Cleaved PARP蛋白表达上调,表明TNF- α 可激活滑膜细胞凋亡通路。

综上所述,TNF- α 处理SW982细胞后典型炎症

小体识别分子NLRP3、AIM2基因及蛋白表达水平均明显上升,表明NLRP3和AIM2炎症小体可能同时被激活,同时诱导IL-1 β 表达增加。RA患者关节中炎症小体激活介导的IL-1 β 和TNF- α 可能协同作用于关节软骨及滑膜组织。后续研究需进一步阐明TNF- α 诱导滑膜细胞炎症小体的激活机制,并利用动物模型加以验证。

参考文献:

- [1] Huang Q Q, Birkett R, Doyle R, et al. The role of macrophages in the response to TNF inhibition in experimental arthritis[J]. *J Immunol*, 2017, doi: 10.4049/jimmunol.1700229.
- [2] 代宇, 范小琴, 史玉朋, 等. 类风湿关节炎患者外周血单个核细胞诱导成熟树突状细胞TIM4表达[J]. *广东医学院学报*, 2016, 34(6): 602-605.
- [3] 黄蓓, 汪庆童, 刘亢亢, 等. 类风湿关节炎发生发展中TNF- α 信号通路及CD4+T细胞的关系[J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(7): 900-903.
- [4] Smith J A. Update on ankylosing spondylitis: current concepts in pathogenesis[J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2015, 15(1): 489.
- [5] McKellar G E, McCarey D W, Sattar N, et al. Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2009, 6(6): 410-417.
- [6] Sharma D, Kanneganti T D. The cell biology of inflammasomes: mechanisms of inflammasome activation and regulation[J]. *J Cell Biol*, 2016, 213(6): 617-629.
- [7] Zheng S C, Zhu X X, Xue Y, et al. Role of the NLRP3 inflammasome in the transient release of IL-1 β induced by monosodium urate crystals in human fibroblast-like synoviocytes[J]. *J Inflamm (Lond)*, 2015, 12: 30.
- [8] Mathews R J, Robinson J I, Battellino M, et al. Evidence of NLRP3-inflammasome activation in rheumatoid arthritis (RA); genetic variants within the NLRP3-inflammasome complex in relation to susceptibility to RA and response to anti-TNF treatment[J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(6): 1202-1210.
- [9] Sommerfelt R M, Feuerherm A J, Jones K, et al. Cytosolic phospholipase A2 regulates TNF-induced production of joint destructive effectors in synoviocytes[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83555.
- [10] Mirza F, Lorenzo J, Drissi H, et al. Dried plum alleviates symptoms of inflammatory arthritis in TNF transgenic mice[J]. *J Nutr Biochem*, 2018, 52: 54-61.
- [11] Walle L V, Van Opdenbosch N, Jacques P, et al. Negative regulation of the NLRP3 inflammasome by A20 protects against arthritis[J]. *Nature*, 2014, 512(7512): 69-73.
- [12] Suschak J J, Wang S, Fitzgerald K A, et al. Identification of Aim2 as a sensor for DNA vaccines[J]. *J Immunol*, 2015, 194(2): 630-636.
- [13] Mengshol J A, Vincenti M P, Coon C I, et al. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3[J]. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(4): 801-811.
- [18] Iyer A, Zurolo E, Prabowo A, et al. MicroRNA-146a: a key regulator of astrocyte-mediated inflammatory response[J]. *Plos One*, 2012, 7(9): e44789.
- [19] Plemel J R, Duncan G, Chen K W, et al. Graded forceps crush spinal cord injury model in mice[J]. *J Neurotrauma*, 2008; 25(4): 350-370.
- [20] Basso D M, Beattie M S, Bresnahan J C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. *J Neurotrauma*, 1995, 12(1): 1-21.
- [20] Fu E S, Tummala R P. Neuroprotection in brain and spinal cord trauma[J]. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2005, 18(2): 181-187.
- [21] 汪红林, 徐祝军. 脊髓损伤后细胞凋亡基因调控研究进展[J]. *国际骨科杂志*, 2010, 31(3): 187-189.
- [22] Lee B B, Cripps R A, Fitzharris M, et al. The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate[J]. *Spinal Cord*, 2013, 52(2): 110-116.
- [23] Strickland E R, Hook M A, Balaraman S, et al. MicroRNA dysregulation following spinal cord contusion: implications for neural plasticity and repair[J]. *Neuroscience*, 2011, 186(186): 146-160.
- [24] Scheff S W, Rabchevsky A G, Fugaccia I, et al. Experimental modeling of spinal cord injury: characterization of a forcedefined injury device[J]. *J Neurotrauma*, 2003, 20(2): 179-193.
- [25] Liu G, Detloff M R, Miller K N, et al. Exercise modulates microRNAs that affect the PTEN/mTOR pathway in rats after spinal cord injury[J]. *Exp Neurol*, 2012, 233: 447-456.
- [26] Yunta M, Nietodiaz M, Esteban F J, et al. MicroRNA Dysregulation in the Spinal Cord following Traumatic Injury[J]. *Plos One*, 2012, 7(4): e34534.

(上接第600页)