

# 降钙素基因相关肽对 LPS 并 ATP 诱导小胶质细胞 NLRP3 炎症小体激活影响

郭蜜<sup>1</sup>, 向建琴<sup>2</sup>, 张健<sup>1</sup>, 李忠正<sup>1</sup>, 邱继文<sup>1</sup>, 崔银洁<sup>1</sup>

(1 天津中医药大学实验针灸学研究中心, 天津 301600; 2 重庆市陆军军医大学第一附属医院健康管理科)

**[摘要]** 目的 探讨降钙素基因相关肽(CGRP)对脂多糖(LPS)联合三磷酸腺苷(ATP)诱导的 BV2 小胶质细胞 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NLRP3)炎症小体活化的抑制作用。方法 通过检测不同方法处理的各组细胞 NLRP3 蛋白含量, 确定 LPS 联合 ATP 激活小胶质细胞最佳模型并筛选 CGRP 最佳作用浓度。实验分为对照组、模型组以及 CGRP 组, 采用蛋白免疫印迹法检测细胞 NLRP3、凋亡相关的斑点样蛋白(ASC)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(caspase-1)的表达, 酶联免疫吸附试验法检测细胞内炎症因子白细胞介素 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )的表达。结果 BV2 小胶质细胞 NLRP3 炎症小体激活最佳模型的制备方法为先加入 100  $\mu$ g/L 的 LPS 作用 12 h, 再加入 5 mmol/L 的 ATP 继续作用 45 min; CGRP 抑制 NLRP3 炎症小体激活的最佳浓度为 10  $\mu$ g/L。模型组细胞 NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1 $\beta$  的蛋白表达较对照组明显升高, CGRP 组细胞上述蛋白表达较模型组明显降低, 差异均有显著性 ( $F=7.261\sim 151.232, P<0.05$ )。结论 CGRP 可能通过抑制 BV2 小胶质细胞 NLRP3 炎症小体激活, 发挥抗炎神经保护作用。

**[关键词]** 降钙素基因相关肽; NLR 家族, 热蛋白结构域包含蛋白 3; 小神经胶质细胞; 脂多糖类; 腺苷三磷酸; 神经保护

**[中图分类号]** R364.5; R338 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2096-5532(2022)02-0229-04

**doi:** 10.11712/jms.2096-5532.2022.58.053

**[开放科学(资源服务)标识码(OSID)]**



**[网络出版]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/37.1517.R.20220320.1554.016.html>; 2022-03-22 09:00:53

**EFFECT OF CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE ON THE ACTIVATION OF NLRP3 INFLAMMASOME INDUCED BY LPS AND ATP IN MICROGLIA** GUO Mi, XIANG Jianqin, ZHANG Jian, LI Zhongzheng, QIU Jiwen, CUI Yinjie (Research Center of Experimental Acupuncture Science, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301600, China)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the inhibitory effect of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on the activation of nod like receptor thermoprotein domain associated protein 3 (NLRP3) inflammatory bodies in BV2 microglia induced by lipopolysaccharide (LPS) combined with adenosine triphosphate (ATP). **Methods** By detecting the content of NLRP3 protein in cells with different treatment methods, the best model of LPS combined with ATP activated microglia was determined, and the best concentration of CGRP was screened. The experiment was divided into control group, model group and CGRP group. The protein expressions of NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing (ASC) and cysteinyl aspartate specific protease-1 (caspase-1) were detected by Western blot; Quantitative detection of intracellular inflammatory factor interleukin-1 $\beta$  protein expression by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** The best model of NLRP3 inflammasome activation in BV2 microglia was prepared with 100  $\mu$ g/L LPS used for 12 h, and then 5 mmol/L ATP was added for 45 min; the optimal concentration of CGRP to inhibit NLRP3 inflammasome activation was 10  $\mu$ g/L. Compared with the control group, the expression of NLRP3, ASC, caspase-1 and IL-1 $\beta$  in model group was significantly higher; compared with the model group, the expression of NLRP3, ASC, caspase-1 and IL-1 $\beta$  decreased significantly ( $F=7.261\sim 151.232, P<0.05$ ). **Conclusion** CGRP can play an anti-inflammatory and neuroprotective role by inhibiting the activation of NLRP3 inflammatory bodies in BV2 microglia.

**[KEY WORDS]** calcitonin gene-related peptide; NLR family, pyrin domain-containing 3 protein; microglia; lipopolysaccharides; adenosine triphosphate; neuroprotection

小胶质细胞在中枢神经系统的免疫调节过程中发挥核心作用<sup>[1]</sup>。研究发现, 小胶质细胞中 NOD

样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NLRP3)在人类轻度认知障碍和阿尔兹海默病(AD)等神经变性疾病中发挥着重要的作用<sup>[2-3]</sup>。NLRP3 作为最具有特色的炎症小体, 是胞浆内识别受体 NOD 样受体家族的一员, 当细胞受到感染、组织损伤等刺激时, 被激活的 NLRP3 能够通过结合凋亡相关的斑点样蛋白

**[收稿日期]** 2020-05-23; **[修订日期]** 2021-09-17

**[基金项目]** 天津市教委科研计划项目(2018KJ024)

**[第一作者]** 郭蜜(1994-), 女, 硕士。

**[通信作者]** 崔银洁(1988-), 女, 硕士, 讲师。E-mail: whylittlee

@163.com。

(ASC)招募半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(caspase-1)前体形成 NLRP3 炎症小体,从而促进 caspase-1 前体激活成为 caspase-1,诱导白细胞介素  $1\beta$ (IL- $1\beta$ )和白细胞介素 18(IL-18)的成熟<sup>[4]</sup>。降钙素基因相关肽(CGRP)是一种神经肽类物质,可以直接作用于巨噬细胞和树突状细胞,抑制 IL- $1\beta$  的生成与释放<sup>[5-7]</sup>。本团队前期研究显示,CGRP 可以改善脊髓损伤大鼠的运动功能,抑制半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(caspase-3)的表达,具有神经保护作用,但其分子机制仍不清楚<sup>[8]</sup>。NLRP3 炎症小体的激活能够促进大量 IL- $1\beta$  的产生,而 CGRP 可以抑制 IL- $1\beta$  的生理功能,CGRP 与 NLRP3 炎症小体之间可能存在着一定的联系。为了进一步探明二者关系,本研究采用脂多糖(LPS)与三磷酸腺苷(ATP)诱导的 BV2 小胶质细胞炎症小体激活模型,从 NLRP3 炎症小体途径探讨 CGRP 的神经保护机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

BV2 小胶质细胞,购自 Santa Cruz Biotechnology 公司。胎牛血清(Cell Signaling Technology);LPS(爱必信);ATP(FERMRNTAS); $\beta$ -actin(Santa Cruz Biotechnology);CGRP 抗体(北京义翘神州科技有限公司);ASC、caspase-1 和 NLRP3 抗体(abcam);酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);BCA 蛋白定量试剂盒(博士德生物工程有限公司);ECL 显影液和 PVDF 膜(Millipore);HRP 标记二抗(Sigma)。全波长酶标仪(Bio-tek,ELX 800);垂直电泳装置(北京市六一仪器厂,DYCZ-24DN);CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(Thermo-Forma,form 1341);LabWorks™ 凝胶成像及分析系统(美国 UVP 公司,GelDoc-It310)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养与传代** BV2 小胶质细胞置于含体积分数 0.10 胎牛血清和 10 g/L 双抗的 RPMI 1640 培养液中,放于 37 °C 的 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中,待细胞生长融合率 80% 时传代,隔 2 d 传代 1 次,传代 3 次后且细胞状态良好时用于后续实验。

**1.2.2 LPS 联合 ATP 激活小胶质细胞最佳模型确定及 CGRP 最佳剂量筛选** 将细胞分为 6 组,依据有关文献确定两种细胞模型处理条件<sup>[9-11]</sup>。对照组细胞用含体积分数 0.10 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液培养;模型 1 组细胞先加入 100  $\mu$ g/L 的 LPS

作用 12 h,然后再加入 5 mmol/L 的 ATP 继续作用 45 min;模型 2 组细胞先加入 100  $\mu$ g/L 的 LPS 作用 4 h,然后再加入 5 mmol/L 的 ATP 继续作用 45 min;CGRP1、CGRP10、CGRP100 组细胞先分别用 1、10、100  $\mu$ g/L 的 CGRP 预处理 1 h,然后加入 100  $\mu$ g/L 的 LPS 作用 12 h,再加入 5 mmol/L 的 ATP 继续作用 45 min。根据 NLRP3 蛋白含量筛选出最佳模型和 CGRP 的最佳作用浓度进行后续实验。

**1.2.3 细胞 NLRP3、caspase-1、ASC 蛋白表达的检测** 采用蛋白免疫印迹法检测对照组(A 组)、模型组(按筛选出的最佳模型制备方法进行处理,B 组)、CGRP 组(按筛选出的最佳作用浓度的 CGRP 进行处理,C 组)细胞中 NLRP3、caspase-1 和 ASC 的含量。样品裂解后提取蛋白,采用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后,浸入脱脂奶粉封闭液中,室温下于摇床上轻轻摇动 2 h;然后分别加入兔抗人单克隆 NLRP3 抗体(1 : 100)、ASC 抗体(1 : 50)、caspase-1(1 : 200)抗体以及兔抗人多克隆 GAPDH 抗体(1 : 500)4 °C 孵育过夜。TBS-T 洗膜后,将膜于含对应二抗(HRP 标记二抗)的脱脂奶粉溶液中,室温作用 1.5 h,用 ECL 显影液显影,用 LabWorks™ 凝胶成像及分析系统摄像,分析条带的光密度值。

**1.2.4 细胞 IL- $1\beta$  表达的 ELISA 检测** 收集对照组、模型组和 CGRP 组的细胞培养上清液,严格按照 IL- $1\beta$  检测试剂盒的说明进行检测。反应终止后使用全波长酶标仪于 450 nm 波长处检测吸光度值,根据标准品浓度和吸光度值做标准曲线,计算各组样本吸光度值对应的浓度值。

### 1.3 统计学分析

应用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析。计量资料结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,先进行方差齐性检验,方差齐则组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法;方差不齐则组间比较采用 Kruskal-Wallis  $H$  检验。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 最佳模型与 CGRP 最佳作用浓度

对照组、模型 1 组、模型 2 组以及 CGRP1、CGRP10、CGRP100 组 NLRP3 蛋白表达量分别为  $0.215 \pm 0.003$ 、 $0.394 \pm 0.006$ 、 $0.303 \pm 0.002$ 、 $0.054 \pm 0.000$ 、 $0.036 \pm 0.000$ 、 $0.047 \pm 0.000$  ( $n=3$ )。对照

组、模型 1 组、模型 2 组 NLRP3 表达量比较差异有统计学意义( $H=7.200, P<0.05$ ),其中模型 1 组 NLRP3 蛋白表达量最高,因此选择模型 1 为最佳模型进行后续实验。对照组、模型 1 组以及 CGRP1、CGRP10、CGRP100 组 NLRP3 表达量比较差异有统计学意义( $H=13.573, P<0.05$ ),其中 CGRP10 组 NLRP3 蛋白表达量最低,因此选择 10  $\mu\text{g/L}$  的 CGRP 进行后续实验。见图 1。

2.2 CGRP 对 NLRP3、ASC、caspase-1 和 IL-1 $\beta$  蛋白表达的影响

模型组细胞 NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1 $\beta$  的蛋白表达较对照组明显升高,CGRP 组细胞上述蛋白表达较模型组明显降低,差异均有显著意义( $F=7.261\sim151.232, P<0.05$ )。表明 CGRP 可以抑制炎症小体 NLRP3 的激活从而减轻炎症反应。见图 2 和表 1。

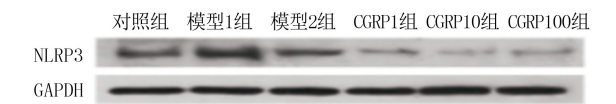


图 1 以 NLRP3 蛋白表达为标准确定最佳模型与 CGRP 最佳作用浓度

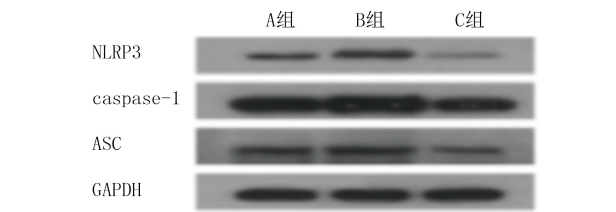


图 2 各组细胞 NLRP3、caspase-1 和 ASC 表达的蛋白免疫印迹检测

表 1 各组细胞 NLRP3、caspase-1、ASC 和 IL-1 $\beta$  蛋白表达的比较( $n=3, \bar{x}\pm s$ )

组别	NLRP3	ASC	caspase-1	IL-1 $\beta$
A 组	0.215 $\pm$ 0.003	0.224 $\pm$ 0.049	1.283 $\pm$ 0.210	31.756 $\pm$ 0.261
B 组	0.394 $\pm$ 0.006*	0.357 $\pm$ 0.041*	1.812 $\pm$ 0.174*	124.495 $\pm$ 0.690*
C 组	0.036 $\pm$ 0#	0.129 $\pm$ 0.019#	0.910 $\pm$ 0.173#	53.056 $\pm$ 0.216#

各指标组间比较, $F=7.261\sim151.232, P<0.05$ 。与对照组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

3 讨 论

NLRP3 炎症小体异常活化产生的过度炎症反应与人类多种疾病密切相关,其中包括 AD、脊髓损伤等神经系统疾病<sup>[12-13]</sup>。已有实验研究结果表明,在 AD 模型中,NLRP3 基因敲除的小鼠空间记忆能力显著提升,运动功能障碍与多巴胺能神经元退行性病变得以改善<sup>[14]</sup>;在脊髓损伤模型中,小胶质

细胞内的 NLRP3 炎症小体活化,并进一步激活核转录因子  $\kappa\text{B}$ (NF- $\kappa\text{B}$ )信号通路,形成级联式炎症反应,加速神经元的死亡<sup>[15]</sup>。因此,抑制 NLRP3 炎症小体的过度激活可能是预防或治疗神经炎症性疾病的关键。

研究发现,体外 NLRP3 炎症小体的激活需要两个信号:信号 1 是指当细胞受到 LPS 的刺激时,Toll 样受体 4(TLR4)迅速识别,激活 NF- $\kappa\text{B}$  通路,导致 pro-IL-1 $\beta$  和 NLRP3 蛋白水平的上调;信号 2 是指高浓度 ATP 刺激 P2X7,导致  $\text{K}^+$  外流,促进 ASC 和 caspase-1 的集合,从而导致 NLRP3 炎症小体的激活<sup>[16]</sup>。有研究表明,将 ATP 与 LPS 联合激活 NLRP3 炎症小体,可以缩短作用时间,并且刺激效果更显著<sup>[17]</sup>。但文献中未报道 LPS 联合 ATP 激活 BV2 小胶质细胞 NLRP3 炎症小体的具体浓度与反应时间。因此,本研究首先通过实验确定 LPS 联合 ATP 激活 BV2 小胶质细胞 NLRP3 炎症小体的最佳模型,结果表明,先以 100  $\mu\text{g/L}$  的 LPS 作用 12 h,然后再以 5 mmol/L 的 ATP 继续作用 45 min,小胶质细胞中炎症小体的激活最为显著,因此选用该浓度和反应时间建立体外小胶质细胞 NLRP3 激活模型。

CGRP 为一种由 37 个氨基酸构成的多功能神经肽,是目前已知最强的扩血管物质,尤其对脑血管扩张具有极强的作用<sup>[18]</sup>。在免疫炎症方面,CGRP 具有抗炎和促炎双向调节作用。例如,注射 CGRP 后,烟曲霉感染的真菌性角膜炎小鼠角膜组织中的 IL-1 $\beta$  水平明显降低,角膜炎症状随之减轻,CGRP 发挥了抗炎作用<sup>[19]</sup>;而在偏头痛模型中,CGRP 则通过一系列反应参与三叉神经血管系统信号转导,促进神经源性炎症从而引发偏头痛<sup>[20]</sup>。为了进一步了解 CGRP 在炎症中的作用,本研究将不同浓度的 CGRP 作用于 BV2 小胶质细胞,结果表明 CGRP 可以显著抑制 NLRP3 炎症小体的激活,但该作用并不呈浓度依赖性。因此我们推测,CGRP 发挥抗炎和促炎的不同作用可能与其组织特性有关。既往有研究还表明,CGRP 具有神经保护作用,该作用可能与 CGRP 抑制低氧海马神经元 c-fos 的表达,降低高阈值钙电流,抑制低氧时细胞外钙离子内流有关<sup>[21]</sup>,但其具体机制尚不很清楚。本团队在研究 CGRP 与炎症关系时显示,CGRP 和 NLRP3 炎症小体之间存在着千丝万缕的关系:CGRP 可以抑制 IL-1 $\beta$  和抗原呈递细胞,而 NLRP3 炎症小体的激活

则可以促进 IL-1 $\beta$  的表达<sup>[22]</sup>;对比 CGRP 与 NLRP3 细胞内激活与传递途径显示,二者存在共同的信号通路 cAMP/PKA<sup>[23-24]</sup>。因此,我们推测 CGRP 与 NLRP3 之间可能存在一定的调控关系,故而设计了本次实验。本文结果表明,CGRP 可以降低 LPS 联合 ATP 诱导的 BV2 小胶质细胞中 NLRP3、ASC 和 caspase-1 的蛋白含量,减少细胞中 IL-1 $\beta$  的表达,提示 CGRP 可以抑制小胶质细胞中 NLRP3 炎症小体的激活。本研究揭示了 CGRP 神经保护的又一作用机制,为临床上 CGRP 治疗神经炎性疾病提供了实验依据。

[参考文献]

[1] HICKMAN S, IZZY S, SEN P, et al. Microglia in neurodegeneration[J]. *Nature Neuroscience*, 2018,21(10):1359-1369.

[2] HENEKA M T, KUMMER M P, STUTZ A, et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice[J]. *Nature*, 2013,493(7434):674-678.

[3] ISING C, VENEGAS C, ZHANG S S, et al. NLRP3 inflammasome activation drives tau pathology[J]. *Nature*, 2019,575(7784):669-673.

[4] BROZ P, DIXIT V M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2016,16(7):407-420.

[5] EDVINSSON L, HAANES K A, WARFVINGE K, et al. CGRP as the target of new migraine therapies — successful translation from bench to clinic[J]. *Nature Reviews Neurology*, 2018,14(6):338-350.

[6] HOLZMANN B. Antiinflammatory activities of CGRP modulating innate immune responses in health and disease[J]. *Current Protein & Peptide Science*, 2013,14(4):268-274.

[7] MIZUSHINA Y, SHIRASUNA K, USUI F, et al. NLRP3 protein deficiency exacerbates hyperoxia-induced lethality through Stat3 protein signaling independent of interleukin-1 $\beta$  [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015,290(8):5065-5077.

[8] 柯晓华,葛杜鹃,王文春,等. 运动点电针对急性脊髓损伤大鼠半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 和降钙素基因相关肽表达的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2014,29(10):913-917.

[9] 刘富群,高崎,王丹丹,等. 银杏酮酯抑制 LPS/ATP 诱导原代小胶质细胞 NLRP3 炎症小体的激活机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2018,43(16):3346-3352.

[10] 王伟,戴敏,徐忠东. 丹皮酚对脂多糖/三磷酸腺苷诱导的小胶质细胞 NLRP3 炎症小体激活的影响[J]. *中国药理学通报*, 2014,30(5):652-656.

[11] DUAN J X, ZHOU Y, ZHOU A Y, et al. Calcitonin gene-related peptide exerts anti-inflammatory property through regulating murine macrophages polarization in vitro[J]. *Molecular*

*Immunology*, 2017,91:105-113.

[12] HAN X J, SUN S F, SUN Y M, et al. Small molecule-driven NLRP3 inflammation inhibition via interplay between ubiquitination and autophagy: implications for Parkinson disease[J]. *Autophagy*, 2019,15(11):1860-1881.

[13] JIANG W, LI M Q, HE F, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome to attenuate spinal cord injury in mice[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2017,14(1):207.

[14] GOLDMANN T, TAY T L, PRINZ M. Love and death: microglia, NLRP3 and the Alzheimer's brain[J]. *Cell Research*, 2013,23(5):595-596.

[15] DAI W Y, WANG X G, TENG H L, et al. Celastrol inhibits microglial pyroptosis and attenuates inflammatory reaction in acute spinal cord injury rats[J]. *International Immunopharmacology*, 2019,66:215-223.

[16] GOMBAULT A, BARON L, COUILLIN I. ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation[J]. *Frontiers in Immunology*, 2013,3:414.

[17] 刘蓓桦,候梁,罗伟珏,等. LPS 与 ATP 共同诱导巨噬细胞中 NLRP3 炎症小体的激活[J]. *北京农学院学报*, 2018,33(1):74-78.

[18] OMEIS I, NEIL J A, JAYSON N A, et al. Treatment of cerebral vasospasm with biocompatible controlled-release systems for intracranial drug delivery[J]. *Neurosurgery*, 2008,63(6):1011-1019.

[19] XU M, LI C, ZHAO G Q, et al. The anti-inflammatory regulation of calcitonin gene-related peptide in mouse *Aspergillus fumigatus* keratitis[J]. *International Journal of Ophthalmology*, 2020,13(5):701-707.

[20] KUZAWIŃSKA O, LIS K, CESSAK G, et al. Targeting of calcitonin gene-related peptide action as a new strategy for migraine treatment [J]. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, 2016,50(6):463-467.

[21] HARADA N, NARIMATSU N, KURIHARA H, et al. Stimulation of sensory neurons improves cognitive function by promoting the hippocampal production of insulin-like growth factor- I in mice[J]. *Translational Research: the Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 2009,154(2):90-102.

[22] 刘元,郭俊峰,蔡俊,等. 降钙素基因相关肽通过降低炎性小体活性抑制巨噬细胞功能[J]. *免疫学杂志*, 2017,33(5):400-404.

[23] RAYAMAJHI M, MIAO E A. Just say NO to NLRP3[J]. *Nature Immunology*, 2013,14(1):12-14.

[24] SHI L, RAO S, SUN H, et al. *In vitro* characterization of AA71, a potent and selective human monoclonal antibody against CGRP receptor[J]. *The Journal of Headache and Pain*, 2013,14(1):1.

(本文编辑 马伟平)