

## 炎症环境下牙髓成纤维细胞中 NOD 样受体蛋白 3 炎症体相关分子表达的调节

<https://doi.org/10.12307/2022.810>张安生<sup>1</sup>, 张海欧<sup>2</sup>, 倪龙兴<sup>1</sup>

投稿日期: 2021-07-02

采用日期: 2021-08-09

修回日期: 2021-10-26

在线日期: 2021-12-06

中图分类号:

R459.9; R781.3; R392.1

文章编号:

2095-4344(2022)26-04107-06

文献标识码: A

## 文章快速阅读:

体外原代培养牙髓成纤维细胞

## 结论:

(1) 脂多糖刺激通过 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路上调牙髓成纤维细胞内 NOD 样受体蛋白 3 和白细胞介素 1 $\beta$  的表达;  
(2) Caspase-1 转录调节机制有待进一步研究。

## 实验分组:

(1) A 组: 正常培养, 不做任何处理;  
(2) B 组: 脂多糖刺激模拟牙髓炎症环境;  
(3) C 组: 加入 Toll 样受体 4 特异性抑制剂与脂多糖;  
(4) D 组: 加入髓样分化因子 88 特异性抑制剂与脂多糖;  
(5) E 组: 加入核因子  $\kappa$ B 特异性抑制剂与脂多糖;  
(6) F 组: 加入髓样分化因子 88 特异性抑制剂阴性对照与脂多糖。

## 检测指标:

(1) NOD 样受体蛋白 3、Caspase-1、白细胞介素 1 $\beta$  基因表达水平;  
(2) NOD 样受体蛋白 3、Caspase-1 蛋白表达水平;  
(3) 白细胞介素 1 $\beta$  分泌水平。

## 文题释义:

**NOD样受体:** 即核酸结合与寡聚化结构域样受体, 可识别病毒的病原相关分子模式。众所周知, NOD样受体调控炎性体的形成, 诱导产生白细胞介素1 $\beta$ 和白细胞介素18, 从而参与炎症反应。

**NOD样受体蛋白3炎症体:** 由NOD样受体蛋白3利用自体寡聚化形成蛋白支架, 通过含有CARD结构域的凋亡相关点状蛋白募集Caspase-1所组成的高分子蛋白复合体。NOD样受体蛋白3是目前研究最为广泛和深入的炎症体, 也是目前的研究热点。

## 摘要

**背景:** NOD样受体蛋白3炎症体是细胞抵御外来病原入侵的重要炎症因子, 前期研究已证实其在牙髓成纤维细胞中有表达, 然而炎症环境下牙髓成纤维细胞NOD样受体蛋白3炎症体相关分子的转录调节机制尚不清楚。

**目的:** 阐明炎症环境下牙髓成纤维细胞中NOD样受体蛋白3炎症体相关分子的转录调节机制。

**方法:** 选择第4代牙髓成纤维细胞, 分6组: A组正常培养, 不进行任何处理; B组加入脂多糖刺激6 h; C组加入Toll样受体4特异性抑制剂处理1 h, 再加入Toll样受体4特异性抑制剂与脂多糖混合溶液处理6 h; D组加入髓样分化因子88特异性抑制剂处理1 h, 再加入髓样分化因子88特异性抑制剂与脂多糖混合溶液处理6 h; E组加入核因子 $\kappa$ B特异性抑制剂处理1 h, 再加入核因子 $\kappa$ B特异性抑制剂与脂多糖混合溶液处理6 h; F组加入髓样分化因子88特异性抑制剂阴性对照处理1 h, 再加入髓样分化因子88特异性抑制剂阴性对照与脂多糖混合溶液处理6 h。采用RT-PCR检测NOD样受体蛋白3、Caspase-1与白细胞介素1 $\beta$  mRNA的表达, Western blot检测NOD样受体蛋白3与Caspase-1蛋白表达, ELISA法检测白细胞介素1 $\beta$ 释放水平。

**结果与结论:** ①与A组比较, B组NOD样受体蛋白3、Caspase-1及白细胞介素1 $\beta$  mRNA表达水平升高( $P < 0.05$ ); 与B组比较, C-E组NOD样受体蛋白3、白细胞介素1 $\beta$  mRNA表达水平降低( $P < 0.05$ ), C组Caspase-1 mRNA表达水平降低( $P < 0.05$ ); ②与A组比较, B组NOD样受体蛋白3、Caspase-1蛋白表达升高( $P < 0.05$ ); 与B组比较, C-E组NOD样受体蛋白3蛋白表达降低( $P < 0.05$ ), C组Caspase-1蛋白表达降低( $P < 0.05$ ); ③与A组比较, B组白细胞介素1 $\beta$ 水平升高( $P < 0.05$ ); 与B组比较, C-E组白细胞介素1 $\beta$ 水平降低( $P < 0.05$ ); ④结果表明, 脂多糖通过TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B信号通路上调牙髓成纤维细胞内NOD样受体蛋白3和白细胞介素1 $\beta$ 的表达。

**关键词:** 牙髓成纤维细胞; 固有免疫; NOD样受体4; NOD样受体蛋白3炎症体; 信号通路; 白细胞介素1 $\beta$ ; 核因子 $\kappa$ B

## Regulating the expression of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 inflammasome-related molecules in dental pulp fibroblasts under inflammation

Zhang Ansheng<sup>1</sup>, Zhang Haiou<sup>2</sup>, Ni Longxing<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Stomatology, Xi'an International Medical Center Hospital, Xi'an 710018, Shaanxi Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology and Otorhinolaryngology, the 928<sup>th</sup> Hospital of Chinese PLA, Haikou 570100, Hainan Province, China

Zhang Ansheng, MD, Attending physician, Department of Stomatology, Xi'an International Medical Center Hospital, Xi'an 710018, Shaanxi Province, China

**Corresponding author:** Ni Longxing, MD, Chief physician, Department of Stomatology, Xi'an International Medical Center Hospital, Xi'an 710018, Shaanxi Province, China<sup>1</sup>西安国际医学中心医院口腔科, 陕西省西安市 710018; <sup>2</sup>解放军联勤保障部队第928医院五官科, 海南省海口市 570100

第一作者: 张安生, 男, 1983年生, 安徽省肥西县人, 汉族, 2014年解放军第四军医大学口腔医学院毕业, 博士, 主治医师, 主要从事牙髓生物学领域研究。

通讯作者: 倪龙兴, 博士, 主任医师, 西安国际医学中心医院口腔科, 陕西省西安市 710018

<https://orcid.org/0000-0003-3268-7620> (张安生)

引用本文: 张安生, 张海欧, 倪龙兴. 炎症环境下牙髓成纤维细胞中 NOD 样受体蛋白 3 炎症体相关分子表达的调节 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(26):4107-4112.



## Abstract

**BACKGROUND:** Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor protein 3 inflammasome is an important inflammatory factor for cellular defense against various pathogens, which has been confirmed to be expressed in dental pulp fibroblasts. However, the mechanisms underlying the transcription regulation of NOD-like receptor protein 3 inflammasome in dental pulp fibroblasts under inflammation remains unclear.

**OBJECTIVE:** To elucidate the mechanisms underlying the transcription regulation of NOD-like receptor protein 3 inflammasome in dental pulp fibroblasts under inflammation.

**METHODS:** The 4<sup>th</sup> generation dental pulp fibroblasts were divided into six groups. Group A was cultured normally without any treatment. Group B was simulated with lipopolysaccharide for 6 hours. Group C was treated with a specific inhibitor of Toll-like receptor 4 for 1 hour, and then it was also treated with a mixed solution of Toll-like receptor 4 specific inhibitor and lipopolysaccharide for 6 hours. Group D was treated with a specific inhibitor of myeloid differentiation factor 88 for 1 hour, and then treated with a mixed solution of specific inhibitor of myeloid differentiation factor 88 and lipopolysaccharide for 6 hours. Group E was treated with a specific inhibitor of nuclear factor  $\kappa$ B for 1 hour, and then treated with a mixture solution of specific inhibitor of nuclear factor  $\kappa$ B and lipopolysaccharide for 6 hours. Group F was treated with a negative control of myeloid differentiation factor 88 specific inhibitor for 1 hour, and then treated with a mixed solution of myeloid differentiation factor 88 specific inhibitor negative control and lipopolysaccharide for 6 hours. Real-time polymerase chain reaction was used to detect the mRNA expression of NOD-like receptor protein 3, Caspase-1 and interleukin 1 $\beta$ . Western blot was used to detect the expression of NOD-like receptor protein 3 and Caspase-1. And enzyme linked immunosorbent assay was used to detect the release level of interleukin 1 $\beta$ .

**RESULTS AND CONCLUSION:** Compared with group A, the mRNA expression of NOD-like receptor protein 3, Caspase-1 and interleukin 1 $\beta$  was increased in group B ( $P < 0.05$ ), while compared with group B, the mRNA expression of NOD-like receptor protein 3 and interleukin 1 $\beta$  was decreased in groups C-E ( $P < 0.05$ ), and the mRNA expression of Caspase-1 was also decreased in group C ( $P < 0.05$ ). Compared with group A, the protein expression of NOD-like receptor protein 3 and Caspase-1 was increased in group B ( $P < 0.05$ ), while compared with group B, the protein expression of NOD-like receptor protein 3 was decreased in groups C-E ( $P < 0.05$ ), and the protein expression of Caspase-1 was also decreased in group C ( $P < 0.05$ ). Compared with group A, the level of interleukin 1 $\beta$  was increased in group B ( $P < 0.05$ ), while compared with group B, the levels of interleukin 1 $\beta$  were decreased in groups C-E ( $P < 0.05$ ). All these findings indicate that lipopolysaccharide upregulates the expression of NOD-like receptor protein 3 and interleukin 1 $\beta$  in dental pulp fibroblasts through the Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88/nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway.

**Key words:** dental pulp fibroblasts; innate immunity; nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor 4; nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 inflammasome; signaling pathway; interleukin 1 $\beta$ ; nuclear factor  $\kappa$ B

**How to cite this article:** ZHANG AS, ZHANG HO, NI LX. Regulating the expression of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 inflammasome-related molecules in dental pulp fibroblasts under inflammation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(26):4107-4112.

## 0 引言 Introduction

致龋微生物的侵袭是牙髓组织出现感染并产生炎症的最主要原因<sup>[1]</sup>。牙髓组织周围由坚硬的牙体硬组织包绕,后者使得牙髓组织免受外界病原的侵袭<sup>[2]</sup>,一旦牙体硬组织的完整性遭到破坏,致龋微生物及其代谢产物即可侵入牙髓组织。

固有免疫系统是保护机体免受病原侵袭的第一道屏障<sup>[3]</sup>,固有免疫主要由巨噬细胞等专职免疫细胞介导;然而,研究发现一些非专职免疫细胞(上皮细胞、内皮细胞以及成纤维细胞等)同样可以介导固有免疫<sup>[4]</sup>。作为牙髓的主体细胞,牙髓成纤维细胞在牙髓组织出现炎症或受到外界刺激时可表达多种促炎因子,如Toll样受体2、Toll样受体4、NOD1、NOD2、白细胞介素6、白细胞介素8和白细胞介素1 $\beta$ 等<sup>[5-8]</sup>。

与其他的细胞因子不同,白细胞介素1 $\beta$ 从表达上调到成熟并释放到胞外,整个过程的调节是一个两步机制<sup>[4]</sup>。当细胞受到外界刺激时,细胞膜上的Toll样受体识别病原,Toll样受体信号通路的激活上调白细胞介素1 $\beta$ 基因表达,促进白细胞介素1 $\beta$ 前体即白细胞介素1 $\beta$ 酶原的合成;白细胞介素1 $\beta$ 酶原无法被细胞释放,必须经过水解形成成熟的白细胞介素1 $\beta$ 才能行使促炎功能,这一步依赖于一种半胱氨酸蛋白酶——Caspase-1,后者由炎症体激活。

当前,NOD样受体蛋白3炎症体是炎症领域的研究热点,也是研究最为广泛和深入的一种炎症小体,它是由NOD样受体蛋白3蛋白支架、接头蛋白ASC及Caspase-1前体所组成的高分子蛋白复合体<sup>[9]</sup>。在特定激活条件下,NOD样受体蛋白3通过其核酸结合与寡聚化结构域实现寡聚化形成NOD样受体蛋白3支架,NOD样受体蛋白3包含PYD结构域,其可通过同型反应结合接头蛋白ASC,后者再通过

CARD结构域募集并结合Caspase-1,形成成熟的NOD样受体蛋白3炎症体。在NOD样受体蛋白3炎症体成熟活化以后,Caspase-1前体会自我剪切,形成p10和p20并以四聚体形式呈现,即为活化的Caspase-1,其具有蛋白水解作用,可以水解白细胞介素1 $\beta$ ,促使其成熟并释放到胞外,行使促炎功能。

有研究证实,牙髓组织中有NOD样受体蛋白3炎症体表达<sup>[10]</sup>,研究组前期研究也证实炎症牙髓组织牙髓成纤维细胞中NOD样受体蛋白3炎症体相关分子表达上调,体外研究也进一步证实脂多糖刺激上调牙髓成纤维细胞中NOD样受体蛋白3炎症体相关分子表达水平<sup>[11]</sup>。然而,脂多糖刺激通过何种信号通路上调牙髓成纤维细胞中NOD样受体蛋白3炎症体相关分子表达水平目前仍不清楚。脂多糖是Toll样受体4的特异性配体,提示Toll样受体4信号通路在脂多糖诱导NOD样受体蛋白3炎症体相关分子表达水平上调过程中具有调节作用。BAUERNFEIND等<sup>[12]</sup>的研究表明,激活核因子 $\kappa$ B的模式识别受体可以调控NOD样受体蛋白3的表达,因此实验采用脂多糖作为刺激物模拟牙髓炎症环境,以激活牙髓成纤维细胞中的NOD样受体蛋白3炎症体,在此基础上通过加入特异性抑制剂的方式分别抑制Toll样受体、髓样分化因子88及核因子 $\kappa$ B的活性,观察脂多糖刺激人牙髓成纤维细胞时对NOD样受体蛋白3炎症体表达水平的影响。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验,组间比较进行ANOVA检验与Lsd-t检验。

1.2 时间及地点 实验于2020年7月至2021年2月在西安国际医学中心医院实验中心完成。

1.3 材料 Toll 样受体 4 特异性抑制剂 (CLI-095)、髓样分化因子 88 特异性抑制剂 (Pepinh-MYD)、髓样分化因子 88 特异性抑制剂阴性对照 (Pepinh-Control) 及 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化抑制剂 (Bay 11-7082)(Invivogen, 美国); 脂多糖 (O111:B4, Sigma, 美国); 鼠抗人 NOD 样受体蛋白 3 抗体、兔抗人 Caspase-1 抗体 (CST, 美国); 人白细胞介素 1 $\beta$  ELISA 试剂盒 (R&D, 美国); ATP(MP, 美国);  $\alpha$ -MEM 培养液、胎牛血清 (Gibco, 美国); RNAiso Plus(Takara, 日本); 反转录试剂盒、RT-PCR 试剂盒 (Roche, 德国); 离心机 (Eppendorf, 德国); RT-PCR 系统 (Applied Biosystems, 美国)。

#### 1.4 实验方法

1.4.1 牙髓成纤维细胞的体外培养 收集西安国际医学中心医院口腔科因正畸减数或阻生需拔除的健康恒牙, 患者年龄 25 岁以下, 患者对实验知情同意, 并均签署了知情同意书。采用组织块法进行牙髓成纤维细胞的原代培养<sup>[13]</sup>。取新鲜拔除的离体牙, 牙面消毒后无菌条件下摘取牙髓,  $\alpha$ -MEM 培养液冲洗 3 次, 将牙髓剪成 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm 大小的碎块并置入 EP 管中, 加入 1 mL I 型胶原酶消化 1 h; 终止消化后, 将组织块平铺于 60 mm 细胞培养皿底壁, 上覆盖玻片, 加入少量含体积分数 10% 胎牛血清及双抗的  $\alpha$ -MEM 培养液, 37  $^{\circ}$ C、体积分数 5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中孵育, 每隔 3 d 换液一次。待细胞融合率达 80%–90% 时传代, 取第 3 代细胞进行波形丝蛋白及角蛋白染色以鉴定细胞。取第 4 代牙髓成纤维细胞用于后续实验。

1.4.2 实验分组与干预 Toll 样受体 4 特异性抑制剂 (CLI-095)、核因子  $\kappa$ B 特异性抑制剂 (Bay 11-7082) 用 DMSO 溶解, 髓样分化因子 88 特异性抑制剂 (Pepinh-MYD)、髓样分化因子 88 特异性抑制剂阴性对照使用不含内毒素的水溶解。所有刺激试剂均用不含血清的  $\alpha$ -MEM 培养基稀释到预设的工作浓度。

将第 4 代牙髓成纤维细胞悬液接种于 6 孔板内, 细胞浓度为 1 $\times$ 10<sup>9</sup> L<sup>-1</sup>, 每孔 2 mL, 倒置显微镜下观察细胞融合率达 80% 时进行实验。刺激前 24 h 更换为不含血清的  $\alpha$ -MEM 培养基。实验分 6 组: A 组正常培养细胞, 不加刺激, 实验开始前 24 h 更换为不含血清的  $\alpha$ -MEM 培养基, 培养 6 h; B 组加入 10 mg/L 脂多糖溶液 2 mL, 37  $^{\circ}$ C、体积分数 5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中孵育 6 h; C 组先加入 5  $\mu$ mol/L 的 Toll 样受体 4 特异性抑制剂 2 mL, 置于细胞培养箱中孵育 1 h, 随后加入 5  $\mu$ mol/L 的 Toll 样受体 4 特异性抑制剂与 10 mg/L 脂多糖混合溶液 2 mL, 细胞培养箱中继续孵育 6 h; D 组先加入 5  $\mu$ mol/L 的核因子  $\kappa$ B 特异性抑制剂 2 mL, 置于细胞培养箱中孵育 1 h, 随后加入 5  $\mu$ mol/L 的核因子  $\kappa$ B 特异性抑制剂与 10 mg/L 脂多糖混合溶液 2 mL, 细胞培养箱中继续孵育 6 h; E 组先加入 50  $\mu$ mol/L 的髓样分化因子 88 特异性抑制剂 2 mL, 置于细胞培养箱中孵育 1 h, 随后加入 50  $\mu$ mol/L 的髓样分化因子 88 特异性抑制剂与 10 mg/L 脂多糖混合溶液 2 mL, 细胞培养箱中继续孵育 6 h; F 组先加入 50  $\mu$ mol/L 的髓样分化因子 88 特异性抑制剂阴性对照 2 mL, 置于细胞培

养箱中孵育 1 h, 随后加入 50  $\mu$ mol/L 的髓样分化因子 88 特异性抑制剂阴性对照与 10 mg/L 脂多糖混合溶液 2 mL, 细胞培养箱中继续孵育 6 h。

检测白细胞介素 1 $\beta$  分泌时, 各组处理过程的最后 30 min 在溶液中加入 ATP, 使其终浓度为 5 mmol/L。

#### 1.5 主要观察指标

RT-PCR 检测 NOD 样受体蛋白 3 炎症体相关基因表达: 刺激完成后, 利用 TRIzol 试剂盒提取各组细胞总 RNA, 反转录成 cDNA。按照 FastStart Universal SybrGreen Master(ROX) 试剂盒操作说明书加入检测体系, 利用实时定量 PCR 检测相关基因的表达。每基因设 4 个复孔 (技术性重复)。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共循环 40 次; 每组实验重复 3 次, 内参为 GAPDH。引物序列见表 1。

表 1 | 引物序列  
Table 1 | Primer sequences

基因	引物序列	长度
NOD 样受体蛋白 3	5'-GAT CTT CGC TGC GAT CAA CA-3'	20 bp
	5'-GGG ATT CGA AAC ACG TGC ATT A-3'	22 bp
Caspase-1	5'-GCC TGT TCC TGT GAT GTG GAG-3'	21 bp
	5'-TGC CCA CAG ACA TTC ATA CAG TTT C-3'	25 bp
白细胞介素 1 $\beta$	5'-CCA GGG ACA GGA TAT GGA GCA-3'	21 bp
	5'-TTC AAC ACG CAG GAC AGG TAC AG-3'	23 bp
GAPDH	5'-GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC-3'	20 bp
	5'-TGG TGA AGA CGC CAG TGG A-3'	19 bp

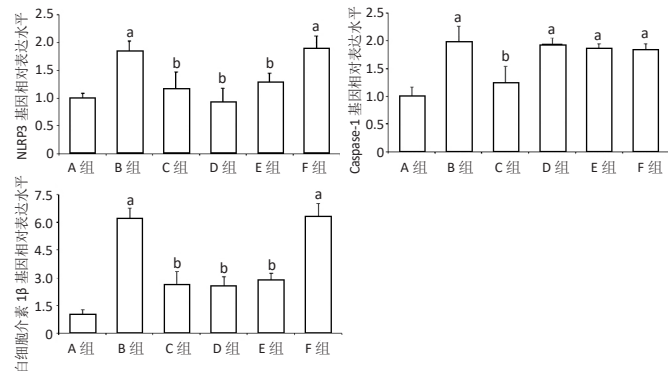
Western blot 检测 NOD 样受体蛋白 3 相关分子蛋白表达: 刺激完成后, PBS 清洗细胞 3 遍, RIPA 裂解液提取总蛋白。采用 BCA 法测定蛋白浓度并配平, 使各组样品浓度一致。100  $^{\circ}$ C 水浴孵育 5 min 使蛋白变性。等体积上样, 进行 SDS 蛋白电泳; 电泳结束后, PVDF 膜湿式转膜, 电流 300 mA, 时间 110 min。转膜完成后, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h。TBST 冲洗后, 分别加入 anti-NOD 样受体蛋白 3 一抗稀释液 (1 : 1 000) 和 anti-Caspase-1 一抗稀释液 (1 : 500), 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜; TBST 冲洗 3 次, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗稀释液 (1 : 500), 室温孵育 1 h。ECL 化学荧光成像检测蛋白表达。

ELISA 检测白细胞介素 1 $\beta$  分泌水平: 刺激结束后, 收集各组细胞培养液上清, 利用人白细胞介素 1 $\beta$  ELISA 试剂盒检测白细胞介素 1 $\beta$  质量浓度, 严格按照试剂盒说明书操作, 比较各实验组白细胞介素 1 $\beta$  分泌水平。

1.6 统计学分析 实验数据收集整理后, 使用 SPSS15.0 软件进行统计分析, 通过 one-way analysis of variance (ANOVA) 进行差异显著性分析, 组间比较采用 Lsd-t 检验, 检验水准取  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果 Results

2.1 各组细胞 NOD 样受体蛋白 3 炎症体相关基因表达 见图 1。



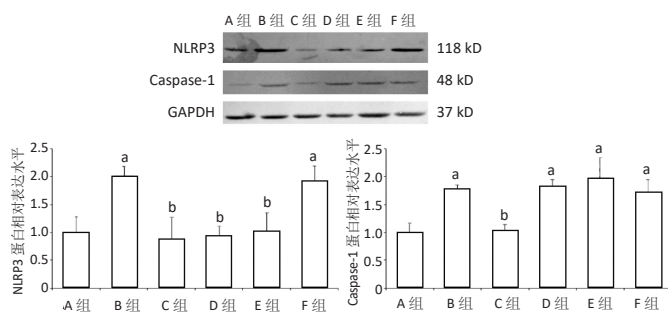
图注: NLRP3 为 NOD 样受体蛋白 3。A 组正常培养, 不进行任何处理; B 组为脂多糖刺激处理组; C 组为 Toll 样受体 4 特异性抑制剂 + 脂多糖混合溶液处理; D 组为髓样分化因子 88 特异性抑制剂 + 脂多糖混合溶液处理; E 组为核因子  $\kappa$ B 特异性抑制剂 + 脂多糖处理; F 组为髓样分化因子 88 特异性抑制剂阴性对照 + 脂多糖混合溶液处理。与 A 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 B 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

图 1 | 各组细胞 NOD 样受体蛋白 3(NLRP3) 炎症体相关基因表达

Figure 1 | Related gene expression of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 inflammasome in dental pulp fibroblasts

RT-PCR 检测结果显示, 与 A 组比较, B 组 NOD 样受体蛋白 3、Caspase-1 及白细胞介素 1 $\beta$  mRNA 表达水平升高 ( $P < 0.05$ )。F 组 NOD 样受体蛋白 3、Caspase-1 及白细胞介素 1 $\beta$  mRNA 表达水平与 B 组比较无明显变化 ( $P > 0.05$ )。与 B 组比较, C-E 组 NOD 样受体蛋白 3、白细胞介素 1 $\beta$  mRNA 表达水平降低 ( $P < 0.05$ ), C 组 Caspase-1 mRNA 表达水平降低 ( $P < 0.05$ ), F 组 NOD 样受体蛋白 3、Caspase-1 及白细胞介素 1 $\beta$  mRNA 表达水平无明显变化 ( $P > 0.05$ ), D、E 组 Caspase-1 mRNA 表达水平无明显变化 ( $P > 0.05$ )。结果说明, Toll 样受体 4 特异性抑制剂 (CLI-095)、核因子  $\kappa$ B 特异性抑制剂 (Bay 11-7082) 与髓样分化因子 88 特异性抑制剂 (Pepinh-MYD) 均可有效抑制 NOD 样受体蛋白 3 和白细胞介素 1 $\beta$  基因的转录; Caspase-1 mRNA 水平的上调仅受到 CLI-095 的抑制, 髓样分化因子 88 特异性抑制剂阴性对照 Pepinh-Control 对 3 种基因的转录无明显影响。

## 2.2 各组细胞 NOD 样受体蛋白 3 相关分子蛋白表达 见图 2。



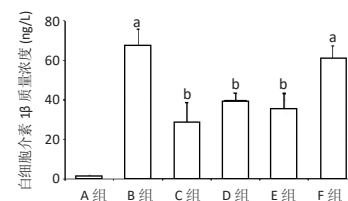
图注: NLRP3 为 NOD 样受体蛋白 3。A 组正常培养, 不进行任何处理; B 组为脂多糖刺激处理组; C 组为 Toll 样受体 4 特异性抑制剂 + 脂多糖混合溶液处理; D 组为髓样分化因子 88 特异性抑制剂 + 脂多糖混合溶液处理; E 组为核因子  $\kappa$ B 特异性抑制剂 + 脂多糖处理; F 组为髓样分化因子 88 特异性抑制剂阴性对照 + 脂多糖混合溶液处理。与 A 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 B 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

图 2 | 各组细胞 NOD 样受体蛋白 3(NLRP3) 相关分子蛋白表达

Figure 2 | Protein expression of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 related molecules in dental pulp fibroblasts

Western blot 检测结果显示, 与 A 组比较, B、F 组 NOD 样受体蛋白 3 表达升高 ( $P < 0.05$ ), B、D、E、F 组 Caspase-1 蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ )。与 B 组比较, C-E 组 NOD 样受体蛋白 3 表达降低 ( $P < 0.05$ ), F 组无明显变化 ( $P > 0.05$ ); C 组 Caspase-1 蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ ), D-F 组 Caspase-1 蛋白表达无明显变化 ( $P > 0.05$ )。结果说明, Toll 样受体 4 特异性抑制剂 (CLI-095)、核因子  $\kappa$ B 特异性抑制剂 (Bay 11-7082) 与髓样分化因子 88 特异性抑制剂 (Pepinh-MYD) 均可有效抑制 NOD 样受体蛋白 3 的蛋白表达量, 而 Caspase-1 蛋白表达仅受到 CLI-095 的抑制, 髓样分化因子 88 特异性抑制剂阴性对照 Pepinh-Control 对两种蛋白均无影响。

## 2.3 各组细胞白细胞介素 1 $\beta$ 分泌水平 见图 3。



图注: A 组正常培养, 不进行任何处理; B 组为脂多糖刺激处理组; C 组为 Toll 样受体 4 特异性抑制剂 + 脂多糖混合溶液处理; D 组为髓样分化因子 88 特异性抑制剂 + 脂多糖混合溶液处理; E 组为核因子  $\kappa$ B 特异性抑制剂 + 脂多糖处理; F 组为髓样分化因子 88 特异性抑制剂阴性对照 + 脂多糖混合溶液处理。与 A 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 B 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

图 3 | 各组细胞白细胞介素 1 $\beta$  分泌水平

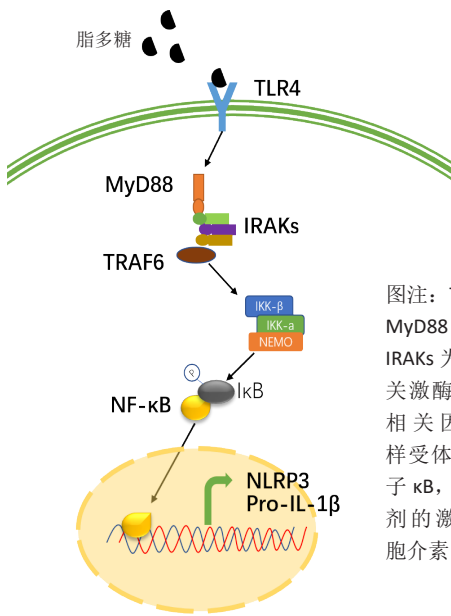
Figure 3 | Secretion level of extracellular interleukin 1 $\beta$

与 A 组比较, B、F 组白细胞介素 1 $\beta$  水平升高 ( $P < 0.05$ ); 与 B 组比较, C-E 组白细胞介素 1 $\beta$  水平降低 ( $P < 0.05$ ), F 组白细胞介素 1 $\beta$  水平无明显变化 ( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论 Discussion

很多促炎信号通路如 Toll 样受体配体所触发的促炎信号等, 都会影响炎症小体的活性并对细胞内白细胞介素 1 $\beta$  前体的表达水平起着重要的调节作用<sup>[9]</sup>。正因为如此, 检测炎症体激活的实验方案常包括一个“准备”步骤, 即用 Toll 样受体激动剂 (如脂多糖) 或促炎细胞因子 (如肿瘤坏死因子) 对细胞进行刺激, 然后再加入激动剂 (如 ATP) 对炎症体进行“活化”<sup>[14-17]</sup>。有研究发现, 尽管在没有这一“准备”步骤存在的情况下, 有时同样可以观察到炎症体依赖的 Caspase-1 激活, 但是白细胞介素 1 $\beta$  的分泌常常检测不到, 这是因为绝大多数细胞并不是持续表达白细胞介素 1 $\beta$  前体。促炎信号如脂多糖或肿瘤坏死因子可以激活转录因子核因子  $\kappa$ B 使白细胞介素 1 $\beta$  启动子激活, 从而诱导白细胞介素 1 $\beta$  前体的产生<sup>[18]</sup>。尽管“准备”步骤主要是为了诱导产生白细胞介素 1 $\beta$  前体, 但同时也潜在增强了 NOD 样受体蛋白 3 炎症体的活性, 因为转录因子核因子  $\kappa$ B 的激活同样上调 NOD 样受体蛋白 3 的表达水平<sup>[12]</sup>。脂多糖通过 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号

通路上调 NOD 样受体蛋白 3 和白细胞介素 1 $\beta$  前体示意图, 见图 4。



图注: TLR4 为 Toll 样受体 4, MyD88 为髓样分化因子 88, IRAKs 为白细胞介素 1 受体相关激酶, 肿瘤坏死因子受体相关因子 6, NLRP3 为 NOD 样受体蛋白 3, NF- $\kappa$ B 为核因子  $\kappa$ B, IKK 为核因子  $\kappa$ B 抑制剂的激酶, Pro-IL-1 $\beta$  为白细胞介素 1 $\beta$  前体

图 4 | 脂多糖通过 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路上调 NOD 样受体蛋白 3 和白细胞介素 1 $\beta$  前体示意图

Figure 4 | Lipopolysaccharide upregulates nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 and interleukin 1 $\beta$  precursor in dental pulp fibroblasts through the Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88/nuclear factor-kappa B signaling pathway

脂多糖是革兰阴性菌细胞壁主要成分, 其作用是诱导 NOD 样受体蛋白 3 和白细胞介素  $\beta$  前体的表达<sup>[19]</sup>。ATP 通常由死亡细胞释放, 其作用是激活 NOD 样受体蛋白 3 炎症体<sup>[20]</sup>。据文献报道, 当龋坏发展到髓-牙本质界时, 革兰阴性菌成为菌群中的优势菌<sup>[21]</sup>, 因此实验选择使用脂多糖 +ATP 激活牙髓成纤维细胞中 NOD 样受体蛋白 3 炎症体, 以模拟牙髓炎症环境。

实验发现, 在脂多糖刺激的诱导下牙髓成纤维细胞中白细胞介素 1 $\beta$  表达水平显著升高, 与此同时, NOD 样受体蛋白 3 和 Caspase-1 的表达水平也显著提升。由于脂多糖是 Toll 样受体 4 的特异性配体, Toll 样受体 4 信号通路在此过程中参与 NOD 样受体蛋白 3 炎症体的转录调节。经典的 Toll 样受体 4 信号通路包括髓样分化因子 88 依赖和  $\beta$  干扰素 TIR 结构域衔接蛋白依赖两条。髓样分化因子 88 依赖的信号通路通过活化肿瘤坏死因子受体相关因子 6 进而激活核因子  $\kappa$ B 抑制剂的激酶 IKKs, 后者促使核因子  $\kappa$ B 的抑制物——I $\kappa$ B 磷酸化; 泛素连接酶复合物能识别磷酸化的 I $\kappa$ B 并使之降解, 解除了对核因子  $\kappa$ B 的抑制并使之入核、启动相关细胞因子的转录<sup>[22-25]</sup>。 $\beta$  干扰素 TIR 结构域衔接蛋白依赖的信号通路主要功能是诱导干扰素  $\beta$  的产生: 通过活化肿瘤坏死因子受体相关因子 3 激活两种 IKK 相关激酶, IKK-i 和 TBK1, 后两者可使干扰素调节因子 3 和干扰素调节因子 7 发生磷酸化, 并

以二聚体的形式入核诱导干扰素  $\beta$  的产生以及干扰素  $\beta$  可诱导基因的表达; 与此同时,  $\beta$  干扰素 TIR 结构域衔接蛋白同样可以激活肿瘤坏死因子受体相关因子 6, 与髓样分化因子 88 依赖的信号通路一样肿瘤坏死因子受体相关因子 6 被激活后, 可激活 IKKs 进而激活核因子  $\kappa$ B<sup>[26-29]</sup>。因此, 实验利用特异性抑制剂阻断 Toll 样受体 4 信号通路, 观察目的基因的表达水平变化。

CLI-095 是一种 Toll 样受体 4 特异性抑制剂, 其与 Toll 样受体 4 的结合位点位于胞内结构域, 一旦与之结合就会阻断下游信号通路。Pepinh-MYD 是一种多肽, 可以竞争性结合髓样分化因子 88 的 TIR 结构域, 阻碍髓样分化因子 88 与 Toll 样受体的结合。Bay 11-7082 是 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化抑制剂, 抑制了 I $\kappa$ B $\alpha$  的磷酸化就抑制了 I $\kappa$ B $\alpha$  的降解, 因此使转录因子核因子  $\kappa$ B 始终处于静息状态。实验结果证明, 在脂多糖刺激过程中, 以上 3 种抑制剂均可有效抑制 NOD 样受体蛋白 3 和白细胞介素 1 $\beta$  表达水平的上调, 证明 Toll 样受体 4、髓样分化因子 88、核因子  $\kappa$ B 信号通路对两种基因具有转录调节作用。

实验还发现, 尽管在脂多糖刺激时 Caspase-1 表达水平上调, 但仅有 CLI-095 对其有显著的抑制作用, 而 Pepinh-MYD 和 Bay 11-7082 并不能抑制其表达水平的上调, 说明尽管 Caspase-1 表达水平与 NOD 样受体蛋白 3 和白细胞介素 1 $\beta$  表达水平同时上调, 但起调节作用的信号通路却不同。Toll 样受体 4 抑制剂 CLI-095 对 Caspase-1 表达有显著的抑制作用, 说明引起 Caspase-1 表达水平升高的信号仍是由 Toll 样受体 4 触发的, 可能的解释有 2 种: 一是 Toll 样受体 4 触发的  $\beta$  干扰素 TIR 结构域衔接蛋白依赖信号通路可能参与其表达的调控; 二是 Toll 样受体之间甚至是模式识别受体 PRRs 之间具有非常密切且目前尚不完全清楚的 cross-talk, 可能是 Toll 样受体 4 信号通路激活其他 Toll 样受体或者模式识别受体 PRR, 由后者完成对 Caspase-1 的转录调节, 具体的机制有待进一步的研究。

实验初步证明脂多糖刺激通过 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路上调牙髓成纤维细胞内 NOD 样受体蛋白 3 和白细胞介素 1 $\beta$  前体的表达, 然而 Caspase-1 的具体转录调节机制及髓样分化因子 88 依赖的信号通路和  $\beta$  干扰素 TIR 结构域衔接蛋白依赖的信号通路之间是否存在一定的“串话”机制, 尚有待与进一步研究。

脂多糖刺激通过 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路上调牙髓成纤维细胞内 NOD 样受体蛋白 3 和白细胞介素 1 $\beta$  的表达, Caspase-1 的转录调节机制尚有待进一步研究。

作者贡献: 张安生进行实验设计, 实验实施为张安生, 资料收集为张海欧, 张安生成文, 倪龙兴审核。

经费支持: 该文章未接受任何经费支持。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 该文统计学方法已经西北大学生命科学院生物统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] HAHN CL, LIEWEHR FR. Relationships between Caries Bacteria, Host Responses, and Clinical Signs and Symptoms of Pulpitis. *J Endod.* 2007; 33(3):213-219.
- [2] JONTELL M, OKIJI T, DAHLGREN U, et al. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998;9(2): 179-200.
- [3] HOU CW, LAURO ML, GRIMES CL. Redefining the Defensive Line: Critical Components of the Innate Immune System. *ACS Infect Dis.* 2016;2(11):746-748.
- [4] LIU J, CAO X. Cellular and molecular regulation of innate inflammatory responses. *Cell Mol Immunol.* 2016;13(6):711-721.
- [5] HIRAO K, YUMOTO H, TAKAHASHI K, et al. Roles of TLR2, TLR4, NOD2, and NOD1 in pulp fibroblasts. *J Dent Res.* 2009;88(8):762-767.
- [6] TOKUDA M, SAKUTA T, FUSHUKU A, et al. Regulation of interleukin-6 expression in human dental pulp cell cultures stimulated with Prevotella intermedia lipopolysaccharide. *J Endod.* 2001;27(4):273-277.
- [7] NAGAOKA S, TOKUDA M, SAKUTA T, et al. Interleukin-8 gene expression by human dental pulp fibroblast in cultures stimulated with Prevotella intermedia lipopolysaccharide. *J Endod.* 1996;22(1):9-12.
- [8] BARKHORDAR RA, GHANI QP, RUSSELL TR, et al. Interleukin-1beta activity and collagen synthesis in human dental pulp fibroblasts. *J Endod.* 2002;28:157-159.
- [9] SCHRODER K, TSCHOPP J. The inflammasomes. *Cell.* 2010;140:821-832.
- [10] SONG Z, LIN Z, HE F, et al. NLRP3 Is Expressed in Human Dental Pulp Cells and Tissues. *J Endod.* 2012;38:1592-1597.
- [11] JIANG W, LV H, WANG H, et al. Activation of the NLRP3/caspase-1 inflammasome in human dental pulp tissue and human dental pulp fibroblasts. *Cell Tissue Res.* 2015;361(2):541-455.
- [12] BAUERNFEIND FG, HORVATH G, STUTZ A, et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol.* 2009;183:787-791.
- [13] 蒋文凯,童忠春,王迪雅,等.NLRP3、Caspase-1炎症体通路在人牙髓成纤维细胞中表达和相关调控因素的初步检测[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2013,23(1):1-5.
- [14] CASO F, COSTA L, NUCERA V, et al. From autoinflammation to autoimmunity: old and recent findings. *Clin Rheumatol.* 2018;37(9): 2305-2321.
- [15] FUSCO R, SIRACUSA R, GENOVESE T, et al. Focus on the Role of NLRP3 Inflammasome in Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(12):4223.
- [16] THEOHARIDES TC. Danger Signals and Inflammation. *Clin Ther.* 2016; 38(5):996-999.
- [17] ELLIOTT EI, SUTTERWALA FS. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly. *Immunol Rev.* 2015;265(1): 35-52.
- [18] NOONIN C, THONGBOONKERD V. Exosome-inflammasome crosstalk and their roles in inflammatory responses. *Theranostics.* 2021;11(9): 4436-4451.
- [19] SHEN R, YIN P, YAO H, et al. Punicalin Ameliorates Cell Pyroptosis Induced by LPS/ATP Through Suppression of ROS/NLRP3 Pathway. *J Inflamm Res.* 2021;14:711-718.
- [20] MEZZASOMA L, ANTOGNELLI C, TALESA VN. Atrial natriuretic peptide down-regulates LPS/ATP-mediated IL-1β release by inhibiting NF-kB, NLRP3 inflammasome and caspase-1 activation in THP-1 cells. *Immunol Res.* 2016;64(1):303-312.
- [21] HAMILTON IR. Ecological basis for dental caries. In: Kuramitsu HK, Ellen RP, editors. *Oral bacterial ecology: the molecular basis.* Wymondham, UK: Horizon Scientific Press, 2000:219-274.
- [22] NARDO DD, BALKA KR, GLORIA YC, et al. Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4) plays a dual role in myddosome formation and Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem.* 2018;293(39):15195-15207.
- [23] ZHANG J, MACARTNEY T, PEGGIE M, et al. Interleukin-1 and TRAF6-dependent activation of TAK1 in the absence of TAB2 and TAB3. *Biochem J.* 2017;474(13):2235-2248.
- [24] FENG H, ZHANG YB, GUI JF, et al. Interferon regulatory factor 1 (IRF1) and anti-pathogen innate immune responses. *PLoS Pathog.* 2021; 17(1):e1009220.
- [25] SCHMITZ F, HEIT A, GUGGEMOOS S, et al. Interferonregulatory-factor 1 controls Toll-like receptor 9-mediated IFN-beta production in myeloid dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2007;37:315-327.
- [26] FUNAMI K, MATSUMOTO M, OSHIUMI H, et al. Functional interfaces between TICAM-2/TRAM and TICAM-1/TRIF in TLR4 signaling. *Biochem Soc Trans.* 2017;45(4):929-935.
- [27] ZHAO XY, HUO RX, YAN XL, et al. IRF3 Negatively Regulates Toll-Like Receptor-Mediated NF-kB Signaling by Targeting TRIF for Degradation in Teleost Fish. *Front Immunol.* 2018;9:867.
- [28] BERTHELOOT D, LATZ E, FRANKLIN BS. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cell Mol Immunol.* 2021; 18(5):1106-1121.
- [29] CUI J, CHEN Y, WANG HY, et al. Mechanisms and pathways of innate immune activation and regulation in health and cancer. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10(11):3270-3285.

(责任编辑: GW, ZN, SX)