

# 甲型流感病毒 H1N1/FM1 对小鼠巨噬细胞 NLRP3 炎症小体信号通路的影响

师小函 吴本权 石云锋 杨洋 朱家馨 张天托

**【摘要】 目的** 探讨甲型流感病毒 H1N1/FM1 感染小鼠巨噬细胞不同时间点 NOD 样受体 P3 (NLRP3) 炎症小体信号通路的变化。**方法** 以小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 为研究对象, 甲型流感病毒 H1N1/FM1 感染 1 周作为实验组, 感染 6 h 作为对照组, ELISA 检测细胞培养上清中 IL-1 $\beta$  的浓度, 荧光定量 PCR 检测炎症小体信号通路中 NLRP3、caspase-1、IL-1 $\beta$  的 mRNA 相对表达量, 蛋白免疫印迹法检测 NLRP3、caspase-1、cleaved-caspase-1 的蛋白相对表达量, 免疫荧光染色法定性检测 NLRP3 的蛋白表达。**结果** 细胞培养上清液中 IL-1 $\beta$  的浓度实验组高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 其 NLRP3 mRNA 和蛋白的表达量低于对照组降低 ( $P$  均  $< 0.05$ ), caspase-1、IL-1 $\beta$  mRNA 相对表达量以及 caspase-1、cleaved-caspase-1 蛋白相对表达量均高于对照组 ( $P$  均  $< 0.05$ )。免疫荧光染色中实验组 NLRP3 蛋白荧光强度弱于对照组。**结论** 甲型流感病毒 H1N1/FM1 感染小鼠巨噬细胞可以激活 NLRP3 炎症小体信号通路, 促进 IL-1 $\beta$  的分泌, 且在感染后期 (约 1 周) 有更强的激活效应。

**【关键词】** 甲型流感病毒 H1N1/FM1; NOD 样受体 P3 炎症小体; 白介素-1 $\beta$

**Effect of influenza A virus H1N1/FM1 on macrophage NLRP3 inflammosome signaling pathway in mouse** Shi Xiaohan, Wu Benquan, Shi Yunfeng, Yang Yang, Zhu Jiaxin, Zhang Tiantuo. Department of Respiratory, ICU, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China  
Corresponding author, Wu Benquan, E-mail: zswbq@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the variation of NOD-like receptor P3 (NLRP3) inflammosome signaling pathway at different time points in mouse macrophages infected by influenza A virus H1N1/FM1. **Methods** Mouse monocyte-macrophage cell line RAW264.7 was used in this experiment. In the study group, the cells were infected with H1N1/FM1 for 1 week, and those were infected for 6 h in the control group. The expression of IL-1 $\beta$  in the cell supernatant was measured by ELISA. The relative expression of NLRP3, caspase-1 and IL-1 $\beta$  mRNA was investigated by fluorescent quantitative PCR. The expression levels of NLRP3, caspase-1 and cleaved caspase-1 proteins were quantitatively detected by Western blot. The expression of NLRP3 protein was observed by immunofluorescent staining. **Results** In the study group, the expression of IL-1 $\beta$  in the cell supernatant was significantly up-regulated ( $P < 0.01$ ), the expression levels of NLRP3 mRNA and protein were significantly down-regulated (both  $P < 0.05$ ), the relative expression of caspase-1 and IL-1 $\beta$  mRNA, and caspase-1 and cleaved-caspase-1 proteins were significantly up-regulated (all  $P < 0.05$ ) compared with those in the control group. The fluorescent intensity of NLRP3 protein in the study group was lower than that in the control group. **Conclusions** Infection of macrophage cells with influenza A virus H1N1/FM1 can activate the NLRP3 inflammosome signaling pathway and promote the secretion of IL-1 $\beta$ . Furthermore, the activating effect can be enhanced during the late stage of infection (approximately 1 week).

**【Key words】** Influenza A virus H1N1/FM1; NOD-like receptor P3 inflammosome; Interleukin-1 $\beta$

流感病毒属于正黏病毒科, 是单股负链 RNA 病毒, 按照病毒核蛋白和基质蛋白的抗原性不同, 分为甲、乙、丙 3 型。其中甲型流感病毒变异快、毒力强, 其感染流行是全球范围内引起危重疾病和

死亡的重要原因。近年高致病性甲型 H5N1 和 H7N9 流感病毒株在亚洲人群中时有流行,病死率高,且有介导人与人间相互传播的潜在可能,对全球健康造成极大的威胁<sup>[1]</sup>。甲型流感病毒不仅可以引起重症感染,还有少见的并发症,先前有甲型 H1N1 流感病毒感染合并噬血细胞综合征的报道<sup>[2]</sup>。甲型流感病毒入侵机体后,其组成蛋白和核酸等作为病原体相关分子模式(PAMP)可被机体免疫系统中模式识别受体(PRR)识别,引起固有免疫反应,介导炎症,严重者可引组织器官的免疫病理损伤<sup>[3]</sup>。NOD 样受体(NLR)是重要的细胞内 PRR,可活化组装形成炎症小体,从而诱导 IL-1 $\beta$ 、IL-18 等促炎因子的分泌,在抗甲型流感病毒的固有免疫中发挥重要作用,目前已有较多研究<sup>[4-5]</sup>。但在细胞水平,甲型流感病毒感染不同时间后炎症小体信号通路的激活程度和 IL-1 $\beta$  等炎症因子的分泌有何变化,目前国内外研究较少。本研究以小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 为对象,以甲型流感病毒鼠肺适应株 H1N1/FM1 分别感染 6 h 和 1 周,观察 NLRP3 炎症小体信号通路的变化,旨在探讨 NLRP3 炎症小体信号通路在甲型流感病毒不同感染时间点的作用。

## 材料与方法

### 一、材 料

#### 1. 细胞株及甲型流感病毒 H1N1/FM1

小鼠单核巨噬细胞株 RAW264.7 购自中国医学科学院基础医学院基础医学细胞中心,甲型流感病毒株 H1N1/FM1 为暨南大学医学院微生物学与免疫学教研室赠予,冻存于液氮罐中。

#### 2. 主要试剂及仪器

DMEM 高糖培养基购自 Life 公司(美国),胎牛血清购自 PAN-Biotech 公司(德国)。NLRP3 单克隆抗体购于 Cell Signaling Technology 公司(美国);NLRP3 免疫荧光羊抗兔二抗购自 R&D 公司(美国);caspase-1 单克隆抗体购自 Novus Biologicals 公司(美国);GAPDH 兔抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗购于广州杰特伟生物科技有限公司

### 二、方 法

#### 1. 细胞培养

按 10% 胎牛血清比例和 DMEM 高糖培养基配成完全培养基,于 25 ml 培养瓶中培养 RAW264.7 细胞,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内,当细胞融合

至约 70% 培养瓶底面积且状态良好时,将细胞用胰酶消化传代,约 2~3 d 传 1 次,使实验所用细胞处于其对数生长期。

#### 2. 甲型流感病毒 H1N1/FM1 株复苏和毒力测定

取出甲型流感病毒 H1N1/FM1 株,置冰盒内复温,用 9 d 龄鸡胚尿囊腔连续传代 2 次,测定血凝滴度为 1:1 280。用不含血清的 DMEM 培养基将 FM1 病毒连续 10 倍递次稀释到 10<sup>-8</sup>/L。取培养的 RAW264.7 细胞,胰酶消化后用含血清培养基调整细胞数为 2 × 10<sup>5</sup>/L,96 孔板每孔加 100  $\mu$ l,置培养箱培养 6~8 h,待细胞贴壁吸弃培养液,加入相应稀释度的甲型流感病毒 H1N1/FM1。每个稀释度做 6 个复孔。培养 5~6 d,用 Reed-Muench 法计算病毒的半数组织细胞感染量(TCID<sub>50</sub>)。

#### 3. 甲型流感病毒 H1N1/FM1 感染细胞

将生长状态良好的 RAW264.7 细胞稀释为 10<sup>9</sup>/L,接种于 6 孔板,每孔加入完全培养基至 2 ml 培养,待细胞数增至 2 × 10<sup>6</sup> 个时开始感染,根据病毒 TCID<sub>50</sub> 的测定结果,每孔加入 100  $\mu$ l 的 10 倍稀释 TCID<sub>50</sub> 病毒液。本实验设对照组和实验组:甲型流感病毒 H1N1/FM1 感染 RAW264.7 细胞 6 h 作为对照组,感染细胞 1 周作为实验组。每组实验重复 3 次。

#### 4. NLRP3、caspase-1 和 IL-1 $\beta$ mRNA 相对表达量测定

采用荧光定量 PCR 法。查找 Gen Bank 数据库中上述 3 种物质和内参  $\beta$ -actin 的基因序列,交美国 Life 公司设计合成特异性引物,引物序列见表 1。收集对照组和实验组细胞,Trizol 法提取细胞的总 RNA,根据试剂盒说明书操作合成模板 DNA。反应体系 20  $\mu$ l,包括模板 DNA、SYBR Master Mix、前后引物和 DEPC 水,置于 ABI7500 系统进行 PCR 反应,反应条件为:50℃ 2 min,95℃ 2 min 预变性,95℃ 15 s 变性,60℃ 1 min 退火,共进行 40 个循环,后 95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 30 s,60℃ 15 s 延伸。记录目的基因与内参基因的 Ct 值,以 2<sup>- $\Delta$ CT</sup> 作为各基因的 mRNA 相对表达量。

#### 5. NLRP3、caspase-1 和 cleaved-caspase-1 蛋白表达水平检测

##### 5.1 3 种蛋白表达水平的检测

采用蛋白免疫印迹法检测。收集各组细胞,提取蛋白并测定浓度,每支 EP 管中加入 30 mg 蛋白、载样缓冲液和去离子水共 30 ml,煮沸 10 min 待上样。用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)

表 1		目的基因引物序列	
引 物	正 向	反 向	产物长度 (bp)
NLRP3	ACTGAAGCACCTGCTCTGCAAC	AACCAATGCGAGATCCTGACAAC	88
caspase-1	TATAATGAAAGACGGCACACC	AGTCACAAGACCAGGCATATTCT	150
IL-1β	GAGCACCTTCTTTTCCTTCATCTT	TCACACACCAGCAGGTTATCATC	84
β-actin	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	154

凝胶电泳法分离各目的蛋白，90 V 恒压电流约 30 min，待蛋白标记物 (marker) 条带清晰分开后，再用 110 V 恒压继续电泳，至条带接近凝胶底端即停止。选择合适的转膜电压和时间，将目的蛋白转至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上，再将膜置于含 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 的孵育盒内，室温封闭 1 h，吸弃封闭液后加入相对应的一抗置于 4℃ 摇床过夜，TBST 缓冲液洗膜后室温孵育二抗 1 h，洗膜后加入 ECL 发光液，用 Chemi Scope 化学发光成像系统曝光，Image J 软件分析蛋白条带得到灰度值，作为其蛋白相对表达量。

5.2 免疫荧光染色法定性检测 NLRP3 的蛋白表达

根据免疫荧光染色的操作步骤，细胞依次经 4% 甲醛固定、0.5% TritonX-100 通透、5% 牛血清白蛋白封闭和 NLRP3 一抗孵育过夜、避光孵荧光二抗 (之后所有步骤均避光操作)、Hoechest33342 复染核，每一个步骤之后均用磷酸盐缓冲液洗涤，最后加入防荧光淬灭剂，置于激光共聚焦显微镜下观察荧光强度。

6. 细胞培养上清液中 IL-1β 的浓度检测

采用 ELISA 检测。收集细胞培养液上清于 EP 管中，根据 R&D 公司 Mouse IL-1β Valukine ELISA Kit 试剂盒的操作说明书检测 IL-1β 的浓度。

三、统计学处理

用 SPSS 20.0 进行统计分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示，组间比较采用独立样本 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、实验组和对照组细胞培养上清液中的 IL-1β 分泌水平比较

实验组细胞培养上清液中 IL-1β 的水平高于对照组 (*t* = -4.355, *P* = 0.005)，见图 1。

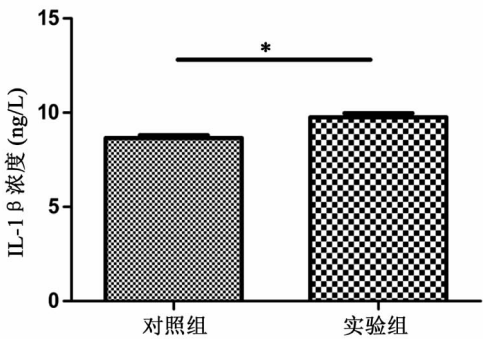


图 1 实验组和对照组上清液中的 IL-1β 浓度比较  
组间比较，\* *P* < 0.01

二、实验组和对照组的 NLRP3、caspase-1 和 IL-1β mRNA 相对表达量比较

NLRP3 mRNA 在实验组的相对表达量为  $1.20 \pm 0.17$ ，在对照组为  $2.35 \pm 0.46$ ；caspase-1 mRNA 在实验组的相对表达量为  $1.624 \pm 0.029$ ，在对照组为  $1.133 \pm 0.016$ ；IL-1β mRNA 在实验组的相对表达量为  $5.35 \pm 1.20$ ，在对照组为  $2.46 \pm 0.24$ 。实验组 NLRP3 mRNA 相对表达量低于对照组 (*t* = 5.744, *P* < 0.001)，caspase-1 和 IL-1β mRNA 的相对表达量高于对照组 (*t* 值分别为 36.312、5.785, *P* 均 < 0.001)，见图 2。

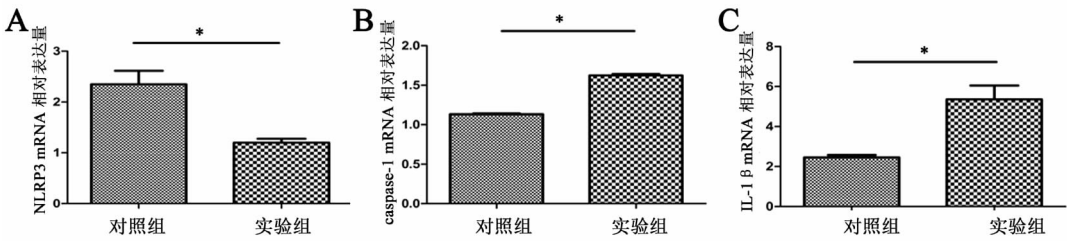


图 2 实验组和对照组的 NLRP3、caspase-1 和 IL-1β 的 mRNA 表达水平比较  
组间比较，\* *P* < 0.01

三、实验组和对照组的 NLRP3、caspase-1 的蛋白表达水平

NLRP3 蛋白在实验组的相对表达量为  $5\,379 \pm 415$ ，在对照组为  $14\,731 \pm 892$ ，实验组的 NLRP3 蛋白表达水平低于对照组（ $t = 23.285$ ， $P < 0.001$ ）。caspase-1 蛋白在实验组的相对表达量为

$20\,643 \pm 740$ ，在对照组为  $13\,857 \pm 214$ ，cleaved-caspase1 蛋白在实验组的相对表达量为  $3\,304 \pm 197$ ，在对照组为  $2\,716 \pm 179$ ，实验组的 caspase-1、cleaved-caspase1 的蛋白表达水平均高于对照组（ $t$  值分别为 21.578、10.380， $P$  均  $< 0.001$ ），见图 3。

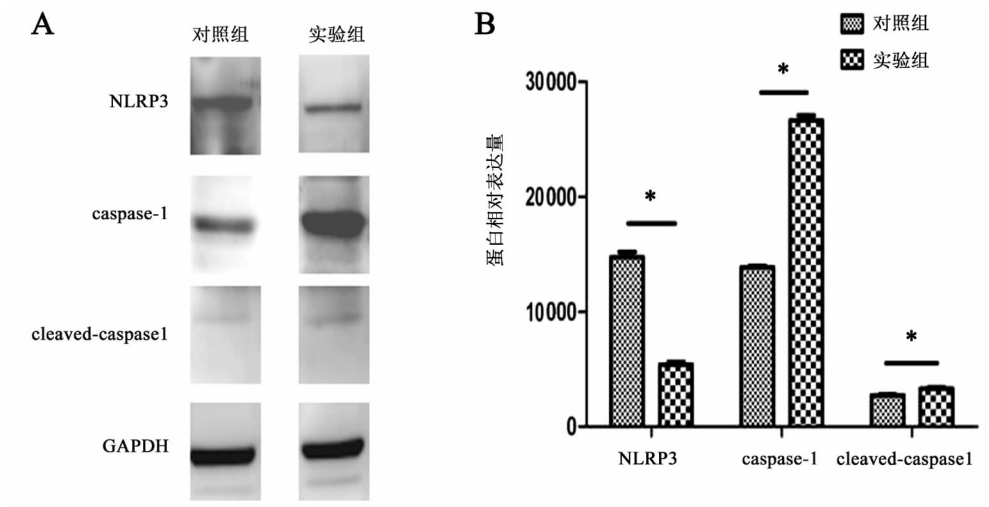


图3 实验组和对照组的 NLRP3、caspase-1、cleaved caspase1 的蛋白表达水平比较

A：蛋白免疫印迹结果；B：定量分析结果；组间比较，\*  $P < 0.01$

四、实验组和对照组的免疫荧光染色 NLRP3 蛋白表达水平比较

实验组的 NLRP3 蛋白荧光强度低于对照组，

表明实验组中 NLRP3 蛋白表达量低于对照组，与蛋白免疫印迹结果一致，见图 4。

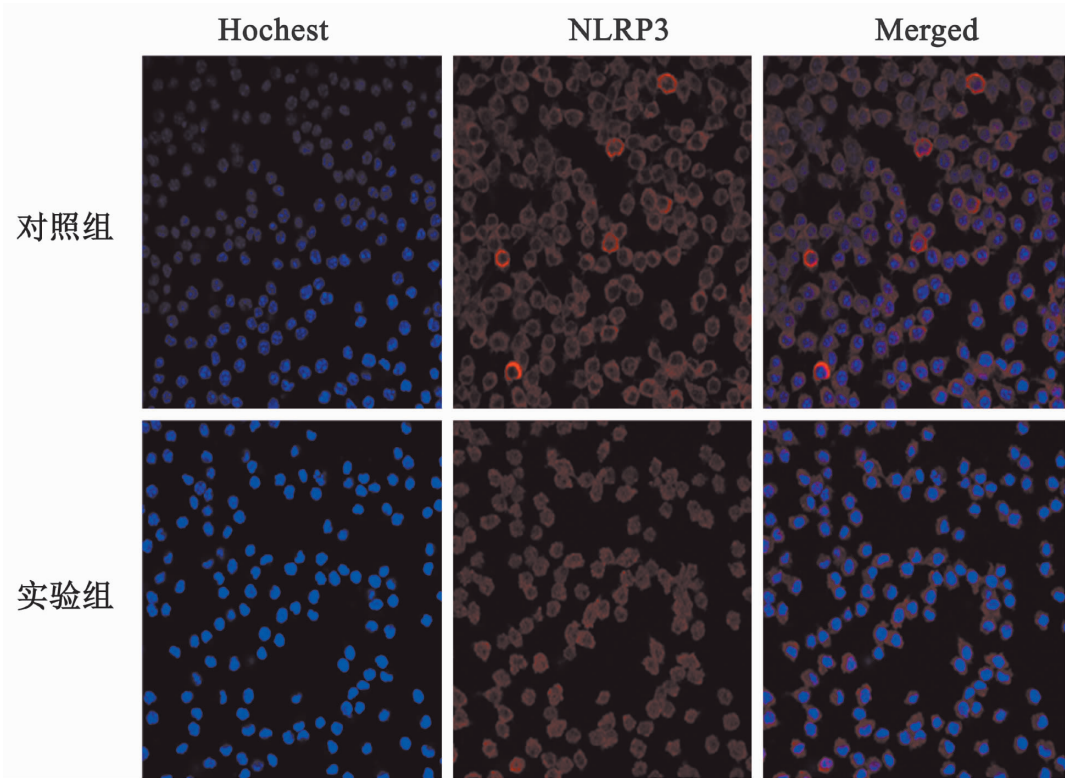


图4 实验组和对照组的 NLRP3 蛋白表达情况（免疫荧光染色，×400）

## 讨 论

天然免疫反应系统是机体抵抗病原微生物入侵的第一道防线。通过 PRR 识别 PAMP 或危险相关分子模式 (DAMP) 等内外源性危险信号, 激活下游信号传导通路, 引起炎症反应并诱发适应性免疫应答<sup>[6]</sup>。NLR 是一类重要的细胞内 PRR, 包括 3 个结构域: C 端的亮氨酸富集的重复序列 (LRR), 中间段的核苷酸结合寡聚化结构域 (NACHT) 和 N 端的半胱天冬蛋白酶激活募集结构域 (CARD) 或热蛋白结构域 (PYD)。NACHT 是各 NLR 成员中唯一同源的结构域。根据 NACHT 的不同, NLR 分成 NOD、NLRP/NALP 和 IPAF 3 个亚家族<sup>[7]</sup>。

炎症小体是由识别蛋白 (主要是 NLR)、接头蛋白 ASC 和效应蛋白 (主要是 caspase-1) 形成的蛋白复合物, 该概念最早是在 2002 年由 Tschoop 研究团队提出<sup>[8]</sup>。目前研究最多、阐明最清楚的是 NLRP3 炎症小体, 其激活需要 2 个信号<sup>[9]</sup>。第 1 信号为 TLR 识别相应配体, 通过 NF- $\kappa$ B 的介导, 诱导无活性的 pro-IL-1 $\beta$  和 pro-IL-18 的基因转录和翻译; 第 2 信号为 NLRP3 识别 PAMP 或 DAMP, 诱导形成 NLRP3-ASC-caspase-1 炎症小体。caspase-1 在细胞未受到刺激时, 是以无活性的酶原形式存在的, 炎症小体形成后, 使得酶原以水解的方式构成四聚体, 成为有酶切活性的 cleaved-caspase-1, 其作为炎症小体活化的效应蛋白, 剪切无活性的 pro-IL-1 $\beta$  为成熟有活性的 IL-1 $\beta$ 。

甲型流感病毒通过呼吸道入肺后, 突破黏膜分泌的黏液层, 入侵肺泡上皮细胞、巨噬细胞和树突状细胞<sup>[10]</sup>。甲型流感病毒的成分如病毒 RNA、M2 离子通道蛋白和非结构蛋白 PB1-F2 均可激活上皮细胞和肺泡巨噬细胞中 NLRP3 炎症小体信号通路, 促进 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的分泌<sup>[11-13]</sup>。目前探究 NLRP3 炎症小体信号通路在甲型流感病毒感染中作用的研究, 多采用基因敲除鼠, 如 NLRP3<sup>-/-</sup>、caspase-1<sup>-/-</sup> 和 IL-1R<sup>-/-</sup>, 在生存率、病毒清除率和肺组织损伤修复的影响方面研究结果不一致, 但多是对机体产生有利影响或没有影响, 如提高小鼠的生存率, 对病毒的清除率没有影响, 促进小鼠肺组织的损伤修复等<sup>[11,14-15]</sup>。Tate 等<sup>[16]</sup>运用 NLRP3 特异性短效抑制剂 MCC950 来研究 NLRP3 炎症小体的作用, 首次发现 NLRP3 在病毒感染后期通过增加细胞因子分泌和肺部炎症细胞浸润对机体产生有害作用。

本研究选取甲型流感病毒 H1N1 作用于小鼠巨

噬细胞 6 h 和 1 周 2 个时间点, 代表病毒感染前期和后期 2 个不同阶段。甲型流感病毒 H1N1/FM1 感染 1 周相比于感染 6 h 时, 除了 NLRP3 炎症小体信号通路 2 中的 NLRP3 mRNA 和蛋白的相对表达量降低, 其余 NLRP3 信号通路中所检测分子的细胞上清液浓度、mRNA 的相对表达量和蛋白表达水平均升高。因为上游因子调控下游因子存在基因转录和翻译的滞后, 由此推测, 在甲型流感病毒感染后期约 1 周, 其激活 NLRP3 炎症小体分泌 IL-1 $\beta$  促炎因子的强度高于感染早期。

综上所述, 我们从细胞水平研究推论甲型流感病毒感染后期 NLRP3 炎症小体激活和 IL-1 $\beta$  促炎因子分泌的强度高于感染早期。NLRP3 炎症小体在抗流感病毒感染中, 既能发挥保护作用, 同时也会由于过度活化导致免疫病理损伤, 对机体造成伤害。因此, 根据炎症小体在病毒感染不同阶段激活程度的不同, 选择合适的时间点对促炎因子的分泌进行干预, 将改善甲型流感病毒感染的临床预后, 具有重要的意义。本实验对临床干预时间点的选择, 从细胞水平提供了重要的依据。目前, 仍需要进一步探究甲型流感病毒感染后 NLRP3 炎症小体的激活和调控机制, 为临床治疗甲型流感病毒感染提供新方法。

## 参 考 文 献

- [1] Lam TT, Zhou B, Wang J, Chai Y, Shen Y, Chen X, Ma C, Hong W, Chen Y, Zhang Y, Duan L, Chen P, Jiang J, Zhang Y, Li L, Poon LL, Webby RJ, Smith DK, Leung GM, Peiris JS, Holmes EC, Guan Y, Zhu H. Dissemination, divergence and establishment of H7N9 influenza viruses in China. *Nature*, 2015, 522 (7554): 102-105.
- [2] 范玲玲, 檀卫平, 陈环, 吴葆菁, 黄花荣, 麦贤弟. 甲型 H1N1 流感病毒感染相关性噬血细胞综合征 2 例. *新医学*, 2010, 41 (10): 676-678.
- [3] Matsumoto Y, Kawamura Y, Nakai H, Sugata K, Yoshikawa A, Ihira M, Ohashi M, Kato T, Yoshikawa T. Cytokine and chemokine responses in pediatric patients with severe pneumonia associated with pandemic A/H1N1/2009 influenza virus. *Microbiol Immunol*, 2012, 56 (9): 651-655.
- [4] Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med*, 2015, 21 (7): 677-687.
- [5] Ong JD, Mansell A, Tate MD. Hero turned villain: NLRP3 inflammasome-induced inflammation during influenza A virus infection. *J Leukoc Biol*, 2017, 101 (4): 863-874.
- [6] Schroder K, Tschoop J. The inflammasomes. *Cell*, 2010, 140 (6): 821-832.
- [7] Ting JP, Lovering RC, Alnemri ES, Bertin J, Boss JM, Davis

- BK, Flavell RA, Girardin SE, Godzik A, Harton JA, Hoffman HM, Hugot JP, Inohara N, Mackenzie A, Maltais LJ, Nunez G, Ogura Y, Otten LA, Philpott D, Reed JC, Reith W, Schreiber S, Steimle V, Ward PA. The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity*, 2008, 28 (3): 285-287.
- [8] Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*, 2002, 10 (2): 417-426.
- [9] Pang IK, Iwasaki A. Inflammasomes as mediators of immunity against influenza virus. *Trends Immunol*, 2011, 32 (1): 34-41.
- [10] Owen DM, Gale M Jr. Fighting the flu with inflammasome signaling. *Immunity*, 2009, 30 (4): 476-478.
- [11] Allen IC, Scull MA, Moore CB, Holl EK, McElvania-TeKippe E, Taxman DJ, Guthrie EH, Pickles RJ, Ting JP. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity*, 2009, 30 (4): 556-565.
- [12] Ichinohe T, Pang IK, Iwasaki A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nat Immunol*, 2010, 11 (5): 404-410.
- [13] McAuley JL, Tate MD, MacKenzie-Kludas CJ, Pinar A, Zeng W, Stutz A, Latz E, Brown LE, Mansell A. Activation of the NLRP3 inflammasome by IAV virulence protein PB1-F2 contributes to severe pathophysiology and disease. *PLoS Pathog*, 2013, 9 (5): e1003392.
- [14] Thomas PG, Dash P, Aldridge JR Jr, Ellebedy AH, Reynolds C, Funk AJ, Martin WJ, Lamkanfi M, Webby RJ, Boyd KL, Doherty PC, Kanneganti TD. The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1. *Immunity*, 2009, 30 (4): 566-575.
- [15] Ichinohe T, Lee HK, Ogura Y, Flavell R, Iwasaki A. Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. *J Exp Med*, 2009, 206 (1): 79-87.
- [16] Tate MD, Ong JD, Dowling JK, McAuley JL, Robertson AB, Latz E, Drummond GR, Cooper MA, Hertzog PJ, Mansell A. Reassessing the role of the NLRP3 inflammasome during pathogenic influenza A virus infection via temporal inhibition. *Sci Rep*, 2016, 6: 27912.

(收稿日期: 2017-03-08)

(本文编辑: 林燕薇)

