



组织蛋白酶B介导NLRP3小体在 砷致小胶质细胞炎症激活中的作用*

张哲昱 皮若铮 刘 吉 方惠民 杨 丹 孙宝飞**

(贵州医科大学基础医学院人体解剖学教研室, 贵阳 550000)

摘要 目的 探究组织蛋白酶B (CTSB) 介导NLRP3小体在砷致小胶质细胞 (BV-2) 炎症激活中的作用。方法 取处于对数生长期的BV-2细胞, 分别暴露于终浓度为0、2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ 亚砷酸钠 (NaAsO_2) 溶液培养24 h, 检测细胞活性, 测定各组细胞内CTSB和细胞焦亡相关蛋白NLRP3、Caspase-1、IL-18、IL-1 β 的表达水平。流式细胞仪检测胞内溶酶体膜稳定性。基于实验结果, 增设CTSB抑制剂组 (5 $\mu\text{mol/L}$ CA074-Me +8 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO_2 、10 $\mu\text{mol/L}$ CA074-Me+8 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO_2), 检测两组细胞内炎症相关蛋白NLRP3、Caspase-1和IL-1 β 、IL-18的表达水平。结果 与对照组比较, 各染砷组细胞抑制率增高, 呈现剂量效应关系, 溶酶体膜稳定性下降, 差异有统计学意义 ($P<0.01$), 胞内CTSB、NLRP3、IL-1 β 、IL-18、Caspase-1表达增高, 差异有统计学意义 ($P<0.01$); 与对照组 (8 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO_2) 比较, 抑制剂组BV-2细胞胞内CTSB、NLRP3、IL-1 β 、IL-18、Caspase-1水平均降低, 差异有统计学差异 ($P<0.01$)。结论 NaAsO_2 通过诱导小胶质细胞内CTSB水平的上升, 介导NLRP3炎症小体激活小胶质细胞, 促其释放炎症因子, 致神经系统损伤。

关键词 亚砷酸钠, 小胶质细胞, 组织蛋白酶B**中图分类号** R34**DOI:** 10.16476/j.pibb.2022.0417

砷及其化合物广泛存在于自然界中, 是目前危害人群健康的主要环境污染物之一。国际癌症研究机构已确认无机砷为人类致癌物^[1]。世界卫生组织估计, 70个国家的2亿多人的饮用水中无机砷 (As) 水平超过世卫组织指南和美国环境保护局 (EPA) 给出的最高污染物水平 10 $\mu\text{g/L}$ ^[2]。长期暴露于有砷的环境下, 使砷通过呼吸道、消化道和皮肤接触等途径进入机体, 并在体内蓄积, 引起砷中毒。长时间的砷暴露会引起严重的疾病, 如糖尿病、高血压、心血管疾病、神经系统疾病和癌症。流行病学研究表明, 长期接触无机砷可损害记忆、学习能力、智力和认知功能, 并诱发神经炎症^[3]。在发育时期接触无机砷可导致智力功能下降^[4]。已有啮齿类动物实验表明, 饮用含 50 mg/L 亚砷酸钠 (NaAsO_2) 水可导致学习记忆障碍^[5], 并且这些化合物能够通过血脑屏障^[6]。到目前为止, 已有证据表明无机砷暴露可诱导部分神经元死亡、脑内胶质细胞凋亡、神经炎症和神经变性^[7]。其中, 神经炎症是目前神经退行性疾病发病机制中公认的因素之一, 并与记忆功能下降和认知功能减退有

关^[8]。在神经退行性疾病的发生与发展中, 观察到脑内存在激活的胶质细胞诱导的炎症反应, 其中高反应性的小胶质细胞 (microglia) 可能导致神经元功能异常和认知缺失。由过度活化的胶质细胞分泌的多种炎症因子积聚于脑内环境中, 引发神经元焦亡。有研究表明, 晶体和颗粒状物质被细胞吞噬入胞内后, 可致胞内溶酶体破坏, 进而其中的组织蛋白酶释放入胞浆^[9]。组织蛋白酶B (CTSB) 对NLRP3的激活过程有促进作用, 激活的NLRP3炎症小体使Caspase-1自身水解活化, 活化的Caspase-1切割低活性的pro-IL-1 β 和pro-IL-18形成性质活跃的IL-18和IL-1 β ^[10]。本实验旨在研究 NaAsO_2 通过提高胞内CTSB的水平, 从而激活NLRP3炎症小体, 诱导小胶质细胞的炎症反应作

* 贵州省卫健委 (gzwkj2021-432), 贵州医科大学国基培育项目 (20NSP017) 和贵州省大学生创新创业训练计划项目 (202110660002, S202010660072) 资助。

** 通讯联系人。

Tel: 15985192592, E-mail: sunbaofei@sina.com

收稿日期: 2022-08-31, 接受日期: 2022-09-28

用。为进一步探索砷致神经系统损伤提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞

本研究采用的BV-2小鼠小胶质细胞系购自中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库(KCB)。

1.1.2 主要试剂

NaAsO₂ (美国Sigma公司); RPMI1640培养基, 胎牛血清 (美国Gibco公司, 8122013); BCA蛋白质浓度测定试剂盒 (中国索莱宝公司, PC0020); Lyso-Tracker Green (中国碧云天公司, C1047S); CTSB (12216-1-AP, 1:200), Caspase-1 (22915-1-AP, 1:500), NLRP3 (19771-1-AP, 1:300) 多克隆抗体 (美国Proteintech公司); IL-1 β (YT5201, 1:500)、IL-18 (YN1926, 1:500) 多克隆抗体, 山羊抗兔IgG (S0002, 1:5000) 抗体 (美国Immunoway公司); anti- β -actin (81115-1-RR, 1:5000) 抗体 (美国Proteintech公司), 辣根过氧化物酶 (美国Millipore公司, WBKLS0100)。

1.1.3 主要仪器

5% CO₂培养箱, 高速离心机购自Thermo公司; 96孔板, 细胞培养皿购自中国NEST公司; 电泳仪购自Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

BV-2细胞培养于培养基(20%胎牛血清、1% 100 mmol/L青霉素和100 mmol/L链霉素、79% RPMI 1640)中, 置37°C、5% CO₂细胞培养箱内培养, 隔天进行换液, 2~3 d传代1次。融合培养采用胰酶消化传代。取处于对数生长期的细胞用于实验。

1.2.2 CCK-8实验

取生长状态良好的BV-2小胶质细胞接种于96孔板内, 调整细胞密度为5000个/孔。设置空白对照组(无任何干预处理), 4个实验组, 每个组包括6个复孔, 培养24 h后, 分别更换含0、2、4、8、16 μ mol/L NaAsO₂的培养基继续培养24 h。24 h后弃上清, 每孔避光加入100 μ l (不含血清的RPMI1640:CCK-8=9:1) CCK-8工作液。避光孵育2 h后放入酶标仪中, 测定450 nm处每孔A值。

1.2.3 溶酶体探针实验

取少量Lyso-Tracker Green按照1:13 333~1:20 000的比例加入到细胞培养液或适当的溶液中, 配制成工作液并置于37°C温育。取出细胞培养皿, 加入胰酶消化到EP管中, 弃上清。加入PBS缓冲液, 1200 r/min离心5 min, 弃上清, 重复2次。加入工作液, 与细胞37°C共孵育15 min。孵育结束, 1200 r/min离心5 min, 弃上清。加入PBS缓冲液, 1200 r/min离心5 min, 弃上清, 重复两次。加入PBS与管内剩余细胞充分混匀, 使用流式细胞仪检测。

1.2.4 蛋白质免疫印迹实验

取出细胞培养皿, 弃去培养基, 加入预冷的PBS清洗, 并弃去清洗液, 再用移液枪吸取200 μ l裂解液(RIPA:PMSF=100:1)加入到培养皿中。10 min后用细胞刮刮取皿底的贴壁细胞, 吸取皿中的混液到EP管中, 离心。完成后, 吸取上清液到新的EP管中, 取部分用于定量, 其余加入5 $\times$ Loading Buffer缓冲液, 加入量为EP管中蛋白质体积的1/4, 放入沸水中加热5~10 min取出, 冷却, 可用于蛋白质免疫印迹实验。进行BCA蛋白质定量, 根据蛋白质定量数据, 上样, 电泳。完成后, 200 mA、2 h条件进行转膜, 50 g/L脱脂奶粉封闭过夜, 孵育一抗, 洗膜, 孵育二抗, 洗膜, 曝光显影, 凝胶成像仪上进行蛋白质条带检测和灰度分析。

1.3 统计学处理

采用SPSS 26.0和GraphPad Prism 8.4.3软件进行统计分析, 正态性检验采用Shapiro-Wilk检验。正态分布资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两间多重比较采用LSD-*t*检验。多组比较采用Kruskal-Wallis H检验, 两两比较采用Mann-Whitney U检验。实验至少重复3次, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同浓度NaAsO₂对BV-2小胶质细胞细胞活力的影响

不同浓度(0、2、4、8、16 μ mol/L) NaAsO₂作用BV-2小胶质细胞24 h, 细胞活力总体差异有统计学差异($F=72.71$, $P<0.01$) (图1)。组内两两多重比较显示, 与对照组(0 μ mol/L)比较, 2、4、8、16 μ mol/L组均有统计学差异($P_{2\mu\text{mol/L}}=0.034$, $P_{4\mu\text{mol/L}}<0.01$, $P_{8\mu\text{mol/L}}<0.01$, $P_{16\mu\text{mol/L}}<0.01$)。

表明2、4、8、16 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 NaAsO_2 可以导致细胞活力下降, 16 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 NaAsO_2 导致细胞活力显著下降, 对细胞毒作用较强。参考CCK-8结果及其他文献, 后续研究采用2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ 作为 NaAsO_2 的实验浓度。

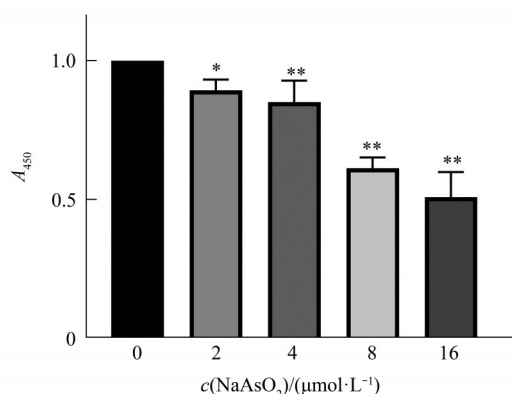


Fig. 1 Effects of different concentrations of NaAsO_2 on BV-2 cell viability

Cell viability was detected by CCK-8 assay. * $P<0.05$ vs Control group (0 $\mu\text{mol/L}$). ** $P<0.01$ vs Control group (0 $\mu\text{mol/L}$).

2.2 不同浓度 NaAsO_2 对BV-2胞内溶酶体水平的影响

不同浓度 (0、2、4、8 $\mu\text{mol/L}$) NaAsO_2 作用BV-2小胶质细胞24 h, 对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 与2 $\mu\text{mol/L}$ 、4 $\mu\text{mol/L}$ 和8 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO_2 组的细胞内溶酶体水平总体差异有统计学意义 ($F=7.385$, $P<0.01$), 实验重复3次 (图2)。组内两两多重比较显示, 与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 比较, 2 $\mu\text{mol/L}$ 、4 $\mu\text{mol/L}$ 和8 $\mu\text{mol/L}$ 组的细胞内溶酶体减少, 差异有统计学意义 ($P_{2\mu\text{mol/L}}=0.030$, $P_{4\mu\text{mol/L}}=0.025$, $P_{8\mu\text{mol/L}}<0.01$)。

2.3 不同浓度 NaAsO_2 对小胶质细胞胞内CTSB水平的影响

对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 和2 $\mu\text{mol/L}$ 、4 $\mu\text{mol/L}$ 和8 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO_2 组细胞内CTSB水平总体差异有统计学意义 ($F=11.84$, $P<0.01$), 实验重复3次 (图3)。组内两两多重比较显示, 与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 比较, 2 $\mu\text{mol/L}$ 、4 $\mu\text{mol/L}$ 和8 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞内CTSB的水平均升高 ($P_{2\mu\text{mol/L}}=0.031$, $P_{4\mu\text{mol/L}}<0.01$, $P_{8\mu\text{mol/L}}<0.01$), 差异有统计学意义。

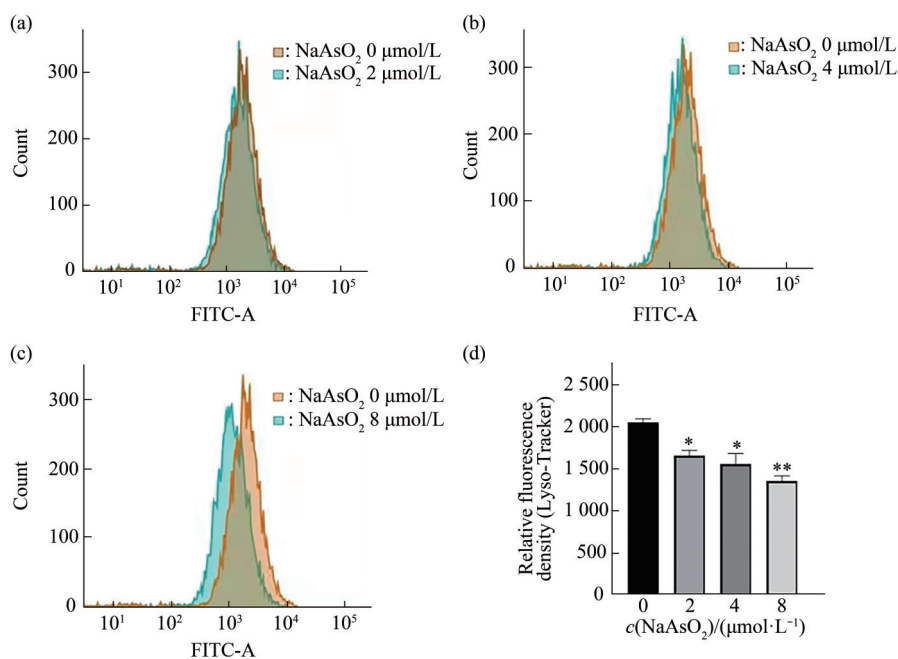


Fig. 2 Effects of different concentrations of NaAsO_2 on the level of intracellular lysosomes in BV-2

(a-c) Comparison of intracellular lysosome levels between different arsenic exposure groups and Control group. (d) Fluorescence intensity of lysosome probe. * $P<0.05$ vs Control group (0 $\mu\text{mol/L}$). ** $P<0.01$ vs Control group (0 $\mu\text{mol/L}$).

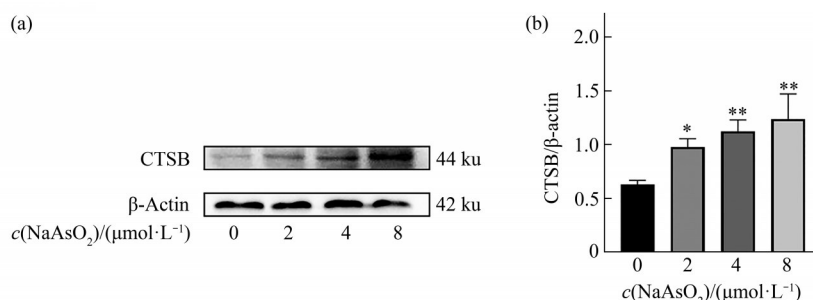


Fig. 3 Effects of different concentrations of NaAsO₂ on the level of intracellular CTSB in BV-2

(a) Expression of CTSB with β-actin as the internal reference. (b) CTSB/β-actin quantitative ratio. * $P < 0.05$ vs Control group (0 μmol/L). ** $P < 0.01$ vs Control group (0 μmol/L).

2.4 不同浓度NaAsO₂对小胶质细胞胞内NLRP3炎症小体和Caspase-1水平的影响

对照组 (0 μmol/L) 和 2 μmol/L、4 μmol/L 和 8 μmol/L NaAsO₂ 组细胞内 NLRP3 和 Caspase-1 水平总体差异有统计学意义 ($F_{\text{NLRP3}}=20.75$, $P_{\text{NLRP3}} <$

0.01; $F_{\text{Caspase-1}}=41.13$, $P_{\text{Caspase-1}} < 0.01$), 实验重复 3 次 (图 4)。与对照组 (0 μmol/L) 比较, 4 μmol/L 和 8 μmol/L 组细胞内 NLRP3 和 Caspase-1 的水平均升高 ($P < 0.01$) 差异有统计学意义。

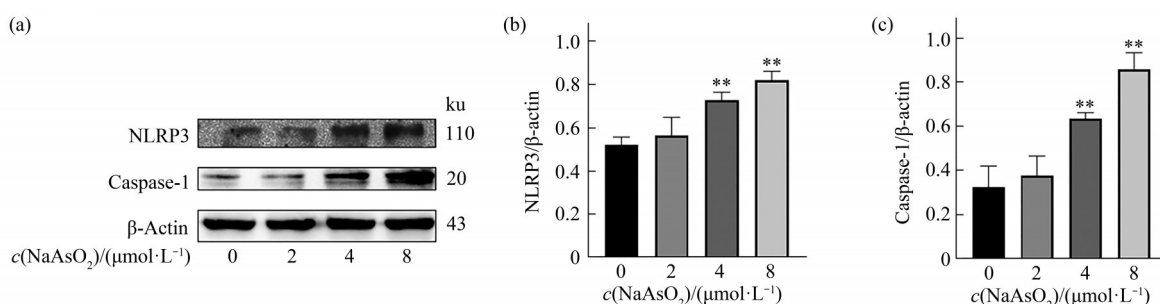


Fig. 4 Effects of different concentrations of NaAsO₂ on the level of intracellular NLRP3, Caspase-1 in BV-2

(a) Expression of NLRP3 and Caspase-1 with β-actin as the internal reference. (b) NLRP3/β-actin quantitative ratio. (c) Caspase-1/β-actin quantitative ratio. ** $P < 0.01$ vs Control group (0 μmol/L).

2.5 不同浓度NaAsO₂对小胶质细胞胞内IL-1β和IL-18水平的影响

对照组 (0 μmol/L) 和 2 μmol/L、4 μmol/L 和 8 μmol/L NaAsO₂ 组细胞内 IL-1β 和 IL-18 水平总体差异有统计学意义, ($F_{\text{IL-1β}}=31.19$, $P_{\text{IL-1β}} < 0.01$; $F_{\text{IL-18}}=76.86$, $P_{\text{IL-18}} < 0.01$), 实验重复 3 次 (图 5)。与对照组 (0 μmol/L) 比较, 4 μmol/L 和 8 μmol/L 组细胞内的 IL-18 水平均升高 ($P_{4\mu\text{mol/L}}=0.018$, $P_{8\mu\text{mol/L}} < 0.01$) 差异有统计学意义, 与对照组 (0 μmol/L) 比较, 2 μmol/L、4 μmol/L 和 8 μmol/L 组细胞内的 IL-1β 水平均升高 ($P_{2\mu\text{mol/L}}=0.036$, $P_{4\mu\text{mol/L}} < 0.01$, $P_{8\mu\text{mol/L}} < 0.01$)。

2.6 CA074-Me干预小胶质细胞对胞内CTSB水平的影响

根据上述实验结果发现, 与对照组 (0 μmol/L) 比较, 8 μmol/L 组的小胶质细胞胞内 CTBSB 水平上升较显著, 所以选择在 8 μmol/L NaAsO₂ 培养细胞的基础上加入 5 μmol/L 或 10 μmol/L CTBSB 抑制剂 CA-074Me 干预。对照组 (8 μmol/L NaAsO₂)、5 μmol/L CA074-Me 干预组、10 μmol/L CA074-Me 干预组, CTBSB 蛋白表达 ($F=53.66$, $P < 0.01$) 差异有统计学意义, 实验重复 3 次 (图 6)。组内两两多重比较显示, 与对照组 (8 μmol/L NaAsO₂) 相比, 5 μmol/L CA074-Me 组和 10 μmol/L CA074-Me 组细胞内 CTBSB 的表达下降, 差异有统计学意义 ($P_{5\mu\text{mol/L}}=0.018$, $P_{10\mu\text{mol/L}} < 0.01$)。

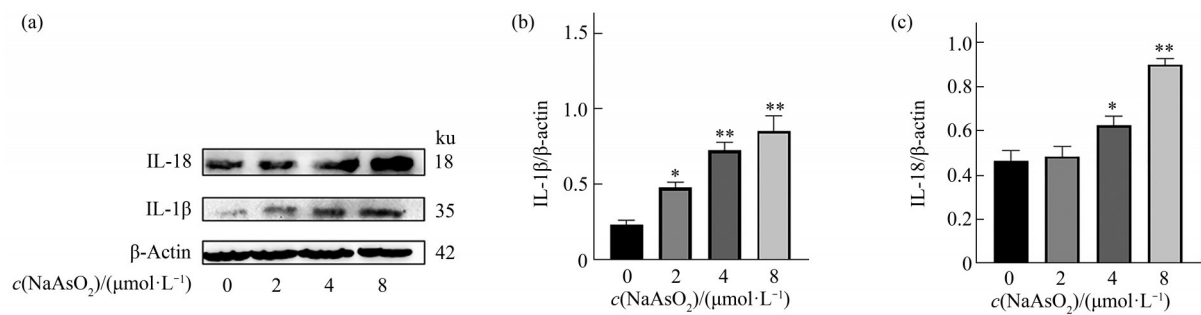


Fig. 5 Effects of different concentrations of NaAsO₂ on the level of intracellular IL-1β, IL-18 in BV-2 (a) Expression of IL-1β and IL-18 with β-actin as the internal reference. (b) IL-1β/β-actin quantitative ratio. (c) IL-18/β-actin quantitative ratio. *P<0.05 vs Control group (0 μmol/L). **P<0.01vs Control group (0 μmol/L).

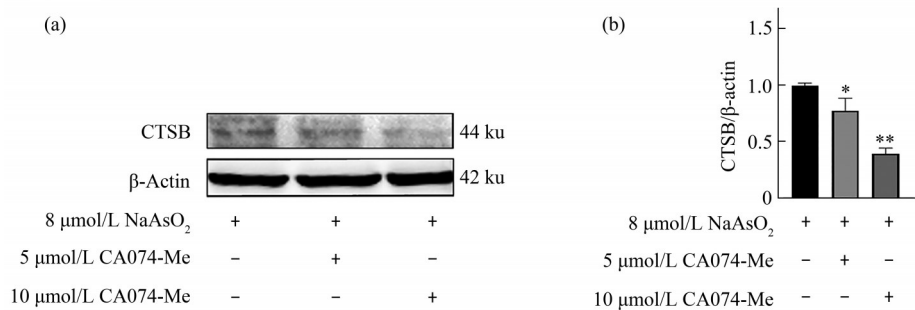


Fig. 6 Effects of co-culture with 8 μmol/L NaAsO₂ and different concentrations of CA074-Me on the level of CTSB in microglia (a) Expression of CTSB with β-actin as the internal reference. (b) CTSB/β-actin quantitative ratio. *P<0.05 vs Control group (8 μmol/L NaAsO₂). **P<0.01 vs Control group (8 μmol/L NaAsO₂).

2.7 抑制剂干预小胶质细胞对胞内NLRP3炎症小体水平的影响

对照组 (8 μmol/L NaAsO₂)、5 μmol/L CA074-Me 干预组、10 μmol/L CA074-Me 干预组, 胞内 NLRP3 和 Caspase-1 浓度差异有统计学意义 ($F_{\text{NLRP3}}=20.16$, $P_{\text{NLRP3}}<0.01$; $F_{\text{Caspase-1}}=41.75$, $P_{\text{Caspase-1}}<0.01$), 实验重复 3 次 (图 7)。组内两两多重比较, 与对照组 (8 μmol/L NaAsO₂) 比较, 加入 CA074-Me 的组 NLRP3 表达下降, 差异有统计学意义 ($P_{5\mu\text{mol/L}}=0.0253$, $P_{10\mu\text{mol/L}}<0.01$)。与对照组 (8 μmol/L NaAsO₂) 比较, 加入 CA074-Me 的组 Caspase-1 表达下降, 差异有统计学意义 ($P_{5\mu\text{mol/L}}<0.01$, $P_{10\mu\text{mol/L}}<0.01$)。

2.8 抑制剂干预小胶质细胞对胞内IL-1β和IL-18水平的影响

对照组 (8 μmol/L NaAsO₂)、5 μmol/L CA074-Me 干预组、10 μmol/L CA074-Me 干预组, IL-18 和 IL-1β 差异有统计学意义 ($F_{\text{IL-1β}}=45.11$, $P_{\text{IL-1β}}<0.01$; $F_{\text{IL-18}}=23.99$, $P_{\text{IL-18}}<0.01$), 实验重复 3 次 (图 8)。组内两两多重比较, 与对照组 (8 μmol/L NaAsO₂) 比较, 5 μmol/L CA074-Me 干预组和 10 μmol/L CA074-Me 干预组细胞内的 IL-1β 表达量下降, 差异有统计学意义 ($P_{5\mu\text{mol/L}}<0.01$, $P_{10\mu\text{mol/L}}<0.01$)。与对照组 (8 μmol/L NaAsO₂) 比较, 5 μmol/L CA074-Me 干预组和 10 μmol/L CA074-Me 干预组细胞内的 IL-18 表达量下降, 差异有统计学意义 ($P_{5\mu\text{mol/L}}<0.01$, $P_{10\mu\text{mol/L}}<0.01$)。

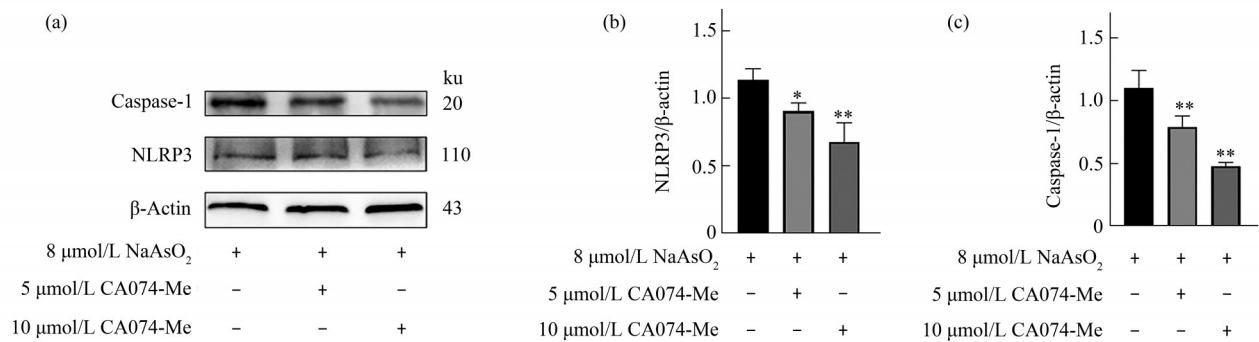


Fig. 7 Effects of co-culture with 8 μmol/L NaAsO₂ and different concentrations of CA074-Me on the level of Caspase-1 and NLRP3 in microglia

(a) Expression of NLRP3 and Caspase-1 with β-actin as the internal reference. (b) NLRP3/β-actin quantitative ratio. (c) Caspase-1/β-actin quantitative ratio. * $P < 0.05$ vs Control group (8 μmol/L NaAsO₂). ** $P < 0.01$ vs Control group (8 μmol/L NaAsO₂).

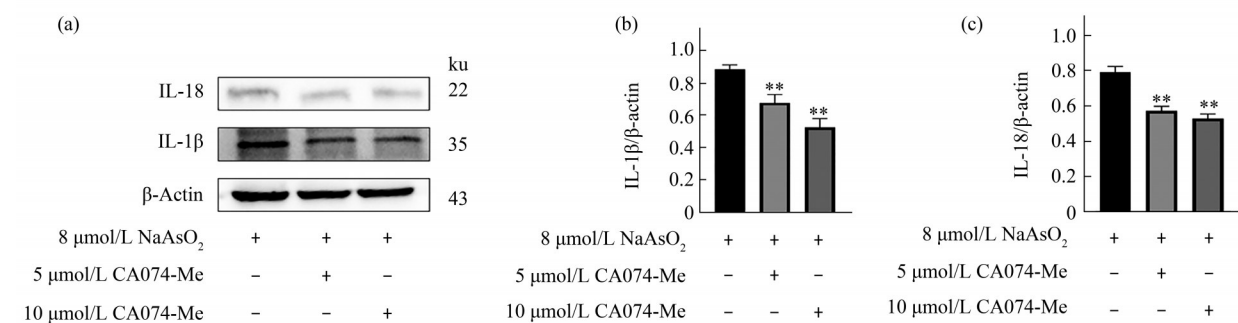


Fig. 8 Effects of co-culture with 8 μmol/L NaAsO₂ and different concentrations of CA074-Me on the level of IL-1β and IL-18 in microglia

(a) Expression of IL-1β and IL-18 with β-actin as the internal reference. (b) IL-1β/β-actin quantitative ratio. (c) IL-18/β-actin quantitative ratio. ** $P < 0.01$ vs Control group (8 μmol/L NaAsO₂).

3 讨 论

小胶质细胞是脑组织内一类重要的免疫效应细胞，作为中枢系统内唯一的巨噬细胞，具有免疫防御功能，主要有分枝状和阿米巴样两种形态，前者为静息状态，后者为激活状态^[11]。小胶质细胞被激活后，在细胞的形态发生改变的同时，迁移、吞噬、增殖和抗原呈递功能也显著加强^[12]。在分子水平上，激活后的小胶质细胞释放大量的IL-1、IL-6、TNF-α、TGF-β、活性氧(ROS)、NO和谷氨酰胺等炎性细胞因子和神经毒性物质^[13]，影响突触强度和可塑性，引起神经元焦亡，从而损伤中枢神经系统。小胶质细胞的活化在有关学习记忆功能的损伤中起突出作用，亦是脑内神经炎症的标志^[14]。在过去的几年里，研究人员认为小胶质细

胞与神经退行性疾病有关，小胶质细胞的活化在阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)和肌萎缩侧索硬化症(ALS)等神经退行性疾病中起重要作用^[15]。

在NLRP3炎症小体的激活过程中，有CTSB的参与^[16]。组织蛋白酶是一类蛋白水解酶，在结构和/或功能上表现出多样性。溶酶体组织蛋白酶家族可分为天冬氨酸组织蛋白酶(D和E)、丝氨酸组织蛋白酶(A和G)和半胱氨酸组织蛋白酶(B、C、F、H、K、L、O、S、V、X和W)3个亚组^[17]。本研究表明，一定浓度的NaAsO₂可致小胶质细胞内溶酶体的膜稳定性下降，由此可能导致溶酶体中的CTSB释放，进而使胞内的CTSB水平上升。值得注意的是，CTSB可以根据其在不同pH范围内作为内肽酶或外肽酶的活性与组织蛋白酶家

族成员区分开来^[17]。在细胞内,CTSB调节多种功能,包括细胞因子胞吐、溶酶体内的蛋白质裂解和诱导细胞死亡^[18-19]。在实验环境中,溶酶体内或胞浆中的CTSB激活被认为可以促进NLRP3-炎症体的激活和IL-1 β 的产生^[20]。

炎症小体是多蛋白质复合物,由胞内模式识别受体参与组装,其中包括受体分子NLRP3、效应蛋白pro-Caspase-1和含CARD的调亡相关斑点样接头蛋白(ASC,炎症体的主体接头蛋白)。NLRP3的寡聚化可以诱导PYD功能区在NLRP3的活性反应过程中聚合,使同源的PYD功能区与ASC之间相互作用^[21]。作为NLRP3炎症小体其中的支架蛋白,ASC还同时具有连接作用,其中的CARD和PYD结构域募集下游pro-Caspase-1的CARD结构域,相互作用产生具有生物活性的Caspase-1,进一步与下游的pro-IL-1 β 和pro-IL-18作用,促使这部分促炎性因子从不具活性的前体蛋白成熟为具有活性的促炎因子IL-1 β 、IL-18,并以成熟的形式释放到胞外^[22]。

IL-1 β 又称淋巴细胞刺激因子,由活化的单核巨噬细胞产生。在细胞内,活化的Caspase-1可以切割无活性的pro-IL-1 β 和pro-IL-18,进而转化为具有活性的促炎因子IL-1 β 和IL-18^[23]。IL-1 β 对神经系统的影响较为广泛,如促进ROS自由基生成,加剧氧化损伤;促进其他炎症因子分泌,加重炎症反应^[24];加速细胞钙离子内流,导致钙超载。IL-18与IL-1 β 有相似之处,研究发现,IL-18可以中枢合成,其受体亚基在神经元中广泛表达^[25]。在过度活跃的小胶质细胞和星形胶质细胞中,IL-18和IL-18R的表达分别上调^[26]。有研究发现,大鼠脑缺血再灌注损伤损害后脑组织,引起经脂多糖(LPS)诱导活化的小胶质细胞内活化的IL-1 β 、IL-18水平均升高^[27-28]。本研究表明,NaAsO₂诱导小胶质细胞胞内IL-1 β 和IL-18的水平上升。但其是否被释放到胞外,从而作用于周围其他胶质细胞和神经元而引发中枢神经系统炎症尚存疑问^[29]。虽然有部分IL-1 β 和IL-18在测定前已经释放至胞外,但是由于组间的培养情况相同,砷暴露的时间相同,与对照组比较可消除其释放至胞外所造成的差异。至于是否与NaAsO₂存在剂量效应关系,还需要进一步实验验证。

而用化学抑制剂抑制CTSB可降低NLRP3炎症的激活^[30]。有研究表明,使用CA074-Me抑制CTSB是适当和合理的,因为它具有高质膜通透性

和快速转化为其非甲基化形式CA074的特性,已证明其非甲基化形式CA074可以特异性地干扰CTSB活性^[31]。同时,本研究使用CTSB的选择性化学抑制剂CA-074Me干预砷作用的小胶质细胞的结果显示,抑制剂干预的组与对照组相比胞内CTSB水平和NLRP3炎症小体的水平都有所下降,以浓度为10 μ mol/L抑制剂干预的组下降较明显。

综上所述,本实验证实了砷可通过破坏溶酶体,促使溶酶体内CTSB释放,致小胶质细胞内的CTSB水平上升,进一步诱导NLRP3炎症小体的组装,胞内活化的Caspase-1含量增加。大量活化的Caspase-1切割pro-IL-1 β 和pro-IL-18,形成活性较高的IL-1 β 和IL-18。CTSB选择性抑制剂CA074-Me对小胶质细胞的干预令这一现象有明显改变,进一步揭示了CTSB在砷诱导的BV-2小胶质细胞胞内的炎症因子水平上升中起着重要作用。

4 结 论

NaAsO₂通过诱导小胶质细胞内CTSB水平的上升,介导NLRP3炎症小体激活小胶质细胞,促其释放炎症因子,致神经系统损伤。

参 考 文 献

- [1] Wang C, Feng R, Li Y, *et al.* The metabolomic profiling of serum in rats exposed to arsenic using UPLC/Q-TOF MS. *Toxicol Lett*, 2014, **229**(3): 474-481
- [2] Mochizuki H. Arsenic neurotoxicity in humans. *Int J Mol Sci*, 2019, **20**(14): 3418
- [3] Chin-Chan M, Navarro-Yepes J, Quintanilla-Vega B. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Front Cell Neurosci*, 2015, **9**: 124
- [4] Wasserman G A, Liu X, Parvez F, *et al.* A cross-sectional study of water arsenic exposure and intellectual function in adolescence in Araihaazar, Bangladesh. *Environ Int*, 2018, **118**: 304-313
- [5] Shi X, Cai X, Di W, *et al.* MFG-E8 selectively inhibited A β -induced microglial M1 polarization via NF- κ B and PI3K-Akt pathways. *Mol Neurobiol*, 2017, **54**(10): 7777-7788
- [6] 代华,夏茵茵,Han TL,等.慢性砷暴露对小鼠脑和血清代谢组学的影响.南方医科大学学报,2016, **36**(9): 1192-1197
- [7] Dai H, Xia Y Y, Han T L, *et al.* Journal of Southern Medical University, 2016, **36**(9): 1192-1197
- [8] Chaudhuri A N, Basu S, Chattopadhyay S, *et al.* Effect of high arsenic content in drinking water on rat brain. *Indian J Biochem Biophys*, 1999, **36**(1): 51-54
- [9] Andreasson K I, Bachstetter A D, Colonna M, *et al.* Targeting innate immunity for neurodegenerative disorders of the central nervous system. *J Neurochem*, 2016, **138**(5): 653-693

- [9] Qiu T, Pei P, Yao X, *et al.* Taurine attenuates arsenic-induced pyroptosis and nonalcoholic steatohepatitis by inhibiting the autophagic-inflammasomal pathway. *Cell Death Dis*, 2018, **9**(10): 946
- [10] 张鹏飞, 于春泽, 于建云, 等. NLRP3 炎性小体在中枢神经系统疾病中的作用研究进展. *中国临床解剖学杂志*, 2022, **40**(1): 113-116
Zhang P F, Yu C Z, Yu J Y, *et al.* *Chinese Journal of Clinical Anatomy*, 2022, **40**(1): 113-116
- [11] 徐艺华, 郑晶, 张晓峰, 等. 百草枯诱导小鼠脑小胶质细胞的炎症反应. *环境与健康杂志*, 2016, **33**(3): 202-204
Xu Y H, Zheng J, Zhang X F, *et al.* *Journal of Environment and Health*, 2016, **33**(3): 202-204
- [12] 傅希玥, 陆地, 边立功, 等. 小胶质细胞的激活与癫痫的关系. *昆明医科大学学报*, 2017, **38**(2): 127-130
Fu X Y, Lu D, Bian L G, *et al.* *Journal of Kunming Medical University*, 2017, **38**(2): 127-130
- [13] Zhang R Y, Tu J B, Ran R T, *et al.* Using the metabolome to understand the mechanisms linking chronic arsenic exposure to microglia activation, and learning and memory impairment. *Neurotox Res*, 2021, **39**(3): 720-739
- [14] Zhou T, Huang Z, Sun X, *et al.* Microglia polarization with M1/M2 phenotype changes in rd1 mouse model of retinal degeneration. *Front Neuroanat*, 2017, **11**: 77
- [15] 黄宗晖, 周荣斌. 神经炎症与神经退行性疾病. *科技导报*, 2021, **39**(20): 45-55
Huang Z H, Zhou R B. *Science and Technology Guide*, 2021, **39**(20): 45-55
- [16] Heneka M T, Mcmanus R M, Latz E. Inflammasome signalling in brain function and neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci*, 2018, **19**(10): 610-621
- [17] Mijanovic O, Brankovic A, Panin A N, *et al.* Cathepsin B: a sellsword of cancer progression. *Cancer Lett*, 2019, **449**: 207-214
- [18] Mishra B B, Moura-Alves P, Sonawane A, *et al.* Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. *Cell Microbiol*, 2010, **12**(8): 1046-1063
- [19] Wong K W, Jacobs W R, Jr. Critical role for NLRP3 in necrotic death triggered by *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Microbiol*, 2011, **13**(9): 1371-1384
- [20] Jang H M, Park J Y, Lee Y J, *et al.* TLR2 and the NLRP3 inflammasome mediate IL-1 β production in *Prevotella nigrescens*-infected dendritic cells. *Int J Med Sci*, 2021, **18**(2): 432-440
- [21] Mariathasan S, Weiss D S, Newton K, *et al.* Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, 2006, **440**(7081): 228-232
- [22] Kelley N, Jeltema D, Duan Y, *et al.* The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation. *Int J Mol Sci*, 2019, **20**(13): 3328
- [23] 刘伟, 丛树艳. 缺血性脑卒中炎症反应标志物的研究现状. *中国临床神经科学*, 2020, **28**(5): 590-594
Liu W, Cong S Y. *Chinese Clinical Neuroscience*, 2020, **28**(5): 590-594
- [24] Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2011, **22**(4): 189-195
- [25] Alboni S, Cervia D, Sugama S, *et al.* Interleukin 18 in the CNS. *J Neuroinflammation*, 2010, **7**: 9
- [26] 舒银银, 谢军明, 李永乐, 等. 鞘内注射 IL-18 中和抗体对大鼠吗啡耐受形成的影响. *中国药理学通报*, 2013, **23**(5): 693-697
Shu Y Y, Xie J M, Li Y L, *et al.* *China Pharmacology Bulletin*, 2013, **29**(5): 693-697
- [27] He Q, Li Z, Meng C, *et al.* Parkin-Dependent mitophagy is required for the inhibition of ATF4 on NLRP3 inflammasome activation in cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Cells*, 2019, **8**(8): 897
- [28] Fu Q, Wu J, Zhou X Y, *et al.* NLRP3/Caspase-1 pathway-induced pyroptosis mediated cognitive deficits in a mouse model of mepsis-associated encephalopathy. *Inflammation*, 2019, **42**(1): 306-318
- [29] Voet S, Srinivasan S, Lamkanfi M, *et al.* Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. *EMBO Mol Med*, 2019, **11**(6): e10248
- [30] Kharroubi W, Haj Ahmed S, Nury T, *et al.* Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and apoptotic induction in microglial BV-2 cells treated with sodium arsenate. *J Environ Sci*, 2017, **51**(1): 44-51
- [31] Jiang M, Meng J, Zeng F, *et al.* Cathepsin B inhibition blocks neurite outgrowth in cultured neurons by regulating lysosomal trafficking and remodeling. *J Neurochem*, 2020, **155**(3): 300-312

The Role of CTSB-mediated NLRP3 Bodies in Arsenic-induced Inflammatory Activation of Microglia*

ZHANG Zhe-Yu, PI Ruo-Zheng, LIU Ji, FANG Hui-Min, YANG Dan, SUN Bao-Fei**

(Department of Human Anatomy, College of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550000, China)

Abstract Objective To explore the role of CTSB (cathepsin B)-mediated NLRP3 bodies in arsenic-induced inflammatory activation of mouse microglial BV-2 cell. **Methods** BV-2 cells in logarithmic growth phase were respectively exposed to NaAsO₂ solution at the final concentration of 0, 2, 4 and 8 μmol/L for 24 h. Cell viability was detected by CCK-8 assay. The levels of intracellular CTSB, NLRP3, Caspase-1, IL-18, and IL-1β were determined by Western blot. The intracellular lysosome level was detected by flow cytometry analysis. According to the experimental results, CTSB inhibitor group (5 μmol/L CA074-Me+8 μmol/L NaAsO₂, 10 μmol/L CA074-Me+8 μmol/L NaAsO₂) was added to detect the expression of NLRP3, Caspase-1, IL-1β and IL-18 in the two groups. **Results** Compared with the control group, the cell inhibition rate of all exposed groups increased in a dose-dependent manner, the level of lysosome integrity decreased, the difference was statistically significant ($P<0.01$). The expression of CTSB, NLRP3, IL-1β and IL-18, Caspase-1 increased significantly, the difference was statistically significant ($P<0.01$). Compared with the inhibitor group, the intracellular CTSB, NLRP3, IL-1β and IL-18, Caspase-1 levels of BV-2 cells exposed to 8 μmol/L NaAsO₂ without inhibitor were significantly higher ($P<0.01$). **Conclusion** NaAsO₂ can induce the increase of CTSB level in microglia, mediate the activation of microglia by NLRP3 inflammatory bodies, promote the release of inflammatory factors and damage the central nervous system.

Key words sodium arsenite, microglia, cathepsin B

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0417

* This work was supported by grants from Science and Technology Foundation of Guizhou Province Health (gzwkj2021-432), Cultivation Project for the National Natural Science Foundation of Guizhou Medical University (20NSP017), and Innovative Entrepreneurship Training Program for College Students in Guizhou Province (202110660002, S202010660072).

** Corresponding author.

Tel: 86-15985192592, E-mail: sunbaofei@sina.com

Received: August 31, 2022 Accepted: September 28, 2022