

## 实验研究

## NALP6 信号转导通路在痛风性关节炎发病过程中的作用机制

隋方宇<sup>1</sup> 姜德友<sup>1</sup> 韩洁茹<sup>1</sup> 周雪明<sup>1</sup> 赵铭宇<sup>2</sup> 解颖<sup>1</sup>

(1 黑龙江中医药大学基础医学院, 哈尔滨, 150040; 2 黑龙江省中医医院妇科, 哈尔滨, 150036)

**摘要** 目的:探讨NALP6信号转导通路在痛风性关节炎(GA)发病过程中的作用机制。方法:选取慢病毒转染技术干扰NALP6蛋白的基因表达,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)、蛋白质印迹法(Western blotting)、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)等技术检测细胞中NALP6蛋白、caspase-1、IL-1 $\beta$ 、核因子- $\kappa$ B的表达情况;结果:干扰成纤维样滑膜细胞中NALP6基因的表达,能减低痛风性关节炎成纤维样滑膜细胞中NALP6蛋白的表达、降低caspase-1和核因子- $\kappa$ B的活性,降低IL-1 $\beta$ 含量;结论:NALP6炎症反应信号转导通路参与了大鼠痛风性关节炎的发病过程,通过能够干扰NALP6基因表达的慢病毒转染技术能保护痛风性关节炎成纤维样滑膜细胞的炎症损伤。

**关键词** 痛风性关节炎;NALP6信号转导通路;caspase-1;白细胞介素-1 $\beta$ ;核因子- $\kappa$ B;慢病毒转染;成纤维样滑膜细胞;靶点

## Study on the Mechanism of NALP6 Signal Transduction Pathway in the Pathogenesis of Gout Arthritis

Sui Fangyu<sup>1</sup>, Jiang Deyou<sup>1</sup>, Han Jieru<sup>1</sup>, Zhou Xueming<sup>1</sup>, Zhao Mingyu<sup>2</sup>, Xie Ying<sup>1</sup>

(1 Basic Medicine Collage, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

2 Department of Gynecology, Heilongjiang Hospital of TCM, Harbin 150036, China)

**Abstract Objective:** To investigate the action mechanism of the NALP6 signal transduction pathway involved in gout arthritis (GA). **Methods:** The lentiviral transfection technology was used to interfere the expression of NALP6 gene and the expression of NALP6, caspase-1, IL-1 $\beta$  and NF- $\kappa$ B was detected by using Elisa, Western Blot and RT-PCR technology. **Results:** Interfering the expression of the NALP6 genes could reduce the expression levels of NALP6 protein and RNA and NF- $\kappa$ B protein, the activity of caspase-1 and the content of IL-1 $\beta$  in fibroblast-like synoviocytes. **Conclusion:** 1) The study confirmed that the NALP6 signal transduction pathway is involved in the pathogenesis process of GA in rats and revealed that the inflammatory signal of "NALP6-caspase-1-IL-1 $\beta$ " and the cycle pathway of inflammatory cascade between IL-1 $\beta$  and NF- $\kappa$ B play an important role in the process of gouty arthritis. 2) The method of interfering the genes expression of NALP6 by lentiviral transfection technology can protect the inflammation injury of fibroblast-like synoviocytes. 3) Regarding NALP6 as a target may provide a new idea for clinical prevention and treatment of gouty arthritis.

**Key Words** Gouty arthritis; NALP6; caspase-1; IL-1 $\beta$ ; NF- $\kappa$ B; Lentiviral transfection; Fibroblast-like synoviocytes; Target

中图分类号: R229; R593 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2019.09.011

NALP6 炎症反应体可以诱导 caspase-1 的活化并且能够参与核因子- $\kappa$ B 的调控,进而参与炎症反应的过程。但是,NALP6 是否在痛风性关节炎(GA)发病机制中起一定的作用,尚未见报道。因此,我们采用大鼠成纤维样滑膜细胞制成 GA 模型,运用慢病毒转染技术干扰 NALP6 基因的表达,通过观察 NALP6、caspase-1、白细胞介素(IL)-1 $\beta$  和核因子- $\kappa$ B

的表达情况,探讨 NALP6 炎症信号通路在 GA 发病过程中的作用机制。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

1.1.1 细胞 选取 10 周龄健康雄性 SD 大鼠成纤维样滑膜细胞(万类生物科技公司提供)。

1.1.2 仪器 慢病毒转染使用仪器和试剂。见表

基金项目:国家自然科学基金项目(81173170);黑龙江中医药大学科研基金项目(201733)

作者简介:隋方宇(1983.12—),女,博士,讲师,研究方向:经方治疗内伤疑难杂病的临床与基础,中药的临床与教学,E-mail:sfy060701@163.com

通信作者:解颖(1981.09—),女,硕士,助理研究员,研究方向:经方治疗内伤疑难杂病的实验研究,E-mail:45232100@qq.com

1,2。NALP6 信号转导通路在痛风性关节炎发病过程中的作用机制研究仪器和试验。见表 3,4。

表 1 实验仪器

所用仪器	仪器型号	产地	公司
超纯水系统	NW10LVF	香港	Heal Force
超速冷冻离心机	H-2050R	长沙	湖南湘仪
培养箱	HF-90	上海	上海力申
倒置相差显微镜	AE31	厦门	麦克奥迪
超净工作台	SW-CJ-2FD	苏州	苏净安泰
电热恒温培养箱	DH36001B	天津	天津泰斯特

### 1.1.3 试剂

表 2 实验试剂

试剂名称	货号	生产公司
DMEM 培养基	12100-46	Gibco
胎牛血清	SH30084.03	Hyclone
PBS	P10033	双螺旋
Polybrene	H9268	Sigma

表 3 实验仪器

所用仪器	仪器型号	仪器产地	公司
微量移液器	Proline	苏州	BIOHIT
酶标仪	ELX-800	美国	BIOTEK
电热恒温培养箱	DH36001B	天津	天津泰斯特
水平摇床	WD-9405B	北京	北京六一
微量移液器	Proline	苏州	BIOHIT
酶标仪	ELX-800	美国	BIOTEK
超纯水系统	NW10LVF	香港	Heal Force
超速冷冻离心机	H-2050R	长沙	湖南湘仪
电热恒温培养箱	DH36001B	天津	天津泰斯特
水平摇床	WD-9405B	北京	北京六一
微量移液器	Proline	苏州	BIOHIT
超纯水系统	NW10LVF	香港	Heal Force
电泳仪	DYY-7C	北京	北京六一
转移槽	DYCZ-40D	北京	北京六一
双垂直蛋白电泳仪	DYCZ-24DN	北京	北京六一
凝胶成像系统	WD-9413B 型	北京	北京六一
超速冷冻离心机	H-2050R	长沙	湖南湘仪
酶标仪	ELX-800	美国	BIOTEK
电热恒温培养箱	DH36001B	天津	天津泰斯特

## 1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 1)慢病毒转染分组:选取空白组、空转染慢病毒载体对照组、NALP6 干扰表达慢病毒载体组。2) NALP6 信号转导通路在痛风性关节炎发病过程中的作用机制研究分组:每3孔为一组,共分为4组:a.空白组:正常滑膜细胞;b.模型组:滑膜细胞+尿酸钠;c.模型空转染组:滑膜细胞+尿酸钠+空转染慢病毒载体;d.模型 NALP6 转染组:滑膜细胞+尿酸钠+NALP6 干扰慢病毒载体。

表 4 实验试剂

试剂名称	公司	货号	产地
大鼠白细胞介素 1 $\beta$ ELISA 试剂盒	Boster	EK0393	中国
蛋白浓度测定试剂盒	wanleibio	WLA004	中国
Caspase1 活性检测试剂盒	碧云天	C1102	中国
全蛋白提取试剂盒	wanleibio	WLA019	中国
细胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒	wanleibio	WLA020	中国
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	wanleibio	WLA004	中国
一抗二抗去除液	wanleibio	WLA007	中国
SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒	wanleibio	WLA013	中国
Western 洗涤液	wanleibio	WLA025	中国
SDS-PAGE 电泳液(干粉)	wanleibio	WLA026	中国
SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液	wanleibio	WLA005	美国
ECL 发光液	wanleibio	WLA003	中国
预染蛋白分子量标准	Fermentas	96616	加拿大
PVDF 膜	Millipore	IPVH00010	美国
脱脂奶粉	伊利	Q/NYLB 0039S	中国
NALP6 抗体	Santa cruz	sc-50634	中国
I $\kappa$ B 抗体	Bioss	bs-1287R	中国
caspase-1 抗体	wanleibio	WL01020	中国
NF-KB 抗体	Boster	BA0610	中国
c-fos 抗体	Boster	BA0207-2	中国
c-jun 抗体	wanleibio	WL0219	中国
驴抗山羊 IgG-HRP	碧云天	A0181	中国
羊抗兔 IgG-HRP	wanleibio	WLA023	中国
羊抗小鼠 IgG-HRP	wanleibio	WLA024	中国
内参抗体 Histone H3	Bioss	bs-17422R	中国
内参抗体 $\beta$ -actin	Santa cruz	sc-47778	美国

模型制备:将大鼠成纤维样滑膜细胞进行原代培养并留取第三代细胞用于后续实验,加入 MSU 溶液制备成痛风性关节炎模型。

1.2.2 检测指标与方法 1)慢病毒转染:通过 ddCt RQ (Relative Quantitation) 以扩增公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  对 NALP6 的表达量进行分析计算。2) NALP6 信号转导通路在痛风性关节炎发病过程中的作用机制研究:采用酶联免疫吸附试验 (ELISA)、蛋白质印迹法 (Western blotting)、逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 等技术检测细胞中 NALP6 蛋白、caspase-1、IL-1 $\beta$ 、核因子- $\kappa$ B 的表达情况。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析。如果数据资料满足正态性和方差齐性,则应用单因素方差分析;如不满足上述条件则采用非参数检验方法,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组慢病毒转染比较 与空白组比较,空转染慢病毒载体空白组 NALP6 表达无明显变化,NALP6 干扰表达慢病毒载体组的 NALP6 表达明显降低,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 5。

表5 各组NALP6表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	NALP6
空白组( $n=3$ )	1.00 ± 0.04
空转染慢病毒载体对照组( $n=3$ )	0.95 ± 0.05
NALP6干扰表达慢病毒载体组( $n=3$ )	0.18 ± 0.01*

注:与空白组比较,\* $P < 0.05$

## 2.2 NALP6信号转导通路在痛风性关节炎发病过程中的作用机制

### 2.2.1 各组滑膜细胞中IL-1 $\beta$ 含量的变化

与空白组比较,模型组细胞中IL-1 $\beta$ 含量明显升高;与模型组比较,模型NALP6转染组细胞内IL-1 $\beta$ 含量下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表6。

表6 各组滑膜细胞IL-1 $\beta$ 比较( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

组别	IL-1 $\beta$
空白组( $n=3$ )	36.41 ± 5.82
模型组( $n=3$ )	200.00 ± 20.65*
模型空转染组( $n=3$ )	196.92 ± 23.47
模型NALP6转染组( $n=3$ )	122.56 ± 10.35 $\Delta$

注:与空白组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型对照组比较, $\Delta P < 0.05$

### 2.2.2 各组滑膜细胞中caspase-1活性

与空白组比较,模型组细胞中caspase-1活性明显升高;与模型组比较,模型NALP6转染组细胞内caspase-1活性下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表7。

表7 各组滑膜细胞caspase-1比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Caspase-1活性
空白组( $n=3$ )	0.56 ± 0.04
模型组( $n=3$ )	1.15 ± 0.07*
模型空转染组( $n=3$ )	1.09 ± 0.08
模型NALP6转染组( $n=3$ )	0.82 ± 0.09 $\Delta$

注:与空白组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型对照组比较, $\Delta P < 0.05$

### 2.2.3 各组滑膜细胞中NALP6蛋白表达比较

与模型组比较,模型NALP6转染组细胞内NALP6蛋白表达明显下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),经慢病毒转染干扰NALP6基因表达能够降低痛风性关节炎成纤维样滑膜细胞中NALP6蛋白的表达。见图1。

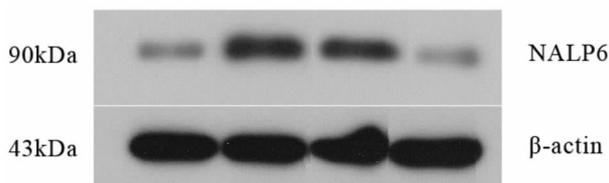
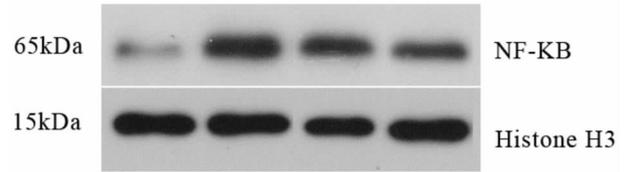


图1 各组滑膜细胞NALP6蛋白表达比较

### 2.2.4 各组滑膜细胞中核因子- $\kappa$ B蛋白表达比较

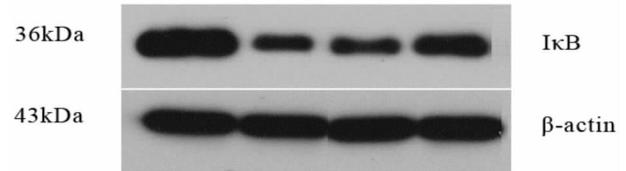
与空白组比较,模型组细胞中核因子- $\kappa$ B蛋白表达明显升高;与模型组比较,模型NALP6转染组

细胞内核因子- $\kappa$ B蛋白表达下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),经慢病毒转染干扰NALP6基因表达能够降低痛风性关节炎成纤维样滑膜细胞中核因子- $\kappa$ B蛋白的表达。见图2。

图2 各组滑膜细胞核因子- $\kappa$ B蛋白表达比较

### 2.2.5 各组滑膜细胞中I $\kappa$ B蛋白表达比较

与空白组比较,模型组细胞中I $\kappa$ B蛋白表达明显降低;与模型组比较,模型NALP6转染组细胞内I $\kappa$ B蛋白表达升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),经慢病毒转染干扰NALP6基因表达能够升高痛风性关节炎成纤维样滑膜细胞中I $\kappa$ B蛋白的表达。见图3。

图3 各组滑膜细胞I $\kappa$ B蛋白表达比较

### 2.2.6 各组滑膜细胞中NALP6mRNA表达情况

与空白组比较,模型组细胞中NALP6mRNA表达明显升高( $P < 0.05$ );与模型对照组比较,模型NALP6转染组细胞内NALP6mRNA表达下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),经慢病毒感染干扰NALP6基因能够降低痛风性关节炎成纤维样滑膜细胞中NALP6mRNA的表达。见表8。

表8 各组滑膜细胞NALP6mRNA表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	NALP6mRNA
空白组( $n=3$ )	1.00 ± 0.05
模型组( $n=3$ )	3.41 ± 0.02*
模型空转染组( $n=3$ )	3.47 ± 0.01
模型NALP6转染组( $n=3$ )	0.84 ± 0.02 $\Delta$

注:与空白组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型对照组比较, $\Delta P < 0.05$

## 3 讨论

GA是一种自身炎症性疾病<sup>[1]</sup>,其发病机制非常复杂,细胞外的尿酸浓度过饱和形成微晶尿酸钠(MSU)晶体,刺激一系列细胞因子、趋化因子的释放,进而引起了关节的疼痛、肿胀、痛风石形成等炎症反应<sup>[2]</sup>。因而MSU晶体是痛风发病机制中的启动因素。虽然MSU晶体在痛风的发病机制中其作用已经阐明,但在滑膜细胞内MSU作为一个危险信号如何与免疫系统相互作用有待进一步研究。本实

验属于导师国家自然科学基金项目课题中的一部分研究<sup>[3-7]</sup>,本课题组前期在 miR 芯片筛选实验已经证实了 NALP6 参与了 GA 的发病过程,但其机制尚不明确,这也是本实验研究的重点内容。

痛风性关节炎发病机制以 IL-1 $\beta$  级联的炎症反应为特征<sup>[8]</sup>。大鼠滑膜细胞慢病毒转染实验显示,MSU 刺激的 GA 滑膜细胞内 NALP6 表达上调,炎症反应递质 caspase-1 活性,IL-1 $\beta$  含量以及核因子- $\kappa$ B 表达均显著增高,与 NALP6 表达正相关,提示 NALP6 参与了痛风性关节炎的发生。通过转染沉默 NALP6 蛋白表达的慢病毒感染过程,能明显降低 caspase-1 活性、IL-1 $\beta$  含量以及核因子- $\kappa$ B 表达,提示 NALP6 可以正调控炎症反应递质 caspase-1、IL-1 $\beta$  等。因此推测 NALP6 对 caspase-1 及核因子- $\kappa$ B 有正调控作用。

痛风性关节炎的大鼠体外研究表明,尿酸钠盐被滑膜表面或胞内的模式识别受体(Pattern Recognition Receptor, PRR)识别,诱导 NALP6 形成炎症复合体<sup>[9-10]</sup>,从而活化 caspase-1,剪切 pro-IL-1 $\beta$ ,产生成熟的 IL-1 $\beta$ ,IL-1 $\beta$  活化 IL-1R<sup>[11-15]</sup>,激活核因子- $\kappa$ B。上述一系列反应释放大量细胞因子、趋化因子等引发痛风性关节炎的炎症反应。组织表现为局部充血、水肿、大量炎症反应细胞浸润、纤维素渗出,同时沉积部位出现组织凝固性坏死,结缔组织细胞间质纤维变性。我们借助慢病毒转染技术证实,沉默 NALP6 表达能降低 NALP6 炎症反应体激活的能力,影响 caspase-1 的生成,降低某些炎症反应递质(IL-1 $\beta$  和 IL-18)产生,从而抑制痛风性关节炎的发生。

综上所述,NALP6 蛋白信号转导通路在 GA 中起重要作用,对 NALP6 的表达进行抑制,可明显抑制 caspase-1 的活性和 IL-1 $\beta$  的含量,可为临床防治 GA 提供新靶点。

#### 参考文献

[1]汪学良,刘念,秦天楠,等. 痛风研究现状及展望[J]. 风湿病与关节炎,2018,7(6):68-70,80.

- [2]周蜜,王一飞,袁佳沁,等. 急性痛风性关节炎免疫学发病机制研究进展[J]. 世界临床药物,2018,39(11):779-782.
- [3]姜德友,李文昊,解颖,等. 补肾利湿法对急性痛风性关节炎大鼠血清 IL-17 表达水平的影响[J]. 世界中医药,2015,10(10):1574-1577.
- [4]姜德友,邹丽,隋方宇,等. 补肾利湿法对急性痛风性关节炎大鼠血清 MMP-7 影响的实验研究[J]. 吉林中医药,2015,35(12):1264-1267.
- [5]姜德友,曲晓雪,陈飞,等. 补肾利湿法对痛风性关节炎大鼠超氧化物歧化酶表达的影响[J]. 湖北中医药大学学报,2016,18(1):11-14.
- [6]隋方宇,韩洁茹,周雪明,等. 补肾利湿法中药复方对大鼠痛风性关节炎 NALP6 信号传导通路调控作用的研究[J]. 上海中医药杂志,2019,53(2):81-85.
- [7]姜德友,冯涛,陈飞,等. 补肾利湿法对大鼠痛风性关节炎 MMP3、Caspase-5 表达的影响[J]. 陕西中医,2016,37(6):752-753.
- [8]Torres R, Macdonald L, Croll SD, et al. Hyperalgesia, synovitis and multiple biomarkers of inflammation are suppressed by interleukin 1 inhibition in a novel animal model of gouty arthritis[J]. Ann Rheum Dis,2009,68(10):1602-1608.
- [9]Grenier JM, Wang L, Manji GA, et al. Functional screening of five PYPAF family members identifies PYPAF5 as a novel regulator of NF-kappaB and caspase-1[J]. FEBS Lett,2002,530(1-3):73-78.
- [10]Wang L, Manji GA, Grenier JM, et al. PYPAF7, a novel PYRIN-containing Apaf1-like protein that regulates activation of NF-kappa B and caspase-1-dependent cytokine processing[J]. J Biol Chem,2002,277(33):29874-29880.
- [11]Kanneganti TD. Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection[J]. Nat Rev Immunol,2010,10(10):688-698.
- [12]Van Gorp H, Kuchmiy A, Van Hauwermeiren F, et al. NOD-like receptors interfacing the immune and reproductive systems[J]. FEBS J,2014,281(20):4568-4582.
- [13]Kanneganti TD, Ozören N, Body-Malapel M, et al. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3[J]. Nature,2006,440(7081):233-236.
- [14]Anand PK, Malireddi RK, Kanneganti TD. Role of the nlrp3 inflammasome in microbial infection[J]. Front Microbiol,2011,2:12.
- [15]Lupfer C, Thomas PG, Anand PK, et al. Receptor interacting protein kinase 2-mediated mitophagy regulates inflammasome activation during virus infection[J]. Nat Immunol,2013,14(5):480-488.

(2018-07-04 收稿 责任编辑:杨觉雄)