

MeCP2 促进山姜素对鼠巨噬细胞炎症因子表达的抑制及其分子机制

胡柯^{1*}, 钱红^{1*}, 刘理静¹, 李玉娟¹, 金玲¹, 陈立军¹, 谭碧峰², 尹辉明³

(1. 湖南医药学院医学院, 怀化 418000; 2. 湖南医药学院第一附属医院 心血管科, 怀化 418000; 3. 湖南医药学院第一附属医院 呼吸科, 怀化 418000)

摘要: 通过分析甲基 CpG 结合蛋白 2(methyl CpG binding protein 2, MeCP2)对山姜素作用下鼠巨噬细胞(RAW246.7)合成 IL-6 和 TNF- α 的影响及作用机制, 揭示山姜素与 MeCP2 联合应用对于炎症性疾病的干预潜力。用重组质粒 pEGFP-C1-MeCP2 以及空白质粒 pGL-basic 分别转染 RAW246.7, 后将细胞随机分为对照组、山姜素组(终浓度 1 mg/mL)以及山姜素 + GW9662(0.1 mmol/L)组。孵育 72 h 后, ELISA 检测培养液中 IL-6 和 TNF- α 表达水平, Western blotting 分别检测细胞核内过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferators-activated receptor, PPAR)、MeCP2 以及胞质中 NLRP3、pro-Caspase-1 和各聚集状态凋亡相关微粒蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC)含量, 并采用免疫荧光染色法检测 ASC 斑点形成情况。结果显示, 与空白质粒转染比较, 重组质粒转染 RAW246.7 在山姜素作用下合成 IL-6 和 TNF- α 的水平更低; 而在对照组以及 GW9662 组, 转染重组质粒对炎症因子合成无明显影响。山姜素对 MeCP2 表达无促进作用, 且重组质粒转染对 PPAR 表达亦无影响。另外, 山姜素可明显抑制 RAW246.7 胞质 NLRP3 合成, 但对 pro-Caspase-1 含量以及 ASC 聚集状态无显著影响; 而过表达 MeCP2 可遏制 pro-Caspase-1 合成并促进 ASC 解聚。由此, MeCP2 可通过抑制炎症小体通路以促进山姜素对鼠巨噬细胞炎症因子合成的抑制, 提示山姜素与 MeCP2 联合有望成为炎症性疾病防治的新策略。

关键词: 山姜素; 甲基 CpG 结合蛋白 2; 炎症因子; 炎症小体通路

中图分类号: R392.12

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2019)04-0271-06

临床上全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)并不鲜见, 肺是主要的受累器官。过去临床常使用激素干预急性肺损伤(acute lung injury, ALI), 虽然有一定效果, 但长期应用副作用较大。因此, 寻求具有抑炎作用且毒副作用小的药物已成为当务之急, 这使得黄酮类天然化合物受到重视。由于具有过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferators-activated receptor, PPAR)激动活性, 多数黄酮类物质可通过激动该受体以遏制炎症介质合成, 山姜素就是其中的典型代表。课题组前期实验证实山姜素激动 PPAR 后, 除直接抑制炎症通路家族 NF- κ B 以及 MAPK 成员合成^[1], 还可能诱导 DNA 碱基或组蛋白发生甲基化以及去乙酰化修饰, 以上均与炎症分子遏制有关^[2-4]。作为炎症因子表达调控的

重要分子, 甲基 CpG 结合蛋白 2(methyl CpG binding protein 2, MeCP2)亦有可能参与了 PPAR 激动后的炎症调节过程。基于以上设想, 本研究构建了 MeCP2 过表达鼠巨噬细胞模型, 并检测了该细胞在山姜素作用下 IL-6 以及 TNF- α 的合成水平。通过进一步对 RAW246.7 胞质中炎症小体通路分子表达水平的检测, 部分揭示了 MeCP2 促进山姜素抑炎的作用机制, 为炎症性疾病的干预提供了新策略。

1 材料与方法

1.1 材料 纯山姜素提取物(分子式: $C_{16}H_{14}O_4$)购自南京泽朗生物科技有限公司; RAW246.7 购自南京华奥生物医药技术有限公司; 重组 pEGFP-C1-MeCP2 以及 pGL-basic 质粒由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; RPMI 1640 培养液、GW9662(PPAR 拮抗剂, 分子式: $C_{13}H_9CN_2O_3$)、PCR 缓冲液、dNTP、DNA marker 以及 Lipofectamine 2000 购自上海生物工程公司; PPAR、MeCP2、NLRP3、pro-Caspase-1、凋亡相关微粒蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC)单体以及二聚单克隆抗体均购自博

收稿日期: 2018-09-12

基金项目: 湖南省教育厅科研项目(17C1144); 湖南省自然科学基金(2019JJ50420)

作者简介: 胡柯(1983—), 男, 博士, 讲师, 主要从事炎症性疾病的发病与防治研究; 钱红(1977—), 女, 硕士, 副教授, 主要从事炎症与心脑血管病相关研究; * 为共同第一作者

通信作者: 尹辉明(E-mail: yinhuiming321@163.com)

大泰克生物基因技术有限责任公司; IL-6、TNF- α ELISA 试剂盒购自北京环亚泰克生物医学技术有限公司。

1.2 细胞转染以及分组 将 RAW246.7 贴壁生长于 RPMI 1640 培养液, 待细胞铺底率达约 80% 时, 将 2 μ g 重组质粒和 Lipofectamine 2000 4 μ L 溶于培养液, 两者充分混匀后, 将质粒脂质体混合物加入细胞。24 h 后, 荧光显微镜下证实 90% 以上重组质粒转染细胞均可表达绿色荧光; 转染后 48 h MTT 检测证实细胞平均活力为 92%。后将细胞以 10^6 个/孔接种于培养板, 按照不同转染以及孵育条件, 分为: (1) pGL-basic+山姜素组(山姜素终浓度 1 mg/mL, 以下同); (2) pEGFP-C1-MeCP2+山姜素组; (3) pGL-basic+山姜素+GW9662 组(GW9662 终浓度为 0.1 mmol/L, 以下同); (4) pEGFP-C1-MeCP2+山姜素+GW9662 组; (5) pGL-basic 组(加入等体积 PBS 使终体积同前, 以下同); (6) 重组质粒 pEGFP-C1-MeCP2 组。设置完成后继续将 RAW246.7 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中孵育 72 h, 离心后分别收集细胞以及培养液。

1.3 RAW246.7 分泌 IL-6 以及 TNF- α 水平测定 ELISA 检测培养液中 IL-6 以及 TNF- α 质量浓度。在酶标包被板上设置标准品孔、待测样本孔和空白对照孔, 分别加入标准以及待测样本各 10 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。加入酶标工作液, 洗板 3 次, 分别加入显色剂, 37 $^{\circ}$ C 避光显色 15 min, 加入终止液。采用酶标仪测定 D(490 nm), 根据标准曲线求得各待测孔的质量浓度。

1.4 Western blotting 检测 MeCP2、PPAR、NLRP3、pro-Caspase-1 以及各聚集态 ASC 含量 根据《分子克隆实验指南》, 分别提取胞核以及胞质蛋白(细

胞数量为 10^6 个), SDS-PAGE 转膜, 脱脂奶粉溶液封闭 24 h。加入标记的兔抗鼠 MeCP2、PPAR、NLRP3、pro-Caspase-1 以及各聚集态 ASC 一抗, 室温作用 2 h, TBST 清洗 3 次; 加入羊抗兔 IgG-HRP 孵育, TBST 清洗 3 次; ECL 显影, Alpha-Ease FC Version 4 软件分析结果, 以目的蛋白/内参蛋白的灰度比值表示目的蛋白的表达水平。

1.5 RAW246.7 胞质内各聚集状态 ASC 相对含量的检测 2 种评估方法为(1) Western blotting 检测 RAW246.7 胞质内各聚集态 ASC 相对含量(步骤同 1.4); (2) 免疫荧光染色法检测 ASC 斑点: 采用兔抗鼠二聚 ASC 抗体, 按照 ASC 斑点检测试剂盒说明书步骤操作, 封片后于激光共聚焦显微镜(发射光波长 488 nm)下观察结果。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件包分析, 定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 两两比较采用最小显著差异法(LSD)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达 MeCP2 促进山姜素对炎症因子合成的抑制 各组 IL-6 与 TNF- α 浓度的变化趋势基本一致, 即相较对照组, 山姜素明显遏制 RAW246.7 合成 IL-6 和 TNF- α ($P < 0.05$), 且上述作用可被 GW9662 阻断。相较空白质粒转染, 山姜素更明显抑制转染重组质粒的 RAW246.7 合成 IL-6 和 TNF- α ($P < 0.05$); 而对照组以及 GW9662 组的炎症因子生成水平与转染质粒种类无关。上述结果表明, PPAR 激动是山姜素遏制炎症因子表达的前提, 否则过表达 MeCP2 对 RAW246.7 炎症因子合成无显著影响。(图 1)

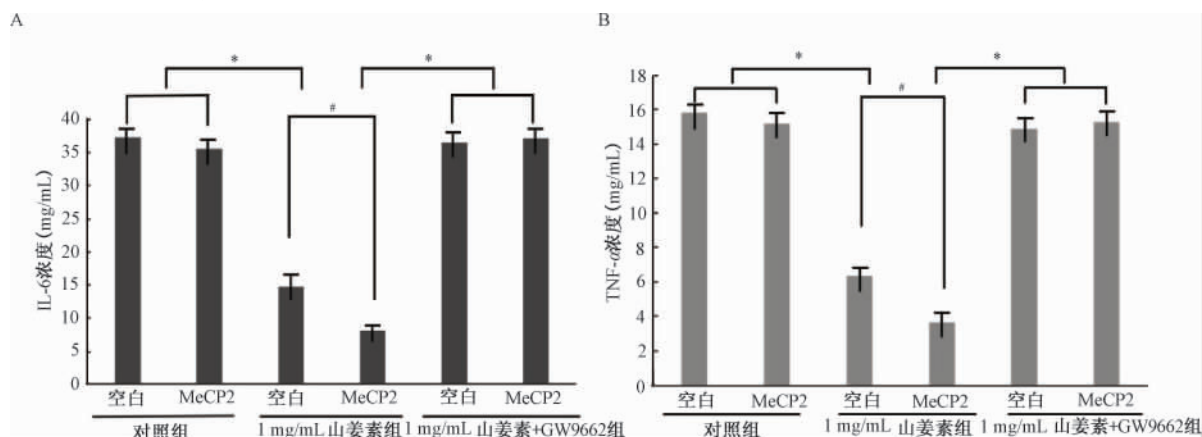


图 1 过表达 MeCP2 促进山姜素对 RAW246.7 IL-6 和 TNF- α 合成的抑制

注: A. IL-6 在山姜素及 MeCP2 作用下的表达情况; B. TNF- α 在山姜素及 MeCP2 作用下的表达情况。空白代表 pGL-basic 转染, MeCP2 代表重组质粒转染。与对照组及 GW9662 组相比, * $P < 0.05$; 与过表达 MeCP2 组相比, # $P < 0.05$

2.2 山姜素以及重组质粒转染对 RAW246.7 核内 PPAR 和 MeCP2 含量的影响 山姜素可促进 RAW246.7 核内 PPAR 表达($P < 0.05$), 而过表达 MeCP2 并不影响 PPAR 表达; RAW246.7 核内 MeCP2 表达仅与转染质粒的种类有关($P < 0.05$), 而与 PPAR 是否被激动无关。以上结果表明, PPAR 以及 MeCP2 两者在核内表达互不影响, MeCP2 并非通过促进 PPAR 合成以提高山姜素的抑炎效果。(图 2)

2.3 山姜素以及重组质粒转染对 RAW246.7 胞质内 NLRP3、pro-Caspase-1 含量的影响 山姜素明显抑制胞质内 NLRP3 表达($P < 0.05$), 但不影响 pro-Caspase-1 表达; 而过表达 MeCP2 可抑制 pro-Caspase-1 表达($P < 0.05$), 但未对 NLRP3 含量造成影响。以上结果提示, 山姜素引起的 PPAR 激动与 MeCP2 对炎症小体不同成分的抑制作用是相互独立的事件。(图 3)

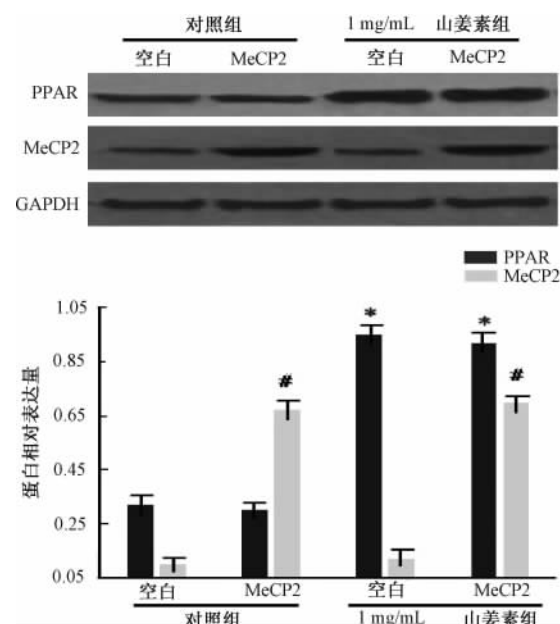


图 2 各组 RAW246.7 核内 PPAR 以及 MeCP2 的相对含量
注: 空白代表空白质粒转染, MeCP2 代表重组质粒转染。与未使用山姜素组相比, $* P < 0.05$; 无论是否使用山姜素, 重组质粒与空白质粒转染相比, $\# P < 0.05$

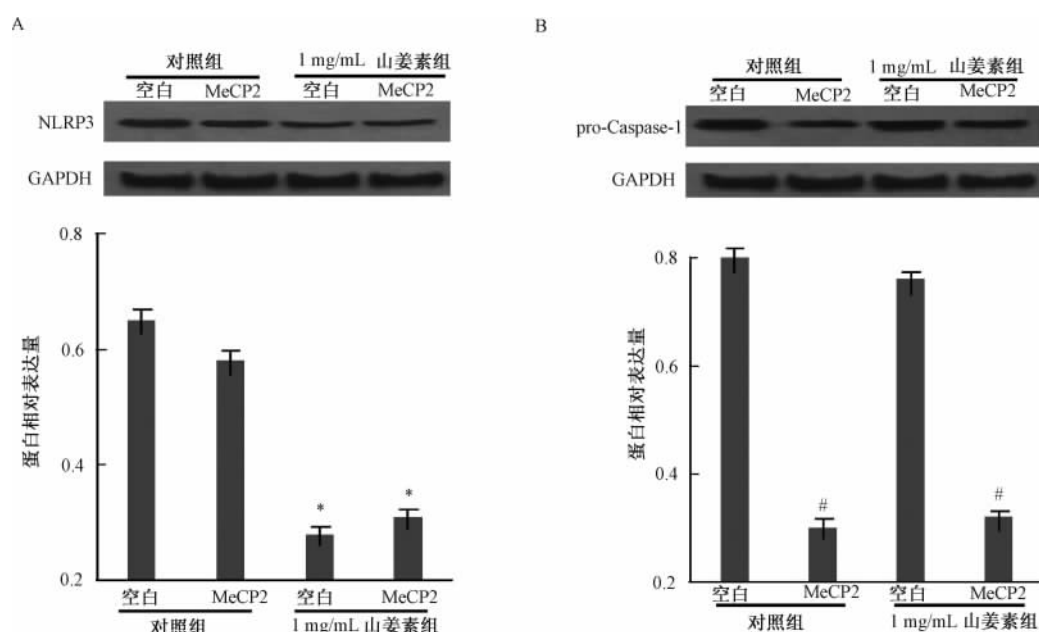


图 3 各组 RAW246.7 胞质中 NLRP3 以及 pro-Caspase-1 的相对含量

注: A. 山姜素及 MeCP2 作用下 NLRP3 的表达情况; B. 山姜素及 MeCP2 作用下 pro-Caspase-1 的表达情况。空白代表空白质粒转染, MeCP2 代表重组质粒转染。与未使用山姜素组相比, $* P < 0.05$; 无论是否使用山姜素, 重组质粒与空白质粒转染相比, $\# P < 0.05$

2.4 山姜素以及重组质粒转染对 RAW246.7 胞质内 ASC 聚集的影响 过表达 MeCP2 可明显促进胞质内 ASC 解聚, 即二聚体 ASC 含量下降, 而 ASC 单体含量增加($P < 0.05$); 而单独使用山姜

素对 ASC 聚集未产生显著影响(图 4A)。与 Western blotting 检测结果一致, MeCP2 过表达可明显抑制 RAW246.7 胞质内 ASC 斑点形成, 而单独使用山姜素对 ASC 斑点数量无显著影响(图 4B)。

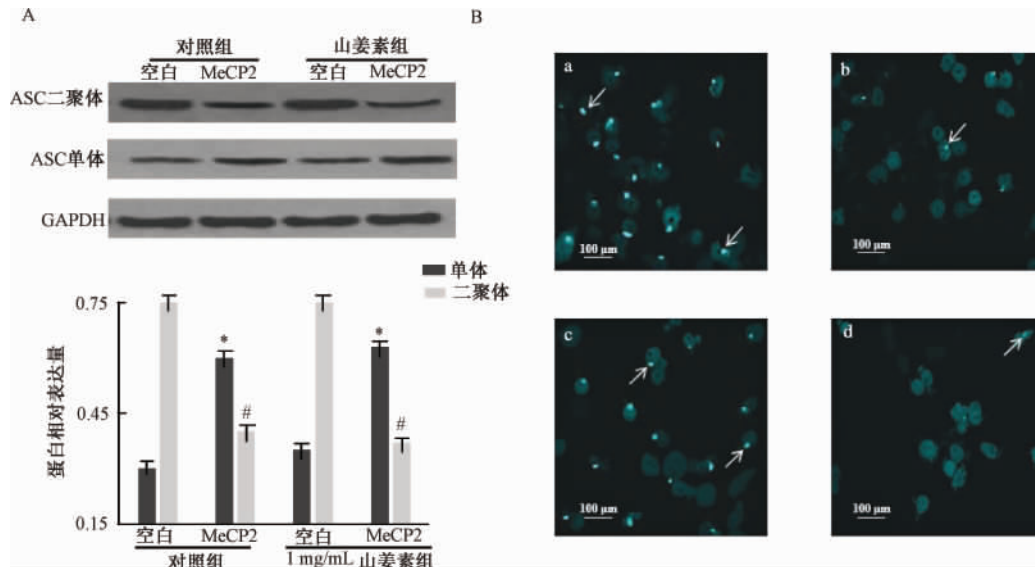


图4 山姜素以及重组质粒转染对 RAW246.7 胞质内 ASC 聚集的影响

注: A. Western blotting 对 ASC 二聚体以及单体的相对含量检测结果; B. 免疫荧光染色显示 ASC 斑点形成数量。其中空白代表空白质粒转染, MeCP2 代表重组质粒转染。重组质粒与空白质粒转染的单体含量相比, * $P < 0.05$; 重组质粒与空白质粒转染的二聚体含量相比, # $P < 0.05$, 以上均不受山姜素作用的干扰。图 B 箭头所指绿色亮点即为 ASC 斑点。a. 对照组; b. 重组质粒转染组; c. 1 mg/mL 山姜素与空白质粒转染共同处理组; d. 1 mg/mL 山姜素与重组质粒转染共同处理组

3 讨论

ALI 以其较高的致残以及致死率严重威胁着人类健康。过去临床激素和免疫抑制剂的应用曾取得一定效果, 但其副作用也不容忽视, 因此开发新型治疗药物一直是研究热点。解放前居住在湘黔渝边境的侗族人常使用血藤果提取物治疗“肿疡”, 后经证实有效成分为黄酮(2-苯基色原酮)类^[5], 可通过激动 PPAR 以抑制炎症介质表达。其中代表物质山姜素可在 ALI 以及 UC 等炎症性疾病动物模型中产生明显的干预作用^[6-7]。本研究前期工作亦证实了山姜素激动 PPAR 后可能通过多种分子机制发挥抑炎作用, 对炎症性疾病的应用前景非常广阔。

随着对炎症反应调控机制研究的不断深入, MeCP2 已逐渐引起了学术界的重视。目前已证实, MeCP2 主要通过其自身 4 个甲基结合域 (methyl-CpG-binding domain, MBD) 与特异的甲基化 DNA 结合, 通常情况下对下游基因转录起抑制作用^[8]。早在上世纪中叶, MeCP2 突变就被证实与 Rett 综合征有关, 此类患者体内多存在淋巴细胞比例 (Th1/Th2/Treg) 失调以及过度炎症反应^[9]。此外, MeCP2^{-/-}巨噬细胞在 LPS 作用下, 其炎症基因启动子部位更易结合转录因子 p65, 导致基因过度表达^[10]。动物模型亦证实, MeCP2 突

变鼠的肺泡更易出现炎症细胞渗出以及炎症损伤, 同时伴有呼吸功能下降^[11]。综上, MeCP2 功能的正常发挥有助于机体维持炎症稳态。

生物体内炎症的发生与维持是一复杂的生物学过程, 需要一系列信号通路分子的积极配合。近期研究表明, 由 NLRP3、ASC 以及 Caspase-1 组成的炎症小体通路是体内炎症活化的关键, 主导了多数炎症性疾病的进展^[12]。作为首站接头分子, NLRP3 可以感应多种病原微生物成分及其他“危险信号”, 通过 PYD 结构域招募并活化接头蛋白 ASC, 此时 ASC 往往发生聚集, 其中二聚体又称为 ASC 斑点, 于荧光显微镜下每个细胞胞质中可发现 1 到数个。此斑点将通过不同结构域连接 NLRP3 以及 pro-Caspase-1, 并促进后者转化为 Caspase-1, 从而为 IL-1 β 以及 IL-6 等炎症因子前体的加工创造条件^[13]。因此, ASC 斑点形成是炎症小体通路发挥作用的关键, 譬如二芳基磺酰脲可通过抑制 NLRP3 并阻遏 ASC 斑点形成显著抑制 IL-1 β 合成^[14]。另有研究证实, 多种黄酮类药物均可通过抑制炎症小体通路中 NLRP3 的活性而参与炎症抑制^[15]。综合以上研究结果, MeCP2 亦有可能作用于炎症小体通路, 从而参与炎症活化的抑制。为验证以上假设, 本研究首先通过重组质粒感染 RAW246.7 从而获得高表达 MeCP2 的鼠巨噬细胞模型。课题组发现在山姜素干预下, 高表达

MeCP2 的 RAW246.7 炎症因子合成受抑制程度更加显著;而无山姜素作用时,高表达 MeCP2 对 RAW246.7 炎症因子合成无明显影响。进一步研究还证实山姜素对 MeCP2 表达无促进作用,且过表达 MeCP2 对 PPAR 表达也无直接影响。可以看出,激动 PPAR 是山姜素遏制炎症因子表达的重要基础,但 MeCP2 促进山姜素抑炎的作用机制并不涉及对 PPAR 合成的诱导。为揭示 MeCP2 促进山姜素抑炎的分子机制,研究分别对山姜素以及重组质粒转染条件下 RAW246.7 胞质炎症小体通路分子的表达进行检测,证实山姜素可抑制胞质 NLRP3 合成,但对 pro-Caspase-1 含量以及 ASC 聚集无显著影响;而过表达 MeCP2 则可进一步促进 ASC 解聚并干预 pro-Caspase-1 合成,但不参与 NLRP3 合成的抑制。综上推断,当面对外界干预时,炎症小体通路不同成分的改变趋势并不一致:激动 PPAR 直接抑制 NLRP3 活性,同时为 ASC 的解聚打下基础;而 MeCP2 很可能通过促进 ASC 解聚并干扰 pro-Caspase-1 合成以起到进一步的抑炎效应。因此,联合山姜素以及 MeCP2 有望对胞质炎症小体通路发挥进一步抑制,这是单独使用山姜素或过表达 MeCP2 所不能实现的。至于 MeCP2 具体通过何种分子机制促进胞质内 ASC 解聚并遏制 pro-Caspase-1 合成,尚需进一步研究。鉴于一般情况下细胞内 MeCP2 含量很低,加之过表达 MeCP2 促进山姜素抑炎的作用已被证实,提示侗药血藤果提取物以及 MeCP2 过表达策略联合很可能为炎症性肺损伤等相关炎症性疾病干预提供新策略。

参考文献

- [1] Hu K, Yang Y, Tu QY, *et al.* Alpinetin inhibits LPS-induced inflammatory mediator response by activating PPAR- γ in THP-1-derived macrophages[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 721(1-3): 96-102.
- [2] 胡柯,刘理静,徐国耀,等. 山姜素诱导组蛋白去乙酰化并调控炎症基因表达的实验研究[J]. *免疫学杂志*, 2016, 32(11): 1005-1008.
- [3] 胡柯,段于峰,黄民江,等. 山姜素促进 H3K9 去乙酰化并抑制鼠巨噬细胞 IL-6 分泌的分子机制[J]. *免疫学杂志*, 2017, 33(6): 461-468.
- [4] 胡柯,刘理静,钱红,等. 山姜素促进过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)与甲基转移酶结合[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2017, 33(12): 1610-1614.
- [5] 肖聪颖,汪治,郑钦方,等. 侗药血藤果化学成分预实验[J]. *中国民族医药杂志*, 2016, 2(2): 40-42.
- [6] Liang XS, Zhang B, Chen Q, *et al.* The mechanism underlying alpinetin-mediated alleviation of pancreatitis-associated lung injury through upregulating aquaporin-1[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2016, 10: 841-850.
- [7] He XE, Wei ZK, Wang JJ, *et al.* Alpinetin attenuates inflammatory responses by suppressing TLR4 and NLRP3 signaling pathways in DSS-induced acute colitis[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 28370.
- [8] Meehan RR, Lewis JD, Bird AP. Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20(19): 5085-5092.
- [9] Cortelazzo A, De Felice C, De Filippis BA, *et al.* Persistent unresolved inflammation in the Mecp2-308 female mutated mouse model of Rett syndrome[J]. *Mediators Inflamm*, 2017: 9467819.
- [10] Odriscoll CM, Lima MP, Kaufmann WE. Methyl CpG binding protein 2 deficiency enhances expression of inflammatory cytokines by sustaining NF- κ B signaling in myeloid derived cells[J]. *J Neuroimmunol*, 2015, 283: 23-29.
- [11] Kida H, Takahashi T, Nakamura Y, *et al.* Pathogenesis of lethal aspiration pneumonia in Mecp2-null mouse model for Rett syndrome[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 12032.
- [12] Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS, *et al.* The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(26): 9035-9040.
- [13] Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes and their roles in health and disease[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2012, 28(10): 137-161.
- [14] Coll RC, Robertson AA, Chae JJ, *et al.* A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases[J]. *Nat Med*, 2015, 21(3): 248-255.
- [15] Hyun L, Dong SM, Haeil P, *et al.* Flavonoids interfere with NLRP3 inflammasome activation[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2018, 355: 93-102.

MeCP2 promotes the inhibitory effect on inflammatory factors synthesis in RAW246.7 caused by alpinetin and its molecular mechanism

HU Ke^{1*}, QIAN Hong^{1*}, LIU Li-jing¹, LI Yu-xian¹, JIN Ling¹, CHEN Li-jun¹, TAN Bi-feng², YIN Hui-ming³ (1. *Medical College of Hunan University of Medicine, Huaihua 418000, China*; 2. *Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital, Hunan University of Medicine, Huaihua 418000, China*; 3. *Respiratory Department, The First Affiliated Hospital, Hunan University of Medicine, Huaihua 418000, China*)

Abstract: In order to reveal the potential of combination of alpinetin and MeCP2 (methyl CpG binding protein 2) in intervention of inflammatory diseases, we examined the effect of MeCP2 on synthesis of IL-6 and TNF- α in RAW246.7 cells co-incubated with alpinetin and explored the underlying mechanism. First, RAW246.7 cells were transfected respectively by pEGFP-C1-MeCP2 (recombinant) or pGL-basic(blank) plasmid, then were randomly divided into control, alpinetin (1 mg/mL) and alpinetin+GW9662 groups (0.1 mmol/L). After cultivation for 72 h, concentrations of IL-6 and TNF- α in the media were evaluated by ELISA, while content of PPAR and MeCP2 in nucleus as well as NLRP3, pro-Caspase-1 and ASC aggregation state in cytoplasm were tested by Western blotting. Meanwhile, immunofluorescence staining was applied to detect the formation of ASC speck. The data showed that, compared with blank plasmid transfection, recombinant plasmid group showed the decrease in synthesis of inflammatory cytokines when co-incubated with alpinetin. However, synthesis of inflammatory cytokines showed no significant difference between recombinant and blank plasmid transfection group in control and GW9662 groups. Alpinetin showed no obvious effect on expression of MeCP2; while transfection of recombinant plasmid caused no impact on content of PPAR. In addition, alpinetin significantly inhibited NLRP3 synthesis in cytoplasm, but had no significant effect on content of pro-Caspase-1 or ASC aggregation state; however, synthesis of pro-Caspase-1 would be blocked and ASC depolymerization would be enhanced after MeCP2 overexpression. In conclusion, MeCP2 could promote the inhibitory effect of alpinetin on synthesis of inflammatory cytokines in rat macrophages via inflammatory corpuscle pathway, which indicates that alpinetin combined with MeCP2 might be a new strategy for treatment of inflammatory diseases.

Key words: alpinetin; methyl CpG binding protein 2; inflammatory factor; inflammatory corpuscle pathway