

## 研究论文

## 晚期糖基化白蛋白通过上调核苷酸结合寡聚结构域样受体蛋白3诱导巨噬细胞焦亡

张昭强<sup>1, #</sup>, 杨一帆<sup>2, #</sup>, 闫京锐<sup>1</sup>, 于飞<sup>1</sup>, 王晓旭<sup>1</sup>, 王志超<sup>3</sup>, 田华<sup>4</sup>, 姚树桐<sup>1, \*</sup>山东第一医科大学(山东省医学科学院)<sup>1</sup>基础医学院; <sup>2</sup>药学院; <sup>3</sup>护理学院; <sup>4</sup>动脉粥样硬化研究所, 泰安 271000

**摘要:** 本研究旨在探讨晚期糖基化白蛋白(advanced glycated albumin, AGE-alb)对巨噬细胞核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3)-caspase-1途径的影响, 以阐明AGE-alb对巨噬细胞焦亡的影响及机制。体外培养RAW264.7巨噬细胞, 分别给予AGE-alb (1、2、4和6 g/L)、对照白蛋白(C-alb, 4 g/L)处理24 h或以NLRP3抑制剂MCC950 (1 μmol/L)预处理细胞, 1 h后以AGE-alb (4 g/L)处理24 h。MTT法检测细胞活力, 试剂盒测定caspase-1和培养基乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性以及白细胞介素-1β (interleukin-1β, IL-1β)、IL-18浓度, TUNEL法和Hoechst 33342/PI双染法检测细胞死亡情况, Western blot分析NLRP3、procaspase-1和cleaved caspase-1表达变化。结果显示: AGE-alb显著诱导RAW264.7巨噬细胞损伤, 表现为细胞活力降低, LDH漏出、TUNEL阳性和PI阳性细胞率显著增加, 且呈浓度依赖性, 并可促进IL-1β和IL-18分泌。AGE-alb显著上调NLRP3表达和caspase-1活性, 尤其在4和6 g/L浓度时更为明显。然而, MCC950预处理可抑制AGE-alb所诱导的RAW264.7巨噬细胞活力降低、LDH漏出、TUNEL阳性和PI阳性细胞率增加以及IL-1β和IL-18分泌, 并可抑制AGE-alb所致的caspase-1活化。以上结果表明, AGE-alb可诱导RAW264.7巨噬细胞焦亡, 其机制至少部分是通过激活NLRP3-caspase-1信号途径实现的。

**关键词:** 晚期糖基化白蛋白; 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3; caspase-1; 巨噬细胞; 焦亡

**中图分类号:** R332; R363.2; R329.2

## Advanced glycated albumin induces macrophage pyroptosis via upregulating nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3

ZHANG Zhao-Qiang<sup>1, #</sup>, YANG Yi-Fan<sup>2, #</sup>, YAN Jing-Rui<sup>1</sup>, YU Fei<sup>1</sup>, WANG Xiao-Xu<sup>1</sup>, WANG Zhi-Chao<sup>3</sup>, TIAN Hua<sup>4</sup>, YAO Shu-Tong<sup>1, \*</sup><sup>1</sup>College of Basic Medical Sciences; <sup>2</sup>College of Pharmacy; <sup>3</sup>College of Nursing; <sup>4</sup>Institute of Atherosclerosis, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Taian 271000, China

**Abstract:** The purpose of the present study was to investigate the effect of advanced glycated albumin (AGE-alb) on pyroptosis of macrophages and the underlying molecular mechanisms. RAW264.7 macrophages were treated with AGE-alb (1, 2, 4 and 6 g/L) and control albumin (C-alb, 4 g/L) for 24 h, or preincubated with MCC950 (1 μmol/L) for 1 h and then treated with AGE-alb (4 g/L) for 24 h. Cell viability and caspase-1 activity were measured by MTT and assay kits, respectively. Lactate dehydrogenase (LDH) activity and the levels of interleukin-1β (IL-1β) and IL-18 in media were detected. Cell death degree was evaluated by TUNEL and Hoechst 33342/PI staining. The protein levels of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3), procaspase-1 and cleaved caspase-1 were assessed by Western blot. The results showed that AGE-alb treatment caused obvious decrease in cell viability and increases in LDH leakage and the percentages of TUNEL- or PI-positive cells in a concentration-dependent manner.

Received 2019-05-14 Accepted 2019-09-18

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81570410, 81800394) and the Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program of Shandong Province, China (No. S201910439106).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: +86-538-6225010; E-mail: yst228@126.com

Additionally, AGE-alb promoted IL-1 $\beta$  and IL-18 secretion, upregulated NLRP3 expression, and increased caspase-1 activity especially at the dose of 4 and 6 g/L. However, MCC950 (an NLRP3 inhibitor) pretreatment inhibited significantly the decrease in cell viability and the increases in LDH leakage and percentages of TUNEL- or PI-positive cells induced by AGE-alb. Furthermore, MCC950 attenuated obviously AGE-alb-induced IL-1 $\beta$  and IL-18 secretion and caspase-1 activation. These results indicate that AGE-alb may induce macrophage pyroptosis, and the mechanism is at least partially by activating NLRP3-caspase-1 pathway.

**Key words:** advanced glycated albumin; nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3; caspase-1; macrophage; pyroptosis

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 作为一种血管壁的慢性炎症性病理过程, 是心脑血管疾病的重要病理基础, 严重危害人类健康, 而糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 患者 AS 的发生率显著高于非 DM 患者, 并且发病早、病情重、进展快, 成为 DM 患者的主要死因, 其中一个重要的致病因素与 DM 患者体内晚期糖基化终产物 (advanced glycation end products, AGE) 水平异常升高有关, AGE 是血液中的蛋白质和脂质长期与高水平的糖经非酶促反应形成的糖基化修饰产物<sup>[1]</sup>。晚期糖基化白蛋白 (advanced glycated albumin, AGE-alb) 作为 AGE 的主要代表, 可激活氧化应激反应、触发炎症反应、诱导血管平滑肌细胞增殖和巨噬细胞脂质积聚及凋亡, 在 DM 患者 AS 的发生和进展中具有重要作用<sup>[2-5]</sup>。巨噬细胞死亡、促炎介质大量释放是造成 AS 斑块破裂, 进而导致急性心脑血管事件的重要机制。细胞焦亡是近年来证实的一种介于坏死和凋亡之间、伴有炎症反应并依赖于天冬半胱氨酸酶 -1 (caspase-1) 的新型程序性细胞死亡形式, 其特征就在于快速的质膜破裂, 随之释放细胞内容物和白细胞介素 -1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、IL-18 等促炎介质<sup>[6]</sup>。文献报道, 介导细胞焦亡的关键信号分子核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 炎性小体、caspase-1 等在急性冠状动脉综合征患者冠状动脉粥样斑块和 DM 患者颈动脉不稳定粥样斑块及巨噬源性泡沫细胞中高表达<sup>[7, 8]</sup>。AS 独立危险因素氧化低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 和广泛存在于粥样斑块中的胆固醇晶体可激活巨噬细胞 NLRP3 炎性小体, 活化 caspase-1, 促进 IL-1 $\beta$  和 IL-18 分泌, 而敲除 NLRP3 基因则明显缩小小鼠 AS 面积<sup>[9-11]</sup>, 表明巨噬细胞焦亡在 AS 发生和发展中具有重要作用。但是 AGE-alb 能否诱导巨噬细胞焦亡, 其机制如何? 国内外尚未见报道。本工作以 AGE-alb 处理 RAW264.7 巨噬细胞, 研究细胞焦亡

情况及其与 NLRP3-caspase-1 信号途径之间的关系, 以进一步阐明 AGE-alb 在 AS 发展过程中的作用及机制。

## 1 材料和方法

**1.1 主要试剂** RAW264.7 巨噬细胞购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所细胞库, 人血白蛋白、NLRP3 抑制剂 MCC950、羟乙醛及抗  $\beta$ -actin 抗体为 Sigma 公司产品; 胎牛血清和 DMEM 高糖培养基分别为 Gibco 和 Hyclone 公司产品; 四甲基偶氮唑蓝 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, MTT] 为 Genview 公司产品; 末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记 [terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL] 凋亡检测试剂盒和 RIPA 裂解液分别购自 Roche 和 Solarbio 公司; 兔抗 NLRP3、procaspase-1 和 cleaved caspase-1 抗体为 Cell Signaling Technology 公司产品; 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 和增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂盒分别为北京中杉金桥和 Pierce 公司产品; caspase-1 活性检测试剂盒和 IL-1 $\beta$ 、IL-18 ELISA 测定试剂盒分别购自碧云天和上海蓝基生物科技有限公司; Hoechst 33342/碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 双染试剂盒和乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

**1.2 AGE-alb 的制备** 依据文献和本研究组既往报道的方法<sup>[5, 12]</sup>, 在无菌条件下使人血白蛋白 (40 g/L) 与羟乙醛 (10 mmol/L) 避光 37 °C 共孵育 4 天即为 AGE-alb, 另外取白蛋白在 PBS 中相同条件下孵育作为正常对照白蛋白 (control albumin, C-alb)。实验前用 PBS 充分透析并过滤除菌。

**1.3 细胞培养与处理** RAW264.7 巨噬细胞用含 10% 胎牛血清、1  $\times$  10<sup>5</sup> U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM 高糖培养基在 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内 37 °C

条件下培养。处理前用无血清培养基同步化 12 h, 随机分为 (1) 正常对照 (control) 组: 常规培养; (2) C-alb 处理组: 培养液中加入 4 g/L C-alb; (3) AGE-alb 处理组: 培养液中分别加入 1、2、4 和 6 g/L AGE-alb; (4) NLRP3 抑制剂 MCC950 预处理组: 培养液中加入 1  $\mu$ mol/L MCC950, 1 h 后再加入 AGE-alb (4 g/L), 继续培养 24 h。

**1.4 MTT 法检测细胞活力** 将 MTT (0.5 g/L) 加入处理后的细胞培养孔中, 避光条件下继续培养 4 h, 吸弃培养基, 加入 150  $\mu$ L 二甲基亚砜, 室温振荡 10 min, 采用多功能酶标仪 (奥地利 Molecular Devices 公司, Spectramax i3x 型) 于 490 nm 处检测各孔吸光度 (optical density, OD) 值。细胞活力用各实验组 OD 值占正常对照组 OD 值的百分比表示。

**1.5 LDH 活性测定** 收集上述各组细胞培养基, 2 500 r/min 离心 10 min 后取上清, 依据试剂盒说明书介绍的方法测定其中 LDH 活性, 以 U/L 表示。

#### 1.6 ELISA 法检测炎症因子 IL-1 $\beta$ 和 IL-18 浓度

收集上述各组细胞培养基, 2 500 r/min 离心 10 min 后取上清, 按照试剂盒操作步骤检测其中 IL-1 $\beta$  和 IL-18 浓度。

**1.7 Caspase-1 活性测定** 胰酶消化收集处理后的各组细胞, 2 500 r/min 离心 10 min, PBS 润洗 1 次, 加入裂解液重悬冰浴裂解 15 min, 4  $^{\circ}$ C 条件下 12 000 r/min 离心 15 min, 取少量上清液用 Bradford 法进行蛋白定量。在 96 孔板中将反应缓冲液 40  $\mu$ L、细胞裂解上清液 50  $\mu$ L 和 caspase-1 底物 (Ac-YVAD-pNA) 10  $\mu$ L 混合, 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h。应用多功能酶标仪 (奥地利 Molecular Devices 公司) 读取 405 nm 处吸光度, 在相同条件下获得标准曲线并计算样品中 caspase-1 活性, 将正常对照组细胞 caspase-1 活性作为 100%, 其它各组细胞 caspase-1 活性以其占正常对照组的百分比表示。

**1.8 TUNEL 染色** 将处理后的各组细胞爬片用 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗涤 3 次, 在冰上以 0.1% Triton X-100 处理透化 3 min, 与 TUNEL 反应混合液 37  $^{\circ}$ C 条件下避光孵育 1 h, PBS 润洗 3 次后以 DAPI 复染细胞核。荧光显微镜 (Olympus BX51) 观察、采集图像, TUNEL 阳性细胞率 = TUNEL 阳性细胞数 / 细胞总数  $\times$  100%。

#### 1.9 Hoechst 33342/PI 双染法检测细胞死亡情况

上述各组细胞经处理后, 吸弃培养基, 与 100 倍稀释的 Hoechst 33342 染色液 37  $^{\circ}$ C 避光孵育 15

min, PBS 轻柔润洗 1 次后与 200 倍稀释的 PI 染色液室温避光孵育 15 min。PBS 轻柔洗涤 2 次后 4% 多聚甲醛固定 5 min, PBS 洗涤 3 次, 甘油 /PBS 封片, 荧光显微镜 (Olympus BX51) 观察。细胞死亡率 = PI 阳性细胞数 / 细胞总数  $\times$  100%。

**1.10 Western blot 分析** 按本课题组以前报道的方法<sup>[5]</sup>操作, 即采用 RIPA 裂解液获取细胞蛋白, 经十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后电转移至二氟化树脂膜上, 5% 脱脂奶粉封闭后与 NLRP3、procaspase-1、cleaved caspase-1 和  $\beta$ -actin 抗体 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗膜后与相应辣根过氧化物酶标记二抗室温孵育 1 h, 洗膜后用 ECL 法显示目的蛋白条带, 运用化学发光成像仪 (上海欧翔科学仪器有限公司) 采集图像。应用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件 (Media Cybernetics, MD, USA) 分析蛋白条带积分光密度 (integrated optical density, IOD) 值, 以靶蛋白 IOD 值与  $\beta$ -actin IOD 值的比值表示靶蛋白的相对表达水平。

**1.11 统计学分析** 实验数据以 mean  $\pm$  SD 表示。运用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析 (ANOVA), 用 SNK 法进行组间两两比较。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 AGE-alb 诱导 RAW264.7 细胞损伤

与正常对照组比较, C-alb 组细胞活力无明显改变 (P > 0.05), LDH 漏出无明显增加 (P > 0.05); 而 AGE-alb 则显著诱导细胞损伤, 表现为细胞活力降低、LDH 漏出增加, 尤其以 2、4 和 6 g/L 浓度时更为明显 (P < 0.05 或 P < 0.01, 图 1A 和 B)。另外, 与正常对照组和 C-alb 组比较, AGE-alb 处理组 TUNEL 阳性细胞率显著增加, 且随浓度的增加而增多 (P < 0.01, 图 1C)。

### 2.2 AGE-alb 促进巨噬细胞炎症因子分泌

采用 ELISA 法检测培养基中炎症因子 IL-1 $\beta$  和 IL-18 水平, 结果 (图 2) 显示, 与正常对照组比较, C-alb 组 IL-1 $\beta$  和 IL-18 浓度无明显增加 (P > 0.05), 而 AGE-alb 则呈浓度依赖性地显著增加 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的分泌 (P < 0.05 或 P < 0.01)。

### 2.3 AGE-alb 上调巨噬细胞 NLRP3 表达

与正常对照组比较, C-alb 组巨噬细胞 NLRP3 蛋白水平无明显改变 (P > 0.05), 而 AGE-alb (2、4 和 6 g/L) 则显著上调 NLRP3 表达 (P < 0.01, 图 3)。

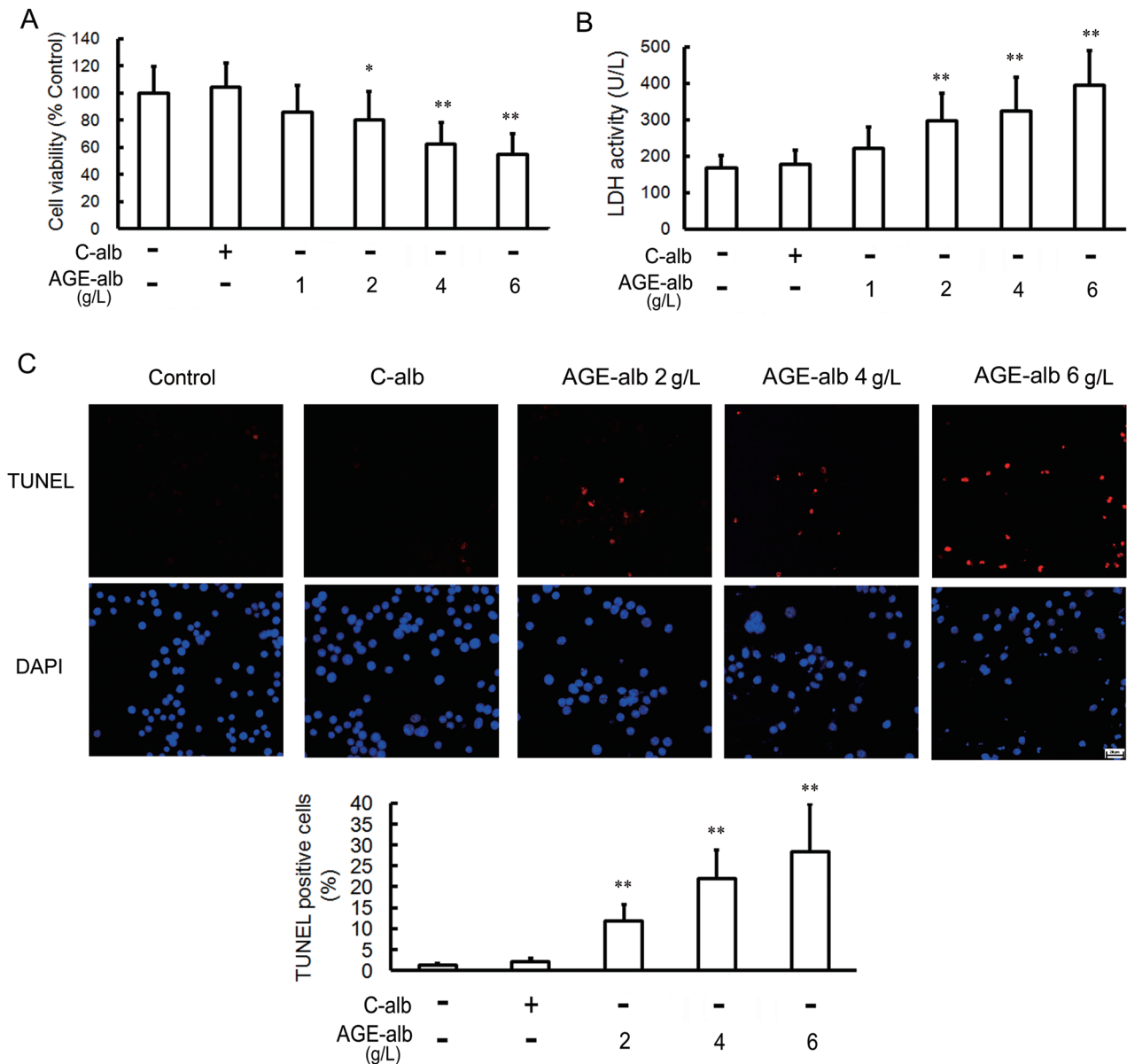


图 1 AGE-alb诱导RAW264.7巨噬细胞损伤

Fig. 1. AGE-alb induces RAW264.7 macrophage cell injury. Cells were treated with the indicated concentration of AGE-alb or C-alb (4 g/L) for 24 h. *A*: Cell viability determined by MTT assay. *B*: LDH activity in media. *C*: TUNEL assay expressed as the percentage of the number of TUNEL-positive cells to total cells. Scale bar, 20  $\mu$ m. Mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group.

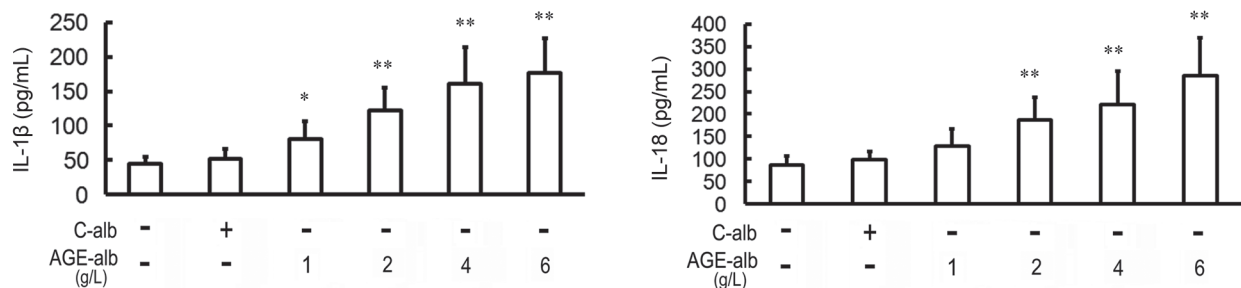


图 2 AGE-alb促进IL-1 $\beta$ 和IL-18分泌

Fig. 2. AGE-alb promotes IL-1 $\beta$  and IL-18 secretion. RAW264.7 cells were treated as described in Fig. 1, and the levels of IL-1 $\beta$  and IL-18 in media were determined by ELISA. Mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group.



**2.4 AGE-alb诱导巨噬细胞caspase-1活化**

Western blot 分析结果 (图 4A) 显示, 与正常对照组比较, C-alb 组巨噬细胞活化型 caspase-1 (cleaved caspase-1) 表达无明显增加 ( $P > 0.05$ ), 而 AGE-alb 处理组 cleaved caspase-1 表达显著上调, 且呈浓度依赖性 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。Caspase-1 活性测定 (图 4B) 也得到与 Western blot 相一致的结果, AGE-alb 处理组 caspase-1 活性明显增加 ( $P < 0.01$ )。

**2.5 MCC950抑制AGE-alb诱导的caspase-1活化和炎症因子分泌**

为了进一步证实 AGE-alb 通过激活 NLRP3-

caspase-1 信号途径诱导巨噬细胞焦亡, 采用 NLRP3 特异性抑制剂 MCC950 预处理, 观察其是否可拮抗 AGE-alb 的上述作用。结果显示, MCC950 可显著抑制 AGE-alb 所诱导的巨噬细胞 caspase-1 活化和 IL-1 $\beta$ 、IL-18 分泌 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ , 见图 5)。

**2.6 MCC950减轻AGE-alb诱导的巨噬细胞焦亡**

与 AGE-alb 组比较, MCC950 预处理组细胞活力增加 ( $P < 0.05$ )、LDH 漏出减少 ( $P < 0.05$ )、TUNEL 阳性细胞率降低 ( $P < 0.05$ ), 且 PI 阳性细胞率也显著下降 ( $P < 0.01$ , 图 6)。

**3 讨论**

细胞死亡和炎症反应与 AS 发生、发展及粥样斑块的易损性关系密切。大量研究证实巨噬细胞凋亡是斑块破裂进而导致急性心脑血管事件的重要机制之一<sup>[13]</sup>, 但是细胞凋亡不能完全解释 AS 及其伴随的炎症反应。ox-LDL 是 AS 发生的独立危险因子, 研究表明其可诱导巨噬细胞凋亡, 但同时也会出现细胞膜破裂、细胞内容物和促炎因子释放等非凋亡形态学特征, 且给予凋亡关键酶抑制剂并不能完全阻断 ox-LDL 诱导的巨噬细胞死亡, 提示可能存在非凋亡机制的参与<sup>[14, 15]</sup>。细胞焦亡是近年来提出的一种伴有促炎因子释放的程序性细胞死亡形式, 兼有坏死与凋亡的形态学特征, 即细胞肿胀、胞膜破裂、细胞内容物 (如 LDH 等) 和 IL-1 $\beta$ 、IL-18 等炎症因子释放, 并出现细胞核固缩、脱氧核糖核酸片段化、TUNEL 检测阳性<sup>[6]</sup>。随着对 AS 病理生理学机制的深入研究, 慢性炎症在 AS 发生、发展中的

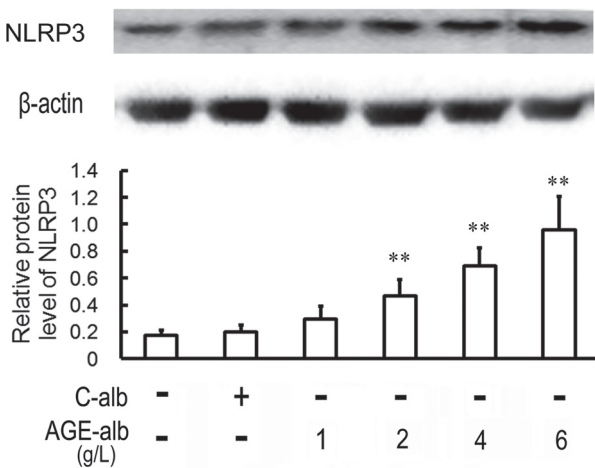


图 3. AGE-alb上调RAW264.7细胞NLRP3表达  
Fig. 3. AGE-alb upregulates NLRP3 expression in RAW264.7 cells. Cells were treated as described in Fig. 1, and NLRP3 level was examined by Western blot analysis. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \*\* $P < 0.01$  vs control group.

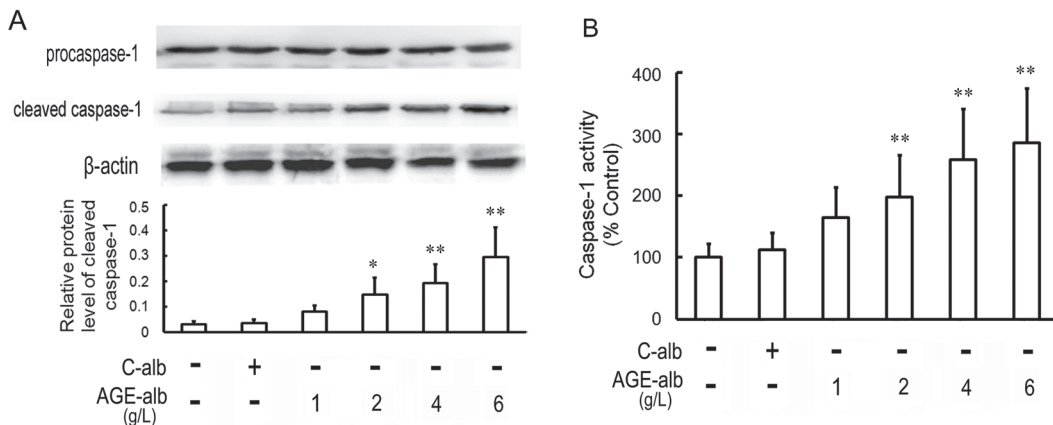


图 4. AGE-alb诱导caspase-1活化  
Fig. 4. AGE-alb induces activation of caspase-1. RAW264.7 cells were treated as described in Fig. 1. A: Western blot analysis of procaspase-1 and cleaved caspase-1. B: Caspase-1 activity. Mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group.

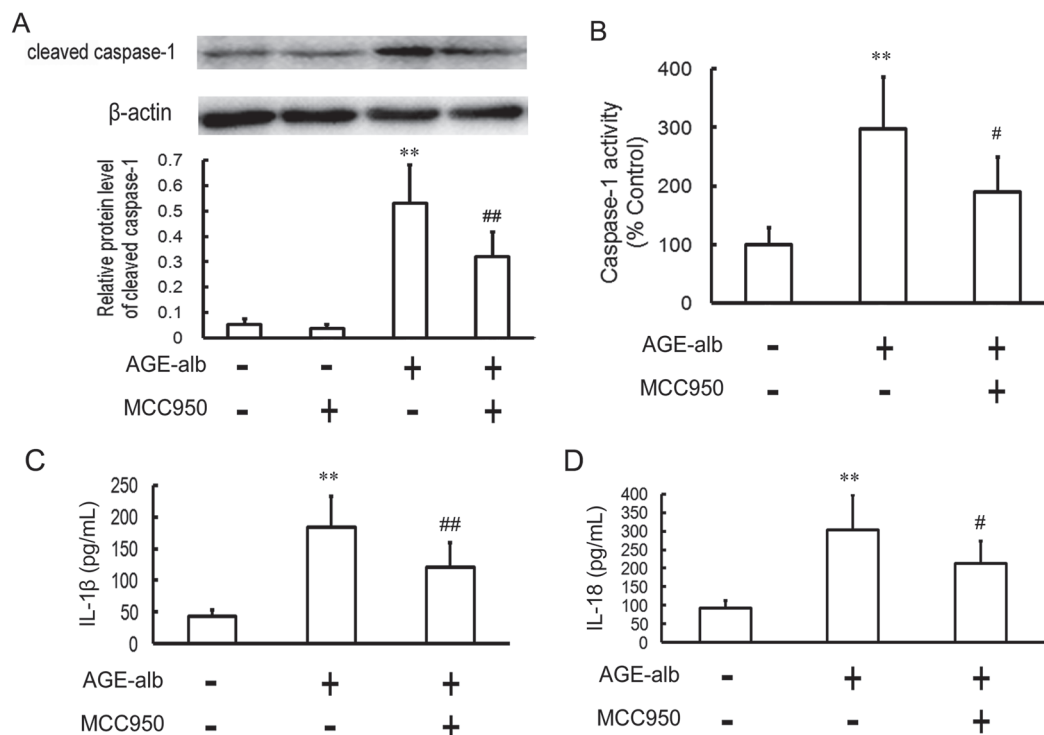


图 5. MCC950抑制AGE-alb诱导的caspase-1活化和IL-1 $\beta$ 、IL-18分泌

Fig. 5. MCC950 inhibits AGE-alb-induced activation of caspase-1 and secretion of IL-1 $\beta$  and IL-18. RAW264.7 cells were preincubated with MCC950 (1  $\mu$ mol/L) for 1 h and then treated with AGE-alb (4 g/L) for 24 h. *A*: Western blot analysis of cleaved caspase-1. *B*: Caspase-1 activity. *C* and *D*: IL-1 $\beta$  and IL-18 levels in media. Mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ . \*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs AGE-alb group.

重要作用已成为共识，而细胞焦亡伴随促炎因子的释放，提示其可能参与 AS 的形成和发展，并与粥样斑块的易损性相关<sup>[16]</sup>。文献报道，ox-LDL 处理巨噬细胞后，死亡细胞和 TUNEL 阳性细胞明显增加、LDH 漏出和 IL-1 $\beta$ 、IL-18 分泌增多<sup>[9, 17]</sup>。本研究结果显示，AGE-alb 处理 RAW264.7 巨噬细胞 24 h 后，细胞活力下降、LDH 漏出和 TUNEL 阳性、PI 阳性细胞率增加，且 IL-1 $\beta$ 、IL-18 分泌增多，提示作为 DM 患者 AS 的主要致病因素，AGE-alb 可诱导巨噬细胞焦亡的发生。

细胞焦亡是受炎症小体调控的依赖于 caspase-1 和 (或) caspase-4/5/11 的新型程序性细胞死亡方式。炎症小体是一类多蛋白复合物，可识别来源于入侵病原体的病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) 和内源性应激诱导的危险相关分子模式 (danger-associated molecular patterns, DAMP)。典型的炎症小体属于核苷酸结合寡聚化结构域样受体 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor, NLR) 家族，由 C-端富含亮氨酸的重

复序列 (leucine-rich repeats, LRR)、中段核苷酸结合寡聚结构域 (nucleotide-binding oligomerization, NOD/NACHT) 和 N-端半胱氨酸蛋白酶激活和募集结构域 (caspase activation and recruitment domain, CARD) 或 pyrin 结构域 (pyrin domains, PYD) 组成<sup>[18]</sup>。文献报道 AS 高风险 (如吸烟、高血压、高胆固醇、糖尿病) 患者主动脉壁内炎症小体表达水平显著上调<sup>[19]</sup>。NLRP3 是研究最为广泛的一种炎症小体，病原体入侵时或在高糖、高脂等因素的刺激下，通过 PAMP 和 DAMP 的作用而被激活。NLRP3 活化后其 PYD 与下游凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain, ASC) 结合并募集 caspase-1 前体 (procaspase-1)，使其自身水解加工成 p10 和 p20 亚基，产生具有酶活性的 caspase-1 (cleaved caspase-1)，后者剪切 IL- $\beta$  和 IL-18 促进其成熟并释放到细胞外，细胞肿胀，诱发细胞焦亡<sup>[20]</sup>。文献报道 NLRP3 在人颈动脉和冠状动脉粥样斑块尤其巨噬源性泡沫细胞中表达明显增加，且与 AS 严重程度及预后相

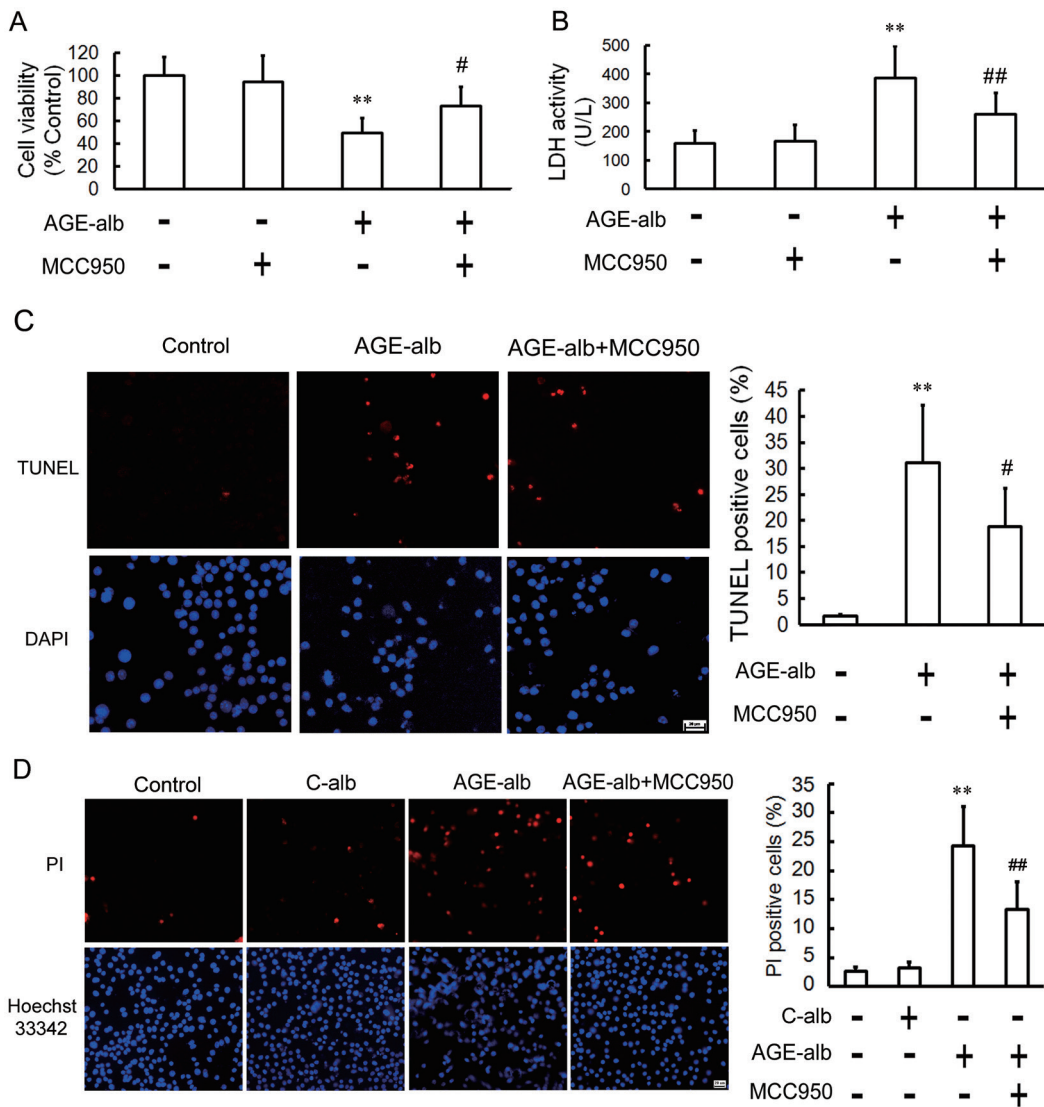


图 6. MCC950抑制AGE-alb诱导的RAW264.7细胞焦亡

Fig. 6. MCC950 inhibits AGE-alb-induced cell pyroptosis. RAW264.7 cells were treated as described in Fig. 5. *A*: Cell viability determined by MTT assay. *B*: LDH activity in media. *C*: TUNEL assay expressed as the percentage of the number of TUNEL-positive cells to total cells. *D*: Hoechst 33342/PI staining assay expressed as the percentage of the number of PI-positive cells to total cells. Scale bar, 20  $\mu$ m. Mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ . \*\* $P < 0.01$  vs control group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs AGE-alb group.

关<sup>[7,8]</sup>, 而 NLRP3 基因沉默或 NLRP3 抑制剂 MCC950 不仅可减少促炎因子生成, 延缓 AS 进展, 还能降低斑块基质金属蛋白酶活性, 增加平滑肌和胶原纤维含量, 增强斑块稳定性<sup>[21, 22]</sup>, 表明 NLRP3 在 AS 发生、发展及易损斑块形成中具有重要作用。本实验结果显示, AGE-alb 处理巨噬细胞后, NLRP3 表达上调, 且随 AGE-alb 浓度的增加而增加。

Caspase-1 是介导经典细胞焦亡途径的关键因子。内外源性刺激因素通过不同途径激活炎性小体进而活化 caspase-1, 介导细胞膜小孔形成, 细胞渗

透性肿胀破裂, 细胞内容物流出以及 IL-1 $\beta$ 、IL-18 等促炎因子成熟和释放<sup>[20]</sup>。在因急性心血管事件死亡的患者冠状动脉易损和破裂斑块中 caspase-1 水平显著增加<sup>[23]</sup>。ox-LDL 和胆固醇结晶可激活 NLRP3 和 caspase-1 诱导巨噬细胞焦亡, 而沉默/敲除 NLRP3 和 caspase-1 则抑制 ox-LDL 和胆固醇结晶诱导的巨噬细胞裂解、DNA 断裂及 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的生成, 并可降低高脂饲养的 *ApoE*<sup>-/-</sup> 小鼠 AS 斑块炎症因子表达和单核细胞募集, 减轻 AS 病变<sup>[9-11, 21, 24]</sup>。本研究结果显示, AGE-alb 可浓度依赖性地增加巨

噬细胞 caspase-1 活性, 而给予 NLRP3 特异性抑制剂 MCC950 预处理, 可明显抑制 AGE-alb 所诱导的 caspase-1 活化、IL-1 $\beta$  和 IL-18 释放、细胞活力降低和 LDH 漏出, 并减少 TUNEL 阳性和 PI 阳性细胞数, 表明 NLRP3-caspase-1 途径是介导 AGE-alb 所致巨噬细胞焦亡的重要机制之一。

综上所述, 本研究结果表明 AGE-alb 可诱导 RAW264.7 巨噬细胞焦亡, 其机制与激活 NLRP3-caspase-1 信号途径有关。

### 参考文献

- 1 Aguiar C, Duarte R, Carvalho D. New approach to diabetes care: from blood glucose to cardiovascular disease. *Rev Port Cardiol* 2019; 38(1): 53–63.
- 2 Gomes DJ, Velosa AP, Okuda LS, Fusco FB, da Silva KS, Pinto PR, Nakandakare ER, Correa-Giannella ML, Woods T, Brimble MA, Pickford R, Rye KA, Teodoro WR, Catanozi S, Passarelli M. Glycated albumin induces lipid infiltration in mice aorta independently of DM and RAS local modulation by inducing lipid peroxidation and inflammation. *J Diabetes Complications* 2016; 30(8): 1614–1621.
- 3 He R, Qu AJ, Mao JM, Wang X, Sun W. Synergistic proliferation induced by insulin and glycated serum albumin in rat vascular smooth muscle cells. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2007; 59(1): 1–7.
- 4 Machado-Lima A, Iborra RT, Pinto RS, Castilho G, Sartori CH, Oliveira ER, Okuda LS, Nakandakare ER, Giannella-Neto D, Machado UF, Corrêa-Giannella ML, Traldi P, Porcu S, Roverso M, Lapolla A, Passarelli M. In type 2 diabetes mellitus glycated albumin alters macrophage gene expression impairing ABCA1-mediated cholesterol efflux. *J Cell Physiol* 2015; 230(6): 1250–1257.
- 5 Kang PP (康攀攀), Yao ST, Guo TT, Wang ZC, Tian H, Jiao P, Zhou J, Qin SC. Activating transcription factor 6-C/EBP homologous protein pathway mediates advanced glycated albumin-induced macrophage apoptosis. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2017; 69(6): 767–774 (in Chinese with English abstract).
- 6 Jia C, Chen H, Zhang J, Zhou K, Zhuge Y, Niu C, Qiu J, Rong X, Shi Z, Xiao J, Shi Y, Chu M. Role of pyroptosis in cardiovascular diseases. *Int Immunopharmacol* 2019; 67: 311–318.
- 7 Afrasyab A, Qu P, Zhao Y, Peng K, Wang H, Lou D, Niu N, Yuan D. Correlation of NLRP3 with severity and prognosis of coronary atherosclerosis in acute coronary syndrome patients. *Heart Vessels* 2016; 31(8): 1218–1229.
- 8 Lee J, Wan J, Lee L, Peng C, Xie H, Lee C. Study of the NLRP3 inflammasome component genes and downstream cytokines in patients with type 2 diabetes mellitus with carotid atherosclerosis. *Lipids Health Dis* 2017; 16(1): 217–223.
- 9 Lin J, Shou X, Mao X, Dong J, Mohabeer N, Kushwaha KK, Wang L, Su Y, Fang H, Li D. Oxidized low density lipoprotein induced caspase-1 mediated pyroptotic cell death in macrophages: implication in lesion instability. *PLoS One* 2013; 8(4): e62148–e62158.
- 10 Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nuñez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 2010; 464(7293): 1357–1361.
- 11 Zhang Y, Li X, Pitzer AL, Chen Y, Wang L, Li PL. Coronary endothelial dysfunction induced by nucleotide oligomerization domain-like receptor protein with pyrin domain containing 3 inflammasome activation during hypercholesterolemia: beyond inflammation. *Antioxid Redox Signal* 2015; 22(13): 1084–1096.
- 12 de Souza Pinto R, Castilho G, Paim BA, Machado-Lima A, Inada NM, Nakandakare ER, Vercesi AE, Passarelli M. Inhibition of macrophage oxidative stress prevents the reduction of ABCA1 transporter induced by advanced glycated albumin. *Lipids* 2012; 47(5): 443–450.
- 13 Martinet W, Coornaert I, Puylaert P, De Meyer GRY. Macrophage death as a pharmacological target in atherosclerosis. *Front Pharmacol* 2019; 10: 306–323.
- 14 Asmis R, Begley JG. Oxidized LDL promotes peroxide-mediated mitochondrial dysfunction and cell death in human macrophages: a caspase-3-independent pathway. *Circ Res* 2003; 92(1): e20–e29.
- 15 Yao S, Zong C, Zhang Y, Sang H, Yang M, Jiao P, Fang Y, Yang N, Song G, Qin S. Activating transcription factor 6 mediates oxidized LDL-induced cholesterol accumulation and apoptosis in macrophages by up-regulating CHOP expression. *J Atheroscler Thromb* 2013; 20(1): 94–107.
- 16 Chang W, Lin J, Dong J, Li D. Pyroptosis: an inflammatory cell death implicates in atherosclerosis. *Med Hypotheses* 2013; 81(3): 484–486.
- 17 Yan H, Li Y, Peng X, Huang D, Gui L, Huang B. Resistance of mitochondrial DNA-depleted cells against oxidized low-density lipoprotein-induced macrophage pyroptosis. *Mol Med Rep* 2016; 13(5): 4393–4399.
- 18 van Hout GPJ, Bosch L. The inflammasomes in cardiovascular disease. *Exp Suppl* 2018; 108: 9–40.
- 19 Zheng F, Xing S, Gong Z, Xing Q. NLRP3 inflammasomes show high expression in aorta of patients with athero-



- sclerosis. *Heart Lung Circ* 2013; 22(9): 746–750.
- 20 Hoseini Z, Sepahvand F, Rashidi B, Sahebkar A, Masoudifar A, Mirzaei H. NLRP3 inflammasome: Its regulation and involvement in atherosclerosis. *J Cell Physiol* 2018; 233(3): 2116–2132.
- 21 Zheng F, Xing S, Gong Z, Mu W, Xing Q. Silence of NLRP3 suppresses atherosclerosis and stabilizes plaques in apolipoprotein E-deficient mice. *Mediators Inflamm* 2014; 2014: 507208–507215.
- 22 van der Heijden T, Kritikou E, Venema W, van Duijn J, van Santbrink PJ, Slütter B, Foks AC, Bot I, Kuiper J. NLRP3 inflammasome inhibition by MCC950 reduces atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice—brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017; 37(8): 1457–1461.
- 23 Kolodgie FD, Narula J, Burke AP, Haider N, Farb A, Hui-Liang Y, Smialek J, Virmani R. Localization of apoptotic macrophages at the site of plaque rupture in sudden coronary death. *Am J Pathol* 2000; 157(4): 1259–1268.
- 24 Yin Y, Li X, Sha X, Xi H, Li YF, Shao Y, Mai J, Virtue A, Lopez-Pastrana J, Meng S, Tilley DG, Monroy MA, Choi ET, Thomas CJ, Jiang X, Wang H, Yang XF. Early hyperlipidemia promotes endothelial activation via a caspase-1-sirtuin 1 pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; 35(4): 804–816.