

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.17.007

# 渥曼青霉素通过 Chemerin/CMKLR1 途径抑制 Kupffer 细胞 NLRP3 的活性缓解小鼠非酒精性脂肪肝\*

吴明兵<sup>1</sup>, 张文锋<sup>2</sup>, 龚建平<sup>2</sup>, 苗春木<sup>2△</sup>

(1. 重庆两江新区第二人民医院普外科 401123;

2. 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科 400010)

**[摘要]** **目的** 探讨 Chemerin 诱导枯否细胞(Kupffer cells, KCs)的炎症反应在小鼠非酒精性脂肪肝病(NAFLD)进展中的作用和机制。**方法** 分别用磷脂酰肌醇 3-激酶的抑制剂渥曼青霉素作用于预先用 Chemerin 体外刺激的 KCs 2 h, 以及由高脂饮食饲养的 C57BL/6J 小鼠 12 周。然后, 利用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞上清液及血清细胞因子水平; 反转录酶-聚合酶链式反应(RT-PCR)和蛋白免疫印迹(Western blot)法分别检测体内外 KCs 中目的分子的 mRNA 和蛋白表达水平; 记录小鼠体质量变化并检测小鼠胰岛素耐受和葡萄糖耐受情况; HE 染色结合 NAS 评分评测小鼠肝脏脂肪变性程度。**结果** 在渥曼青霉素处理的 Chemerin-KCs 或者 NAFLD 模型小鼠中; 细胞上清液和血清中白细胞介素 1 $\beta$ (interleukin 1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )和 IL-18 的水平明显低于单独用 Chemerin 处理组或者单独高脂饮食组; Chemerin 细胞受体(CMKLR1)和炎症小体 3 样受体蛋白(NLRP3)的 mRNA 和蛋白表达明显低于单独用 Chemerin 处理 KCs 或者单独高脂饮食的小鼠。此外, 在高脂饮食单独饲养的小鼠的体质量变化、肝功能变化、胰岛素抵抗情况、葡萄糖抵抗情况及肝脏脂肪指数变化均比渥曼青霉素处理的 NAFLD 模型小鼠变化明显。**结论** 渥曼青霉素能通过下调 CMKLR1 和 NLRP3 的表达减轻由高脂饮食诱导的肝脏脂肪变和 KCs 介导的炎症反应。

**[关键词]** 非酒精性脂肪肝; 枯否细胞; 渥曼青霉素; 炎症小体; Chemerin**[中图法分类号]** R575.5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)17-2279-06

## Wortmannin inhibits the activity of NLRP3 in Kupffer cells through the Chemerin/CMKLR1 pathway and relieves nonalcoholic fatty liver in mice\*

WU Mingbing<sup>1</sup>, ZHANG Wenfeng<sup>2</sup>, GONG Jianping<sup>2</sup>, MIAO Chunmu<sup>2△</sup>

(1. Department of General Surgery, the Second People's Hospital of Chongqing Liangjiang New Area, Chongqing 401123, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the role and mechanism of inflammatory response of Kupffer cells induced by Chemerin in the progression of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in mice. **Methods** Wortmannin was used to treated on KCs which pre-treated with Chemerin in vitro for two hours, and treated on C57BL/6J mice which was fed with a high-fat die. Levels of cytokines in supernatant/serum were tested by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA); mRNA and protein levels of KCs' Chemokine-like receptor 1 (CMKLR) and nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3) in vivo and vitro were detected by real time polymerase chain reaction(real time-PCR) and Western blot; changes of mouse weight were recorded; insulin resistance and glucose tolerance were detected; the severity of liver steatosis was evaluated by HE staining combined with NAS score. **Results** The levels of interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and IL-18 in the KCs and mice treated with wortmannin were significantly lower than the KCs treated with Chemerin only and mice fed with high fat diet only. The mRNA and protein levels of CMKLR1 and inflammasome 3 (NLRP3) were significantly lower in the KCs and mice treated with Wortmannin than the KCs treated with Chemerin only and mice fed with high fat diet only. In addition, changes in mouse weight, hepatic steatosis, liver function, insulin resistance and glucose tolerance were much milder in mice treated with Wortmannin than those mice fed with high fat diet. **Conclusion** Wortmannin alleviates liver steatosis and inflammation mediated by KCs via down-regulating the expression of CMKLR1 and NLRP3 in high fat diet fed mice.

**[Key words]** non-alcoholic fatty liver disease; Kupffer cells; Wortmannin; NLRP3; Chemerin

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81701957); 重庆卫生和计划生育委员会科技项目(2015-2-126)。 作者简介: 吴明兵(1971-), 副主任医师, 本科, 主要从事肝胆胃肠外科疾病治疗。 △ 通信作者, E-mail: luckmcm@163.com。

目前,全球约 20% 人群患有非酒精性脂肪肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的风险, NAFLD 是糖尿病的主要危险因素,也是慢性肝病进展为肝癌的危险因素之一<sup>[1]</sup>。“双重打击”即游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 和脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 被认为是单纯非酒精性脂肪肝向非酒精性脂肪性肝炎转变的最重要的因素<sup>[2]</sup>。在这个过程中,枯否细胞 (Kupffer cells, KCs) 介导的固有免疫反应激活,导致持续慢性的肝脏炎症,最终造成肝细胞损伤、肝纤维化及肝硬化等不可逆的病理变化<sup>[2]</sup>。因此,抑制 KCs 介导的肝脏炎症反应,可缓解单纯非酒精性脂肪肝向非酒精性脂肪性肝炎转变的进程。

大量的细胞因子和趋化因子参与了 NAFLD 的进展过程。Chemerin 是一种新近被证实的参与 NAFLD 进展的趋化蛋白之一<sup>[3]</sup>。Chemerin 还可能通过调控脓毒症患者糖代谢过程影响患者的生存时间<sup>[4]</sup>。此外,LPS 可上调巨噬细胞表面 Chemerin 样受体 (chemokine-like receptor 1, CMKLR1) 的表达<sup>[5]</sup>。因此,Chemerin 参与机体炎症反应中代谢紊乱的调节。但是,Chemerin 是否能诱导 KCs 激活,以及其在单纯非酒精性脂肪肝向非酒精性脂肪性肝炎转变过程中的作用如何,目前鲜有报道。

最近,磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (PI3K) 抑制剂被报道具有减少脂肪的功能<sup>[6]</sup>。但是,PI3K 抑制剂是否可通过减轻 KCs 诱导的炎症反应缓解 NAFLD 的进展,目前尚不清楚。因此,本研究将利用 PI3K 抑制剂渥曼青霉素 (wortmannin) 作用于体外预先用 Chemerin 处理的 KCs 模型,以及腹腔注射 NAFLD 小鼠模型,通过 KCs 介导固有免疫反应相关蛋白的变化,研究和探讨 Chemerin 参与 NAFLD 进展的机制。

## 1 材料与方法

**1.1 动物** 本实验所用的 C57BL/6J 小鼠 (4 周龄, 13~15 g, 雄性) 均购买于重庆医科大学动物实验中心。小鼠饲养在具有昼夜固定周期的独立通风笼盒 (IVC) 动物房中,可自由进食和饮水。所有与小鼠有关的操作均得到重庆医学大学动物伦理委员会批准,以及所有涉及小鼠的操作均符合动物伦理学相关规定。

**1.2 试剂** LPS (L5293) 购买于美国 Sigma 公司。渥曼青霉素 (S2758) 购买于美国 Selleck Chemicals 公司。Chemerin 活性成分 Chem157S (SRP6002) 和 IV 型胶原酶 (C5138) 购买于美国 Sigma 公司。鼠白细胞介素 1 $\beta$  (interleukin 1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (EK0394)、鼠 Chemerin ELISA 试剂盒

(EK1330)、兔抗  $\beta$ -actin 抗体 (BM0626)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (BA1050) 和 RIPA 裂解液 (AR0102) 均购买于武汉博士德科技公司。鼠 IL-18 ELISA 试剂盒 (C507380) 和基因引物序列均购买于上海生工生物科技公司。BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (KGP902) 和超敏型 ECL 化学发光试剂盒 (KGP1127) 均购于江苏凯基生物技术公司。总 RNA 提取试剂盒 (RP5612)、cDNA 反转录试剂盒 (PR6102) 和荧光定量聚合酶链式反应 (fluorescence quantitative polymerase chain reaction, FQ-PCR) 试剂盒 (PR7702) 均购于北京百泰克生物技术公司。兔抗 CMKLR1 抗体 (ab199603)、兔抗炎症小体 3 样受体蛋白 (nucleotide oligomerization domain-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3) 抗体 (ab214185) 购买于美国 Abcam 公司。兔抗 caspase 1 p10 (67314) 抗体购买于美国 CST 公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 KCs 提取与培养** KCs 的分离和培养参考课题组 LI 等<sup>[7]</sup> 的报道,即 C57BL/6J 小鼠乙醚吸入麻醉后,常规备皮、消毒,并逐层剪开皮肤、肌层,以暴露腹腔、肝脏和门静脉。5 mL 磷酸盐缓冲液 (PBS) 经门静脉原位灌注肝脏,同时开放上腔静脉。然后,游离肝组织,并在 0.1% 的 IV 型胶原酶浸润下离碎肝组织,之后在 37 °C 水浴中消化 30 min。所得的组织匀浆通过一个 200 目的滤网过滤,之后利用密度梯度离心法纯化。最后,分离得到的细胞沉渣可继续用来培养,或者提取总蛋白和总 RNA。

**1.3.2 Chemerin 和渥曼青霉素体外刺激 KCs 实验** 关于 Chemerin 刺激实验,即 KCs 用梯度浓度的 Chem157S (0、150、300 ng/mL) 处理 12 h 后, FQ-PCR 和蛋白印记法 (Wester blot) 分别检测 CMKLR1 的 mRNA 与蛋白表达水平进行后续实验的作用浓度的判断。关于渥曼青霉素刺激实验,即 KCs 用渥曼青霉素 (100 nmol/L) 预处理 1 h 后,再用 Chem157S 刺激 12 h。收集细胞上清液,提取细胞总 RNA 和总蛋白。

**1.3.3 动物分组与处理** 20 只 C57BL/6J 小鼠分为 4 组,每组 5 只;即标准饲养组 (standard diet group, SD 组),即小鼠每天以正常饲料喂养;单独渥曼青霉素处理组 (WOR 组),即渥曼青霉素 (0.7 g · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>) 腹腔注射小鼠 12 周;高脂饲料饲养组 (HFD 组),即小鼠每天以高脂饲料 (24% 蛋白质、41% 碳水化合物和 24% 脂肪) 喂养;高脂饲料饲养结合渥曼青霉素处理组 (TRE 组),即小鼠每天喂以高脂饮食,同时以腹腔注射渥曼青霉素 (0.7 g · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>) 12 周。渥曼青霉素安全有效剂量参考 VISSER 等<sup>[8]</sup> 的报道。此外,

SD 和 HFD 组小鼠每天以腹腔注射等量的生理盐水 12 周作为对照。各组小鼠均于 12 周后人道处死:收集小鼠血清以检测肝功能和细胞因子,收集肝组织标本以分离 KCs 和进行组织学检测。

**1.3.4 葡萄糖和胰岛素耐量试验** 葡萄糖耐量试验,各组小鼠禁食 8 h,经腹腔注射葡萄糖(1.5 g/kg)。在胰岛素耐量试验,即小鼠禁食 4 h,腹腔注射胰岛素(0.7 IU/kg)。分别在葡萄糖或胰岛素注射后 0、30、120 min 收集小鼠外周静脉血,利用便携式血糖仪检测血糖水平。

**1.3.5 ELISA 试验和肝功能检测** 用以检测 IL-1 $\beta$  和 IL-18 水平的上清液和血清稀释 20% 后,利用市售 ELISA 试剂盒测定。用以检测 Chemerin 的血清,其浓度调整为原液的 50% 后,利用市售 ELISA 试剂盒测定。ELISA 检测中涉及的所有的操作均严格按照试剂盒说明书进行操作。小鼠肝功能指标丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)和三酰甘油(triglyceride, TG)由美国贝克曼全自动生化分析仪检测。

**1.3.6 FQ-PCR 检测** KCs( $1 \times 10^6$ )利用总 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA 并测定浓度后,进行 cDNA 反转录实验:即 20  $\mu$ L 反应体系(1  $\mu$ g 总 RNA、10  $\mu$ L Reverse transcriptase MIX、1  $\mu$ L FQ-PCR 引物和 ddH<sub>2</sub>O)进行 50  $^{\circ}$ C 5 min,72  $^{\circ}$ C 2 min 反应。然后,进行 FQ-PCR:20  $\mu$ L 体系包括 10.0  $\mu$ L 2 $\times$ Plus SYBR real-time PCR mixture、0.5  $\mu$ L 上游引物(10  $\mu$ mol/L)、0.5  $\mu$ L 下游引物(10  $\mu$ mol/L)、1.0  $\mu$ L cDNA 模板、10  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。反应条件为:94.0  $^{\circ}$ C,2 min;94  $^{\circ}$ C 15 s,60  $^{\circ}$ C 15 s,72  $^{\circ}$ C,30 s,进行 45 循环反应。最后,利用公式进行定量分析。

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[(Ct_{目的} - Ct_{内参})_{实验组} - (Ct_{目的} - Ct_{内参})_{参组}]}$$

CMKLR1 上游引物序列 5'-ATG GAG TAC GAC GCT TAC AAC G-3',下游引物序列 5'-GGT GGC GAT GAC AAT CAC CA-3',大小为 192 bp; GAPDH 上游引物序列 5'-AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG-3',下游引物序列 5'-TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA-3',大小为 123 bp。

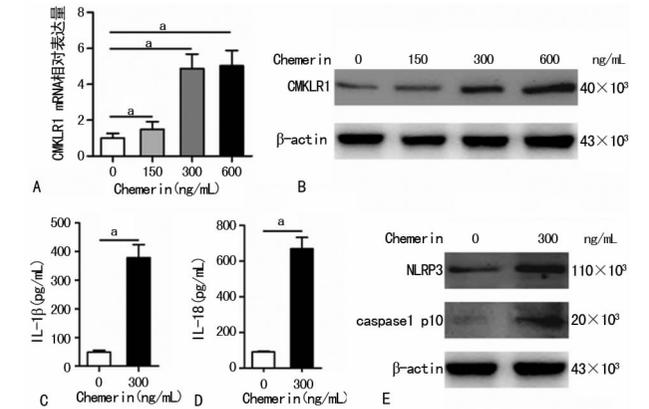
**1.3.7 Western blot 检测** 用 RIPA 裂解液裂解细胞提取总蛋白,采用 BCA 法检测蛋白浓度并定量。然后,10%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)垂直电泳:100 V,120 min。接着进行转膜:250 mA,110 min。然后,利用 5%脱脂奶粉室温封闭丙聚偏氟乙烯(PVDF)膜 2 h;一抗 4  $^{\circ}$ C 孵育 16 h 以上;PVDF 膜洗涤后,加辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 二抗室温孵育 1.5 h 后,利用增强化学发光(ECL)法进行显影。蛋白半定量分析,目的条带

灰度值与相应  $\beta$ -actin 条带灰度值的比值即为目的蛋白相对表达量。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS18.0(美国)软件进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),两组间比较采用独立样本  $t$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

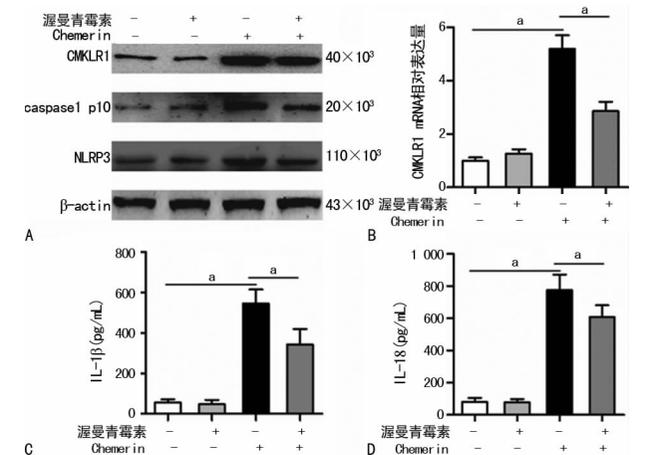
## 2 结 果

**2.1 Chemerin 诱导体外 KCs 炎症小体的激活** 梯度浓度(0~600 ng/mL)的 Chemerin 刺激 12 h 后,体外 KCs 的 CMKLR mRNA 和蛋白的表达水平在随着 Chemerin 浓度升高而提高。但当 Chemerin 浓度上升至 600 ng/mL 时,CMKLR 的 mRNA 和蛋白的表达水平将不再升高(图 1A、B)。当用 300 ng/mL 的 Chemerin 刺激 KCs 时,细胞上清中 IL-1 $\beta$  和 IL-18 水平明显高于正常 KCs,且 NLRP3 和 caspase 1 p10 蛋白表达水平亦明显高于正常 KCs(图 1C~E)。因此,浓度为 300 ng/mL 的 Chemerin 可作为体外刺激 KCs 而引起炎症小体激活的适当浓度。



A: FQ-PCR 分析图; B、E: Western blot; C、D: ELISA 分析图; <sup>a</sup>:  $P < 0.05$

图 1 Chemerin 诱导体外 KCs 炎症小体的激活



A: Western blot; B: FQ-PCR 分析图; C、D: ELISA 分析图; <sup>a</sup>:  $P < 0.05$

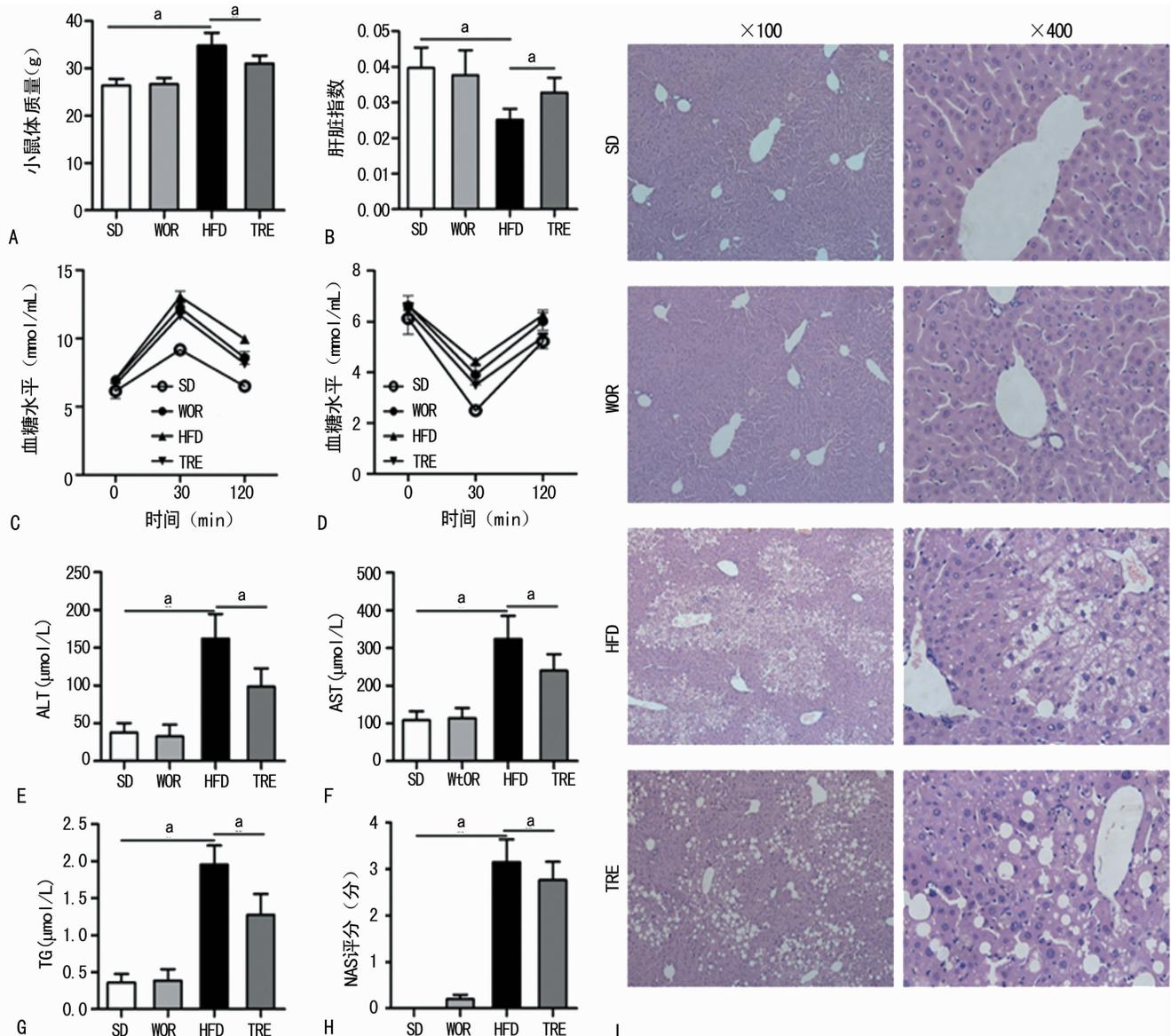
图 2 槲皮素抑制由 Chemerin 诱导体外 KCs 炎症小体的激活

**2.2 渥曼青霉素抑制由 Chemerin 诱导体外 KCs 炎症小体的激活** 利用渥曼青霉素预处理的 Chemerin-KCs, 其 CMKLR1、NLRP3 和 caspase 1 p10 的 mRNA 与蛋白的表达水平均明显低于单独使用 Chemerin 刺激组, 且细胞上清液中 IL-1 $\beta$  和 IL-18 水平明显低于单独使用 Chemerin 刺激组(图 2)。因此, 渥曼青霉素可抑制由 Chemerin 诱导体外 KCs 炎症小体的激活。

### 2.3 渥曼青霉素缓解高脂饮食诱导的小鼠 NAFLD

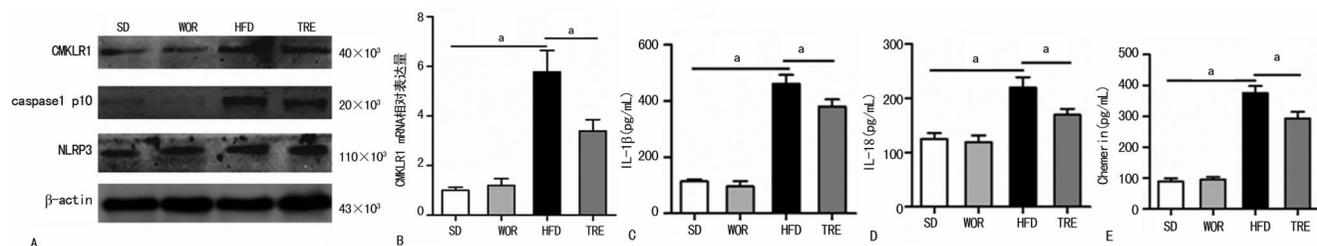
HFD 组小鼠体质量明显高于 SD 组, 而 WOR 组小鼠体质量明显低于 HFD 组, 而高于 SD 组小鼠(图 3A); HFD 组小鼠肝脏指数明显低于 SD 组, WOR 组小鼠肝脏指数明显高于 HFD 组, 而低于 SD 组小鼠(图 3B); HFD 组小鼠葡萄糖耐受能力影响低于 SD 组小鼠, 而 WOR 组小鼠葡萄糖耐受能力明显高于

HFD 组, 而明显低于 SD 组小鼠(图 3C); HFD 组小鼠胰岛素耐受能力低于 SD 组小鼠, 而 WOR 组小鼠胰岛素耐受能力明显高于 HFD 组, 而明显低于 SD 组小鼠(图 3D); HFD 组小鼠的 ALT、AST、TG 和 NAS 评分明显高于 SD 组小鼠, 而 WOR 组小鼠的 ALT、AST、TG 和 NAS 评分明显低于 HFD 组, 而明显高于 SD 组小鼠(图 3E~H); HFD 组小鼠肝组织脂肪变和炎症细胞聚集均明显多于 SD 组小鼠, 而 WOR 组小鼠肝组织脂肪变和炎症细胞聚集均明显少于 HFD 组, 明显多于 SD 组小鼠(图 3I); 以上变化差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。利用渥曼青霉素治疗高脂饲料喂养的小鼠, 可明显减减小鼠体质量、提高肝脏指数, 改善肝功能(ALT、AST 和 TG), 并且缓解肝组织的脂肪变性、葡萄糖和胰岛素抵抗。



A: 体质量分析; B: 肝脏指数分析; C: 小鼠葡萄糖耐受能力分析; D: 胰岛素耐受能力分析; E: ALT; F: AST; G: TG; H: NAS 评分; I: HE 染色;  $^a$ :  $P < 0.05$

图 3 渥曼青霉素缓解高脂饮食诱导的小鼠 NAFLD



A: Western blot; B: FQ-PCR; C~E: ELISA 分析结果图; <sup>a</sup>:  $P < 0.05$

图 4 渥曼青霉素抑制高脂饮食诱导的 KCs 炎症小体激活

## 2.4 渥曼青霉素抑制高脂饮食诱导的 KCs 炎症小体激活

HFD 组小鼠 KCs 中 CMKLR1、NLRP3 和 caspase 1 p10 的蛋白和 mRNA 相对表达量明显高于 SD 组,而 WOR 组小鼠 KCs 中 CMKLR1、NLRP3 和 caspase 1 p10 的蛋白和 mRNA 相对表达量明显低于 HFD 组,而高于 SD 组(图 4A、B);HFD 组小鼠血清中 IL-1β 和 IL-18 的水平明显高于 SD 组,而 WOR 组小鼠血清中 IL-1β 和 IL-18 的水平明显低于 HFD 组,而高于 SD 组(图 4C、D);以上变化,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。利用渥曼青霉素治疗高脂饮食饲养的小鼠,可明显抑制 KCs 中 CMKLR1、NLRP3 和 caspase 1 p10 mRNA 与蛋白的表达,以及降低血清中 IL-1β 和 IL-18 水平。见图 4。

## 3 讨论

本研究利用 Chemerin 刺激体外 KCs,观察到了 CMKLR1 表达升高及 NLRP3 炎症小体激活。而 PI3K 的抑制剂渥曼青霉素可抑制 Chemerin 诱导的炎症小体激活。此外,渥曼青霉素还可减轻由高脂饮食诱导的葡萄糖抵抗、胰岛素抵抗和肝组织脂肪变。

NAFLD 的严重程度与肠道菌群失调密切相关,即高脂饮食引起肠道通透性增加,导致肠源性细菌产物 LPS 等积累引起持续的、低程度的肝脏炎症<sup>[9]</sup>。Chemerin 是机体发生胰岛素抵抗和 NAFLD 的危险因素。据报道,Chemerin 诱导的葡萄糖代谢紊乱与脓毒症患者应激性高血糖诱发的病死率密切相关<sup>[4]</sup>。因此,Chemerin 在 NAFLD 发病过程中可能起到了降低机体胰岛素敏感性和增加肝脏炎症的作用。此外,肥胖患者的血清 Chemerin 水平明显高于正常人群,而进行减肥手术后,Chemerin 水平急剧下降<sup>[10]</sup>。相反,GRUBEN 等<sup>[11]</sup>报道在敲除 CMKLR1 不能缓解非酒精性脂肪肝的进展。然而,本研究的数据表明,Chemerin 可提高 KCs 中 CMKLR1 表达,以及诱导炎症小体的激活。此外,Chemerin 和 CMKLR1 在 NAFLD 小鼠模型均明显高于正常饲料喂养的小鼠。因此,笔者猜测,造成本研究结果与 GRUBEN 等报道的结果不一致的原因可能是饲养小鼠高脂饲料的配方和饲养时间。

PI3K/Akt 通路参与巨噬细胞的活化、存活和分

化的调节。而且,PI3K/Akt 通路与感染、炎症、非酒精性脂肪肝等疾病的发生发展密切相关<sup>[12]</sup>。PI3K 的亚基可诱导 Toll 样受体 4 区室化,减轻 LPS 诱导的炎症反应<sup>[13]</sup>。PI3K 抑制剂可减少小鼠的脂肪储存和降低小鼠体质量<sup>[6]</sup>。同时,高脂饮食可诱导肝脏 KCs 中 NLRP3 炎症小体激活并增加 KCs 的炎症因子分泌<sup>[14]</sup>。NLRP3 炎症小体通过激活 caspase-1 促进 KC 分泌 IL-1β 和 IL-18,从而促进 NAFLD 的进展<sup>[14]</sup>。在本研究中,PI3K 抑制剂渥曼青霉素可抑制 Chemerin 诱导体外 KCs NLRP3 炎症小体的激活,并且减轻由高脂饮食诱导的肝脏脂肪变性。这些结果说明,PI3K 抑制剂渥曼青霉素通过下调 KCs 的 CMKLR1 和 NLRP3 的表达缓解高脂饮食诱导的 NAFLD。然而,本研究结果并没有充分的证据证明 CMKLR1/NLRP3 信号通路的存在。假设 CMKLR1/NLRP3 通路是确实存在,这意味着 CMKLR1 将可能通过核因子 κB(nuclear factor κB, NF-κB)途径激活下游的 NLRP3 炎症小体。但是,BONDUE 等<sup>[15]</sup>已报道 TLR 激动剂不能改变巨噬细胞中 Chemerin 及其受体 CMKLR1 介导的炎症因子分泌的水平。因此,本研究结果尚未建立 Chemerin 和 NLRP3 真正的连接机制,需要在 CMKLR1 敲除小鼠和 NLRP3 转基因小鼠上进行更深入的研究。

综上所述,Chemerin 可提高 KCs 中 NLRP3 和 caspase-1 p10 的表达,并促进炎症因子分泌。而 PI3K 抑制剂渥曼青霉素通过下调 CMKLR1 和 NLRP3 的表达,从而抑制 Chemerin 诱导的炎症小体激活,以及减轻高脂饮食诱导的小鼠肝脏脂肪病变,这些发现可为 NAFLD 的防治提供新的思路。

## 参考文献

[1] YOUNOSSI Z M, LOOMBA R, RINELLA M E, et al. Current and future therapeutic regimens for non-alcoholic fatty liver disease(NAFLD)and non-alcoholic steatohepatitis(NASH)[J]. *Hepatology*, 2017.

[2] LIU Y, ZHANG W F, WU X L, et al. Foxo3a-dependent Bim transcription protects mice from a high fat diet via inhibition of activation of the NLRP3 inflammasome by facilitating autophagy flux in Kupffer cells[J]. *Oncotarget*,

- 2017,8(21):34258-34267.
- [3] POHL R, HABERL E M, REIN-FISCHBOECK L, et al. Hepatic chemerin mRNA expression is reduced in human nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Eur J Clin Invest*, 2017, 47(1):7-18.
- [4] HORN P, METZING U B, STEIDL R, et al. Chemerin in peritoneal sepsis and its associations with glucose metabolism and prognosis: a translational cross-sectional study [J]. *Critical Care*, 2016, 20(1):39.
- [5] WENG C Y, SHEN Z J, LI X B, et al. Effects of chemerin/CMKLR1 in obesity-induced hypertension and potential mechanism[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(6):3096-3104.
- [6] LOPEZ-GUADAMILLAS E, MUÑOZMARTIN M, MARTINEZ S, et al. PI3K $\alpha$  inhibition reduces obesity in mice[J]. *Aging (Albany NY)*, 2016, 8(11):2747-2753.
- [7] LI X F, WU Y K, ZHANG W F, et al. Pre-conditioning with tanshinone II A attenuates the ischemia/reperfusion injury caused by liver grafts via regulation of HMGB1 in rat Kupffer cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89: 1392-1400.
- [8] VISSER J G, SMITH C. Development of a transendothelial shuttle by macrophage modification[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2017(14):1889-1898.
- [9] ZHANG W F, WU Y K, MU D, et al. Kupffer cells: increasingly significant role in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Ann Hepatol*, 2014, 13(5):489-495.
- [10] RANGWALA F, GUY C D, LU J Y, et al. Increased pro-duction of sonic hedgehog by ballooned hepatocytes[J]. *J Pathol*, 2011, 224(3):401-410.
- [11] GRUBEN N, APARICIO V M, KLOOSTERHUIS N J, et al. Chemokine-like receptor 1 deficiency does not affect the development of insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in mice [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e96345.
- [12] ZHOU D X, HUANG C, LIN Z, et al. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways[J]. *Cell Signal*, 2014, 26(2):192-197.
- [13] BILANCIO A, RINALDI B, OLIVIERO M A, et al. Inhibition of p110 $\delta$  PI3K prevents inflammatory response and restenosis after artery injury[J]. *Biosci Rep*, 2017, 37(5): bsr20171112.
- [14] HE K, ZHU X, LIU Y, et al. Inhibition of NLRP3 inflammasome by thioredoxin-interacting protein in mouse Kupffer cells as a regulatory mechanism for non-alcoholic fatty liver disease development [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(23):37657-37672.
- [15] BONDUE B, HENAU O D, LUANGSAY S, et al. The chemerin/ChemR23 System does not affect the pro-inflammatory response of mouse and human macrophages ex vivo[J]. *Plos One*, 2012, 7(6):e40043.

(收稿日期:2017-12-21 修回日期:2018-02-27)

(上接第 2278 页)

- [14] ARGUDIN M A, VANDERHAEGHEN W, VANDEN-DRIESSCHE S, et al. Biofilm formation of ica operon-positive *Staphylococcus epidermidis* from different sources[J]. *APMIS*, 2015, 123(12):1081-1089.
- [15] MERTENS A, GHEBREMEDHIN B. Genetic determinants and biofilm formation of clinical *Staphylococcus epidermidis* isolates from blood cultures and indwelling devices[J]. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*, 2013, 3(2): 111-119.
- [16] CHO S H, NABER K, HACKER J, et al. Detection of the icaADBC gene cluster and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from catheter-related urinary tract infections [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2002, 19(6):570-575.
- [17] TANG Q, YUAN B, HUANG Y, et al. [Biofilm and role of icaA, icaD, and accumulation-associated protein in *Staphylococcus epidermidis* isolated in breast surgery] [J]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2014, 28(2):244-249.
- [18] JUAREZ-VERDAYES M A, RAMON-PEREZ M L, FLORES-PAEZ L A, et al. *Staphylococcus epidermidis* with the icaA<sup>-</sup>/icaD<sup>-</sup>/IS256<sup>-</sup> genotype and protein or protein/extracellular DNA biofilm is frequent in ocular infections[J]. *J Med Microbiol*, 2013, 62(Pt 10):1579-1587.
- [19] PAPANIMITRIOU-OLIVGERI I, GIORMEZIS N, PAPANIMITRIOU-OLIVGERIS M, et al. Number of positive blood cultures, biofilm formation, and adhesin genes in differentiating true coagulase-negative staphylococci bacteremia from contamination[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2016, 35(1):57-66.
- [20] RIOOL M, DE BOER L, JASPERS V, et al. *Staphylococcus epidermidis* originating from Titanium implants infects surrounding tissue and immune cells [J]. *Acta Biomater*, 2014, 10(12):5202-5212.
- [21] PEREZ-TANOIRA R M, HYYRYNEN T. Effect of S53P4 bone substitute on staphylococcal adhesion and biofilm formation on other implant materials in normal and hypoxic conditions[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2015, 26(9):239.

(收稿日期:2017-12-21 修回日期:2018-02-23)