

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.04.001

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20201201.1526.004.html\(2020-12-01\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20201201.1526.004.html(2020-12-01))

P62-ASC 泛素化介导自噬对 NLRP3 炎症小体调节的机制研究*

张 雷¹, 朱稀雯², 何 堃², 龚建平², 彭自力^{1△}

(1. 重庆市奉节县人民医院肝胆外科 404600; 2. 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科 400010)

[摘要] **目的** 探讨棕榈酸(PA)刺激下 P62 介导的自噬和含 NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3(NLRP3)炎症小体相互作用机制。**方法** 分离培养小鼠 Kupffer 细胞(KCs),分对照组、PA 组、渥曼青霉素组和雷帕霉素组。Western blot 测定各组 KCs 中 LC3、NLRP3、凋亡相关点样蛋白(ASC)、半胱氨酸天冬氨酸酶-1(caspase-1)及 Beclin-1 表达水平的变化,激光共聚焦显微镜观察 P62 与 ASC,以及 P62 与 LC3 在细胞中的共定位情况;免疫共沉淀技术测定 PA 刺激前后 P62 与 ASC、LC3 之间的相互作用;Western blot 测定 PA 处理 12 h 前后 ASC 泛素化改变情况。**结果** 与对照组比较,PA 组 LC3 II/LC3 I、NLRP3、ASC、caspase-1 和 Beclin-1 表达水平明显升高($P < 0.05$)。而渥曼青霉素组 LC3 II/LC3 I 较 PA 组下降,NLRP3、ASC 及 caspase-1 表达水平较 PA 组增加($P < 0.05$);雷帕霉素组 LC3 II/LC3 I 较 PA 组增加,而 NLRP3、ASC 及 caspase-1 表达水平较 PA 组减少($P < 0.05$)。激光共聚焦结果显示 KCs 中 P62 与 ASC、P62 与 LC3 共定位,且在 PA 处理 24 h 后明显增强。免疫共沉淀结果表明,与对照组比较,PA 组 P62、ASC 形成的共聚体明显增多。Western blot 检测结果表明,PA 组 ASC 泛素化水平较对照组增强。**结论** KCs 在 PA 刺激下,自噬与 NLRP3 炎症小体的表达均增强,且促进自噬能降低 NLRP3 炎症小体的表达,对 KCs 具有保护作用。P62 对 ASC 泛素蛋白的识别在自噬对 NLRP3 炎症小体的调节中非常关键。

[关键词] 自噬;泛素化;NLR 家族,热蛋白结构域包含蛋白 3;原癌基因蛋白质 c-myc**[中图分类号]** R575.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)04-0541-06

Study on P62-ASC ubiquitination mediated regulation of NLRP3 inflammasome by autophagy*

ZHANG Lei¹, ZHU Xiwen², HE Kun², GONG Jianping², PENG Zili^{1△}

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, People's Hospital of Fengjie County, Chongqing 404600, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism and interaction of palmitic acid (PA)-induced autophagy and recombinant NLR family, Pyrin domain containing protein 3 (NLRP3). **Methods** Mouse kupffer cells (KCs) were isolated, cultured and divided into the control group, the PA group, the wortmannin group and the rapamycin group. The protein levels of LC3, NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC), cysteinyl aspartate specific proteinase-1 (caspase-1) and Beclin-1 were detected by Western blot. Confocal microscopy was used to observe the co-localization of P62 and ASC protein and the co-localization of P62 and LC3 protein in KCs; co-immunoprecipitation assay was used to detect the interaction between P62 and ASC protein before and after PA stimulation; ASC ubiquitination level were detected by WB before and after PA stimulation. **Results** The protein levels of LC3 II/LC3 I, NLRP3, ASC, caspase-1 and Beclin-1 in the PA group significantly increased compared with the control group ($P < 0.05$). In

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31370753);重庆市卫生和计划生育委员会医学科研计划项目(2015XMSB000662、2017ZBXM070)。

作者简介:张雷(1986—),主治医师,硕士,主要从事普通外科学研究。△ 通信作者,E-mail:3211832658@qq.com。

the rapamycin group, LC3 II / LC3 I was increased significantly compared with the PA group, but the expression of NLRP3, ASC and caspase-1 protein was decreased compared with the PA group ($P < 0.05$). In the wortmannin group, compared with the PA group, LC3 II / LC3 I decreased while NLRP3, ASC and caspase-1 protein expression increased ($P < 0.05$). The co-localization of P62 and ASC protein in KCs was observed by laser scanning confocal microscope, which enhanced after stimulation with PA. Co-immunoprecipitation showed that the amount of P62 intercalating with ASC protein in the PA group increased compared with the control group. The level of ASC ubiquitination in the PA group was higher than that in the control group. **Conclusion** The interaction between autophagy and NLRP3 inflammasome is enhanced under the stimulation of PA, and the enhanced autophagy could inhibit the expression of NLRP3. P62-ASC ubiquitination plays an important role in the regulation of NLRP3 inflammasome by autophagy.

[Key words] autophagy; ubiquitination; NLR family, Pyrin domain-containing 3 protein; proto-oncogene proteins c-myc

含 NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3 (NLRP3) 是由 NLRP3、凋亡相关点样蛋白 (ASC) 和 pro-半胱氨酸天冬氨酸酶-1 (caspase-1) 组成的蛋白复合体, 是 NLR 家族中目前研究最明确的成员。它被多种分子、细菌或病毒激活, 促进白细胞介素 (IL)-18、IL-1 β 等炎症因子的成熟与分泌, 与痛风、2 型糖尿病、阿尔茨海默病、非酒精性脂肪肝等炎症疾病有关^[1]。

自噬对机体的正常运转必不可少, 其参与了机体免疫应答并对炎症反应进行调节。有研究证实, 在棕榈酸 (PA) 导致的肝细胞凋亡中, 自噬可对细胞起保护作用^[2]。还有报道称自噬可以通过降解 NLRP3 炎症小体抑制 IL-1 β 的产生^[3]。P62 是自噬最主要的结合蛋白, 它含有 TRAF6 结合域 (TB), LC3 互相作用区域 (LIR) 及泛素结合区域 (UBA)。因此, 它可以和多聚泛素化链结合, 识别泛素化底物并运至自噬体^[4]。

在非酒精性脂肪肝中 P62 是否可以介导并识别 ASC 的泛素化, 从而促进 NLRP3 炎症小体降解还有待证实。因此, 本实验将检测 PA 刺激 Kupffer 细胞 (KCs) 后, P62 与 ASC 的互相作用及泛素化水平, 探讨自噬体对炎症小体蛋白的调控机制, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

NLRP3、ASC 和 β -actin 抗体 (武汉三鹰公司产品), LC3 抗体 (美国 Cell Signaling 公司产品), P62/SQSTM1、Beclin-1 抗体 (美国 Abcam 公司产品), Anti-Ubiquitin 抗体 (美国 Millipore 公司产品)。蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司)。IL-1 β ELISA 检测试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠肝脏 KCs 的分离及处理

小鼠异氟烷吸入麻醉, 消毒后逐层开腹, 显露肝脏及门静脉, 无菌磷酸盐缓冲液 (PBS) 5 mL 由门静脉灌注肝脏至黄褐色。小心取下肝脏转入 0.15% IV 型胶原酶中, 碎肝、过滤后进行梯度离心和选择性贴壁培养, 得到纯化 KCs^[5]。KCs 培养 48 h 后分为对照组、PA 组、渥曼青霉素组、雷帕霉素组。对照组: 常规培养基; PA 组: 检测时间点前 12 h 向培养基中加入 PA, 终浓度为 0.5 mmol/L; 渥曼青霉素组: 50 μ mol/L 渥曼青霉素预处理 4 h, 更换培养基后, 再用 0.5 mmol/L PA 刺激 12 h; 雷帕霉素组: 50 μ mol/L 雷帕霉素预处理 4 h, 更换培养基后, 再用 0.5 mmol/L PA 刺激 12 h。

1.2.2 Western blot 检测

按照总蛋白提取试剂盒说明书的方法提取各处理组小鼠 KCs 总蛋白, BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测各组 KCs 总蛋白浓度并计算上样量。煮沸变性后按 30 μ g 总蛋白上样。进行 SDS-PAGE 电泳, 并转膜至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上, 用 5% 脱脂牛奶室温下封闭 PVDF 膜 1 h。TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 再置于 4 $^{\circ}$ C 下, 一抗 (抗 LC3、NLRP3、ASC、caspase-1、Beclin-1) 孵育过夜。PVDF 膜在室温下漂洗 3 次, 置于稀释之后的二抗中, 室温孵育 2 h。取出 PVDF 膜轻轻漂洗后放入干净培养皿, 将 1:1 配制的电化学发光 (ECL) 显色液均匀涂抹于 PVDF 膜上, 在 Bio-Rad 曝光仪中曝光、采图。

1.2.3 IL-1 β 测定

用 ELISA 检测 KCs 上清液中 IL-1 β 表达水平, 按试剂盒说明操作。

1.2.4 激光共聚焦检测 P62 和 ASC 及 P62 和 LC3 的共表达

将提取自小鼠的 KCs 接种于激光共聚焦专用培养皿中,给予相应处理因素。弃去培养基,用 PBS 洗干净后加入 10% 甲醛室温固定 30 min。0.2% Trion-100 打孔,37 °C 5 min,PBS 洗涤 3 次。山羊血清滴于细胞上,37 °C 孵箱封闭 1 h。滴加按比例稀释的一抗(ASC 和 P62),4 °C 冰箱过夜。弃去一抗,PBS 漂洗 3 次后加入相应二抗,37 °C 暗盒中孵育 2 h。PBS 漂洗后,滴加 DAPI 染液,37 °C 暗盒中孵育 5 min。漂洗晾干后滴加防猝灭剂封片,激光共聚焦显微镜采图。

1.2.5 免疫共沉淀检测 KCs 中 ASC 与 P62 结合情况

细胞用冰 PBS 洗涤后,加入 RIPA 裂解液,4 °C,12 000 r/min 离心 15 min。保留上清液,用 BCA 试剂盒检测每组蛋白水平并标化。将标化的蛋白裂解液加入装有磁珠的 EP 管中,4 °C 摩天轮旋转混匀孵育 1 h,去除已经存在的抗原抗体复合物。每组上清液分为两管,分别加入抗 ASC 一抗和 IgG 抗体,均于摩天轮上 4 °C 孵育过夜。然后将孵育过夜的蛋白裂

解液转移至装有磁珠的 EP 管中,4 °C 摩天轮孵育 2 h。将上述 EP 管置于磁力架上,吸去上清液,剩余即为磁珠-抗原抗体复合物。PBST 和 dilute buffer 洗涤后,加入 loading buffer 开水煮沸 8~10 min,再置于磁力架上,将上清液转入新 EP 管中,即为所需抗原抗体复合物。下步分析同 Western blot 检测。

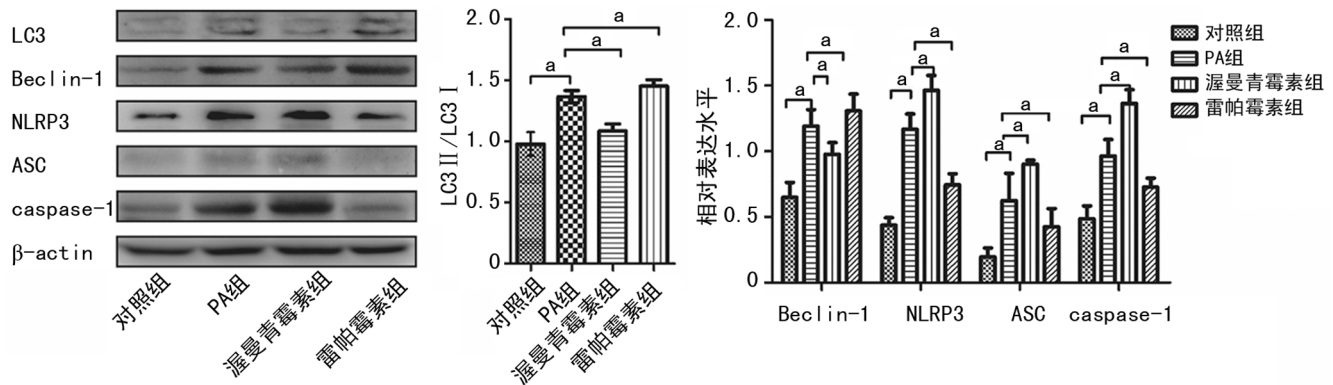
1.3 统计学处理

采用 SPSS18.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 *t* 检验或单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组 KCs 中 LC3、Beclin-1 及 NLRP3 炎症小体相关蛋白的相对表达水平

与对照组比较,PA 组 LC3 II/LC3 I 转化明显增加,且 NLRP3、ASC、Beclin-1 和 caspase-1 蛋白的表达水平也明显升高($P < 0.05$)。渥曼青霉素组 LC3 II/LC3 I 较 PA 组低,且 NLRP3、ASC、caspase-1 表达水平增加($P < 0.05$)。雷帕霉素组 LC3 II/LC3 I 较 PA 组增加,NLRP3、ASC 和 caspase-1 表达水平较 PA 组下降($P < 0.05$),见图 1。



^a: $P < 0.05$ 。

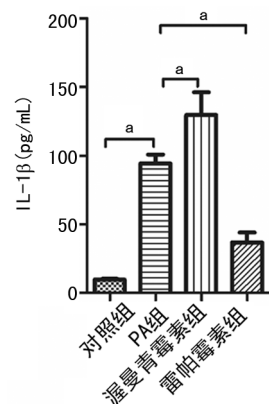
图 1 各组 KCs 中 LC3、Beclin-1 及 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达水平

2.2 各组 KCs 上清液 IL-1β 的表达水平

与对照组比较,PA 组 IL-1β 水平明显升高($P < 0.05$)。渥曼青霉素组 IL-1β 水平较 PA 组进一步升高($P < 0.05$);而雷帕霉素组 IL-1β 水平较 PA 组明显降低($P < 0.05$),见图 2。

2.3 P62 与 ASC 共定位表达

绿色荧光抗体标记 ASC;红色荧光抗体标记 P62,激光共聚焦显微镜观察各组 KCs 中 P62、ASC 的表达。PA 组 P62 和 ASC 表达水平均较对照组均明显增加。P62 与 ASC 存在共定位表达,且 PA 组共定位关系增强,见图 3。



^a: $P < 0.05$ 。

图 2 各组 KCs 细胞培养上清液 IL-1β 水平变化

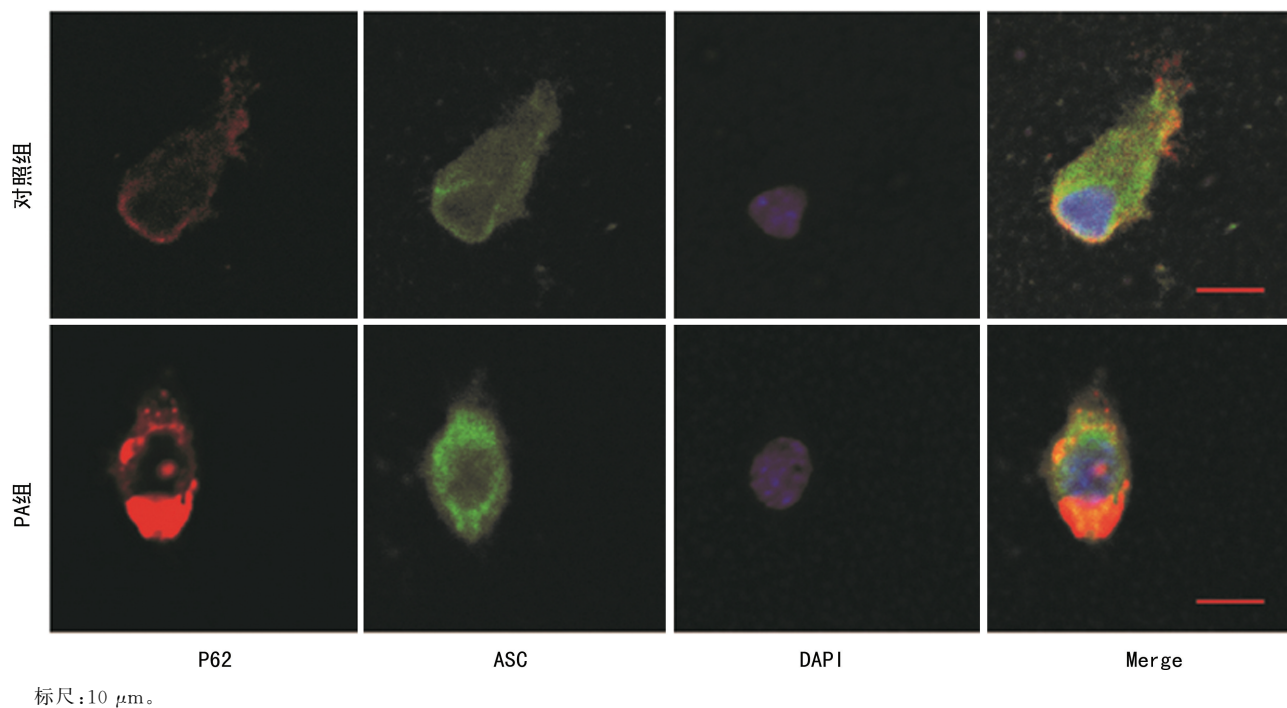


图 3 P62 与 ASC 在 KCs 中的共定位表达

2.4 LC3 与 P62 共定位表达

绿色荧光抗体标记 LC3; 红色荧光抗体标记 P62, 激光共聚焦显微镜观察各组 KCs 中 P62 和 LC3 的表达。PA 组 P62 和 LC3 表达水平均较对照组均明显增加。P62 与 LC3 存在共定位表达, 且 PA 组共定位关系增强, 见图 4。

2.5 免疫共沉淀检测小鼠 KCs 中 LC3、P62 和 ASC 的结合情况

PA 刺激的 KCs 中 ASC 表达较对照组明显增多, 同时, 与 ASC 结合的蛋白复合体中 LC3 和 P62 表达水平也明显增多, 见图 5。

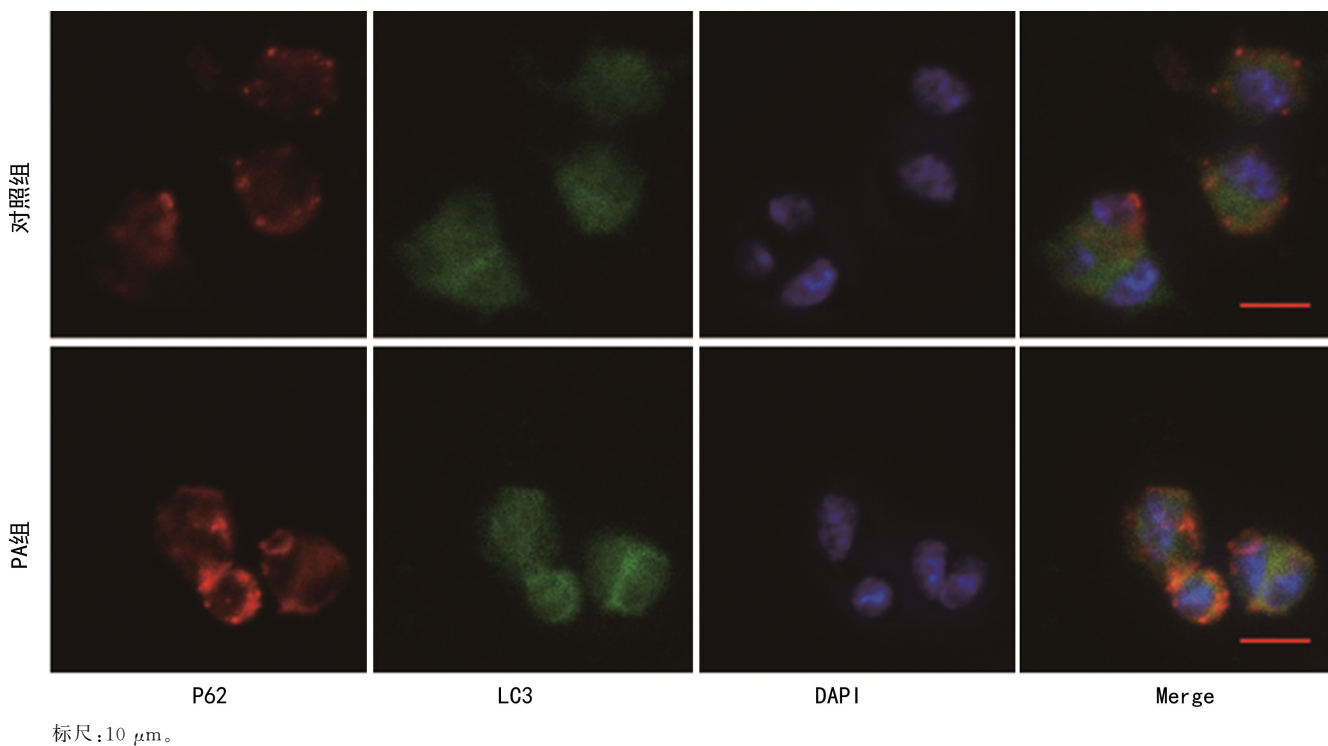


图 4 P62 与 LC3 在 KCs 中的共定位表达

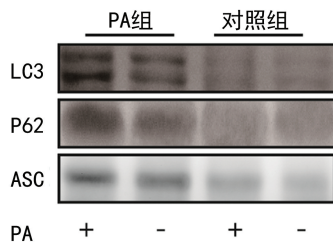


图 5 免疫共沉淀检测小鼠 KCs 中 LC3、P62 和 ASC 的结合情况

2.6 PA 刺激前后 ASC 蛋白复合物总泛素化水平的变化

由于 ASC-P62-LC3 具有相互作用, P62 具有识别泛素化蛋白的能力, 因此进一步研究 ASC 的泛素化水平。Western blot 检测 ASC 泛素化水平结果发现 PA 能明显诱导 ASC 总蛋白增加, 同时泛素化 ASC 也明显升高, 见图 6。

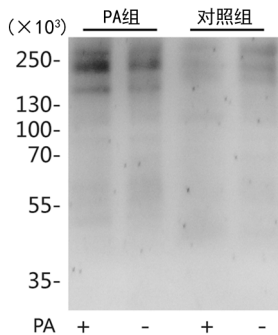


图 6 PA 刺激前后 ASC 蛋白复合物总泛素化水平的变化

3 讨论

近年来, 自噬和 NLRP3 炎症小体间的相互作用受到广泛关注。实验中, 激光共聚焦显微镜证实 KCs 中 ASC 与 P62、LC3 存在共定位, 且在 PA 刺激后, ASC 与 P62、LC3 的共定位颗粒数增加, 提示 P62 在自噬和 NLRP3 炎症小体的链接中起重要作用。免疫共沉淀的结果显示 ASC 与 LC3、P62 确有互相作用, 且在 PA 刺激下其形成的蛋白复合物数量增多, 这进一步证实 P62 介导 ASC 与 LC3 的连接。

P62 是一种由应激产生的蛋白, 参与多种信号通路, 且在细胞增殖、分化中发挥作用^[6]。同时, 它也是维持线粒体形态和功能的关键分子, 参与糖尿病、肥胖、肿瘤等多种疾病发生、发展过程^[7]。P62 还是雷帕霉素靶蛋白(mTOR)的组成部分, 其对 S6K1 磷酸化, 是调节氨基酸激活的 mTOR 信号所必需的^[8]。作为一种泛素结合蛋白, P62 是自噬体最重要的结合蛋白。在自噬过程中, P62 识别并结合泛素化蛋白, 与 LC3 II 形成复合物, 再将受损细胞器、错误折叠蛋白等

在自噬溶酶体内被降解。当细胞自噬受到抑制后, 常发生 P62 的蓄积。因此, P62 被认为是反映细胞自噬活性的标志物之一^[9]。

在细胞质中, P62 能通过 PB 结构域, 形成 P62-泛素化结合蛋白聚合体, 为进一步在自噬溶酶体中降解发挥作用^[10]。本研究发现在 PA 刺激 KCs 的过程中, 增强自噬能减少 NLRP3 炎症小体蛋白。LC3 泛素化修饰系统在自噬小体形成和成熟的过程中非常重要^[11]。进一步探讨泛素化修饰在 NLRP3 炎症小体降解中的作用发现, PA 刺激下 P62、LC3 与 ASC 形成复合物增多; 同时, 检测 ASC 的泛素化水平发现, ASC 的泛素化水平在 PA 刺激后也明显增加。因此, 推测自噬体能降解 NLRP3 炎症小体水平, 这一过程是通过 P62 识别和结合炎症小体中泛素化的 ASC 分子而实现的。

近年来, 有研究表明蛋白的两种降解机制——泛素化-蛋白酶体系统和自噬是存在联系的, 而不是完全独立的系统。当蛋白酶体系统受抑制, 自噬水平将增高, 表明这两个系统可能是相互支持的^[12]。作为重要的选择性自噬结合蛋白, P62 通过 UBA、LIR 及 PB1 结构域将泛素化蛋白送入自噬溶酶体中降解; 同时 P62 也可将泛素化蛋白送入蛋白酶体降解, 将蛋白降解的两种机制联系起来^[13-14]。P62 的 TB 结构域可与 TRAF6 结合, TRAF6 是一种经典多功能的 E3 连接酶, 而 P62-TRAF6 还可通过调节受体转运参与细胞信号的调节^[15-16]。在 P62-ASC 介导的自噬对 NLRP3 炎症小体的降解中 TRAF6 是否扮演角色还有待进一步实验。

综上所述, 在 PA 刺激 KCs 后, 自噬体与 NLRP3 炎症小体的表达增加且互相作用增强, P62 也同步升高, P62-ASC 泛素化促进 P62 将 NLRP3 炎症小体转运至自噬体, 在自噬调节 NLRP3 炎症小体降解的机制中有重要作用。

参考文献

- [1] SWANSON K V, DENG M, TING J P. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics[J]. Nat Rev Immunol, 2019, 19(8): 477-489.
- [2] LIU Y, WANG N, ZHANG S, et al. Autophagy protects bone marrow mesenchymal stem cells from palmitate-induced apoptosis through the

- ROS-JNK/p38 MAPK signaling pathways[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(2):1485-1494.
- [3] SHI C S, SHENDEROV K, HUANG N N, et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction[J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(3):255-263.
- [4] ISLAM M A, SOORO M A, ZHANG P. Autophagic regulation of P62 is critical for cancer therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5):1405.
- [5] LI P Z, LI J Z, LI M, et al. An efficient method to isolate and culture mouse Kupffer cells[J]. *Immunol Lett*, 2014, 158(1):52-56.
- [6] FAN L, YIN S, ZHANG E, et al. Role of p62 in the regulation of cell death induction[J]. *Apoptosis*, 2018, 23(3):187-193.
- [7] LONG M, LI X, LI L, et al. Multifunctional p62 effects underlie diverse metabolic diseases[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2017, 28(11):818-830.
- [8] DURAN A, AMANCHY R, LINARES J F, et al. p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway[J]. *Mol Cell*, 2011, 44(1):134-146.
- [9] LIU W J, YE L, HUANG W F, et al. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2016, 21:29.
- [10] LINARES J F, DURAN A, REINA-CAMPOS M, et al. Amino acid activation of mTORC1 by a PBI-domain-driven kinase complex cascade[J]. *Cell Rep*, 2015, 12(8):1339-1352.
- [11] WANG R, WANG G. Protein modification and autophagy activation[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1206:237-259.
- [12] SCHREIBER A, PETER M. Substrate recognition in selective autophagy and the ubiquitin-proteasome system[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(1):163-181.
- [13] LAMARK T, SVENNING S, JOHANSEN T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm[J]. *Essays Biochem*, 2017, 61(6):609-624.
- [14] LEE Y, WEIHL C C. Regulation of SQSTM1/p62 via UBA domain ubiquitination and its role in disease[J]. *Autophagy*, 2017, 13(9):1615-1616.
- [15] WAUER T, SWATEK K N, WAGSTAFF J L, et al. Ubiquitin Ser65 phosphorylation affects ubiquitin structure, chain assembly and hydrolysis[J]. *EMBO J*, 2015, 34(3):307-325.
- [16] XU Y, LIAO C, LIU R, et al. IRGM promotes glioma M2 macrophage polarization through p62/TRAF6/NF- κ B pathway mediated IL-8 production[J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43(2):125-135.

(收稿日期:2020-04-25 修回日期:2020-09-30)