

全反式维甲酸对巨噬细胞中白介素-1 β 表达的调控及机制研究*

郭莉^{1,2,3}, 张燕^{1,2,3}, 罗文萍^{1,2,3}, 赵天宇^{1,2,3}, 杨德琴^{1,2,3 Δ}

1. 重庆医科大学附属口腔医院(重庆 401147); 2. 口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室(重庆 401147);
3. 重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验室(重庆 401147)

【摘要】目的 探究全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)对巨噬细胞中白介素(interleukin, IL)-1 β 表达的调控及作用机制。**方法** 巨噬细胞经1 μ mol/L ATRA处理24 h后转录组测序,筛选差异表达基因,进行KEGG通路分析、GO功能分析和PPI网络分析。不同剂量ATRA处理巨噬细胞24 h后,qRT-PCR和Western blot验证炎症因子IL-1 β 的表达水平。Western blot和免疫荧光染色检测核因子(nuclear factor, NF)- κ B信号和半胱天冬酶-1(caspase-1)的变化。**结果** 测序结果显示,与空白对照组相比,巨噬细胞经ATRA处理后71个差异表达基因上调,KEGG分析显示上调基因参与IL-17信号通路、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)信号通路等,GO分析显示上调基因参与IL-1 β 的产生、对脂多糖的反应等生物学过程,PPI分析揭示炎症因子,黏附分子和趋化因子为ATRA作用的核心基因。体外实验表明,ATRA呈浓度依赖性促进巨噬细胞中IL-1 β 的表达,ATRA组中磷酸化(p)-NF- κ B、NF- κ B和caspase-1的表达较对照组升高($P < 0.05$),且p-NF- κ B发生了核转移。**结论** ATRA可能通过激活巨噬细胞中的NF- κ B信号和caspase-1促进炎症因子IL-1 β 的表达。

【关键词】 全反式维甲酸 生物信息学 白介素-1 β NF- κ B信号通路 半胱天冬酶-1

Regulatory Effect of All-Trans Retinoic Acid on the Expression of IL-1 β in Macrophages and the Mechanisms Involved GUO Li^{1,2,3}, ZHANG Yan^{1,2,3}, LUO Wen-ping^{1,2,3}, ZHAO Tian-yu^{1,2,3}, YANG De-qin^{1,2,3 Δ} . 1. Stomatological Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401147, China; 2. Chongqing Municipal Key Laboratory of Oral Diseases and Biomedical Sciences, Chongqing 401147, China; 3. Chongqing Municipal Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Higher Education Institutions, Chongqing 401147, China

Δ Corresponding author, E-mail: yangdeqin@hospital.cqmu.edu.cn

【Abstract】Objective To investigate the regulatory effect of all-trans retinoic acid (ATRA) on the expression interleukin-1 β (IL-1 β) in macrophages and the mechanisms involved. **Methods** Macrophages were treated with 1 μ mol/L ATRA for 24 h before RNA-Sequence. Differentially expressed genes (DEGs) were screened out and analyzed by Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis, gene ontology (GO) functional analysis, and protein-protein interaction networks (PPI) analysis. After treatment with different doses of ATRA for 24 h, the expression of IL-1 β was examined with qRT-PCR and Western blot. The activation of NF- κ B signaling and caspase-1 was observed by Western blot and immunofluorescence staining. **Results** Compared with the blank control group, a total of 71 DEGs of macrophages were upregulated in the ATRA treatment group. KEGG analysis showed that the up-regulated DEGs were involved in IL-17 signaling pathway, tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway, etc. GO analysis indicated that the up-regulated DEGs were involved in the biological processes of the production of IL-1 β , response to lipopolysaccharide, etc. PPI analysis revealed that inflammatory cytokines, adhesion molecules, and chemokines were the key genes that ATRA acted on. *In vitro* experiments showed that ATRA promoted IL-1 β expression in macrophages in a concentration-dependent manner. The expression of p-NF- κ B, NF- κ B, and caspase-1 were significantly increased by ATRA compared with those of the control group ($P < 0.05$), and p-NF- κ B translocated to the cell nucleus in the ATRA group. **Conclusion** ATRA may promote the expression of IL-1 β by activating NF- κ B signaling and caspase-1 in macrophages, this study may provide evidence for the immune regulatory function of ATRA on macrophages.

【Key words】 All-trans retinoic acid (ATRA) Bioinformatics IL-1 β NF- κ B signaling pathway Caspase-1

全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)是维生素A在体内的主要活性衍生物^[1],在细胞增殖、分化、肿

瘤发生和炎症反应等诸多生物学过程中发挥着重要作用^[2],近年来ATRA在免疫调节中的作用受到越来越多的关注^[3]。ATRA促进白细胞的归巢和分化,因此临床上主要用于治疗急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)^[4],但是治疗过程中会引起一系列严重的并发症统称分化综合征,其发生机制至今尚未明确,免疫调节失衡

* 国家自然科学基金面上项目(No. 319770783)、重庆市医学重点学科建设项目(2011年, No.55,《牙体牙髓病学》)、重庆市教育委员会重点项目(No.KJZD-K201900402)资助

Δ 通信作者, E-mail: yangdeqin@hospital.cqmu.edu.cn

被普遍认为是主要的致病因素。

研究表明 ATRA 治疗 APL 时 80% 的患者会不同程度地出现并发症^[5], 因此, 临床上急需探究导致该并发症的机制。ATRA 治疗 APL 会导致免疫调节失衡, 主要表现为血清中的炎症因子、趋化因子和细胞间黏附分子表达上调^[6]。ATRA 治疗 APL 能明显诱导体内炎症因子白介素 (interleukin, IL)-1 β 、IL-8、IL-6 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α 的表达升高, 引发全身炎症反应综合征^[7]。炎症因子是先天免疫反应中的关键组成部分, 在多种疾病的发病机制中发挥着核心作用。研究表明 ATRA 能促进免疫细胞中炎症因子的表达, 如 ATRA 能促进肥大细胞分泌 IL-8、IL-1 β 和 TNF- α ^[8]; ATRA 能促进小鼠巨噬细胞和人外周血单核细胞中 IL-1 β 的表达^[9]; 以及 ATRA 能通过核因子 (neuclear factor, NF)- κ B、细胞外信号调节激酶 (extracellular signal regulated kinase, ERK) 等信号通路增强巨噬细胞中脂多糖诱导的 IL-1 β 的表达, 综上所述, ATRA 可能是一种潜在的促炎物质。在所有分泌的炎症因子中, IL-1 β 是最强大的炎症因子, 它广泛地分布在组织和各种免疫细胞中, 尤其是巨噬细胞中^[10], 因此本实验拟初步探究 ATRA 对巨噬细胞中 IL-1 β 产生的影响及其机制。

另外, ATRA 处理 APL 细胞会诱导多种趋化因子及其受体的表达升高, 导致细胞趋化性增加, 体外实验也证实 ATRA 会增强趋化因子的表达^[11]。同时, ATRA 能促进细胞间黏附分子的表达, MOHAMMADZADEH 等^[12]研究表明 ATRA 能诱导 APL 细胞表面 β 2 整合素的表达, 促使其与血管内皮细胞表面的黏附分子 ICAM-1 和 ICAM-2 结合, 加速了 APL 细胞向周围组织的迁移。炎症因子、趋化因子和黏附分子是白细胞分泌的重要的免疫调节因子, 影响白细胞的迁移、浸润、炎症反应等生物学过程。目前 ATRA 与免疫调节因子相关的生物信息学研究较少, 鉴于此, 本研究拟通过转录组测序来检测免疫调节相关基因的变化, 全面地分析 ATRA 如何影响巨噬细胞的免疫调节功能, 为 ATRA 对巨噬细胞的免疫调节研究提供一定的实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞的培养

THP-1 细胞系购自武汉普诺赛有限公司, THP-1 为悬浮生长的单核细胞, 采用 THP-1 专用培养基 (普诺赛, 中国) 进行培养, 每 3 d 更换一次培养基, 每 6 d 传代一次。使用 1 μ g/mL 的佛波酯 (PMA, Sigma) 处理 24 h 可诱导分化为贴壁生长的巨噬细胞。培养箱条件为 37 $^{\circ}$ C, 湿润, 含体积

分数 5% 的 CO₂。

1.2 转录组测序

将使用 1 μ mol/L 的 ATRA 处理巨噬细胞 24 h 作为实验组, 同时设不做任何处理的空白对照组, 每组 3 个样本。收集样本送至华大基因进行转录组测序。所有的原始数据在华大基因 Dr.tom 系统进行在线分析, 包括筛选差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs)、京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析、基因本体 (gene ontology, GO) 功能分析、蛋白互作网络 (protein-protein interaction networks, PPI) 分析。基因的表达使用 FPKM 表示, 差异表达基因的筛选条件为 $|\log_2 FC| \geq 1$ (FC 为差异倍数)、 $P < 0.05$ 、 $q < 0.05$ (q 值即校正后 P 值)。

1.3 qRT-PCR

实验分为空白对照组、10 nmol/L ATRA 组、100 nmol/L ATRA 组、1 μ mol/L ATRA 组、10 μ mol/L ATRA 组。每组 3 个复孔, 处理 24 h 后用 RNAiso plus (TaKaRa) 提取总 RNA, 使用逆转录试剂盒 (TaKaRa) 将 1 000 ng RNA 逆转录合成 cDNA, 逆转录反应体系为 20 μ L。qRT-PCR 反应体系为 12 μ L: TB Green Premix Ex Taq II 6 μ L, 上下游引物各 1 μ L, DEPC 2.5 μ L, cDNA 1.5 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 然后 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 40 s, 共 40 个循环, 最后 65 $^{\circ}$ C 5 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s。以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对目标基因表达水平进行半定量分析。IL-1 β 、caspase-1、GAPDH 的正反向引物序列见表 1。

表 1 炎症相关基因的引物序列

Table 1 Primer sequences for genes associated with inflammation	
Gene (human)	Primer sequence (5'-3')
IL-1 β	F: GAAATGATGGCTTATTACAGTGGC
	R: TTGCTGTAGTGGTGGTCGGAG
Caspase-1	F: GAGAAACATCCAAAAGTGAGGG
	R: GCCTTCTCTCTGGTCAGTGC
GAPDH	F: CAGGAGGCATTGCTGATGAT
	R: GAAGGCTGGGGCTCATT

1.4 Western blot

检测 IL-1 β 时, 实验分组为空白对照组、10 nmol/L ATRA 组、100 nmol/L ATRA 组、1 μ mol/L ATRA 组、5 μ mol/L ATRA 组、10 μ mol/L ATRA 组; 检测 NF- κ B 及 caspase-1 时, 实验分组为空白对照组、100 nmol/L ATRA 组、1 μ mol/L ATRA 组、10 μ mol/L ATRA 组。处理巨噬细胞 24 h 后, 将 ATRA 组和空白对照组样本用 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 缓冲液清洗 3 次, 加入含 1 mmol/L PMSF 的 RIPA 裂解液 (碧云天) 收集细胞蛋白。用 BCA 蛋白定量试剂盒 (碧云天) 检测蛋白浓度, 加入 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液后 100 $^{\circ}$ C 变性

5 min, 样品保存在 -80°C 备用。每孔加 $20\ \mu\text{L}$ 样品到SDS-PAGE凝胶上进行电泳(碧云天), 待目的条带分离后将蛋白电转到聚偏二氟乙烯膜上, 电转完成后将膜放到5%脱脂奶粉中室温封闭2 h, 随后加入抗IL- 1β 、caspase-1、NF- κB /p65、磷酸化(p)-NF- κB /p-p65、GAPDH抗体(1 : 1000, CST)4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。1 $\times$ TBST溶液清洗3次, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育1 h, 1 $\times$ TBST溶液清洗3次, 使用超敏化学发光试剂盒(碧云天)曝光蛋白条带, 并采集图像。Image J软件进行目的蛋白条带灰度分析, GAPDH为内参蛋白, 目的蛋白与内参蛋白的灰度值比值为目的蛋白的相对表达量。

1.5 细胞免疫荧光染色

实验分为空白对照组、100 nmol/L ATRA组、1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA组、10 $\mu\text{mol/L}$ ATRA组。将巨噬细胞接种于4分隔35 mm共聚焦皿中, 处理6 h后, 体积分数为4%多聚甲醛固定30 min, PBS清洗3次, 0.2% TritonX-100透化10 min, PBS清洗3次, 5%牛血清白蛋白封闭30 min, 加入p-NF- κB /p-p65抗体(1 : 1000, Abcam)4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育过夜。次日加入荧光二抗(1 : 1000, 博奥森)室温避光孵育1 h, PBS清洗3次, DAPI染色5 min, PBS清洗3次,

共聚焦荧光显微镜拍摄图像。

1.6 统计学方法

使用Graphpad Prism7.0进行统计分析, 采用单因素方差分析比较多个组间统计学差异, 采用 t 检验分析两组之间的统计学差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生物信息学分析结果

根据筛选标准, ATAR组中共筛选出140个DEGs, 其中上调表达基因71个, 下调表达基因69个(表2), 所有DEGs聚类分布热图见图1A。KEGG通路分析表明71个上调表达基因参与炎症相关的信号通路, 如白介素-17(IL-17)信号通路、肿瘤坏死因子(TNF)信号通路和细胞因子—受体相互作用通路(图1B)。GO功能分析证实上调基因参与IL- 1β 的产生、炎症反应、免疫反应、中性粒细胞的趋化等生物学过程(图1C)。71个上调表达基因中共有24个基因被筛选到PPI网络中, 其中有6个核心基因, 分别为白介素1 α (IL-1 α)、白介素1 β (IL-1 β)、细胞间粘附分子-1(ICAM-1)、趋化因子配体2(CCL2)、趋化因子配体20(CCL20)、白介素8(CXCL8)(图1D)。

表 2 DEGs包括71个上调基因和69个下调基因

Table 2 The DEGs included 71 upregulated genes and 69 downregulated genes

DEGs	Gene name
Up-regulated genes	H2AC19, BPI, KLK6, PTGES, IL31RA, STC1, ITGA1, EFN2, ANGPTL4, ST6GALNAC5, IL1A, HLA-DMB, SCG2, HIC1, CCL20, LRRC32, CYP26B1, CD300LB, IL1B, CCL2, ALOX5AP, THBD, SLA, ETV7, RAB3C, LTBP3, IFI44L, MLPH, ABCA1, TDO2, GBP4, LOC400499, CXCL8, SH3BGRL2, SEMA6B, BAALC, CHST15, FRMD3, RCAN2, ATP9A, STOX2, MAP2, CYFIP2, PLAAT4, HIVEP2, LOC107986113, DCSTAMP, ANKRD35, CNR1, SELENOP, PLS1, SMAD3, NR2F1, NDFIP1, SYT2, C10orf105, IL15RA, ALX4, PIK3CG, PLK3, GDF15, ICAM1, FAM20C, CHST7, DSE, CEBPB, BATF2, SLC5A3, LILRA1, CYTH3, MRPS6
Down-regulated genes	OLFM3, STXBP6, GRXCR2, EMP3, COL11A1, S100A3, SLC13A3, CACNB4, ZBTB16, PBX1, ROBO4, UNC5A, VIPR1, HSPB7, SEPTIN4, HTR2A, FAM184B, GPR88, C2CD4C, CX3CR1, MMP12, CSPG4, LMO4, RAB6B, IL1R1, S100A6, FA2H, SLC12A8, NCR3LG1, HCK, SDC2, S100A4, CHST13, LGALS1, PLP2, C2orf92, AHNAC, EHD2, KCNIP3, ITGA7, PTPRK, TMPRSS9, CFAP251, MMP8, RET, PRELID2, SLC17A7, CAPN2, SYNE3, MYEOV, FKBP5, KCNC4, IFNGR1, AGRN, SCIN, C3orf80, MMP17, MUC1, DCBLD1, PTK2B, KIFC2, TNNT1, ITGA9, AHNAC2, TSC22D3, CERCAM, ANXA2, PFKP, NRB2

The upregulated genes were arranged in log₂FC order from large to small, and the down-regulated genes were arranged in log₂FC order from small to large.

2.2 PPI中核心基因的FPKM表达

与空白对照组相比, ATRA促进了巨噬细胞中IL-1 α 、ICAM1、IL-1 β 、CCL2、CCL20及CXCL8的表达, 变化倍数分别为3.9、1.2、2.7、2.6、2.9、1.9。其中IL-1 α 的FPKM表达量最低, FPKM < 1; IL-1 β 的FPKM表达量最高, FPKM > 170(图2)。综合GO功能分析中ATRA参与IL-1 β 的产生(图1C), 提示IL-1 β 可能是ATRA的下游靶基因。

2.3 ATRA对IL-1 β 的影响

使用不同浓度梯度的ATRA处理巨噬细胞24 h后, qRT-PCR结果表明相较于空白对照组, 高浓度ATRA促进

IL-1 β mRNA的表达($P < 0.05$)(图3A), Pearson相关分析显示, ATRA浓度与IL-1 β 表达水平呈正相关($r = 0.894$, $P < 0.01$), Western blot结果表明ATRA不仅促进IL-1 β 前体蛋白的表达, 而且促进成熟的IL-1 β (即cleaved IL-1 β)蛋白表达(图3B ~ 3D)。

2.4 ATRA对NF- κB 信号通路的影响

ATRA处理巨噬细胞6 h后, 相对于空白对照组, Western blot表明ATRA促进了p-NF- κB 和NF- κB 的蛋白表达(图4A、4B、4C), 细胞免疫荧光染色表明ATRA促进了巨噬细胞中p-NF- κB 的核转移, 表明NF- κB 信号通路被激活(白箭头, 图4D)。这些结果提示ATRA可能通过NF-

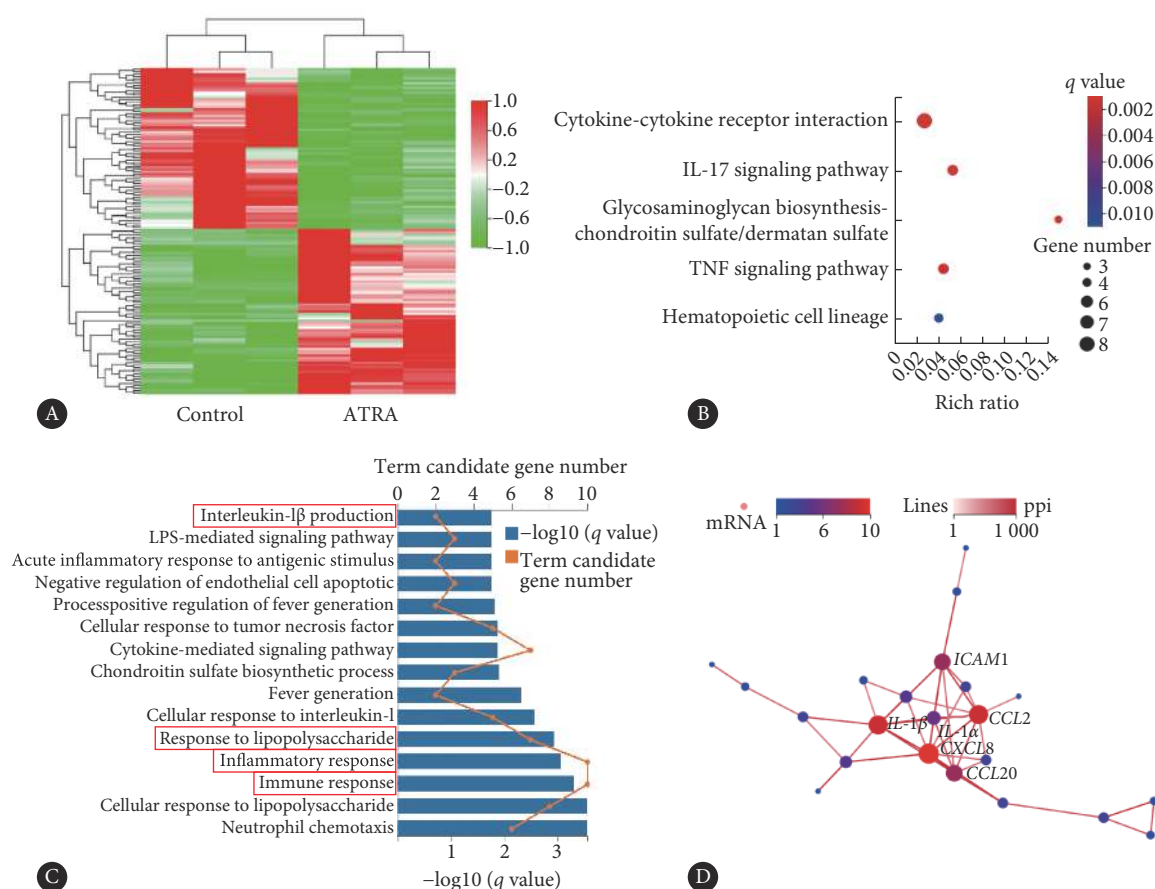


图1 差异表达基因的生物信息学分析

Fig 1 Bioinformatics analysis of differentially expressed genes (DEGs)

A: Heat map of DEGs between the control and the ATRA groups, with red representing upregulated genes and green representing downregulated genes; B-C: KEGG and GO analysis of upregulated genes; D: Protein-protein interaction networks (PPI), with labels for the top six genes ranked according to the degree of nodes.

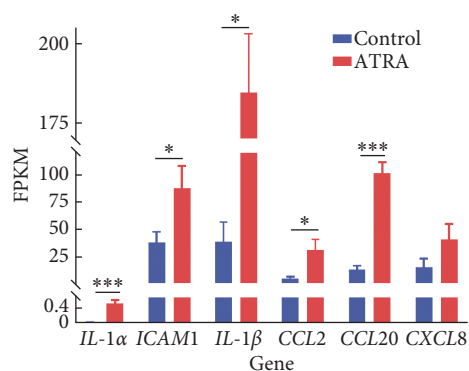


图2 PPI中核心基因的FPKM表达 (n=3)

Fig 2 FPKM of key genes represented in the PPI(n=3)

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

κ B信号通路促进炎症因子IL-1 β 的表达。

2.5 ATRA对caspase-1的影响

ATRA处理巨噬细胞24 h后, qRT-PCR显示相较于空白对照组, caspase-1 mRNA表达增加($P < 0.05$) (图5A), Western blot显示caspase-1蛋白表达也明显增加(图5B ~

5C), 表明ATRA促进了巨噬细胞中caspase-1的表达。图3B中成熟的IL-1 β 表达明显升高, 提示ATRA可能通过激活caspase-1促进成熟IL-1 β 的分泌。

3 讨论

综合本研究中的生物信息学分析和实验结果, 证明ATRA能促进巨噬细胞中IL-1 β 的表达。近年来研究表明炎症小体与IL-1 β 的产生密切相关, 初步合成的IL-1 β 是没有生物活性的前体蛋白, 经炎症小体中的caspase-1剪切成熟后才能分泌到胞外。炎症小体是一个多蛋白复合物, 包括胞质传感器、衔接蛋白和caspase-1前体(procaspase-1)^[13]。炎症小体的激活通常需要两种信号, 即启动信号和激活信号。启动信号如NF- κ B信号通路的激活会促进炎症小体的传感器、IL-1 β 和IL-18的表达上调; 激活信号会触发炎症小体的组装, 形成传感器、衔接蛋白和procaspase-1复合物, 之后procaspase-1溶解为具有酶活性的caspase-1, 活化的caspase-1剪切IL-1 β 和IL-18前体蛋白形成成熟的IL-1 β 和IL-18^[14]。本实验ATRA组中成

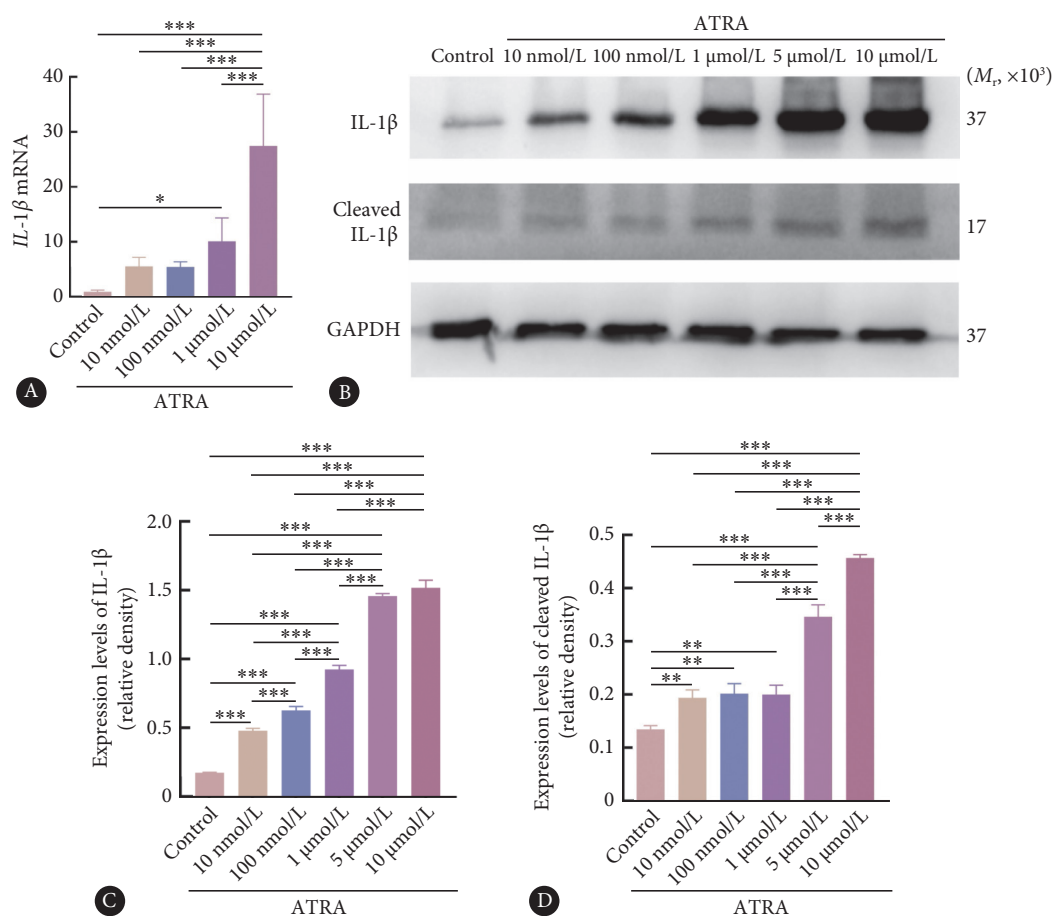


图 3 ATRA处理后巨噬细胞中IL-1β的表达 (n=3)

Fig 3 Expression of IL-1β in macrophages after ATRA treatment(n=3)

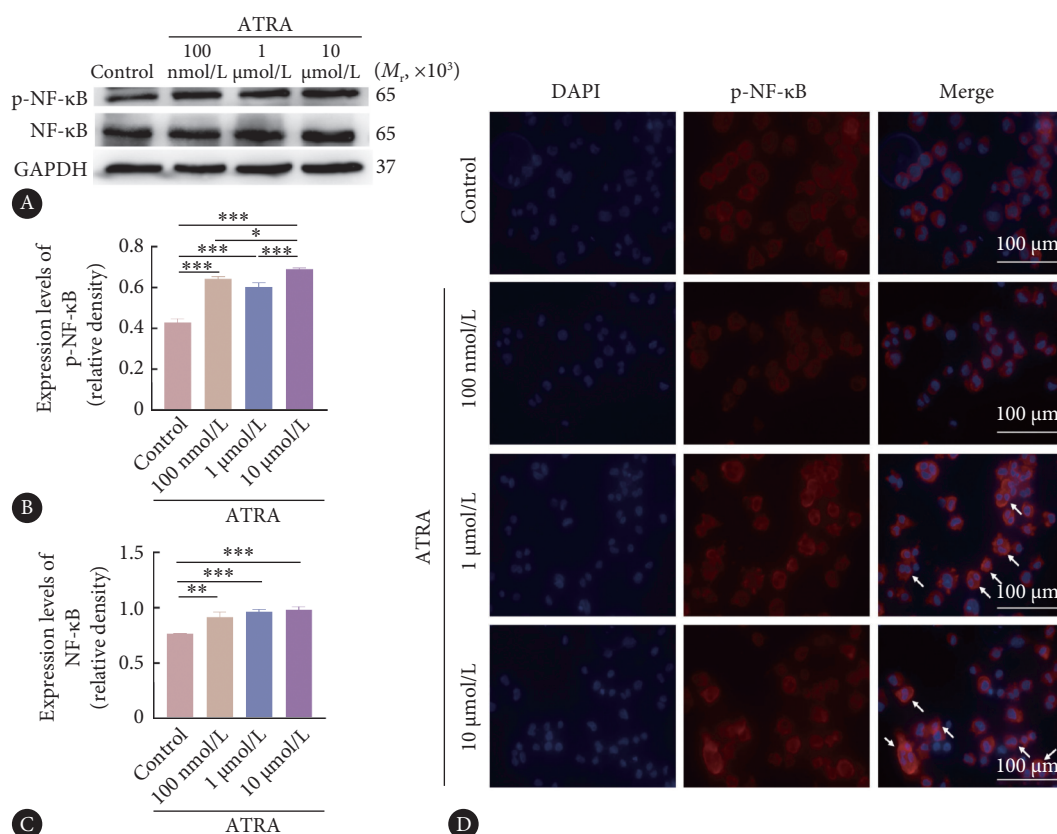
A: mRNA expression of *IL-1β* in macrophages after ATRA treatment for 24 h; B-D: Western blot and protein quantification of IL-1β and cleaved IL-1β in macrophages after ATRA treatment for 24 h. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

熟的IL-1β表达呈浓度依赖性升高, caspase-1的mRNA和蛋白表达也均明显升高, 提示ATRA可能激活了炎症小体中的caspase-1从而促进了成熟IL-1β的表达, 具体的机制尚需要后期研究。

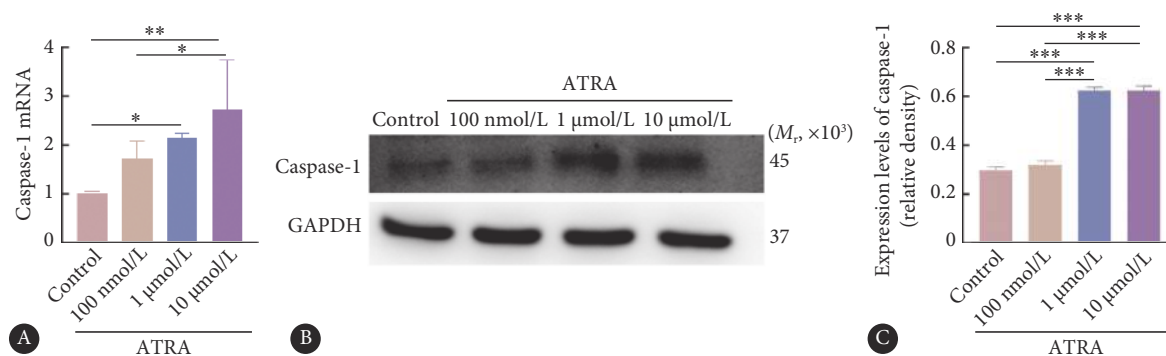
NF-κB是介导基因转录调控的蛋白家族, 在固有免疫和适应性免疫的宿主防御中发挥重要作用, 其转录活性受到多种胞内胞外信号的调控。在胞质中, NF-κB通常与NF-κB抑制蛋白(IκB)结合处于非活性状态, 受到胞外信号刺激后IκB被激活, 与NF-κB解聚, NF-κB二聚体磷酸化并发生核转移, 促进靶基因的转录^[15]。NF-κB信号通路参与多个生物学过程, 包括氧化应激、炎症因子的释放、凋亡、炎症小体的激活等, 该通路是炎症反应的主要介导者, 可调节炎症因子IL-1β、IL-6、IL-18、TNF-α的表达^[16]。本实验中ATRA组中IL-1β表达升高, NF-κB磷酸化并发生了核转移, 提示ATRA可能通过NF-κB信号通路促进了炎症因子IL-1β的表达。NLRP3炎症小体是目前研究最多的炎症小体, NLRP3来源的IL-1β是慢性无菌性炎症的主要

驱动因素。NF-κB信号通路作为炎症小体的启动信号之一可调控NLRP3的转录, 促进成熟IL-1β的表达, 一些抗炎物质通过抑制NF-κB/NLRP3炎症小体信号轴抑制IL-1β的表达, 抑制炎症反应^[17-19], 那么, ATRA是否通过NF-κB/NLRP3炎症小体信号轴促进IL-1β的表达, 本实验没有进行更深的研究, 后期需要使用NF-κB信号通路的抑制剂BAY11-7082和NLRP3炎症小体的抑制剂MCC950进一步证实。

另外, 本研究中生物信息学分析显示ATRA处理巨噬细胞后黏附分子ICAM-1表达升高, 而其他与淋巴细胞迁移相关的黏附分子如ICAM-2、VCAM-1、Mad等未见明显变化, 提示ATRA可能特异性促进ICAM-1的表达。此外, ATRA组中趋化因子CXCL8、CCL2、CCL20的log₂FC值均大于2, CCL20的log₂FC值最大, CXCL8的log₂FC值最小。趋化因子的主要作用是参与白细胞的发育、分化和迁移, 综上ATRA可能通过增加THP-1来源的巨噬细胞的趋化性促进其迁移。最后, ATRA组中炎症因

图4 ATRA对巨噬细胞中NF-κB信号通路的影响 ($n=3$)Fig 4 The effect of ATRA on NF-κB signaling pathway in macrophages($n=3$)

A-C: Western blot and protein quantification of p-NF-κB and NF-κB in macrophages after ATRA treatment for 6 h; D: Immunofluorescence images of p-NF-κB translocation in macrophages after ATRA treatment for 6 h (blue: DAPI; red: p-NF-κB; white arrows pointing to nuclear translocation of p-NF-κB); * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

图5 ATRA对巨噬细胞中caspase-1表达的影响 ($n=3$)Fig 5 The effect of ATRA on the expression of caspase-1 in macrophages($n=3$)

A: mRNA expression of caspase-1 in macrophages after ATRA treatment for 24 h; B, C: Western blot and protein quantification of caspase-1 in macrophages after ATRA treatment for 24 h. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

子IL-1 α 的表达也明显升高, IL-1 α 和IL-1 β 结构相似, 共享一个受体IL-1R1, IL-1 α 在体内的存在形式较多, 包括IL-1 α 前体、分泌型、膜型和propeiece, 因此IL-1 α 的功能也较多, 在本实验中没有进一步深入的探究。

维生素A近百年一直被认为是维持免疫系统正常功能的必要营养素, 对抵抗感染至关重要, 向孕妇和幼儿

补充维生素A甚至能降低儿童死亡率^[20]。但是, 维生素A必须代谢为ATRA才能在感染部位发挥免疫效应, 因此ATRA在免疫调节方面的作用也引起越来越多的关注。体外实验研究表明ATRA具有免疫增强作用, 在微生物感染过程中, ATRA能显著增强单核细胞中NF-κB的活性, 增加IL-1 β 和TNF- α 的表达, 促进单核细胞的促

炎症反应^[9,21]。另外, ATRA已被证明对自身免疫性疾病包括系统性红斑狼疮^[22]、溃疡性结肠炎^[23]、免疫性血小板减少症等^[24]有一定的疗效。肿瘤免疫治疗方面 ATRA 主要用于分化治疗 APL, 不可逆地改变瘤细胞的表型, 抑制肿瘤的发展, 但也有研究表明小鼠肉瘤模型中, 免疫抑制性的肿瘤微环境能诱导肿瘤细胞产生 ATRA, 促进肿瘤内单核细胞分化为免疫抑制性巨噬细胞, 从而促进肿瘤的发展^[25]。综上所述, ATRA 对于免疫系统的影响复杂, 本实验仅探究了体外生理状态下 ATRA 对巨噬细胞的作用, 在微生物等病原体存在的病理情况下以及体内实验中 ATRA 如何发挥免疫调节作用还需要进一步探索。

通过测序和体外实验, 本研究首次明确了 ATRA 呈浓度依赖性促进巨噬细胞中炎症因子 IL-1 β 的表达和分泌, 通过 Western blot 和免疫荧光染色, 本研究表明 ATRA 激活了巨噬细胞中 NF- κ B 信号和 caspase-1, 提示 ATRA 可能通过 NF- κ B 信号和 caspase-1 促进巨噬细胞中 IL-1 β 的表达, 为 ATRA 对巨噬细胞的免疫调节研究提供了实验依据。本研究局限性在于无体内实验, 课题组后续将建立动物模型, 进一步验证具体的分子学机制。

* * *

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] SZYMAŃSKI Ł, SKOPEK R, PALUSIŃSKA M, *et al.* Retinoic acid and its derivatives in skin. *Cells*, 2020, 9(12): 2660[2022-03-27]. <https://doi.org/10.3390/cells9122660>.
- [2] WANG L, ROHATGI A, WAN Y J M I E. Retinoic acid and microRNA. *Methods Enzymol*, 2020, 637: 283–308.
- [3] BROWN C, ESTERHAZY D, SARDE A, *et al.* Retinoic acid is essential for Th1 cell lineage stability and prevents transition to a Th17 cell program. *Immunity*, 2015, 42(3): 499–511.
- [4] MARTINO O, WELCH J. Retinoic acid receptors in acute myeloid leukemia therapy. *Cancers*, 2019, 11(12): 1915[2022-03-27]. <https://doi.org/10.3390/cancers11121915>.
- [5] STAHL M, TALLMAN M S. Differentiation syndrome in acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 2019, 187(2): 157–162.
- [6] ALBANESI J, NOGUERA N, BANELLA C, *et al.* Transcriptional and metabolic dissection of atra-induced granulocytic differentiation in nb4 acute promyelocytic leukemia cells. *Cells*, 2020, 9(11): 2423[2022-03-27]. <http://dx.doi.org/10.3390/cells9112423>.
- [7] DUNOYER-GEINDRE S, RIVIER-CORDEY A, TSOPRA O, *et al.* Effect of ATRA and ATO on the expression of tissue factor in NB4 acute promyelocytic leukemia cells and regulatory function of the inflammatory cytokines TNF and IL-1 β . *Ann Hemato*, 2017, 96(6): 905–917.
- [8] BABINA M, GUHL S, MOTAKIS E, *et al.* Retinoic acid potentiates inflammatory cytokines in human mast cells: identification of mast cells as prominent constituents of the skin retinoid network. *Mol Cellular Endocrinol*, 2015, 406: 49–59.
- [9] CHO H, CHOI E, LEE S, *et al.* All-trans retinoic acid induces TLR-5 expression and cell differentiation and promotes flagellin-mediated cell functions in human THP-1 cells. *Immunol Lett*, 2011, 136(1): 97–107.
- [10] KANEKO N, KURATA M, YAMAMOTO T, *et al.* The role of interleukin-1 in general pathology. *Inflamm Regen*, 2019, 39: 12[2022-03-27]. <http://dx.doi.org/10.1186/s41232-019-0101-5>.
- [11] JAMBROVICS K, URAY I, KERESZTESZY Z, *et al.* Transglutaminase 2 programs differentiating acute promyelocytic leukemia cells in all-trans retinoic acid treatment to inflammatory stage through NF- κ B activation. *Haematologica*, 2019, 104(3): 505–515.
- [12] MOHAMMADZADEH Z, OMIDKHODA A, CHAHARDOULI B, *et al.* The impact of ICAM-1, CCL2 and TGM2 gene polymorphisms on differentiation syndrome in acute promyelocytic leukemia. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 46[2022-03-27]. <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-021-07783-y>.
- [13] DUEZ H, POURCET B J F I E. Nuclear receptors in the control of the nlrp3 inflammasome pathway. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 630536[2022-03-27]. <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2021.630536>.
- [14] SCHWAID A, SPENCER K B. Strategies for targeting the NLRP3 inflammasome in the clinical and preclinical space. *J Med Chem*, 2021, 64(1): 101–122.
- [15] BARNABEI L, LAPLANTINE E, MBONGO W, *et al.* NF- κ B: At the borders of autoimmunity and inflammation. *Front Immunol*, 2021, 12: 716469[2022-03-27]. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2021.716469>.
- [16] WEN L, SUN W, XIA D, *et al.* The m6A methyltransferase METTL3 promotes LPS-induced microglia inflammation through TRAF6/NF- κ B pathway. *Neuroreport*, 2020, 33(6): 243–251.
- [17] CHEN S, LI Y, CHU B, *et al.* *Lactobacillus johnsonii* L531 alleviates the damage caused by typhimurium via inhibiting TLR4, NF- κ B, and NLRP3 inflammasome signaling pathways. *Microorganisms*, 2021, 9(9): 1983[2022-03-27]. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9091983>.
- [18] DU X, QUE W, HU X, *et al.* Oridonin prolongs the survival of mouse cardiac allografts by attenuating the NF- κ B/NLRP3 pathway. *Front Immunol*, 2021, 12: 719574[2022-03-27]. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2021.719574>.
- [19] HUANG J, AN Q, JU B, *et al.* Role of vitamin D/VDR nuclear translocation in down-regulation of NF- κ B/NLRP3/caspase-1 axis in lupus nephritis. *Int Immunopharmacol*, 2021, 100: 108131[2022-03-27]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108131>.
- [20] XAVIER-ELSAS P, VIEIRA B, MASID-DE-BRITO D, *et al.* The need to

- consider context in the evaluation of anti-infectious and immunomodulatory effects of vitamin A and its derivatives. *Curr Drug Targets*, 2019, 20(8): 871–878.
- [21] HOANG T, JUNG J, KIM J J B R I. All-Trans retinoic acid enhances bacterial flagellin-stimulated proinflammatory responses in human monocyte THP-1 cells by upregulating CD14. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 8059312[2022-03-27]. <http://dx.doi.org/10.1155/2019/8059312>.
- [22] CHU Y, ZHAO C, ZHANG B, *et al*. Restoring T-helper 17 cell/regulatory T-cell balance and decreasing disease activity by rapamycin and all-trans retinoic acid in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 2019, 28(12): 1397–1406.
- [23] RAFA H, BENKHELIFA S, AITYOUNES S, *et al*. All-trans retinoic acid modulates TLR4/NF- κ B signaling pathway targeting TNF- α and nitric oxide synthase 2 expression in colonic mucosa during ulcerative colitis and colitis associated cancer. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017: 7353252[2022-03-27]. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/7353252>.
- [24] HUANG Q, LIU Y, WANG J, *et al*. All-trans retinoic acid plus high-dose dexamethasone as first-line treatment for patients with newly diagnosed immune thrombocytopenia: A multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Haematol*, 2021, 8(10): e688–e699.
- [25] DEVALARAJA S, TO T, FOLKERT I, *et al*. Tumor-derived retinoic acid regulates intratumoral monocyte differentiation to promote immune suppression. *Cell*, 2020, 180(6): 1098–1114.e16.
- (2021 – 12 – 20收稿, 2022 – 03 – 28修回)
- 编辑 汤 洁