

细胞外组蛋白通过激活 TWIK2-NLRP3 通路参与脂多糖诱导的肺泡巨噬细胞损伤

孙梦^{1,2} 江雪梅² 金杨² 杨华³ 陈昶⁴ 吕欣² 温宗梅^{1,2}

¹南昌大学,江西南昌 330006; ²同济大学附属上海市肺科医院麻醉科 200433; ³同济大学附属上海市肺科医院结核重点实验室 200433; ⁴同济大学附属上海市肺科医院胸外科 200433

通信作者:温宗梅, Email: wzm1103@126.com

【摘要】 目的 探讨细胞外组蛋白参与脂多糖(LPS)诱导的肺泡巨噬细胞损伤的作用及机制。**方法** 体外培养小鼠肺泡巨噬细胞株(MH-S)并传代,取融合生长至 80% 时的细胞进行实验,用 1 mg/L 的 LPS 刺激细胞 3 h 后以 50 mg/L 的外源性组蛋白分别刺激细胞 3、6、12、24 h (LPS + 组蛋白 3、6、12、24 h 组),并设磷酸盐缓冲液(PBS)对照组(PBS 组)、LPS 单独刺激组(LPS 组)、外源性组蛋白单独刺激组(组蛋白组)及肝素预处理组蛋白组(肝素 + LPS + 组蛋白组)。各组细胞经相应处理后,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测上清液中乳酸脱氢酶(LDH)及炎症因子表达,用 FluxOR™ II 绿色钾离子通道检测试剂盒检测细胞内 K⁺ 浓度,采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)测定钾离子通道蛋白(TWIK2)、炎症小体(NLRP3)及凋亡相关斑点样蛋白(ASC)的表达。**结果** 与 PBS 组比较,单用 LPS 刺激可使 LDH 及白细胞介素(IL-1 β 、IL-18)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等炎症因子水平显著升高。与 LPS 组比较,加用外源性组蛋白处理后 LDH 及炎症因子水平显著升高,当组蛋白刺激时间为 3 h 时达到峰值[LDH (U/L): 123.10 $\pm$ 1.83 比 85.32 $\pm$ 1.66, IL-1 β (mg/L): 40.75 $\pm$ 2.60 比 18.78 $\pm$ 1.37, IL-18 (mg/L): 49.94 $\pm$ 2.45 比 30.19 $\pm$ 1.82, TNF- α (mg/L): 36.51 $\pm$ 1.56 比 20.84 $\pm$ 1.61, 均 $P < 0.01$]。Western Blot 结果显示,与 LPS 组比较,NLRP3、ASC 及 TWIK2 蛋白在 LPS + 组蛋白组表达均明显上调(NLRP3/GAPDH: 0.80 $\pm$ 0.02 比 0.57 $\pm$ 0.02, ASC/GAPDH: 0.57 $\pm$ 0.02 比 0.38 $\pm$ 0.01, TWIK2/GAPDH: 0.65 $\pm$ 0.01 比 0.41 $\pm$ 0.01, 均 $P < 0.01$),而肝素预处理后上述蛋白表达均明显下调(NLRP3/GAPDH: 0.28 $\pm$ 0.02 比 0.80 $\pm$ 0.02, ASC/GAPDH: 0.25 $\pm$ 0.02 比 0.57 $\pm$ 0.02, TWIK2/GAPDH: 0.35 $\pm$ 0.01 比 0.65 $\pm$ 0.01, 均 $P < 0.01$),表明组蛋白可通过 TWIK2 活化 NLRP3 参与炎症反应。此外, LPS + 组蛋白组细胞内 K⁺ 浓度较 LPS 组明显下降(荧光强度: 35.48 $\pm$ 2.53 比 83.92 $\pm$ 3.11, $P < 0.01$);与 LPS + 组蛋白组比较,给予肝素预处理后 K⁺ 浓度明显上升(荧光强度: 72.10 $\pm$ 1.78 比 35.48 $\pm$ 2.53, $P < 0.01$),表明细胞外组蛋白可通过 TWIK2 致 K⁺ 大量外流从而介导 NLRP3 活化参与肺泡巨噬细胞炎症损伤。**结论** 细胞外组蛋白可致肺泡巨噬细胞炎症损伤,其作用机制可能与细胞外组蛋白激活 TWIK2 通道促进 K⁺ 外流从而活化 NLRP3 有关。

【关键词】 脓毒症; 细胞外组蛋白; 肺损伤; 炎症

基金项目:上海市自然科学基金(19ZR1443000);上海市临床发展学科建设项目(2017-2)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20191113-00036

Extracellular histones are involved in lipopolysaccharide-induced alveolar macrophage injury by activating the TWIK2-NLRP3 pathway

Sun Meng^{1,2}, Jiang Xuemei², Jin Yang², Yang Hua³, Chen Chang⁴, Lyu Xin², Wen Zongmei^{1,2}

¹Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China; ²Department of Anesthesiology, Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200433, China; ³Shanghai Key Laboratory of Tuberculosis, Clinic and Research Center of Tuberculosis, Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200433, China; ⁴Department of Thoracic Surgery, Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200433, China

Corresponding author: Wen Zongmei, Email: wzm1103@126.com

【Abstract】 Objective To explore the role and mechanism of extracellular histones involved in lipopolysaccharide (LPS)-induced alveolar macrophage injury. **Methods** The mouse alveolar macrophage cell line (MH-S) was cultured *in vitro* and passaged, and the cells were cultured to 80% of cells for cell proliferation. The cells were stimulated with 1 mg/L LPS for 3 hours and 50 mg/L exogenous histones for 3, 6, 12, and 24 hours, respectively (LPS+histones 3, 6, 12, 24 h groups), and other groups included phosphate buffered saline (PBS) control group (PBS group), LPS alone stimulation group (LPS group), the exogenous histones alone stimulation group (histones group) and heparin pretreatment histones group (heparin+LPS+histones group). The cells in each group were challenged with different reagent, the expression of lactate dehydrogenase (LDH) and inflammatory factors in the supernatant were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and the change of intracellular K⁺ concentration was detected by FluxOR™ II green potassium channel. The proteins such as potassium channel protein (TWIK2), inflammasome (NLRP3), and apoptosis associated speck like protein containing a CARD (ASC) were determined by Western Blot. **Results** Compared with the PBS group, the levels of LDH and inflammatory factors such as interleukin (IL-1 β ,

IL-18) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were significantly increased after LPS stimulation group. Compared with the LPS group, the levels of LDH and inflammatory factors were significantly increased after the treatment with exogenous histones, and reached a peak after 3 hours of the histones stimulation [LDH (U/L): 123.10 ± 1.83 vs. 85.32 ± 1.66 , IL-1 β (mg/L): 40.75 ± 2.60 vs. 18.78 ± 1.37 , IL-18 (mg/L): 49.94 ± 2.45 vs. 30.19 ± 1.82 , TNF- α (mg/L): 36.51 ± 1.56 vs. 20.84 ± 1.61 , all $P < 0.01$]. Western Blot results showed that compared with the LPS group, NLRP3, ASC and TWIK2 protein expression were significantly up-regulated in the LPS+histones group (NLRP3/GAPDH: 0.80 ± 0.02 vs. 0.57 ± 0.02 , ASC/GAPDH: 0.57 ± 0.02 vs. 0.38 ± 0.01 , TWIK2/GAPDH: 0.65 ± 0.01 vs. 0.41 ± 0.01 , all $P < 0.01$), and the expression of the above proteins were significantly down-regulated after heparin pretreatment (NLRP3/GAPDH: 0.28 ± 0.02 vs. 0.80 ± 0.02 , ASC/GAPDH: 0.25 ± 0.02 vs. 0.57 ± 0.02 , TWIK2/GAPDH: 0.35 ± 0.01 vs. 0.65 ± 0.01 , all $P < 0.01$), indicating that histones could activate NLRP3 through TWIK2 to participate in inflammatory reaction. In addition, intracellular K^+ concentration in LPS+histones group decreased significantly compared with the LPS group (fluorescence intensity: 35.48 ± 2.53 vs. 83.92 ± 3.11 , $P < 0.01$). Compared with LPS+histones group, K^+ concentration increased significantly after pretreatment with heparin (fluorescence intensity: 72.10 ± 1.78 vs. 35.48 ± 2.53 , $P < 0.01$), indicating that extracellular histones could cause K^+ massive efflux through TWIK2, and thus mediate NLRP3 activation and participate in inflammatory injury of alveolar macrophages. **Conclusion** Extracellular histones can cause inflammatory damage in alveolar macrophages, and its mechanism may be related to the activation of NLRP3 by extracellular histones activation of TWIK2 channel to promote K^+ efflux.

【Key words】 Sepsis; Extracellular histone; Lung injury; Inflammatory

Fund program: Science and Technology Commission of Shanghai Municipality of China (19ZR1443000); Shanghai Clinical Development Discipline Construction Project of China (2017-2)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20191113-00036

组蛋白是真核生物体细胞染色质中高度保守的带碱性的阳离子蛋白,在DNA相关活动中具有重要作用^[1]。当细胞受到各种损伤或刺激时,细胞内的组蛋白可释放到细胞外空间成为细胞外组蛋白。近年来有研究表明,细胞外组蛋白具有细胞毒性、促炎作用以及促进血小板聚集等特性,从而参与多种疾病的发生^[2]。2009年Xu等^[3]首次发现细胞外组蛋白是一种新的损伤相关分子模式(DAMP)分子。大量研究显示,脓毒症及肺损伤等患者血浆中细胞外组蛋白水平明显升高,表明细胞外组蛋白在脓毒症、肺损伤等疾病的发生发展过程中扮演着重要的角色^[4-5]。肺泡巨噬细胞在肺损伤的急性/初始阶段中起着关键作用,使其成为潜在的治疗靶点^[6],因此,针对肺泡巨噬细胞进行研究,对阐明肺损伤的具体分子机制至关重要。

炎症小体(NLRP3)是负责激活炎症反应的多蛋白细胞内复合物,被认为是微生物和其他危险信号的传感器,多项研究表明它与多种炎症性疾病和器官损伤相关^[7]。有研究者指出,细胞外组蛋白可激活NLRP3使其活化从而参与多种炎症性损伤相关疾病^[8]。虽然活性氧(ROS)、线粒体和溶酶体损伤、大细胞膜孔的形成和细胞内 Ca^{2+} 的增加可能导致NLRP3活化,但有研究表明,细胞内 K^+ 大量外流至细胞外导致细胞内 K^+ 含量大量降低是诱导NLRP3活化的必要触发因素^[9]。因此,本研究旨在探讨细胞外组蛋白在脂多糖(LPS)诱导的肺泡巨噬细胞炎症损伤中的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂:小鼠来源的肺泡巨噬细胞株(MH-S)购自上海斯信生物科技有限公司。0.25%胰蛋白酶、RPMI 1640培养液、青霉素/链霉素购自美国Hyclone公司;肝素钠购自上海万邦生化有限公司;LPS、重组小牛胸腺组蛋白购自美国Sigma公司;FluxOR™ II绿色钾离子通道检测试剂盒购自美国ThermoFisher公司;钾离子通道蛋白(TWIK2)抗体购自美国Santa公司;NLRP3及凋亡相关斑点样蛋白(ASC)抗体购自美国Adipogen公司;3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)抗体、抗兔辣根过氧化物酶(HRP)二抗及抗鼠HRP二抗购自美国CST公司;BCA蛋白定量试剂盒及细胞蛋白抽提试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒购自美国Abcam公司;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒购自上海欣博盛公司。

1.2 肺泡巨噬细胞培养:小鼠来源的MH-S细胞株经胰蛋白酶消化后接种于培养皿中,加入10 mL含10%胎牛血清的RPMI 1640完全培养液,置于5% CO_2 、37℃培养箱中培养,待细胞融合生长至培养皿的80%时,加入完全培养液终止消化融合,用于后续实验。

1.3 实验分组及处理:①将小鼠来源的MH-S细胞株分为7组:1 mg/L的LPS刺激细胞3 h后以50 mg/L的外源性组蛋白分别刺激细胞3、6、12、24 h (LPS+组蛋白3、6、12、24 h组),并设磷酸盐缓冲液(PBS)对照组(PBS组)、LPS单独刺激组(LPS组)及

外源性组蛋白单独刺激组(组蛋白组),观察细胞上清液中 LDH 及炎症因子的动态变化,确定组蛋白的最佳刺激时间为 3 h。② 将小鼠来源的 MH-S 细胞株分为 5 组:PBS 组、1 mg/L LPS 单独刺激 3 h 组(LPS 组)、50 mg/L 外源性组蛋白单独刺激 3 h 组(组蛋白组)、1 mg/L 的 LPS 刺激细胞 3 h 后以 50 mg/L 外源性组蛋白刺激 3 h 组(LPS + 组蛋白组)、肝素预处理组蛋白组(肝素 + LPS + 组蛋白组; 1×10^5 U/L 普通肝素预处理 30 min 后,用 1 mg/L 的 LPS 刺激细胞 3 h,再以 50 mg/L 外源性组蛋白刺激 3 h),观察组蛋白参与 LPS 诱导肺泡巨噬细胞损伤的具体机制。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 LDH 检测:将 MH-S 细胞按每孔 1×10^4 个接种于 96 孔培养板中,根据细胞分组给予相应刺激,每孔加入 50 μ L LDH 反应混合液,室温避光孵育 1 h,用酶标仪测定波长 450 nm 处的吸光度(A)值。

1.4.2 炎症因子检测:将 MH-S 细胞按每孔 1×10^6 个接种于 6 孔培养板中,根据细胞分组给予相应刺激后收集上清液,用 ELISA 试剂盒检测上清液中白细胞介素(IL-1 β 、IL-18)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平,按照试剂盒说明书步骤操作。

1.4.3 细胞内 K⁺ 浓度检测:将 MH-S 细胞按每孔 1×10^4 个接种于 96 孔培养板中,根据细胞分组给予相应刺激,按照 FluxOR™ II 绿色钾离子通道检测试剂盒说明书步骤进行检测,每孔中加入 80 μ L 的 $1 \times$ 上样缓冲液,将细胞于 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min。去除上样缓冲液,每孔中加入 80 μ L 的分析缓冲液进行替换。使用标准异硫氰酸荧光素(FITC)绿色滤光片设置仪器或将激发波长设置为 488 nm,发射波长设置为 520 nm。记录 10 s 后,以 1:5 的最终稀释度向每孔细胞中加入钾通道刺激缓冲液 20 μ L,读板。

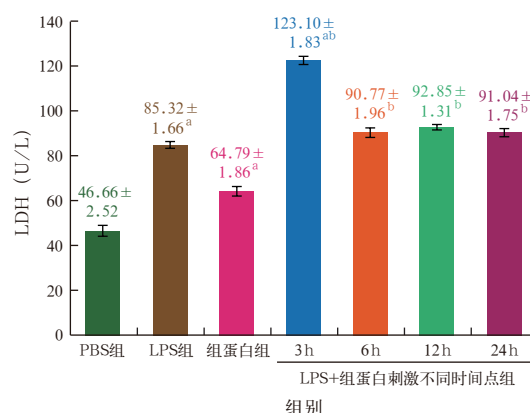
1.4.4 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测 TWIK2、NLRP3 及 ASC 表达:将培养好的 MH-S 细胞分组给予相应刺激后,提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,用 RIPA 裂解液将各蛋白调整至相同浓度;蛋白变性,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电转印至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上;用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h;加入 TWIK2(1:100)、NLRP3(1:1000)、ASC(1:1000)或 GAPDH(1:1000)一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;加入 HRP 标记的羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG, 1:1000)或羊抗鼠 IgG(1:1000)二抗室温孵育 1 h,加入发光液,电化学发光(ECL)法进行曝光;用 Image J 图像分析软件进行定量分

析,测定各蛋白电泳条带灰度值,以目的蛋白与内参 GAPDH 的灰度值比值代表蛋白表达量。

1.5 统计学分析:所有实验均重复 6 次取平均值,使用 GraphPad Prism v7 软件进行统计学处理。实验结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞外组蛋白对 LPS 诱导 MH-S 细胞损伤后 LDH 水平的影响(图 1):与 PBS 组相比,经 LPS 刺激后及单独给予外源性组蛋白后上清液中 LDH 水平明显升高(均 *P* < 0.01)。与 LPS 组比较,加用外源性组蛋白刺激后各时间点上清液中 LDH 水平均明显升高(均 *P* < 0.01),当组蛋白刺激时间为 3 h 时,LDH 升高最为显著。



注:PBS 为磷酸盐缓冲液, LPS 为脂多糖, LDH 为乳酸脱氢酶;与 PBS 组比较, ^a*P* < 0.01; 与 LPS 组比较, ^b*P* < 0.01

图 1 各组小鼠来源的肺泡巨噬细胞株(MH-S)上清液中 LDH 水平比较

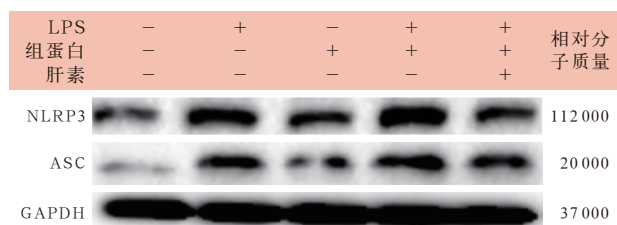
2.2 细胞外组蛋白对 LPS 诱导 MH-S 细胞损伤后炎症因子水平的影响(表 1):与 PBS 组相比, LPS 组细胞上清液中 IL-1 β 、IL-18 及 TNF- α 水平均明显升高(均 *P* < 0.01)。与 LPS 组比较,加用外源性组蛋白刺激后可使细胞上清液中炎症因子水平明显升高(均 *P* < 0.01),其中组蛋白作用 3 h 时炎症因子升高最为明显,说明组蛋白作用 3 h 时具有更强的炎症损伤作用,故后续采用组蛋白刺激 3 h 进行实验。

2.3 细胞外组蛋白对 LPS 诱导 MH-S 细胞损伤后 NLRP3 及 ASC 表达的影响(图 2; 表 2):与 LPS 组相比, LPS 加组蛋白刺激 3 h 后 NLRP3 及 ASC 蛋白表达均明显上调(均 *P* < 0.01);而肝素预处理后 NLRP3 及 ASC 蛋白表达明显下调(均 *P* < 0.01)。表明组蛋白可介导 NLRP3 活化从而加重炎症损伤。

表 1 各组小鼠来源的肺泡巨噬细胞株 MH-S 上清液中炎症因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (个)	炎症因子 (mg/L)		
		IL-1 β	IL-18	TNF- α
PBS 组	6	6.68 $\pm$ 0.87	13.02 $\pm$ 1.66	9.69 $\pm$ 1.27
LPS 组	6	18.78 $\pm$ 1.37 ^a	30.19 $\pm$ 1.82 ^a	20.84 $\pm$ 1.61 ^a
组蛋白组	6	15.71 $\pm$ 1.39	21.79 $\pm$ 1.62	16.90 $\pm$ 1.42
LPS + 组蛋白 3 h 组	6	40.75 $\pm$ 2.60 ^{ab}	49.94 $\pm$ 2.45 ^{ab}	36.51 $\pm$ 1.56 ^{ab}
LPS + 组蛋白 6 h 组	6	33.08 $\pm$ 2.46 ^{ab}	43.04 $\pm$ 1.94 ^{ab}	27.86 $\pm$ 1.45 ^{ab}
LPS + 组蛋白 12 h 组	6	33.80 $\pm$ 2.14 ^{ab}	43.83 $\pm$ 2.08 ^{ab}	27.76 $\pm$ 1.16 ^{ab}
LPS + 组蛋白 24 h 组	6	33.97 $\pm$ 2.94 ^{ab}	43.99 $\pm$ 2.09 ^{ab}	27.93 $\pm$ 1.16 ^{ab}

注: PBS 为磷酸盐缓冲液, LPS 为脂多糖, IL-1 β 为白细胞介素-1 β , IL-18 为白细胞介素-18, TNF- α 为肿瘤坏死因子- α ; 与 PBS 组比较, ^a P <0.01; 与 LPS 组比较, ^b P <0.01



LPS 为脂多糖, NLRP3 为炎症小体, ASC 为凋亡相关斑点样蛋白, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图 2 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测各组小鼠来源的巨噬细胞株 (MH-S) NLRP3、ASC 蛋白表达

表 2 各组小鼠来源的肺泡巨噬细胞株 MH-S 中 NLRP3、ASC、TWIK2 蛋白表达以及细胞内 K⁺ 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

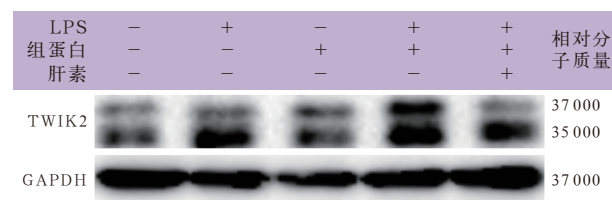
组别	样本数 (个)	NLRP3/ GAPDH	ASC/ GAPDH
PBS 组	6	0.23 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01
LPS 组	6	0.57 $\pm$ 0.02 ^a	0.38 $\pm$ 0.01 ^a
组蛋白组	6	0.30 $\pm$ 0.02 ^b	0.24 $\pm$ 0.01 ^b
LPS + 组蛋白组	6	0.80 $\pm$ 0.02 ^{ab}	0.57 $\pm$ 0.02 ^{ab}
肝素 + LPS + 组蛋白组	6	0.28 $\pm$ 0.02 ^d	0.25 $\pm$ 0.02 ^d

组别	样本数 (个)	TWIK2/ GAPDH	细胞内 K ⁺ (荧光强度)
PBS 组	6	0.15 $\pm$ 0.01	95.80 $\pm$ 2.58
LPS 组	6	0.41 $\pm$ 0.01 ^a	83.92 $\pm$ 3.11 ^a
组蛋白组	6	0.23 $\pm$ 0.02	91.56 $\pm$ 1.12 ^c
LPS + 组蛋白组	6	0.65 $\pm$ 0.01 ^{ab}	35.48 $\pm$ 2.53 ^{ab}
肝素 + LPS + 组蛋白组	6	0.35 $\pm$ 0.01 ^d	72.10 $\pm$ 1.78 ^d

注: PBS 为磷酸盐缓冲液, LPS 为脂多糖, NLRP3 为炎症小体, ASC 为凋亡相关斑点样蛋白, TWIK2 为钾离子通道蛋白, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 与 PBS 组比较, ^a P <0.01; 与 LPS 组比较, ^b P <0.01, ^c P <0.05; 与 LPS + 组蛋白组比较, ^d P <0.01

2.4 细胞外组蛋白对 LPS 诱导 MH-S 细胞损伤后细胞内 K⁺ 水平及 TWIK2 蛋白表达的影响 (表 2; 图 3): 与 LPS 组相比, LPS 加组蛋白刺激 3 h 后细胞内 K⁺ 水平明显下降 (P <0.01); 当给予肝素预处理后, 细胞内 K⁺ 水平明显升高 (P <0.01)。表明细胞外组蛋白可诱导细胞内 K⁺ 大量外流, 而肝素可减少细胞外组蛋白诱导的细胞内 K⁺ 外流。

LPS 加组蛋白刺激 3 h 后 TWIK2 蛋白表达较 LPS 组明显上调 (P <0.01); 而给予肝素预处理后 TWIK2 蛋白表达明显下调 (P <0.01)。表明细胞外组蛋白可激活 TWIK2 通道蛋白从而促进 K⁺ 大量外流。



LPS 为脂多糖, TWIK2 为钾离子通道蛋白, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图 3 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测各组小鼠来源的巨噬细胞株 (MH-S) TWIK2 蛋白表达

3 讨论

组蛋白是一组带正电荷的碱性阳离子蛋白, 1884 年由 Albrecht Kossel 首次发现, 其是染色质的基本组成成分^[1, 10-11]。当细胞受到损伤或坏死时, 细胞内组蛋白释放到细胞外空间成为细胞外组蛋白后, 不仅在炎症反应中发挥重要作用, 而且在组织损伤、凝血系统及免疫系统等方面有巨大作用^[1, 11]。Xu 等^[3]通过模拟脓毒症模型发现, 在体内实验中组蛋白可导致中性粒细胞边缘化, 肺泡内出血, 大血管和微血管血栓的形成; 在体外实验中 H3 和 H4 型组蛋白是损伤内皮细胞及促进炎症因子释放的主要作用分子, 而给予组蛋白抗体能减少 LPS、TNF- α 的释放以及改善盲肠结扎穿孔术 (CLP) 所致的脓毒症。

NLRP3 是一种胞质内模式识别受体, 微生物和内源性危险信号可使 NLRP3 激活, 与 ASC 形成炎症小体, 导致天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1 (caspase-1) 的活化, 从而促进炎症因子释放和导致细胞死亡^[12]。Allam 等^[8]通过建立坏死细胞诱导的中粒细胞浸润模型发现, 组蛋白诱导中粒细胞释放依赖于 NLRP3 的活化, 向 NLRP3 缺失的小鼠腹腔内注射组蛋白, 可显著减弱组蛋白诱导的 IL-1 β 产生和中性粒细胞募集, 说明细胞外组蛋白可作为 NLRP3 的激动剂, 促进炎症性损伤。有研究显示, 细胞内 K⁺ 大量外流导致细胞内 K⁺ 含量大量降低是诱导 NLRP3 活化的必要触发因素^[9]。三磷酸腺苷 (ATP) 和其他 DAMP 可引发 K⁺ 大量外流后导致细胞内 K⁺ 含量大量降低, 诱发 NLRP3 活化后介导 caspase-1 活化和 IL-1b 的释放, 从而激活炎症反应^[13]。而对于作为 DAMP 的细胞外组蛋白是否可引起 K⁺ 外流而诱导 NLRP3 活化造成炎症损伤鲜

见报道。肝素是临床中常见的抗凝剂,但其也有很强的抗炎作用,其机制可能与结合组蛋白有关^[14],因此本研究设置了肝素预处理组对组蛋白进行干预。结果显示,细胞外组蛋白可明显升高 LPS 诱导 MH-S 细胞损伤后的炎性因子水平,且 NLRP3 表达也明显升高;通过检测细胞内 K^+ 浓度发现,组蛋白能诱导细胞内 K^+ 大量外流从而诱导 NLRP3 活化加重细胞炎症损伤;而肝素能改善因组蛋白引起 K^+ 外流所致的炎症损伤。

TWIK2(由 Kcnk6 编码)是双孔结构域 K^+ 通道家族(K2P 6.1)的成员,其产生弱内 K^+ 电流,负责稳定负静息膜电位和平衡去极化^[15]。有研究表明,巨噬细胞中的 K^+ 外排通道 TWIK2 在激活 NLRP3 炎性体并在介导炎症方面具有基础作用,因此参与由 PAMP 诱导的炎症调节^[16]。为了探讨 K^+ 是否通过 TWIK2 蛋白分子大量外流引起 NLRP3 的活化,我们检测了相关蛋白的表达,结果显示,给予组蛋白刺激后 TWIK2 明显上调,肝素预处理后蛋白表达明显下调,表明细胞外组蛋白可触发 TWIK2 通道 K^+ 外流促使 NLRP3 活化参与肺损伤,而肝素能减轻损伤。

既往研究表明,细胞外组蛋白的直接致细胞毒性作用可致 Ca^{2+} 大量内流从而导致细胞损伤^[3, 17],但细胞外组蛋白是否可致 K^+ 大量外流而造成细胞损伤鲜见研究报道。因此我们猜测,细胞外组蛋白的直接致细胞毒性是否也可导致 K^+ 含量变化从而损伤细胞? 本研究显示,组蛋白能诱导细胞内 K^+ 大量外流而致细胞内 K^+ 浓度大量降低。穿过质膜的 K^+ 流出被认为是诱导 NLRP3 炎性体激活的必要触发因素^[9],但具体的流出通道蛋白仍未阐明,而我们进一步研究发现,细胞外组蛋白可通过 TWIK2 通道蛋白大量排出 K^+ 诱发炎症反应。另有研究表明,溶酶体中的 TWIK2 活化可能是 NLRP3 炎性体激活的替代途径^[18],这为本研究结果提供了依据。有研究者认为, TWIK2 是巨噬细胞中炎症反应的关键调节因子,对 TWIK2 进行阻断可有效降低炎症反应^[9]。本研究中针对组蛋白给予肝素预处理也可有效降低 TWIK2 的表达,从而验证了细胞外组蛋白激活 TWIK2 通道促进 K^+ 外流活化 NLRP3 参与炎症损伤的机制。

综上所述,本研究表明,细胞外组蛋白可激活 TWIK2 通道促进 K^+ 外流从而活化 NLRP3 诱导肺巨噬细胞的炎症损伤,为进一步深入探讨细胞外组蛋白在肺损伤的相关机制提供了新的研究思路,

也为临床治疗炎症损伤提供一些见解。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hoeksema M, Van Eijk M, Haagsman HP, et al. Histones as mediators of host defense, inflammation and thrombosis [J]. *Future Microbiol*, 2016, 11 (3): 441–453. DOI: 10.2217/fmb.15.151.
- [2] Silk E, Zhao H, Weng H, et al. The role of extracellular histone in organ injury [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8 (5): e2812. DOI: 10.1038/cddis.2017.52.
- [3] Xu J, Zhang X, Pelayo R, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis [J]. *Nat Med*, 2009, 15 (11): 1318–1321. DOI: 10.1038/nm.2053.
- [4] Cheng Z, Abrams ST, Alhamdi Y, et al. Circulating histones are major mediators of multiple organ dysfunction syndrome in acute critical illnesses [J]. *Crit Care Med*, 2019, 47 (8): e677–e684. DOI: 10.1097/CCM.0000000000003839.
- [5] 卢年芳, 姜利, 朱波, 等. 血浆组蛋白预测脓毒症患者的预后价值 [J]. *中华危重病急救医学*, 2019, 31 (6): 674–679. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.06.003.
- [6] Lu NF, Jiang L, Zhu B, et al. Prediction value of plasma histone in prognosis of sepsis patients [J]. *Chin Crit Care Med*, 2019, 31 (6): 674–679. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.06.003.
- [7] Liu H, He Y, Lu C, et al. Efficacy of pulmonary transplantation of engineered macrophages secreting IL-4 on acute lung injury in C57BL/6J mice [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10 (9): 664. DOI: 10.1038/s41419-019-1900-y.
- [8] Wang S, Li Y, Fan J, et al. Interleukin-22 ameliorated renal injury and fibrosis in diabetic nephropathy through inhibition of NLRP3 inflammasome activation [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8 (7): e2937. DOI: 10.1038/cddis.2017.292.
- [9] Allam R, Darisipudi MN, Tschopp J, et al. Histones trigger sterile inflammation by activating the NLRP3 inflammasome [J]. *Eur J Immunol*, 2013, 43 (12): 3336–3342. DOI: 10.1002/eji.201243224.
- [10] Franchi L, Kanneganti TD, Dubyak GR, et al. Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K^+ for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282 (26): 18810–18818. DOI: 10.1074/jbc.M610762200.
- [11] Chen R, Kang R, Fan XG, et al. Release and activity of histone in diseases [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1370. DOI: 10.1038/cddis.2014.337.
- [12] Osada K, Minami T, Arioka T, et al. Thrombomodulin alfa attenuates the procoagulant effect and cytotoxicity of extracellular histones through the promotion of protein C activation [J]. *Thromb Res*, 2017, 160: 51–57. DOI: 10.1016/j.thromres.2017.10.019.
- [13] Gaidt MM, Hornung V. The NLRP3 inflammasome renders cell death pro-inflammatory [J]. *J Mol Biol*, 2018, 430 (2): 133–141. DOI: 10.1016/j.jmb.2017.11.013.
- [14] 赵宁, 李勇, 刘芬, 等. 线粒体 DNA 介导细胞焦亡放大肺巨噬细胞炎症反应 [J]. *中华危重病急救医学*, 2018, 30 (2): 97–100. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.02.001.
- [15] Zhao N, Li Y, Liu F, et al. Pyroptosis mediated by mitochondrial DNA amplifies the inflammatory response of alveolar macrophage [J]. *Chin Crit Care Med*, 2018, 30 (2): 97–100. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.02.001.
- [16] Longstaff C, Hogwood J, Gray E, et al. Neutralisation of the anti-coagulant effects of heparin by histones in blood plasma and purified systems [J]. *Thromb Haemost*, 2016, 115 (3): 591–599. DOI: 10.1160/TH15-03-0214.
- [17] Patel AJ, Maingret F, Magnone V, et al. TWIK-2, an inactivating 2P domain K^+ channel [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (37): 28722–28730. DOI: 10.1074/jbc.M003755200.
- [18] Di A, Xiong S, Ye Z, et al. The TWIK2 potassium efflux channel in macrophages mediates NLRP3 inflammasome-induced inflammation [J]. *Immunity*, 2018, 49 (1): 56–65. e4. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.04.032.
- [19] Manda-Handzik A, Bystrzycka W, Wachowska M, et al. The influence of agents differentiating HL-60 cells toward granulocyte-like cells on their ability to release neutrophil extracellular traps [J]. *Immunol Cell Biol*, 2018, 96 (4): 413–425. DOI: 10.1111/imcb.12015.
- [20] Bobak N, Feliciangeli S, Chen CC, et al. Recombinant tandem of pore-domains in a Weakly Inward rectifying K^+ channel 2 (TWIK2) forms active lysosomal channels [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 649. DOI: 10.1038/s41598-017-00640-8.

(收稿日期: 2019-11-13)