

## 摘要

# Caspase-11通过开放Pannexin1通道促进牙周炎中NLRP3炎症小体激活的作用 及机制研究

### 目的:

牙周炎是由菌群失调引发的慢性炎症，是目前导致牙齿缺失的主要原因之一。其临床主要表现为牙龈炎症和牙槽骨的吸收。牙周炎的发生发展过程是由多种炎症因子进行调控的，NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)炎症小体是存在于胞质的多蛋白复合体。它参与了机体的固有免疫反应，活化白细胞介素-1 $\beta$ (Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )和白细胞介素-18(Interleukin-18, IL-18)等促炎因子并介导细胞焦亡，在维持免疫平衡与调控炎症进程等方面具有重要作用。但在牙周炎中，NLRP3炎症小体激活的具体机制尚不清晰。本实验中分别抑制Caspase-11和Pannexin1的表达，检测其下游NLRP3炎症小体激活情况，探讨Caspase-11在牙周炎中激活NLRP3炎症小体的机制。

### 方法:

- 1、使用牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*)-脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)预处理Raw264.7, 采用Western blot方法, 检测Caspase-11、Pannexin1、NLRP3、Caspase-1和IL-1 $\beta$ 的蛋白表达。
- 2、应用si-Casp-11转染方法, 敲低Raw264.7中Caspase-11的表达, 采用Western blot方法, 检测Caspase-11蛋白表达, 评价转染效率。使用*P. gingivalis*-LPS预处理Raw264.7, 采用Western blot方法, 检测Caspase-11、Pannexin1、NLRP3、Caspase-1和IL-1 $\beta$ 的蛋白表达。
- 3、应用si-Panx1转染方法, 敲低Raw264.7中Pannexin1的表达, 采用Western blot方法, 检测Pannexin1蛋白表达, 评价转染效率。使用*P. gingivalis*-LPS预处理Raw264.7, 采用Western blot方法, 检测Caspase-11、Pannexin1、NLRP3、Caspase-1和IL-1 $\beta$ 的蛋白表达。
- 4、应用CBX和AZD9056分别抑制Pannexin1通道和P2X7受体的功能, 使用*P. gingivalis*-LPS预处理Raw264.7, 采用Western blot方法, 检测Caspase-1和IL-1 $\beta$ 的蛋白表达。
- 5、应用正畸丝结扎法构建大鼠牙周炎模型, 使用Micro-CT扫描动物样本, 检测牙槽骨吸收

情况，并对骨参数进行分析。应用局部注射CBX或AZD9056的方式治疗实验组大鼠，采用Western blot和组织学染色方法，检测大鼠牙龈组织中Caspase-1和IL-1 $\beta$ 的蛋白表达。

### 结果:

- 1、Western Blot结果显示，LPS组Caspase-11、Pannexin1、NLRP3、Caspase-1和IL-1 $\beta$ 的蛋白表达较对照组均显著上调。
- 2、Western Blot结果显示，si-Casp-11组Caspase-11的蛋白表达较阴性对照组下降了约60%，*P. gingivalis*-LPS诱导的Pannexin1通道开放和NLRP3炎症小体的激活受到明显抑制。
- 3、Western Blot结果显示，si-Panx1组Pannexin1的蛋白表达较阴性对照组下降了约60%，*P. gingivalis*-LPS诱导的NLRP3炎症小体的激活受到明显抑制。
- 4、Western Blot 结果显示，CBX 组和 AZD9056 组 *P. gingivalis*-LPS 诱导的 NLRP3 炎症小体的激活受到明显抑制。
- 5、Micro-CT 分析显示，大鼠上颌第一磨牙存在较为严重的骨吸收现象，釉牙骨质界到牙槽嵴顶（Cementoenamel junction to the alveolar bone crest, CEJ-ABC）的距离是对照组的 3.0 倍。Western blot 和组织学染色结果显示，两抑制剂组大鼠牙龈组织中 Caspase-1 和 IL-1 $\beta$  的表达较牙周炎组降低。

### 结论:

- 1、Caspase-11 通过开放 Pannexin1 通道促进牙周炎中 NLRP3 炎症小体激活；
- 2、Pannexin1 通道通过释放胞外 ATP 介导牙周炎中 NLRP3 炎症小体激活。

### 关键词:

牙周炎，脂多糖，Caspase-11，Pannexin1，NLRP3 炎症小体

## Abstract

The effect and mechanism of Caspase-11 on promoting NLRP3 inflammasome activation via the cleavage of Pannexin1 in periodontitis

### Purpose:

Periodontitis, which was regarded as one of the main cause of tooth loss, is a chronic inflammation caused by bacterial dysbiosis. The clinical manifestations of periodontitis include gingival inflammation and alveolar bone resorption. The occurrence and development of periodontitis is regulated by multiple inflammatory factors. NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3) inflammasome is a multiprotein complex located in the cytoplasm. It participates in the innate immune response of the body by activating pro-inflammatory cytokines such as interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and interleukin-18 (IL-18), and mediates pyroptosis. It plays an important role in maintaining immune balance and regulating the inflammatory process. However, the specific mechanism of NLRP3 inflammasome activation in periodontitis is still unclear. In this experiment, we inhibited the expression of Caspase-11 and Pannexin1, and detected the activation of NLRP3 inflammasome to explore the mechanism of how Caspase-11 activates the NLRP3 inflammasome in periodontitis.

### Methods:

1. Raw264.7 cells were pretreated with *P. gingivalis*-LPS, and western blot was used to detect the protein expression of Caspase-11, Pannexin1, NLRP3, Caspase-1 and IL-1 $\beta$ .
2. Caspase-11 expression in Raw264.7 cells was knocked down using si-Casp-11 transfection method, and western blot was used to detect the protein expression of Caspase-11 to evaluate transfection efficiency. Using *P. gingivalis*-LPS pre-treated Raw264.7, western blot was used to detect the protein expression of Caspase-11, Pannexin1, NLRP3, Caspase-1 and IL-1 $\beta$ .
3. Pannexin1 expression in Raw264.7 cells was knocked down using si-Panx1 transfection method, and western blot was used to detect the protein expression of Pannexin1 to evaluate transfection efficiency. Using *P. gingivalis*-LPS pre-treated Raw264.7, western blot was used to detect the

protein expression of Caspase-11, Pannexin1, NLRP3, Caspase-1 and IL-1 $\beta$ .

4. CBX and AZD9056 were used to inhibit the function of Pannexin1 and P2X7 receptor. Using *P. gingivalis*-LPS pre-treated Raw264.7, western blot was used to detect the protein expression of Caspase-1 and IL-1 $\beta$ .

5. The rat model of periodontitis was established by orthodontic wire ligation. Micro-CT was used to detect alveolar bone resorption and analyze bone parameters. The rats in the experimental group were treated with local injection of CBX or AZD9056. Western blot and histological staining were used to detect the changes of Caspase-1 and IL-1 $\beta$  expression in rats gingival tissue

### **Results:**

1. Western blot results showed that the protein expression of Caspase-11, Pannexin1, NLRP3, Caspase-1 and IL-1 $\beta$  in the LPS group were significantly upregulated compared to the control group.

2. Western blot results showed that the protein expression of Caspase-11 in the si-Casp-11 group decreased by about 60% compared to the negative control group, and the cleavage of Pannexin1 and the activation of NLRP3 inflammasome induced by *P. gingivalis*-LPS were significantly inhibited.

3. Western blot results showed that the protein expression of Pannexin1 in the si-Panx1 group decreased by about 60% compared to the negative control group, and the activation of NLRP3 inflammasome induced by *P. gingivalis*-LPS were significantly inhibited.

4. Western blot results showed that the activation of NLRP3 inflammasome induced by *P. gingivalis*-LPS was significantly inhibited in the CBX group and AZD9056 group.

5. Micro-CT analysis showed that the distance of CEJ-ABC was 3.0 times greater in rats with maxillary first molars with significant alveolar bone resorption than in control rats. Western blot and histological staining results showed that the expression of Caspase-1 and IL-1 $\beta$  in the gingival tissues of the inhibitor group rats was reduced compared with that of the periodontitis group.

### **Conclusion:**

1. Caspase-11 promotes NLRP3 inflammasome activation via the cleavage of Pannexin1 in periodontitis.

2. The cleavage of Pannexin1 leads to the activation of NLRP3 inflammasome through the release of extracellular ATP.

**Keywords:**

Periodontitis; Lipopolysaccharide; Caspase-11; Pannexin1; NLRP3 inflammasome

## 关于学位论文使用授权的声明

本人完全了解吉林大学有关保留、使用学位论文的规定，同意吉林大学保留或向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权吉林大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。

论文级别：  硕士  博士

学科专业： 口腔医学

论文题目： Caspase-11 通过开放 Pannexin1 通道促进牙周炎中 NLRP3 炎症小体激活的作用及机制研究

作者签名： 李碧榕

指导教师签名： 孟妍艳

2023 年 6 月 2 日

# 目 录

第 1 章 引言 .....	1
1.1 Caspase-11 在牙周炎中的研究进展 .....	2
1.1.1 Caspase-11 的激活 .....	2
1.1.2 Caspase-11 介导细胞焦亡的机制 .....	3
1.2 Pannexin1 通道蛋白在牙周炎中的研究进展 .....	3
1.2.1 Pannexin1 通道蛋白的结构 .....	4
1.2.2 Pannexin1 通道蛋白开放相关的调控机制 .....	4
1.3 NLRP3 炎症小体在牙周炎中的研究进展 .....	5
1.3.1 NLRP3 炎症小体的激活 .....	6
1.3.2 NLRP3 炎症小体激活的调控 .....	6
1.4 选题思路及意义 .....	7
第 2 章 材料和方法 .....	9
2.1 实验设备、材料与试剂 .....	9
2.1.1 实验设备 .....	9
2.1.2 实验材料与试剂 .....	9
2.1.3 主要试剂配置 .....	11
2.2 实验方法 .....	11
2.2.1 巨噬细胞 (RAW264.7) 的培养及实验分组 .....	11
2.2.2 siRNA 转染 .....	13
2.2.3 动物模型的制备 .....	13
2.2.4 Micro-CT 成像和分析 .....	14
2.2.5 HE 染色及 IHC 染色 .....	14
2.2.6 免疫印迹实验 (Western blot) .....	15
2.2.7 统计学分析 .....	16
第 3 章 实验结果 .....	17
3.1 LPS 介导的 NLRP3 炎症小体激活依赖于 Caspase-11 .....	17

3.2 LPS 介导的 Pannexin1 通道开放依赖于 Caspase-11 .....	22
3.3 Caspase-11 介导的 NLRP3 炎症小体激活依赖于 Pannexin1 通道的开放 .....	23
3.4 Pannexin1 通道蛋白通过释放胞外 ATP 激活 NLRP3 炎症小体 .....	26
第 4 章 讨论 .....	32
第 5 章 结论 .....	36
参考文献 .....	37
作者简介及在学期间的科研成果 .....	45
致 谢 .....	46

## 英文缩略词表

缩略词	英文全称	中文全称
AR	Anchoring protein repeat	锚定蛋白重复
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	凋亡相关斑点样蛋白
BV/TV	Percent trabecular area	骨小梁相对体积
CARD	Caspase-activated recruitment domain	半胱天冬酶募集结构域
Caspase	CysteinyI aspartate specific proteinase	含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶
CBX	Carbenoxolone	甘珀酸二钠
CEJ-ABC	Cementoenamel junction to the alveolar bone crest	釉牙骨质界到牙槽嵴顶的距离
CTT	C-terminal tail	羧基末端尾巴
DAMP	Damage-associated molecular pattern	损伤相关分子模式
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	杜尔伯科改良培养基
ECD	Extracellular domain	细胞外结构域
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
GSDMD	Gasdermin D	消皮素 D
HDAC6	Histone deacetylase 6	组蛋白去乙酰化酶 6
HE	Hematoxylin-eosin	苏木精-伊红
ICD	Intracellular domain	细胞内结构域
IHC	Immunohistochemical	免疫组织化学
IL	Interleukin	白介素
LPS	Lipopolysaccharide	脂多糖
LRR	Leucine-rich repeats	富含亮氨酸的重复序列
MTOC	Microtubule-organizing center	微管组织中心
NLR	NOD-like receptor	NOD 样受体
NLRP3	NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3	NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3

<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	牙龈卟啉单胞菌
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern	病原相关分子模式
PBS	Phosphate Buffer Saline	磷酸盐缓冲液
PFT	Pore-forming toxin	成孔素
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride	苯甲磺酰氟
PRR	Pattern recognition receptor	细胞模式识别受体
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏氟乙烯
PYD	Pyrin domain	pyrin 结构域
RIPA	Radio immunoprecipitation assay	细胞裂解液
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
TLR	Toll-like receptor	Toll 样受体
TMD	Transmembrane domain	锥形跨膜结构域
Tris	Tris (hydroxymethyl) methyl aminomethane	三羟甲基氨基甲烷

---

## 第 1 章 引言

牙周炎 (Periodontitis) 是一种主要由微生物感染导致牙周支持组织发生破坏的急性/慢性炎症<sup>[1]</sup>。最近的统计结果显示, 全球有 7.96 亿严重牙周炎患者, 患病率接近 10%<sup>[2]</sup>。近年来的研究表明, 牙周炎的发病机制涉及多个因素, 其中包括由微生物毒力直接引起的炎症反应和由微生物诱导宿主免疫反应间接引起的炎症反应, 这些因素协同作用可能导致牙周支持组织的破坏<sup>[3,4]</sup>。

巨噬细胞是机体固有免疫反应中的重要组成部分, 在各种生理和病理过程中起着重要作用<sup>[5]</sup>。在牙周组织中, 巨噬细胞对组织稳态和防御有重大贡献, 但巨噬细胞的过度聚集和活化也会导致牙周组织损伤<sup>[6]</sup>。巨噬细胞可以通过 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 识别包括脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 在内的病原相关分子模式 (Pathogen-associated molecular pattern, PAMP), 并产生特异性细胞因子和趋化分子, 以招募其他白细胞参与防御反应<sup>[7]</sup>。

NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 是胞质中形成的多蛋白复合体, 被称为炎症小体, 在维持免疫平衡与调控炎症进程等方面发挥着重要的作用<sup>[8]</sup>。以往的研究表明, NLRP3 炎症小体的激活在牙周炎的发生发展中起着重要作用<sup>[9-11]</sup>。在慢性牙周炎患者的牙龈组织中, NLRP3 炎症小体的表达显著增高<sup>[12]</sup>。NLRP3 炎症小体可以被多种炎症信号激活, 包括细菌和病毒的 PAMPs, 如 LPS, 细菌成孔素 (Pore-forming toxin, PFT) 和胞外 ATP 等<sup>[13]</sup>。ATP 是细胞的主要生物能量分子, 它作为一种信号媒介能够调节多种细胞功能。通过胞外 ATP 识别受体 P2X7, ATP 能够诱导细胞内液和细胞外液中的阳离子穿越质膜, 导致  $K^+$  外流和  $Na^+$  内流。已有研究证明, 细胞内  $K^+$  的外流是 NLRP3 炎症小体激活的一个必要因素, 进而激活 Caspase-1, 并且使促炎因子 IL-1 $\beta$  前体水解活化<sup>[14]</sup>。

模式识别受体 (Pattern recognition receptor, PRR) 是细胞中的免疫受体, 能够感知细胞外基质中可能存在的“非自身”分子, 并启动机体的防御机制, 以避免侵入的微生物引起细胞损伤<sup>[15]</sup>, 这是机体应对微生物感染和促进受损组织修复的主要过程<sup>[16]</sup>。PRR 可以分为经典 PRR (如 Toll 样受体和 NOD 样受体) 和非经典 PRR (如 Caspase-11), 其中 TLR4 是最经典的 LPS 识别通路。Caspase-11

是 Caspase 家族中的一个成员，在牙周炎中巨噬细胞通过非经典模式识别受体 Caspase-11 及其人类同源物 Caspase-4 识别胞内 LPS，该过程独立于经典模式识别受体 TLR4 通路<sup>[17]</sup>。在非经典炎症途径中，Caspase-11 可以直接识别并结合 LPS 来促进炎症因子的成熟<sup>[18]</sup>。近些年有研究表明，NLRP3 炎症小体可以通过 Caspase-11 介导的非经典途径而被激活<sup>[18,19]</sup>。在课题组的前期研究中指出，在牙周炎中巨噬细胞除 TLR4 外，Caspase-11 也能够作为受体识别 LPS 介导炎症反应，激活 NLRP3 炎症小体<sup>[20]</sup>，然而其下游的炎症调控机制仍不清楚。

Pannexin1 是质膜蛋白的 Pannexin 家族(Pannexin1、Pannexin2 和 Pannexin3) 的一员，与 Pannexin 家族的其他成员相似，Pannexin1 的激活受翻译后修饰的调节。Pannexin1 通道在一些特定情况下被激活而开放，将 ATP 释放至胞外<sup>[21]</sup>。胞外 ATP 激活 P2X7 受体，使 K<sup>+</sup>外流，从而导致 NLRP3 炎性小体激活<sup>[22]</sup>。已有研究表明，在细胞凋亡过程中 Pannexin1 通道的开放可以促进 NLRP3 炎症小体的组装<sup>[23]</sup>。

在本研究中，我们探究了在牙周炎中 Caspase-11 作为细胞内 PRR 是如何促进炎症发生发展的。我们应用 siRNA 对关键因子进行选择性的基因沉默，应用抑制剂对细胞膜上相关蛋白的功能进行抑制，通过 *P. gingivalis*-LPS 刺激巨噬细胞的方式来模拟牙周炎时的细胞状态，测定 NLRP3 炎症小体的激活水平，探究 Caspase-11、Pannexin1 通道和 NLRP3 炎症小体之间的联系，为临床上牙周炎的治疗提供新的思路。

## 1.1 Caspase-11 在牙周炎中的研究进展

Caspase-11 是 Caspase 家族中的一员，巨噬细胞通过 Caspase-11/4 识别胞内 LPS，并且该过程独立于 TLR4 通路<sup>[17]</sup>。在非经典炎症途径中，Caspase-11 可以直接识别并结合 LPS 来促进炎症因子的成熟<sup>[18]</sup>。本段将从 Caspase-11 的激活和介导细胞焦亡的机制方面进行综述。

### 1.1.1 Caspase-11 的激活

2013 年，Nobuhiko 正式发现 Caspase 可以独立于 TLR4 识别细菌 LPS 并介导免疫反应和调节下游炎症因子分泌<sup>[24]</sup>。Caspase-11 和 LPS 的特异性识别依赖

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/718116057067006042>