

陈志达,付彬,李思迪,等. Chrm3 通过 MAPK/ERK 途径调节 LPS 诱导的 *Lbp*^{-/-} 小鼠腹腔巨噬细胞炎症 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(4): 69-78.

Chen ZD, Fu B, Li SD, et al. Chrm3 regulates LPS-induced inflammation in peritoneal macrophages in *Lbp*^{-/-} mice via the MAPK/ERK signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(4): 69-78.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.04.007

Chrm3 通过 MAPK/ERK 途径调节 LPS 诱导的 *Lbp*^{-/-} 小鼠腹腔巨噬细胞炎症

陈志达¹, 付彬^{1*}, 李思迪^{1,2}, 刘赛¹, 郭中坤¹, 张悦¹, 王可洲^{1*}

(1. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)实验动物学院(省实验动物中心), 济南 250117;

2. 济南朋悦实验动物繁育有限公司, 济南 250000)

【摘要】目的 基于 LBP 敲除小鼠(*Lbp*^{-/-}小鼠)探讨 LBP 缺失后 Chrm3 在 LPS 诱导的腹腔巨噬细胞炎症中的作用。**方法** 提取 WT 型、*Lbp*^{-/-} 型小鼠腹腔巨噬细胞, 构建 LPS 诱导的腹腔巨噬细胞炎症模型。分别采取加入抑制剂 4-damp、转染 siRNA 两种方法抑制 *Lbp*^{-/-} 小鼠腹腔巨噬细胞中 Chrm3 的表达; 通过转染慢病毒的方法使 *Lbp*^{-/-} 小鼠腹腔巨噬细胞中的 Chrm3 过表达; 抑制剂法将细胞分为对照组 A、LPS 组 A、抑制剂组, 转染 siRNA 法将细胞分为对照组 B、LPS 组 B、si-NC 组、si-Chrm3 组, 过表达法将细胞分为对照组 C、LPS 组 C、阴性对照组、过表达组。本研究以 WT 型、*Lbp*^{-/-} 型小鼠腹腔巨噬细胞为研究对象利用 Western blot 方法验证 Chrm3 在 LPS 刺激下的变化情况, 采用 CCK-8、RT-PCR、Western blot 等实验方法探讨 4-damp、si-Chrm3 及过表达慢病毒对 *Lbp*^{-/-} 小鼠腹腔巨噬细胞的存活率及炎症的影响。**结果** 在 LPS 刺激下 *Lbp*^{-/-} 小鼠的腹腔巨噬细胞 Chrm3 蛋白表达显著升高($P < 0.001$), 而野生型变化并不明显; 抑制剂组及 si-Chrm3 组的细胞存活率显著升高($P < 0.05, P < 0.01$)、过表达组细胞存活率显著下降($P < 0.01$); 抑制剂组及 si-Chrm3 组的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 炎症因子表达情况显著降低($P < 0.01, P < 0.001$), 与细胞损伤及炎症相关的蛋白 p-ERK 的表达量也显著降低($P < 0.01, P < 0.001$), 而过表达组则与之相反, 其炎症因子($P < 0.001$)和 p-ERK 蛋白的磷酸化水平显著升高($P < 0.001$)。**结论** LPS 刺激 *Lbp*^{-/-} 小鼠腹腔巨噬细胞后 Chrm3 的表达上调、炎症因子表达上调, 使用 4-damp 与 si-Chrm3 特异性降低 Chrm3 表达后使 LPS 导致的相关的 *Lbp*^{-/-} 小鼠细胞炎症因子明显下降, 使用过表达慢病毒上调 Chrm3 后使相关炎症因子显著升高。由此可验证敲除 LBP 后 Chrm3 调控 LPS 诱导的炎症反应。

【关键词】 毒蕈碱受体; *Lbp*^{-/-} 小鼠; 腹腔巨噬细胞; 4-damp; 干扰 RNA; 过表达; MAPK 信号通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 04-0069-10

Chrm3 regulates LPS-induced inflammation in peritoneal macrophages in *Lbp*^{-/-} mice via the MAPK/ERK signaling pathway

【基金项目】 山东省医学科学院医药卫生科技创新工程; 济南市科技局“高校 20 条”(2021GXRC011); 山东省生猪产业技术体系(SDAIT-08-17)。

【作者简介】 陈志达(1999—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 免疫药理学。E-mail: 1034743147@qq.com

【通信作者】 王可洲(1974—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 药理毒理学研究。E-mail: wangkezhou_cn@163.com

付彬(1991—), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 基因工程模式动物研究。E-mail: fubin@sdfmu.edu.cn

* 共同通信作者

CHEN Zhida¹, FU Bin^{1*}, LI Sidi^{1,2}, LIU Sai¹, GUO Zhongkun¹, ZHANG Yue¹, WANG Kezhou^{1*}

(1. School of Laboratory Animal & Shandong Laboratory Animal Center, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Ji'nan 250117, China. 2. Jinan Pengyue Experimental Animal Breeding Co., Ltd, Ji'nan 250000)

【Abstract】 Objective To investigate the role of cholinergic receptor muscarinic 3 (Chrm3) in regulating lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in peritoneal macrophages in lipopolysaccharide binding protein (LBP)-knockout (*Lbp*^{-/-}) mice. **Methods** Peritoneal macrophages were isolated from wild-type and *Lbp*^{-/-} mice to establish an LPS-induced inflammation model. Chrm3 expression in *Lbp*^{-/-} mouse peritoneal macrophages was inhibited by 1,1-dimethyl-4-diphenylacetoxypiperidinium iodide (4-damp) and small interfering (siRNA) and Chrm3 overexpression was achieved by lentivirus transfection. For 4-damp inhibition, cells were divided into control, LPS, and inhibitor groups, and for siRNA transfection, cells were divided into control, LPS, si-normal control group, and si-Chrm3 groups. For overexpression, cells were divided into control, LPS, negative control, and overexpression groups. Changes in Chrm3 in response to LPS stimulation were verified by Western blot. The effects of 4-damp, si-Chrm3, and lentivirus on cell inflammation and survival were confirmed by Cell Counting Kit-8, quantitative polymerase chain reaction, and Western blot assays. **Results** Chrm3 protein expression was significantly elevated in *Lbp*^{-/-} peritoneal macrophages post-LPS stimulation ($P < 0.001$), whereas there was no notable change in wild-type cells. The cell survival rate was significantly increased in the 4-damp and si-Chrm3 groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and cell survival was significantly reduced in the overexpression group ($P < 0.01$). Furthermore, 4-damp and si-Chrm3 significantly reduced expression levels of the inflammatory factors tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6 ($P < 0.01$, $P < 0.001$), and phospho-extracellular signal-regulated kinase (p-ERK) ($P < 0.01$, $P < 0.001$), which are associated with cell damage and inflammation. In contrast, TNF- α , IL-1 β , IL-6 ($P < 0.001$), and p-ERK protein ($P < 0.001$) were significantly elevated in the overexpression group. **Conclusions** LPS stimulation upregulated the expression of Chrm3 and proinflammatory cytokines in *Lbp*^{-/-} peritoneal macrophages. Specific downregulation of Chrm3 by 4-damp and si-Chrm3 significantly decreased LPS-induced proinflammatory cytokines in *Lbp*^{-/-} peritoneal macrophages, while upregulation of Chrm3 using overexpressing lentivirus significantly elevated the expression of related inflammatory factors. Chrm3 is implicated in the regulation of the LPS-induced inflammation response in peritoneal macrophages in *Lbp*^{-/-} mice.

【Keywords】 Chrm3; *Lbp*^{-/-} mice; peritoneal macrophages; 4-damp; RNAi; overexpression; MAPK signaling pathway

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 作为内毒素中的毒性成分, 主要存在于革兰氏阴性菌 (gram-negative bacteria, GNB) 的细胞外膜中。当革兰氏阴性菌死亡并裂解时, LPS 会从细胞外膜释放出来^[1], LPS 一旦进入机体内, 就可能引发全身性的炎症反应。LPS 进入机体后主要通过与其结合蛋白 (lipopolysaccharide-binding protein, LBP) 结合来发挥作用^[2]。LBP 作为一种急性反应期蛋白, 主要功能是结合细菌内毒素 LPS^[3]。它能够将 LPS 转运至细胞表面的 CD14 受体, 形成 LPS-LBP-CD14 三元复合体, 从而激活炎症反应^[4]。巨噬细胞是一种多功能免疫细胞^[5], 主要负责清

除入侵的病原体和死亡细胞^[6]。活化的巨噬细胞通过触发不同的信号通路。当巨噬细胞被激活时, 它们可以表达表面识别受体, 如 Toll 样受体 TLR2/TLR4, 触发信号通路, 如丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen activated protein kinases, MAPK) 和促炎细胞因子 (如白细胞介素 IL-6、IL-1 β 和肿瘤坏死因子 TNF- α)^[7], 从而有效地降低疾病的严重程度。

有研究表明敲除 LBP 基因可改善由 LPS 刺激所导致的细胞损伤^[8], 在前期研究中, 我们以 *Lbp*^{-/-} 小鼠原代肝细胞为模型, 揭示了血管紧张素 II 受体 1a 型 (angiotensin II receptor type 1a,

Agtr1a) 和肾上腺素受体 $\alpha 1A$ 型受体(adrenoceptor $\alpha 1a$, Adra1a) 在 LPS 诱导的炎症信号传递中发挥着关键作用。然而通过抑制剂与 siRNA 特异性抑制它们的表达后, LPS 引发的炎症反应仅被部分阻断, 且肝细胞损伤的缓解程度仍有限^[9-10], 这提示在 LBP 基因缺失的背景下, LPS 的炎症信号可能通过其他未知途径传递。基于此, 本研究旨在进一步探索 *Lbp*^{-/-} 小鼠体内潜在的代偿性炎症信号传递机制, 以期深入阐明 LPS 致病过程中的分子调控网络, 并为临床治疗内毒素血症及相关重症炎症反应提供新型干预靶点和理论依据。

胆碱能受体毒蕈碱 3 (cholinergic receptor muscarinic 3, Chrm3) 是 G 蛋白偶联受体家族的一员, 可以选择性地结合 Gq 蛋白并激活 Gq-PLC-DAG/IP3 信号传导途径以释放 Ca^{2+} 。其还可以将 MAPK 信号通路激活。有研究表明发现, 阻断 M3R 可以抑制炎症因子、增强抗肿瘤免疫反应从而减少肿瘤的生长, 改善对癌症的免疫反应^[11]。此外许多研究也观察到通过毒蕈碱受体给药可以减轻体内炎症, 这也表明毒蕈碱受体具有促炎作用^[12-13]。本文通过抑制剂 4-damp、si-Chrm3 特异性降低 Chrm3 的表达, 有效地降低了 LPS 引起的细胞炎症, 并通过过表达慢病毒反向验证了 Chrm3 在 LPS 诱导细胞炎症中的作用, 为 LPS 所致的炎症提供新靶点和新机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取济南朋悦实验动物繁育有限公司构建保存^[14]的 20 只 SPF 级 *Lbp*^{-/-} 雌性 6 周龄、体质量 20~22 g 的小鼠, 5 只 SPF 级 C57BL/6J 雌性 6 周龄、体质量 20~22 g 的小鼠 [SCXK (鲁) 2023-0002], 实验用鼠饲养于山东第一医科大学实验动物学院 [SYXK (鲁) 2023-0012], 光照/黑暗循环 12 h/12 h、温度 22~25 °C、湿度 55%~60%, 实验经山东省实验动物中心伦理审批通过 (LS002024056), 实验小鼠的使用遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

硫代乙醇酸钠 (上海生工生物工程有限公司, 367-51-1); LPS (美国 Sigma-Aldrich, L5418); 4-damp (美国 MCE; HY-100958); 干扰 RNA (北京

擎科生物公司合成); LipofectamineTM RNAiMAX 转染试剂 (美国 Invitrogen, 13778-150); RNA 提取试剂盒 (美国 Omega, R6934-02); 逆转录试剂盒 (日本 TaKaRa, RR047A); 蛋白酶抑制剂混合液 (上海雅酶生物医药科技有限公司, GRF101); 磷酸酶抑制剂混合液 (上海雅酶生物医药科技有限公司, GRF102); 高效 RIPA 组织/细胞快速裂解液 (上海雅酶生物医药科技有限公司, PC101); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海雅酶生物医药科技有限公司, ZJ102); Chrm3、 β -actin、ERK1/2、p-ERK (中国 Cohensionn, CQA4080、CPA9066、CPA1944、CPA4924); 山羊抗兔二抗 (上海雅酶生物医药科技有限公司, LF102)。倒置显微镜 (德国 ZEISS, 型号: 382011386); 细胞培养箱 (德国 Thermo, 型号: i160); Light Cycle 480 II 实时荧光定量 PCR 仪 (德国 Thermo, 型号: Light Cycle 480 II); 超高灵敏度化学发光成像系统 (美国 Bio-Rad, 型号: BR17952); 蛋白电泳印迹系统 (美国 Bio-Rad, 型号: Mini protean); 高通量三通道读板仪 (美国 Spectra Max, 型号: i3x)。

1.3 实验方法

1.3.1 腹腔巨噬细胞的提取

参照文献^[15]的方法提取腹腔巨噬细胞, 对小鼠腹腔注射 0.1 mL 的 3% 巯基乙醇酸钠溶液, 3 d 后处死小鼠然后在 75% 乙醇中浸泡 3 min。取出, 以掌心抓持小鼠颈背部皮肤, 使其呈头高位直立姿势, 于胸骨右外侧约 0.5 cm 处 (避开肝区域), 以 30° 进针角度将注射器针尖斜面朝向腹侧缓慢刺入, 感知针尖突破横膈膜阻力后匀速推注 10 mL 的生理盐水, 拔针后立即以指腹沿小鼠腹部顺时针环形按摩 3 min。将小鼠固定于仰卧位, 无菌条件下, 用镊子微微提起腹膜, 用注射器小心吸出腹腔内液体, 可回收约 9 mL 的灌洗液。用 2000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 重悬, 细胞计数。

1.3.2 细胞分组

抑制剂法将细胞分为对照组 A (空白对照)、LPS 组 A (LPS 处理 12 h)、抑制剂组 (4-damp 干预 30 min 后加入 LPS 共同孵育 12 h); 转染 siRNA 法将细胞分为对照组 B (空白对照)、LPS 组 B (LPS 暴露 12 h)、si-NC 组 (si-NC 转染 12 h 后再加入 LPS 孵育 12 h)、si-Chrm3 组 (si-Chrm3

敲低 12 h 后再加入 LPS 处理 12 h);过表达法将细胞分为对照组 C(空白对照)、LPS 组 C(LPS 暴露 12 h)、阴性对照组(转染 Lentivirus(ZsGreen-Puro)/CMV-NC 12 h 后再加入 LPS 处理 12 h)、过表达组(转染 Lentivirus(ZsGreen-Puro)/CMV-Chrm3 12 h 后再加入 LPS 共同孵育 12 h)。WT 型小鼠腹腔巨噬细胞则只分为对照组(空白对照)和 LPS 组(LPS 处理 12 h)。

1.3.3 LPS 处理构建细胞炎症模型

将提取的巨噬细胞按 80% 细胞密度铺板,培养过夜贴壁后加入 LPS 使其终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,刺激 12 h 后再做后续实验。

1.3.4 抑制剂 4-damp 处理巨噬细胞

将腹腔来源的巨噬细胞按上述密度接种于十二孔板,向抑制剂 4-damp 组中加入 5 nmol/L 的 4-damp,孵育 1 h 后加入 LPS 至 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 并共处理 12 h,收集样本备用。

1.3.5 干扰 RNA 转染

在巨噬细胞的 si-NC 组和 si-Chrm3 组分别转染 50 nmol/L 的 siRNA 复合物,经过 12 h 转染后,将 LPS 加入其中,刺激 12 h 后,收集细胞,备用, si-Chrm3 的序列为 GGATCTATAAGGAACTGA,正向为: 5'-GGAUCUAUAAGGAAACUGA (dT) (dT)-3';反向为: 5'-UCAGUUUCCUUAUAGAUCC(dT)(dT)-3'。

1.3.6 慢病毒过表达

取完全贴壁后的腹腔巨噬细胞,根据病毒感染复数(MOI=5)在阴性对照组(转染 Lentivirus(ZsGreen-Puro)/CMV-NC)和过表达组(转染 Lentivirus(ZsGreen-Puro)/CMV-Chrm3)中加入适量病毒进行转染,转染 12 h 后,进行换液,然后继续培养 12 h,之后加入 LPS 进行刺激,12 h 后收

集细胞,备用。

1.3.7 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)

RT-PCR 对 Chrm3、 β -actin、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的 mRNA 表达水平进行检测。采用 TRIzol 试剂裂解巨噬细胞,氯仿-异丙醇法分离总 RNA 并测定浓度,之后按照逆转录试剂盒合成 cDNA,然后以 cDNA 为模板通过 SYBR 构建反应体系并进行扩增,反应结束后进行熔解曲线分析,验证扩增特异性,将 β -actin 作为内参,最后采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对数据进行相对表达量分析(表 1)。

1.3.8 CCK-8 检测细胞存活率

在 96 孔板中接种细胞(6×10^3 /孔),每组设 3 个平行复孔,常规培养条件(37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2)下进行干预处理(抑制剂、干扰 RNA 及慢病毒过表达),往 LPS 各组细胞中加入 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 刺激 12 h。之后向每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,充分混合后继续于培养箱中避光孵育 3 h,随后用酶标仪测定 450 nm 处吸光度(OD 值),设置标准曲线,计算细胞存活率。

1.3.9 Western blot 检测相关蛋白的表达情况

用含 1% 蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液在冰上裂解细胞 20 min,用 BCA 蛋白浓度定量试剂盒检测蛋白浓度。取约 10 μg 的蛋白样品进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),然后半干转法将蛋白转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。用无蛋白快速封闭液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 PVDF 膜 15 min,1 $\times$ TBST 清洗 3 遍后将一抗 β -actin (1 : 2000 ~ 1 : 10 000)、Chrm3 (1 : 500 ~ 1 : 2000)、ERK、p-ERK (1 : 750)与 PVDF 膜一起在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜,1 $\times$ TBST 清洗 3 遍,每次 10 min;HRP 标记兔源二抗(1 : 2000 ~ 1 : 10 000)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 ~

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因 Gene	正向引物(5'-3') Forward primer(5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse primer(5'-3')
Chrm3	CCTCGCCTTTGTTTCCCAAC	TTGAGGAGAAATTTCCAGAGGT
β -actin	GGCTGTATTCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
IL-6	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
IL-1 β	GCAACTGTTCTGAACTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
TNF- α	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG

2 h, 1×TBST 清洗 3 遍后滴加 ECL 显影液显影拍照, 以 β -actin 作为内参蛋白, 利用 Image lab 6.0 分析蛋白条带, 计算出每种蛋白的相对表达量。

1.4 统计学方法

实验数据用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 并采用 GraphPad Prism 8.4.2 软件进行统计学分析, 两组之间采用非配对 t 检验法进行差异分析, 认为 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LBP 蛋白的表达情况

Western blot 实验结果显示, $Lbp^{-/-}$ 小鼠腹腔巨噬细胞中的 LBP 蛋白已完全敲除不再进行表达(图 1)。

2.2 LBP 基因敲除对 LPS 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞炎症的影响

由 RT-PCR 的结果可知, 在 LPS 的刺激下, WT 小鼠腹腔巨噬细胞炎症因子显著升高, 而 $Lbp^{-/-}$ 小鼠腹腔巨噬细胞的炎症因子水平相比 WT 小鼠虽有明显的下降但仍然存在($P<0.01$), 如图 2。由此可说明 LPS 刺激信号在 LBP 基因敲除后还存在其它传递途径。

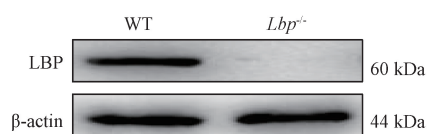
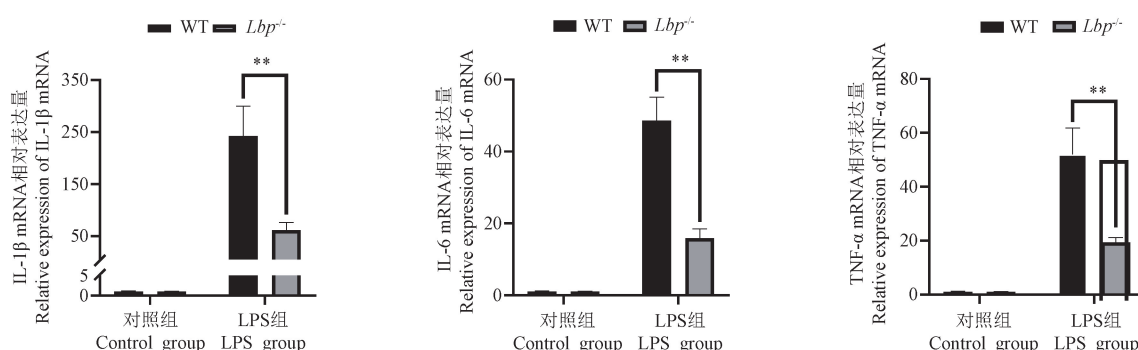


图 1 腹腔巨噬细胞中 LBP 蛋白的表达图

Figure 1 LBP protein expression map in peritoneal macrophages



注: 与 WT 小鼠相比, ** $P<0.01$ 。

图 2 WT 小鼠和 $Lbp^{-/-}$ 小鼠腹腔巨噬细胞对 LPS 刺激的炎症反应

Note. Compared with the WT mice, ** $P<0.01$.

Figure 2 Inflammatory response of peritoneal macrophages to LPS stimulation in WT mice and $Lbp^{-/-}$ mice

2.3 LPS 刺激下 Chrm3 蛋白表达变化情况

由 Western blot 实验结果可以看出, 野生型小鼠腹腔巨噬细胞在 LPS 刺激下 Chrm3 的蛋白表达量虽有变化, 但与对照组的差异并不明显($P>0.05$), 如图 3A; 而 $Lbp^{-/-}$ 小鼠腹腔巨噬细胞在 LPS 刺激后其蛋白表达量显著升高($P<0.001$), 经抑制剂 4-damp 处理后, 该组 Chrm3 蛋白水平较 LPS 组呈现明显下降趋势($P<0.05$), 如图 3B; 当采用特异性 siRNA 进行基因沉默干预时, Chrm3 蛋白的表达受到更为显著地抑制($P<0.01$), 如图 3C; 相反, 在加入过表达慢病毒后, Chrm3 蛋白表达量显著升高($P<0.001$), 如图 3D。

2.4 Chrm3 的改变对细胞存活率的影响

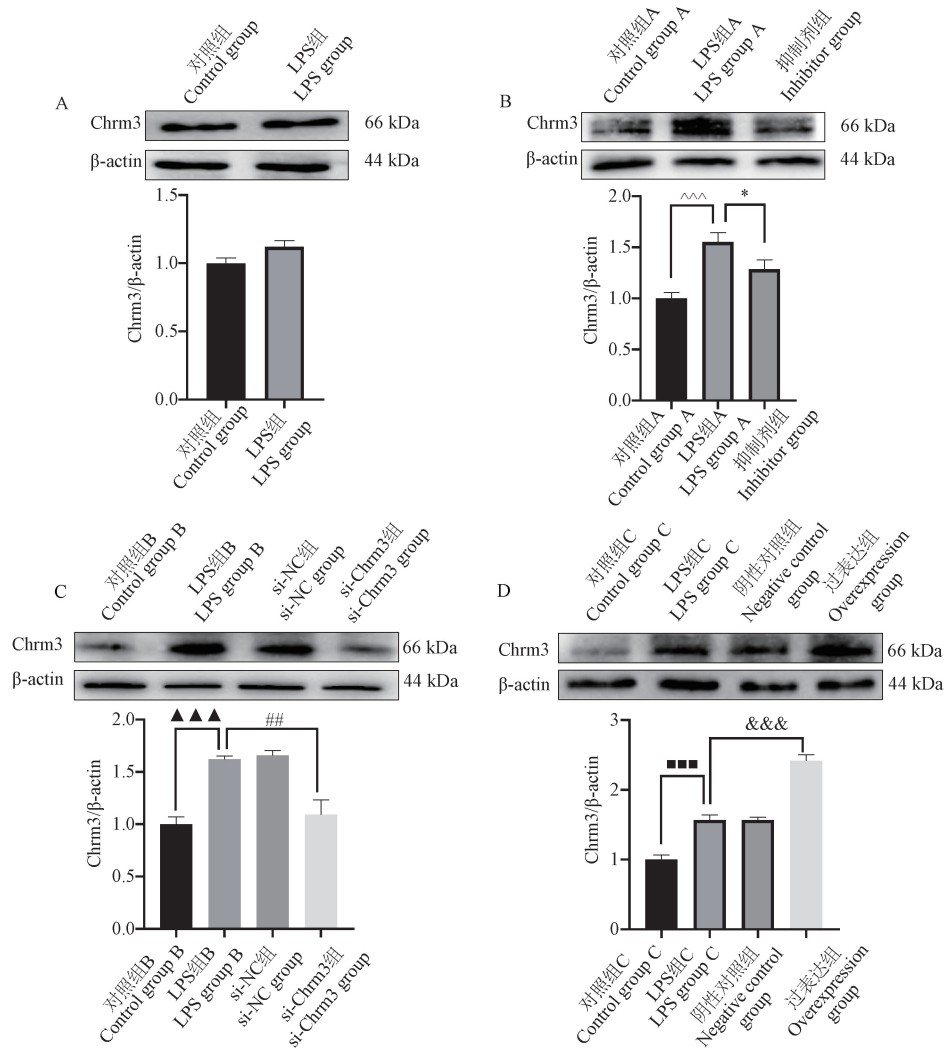
基于 CCK8 的检测数据可知, 相较于 LPS 组, 抑制剂组的细胞存活率得到显著改善($P<0.05$), 如图 4A; 同样, si-Chrm3 组的细胞活力也有明显增强($P<0.05$), 如图 4B; 而过表达组的细胞存活率则明显下降($P<0.05$), 如图 4C。

2.5 抑制和干扰 Chrm3 表达对炎症因子的影响

基于 RT-PCR 的分析结果可知, $Lbp^{-/-}$ 小鼠腹腔巨噬细胞在 LPS 的刺激下炎症因子显著升高, 而在经抑制剂 4-damp 处理后, IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子的 mRNA 水平显著降低($P<0.001$, $P<0.0001$), 如图 5A。在对 Chrm3 进行干扰后 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达量显著降低($P<0.001$, $P<0.0001$), 如图 5B。

2.6 过表达 Chrm3 对炎症因子的影响

根据 RT-PCR 的结果可知, 在 LPS 的刺激下



注:A:野生型小鼠 Chrm3 蛋白的变化;B:抑制剂处理后 $Lbp^{-/-}$ 小鼠 Chrm3 蛋白的变化;C:干扰 RNA 处理后 $Lbp^{-/-}$ 小鼠 Chrm3 蛋白的变化;D:过表达后处理后 $Lbp^{-/-}$ 小鼠 Chrm3 蛋白的变化。与对照组 A 相比,~ $P<0.001$;与抑制剂组相比,* $P<0.05$;与对照组 B 相比,▲▲▲ $P<0.001$;与 si-Chrm3 组相比,## $P<0.01$;与对照组 C 相比,■■■ $P<0.001$;与过表达组相比,&&& $P<0.001$ 。

图 3 LPS 刺激条件下 Chrm3 表达的变化

Note. A, Changes in Chrm3 protein in WT mice. B, Changes in Chrm3 protein after inhibitor treatment in $Lbp^{-/-}$ mice. C, Changes in Chrm3 protein after siRNA treatment in $Lbp^{-/-}$ mice. D, Changes in Chrm3 protein after overexpression treatment in $Lbp^{-/-}$ mice. Compared with Control group A, ~ $P<0.001$. Compared with Inhibitor group, * $P<0.05$. Compared with Control group B, ▲▲▲ $P<0.001$. Compared with si-Chrm3 group, ## $P<0.01$. Compared with Control group C, ■■■ $P<0.001$. Compared with Overexpression group, &&& $P<0.001$.

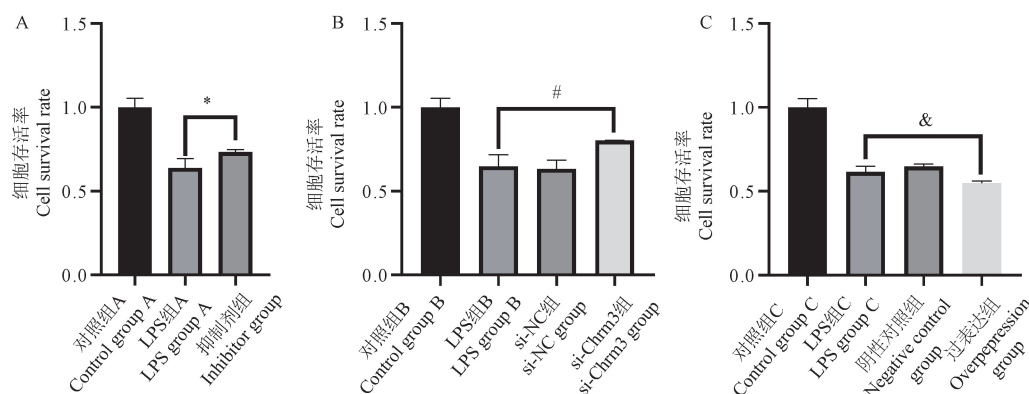
Figure 3 Changes in Chrm3 expression under LPS stimulation

$Lbp^{-/-}$ 小鼠腹腔巨噬细胞的炎症因子升高,而在加入过表达慢病毒后,IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子的表达水平显著升高($P<0.01$, $P<0.001$),如图 6。

2.7 抑制、干扰和过表达 Chrm3 的表达对 p-ERK 蛋白的影响

Western blot 结果显示,在 LPS 刺激下,ERK

蛋白磷酸化显著升高($P<0.001$),当加入抑制剂 4-damp 后 ERK 的磷酸化进程受到显著性抑制($P<0.01$),如图 7A。同样,对腹腔巨噬细胞进行转染 si-Chrm3 敲低 Chrm3 基因后,ERK 磷酸化水平也显著性降低($P<0.01$),如图 7B,而对其进行慢病毒过表达时,ERK 的磷酸化则显著升高($P<0.01$),如图 7C。

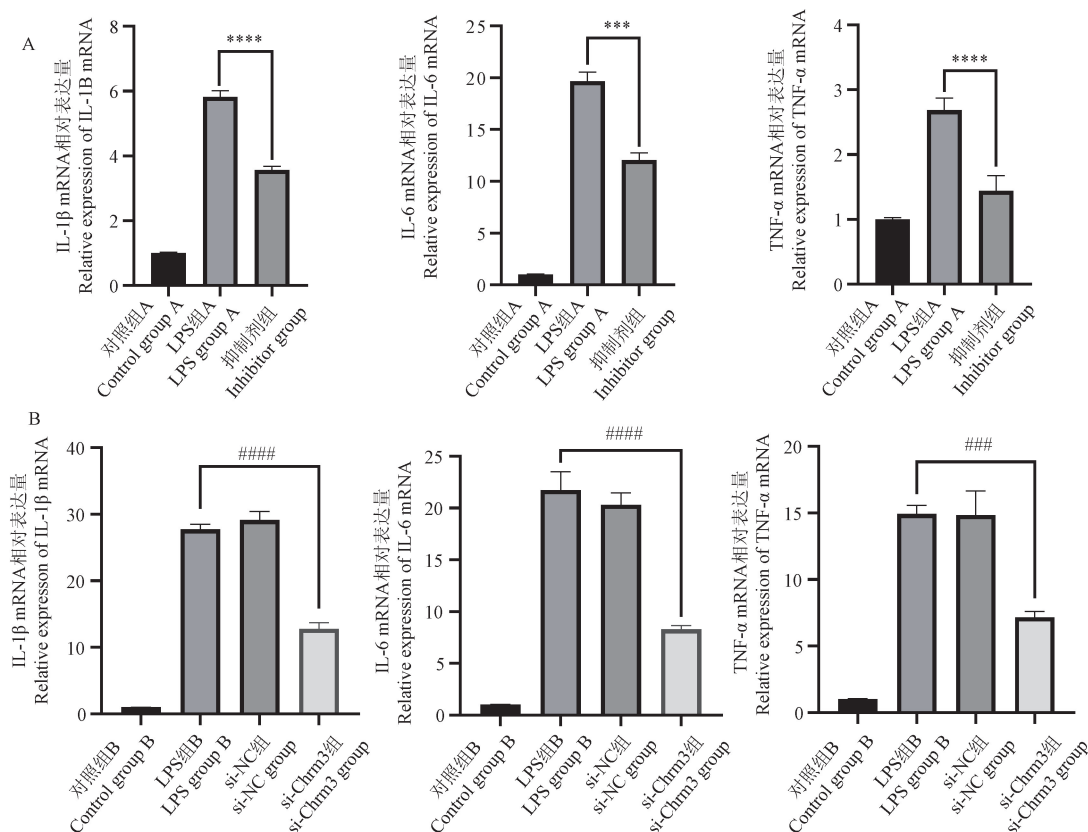


注:A:抑制 Chrm3 后细胞存活率的变化;B:干扰 Chrm3 后细胞存活率的变化;C:过表达 Chrm3 后细胞存活率的变化。与抑制剂组相比, * $P < 0.05$; 与 si-Chrm3 组相比, # $P < 0.05$; 与过表达组相比, & $P < 0.05$ 。

图 4 抑制 Chrm3 和过表达 Chrm3 对 $Lbp^{-/-}$ 小鼠腹腔巨噬细胞存活率的影响

Note. A, Changes in cell viability after Chrm3 inhibition. B, Changes in cell viability after Chrm3 knockdown. C, Changes in cell viability after Chrm3 overexpression. Compared with Inhibitor group, * $P < 0.05$. Compared with si-Chrm3 group, # $P < 0.05$. Compared with Overexpression group, & $P < 0.05$.

Figure 4 Effect of inhibition of Chrm3 expression and overexpression of Chrm3 on peritoneal macrophages viability in $Lbp^{-/-}$ mice

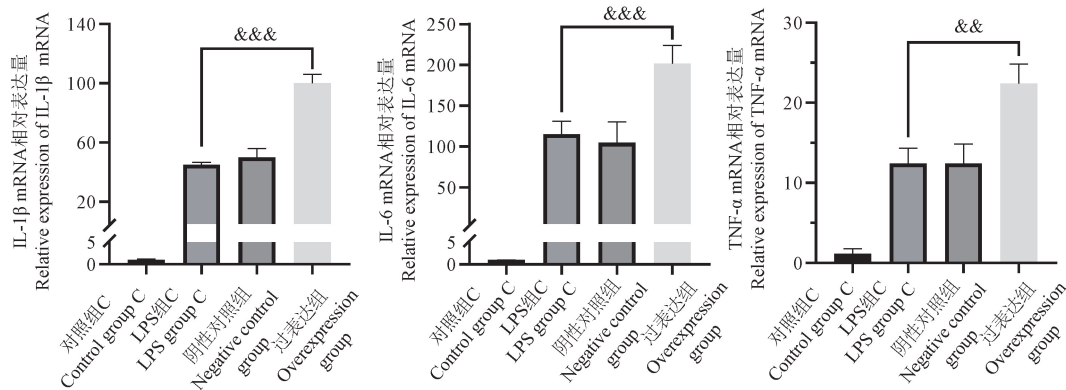


注:A:抑制 Chrm3 后细胞炎症因子的变化;B:干扰 Chrm3 后细胞炎症因子的变化。与抑制剂组相比, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; 与 si-Chrm3 组相比, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ 。

图 5 抑制 Chrm3 的表达对 $Lbp^{-/-}$ 小鼠腹腔巨噬细胞 IL-1β、IL-6、TNF-α 的影响

Note. A, Changes in inflammatory factors after Chrm3 inhibition. B, Changes in inflammatory factors after Chrm3 knockdown. Compared with Inhibitor group, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. Compared with si-Chrm3 group, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$.

Figure 5 Inhibition of Chrm3 expression on IL-1β, IL-6 and TNF-α in peritoneal macrophages of $Lbp^{-/-}$ mice

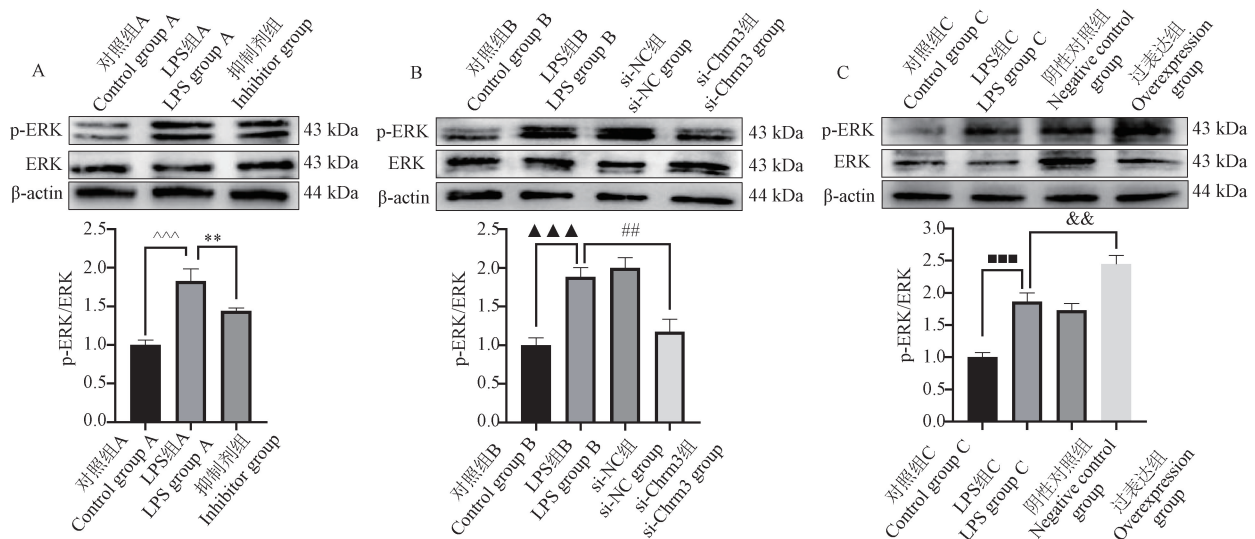


注:与过表达组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 6 过表达 Chrm3 对 $Lbp^{-/-}$ 小鼠腹腔巨噬细胞 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的影响

Note. Compared with Overexpression group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 6 Overexpress of Chrm3 expression on IL-1 β , IL-6 and TNF- α in peritoneal macrophages of $Lbp^{-/-}$ mice



注:A:抑制 Chrm3 后 p-ERK 蛋白的变化;B:干扰 Chrm3 后 p-ERK 蛋白的变化;C:过表达 Chrm3 后 p-ERK 蛋白的变化。与对照组 A 相比, *** $P < 0.001$;与抑制剂组相比, ** $P < 0.01$;与对照组 B 相比, *** $P < 0.001$;与 si-Chrm3 组相比, ## $P < 0.01$;与对照组 C 相比, *** $P < 0.001$;与过表达组相比, && $P < 0.01$ 。

图 7 抑制、干扰和过表达 Chrm3 的表达对 p-ERK 蛋白的影响

Note. A, Changes in p-ERK protein after Chrm3 inhibition. B, Changes in p-ERK protein after Chrm3 knockdown. C, Changes in p-ERK protein after Chrm3 overexpression. Compared with the Control group, *** $P < 0.001$. Compared with Inhibitor group, ** $P < 0.01$. Compared with Control group B, *** $P < 0.001$. Compared with si-Chrm3 group, ## $P < 0.01$. Compared with Control group C, *** $P < 0.001$. Compared with Overexpression group, && $P < 0.01$.

Figure 7 Effect of inhibiting and overexpressing the expression of Chrm3 protein on the expression of p-ERK protein

3 讨论

LPS 是在大多数革兰氏阴性菌的外膜中发现的一种特征明确的病原体分子,可以引发强烈的免疫反应,而 LBP 作为一种 I 类急性期蛋白^[16],

在免疫系统中起到了重要的预警作用。JIN 等^[17]通过敲除 LBP 破坏了 LPS 与其受体复合物 TLR4/MD-2 的结合,从而减轻了小鼠因饮食诱导产生的非酒精性脂肪肝炎。BRASS 等^[18]研究发现 LBP 的敲除会减轻小鼠下呼吸道的炎症及皮

下黏膜的纤维化,但 MINTER 等^[19]研究表明,在注射 LPS 刺激后, *Lbp*^{-/-} 小鼠和 WT 小鼠的 Kupffer 细胞上,TLR4、CD14 和 CD18 的细胞因子表达相差并不大。此外,BELCHER 等^[20]报道了一例注射特异性小分子抑制剂 TAK-242 恢复内皮功能的案例,该抑制剂能够选择性地结合 TLR4 的胞内结构域并关闭细胞内信号传导。然而,在日本进行的一项为期 28 d 的严重脓毒症患者全因死亡率研究中发现,TAK-242 未能有效抑制脓毒症及呼吸衰竭患者的炎症因子水平,不符合继续研发的标准^[21]。这些结果表明阻断 TLR4 的信号传导不能有效阻断 LPS 诱导的炎症反应,需要寻找其他的代偿途径。

本研究通过对 WT 小鼠和 *Lbp*^{-/-} 小鼠进行 LPS 刺激后,发现 *Lbp*^{-/-} 小鼠的炎症因子 mRNA 水平显著下降,但仍然大量表达,之后便对 *Lbp*^{-/-} 小鼠腹腔巨噬细胞进行 LPS 刺激,发现 Chrm3 蛋白的表达量显著升高,故猜测 Chrm3 蛋白在传导 LPS 通路中起关键作用。在分别加入 4-damp 和 si-Chrm3 特异性抑制 Chrm3 蛋白的表达后,发现 *Lbp*^{-/-} 小鼠腹腔巨噬细胞的存活率明显升高,且 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等炎症因子的 mRNA 水平显著下降;而在使用过表达慢病毒提高 Chrm3 的蛋白表达后,炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的 mRNA 表达量显著升高,细胞存活率则显著降低。

Chrm3 属于 G 蛋白偶联受体之一,活化的 Chrm3 将通过激活 MAPK 信号通路(ERK、p38、JNK)调节 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎症因子的表达^[22-23],并对细胞的重要反应,如炎症、氧化应激、增殖和衰亡等均存在介导作用^[24]。Chrm3 可以通过上调磷脂酶 C(PLC)的活性,从而产生二酰甘油(DAG)和肌醇三磷酸(IP3),并增加细胞内钙离子的水平。而 DAG 和钙离子的增加会激活蛋白激酶 C(PKC),并经 MAPK 途径改变基因转录,其中关键的因子包括细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)。因此 Chrm3 的激活可能通过 MAPK 信号通路,对巨噬细胞造成损伤。随即对 MAPK 信号通路的相关蛋白 ERK 的磷酸化表达进行实验验证,结果表明,在 LPS 刺激下,MAPK 通路中 ERK 蛋白磷酸化显著升高,而在抑制了 Chrm3 的表达后,ERK 的蛋白磷酸化水平显著降低;在过表达 Chrm3 后,MAPK 通路的 p-ERK 则

显著升高,由此可以得出 Chrm3 通过 MAPK 通路调控细胞炎症。

综上所述,本研究通过 LPS 刺激的细胞炎症模型,发现在 *Lbp*^{-/-} 小鼠中 Chrm3 蛋白的上调可能起到代偿 LBP 蛋白的作用,通过 MAPK/ERK 信号通路引起炎症因子的产生,从而导致细胞损伤和存活率下降。目前该实验的对象为小鼠腹腔巨噬细胞,后续将在 *Lbp*^{-/-} 小鼠其他细胞和体内进行验证,希望可以在小鼠体内找到传递 LPS 诱导炎症信号的有效代偿途径。

参考文献:

- [1] WHITFIELD C, STEPHEN TRENT M. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides [J]. Annu Rev Biochem, 2014, 83: 99-128.
- [2] SCHUMANN R R, LATZ E. Lipopolysaccharide-binding protein [J]. Chem Immunol, 2000, 74: 42-60.
- [3] ZWEIGNER J, SCHUMANN R R, WEBER J R. The role of lipopolysaccharide-binding protein in modulating the innate immune response [J]. Microbes Infect, 2006, 8(3): 946-952.
- [4] ZELDIN D C, EGGLESTON P, CHAPMAN M, et al. How exposures to biologics influence the induction and incidence of asthma [J]. Environ Health Perspect, 2006, 114(4): 620-626.
- [5] 陈婷婷,单杉,李南,等. β -arrestin2 基因敲除对小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 40-46.
CHEN T T, SHAN S, LI N, et al. Effect of β -arrestin2 deficiency on the function of mouse peritoneal macrophages [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 40-46.
- [6] SASAGAWA T, TAKAGI H, MAKINODA S. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer [J]. J Infect Chemother, 2012, 18(6): 807-815.
- [7] TAPPING R I. Innate immune sensing and activation of cell surface Toll-like receptors [J]. Semin Immunol, 2009, 21(4): 175-184.
- [8] SONG Z, MENG L, HE Z, et al. LBP protects hepatocyte mitochondrial function via the PPAR-CYP4A2 signaling pathway in a rat sepsis model [J]. Shock, 2021, 56(6): 1066-1079.
- [9] 米传靓,付彬,李思迪,等. Agtr1a 调节 LPS 诱导的 *Lbp*^{-/-} 小鼠原代肝细胞炎症 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(8): 1021-1027.
MI C L, FU B, LI S D, et al. Agtr1a regulates LPS-induced inflammation in primary hepatocytes of *Lbp*^{-/-} mice [J].

- Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(8): 1021–1027.
- [10] 米传靓, 付彬, 李思迪, 等. Adra1a 调节 LPS 诱导的 Lbp^{-/-}小鼠原代肝细胞炎症反应 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 84–91.
- MI C L, FU B, LI S D, et al. Adra1a regulates LPS-induced inflammation in primary hepatocytes of Lbp^{-/-} mice [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5): 84–91.
- [11] KUOL N, DAVIDSON M, KARAKKAT J, et al. Blocking muscarinic receptor 3 attenuates tumor growth and decreases immunosuppressive and cholinergic markers in an orthotopic mouse model of colorectal cancer [J]. Int J Mol Sci, 2022, 24(1): 596.
- [12] BOS I T, GOSENS R, ZUIDHOF A B, et al. Inhibition of allergen-induced airway remodelling by tiotropium and budesonide: a comparison [J]. Eur Respir J, 2007, 30(4): 653–661.
- [13] RAZANI-BOROUJERDI S, BEHL M, HAHN F F, et al. Role of muscarinic receptors in the regulation of immune and inflammatory responses [J]. J Neuroimmunol, 2008, 194(1/2): 83–88.
- [14] 李思迪, 付彬, 郭中坤, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建脂多糖结合蛋白基因敲除小鼠 [J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(4): 294–300.
- LI S D, FU B, GUO Z K, et al. Construction of lipopolysaccharide binding protein knockout mice using CRISPR/Cas9 technology [J]. Lab Anim Comp Med, 2022, 42(4): 294–300.
- [15] 耿田欣, 臧光耀, 严金川. 3% 巯基乙酸盐肉汤诱导法高效提取小鼠腹腔巨噬细胞 [J]. 江苏大学学报(医学版), 2019, 29(1): 45–48, 53.
- GENG T X, ZANG G Y, YAN J C. Efficient extraction of primary peritoneal macrophages in mice induced by 3% thioglycollate broth [J]. J Jiangsu Univ Med Ed, 2019, 29(1): 45–48, 53.
- [16] HE Z, SONG Z, MENG L, et al. Lipopolysaccharide-induced transcriptional changes in LBP-deficient rat and its possible implications for liver dysregulation during sepsis [J]. J Immunol Res, 2021, 2021: 8356645.
- [17] JIN C J, ENGSTLER A J, ZIEGENHARDT D, et al. Loss of lipopolysaccharide-binding protein attenuates the development of diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2017, 32(3): 708–715.
- [18] BRASS D M, SAVOV J D, WHITEHEAD G S, et al. LPS binding protein is important in the airway response to inhaled endotoxin [J]. J Allergy Clin Immunol, 2004, 114(3): 586–592.
- [19] MINTER R M, BI X, BEN-JOSEF G, et al. LPS-binding protein mediates LPS-induced liver injury and mortality in the setting of biliary obstruction [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009, 296(1): G45–G54.
- [20] BELCHER J D, CHEN C, NGUYEN J, et al. Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease [J]. Blood, 2014, 123(3): 377–390.
- [21] RICE T W, WHEELER A P, BERNARD G R, et al. A randomized, double-blind, placebo-Controlled trial of TAK-242 for the treatment of severe sepsis [J]. Crit Care Med, 2010, 38(8): 1685–1694.
- [22] LUO L, XI C, XU T, et al. Muscarinic receptor mediated signaling pathways in hepatocytes from CCL4-induced liver fibrotic rat [J]. Eur J Pharmacol, 2017, 807: 109–116.
- [23] 尹嘉玉. 海参岩藻聚糖改善 LPS 诱导的 C57BL/6J 小鼠急性肝损伤的机制 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2020.
- YIN J Y. The mechanisms of the fucoidan from seacucumber *Apostichopus japonicus* on attenuating lipopolysaccharide-challenged liver injury in C57BL/6J mice [D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2020.
- [24] 董琳琳, 芦永良, 鄂维建, 等. MAPK 信号通路——肝棘球蚴病治疗新靶点 [J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(3): 714–718.
- DONG L L, LU Y L, E W J, et al. The MAPK signaling pathway: a new target for the treatment of hepatic echinococcosis [J]. J Clin Hepatol, 2022, 38(3): 714–718.

〔收稿日期〕2024-09-18