

引文格式:崔铮,靖鹏举,朱冬梅,王媛.地塞米松对脂多糖诱导人视网膜色素上皮细胞炎症损伤及 NLRP3/Caspase-1 通路的影响[J].眼科新进展,2020,40(9):826-830. doi:10.13389/j.cnki.rao.2020.0188

【实验研究】

地塞米松对脂多糖诱导人视网膜色素上皮细胞炎症损伤及 NLRP3/Caspase-1 通路的影响[△]

崔铮 靖鹏举 朱冬梅 王媛

作者简介:崔铮 (ORCID: 0000-0002-5989-2547),女,1984年6月出生,河南滑县人,硕士。主要从事眼底病方面的研究。E-mail: cwt810707@sina.com
通信作者:王媛 (ORCID: 0000-0001-8740-729X),女,1981年8月出生,河南南阳人,博士,副主任医师。主要研究方向:眼底病、屈光、青光眼。E-mail: sunrain_6@163.com
收稿日期:2019-12-25
修回日期:2020-03-21
本文编辑:盛丽娜
△基金项目:2018年河南省医学科技攻关项目(编号:2018020799)
作者单位:450007 河南省郑州市,郑州大学附属郑州中心医院眼科

【摘要】 目的 探究地塞米松(Dex)对脂多糖(LPS)诱导人视网膜色素上皮(HRPE)细胞炎症损伤及核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(NLRP3)/半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)通路的影响。方法 体外培养 ARPE-19 细胞株,MTT 法检测不同浓度 Dex 处理细胞 24 h、48 h、74 h 对 LPS 诱导 ARPE-19 细胞存活率的影响,确定 Dex 最佳处理浓度和时间。ARPE 细胞随机分为:正常对照组(NC 组)、LPS 组(5 mg · L⁻¹ LPS)、Dex 组(0.20 mol · L⁻¹ Dex)、Dex + LPS 组(0.20 mol · L⁻¹ Dex + 5 mg · L⁻¹ LPS),RT-qPCR 检测各组细胞肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素(IL)-1β、IL-6、NLRP3、Caspase-1 mRNA 相对表达量,ELISA 法测定 TNF-α、IL-1β、IL-6 蛋白表达水平,Western blot 检测 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达水平。结果 同一时间点,与 NC 组比较,LPS 组 ARPE-19 细胞存活率均显著降低(均为 P < 0.05),且随着 Dex 浓度增加,细胞存活率呈先升高后下降的趋势;0.20 mol · L⁻¹ Dex 作用 LPS 诱导的 ARPE-19 细胞 24 h 时细胞存活率为(90.77 ± 5.73)%,接近 NC 组,因此选用 0.20 mol · L⁻¹ Dex 作用 24 h 用于后续实验。NC 组与 Dex 组间 TNF-α、IL-1β、IL-6、NLRP3、Caspase-1 mRNA 相对表达量差异均无统计学意义(均为 P > 0.05)。与 NC 组、Dex 组比较,LPS 组、Dex + LPS 组 TNF-α、IL-1β、IL-6、NLRP3、Caspase-1 mRNA 及蛋白表达水平均显著升高,且 Dex + LPS 组 TNF-α、IL-1β、IL-6、NLRP3、Caspase-1 mRNA 及蛋白表达水平均显著低于 LPS 组(均为 P < 0.05)。结论 Dex 可能通过抑制 NLRP3/Caspase-1 通路减轻 LPS 诱导的 HRPE 炎症损伤。
【关键词】 地塞米松;脂多糖;人视网膜色素上皮细胞;炎症损伤;核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3/半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 通路
【中图分类号】 R774.1

多种眼科疾病与视网膜炎症相关,如葡萄膜炎、糖尿病视网膜病变及年龄相关性黄斑变性等^[1-3]。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)可通过激活白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、活化核因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB)炎症信号通路等导致炎症因子释放,诱导人视网膜色素上皮(retinal pigment epithelial, RPE)细胞产生炎症反应,炎症反应可引起多种化学介质、细胞因子等分泌,导致视力不同程度损伤^[4-6]。地塞米松(dexamethasone, Dex)是一种人工合成的皮质类固醇,可有效减轻和防止组织炎症反应,减轻炎症表现。有研究报道,Dex 可减轻 LPS 内毒素诱导的小鼠葡萄膜炎炎症反应^[7-8],但关于 Dex 对 LPS 诱导 RPE 细胞炎症反应的作用鲜见报道。核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(nucleotide-binding oligomerization domain like receptor protein 3, NLRP3)属于 NOD 样受体家族中一种重要炎性小体,可通过激活含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1),在固有免疫及疾病发生发展中发挥重要作用,与系统性红斑狼疮等多种疾病有关^[9-11]。因此,本研究拟探究 Dex 对 LPS 诱导 RPE 细胞 ARPE-19 炎症损伤的作用,及其对 NLRP3/Caspase-1 通路的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 ARPE-19 细胞(货号:CC-Y1051)购自 ATCC 细胞库;Dex(HPLC ≥ 98%,货号:D8040-100 mg)、LPS(货号:L8880)均购自北京索莱宝科技有限公司;DMEM/F-12 培养基(货号:12634010)、胎牛血清(货号:10099141)均购自美国 Gibco 公司;PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(货号:6210A)、Mir-X miRNA qRT-PCR SYBR Kit(货号:638314)、TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)(货号:RR820A)均购自大连宝生物科技有限公司;引物由上海生工生物科技有限公司合成;蛋白抽提试剂盒(批号:P0028)、BCA 蛋白定量试剂盒(批号:P0010S)均购自上海碧云天有限公司;MTT 试剂盒(货号:V13154)、人肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-alpha, TNF-α) ELISA 试剂盒(货号:BMS223HS)、人 IL-1β 试剂盒(货号:BMS213HS)、人 IL-6 ELISA 试剂盒(货号:BMS213HS)、兔源 NLRP3 抗体(货号:PA5-20838)、Caspase-1(货号:MA5-32137)、GAPDH 抗体(货号:TAB1001)、羊抗兔 IgG(货号:A32731)均购自美国 Invitrogen 公司。MOD-EL550 型酶标仪、7300 RT-qPCR 仪均购自美国 Bio-

Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 常规复苏 ARPE-19 细胞后,于含体积分数 10% 胎牛血清、 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 青-链霉素的 DMEM/F12 培养基中,置于含体积分数 5% CO_2 、 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中培养,每 2 d 更换培养基, $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 MTT 检测及实验分组 将对数期生长 ARPE-19 细胞消化计数后以每孔 5000 个接种于 96 孔板,每孔添加 $100\text{ }\mu\text{L}$ 培养基,待细胞融合至 85%~90% 时更换为无血清培养基孵育 24 h,随机分组:无任何处理的 ARPE-19 细胞为正常对照(normal control, NC) 组; $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS 刺激 24 h 的 ARPE-19 细胞为 LPS 组; $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.10\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.20\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.40\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.80\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Dex 分别预处理 2 h 后, $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS 刺激 24 h 的 ARPE-19 细胞为不同浓度 Dex + LPS 组。各组均继续培养 24 h、48 h、72 h 后,采用 MTT 试剂盒检测细胞存活率,具体步骤严格按照试剂盒说明书进行。细胞存活率 = $(D_{\text{处理组}}/D_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

筛选出 Dex 的最佳作用浓度和时间后,确定最终分组:NC 组、Dex 组($0.20\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Dex 处理 ARPE-19 细胞 24 h)、LPS 组、Dex + LPS 组($0.20\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Dex 预处理 2 h 后, $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS 处理 ARPE-19 细胞 24 h)。取对数期生长 ARPE-19 细胞消化计数后,以每孔 5×10^6 个接种于 6 孔细胞板,分组处理后收集细胞进行后续检测。

1.2.3 RT-PCR 检测 收集各组细胞,添加 Trizol 试剂提取总 RNA,纯度及浓度检测合格后反转录合成 cDNA,采用 RT-qPCR 试剂盒说明进行 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、NLRP3、Caspase-1 mRNA 扩增,GAPDH 为内参,引物序列见表 1。每个样品设置 3 个复孔。反应条件设置: $95\text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $95\text{ }^\circ\text{C}$ 5 s, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 34 s;40 个循环,添加溶解曲线。TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、NLRP3、Caspase-1 mRNA 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析。

表 1 RT-qPCR 引物序列

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
TNF- α	AACTAGTGGTGCCAGCCGAT	CTTCACAGCAGGCAGTATCACTC
IL-1 β	GCAACTGTTCGGAAGTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
IL-6	AGTGAGGAACAAGCCAGAGC	CAGGGGTGTTATTCATCT
NLRP3	CCCGCTGTGAGTCCATT A	GACGCCCACTCCAACAT
Caspase-1	ACAAGGCACGGGACCTATG	TCCCAGTCAGTCCTGGAATG
GAPDH	GTCCGATGGCTAGCTAGCATCGAT	TGCTAGCTGGCATGCCCGATCGATC

1.2.4 ELLSA 检测 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 蛋白水平

ELLSA 法检测各组 ARPE-19 细胞 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 蛋白表达水平,具体步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.5 Western blot 检测 NLRP3、Caspase-1 蛋白水平 提取各组 ARPE-19 细胞总蛋白,BCA 试剂盒检测 562 nm 处样品蛋白含量。取 $60\text{ }\mu\text{g}$ 蛋白样品

进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳,恒压转膜, $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 脱脂奶粉室温封闭 120 min,PBST 冲洗 3 次,每次 20 min,分别添加一抗 NLRP3 抗体(1:1000)、Caspase-1 抗体(1:1000)、GAPDH 抗体(1:500), $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜,PBST 缓冲液洗 3 次,每次 20 min,用适量含 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 脱脂奶粉的 PBS 稀释辣根过氧化物酶标记的二抗 IgG(1:5000)室温孵育 1 h 后,洗膜,显色,曝光拍照,应用 Image J 图像分析软件分析各蛋白条带灰度值,以靶蛋白条带与 GAPDH 蛋白条带比值为靶蛋白相对表达量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、NLRP3、Caspase-1 mRNA 及蛋白水平均以均数 \pm 标准差表示,多组比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA 检验),组内两两比较采用 SNK- q 检验。检验水准: $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 Dex、LPS 对 ARPE-19 细胞活性的影响 同一时间点,与 NC 组比较,LPS 组 ARPE-19 细胞存活率均显著降低(均为 $P < 0.05$);与 LPS 组比较,不同浓度 Dex + LPS 组 ARPE-19 细胞存活率均显著增加(均为 $P < 0.05$)。同一作用时间,随着 Dex 浓度增加,细胞存活率呈先升高后下降的趋势;同一处理浓度,24 h、48 h、72 h 细胞活性差异无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。其中 $0.20\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Dex 作用 LPS 诱导 ARPE-19 细胞 24 h、48 h 时细胞存活率均接近 NC 组,综合考虑后选用 $0.20\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Dex 作用 24 h 用于后续实验(见表 2)。

表 2 各组 ARPE-19 细胞存活率

组别	细胞存活率/%		
	24 h	48 h	72 h
NC 组	95.61 \pm 3.43	95.28 \pm 3.11	94.42 \pm 3.74
LPS 组	47.84 \pm 5.62 ^a	45.73 \pm 4.61 ^a	43.69 \pm 4.12 ^a
不同浓度 Dex + LPS 组			
0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	57.16 \pm 3.43 ^{ab}	58.25 \pm 3.28 ^{ab}	56.18 \pm 4.98 ^{ab}
0.10 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	76.85 \pm 3.85 ^{abc}	74.46 \pm 4.29 ^{abc}	73.26 \pm 4.53 ^{abc}
0.20 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	90.76 \pm 5.91 ^{bed}	90.97 \pm 5.73 ^{bed}	89.86 \pm 5.35 ^{bed}
0.40 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	81.76 \pm 4.26 ^{abede}	80.76 \pm 5.21 ^{abede}	80.41 \pm 4.13 ^{abede}
0.80 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	64.76 \pm 3.75 ^{abedef}	62.76 \pm 4.80 ^{abedef}	61.76 \pm 3.61 ^{abedef}

注:与 NC 组比较,^a $P < 0.05$;与 LPS 组比较,^b $P < 0.05$;与 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Dex + LPS 组比较,^c $P < 0.05$;与 $0.10\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Dex + LPS 组比较,^d $P < 0.05$;与 $0.20\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Dex + LPS 组比较,^e $P < 0.05$;与 $0.40\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Dex + LPS 组比较,^f $P < 0.05$

2.2 Dex 对 LPS 诱导的 ARPE-19 细胞炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 水平的影响

NC 组与 Dex 组间 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 相对表达量差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。与 NC 组、Dex 组比较,LPS 组、Dex + LPS 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 相对表达量均显著升高,且 Dex + LPS 组各炎症因子 mRNA 相对表达量均显著低于 LPS 组(均为 $P < 0.05$)(见表 3)。

表3 各组 ARPE-19 细胞各炎症因子 mRNA 相对表达量

组别	TNF-α	IL-1β	IL-6
NC 组	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.11	1.01 ± 0.12
Dex 组	1.03 ± 0.12	1.02 ± 0.10	1.02 ± 0.11
LPS 组	91.26 ± 16.47 ^{ab}	23.86 ± 4.17 ^{ab}	39.54 ± 7.92 ^{ab}
Dex + LPS 组	12.38 ± 2.46 ^{abc}	6.72 ± 1.35 ^{abc}	8.23 ± 1.65 ^{abc}
F 值	164.177	145.856	123.796
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 NC 组比较,^a*P* < 0.05;与 Dex 组比较,^b*P* < 0.05;与 LPS 组比较,^c*P* < 0.05

2.3 Dex 对 LPS 诱导的 ARPE-19 细胞炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 蛋白表达水平的影响 NC 组与 Dex 组 TNF-α、IL-1β、IL-6 蛋白表达水平差异均无统计学意义(均为 *P* > 0.05)。与 NC 组、Dex 组比较,LPS 组、Dex + LPS 组 TNF-α、IL-1β、IL-6 蛋白表达水平均显著升高,且 Dex + LPS 组各蛋白表达水平均显著低于 LPS 组(均为 *P* < 0.05)(见表4)。

表4 各组 ARPE-19 细胞 TNF-α、IL-1β、IL-6 蛋白表达水平

组别	TNF-α/ng · L ⁻¹	IL-1β/ng · L ⁻¹	IL-6/ng · L ⁻¹
NC 组	121.31 ± 24.16	31.95 ± 6.39	69.81 ± 10.16
Dex 组	123.64 ± 23.82	33.07 ± 6.62	65.72 ± 11.15
LPS 组	685.43 ± 116.08 ^{ab}	483.86 ± 74.67 ^{ab}	238.44 ± 37.69 ^{ab}
Dex + LPS 组	236.58 ± 45.36 ^{abc}	189.72 ± 27.59 ^{abc}	112.63 ± 22.52 ^{abc}
F 值	152.929	169.240	72.519
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 NC 组比较,^a*P* < 0.05;与 Dex 组比较,^b*P* < 0.05;与 LPS 组比较,^c*P* < 0.05

2.4 Dex 对 LPS 诱导的 ARPE-19 细胞中 NLRP3/Caspase-1 通路的影响 NC 组与 Dex 组 NLRP3、Caspase-1 mRNA 及蛋白表达水平差异均无统计学意义(均为 *P* > 0.05)。与 NC 组、Dex 组比较,LPS 组、Dex + LPS 组 NLRP3、Caspase-1 mRNA 及蛋白表达水平均显著升高,且 Dex + LPS 组 NLRP3、Caspase-1 mRNA 及蛋白水平均显著低于 LPS 组(均为 *P* < 0.05)(见图1、表5)。

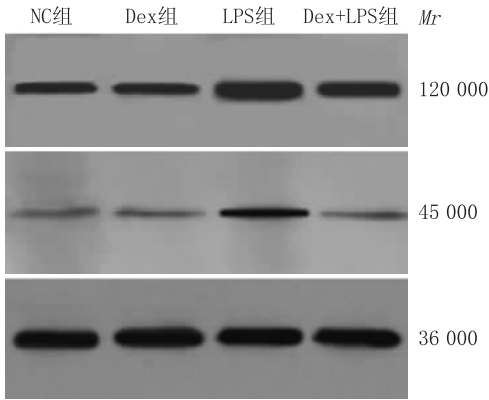


图1 Western blot 检测各组 ARPE-19 细胞中 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达水平

表5 各组 ARPE-19 细胞中 NLRP3、Caspase-1 mRNA 和蛋白表达水平

组别	NLRP3		Caspase-1	
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
NC 组	0.99 ± 0.11	0.32 ± 0.09	1.01 ± 0.11	0.13 ± 0.03
Dex 组	0.98 ± 0.12	0.33 ± 0.10	1.03 ± 0.12	0.14 ± 0.03
LPS 组	11.57 ± 1.54 ^{ab}	1.12 ± 0.13 ^{ab}	19.57 ± 2.91 ^{ab}	0.31 ± 0.05 ^{ab}
Dex + LPS 组	3.38 ± 0.46 ^{abc}	0.57 ± 0.11 ^{abc}	4.16 ± 0.62 ^{abc}	0.22 ± 0.06 ^{abc}
F 值	231.929	71.626	212.950	21.266
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 NC 组比较,^a*P* < 0.05;与 Dex 组比较,^b*P* < 0.05;与 LPS 组比较,^c*P* < 0.05

3 讨论

RPE 细胞在视觉形成及维持过程中起非常关键的作用,而炎症反应可导致 RPE 细胞炎症损伤,与多种眼科疾病发病机制有关,可引起不同程度视力受损^[12-14]。本研究采用 LPS 诱导 ARPE-19 细胞发现,与正常 ARPE-19 细胞比较,LPS 组 ARPE-19 细胞存活率降低,细胞炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 的 mRNA 及蛋白表达水平升高。TNF-α 主要由单核巨噬细胞分泌,在病理状态下水平上升,有抗感染、抗炎性介质作用;而 IL-1β、IL-6 均为重要促炎因子,提示 LPS 诱导 ARPE-19 细胞炎症损伤成功。本研究还发现,与 LPS 组比较,Dex + LPS 组 ARPE-19 细胞中 TNF-α、IL-1β、IL-6 mRNA 及蛋白表达水平均显著降低。Dex 是一种糖皮质激素,可抑制炎症细胞聚集、炎症介质合成和释放等,有效减轻炎症反应^[15-16]。张治成等^[17]报道,鼻窦内窥镜术后盐酸氨溴索联合 Dex 雾化治疗可显著降低患者血清 IL-5、IL-12 水平,缓解鼻窦炎临床症状、促进鼻腔黏膜功能恢复。Yu 等^[8]报道,Dex 可通过下调 IL-6、TNF-α 表达减轻 LPS 诱导性小鼠葡萄膜炎前房炎症,对小鼠葡萄膜炎有保护作用。综合以上研究及本研究结果,我们认为,Dex 可减轻 ARPE-19 细胞炎症反应,可能与下调 TNF-α、IL-1β、IL-6 因子的表达有关。

NLRP3 在单核细胞、巨噬细胞等免疫细胞中大量表达,可通过 LRR 结构域与其配体结合,募集凋亡相关斑点样蛋白(ACS)、Caspase 形成复杂炎性小体,产生活化的 Caspase-1(又称 IL-1β 转化酶),进而将 IL-1β 前体裂解为成熟 IL-1β 分泌到细胞外发挥作用。NLRP3 还可激活 NF-κB 信号通路,引起 IL-1、TNF-α、IL-8 等大量促炎因子产生级联放大效应^[18-19]。Qu 等^[20]报道,肉桂醛可通过抑制 DSS 诱导的结肠炎细胞 RAW264.7 中 NLRP3 炎症小体表达,进而抑制细胞中 TNF-α、IL-1β、IL-6 活性,减轻溃疡性结肠炎炎症反应。Bian 等^[21]报道,Dex 处理单侧角膜中央碱烧伤大鼠,可下调 NLRP3、Caspase-1、IL-1β mRNA 及蛋白表达水平,抑制 NLRP3 炎症小体通路,促进角膜碱烧伤创面愈合。本研究结果显

示,与 LPS 组比较, Dex + LPS 组 ARPE-19 细胞中 NLRP3、Caspase-1 mRNA 及蛋白表达水平均显著降低,提示 Dex 可能通过下调 NLRP3、Caspase-1 的表达抑制 NLRP3/Caspase-1 通路。

综上所述, Dex 可能通过抑制 NLRP3/Caspase-1 通路下调炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的表达,减轻 LPS 诱导的 ARPE-19 细胞炎症损伤作用。但 Dex 抑制 ARPE-19 细胞炎症损伤的具体作用机制及是否还存在其他通路共同作用尚不完全清楚,有待后期进一步深入探究。本研究结果可能为视网膜炎症相关性眼科疾病的防治提供一定参考。

参考文献

[1] 卢颖毅,谷潇雅,喻晓兵,戴红. 不同年龄视网膜中央静脉阻塞继发黄斑水肿患者玻璃体腔注射地塞米松玻璃体内植入剂疗效比较[J]. 中华实验眼科杂志, 2019, 37(5): 363-368.

LU Y Y, GU X Y, YU X B, DAI H. Comparative study of intravitreal dexamethasone implant in the treatment of macular edema secondary to central retinal vein occlusion with different ages[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2019, 37(5): 363-368.

[2] 李彦,李化,周善璧. 姜黄素抑制脂多糖诱导视网膜色素上皮细胞炎症反应[J]. 重庆医科大学学报, 2018, 143(7): 994-998.

LI Y, LI H, ZHOU S B. Inhibitory effect of curcumin on inflammatory responses induced by LPS in human retinal pigment epithelial cells[J]. *J Chongqing Med Univ*, 2018, 143(7): 994-998.

[3] 刘爱琴,宋子宣. 改良视网膜光凝术治疗糖尿病视网膜病变的效果及其对血清血管内皮生长因子和内皮素 1 水平的影响[J]. 新乡医学院学报, 2019, 36(4): 372-375.

LIU A Q, SONG Z X. Effect of modified retinal photocoagulation on diabetic retinopathy and its effect on serum vascular endothelial growth factor and endothelin 1 levels[J]. *J Xinxiang Med Univ*, 2019, 36(4): 372-375.

[4] NOAILLES A, MANEU V, CAMPELLO L, LAX P, CUENCA N. Systemic inflammation induced by lipopolysaccharide aggravates inherited retinal dystrophy[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 350-367.

[5] ZHENG Y, GAO J M, LYU C, LANG L H, SHI J S, YU C Y, et al. Icariside II inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation and amyloid production in astrocytes by regulating IKK/I κ B/NF- κ B signaling pathway[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(2): 154-162.

[6] LI X, MIN L, WEI J, GOU H, BAO Z, WANG J, et al. Heliangin inhibited lipopolysaccharide-induced inflammation through signaling NF- κ B pathway on LPS-induced RAW 264. 7 cells[J]. *Biom. Pharm*, 2017, 88(1): 102-108.

[7] SCHMID A S, HEMMERLE T, PRETTO F, KIPAR A, NERI D. Antimicrobial-based targeted delivery of interleukin-4 synergizes with dexamethasone for the reduction of inflammation in arthritis[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2018, 57(4): 748-755.

[8] YU P, QIU Y G, LIN R, FU X Y, HAO B T, LEI B. Retinal transcriptome profile in mice following dexamethasone treatment for endotoxin-induced uveitis [J]. *J South Med Univ*, 2018, 38(8): 901-909.

[9] 张慧珊,叶乐平. 炎性小体与肺部疾病发生及其干预的研究进展[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2019, 34(9): 711-714.

ZHANG H S, YE L P. Advances in inflammasome and pulmonary disease and its intervention[J]. *Chin J Appl Clin Pediatr*, 2019, 34(9): 711-714.

[10] 麻贞贞,赵萍,吕继彩,孙红胜,杨清锐. 系统性红斑狼疮患者外周血单个核细胞中微 RNA-223 及核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族蛋白 3 炎性小体的表达及临床意义[J]. 中华风湿病学杂志, 2019, 23(1): 10-14.

MA Z Z, ZHAO P, LYU J C, SUN H S, YANG Q R. Expression and clinical significance of microRNA-223 and NLRP3 inflammasome in peripheral blood mononuclear cells in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Chin J Rheumatol*, 2019, 23(1): 10-14.

[11] ARTLETT C M, SASSI-GAHA S, HOPE J L. Mir-155 is overexpressed in systemic sclerosis fibroblasts and is required for NLRP3 inflammasome-mediated collagen synthesis during fibrosis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2017, 19(1): 144-151.

[12] 杨婧,陈松. 外泌体在年龄相关性黄斑变性发病机制中的作用研究进展[J]. 中华实验眼科杂志, 2017, 35(1): 83-86.

YANG J, CHEN S. Effects of exosomes in pathogenesis of age-related macular degeneration[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2017, 35(1): 83-86.

[13] 韩若安,陈有信. 临床常见眼底疾病眼底自身荧光特征及其意义研究现状[J]. 中华眼底病杂志, 2017, 33(1): 83-86.

HAN R A, CHEN Y X. Fundus autofluorescence and its applications in retinal diseases[J]. *Chin J Ocul Fundus Dis*, 2017, 33(1): 83-86.

[14] 钟毅敏,李晶明,汪建新,于强. 转录因子 X 盒结合蛋白 1 参与视网膜色素上皮抗氧化防御机制[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2017, 38(1): 1-7.

ZHONG Y M, LI J M, ZHANG X, WANG J X, YU Q. Role of X-box binding protein 1 in acrolein-induced oxidative injury of retinal pigment epithelium[J]. *J Sun Yat-Sen Univ (Med Sci Edit)*, 2017, 38(1): 1-7.

[15] CIRIGLIANO G, PASTORE M R, PERROTTA A A, DE GIACINTO C, TOGNETTO D. Combined descemet stripping automated endothelial keratoplasty and intravitreal dexamethasone implant for concomitant pseudophakic bullous keratopathy and cystoid macular edema[J]. *Int J Ophthalmol*, 2019, 12(5): 176-179.

[16] 张宏彬,杨俭伟,白萍. Nd:YAG 激光泪道成形术中应用妥布霉素地塞米松眼膏的疗效和安全性观察[J]. 中国药房, 2017, 28(35): 4992-4995.

ZHANG H B, YANG J W, BAI P. Efficacy and safety observation of tobramycin dexamethasone eye ointment in Nd:YAG laser lacrimal duct plasty[J]. *CHN Pharm*, 2017, 28(35): 4992-4995.

[17] 张治成,杨晓,杨晓刚. 鼻窦内窥镜治疗慢性鼻窦炎术后应用盐酸氨溴索和地塞米松雾化吸入对疗效、血清 IL-5 和 IL-12 水平的影响[J]. 重庆医学, 2017, 46(17): 2372-2374.

ZHANG Z C, YANG X, YANG X G. Impact of ambroxol hydrochloride and dexamethasone by nasal spray inhalation on efficacy and serum IL-5 and IL-12 levels after endoscopic sinus surgery in treating chronic sinusitis[J]. *Chongqing Med*, 2017, 46(17): 2372-2374.

[18] 宋占帅,邵华,陈艳芹,张蓉. NLRP3/IL-1 β /TGF- β 1 信号轴在矽肺肺纤维化大鼠模型中的表达及意义[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2018, 36(11): 819-823.

SONG Z S, SHAO H, CHEN Y Q, ZHANG R. Expression and significance of NLRP3/IL-1 β /TGF- β 1 signal axis in rat model of silicosis pulmonary fibrosis[J]. *Chin J Ind Hyg Occup Dis*, 2018, 36(11): 819-823.

[19] 张任飞,杨泓,郭立新. Nod 样受体蛋白 3 和白细胞介素 1 β 在 2 型糖尿病合并慢性牙周炎中的作用[J]. 中华糖尿病杂志, 2017, 9(8): 509-514.

ZHANG R F, YANG H, GUO L X. Role of nod-like receptor family pyrin domain containing 3 and interleukin-1 β on type 2 diabetes mellitus with chronic periodontitis[J]. *Chin J Diab Mell*, 2017, 9(8): 509-514.

[20] QU S, SHEN Y, WANG M, WANG X, YANG Y. Suppression of miR-21 and miR-155 of macrophage by cinnamaldehyde ameliorates ulcerative colitis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 67(1): 22-34.

[21] BIAN F, XIAO Y, ZAHEER M, VOLPE E A, PFLUGFELDER S C, LI D Q, et al. Inhibition of NLRP3 inflammasome pathway by butyrate improves corneal wound healing in corneal alkali burn[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(3): 562-575.

Effects of dexamethasone on lipopolysaccharide-induced inflammatory damage of human retinal pigment epithelial cells and NLRP3/Caspase-1 pathway

CUI Zheng, JING Pengju, ZHU Dongmei, WANG Yuan

Department of Ophthalmology, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450007, Henan Province, China

Corresponding author: WANG Yuan, E-mail: sunrain_6@163.com

[Abstract] Objective To investigate the effects of dexamethasone (Dex) on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory damage of human retinal pigment epithelial cells (HRPE) and the nucleotide-binding oligomerization domain like receptor protein 3/Caspase-1 (NLRP3/Caspase-1) pathway. **Methods** ARPE-19 cell line was cultured *in vitro*, thiazole blue (MTT) was used to detect the effects of Dex at different concentrations on the activity of LPS-induced ARPE-19 cells to determine the optimum concentration and time. The ARPE-19 cells was divided into four groups: normal control group (NC group, normal growth ARPE-19 cells), LPS inflammatory injury group (LPS group, 5 mg · L⁻¹ LPS treatment to cells), Dex group (0.20 mol · L⁻¹ Dex treatment to cells), Dex + LPS group (0.20 mol · L⁻¹ Dex + 5 mg · L⁻¹ LPS treatment to cells). The levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β), IL-6, NLRP3 and Caspase-1 mRNAs were detected by RT-qPCR, the levels of TNF-α, IL-1β, IL-6 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and Western blot was used to detect the expressions of NLRP3 and Caspase-1 proteins in ARPE-19 cells. **Results**

At the same time, compared with NC group, the activity of ARPE-19 cells in LPS group decreased significantly (all $P < 0.05$), and as the concentration of Dex increases, the cell survival rate increases first and then decreases. The cell survival rate of ARPE-19 cells induced by LPS by 0.20 mol · L⁻¹ Dex for 24 hours was $(90.77 \pm 5.73)\%$, which was close to the NC group, and therefore, 0.20 mol · L⁻¹ dex for 24 hours was chosen as the optimal concentration for the follow experiment. There was no significant difference in TNF-α, IL-1β, IL-6, NLRP3, Caspase-1 mRNA levels between NC group and Dex group (all $P > 0.05$). Compared with NC group and Dex group, TNF-α, IL-1β, IL-6, NLRP3, Caspase-1 mRNA and protein levels were increased in LPS group and Dex + LPS group, and the levels of TNF-α, IL-1β, IL-6, NLRP3, Caspase-1 mRNA and protein in Dex + LPS group were significantly lower than those in LPS group (all $P < 0.05$). **Conclusion** Dex may reduce the lipopolysaccharide induced inflammatory damage of HRPE cells by inhibiting NLRP3/Caspase-1 pathway.

[Key words] dexamethasone; lipopolysaccharide; human retinal pigment epithelial cells; inflammatory damage; nucleotide-binding oligomerization domain like receptor protein 3/Caspase-1 pathway