

NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3对哮喘小鼠 气道炎症反应及细胞焦亡的调控作用

惠超 刘馨

(锦州医科大学附属第一医院检验科, 辽宁锦州 121000)

[摘要] **目的** 研究NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3 (nod-like receptor, pyrin domain containing 3, NLRP3) 对哮喘小鼠气道炎症反应及细胞焦亡的调控作用。**方法** 将NLRP3野生型 (wild type, WT) C57BL/6J小鼠分为NLRP3-WT对照组、NLRP3-WT哮喘组, NLRP3敲除 (knockout, KO) 小鼠分为NLRP3-KO对照组、NLRP3-KO哮喘组, 每组各10只。采用卵白蛋白+氢氧化铝腹腔注射致敏、卵白蛋白吸入激发的方法建立哮喘模型。检测各组小鼠气道反应性指标增强呼气间歇; 苏木精-伊红染色观察各组小鼠肺组织形态学改变, 并进行炎症评分; 收集各组小鼠支气管肺泡灌洗液, 计数中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞数目, 并检测白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 、IL-18含量; 采用Western blot法检测各组小鼠肺组织中NLRP3、裂解型含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-1、Gasdermin D-N表达水平的差异。**结果** 与NLRP3-WT对照组相比, NLRP3-WT哮喘组小鼠肺组织出现气道平滑肌增厚、炎性细胞浸润等形态学改变; NLRP3-KO哮喘组小鼠上述形态学表现较NLRP3-WT哮喘组小鼠明显改善。与NLRP3-WT对照组相比, NLRP3-WT哮喘组小鼠增强呼气间歇、肺组织炎症评分, 支气管肺泡灌洗液中中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞计数及IL-1 β 、IL-18含量, 肺组织中NLRP3、裂解型含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-1、Gasdermin D-N的表达水平均升高 ($P<0.05$); NLRP3-KO哮喘组小鼠上述各检测指标水平均低于NLRP3-WT哮喘组 ($P<0.05$)。**结论** NLRP3高表达与哮喘发病有关, 激活气道炎症反应及细胞焦亡可能是与之相关的分子机制。

[中国当代儿科杂志, 2021, 23 (9): 959-964]

[关键词] 支气管哮喘; NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3; 基因敲除; 炎症反应; 细胞焦亡; 小鼠

Regulatory effect of NLRP3 on airway inflammatory response and pyroptosis in mice with asthma

HUI Chao, LIU Xin. Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China (Liu X, Email: 420901580@qq.com)

Abstract: Objective To study the regulatory effect of the NOD-like receptor, pyrin domain-containing 3 (NLRP3) on airway inflammatory response and pyroptosis in mice with asthma. **Methods** The NLRP3 wild-type (WT) C57BL/6J mice were divided into two groups: NLRP3-WT control and NLRP3-WT asthma. The mice with NLRP3 knockout (KO) were divided into two groups: NLRP3-KO control and NLRP3-KO asthma ($n=10$ each). A model of asthma was prepared by intraperitoneal injection of ovalbumin + aluminium hydroxide for sensitization and ovalbumin inhalation for challenge. Enhanced pause, an index for airway responsiveness, was measured for each group. Hematoxylin and eosin staining was used to observe the histomorphological changes of lungs and determine the inflammation score for each group. Bronchoalveolar lavage fluid was collected from each group to determine the numbers of neutrophils, eosinophils, and lymphocytes and measure the content of interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-18 (IL-18). Western blot was used to measure the expression of NLRP3, cleaved caspase-1, and Gasdermin D-N in lung tissue of each group. **Results** Compared with the NLRP3-WT control group, the NLRP3-WT asthma group showed morphological changes including airway smooth muscle thickening and inflammatory cell infiltration. Compared with the NLRP3-WT asthma group, the

[收稿日期] 2021-06-23; [接受日期] 2021-08-02

[基金项目] 国家自然科学基金 (81472016); 辽宁省卫计委临床能力建设项目 (LNCCC-D26-2015)。

[作者简介] 惠超, 女, 硕士研究生, 主治医师。

[通信作者] 刘馨, 男, 教授。Email: 420901580@qq.com。

NLRP3-KO asthma group had significant improvements in the above morphological manifestations. Compared with the *NLRP3*-WT control group, the *NLRP3*-WT asthma group had significant increases in the enhanced pause, the inflammation score of lung tissue, the numbers of neutrophils, eosinophils and lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid, and the levels of IL-1 β and IL-18 in bronchoalveolar lavage fluid ($P<0.05$). The expression of *NLRP3*, cleaved caspase-1, and Gasdermin D-N in lung tissue also significantly increased in the *NLRP3*-WT asthma group ($P<0.05$). The above indices in the *NLRP3*-KO asthma group were significantly lower than those in the *NLRP3*-WT asthma group ($P<0.05$). **Conclusions** The overexpression of *NLRP3* is associated with the pathogenesis of asthma, which may be related to the molecular mechanisms of the activation of airway inflammatory response and pyroptosis.

[Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2021, 23(9): 959-964]

Key words: Bronchial asthma; NOD-like receptor, pyrin domain-containing 3; Gene knockout; Inflammatory response; Pyroptosis; Mouse

支气管哮喘是儿科常见的呼吸系统疾病，是一类以可逆性气流受限为特征的慢性气道炎症性疾病，中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞等多种炎性细胞在气道内大量浸润所介导的炎症反应、细胞焦亡与该病的发病密切相关^[1-2]。目前，哮喘发病的具体分子机制及发病过程中炎症反应、细胞焦亡的调控机制尚不十分清楚。NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3 (nod-like receptor, pyrin domain containing 3, *NLRP3*) 是在呼吸系统内发挥重要作用的模式识别受体，与凋亡相关斑点样蛋白、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-1 (cysteine/aspartate specific proteinase-1, caspase-1) 组成炎症小体，激活后的生物学效应是生成裂解型 caspase-1 (cleaved caspase-1)，促进白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 及 IL-18 的释放，并介导炎症反应，同时促进 Gasdermin D (GSDMD) 剪切为 GSDMD-N 并介导细胞焦亡^[3-4]。已有哮喘相关的研究证实哮喘患者血清中 IL-1 β 、IL-18 的含量增加^[5-6]，哮喘小鼠肺组织中 *NLRP3* 表达增加^[7]，但 *NLRP3* 在哮喘发病中的直接生物学作用尚未见报道。本研究将通过 *NLRP3* 基因敲除 (knockout, KO) 的方式观察 *NLRP3* 在支气管哮喘发病中的作用，具体探究 *NLRP3* 对哮喘小鼠气道炎症反应及细胞焦亡的调控作用，以期为今后深入认识哮喘的发病机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

NLRP3 野生型 (wild type, WT) C57BL/6J 小鼠、*NLRP3* KO C57BL/6J 小鼠均购自上海南方模式生物研究中心。

1.2 试剂与仪器

卵白蛋白 (ovalbumin, OVA)、氢氧化铝凝胶 (Sigma 公司, 美国), 苏木精-伊红染色试剂盒

(上海碧云天生物技术有限公司), IL-1 β 、IL-18 的酶联免疫吸附法检测试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司), *NLRP3*、cleaved caspase-1、GSDMD-N 及 β -actin 一抗 (Abcam 公司, 美国)。

全身体积描记检测系统 (巴克西科公司, 美国), 显微镜 (尼康公司, 日本), 酶标仪 (南京德铁实验设备有限公司), 凝胶电泳系统 (Bio-Rad 公司, 美国), 凝胶成像系统 (上海勤翔科学仪器有限公司)。

1.3 动物分组及造模

NLRP3 WT 小鼠分为 *NLRP3*-WT 对照组、*NLRP3*-WT 哮喘组, *NLRP3* KO 小鼠分为 *NLRP3*-KO 对照组、*NLRP3*-KO 哮喘组, 每组各 10 只。参照文献^[7-8]进行哮喘模型制备, 方法如下: 第 1、7、14 天时给予 OVA 与氢氧化铝凝胶混悬液 0.2 mL (100 μ g OVA、1 mg 氢氧化铝凝胶溶于 0.2 mL 0.9% 氯化钠溶液) 腹腔注射致敏; 第 21 天起每天给予 5% OVA 雾化吸入, 每次持续 30 min, 连续 7 d 进行激发。对照组用等体积 0.9% 氯化钠溶液代替 OVA 与氢氧化铝凝胶混悬液进行腹腔注射、代替 OVA 进行雾化吸入。末次雾化吸入激发 24 h 后进行标本收集。

1.4 气道反应性的检测

末次雾化吸入激发 24 h 后, 将小鼠放入全身体积描记检测系统, 记录 3 min 的基线读数后给予乙酰甲胆碱 25.0 g/L 雾化吸入 3 min 并记录读数, 根据配套的 Cough analyzer 系统计算增强呼吸间歇 (enhanced pause, Penh)。

1.5 支气管肺泡灌洗液的收集及检测

完成气道反应性检测后对小鼠进行麻醉, 采用 1 mL 预冷的磷酸盐缓冲液进行肺泡灌洗, 得到支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 后在离心机中以 4 $^{\circ}$ C、15 000 r/min 的条件离心 5 min, 收集上清并采用酶联免疫吸附法试剂

盒检测IL-1 β 、IL-18的含量；收集沉淀并加入双蒸水0.2 mL定容，Diff-quick染色后在显微镜下对中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞进行计数。

1.6 肺组织苏木精-伊红染色

完成BALF收集后处死小鼠，收集适量肺组织，0.9%氯化钠溶液清洗后4%多聚甲醛固定，制作4 μ m厚度的病理切片后采用苏木精-伊红染色试剂盒进行染色实验，在显微镜下观察肺组织形态学表现，按照下列标准进行炎症评分^[8]：无炎性细胞浸润为0分，偶见炎性细胞浸润为1分，多数支气管或血管表层见1~2个炎性细胞为2分，中层见3~5个炎性细胞为3分，厚层见5个以上炎性细胞为4分。

1.7 Western blot法检测肺组织中蛋白表达水平

取适量肺组织，采用组织裂解液进行匀浆，匀浆液在离心机中以4℃、12 000 r/min的条件离心10 min，收集上清并检测蛋白浓度。根据检测结果将30 μ g蛋白样本用于Western blot实验，在SDS-聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳，分离不同分子量的蛋白，电转移至硝酸纤维素膜，用5%脱脂牛奶室温封闭硝酸纤维素膜1 h；用1:1 000稀释的NLRP3、cleaved caspase-1、GSDMD-N一抗或1:2 500稀释的 β -actin一抗4℃孵育硝酸纤维素膜16~24 h；而后用1:2 000稀释的二抗室温孵育硝酸纤维素膜1 h，最后在凝胶成像系统中进行蛋白显影及表达水平的半定量分析。结果以目的蛋白NLRP3、cleaved caspase-1、GSDMD-N与内参蛋白 β -actin的比值表示。

1.8 统计学分析

采用SPSS 22.0软件对数据进行统计学分析，采用Prism 6.0软件进行数据的制图。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-*t*法，*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肺组织中NLRP3表达水平的鉴定

NLRP3-WT对照组、NLRP3-WT哮喘组小鼠肺组织中均表达NLRP3，且NLRP3-WT哮喘组小鼠肺组织中NLRP3的表达水平(0.91 ± 0.16)高于NLRP3-WT对照组(0.38 ± 0.08 , $t=15.575$, $P<0.05$)。NLRP3-KO对照组、NLRP3-KO哮喘组小鼠肺组织中均不表达NLRP3。见图1。

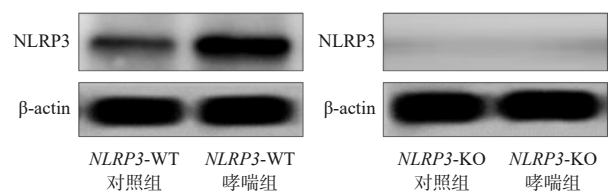


图1 Western blot法检测各组小鼠肺组织中NLRP3表达水平电泳图

2.2 各组小鼠气道反应性的变化

NLRP3-WT对照组、NLRP3-WT哮喘组、NLRP3-KO对照组、NLRP3-KO哮喘组小鼠的Penh分别为 117 ± 14 、 375 ± 63 、 108 ± 15 、 189 ± 25 ，差异有统计学意义($F=20.398$, $P<0.001$)。与NLRP3-WT对照组比较，NLRP3-WT哮喘组小鼠的Penh明显升高($P<0.05$)，NLRP3-KO对照组小鼠的Penh水平无明显变化($P>0.05$)；与NLRP3-WT哮喘组比较，NLRP3-KO哮喘组小鼠的Penh水平明显降低($P<0.05$)。

2.3 各组小鼠BALF中各细胞计数变化

与NLRP3-WT对照组比较，NLRP3-WT哮喘组小鼠BALF中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞计数明显升高($P<0.05$)，NLRP3-KO对照组小鼠BALF中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞计数无明显变化($P>0.05$)；与NLRP3-WT哮喘组比较，NLRP3-KO哮喘组小鼠BALF中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞计数明显降低($P<0.05$)。见表1。

2.4 各组小鼠肺组织形态学表现及炎症评分的变化

NLRP3-WT对照组、NLRP3-KO对照组小鼠肺组织内气道平滑肌形态正常，未见明显炎性细胞浸润；NLRP3-WT哮喘组小鼠肺组织出现气道平滑肌增厚、炎性细胞浸润的形态学表现；NLRP3-KO哮喘组小鼠肺组织内气道平滑肌增厚、炎性细胞浸润的形态学表现较NLRP3-WT哮喘组明显改善。见图2。

NLRP3-WT对照组、NLRP3-WT哮喘组、NLRP3-KO对照组、NLRP3-KO哮喘组小鼠的肺组织炎症评分分别为(0.61 ± 0.09)分、(3.94 ± 0.67)分、(0.55 ± 0.08)分、(1.62 ± 0.22)分，差异有统计学意义($F=19.383$, $P<0.001$)。与NLRP3-WT对照组比较，NLRP3-WT哮喘组小鼠肺组织炎症评分明显升高($P<0.05$)，NLRP3-KO对照组小鼠肺组织炎症评分无明显变化($P>0.05$)；与NLRP3-WT

哮喘组比较，*NLRP3*-KO 哮喘组小鼠肺组织炎症评分明显降低 ($P<0.05$)。

表 1 各组小鼠 BALF 中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞计数比较 ($\bar{x} \pm s$, $\times 10^5/\text{mL}$)

组别	<i>n</i>	中性粒细胞计数	嗜酸性粒细胞计数	淋巴细胞计数
<i>NLRP3</i> -WT 对照组	10	2.2 ± 0.4	5.1 ± 0.8	2.9 ± 0.5
<i>NLRP3</i> -WT 哮喘组	10	5.1 ± 0.8^a	18.4 ± 3.6^a	5.7 ± 0.8^a
<i>NLRP3</i> -KO 对照组	10	2.2 ± 0.5	5.0 ± 0.7	2.8 ± 0.4
<i>NLRP3</i> -KO 哮喘组	10	3.2 ± 0.4^b	8.9 ± 1.3^b	3.4 ± 0.6^b
<i>F</i> 值		11.092	9.829	13.575
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注：a 示与 *NLRP3*-WT 对照组比较， $P<0.05$ ；b 示与 *NLRP3*-WT 哮喘组比较， $P<0.05$ 。

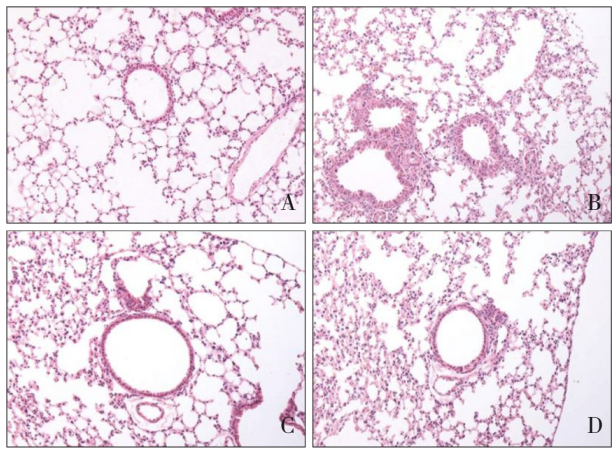


图 2 各组小鼠肺组织形态学表现 (苏木精-伊红染色, $\times 200$) *NLRP3*-WT 对照组 (A)、*NLRP3*-KO 对照组 (C) 小鼠肺组织内气道平滑肌形态正常, 未见明显炎症细胞浸润; *NLRP3*-WT 哮喘组 (B) 小鼠肺组织出现气道平滑肌增厚、炎症细胞浸润的形态学表现; *NLRP3*-KO 哮喘组 (D) 小鼠肺组织内气道平滑肌增厚、炎症细胞浸润的形态学表现较 *NLRP3*-WT 哮喘组明显改善。

2.5 各组小鼠肺组织中 cleaved caspase-1 表达水平的变化

NLRP3-WT 对照组、*NLRP3*-WT 哮喘组、*NLRP3*-KO 对照组、*NLRP3*-KO 哮喘组小鼠的肺组织 cleaved caspase-1 表达水平分别为 0.76 ± 0.08 、 1.32 ± 0.20 、 0.45 ± 0.06 、 0.64 ± 0.08 , 差异有统计学意义 ($F=12.575$, $P<0.001$)。与 *NLRP3*-WT 对照组比较, *NLRP3*-WT 哮喘组小鼠肺组织中 cleaved caspase-1 的表达水平明显升高, *NLRP3*-KO 对照组小鼠肺组织中 cleaved caspase-1 的表达水平明显降低 ($P<0.05$); 与 *NLRP3*-WT 哮喘组比较, *NLRP3*-KO 哮喘组小鼠肺组织中 cleaved caspase-1 的表达水平明显降低 ($P<0.05$)。见图 3。

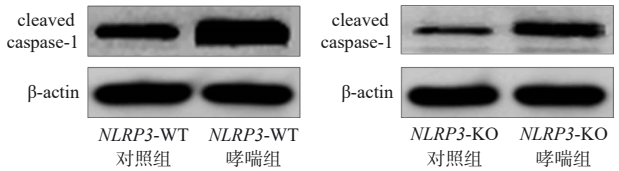


图 3 Western blot 法检测各组小鼠肺组织中 cleaved caspase-1 表达水平电泳图

2.6 各组小鼠 BALF 中 IL-1 β 、IL-18 含量的变化

与 *NLRP3*-WT 对照组比较, *NLRP3*-WT 哮喘组小鼠 BALF 中 IL-1 β 、IL-18 的含量明显升高 ($P<0.05$), *NLRP3*-KO 对照组小鼠 BALF 中 IL-1 β 、IL-18 的含量无明显变化 ($P>0.05$); 与 *NLRP3*-WT 哮喘组比较, *NLRP3*-KO 哮喘组小鼠 BALF 中 IL-1 β 、IL-18 的含量明显降低 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组小鼠 BALF 中 IL-1 β 、IL-18 含量的比较

($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

组别	<i>n</i>	IL-1 β	IL-18
<i>NLRP3</i> -WT 对照组	10	3.12 ± 0.62	1.84 ± 0.32
<i>NLRP3</i> -WT 哮喘组	10	11.46 ± 2.05^a	6.09 ± 0.77^a
<i>NLRP3</i> -KO 对照组	10	2.96 ± 0.56	1.77 ± 0.29
<i>NLRP3</i> -KO 哮喘组	10	5.71 ± 0.82^b	3.56 ± 0.51^b
<i>F</i> 值		11.315	15.474
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注：[IL] 白细胞介素。a 示与 *NLRP3*-WT 对照组比较， $P<0.05$ ；b 示与 *NLRP3*-WT 哮喘组比较， $P<0.05$ 。

2.7 各组小鼠肺组织中 GSDMD-N 表达水平的变化

NLRP3-WT 对照组、*NLRP3*-WT 哮喘组、*NLRP3*-KO 对照组、*NLRP3*-KO 哮喘组小鼠的肺组织 GSDMD-N 表达水平分别为 0.54 ± 0.07 、 1.08 ± 0.16 、 0.31 ± 0.06 、 0.46 ± 0.06 , 差异有统计学意义 ($F=$

9.387, $P<0.001$)。与 *NLRP3*-WT 对照组比较, *NLRP3*-WT 哮喘组小鼠肺组织中 GSDMD-N 的表达水平明显升高, *NLRP3*-KO 对照组小鼠肺组织中 GSDMD-N 的表达水平明显降低 ($P<0.05$); 与 *NLRP3*-WT 哮喘组比较, *NLRP3*-KO 哮喘组小鼠肺组织中 GSDMD-N 的表达水平明显降低 ($P<0.05$)。见图4。

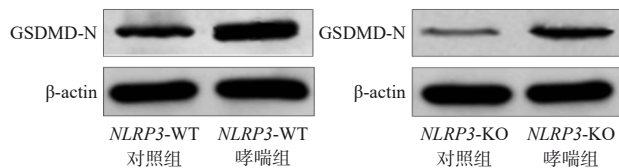


图4 Western blot 法检测各组小鼠肺组织中 GSDMD-N 表达水平电泳图

3 讨论

支气管哮喘的发病过程涉及多种炎性细胞及细胞组分,但具体的机制尚未完全阐明。在气流受限反复发作的过程中,气道炎症反应持续激活是特征性的病理改变,同时也会诱发细胞焦亡、引起气道上皮细胞损伤并加重气道高反应性。*NLRP3* 炎症小体在炎症反应及细胞焦亡的调控中起关键作用,在病原相关分子、活性氧簇、组织蛋白酶等刺激下 *NLRP3* 表达增加,进而通过凋亡相关斑点样蛋白使下游 caspase-1 前体活化为 cleaved caspase-1,后者能够介导炎症反应及细胞焦亡的激活。近些年,多项基础研究报道了地塞米松^[9]、雌激素^[10]、miR-223 过表达^[11]、苍术内酯Ⅲ^[12] 等不同哮喘治疗手段不仅显著改善哮喘动物模型肺功能,同时也对 *NLRP3* 的表达具有抑制作用,提示 *NLRP3* 的高表达可能在哮喘的发病中起重要作用。

Wood 等^[13] 的临床研究证实哮喘患者外周血中 *NLRP3* 的表达水平明显增加; Xu 等^[7] 及 Zhang 等^[14] 的动物实验证实哮喘小鼠肺组织中 *NLRP3* 炎症小体的表达均显著增加。本研究通过 OVA 联合氢氧化铝致敏、OVA 激发的方式建立支气管哮喘小鼠模型,在 WT 哮喘小鼠肺组织中检测到 *NLRP3*、cleaved caspase-1 的表达增加,与既往其他学者报道支气管哮喘发病过程中 *NLRP3* 炎症小体表达增加的结果^[7, 13] 一致。为了进一步探究 *NLRP3* 在哮喘发病过程中的作用,本研究对小鼠进行了 *NLRP3* KO, *NLRP3* KO 后进行支气管哮喘模型制

备, *NLRP3* KO 哮喘小鼠较 WT 哮喘小鼠的气道反应性指标 Penh 水平明显降低,肺组织中气道平滑肌增厚、炎性细胞浸润的形态学改变明显改善,表明 *NLRP3* KO 显著改善哮喘小鼠的气道高反应性及气道病理改变,由此也提供了 *NLRP3* 高表达参与哮喘发病的直接证据。

NLRP3 表达增加后使下游有活性的 cleaved caspase-1 生成增加,后者能够使 IL-1 β 和 IL-18 的前体裂解为有活性的成熟的 IL-1 β 和 IL-18 并释放进入局部组织、血液循环,进而发挥促炎生物学效应,在局部招募多种炎性细胞浸润并介导炎症反应激活^[15-16]。炎症反应激活是造成哮喘发病过程中气道高反应性、气流受限的关键因素,既往多项研究^[8] 及本研究均证实哮喘小鼠肺组织的炎症评分增加、BALF 中多种炎性细胞数目增多。同时,本研究还检测到 WT 哮喘小鼠 BALF 中 IL-1 β 和 IL-18 的含量增加,与 *NLRP3* 及 cleaved caspase-1 表达增加的结果吻合,进一步确认哮喘发病过程中 *NLRP3* 炎症小体过度激活。为了阐明 *NLRP3* 在哮喘发病过程中的炎症调控作用,本研究在 *NLRP3* KO 后观察到哮喘小鼠肺组织的炎症评分降低、BALF 中多种炎性细胞数目减少且 IL-1 β 和 IL-18 的含量降低,表明 *NLRP3* 在哮喘发病过程中直接参与气道炎症反应的调控,高表达的 *NLRP3* 能够增加 IL-1 β 和 IL-18 的释放、招募多种炎性细胞浸润并介导炎症反应的激活。

近些年关于哮喘、慢性阻塞性肺疾病等的研究发现细胞焦亡是与上述呼吸道疾病发生密切相关的生物学环节,在焦亡过程中细胞膜迅速破裂,细胞内大量炎症介质释放进入细胞间液,进而介导炎症反应的级联放大。目前认为焦亡的经典途径由 *NLRP3* 介导,使细胞内 GSDMD 裂解为 GSDMD-N 并使细胞发生焦亡,这一过程主要发生在单核细胞、巨噬细胞、气道上皮细胞等, GSDMD-N 是目前公认的焦亡标志物。有研究报道,激活焦亡使哮喘小鼠的气道功能减退、炎症反应加剧^[17]。本研究在 WT 哮喘小鼠中检测到肺组织 GSDMD-N 的表达水平增加,表明哮喘发病过程中存在焦亡的过度激活,既与既往关于焦亡与哮喘的其他研究结果一致,也与本研究观察到哮喘发病过程中 *NLRP3* 表达增加的结果吻合。进一步在 *NLRP3* KO 后检测焦亡程度可知:在 *NLRP3* KO 哮喘小鼠肺组织内 GSDMD-N 的表达水平降低,表明 *NLRP3* KO 对 GSDMD-N 的表达及细胞焦亡具有抑

制作用,进而证实哮喘发病过程中高表达的NLRP3不仅参与炎症反应的调控,还对细胞焦亡产生调控。

综上所述,本研究中WT小鼠的实验表明哮喘发病过程中存在NLRP3炎症小体的过度表达,NLRP3 KO小鼠的实验表明NLRP3在哮喘发病过程中参与炎症反应及细胞焦亡的调控。这为今后深入认识NLRP3在哮喘发病中的作用及哮喘的发病机制提供了实验依据,也为发现哮喘新的治疗靶点提供了思路。

[参 考 文 献]

- [1] Graff S, Bricmont N, Moermans C, et al. Clinical and biological factors associated with irreversible airway obstruction in adult asthma[J]. *Respir Med*, 2020, 175: 106202. PMID: 33202369. DOI: 10.1016/j.rmed.2020.106202.
- [2] Daya M, Ortega VE. Asthma genomics and pharmacogenomics[J]. *Curr Opin Immunol*, 2020, 66: 136-142. PMID: 33171417. DOI: 10.1016/j.coi.2020.10.001.
- [3] Wang L, Lei W, Zhang SJ, et al. MCC950, a NLRP3 inhibitor, ameliorates lipopolysaccharide-induced lung inflammation in mice[J]. *Bioorg Med Chem*, 2021, 30: 115954. PMID: 33360197. DOI: 10.1016/j.bmc.2020.115954.
- [4] He DK, Xu N, Shao YR, et al. NLRP3 gene silencing ameliorates phosgene-induced acute lung injury in rats by inhibiting NLRP3 inflammasome and proinflammatory factors, but not anti-inflammatory factors[J]. *J Toxicol Sci*, 2020, 45(10): 625-637. PMID: 33012731. DOI: 10.2131/jts.45.625.
- [5] Han MW, Kim SH, Oh I, et al. Serum IL-1 β can be a biomarker in children with severe persistent allergic rhinitis[J]. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 2019, 15: 58. PMID: 31548841. PMCID: PMC6749717. DOI: 10.1186/s13223-019-0368-8.
- [6] Kubysheva N, Boldina M, Eliseeva T, et al. Relationship of serum levels of IL-17, IL-18, TNF- α , and lung function parameters in patients with COPD, asthma-COPD overlap, and bronchial asthma[J]. *Mediators Inflamm*, 2020, 2020: 4652898. PMID: 32733164. PMCID: PMC7372292. DOI: 10.1155/2020/4652898.
- [7] Xu MM, Wang L, Wang MY, et al. Mitochondrial ROS and NLRP3 inflammasome in acute ozone-induced murine model of airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness[J]. *Free Radic Res*, 2019, 53(7): 780-790. PMID: 31185753. DOI: 10.1080/10715762.2019.1630735.
- [8] 栾雪, 延光海, 李海波, 等. 红景天苷对哮喘模型小鼠气道炎症的抑制作用及其机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2021, 47(3): 537-544. DOI: 10.13481/j.1671-587X.20210301.
- [9] Guan ML, Ma HL, Fan XY, et al. Dexamethasone alleviate allergic airway inflammation in mice by inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 78: 106017. PMID: 31780368. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.106017.
- [10] Cheng C, Wu HM, Wang MZ, et al. Estrogen ameliorates allergic airway inflammation by regulating activation of NLRP3 in mice[J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(1): BSR20181117. PMID: 30373775. PMCID: PMC6328879. DOI: 10.1042/BSR20181117.
- [11] Xu WJ, Wang YM, Ma Y, et al. MiR-223 plays a protecting role in neutrophilic asthmatic mice through the inhibition of NLRP3 inflammasome[J]. *Respir Res*, 2020, 21(1): 116. PMID: 32423405. PMCID: PMC7236263. DOI: 10.1186/s12931-020-01374-4.
- [12] Zhu CM, Zhang LG, Liu ZM, et al. Atractylenolide III reduces NLRP3 inflammasome activation and Th1/Th2 imbalances in both *in vitro* and *in vivo* models of asthma[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2020, 47(8): 1360-1367. PMID: 32196713. DOI: 10.1111/1440-1681.13306.
- [13] Wood LG, Li Q, Scott HA, et al. Saturated fatty acids, obesity, and the nucleotide oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome in asthmatic patients[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2019, 143(1): 305-315. PMID: 29857009. DOI: 10.1016/j.jaci.2018.04.037.
- [14] Zhang JH, Chen YP, Yang X, et al. Vitamin D₃ levels and NLRP3 expression in murine models of obese asthma: association with asthma outcomes[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2017, 51(1): e6841. PMID: 29160418. PMCID: PMC5685066. DOI: 10.1590/1414-431X20176841.
- [15] Malinczak CA, Schuler CF, Duran AJ, et al. NLRP3-inflammasome inhibition during respiratory virus infection abrogates lung immunopathology and long-term airway disease development[J]. *Viruses*, 2021, 13(4): 692. PMID: 33923693. PMCID: PMC8072578. DOI: 10.3390/v13040692.
- [16] Donovan C, Liu G, Shen S, et al. The role of the microbiome and the NLRP3 inflammasome in the gut and lung[J]. *J Leukoc Biol*, 2020, 108(3): 925-935. PMID: 33405294. DOI: 10.1002/JLB.3MR0720-472RR.
- [17] Zhuang J, Cui HY, Zhuang LL, et al. Bronchial epithelial pyroptosis promotes airway inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125: 109925. PMID: 32014690. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.109925.

(本文编辑: 万静)