

引用本文:陈忠仁,欧宗兴,王蕾,等.Nod样受体蛋白-3炎性小体在慢性阻塞性肺疾病大鼠气道重塑中的作用[J].安徽医药,2021,25(3):494-496.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.03.015.



◇临床医学◇

Nod样受体蛋白-3炎性小体在慢性阻塞性肺疾病大鼠气道重塑中的作用

陈忠仁,欧宗兴,王蕾,沈彬,梁海梅,杨绪莉,黄实仁

作者单位:中南大学湘雅医学院附属海口医院呼吸与危重症医学科,海南 海口 570208

通信作者:欧宗兴,男,硕士生导师,主任医师,研究方向为慢性气道炎症疾病、肺恶性肿瘤,Email:ouzongxing@163.com

基金项目:海南省自然科学基金面上项目(818MS136)

摘要: **目的** 探讨Nod样受体蛋白-3(NLRP3)炎性小体在慢性阻塞性肺疾病(慢阻肺)大鼠气道重塑中的作用。**方法** 用随机数字表法将24只Wistar大鼠均分为慢阻肺组及空白组(各12只),模型制造成功后测定两组大鼠外周血淋巴细胞NLRP3 mRNA、肺泡灌洗液炎性因子、气管平滑肌厚度水平。**结果** 慢阻肺组外周血淋巴细胞NLRP3 mRNA水平高于空白组($P < 0.05$)。慢阻肺组气管平滑肌厚度为 $(14.25 \pm 0.63) \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$,空白组为 $(10.44 \pm 0.61) \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$,慢阻肺组高于空白组($P < 0.05$)。与空白组相比,慢阻肺组肺泡灌洗液的IL-18 $[(62.98 \pm 1.69)$ 比 $(36.24 \pm 3.45) \text{ng/L}]$ 、慢阻肺组肺泡灌洗液的IL-1 $[(54.51 \pm 1.91)$ 比 $(38.06 \pm 0.90) \text{ng/L}]$ 水平升高(均 $P < 0.05$)。气管平滑肌厚度与外周血淋巴细胞NLRP3 mRNA相对表达量的 r 值为0.799;与肺泡灌洗液IL-18的 r 值为0.938;与肺泡灌洗液IL-1 β 水平的 r 值为0.970(均 $P < 0.05$)。**结论** 慢阻肺大鼠外周血淋巴细胞NLRP3炎性小体表达水平升高,在其气道重塑中发挥关键作用,为治疗慢阻肺提供了新的靶点。

关键词: 肺疾病,慢性阻塞性; Nod信号接头蛋白质类; 白细胞介素-18; 白细胞介素-1; 大鼠,Wistar; 气管平滑肌

Role of NLRP3 inflammasome in airway remodeling in rats with chronic obstructive pulmonary disease

CHEN Zhongren,OU Zongxing,WANG Lei,SHEN Bin,LIANG Haimei,YANG Xuli,HUANG Shiren

Author Affiliation: Pulmonary and Critical Care Medicine Department, Central South University Xiangya School of Medicine Affiliated Haikou Hospital, Haikou, Hainan 570208, China

Abstract: **Objective** To investigate the role of Nod like receptor protein-3 (NLRP3) inflammasome in airway remodeling in rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** Using the random number table method, 24 Wistar rats were divided into COPD group and control group (12 rats each). The levels of NLRP3 mRNA in peripheral blood lymphocyte, inflammatory cytokines in bronchoalveolar lavage fluid and airway smooth muscle thickness were measured after the models were successfully established. **Results** The NLRP3 mRNA level of peripheral blood lymphocytes in COPD group was higher than that in control group ($P < 0.05$). The thickness of airway smooth muscle in COPD group was $(14.25 \pm 0.63) \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$, which was higher than that in control group $[(10.44 \pm 0.61) \mu\text{m}^2/\mu\text{m}]$ ($P < 0.05$). Compared with the control group, the levels of IL-18 in BALF of COPD Group $[(62.98 \pm 1.69) \text{ vs. } (36.24 \pm 3.45) \text{ ng/L}]$ and IL-1 β in BALF of COPD Group $[(54.51 \pm 1.91) \text{ vs. } (38.06 \pm 0.90) \text{ ng/L}]$ were increased (all $P < 0.05$). The R value between the thickness of tracheal smooth muscle and the relative expression of NLRP3 mRNA in peripheral blood lymphocytes was 0.799; the R value between the thickness of tracheal smooth muscle and IL-18 in bronchoalveolar lavage fluid was 0.938; the R value between the thickness of tracheal smooth muscle and IL-1 β in bronchoalveolar lavage fluid was 0.970 (all $P < 0.05$). **Conclusion** The increased expression of NLRP3 inflammasome in peripheral blood lymphocytes of COPD rats plays a key role in airway remodeling, which provides a new target for the treatment of COPD.

Key words: Pulmonary disease, chronic obstructive; Nod signaling adaptor proteins; Interleukin-18; Interleukin-1; Rats, Wistar; Trachea smooth muscle

慢性阻塞性肺疾病(慢阻肺)是以气流受限持续存在为特征性病变的气道慢性炎症疾病,随着疾病的进展,肺功能进行性减退,急性发作事件增加,其中的一个重要原因是慢阻肺的气道重塑^[1]。气道重塑即气道结构的改变,主要病理改变是气管壁的增

厚及气管平滑肌细胞的增殖,其主要发生机制目前认为是慢性炎症的反复破坏。Nod样受体蛋白-3(Nod-like receptor protein-3, NLRP3)近来认为在慢阻肺、支气管哮喘等疾病的持续恶化中起关键作用,它被激活是疾病发生发展的主要原因^[2]。本研究于

2018年7月至2019年3月通过制备慢阻肺大鼠模型,检测外周血淋巴细胞NLRP3 mRNA相对表达量、肺泡灌洗液炎症因子水平及大鼠气管平滑肌厚度,以探讨它们间的关系。

1 材料与方法

1.1 动物 24只1月龄清洁级Wistar大鼠,体质量范围为220~250 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[许可证SCXK(沪)2017-0005]。本研究符合一般动物实验伦理学原则。

1.2 主要试剂 内毒素(西格玛公司);SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus) RR420A(TAKARA公司);TRIzol Reagent(Ambion公司);红梅牌香烟(红塔集团)。

1.3 主要仪器与设备 荧光定量PCR仪(LightCycler[®] 96)罗氏;酶标仪(MK3)Axygen公司;酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(南京建成);熏烟箱(自备)。

1.4 实验方法

1.4.1 模型的分组和复制 将大鼠以随机数字表法均分成空白组和慢阻肺组(各12只)。依据经典的烟熏加气管静滴内毒素方法复制慢阻肺模型。方法如下:第1、14天经气道滴入1 g/L的内毒素2 000 μ L,后2~30 d(第14天除外),将大鼠放入5%香烟烟雾中熏0.5 h/d。

1.4.2 苏木精-伊红(HE)染色及支气管平滑肌测量 (1)石蜡切片制备。取材与固定→水洗→脱水→透明→透蜡→包埋→切片→展片→捞片→贴片→烤片。(2)HE染色步骤。先后予二甲I、II苯脱蜡,续予乙醇水化,再予苏木精染液浸泡、1%盐酸乙醇分化、1%伊红乙醇染色,后梯度乙醇脱水,再分别予二甲苯I、II透明,封片。(3)测量支气管平滑肌厚度。应用Image-Pro Plus 6.0软件测定。以管壁内周长标准化的平滑肌层面积代表平滑肌厚度。

1.4.3 实时聚合酶链反应(Real-time PCR)检测大鼠外周血淋巴细胞NLRP3 mRNA 取大鼠外周血,分离出淋巴细胞,加入Trizol提取总RNA,逆转录合成互补DNA(cDNA)。将获得的cDNA扩增目的基因。引物 β -肌动蛋白(β -actin)正向:GGAGAAGATTG-GCACCACAC,反向:ACACAGCCTGGATGGCTACG,片段长度173 bp;NLRP3正向:AGCTCCTCTGT-GAGGGACTT,反向:GAGCGTCACCACACAGAT,片段长度179 bp。反应条件:95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 60 s,95 $^{\circ}$ C 15 s,共40~45个循环。上机扩增检测,应用2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法计算NLRP3 mRNA的相对表达量。

1.4.4 ELISA测定白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-18(IL-18) 应用双抗体夹心法测定肺泡灌洗液细胞因子的浓度,依试剂盒使用说明书,用酶标仪测量吸光度,后通过标准曲线计算细胞因子浓度。

1.5 统计学方法 应用SPSS 22.0统计软件进行数据分析。定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验、Pearson分析法进行分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组身体情况对比 空白组饮食如常,行动敏捷,活跃;慢阻肺组渐渐表现为体质量下降、身懒少动、皮毛无光。

2.2 大鼠肺组织病理 光镜下可见慢阻肺组大鼠肺组织有许多炎性细胞浸润,以巨噬细胞为主要成分,肺泡腔内表达为主,见图1A。空白组大鼠肺组织小气管黏膜上皮无破损,无炎症细胞集聚,管腔没有渗出物,见图1B。

2.3 两组大鼠NLRP3 mRNA相对表达量、肺泡灌洗液炎症因子浓度及气管平滑肌厚度水平差异 慢阻肺组外周血淋巴细胞NLRP3 mRNA相对表达量、肺泡灌洗液炎症因子浓度及气管平滑肌厚度均高于空白组($P < 0.05$)。如表1所示。

表1 两组大鼠Nod样受体蛋白-3(NLRP3)mRNA相对表达量、肺泡灌洗液炎症因子浓度及气管平滑肌厚度水平差异 $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	NLRP3 mRNA	气管平滑肌厚度/ $(\mu\text{m}^2/\mu\text{m})$	肺泡灌洗液IL-18/(ng/L)	肺泡灌洗液IL-1 β /(ng/L)
空白组	12	0.86 \pm 0.19	10.44 \pm 0.61	36.24 \pm 3.45	38.06 \pm 0.90
慢阻肺组	12	3.00 \pm 0.81	14.25 \pm 0.63	62.98 \pm 1.69	54.51 \pm 1.91
t 值		-5.747	-8.260	-12.059	-4.934
P 值		0.003	<0.001	0.001	0.035

2.4 两组大鼠支气管平滑肌厚度与NLRP3 mRNA相对表达量、肺泡灌洗液炎症因子的Pearson相关性分析 气管平滑肌厚度与外周血淋巴细胞NLRP3 mRNA相对表达量的 r 值为0.799;与肺泡灌洗液IL-18的 r 值为0.938;与肺泡灌洗液IL-1 β 水平的 r 值为0.970。均 $P < 0.001$ 。

3 讨论

慢阻肺为呼吸系统的常见疾病,防治重点就是延缓气道重塑的发生,减少急性加重事件的发生,改善生存质量。气道重塑是气流受限持续存在的病理学基础,其基本病变为气管平滑肌的增殖,造成气管管腔狭窄,肺动态及过度充气,极大影响慢阻肺的预后。气道重塑的机制目前尚未明确,目前主流的观点认为是慢性气道炎症所致^[3-4]。炎性小体为一种蛋白复合物,其分布于细胞质内,可以被多种内外源性分子激活^[5]。其中NLRP3炎性小体当前探讨比较深入,多种外源性异物及内源性分子均可激活它,其可诱导多种成分进行组合,其中包括NLRP3,就构成了NLRP3炎性小体。NLRP3炎性小

体在多种与慢性炎症相关的疾病进程里发挥了重要的作用,如呼吸系统疾病中的慢阻肺、哮喘。目前还有学者认为,慢阻肺的发生发展,炎性小体持续被激活起了关键的影响^[6]。

慢阻肺是暴露于有害气体后引起气道的异常炎症反应。本研究通过烟熏大鼠模拟慢阻肺的发生,并气管内滴入内毒素刺激炎症反应,模型大鼠的肺组织病理提示造模成功。谢圆媛等研究认为,持续存在的气道与肺部的炎症是导致慢阻肺病情持续恶化的重要机制,但导致炎症发生并持续扩散的机制尚不明确^[7]。NLRP3炎性小体是机体固有免疫系统的识别受体,可通过引起炎症细胞浸润及炎性因子分泌参与慢阻肺的疾病进程^[8-9]。同时,有研究指出,慢阻肺病人病情恶化的一个重要因素,就是IL-1 β 、IL-18浓度升高^[10]。IL-1 β 是可在机体内起重要作用的炎性因子,属IL-1亚家族成员,多种细胞如淋巴细胞、单核细胞等均能够分泌。既往研究指出,IL-1 β 能激活免疫应答,使多种炎性介质及炎性细胞浸润到支气管黏膜^[11-12]。IL-18可由多种组织细胞分泌,是一种作用强大的细胞因子,可调控多种细胞的增殖及细胞因子的合成分泌。宋素莉^[13]研究指出,IL-18通过诱导多种炎性介质而引起气道重塑。还有研究发现,小鼠肺气肿程度与肺组织内IL-18的表达呈正相关^[14]。本研究发现,相对于空白组,慢阻肺组外周血淋巴细胞的NLRP3 mRNA相对表达量水平升高;同时肺泡灌洗液里的IL-18、IL-1 β 在慢阻肺组里的浓度高于空白组。这表明,外源性信号活化NLRP3炎性小体后,有激活下游肺泡中炎性因子可能,引起气道炎症,促进了慢阻肺的进展,这与既往的研究相符合^[15]。本研究也表明了慢阻肺的气管平滑肌厚度高于空白组,随着慢阻肺疾病的发生及进展,气管平滑肌进行性增厚,使气道发生重塑;而气道重塑可使肺功能的进行性下降^[16]。因此,对气道重塑的有效干预,是防治慢阻肺及延缓其疾病进展的重要步骤。

同时,本研究采用Pearson相关分析还发现气管平滑肌厚度与NLRP3 mRNA相对表达量及肺泡炎性因子水平有正相关,说明随着炎症反应的增强,慢阻肺气道重构也随之增强。这与既往研究一致^[17]。目前观点认为,NLRP3炎性小体及产物,可引起慢阻肺气道的炎性介质及细胞浸润,并刺激气道分泌及合成细胞外基质,促进气管平滑肌的增殖^[15,18]。因此,NLRP3炎性小体可作为防治气道重塑的一个位点。

本研究通过制备慢阻肺大鼠模型,通过检测气管平滑肌厚度及外周血淋巴细胞NLRP3 mRNA相对表达量及肺泡灌洗液里炎性因子浓度,初步表明了NLRP3炎性小体在慢阻肺气道重塑中的作用,为

我们防治及延缓慢阻肺的发生提供了新的思路。

(本文图1见插图3-2)

参考文献

- [1] POLOSA R, MORJARIA JB, PROSPERINI U, et al. Health effects in COPD smokers who switch to electronic cigarettes: a retrospective-prospective 3-year follow-up [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2018, 13:2533-2542.
- [2] 马强,吴占庆,杨培雄,等.慢性阻塞性肺疾病患者血清白细胞介素表达及临床意义[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(17): 4266-4267.
- [3] JONES RL, NOBLE PB, ELLIOT JG, et al. Airway remodelling in COPD: It's not asthma! [J]. *Respirology*, 2016, 21(8):1347-1356.
- [4] 满鑫,高燕鲁,俞晓滢. COPD气道重塑非炎症机制的研究进展 [J]. *山东医药*, 2017, 57(13): 110-112.
- [5] GUO H, CALLAWAY JB, TING JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics [J]. *Nat Med*, 2015, 21(7): 677-687.
- [6] PINKERTON JW, KIM RY, ROBERTSON A, et al. Inflammasomes in the lung [J]. *Mol Immunol*, 2017, 86: 44-55.
- [7] 谢圆媛,杨丹芬.老年COPD患者外周血单核细胞TLR2,TLR4的表达及其与炎症因子的关系研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2015, 30(4): 80-83, 86.
- [8] SU Q, LI L, SUN Y, et al. Effects of the TLR4/Myd88/NF- κ B signaling pathway on NLRP3 inflammasome in coronary microembolization-induced myocardial injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(4): 1497-1508.
- [9] COLL RC, ROBERTSON AA, CHAE JJ. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases [J]. *Nat Med*, 2015, 21(3): 248-255.
- [10] HAMMAD DR, ELGAZZAR AG, ESSAWY TS, et al. Evaluation of serum interleukin-1 beta as an inflammatory marker in COPD patients [J]. *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis*, 2015, 64(2): 347-352.
- [11] SATOH T, OTSUKA A, CONTASSOT E, et al. The inflammasome and IL-1 β : implications for the treatment of inflammatory diseases [J]. *Immunotherapy*, 2015, 7(3): 243-254.
- [12] BAL SM, BERNINK JH, NAGASAWA M, et al. IL-1 β , IL-4 and IL-12 control the fate of group 2 innate lymphoid cells in human airway inflammation in the lungs [J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(6): 636-645.
- [13] 宋素莉. 百合胶囊联合常规西医药物对稳定期COPD患者气道重塑进程的影响 [J]. *海南医学院学报*, 2017, 23(15): 2033-2036.
- [14] DIMA E, KOLTSIDA O, KATSOUNOU P, et al. Implication of Interleukin (IL)-18 in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [J]. *Cytokine*, 2015, 74(2): 313-317.
- [15] ELLIOTT EI, SUTTERWALA FS. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly [J]. *Immunol Rev*, 2015, 265(1): 35-52.
- [16] 管频,于化鹏,李伟,等.慢性阻塞性肺疾病患者肺组织中核转录因子- κ B、转化生长因子- β 1表达与气道重塑的关系 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(2): 313-314.
- [17] PINKERTON JW, KIM RY, ROBERTSON AAB, et al. Inflammasomes in the lung [J]. *Mol Immunol*, 2017, 86: 44-55.
- [18] HOWRYLAK JA, NAKAHIRA K. Inflammasomes: key mediators of lung immunity [J]. *Annu Rev Physiol*, 2017, 79: 471-494.

(收稿日期:2019-10-16,修回日期:2020-01-10)