

NOD 样受体蛋白 3 炎症小体在呼吸机相关性肺损伤中的作用机制研究

张维康 潘灵辉

【摘要】 目的 探讨 NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体在呼吸机相关性肺损伤 (VILI) 中的作用及其机制。方法 将 30 只清洁级雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为自主呼吸对照组、正常潮气量 (V_T) 组 (V_T 为 8 mL/kg)、大 V_T 组 (V_T 为 40 mL/kg) 3 组, 每组 10 只。所有大鼠均行气管切开插管术, 自主呼吸对照组保持自主呼吸, 两个 V_T 组分别行不同 V_T 的机械通气; 4 h 后颈总动脉放血处死大鼠, 收集支气管肺泡灌洗液 (BALF)、血清和肺组织标本。测定肺组织湿/干质量 (W/D) 比值, 光镜下观察肺组织病理学改变, 透射电镜下观察肺泡巨噬细胞超微结构改变; 用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定 BALF 中总蛋白含量以及血清和 BALF 中白细胞介素 (IL-1 β 、IL-18) 含量; 用反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 和蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 分别检测肺泡巨噬细胞中 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (ASC)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1 (caspase-1) 和核转录因子- κ B (NF- κ B) 的 mRNA 及蛋白表达。结果 镜下观察显示, 自主呼吸对照组和正常 V_T 组肺组织及肺泡巨噬细胞结构基本正常, 大 V_T 组则有明显的炎症性改变。与自主呼吸对照组和正常 V_T 组比较, 大 V_T 组肺组织 W/D 比值明显升高 (8.89 ± 0.90 比 5.18 ± 0.86 、 5.71 ± 0.82 , 均 $P < 0.05$), BALF 中总蛋白、IL-1 β 、IL-18 含量明显升高 [总蛋白 (g/L): 2.34 ± 0.41 比 1.77 ± 0.14 、 1.81 ± 0.06 , IL-1 β (ng/L): 133.48 ± 10.48 比 81.54 ± 3.12 、 83.80 ± 5.22 , IL-18 (μ g/L): 4.57 ± 0.45 比 3.04 ± 0.51 、 3.43 ± 0.43 , 均 $P < 0.05$], 血清中 IL-1 β 、IL-18 含量也明显升高 [IL-1 β (ng/L): 105.06 ± 10.18 比 65.11 ± 8.58 、 75.30 ± 10.62 , IL-18 (μ g/L): 2.27 ± 0.09 比 1.18 ± 0.34 、 1.43 ± 0.15 , 均 $P < 0.05$]。大 V_T 组肺泡巨噬细胞中 NLRP3、ASC、caspase-1 和 NF- κ B 的 mRNA 及蛋白表达均较自主呼吸对照组和正常 V_T 组明显升高, 大 V_T 组 NLRP3、ASC、caspase-1 和 NF- κ B 的 mRNA 表达分别是自主呼吸对照组的 (8.53 ± 2.21)、(5.75 ± 1.17)、(7.47 ± 1.23)、(10.86 ± 2.38) 倍, NLRP3、ASC、caspase-1 和 NF- κ B 的蛋白表达分别是自主呼吸对照组的 (1.50 ± 0.14)、(1.49 ± 0.04)、(1.53 ± 0.15)、(1.51 ± 0.11) 倍, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$); 而正常 V_T 组各指标与自主呼吸对照组比较差异均无统计学意义。结论 NLRP3 炎症小体参与了大鼠机械通气所致的肺损伤。

【关键词】 机械通气; 呼吸机相关性肺损伤; NOD 样受体蛋白 3 炎症小体; 肺泡巨噬细胞

Role and mechanism of the NOD-like receptor 3 inflammasome in ventilator-induced lung injury in rats

Zhang Weikang, Pan Linghui. Department of Anesthesiology, the Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China

Corresponding author: Pan Linghui, Email: plinghui@hotmail.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the role and its mechanism of the NOD-like receptor 3 (NLRP3) inflammasome in alveolar macrophages in ventilator-induced lung injury (VILI) in rats. **Methods** Thirty adult male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into three groups, with 10 rats in each group: spontaneous breathing control group, normal tidal volume (V_T) group (V_T 8 mL/kg) and high V_T group (V_T 40 mL/kg). All of the rats underwent tracheotomy. Then rats in spontaneous breathing control group were kept to have spontaneous breathing, while rats in normal V_T group and high V_T group received mechanical ventilation. After 4 hours, the rats were sacrificed by carotid artery bleeding, and the bronchoalveolar lavage fluid (BALF), blood serum and lung tissue were collected. Lung wet/dry ratios (W/D) were measured. Light microscopy and electron microscopy were performed to observe the pathological changes in lung tissue, and the ultrastructural changes in alveolar macrophages. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to measure the total protein content in the BALF and the interleukins (IL-1 β and IL-18) in the serum and BALF. The mRNA expressions and protein levels of NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC), caspase-1, and nuclear factor- κ B (NF- κ B) in alveolar macrophages were

DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-4352.2015.10.008

基金项目: 广西自然科学基金 (2014GXNSFDA118026)

作者单位: 530021 广西南宁, 广西医科大学附属肿瘤医院麻醉科

通讯作者: 潘灵辉, Email: plinghui@hotmail.com

assayed by real-time fluorescent quantization reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western Blot. **Results** The structure of lung tissue and alveolar macrophages of rats in spontaneous breathing control group and normal V_T group appeared normal, while obvious inflammatory changes were found in high V_T group. Compared with spontaneous breathing control group and normal V_T group, the ratio of W/D (8.89 ± 0.90 vs. 5.18 ± 0.86 , 5.71 ± 0.82 , both $P < 0.05$), contents of total protein, IL-1 β , IL-18 in BALF were significantly increased [total protein (g/L): 2.34 ± 0.41 vs. 1.77 ± 0.14 , 1.81 ± 0.06 , IL-1 β (ng/L): 133.48 ± 10.48 vs. 81.54 ± 3.12 , 83.80 ± 5.22 , IL-18 ($\mu\text{g/L}$): 4.57 ± 0.45 vs. 3.04 ± 0.51 , 3.43 ± 0.43 , all $P < 0.05$], and IL-1 β and IL-18 in serum were also increased [IL-1 β (ng/L): 105.06 ± 10.18 vs. 65.11 ± 8.58 , 75.30 ± 10.62 , IL-18 ($\mu\text{g/L}$): 2.27 ± 0.09 vs. 1.18 ± 0.34 , 1.43 ± 0.15 , all $P < 0.05$]. The mRNA and protein expressions of NLRP3, ASC, caspase-1 and NF- κB in alveolar macrophages of high V_T group were significantly increased compared with that of spontaneous breathing control group and normal V_T group. The mRNA expressions of NLRP3, ASC, caspase-1 and NF- κB in high V_T group were (8.53 ± 2.21), (5.75 ± 1.17), (7.47 ± 1.23) and (10.86 ± 2.38) folds of those in spontaneous breathing control group, and the protein expressions of NLRP3, ASC, caspase-1 and NF- κB were (1.50 ± 0.14), (1.49 ± 0.04), (1.53 ± 0.15) and (1.51 ± 0.11) folds of those in spontaneous breathing control group (all $P < 0.01$). There were no significant differences in all the indexes between normal V_T group and spontaneous breathing control group. **Conclusion** NLRP3 inflammasome in alveolar macrophages may be involved in the mechanism of occurrence of VILI.

【Key words】 Mechanical ventilation; Ventilator-induced lung injury; NOD-like receptor 3 inflammasome; Alveolar macrophage

机械通气是临床医疗中重要的生命支持手段,使用不当会引起呼吸机相关性肺损伤(VILI)。VILI主要是由于异常机械力刺激肺泡上皮细胞,激活肺泡巨噬细胞等炎性细胞使其释放炎性因子,进而介导肺内失控的“瀑布式”炎症反应^[1-4]。据报道,目前VILI的发生率已高达22.8%^[5],但其炎症反应的主要发病机制尚未阐明。探究其发生机制对于预防和治疗VILI具有重要的意义。最近有研究表明,NOD样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体不仅能够识别入侵的细菌等病原体引起机体固有免疫应答,也可能参与到一些非感染性炎症反应中^[6-8]。然而,NLRP3炎症小体在VILI过程中的作用机制目前尚未明确。本研究通过建立大鼠VILI模型,探讨NLRP3炎症小体在VILI中的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及VILI模型建立:健康清洁级成年雄性SD大鼠,体质量240~260 g,由广西医科大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(桂)2014-0002。采用随机数字表法将30只SD大鼠分为自主呼吸对照组、正常潮气量(V_T)组、大 V_T 组3组,每组10只。各组大鼠均行气管切开插管术;经股动脉插管监测动脉血压,经股静脉插管建立静脉通道,以 $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 的速度输注生理盐水,使肛温维持在 $37.3 \sim 38.3 \text{ }^\circ\text{C}$ 。参考文献[9]方法制备不同 V_T 大鼠VILI模型。插管成功后,自主呼吸对照组保持自主呼吸;两个 V_T 组经股静脉注射维库溴铵 0.1 mg/mL ,待自主呼吸消失后连接TOPO型小动物呼吸机(美国KENT公司)进行机械通气4 h;

正常 V_T 组 V_T 为 8 mL/kg ,大 V_T 组 V_T 为 40 mL/kg 。机械通气参数:吸呼比(I:E)为1:1,呼吸频率(f)为80次/min,吸入氧浓度(FiO_2)为0.50,呼气末正压(PEEP)为0。腹腔注射氯胺酮 $36 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 维持麻醉。机械通气4 h后行颈动脉放血处死大鼠,采集标本备检。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 标本的采集和制备:机械通气4 h后结扎右肺,用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)反复灌洗支气管肺泡,收集支气管肺泡灌洗液(BALF),离心分离上清,参照文献[10]方法提取肺泡巨噬细胞。采用姬姆萨染色、锥虫蓝染色和墨汁吞噬试验鉴定细胞纯度,检测存活率和吞噬特性,将大鼠肺泡巨噬细胞保存于液氮中备检。左心室穿刺抽血,离心取上清,于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备检。

1.2.2 肺组织病理学观察:取右肺中叶部分组织,用多聚甲醛溶液固定,石蜡包埋、切片、苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察肺组织病理学改变。

1.2.3 肺泡巨噬细胞超微结构观察:取右肺尖组织约 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$,戊二醛溶液固定,丙酮梯度脱水,环氧树脂包埋、修块、切片,醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染,透射电镜下观察细胞超微结构改变。

1.2.4 肺湿/干质量(W/D)比值:取右肺下叶部分组织,称湿质量和干质量,计算肺组织W/D比值。

1.2.5 BALF中总蛋白测定:用BCA法检测BALF中总蛋白含量,操作按照BCA试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)说明书进行。

1.2.6 白细胞介素 (IL-1 β 、IL-18) 含量检测:采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定血清和 BALF 中 IL-1 β 、IL-18 含量,操作按照 ELISA 试剂盒 (武汉华美生物工程有限公司) 说明书进行。

1.2.7 反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (ASC)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1 (caspase-1) 和核转录因子- κ B (NF- κ B) 的 mRNA 表达:取大鼠肺泡巨噬细胞,采用 TRIzol 一步法提取细胞总 RNA,提取试剂 TRIzol 为美国 Invitrogen 生命技术公司产品,操作按说明书进行。用反转录试剂盒 (日本 TaKaRa 公司) 将得到的 RNA 合成 cDNA,然后在 Mx3000P 荧光 PCR 扩增仪上进行 NLRP3、ASC、caspase-1 和 NF- κ B 的 mRNA 扩增。NLRP3、ASC、caspase-1、NF- κ B 以及内参三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 引物由日本 TaKaRa 公司合成。PCR 反应体系:绿色荧光染料混合物 10 μ L,上下游引物各 0.8 μ L, cDNA 2 μ L, ROX 校正染料 0.4 μ L, 双蒸水 6.0 μ L。PCR 扩增条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 31 s, 共 40 个循环。采用相对定量法 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = \text{目的基因 Ct 值} - \text{内参 Ct 值}$) 进行各组之间差异的比较,数据采用仪器自带软件进行分析。

1.2.8 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测 NLRP3、ASC、caspase-1 和 NF- κ B 的蛋白表达:取大鼠肺泡巨噬细胞,加入 RIPA 蛋白裂解液与蛋白酶抑制剂 (PMSF) 配置的裂解液 (100:1) 进行冰上裂解,离心取上清,其中 5 μ L 采用 BCA 法测定蛋白浓度;剩余上清用于十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),经转膜、脱脂牛奶封闭,多克隆抗体 (一抗) 孵育过夜、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔 IgG (二抗,美国 Proteintech Group 公司) 室温孵育 1 h,使用电化学发光 (ECL) 试剂盒显影,ChemiDocTM MP 成像系统进行成像并检测灰度值,以目的蛋白与内参 GAPDH 的灰度值比值代表各组目的蛋白的相对表达量。

1.3 统计学处理:采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,计量数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,不同处理组间比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 SNK 检验方法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组肺组织病理学改变 (图 1):光镜下观察,自主呼吸对照组、正常 V_T 组肺泡结构基本正常,肺间质轻度水肿,仅见少量炎性细胞渗出;大 V_T 组肺

泡腔融合,肺泡结构紊乱,肺间隔增宽,肺间质水肿,可见大量炎性细胞和红细胞浸润。

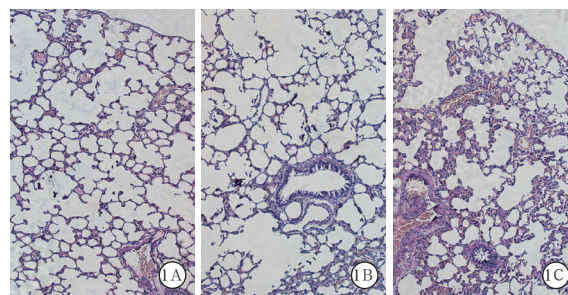


图 1 光镜下观察各组大鼠肺组织病理学改变 自主呼吸对照组 (A) 和正常潮气量 (V_T) 组 (B, V_T 为 8 mL/kg) 肺组织结构基本正常,仅见轻度炎性细胞浸润;大 V_T 组 (C, V_T 为 40 mL/kg) 可见大量肺泡腔融合,肺间隔增宽,肺泡腔内有大量炎性细胞浸润 HE 中倍放大

2.2 各组肺泡巨噬细胞超微结构改变 (图 2):透射电镜下观察,自主呼吸对照组、正常 V_T 组肺泡巨噬细胞超微结构基本正常,细胞器空泡化轻微;大 V_T 组巨噬细胞核固缩,染色质边集,核周间隙增宽,胞质内细胞器空泡化严重,伪足及吞噬体明显增多。

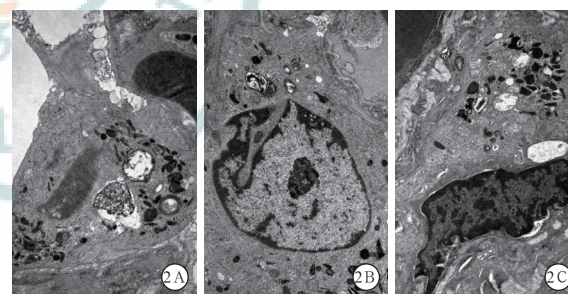


图 2 透射电镜下观察各组大鼠肺泡巨噬细胞超微结构改变 自主呼吸对照组 (A, $\times 15\ 000$) 和正常潮气量 (V_T) 组 (B, V_T 为 8 mL/kg, $\times 12\ 000$) 肺泡巨噬细胞超微结构基本正常,仅见轻微细胞器空泡化改变;大 V_T 组 (C, V_T 为 40 mL/kg, $\times 12\ 000$) 肺泡巨噬细胞细胞核固缩,核仁不清晰,胞质内细胞器空泡化严重 醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染

2.3 各组肺组织 W/D 比值比较 (表 1):大 V_T 组肺组织 W/D 比值明显高于自主呼吸对照组和正常 V_T 组 (均 $P < 0.05$),而后两组间差异无统计学意义。

2.4 各组 BALF 中总蛋白含量以及血清和 BALF 中 IL-1 β 、IL-18 含量比较 (表 1):与自主呼吸对照组和正常 V_T 组比较,大 V_T 组 BALF 中总蛋白含量以及血清和 BALF 中 IL-1 β 、IL-18 含量均明显增高 (均 $P < 0.05$);而自主呼吸对照组与正常 V_T 组各指标比较差异无统计学意义。

表 1 不同 V_T 对大鼠肺组织 W/D 比值、BALF 中总蛋白含量以及血清和 BALF 中 IL-1 β 、IL-18 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	肺组织 W/D 比值	BALF 总蛋白 (g/L)	IL-1 β (ng/L)		IL-18 (μ g/L)	
				血清	BALF	血清	BALF
自主呼吸对照组	10	5.18 \pm 0.86	1.77 \pm 0.14	65.11 \pm 8.58	81.54 \pm 3.12	1.18 \pm 0.34	3.04 \pm 0.51
正常 V_T 组	10	5.71 \pm 0.82	1.81 \pm 0.06	75.30 \pm 10.62	83.80 \pm 5.22	1.43 \pm 0.15	3.43 \pm 0.43
大 V_T 组	10	8.89 \pm 0.90 ^{ab}	2.34 \pm 0.41 ^{ab}	105.06 \pm 10.18 ^{ab}	133.48 \pm 10.48 ^{ab}	2.27 \pm 0.09 ^{ab}	4.57 \pm 0.45 ^{ab}
F 值		43.977	12.814	49.791	140.651	5.460	14.519
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.028	0.001

注:正常潮气量 (V_T) 组 V_T 为 8 mL/kg,大 V_T 组 V_T 为 40 mL/kg; W/D 为湿/干质量比值, BALF 为支气管肺泡灌洗液, IL-1 β 、IL-18 为白细胞介素 -1 β 、-18;与自主呼吸对照组比较, ^a $P < 0.05$;与正常 V_T 组比较, ^b $P < 0.05$

表 2 不同 V_T 对大鼠肺泡巨噬细胞中 NLRP3、ASC、caspase-1、NF- κ B 的 mRNA 和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	mRNA 表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)				蛋白表达 (灰度值)			
		NLRP3	ASC	caspase-1	NF- κ B	NLRP3	ASC	caspase-1	NF- κ B
自主呼吸对照组	10	1.00 \pm 0.15	1.07 \pm 0.37	1.01 \pm 0.15	1.02 \pm 0.19	0.57 \pm 0.06	0.51 \pm 0.07	0.56 \pm 0.01	0.65 \pm 0.10
正常 V_T 组	10	1.27 \pm 0.33	1.79 \pm 0.66	1.25 \pm 0.25	1.20 \pm 0.20	0.64 \pm 0.06	0.52 \pm 0.04	0.63 \pm 0.11	0.70 \pm 0.14
大 V_T 组	10	8.13 \pm 2.44 ^{ab}	6.13 \pm 1.25 ^{ab}	7.25 \pm 1.24 ^{ab}	11.02 \pm 2.02 ^{ab}	0.86 \pm 0.06 ^{ab}	0.76 \pm 0.18 ^{ab}	0.86 \pm 0.08 ^{ab}	0.98 \pm 0.91 ^{ab}
F 值		174.171	167.853	405.369	265.923	24.328	26.136	12.142	9.937
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.008	0.005

注:正常潮气量 (V_T) 组 V_T 为 8 mL/kg,大 V_T 组 V_T 为 40 mL/kg; NLRP3 为 NOD 样受体蛋白 3, ASC 为凋亡相关斑点样蛋白, caspase-1 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1, NF- κ B 为核转录因子 - κ B;与自主呼吸对照组比较, ^a $P < 0.05$;与正常 V_T 组比较, ^b $P < 0.05$

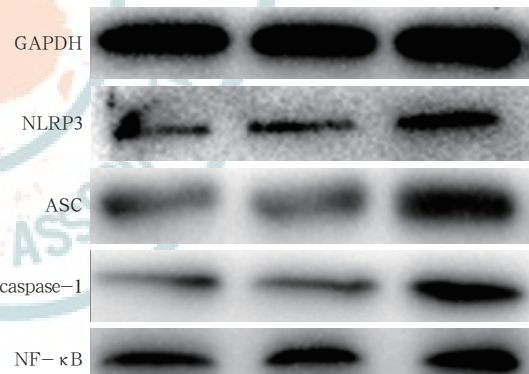
2.5 各组肺泡巨噬细胞中 NLRP3、ASC、caspase-1 和 NF- κ B 的 mRNA 表达比较 (表 2):正常 V_T 组肺泡巨噬细胞中 NLRP3、ASC、caspase-1 和 NF- κ B 的 mRNA 表达分别是自主呼吸对照组的 (1.29 \pm 0.34)、(1.68 \pm 0.62)、(1.25 \pm 0.25)、(1.17 \pm 0.19) 倍,但差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$);大 V_T 组肺泡巨噬细胞中 NLRP3、ASC、caspase-1 和 NF- κ B 的 mRNA 表达分别是自主呼吸对照组的 (8.53 \pm 2.21)、(5.75 \pm 1.17)、(7.47 \pm 1.23)、(10.86 \pm 2.38) 倍,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。

2.6 各组肺泡巨噬细胞中 NLRP3、ASC、caspase-1 和 NF- κ B 的蛋白表达比较 (表 2;图 3):正常 V_T 组肺泡巨噬细胞中 NLRP3、ASC、caspase-1 和 NF- κ B 的蛋白表达分别是自主呼吸对照组的 (1.08 \pm 0.21)、(1.02 \pm 0.08)、(1.11 \pm 0.19)、(1.12 \pm 0.10) 倍,但差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$);而大 V_T 组肺泡巨噬细胞中 NLRP3、ASC、caspase-1 和 NF- κ B 的蛋白表达分别是自主呼吸对照组的 (1.50 \pm 0.14)、(1.49 \pm 0.04)、(1.53 \pm 0.15)、(1.51 \pm 0.11) 倍,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。

3 讨论

NLRP3 炎症小体是一类存在于胞质内的模式识别受体 (PRR),隶属于 NOD 样受体 (NLR) 家族,其在单核/巨噬细胞系统、淋巴细胞、中性粒细胞、树突细胞等多种细胞中都有表达,主要由 NLRP3、ASC 和 caspase-1 组成,是目前结构和功能最明确的

自主呼吸对照组 正常 V_T 组 大 V_T 组



正常潮气量 (V_T) 组 V_T 为 8 mL/kg,大 V_T 组 V_T 为 40 mL/kg; NLRP3 为 NOD 样受体蛋白 3, ASC 为凋亡相关斑点样蛋白, caspase-1 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1, NF- κ B 为核转录因子 - κ B, GAPDH 为三磷酸甘油醛脱氢酶

图 3 蛋白质免疫印迹试验检测各组大鼠肺泡巨噬细胞中 NLRP3、ASC、caspase-1 和 NF- κ B 的蛋白表达

炎症小体^[11-12]。NLRP3 的 C 末端能够识别胞质中不同的病原相关分子模式 (PAMP) 和危险相关分子模式 (DAMP)^[13],通过其 NOD 结构域发生自身寡聚化使其效应结构域暴露,进而募集 ASC。ASC 是一种同时含有胱天蛋白募集域 (CARD) 和热蛋白结构域 (PYD) 的接头蛋白,参与多条信号转导通路,可以在炎症介导、肿瘤发生和细胞凋亡等多种生物学过程中发挥作用^[14]。ASC 被招募后,其 PYD 结构域与具有相似结构的 NLRP3 N 末端结合并通过 CARD 结构域召集 pro-caspase-1, pro-caspase-1 通过自身剪切作用裂解为成熟的 caspase-1,最终活

化 IL-1 β 和 IL-18 前体分泌到胞外,启动“瀑布式”炎症反应^[15-16]。

本实验中,大 V_T 组大鼠经过 40 mL/kg V_T 机械通气 4 h 后,肺泡结构紊乱、肺泡壁塌陷,肺间质增宽、水肿,肺泡腔内可见大量炎性细胞和红细胞浸润;肺泡巨噬细胞超微结构损伤明显,细胞器空泡化严重,出现核固缩、核周间隙增宽、伪足和吞噬体增多现象;肺组织 W/D 比值和 BALF 中总蛋白含量较自主呼吸对照组和正常 V_T 组均明显升高。表明 VILI 模型建立成功,大 V_T 机械通气导致了大鼠肺组织急性炎症性损伤的发生。

本研究大 V_T 组大鼠发生 VILI,其肺泡巨噬细胞内 NLRP3、ASC 和 caspase-1 的 mRNA 及蛋白表达均较自主呼吸对照组和正常 V_T 组明显上调,同时血清和 BALF 中炎性因子 IL-1 β 和 IL-18 含量也较自主呼吸对照组和正常 V_T 组显著升高;而自主呼吸对照组和正常 V_T 组各指标比较差异无统计学意义。提示大 V_T 机械通气刺激会激活 NLRP3 炎症小体,NLRP3 炎症小体可以诱导炎性因子 IL-1 β 和 IL-18 的成熟与分泌,从而介导肺部炎症反应和损伤。这与国外研究结果^[17-18]是一致的。

Toll 样受体 4 (TLR4)/NF- κ B 信号转导通路的激活是 VILI 炎症反应发生过程中至关重要的一环,急性肺损伤 (ALI) 发生时介导大量炎性细胞的活化和炎性因子的释放^[19-21]。研究证实,大 V_T 机械通气会导致大鼠肺泡巨噬细胞内 TLR4 表达升高^[22-23]。NLRP3 炎症小体介导细胞释放 IL-1 β 的过程依赖于 TLR4/NF- κ B 信号通路的激活。本研究结果显示,大 V_T 组大鼠肺泡巨噬细胞中 NF- κ B 的 mRNA 和蛋白表达水平均较自主呼吸对照组和正常 V_T 组明显上调。我们认为大 V_T 机械通气过程中,会同时激活 NLRP3-ASC-caspase-1 和 TLR4/NF- κ B 两条通路,介导细胞合成并分泌成熟的 IL-1 β 和 IL-18,诱导肺组织炎症的发生。

综上所述,本实验结果证明,大 V_T 通气可以使肺组织发生急性炎症性损伤并导致 VILI 的发生,肺泡巨噬细胞 NLRP3 炎症小体参与了此过程,我们认为 NLRP3 炎症小体在 VILI 中起到了一定的作用。

参考文献

- [1] Li LF, Liu YY, Yang CT, et al. Improvement of ventilator-induced lung injury by IPS cell-derived conditioned medium via inhibition of PI3K/Akt pathway and IP-10-dependent paracrine regulation [J]. *Biomaterials*, 2013, 34 (1): 78-91.
- [2] Hayes M, Masterson C, Devaney J, et al. Therapeutic efficacy of human mesenchymal stromal cells in the repair of established ventilator-induced lung injury in the rat [J]. *Anesthesiology*,

- 2015, 122 (2): 363-373.
- [3] Bruells CS, Smuder AJ, Reiss LK, et al. Negative pressure ventilation and positive pressure ventilation promote comparable levels of ventilator-induced diaphragmatic dysfunction in rats [J]. *Anesthesiology*, 2013, 119 (3): 652-662.
- [4] 刘毅,杨明会,张海燕,等. 益气活血中药对急性肺损伤大鼠血浆和肺组织中炎症介质的影响[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2011, 18 (6): 326-328.
- [5] 陈琦,王夜明,尹虹祥,等. 血必净注射液对呼吸机相关性肺炎患者的疗效观察[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2015, 22 (4): 364-366.
- [6] Qu C, Bonar SL, Hickman-Brecks CL, et al. NLRP3 mediates osteolysis through inflammation-dependent and -independent mechanisms [J]. *FASEB J*, 2015, 29 (4): 1269-1279.
- [7] Peeters PM, Perkins TN, Wouters EF, et al. Silica induces NLRP3 inflammasome activation in human lung epithelial cells [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2013, 10: 3.
- [8] Girardelli M, Maestri I, Rinaldi RR, et al. NLRP1 polymorphisms in patients with asbestos-associated mesothelioma [J]. *Infect Agent Cancer*, 2012, 7 (1): 25.
- [9] 傅瑞丽,潘灵辉,林飞,等. 调控 Toll 样受体 2/核转录因子- κ B 信号通路对呼吸机相关性肺损伤大鼠的影响[J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26 (12): 865-869.
- [10] 戴惠军,潘灵辉,林飞,等. 肺泡巨噬细胞 Toll 样受体 9-髓样分化因子 88 信号通路在呼吸机相关性肺损伤中的作用机制研究[J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26 (5): 289-293.
- [11] Xiang M, Shi X, Li Y, et al. Hemorrhagic shock activation of NLRP3 inflammasome in lung endothelial cells [J]. *J Immunol*, 2011, 187 (9): 4809-4817.
- [12] Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Wu J, et al. Anti-inflammatory compounds parthenolide and Bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285 (13): 9792-9802.
- [13] 肖元廷,李国超,王西墨. NOD 样受体通路在急性腹腔感染早期对大鼠肠屏障的作用机制初探[J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25 (9): 527-532.
- [14] Masumoto J, Taniguchi S, Ayukawa K, et al. ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274 (48): 33835-33838.
- [15] Fukumoto J, Fukumoto I, Parthasarathy PT, et al. NLRP3 deletion protects from hyperoxia-induced acute lung injury [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013, 305 (2): C182-189.
- [16] 刘文秀,尹新华. NLRP3 炎症小体与心血管疾病的研究进展[J]. *国际免疫学杂志*, 2014, 37 (2): 97-100.
- [17] Jones HD, Crother TR, Gonzalez-Villalobos RA, et al. The NLRP3 inflammasome is required for the development of hypoxemia in LPS/mechanical ventilation acute lung injury [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2014, 50 (2): 270-280.
- [18] Wu J, Yan Z, Schwartz DE, et al. Activation of NLRP3 inflammasome in alveolar macrophages contributes to mechanical stretch-induced lung inflammation and injury [J]. *J Immunol*, 2013, 190 (7): 3590-3599.
- [19] Ko YA, Yang MC, Huang HT, et al. NF- κ B activation in myeloid cells mediates ventilator-induced lung injury [J]. *Respir Res*, 2013, 14: 69.
- [20] 李克忠,姚尚龙,马利. 机械通气对大鼠肺泡巨噬细胞 Toll 样受体 4 表达的影响[J]. *中华危重病急救医学*, 2007, 19 (2): 73-76.
- [21] Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, et al. Cutting edge: NF- κ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression [J]. *J Immunol*, 2009, 183 (2): 787-791.
- [22] 陈林,尚游,姚尚龙. 机械通气所致肺损伤的分子生物学机制研究进展[J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26 (2): 126-128.
- [23] Dai H, Pan L, Lin F, et al. Mechanical ventilation modulates Toll-like receptors 2, 4, and 9 on alveolar macrophages in a ventilator-induced lung injury model [J]. *J Thorac Dis*, 2015, 7 (4): 616-624.

(收稿日期:2015-06-10) (本文编辑:李银平)