

• 论著 •

MLKL-NLRP3 炎症小体介导的坏死性炎症反应在脓毒症急性肺损伤小鼠中的作用及其机制

李娜¹ 朱雄² 程远¹ 何庆¹¹成都市第三人民医院/西南交通大学附属医院全科医学科,四川成都 610031; ²珠海市人民医院重症医学科,广东珠海 519000

通信作者:何庆, Email: Kk555888@126.com

【摘要】 目的 探讨混合谱系激酶结构域 (MLKL) 介导的肺脏细胞坏死激活 NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体引发的炎症反应在脓毒症小鼠急性肺损伤 (ALI) 中的作用及可能的致病机制。**方法** 采用随机数字表法将 18 只 BALB/c 小鼠分为假手术组 (Sham 组)、盲肠结扎穿孔术 (CLP) 致脓毒症模型组 (CLP 组) 和特异性抑制剂坏死抑制素-1 (Necrostatin-1) 干预组 (CLP+Nec-1 组, 制模前 10 min 经尾静脉注射 Necrostatin-1 溶液 20 mg/kg), 每组 6 只。术后 2 d, 经眼眶取血并断颈处死小鼠取肺组织, 采用苏木素-伊红 (HE) 染色观察肺组织形态学改变, 干湿重法检测肺组织含水率, 伊文思蓝 (EB) 法检测肺血管通透性, 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测肺组织 MLKL 和 NLRP3 的蛋白表达, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测血清白细胞介素-1 β (IL-1 β) 水平。**结果** HE 染色显示, Sham 组肺组织形态学正常; CLP 组肺泡腔和肺间质充血水肿、中性粒细胞浸润, 肺泡壁明显增厚; CLP+Nec-1 组肺组织形态学改变较 CLP 组明显好转。与 Sham 组比较, CLP 组肺组织含水率明显增加 [(88.00 $\pm$ 0.00)% 比 (78.00 $\pm$ 0.01)%], 肺血管通透性明显增加 [EB 含量 (mg/L): 11.82 $\pm$ 1.15 比 4.00 $\pm$ 0.71], 坏死性炎症反应相关分子, 即肺组织磷酸化 MLKL (p-MLKL) 和 NLRP3 的蛋白表达及血清 IL-1 β 水平明显升高 [p-MLKL/GAPDH: 0.34 $\pm$ 0.04 比 0.12 $\pm$ 0.01, NLRP3/GAPDH: 0.47 $\pm$ 0.07 比 0.16 $\pm$ 0.04, IL-1 β (ng/L): 183.56 $\pm$ 9.61 比 44.14 $\pm$ 6.95], 差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$)。与 CLP 组比较, CLP+Nec-1 组肺组织含水率明显下降 [(81.00 $\pm$ 0.01)% 比 (88.00 $\pm$ 0.00)%], 肺血管通透性降低 [EB 含量 (mg/L): 7.90 $\pm$ 0.00 比 11.82 $\pm$ 1.15], 肺组织 p-MLKL 和 NLRP3 的蛋白表达及血清 IL-1 β 水平明显下降 [p-MLKL/GAPDH: 0.13 $\pm$ 0.03 比 0.34 $\pm$ 0.04, NLRP3/GAPDH: 0.18 $\pm$ 0.04 比 0.47 $\pm$ 0.07, IL-1 β (ng/L): 113.81 $\pm$ 6.62 比 183.56 $\pm$ 9.61], 差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$)。**结论** 坏死性炎症反应信号通路蛋白 MLKL 和 NLRP3 的表达水平在脓毒症小鼠肺组织中显著上调; 特异性抑制剂 Necrostatin-1 可明显减轻脓毒症小鼠肺组织损伤程度, 其机制可能与 MLKL-NLRP3 通路被抑制有关。

【关键词】 脓毒症; 急性肺损伤; 程序性坏死; 炎症; 坏死性炎症**基金项目:** 睿 E (睿意) 急诊医学专项研究基金资助项目 (R2019009)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200622-00483

Role and mechanisms of MLKL-NLRP3-mediated necroinflammation in mice with sepsis-induced acute lung injuryLi Na¹, Zhu Xiong², Cheng Yuan¹, He Qing¹¹Department of General Practice, Chengdu Third People's Hospital/Southwest Jiaotong University Affiliated Hospital, Chengdu 610031, Sichuan, China; ²Department of Critical Care Medicine, Zhuhai People's Hospital, Zhuhai 519000, Guangdong, China

Corresponding author: He Qing, Email: Kk555888@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the roles and underlying mechanisms of mixed lineage kinase domain like (MLKL)-mediated inflammatory response induced by NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammatory corpuscles in the acute lung injury (ALI) after sepsis. **Methods** Eighteen BALB/c mice were randomly divided into sham operation group (Sham group), cecal ligation and puncture (CLP)-induced sepsis model group (CLP group) and specific inhibitor Necrostatin-1 intervention group [CLP+Nec-1 group, Necrostatin-1 solution (20 mg/kg) was injected intravenously 10 minutes before modeling], with 6 mice in each group. The mice were sacrificed by neck amputation at the 2nd day after operation, and the serum and lung tissue samples were collected. The morphological changes of lung tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The water content of lung tissue was detected by dry-wet weight method. The pulmonary vascular permeability was measured by Evans blue (EB) staining. The protein expressions of MLKL and NLRP3 in the lung tissue were detected by Western blotting, and the level of serum interleukin-1 β (IL-1 β) was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** HE staining showed that the lung morphological structure in Sham group was normal. In CLP group, congestion and edema in the alveolar cavity and interstitium, infiltration of neutrophils and thickening of alveolar wall were observed. The histopathological changes of lung tissue in CLP+Nec-1 group were better than those in CLP group. Compared with Sham group,

the water content of lung tissue [(88.00±0.00)% vs. (78.00±0.01)%], pulmonary vascular permeability [EB content (mg/L): 11.82±1.15 vs. 4.00±0.71], the protein expressions of phosphorylated MLKL (p-MLKL) and NLRP3 in lung tissue (p-MLKL/GAPDH: 0.34±0.04 vs. 0.12±0.01, NLRP3/GAPDH: 0.47±0.07 vs. 0.16±0.04), and the level of serum IL-1 β (ng/L: 183.56±9.61 vs. 44.14±6.95) in CLP group were all significantly increased (all $P < 0.01$). Compared with CLP group, the water content of lung tissue [(81.00±0.01)% vs. (88.00±0.00)%], pulmonary vascular permeability [EB content (mg/L): 7.90±0.00 vs. 11.82±1.15], protein expressions of p-MLKL and NLRP3 in lung tissue (p-MLKL/GAPDH: 0.13±0.03 vs. 0.34±0.04, NLRP3/GAPDH: 0.18±0.04 vs. 0.47±0.07), and the level of serum IL-1 β (ng/L: 113.81±6.62 vs. 183.56±9.61) were all significantly decreased (all $P < 0.01$).

Conclusion MLKL-NLRP3-mediated necroinflammation was significantly up-regulated in the lung tissue of septic mice, which could be attenuated by specific inhibitor Necrostatin-1.

【Key words】 Sepsis; Acute lung injury; Necroptosis; Inflammation; Necroinflammation

Fund program: Rui E Emergency Medicine Special Research Fund Project of China (R2019009)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200622-00483

肺脏是脓毒症病理过程中最早且最常衰竭的器官,脓症患者于病程早期阶段即可出现肺部损伤,很快进展为急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)^[1-3]。脓毒症诱导急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的病理特征主要表现为损伤应激活化肺泡巨噬细胞且分泌大量的促炎介质和细胞因子,如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、趋化因子等,从而募集中性粒细胞不受控制地向肺部迁移,聚集在肺泡内的中性粒细胞通过释放大量的有毒介质触发失控性自我破坏和持续放大的炎症“瀑布”效应,破坏肺泡-毛细血管屏障使其完整性缺如、屏障功能丧失,透明膜形成,肺微血管通透性增加,以致富含蛋白质的血液内容物渗出至组织间隙和肺泡腔内,造成肺间质和肺泡腔的充血水肿^[4-6]。目前,关于脓毒症 ALI 确切的发病机制尚不清楚。前期研究显示,通过使用药物抑制剂坏死抑制素-1(Necrostatin-1)或基因敲除关键分子受体相互作用蛋白激酶(receptor-interacting protein kinases, RIPK1、RIPK3)阻断 TNF 介导的细胞程序性坏死(necroptosis)通路,可以有效减轻肺脏的炎症反应和损伤相关分子模式的数量,从而保护机体免受脓毒症的致命侵袭,表明细胞程序性坏死在脓毒症 ALI 的病理过程中发挥一定的作用^[7-8]。然而细胞程序性坏死通路触发的下游效应即坏死性炎症反应在脓毒症 ALI 中的作用及其机制尚未明确。本研究通过检测脓毒症小鼠体内坏死性炎症相关分子,即混合谱系激酶结构域(mixed lineage kinase domain like, MLKL)、NOD 样受体蛋白 3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)的表达水平及肺组织病理改变,观察特异性抑制剂 Necrostatin-1 对 MLKL-NLRP3 通路的影响,初步探索 MLKL-NLRP3

介导的坏死性炎症反应在脓毒症 ALI 小鼠中的作用,为进一步研究靶向坏死性炎症相关通路分子的预防和治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物: 清洁级雄性 BALB/c 小鼠,体质量 30~35 g, 8~10 周龄,由湖北省宜昌市三峡大学动物实验中心提供,动物生产许可证号:SCXK(鄂)2017-0012。小鼠正常进食,自由饮水,人工光照和阴暗时间交替各 12 h,相对湿度 50%~60%,温度 18~22℃,适应性饲养 7 d。

1.2 主要实验试剂: Necrostatin-1 购于美国 Sigma-Aldrich 公司,0.5% 伊文思蓝(Evans blue, EB)染色液购于北京索莱宝科技有限公司,兔多克隆抗体磷酸化 MLKL(phosphorylated MLKL, p-MLKL,相对分子质量 54 000)和 NLRP3(相对分子质量 118 000)购于美国 Affinity 公司,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记羊抗兔二抗购于武汉博士德生物工程有限公司,IL-1 β 小鼠酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购于上海吉泰依科赛生物科技有限公司。

1.3 实验分组及处置: 采用随机数字表法将 BALB/c 小鼠分为假手术组(Sham 组)、盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture, CLP)致脓毒症模型组(CLP 组)和 Necrostatin-1 干预组(CLP+Nec-1 组),每组 6 只。采用 CLP 构建脓毒症 ALI 小鼠模型^[9-10]。饲养观察 24 h 后经腹腔注射 3.5% 水合氯醛 0.1 mL 麻醉小鼠,开腹并暴露盲肠;盲肠近端丝线结扎,远端用 20 mL 注射器针头穿孔 3 个并挤出少许肠内容物;还纳腹腔,缝合关腹。Sham 组开腹后只翻动盲肠,不作其他任何处理,缝合关腹。CLP+Nec-1 组于制模前 10 min 经小鼠尾静脉注射溶于二甲基亚砜的 Necrostatin-1 溶液 20 mg/kg; Sham 组和 CLP

组注射等量 0.9% NaCl 溶液。

实验过程中动物处理措施符合伦理学要求,获得了西南交通大学实验动物伦理委员会批准(审批号:201991)。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 小鼠一般情况观察:CLP 术后继续饲养,正常进食,自由饮水。其间观察并记录各组小鼠的一般情况,包括精神状态、进食饮水、背部毛发状况、触觉反应、行为活动改变、排便情况及眼睑周围是否存在脓性分泌物等。

1.4.2 血清和肺组织标本采集:术后 2 d 经眼眶取血并提取血清。采血后腹腔注射 4% 水合氯醛麻醉小鼠,通过右心腔注入 1 mL 肝素化生理盐水冲洗实现抗凝处理,断颈处死小鼠,收集肺组织标本。

1.4.3 苏木素-伊红(HE)染色观察肺组织形态学改变:取小鼠右肺下叶组织,进行组织切片和 HE 染色,光镜下观察肺组织形态结构改变并采集图像分析。

1.4.4 干湿重法检测肺组织含水率:使用滤纸充分吸干左侧肺组织标本表面的血迹及液体后,称湿质量,然后将标本置于 75 °C 电热恒温干燥箱中 24 h,烘干完全脱水后,称干质量。肺组织含水率(%)=(湿质量-干质量)/湿质量×100%。

1.4.5 EB 法检测肺血管通透性:CLP 术后 2 d,经小鼠颈静脉注入 0.5% EB 染色液,直到小鼠眼睛、皮肤出现蓝色。0.5 h 后开胸取肺组织,用荧光光度计测定吸光度,绘制 EB 含量与吸光度的标准曲线(波长为 620 nm),根据标准曲线获得 EB 含量。

1.4.6 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测 MLKL 和 NLRP3 蛋白表达:取右肺尖叶组织,进行蛋白定量,经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 1.5 h,电转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,洗膜后加入 p-MLKL、NLRP3 一抗和 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)内参蛋白(稀释度均为 1:1 000)4 °C 孵育过夜。次日洗膜,加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗(稀释度均为 1:50 000)37 °C 摇床孵育 2 h,含吐温 20 的 Tris-HCl 缓冲盐溶液(Tris-HCl buffered saline with Tween-20, TBST)充分洗膜。电化学发光法显色曝光,采集图像,用 Image J 软件分析各组条带灰度值,以目标蛋白与内参蛋白的灰度比值反映目标蛋白表达量。

1.4.7 ELISA 检测血清 IL-1 β 水平:将采集的血

液标本自然存放 1~2 h 后,3 000 r/min(离心半径为 10 cm)离心 15 min 取血清。按照 ELISA 试剂盒说明书步骤操作,用多功能酶标分析仪测定血清 IL-1 β 含量。

1.5 统计学方法:使用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 Kolmogorov-Smirnov 检验评估定量变量的正态性。多组间及组内样本均数采用 Levene 法进行方差齐性检验,方差齐时用单因素方差分析(one-way ANOVA)比较各组间的定量资料,采用 LSD-*t* 检验进行组间差异的多重比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。使用 GraphPad Prism 6 软件制图。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况:Sham 组小鼠精神状态良好,进食饮水较积极,活动量不减,未发现其他明显的异常反应;开腹后腹腔内未见明显渗液,肠管表面整洁无粘连。CLP 组小鼠意识不清、嗜睡、触觉迟钝、身体蜷缩,体力活动减少,进食饮水次数明显减少,大便呈稀水样,腥臭味加重,有时出现腹泻,少部分小鼠眼睛周围可见脓性分泌物;腹腔内可见脓血性渗液,部分可见包裹性积液,肠管水肿扩张、粘连,盲肠呈黑色。CLP+Nec-1 组小鼠精神状态优于 CLP 组,活动量轻微减少,进食饮水次数基本正常;开腹检查时可见结扎的盲肠坏死变黑,腹腔脓血性渗液量少于 CLP 组。

2.2 肺组织病理改变

2.2.1 肺组织形态学改变(图 1):Sham 组肺组织支气管结构清楚,肺泡大小均匀、结构完整,肺泡上皮细胞形态正常,肺泡间隔未见异常,肺微血管无异常变化,肺间质无炎性浸润、出血。CLP 组肺泡壁增厚、损伤和断裂,肺血管充血扩张,肺间质和肺泡腔内充血水肿、中性粒细胞广泛浸润。CLP+Nec-1 组肺组织病理形态学改变介于 Sham 组与 CLP 组之间,肺组织轻微水肿,肺泡壁稍微增厚,肺泡及肺间质发生中性粒细胞浸润及出血现象较 CLP 组明显减轻。

2.2.2 肺组织含水率(表 1):与 Sham 组比较,CLP 组肺组织含水率明显增加($P<0.01$)。CLP+Nec-1 组肺组织含水率则较 CLP 组明显减少($P<0.01$)。

2.2.3 肺血管通透性改变(表 1):与 Sham 组比较,CLP 组肺组织 EB 含量显著增加($P<0.01$)。CLP+Nec-1 组肺组织 EB 含量显著下降($P<0.01$)。表明 CLP 组小鼠肺血管通透性较 Sham 组显著升高,而在注射 Necrostatin-1 后,小鼠肺血管通透性下降。

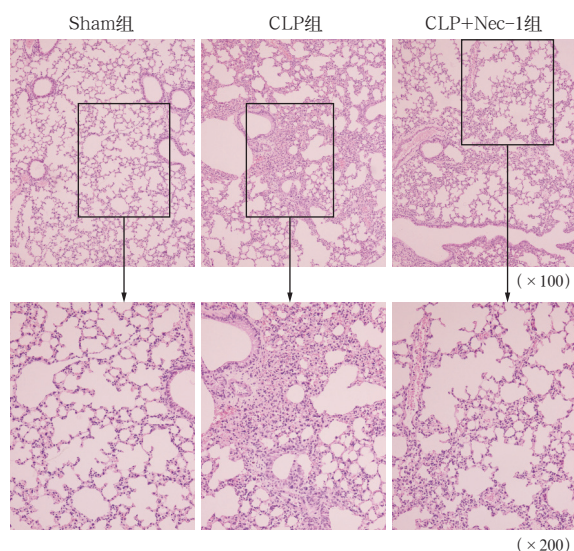


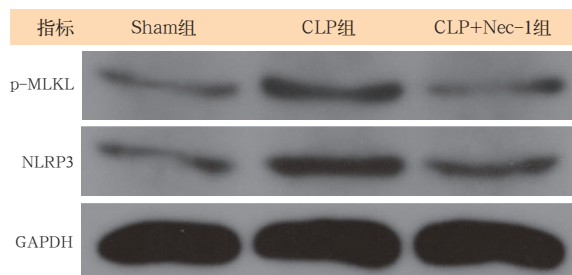
图1 光镜下观察各组小鼠肺组织病理改变 假手术组(Sham组)肺组织形态及结构未见明显异常;盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组(CLP组)肺组织结构破坏,炎性细胞浸润;坏死抑制素-1(Necrostatin-1)干预组(CLP+Nec-1组)肺组织病理形态学改变介于Sham组与CLP组之间 HE染色

表1 各组小鼠肺组织含水率及血管通透性比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	肺组织含水率 (%)	EB含量 (mg/L)
Sham组	6	78.00 ± 0.01	4.00 ± 0.71
CLP组	6	88.00 ± 0.00 ^a	11.82 ± 1.15 ^a
CLP+Nec-1组	6	81.00 ± 0.01 ^b	7.90 ± 0.00 ^b

注:Sham组为假手术组,CLP组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组,CLP+Nec-1为坏死抑制素-1(Necrostatin-1)干预组;EB为伊文思蓝;与Sham组比较,^a $P < 0.01$;与CLP组比较,^b $P < 0.01$

2.3 坏死性炎症相关分子表达(图2;表2):与Sham组比较,CLP组肺组织中坏死性炎症相关分子p-MLKL和NLRP3的蛋白表达及血清中细胞因子IL-1 β 水平均显著上调(均 $P < 0.01$)。与CLP组比较,CLP+Nec-1组肺组织中p-MLKL和NLRP3的蛋白表达及血清IL-1 β 水平均显著下调(均 $P < 0.01$)。



Sham组为假手术组,CLP组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组,CLP+Nec-1为坏死抑制素-1(Necrostatin-1)干预组;p-MLKL为磷酸化混合谱系激酶结构域,NLRP3为NOD样受体蛋白3,GAPDH为3-磷酸甘油醛脱氢酶

图2 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测各组小鼠肺组织中p-MLKL和NLRP3的蛋白表达

表2 各组小鼠肺组织p-MLKL和NLRP3的蛋白表达及血清IL-1 β 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	肺p-MLKL/ GAPDH	肺NLRP3/ GAPDH	血IL-1 β (ng/L)
Sham组	6	0.12 ± 0.01	0.16 ± 0.04	44.14 ± 6.95
CLP组	6	0.34 ± 0.04 ^a	0.47 ± 0.07 ^a	183.56 ± 9.61 ^a
CLP+Nec-1组	6	0.13 ± 0.03 ^b	0.18 ± 0.04 ^b	113.81 ± 6.62 ^b

注:Sham组为假手术组,CLP组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组,CLP+Nec-1为坏死抑制素-1(Necrostatin-1)干预组;p-MLKL为磷酸化混合谱系激酶结构域,NLRP3为NOD样受体蛋白3,IL-1 β 为白细胞介素-1 β ,GAPDH为3-磷酸甘油醛脱氢酶;与Sham组比较,^a $P < 0.01$;与CLP组比较,^b $P < 0.01$

3 讨论

采用CLP构建的脓毒症动物模型与人类脓毒症具有相似的血流动力学改变和炎症特征,高度再现了人类脓毒症的病程进展^[9-10]。实验结果显示,CLP致脓毒症模型大鼠的肺泡腔内具有更高水平的中性粒细胞和IL-1 β ,表明CLP诱导的脓毒症在大鼠机体引发了肺部炎症^[11-12]。

本实验采用CLP构建脓毒症ALI小鼠模型,术后观察各组小鼠一般情况,结果显示,Sham组小鼠精神状态良好,摄食饮水较积极,活动量不减,未见其他异常反应。CLP组小鼠神态萎靡、嗜睡、触觉迟钝、身体蜷缩、竖毛,体力活动减少,进食饮水次数明显减少,大便呈稀水样,腥臭味加重,少许小鼠眼睛周围可见脓性分泌物;腹腔内含有脓血性渗液,盲肠呈黑色,肠管水肿粘连,部分可见包裹性积液,符合脓毒症的特征性表现;CLP术后2d,小鼠肺组织病理改可见肺泡壁增厚、损伤和断裂,肺血管充血扩张,肺间质和肺泡腔内充血水肿、中性粒细胞广泛浸润;肺组织含水率增加;肺组织EB含量显著增加,肺血管通透性明显增加。以上实验结果表明脓毒症能够诱导小鼠发生ALI,促使肺组织形态结构发生病理性改变,这与既往的研究结果即肺脏是脓毒症最早且最易浸润的人体器官相契合。虽然,在脓毒症诱导ALI的致病过程中已存在诸多研究证据,但是其确切的病理机制仍不清楚。本实验在脓毒症ALI小鼠模型的基础上,探索脓毒症诱导ALI可能的致病机制。

细胞死亡已成为驱动ALI发展的一个致病机制,在各种发病因素如严重创伤、脓毒症等诱导ALI的病理机制中,细胞程序性坏死而不是细胞凋亡起着关键性作用^[13]。细胞程序性坏死主要涉及3种关键性激酶,即RIPK1、RIPK3和MLKL。TNF- α 诱导RIPK1和RIPK3相互作用形成坏死小体,募

集 RIPK3 诱发 RIPK3 聚合、自身磷酸化,磷酸化的 RIPK3 招募并磷酸化下游分子 MLKL,使激活的 MLKL 转移至细胞质膜,形成膜孔,破坏细胞质膜完整性,造成细胞裂解死亡^[14]。大量实验及临床结果已显示,组织坏死与包括 ARDS 在内的多种人类综合征具有潜在的相关性,例如:一项采用 CLP 诱导的脓毒症小鼠模型研究显示,基因敲除 RIPK3 可以延长脓毒症小鼠的存活时间,明显减轻脓毒症诱导的肺损伤程度^[7];另一项关于脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导脓毒症小鼠和创伤患者组成的队列研究显示,血浆 RIPK3 水平升高与 ALI/ARDS 高度相关,可作为一种潜在的鉴定肺损伤的标志分子^[15]。这些研究结果可以表明,RIPK1-RIPK3-MLKL 介导的细胞程序性坏死通路可能在 ALI/ARDS 病理过程中具有重要的促进作用。本实验结果也具有类似发现,CLP 组小鼠肺组织中程序性坏死相关分子 MLKL 过表达,肺组织含水率增加,肺血管通透性增加,肺组织形态结构发生病理性改变,表明 CLP 诱导的脓毒症小鼠可能通过 RIPK1-RIPK3-MLKL 介导的细胞程序性坏死通路诱发 ALI。然而另一项研究显示,通过 RIPK3 基因缺失阻断由 RIPK1-RIPK3-MLKL 介导的细胞程序性坏死通路对 LPS 诱导的脓毒症模型小鼠并没有产生保护作用^[16]。由于目前存在的研究证据有限,并未阐明其具体的原因,认为可能与构建脓毒症小鼠模型采用的诱导方式不同有关^[14]。总之,普遍的观点认为,程序性坏死在 ARDS 患者和 CLP、缺血/再灌注损伤、机械通气等诱导的 ALI 动物模型中发挥促进作用^[17]。

已知在诱导细胞坏死的病理过程中可以伴随强烈的炎症反应^[18]。由 RIPK1-RIPK3-MLKL 介导的程序性坏死作为坏死性炎症反应的触发因素,通过激活 NLRP3 炎症小体引发下游的炎症反应。NLRP3 炎症小体是先天免疫系统细胞内的蛋白质复合物,在内源性危险信号损伤相关分子模式如三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)、尿酸晶体等刺激下,形成 NLRP3 炎症小体,将细胞因子前体 IL-1 β 和 IL-18 加工成具有活性的 IL-1 β 及 IL-18,促发炎症反应^[19]。有报道,NLRP3 炎症小体的激活可能参与了 ALI 的病程进展,在促进 IL-1 β 和 IL-18 的释放及诱导肺部炎症中也发挥着关键作用;此外,NLRP3 的缺失可以防止高氧血症诱发的 ALI^[4, 20]。有研究显示,过表达的微小 RNA-495

(microRNA-495, miR-495) 通过负调控 NLRP3 分子的基因表达,抑制 NLRP3 炎症小体的活化,从而减轻 LPS 诱导的 ALI 模型大鼠的肺损伤程度,表明 NLRP3 炎症小体在 ALI 的病理过程中发挥了促进作用^[4, 21]。本实验结果也显示,CLP 组小鼠肺组织中的坏死性炎症相关分子 p-MLKL、NLRP3 表达和血清 IL-1 β 水平显著升高,表明在脓毒症病理条件下,肺组织通过 RIPK1-RIPK3-MLKL 介导程序性坏死,驱动免疫细胞 NLRP3 炎症小体的激活,触发炎症反应。CLP 组小鼠肺组织损伤加重,表明 MLKL-NLRP3 介导的坏死性炎症反应在 CLP 诱导脓毒症小鼠诱发 ALI 的病理过程中发挥了一定的促进作用。因此,以 MLKL-NLRP3 介导的坏死性炎症反应途径为靶点可能成为一种新的治疗策略。

Necrostatin-1 作为 RIPK1 激酶的特异性抑制剂,可以有效阻断 RIPK1-RIPK3-MLKL 介导的程序性坏死通路,从而发挥保护作用。有研究表明,通过使用 Necrostatin-1 或基因敲除 RIPK1 阻断 RIPK1-RIPK3-MLKL 介导的程序性坏死通路可能成为治疗的新靶点^[7, 22]。另外一些研究也表明,通过 Necrostatin-1 抑制 RIPK1 可以有效减轻小鼠的肺损伤,显著延长小鼠的存活时间^[23-24]。这些在构建脓毒症动物模型基础之上的研究结果可以表明,通过抑制剂 Necrostatin-1 特异性抑制 RIPK1 激酶的过表达,能够有效阻断 RIPK1-RIPK3-MLKL 介导的细胞程序性坏死通路,从而显著改善脓毒症诱导的 ALI,明显延长存活时间。

本实验中给脓毒症小鼠注射特异性坏死抑制剂 Necrostatin-1 后,肺组织中 MLKL 分子表达水平被抑制,并且有效减少了 NLRP3 炎症小体的激活和炎性因子 IL-1 β 的释放,肺组织病理改变也出现好转,可见中性粒细胞浸润减轻,肺泡腔及间质充血水肿程度明显好转,肺组织含水率下降,肺血管通透性下降。以上结果提示,通过 Necrostatin-1 特异性抑制 RIPK1-RIPK3-MLKL 介导的程序性坏死通路可有效减轻 NLRP3 触发的炎症反应,从而减轻脓毒症小鼠 ALI,表明 Necrostatin-1 可能通过特异性阻断 MLKL-NLRP3 介导的分子途径,抑制坏死性炎症反应的发生,从而有效减轻脓毒症导致的 ALI,在 CLP 诱导的脓毒症 ALI 小鼠模型中发挥保护性作用。因此,使用 Necrostatin-1 特异性抑制 MLKL-NLRP3 介导的坏死性炎症反应通路有望成为脓毒症诱发 ALI/ARDS 的一种潜在治疗方法。

综上,本实验表明 MLKL 和 NLRP3 的表达水平在脓毒症小鼠肺组织中显著上调,坏死性炎症反应可能通过 MLKL-NLRP3 的分子途径在脓毒症 ALI 小鼠模型中发挥促进作用。使用特异性抑制剂 Necrostatin-1 后,脓毒症小鼠肺组织的急性损伤程度明显减轻,其机制与 MLKL-NLRP3 通路被抑制有关。这可能是脓毒症诱发 ALI 的病理机制之一,可为脓毒症 ALI 的诊疗提供新型的有价值的临床策略。但是本实验也具有不足之处,动物实验不能完全说明临床问题。后期还需要开展更深入的临床试验和体外细胞实验来验证当前的发现及探索更多潜在的病理机制,特别是坏死性炎症反应的过程非常复杂,参与因素众多,需要深入揭示脓毒症 ALI 其他未被发掘的致病机制,为临床工作提供更加确切有效的理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Cecconi M, Evans L, Levy M, et al. Sepsis and septic shock [J]. *Lancet*, 2018, 392 (10141): 75–87. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)30696-2.
- [2] Zhao H, Chen H, Meng X, et al. Autophagy activation improves lung injury and inflammation in sepsis [J]. *Inflammation*, 2019, 42 (2): 426–439. DOI: 10.1007/s10753-018-00952-5.
- [3] 于学忠, 姚咏明, 周荣斌, 等. 中国脓毒症 / 脓毒性休克急诊治疗指南 (2018) [J]. *临床急诊杂志*, 2018, 19 (9): 567–588. DOI: 10.13201/j.issn.1009-5918.2018.09.001.
- [4] Yu XZ, Yao YM, Zhou RB, et al. Guidelines for emergency treatment of sepsis/septic shock in China: 2018 [J]. *J Clin Emerg*, 2018, 19 (9): 567–588. DOI: 10.13201/j.issn.1009-5918.2018.09.001.
- [5] Ying Y, Mao Y, Yao M. NLRP3 inflammasome activation by microRNA-495 promoter methylation may contribute to the progression of acute lung injury [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 18: 801–814. DOI: 10.1016/j.omtn.2019.08.028.
- [6] Herrero R, Sanchez G, Lorente JA. New insights into the mechanisms of pulmonary edema in acute lung injury [J]. *Ann Transl Med*, 2018, 6 (2): 32. DOI: 10.21037/atm.2017.12.18.
- [7] 李小茜, 杨爱东. 急性肺损伤发病机制及中医辨证治疗的思考 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2018, 25 (1): 9–14. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2018.01.003.
- [8] Li XQ, Yang AD. Study on pathogenesis and traditional Chinese medicine syndrome differentiation of acute lung injury [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2018, 25 (1): 9–14. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2018.01.003.
- [9] Sharma A, Matsuo S, Yang WL, et al. Receptor-interacting protein kinase 3 deficiency inhibits immune cell infiltration and attenuates organ injury in sepsis [J]. *Crit Care*, 2014, 18 (4): R142. DOI: 10.1186/cc13970.
- [10] Duprez L, Takahashi N, Van Hauwermeiren F, et al. RIP kinase-dependent necrosis drives lethal systemic inflammatory response syndrome [J]. *Immunity*, 2011, 35 (6): 908–918. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.09.020.
- [11] Gong W, Wen H. Sepsis induced by cecal ligation and puncture [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1960: 249–255. DOI: 10.1007/978-1-4939-9167-9_22.
- [12] 王圆圆, 陈晴, 赵晗, 等. 盲肠不同部位结扎穿孔致脓毒症模型的建立研究 [J]. *重庆医学*, 2021, 50 (4): 552–556. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8348.2021.04.003.
- [13] Wang YY, Chen Q, Zhao H, et al. Study on sepsis model caused by ligation and perforation in different parts of cecum [J]. *Chongqing Med*, 2021, 50 (4): 552–556. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8348.2021.04.003.
- [14] 孙冰珂, 李秀华, 郑贵珍, 等. 基于肺微血管内皮细胞而非肺上皮细胞途径阻断 PD-L1 表达可以减轻小鼠的间接急性肺损伤 [J]. *中华危重病急救医学*, 2019, 31 (1): 37–43. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.01.009.
- [15] Sun BK, Li XH, Zheng GZ, et al. Blockade of programmed death-ligand 1 attenuates indirect acute lung injury in mice through targeting endothelial cells but not epithelial cells [J]. *Chin Crit Care Med*, 2019, 31 (1): 37–43. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.01.009.
- [16] Yehya N, Xin Y, Oquendo Y, et al. Cecal ligation and puncture accelerates development of ventilator-induced lung injury [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 308 (5): L443–451. DOI: 10.1152/ajplung.00312.2014.
- [17] Faust H, Mangalmurti NS. Collateral damage: necroptosis in the development of lung injury [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2020, 318 (2): L215–L225. DOI: 10.1152/ajplung.00065.2019.
- [18] 李娜, 黄煜, 何庆. RIP3 在心肌细胞坏死中的作用及其机制 [J]. *中华危重病急救医学*, 2019, 31 (8): 1045–1047. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.08.028.
- [19] Li N, Huang Y, He Q. Vital role of RIP3 in the mechanism of myocardial cell necroptosis [J]. *Chin Crit Care Med*, 2019, 31 (8): 1045–1047. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.08.028.
- [20] Shashaty MGS, Reilly JP, Faust HE, et al. Plasma receptor interacting protein kinase-3 levels are associated with acute respiratory distress syndrome in sepsis and trauma: a cohort study [J]. *Crit Care*, 2019, 23 (1): 235. DOI: 10.1186/s13054-019-2482-x.
- [21] Newton K, Dugger DL, Maltzman A, et al. RIPK3 deficiency or catalytically inactive RIPK1 provides greater benefit than MLKL deficiency in mouse models of inflammation and tissue injury [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23 (9): 1565–1576. DOI: 10.1038/cdd.2016.46.
- [22] Khoury MK, Gupta K, Franco SR, et al. Necroptosis in the pathophysiology of disease [J]. *Am J Pathol*, 2020, 190 (2): 272–285. DOI: 10.1016/j.ajpath.2019.10.012.
- [23] Zhu K, Liang W, Ma Z, et al. Necroptosis promotes cell-autonomous activation of proinflammatory cytokine gene expression [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9 (5): 500. DOI: 10.1038/s41419-018-0524-y.
- [24] Mangan MSJ, Olhava EJ, Roush WR, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17 (8): 588–606. DOI: 10.1038/nrd.2018.97.
- [25] Jiang L, Zhang L, Kang K, et al. Resveratrol ameliorates LPS-induced acute lung injury via NLRP3 inflammasome modulation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 130–138. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.09.020.
- [26] 张飞, 李湘民, 张方杰. NOD 样受体家族核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 炎性小体在脓毒症中的作用 [J/CD]. *中华危重症医学杂志 (电子版)*, 2018, 11 (6): 420–424. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-6880.2018.06.014.
- [27] Zhang F, Li XM, Zhang FJ. Role of NOD like receptor family nucleotide binding oligomerization domain like receptor 3 inflammasome in sepsis [J/CD]. *Chin J Crit Care Med (Electronic Edition)*, 2018, 11 (6): 420–424. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-6880.2018.06.014.
- [28] Zhang L, Feng Q, Wang T. Necrostatin-1 protects against paraquat-induced cardiac contractile dysfunction via RIP1–RIP3–MLKL-dependent necroptosis pathway [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2018, 18 (4): 346–355. DOI: 10.1007/s12012-017-9441-z.
- [29] Bolognese AC, Yang WL, Hansen LW, et al. Inhibition of necroptosis attenuates lung injury and improves survival in neonatal sepsis [J]. *Surgery*, 2018, 164 (1): 110–116. DOI: 10.1016/j.surg.2018.02.017.
- [30] Guan E, Wang Y, Wang C, et al. Necrostatin-1 attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice [J]. *Exp Lung Res*, 2017, 43 (9–10): 378–387. DOI: 10.1080/01902148.2017.1384083.

(收稿日期: 2020-06-22)