

NLRP3 炎症小体活化促进中性粒细胞胞外诱捕网生成影响脓毒症预后的机制研究

王春立¹ 王程¹ 张雯怡² 孟祥军¹ 胡斌³ 戚峰³

¹天津医科大学总医院急创外科,天津 300052; ²天津医科大学总医院口腔科,天津 300052;

³天津医科大学总医院空港医院普通外科,天津 300300

通信作者:戚峰,Email: qf@medmail.com.cn

【摘要】 目的 探讨 NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体活化与中性粒细胞胞外诱捕网 (NETs) 生成之间的内在联系及其在脓毒症病理过程中的作用机制。方法 分别将野生型 (WT) 和 NLRP3 基因敲除型 (NLRP3^{-/-}) 小鼠随机分为假手术 (Sham) 组和盲肠结扎穿孔术 (CLP) 组,即 WT-Sham 组、NLRP3^{-/-}-Sham 组、WT-CLP 组和 NLRP3^{-/-}-CLP 组,每组 6 只。术后 24 h 采用苏木素-伊红 (HE) 染色观察肝、肺组织病理学改变;采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测血细胞因子水平、瓜氨酸化组蛋白 H3 (Cit-H3) 和髓过氧化物酶-DNA (MPO-DNA) 复合物水平;采用蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测肺组织肽酰基精氨酸脱亚氨酶 4 (PAD4)、Cit-H3 蛋白表达;同时检测各组外周血和腹腔灌洗液 (PLF) 中菌落计数。观察各组小鼠术后 7 d 存活情况。结果 与相应 Sham 组相比,WT 和 NLRP3^{-/-} 小鼠 CLP 术后存活率均降低,血中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-10 (IL-10) 水平均升高,肝组织和肺组织病理损伤加重,且外周血和 PLF 中细菌负荷增加,肺组织 PAD4 和 Cit-H3 蛋白表达增加,血清 Cit-H3 和 MPO-DNA 复合物水平升高 (均 $P < 0.05$)。而与 WT-CLP 组相比,NLRP3^{-/-}-CLP 组术后 7 d 动物存活率下降 (16.7% 比 55.6%, Log-rank 检验: $\chi^2 = 4.35$, $P < 0.05$),促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平下降 [IL-1 β (ng/L): 136.30 \pm 56.16 比 243.50 \pm 55.29, IL-6 (ng/L): 411.30 \pm 114.50 比 669.70 \pm 222.60, TNF- α (ng/L): 672.80 \pm 16.43 比 717.30 \pm 30.16], 抗炎因子 IL-10 水平升高 (ng/L: 1 111.00 \pm 223.20 比 833.70 \pm 154.90), 肝组织和肺组织病理损伤减轻 [肝组织病理学评分 (分): 2.50 \pm 0.55 比 3.67 \pm 0.52, 肺组织病理学评分 (分): 2.33 \pm 0.52 比 3.67 \pm 0.52], 细菌清除率改善 [外周血菌落计数 ($\times 10^5$ CFU/L): 12.16 \pm 7.31 比 36.00 \pm 13.80, PLF 菌落计数 ($\times 10^7$ CFU/L): 113.33 \pm 79.69 比 277.00 \pm 77.23], 肺组织中 PAD4、Cit-H3 蛋白表达降低 (PAD4/ β -actin: 0.17 \pm 0.05 比 0.29 \pm 0.05, Cit-H3/ β -actin: 1.36 \pm 0.23 比 1.96 \pm 0.26), 血清 Cit-H3、MPO-DNA 复合物水平亦下降 [Cit-H3 (ng/L): 132.80 \pm 20.68 比 182.70 \pm 13.43, MPO-DNA (ng/L): 47.67 \pm 34.96 比 177.20 \pm 43.95], 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。结论 NLRP3 炎症小体可能通过正向调控 NETs 的生成,参与炎症放大和器官损伤,进而影响脓毒症的病程与结局。NLRP3 缺失可抑制异常 NETs,减轻炎症反应和器官损伤,增强细菌清除能力,从而改善脓毒症小鼠的预后,提示 NLRP3-NETs 轴可能作为脓毒症的潜在干预靶点。

【关键词】 脓毒症;中性粒细胞;中性粒细胞胞外诱捕网;NOD 样受体蛋白 3 炎症小体

基金项目:国家临床重点专科建设项目 (2023-421)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20250626-00352

The mechanism by which NLRP3 inflammasome activation promotes the formation of neutrophil extracellular traps and affects the prognosis of sepsis

Wang Chunli¹, Wang Cheng¹, Zhang Wenyi², Meng Xiangjun¹, Hu Bin³, Qi Feng³

¹Department of Emergency and Trauma Surgery, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China;

²Department of Stomatology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China; ³Department of General Surgery, Tianjin Medical University General Hospital Airport Hospital, Tianjin 300300, China

Corresponding author: Qi Feng, Email: qf@medmail.com.cn

【Abstract】 **Objective** To explore the intrinsic relationship between NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome activation and neutrophil extracellular traps (NETs) formation, as well as their mechanism of action in the pathological process of sepsis. **Methods** Wild-type (WT) and NLRP3 knockout (NLRP3^{-/-}) mice were randomly divided into sham operation (Sham) group and cecal ligation and puncture (CLP) group, namely WT-Sham group, NLRP3^{-/-}-Sham group, WT-CLP group and NLRP3^{-/-}-CLP group, with 6 mice in each group. At 24 hours after operation, hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe histopathological changes in the liver and lung tissues; enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to detect the levels of blood cytokines, citrullinated histone H3 (Cit-H3), and myeloperoxidase-DNA (MPO-DNA) complexes; Western blotting was used to measure the protein expressions of peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) and Cit-H3 in lung tissue. Meanwhile, colony counts in peripheral blood and peritoneal lavage fluid (PLF) were determined in each group. The 7-day survival of mice in each group was observed postoperatively. **Results** Compared with the corresponding Sham group, the survival rate of WT and

NLRP3^{-/-} mice was decreased after CLP, while the serum levels of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin-10 (IL-10) were increased, pathological injury in the liver and lung tissues was aggravated, bacterial burden in peripheral blood and PLF was elevated, protein expressions of PAD4 and Cit-H3 in lung tissue were up-regulated, and serum levels of Cit-H3 and MPO-DNA complexes were increased (all $P < 0.05$). Compared with the WT-CLP group, the NLRP3^{-/-}-CLP group showed a lower 7-day survival rate (16.7% vs. 55.6%, Log-rank test: $\chi^2 = 4.35$, $P < 0.05$), the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF- α were decreased [IL-1 β (ng/L): 136.30 \pm 56.16 vs. 243.50 \pm 55.29, IL-6 (ng/L): 411.30 \pm 114.50 vs. 669.70 \pm 222.60, TNF- α (ng/L): 672.80 \pm 16.43 vs. 717.30 \pm 30.16], whereas the anti-inflammatory cytokine IL-10 was increased (ng/L: 1 111.00 \pm 223.20 vs. 833.70 \pm 154.90), pathological injury in the liver and lung tissues was alleviated (liver injury score: 2.50 \pm 0.55 vs. 3.67 \pm 0.52, lung injury score: 2.33 \pm 0.52 vs. 3.67 \pm 0.52), bacterial clearance was markedly improved [peripheral blood colony count ($\times 10^5$ CFU/L): 12.16 \pm 7.31 vs. 36.00 \pm 13.80, PLF colony count ($\times 10^7$ CFU/L): 113.33 \pm 79.69 vs. 277.00 \pm 77.23], protein expressions of PAD4 and Cit-H3 in lung tissue were reduced (PAD4/ β -actin: 0.17 \pm 0.05 vs. 0.29 \pm 0.05, Cit-H3/ β -actin: 1.36 \pm 0.23 vs. 1.96 \pm 0.26), and serum levels of Cit-H3 and MPO-DNA complexes were also decreased [Cit-H3 (ng/L): 132.80 \pm 20.68 vs. 182.70 \pm 13.43, MPO-DNA (ng/L): 47.67 \pm 34.96 vs. 177.20 \pm 43.95], all differences were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusions** The NLRP3 inflammasome may participate in inflammatory amplification and organ injury by positively regulating NET formation, thereby influencing the course and outcome of sepsis. NLRP3 deficiency can suppress aberrant NET formation, alleviate inflammatory responses and organ damage, enhance bacterial clearance, and thus improve the prognosis of septic mice, suggesting that the NLRP3-NET axis may serve as a potential intervention target for sepsis.

[Key words] Sepsis; Neutrophil; Neutrophil extracellular traps; NOD-like receptor protein 3 inflammasome

Fund program: National Clinical Key Specialty Construction Project (2023-421)

DOI: 10.3760/ema.j.cn121430-20250626-00352

脓毒症是由感染引发的免疫失控反应导致的致命性器官功能障碍,是重症监护病房患者死亡的主要原因^[1]。作为先天免疫中的关键效应细胞,中性粒细胞通过吞噬、脱颗粒和中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)释放等参与抗感染机制^[2-3];然而,在脓毒症中,中性粒细胞表现为过度活化,因而释放大量促炎因子和毒性物质,包括NETs的异常生成等^[4]。NETs由活化的中性粒细胞释放,是一种由脱凝聚的染色质DNA及其上的抗菌蛋白质[如组蛋白、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)、中性粒细胞弹性蛋白酶等]构成^[5-6]。NETs虽有抗菌功能^[7],但其过度释放可诱导血栓形成、破坏内皮屏障、激活其他免疫细胞^[8-9],成为炎症反应失控和多器官功能障碍的重要原因^[10]。

NOD样受体蛋白3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)属于模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR),定位于胞质,感应病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)和损伤相关分子模式(damage-associated molecular pattern, DAMP)信号后招募凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶1(caspase-1)前体组成NLRP3炎症小体,进一步激活caspase-1,促使白细胞介素(interleukins, IL-1 β 、IL-18)成熟和释放,并促进Gasdermin D(GSDMD)介导的焦亡,其作为炎症放大和程序性细胞死亡

的枢纽,是先天免疫系统中重要的炎症调节平台^[11-12]。研究已证实,NLRP3在脓毒症中发挥关键作用,是调控脓毒症炎症反应失控的关键节点^[13]。

近年研究发现,NLRP3炎症小体异常激活与NETs过度生成同为脓毒症病理生理机制的重要特征,二者可能协同驱动炎症反应失控。但在脓毒症中,NLRP3是否介导NETs生成仍不明确。因此,本研究通过构建野生型(wild type, WT)和NLRP3基因敲除(NLRP3^{-/-})脓毒症小鼠模型,评价NLRP3缺失对NETs生成、炎症反应、器官损伤、细菌清除及存活率等的影响,探讨NLRP3与NETs间的内在联系,及其影响脓毒症病理生理过程的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂: WT雄性C57BL/6J小鼠6~8周龄,体质量22~25g,购自北京维通利华实验动物有限公司,动物合格证号:SCXK(京)2021-0006。NLRP3^{-/-}雄性C57BL/6J小鼠6~8周龄,体质量22~25g,购自上海南方模式生物科技股份有限公司,动物合格证号:SCXK(沪)2021-0004。IL-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和IL-10酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自优宁维生物科技公司;MPO-DNA ELISA试剂盒购自天津科维诺生物科技有限公司;瓜氨酸化组蛋白H3(citrullinated histone H3, Cit-H3)ELISA试剂盒购自江苏酶标生物科技股份有限公司;佛波酯(phorbol

12-myristate 13-acetate, PMA) 购自碧云天生物技术公司; Cit-H3 抗体购自英国 Abcam 公司; 肽酰基精氨酸脱亚氨酶 4 (peptidylarginine deiminase 4, PAD4) 抗体购自美国 Proteintech 公司; β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体购自普利莱基因技术公司。

1.2 动物分组及处理:按随机数字表法分别将 WT 小鼠和 NLRP3^{-/-} 小鼠分为假手术组 (Sham) 及盲肠结扎穿孔术 (cecal ligation and puncture, CLP) 组, 即 WT-Sham 组、NLRP3^{-/-}-Sham 组、WT-CLP 组和 NLRP3^{-/-}-CLP 组 4 组。采用 CLP 法建立脓毒症模型: 实验前禁食 12 h, 异氟烷麻醉小鼠, 开腹, 游离盲肠根部, 在回盲瓣远端以 4-0 丝线结扎 1/2 处盲肠, 用 21 G 注射针头于结扎端穿孔, 并挤出少许粪便, 然后用 4-0 丝线间断缝合腹膜及皮肤, 立即皮下注射生理盐水 50 mL/kg 抗休克。术后将动物置于保温毯复温后常规饲养。Sham 组仅进行开腹探查, 不结扎及穿刺盲肠。模型构建后, 将所有小鼠置于相同环境饲养, 自由饮食水, 每日观察 1 次小鼠生存状态, 连续观察至术后 7 d, 分析各组生存情况。

本研究中操作均符合动物伦理学标准, 且经天津医科大学总医院实验动物福利伦理委员会审查批准 (审批号: IRB2025-DW-71)。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色:制模后 24 h 取小鼠肝脏及肺组织, 于 4% 多聚甲醛中固定 48 h, 依次进行水洗、脱水、透明、石蜡包埋、切片及 HE 染色。光镜下观察组织病理学改变, 并采用 Smith 积分法进行病理学评分^[14]。

1.3.2 ELISA:制模后 24 h 采集小鼠外周血, 分离血清, 按照 ELISA 试剂盒说明书操作依次进行加样、加检测抗体、洗板、加酶、显色及终止反应, 终止反应后 10 min 内, 在 450 nm 波长下读取吸光度 (A) 值, 测定 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-10、Cit-H3 和 MPO-DNA 水平。

1.3.3 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting):取小鼠肺组织, 冰上剪碎, 加入 RIPA 裂解液, 用组织研磨枪充分研磨肺组织, 于冰上裂解 30 min, 离心后取上清液。采用二辛可宁酸 (bicinchoninic acid assay, BCA) 法进行蛋白定量后, 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质, 并转至聚偏二氟乙烯膜。用快速封闭液封闭 15 min, 随后于 4 $^{\circ}$ C 孵育一抗过夜, 次日室温孵育二抗 1 h 后使用凝胶成像系统进行显色分析。应用 Image J 软件分析各

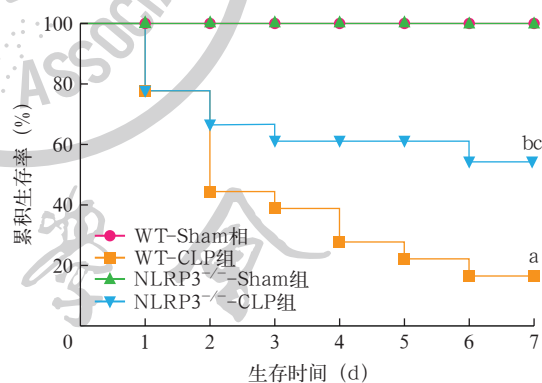
条带灰度值, 以目的蛋白与内参 β -actin 的灰度值比值代表目的蛋白表达量, 实验重复 3 次, 取均值。

1.3.4 细菌负荷检测:制模后 24 h 收集小鼠外周血和腹腔灌洗液 (peritoneal lavage fluid, PLF), 置于冰上, 用无菌磷酸盐缓冲液进行梯度稀释, 取 100 μ L 稀释液涂布于含 5% 绵羊血的胰酶水解大豆琼脂平板上, 在 37 $^{\circ}$ C 湿润培养箱中孵育 24 h, 计数菌落数。

1.4 统计学分析:使用 GraphPad Prism 10.0 软件对数据进行统计分析。结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Tukey 法。绘制各组小鼠术后 7 d Kaplan-Meier 生存曲线, 采用 Log-rank 检验比较。检验水准 α 值设置为双侧 0.05。

2 结果

2.1 NLRP3 敲除改善脓毒症小鼠存活率:图 1 显示, WT-Sham 组和 NLRP3^{-/-}-Sham 组小鼠术后 7 d 累积生存率均为 100%。与 Sham 组相比, WT-CLP 组和 NLRP3^{-/-}-CLP 组小鼠 7 d 累积生存率均下降 (分别为 16.7%、55.6%, Log-rank 检验: χ^2 值分别为 24.62、9.65, 均 $P < 0.05$)。而 NLRP3^{-/-}-CLP 组小鼠术后 7 d 累积生存率较 WT-CLP 组改善 (Log-rank 检验: $\chi^2 = 4.35, P < 0.05$)。



注: WT 为野生型, NLRP3^{-/-} 为 NOD 样受体蛋白 3 基因敲除型, Sham 为假手术, CLP 为盲肠结扎穿孔术; ^a 与 WT-Sham 组比较, $P < 0.05$; ^b 与 NLRP3^{-/-}-Sham 组比较, $P < 0.05$; ^c 与 WT-CLP 组比较, $P < 0.05$

图 1 各组小鼠术后 7 d Kaplan-Meier 生存曲线

2.2 NLRP3 敲除减轻脓毒症炎症反应:表 1 显示, 与 Sham 组相比, CLP 组血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 IL-10 水平均升高 (均 $P < 0.05$); 与 WT-CLP 组相比, NLRP3^{-/-}-CLP 组 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平下降, 抗炎因子 IL-10 水平上调 (均 $P < 0.05$)。

2.3 NLRP3 敲除缓解肺、肝组织病理损伤:图 2 和表 2 显示, 与 Sham 组相比, WT 和 NLRP3^{-/-} 小鼠

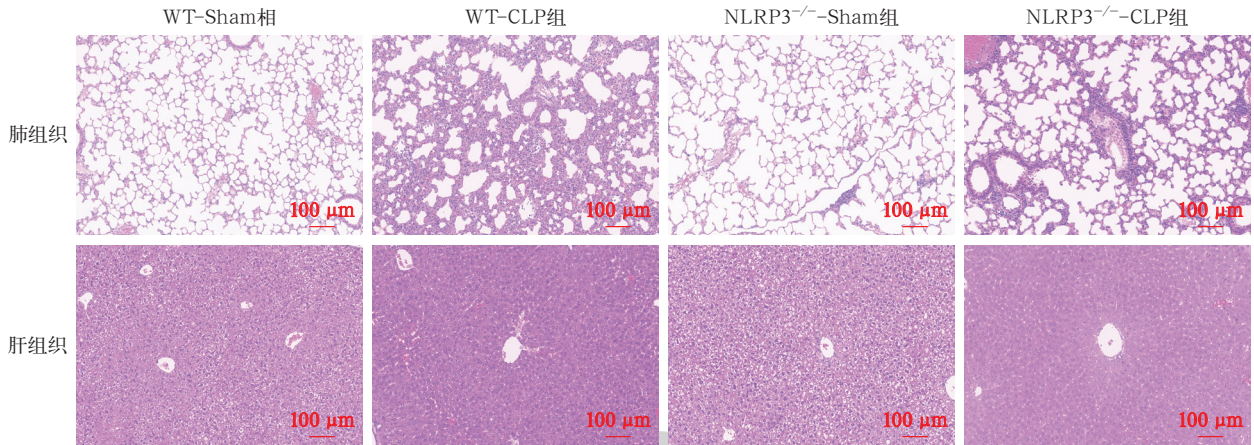


图 2 光镜下观察各组小鼠肺脏及肝脏组织病理学改变 野生型假手术组 (WT-Sham 组) 和 NOD 样受体蛋白 3 基因敲除型假手术组 (NLRP3^{-/-}-Sham 组) 小鼠肺泡结构明显, 无间质水肿及炎症细胞浸润; 肝结构正常, 肝细胞无水肿、坏死, 肝窦无充血。野生型盲肠结扎穿孔术组 (WT-CLP 组) 小鼠肺泡间隔增厚, 肺间质水肿, 炎症渗出和炎症细胞浸润明显; 肝脏炎症细胞增多, 部分肝细胞出现水肿、肝窦充血。与 WT-CLP 组相比, NLRP3^{-/-}-CLP 组小鼠肺泡间质水肿减轻, 炎症细胞浸润明显减少; 肝细胞水肿程度降低, 炎症细胞浸润减少 苏木素-伊红 (HE) 染色 中倍放大

表 1 各组小鼠血清细胞因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	IL-1 β (ng/L)	IL-6 (ng/L)
WT-Sham 组	6	25.50 \pm 26.35	33.48 \pm 11.13
WT-CLP 组	6	243.50 \pm 55.29 ^a	669.70 \pm 222.60 ^a
NLRP3 ^{-/-} -Sham 组	6	24.04 \pm 16.64	20.57 \pm 5.73
NLRP3 ^{-/-} -CLP 组	6	136.30 \pm 56.16 ^{bc}	411.30 \pm 114.50 ^{bc}

组别	动物数 (只)	TNF- α (ng/L)	IL-10 (ng/L)
WT-Sham 组	6	143.50 \pm 6.03	486.50 \pm 51.39
WT-CLP 组	6	717.30 \pm 30.16 ^a	833.70 \pm 154.90 ^a
NLRP3 ^{-/-} -Sham 组	6	134.60 \pm 3.29	488.80 \pm 20.16
NLRP3 ^{-/-} -CLP 组	6	672.80 \pm 16.43 ^{bc}	1111.00 \pm 223.20 ^{bc}

注: WT 为野生型, NLRP3^{-/-} 为 NOD 样受体蛋白 3 基因敲除型, Sham 为假手术, CLP 为盲肠结扎穿孔术, IL-1 β 为白细胞介素-1 β , IL-6 为白细胞介素-6, TNF- α 为肿瘤坏死因子- α , IL-10 为白细胞介素-10; ^a 与 WT-Sham 组比较, $P < 0.05$; ^b 与 NLRP3^{-/-}-Sham 组比较, $P < 0.05$; ^c 与 WT-CLP 组比较, $P < 0.05$

CLP 术后均表现为明显的肺泡充血、炎症细胞浸润及肺泡壁增厚; 肝细胞出现明显肿胀, 局灶性坏死, 脂肪变性, 弥漫性凝血等病理改变; 肺组织和肝组织病理学评分升高 (均 $P < 0.05$)。与 WT-CLP 组相比, NLRP3^{-/-}-CLP 组肺泡充血、炎症细胞浸润、肺泡壁增厚, 以及肝细胞肿胀、局灶性坏死、脂肪变性、弥漫性凝血等病理改变减轻; 肺组织和肝组织病理学评分降低 (均 $P < 0.05$)。

2.4 NLRP3 敲除增强细菌清除能力: 表 3 显示, WT-Sham 组与 NLRP3^{-/-}-Sham 组均未检测到菌落生长。与相应 Sham 组相比, WT-CLP 组和 NLRP3^{-/-}-CLP 组外周血和 PLF 中菌落计数均增加 (均 $P < 0.05$)。NLRP3^{-/-}-CLP 组外周血和 PLF 中菌落计数均较 WT-CLP 组降低 (均 $P < 0.05$)。

2.5 NLRP3 敲除对 NETs 生成的影响: Western

表 2 各组小鼠肺、肝组织病理学评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	肺组织病理学评分 (分)	肝组织病理学评分 (分)
WT-Sham 组	6	0.17 \pm 0.41	0.17 \pm 0.41
WT-CLP 组	6	3.67 \pm 0.52 ^a	3.67 \pm 0.52 ^a
NLRP3 ^{-/-} -Sham 组	6	0.33 \pm 0.52	3.33 \pm 0.52
NLRP3 ^{-/-} -CLP 组	6	2.33 \pm 0.52 ^{bc}	2.50 \pm 0.55 ^{bc}

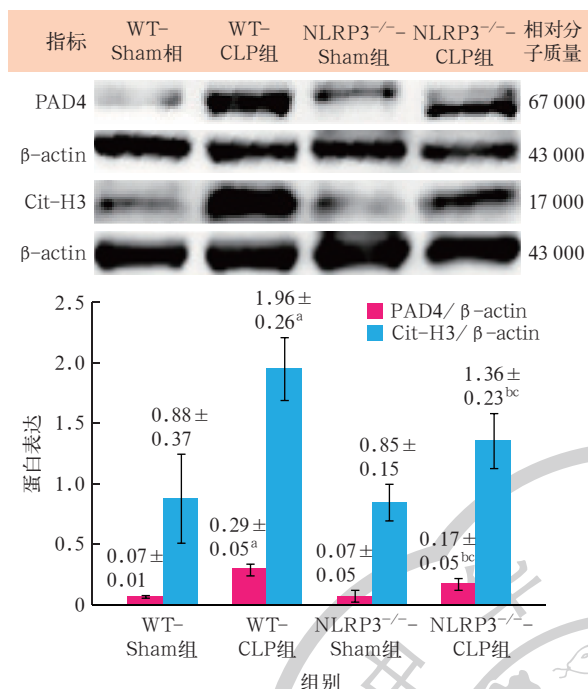
注: WT 为野生型, NLRP3^{-/-} 为 NOD 样受体蛋白 3 基因敲除型, Sham 为假手术, CLP 为盲肠结扎穿孔术; ^a 与 WT-Sham 组比较, $P < 0.05$; ^b 与 NLRP3^{-/-}-Sham 组比较, $P < 0.05$; ^c 与 WT-CLP 组比较, $P < 0.05$

表 3 各组小鼠外周血和 PLF 中菌落计数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	外周血菌落计数 ($\times 10^5$ CFU/L)	PLF 菌落计数 ($\times 10^7$ CFU/L)
WT-Sham 组	6	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
WT-CLP 组	6	36.00 \pm 13.80 ^a	277.00 \pm 77.23 ^a
NLRP3 ^{-/-} -Sham 组	6	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
NLRP3 ^{-/-} -CLP 组	6	12.16 \pm 7.31 ^{bc}	113.33 \pm 79.69 ^{bc}

注: WT 为野生型, NLRP3^{-/-} 为 NOD 样受体蛋白 3 基因敲除型, Sham 为假手术, CLP 为盲肠结扎穿孔术, PLF 为腹腔灌洗液; ^a 与 WT-Sham 组比较, $P < 0.05$; ^b 与 NLRP3^{-/-}-Sham 组比较, $P < 0.05$; ^c 与 WT-CLP 组比较, $P < 0.05$

blotting 结果显示 (图 3), 与相应 Sham 组相比, WT 和 NLRP3^{-/-} 小鼠 CLP 术后肺组织中 PAD4 和 Cit-H3 蛋白表达均增加 (均 $P < 0.05$)。NLRP3^{-/-}-CLP 组 PAD4 和 Cit-H3 蛋白表达均较 WT-CLP 组降低 (均 $P < 0.05$)。ELISA 结果显示 (表 4), 与相应 Sham 组相比, WT 和 NLRP3^{-/-} 小鼠 CLP 术后血清 Cit-H3、MPO-DNA 复合物水平均升高 (均 $P < 0.05$)。而 NLRP3^{-/-}-CLP 组血清 Cit-H3、MPO-DNA 复合物水平均较 WT-CLP 组降低 (均 $P < 0.05$)。表明 NLRP3 敲除抑制了 NETs 过程, 减少了 NETs 的异常生成。



注: WT 为野生型, NLRP3^{-/-} 为 NOD 样受体蛋白 3 基因敲除型, Sham 为假手术, CLP 为盲肠结扎穿孔术, PAD4 为肽酰基精氨酸脱亚氨酶 4, Cit-H3 为瓜氨酸化组蛋白 H3, β-actin 为 β-肌动蛋白; ^a 与 WT-Sham 组比较, $P < 0.05$; ^b 与 NLRP3^{-/-}-Sham 组比较, $P < 0.05$; ^c 与 WT-CLP 组比较, $P < 0.05$

图 3 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测各组小鼠肺组织 PAD4、Cit-H3 蛋白表达

表 4 各组小鼠血清 MPO-DNA、Cit-H3 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	MPO-DNA (ng/L)	Cit-H3 (ng/L)
WT-Sham 组	6	18.00 ± 1.87	31.25 ± 7.47
WT-CLP 组	6	117.20 ± 43.95 ^a	182.70 ± 13.43 ^a
NLRP3 ^{-/-} -Sham 组	6	13.50 ± 3.38	28.17 ± 7.03
NLRP3 ^{-/-} -CLP 组	6	47.67 ± 34.96 ^{bc}	132.80 ± 20.68 ^{bc}

注: WT 为野生型, NLRP3^{-/-} 为 NOD 样受体蛋白 3 基因敲除型, Sham 为假手术, CLP 为盲肠结扎穿孔术, MPO-DNA 为髓过氧化物酶-DNA, Cit-H3 为瓜氨酸化组蛋白 H3; ^a 与 WT-Sham 组比较, $P < 0.05$; ^b 与 NLRP3^{-/-}-Sham 组比较, $P < 0.05$; ^c 与 WT-CLP 组比较, $P < 0.05$

3 讨论

中性粒细胞是机体抵御感染的第一道防线,在清除病原体过程中发挥核心作用^[15]。感染发生后,中性粒细胞在趋化因子的引导下迅速迁移至感染灶,通过吞噬、脱颗粒以及释放 NETs 等机制参与病原清除^[2-3],是先天免疫应答的关键效应细胞。然而,在脓毒症中,中性粒细胞常处于过度激活状态,导致免疫失衡和组织损伤^[16],其介导的炎症反应强度与疾病的严重程度密切相关。临床上,采用糖皮质激素等非特异性抑制中性粒细胞功能或炎症反应,对脓毒症疗效有限^[17],且可能引发免疫抑制等副作用^[18]。因此,深入解析脓毒症中性粒细胞功能

异常的分子机制,推动精准治疗策略的研发,具有重要的研究意义和临床转化价值。

NLRP3 属于胞内模式识别受体,识别多种外源性 PAMP 和内源性 DAMP,通过招募接头蛋白 ASC 和 caspase-1 前体,组装成炎症小体激活 caspase-1,继而介导 IL-1β 和 IL-18 的成熟与分泌,并促进 GSDMD 介导的细胞焦亡^[11-12]。脓毒症中, NLRP3 炎症小体的过度激活已被证实是全身炎症反应综合征和器官功能障碍的重要驱动因素^[13],在脓毒症相关的急性肺损伤、急性肾损伤及多器官功能障碍综合征中发挥关键作用^[19]。临床数据显示,脓症患者血清 ASC 和 IL-1β 水平均显著升高,且与病死率呈正相关^[20]。本研究结果显示, NLRP3^{-/-} 可抑制 CLP 术后 IL-1β、TNF-α 和 IL-6 等促炎因子的释放,并上调 IL-10 的表达,减轻肺组织和肝组织损伤,提高脓毒症小鼠的存活率,证实 NLRP3 在脓毒症发病机制中的核心地位;同时, NLRP3^{-/-} 抑制了 NETs 的异常生成,表现为外周血 MPO-DNA 复合物和 Cit-H3 水平下降,肺组织中 PAD4 和 Cit-H3 表达下调,提示 NLRP3 炎症小体的激活与 NETs 之间存在潜在的正向调控关系。

NETs 是中性粒细胞受到病原体刺激后释放的以 DNA 为骨架的网状结构,包含 DNA、组蛋白、MPO 和中性粒细胞弹性蛋白酶等成分,在限制感染扩散和启动免疫反应中发挥重要作用。然而,过度生成的 NETs 具有显著的细胞毒性,可引发内皮损伤、激活炎症级联反应并促进血栓形成^[8-9],最终导致肺、肝、肾等多个器官的结构与功能破坏^[10]。并且, NETs 还可通过正反馈机制促进其自身的持续释放,导致炎症反应失控,加剧组织损伤。本研究结果显示, CLP 术后 NLRP3^{-/-} 小鼠表现为炎症反应和器官损伤缓解,在存活率改善的同时, NETs 水平降低,提示 NLRP3 基因敲除带来的生存获益,除直接降低 IL-1β 等促炎因子水平外,也可能与对 NETs 的抑制有关,通过打破由 NETs 驱动的炎症正反馈环,从而减轻器官损伤,使存活率得以改善。

值得注意的是,尽管 NETs 在抗菌防御中扮演着重要角色,但本研究数据显示 NLRP3 缺失导致 NETs 水平下降的同时,细菌清除能力反而得到改善。这一“悖论”现象可能反映出 NETs 在特定条件下的“双刃剑”效应。一方面, NLRP3 驱动的过度 NETs 会导致中性粒细胞耗竭,减少其数量;另一方面, NETs 优先占用中性粒细胞功能,可能抑制其

经典的吞噬杀菌活性^[21]。而 NLRP3 缺失通过抑制异常 NETs, 有助于恢复中性粒细胞的数量和吞噬能力等, 从而增强细菌清除效能^[22]。此外, NETs 中的组蛋白和 MPO 等具有较强毒性, 其积聚可加重组织损伤^[23], 阻碍局部免疫细胞募集与功能发挥; 而 NLRP3 缺失降低了这些毒性组分的释放, 改善组织灌注和局部微环境, 间接提升了细菌清除能力。由于本研究采用全身性 NLRP3 基因敲除策略, 因此不能排除 NLRP3 对其他免疫细胞(如巨噬细胞、树突状细胞等)功能的协同调节效应, 共同促进抗菌效应的提升^[24-25]。因此, 适度抑制 NETs 不仅不会削弱抗菌免疫, 反而可能通过多机制的协同, 实现更高效且低损伤的抗感染效应。

综上所述, 本研究表明, NLRP3 介导的信号转导对 NETs 过程存在重要的正向调控作用, 而阻断 NLRP3 炎症小体的活化可显著抑制 NETs 的形成, 打断 NETs 介导的炎症正反馈环路, 减轻器官损伤, 并有助于改善细菌清除能力, 从而改善脓毒症预后。本研究体现出 NLRP3-NETs 轴在脓毒症病理生理机制中的核心作用, 未来应进一步深入解析 NLRP3 调控 NETs 的分子机制, 以期以中性粒细胞为靶点的脓毒症精准干预策略的探索提供参考和依据。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

志谢 感谢本课题及论文写作中导师及同事的指导和支持

作者贡献声明 王春立: 酝酿和设计实验、实施研究、起草文章; 王程: 实施研究、起草文章; 张雯怡、孟祥军、胡斌: 采集数据、分析/解释数据、起草文章、统计分析; 戚峰: 酝酿和设计实验, 对文章的知识性内容作批评性审阅, 获取研究经费, 行政、技术或材料支持, 指导, 支持性贡献

参考文献

- [1] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3)[J]. *JAMA*, 2016, 315(8): 801-810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.
- [2] Mihlan M, Wissmann S, Gavrilo A, et al. Neutrophil trapping and necrocytosis, mast cell-mediated processes for inflammatory signal relay[J]. *Cell*, 2024, 187(19): 5316-5335. e28. DOI: 10.1016/j.cell.2024.07.014.
- [3] Xie XY, Wang P, Jin M, et al. IL-1 β -induced epithelial cell and fibroblast transdifferentiation promotes neutrophil recruitment in chronic rhinosinusitis with nasal polyps[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 9101. DOI: 10.1038/s41467-024-53307-0.
- [4] Guo WJ, Gong Q, Zong XF, et al. GPR109A controls neutrophil extracellular traps formation and improve early sepsis by regulating ROS/PAD4/Cit-H3 signal axis[J]. *Exp Hematol Oncol*, 2023, 12(1): 15. DOI: 10.1186/s40164-023-00376-4.
- [5] Fei YX, Huang X, Ning FY, et al. NETs induce ferroptosis of endothelial cells in LPS-ALI through SDC-1/HS and downstream pathways[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 175: 116621. DOI: 10.1016/j.biopha.2024.116621.
- [6] 黄垂巧, 陈帅, 李倩, 等. 当归补血汤调控中性粒细胞胞外诱捕网改善卵巢早衰大鼠骨质疏松的机制研究[J]. *中国药房*, 2025, 36(6): 655-660. DOI: 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.06.03.
- [7] Zhang H, Wang YHZ, Qu M, et al. Neutrophil, neutrophil extracellular traps and endothelial cell dysfunction in sepsis[J]. *Clin Transl Med*, 2023, 13(1): e1170. DOI: 10.1002/ctm2.1170.
- [8] Qiao J, Tan Y, Liu HC, et al. Histone H3K18 and ezrin lactylation promote renal dysfunction in sepsis-associated acute kidney injury[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(28): e2307216. DOI: 10.1002/advs.202307216.
- [9] Zhang L, Zheng B, Bai Y, et al. Exosomes-transferred LINC00668 contributes to thrombosis by promoting NETs formation in inflammatory bowel disease[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10(28): e2300560. DOI: 10.1002/advs.202300560.
- [10] Sha HX, Liu YB, Qiu YL, et al. Neutrophil extracellular traps trigger alveolar epithelial cell necroptosis through the cGAS-STING pathway during acute lung injury in mice[J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(12): 4713-4730. DOI: 10.7150/ijbs.99456.
- [11] Chen Y, Ye XY, Escames G, et al. The NLRP3 inflammasome: contributions to inflammation-related diseases[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2023, 28(1): 51. DOI: 10.1186/s11658-023-00462-9.
- [12] 刘亚男, 牛志强, 李甫, 等. 原人参三醇通过抑制 NLRP3 炎症小体激活改善巨噬细胞炎症[J]. *现代食品科技*, 2025, 41(2): 31-39. DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.2.0176.
- [13] Vigneron C, Py BF, Monneret G, et al. The double sides of NLRP3 inflammasome activation in sepsis[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2023, 137(5): 333-351. DOI: 10.1042/CS20220556.
- [14] Su X, Bai CX, Hong QY, et al. Effect of continuous hemofiltration on hemodynamics, lung inflammation and pulmonary edema in a canine model of acute lung injury[J]. *Intensive Care Med*, 2003, 29(11): 2034-2042. DOI: 10.1007/s00134-003-2017-3.
- [15] Liew PX, Kubes P. The neutrophil's role during health and disease[J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(2): 1223-1248. DOI: 10.1152/physrev.00012.2018.
- [16] Zhang J, Shao YW, Wu JY, et al. Dysregulation of neutrophil in sepsis: recent insights and advances[J]. *Cell Commun Signal*, 2025, 23(1): 87. DOI: 10.1186/s12964-025-02098-y.
- [17] Menon K, McNally D, Choong K, et al. A systematic review and meta-analysis on the effect of steroids in pediatric shock[J]. *Pediatr Crit Care Med*, 2013, 14(5): 474-480. DOI: 10.1097/PCC.0b013e31828a8125.
- [18] CORTICUS Study Group. Hydrocortisone therapy for patients with septic shock[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(2): 111-124. DOI: 10.1056/NEJMoa071366.
- [19] Rao TW, Yang W, Ma XM, et al. Bergapten attenuates hemorrhagic shock induced multi-organ injury by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 140: 112839. DOI: 10.1016/j.intimp.2024.112839.
- [20] Martínez-García JJ, Martínez-Banaolocha H, Angosto-Bazarra D, et al. P2X7 receptor induces mitochondrial failure in monocytes and compromises NLRP3 inflammasome activation during sepsis[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2711. DOI: 10.1038/s41467-019-10626-x.
- [21] Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens[J]. *Nat Immunol*, 2014, 15(11): 1017-1025. DOI: 10.1038/ni.2987.
- [22] Jin LL, Batra S, Jeyaseelan S. Deletion of Nlrp3 augments survival during polymicrobial sepsis by decreasing autophagy and enhancing phagocytosis[J]. *J Immunol*, 2017, 198(3): 1253-1262. DOI: 10.4049/jimmunol.1601745.
- [23] 高然, 刘晨雨, 邓超华, 等. 自身免疫性疾病中 NETs 与免疫细胞的相互作用[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2025, 54(1): 129-136. DOI: 10.3870/j.issn.1672-0741.24.09.001.
- [24] Cornelius DC, Travis OK, Tramel RW, et al. NLRP3 inflammasome inhibition attenuates sepsis-induced platelet activation and prevents multi-organ injury in cecal-ligation puncture[J]. *PLoS One*, 2020, 15(6): e0234039. DOI: 10.1371/journal.pone.0234039.
- [25] Stanojeic M, Vinaik R, Abdullahi A, et al. NLRP3 knockout enhances immune infiltration and inflammatory responses and improves survival in a burn sepsis model[J]. *Immunology*, 2022, 165(2): 195-205. DOI: 10.1111/imm.13427.

(收稿日期: 2025-06-26)

(本文编辑: 保健媛 张耘菲)