

## 慢性阻塞性肺疾病(COPD)模型大鼠肺组织中 NLRP3 炎症小体表达水平的变化及意义\*

杨文林, 顾慧玲, 倪红燕, 王海峰 (上海市第一人民医院宝山分院呼吸科, 上海 200940)

**摘要:**目的 探讨 NOD 样受体热蛋白结构相关蛋白 3(NLRP3)炎症小体在慢性阻塞性肺疾病(COPD)模型中的变化及意义。方法 将 30 只雄性大鼠随机分为 2 组, 正常对照组( $n=10$  只)给予自由饮水和摄食, 喂养 75 天; 吸烟组( $n=20$  只)采用单纯吸入香烟烟雾的方法制造大鼠 COPD 模型, 连续 75 天后再根据大鼠最大呼气流速(PEF)及气道肺组织病理变化分为吸烟 COPD 组( $n=9$  只)和吸烟非 COPD 组( $n=11$  只)。收集支气管肺泡灌洗液(BALF)计算巨噬细胞(AMC)、中性粒细胞(NEU)和淋巴细胞(LYM)的绝对计数。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)、逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术分别测定 BALF, 肺组织中 NLRP3 炎症小体的浓度以及 NLRP3 mRNA 的相对表达量。结果 与正常对照组比较, 吸烟非 COPD 组、吸烟 COPD 组 BALF 中 NEU( $\times 10^6/L$ )( $524.2 \pm 73.1, 916.9 \pm 84.8$  vs  $106.6 \pm 31.8$ ), AMC( $\times 10^6/L$ )( $1570.9 \pm 273.5, 2307.8 \pm 410.4$  vs  $496.6 \pm 61.7$ )和 LYM( $\times 10^6/L$ )( $72.1 \pm 14.7, 115.4 \pm 23.8$  vs  $21.6 \pm 4.2$ ), 计数明显升高, 吸烟 COPD 组 BALF 中 NEU, AMC 和 LYM 计数亦较吸烟非 COPD 组明显升高( $F=350.59, 100.57, 82.63$ , 均  $P<0.05$ )。与正常对照组比较, 吸烟非 COPD 组、吸烟 COPD 组 BALF(pg/ml)( $107.8 \pm 23.5, 126.7 \pm 34.9$  vs  $76.7 \pm 15.1$ ), 肺组织(pg/ml)( $118.8 \pm 33.3, 147.4 \pm 40.2$  vs  $84.1 \pm 21.5$ )中 NLRP3 炎症小体的浓度明显升高, 与吸烟非 COPD 组比较, 吸烟 COPD 组 BALF, 肺组织中 NLRP3 炎症小体的浓度亦明显升高( $F=9.53, 9.17$ , 均  $P<0.05$ )。吸烟非 COPD 组和吸烟 COPD 组肺组织 NLRP3 mRNA 相对表达量均显著高于正常对照组( $P<0.05$ ), 吸烟 COPD 组肺组织 NLRP3 mRNA 相对表达量显著高于吸烟非 COPD 组( $P<0.05$ )。BALF, 肺组织中 NLRP3 炎症小体浓度、肺组织 NLRP3 mRNA 相对表达量与 NEU, AMC, LYM 计数均呈显著正相关( $P<0.05$ )。结论 NLRP3 炎症小体参与了 COPD 慢性炎症的发生、发展, 与肺组织炎症细胞以及气道病理改变密切相关, 阻断 NLRP3 炎症小体的活化, 有望成为治疗 COPD 新的靶点和方向。

**关键词:** NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 炎症小体; 慢性阻塞性肺疾病; 大鼠 COPD 模型

**中图分类号:** R563; R-332 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2018)06-069-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2018.06.018

## Changes and Significance of NLRP3 Inflammasome in the Rats Model of Chronic Obstructive Pulmonary Disease(COPD)

YANG Wen-lin, GU Hui-ling, NI Hong-yan, WANG Hai-feng

(Department of Respiratory,

Baoshan Branch of Shanghai First People's Hospital, Shanghai 200940, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the changes and significance of NLRP3 inflammasome in the rats of chronic obstructive pulmonary disease(COPD). **Methods** 30 male rats were divided randomly into two groups. Control group ( $n=10$ ) was given with drink and eat freely for 75 days. Smoking group ( $n=20$ ) was given with inhaling cigarette smoke to establish rat model of COPD. After 75 days, the rats in smoking group were divided into smoking COPD group ( $n=9$ ) and smoking non-COPD group ( $n=11$ ) according to the maximum expiratory velocity (PEF) and pathologic changes of airway lung tissue. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected to calculate the count of macrophages (AMC), neutrophils (NEU), and lymphocyte (LYM). Enzyme-linked immunosorbent (ELISA), reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the NLRP3 inflammasome in BALF and lung tissue, and the relative expression of NLRP3mRNA. **Results** Compared with control group, the count of NEU ( $\times 10^6/L$ )( $524.2 \pm 73.1, 916.9 \pm 84.8$  vs  $106.6 \pm 31.8$ ), AMC( $\times 10^6/L$ )( $1570.9 \pm 273.5, 2307.8 \pm 410.4$  vs  $496.6 \pm 61.7$ ) and LYM( $\times 10^6/L$ )( $72.1 \pm 14.7, 115.4 \pm 23.8$  vs  $21.6 \pm 4.2$ ) in BALF of smoking COPD group and smoking non-COPD group were increased significantly, these indicators were also increased significantly in smoking COPD group compared with smoking non-COPD groups ( $F=350.59, 100.57$  and  $82.63$ , all  $P<0.05$ ). Compared with control group, the count of NEU, AMC, LYM in BALF of smoking COPD group and smoking non-COPD group were increased significantly, these indicators were also increased significantly in smoking COPD group compared with smoking non-COPD groups ( $P<0.05$ ). Compared with control group, the concentration of NLRP3 inflammasome in BALF (pg/ml)( $107.8 \pm 23.5, 126.7 \pm 34.9$  vs  $76.7 \pm 15.1$ ), lung tissue ( $118.8 \pm 33.3$  pg/ml,  $147.4 \pm 40.2$  pg/ml vs  $84.1 \pm 21.5$  pg/ml) of smoking COPD group and smoking non-COPD group was increased significantly, and these in-

\* 基金项目:上海市宝山区科学技术委员会(编号:14-E-12)。

作者简介:杨文林(1968—),男,本科,副主任医师,研究方向:哮喘,肺部感染,肺癌等,E-mail:yangwen19684@sina.com。

dicators were also increased significantly in smoking COPD group compared with smoking non-COPD groups ( $F=9.53, 9.17, \text{all } P<0.05$ ). The NLRP3 mRNA relative expression in lung tissue of smoking COPD group and smoking non-COPD group was significantly lower than that of control group, and the NLRP3 mRNA relative expression in lung tissue of smoking COPD group was significantly lower than that of smoking non-COPD group ( $P<0.05$ ). The concentration of NLRP3 inflammasome in BALF, lung tissue, and NLRP3 mRNA relative expression in lung tissue were significantly positive correlated with NEU, AMC and LYM count ( $P<0.05$ ). **Conclusion** NLRP3 inflammasome involves in the occurrence and development of chronic inflammation of COPD, and closely related with inflammation cells of lung tissue and airway pathologic change, blocking the activation of NLRP3 inflammasome is expected to be as a new target and direction in the treatment of COPD.

**Keywords:** NLRP3 inflammasome; chronic obstructive pulmonary disease; rat model of chronic obstructive pulmonary disease

慢性阻塞性肺疾病(COPD)作为一种常见的呼吸系统疾病,患病率高,死亡率高,已成为一种公共卫生问题。流行病学数据显示,若不能及时采取有效措施,在未来20年内,包括COPD在内的慢性疾病所致疾病负担将超过50%,严重影响患者的生活质量<sup>[1]</sup>。COPD的发病机制尚未完全阐明,且无特殊有效的治疗方法。从本质上讲,COPD是由Th1因子介导,巨噬细胞、中性粒细胞,CD8<sup>+</sup>T细胞等多种炎性介质共同参与的气道、肺血管及肺实质慢性炎症反应,其发生与免疫反应细胞及其炎症介质、细胞因子和黏附分子密切相关<sup>[2]</sup>。近年来,NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)炎症小体作为固有免疫系统的一种模式识别受体,与自身免疫疾病和感染性疾病的关系愈发引起关注<sup>[3,4]</sup>,但关于其在COPD的发生发展中的作用尚未明确。本研究通过建立COPD大鼠模型,分析NLRP3炎症小体在动物模型肺组织中的表达水平,探讨COPD的发病机制,为COPD的治疗提供新的思路和途径。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 Wistar健康雄性大鼠30只,鼠龄12周,体重 $200\pm 20$ g,由第二军医大学实验动物中心提供,在清洁的二级动物房中饲养。

1.2 试剂和仪器 大前门牌香烟(上海卷烟厂);Trizol(美国Invitrogen公司);Prime Script<sup>TM</sup> RT Reagent Kit;ELISA试剂盒(美国Blue Gene公司);ABI 7300型荧光定量PCR仪(Applied Biosystems公司)。

## 1.3 方法

1.3.1 分组及建立COPD大鼠模型:按随机数字表法分为吸烟组( $n=20$ )和正常对照组( $n=10$ )。吸烟组大鼠自实验第2天起置于自制箱( $120\text{ cm}\times 80\text{ cm}\times 80\text{ cm}$ )内进行被动吸大前门牌香烟(焦油含量23 mg/支上海卷烟厂),每天3次,第1天8支/次,第2,3天10支/次,第4天后15支/次,每次持续30 min,3次之间间隔至少3 h,连续75天。实验动物操作过程均遵照医院动物伦理委员会规程进行。选模后根据大鼠最大呼气流速(PEF)及

气道肺组织病理变化分为吸烟COPD组( $n=9$ )和吸烟非COPD组( $n=11$ )。正常对照组大鼠自由饮水和摄食,喂养75天。

## 1.3.2 检测指标

1.3.2.1 支气管肺泡灌洗液(BALF)收集:大鼠采用1 g/dl戊巴比妥钠腹腔内麻醉(33 mg/kg)。纵向剪开颈胸部皮肤和肌肉,暴露气管和双肺。在气管下部做横行切口,夹闭右主支气管,通过硅胶管用注射器从气管缓缓注入无菌生理盐水3 ml灌洗左肺,每次注入后立即轻柔回吸得BALF,重复3次。灌洗液纱布过滤,回收率为80%~90%。将BALF离心( $4^{\circ}\text{C}, 2000\text{ r/min}, 10\text{ min}$ ),细胞沉淀重新混悬于PBS液并制作4张细胞涂片,Wright-Giemsa染色做细胞计数和分类计数(至少计数200个细胞),计算巨噬细胞(AMC)、中性粒细胞(NEU)和淋巴细胞(LYM)的绝对计数。

1.3.2.2 NLRP3炎症小体浓度的检测:应用人隐热蛋白NLRP3炎症小体的检测试剂盒,严格按说明书用酶联免疫吸附试验(ELISA)分别测定BALF,肺组织中NLRP3炎症小体的浓度。

1.3.3 肺组织内NLRP3炎症小体mRNA表达的检测:采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术,依照试剂盒说明书操作。按照Trizol-氯仿抽提法提取细胞总RNA,经MMLV酶逆转录得到cDNA模板,采用NLRP3炎症小体与 $\beta$ -actin二对引物在同一反应体系中进行PCR。通过基因库查找基因序列,引物设计使用Primer Premier 5软件。

1.4 统计学分析 采用SPSS13.0版统计软件包。计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,组间多重比较建议用SNK-q检验,采用Spearman秩相关进行相关性分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组BALF中细胞分类计数结果比较 见表1。各组BALF中NEU,AMC,LYM计数比较,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ )。与正常对照组比较,吸烟非COPD组、吸烟COPD组BALF

中 NEU, AMC, LYM 计数明显升高, 与吸烟非 COPD 组比较, 吸烟 COPD 组 BALF 中 NEU,

AMC, LYM 计数亦明显升高, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。

表 1

各组细胞分类计数结果比较 ( $\bar{x} \pm s, \times 10^6/L$ )

指标	正常对照组 ( $n=10$ )	吸烟非 COPD 组 ( $n=11$ )	吸烟 COPD 组 ( $n=9$ )	F	P
NEU	106.6 $\pm$ 31.8	524.2 $\pm$ 73.1	916.9 $\pm$ 84.8	350.59	<0.05
AMC	496.6 $\pm$ 61.7	1 570.9 $\pm$ 273.5	2 307.8 $\pm$ 410.4	100.57	<0.05
LYM	21.6 $\pm$ 4.2	72.1 $\pm$ 14.7	115.4 $\pm$ 23.8	82.63	<0.05

2.2 各组 BALF, 肺组织中 NLRP3 炎症小体的浓度及肺组织 NLRP3 mRNA 相对表达量比较 见表 2。各组 BALF, 肺组织中 NLRP3 炎症小体的浓度比较, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。与正常对照组比较, 吸烟非 COPD 组、吸烟 COPD 组 BALF, 肺组织中 NLRP3 炎症小体的浓度明显升高, 与吸烟非 COPD 组比较, 吸烟 COPD 组

BALF, 肺组织中 NLRP3 炎症小体的浓度亦明显升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。吸烟非 COPD 组和吸烟 COPD 组肺组织 NLRP3 mRNA 相对表达量均显著高于正常对照组 ( $P < 0.05$ )。吸烟 COPD 组肺组织 NLRP3 mRNA 相对表达量显著高于吸烟非 COPD 组 ( $P < 0.05$ )。

表 2

各组 BALF, 肺组织中 NLRP3 炎症小体的浓度及肺组织 NLRP3 mRNA 相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	正常对照组 ( $n=10$ )	吸烟非 COPD 组 ( $n=11$ )	吸烟 COPD 组 ( $n=9$ )	F	P
BALF (pg/ml)	76.7 $\pm$ 15.1	107.8 $\pm$ 23.5	126.7 $\pm$ 34.9	9.53	<0.05
肺组织 (pg/ml)	84.1 $\pm$ 21.5	118.8 $\pm$ 33.3	147.4 $\pm$ 40.2	9.17	<0.05
NLRP3 mRNA	1.07 $\pm$ 0.14	4.28 $\pm$ 0.51	7.17 $\pm$ 1.28	150.41	<0.05

2.3 NLRP3 炎症小体的表达与细胞分类计数的相关性 见表 3。Spearman 秩相关性分析显示, BALF, 肺组织中 NLRP3 炎症小体浓度、肺组织 NLRP3 mRNA 相对表达量与 NEU, AMC, LYM 计数均呈显著正相关 ( $P < 0.05$ )。

表 3 NLRP3 炎症小体的表达与细胞分类计数的相关性 ( $r$ )

指标	NLRP3 炎症小体浓度		NLRP3 mRNA 相对表达量
	BALF	肺组织	
NEU	0.474	0.407	0.454
AMC	0.491	0.434	0.483
LYM	0.373	0.356	0.394

3 讨论 目前研究认为, 气道与肺部的慢性炎症是导致 COPD 发生、发展的重要机制, 但诱发炎症产生并大量扩散的机制尚不十分清楚<sup>[5]</sup>。NLRP3 炎症小体是近年来研究最多的一种炎症小体, 属于机体固有免疫的一部分, 激活后可参与对外来病原体 (细菌、病毒) 的抵抗<sup>[6,7]</sup>。呼吸系统疾病的研究中发现炎症小体异常激活导致与疾病相关的慢性炎症的发生, 在感染所致病原相关分子模式的信号刺激、氧化应激所致损伤相关分子模式的信号刺激下, 机体炎性小体信号分子被激活, 促进配体与 NLRP3 结合并形成 NLRP3 炎性小体, 进而诱导

白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-18 等大量炎性介质释放<sup>[8,9]</sup>。Mankan 等<sup>[10]</sup>研究表明, 小鼠中性粒细胞通过活化的 NLRP3 炎性小体分泌白细胞介素, 其研究中检测到 IL-1 $\beta$  和 IL-18 分泌增加。因此, 学者推测 NLRP3 炎性小体可能参与了 COPD 的发生、发展过程, 但国内外关于 NLRP3 炎性小体在 COPD 的 BALF, 肺组织等标本中表达水平及临床意义的研究仍较为少见。

本研究采用单纯香烟熏吸法成功建立 COPD 大鼠模型, BALF 中炎症细胞计数与分类对于反映气道炎症具有重要意义。本研究结果显示, 吸烟非 COPD 组、吸烟 COPD 组大鼠 BALF 中 NEU, AMC 和 LYM 计数明显高于对照组, 且 COPD 模型较非 COPD 模型大鼠 BALF 中 NEU, AMC 和 LYM 计数亦明显升高 ( $P < 0.05$ )。香烟烟雾导致炎性细胞聚集于气道, 一方面释放蛋白酶类和氧自由基, 另一方面抑制抗蛋白酶类活性, 从而破坏蛋白酶与抗蛋白酶的平衡, 不断加重 COPD 相关肺损伤。冯一等<sup>[11]</sup>研究结果发现, 在烟雾刺激下, NEU, AMC 和 LYM 被大量诱导活化, 大量蛋白酶类过度释放, 参与了气道壁及肺泡壁结构的炎症、破坏及重塑等气道病理改变, 最终导致 COPD 的发生。钟琳晔等<sup>[12]</sup>研究认为, NLRP3 可能对肺泡巨噬细胞具有刺激作用, 促进其合成和分泌基质

金属蛋白酶-9(MMP-9),刺激气道上皮细胞合成细胞外基质糖蛋白,参与 COPD 的发生发展。

ELISA 分析结果发现,与正常对照组比较,吸烟非 COPD 组、吸烟 COPD 组 BALF,肺组织中 NLRP3 炎症小体的浓度明显升高,与吸烟非 COPD 组比较,吸烟 COPD 组 BALF,肺组织中 NLRP3 炎症小体的浓度亦明显升高( $P<0.05$ )。对肺组织的 RT-PCR 检测结果也得到相似的结论,COPD 模型大鼠肺组织 NLRP3 mRNA 相对表达量显著升高( $P<0.05$ ),进一步证实了 NLRP3 炎症小体作为一种肺组织特异性表达的炎症介质,可能参与了 COPD 病情的发生与发展,其机制可能与引起 NEU,AMC,LYM 等炎症细胞浸润以及炎性介质分泌有关<sup>[13,14]</sup>。此外,NEU,AMC 和 LYM 计数与 BALF,肺组织中 NLRP3 炎症小体浓度、肺组织 NLRP3 mRNA 相对表达量均呈显著正相关( $P<0.05$ )。由此可见,NEU,AMC 和 LYM 计数在气道内的聚集可导致 NLRP3 水平的升高<sup>[15]</sup>。

综上所述,香烟熏吸可诱发大鼠 COPD,而 NLRP3 炎症小体在 COPD 的慢性炎症的发生、发展中发挥着重要作用,与肺组织炎性细胞以及气道病理改变密切相关,阻断 NLRP3 炎症小体的活化有望成为治疗 COPD 新的靶点和方向。

#### 参考文献:

- [1] Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (Updated 2014) [EB/OL]. [http://www. goldcopd. org/Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease](http://www.goldcopd.org/Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease).
- [2] Crim C, Dransfield MT, Bourbeau J, et al. Pneumonia risk with inhaled fluticasone furoate and vilanterol compared with vilanterol alone in patients with COPD[J]. *Ann Am Thorac Soc*, 2015, 12(1): 27-34.
- [3] Zheng F, Xing SS, Gong ZS, et al. Silence of NLRP3 suppresses atherosclerosis and stabilizes plaques in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Mediators Inflamm*, 2014, 2014(1): 507208.
- [4] Wang HY, Lü C, Wang S, et al. NLRP3 inflammasome involves in the acute exacerbation of patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Inflammation*, 2018, 11(6): 1-13.
- [5] 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.  
Xie YY, Yang DF. Study on the expressions of TLR2, TLR4 in peripheral blood mononuclear cells and its correlation with the inflammatory factors levels of the elderly patients with COPD[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2015, 30(4): 80-83, 86.
- [6] Howrylak JA, Nakahira K. Inflammasomes: key mediators of lung immunity[J]. *Annu Rev Physiol*, 2017, 79(12): 471-494.
- [7] Faner R, Sobradillo P, Noguera A, et al. The inflammasome pathway in stable COPD and acute exacerbations[J]. *ERJ Open Res*, 2016, 2(3): 2010-2016.
- [8] Di Stefano A, Caramori G, Barczyk A, et al. Innate immunity but not NLRP3 inflammasome activation correlates with severity of stable COPD[J]. *Thorax*, 2014, 69(6): 516-524.
- [9] 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.  
Ma Q, Wu ZQ, Yang PX, et al. Expression and clinical significance of interleukin in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2016, 36(17): 4266-4267.
- [10] Mankan AK, Dau T, Jenne D, et al. The NLRP3/ASC/Caspase-1 axis regulates IL-1 $\beta$  processing in neutrophils[J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(3): 710-715.
- [11] 冯一, 陈丽, 李红, 等. FIZZ1 在吸烟大鼠 COPD 模型肺组织的表达及与气道炎症的相关性研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(6): 1101-1108.  
Feng Y, Chen L, Li H, et al. Expression of FIZZ1 on lung tissue of cigarette smoking-induced COPD rats and its relationship with airway inflammation[J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2018, 34(6): 1101-1105.
- [12] 钟琳晔, 杨汀. NLRP3 炎症小体及其激活产物在慢性阻塞性肺疾病中的作用研究进展[J]. *国际呼吸杂志*, 2013, 33(15): 1182-1187.  
Zhong LY, Yang T. Research advance of the role of the NLRP3 inflammasome and its products in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Int J Respir*, 2013, 33(15): 1182-1187.
- [13] Faustin B, Reed JC. Reconstituting the NLRP1 inflammasome in vitro[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1040(12): 137-152.
- [14] 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.
- [15] Westwell-Roper C, Dunne A, Kim ML, et al. Activating the NLRP3 inflammasome using the amyloidogenic peptide IAPP[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1040(2): 9-18.

收稿日期: 2018-09-26

修回日期: 2018-10-01