

## 基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003471

## NLRP6 基因敲除对小鼠生长繁育和实质器官的影响

穆青蓝<sup>1</sup>, 孟唱唱<sup>2</sup>, 陈诗钰<sup>3</sup>, 何 琪<sup>1</sup>

(1.重庆医科大学基础医学院病理生理学教研室, 重庆 400016; 2.遵义医科大学珠海校区, 珠海 519041;

3.重庆医科大学基础医学院病理教研室, 重庆 400016)

**【摘要】目的:** NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白6(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 6, NLRP6)是新发现的寡聚化核苷酸结合结构域样受体家族成员, 广泛表达于肠道、肝脏、肾脏、脾脏和肌肉等组织器官, 在炎症、焦亡和自噬等多种生物过程发挥广泛的调节作用。近期研究表明, NLRP6在应激条件下对多种组织器官的疾病表型具有重要影响。然而, NLRP6对组织器官生长发育的影响尚未可知。**方法:** 采用CRISPR/Cas9基因编辑技术构建NLRP6基因敲除小鼠, 饲养并记录小鼠的生长和繁殖情况。将小鼠的脾、肝、心、肾、脑、四肢和后背皮肤等组织器官进行解剖和切片染色, 以评估NLRP6基因敲除对实质器官的宏观发育影响和对组织结构的微观影响。**结果:** 在自然状态下, NLRP6基因敲除缩短了雄鼠的性成熟期并使成年雄鼠的睾丸发生不可逆的破溃与萎缩。在四肢发育上, NLRP6基因敲除诱导成年雄鼠后肢横纹肌断裂, 导致后肢明显萎缩。在脾脏发育上, NLRP6基因敲除不仅显著增加了雄鼠的脾脏体积( $P<0.01$ )还诱导雄鼠脾脏出现炎性细胞浸润。在后背皮肤上, NLRP6基因敲除引发雄鼠后背皮肤出现明显的溃疡损伤、胶原纤维增生和炎性细胞浸润。**结论:** 在自然生长发育条件下, NLRP6基因敲除选择性影响小鼠的生殖器发育与性成熟期、后肢肌肉发育、脾脏大小及其炎症免疫状态以及后背皮肤的结构完整性, 而且这一作用具有明显的雄激素依赖性。

**【关键词】** NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白6; 生长发育; 睾丸; 后肢; 脾脏; 后背皮肤

**【中图分类号】** R363.1

**【文献标志码】** A

**【收稿日期】** 2024-03-10

## Effect of NLRP6 gene knockout on growth and reproduction and parenchymal organs in mice

Mu Qinglan<sup>1</sup>, Meng Changchang<sup>2</sup>, Chen Shiyu<sup>3</sup>, He Qi<sup>1</sup>

(1.Department of Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University;

2.Zhuhai Campus of Zunyi Medical University; 3.Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences,

Chongqing Medical University)

**【Abstract】Objective:** NLRP6 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 6), a recently identified member of the nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors family, is abundantly expressed in the intestine, liver, kidney, spleen, muscle, and other tissues or organs, playing a regulatory role in various biological processes such as inflammation, pyroptosis, and autophagy. Recently, NLRP6 was reported to exert a significant impact on the disease phenotypes of various tissues and organs under stress conditions. However, the role of NLRP6 in the growth and development of tissues and organs in a natural state remains unclear. **Methods:** A mouse model of NLRP6 gene knockout was established using CRISPR/Cas9 gene editing technique. The mice were raised and observed for their growth and reproduction. The spleen, liver, heart, kidney, brain, limbs, and dorsal skin of the mice were dissected, sectioned, and stained to evaluate the effect of NLRP6 gene knockout on the macroscopic development of parenchymal organs and microscopic tissue structure. **Results:** In the natural state, NLRP6 knockout shortened the sexual maturity in male mice, resulting in irreversible ulceration and atrophy of the testicles in adult male mice. NLRP6 gene knockout led to the rupture of striated muscle in the hindlimbs in adult male mice, resulting in obvious atrophy of the hindlimbs. NLRP6 gene knockout not only significantly increased the volume of the spleen ( $P<0.01$ ) but also induced inflammatory cell infiltration in male mice. NLRP6 gene knockout caused significant ulcerous damage, collagen fiber proliferation, and inflam-

**作者介绍:** 穆青蓝, Email: muqinglan@stu.cqmu.edu.cn,

研究方向: 固有免疫炎症反应。

**通信作者:** 何 琪, Email: heqi191045@cqmu.edu.cn。

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(编号: 8207051351); 国家自然科学基金青年基金资助项目(编号: 82302474); 重庆市博士后科学基金资助项目(编号: CSTB2022NSCQ-BHX0629)。

**优先出版:** <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240418.1459.022>

(2024-04-22)

resulting in irreversible ulceration and atrophy of the testicles in adult male mice. NLRP6 gene knockout led to the rupture of striated muscle in the hindlimbs in adult male mice, resulting in obvious atrophy of the hindlimbs. NLRP6 gene knockout not only significantly increased the volume of the spleen ( $P<0.01$ ) but also induced inflammatory cell infiltration in male mice. NLRP6 gene knockout caused significant ulcerous damage, collagen fiber proliferation, and inflam-

matory cell infiltration in the dorsal skin in male mice. **Conclusion:** In the natural condition of growth and development, NLRP6 gene knockout selectively affects genital development and sexual maturity, hindlimb muscle development, the size and immune response of the spleen, and the structural integrity of the dorsal skin in mice. This effect is significantly androgen-dependent.

**[Key words]** NLRP6; growth and development; testicle; hindlimb; spleen; dorsal skin

寡聚化核苷酸结合结构域样受体(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor proteins, NLRs)是一种多结构域蛋白家族,分布于细胞质,可以识别病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)或损伤相关分子模式(damage-associated molecular patterns, DAMPs)等损伤信号,参与先天免疫应答反应,在固有免疫炎症反应过程中发挥不可或缺的作用<sup>[1]</sup>。此外,NLRs蛋白家族还参与焦亡、凋亡、线粒体自噬和发育等生物过程<sup>[2-3]</sup>。NLRP6是新发现的NLRs家族成员,由N端的吡啶(pyrin domain, PYD)、中心的核苷酸结合寡聚结构域(nucleoside triphosphatase domain, NACTH)结构域和C端的富含亮氨酸的重复序列(leucine-rich repeat, LRR)组成<sup>[4]</sup>。在损伤信号刺激下,NLRP6被激活并以炎症小体形式调节炎症反应<sup>[4-5]</sup>;NLRP6的PYD结构域与凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)相互作用并形成寡聚体,引发 Pro-caspase-1的裂解与活化,随后促进IL-1 $\beta$ 和IL-18的成熟与分泌,加强炎症反应。例如,在RNA病毒感染的肠上皮细胞中,NLRP6通过其NACTH结构域与RNA解旋酶DHX15结合,促进NLRP6与ASC的相互作用,诱导NLRP6炎症小体的组装以及IL-18的成熟,增强炎症反应,从而抑制RNA病毒的复制<sup>[6]</sup>。此外,NLRP6也能以蛋白单体形式调节炎症反应。例如,在类风湿性关节炎中,NLRP6不仅直接抑制NF- $\kappa$ B的转录活性还能间接通过促进关键激活蛋白TAB2/3的溶酶体降解而阻断NF- $\kappa$ B的激活,从而减少促炎细胞因子和基质金属蛋白酶的产生,抑制炎症反应<sup>[7]</sup>。在外周坐骨神经损伤中,NLRP6的敲除上调ERK的磷酸化水平,增强炎症反应,而且这一过程不依赖ASC和Caspase-1<sup>[8]</sup>。由此可见,NLRP6在不同的应激条件下能以不同的方式对炎症反应发挥不同的调节作用。

NLRP6广泛表达于肠道、肝脏、肾脏、脾脏和肌肉等组织器官,在应激条件下对疾病表型具有重要

影响。在小鼠结肠炎模型中,敲除NLRP6能够增加炎症易感性,促进炎症细胞浸润和促炎介质的产生,导致广泛的肠道上皮损伤并延迟上皮屏障恢复<sup>[9]</sup>。在酒精性肝炎中,NLRP6不仅减轻肝细胞的脂肪变性和炎症反应,还通过抑制肝星状细胞的活化减轻肝组织纤维化,发挥肝脏保护作用<sup>[10]</sup>。在急性肾损伤中,NLRP6的下调能够增强肾组织的炎症细胞浸润,加重肾细胞死亡率和肾组织纤维化<sup>[11-12]</sup>。由此可知,NLRP6对多种组织器官的疾病表型具有重要影响。然而,在自然条件下,NLRP6对组织器官生长发育的影响尚未可知。因此,在本实验中,本课题组应用CRISPR/Cas9技术构建NLRP6基因敲除小鼠,对其进行基因型鉴定和饲养繁殖,解剖并观察小鼠的脾、肝、心、肾、脑、四肢和后背皮肤等组织器官,以评估NLRP6基因敲除对实质器官的宏观发育影响和对组织结构的微观影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 25~47日龄(3~7周龄)SPF级C57BL/6N的NLRP6基因敲除纯合子(NLRP6<sup>-/-</sup>)小鼠共15只,9雌6雄,体重约为11~20g左右,购自赛业(苏州)生物科技有限公司【SCXK(苏)2018-0003】。4~5周龄SPF级C57BL/6N的野生型(WT)小鼠数量共20只,10雌10雄,体重约为12~18g左右,购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】。实验动物饲养于重庆医科大学动物实验中心【SYXK(渝)2022-0016】。饲养期间各组小鼠自由饮水,饲喂普通维持饲料由重庆医科大学实验动物中心【SCXK(渝)2022-0010】提供。SPF级标准饲养:温度(23 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C,相对湿度(50 $\pm$ 15)%,12h昼夜循环照明,笼子垫料等物品均进行高压真空灭菌,饲料进行消毒,小鼠自由进食;小鼠自由饮水,饮用水达到纯净无菌要求。所有操作均符合实验动物伦理学要求(审批号:IACUC-4th Hos Hebmu-1018001)。

1.1.2 主要试剂与仪器 鼠尾基因鉴定试剂盒(碧云天生物科技公司,D7283M,中国),引物合成(擎科生物,中国),蛋白酶K(天根生物,RT403,中国),核酸染料(荣达生物科技,中国),2X Taq Master Mix(苏州近岸蛋白质科技,E005-01B,中国),TritonX-100(Thermo Fisher,85111,美国),100 bp DNA

ladder(天根生物,MD109,中国),BSA(鼎国生物,中国),琼脂糖(天根生物,RT101,中国),PCR 扩增仪(百乐科技,中国),凝胶电泳仪(BIO-RAD,1704469,美国),凝胶成像仪(广州光仪生物科技有限公司,01100,中国),轮转式石蜡切片机(瑞沃德,S700A,中国),苏木精伊红(HE)染色试剂盒(索莱宝生物科技有限公司,G1120,中国),Masson 三色液试剂盒(塞维尔生物科技有限公司,G1006,中国),全自动数字病理扫描分析系统(江丰生物,KFPRO-002,中国),显微镜(江丰生物,KF-FL-020,中国)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠的饲养与繁殖 在 SPF 级条件下分别饲养 NLRP6<sup>-/-</sup>小鼠和 WT 小鼠;分别选取 6~8 周龄、体质量 20 g 左右的 NLRP6<sup>-/-</sup>小鼠(雄性和雌性)或 WT 小鼠(雄性和雌性)随机按照 2:1 方式合笼繁殖,根据小鼠产仔率高低,配 2~5 笼延续保种,留 6 只以上雌雄小鼠替换繁殖;待 NLRP6<sup>-/-</sup>新生小鼠与 WT 新生小鼠长至 3~4 周龄,随机按照每笼 5:1 方式剪鼠尾基因鉴定。

1.2.2 引物设计 NLRP6 引物和 GAPDH 引物由擎科生物公司合成,引物序列见表 1。

1.2.3 小鼠基因型鉴定 (1)小鼠基因组 DNA 提取。①获取组织样本:小鼠断奶后,剪取尾尖长度 2~3 mm 的组织,置于 1.5 mL EP 管,在冰上暂时保存;②消化组织样本:配制消化液时,把 DNA Extraction Solution 和蛋白酶 K 充分混匀(现配现用、尽快使用)。配置好 100  $\mu$ L 的消化液,使鼠尾完全浸没在消化液中,金属浴 55  $^{\circ}$ C 敷 15 min;③灭活组织样本中蛋白酶:进一步金属浴 95  $^{\circ}$ C 敷 5 min,使蛋白酶 K 高温下降解;④终止消化组织样本:加入 100  $\mu$ L 的 Stop solution,涡旋混匀,即可得到基因组 DNA 产物并测定 DNA 产物浓度。(2)小鼠基因型鉴定。PCR 反应体系(20  $\mu$ L):灭菌双蒸水 7.4  $\mu$ L,基因组 DNA 模板 1.0  $\mu$ L(200 ng/ $\mu$ L),引物 NLRP6-F<sub>1</sub> 0.8  $\mu$ L(10  $\mu$ mol/L)、NLRP6-R<sub>1</sub> 0.8  $\mu$ L(10  $\mu$ mol/L),引物 GAPDH-F 0.8  $\mu$ L(10  $\mu$ mol/L)、GAPDH-R 0.8  $\mu$ L(10  $\mu$ mol/L),Easy-Load<sup>TM</sup> PCR Master Mix (Green, 2 $\times$ ) 10.0  $\mu$ L。PCR 反应条件:起始变性 94  $^{\circ}$ C 3 min;变性 94  $^{\circ}$ C 30 s,退火 58  $^{\circ}$ C 30 s,延伸 72  $^{\circ}$ C 50 s,循环 30 次;最终延伸 72  $^{\circ}$ C 10 min;保持 4  $^{\circ}$ C。(3)PCR 产物鉴定。取 PCR 扩增后的 DNA 样本 10  $\mu$ L,在 2% 琼脂糖凝胶中以 120V 的电压电泳 30 min 后在凝胶成像分析系统中观察,最后琼脂糖凝胶上 PCR 条带显示: NLRP6 引物扩增产物长度为 594 bp, NLRP6<sup>-/-</sup>小鼠在该位置

无条带表示小鼠为纯合的 NLRP6 基因敲除小鼠,WT 小鼠在该位置有条带表示小鼠存在 NLRP6 基因。GAPDH 引物扩增产物长度为 299 bp。理论与实验结果一致。

1.2.4 观察小鼠生长情况 ①经基因鉴定确定 NLRP6<sup>-/-</sup>小鼠为纯合的基因敲除小鼠后,把 NLRP6<sup>-/-</sup>雌鼠和雄鼠随机按照 2:1 方式合笼繁殖;②待 NLRP6<sup>-/-</sup>雌鼠和雄鼠生产的幼鼠长至 10 g 左右,分别对其幼鼠进行雌雄分笼,并按 SPF 级标准饲养;③观察和记录 NLRP6<sup>-/-</sup>雌鼠和雄鼠的性成熟期:雌鼠阴道口皮肤逐渐变薄,阴道口张开,愿意接触雄鼠;雄鼠睾丸下降,体质量增加;④观察和记录 NLRP6<sup>-/-</sup>雌鼠的妊娠期:将 NLRP6<sup>-/-</sup>雌鼠和雄鼠合笼交配后,第 2 天检查雌鼠是否有阴栓,如果有则发生了交配行为,之后每天观察雌鼠的腹部情况。如果雌鼠腹部隆起时采用摸胎法,当摸到黄豆粒大小的胚胎则代表怀孕,一般小鼠孕后 10~12 d 才可触摸到胎儿;⑤观察和记录 NLRP6<sup>-/-</sup>雌鼠的哺乳期:当幼鼠出生后体重达到 10~13 g 后可脱离哺乳期;⑥观察 WT 雌鼠的性成熟期、妊娠期和哺乳期同上述①~⑤过程一致。同时,观察 WT 雄鼠的性成熟期同上述①~③过程一致。

1.2.5 小鼠样品解剖分离 ①将 8 周龄的 NLRP6<sup>-/-</sup>雄鼠、WT 雄鼠、NLRP6<sup>-/-</sup>雌鼠和 WT 雌鼠脱颈处死,剪开小鼠的胸腔和腹腔,解剖分离后背皮肤、脾、肝、心、肾、脑和小腿后肢肌肉组织;②用预冷的 PBS 冲洗上述实质器官两次并用滤纸擦干水分;将上述实质器官摆放在有标尺的滤纸上拍照;③利用 Image J 软件测量小鼠各器官的面积;④拍照完毕后,将上述实质器官置于 4% 多聚甲醛中固定保存,用于制作石蜡切片。

1.2.6 多组织蜡块制备 ①脱水:将上述固定的组织取出后使用乙醇脱水,具体过程按照 75% 乙醇 12~24 h $\rightarrow$ 90% 乙醇 12 h $\rightarrow$ 95% 乙醇 4 h $\rightarrow$ 100% 乙醇 2 h 进行;②透明:经过脱水处理的组织样本放置于 1:1 的比例混合的无水乙醇和二甲苯中浸泡 20 min $\rightarrow$ 二甲苯 I 中浸泡 15 min $\rightarrow$ 二甲苯 II 中浸泡 15 min;③浸蜡与包埋:将经过透明处理的组织样本转移至 1:1 的比例混合的二甲苯和石蜡的溶液中浸泡 30 min $\rightarrow$ 纯石蜡 I 中浸泡 2~3 h $\rightarrow$ 纯石蜡 II 中 2~3 h $\rightarrow$ 石蜡完全凝固冷却后可切片。

1.2.7 HE 染色 ①将包埋的小鼠后背皮肤、脾、肝、心、肾和脑实质器官蜡块脱蜡切片,切片厚度为 4  $\mu$ m;②利用苏木素伊红(HE)染色试剂盒进行染色:苏木精 13 min;自来水洗 1 min;0.3% 盐酸乙醇分化 1 s;自来水洗 1 min;高压 ddH<sub>2</sub>O 洗 20 min;伊红 5 min;自来水洗 1 min;95% 乙醇 20 s;无水

表 1 小鼠基因型鉴定的引物序列

基因	引物序列(5'-3')	WT 产物大小	NLRP6 产物大小
NLRP6	F1:GGTCAGAAACATCCGATCTCTGC	594 bp	0 bp
	R1:TGAGTGACAACATTCAGCAACAC		
GAPDH	F:CATCCTGACCTATGGCGTAGCAATC	299 bp	299 bp
	R:CTCCTCGTTGTTCTTCGGTAGTGAC		

乙醇 3 次,每次 1 min;二甲苯 3 次,每次 3 min;中性树胶封固。③利用显微镜采集分析观察 NLRP6 基因敲除后对小鼠实质器官免疫炎症性反应的影响。

1.2.8 Masson 染色 将包埋的小鼠后肢组织的脱蜡切片后,利用 Masson 染色试剂盒进行染色(A 液是 2.5% 重铬酸钾媒染剂,B 液与 C 液等体积混合后为 Weigert 铁苏木素染液,D 液是丽春红酸性品红,E 液是 1% 磷钼酸溶液,F 液是 2.5% 苯胺蓝溶液)。将切片在 Masson A 液中室温浸泡过夜;第 2 天将切片浸泡于 Masson A 液于 65 ℃烤箱内孵育 30 min,自来水洗 30 s。同时将 Masson D 液及 Masson F 液放于 65 ℃烤箱内预热;将 Masson B 液与 Masson C 液等体积混合(现配现用),切片入混合液内浸染 1 min,流水稍洗;切片经 1% 盐酸酒精分化 1 min 左右,至细胞核呈灰黑色,背景几乎无色或淡灰色;自来水稍洗,稍稍沥干切片上的多余水分,切片入 Masson D 液浸染 6 min,此时组织呈现亮红色,然后切片经自来水流水冲洗 20 s 左右,至切片上流下的水为无色;切片稍微沥干水分,入 Masson E 液浸泡约 1 min 后稍微沥干,不经水洗,直接入 Masson F 液染色,常规组织一般 2~30 s;切片经连续三缸 1% 冰醋酸水溶液漂洗分化,每缸 7 s 左右,第 3 缸 1% 冰醋酸水溶液漂洗时镜检,避免蓝色过度分化;切片经连续 3 缸无水乙醇依次脱水约 3 s、5 s、5 s。经二甲苯透明 5 min,中性树胶封片后,利用显微镜采集分析观察 NLRP6 基因敲除后对小鼠后肢组织免疫炎症性反应的影响。

### 1.3 统计学方法

数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,每组重复至少 3 次。

所有数据采用 Graph Pad Prism 8 软件分析,多组间比较使用单因素方差分析,2 组间比较使用 *t* 检验,检验水准  $\alpha=0.05$ 。

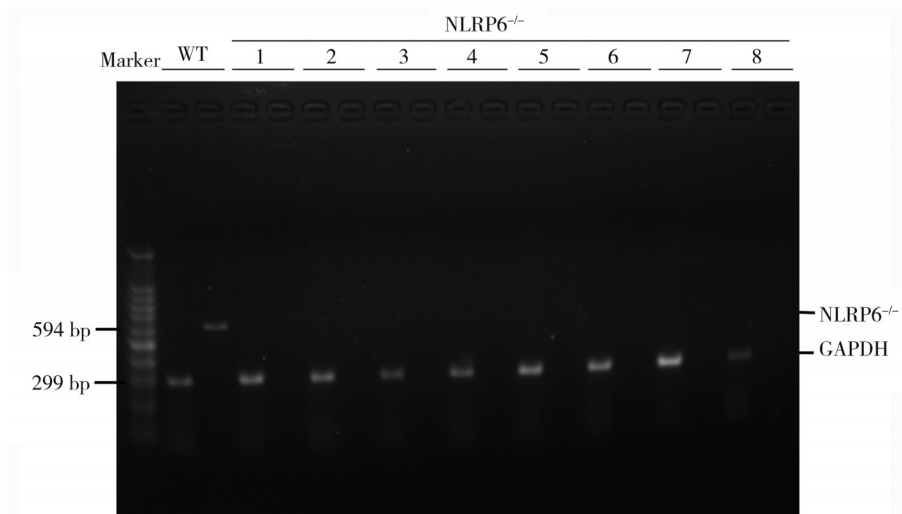
## 2 结果

### 2.1 NLRP6 基因敲除小鼠的构建与基因型鉴定

由赛业(苏州)生物科技有限公司运用 CRISPR/Cas9 技术构建 NLRP6 基因敲除小鼠。使用 PCR 技术鉴定 NLRP6<sup>-/-</sup> 鼠尾基因组 DNA,结果显示:NLRP6<sup>-/-</sup> 小鼠在 594 bp 位置未出现条带,表示该小鼠为纯合的 NLRP6 基因敲除小鼠;WT 小鼠在 594 bp 位置出现条带,表示该小鼠存在 NLRP6 基因;GAPDH 引物扩增产物长度为 299 bp,NLRP6<sup>-/-</sup> 小鼠和 WT 小鼠在该位置均有条带,排除了提取的基因组 DNA 不稳定导致的 NLRP6<sup>-/-</sup> 小鼠在 594 bp 无条带(图 1)。以上结果提示 NLRP6 基因敲除小鼠构建成功。

### 2.2 NLRP6 基因敲除小鼠的繁殖情况

将 NLRP6<sup>-/-</sup> 小鼠或 WT 小鼠分别进行合笼繁殖。观察发现(表 2):WT 雄鼠性成熟期为 45~60 d;与 WT 雄鼠相比,NLRP6<sup>-/-</sup> 雄鼠性成熟期明显缩短,约为 38~40 d。此外,在 WT 雌鼠和 NLRP6<sup>-/-</sup> 雌鼠中,性成熟期均为 60 d 左右;WT 雌鼠妊娠期 22 d 左右,NLRP6<sup>-/-</sup> 雌鼠妊娠期为 21 d 左右;WT 雌鼠和 NLRP6<sup>-/-</sup> 雌鼠的哺乳期均为 21 d 左右。WT 雌鼠在性成熟期、妊娠期和哺乳期 3 个周期无明显差异。



注:图 1 是 NLRP6 基因敲除的琼脂糖凝胶鉴定结果,其中 1~8 是 NLRP6 基因敲除鼠。

图 1 NLRP6 基因敲除小鼠的构建与基因型鉴定

表 2 NLRP6<sup>-/-</sup> 小鼠与 WT 小鼠繁殖情况比较

基因	WT 雄鼠	NLRP6 <sup>-/-</sup> 雄鼠	WT 雌鼠	NLRP6 <sup>-/-</sup> 雌鼠
性成熟期(d)	45~60	38~40	60	60
妊娠期(d)	—	—	22	21
哺乳期(d)	—	—	21	21

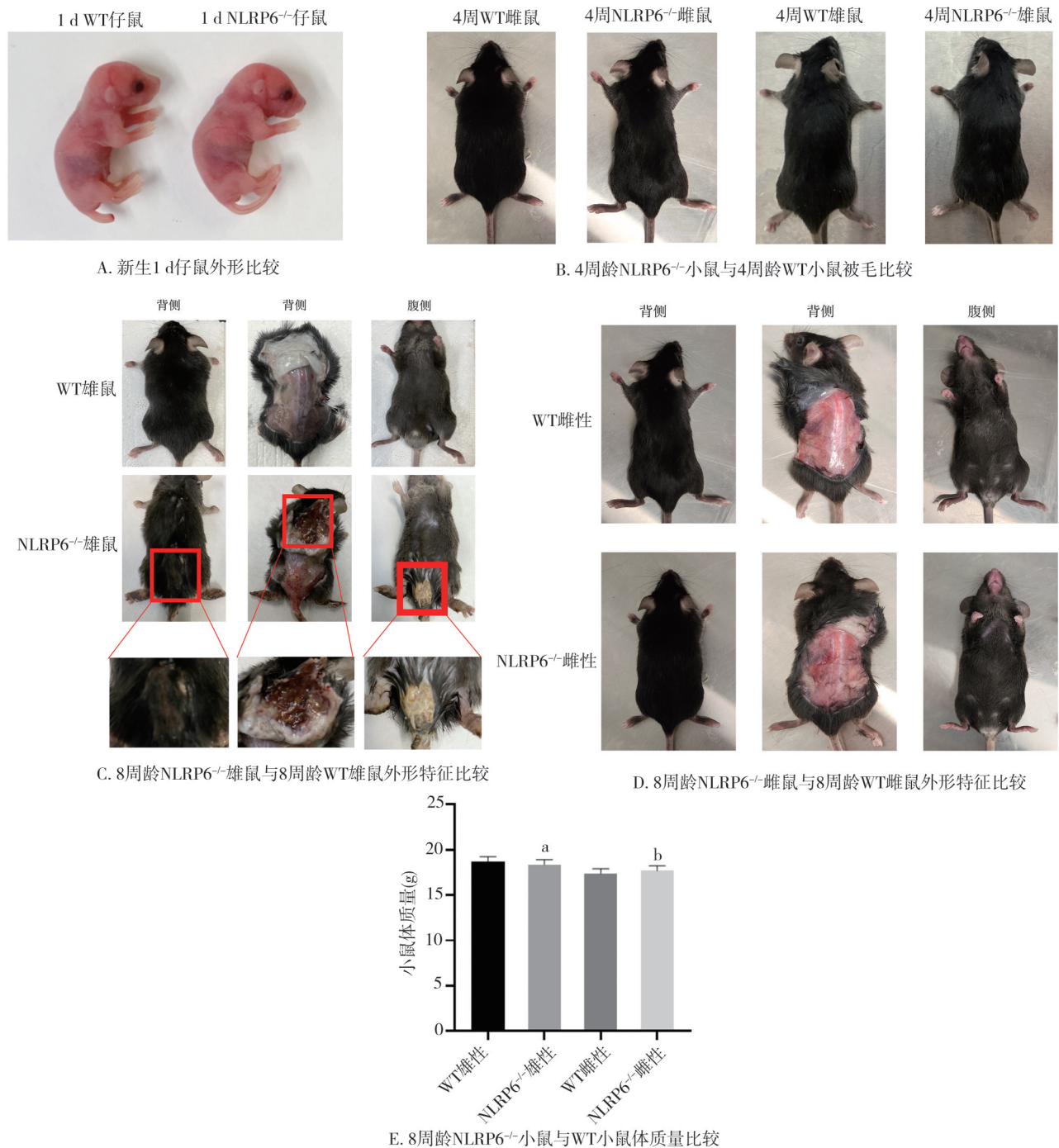
注:与 WT 雄鼠相比,NLRP6<sup>-/-</sup> 雄鼠性成熟期缩短。在 NLRP6<sup>-/-</sup> 雌鼠与 WT 雌鼠中,性成熟期、妊娠期和哺乳期均无明显变化。

以上结果提示,NLRP6 基因敲除主要缩短雄鼠的性成熟期,而对雌鼠的性成熟期、妊娠期和哺乳期无明显影响。

### 2.3 NLRP6 基因敲除小鼠的外形特征

NLRP6<sup>-/-</sup>新生 1 d 仔鼠与 WT 新生 1 d 仔鼠的皮肤均为粉嫩肉红色,双眼未睁,四肢躯干向腹侧蜷缩,两者无明显差异(图 2A)。当小鼠生长至 4 周龄,NLRP6<sup>-/-</sup>雄鼠与 WT 雄鼠的被毛均为黑色,2 者无明显差异。与此同时,4 周龄的

NLRP6<sup>-/-</sup>雌鼠与 WT 雌鼠被毛均为黑色,两者也无明显差异(图 2B)。当小鼠生长至 8 周龄,与 WT 雄鼠相比,NLRP6<sup>-/-</sup>雄鼠后背皮肤可见明显溃疡和损伤,生殖器明显受损并且后肢出现明显萎缩(图 2C)。然而,在 8 周龄 NLRP6<sup>-/-</sup>雌鼠与 WT 雌鼠的后背皮肤、生殖器和后肢中,两者相比无明显差异(图 2D)。此外,8 周龄 NLRP6<sup>-/-</sup>小鼠(雄性或雌性)和 WT 小鼠(雄性或雌性)在体质量上也无明显差异(图 2E)。



注:a,与对照组 WT 雄鼠体质量相比, $P > 0.05$ ;b,与对照组 WT 雌鼠相比, $P > 0.05$ (对照组  $n=6$ )

图 2 NLRP6 基因敲除对小鼠外形特征及生长发育的影响

综上所述,在外形特征方面,敲除 NLRP6 基因主要损伤 8 周龄雌鼠的后背皮肤、生殖器以及后肢肌肉组织,而对 8 周龄雌鼠的后背皮肤、生殖器以及后肢肌肉组织无明显影响。

#### 2.4 NLRP6 基因敲除对小鼠实质器官的影响

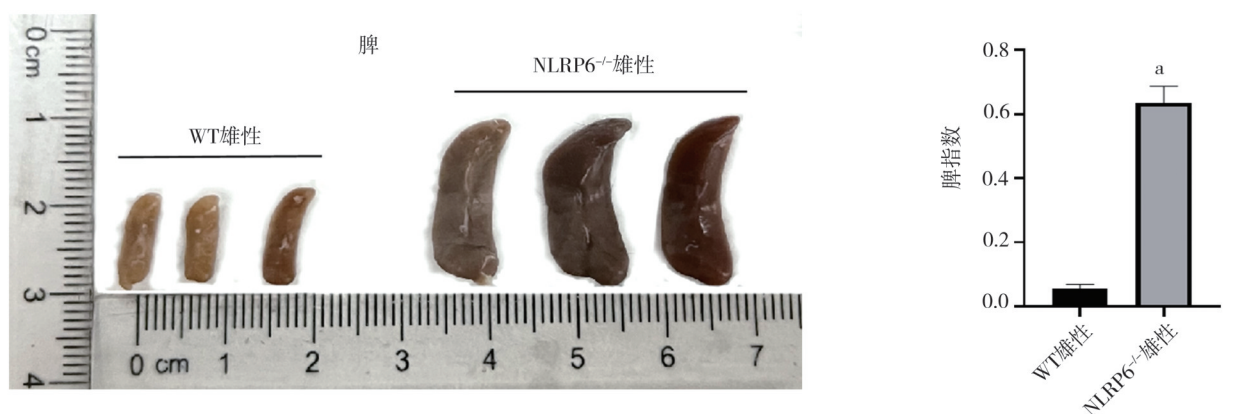
为了进一步分析 NLRP6 基因敲除对 8 周龄小鼠脾、肝、心、肾和脑等主要实质器官发育的影响,本研究将 8 周龄的 NLRP6<sup>-/-</sup>雄鼠、WT 雄鼠、NLRP6<sup>-/-</sup>雌鼠和 WT 雌鼠处死,解剖分离脾、肝、心、肾和脑并拍照记录,利用 Image J 软件测量其面积。结果显示:与 WT 雄鼠相比,8 周龄 NLRP6<sup>-/-</sup>雄鼠的脾面积明显增加(图 3A),但肝、心、肾和脑实质器官的面积无明显变化(图 3B)。同时,在 8 周龄的 NLRP6<sup>-/-</sup>雌鼠与 WT 雌鼠中,两者的脾、肝、心、肾和脑实质器官面积均无明显差异

(图 4)。

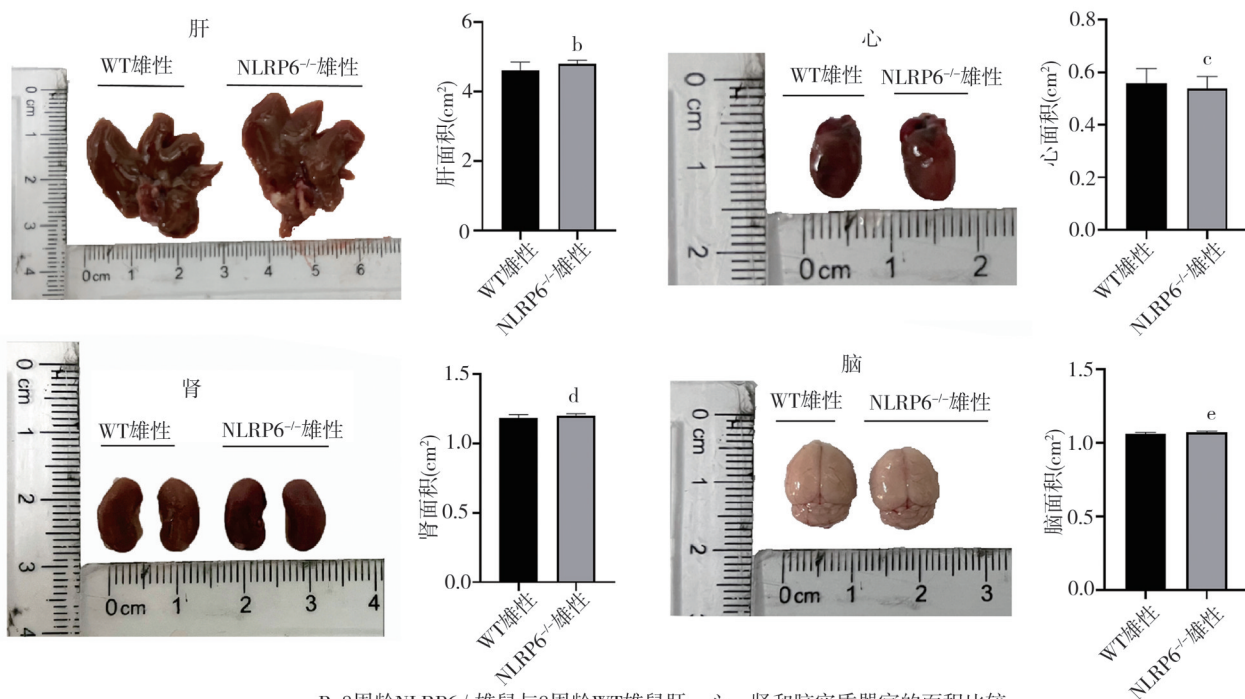
综上所述,NLRP6 基因敲除显著增加了 8 周龄 NLRP6<sup>-/-</sup>雄鼠的脾面积,但对肝、心、肾和脑主要实质器官面积无明显影响。此外,NLRP6 基因敲除对 8 周龄 NLRP6<sup>-/-</sup>雌鼠脾、肝、心、肾和脑主要实质器官面积均无明显影响。

#### 2.5 NLRP6 基因敲除对小鼠组织器官免疫炎症反应的影响

使用 HE 染色或 Masson 染色评估 NLRP6 敲除对 8 周龄小鼠后背皮肤、脾、肝、心、肾、脑和后肢组织免疫炎症反应的影响。HE 染色结果显示:与 WT 雄鼠相比,NLRP6<sup>-/-</sup>雄鼠后背皮肤出现胶原纤维增生和炎性细胞浸润(图 5A),脾出现炎性细胞浸润和淋巴造血组织异常(图 5B),肝出现细胞变性、双核肝细胞增多和汇管区炎性细胞浸润(图 5C),但心、



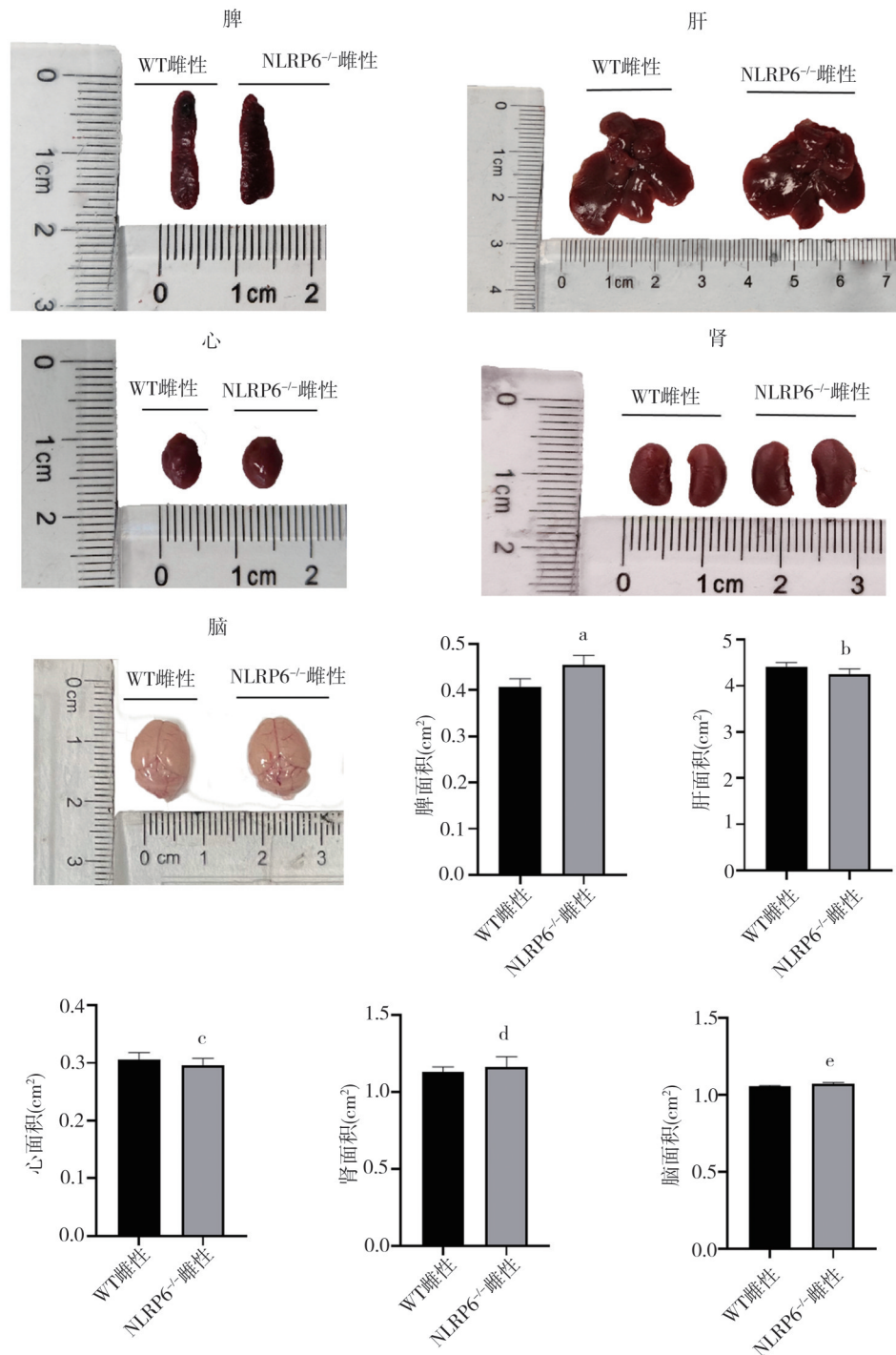
A. 8周龄NLRP6<sup>-/-</sup>雄鼠与8周龄WT雄鼠的脾面积比较



B. 8周龄NLRP6<sup>-/-</sup>雄鼠与8周龄WT雄鼠肝、心、肾和脑实质器官的面积比较

注:a,与对照组 WT 雄鼠脾脏大小相比, $P < 0.01$ ;b,WT 雄鼠肝脏大小相比, $P > 0.05$ ;c,与对照组 WT 雄鼠心脏大小相比, $P > 0.05$ ;d,与对照组 WT 雄鼠肾脏大小相比, $P > 0.05$ ;e,与对照组 WT 雄鼠脑大小相比, $P > 0.05$ (对照组  $n=6$ )

图3 NLRP6 基因敲除对雄鼠实质器官的影响



注:a,与对照组 WT 雌鼠脾脏大小相比, $P > 0.05$ ;b,与对照组 WT 雌鼠肝脏大小相比, $P > 0.05$ ;c,与对照组 WT 雌鼠心脏大小相比, $P > 0.05$ ;d,与对照组 WT 雌鼠肾脏大小相比, $P > 0.05$ ;e,与对照组 WT 雌鼠脑大小相比, $P > 0.05$ (对照组  $n=6$ )

图4 NLRP6基因敲除对雌鼠实质器官的影响

肾、脑实质器官组织均未观察到免疫炎症反应发生。(图 5D~F)。Masson 染色结果显示:与 WT 雄鼠相比,NLRP6<sup>-/-</sup>雄鼠后肢组织横纹肌断裂(图 5G)。同时,收集 8 周龄的 NLRP6<sup>-/-</sup>雌鼠或 WT 雌鼠的后背皮肤、脾、肝、心、肾、脑和后肢组织并进行 HE 和 Masson 染色。结果显示,在 NLRP6<sup>-/-</sup>雌鼠和 WT 雌鼠中,两者的后背皮肤、脾、肝、心、肾、脑和后肢组

织均未观察到炎症细胞浸润,免疫炎症反应不明显(图 6)。

以上结果提示,NLRP6 基因敲除导致 8 周龄雄鼠的后背皮肤、脾、肝和后肢组织均出现免疫炎症反应,而对心、肾、脑实质器官的免疫炎症反应无明显影响。同时,NLRP6 基因敲除对 8 周龄雌鼠的后背皮肤、脾、肝、心、肾、脑和后肢组织的免疫炎症细胞的浸润、形态改变等免疫炎症反应均无明显影响。

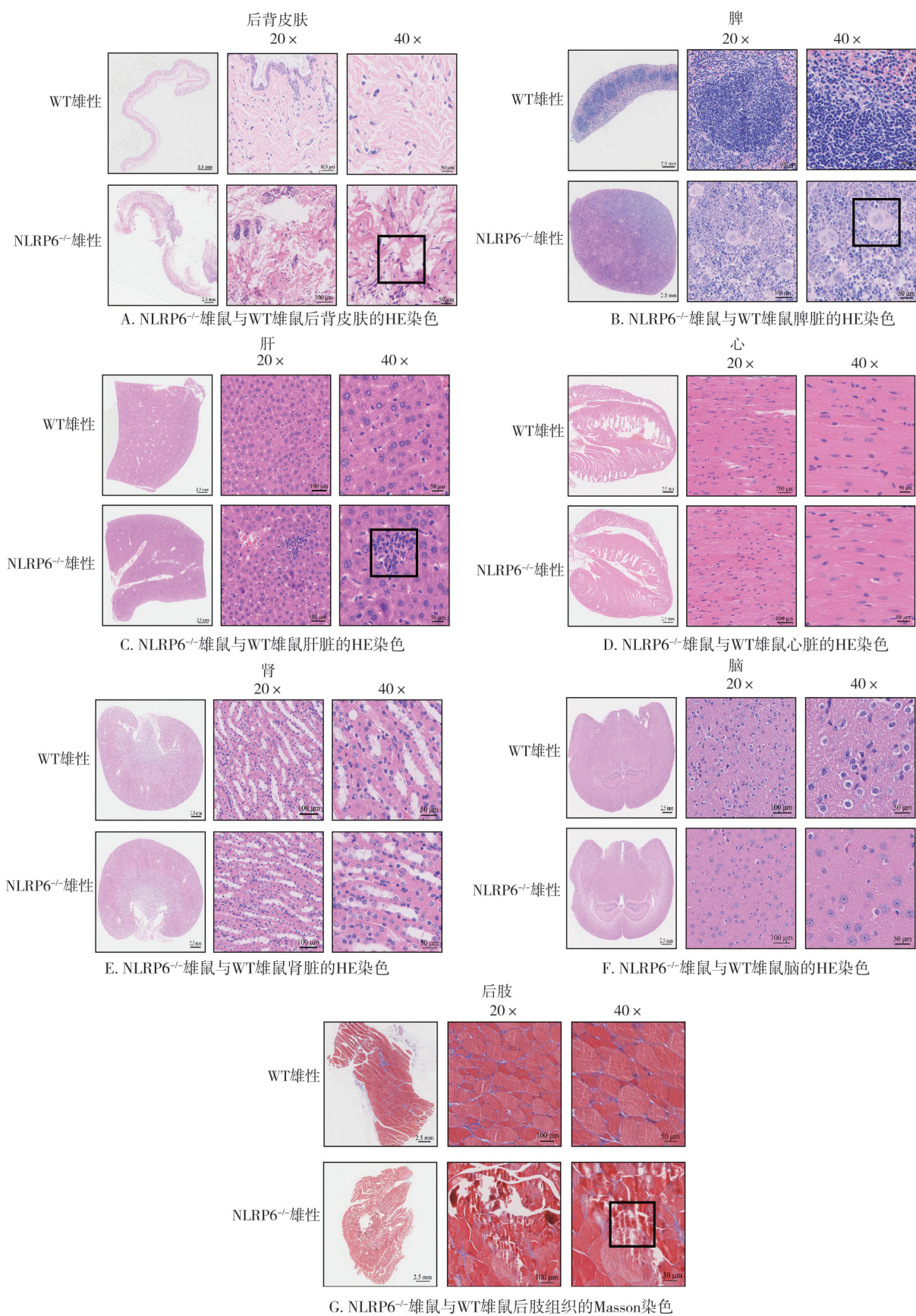
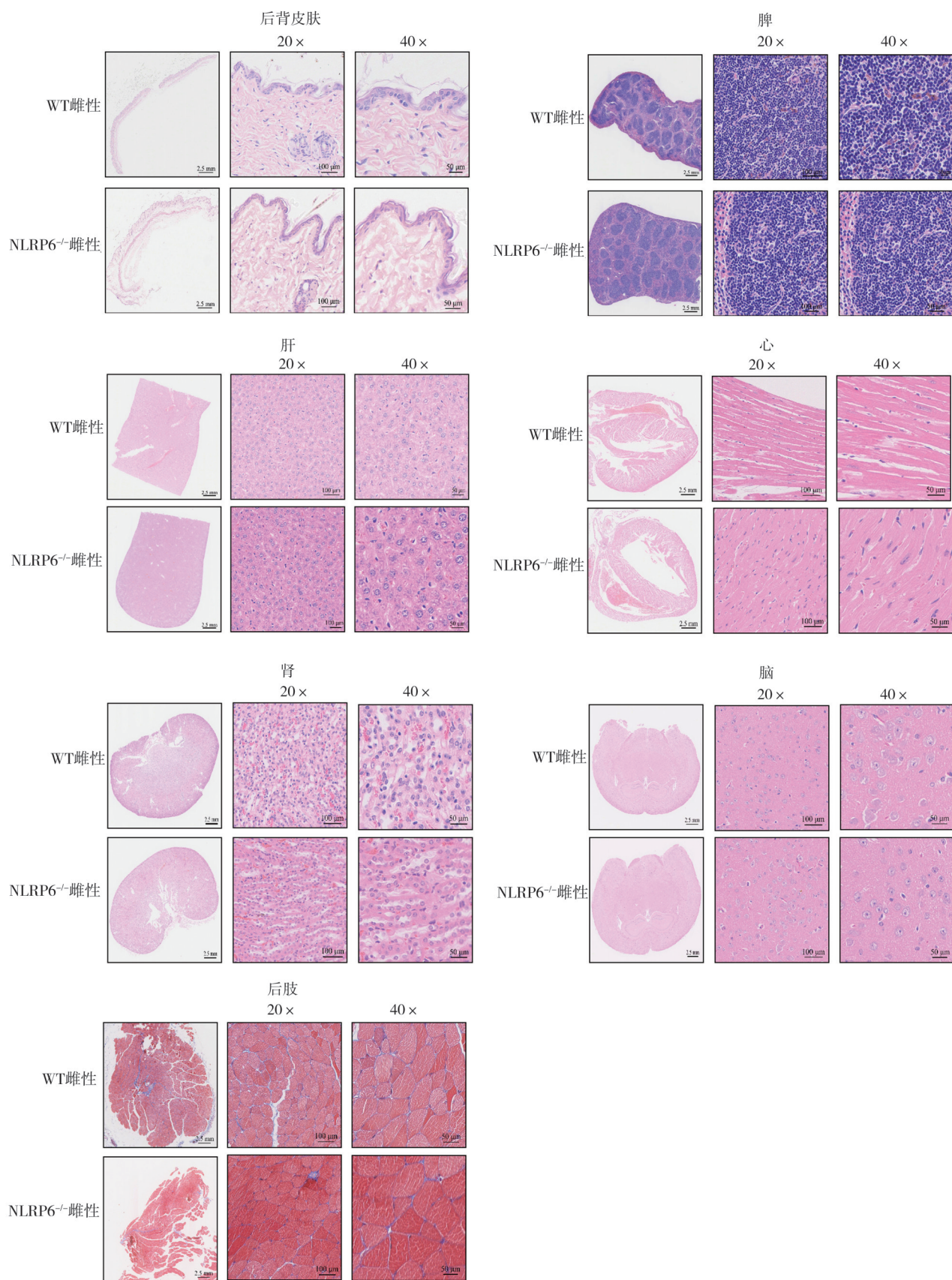


图5 NLRP6基因敲除对雄鼠组织器官免疫炎症反应的影响



注: Bar=50/100 μm

图6 NLRP6基因敲除对雌鼠组织器官免疫炎症反应的影响

### 3 讨 论

作为新发现的 NLRs 家族成员, NLRP6 能够以炎性小体依赖性方式或非炎性小体依赖性方式调节炎症免疫反应: 一方面, NLRP6 通过其 N 端的 PYD 结构域的同源蛋白连接与 ASC 蛋白相结合, 进而通过 ASC 的 CARD 结构域募集 caspase-1 或 caspase-11, 最终组装形成 NLRP6 炎性小体, 进而诱导生成具有生物活性的 IL-1 $\beta$  和 IL-18, 调节炎症免疫反应<sup>[13-14]</sup>; 另一方面, NLRP6 能够调控 MAPK/ERK 信号通路、NF- $\kappa$ B 转录活性或 I/III 型干扰素信号途径, 以与炎症小体无关的方式对炎症免疫反应发挥调节作用<sup>[6,10,15]</sup>。除了在炎症免疫反应中的调节作用外, NLRP6 近年来也被报道在焦亡、自噬和蛋白降解等生物过程中发挥调节作用。例如, 在神经细胞中, 本课题组实验证实 NLRP6 能够诱导 GSDMD 的裂解, 促进细胞焦亡<sup>[16]</sup>。在肠上皮细胞中, NLRP6 直接与 Ulk1, Beclin-1, LC3B 和 p62 等多种自噬相关蛋白结合, 直接促进自噬活性<sup>[17]</sup>。在胃癌细胞中, NLRP6 上调 GRP78 的泛素化水平, 增强 GRP78 的蛋白酶体降解活性<sup>[18]</sup>。总的来说, NLRP6 在炎症、焦亡、自噬和蛋白降解等多种生物过程发挥着广泛的调节作用。

由于 NLRP6 在肠道、肝、心、脾、肾和脑等实质器官中具有较高的表达丰度, 目前有关 NLRP6 的研究主要集中在疾病状态下实质器官的功能调节。例如, 在革兰氏阳性菌(如李斯特菌和金黄色葡萄球菌)感染的小鼠肠道中, NLRP6 直接结合革兰氏阳性菌的脂壁酸, 诱导 NLRP6 炎性小体的组装和活化, 促进依赖于 caspase-11 的 IL-18 的产生, 最终加剧革兰氏阳性菌感染并降低小鼠存活率, 这表明 NLRP6 对宿主的肠道防御免疫反应具有负性调控作用<sup>[19]</sup>。在非酒精性肝炎中, NLRP6 的敲除不仅促进 Cd36 介导的脂质摄取、加重肝脏的脂质代谢失调和肝细胞脂肪变性, 还通过增强 NF- $\kappa$ B 的转录活性上调促炎细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的表达, 加重肝脏炎症反应和纤维化, 最终加重肝组织损伤, 这表明 NLRP6 对非酒精性肝炎具有保护作用<sup>[20]</sup>。在急性肾损伤中, 敲除 NLRP6 能够上调 ERK1/2 和 p38 MAPK 的磷酸化水平, 促进趋化因子的表达和免疫细胞(如巨噬细胞与中性粒细胞)的浸润, 增强炎症

反应, 加重肾细胞死亡和肾组织纤维化, 最终导致肾功能损伤和血清肌酐与尿素水平的升高, 这表明 NLRP6 对急性肾损伤具有保护作用<sup>[11]</sup>。不同于 NLRP6 在肝脏和肾脏中的保护作用, NLRP6 在本课题组前期研究中被证实对缺血性脑卒中具有损害作用。在脑缺血后, NLRP6 以炎性小体依赖性方式不仅促进炎症因子 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的成熟与分泌、增强神经炎症反应, 还诱导 GSDMD 的裂解、促进细胞焦亡, 最终导致脑梗死体积的增大、神经功能缺损评分的增加和脑组织形态损伤的加重<sup>[16,21-22]</sup>。由此可见, NLRP6 对疾病状态下多种实质器官的功能均具有显著的调节作用。然而, 在自然生长发育状态下, NLRP6 对组织器官的影响尚未可知。在本实验中, 通过饲养并繁殖野生型和 NLRP6<sup>-/-</sup>型小鼠, 在自然生长发育状态下分析 NLRP6 基因型对小鼠的睾丸、脾、肝、心、肾和脑等主要实质器官及皮肤毛发等组织的影响。研究发现, NLRP6 基因敲除主要缩短了雄鼠的性成熟周期、使成年雄鼠的睾丸发生不可逆的破溃与萎缩, 但对雌鼠的性成熟期、妊娠期、哺乳期和卵巢生长发育无明显影响。在四肢发育上, NLRP6 的基因敲除诱导成年雄鼠后肢横纹肌断裂, 导致后肢出现明显萎缩, 但对雌鼠的后肢生长和组织结构无明显影响。在脾脏的生长发育上, NLRP6 的基因敲除不仅显著增加了雄鼠的脾脏体积还诱导雄鼠脾脏出现炎性细胞浸润和淋巴造血组织异常。然而, NLRP6 基因敲除对雌鼠的脾脏体积和免疫炎症反应未产生明显影响。在后背皮肤上, NLRP6 基因敲除引发雄鼠后背皮肤出现明显的溃疡损伤、胶原纤维增生和炎性细胞浸润, 但对雌鼠后背皮肤的完整性和免疫炎症反应无明显影响。除此之外, 本研究还分析了 NLRP6 基因型对其他实质器官(如心、肝、肾和脑)生长发育和组织结构的影响。结果显示, 在自然生长发育状态下, NLRP6 的基因型对小鼠(包括雄性和雌性)的心、肝、肾、脑实质器官和毛发生长均无显著影响。由此可见, NLRP6 不仅在疾病状态下实质器官的功能调节中发挥作用, 还对组织器官的生长发育具有重要影响。

如前所述, 在自然生长状态下, NLRP6 基因敲除选择性影响雄鼠的生殖器发育与性成熟期、后肢肌肉发育、脾脏大小及其炎症免疫反应, 以及后背皮肤的组织结构及其炎症免疫反应。而且, 这一作

用具有明确的性别依赖性,即 NLRP6 基因敲除对自然状态下雌鼠的生殖器、后肢肌肉、脾脏及后背皮肤均无明显影响。雌激素是维持雌性动物第二性征发育的关键激素,近年来还被报道在心血管系统、免疫系统和神经系统等疾病中发挥保护作用。例如,在心肌梗死中,雌激素受体  $\beta$  (ER $\beta$ ) 通过上调 SERCA2a 的表达活性增加肌浆网中钙离子的摄取与吸收,加速心脏舒张,减少心脏破裂和心室不良重塑,降低小鼠心肌梗死后的死亡率<sup>[23]</sup>。NLRP6 是近年来新发现的模式识别受体家族成员,其与雌激素之间的分子相关性已被报道。例如,在结肠炎疾病中,雌激素受体  $\beta$  (ER $\beta$ ) 通过直接结合 NLRP6 基因启动子的雌激素反应元件促进 NLRP6 的基因表达,进而上调 ASC、caspase-1、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的表达水平,促进炎症细胞浸润和黏膜损伤,最终加剧小鼠结肠炎症<sup>[17]</sup>。这表明雌激素与 NLRP6 具有密切的分子相关性,两者在抑制结肠炎的病情进展中发挥重要作用。本实验首次证实 NLRP6 基因敲除选择性影响雄鼠的实质器官生长繁育,而对雌鼠的实质器官生长繁育无明显影响。考虑到这一表型的性别差异以及雌激素的保护作用,推断雌激素能够阻断 NLRP6 基因敲除对小鼠实质器官生长繁育的影响,但其具体作用和分子机制还有待于进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Almeida-da-Silva CLC, Savio LEB, Coutinho-Silva R, et al. The role of NOD-like receptors in innate immunity[J]. Front Immunol, 2023, 14:1122586.
- [2] Chuphal B, Rai U, Roy B. Teleost NOD-like receptors and their downstream signaling pathways: a brief review[J]. Fish Shellfish Immunol Rep, 2022, 3:100056.
- [3] Kersse K, Bertrand MJ, Lamkanfi M, et al. NOD-like receptors and the innate immune system: coping with danger, damage and death[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2011, 22(5/6):257-276.
- [4] Zheng DP, Kern L, Elinav E. The NLRP6 inflammasome[J]. Immunology, 2021, 162(3):281-289.
- [5] Ohto U. Activation and regulation mechanisms of NOD-like receptors based on structural biology[J]. Front Immunol, 2022, 13:953530.
- [6] Wang PH, Zhu S, Yang L, et al. Nlrp6 regulates intestinal antiviral innate immunity[J]. Science, 2015, 350(6262):826-830.
- [7] Lin Y, Luo ZQ. NLRP6 facilitates the interaction between TAB2/3 and TRIM38 in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. FEBS Lett, 2017, 591(8):1141-1149.
- [8] Ydens E, Demon D, Lornet G, et al. Nlrp6 promotes recovery after peripheral nerve injury independently of inflammasomes[J]. J Neuroinflammation, 2015, 12:143.
- [9] Elinav E, Strowig T, Kau AL, et al. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis[J]. Cell, 2011, 145(5):745-757.
- [10] Ji XY, Li LL, Lu PP, et al. NLRP6 exerts a protective role via NF- $\kappa$ B with involvement of CCL20 in a mouse model of alcoholic hepatitis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 528(3):485-492.
- [11] Valiño-Rivas L, Cuarental L, Nuñez G, et al. Loss of NLRP6 expression increases the severity of acute kidney injury[J]. Nephrol Dial Transplant, 2020, 35(4):587-598.
- [12] Bracey NA, Platnich JM, Lau A, et al. Tissue-selective alternate promoters guide NLRP6 expression[J]. Life Sci Alliance, 2021, 4(3):e202000897.
- [13] Angosto-Bazarra D, Molina-López C, Pelegrín P. Physiological and pathophysiological functions of NLRP6: pro- and anti-inflammatory roles[J]. Commun Biol, 2022, 5(1):524.
- [14] Li RZ, Zan Y, Sui KW, et al. The latest breakthrough on NLRP6 inflammasome[J]. Precis Clin Med, 2022, 5(3):pbac022.
- [15] Lu WL, Zhang L, Song DZ, et al. NLRP6 suppresses the inflammatory response of human periodontal ligament cells by inhibiting NF- $\kappa$ B and ERK signal pathways[J]. Int Endod J, 2019, 52(7):999-1009.
- [16] Zhang JY, Jiang N, Zhang LY, et al. NLRP6 expressed in astrocytes aggravates neurons injury after OGD/R through activating the inflammasome and inducing pyroptosis[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 80:106183.
- [17] Fan WT, Ding CC, Liu SH, et al. Estrogen receptor  $\beta$  activation inhibits colitis by promoting NLRP6-mediated autophagy[J]. Cell Rep, 2022, 41(2):111454.
- [18] Wang XY, Wu XW, Wang QQ, et al. NLRP6 suppresses gastric cancer growth via GRP78 ubiquitination[J]. Exp Cell Res, 2020, 395(1):112177.
- [19] Hara H, Seregin SS, Yang DH, et al. The NLRP6 inflammasome recognizes lipoteichoic acid and regulates gram-positive pathogen infection[J]. Cell, 2018, 175(6):1651-1664.
- [20] 张炜琪, 谢炎, 蒋文涛. 非酒精性脂肪性肝病与肝移植[J]. 中华肝脏病杂志, 2022, 30(4):439-442.
- [21] Zhang WQ, Xie Y, Jiang WT. Nonalcoholic fatty liver disease and liver transplantation[J]. Chin J Hepatol, 2022, 30(4):439-442.
- [22] Huang XH, Gan H, Tan JY, et al. BRCC3 promotes activation of the NLRP6 inflammasome following cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury in rats[J]. Neurosci Lett, 2021, 756:135954.
- [23] Meng CC, Zhang JY, Zhang LY, et al. Effects of NLRP6 in cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury in rats[J]. J Mol Neurosci, 2019, 69(3):411-418.
- [24] Schuster I, Mahmoodzadeh S, Dworatzek E, et al. Cardiomyocyte-specific overexpression of oestrogen receptor  $\beta$  improves survival and cardiac function after myocardial infarction in female and male mice[J]. Clin Sci, 2016, 130(5):365-376.

(责任编辑:李青颖)