

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002680

PM_{2.5} 对大鼠肺泡巨噬细胞内 NLRP3 炎性小体表达及细胞凋亡的影响顾娜¹, 谭程¹, 张桂贤¹, 史鹏程¹, 刘伟伟¹, 赵秀梅¹, 刘洪斌¹, 田瑛泽², 石钊³

(1. 天津市医药科学研究所, 天津 300020; 2. 南开大学环境科学与工程学院, 天津 300350;

3. 天津旷博同生生物技术有限公司, 天津 300392)

【摘要】目的:初步探讨大气细颗粒物(fine particulate matter, PM_{2.5})诱导大鼠肺泡巨噬细胞内 NLRP3 炎性小体活化及细胞凋亡的潜在分子机制。**方法:**采用中流量采样器收集 PM_{2.5} 颗粒物,经超声提取制成混悬液,作用于大鼠肺泡巨噬细胞(NR8383)后,MTT 法检测细胞存活率,Western blot 检测 Nod 样受体蛋白 3(NLRP3)、组织蛋白酶 B(Cathepsin-B)及凋亡相关蛋白[Bax、Bcl-2 及半胱天冬酶-3(Caspase-3)]的表达水平,ELISA 检测 PM_{2.5} 诱导的细胞上清液中半胱天冬酶-1(Caspase-1)、白介素(interleukin, IL)-18 和 IL-1β 的含量。**结果:**随着 PM_{2.5} 浓度的增加和刺激时间的延长, NR8383 细胞存活率降低(24 h: $F=17.253$, $P=0.000$; 48 h: $F=18.678$, $P=0.000$; 72 h: $F=256.104$, $P=0.000$); PM_{2.5} 诱导 NR8383 细胞内 NLRP3 ($F=437.166$, $P=0.000$) 和 Cathepsin-B ($F=42.062$, $P=0.000$) 蛋白的表达上调; PM_{2.5} 上调细胞内促凋亡蛋白 Bax ($F=72.827$, $P=0.000$) 表达, 下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 ($F=390.322$, $P=0.000$) 表达, 下调 Caspase-3 ($F=169.833$, $P=0.000$) 蛋白的表达; PM_{2.5} 上调细胞培养液中 Caspase-1 ($F=629.866$, $P=0.000$)、IL-18 ($F=587.165$, $P=0.000$) 和 IL-1β ($F=68.472$, $P=0.000$) 的水平。**结论:**PM_{2.5} 可通过溶酶体模式诱导肺泡巨噬细胞内 NLRP3 炎性小体活化, 促进 IL-18 和 IL-1β 分泌, 并引起肺泡巨噬细胞发生凋亡。

【关键词】大气细颗粒物; 肺泡巨噬细胞; NLRP3 炎性小体; 细胞凋亡**【中图分类号】**R56**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2020-08-11Effects of PM_{2.5} on the expression of NLRP3 inflammasome and apoptosis in rat alveolar macrophagesGu Na¹, Tan Cheng¹, Zhang Guixian¹, Shi Pengcheng¹, Liu Weiwei¹, Zhao Xiumei¹,
Liu Hongbin¹, Tian Yingze², Shi Chuan³

(1. Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences; 2. College of Environmental Science and Engineering, Nankai University; 3. Tianjin QuantoBio Biotech Co., Ltd.)

【Abstract】Objective: To investigate the potential molecular mechanism of fine particulate matter (PM_{2.5}) on activation of NLRP3 inflammasome and apoptosis in rat alveolar macrophages. **Methods:** Rat alveolar macrophages were treated with PM_{2.5} suspension collected by medium flow atmospheric sampler. After action of the suspension on rat alveolar macrophages (NR8383), MTT assay was used to detect the cell survival rate. Western blot was performed to detect the expression of NLRP3, Cathepsin-B and apoptosis-related proteins (Bax, Bcl-2, Caspase-3). The level of Caspase-1, interleukin-18 (IL-18) and interleukin-1β (IL-1β) in the cell supernatant induced by PM_{2.5} were measured by ELISA method. **Results:** With the increase of PM_{2.5} concentration and the extension of stimulation time, the survival rate of NR8383 decreased (24 h: $F=17.253$, $P=0.000$; 48 h: $F=18.678$, $P=0.000$; 72 h: $F=256.104$, $P=0.000$); PM_{2.5} accelerated the expression of NLRP3 ($F=437.166$, $P=0.000$) and Cathepsin-B ($F=42.062$, $P=0.000$) in NR8383; PM_{2.5} up-regulated the expression of pro-apoptotic protein Bax ($F=72.827$, $P=0.000$), down-regulated the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 ($F=390.322$, $P=0.000$), and down-regulated the expression of Caspase-3 ($F=169.833$, $P=0.000$); PM_{2.5} increased the level of Caspase-1 ($F=629.866$, $P=0.000$), IL-18 ($F=587.165$, $P=0.000$) and IL-1β ($F=68.472$, $P=0.000$) in cell culture medium. **Conclusion:**

作者介绍: 顾娜, Email: xiaole29@163.com,

研究方向: 药理学相关研究。

通信作者: 刘洪斌, Email: jtss@sina.com。

基金项目: 天津市卫计委科技基金资助项目 (编号: 2015KY39)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20201104.1714.002.html>

(2020-11-05)

PM_{2.5} can activate NLRP3 inflammasome in alveolar macrophages through the lysosomal model, promote the secretion of IL-18 and IL-1β, and cause apoptosis of alveolar macrophages.**【Key words】**fine particulate matter; alveolar macrophages; NLRP3 inflammasome; apoptosis

空气动力学直径 $\leq 2.5 \mu\text{m}$ 的大气细颗粒物(fine particulate matter, $\text{PM}_{2.5}$)因粒径小、比表面积大、较易吸附大气中的有害物质,且能长期悬浮于空气中,可随呼吸进入呼吸道下段并沉积于细支气管和肺泡,故可破坏呼吸道防御功能,加重咳嗽、咳痰等呼吸系统炎症症状,诱发慢性支气管炎、慢性阻塞性肺疾病、支气管哮喘等呼吸系统疾病,甚至和肺部肿瘤的发生发展密切相关^[1]。肺泡巨噬细胞是呼吸系统固有免疫的第一道防线^[2]。正常状况下 $\text{PM}_{2.5}$ 进入呼吸系统后,肺泡巨噬细胞立即发挥吞噬、免疫和分泌作用,对其及时进行清除。当 $\text{PM}_{2.5}$ 浓度超过一定量后,会引起一系列生理、生化指标变化,造成肺泡巨噬细胞损伤,但具体的损伤机制尚不明确。NLRP3 炎性小体是机体固有免疫的重要组成部分,其活化与哮喘、慢性阻塞性肺疾病、肺纤维化等密切相关。研究发现,各种病原体、晶体类物质及某些药物可通过离子通道模式、溶酶体模式或活性氧模式激活 NLRP3 炎性小体复合物^[3]。但 $\text{PM}_{2.5}$ 作为一种大气细颗粒物,是否可引起 NLRP3 炎性小体活化及活化机制尚不明确。因此,本研究以大鼠肺泡巨噬细胞为研究对象,探讨 $\text{PM}_{2.5}$ 诱导肺泡巨噬细胞损伤的潜在机制,为 $\text{PM}_{2.5}$ 相关性疾病的预防和临床治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与试剂 大鼠巨噬细胞系 NR8383(中国科学院上海生命科学研究院),F12K 培养基(Gibco),胎牛血清(澳大利亚 AusGeneX),NLRP3 兔多克隆抗体(Abcom),白介素(interleukin, IL)-18、IL-1 β 及 Caspase-1 的 ELISA 试剂盒(南京建成生物工程研究所),MTT(碧云天生物技术公司),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京 Solarbio),兔单抗 β -actin(北京博奥森生物技术有限公司);Cathepsin-B(沈阳万类生物科技有限公司),Bax(美国 CST 公司),Bcl-2(美国 CST 公司),Caspase-3(美国 Proteintech),HRP 标记羊抗兔二抗(美国 CST 公司),ECL 化学发光试剂盒(美国 Millipore Corporation)。

1.1.2 仪器与设备 TH-16E 型环境空气颗粒物($\text{PM}_{2.5}$)采样器(武汉市天虹仪表有限责任公司);超净工作台(SW-CJ-ID 苏州净化设备有限公司);多功能酶标仪 infinite M200(瑞士 TECAN 公司); CO_2 培养箱(REVCO);显微镜(奥林巴斯 BX53 型生物显微镜);电子天平(日本 Shimadzu AUW120);MH-2

型微量振荡器(日本 Sanyo MLS-3750);恒温水浴箱(德国 Eppendorf 公司);超低温冰箱(北京市医疗设备厂);电热恒温干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司);96 孔板及 6 孔板(美国 COSTAR);垂直电泳仪及电泳槽(Bio-Rad);水平摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);恒温金属浴(杭州博日科技有限公司);台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);微量移液器(德国 Eppendorf 公司);化学发光成像分析仪(美国 GE)。

1.2 方法

1.2.1 $\text{PM}_{2.5}$ 的采集和处理 采样地点为南开大学理化楼楼顶,采样时间为 2017 年 11 月 1 日至 2018 年 2 月 6 日。 $\text{PM}_{2.5}$ 由载带石英滤膜的中流量采样器进行采样,设计流量 100 L/min,每张滤膜连续采样 22 h(当日 09:00 至次日 07:00),雨雪天停止采样。采样后将载有颗粒物的滤膜剪裁成 3 cm $\times$ 1 cm 大小,浸入去离子蒸馏水中超声 3 次,每次振荡 40 min,震荡液经 6 层纱布过滤,滤液经冷冻真空干燥,低温冰箱保存备用。临用前高压灭菌,用培养基配成所需浓度后超声振荡 15 min 使颗粒物充分混匀。

1.2.2 细胞培养 大鼠肺巨噬细胞 NR8383 培养在含 20% 胎牛血清及 1% 双抗的 F12K 培养基内,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度条件下培养。每 3~5 d 传代 1 次,取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.3 $\text{PM}_{2.5}$ 对 NR8383 增殖的影响 取对数生长期的 NR8383 细胞,吹打均匀,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用含 20% 胎牛血清、1% 双抗的 F12K 培养基吹打均匀制备成单细胞悬液,调整细胞密度为 2×10^5 个/mL 接种到 96 孔板,每孔 100 μL ,然后加入终浓度分别为 3.9 $\mu\text{g/mL}$ 、7.8 $\mu\text{g/mL}$ 、15.625 $\mu\text{g/mL}$ 、31.25 $\mu\text{g/mL}$ 、62.5 $\mu\text{g/mL}$ 、125 $\mu\text{g/mL}$ 的 $\text{PM}_{2.5}$ 悬液分别孵育 24 h、48 h 及 72 h,对照组加入相同体积的 F12K 培养基,同时设 $\text{PM}_{2.5}$ 对照组(加入相应浓度的 $\text{PM}_{2.5}$ 液进行培养)。反应结束后,显微镜下观察并拍照,每孔加入 10 μL 浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下继续孵育 4 h 后,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,每加入 180 μL 的 DMSO 溶液,用酶标仪在 570 nm 处测定光密度(optical density, OD)值,并计算细胞增殖抑制率(%)=(1-实验组 OD 值/对照组 OD 值) $\times$ 100%。每组 4 个平行。

1.2.4 NR8383 内 NLRP3、Cathepsin-B 及相关凋亡蛋白的表达 取对数生长期的 NR8383 细胞,吹打均匀,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用含 20% 胎牛血清、1% 双抗的 F12K 培养基吹打均匀制备成单细胞悬液,调整细胞密度为 4×10^5 个/mL 接种到 6 孔板,每孔 1 mL,然后加入终浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 的 $\text{PM}_{2.5}$ 悬液孵育 48 h,对照组加入相同体积 F12K 培养基。反应结束后,收集细胞,提取各组总

蛋白,BCA 法测蛋白浓度,并调整蛋白浓度为 20 g/L。将提取的蛋白与 4× 上样缓冲液混匀,于 100 ℃金属浴中煮沸 10 min,分装后-80 ℃存放。按照 Western blot 的测定方法依次进行电泳、电泳转膜、免疫反应等实验,ECL 化学发光法曝光显影,利用 Image J 软件测量其对应的灰度值。

1.2.5 ELISA 测定细胞上清液中 Caspase-1、IL-18 及 IL-1 β 的表达 取对数生长期的 NR8383 细胞,吹打均匀,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用含 20%胎牛血清、1%双抗的 F12K 培养基吹打均匀制备成单细胞悬液,调整细胞密度为 2×10⁵ 个/mL 接种到 96 孔板,每孔 100 μ L,然后加入终浓度为 10、50、100 μ g/mL 的 PM_{2.5} 悬液孵育 48 h,对照组加入相同体积的 F12K 培养基。反应结束后,2 000 r/min 离心 15 min,上清液按 ELISA 试剂盒说明书测定 IL-18 及 IL-1 β 的表达情况,同时在酶标包被板设标准品孔、空白孔及待测样品孔。反应终止后,450 nm 波长测量各孔的 OD 值,根据 OD 值和标准曲线的回归方程计算 Caspase-1、IL-18 及 IL-1 β 的浓度。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行数据处理。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,其中,ELISA 数据分析采用 ELISA Calc 回归/拟合计算软件处理,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 PM_{2.5} 对 NR8383 增殖的影响

MTT 结果发现,24 h、48 h 及 72 h 时 PM_{2.5} 对 NR8383 细胞增殖的抑制作用均呈明显的量效关系,即随着 PM_{2.5} 浓度的逐渐升高,其对 NR8383 细胞生长的抑制作用也逐渐增强(24 h: $F=17.253$, $P=0.000$;48 h: $F=18.678$, $P=0.000$;72 h: $F=256.104$, $P=0.000$),组间差异有统计学意义(表 1),但这种剂

量依赖关系呈现出非完全线性(图 1)。综合考虑后选用 10、50、100 g/mL 分别作为低、中、高剂量组进行后续实验。

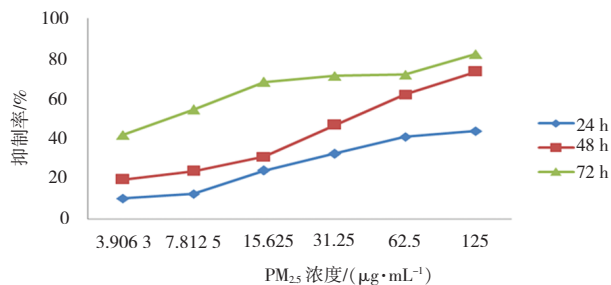


图 1 NR8383 细胞增殖抑制率曲线

显微镜下观察细胞形态学变化发现,随着 PM_{2.5} 浓度的增加,NR8383 细胞数目明显减少,且细胞透明度和折光率减弱,细胞内出现黑色的 PM_{2.5} 颗粒物,这种现象在高剂量组尤为明显(图 2)。

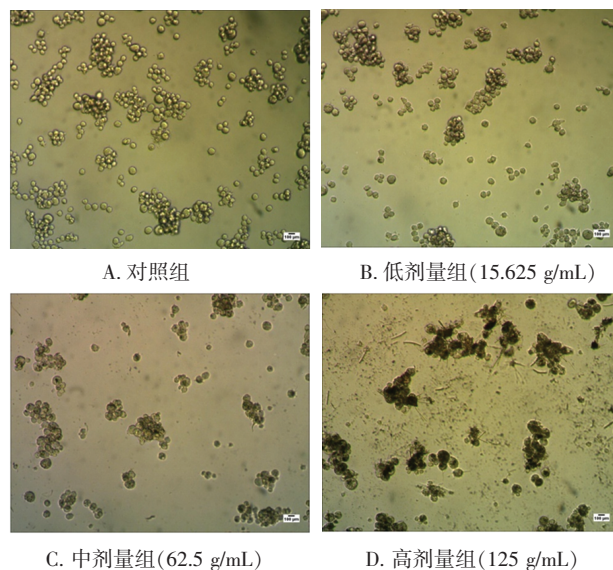


图 2 PM_{2.5} 对 NR8383 细胞形态的影响 (100×)

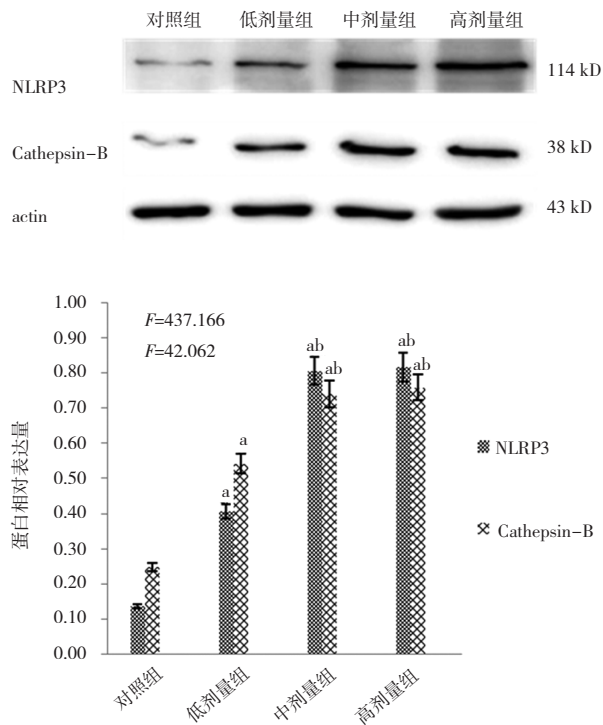
表 1 PM_{2.5} 对 NR8383 细胞增殖能力的影响 ($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

PM _{2.5} /(g·mL ⁻¹)	24 h		48 h		72 h	
	OD值	抑制率/%	OD值	抑制率/%	OD值	抑制率/%
—	0.579 4 $\pm$ 0.043 0	—	0.646 0 $\pm$ 0.071 9	—	0.805 6 $\pm$ 0.039 4	—
3.9	0.519 3 $\pm$ 0.058 7	10.37	0.519 1 $\pm$ 0.111 7 ^a	19.64	0.468 5 $\pm$ 0.037 8 ^a	41.84
7.8	0.506 5 $\pm$ 0.040 0 ^a	12.58	0.492 4 $\pm$ 0.084 7 ^a	23.78	0.366 4 $\pm$ 0.022 4 ^a	54.52
15.625	0.439 0 $\pm$ 0.046 2 ^a	24.23	0.445 1 $\pm$ 0.089 1 ^a	31.10	0.255 5 $\pm$ 0.023 0 ^a	68.28
31.25	0.390 6 $\pm$ 0.034 4 ^a	32.59	0.343 5 $\pm$ 0.074 0 ^a	46.83	0.231 2 $\pm$ 0.002 7 ^a	71.30
62.5	0.342 6 $\pm$ 0.035 6 ^a	40.87	0.245 7 $\pm$ 0.042 4 ^a	61.97	0.226 6 $\pm$ 0.026 9 ^a	71.87
125	0.325 3 $\pm$ 0.058 6 ^a	43.86	0.172 5 $\pm$ 0.028 6 ^a	73.30	0.144 1 $\pm$ 0.027 5 ^a	82.11
<i>F</i> 值	17.253	—	18.678	—	256.104	—
<i>P</i> 值	0.000	—	0.000	—	0.000	—

注:a,与对照组比较, $P<0.05$

2.2 NR8383 细胞内 NLRP3、Cathepsin-B 及相关凋亡蛋白的表达

正常对照组细胞内 NLRP3 及 Cathepsin-B 的表达量均较低,分别为 $0.137 1 \pm 0.010 6$ 及 $0.248 7 \pm 0.037 4$;低剂量组细胞内 NLRP3 表达为 $0.407 3 \pm 0.019 5$,Cathepsin-B 表达为 $0.543 9 \pm 0.070 2$;中剂量组细胞内 NLRP3 表达为 $0.806 6 \pm 0.039 3$,Cathepsin-B 表达为 $0.713 3 \pm 0.064 4$,高剂量组细胞内 NLRP3 表达为 $0.819 6 \pm 0.031 2$,Cathepsin-B 表达为 $0.760 6 \pm 0.069 4$,且中剂量组及高剂量组较低剂量组上调更明显 ($P=0.010, P=0.003$),而中剂量组与高剂量组之间比较差异无统计学意义 ($P=0.376$)。这提示 $PM_{2.5}$ 上调 NR8383 细胞内 NLRP3 ($F=437.166, P=0.000$) 及 Cathepsin-B ($F=42.062, P=0.000$) 的表达,组间差异有统计学意义 ($P<0.05$) (图 3)。

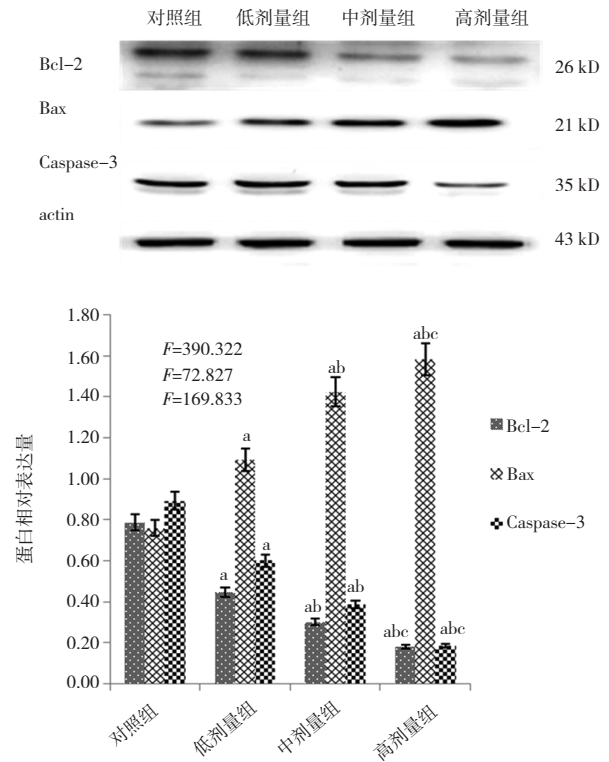


注:a,与对照组比较, $P<0.05$;b:与低剂量组比较, $P<0.05$

图 3 $PM_{2.5}$ 对 NLRP3 及 Cathepsin-B 表达的影响

结果还发现,对照组细胞内 Bax 表达为 $0.761 0 \pm 0.017 8$, Bcl-2 表达为 $0.787 8 \pm 0.034 1$,Caspase-3 表达为 $0.893 9 \pm 0.065 1$;低剂量组细胞内 Bax 表达为 $1.093 0 \pm 0.076 8$,Bcl-2 表达为 $0.447 1 \pm 0.021 5$,Caspase-3 表达为 $0.466 4 \pm 0.028 2$;中剂量组细胞内 Bax 表达为 $1.426 5 \pm 0.074 7$,Bcl-2 表达为 $0.303 0 \pm 0.017 3$,Caspase-3 表达为 $0.387 7 \pm 0.033 4$;高剂量组细胞内 Bax 表达为 $1.584 5 \pm 0.101 4$,Bcl-2 表达为 $0.182 0 \pm$

$0.013 6$,Caspase-3 表达为 $0.186 5 \pm 0.011 0$,提示 $PM_{2.5}$ 可上调 NR8383 内促凋亡蛋白 Bax 表达 ($F=72.827, P=0.000$),下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达 ($F=390.322, P=0.000$),下调 Caspase-3 蛋白表达 ($F=169.833, P=0.000$)。各组比较,差异有统计学差异 ($P<0.05$) (图 4)。



注:a,与对照组比较, $P<0.05$;b:与低剂量组比较, $P<0.05$;c:与中剂量组比较, $P<0.05$

图 4 $PM_{2.5}$ 对凋亡相关蛋白表达的影响

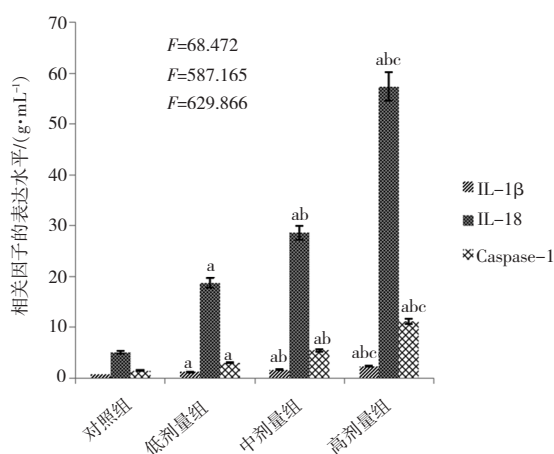
2.3 $PM_{2.5}$ 对 IL-18、IL-1 β 及 Caspase-1 产生的影响

对照组上清液中 IL-18、IL-1 β 及 Caspase-1 的表达水平分别为 ($5.032 6 \pm 0.750 8$) g/mL、($0.708 7 \pm 0.130 5$) g/mL 及 ($1.447 3 \pm 0.321 5$) g/mL,低剂量组上清液中 IL-18、IL-1 β 及 Caspase-1 的表达水平分别为 ($18.687 7 \pm 1.351 9$) g/mL、($1.163 7 \pm 0.172 9$) g/mL 及 ($3.010 6 \pm 0.345 2$) g/mL,中剂量组上清液中 IL-18、IL-1 β 及 Caspase-1 的表达水平分别为 ($28.590 2 \pm 2.298 2$) g/mL、($1.606 1 \pm 0.144 8$) g/mL 及 ($5.436 7 \pm 0.315 5$) g/mL,高剂量组上清液中 IL-18、IL-1 β 及 Caspase-1 的表达水平分别为 ($57.410 8 \pm 2.398 8$) g/mL、($2.320 1 \pm 0.205 4$) g/mL 及 ($11.140 2 \pm 0.370 0$) g/mL,提示 $PM_{2.5}$ 可上调细胞培养液中 IL-18 ($F=587.165, P=0.000$)、IL-1 β ($F=68.472, P=0.000$) 及 Caspase-1 ($F=629.866, P=0.000$) 的水平。各组比较,差异有统计学差异 ($P<0.05$) (表 2、图 5)。

表 2 NR8383 内 IL-18、IL-1 β 及 Caspase-1 的表达情况 (g/mL, $n=4, \bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β	IL-18	Caspase-1
对照组	0.708 7 $\pm$ 0.130 5	5.032 6 $\pm$ 0.750 8	1.447 3 $\pm$ 0.321 5
低剂量组	1.163 7 $\pm$ 0.172 9 ^a	18.687 7 $\pm$ 1.351 9 ^a	3.010 6 $\pm$ 0.345 2 ^a
中剂量组	1.606 1 $\pm$ 0.144 8 ^{ab}	28.590 2 $\pm$ 2.298 2 ^{ab}	5.436 7 $\pm$ 0.315 5 ^{ab}
高剂量组	2.320 1 $\pm$ 0.205 4 ^{abc}	57.410 8 $\pm$ 2.398 8 ^{abc}	11.140 2 $\pm$ 0.370 0 ^{abc}
<i>F</i> 值	68.472	587.165	629.866
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

注: a, 与对照组比较, $P < 0.05$; b, 与低剂量组比较, $P < 0.05$; c, 与中剂量组比较, $P < 0.05$



注: a, 与对照组比较, $P < 0.05$; b, 与低剂量组比较, $P < 0.05$; c, 与中剂量组比较, $P < 0.05$

图 5 PM_{2.5} 对 NR8383 内 IL-18、IL-1 β 及 Caspase-1 表达的影响

3 讨论

近年来,随着我国工业化和城市化的迅速发展,环境污染问题日益加剧,其中 PM_{2.5} 作为最主要的空气污染物,严重威胁着人类健康^[4]。流行病学及毒理学研究已经证实,PM_{2.5} 与支气管哮喘^[5]、慢性阻塞性肺疾病^[6]、肺纤维化^[7]及肺癌^[8]等呼吸系统疾病的发病率和死亡率密切相关。因此,针对 PM_{2.5} 的毒性作用及分子机制的研究迫在眉睫。

NLRP3 炎性小体是近年来研究的热点。研究发现,NLRP3 炎性小体主要表达于免疫细胞,尤其是炎症刺激触发后的抗原呈递细胞(antigen presenting cell, APC)和炎症细胞,如巨噬细胞、树突细胞(dendritic cells, DC)、脾脏中单核细胞及中性粒细胞^[9]。故本项研究以肺巨噬细胞 NR8383 为研究对象,观察 PM_{2.5} 诱导 NR8383 内 NLRP3 炎性小体活化及细

胞凋亡的潜在分子机制。肺泡巨噬细胞是肺泡腔内常驻的免疫细胞,吞噬、免疫和分泌作用都十分活跃,是肺组织免疫系统的第一道天然屏障,且与气道炎症性疾病的发生发展直接相关^[10]。正常情况下,空气中的尘粒(包括 PM_{2.5})、细菌等异物进入肺泡和肺间质后多被巨噬细胞吞噬而形成尘细胞。吞噬异物的尘细胞,有的从肺泡腔经呼吸道黏液流动和纤毛运动被咳出,有的进入肺淋巴管随淋巴液进入肺淋巴结内。当肺泡巨噬细胞被过度激活后可释放多种炎症因子及炎症介质,造成炎症的级联瀑布反应^[11-12],但具体机制尚不明确。NLRP3 炎性小体是位于细胞质内一种能对内源性危险信号产生炎症免疫应答反应的多蛋白复合物,是机体调节固有免疫反应的重要组成部分。内/外源性刺激通过 NLRP3 炎性小体的聚集引起半胱天冬酶原(pro-Caspase-1)蛋白裂解,生成活化的半胱天冬酶 1 (Caspase-1),Caspase-1 又促使白细胞介素-1 β 前体和白细胞介素-18 前体转变为成熟的 IL-1 β 和 IL-18^[13]。本研究发现,PM_{2.5} 可抑制大鼠肺泡巨噬细胞系 NR8383 的增殖,两者呈明显的量效关系,即随着 PM_{2.5} 浓度的逐渐升高,其对 NR8383 细胞生长的抑制作用也逐渐增强。研究还发现,PM_{2.5} 上调 NR8383 内 NLRP3 表达,也呈明显的量效关系;且 PM_{2.5} 作用于 NR8383 后,细胞上清液中 IL-18、IL-1 β 及 Caspase-1 的表达水平均显著上调,这证实 PM_{2.5} 可引起 NR8383 内 NLRP3 炎性小体活化,但活化机制尚不明确。目前关于 NLRP3 炎性小体的活化方式主要分为活性氧模式、离子通道模式及溶酶体模式^[14]。其中溶酶体模式认为,刺激物进入细胞后,会改变溶酶体膜电位干扰其稳定性,导致溶酶体蛋白水解酶释放,其中 Cathepsin-B 的释放在炎性小体激活

过程中发挥关键性作用^[15]。本研究发现,PM_{2.5}可引起 NR8383 内 Cathepsin-B 表达上调,因此证实 PM_{2.5}可通过溶酶体模式引起 NR8383 内 NLRP3 炎性小体活化。

进一步的 Western blot 结果发现,PM_{2.5}可引起 NR8383 发生细胞凋亡,表现为细胞内 Bax 表达上调,Bcl-2 及 Caspase-3 表达下调。Bax 及 Bcl-2 属于 Bcl-2 蛋白家族成员,其中 Bcl-2 为抗凋亡蛋白,而 Bax 为促凋亡蛋白。Caspase-3 是细胞凋亡过程中一种重要的终末剪切酶,三者为细胞凋亡内源性(线粒体)途径的重要组成部分^[16]。但 NR8383 发生凋亡的具体机制尚不明确。有研究发现,NLRP3 可通过 ASC 的 PYD 结构域与 Caspase-8 的死亡结构域相互募集,形成 NLRP3/ASC/Caspase-8 复合物,并可活化 Caspase-8,Caspase-8 活化后可裂解 Bcl-2 家族成员 Bid,产生的 Bid 移位至线粒体,诱导线粒体损伤、线粒体内凋亡相关蛋白(Bax、Bcl-2)的释放及细胞色素 C 的释放,释放的细胞色素 C 与凋亡,蛋白酶活化因子 Apaf-1 结合形成多聚复合体,募集并活化 Caspase-9 及 Caspase-3,最终引起细胞凋亡,进而引起线粒体内凋亡通路的活化及细胞凋亡^[17-18]。PM_{2.5}引起 NR8383 发生凋亡的机制是否与此有关将是下一步的研究方向。

综上所述,PM_{2.5}可通过溶酶体模式诱导肺泡巨噬细胞内 NLRP3 炎性小体活化,促进 IL-18 和 IL-1 β 分泌,并可引起肺泡巨噬细胞发生凋亡。

参 考 文 献

- [1] 夏伟,刘学武,王小青,等.金水宝片对 PM_{2.5} 致大鼠肺损伤的保护作用及其机制研究[J].中草药,2019,50(13):3113-3118.
- [2] Potera RM, Cao M, Jordan LF, et al. Alveolar macrophage chemokine secretion mediates neutrophilic lung injury in Nox2-deficient mice[J]. Inflammation, 2019, 42(1):185-198.
- [3] Kelley N, Jeltama D, Duan Y, et al. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(13):3328.
- [4] Yang Y, Li J, Zhu GB, et al. Spatio-temporal relationship and involvement of socioeconomic factors and PM_{2.5} in China during 1998-2016[J]. Int J Environ Res Public Health, 2019, 16(7):1149-1172.
- [5] Williams AM, Phaneuf DJ, Barrett MA, et al. Short-term impact of PM_{2.5} on contemporaneous asthma medication use: behavior and the value of pollution reductions[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(12):5246-5253.
- [6] Zhao JL, Li M, Wang ZH, et al. Role of PM_{2.5} in the development and progression of COPD and its mechanisms[J]. Respir Res, 2019, 20(1):120.
- [7] Liu S, Zhang W, Zhang F, et al. TMT-based quantitative proteomics analysis reveals airborne PM_{2.5}-induced pulmonary fibrosis[J]. Int J Environ Res Public Health, 2018, 16(1):98.
- [8] Shankar A, Dubey A, Saini D, et al. Environmental and occupational determinants of lung cancer[J]. Transl Lung Cancer Res, 2019, 8(S1):S31-S49.
- [9] Wang Z, Zhang SM, Xiao Y, et al. NLRP3 inflammasome and inflammatory diseases[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020:4063562.
- [10] 梁珍珍,吕燕平,张艳莉,等. miR-181a 参与调控香烟提取物诱导的 NR8383 肺泡巨噬细胞自噬紊乱与促炎因子的生成[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(4):710-717.
- [11] Kalymbetova TV, Selvakumar B, Rodríguez-Castillo JA. Resident alveolar macrophages are master regulators of arrested alveolarization in experimental bronchopulmonary dysplasia[J]. J Pathol, 2018, 245(2):153-159.
- [12] 顾娜,张桂贤,史鹏程,等. PM_{2.5} 致大鼠肺损伤模型中肺巨噬细胞 NLRP3 炎性小体活化研究[J]. 天津医药, 2018, 46(11):1171-1175.
- [13] 杨根梦,曾晓锋,张冬先,等. Nupr1/ERS/NLRP3 炎性小体在甲基苯丙胺诱导的神经毒性中的作用[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(3):297-300.
- [14] 李雪莲,李智洋,李宾公,等. NLRP3 炎症小体与糖尿病性心脏病研究进展[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(8):1051-1054.
- [15] Yang Y, Wang H, Kouadir M, et al. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(2):128.
- [16] 冯健愉,朱玉山,陈 仨,等. Bcl-2 家族蛋白的生理功能及结构基础[J]. 中国细胞生物学报, 2019, 41(8):1477-1489.
- [17] Tian YZ, Li H, Liu XX, et al. Pharmacological inhibition of caspase-8 suppresses inflammation-induced angiogenesis in the cornea[J]. Biomolecules, 2020, 10(2):210.
- [18] Chung H, Vilaysane A, Lau A, et al. NLRP3 regulates a non-canonical platform for caspase-8 activation during epithelial cell apoptosis[J]. Cell Death Differ, 2016, 23(8):1331-1346.

(责任编辑:唐秋姗)