



第四军医大学

The Fourth Military Medical University

分类号 R644

U D C 616-03

密 级 公开

硕士学位论文

ROS 介导的 NLRP3 炎症小体活化参与烧伤
后肺损伤的机制研究

韩士超

学 号 2222013436

培 养 类 别 全日制

学 位 类 型 学术学位

一级学科(专业类) 临床医学

二级学科(专业) 外科学(烧伤)

研 究 方 向 烧伤后脏器损伤

指 导 教 师 胡大海 教授(主任医师)

培 养 单 位 西京医院烧伤与皮肤外科

二〇一六年五月

独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：_____日期：_____

保护知识产权声明

本人完全了解第四军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为第四军医大学。本人保证毕业离校后，发表论文等使用本论文工作成果时第一署名单位仍然为第四军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：_____导师签名：_____日期：_____

目 录

缩略语表	2
中文摘要	4
ABSTRACT	7
前 言	10
文献回顾	12
正 文	26
第一部分 NLRP3 炎症小体在严重烧伤大鼠急性肺损伤中的作用研究.....	26
1 材料.....	26
2 方法.....	29
3 结果.....	36
4 讨论.....	41
第二部分 ROS 在烧伤血清诱导巨噬细胞 NLRP3 炎症小体活化中的机制研究..	44
1 材料.....	44
2 方法.....	47
3 结果.....	52
4 讨论.....	55
小 结	58
参考文献	59
个人简历和研究成果	71
致 谢	72

缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
AIM2	absence in melanoma 2	黑色素缺失蛋白 2
AMs	Alveolar Macrophages	肺泡巨噬细胞
ASC	Apoptosis-associated Specklike protein containing a CARD	凋亡相关颗粒样蛋白
CARD	Caspase-Recruitment Domain	Caspase 募集域
CCL5	C-C motif ligand 5	趋化因子 5
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease	慢性阻塞性肺疾病
CXCL4	C-X-C motif Ligand- 4	血小板因子-4
DAMP	Damage-Associated Molecular Patterns	危险信号分子模式
DCs	Dendritic Cells	树突状细胞
ET	Endothelin	内皮素
ICAM-1	Intercellular Cell Adhesion Molecule-1	细胞间黏附分子-1
IFI16	IFN- γ -inducible protein 16	干扰素- γ 诱导蛋白 16
IL	Interleukin	白介素
LPS	Lipopolysaccharide	脂多糖
LRR	Leucine-Rich Repeat	富含亮氨酸重复序列
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1	单核细胞趋化蛋白-1
MIP-1 α	Macrophage Inflammatory Protein-1 α	巨噬细胞炎症蛋白-1 α
MIP-2	Macrophage Inflammatory Protein-2	巨噬细胞炎症蛋白-2
MMP-2	Matrix Metalloproteinase-2	基质金属蛋白酶-2
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome	多脏器功能衰竭综合征
MPO	Myeloperoxidase	髓过氧化物酶
NAC	N-acetylcysteine	N-乙酰半胱氨酸
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸
NBD	Nucleotide Binding Domain	核苷酸结合域

NLRP3	NOD-like receptor-3	核苷酸寡聚结合样受体 3
NOD	Nucleotide-binding Oligomerization Domain	核苷酸寡聚结合域
PAF	Platelet Activating Factor	血小板活化因子
PAMP	Pathogen-associated Molecular Pattern	病原相关分子模式
PYD	PYRIN domain	脓素蛋白结构域
RIG-I	Retinoic acid Inducible Gene-I	维甲酸诱导基因蛋白 I
ROS	Reactive Oxygen Species	活性氧簇
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome	全身炎症反应综合症
TGF- β	Transforming Growth Factor- β	转化生长因子- β
TNF- α	Tumour Necrosis Factor- α	肿瘤坏死因子- α
TXNIP	Thioredoxin-interacting Protein	硫氧还原蛋白互动蛋白
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1	血管细胞粘附分子-1

ROS 介导的 NLRP3 炎症小体活化参与烧伤后肺损伤的 机制研究

硕士研究生：韩士超

导 师：胡大海 教授

辅 导 教 师：××× 教授

第四军医大学西京医院医院烧伤与皮肤外科科，西安 710032

中文摘要

严重烧伤会导致机体内环境发生剧烈变化，可对机体造成严重损害。创伤应激，热力的直接损害，组织灌注不足，以及全身炎症反应，这种种刺激，使严重烧伤后，损害不仅仅局限于受损的皮肤，还影响体内多种脏器的功能，产生多脏器功能障碍。严重烧伤后，多脏器功能不全发病率高达 28.1%，一旦发生，难以逆转。由于肺脏与外界环境直接相通，容易受到外界环境因素的侵袭，因此对严重烧伤患者，尤其是伴有吸入性损伤或基础肺疾病的患者，肺损伤是烧伤后脏器损伤中最常见的损伤之一。多种因素参与了急性肺损伤的发病机制，其归纳起来主要分为两大部分：细胞因素和体液因素。细胞因素包括活化的炎性细胞如中性粒细胞、巨噬细胞以及肺固有细胞如肺泡上皮细胞、血管内皮细胞等。体液因素包括各种炎性介质、细胞因子、氧化应激等。严重烧伤后，可以激活其中的多种因素，对肺脏造成损伤。其中炎性细胞大量活化，合成和释放一系列的炎性介质，从而导致强烈的全身炎症反应，是烧伤诱导肺损伤的重要原因。

NLRP3 炎症小体是固有免疫的组成成分，是由多种蛋白组成的复合体。炎症小体能够调节 caspase-1 的活化进而在天然免疫防御的过程中促进细胞因子前体 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 的切割成熟，而 IL-1 β 和 IL-18 是强有力的炎症启动因子，能够促进炎症反应的发生。因此我们推测 NLRP3 炎症小体在烧伤后肺损伤的发病过程

中起着重要作用。故本研究通过在体和离体实验，探究了严重烧伤后 NLRP3 炎症小体信号通路的表达及其对肺损伤的作用，并进一步研究了烧伤后 NLRP3 炎症小体活化的机制。

实验方法：

1. 建立 30% 总体表面积严重烫伤大鼠肺损伤模型，并检测烫伤后各时间点 NLRP3、Caspase-1 等炎症小体信号在肺组织中的表达水平及 IL-1 β 、IL-18 等炎症启动因子在血清和肺组织中的表达，探讨严重烧伤后 NLRP3 炎症小体的活化情况并为后续实验确定时间节点。
2. 通过腹腔注射 NLRP3 炎症小体抑制剂 BAY11-7082，观察其对严重烫伤大鼠 NLRP3 炎症小体信号通路活化的影响；通过观察肺组织病理切片，肺损伤指标研究其对严重烫伤大鼠肺损伤的效应，探讨 NLRP3 炎症小体在严重烧伤后肺损伤中的作用。
3. 通过分离提取大鼠肺泡灌洗液中的肺泡巨噬细胞并用严重烧伤大鼠血清刺激来模拟烧伤后肺损伤的微环境，观察烧伤血清刺激后肺泡巨噬细胞中 NLRP3 炎症小体信号通路活化情况及 ROS 产生情况，探讨严重烧伤后 NLRP3 炎症小体活化的可能机制。
4. 通过使用 ROS 清除剂 N-acetylcysteine，观察烧伤血清刺激肺泡巨噬细胞后 NLRP3 炎症小体信号通路活化情况，明确 ROS 在严重烧伤后 NLRP3 炎症小体活化过程中的作用。

主要结果：

1. 大鼠 30% 总体表面积烫伤后，肺组织中 NLRP3、Caspase-1 等炎症小体信号及 IL-1 β 、IL-18 等炎症启动因子的基因和蛋白水平在烫伤后 48h 呈时间依赖性逐渐升高趋势，并在 24h 或 48h 达到最高值。
2. 腹腔注射 NLRP3 炎症小体抑制剂 BAY11-7082 后，严重烫伤大鼠肺组织中的 NLRP3、Caspase-1 等炎症小体信号及 IL-1 β 、IL-18 等炎症启动因子的基因和蛋白水平被显著抑制，且抑制 NLRP3 炎症小体的活化可显著减轻严重烧伤引起的肺部病理损害，降低肺部的炎症水平。
3. 烧伤血清刺激肺泡巨噬细胞后，细胞内 NLRP3 炎症小体信号通路显著活化，ROS 水平显著升高。ROS 可能调控严重烧伤后 NLRP3 炎症小体的活化。

4. 使用 ROS 清除剂后，烧伤血清刺激的肺泡巨噬细胞中的 NLRP3 炎症小体活化程度可被显著抑制，说明严重烧伤后 NLRP3 炎症小体的活化是部分 ROS 依赖的。

结论：

烧伤后可激活肺泡巨噬细胞中的 NLRP3 炎症小体信号通路，而活化的 NLRP3 炎症小体可进一步促进 IL-1 β 和 IL-18 等炎症启动因子的表达，进而扩大炎症反应，导致肺损伤。烧伤诱导的 NLRP3 炎症小体活化是部分 ROS 依赖的过程。而抑制 NLRP3 炎症小体的活性或清除细胞内过量的 ROS，均可有效减轻肺损伤。

关键词：烧伤；肺损伤；NLRP3；炎症小体；ROS；IL-1 β ；IL-18

ROS-Mediated NLRP3 Inflammasome Activity Is Essential for Burn-Induced Acute Lung Injury

Candidate for master: Han Shichao

Supervisor: Hu Dahai Professor

Tutor:

Department of Burns and Cutaneous Surgery, Xijing hospital,

Fourth Military Medical University,

Xi'an 710032, China

Abstract

Severe burns can cause dramatic changes in the body homeostasis, leading to serious damage to the body. Traumatic stress, direct heat damage, inadequate tissue perfusion, and systemic inflammatory response, all these stimulus, so that after severe burns, damage is not limited to skin, but also affects many body organs function, resulting in more function disorders. After burns, multiple organ dysfunction incidence rate of 28.1%, in the event, it is difficult to reverse. Since the lungs directly connected with the external environment, vulnerable to external environmental factors, so severely burned patients, especially patients with inhalation injury or underlying lung disease, lung injury is the most common injury after burns. A variety of factors involved in the pathogenesis of acute lung injury, which mainly divided into two parts: cell factors and humoral factors. Cells include activated inflammatory cells such as neutrophils, macrophages, and pulmonary resident cells, such as lung alveolar epithelial cells, vascular endothelial cells. Humoral factors include a variety of inflammatory mediators, cytokines, oxidative stress. After severe burns, a variety of factors are activated and result in lung damage. Wherein after severe burns, plenty of inflammatory cells are activated, synthesize and release a number of inflammatory mediators, leading to strong systemic inflammatory response, it is an

important cause of burn-induced lung injury.

NLRP3 inflammasome is a component of innate immunity, it is a combination of complex proteins. Inflammasome can regulate caspase-1 activity, thus contributing to the activation of cytokine precursor pro-IL-1 β and pro-IL-18 in the course of natural immune defense. IL-1 β and IL-18 is a powerful inflammatory initiation factor, which can promote inflammatory reactions. Therefore, we hypothesized that NLRP3 inflammasome plays an important role in the pathogenesis of lung injury after burns. In this study we explored the NLRP3 inflammasome signaling pathway expression by in vivo and in vitro experiments, and its effects to lung injury, and we further explore the mechanism of NLRP3 inflammasome activation.

Main methods:

1. We established 30% of total body surface area model of lung injury in rats following severe burns and test NLRP3, Caspase-1 inflammasome signal in lung tissue and the level of IL-1 β , IL-18 in serum and lungs at each time point, to explore the activation of inflammasome signal after severe burns and determine the time point for subsequent experiments.
2. Inhibition of NLRP3 inflammasome by intraperitoneal injection BAY11-7082, and observe its effect on NLRP3 inflammasome signal pathway activation in rats with severe burn; through biopsy of lung tissue, lung injury indicators lungs of rats with severe burn to explore the role of inflammation NLRP3 inflammasome after severe burn injury in the lung.
3. Isolation rat alveolar macrophages from bronchoalveolar lavage fluid and simulated with burn serum to simulate burn lung injury microenvironment, and observe NLRP3 inflammasome signaling pathways activation and ROS production after burn serum stimulation of alveolar macrophages, and explore the possible mechanism of NLRP3 inflammasome activation after severe burn.
4. By using the ROS scavenger N-acetylcysteine, observe NLRP3 inflammasome signaling pathways activation after burn serum stimulation of alveolar macrophages, to

verify the role of ROS in NLRP3 inflammasome activation process after severely burned.

The main results are:

1. The mRNA and protein expression of NLRP3, Caspase-1 inflammasome signaling pathways and IL-1 β , IL-18 within 48h after 30% of the total body surface area burns rat lung tissue is gradually increased in a time-dependent manner, and reached the highest value at 24h or 48h.
2. After intraperitoneal injection NLRP3 inflammasome inhibitor BAY11-7082, the expression of NLRP3, Caspase-1 inflammasome signaling pathways and IL-1 β , IL-18 gene and protein was significantly inhibited in severe burns lung tissue, and the inhibition of NLRP3 inflammasome activation can significantly reduce severe burns caused lung pathology damage by reduced inflammation response in lungs.
3. Intracellular signaling pathways of NLRP3 inflammasome significant activate, and ROS levels were significantly increased after burn serum stimulation of alveolar macrophages. ROS may regulate NLRP3 inflammasome activation after severe burns.
4. After using ROS scavenger, NLRP3 inflammasome signal activation in the burn serum stimulation of alveolar macrophages can be significantly suppressed, indicating activation of NLRP3 inflammasome is part of ROS-dependent.

Conclusions:

This study demonstrated that burn injury activates the NLRP3 inflammasome in AMs, which promotes the release of inflammatory initiating cytokines, such as IL-1 β and IL-18, and amplifies the inflammatory response to cause ALI. Additionally, burn injury-induced NLRP3 inflammasome activity is a partial ROS-dependent process. Inhibition of either NLRP3 or ROS activity alleviates ALI.

Key words: Burn injury; Acute lung injury; NLRP3; Inflammasome; ROS; IL-1 β ;
IL-18

前 言

肺脏与外界环境直接相通，很容易受到外界环境因素的侵袭，因此对严重烧伤患者，尤其是伴有吸入性损伤或基础肺脏疾病的患者，肺脏是其最常累及的脏器之一，同时肺损伤也是严重烧伤最主要的死亡原因。临床上严重烧伤后肺损伤的发生机制非常复杂，主要包括吸入性损伤；误吸；氧中毒；大量丢失液体后继续补液，由于操作或计算失误补液过多或病人个体的差异，可进一步加重肺损害；休克导致机体产生应激反应，肾素血管紧张素醛固酮系统以及交感肾上腺素系统功能亢进，引起肺血管收缩，肺动脉压力升高，液体大量渗出至肺组织，导致肺水肿，同时由于缺血缺氧损害，以及补充液体之后的再灌注损害，可引起肺内固有细胞的直接损伤；烧伤后 48h 之内机体处于休克期，感染并不明显，但肺组织可出现强烈炎症反应，这种情况的出现可能是由于肺脏受到吸入性损伤的破坏或机体缺血再灌注后，肺组织内的正常细胞受到破坏，引起的防御反应。以上这些因素，除去不可控的因素如吸入性损伤以及操作失误如误吸、氧中毒外、过度补液外，休克和炎症反应的发生在烧伤后肺损伤的发生过程中尤为重要。目前临床上针对烧伤后肺损伤的原因进行了针对性的处理，大大降低了烧伤后肺损伤的发病率，但对严重烧伤病人尤其是重症烧伤病人，肺损伤依然是其死亡的主要原因。

炎症小体是先天性免疫的一部分，它是机体细胞内感受内外环境中有害物质刺激的主要成分，它同细胞膜表面的 Toll 样受体 (Toll like receptors, TLRs)、C 型凝集素受体 (C type lectin receptors, CLR) 等膜表面受体一道，一起构成了细胞识别内源或外源刺激的模式识别受体 (Pattern Recognition Receptor)，共同筑建了机体的固有免疫防御系统。然而目前的研究主要集中在了膜表面的模式识别受体，对胞内的模式识别受体的研究还远远不够。在炎症小体的研究中，NLRP3 炎症小体是研究最为广泛的炎症小体。它可识别一系列刺激因素，外源性因素如各种病原微生物如仙台病毒、流感病毒、腺病毒等各种病毒；或酿酒酵母菌、白假丝酵母菌等真菌；或葡萄球菌、李斯特单核细胞菌、福氏志贺菌等多种病菌，均可激活 NLRP3 炎症小体；其次一些无机化合物颗粒如硅颗粒、石棉颗粒等也可活化 NLRP3 炎症小体；再次，多种内源性刺激如胞外 eATP、胞内 ROS、损伤细胞释放的透明质酸、组织蛋白酶、错误折叠的蛋白、淀粉样蛋白 β 、高血糖、谷氨酸钠、钙盐沉积等也可激活 NLRP3

炎症小体，进而促进炎症反应的发生，加重组织损害。而在这些刺激因子中，有很多因素都参与了严重烧伤后肺损伤的发病机制。同时 NLRP3 炎症小体参与了多种疾病的发生发展过程，如心肌缺血再灌注损害、LPS 诱导的肺损伤、失血性休克后脏器损伤等一系列急性损伤疾病的发病过程，同时它也在慢性损伤疾病如纤维化、慢性炎症、神经退行性疾病中扮演着重要角色。而严重烧伤的发病过程和这些疾病有很多相似之处，因此我们有理由推测 NLRP3 炎症小体在烧伤后肺损伤中也可能发挥着重要的作用。

在本实验中我们采用严重烫伤大鼠诱导的肺损伤模型，探究了 NLRP3 炎症小体在严重烧伤后肺组织中的表达及作用；同时我们提取烧伤大鼠血清刺激肺泡巨噬细胞来模拟烧伤后肺组织中的微环境，探索了烧伤后肺泡巨噬细胞活化的机制。从而为临床上严重烧伤病人肺损伤的预防和治疗提供了新的思路和研究方向。

文献回顾

一、严重烧伤诱导的肺损伤

烧伤是指热力（包括热液、蒸汽、高温气体、火焰、炽热金属等）所引起的机体组织损害，主要累及皮肤或粘膜，严重者可伤及皮下或粘膜下组织，如肌肉、骨、关节甚至内脏。而随着社会的发展，由电能、化学物质或放射线等损伤因素所致的组织损害和临床过程与热力烧伤类似，因此临床习惯上将其也归于烧伤一类。

烧伤尤其是严重烧伤时，机体皮肤黏膜屏障受到破坏，易受到外界因素的侵袭，同时机体内环境稳态发生剧烈变化，很容易导致系统性炎症反应综合征（systemic inflammatory response syndrome, SIRS）甚至多脏器功能不全综合征（multiple organ dysfunction syndrome, MODS）^[1,2]。由于肺脏与外界环境直接相通，容易受到外界环境因素的影响，因此对严重烧伤患者，尤其是伴有吸入性损伤或基础肺疾病的患者，肺脏是烧伤后 MODS 中最常累及的脏器之一，同时烧伤后急性肺损伤也是烧伤后病人最主要的死亡原因之一^[3-5]。如何有效控制烧伤后肺损伤的发生，是每一个烧伤临床医师所必需面对和思考的问题。

严重烧伤对机体造成的损害主要来源于创伤刺激、热力直接侵害以及组织灌注不足，这种种刺激可导致过量炎症反应、氧化应激损害以及凋亡等二次损害，最终导致急性肺损伤或急性呼吸窘迫综合症。

急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征是由肺内或肺外各种复杂因素引起的，以顽固性低氧血症为显著特征的临床综合征。肺气体交换界面发生急性炎症，而失控的炎症反应进一步促进肺组织内白细胞和血小板的堆积，进而导致促凝血系统活化以及肺泡毛细血管屏障受损，临床上主要表现为低氧血症、呼吸功能受限以及肺水肿^[6]。急性肺损伤最根本的病理过程是血管内皮和肺泡上皮细胞受到破坏，肺泡毛细血管屏障功能受损，伴随大量炎症细胞浸润，进而引起肺组织水肿、肺出血以及严重的气体交换障碍^[7]。多种因素参与了急性肺损伤的发病机制，其归纳起来主要分为两大部分：细胞因素和体液因素。不同类型的细胞和不同的介质在急性肺损伤发病过程中发挥着不同的作用，下面我们对现阶段不同细胞在急性肺损伤中发挥的作用作一简介。

1. 急性肺损伤发病的细胞因素

肺泡上皮细胞与急性肺损伤

肺泡内上皮细胞可分为两类，其中 I 型肺泡上皮细胞较扁平，约占肺泡表面积的 90%，主要参与肺部气体交换；II 型肺泡上皮为立方形，所占面积较少，但其数目较多，具有多种功能，它能产生肺表面活性物质，有利于肺泡内液体的清除^[8, 9]。

与内皮细胞屏障相比，肺泡上皮细胞屏障的通透性较差，因此当急性肺损伤发生时，一旦上皮细胞完整性受到破坏，很容易导致血管中富含蛋白的液体渗出至肺泡^[10, 11]，同时伴随基底膜玻璃样变性；并且肺泡上皮受到破坏可抑制肺泡内液体的回吸收，影响肺泡内液体的清除，从而加重肺水肿^[12]；同时肺泡上皮细胞主要参与气体交换，一旦受损，可引起顽固的低氧血症^[13]。在急性肺损伤时，上皮细胞受损的程度和病人的预后呈正相关关系^[14, 15]，提示了其在急性肺损伤中的重要作用。急性肺损伤时，上皮细胞主要表现为 I 型肺泡上皮的广泛性坏死，且 I 型肺泡上皮对损伤敏感，而 II 型肺泡上皮则具有较强抵抗性，并能在上皮细胞受损后形成前体细胞，生成新的上皮细胞，促进上皮的再生。同时对急性呼吸窘迫致死的病人进行尸检发现其肺泡上皮中促凋亡蛋白 Bax 高表达且 DNA 碎片增多^[16, 17]。进一步研究发现急性肺损伤时，肺泡上皮细胞的 Fas 受体大量活化，而浸润的单核细胞和中性粒细胞是 Fas 配体的重要来源^[18, 19]，表明炎症细胞和肺泡上皮细胞相互作用可导致肺泡上皮细胞凋亡。下调 Fas 的表达或抑制与凋亡密切相关的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (caspase-3)，能够明显减少肺泡上皮细胞的凋亡以及肺组织炎症反应^[20]。而激活肺泡上皮细胞的 Fas，可促使其释放 TNF- α 、MIP-1 α 、MIP-2、MCP-1 以及 IL-6 等促炎细胞因子^[21]，促进炎症反应发生，进而破坏肺泡毛细血管屏障，加重肺损伤。

血管内皮细胞与急性肺损伤

血管内皮细胞呈连续状单层排列在血管内膜，它与肺泡内皮细胞以及他们各自的基底膜一起构成肺泡毛细血管屏障，是肺内进行气体交换的主要部位。同时肺毛细血管内皮细胞还参与血液和肺间隙间的水分和营养物质的交换^[22]。肺血管内皮细胞还具有重要的代谢功能，它不仅能够清除血液中内皮素、血管紧张素 I 或血管缓激肽等物质，在受到刺激时，还可生成一系列血管活性物质如血管紧张素 II、一氧化氮或前列环素，从而调节自身及周边血管内皮细胞的张力，细胞增殖及血管形成

[23]。肺血管内皮细胞还可以分泌一系列炎症介质或影响炎症细胞的迁移及活化来调节炎症反应，参与机体的防御功能^[24, 25]。

急性肺损伤时，肺血管内皮细胞受到严重损伤，内皮细胞 F-肌动蛋白、肌球蛋白发生重排，细胞骨架蛋白收缩，细胞间距增大^[26]，同时内皮细胞产生血小板活性因子 PAF、内皮素 ET-1^[27]等，使内皮细胞通透性增高，内皮细胞进一步损伤，最终可导致凋亡或坏死，这一系列变化致使血管通透性增加，大量液体渗出至肺组织间隙引起肺水肿，同时由于内皮间隙增大，大量的炎性细胞穿透血管膜浸润至肺组织，释放大量的组织水解酶、细胞因子以及氧化活性物质破坏正常肺组织结构。肺血管内皮细胞受到破坏后，其表面表达大量细胞间粘附分子 ICAM-1、血管细胞粘附分子 VCAM-1、E-选择素等白细胞粘附分子及细胞趋化因子^[28]，促进炎症细胞粘附聚集于内皮细胞表面，并穿过内皮间隙向受损肺组织局部定向迁移，因而内皮细胞在急性肺损伤中炎症反应的发生及其级联放大过程中起着至关重要的作用。其次急性肺损伤时，肺血管内皮细胞代谢功能失调，缩血管活性物质大量升高，如 ET、PAF、血管紧张素 II、血栓素等，而舒张血管物质生成大量减少，引起血管严重收缩，肺动脉压力增高^[29, 30]；同时内皮细胞损伤时，可吸引大量血小板和炎症细胞聚集，而内皮细胞分泌的促凝血物质增加，抗凝血物质减少，最终可导致弥漫性血管内凝血^[31]，加重肺损伤。

肺泡巨噬细胞与急性肺损伤

肺内巨噬细胞有多种不同的亚型，而肺泡巨噬细胞由于提取简便，且其含量最多，故对其研究比较深入广泛。肺泡巨噬细胞是吞噬细胞的一种，它定居在肺内或粘附于肺泡壁，其形态和功能具有不均一性，相比间质巨噬细胞，它具有更强的粘附和吞噬功能^[32]。生理状态下，肺泡巨噬细胞在保护肺组织免受外界环境如灰尘、细菌、病毒等刺激过程中发挥着重要的作用；然而在急性肺损伤时，内外环境中的刺激可使肺泡巨噬细胞大量活化，表达和释放一系列的趋化因子、粘附分子，如单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1)，巨噬细胞炎症蛋白 2 (MIP-2) 等，而这些趋化因子和粘附因子能募集大量炎性细胞至损伤的肺组织处，进而扩大炎症反应，加重组织损伤^[33]。同时活化的巨噬细胞还可以释放大量的促炎因子如 IL-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-8 等^[34]，这些促炎因子不仅可以直接损伤肺组织，还能够进一步活化炎症细胞，释放更多的炎症因子，形成级联放大效应，产生失控性炎症反应。

研究表明急性肺损伤时,肺泡巨噬细胞内 NF- κ B 通路显著活化,而 NF- κ B 通路与多种炎症因子基因的调控具有直接联系,提示巨噬细胞内 NF- κ B 通路的活化可能是导致急性肺损伤的关键环节^[35]。肺泡巨噬细胞还可以表达凋亡配体 FasL,从而诱导肺泡上皮细胞凋亡^[36],同时肺泡巨噬细胞本身也表达凋亡受体 Fas,其活动也受到凋亡的调控。肺泡巨噬细胞表面 FasL 与 Fas 的结合,一方面可促使巨噬细胞凋亡,另一方面还可以改变其分泌的细胞因子^[37],进而可能在急性肺损伤炎症的转归与修复方面发挥着重要的作用。

中性粒细胞与急性肺损伤

正常情况下中性粒细胞在机体的防御反应中发挥着重要作用,他们能够清除病原微生物,或限制其扩散浸润,对机体有重要的保护作用,但过度活化的中性粒细胞却可导致机体损伤。

肺组织内大量中性粒细胞浸润和活化是急性肺损伤的特征。在肺损伤早期,中性粒细胞即可浸润至肺组织,中性粒细胞定向迁移至损伤肺组织的过程是一个复杂的过程,它涉及中性粒细胞的捕获、翻滚、活化、粘附、渗出等多个过程,这其中炎症因子参与了每一步的过程^[38]。急性肺损伤时,损伤因素和炎症因子的释放可促使中性粒细胞的产生,进而血管内皮细胞表面表达大量的糖蛋白样的 E 选择素或 P 选择素,通过与中性粒细胞表面的 L 选择素相结合,而诱导中性粒细胞粘附聚集于内皮细胞表面^[28]。由于中性粒细胞的直径比肺泡毛细血管间隙的直径大,因此中性粒细胞必须改变其自身形状,形成阿米巴样的运动才能穿过毛细血管壁屏障,在这个过程中,炎症因子和胞内信号分子的活化能使中性粒细胞骨架发生改变,有利于其变性^[39]。一旦迁移至肺泡腔,中性粒细胞即释放大量蛋白水解酶和氧化活性物质,从而加重肺组织损伤。中性粒细胞合成 ROS 主要有两种途径,即 NADPH 氧化酶途径和 NO 合成酶途径。NADPH 氧化酶生理状态下存在于胞膜或胞浆中,一旦中性粒细胞活化,NADPH 氧化酶可形成具有氧化酶活性的复合体,催化 NADPH 生成 NADP 和超氧化物^[40];同时活化的中性粒细胞可转录激活一氧化氮合酶,合成大量 NO,进而同巯基化合物反应,生成大量超氧化物^[41],而导致组织氧化损伤。生理状态下,成熟的中性粒细胞在外周血中大概只能存活 6-12h,一旦病原微生物或坏死细胞被清除,中性粒细胞也随之凋亡坏死。但急性肺损伤时,其自身或周围的巨噬细胞等释放的炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 或集落刺激因子可显著抑制中性粒细胞的凋亡,

其机制可能是通过集落刺激因子受体或与 caspase-3/9 的活性降低有关^[42]。

血小板与急性肺损伤

血小板在凝血和溶血平衡中发挥着重要作用，但最近研究发现血小板在机体防御与炎症发展过程中也起着重要作用。血小板可通过其表面的 Toll 样受体被外界多种病原相关分子信号刺激所活化，释放大量微生物杀伤分子或直接吞噬病原，抵抗病原入侵^[43]，除此之外，血小板还可调节血管内皮细胞和白细胞的功能。研究表明，在多种急性肺损伤模型中，血小板-中性粒细胞相互作用可释放多种血小板源的趋化因子如 CCL5、CXCL4 以及 P 选择素等，可能是肺泡内中性粒细胞募集的重要因素，除此之外，血小板还可以分泌多种代谢产物如 IL-1 β 、血栓素 A2 等从而增强中性粒细胞的活性^[44]。血小板、炎性细胞和内皮细胞之间的相互作用，提示炎症过程和凝血过程存在串话，共同参与肺损伤的发病机制^[45]。

急性肺损伤的发病机制复杂，多种细胞因素参与了其发病过程（见图 1），尽管目前关于急性肺损伤的研究已取得了很大进展，但其详机制目前仍不清楚。

2. 急性肺损伤发病的体液因素

急性肺损伤发病的另一重要机制是体液因素，由于其涉及的种类和数目较多，这里不一一展开叙述，但由于急性肺损伤最重要的原因是失控性炎症反应，因此根据其炎症的关系可主要分为三类。第一类是促进炎症反应的因素，这类因素包括大量细胞因子、趋化因子以及一些促进炎症细胞转运与活性的其他介质如 CXCL 趋化因子、IL-8、TNF- α 、IL-6、高迁移率蛋白 HMGB1、血管紧张素 AT1 等；第二类是粘附分子如细胞间粘附分子 ICAM-1、选择素等；第三类是炎症细胞效应分子如血小板活化因子 PAF、组织蛋白酶、活性氧 ROS、NADPH 氧化酶、基质金属蛋白酶等^[46]。

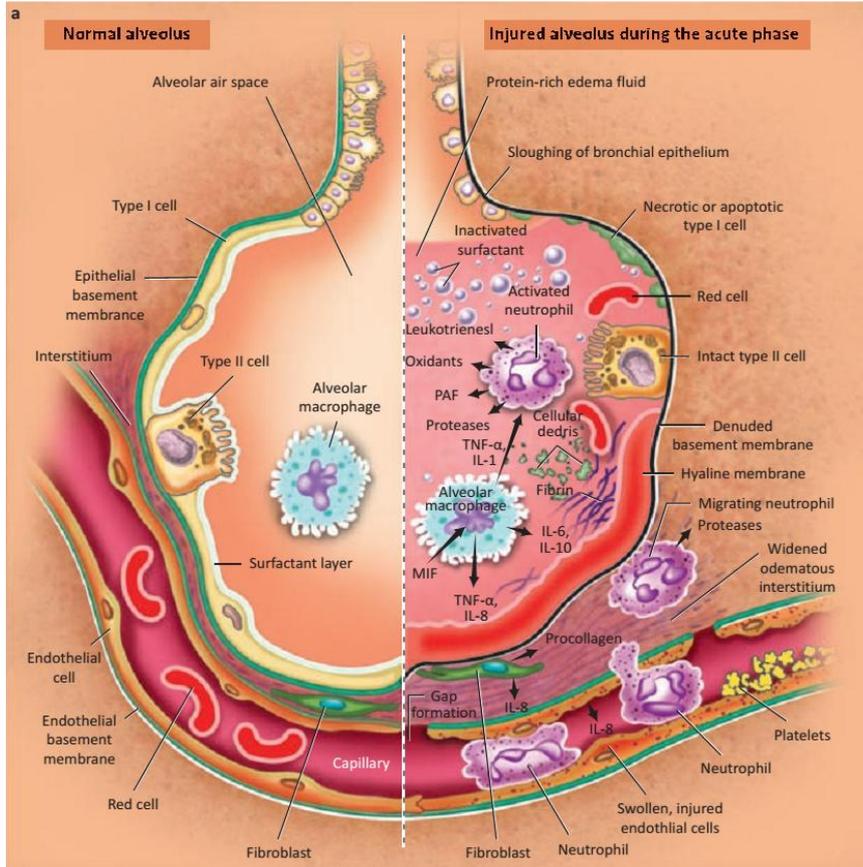


图 1 急性肺损伤发病的细胞机制

[Parekh, D etc. Clin Med 2011, 11:615-8]

二、炎症小体

当病原体侵入机体，最先产生免疫应答反应的就是先天性免疫，从而保护机体免受侵袭。先天性免疫反应在进化过程中高度保守，是机体在长期种系发育和进化过程中不断地与入侵的病原体作斗争而逐渐形成并能够稳定遗传的免疫反应，是植物、真菌、昆虫以及原生多细胞生物最主要的免疫系统^[47]。先天性免疫的特点是作用较广，能针对多种病原体产生应答，但专一性或针对性较差，故又称为非特异性免疫。

Toll 样受体（TLRs）和 C 型凝集素受体（CLRs）是表达在细胞膜上的模式识别受体，他们能识别各种不同的病原相关分子模式（PAMP）^[48]，如革兰阳性菌的肽聚糖和磷壁酸，革兰阴性菌的脂多糖（LPS）、某些病原体的脂蛋白、具有鞭毛蛋白的某些细菌、一些病毒的中间产物或者一些内源性降解产物^[49]等等，从而导致单核-巨噬细胞系统活化，吞噬杀伤入侵的病原微生物或异常代谢产物，同时释放一系列炎

症因子与细胞因子，引起一系列炎症反应，产生非特异性免疫应答。

但细胞膜表面的模式识别受体并不能完全识别所有的病原相关分子模式（PAMP）或危险信号分子模式（DAMP），仍有一部分“漏网之鱼”逃过其识别，他们或直接进入细胞内，造成细胞损伤，或通过间接作用，引起细胞各种平衡失调。有趣的是，在细胞胞质内也存在有一系列的模式识别受体，他们能够识别这些“逃逸”的病原相关分子模式或危险信号分子模式，构成机体另一道防御屏障，其中最重要的是炎症小体家族。

典型的炎症小体是由感受蛋白（如各种类型的炎症小体蛋白）、连接蛋白即凋亡相关颗粒样蛋白（Apoptosis-associated Speck like protein containing a Caspase-recruitment Domain (CARD), ASC）以及效应蛋白半胱氨酸蛋白酶 caspase-1 组成^[50]。富集的炎症小体能够使 caspase-1 转化成其活化形式，而活化的 caspase-1 可以促使 IL-1 β 和 IL-18 的前体向其活化形式转变，进而促进炎症反应的发生。除了促进炎症因子的分泌，炎症小体的活化还可以诱发炎症细胞死亡即焦亡（pyroptosis），从而阻断胞内病原体的复制^[51]。现如今炎症小体的研究已成为免疫学中发展最为迅猛的方向之一。炎症小体不仅在机体抵抗外界病原体入侵的过程中发挥重要作用，而且在肿瘤的发生^[52]、自身免疫疾病^[53]、代谢^[54, 55]、神经退行性疾病^[56]方面也具有重要作用。

核苷酸结合寡聚结构域样受体（Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD)-like receptors, NLRs）即 NOD 样受体（NLRs）是一大类细胞内模式识别受体家族，不同物种间其成员数量不同，在人类含有 22 个 NOD 样受体，而小鼠则含有 34 个 NOD 样受体。他们能识别多种病原相关分子模式或危险信号分子模式，从而介导先天性免疫反应，抵抗外界病原感染以及内源性损伤。

经典的 NLRs 主要由三部分构成：即 C 端的富含亮氨酸重复序列（leucine-rich repeat (LRR) domain），其主要作用是用来感受各种刺激信号或结合配体；中间的核苷酸结合域（nucleotide binding domain, NBD），其主要作用是用来介导 NLRs 的聚集；以及 N 端的脓素蛋白结构域（PYRIN domain, PYD）和/或 caspase 募集域（caspase-recruitment Domain, CARD），其作用是连接下游的接头蛋白或效应蛋白。而连接蛋白 ASC 主要含有两部分，即 PYD 和 CARD，其中 PYD 可以和 NLRs 相互连接，CARD 可以和效应蛋白 caspase-1 上的 CARD 域相互结合^[57]。图 2 是不同类型

的 NLRs 的结构图。

NOD 样受体依据其所含有的特定的 NLR 结构域而命名, NLRs 参与的炎症小体复合体包括 NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP12 和 NLRC4, 同时黑色素缺失蛋白 2 (absence in melanoma 2, AIM2) 以及干扰素- γ 诱导蛋白 16 (IFN- γ -inducible protein 16, IFI16) 也可使炎症小体聚集, 因此也被归于此^[58]。以下是几种主要炎症小体的结构示意图。

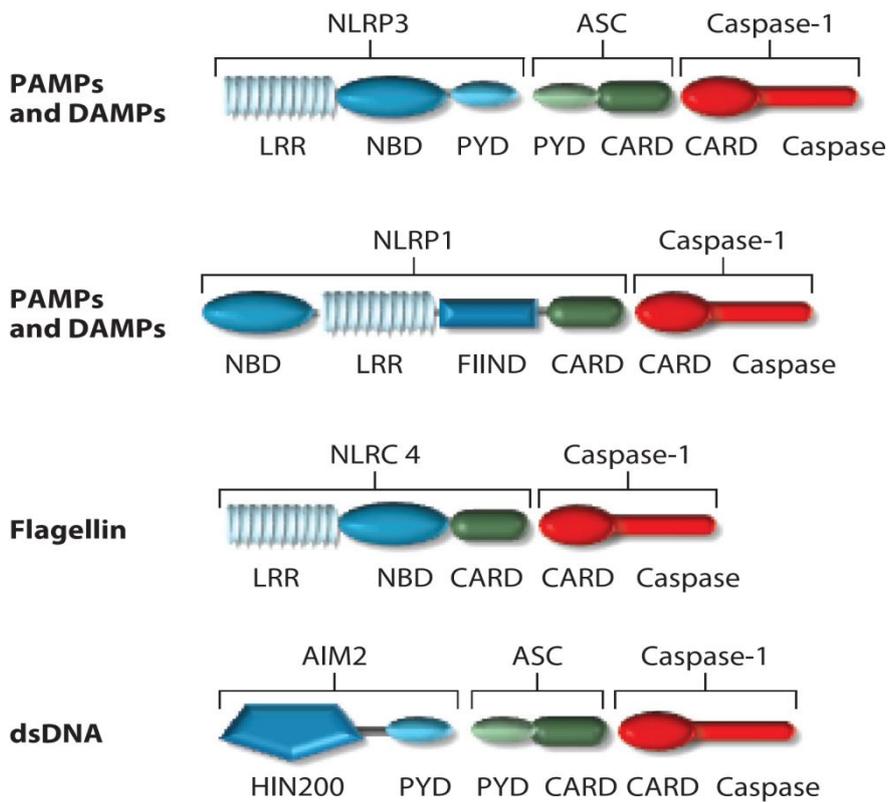


图 2 不同类型 NLRs 的结构组成

[Netea, M.G etc. Annu Rev Immunol 2015, 33:49-77]

1. NLRP3 炎症小体

NLRP3 炎症小体是研究最为广泛的炎症小体, 它能识别一系列危险信号并在多种疾病中诱发无菌性炎症反应。NLRP3 炎症小体是由结合蛋白 NLRP3, 连接蛋白 ASC 以及效应蛋白 caspase-1 组成。

多种内源性和外源性的刺激可以激活 NLRP3 炎症小体。各种病原微生物如仙台病毒、流感病毒、腺病毒等各种病毒; 酿酒酵母菌、白假丝酵母菌等真菌; 葡萄球菌、李斯特单核细胞菌、福氏志贺菌等多种病菌^[59-63], 均可激活 NLRP3 炎症小体。

其次，多种内源性刺激如胞外 eATP、损伤细胞释放的透明质酸、淀粉样蛋白 β 、高血糖、谷氨酸钠、钙盐沉积等也可激活 NLRP3 炎症小体活化^[59, 64, 65]。再次，一些异物颗粒如硅颗粒、石棉颗粒等也可以诱导 NLRP3 炎症小体活化^[66, 67]。当 NLRP3 的 LRR 被活化后，NLRP3 通过 NBD 相互结合而多聚化，其 PYD 端可以和 ASC 连接蛋白的 PYD 端同型结合，进而通过 ASC 的 CARD 端募集 caspase-1。而一旦 NLRP3 炎症小体多聚化后，caspase-1 也相互聚合，发生构象改变，将其末端的非活性段蛋白水解，从而具有活性^[68]。活化的 NLRP3 炎症小体立体结构示意图见图 3。活化的 caspase-1 又称为 IL-1 β 转化蛋白，能够促使 IL-1 β 和 IL-18 由其前体非活化形式向活化状态转变，这被称为信号 2。当机体受到外界病原体入侵的同时，Toll 样受体活化，通过激活下游的 NF- κ B 信号通路进而促进 IL-1 β 和 IL-18 的转录翻译，称为信号 1。这两种信号合作，才能够促进大量具有活化形式的 IL-1 β 和 IL-18 的释放，进而促进炎症的发生和疾病的发展。Caspase-1 除了切割活化 IL-1 β 和 IL-18 外，还可诱导细胞产生焦亡 (pyroptosis)。焦亡是一种具有剧烈炎症反应的细胞死亡形式，既具有凋亡的特点 (如 DNA 聚集破碎)，又具有坏死的特点 (如细胞肿胀破裂)。

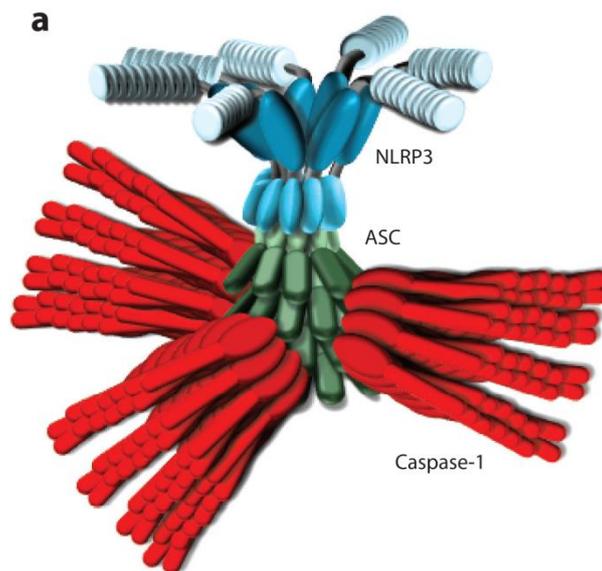


图 3 NLRP3 炎症小体三维立体结构示意图

[Netea, M.G etc. Annu Rev Immunol 2015, 33:49-77]

然而，这些刺激信号引发炎症小体活化的机制目前仍不太清楚。考虑到这些刺激信号的结构以及生化特性不尽相同，这些刺激很可能并不直接与 NLRP3 直接相互作用，相反这些互不相同的刺激信号很可能通过诱发共同的胞内反应从而激活

NLRP3 炎症小体。

研究表明 NLRP3 蛋白的 LRP 端可以识别一些共同的上游活化信号。目前比较公认的有三种上游活化信号。

1.1 钾离子外流

多项研究表明,钾离子外流对 NLRP3 炎症小体的活化是必须的。当使用药物阻断细胞内钾离子外流或提高细胞外液中钾离子浓度后,不管使用何种活化剂刺激细胞,NLRP3 炎症小体均不能活化^[61,62]。众所周知,细胞外 eATP 能够激活 ATP 门控离子通道 P2X7 受体,从而引发钾离子外流,同时细菌毒素也可以作用于细胞膜,导致细胞膜上出现孔隙从而引发钾离子外流,进而激活 NLRP3 炎症小体^[69]。但内外环境中各种刺激因素是如何诱导钾离子外流,以及钾离子外流是否是由于特定的离子通道活化还是细胞膜受到破坏而导致非选择性的离子通透性增加仍不得知。另一方面,单独的钾离子外流并不足以引起 NLRP3 炎症小体活化。当细胞培养基中的钠离子 (Na^+) 被同等浓度的锂离子 (Li^+) 或胆碱取代^[70],或培养基中的氯离子 Cl^- 被氢硫根离子 SCN^- 或碘离子 I^- 所取代时^[71],细胞外 eATP 并不能诱导 NLRP3 炎症小体活化。上述试验表明 NLRP3 炎症小体活化时涉及到细胞内外离子环境的整体改变。

1.2 ROS 生成

NLRP3 炎症小体活化的另一项上游活化信号是活性氧 (ROS)。研究表明,使用 ROS 的化学清除剂、抑制 NADPH 氧化酶或 siRNA 干扰 NADPH 氧化酶亚单位 $\text{p}22^{\text{phox}}$ 从而抑制 ROS 的产生均可广泛抑制 NLRP3 炎症小体的活化^[72]。另一项研究表明,ROS 可直接促使硫氧还原蛋白互动蛋白 (thioredoxin-interacting protein, TXNIP) 与 NLRP3 结合,从而激活 NLRP3 炎症小体^[73],促进炎症反应的发生。

尽管已经证实 ROS 是 NLRP3 炎症小体的重要上游活化信号,但激活 NLRP3 的 ROS 产生的来源仍不清楚。多种生理过程均可产生 ROS,如细胞色素 P450 氧化酶解偶联,线粒体呼吸或黄嘌呤氧化酶、过氧化物酶以及 NADPH 氧化酶活化^[74]。使用化学抑制剂抑制线粒体复合物 I 和 II 并不能阻断石棉颗粒活化 NLRP3 炎症小体^[66],说明诱导 NLRP3 活化的 ROS 并不是线粒体来源的。而阻断不同的 NADPH 氧化酶亚单位成分,能够抑制不同的刺激信号活化 NLRP3 炎症小体。目前,ROS 调节 NLRP3 活性的机制仍有待探索。

1.3 组织蛋白酶 B 的释放

当细胞吞噬一些晶体或微小颗粒等物质时，可引起细胞内酸性溶酶体不稳定，释放组织蛋白酶 B，从而活化 NLRP3 炎症小体。当使用组织蛋白酶 B 的抑制剂或用药物干扰细胞吞噬作用，能够阻断明矾、硅、淀粉类蛋白- β 以及疟疾色素等引起的 NLRP3 炎症小体活化^[65, 75]。同时部分其他活化 NLRP3 的因素也可引起组织蛋白酶 B 释放。

总之，上述三种上游活化信号并不是单一的起作用。当细胞发生胞内离子环境或氧化还原状态发生改变时，可引起 NLRP3 的特定构象发生变化，从而促使炎症小体聚集。或者这三种上游活化信号能够调节配体的释放、结构的改变或配体的识别，从而使配体与 NLRP3 蛋白结合。同时还有一些非经典信号如胞内吞噬的细菌释放的 LPS 等可通过活化 caspase-11，进而活化 NLRP3，但其机制目前仍不清楚。

2. NLRP3 炎症小体在肺脏疾病中的作用

NLRP3 炎症小体主要表达在骨髓来源的巨噬细胞或树突状细胞 (DCs)，但同时 NLRP3 炎症小体也参与了组织细胞的多种生理病理过程。有研究通过测定小鼠各组织中 NLRP3 炎症小体 mRNA 的含量发现，NLRP3 炎症小体在脾脏中表达最高，其次就是肺脏^[76]。NLRP3 炎症小体之所以在肺脏高表达，可能是由于肺脏中含有大量的免疫细胞。实际上，动物肺泡灌洗液中有超过 90% 的细胞都是肺泡巨噬细胞^[77]，而肺泡巨噬细胞同其他肺组织中髓系来源的细胞如树突状细胞一样高表达 NLRP3 炎症小体^[78]，且肺泡巨噬细胞是肺组织中 IL-1 β 和 IL-18 的主要来源。除了肺泡中的巨噬细胞和树突状细胞，肺泡上皮细胞也可在受到刺激时活化 NLRP3 并产生 IL-1 β ^[79, 80]。NLRP3 炎症小体的活化参与了多种肺组织炎症或其他疾病的过程。

2.1 NLRP3 炎症小体与流感

全世界每年有百万人感染流感病毒，仅在美国，每年就有 40000 人因感染流感病毒而死亡^[81]。多项研究表明，NLRP3 炎症小体对小鼠流感感染模型有保护作用，当流感病毒感染 NLRP3 或 caspase-1 敲除小鼠时，其发病率大大增加^[82, 83]。而发病率和致死率的增加可能跟 NLRP3 或 caspase-1 敲除小鼠产生的 IL-1 β 和 IL-18 炎症因子水平较低，以及肺泡中炎症细胞浸润较少，从而无法启动足够的炎症反应来抵抗病毒的入侵有关。考虑到流感的高感染性以及 NLRP3 炎症小体对流感的保护作用，进一步说明了 NLRP3 炎症小体对机体的重要作用。目前仍不完全清楚流感病毒是如何激活 NLRP3 炎症小体的，但其可能是通过病毒的单链 RNA 或病毒编码的蛋白直

接与 NLRP3 相互作用而实现的。除了 NLRP3 炎症小体，流感病毒还可以激活多种模式识别受体进而启动先天性免疫反应，如 Toll 样受体或维甲酸诱导基因蛋白 I (RIG-I)，从而诱导产生 I 型干扰素，抵抗病毒入侵^[84]。

2.2 NLRP3 炎症小体与肺脏纤维化

石棉和硅是一种具有多种化学物理性质的矿物质。长期以来，石棉和硅就在工业和建筑业方面广泛使用，但长期暴露于石棉和硅的环境中，可导致肺组织纤维化，临床上称之为尘肺和石棉肺。当长时间吸入石棉颗粒或二氧化硅颗粒，肺内的巨噬细胞即肺泡巨噬细胞可将其吞噬，并持续处于炎症状态，而长期慢性炎症最终可导致肺纤维化。

NLRP3 炎症小体在石棉颗粒或二氧化硅颗粒诱导的肺纤维化中起着重要作用^[85]。当巨噬细胞吞噬了石棉颗粒或二氧化硅颗粒，细胞内的溶酶体受到破坏，胞内 ROS 产生增加，促使其释放组织蛋白酶 B，进而促使 NLRP3 炎症小体活化及 IL-1 β 的生成。进一步研究表明，NLRP3 敲除小鼠鼻内吸入石棉颗粒后，肺内炎症细胞浸润减少，肺泡灌洗液中 IL-1 β 含量降低^[66]。另一项试验中，与野生小鼠相比，吸入二氧化硅颗粒的 ASC 或 NLRP3 敲除小鼠，其肺泡中浸润的炎症细胞明显减少，胶原沉积降低，肺组织纤维化程度减轻^[75]。这些结果说明，外源性的颗粒可激活 NLRP3 炎症小体诱导炎症反应的发生，进而促使肺组织纤维化。

而与石棉或二氧化硅颗粒诱导的肺纤维化不同，特发性肺纤维化是一种肺组织急性损伤与修复循环交替的进行性周期性发作的肺间质炎症，最终导致肺纤维化，但其发生机制尚不清楚。

目前研究特发性肺纤维化最常使用博来霉素滴注模型，博来霉素是一种抗肿瘤药物，能够诱导肺泡巨噬细胞和上皮细胞 DNA 损伤和细胞死亡^[86]。据报道，与野生小鼠相比，博来霉素滴注诱导 NLRP3 敲除小鼠肺纤维化模型中的肺泡灌洗液中中性粒细胞聚集和基质金属蛋白酶 (MMP-2) 显著减少。研究进一步发现博来霉素滴注后，可在小鼠肺泡灌洗液中发现尿酸结晶，而抑制尿酸结晶的合成能够显著消除博来霉素诱导的中性粒细胞聚集和 IL-1 β 的生成。这些研究表明博来霉素可导致肺组织内尿酸结晶的沉积，而沉积的尿酸结晶可激活 NLRP3 炎症小体并进一步促进 IL-1 β 的生成，进而导致肺组织纤维化^[87]。

2.3 NLRP3 炎症小体与慢性阻塞性肺疾病 (COPD)

COPD 是慢性支气管炎、支气管扩张、肺气肿等多种气道阻塞疾病的总称，可导致呼气困难、咳嗽咳痰、以及进行性的气道阻塞。COPD 的发生可能和吸入有害气体等有关，最常见的因素是吸烟。COPD 发生时，肺组织内的多种细胞如肺泡上皮细胞、肺泡巨噬细胞、树突状细胞等以及外周迁移而来的炎症细胞均可被活化，活化的细胞产生大量的促炎症因子、ROS 以及组织降解酶等导致组织损伤和重塑、肺泡融合或慢性炎症发生。而吸烟可引起肺泡上皮损伤，导致炎细胞浸润呼吸道粘膜、粘膜下层以及腺体，促进炎症反应发生，除此之外呼吸道上皮也可以释放 TGF- β ，引起气道重塑^[88]。

尽管目前 NLRP3 炎症小体在 COPD 疾病中的作用尚不清楚，但一些间接证据表明炎症小体相关的细胞因子释放与 COPD 的病理过程相关^[89]。研究发现，COPD 病人的肺组织中 IL-1 α 和 IL-1 β 表达增高，尤其是在疾病急性加重期时，其分泌量大大增加^[90]。而过表达 IL-1 β 的小鼠肺脏的特点与 COPD 相似，肺组织呈现炎症反应、肺气肿以及肺纤维化的特点^[91]，IL-1 受体敲除小鼠肺脏则对吸烟不敏感^[92]。NLRP3 炎症小体相关的另一种炎症因子 IL-18 与 COPD 密切相关。COPD 病人血液及肺组织中 IL-18 高表达^[93]，病人痰液及血清中 IL-18 的水平与肺功能成负相关关系，强烈提示 IL-18 在 COPD 病理过程中也起着重要作用^[94]。而肺组织特异性高表达 IL-18 的转基因小鼠，肺组织出现慢性炎症改变以及肺气肿和肺动脉高压等类似 COPD 的表现。进一步研究发现，在吸烟诱导的肺气肿模型中，抑制 caspase-1 能够有效减少气道炎症^[95]。这些结果均说明炎症小体信号通路可能参与了 COPD 的发病过程。

2.4 NLRP3 炎症小体与其他肺组织疾病

研究表明，NLRP3 还与多种肺组织疾病有关，如输血相关性急性肺损伤^[96]、机械通气诱导的肺损伤^[97]、哮喘^[98]、肺结核^[99]等等。NLRP3 炎症小体参与肺脏疾病的过程及机制见图 4。尽管我们对 NLRP3 炎症小体在这些疾病的病理生理过程中的作用已经有了比较深入的了解，但完全阐明 NLRP3 在其中的机制，目前仍是一项重大挑战，仍需人们不断探索。在未来的研究中，重点应放在不同肺脏疾病中究竟是组织中的何种细胞的 NLRP3 炎症小体被活化，以及 NLRP3 炎症小体效应分子进一步激活的细胞类型，从而对我们治疗这些疾病提供有益帮助。

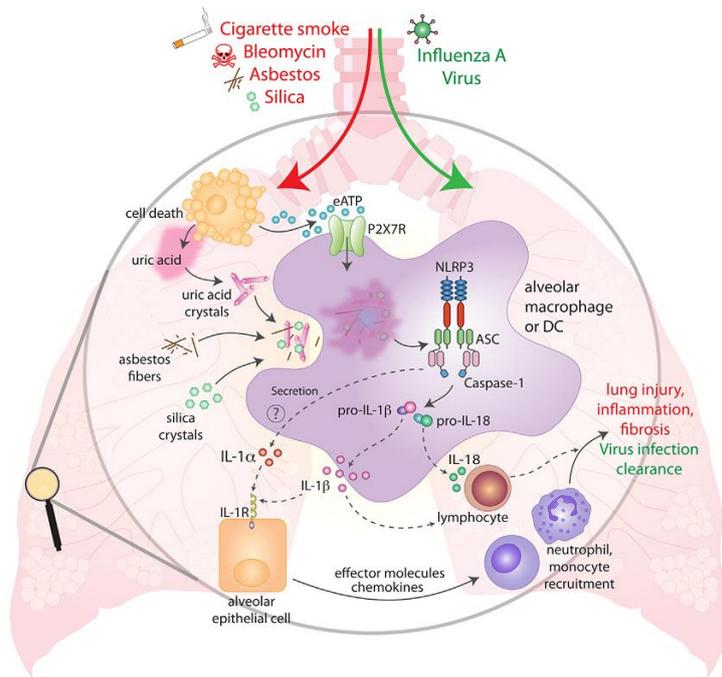


图 4 NLRP3 炎症小体活化与肺脏疾病

[De Nardo etc. Am J Pathol, 2014, 11:42-54]

正文

第一部分 NLRP3 炎症小体在严重烧伤大鼠急性肺损伤中的作用研究

严重烧伤后机体内环境发生剧烈变化，很容易导致系统性炎症反应综合征甚至多脏器功能不全综合征，由于肺脏与外界环境直接相通，容易受到外界环境因素的影响，因此对严重烧伤患者，尤其是伴有吸入性损伤或基础肺疾病的患者，肺脏是烧伤后 MODS 中最常累及的脏器之一，同时烧伤后急性肺损伤也是烧伤后病人最主要的死亡原因之一^[1,2]。急性肺损伤发生的根本病理机制是血管内皮细胞和肺泡上皮细胞受到破坏，进而导致肺泡毛细血管屏障受损，引起肺水肿、肺出血以及严重的气体交换障碍^[27]。严重烧伤后诱发急性肺损伤的机制目前仍不完全清楚，但烧伤后引起的失控性炎症反应可能是其重要原因。NLRP3 炎症小体是先天性免疫的重要成分，是机体重要的防御反应，NLRP3 炎症小体的激活能够诱导促炎因子 IL-1 β 和 IL-18 的释放，而 IL-1 β 和 IL-18 是两种强有力的炎症启动因子，他们能够激活更多的炎症细胞，释放更多的炎症因子，形成级联放大效应，进而促进炎症的发生^[100]。同时有研究表明，NLRP3 炎症小体在失血性休克后诱导的急性肺损伤中发挥着重要的作用，因此我们推测，NLRP3 炎症小体是否也参与了烧伤后急性肺损伤的发生过程。为此，我们设计如下实验，观察严重烫伤大鼠肺组织中 NLRP3 炎症小体信号通路的表达，同时对 NLRP3 炎症小体进行调控，观察其对肺损伤的影响。

1 材料

1.1 实验动物

本部分实验采用 10 周龄 200-250g 左右健康雄性 SD 大鼠，于我校实验动物中心购买，于本科室动物房饲养，适应 1 周，温度湿度保持恒定（温度保持在 22-26 $^{\circ}$ C，空气湿度保持在 40-60%），不限量饮水和进食。实验中的所有操作和程序均经过第

四军医大学伦理委员会批准。

1.2 主要试剂

试剂名称	厂家
Na ₂ S	天津恒兴试剂公司, 中国
75%乙醇溶液	天津恒兴试剂公司, 中国
NaCl	天津恒兴试剂公司, 中国
KCl	天津恒兴试剂公司, 中国
KH ₂ PO ₄	天津恒兴试剂公司, 中国
Na ₂ HPO ₄	天津恒兴试剂公司, 中国
戊巴比妥钠	Sigma 公司, 美国
异氟烷	深圳瑞沃德生命科技, 中国
4%甲醛溶液	天津恒兴试剂公司, 中国
二甲苯	天津恒兴试剂公司, 中国
无水乙醇	天津恒兴试剂公司, 中国
95%乙醇	天津恒兴试剂公司, 中国
苏木精染料	Sigma 公司, 美国
盐酸酒精	天津恒兴试剂公司, 中国
氨水	天津恒兴试剂公司, 中国
伊红溶液	Sigma 公司, 美国
BSA	武汉博士德生物工程公司, 中国
组织 MPO 测定试剂盒	北京碧云天有限公司, 中国
RNAiso Plus	TaKaRa 公司, 日本
氯仿	天津恒兴试剂公司, 中国
异丙醇	天津恒兴试剂公司, 中国
DEPC	北京碧云天有限公司, 中国
PrimeScript ^{RT} Master Mix	TaKaRa 公司, 日本
SYBR [®] Premix Ex Taq II	TaKaRa 公司, 日本
兔抗 NLRP3	Biorbyt 公司, 英国

兔抗 Caspase-1	Santa Cruz 公司, 美国
兔抗 GAPDH	武汉博士德生物工程公司, 中国
IL-1 β Elisa 试剂盒	南京建成有限责任公司, 中国
IL-18 Elisa 试剂盒	南京建成有限责任公司, 中国
BAY11-7082 抑制剂	Selleckchem 公司, 美国
柠檬酸粉末	北京碧云天有限公司, 中国
通用型二抗试剂盒	武汉博士德生物工程公司, 中国
DAB 显色液	武汉博士德生物工程公司, 中国
浓盐酸	天津恒兴试剂公司, 中国
Tris	西安国安生物科技, 中国
Tween 20	西安国安生物科技, 中国
甘氨酸	西安国安生物科技, 中国
SDS	西安国安生物科技, 中国
甲醇	天津恒兴试剂公司, 中国
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	北京碧云天有限公司, 中国
SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒	北京碧云天有限公司, 中国
PVDF 聚二氟乙烯膜	北京碧云天有限公司, 中国
辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗	北京碧云天有限公司, 中国
超敏发光液	北京碧云天有限公司, 中国

1.3 主要溶液

PBS 缓冲液 (1L, PH=7.4): KCl 为 0.2g, KH₂PO₄ 为 0.24g, Na₂HPO₄ 为 1.44g, NaCl 为 8.0g, 加蒸馏水至 1000ml。

Tris-HCl (1.0mol/L, PH=7.5): 称 Tris 30.92g, 加蒸馏水至 200ml。溶解后用浓盐酸调 PH 至 7.5, 最后用蒸馏水定容至 250ml, 高温灭菌后室温下保存。

TBS 缓冲液 (100mmol/L PH 为 7.5 的 Tris-HCl, 150mmol/L NaCl): 1.0mol/L PH 为 7.5 的 Tris-HCl 10ml, 加 NaCl 8.8g, 最后用蒸馏水定容至 1000ml。

TBST 缓冲液: 20% Tween20 1.65ml 加入 700ml TBS 缓冲液中。

电泳液: Tris 3.03g, 甘氨酸 18.77g, SDS 1g 溶于 1000ml 蒸馏水中。

转膜液: Tris 3.03g, 甘氨酸 14.42g 溶于 800ml, 再加入 200ml 甲醇, 混匀。置于 4℃ 冰箱低温保存。

抗体洗脱液: 甘氨酸 1.88g, SDS 10g, HCl 1.5ml (调 PH 至 2), 蒸馏水定容至 1000ml。

RIPA 裂解液: Tris-HCl (PH=7.5) 5ml, NaCl 0.8766g, 脱氧胆酸钠 1g, NP-40 1ml, SDS 0.1g, 溶于 1000ml 蒸馏水中。

脱毛剂: Na₂S 8g 溶于 60ml 蒸馏水中, 再加 40ml 75% 乙醇, 混匀。

1.4 主要仪器

器材	产地
电子分析天平	Mettler-Toledo 公司, 瑞士
超高速离心机	Heraeus 公司, 德国
超薄切片机	Thermo 公司, 美国
Alphamager TM2200 型凝胶图像分析系统	Alpha Innotech 公司, 美国
电泳仪	Bio-Rad 公司, 美国
DU800 型分光光度仪	Beckman Coulter 公司, 美国
IQ5TM 型荧光定量 PCR 仪	Bio-Rad 公司, 美国
680 型酶标仪	Bio-Rad 公司, 美国
FSX100 型生物图像导航仪	Olympus 公司, 日本
深低温冰箱	Nuaire 公司, 瑞士

2 方法

2.1 实验分组以及动物模型制作

SD 大鼠随机分为以下三组: 对照组 (n=6 只), 单纯烫伤组 (n=24 只), 以及烫伤+ BAY11-7082 干预组 (n=12 只)。所有大鼠在制模前一天, 采用异氟烷气体麻醉, 脱毛机背部脱毛, 继而背部棉签涂抹 8% 硫化钠, 一分钟后温水纱布清拭擦净, 即制备好约 30% 总体表面积的备皮区。大鼠适应一天后, 腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (5ml/kg) 麻醉, 随即将大鼠背部固定于特定模具上, 单纯烫伤组和烫伤+ BAY11-7082 干预组大鼠将备皮区置于 92℃ 水浴锅热水中 18s, 注意固定好大鼠尾巴, 防止其坠入热水中, 制备出总体表面积约 30% 三度烫伤模型 (烫伤深度经病理切片证实)^[101]。伤后

单纯烫伤组大鼠立即腹腔注射 5ml 生理盐水预防休克发生，而烫伤+BAY11-7082 干预组立即注射 5ml 生理盐水+15 μ mol/kg BAY11-7082。对照组大鼠在备皮后将背部置于 25 $^{\circ}$ C 温水中 18s，模拟烫伤后腹腔不注射生理盐水，其他操作同单纯烫伤组。烫伤后老鼠单笼饲养，以防老鼠互相噬咬损伤区域。

2.2 动物标本采集

单纯烫伤组大鼠于烫伤后 6h, 12h, 24h 以及 48h, 烫伤+ BAY11-7082 干预组则于烫伤后 24h 和 48h, 每个时间点分别取 6 只老鼠, 异丙醇气体麻醉。铺无菌单, 腹部消毒, 开腹, 暴露腹主动脉, 用注射器经腹主动脉抽血, 直至大鼠死亡。所抽血液立即置于不含抗凝剂的抽血管中, 室温放置 30 min, 4 $^{\circ}$ C 环境下离心机 3000rpm 离心 15min, 将离心管置于无菌操作台中, 小心抽取上层血清, 置于 1.5ml 无菌离心管中, -80 $^{\circ}$ C 冰箱冻存以备后续使用。大鼠处死后立即开胸, 暴露气管和肺脏, 将右侧肺脏支气管结扎并离取右侧肺脏。剪取部分右侧肺脏, 置于 4% 多聚甲醛中固定, 48h 后石蜡包埋; 剩余组织分为三份, 冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱以备后续使用。中央气管插管同时固定, 4ml 预冷 PBS 反复冲洗 3 次, 每次冲洗 PBS 在肺组织中留存 30s。所得肺泡灌洗液 4 $^{\circ}$ C 环境离心机下 300g 离心 10min, 收集上清并储存在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱以备后续使用。

2.3 血清 IL-1 β 和 IL-18 含量的检测

操作步骤: 加样品或标准品 100 μ l/well, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5h \rightarrow 加生物素标记的抗体 100 μ l/well, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5h \rightarrow 加亲和素-辣根过氧化物酶标记物 100 μ l/well, 37 $^{\circ}$ C 孵育 0.5h \rightarrow 加显色液, 37 $^{\circ}$ C 避光 15min \rightarrow 加终止液 100 μ l/well 终止反应 \rightarrow 立即读板 \rightarrow 在 $\lambda=450\text{nm}$ 处读取吸光度值。

按照 IL-1 β 和 IL-18 ELISA 说明书上的操作步骤, 检测血清中的 IL-1 β 和 IL-18 的含量, 使用 680 型酶标仪读取 450nm 波长处的光度值, 根据标准曲线计算血清中 IL-1 β 和 IL-18 的含量。

2.4 肺组织匀浆中 MPO 含量的检测

样本处理: 取各组部分冻存肺组织, 室温放置 10min, 用滤纸吸干表面血迹, 生理盐水中漂洗, 滤纸吸干表面水分, 每组称取 50mg 肺组织, 眼科剪剪碎。每组加入试剂盒中的溶解液 (试剂二) 0.95ml, 充分摇匀, 裂解肺组织。

取 5%组织匀浆液 0.9ml 与 0.1ml 试剂三液体充分混匀, 37℃温水浴 15min, 取出待测。正确设置空白组和对照组, 取上述混合液体 0.2ml 与试剂四液体和 3ml 显色剂混合, 充分混匀, 37℃水浴 30min。再加入试剂七液体, 充分混匀, 60℃水浴 10min, 取出后立即在波长为 460nm 处读取各组吸光度值, 并根据公式计算各组 MPO 含量。

2.5 肺组织标本 HE 染色以及病理评分

常规脱蜡: 石蜡包块→连续切片(厚度为 4μm)→漂片(每张玻片附两块组织)→切片烘烤(70℃, 20min)→二甲苯脱蜡 10min→二甲苯脱蜡 10min→无水乙醇 5min→95%乙醇 3min→95%乙醇 3min→75%乙醇 5s→流动水冲洗→双蒸水 5s。

HE 染色

取出切片→苏木精染核 7min→流动水冲洗→盐酸酒精分色 5-8s→氨水固定(核着色) 3min→双蒸水 5s→伊红染色(胞浆着色) 40s→流动水冲洗。

复水: 将切片取出→75%乙醇 5s→95%乙醇 5s→无水乙醇 5s。

封片: 将切片取出→二甲苯 5min→二甲苯 5min 透明→中性树脂封片, 10min 后显微镜下观察、照相。

肺组织病理评分

肺组织病理损害评分采用 Gloor 评分系统对肺组织病理损害情况进行评价^[102]。主要从炎症细胞浸润, 肺泡和肺间质水肿以及肺出血等几个方面进行评价, 每项根据其严重程度, 给予 0, 1, 2, 3, 4 不同等级的评分, 0 表示无, 1 表示病变轻微, 2 表示中等程度病变, 3 表示病变严重, 4 表示弥漫性病变。整体肺组织病理评分为三项评分之和, 最高为 12 分, 最低为 0 分。每组病理切片随机选取 3 个视野评分, 每个视野由两位病理专业人士进行评分, 最终得分取其均值。

2.6 肺组织标本 DAB 染色观察及阳性细胞计数

DAB 染色

切片脱蜡至水→柠檬酸抗原修复(微波炉加热 6min)→冷却 1h→PBS 洗 3 次→3% H₂O₂ 37℃ 30min 封闭内源性抗体→PBS 洗 3 次→1% BSA 37℃孵育 30min→PBS 洗 3 次→兔抗 NLRP3 抗体(1:200 稀释)孵育→4℃过夜→PBS 洗 3 次→通用型二抗孵育 1h(避光孵育)→PBS 洗 3 次。

DAB 显色: 配置 DAB 显色液(在 1ml PBS 缓冲液中滴加 A、B、C 液各一滴)

→PBS 洗 3 次。

染核：将切片取出→苏木精染色 5min→流动水冲洗→盐酸酒精分化 10s→流动水冲洗→氨水返蓝 1min→流动水冲洗。

脱水透明：将切片取出→75%乙醇 5s→95%乙醇 5s→无水乙醇 5s。

封片：将切片取出→二甲苯 5min→二甲苯 5min 透明→中性树脂封片，10min 后显微镜下观察、照相。

NLRP3 阳性细胞计数：每张免疫组化切片随机选择 1×1cm 大小视野，记录视野中 NLRP3 阳性细胞（胞浆为棕色细胞）数目以及视野中所有细胞数目，计算其百分比率，为减少误差，每张切片随机选取 3 个视野，三个视野的平均阳性率即为其最终阳性率。

2.7 肺泡灌洗液中蛋白浓度测定

取各组冻存肺泡灌洗液，室温放置 15min 以使灌洗液完全溶解。随即采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测各组肺泡灌洗液中的总蛋白浓度。按照 BCA 试剂盒说明书，取 96 孔板，完全溶解蛋白标准品，取 10 μ l 稀释至 100 μ l，使其最终浓度为 0.5mg/ml。将标准品按照 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 μ l 加入到 96 孔板中，并将这些孔用标准品稀释液补足到 20 μ l，测定其吸光度并绘制标准曲线。另取 96 孔板，空白孔加 20 μ l 去离子水，其他各组每孔加 18 μ l 去离子水以及 2 μ l 肺泡灌洗液。BCA 试剂盒中 A 液：B 液=50:1 混合，避光放置。96 孔板每孔加 200 μ l 混合液，每组重复 3 次，37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30min，立即在波长为 565nm 处测定各组吸光度值，并根据吸光度值计算各组肺泡灌洗液中的蛋白浓度。

2.8 Western Blot 检测肺组织中 NLRP3 和 Caspase-1 表达水平

2.8.1 组织中总蛋白质的提取

取冻存于-80 $^{\circ}$ C 冰箱的肺脏组织，含量大约为 50mg，按照分组进行编号，加入 500 μ l 组织细胞裂解液（RIPA），置于冰上，使用简易裂解设备反复研磨组织 3 遍，然后置于超声容器进行超声裂解。4 $^{\circ}$ C，12000g，离心 15min 吸取上清约 100-200 μ l，吸取部分液体约 10 μ l 使用 BCA 方法进行总蛋白浓度的测定，绘制标准曲线，确定上样量。其他样品加入 5×Loading Buffer 20 μ l 放入沸水架煮沸 10min 使蛋白变性，然后拿出置于冰上，于-20 $^{\circ}$ C 保存。下次使用前要 4 $^{\circ}$ C，12000g，离心 5min。

2.8.2 琼脂糖凝胶电泳及转膜

(1) 电泳：配制浓缩胶和分离胶，浓缩胶浓度为 5%，分离胶浓度为 10%（根据目的蛋白的大小确定分离胶的浓度，原则上目的蛋白分子量越大，所需分离胶浓度越小，反之亦然）。待胶凝好后加入 500ml 电泳液，使胶完全浸没于电泳液中，按照 30 μ g 的蛋白体系，逐孔加入样品（注意动作轻柔，以防将样品带出）。电泳条件：恒压 90V，时间 20min；恒压 110V，时间 100min。

当所分离的蛋白分子量越大，所使用的分离胶浓度越小，反之，所分离的蛋白分子量较小，所使用的分离胶浓度越大。本实验目的蛋白为 NLRP3: 110KD, Caspase-1: 30KD 和 GAPDH: 37KD，根据目的蛋白的大小，我们选用 10% 的分离胶。

将配胶所需仪器组装好后置于试验台，首先配制 10% 分离胶，配方如下：

配置不同体积分离胶所需各组分的体积(ml)			
溶剂	5ml	15 ml	25 ml
dd 水	1.9	5.9	9.9
30% 丙烯酰胺溶液	1.7	5	8.3
1.5mol/L Tris (PH 8.8)	1.3	3.8	6.3
10% SDS	0.05	0.15	0.25
10% AP	0.05	0.15	0.25
TEMED	0.002	0.006	0.01

在配置过程中要按照上述顺序依次加入，混匀后用 1ml 枪快速转移入配胶器，为保证分离胶液面水平，使用异丙醇压平，待分离胶凝固后，弃去异丙醇配制浓缩胶，配方如下：

配置不同体积浓缩胶所需各组分的体积(ml)			
溶剂	1 ml	2 ml	3 ml
dd 水	0.68	2.1	3.4
30% 丙烯酰胺溶液	0.17	0.5	0.83
1.5mol/L Tris (PH 8.8)	0.13	0.38	0.63
10% SDS	0.01	0.03	0.05
10% AP	0.01	0.03	0.05

TEMED	0.001	0.003	0.005
-------	-------	-------	-------

同样浓缩胶的配置规程按照上标顺序加入，用 1ml 移液枪加到配胶器，随即加入梳子，待凝固好便可使用，若不及时使用必须放置在 4℃ 冰箱。

上样，跑胶，100V 恒压 2h。

(2) 转膜：PVDF 浸入甲醇溶液 1min，将胶、PVDF 膜、厚滤纸和棉片组合成三明治夹，置于湿转仪器中，加转膜液，使三明治夹子完全浸没，PVDF 膜靠近正极（蛋白带负电荷，转膜过程中从胶转移到膜上）。转膜时间：恒压 100V 根据目的蛋白分子量大小确定时间：NLRP3 目的蛋白分子质量 110KD，转膜时间为 110min；Caspase-1 和内参蛋白分子量为 30KD 和 37KD，转膜时间为 40min。

2.8.3 一抗和二抗孵育

一抗孵育：将转好的 PVDF 膜取出置于室温下的 5% 的脱脂牛奶中进行蛋白封闭，摇床室温 1 小时，封闭后用 TBST 洗去多余的牛奶，加入稀释好的 NLRP3 (1: 1000)、Caspase-1 (1: 500)、GAPDH (1: 3000) 一抗溶液。

将膜和抗体置于小塑料袋内，赶走气泡，4℃ 冰箱，过夜保存。

二抗孵育：第二天将膜从取出，室温放置 30min，TBST 进行洗膜，每次 10min，共 3 次，摇床室温孵育兔源二抗 1 小时。

2.8.4 ECL 化学发光

二抗孵育结束后，TBST 洗膜，每次 5min，共 3 次。配制 ECL 发光液：A 液：B 液=1:1，注意避光配制，将配好的发光液均与滴于 PVDF 膜上，快速放入发光仪进行图像采集。

2.9 qRT-PCR 检测肺组织中相关分子 mRNA 表达水平

2.9.1 引物设计

根据 NCBI 数据库查找大鼠 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18、GAPDH 基因序列，使用引物设计软件 Primer 进行高保真度的引物设计，各基因引物序列如下表

基因名称	种属	引物序列 (5'→3')	产物大小 (bp)
NLRP3	大鼠	上游引物 CAGCGATCAACAGGCGAGAC	141
		下游引物 AGAGATATCCCAGCAAACCTATCCA	

Caspase-1	大鼠	上游引物 CTGGGCAGGCAGCAAATTC	190
		下游引物 AGAGATATCCCAGCAAACCTATCCA	
IL-1 β	大鼠	上游引物 CCCTGAACTCAACTGTGAAATAGCA	111
		下游引物 CCCAAGTCAAGGGCTTGGAA	
IL-18	大鼠	上游引物 GACTGGCTGTGACCCTATCTGTGA	154
		下游引物 TTGTGTCCTGGCACACGTTTC	
GAPDH	大鼠	上游引物 GAACATCATCCCTGCATCCA	143
		下游引物 CCAGTGAGCTTCCCGTTCA	

2.9.2 提取组织总 RNA

(1) 收集大鼠肺组织，立即加入 1ml RNAiso Plus，若不直接实验即可冻存于 -80℃ 冰箱，实验开始前将冻存于 -80℃ 冰箱的组织取出，置于室温环境使其融化，然后置于冰上，使用 200ml 移液器反复吹打，直至组织全部溶解，溶液内无杂质。室温静置 10min，12000g，4℃，离心 5min，小心吸取上清 500ml，置于新的无 RNA 酶离心管中。

(2) 加入 200 μ l 氯仿，上下颠倒混匀，静置 10min，12000g，4℃，离心 10-20min，需要特别小心将离心管从离心机中取出，现在离心管中液体分 3 层，小心吸取上层透明液体，将其置于新的无 RNA 酶离心管中（宁少勿多）。

(3) 加入与管内液体等体积的异丙醇，约 400-500 μ l，上下颠倒混匀，室温静置 10min，12000g，4℃，离心 10min，离心结束后底部可见白色星状 RNA 沉淀析出，将上清倒掉，动作要轻柔。

(4) 加入 1ml 75% 酒精（配制方法：无水乙醇：DEPC 水=3:1），上下轻轻旋转离心管，将挂在管壁上的 RNA 洗去，7500g，4℃，离心 5min，倒掉上清，离心管底可见少量白色沉淀为 RNA，使用 200 μ l 移液器将管底残留的少量液体吸出，干燥 RNA，在室温静置 5min 左右，切勿时间太长或加热。

(5) 加入无 RNA 酶的水 30-50 μ l 溶解 RNA，视 RNA 多少而定。

(6) 使用紫外分光光度计检测 RNA 吸光度，计算所提 RNA 浓度和 A260/A280 比，根据 RNA 浓度确定反转录时样本量，一般为 20 μ l 含 500-1000 μ g，A260/A280 比控制在 1.8-2.1 之间。

2.9.3 RNA 反转录

反转录体系 10 μ l: 2 μ l PrimeScript^{RT} Mix、1 μ l RNA 样品、7 μ l 无 RNA 酶水。

反转录体系 20 μ l: 4 μ l PrimeScript^{RT} Mix、2 μ l RNA 样品、14 μ l 无 RNA 酶水。

反转录条件: 37 $^{\circ}$ C, 900s; 85 $^{\circ}$ C, 5s; 12 $^{\circ}$ C, 3600s。

转录结束后产物为 DNA, 相对稳定, 以后操作不需无 RNA 酶操作。

2.9.4 RT-PCR 扩增

反转录体系 10 μ l: SYBR 5 μ l、引物各 0.5 μ l、cDNA0.5 μ l、蒸馏水 4 μ l。

反转录体系 20 μ l: SYBR 10 μ l、引物各 1 μ l、cDNA1 μ l、蒸馏水 8 μ l。

反应条件: 两步法: 第一步: 初始变性 95 $^{\circ}$ C 30s。第二步: PCR 反应 变性 95 $^{\circ}$ C 维持 15s, 退火 60 $^{\circ}$ C 维持 30s, 延长 72 $^{\circ}$ C 维持 10s 重复 40 个循环。第三步: 4 $^{\circ}$ C 保温。

2.9.5 结果分析

反应结束后使用 Bio-Rad 公司的 CFX Manager 进行分析。结果处理采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对量的方法。

2.10 数据分析

肺组织病理评分以均数 \pm 标准误表示, 各组间的组内差异使用非参数 Kruskal-Wallis 检验分析, 组间差异使用 Nemenyi 检验分析, 运用 SPSS 13.00 软件对数据进行统计; 实验测量数据均数 \pm 标准误表示各组间的差异采用单因素方差分析比较, 各组内差异采用 t 检验分析, 采用 GraphPad Prism 软件对数据进行统计分析。检验水准为 $P < 0.05$, 表示统计结果之间有统计学差异。

3 结果

3.1 烫伤后大鼠血清和肺组织中 IL-1 β 和 IL-18 的表达水平

严重烧伤可导致全身性炎症反应, 而 IL-1 β 和 IL-18 在炎症启动过程中扮演着启动因子的作用, 从而加重损伤信号并促进“炎症瀑布”形成。我们通过 ELISA 分别检测对照组以及烧伤后 6h, 12h, 24h 和 48h 大鼠血清中的 IL-1 β 和 IL-18 含量 (见图 5a 和 5b), 发现在烫伤 6 小时后 IL-1 β 和 IL-18 的表达即明显升高, 且随着时间的延长, IL-1 β 和 IL-18 的表达越来越高, 在烧伤后 24-48h, 其达到最高水平。同时我们对对照组以及烫伤后 6h, 12h, 24h 和 48h 大鼠肺组织中 IL-1 β 和 IL-18 的 mRNA 表达水平行 RT-PCR 检测 (见图 5c 和 5d)。结果表明, 烫伤后大鼠肺组织中 IL-1 β

和 IL-18 的 mRNA 表达水平逐渐升高，且在烫伤后 24-48h 达到顶峰，与烫伤后大鼠血清中 IL-1 β 和 IL-18 的表达一致。上述结果表明，烫伤后大鼠肺组织和血清中的 IL-1 β 和 IL-18 表达显著升高，肺组织中炎症因子大量活化，加重肺部损伤。

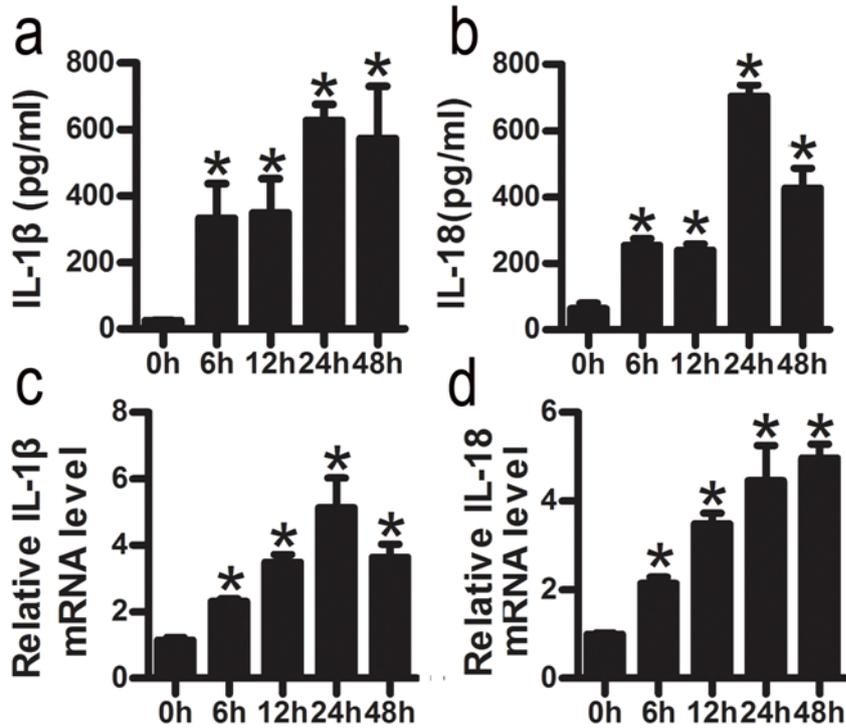


图 5 烫伤大鼠血清中和肺组织中 IL-1 β 和 IL-18 随时间的改变。

本部分实验使用 30% 大鼠烫伤模型。ELISA 检测大鼠血清中 IL-1 β (a) 和 IL-18 (b) 的水平；RT-PCR 检测大鼠肺组织中 IL-1 β (c) 和 IL-18 (d) 的 mRNA 表达水平，结果表示为 IL-1 β 和 IL-18 与 GAPDH 的相对比值。(n=6, *表示与 0h 相比, $P < 0.05$)

3.2 烫伤后大鼠肺组织中 NLRP3 和 Caspase-1 的表达情况

NLRP3 炎症小体能够活化 Caspase-1 蛋白，而 Caspase-1 蛋白的活化能够促使 IL-1 β 和 IL-18 由其前体形式向其活化形式的转化，促进 IL-1 β 和 IL-18 的切割成熟。为了检测烫伤后大鼠肺组织中 NLRP3 和 Caspase-1 是否活化，我们使用 Western Blot 和 RT-PCR 的方法对其进行了检测。结果提示，对照组和烫伤后 6h 大鼠，肺组织中 NLRP3 和 Caspase-1 的 mRNA 水平（见图 6a 和 6b）没有发生明显变化，与对照组相比，在烫伤后 12h，其 mRNA 水平显著升高，而在烫伤后 24-48h 依然保持较高水平。我们进一步检测了 NLRP3 和 Caspase-1 的蛋白水平（见图 6c-e），结果提示烫伤后大鼠肺组织 NLRP3 和 Caspase-1 的蛋白水平与其 mRNA 水平一致，即烫伤后 6h

其蛋白水平不变，而烫伤后 12h，其蛋白水平显著升高，且在 24-48h 依然保持较高水平。这些结果提示，NLRP3 炎症小体可能参与了烫伤大鼠肺损伤的发病过程。

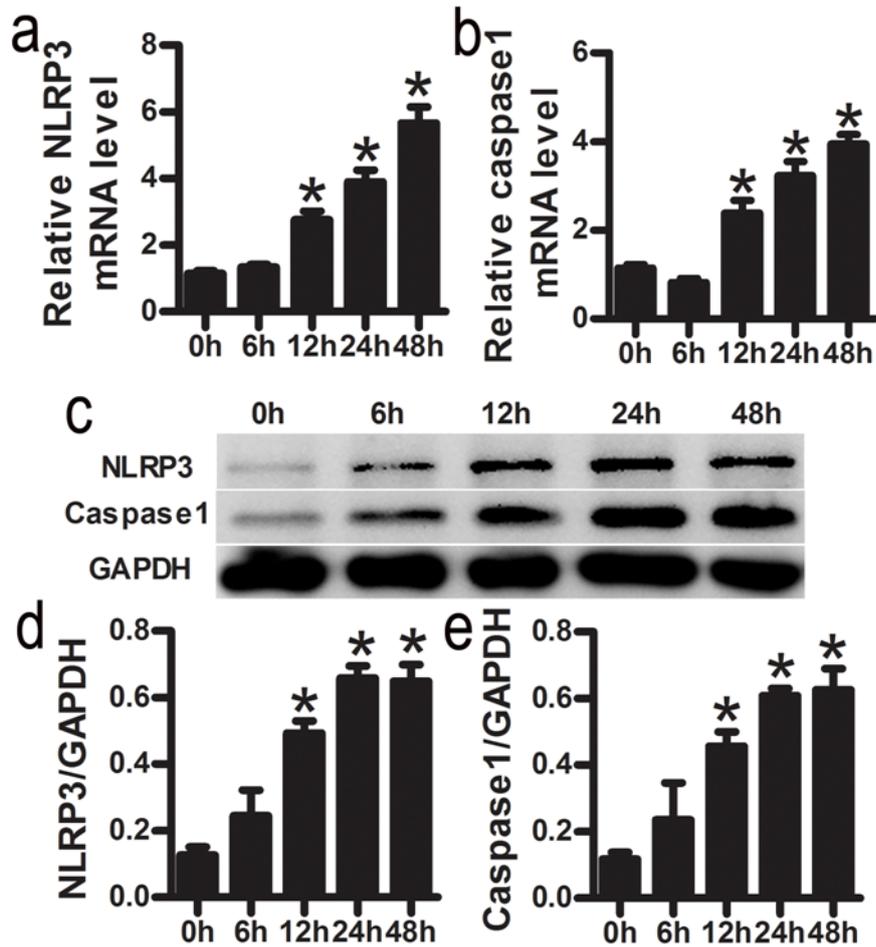


图 6 严重烫伤后大鼠肺组织 NLRP3 和 Caspase-1 活化。

本部分实验使用 30% 大鼠烫伤模型。a-b: RT-PCR 检测烫伤大鼠肺组织中 NLRP3 和 Caspase-1 的 mRNA 水平随时间的变化；c: Western Blot 检测烧伤大鼠肺组织中 NLRP3 和 Caspase-1 的蛋白水平随时间的变化；d-e: NLRP3 和 Caspase-1 的蛋白变化柱状统计图。(n=6, *表示与 0h 相比, $P < 0.05$)

3.3 BAY11-7082 对烫伤大鼠肺组织中 NLRP3 和 Caspase-1 活化的影响

BAY11-7082 是 NLRP3 炎症小体的抑制剂, 为了检测 NLRP3 是否成功的抑制了 NLRP3 炎症小体的活化, 我们对烫伤大鼠腹腔注射 BAY11-7082, 进而检测其肺组织中 NLRP3 和 Caspase-1 的活化水平。在前面实验中, 我们总结出 NLRP3 炎症小体在烫伤后 24-48 小时活化最显著, 因此我们选取 24h 和 48h 这两个时间点进行抑制实验的研究。结果显示, 腹腔注射 BAY11-7082 24-48h 后 NLRP3 和 Caspase-1 的 mRNA

表达水平降低了 2-3 倍（见图 7a 和 7b）；而 Western Blot 实验结果也显示，腹腔注射 BAY11-7082 后能大大降低 NLRP3 和 Caspase-1 蛋白的活化（见图 7c-e）；我们进一步采用免疫组织化学方法标记烫伤大鼠肺组织标本（见图 f-g），发现烫伤后 24-48h，肺组织切片中的 NLRP3 阳性细胞数显著升高，而在应用 NLRP3 抑制剂 BAY11-7082，其阳性细胞数显著降低，差异具有显著意义。

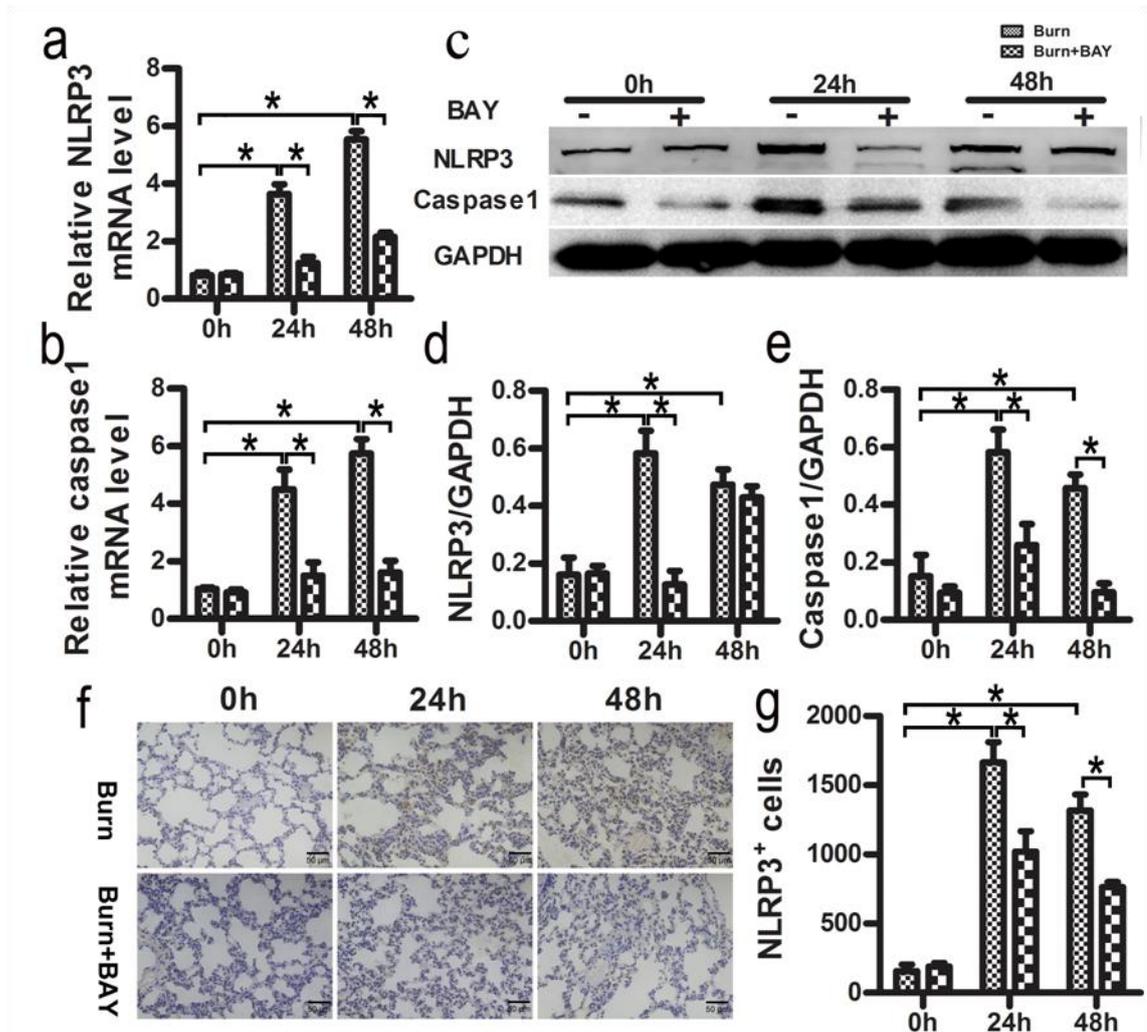


图 7 NLRP3 炎症小体抑制剂 BAY11-7082 减轻烫伤大鼠肺组织中 NLRP3 炎症小体信号通路的活化

本部分实验使用 30% 大鼠烫伤模型，BAY11-7082 在大鼠烫伤后立即腹腔注射给药，24h 和 48h 后收集肺组织进行相关检测。a-b: RT-PCR 检测 BAY11-7082 处理烫伤大鼠肺组织中 NLRP3 和 Caspase-1 的 mRNA 水平变化；c: Western Blot 检测 BAY11-7082 处理烫伤大鼠肺组织中 NLRP3 和 Caspase-1 的蛋白水平变化；d-e:

NLRP3 和 Caspase-1 的蛋白变化柱状统计图；f：免疫组织化学 DAB 染色检测 BAY11-7082 处理烫伤大鼠肺组织病理切片 NLRP3 阳性信号表达；g：肺组织病理切片 NLRP3 阳性细胞百分比统计图。（n=6，*表示 $P < 0.05$ ）

3.4 BAY11-7082 对烫伤大鼠肺组织中 IL-1 β 和 IL-18 表达的影响

由于 IL-1 β 和 IL-18 是 NLRP3 炎症小体的下游产物以及炎症启动的重要因子，我们进而通过 RT-PCR 检测了腹腔注射 BAY11-7082 对烫伤大鼠肺组织中 IL-1 β 和 IL-18 表达的影响（见图 8a 和 8b）。结果显示，腹腔注射 BAY11-7082 24-48h 后，烫伤大鼠肺组织中的 IL-1 β 和 IL-18 表达严重下降，差异具有统计学意义。以上结果说明，烫伤后通过 BAY11-7082 抑制 NLRP3 炎症小体的活化，能够降低肺组织的炎症反应。

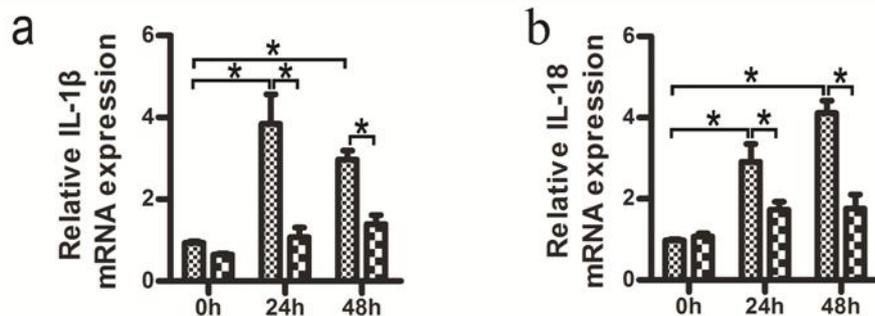


图 8 NLRP3 炎症小体抑制剂 BAY11-7082 减轻烫伤大鼠肺组织中炎症反应

本部分实验使用 30% 大鼠烫伤模型，BAY11-7082 在大鼠烫伤后立即腹腔注射给药，24h 和 48h 后收集肺组织进行相关检测。a-b：RT-PCR 检测 BAY11-7082 处理烫伤大鼠肺组织中 IL-1 β 和 IL-18 的 mRNA 水平变化。（n=6，*表示 $P < 0.05$ ）

3.5 BAY11-7082 对烫伤大鼠肺损伤的影响。

炎症是造成烧伤后肺损伤的重要原因，而抑制烧伤后 NLRP3 炎症小体的活化能够减轻肺部的炎症反应。为了检测抑制 NLRP3 炎症小体活化是否能够减轻烫伤后肺损伤，我们对烫伤后 24-48h 大鼠肺组织病理切片进行了观察（见图 9a）。结果显示，正常肺组织结构清晰完整，肺泡连接紧密，肺泡无出血及渗出，肺间质较薄，无水肿及炎性渗出；而烫伤后 24-48h 大鼠肺组织结构模糊，部分肺泡融合断裂，肺泡内可见大量红细胞渗出及液体渗出，间质水肿严重，炎性细胞浸润明显，间隔变厚；而在应用 NLRP3 抑制剂 BAY11-7082 后，肺泡内红细胞渗出及液体渗出明显减少，间质水肿明显消退，炎细胞浸润明显降低，间隔变厚情况较烫伤组明显好转。我们

对肺组织病理切片进行病理评分发现（见图 9b），单纯烫伤组肺组织病理评分显著高于对照组，而应用 NLRP3 抑制剂 BAY11-7082 后，其病理评分虽仍高于对照组，但相比于烫伤组明显降低。我们同时还检测了肺泡灌洗液中的蛋白含量以及肺组织匀浆中 MPO 水平（见图 9c 和 9d），发现烫伤后大鼠肺组织肺泡灌洗液中蛋白浓度和肺组织匀浆中 MPO 含量明显升高，而应用 BAY11-7082 抑制 NLRP3 炎症小体活化后，肺泡灌洗液中蛋白渗出及肺组织匀浆中 MPO 表达明显下降。以上结果说明，烫伤后大鼠肺组织损伤严重，而应用 BAY11-7082 抑制 NLRP3 炎症小体可显著减轻烧伤后肺损伤。

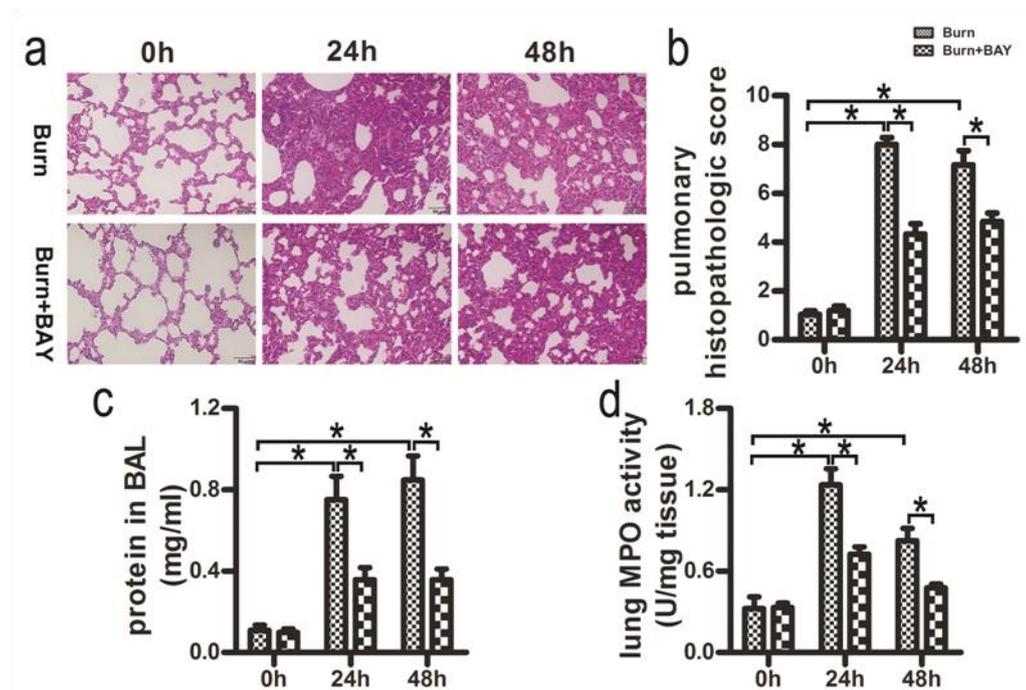


图 9 NLRP3 炎症小体抑制剂 BAY11-7082 减轻烫伤诱导的大鼠肺损伤

本部分实验使用 30% 大鼠烫伤模型，BAY11-7082 在大鼠烫伤后立即腹腔注射给药，24h 和 48h 后收集肺组织和肺泡灌洗液进行相关检测。a: 肺组织病理切片观察 BAY11-7082 处理烫伤大鼠肺部病理改变；b: BAY11-7082 处理烫伤大鼠肺部病理评分；c: BCA 法检测 BAY11-7082 处理烫伤大鼠肺泡灌洗液中蛋白浓度；d: BAY11-7082 处理烫伤大鼠肺组织匀浆中 MPO 活性。（n=6，*表示 $P < 0.05$ ）

4 讨论

急性肺损伤是严重烧伤病人常见的并发症，也是严重烧伤病人死亡的主要原因。肺脏与外界相通，其持续受到内外环境中多种因素的侵袭，因此即使不伴有吸入性

损伤, 肺脏也常常是严重烧伤患者最早衰竭的器官之一^[103]。在发生严重烧伤 48h 以内, 机体处于休克状态, 在此时期虽然没有明显外部病原体感染, 但休克诱发的氧化应激损害及无菌性炎症反应的发生, 仍可导致肺组织发生严重损害^[104]。在本实验中, 我们建立了 30% 大面积烫伤诱导的急性肺损伤大鼠模型, 通过肺组织病理切片观察到烫伤后 24h 和 48h, 肺组织严重水肿, 肺泡出血严重, 肺泡和肺间质炎症细胞浸润明显, 说明我们使用的模型建立成功。

越来越多的证据表明炎症介质和炎症因子可诱导活化的炎症细胞向肺组织迁移, 而这些活化的炎症细胞可进一步释放炎症介质进而损伤肺组织, 导致急性肺损伤或急性呼吸窘迫综合征^[105]。阻断炎症因子的释放可能改变过度炎症反应的进行, 降低肺组织损害, 减轻急性肺损伤。

严重烧伤是一种复杂的病理生理过程, 严重烧伤后, 机体处于低血容量性休克状态, 进而启动大量炎症因子和趋化因子的释放, 促进炎症反应的发生。而针对炎症细胞或炎症因子的治疗, 可显著减轻烧伤后的脏器损害^[106]。IL-1 β 和 IL-18 能够激活大量炎症细胞, 进而释放更多的炎症因子, 形成炎症瀑布, 加重组织损伤。研究发现, 人和啮齿类动物血清和肺组织中的 IL-1 β 可在烧伤后几小时之内显著升高, 同时 25% 烧伤大鼠肺和肠组织以及淋巴细胞上清液中的 IL-18 含量也显著升高, 且其肺和肠组织水肿明显, 肺和肠组织 MPO 水平表达明显升高^[107, 108]。而使用 IL-1 β 和 IL-18 受体拮抗剂可显著减轻多种因素诱导的肺损伤^[109, 110]。我们的实验也证明了, 在严重烫伤后, 大鼠肺组织和血清中的 IL-1 β 和 IL-18 在 12h 内逐渐升高, 并在 24h 和 48h 达到高峰。

IL-1 β 和 IL-18 转录翻译的蛋白是以前体 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 形式存在的。IL-1 β 和 IL-18 生成受到两个关键节点的调控, 即 IL-1 β 和 IL-18 前体的转录与翻译和 IL-1 β 和 IL-18 前体的切割成熟, 从而转变成活化形式。Caspase-1, 又被称为 IL-1 β 转化酶, 能够促使 IL-1 β 和 IL-18 的前体向其活化形式转变, 因此 Caspase-1 也是炎症形成的关键介质。实际上, Caspase-1 的活化还可以促使一系列蛋白前体向其活化形式转变, 这些蛋白在细胞骨架形成、糖酵解^[111]、线粒体功能^[112]及炎症过程中均发挥着重要作用。近期研究表明, 烧伤后 4h 巨噬细胞和树突状细胞中的 Caspase-1 即活化, 其活性在 24h 后达到顶点^[113], 同时烧伤后 NK 细胞、CD4⁺T 细胞以及 B 细胞中也发现 Caspase-1 的活化。Rana 等观察到在酒精所致的烧伤模型中, 大鼠腹腔注

射 AC-YVAD-CHO (Caspase-1 的抑制剂), 24h 后发现组织水肿程度减轻, 且其 MPO 活性降低^[107]。我们的研究表明, 烫伤后 Caspase-1 的 mRNA 水平和蛋白水平均显著升高, 而当抑制 Caspase-1 上游分子 NLRP3 后, Caspase-1 的表达也受到抑制, 同时肺损伤程度也得到缓解。

Caspase-1 可切割无活性的 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 使其成为有活性的 IL-1 β 和 IL-18, 这种切割过程是由一种多分子复合物——炎症小体介导的。在所有的炎症小体中, NLRP3 炎症小体是研究的最为广泛深入的。NLRP3 炎症小体的主要功能是通过分泌 IL-1 β 和 IL-18 激活先天性免疫系统, 促进炎症反应的发生, 因此我们推测 NLRP3 炎症小体可能在烧伤诱导的急性肺损伤中发挥着重要作用。实际上, Stanojic 及其同事^[114]和 Diao 等^[115]人发现 NLRP3 炎症小体在烧伤病人的白色脂肪组织大量活化, 然而烧伤刺激究竟是如何调控 NLRP3 炎症小体的活化机制目前仍未阐明, NLRP3 炎症小体在烧伤后肺损伤中的作用也不清楚。在我们的试验中, 我们观察到烫伤后肺组织中 NLRP3 的基因水平和蛋白水平以一种时间依赖性的方式逐渐升高。肺组织中 NLRP3 炎症小体的升高可能有两种原因, 其一是大量的炎症细胞如中性粒细胞和巨噬细胞等迁移浸润到肺组织, 而这些细胞中的 NLRP3 炎症小体处于活化状态; 其二是肺组织内固有的细胞如肺泡巨噬细胞、肺泡上皮细胞或血管内皮细胞中 NLRP3 炎症小体表达增高。为了研究肺泡巨噬细胞中 NLRP3 炎症小体在烫伤后肺损伤中的作用, 将其从肺组织中分离出来并分别评估 NLRP3 炎症小体在其中的作用是很有必要的。BAY11-7082 是一种泛素化抑制剂, 有报道称其可用作 NLRP3 炎症小体的抑制剂^[116], 因此在本实验中为了研究 NLRP3 炎症小体的作用, 我们选择其来抑制 NLRP3 炎症小体的活化。我们的研究发现烫伤大鼠腹腔注射 BAY11-7082, 可显著抑制 NLRP3 炎症小体的活化, 同时能显著抑制 IL-1 β 和 IL-18 炎症启动因子的水平。我们进一步取大鼠肺组织进行观察, 发现 BAY11-7082 能显著减轻烫伤后大鼠肺损伤的发生。这些结果表明烫伤后 NLRP3 炎症小体活化对肺组织有害, 而抑制其活化能减轻肺损伤, 对肺脏有保护作用。其保护作用可能是通过降低 IL-1 β 和 IL-18 炎症启动因子水平所介导的。

本实验研究了烫伤后 NLRP3 炎症小体在肺损伤中的作用, 发现抑制 NLRP3 炎症小体的活化对烫伤诱导的急性肺损伤有保护作用, 然而, 烫伤后肺组织中 NLRP3 炎症小体是如何活化的目前仍不清楚。为了进一步探索其机制, 我们进行了进一步

的研究。

第二部分 ROS 在烧伤血清诱导巨噬细胞 NLRP3 炎症小体活化中的机制研究

近年来发现活性氧簇 (Reactive oxygen species, ROS) 引起氧化应激状态参与了烧伤后急性肺损伤的发生发展。在烧伤早期, 肺组织存在明显的缺血缺氧和过氧化物的堆积, 同时肺组织是含氧量最多的器官, 也是最易受到内源性和外源性 ROS 损伤的器官^[117]。ROS 主要来源于中性粒细胞和巨噬细胞等炎症细胞, 白细胞表达 NADPH 氧化酶能够产生大量的 ROS^[118]。ALI/ARDS 过程中, 肺泡巨噬细胞首先被激活, 同时募集大量炎性细胞特别是中性粒细胞聚集于肺组织, 进而产生大量的 ROS^[118]; 中性粒细胞释放大量炎性介质, 促使更多的炎性细胞聚集, 而炎性介质的刺激又可导致中性粒细胞、肺泡巨噬细胞、肺泡上皮细胞以及内皮细胞产生更多的 ROS, 最终导致“氧化爆发”。同时文献回顾中可知, ROS 是 NLRP3 炎症小体活化的重要激活信号。但其是否参与了烧伤后肺损伤中 NLRP3 炎症小体的活化目前仍不清楚, 因此本实验采用烧伤血清模拟烧伤后微环境, 刺激分离的肺泡巨噬细胞以及 RAW264.7 小鼠巨噬细胞系, 通过对 ROS 的干预, 检测巨噬细胞内 NLRP3 炎症小体信号通路的表达, 探索 ROS 对 NLRP3 炎症小体的的调控机制。

1 材料

1.1 实验动物

本部分实验采用 10 周龄 200-250g 左右健康雄性 SD 大鼠, 于我校实验动物中心购买。我科动物房适应饲养 1 周, 温度湿度保持恒定 (温度保持在 22-26℃, 空气湿度保持在 40 - 60%), 不限量饮水和进食。实验中的所有操作和程序均经过第四军医大学伦理委员会批准。

1.2 实验细胞

大鼠肺泡巨噬细胞原代, 分离培养方法见下文。

小鼠巨噬细胞系 RAW264.7，由本实验室保存。

1.3 主要试剂

试剂名称	厂家
Na ₂ S	天津恒兴试剂公司，中国
75%乙醇溶液	天津恒兴试剂公司，中国
NaCl	天津恒兴试剂公司，中国
KCl	天津恒兴试剂公司，中国
KH ₂ PO ₄	天津恒兴试剂公司，中国
Na ₂ HPO ₄	天津恒兴试剂公司，中国
戊巴比妥钠	Sigma 公司，美国
异氟烷	深圳瑞沃德生命科技，中国
胎牛血清	Gibco 公司，美国
DMEM 培养基	Gibco 公司，美国
RPMI 1640 培养基	Gibco 公司，美国
链霉素/青霉素抗体	Gibco 公司，美国
DEMSO	Gibco 公司，美国
N-acetylcysteine	北京碧云天有限公司，中国
ROS 检测试剂盒	北京碧云天有限公司，中国
RNAiso Plus	TaKaRa 公司，日本
氯仿	天津恒兴试剂公司，中国
异丙醇	天津恒兴试剂公司，中国
DEPC	北京碧云天有限公司，中国
PrimeScript ^{RT} Master Mix	TaKaRa 公司，日本
SYBR [®] Premix Ex Taq II	TaKaRa 公司，日本
兔抗 NLRP3	Biorbyt 公司，英国
兔抗 Caspase-1	Santa Cruz 公司，美国
兔抗 GAPDH	武汉博士德生物工程公司，中国
IL-1 β Elisa 试剂盒	南京建成有限责任公司，中国

IL-18 Elisa 试剂盒	南京建成有限责任公司, 中国
BAY11-7082 抑制剂	Selleckchem 公司, 美国
柠檬酸粉末	北京碧云天有限公司, 中国
通用型二抗试剂盒	武汉博士德生物工程公司, 中国
DAB 显色液	武汉博士德生物工程公司, 中国
浓盐酸	恒兴试剂, 中国
Tris	西安国安生物科技, 中国
Tween 20	西安国安生物科技, 中国
甘氨酸	西安国安生物科技, 中国
SDS	西安国安生物科技, 中国
甲醇	天津恒兴试剂公司, 中国
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	北京碧云天有限公司, 中国
SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒	北京碧云天有限公司, 中国
PVDF 聚二氟乙烯膜	北京碧云天有限公司, 中国
辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗	北京碧云天有限公司, 中国
超敏发光液	北京碧云天有限公司, 中国

1.4 主要仪器

器材	产地
电子分析天平	Mettler-Toledo 公司, 瑞士
超净工作台	Baker 公司, 美国
超高速离心机	Heraeus 公司, 德国
二氧化碳培养箱	Thermo Fisher 公司, 美国
AlphamagerTM2200 型凝胶图像分析系统	Alpha Innotech 公司, 美国
电泳仪	Bio-Rad 公司, 美国
DU800 型分光光度仪	Beckman Coulter 公司, 美国
IQ5TM 型荧光定量 PCR 仪	Bio-Rad 公司, 美国
680 型酶标仪	Bio-Rad 公司, 美国

FSX100 型生物图像导航仪	Olympus 公司, 日本
深低温冰箱	Nuaire 公司, 瑞士
流式细胞仪	BD 公司, 美国
倒置显微镜	Olympus 公司, 日本

2 方法

2.1 烧伤血清的制备

对照组大鼠和烫伤后 12h 大鼠异丙醇气体麻醉。铺无菌单, 腹部消毒, 开腹, 暴露腹主动脉, 用注射器经腹主动脉抽血, 直至大鼠死亡。所抽血液立即置于不含抗凝剂的抽血管中, 室温放置 30min, 4℃环境下离心机 3000rpm 离心 15min, 将离心管置于无菌操作台中, 小心抽取上层血清, 置于 1.5ml 无菌离心管中, -80℃冰箱冻存以备后续使用。

2.2 肺泡巨噬细胞的分离

肺泡巨噬细胞由肺泡灌洗液中分离^[119]。取正常健康 8-10 周龄 (200-250g 左右) 雄性 SD 大鼠, 腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (5ml/kg) 麻醉, 腹腔腹主动脉放血处死, 处死后立即开胸, 暴露气管和肺脏。中央气管插管同时固定, 6ml 预冷 PBS 反复冲洗 10 次, 每次冲洗 PBS 在肺组织中留存 30s, 轻柔肺部。抽出灌洗液。所得肺泡灌洗液 4℃环境离心机下 300g 离心 5min 沉淀细胞, 用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基重悬 AM, 将 AM 浓度调整至 5×10^5 /ml, 接种于 35mm² 中。在 CO₂ 恒温孵箱中培养 2h 换液, PBS 冲洗掉未贴壁细胞, 37℃继续培养 24h。

2.3 细胞培养

细胞饲养在 5% CO₂ 37℃恒温孵箱中。肺泡巨噬细胞种植于预先用胶原 I 包被的 6 孔板中, 加入含有 10%胎牛血清、2mM 谷氨酰胺和 1%链霉素/青霉素双抗的 RPMI 1640 培养基, 细胞每两天换液一次。RAW264.7 细胞使用含有 10%胎牛血清、2mM 谷氨酰胺和 1%链霉素/青霉素双抗的 DMEM 培养基培养, 每两天换液一次。由于 RAW264.7 细胞与培养皿底壁贴附较紧密, 故其传代时使用弯头滴管弯部轻刮底壁, 将细胞分离, 离心机 3000rpm 离心 5 分钟使细胞沉淀, 培养基重悬, 以 2×10^5 /ml 接种于 35mm² 中。

2.4 烧伤血清刺激巨噬细胞

为了验证烧伤血清是否能够活化巨噬细胞中的 NLRP3 炎症小体信号通路,我们分别选取大鼠肺泡巨噬细胞及 RAW264.7 细胞系进行研究。选取细胞状态生长良好的肺泡巨噬细胞和 RAW264.7 细胞,细胞汇集约 70%左右,实验前用不含血清的培养基换液,致其饥饿 2h,以排除胎牛血清中可能含有的干扰实验的成分。肺泡巨噬细胞和 RAW264.7 细胞共分 4 组,即 10% (vol/vol) 正常大鼠血清 (Sham Serum, SS) 刺激组,即 10%SS 刺激组; 10% SS+ BAY11-7082 (10 μ M) 处理组; 10%烧伤血清 (Burn Serum, BS) 刺激组,即 10%BS 刺激组; 10% BS+ BAY11-7082 处理组。BAY11-7082 于血清刺激细胞后立即加入培养基中进行干预,分别刺激 24h 和 48h 后收取细胞,分为两份,行 Western Blot 和 RT-PCR 检测相应指标。为了研究 ROS 在烧伤血清活化 NLRP3 炎症小体过程中的作用,我们使用 ROS 清除剂 N-acetylcysteine 进行另一项实验。细胞分为 10%SS 刺激组, 10%BS 刺激组以及 10%BS+NAC (1 μ M) 干预组。NAC 于血清刺激细胞后立即加入培养基中进行干预,刺激 24h 后收集细胞,进行相关项目的检测。

2.5 细胞活性氧 (ROS) 的检测

本步实验操作按照说明书进行。按照 1:1000 的比例用不含血清的培养基稀释 DCFH-DA,使其最终浓度为 10 μ mol/l。将细胞消化至 10ml 离心管中,每次样品分三份,3000rpm 离心 5min,使细胞沉淀。去除细胞培养基,加入 1ml 稀释的 DCFH-DA,避光 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床孵育 20min。用无血清细胞培养基洗涤三次,尽量去除未进入细胞内的 DCFH-DA。收集细胞使用流式细胞仪进行荧光强度检测。ROS 的表达水平取决于平均荧光强度。

2.6 细胞上清中 IL-1 β 和 IL-18 的检测

按照 IL-1 β 和 IL-18 ELISA 说明书上的操作步骤,检测细胞上清中的 IL-1 β 和 IL-18 的含量,使用 680 型酶标仪读取 450nm 波长处的光度值,根据标准曲线计算上清中 IL-1 β 和 IL-18 的含量。

2.7 Western Blot 检测肺组织中 NLRP3 和 Caspase-1 表达水平

2.7.1 细胞中总蛋白质的提取

将 60mm 培养皿中的培养基弃去,用 PBS 沿着培养皿边沿缓慢注入,轻轻洗去

剩余的培养基。将培养基倒扣至吸水纸上，轻轻拍打，直至培养皿中水分吸干，然后冰面上放置 2min 使水分完全挥发。待培养基中水分挥发干净，每 60mm 培养皿中加入含蛋白酶抑制剂 PMSF 的 RIPA 蛋白裂解液 60 μ l，用细胞刮子轻轻将细胞刮下，与 RIPA 裂解液充分混合，冰面放置 5min 使其充分裂解。然后用细胞刮子将裂解液收集于一侧，枪头转移至编号的离心管中。随后加入 5 \times Loading Buffer 15 μ l 放入沸水架煮沸 10min 使蛋白变性，然后拿出置于冰上，于 -20 $^{\circ}$ C 保存。下次使用前要 4 $^{\circ}$ C，12000g，离心 5min。

2.7.2 琼脂糖凝胶电泳及转膜

(1) 电泳：配制浓缩胶和分离胶，浓缩胶浓度为 5%，分离胶浓度为 10%。待胶凝好后加入 500ml 电泳液，使胶完全浸没于电泳液中，按照 30 μ g 的蛋白体系，逐孔加入样品（注意动作轻柔，以防将样品带出）。电泳条件：恒压 90V，时间 20min；恒压 110V，时间 100min。

(2) 转膜：PVDF 浸入甲醇溶液 1min，将胶、PVDF 膜、厚滤纸和棉片组合成三明治夹，置于湿转仪器中，加转膜液，使三明治夹子完全浸没，PVDF 膜靠近正极（蛋白带负电荷，转膜过程中从胶转移到膜上）。转膜时间：恒压 100V 根据目的蛋白分子量大小确定时间：NLRP3 目的蛋白分子质量 110KD，转膜时间为 110min；Caspase-1 和内参蛋白分子量为 30KD 和 37KD，转膜时间为 40min。配制 10% 分离胶和 5% 浓缩胶，随即加入梳子，待凝固好便可使用，若不及时使用必须放置在 4 $^{\circ}$ C 冰箱。

上样，跑胶，100V 恒压 2h。

2.7.3 一抗和二抗孵育

一抗孵育：将转好的 PVDF 膜取出置于室温下的 5% 的脱脂牛奶中进行蛋白封闭，摇床室温 1 小时，封闭后用 TBST 洗去多余的牛奶，加入稀释好的 NLRP3 (1: 1000)、Caspase-1 (1: 500)、GAPDH (1: 3000) 一抗溶液。

将膜和抗体置于小塑料袋内，赶走气泡，4 $^{\circ}$ C 冰箱，过夜保存。

二抗孵育：第二天将膜从取出，室温放置 30min，TBST 进行洗膜，每次 10min，共 3 次，摇床室温孵育兔源二抗 1 小时。

2.7.4 ECL 化学发光

二抗孵育结束后，TBST 洗膜，每次 5min，共 3 次。配制 ECL 发光液：A 液：

B液=1:1, 注意避光配制, 将配好的发光液均与滴于 PVDF 膜上, 快速放入发光仪进行图像采集。

2.8 RT-PCR 检测肺组织中相关分子 mRNA 表达水平

2.8.1 引物设计

根据 NCBI 数据库查找大鼠 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18、GAPDH 基因序列, 使用引物设计软件 Primer Premier 进行高保真度的引物设计, 各基因引物序列如下表

基因名称	种属	引物序列 (5'→3')	产物大小 (bp)
NLRP3	大鼠	上游引物 CAGCGATCAACAGGCGAGAC	141
		下游引物 AGAGATATCCCAGCAAACCTATCCA	
Caspase-1	大鼠	上游引物 CTGGGCAGGCAGCAAATTC	190
		下游引物 AGAGATATCCCAGCAAACCTATCCA	
IL-1 β	大鼠	上游引物 CCCTGAACTCAACTGTGAAATAGCA	111
		下游引物 CCCAAGTCAAGGGCTTGAA	
IL-18	大鼠	上游引物 GACTGGCTGTGACCCTATCTGTGA	154
		下游引物 TTGTGTCCTGGCACACGTTTC	
GAPDH	大鼠	上游引物 GAACATCATCCCTGCATCCA	143
		下游引物 CCAGTGAGCTTCCCGTTCA	

2.8.2 提取组织总 RNA

(1) 收集细胞, 培养皿中立即加入 1ml RNAiso Plus, 若不直接实验即可冻存于 -80℃ 冰箱, 实验开始前将冻存于 -80℃ 冰箱的样品取出, 置于室温环境使其融化, 然后置于冰上, 使用 200ml 移液器反复吹打, 直至组织全部溶解, 溶液内无杂质。室温静置 10min, 12000g, 4℃, 离心 5min, 小心吸取上清 500ml, 置于新的无 RNA 酶离心管中。

(2) 加入 200 μ l 氯仿, 上下颠倒混匀, 静置 10min, 12000g, 4℃, 离心 10-20min, 需要特别小心将离心管从离心机取出, 现在离心管中液体分 3 层, 小心吸取上层透明液体, 将其置于新的无 RNA 酶离心管中 (宁少勿多)。

(3) 加入与管内液体等体积的异丙醇, 约 400-500 μ l, 上下颠倒混匀, 室温静置

10min, 12000g, 4℃, 离心 10min, 离心结束后底部可见白色星状 RNA 沉淀析出, 将上清倒掉, 动作要轻柔。

(4) 加入 1ml 75%酒精 (配制方法: 无水乙醇: DEPC 水=3:1), 上下轻轻旋转离心管, 将挂在管壁上的 RNA 洗去, 7500g, 4℃, 离心 5min, 倒掉上清, 离心管底可见少量白色沉淀为 RNA, 使用 200 μ l 移液器将管底残留的少量液体吸出, 干燥 RNA, 在室温静置 5min 左右, 切勿时间太长或加热。

(5) 加入无 RNA 酶的水 30-50 μ l 溶解 RNA, 视 RNA 多少而定。

(6) 使用紫外分光光度计检测 RNA 吸光度, 计算所提 RNA 浓度和 A260/A280 比, 根据 RNA 浓度确定反转录时样本量, 一般为 20 μ l 含 500-1000 μ g, A260/A280 比控制在 1.8-2.1 之间。

2.8.3 RNA 反转录

反转录体系 10 μ l: 2 μ l PrimeScript^{RT} Mix、1 μ l RNA 样品、7 μ l 无 RNA 酶水。

反转录体系 20 μ l: 4 μ l PrimeScript^{RT} Mix、2 μ l RNA 样品、14 μ l 无 RNA 酶水。

反转录条件: 37℃, 900s; 85℃, 5s; 12℃, 3600s。

转录结束后产物为 DNA, 相对稳定, 以后操作不需无 RNA 酶操作。

2.8.4 RT-PCR 扩增

反转录体系 10 μ l: SYBR 5 μ l、引物各 0.5 μ l、cDNA0.5 μ l、蒸馏水 4 μ l。

反转录体系 20 μ l: SYBR 10 μ l、引物各 1 μ l、cDNA1 μ l、蒸馏水 8 μ l。

反应条件: 两步法: 第一步: 初始变性 95℃ 30s。第二步: PCR 反应 变性 95℃ 维持 15s, 退火 60℃维持 30s, 延长 72℃维持 10s 重复 40 个循环。第三步: 4℃ 保温。

2.8.5 结果分析

反应结束后使用 Bio-Rad 公司的 CFX Manager 进行分析。结果处理采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对量的方法。

2.9 统计学分析

实验数据用均数 \pm 标准误表示, 多组之间的统计学差异比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 组内差异比较采用 t 检验, 使用 GraphPad Prism 软件进行统计学。 $P < 0.05$ 表示结果之间统计学差异有意义。

3 结果

3.1 应用烧伤血清以及 BAY11-7082 后对肺泡巨噬细胞 NLRP3 及 Caspase-1 的表达的影响

我们使用烧伤血清刺激肺泡巨噬细胞来模拟烧伤后脏器损伤微环境。我们通过 RT-PCR 和 Western Blot 检测了烧伤血清刺激后肺泡巨噬细胞内 NLRP3 炎症小体和 Caspase-1 的 mRNA (见图 10a 和 10b) 和蛋白 (见图 10c-e) 表达。结果提示烧伤血清刺激 24-48h 后, 肺泡巨噬细胞内 NLRP3 和 Caspase-1 的蛋白表达和 mRNA 表达较正常血清刺激组明显升高, 差异具有统计学意义。而经过 BAY11-7082 干预, 其 NLRP3 和 Caspase-1 蛋白表达和 mRNA 表达虽较正常血清刺激组稍高, 但显著低于烧伤血清刺激组。说明烧伤血清刺激后, 肺泡巨噬细胞内 NLRP3 炎症小体活化, 而应用 BAY11-7082 后, 其活化水平降低。

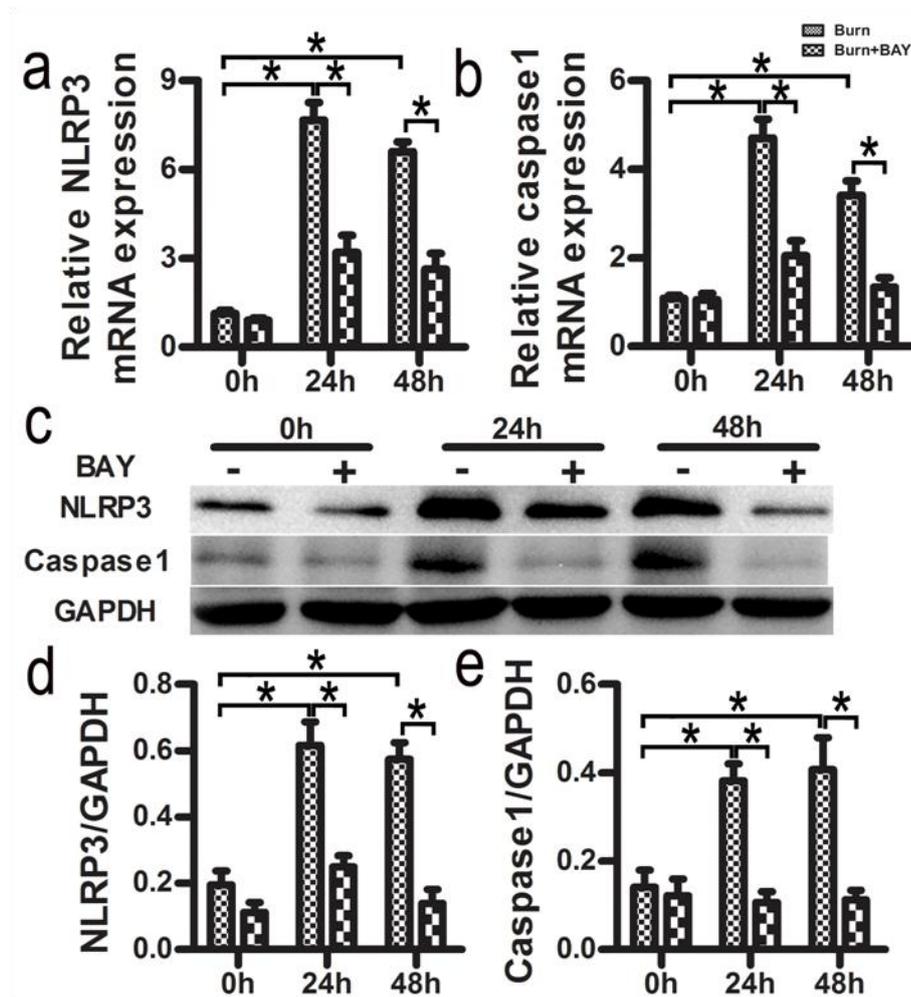


图 10 BAY11-7082 抑制烧伤血清刺激肺泡巨噬细胞 NLRP3、Caspase-1 活化

使用含 10% 烧伤血清的培养基刺激肺泡巨噬细胞, 24h 和 48h 后收集细胞进行检测, 含 10% 正常大鼠血清的培养基刺激的肺泡巨噬细胞作为对照, 同时部分细胞在加入血清刺激后立即加入 BAY11-7082 干预。a-b: RT-PCR 检测 BAY11-7082 预处理肺泡巨噬细胞中 NLRP3 和 Caspase-1 的 mRNA 水平变化; c: Western Blot 检测 BAY11-7082 预处理肺泡巨噬细胞中 NLRP3 和 Caspase-1 的蛋白水平的变化; d-e: NLRP3 和 Caspase-1 的蛋白变化柱状统计图。(n=6, *表示 $P < 0.05$)

3.2 应用烧伤血清以及 BAY11-7082 后对肺泡巨噬细胞 IL-1 β 和 IL-18 表达的影响

我们进而采用 ELISA 方法检测烧伤血清刺激肺泡巨噬细胞后其细胞上清中 IL-1 β 和 IL-18 的含量 (见图 11a 和 11b), 发现烧伤血清刺激 24-48h 后, 其上清中的 IL-1 β 和 IL-18 明显升高, 而应用 BAY11-7082 抑制剂后, 能显著降低其活化水平。说明烧伤血清刺激肺泡巨噬细胞, 能激活细胞内的炎症反应, 而应用 NLRP3 炎症小体抑制剂后, 其炎症反应明显降低。

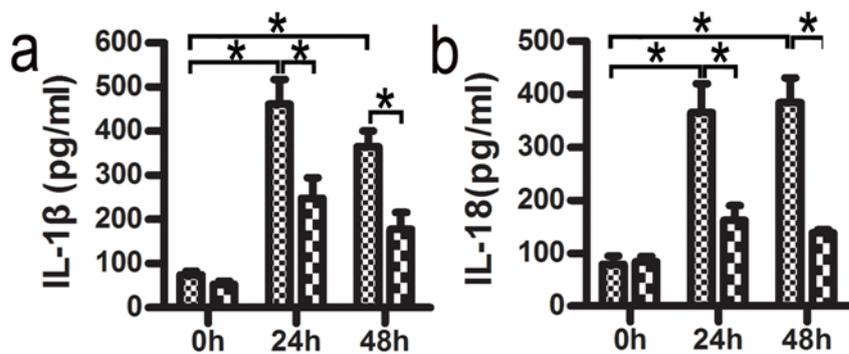


图 11 BAY11-7082 抑制烧伤血清刺激肺泡巨噬细胞 IL-1 β 和 IL-18 的生成

使用含 10% 烧伤血清的培养基刺激肺泡巨噬细胞, 24h 和 48h 后收集细胞上清进行检测, 含 10% 正常大鼠血清的培养基刺激的肺泡巨噬细胞上清作为对照, 同时部分细胞在加入血清刺激后立即加入 BAY11-7082 干预。a-b: ELISA 检测 BAY11-7082 预处理肺泡巨噬细胞中 IL-1 β 和 IL-18 的生成。(n=6, *表示 $P < 0.05$)

3.3 ROS 清除剂对烧伤血清刺激肺泡巨噬细胞 NLRP3 炎症小体信号通路的影响。

ROS 在缺血再灌注损伤中 NLRP3 炎症小体信号通路的活化过程中起着重要作用, 为了探究烧伤刺激后 NLRP3 炎症小体活化是否是 ROS 依赖的, 我们采用 ROS 清除剂 NAC 预处理肺泡巨噬细胞, 进而检测其 NLRP3 炎症小体信号通路的活化水平。结果发现, 烧伤血清刺激后, 肺泡巨噬细胞内 ROS 含量显著升高 (见图 12a 和 12b), 同时细胞内 NLRP3 炎症小体、Caspase-1 以及细胞上清中 IL-1 β 和 IL-18 显著

活化（见图 12c-h）；而应用 ROS 清除剂 NAC 后，能显著清除细胞内 ROS 水平（见图 12a 和 12b），同时其细胞内 NLRP3 炎症小体、Caspase-1 的蛋白水平和 mRNA 水平以及细胞上清中 IL-1 β 和 IL-18 表达明显降低（见图 12c-h）。说明，应用 ROS 清除剂能显著抑制 NLRP3 炎症小体信号通路的活化，烧伤后 NLRP3 炎症小体的活化至少是部分 ROS 依赖的。

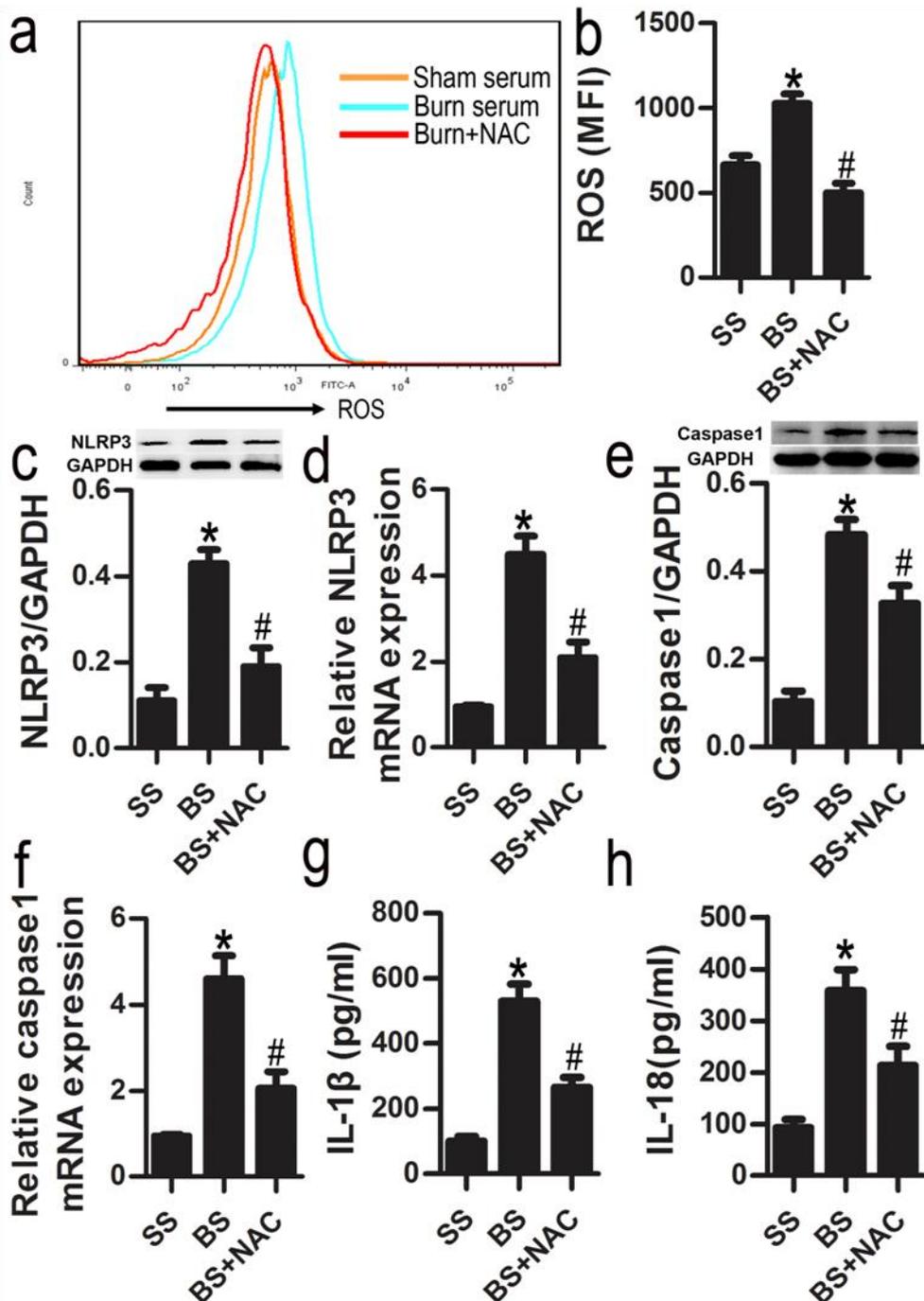


图 11 ROS 清除剂抑制烧伤血清刺激肺泡巨噬细胞 NLRP3 炎症小体信号通路和

IL-1 β 和 IL-18 的生成

使用含 10% 烧伤血清的培养基刺激肺泡巨噬细胞，部分细胞在加入烧伤血清刺激后立即加入 NAC 干预，含 10% 正常大鼠血清的培养基刺激的肺泡巨噬细胞和上清作为对照，24h 后收集细胞和上清进行检测。a-b: 使用流式细胞仪检测细胞内 ROS 含量并制作统计图；c-f: Western Blot 和 RT-PCR 检测 NAC 干预烧伤血清刺激肺泡巨噬细胞中 NLRP3 和 Caspase-1 的蛋白水平和 mRNA 水平的变化，并制作统计图；g-h: ELISA 检测 NAC 干预烧伤血清刺激肺泡巨噬细胞上清中 IL-1 β 和 IL-18 的生成。(n=6, *表示与 SS 组相比 $P < 0.05$, #表示与 BS 组相比 $P < 0.05$; SS 表示正常血清刺激组, BS 表示烧伤血清刺激组。)

4 讨论

在第一部分的实验中，我们证明了烫伤后肺组织中 NLRP3 炎症小体信号通路大量活化，而抑制 NLRP3 炎症小体信号通路的活化，能够显著减轻肺损伤。然而，烫伤后 NLRP3 炎症小体是如何活化的目前仍不清楚。

在文献回顾中我们知道，内外环境中多种因素均可以激活 NLRP3 炎症小体，但这些因素主要是通过三种机制来活化 NLRP3 的，即钾离子外流、组织蛋白酶 B 的释放以及 ROS 的生成。既往研究表明，在 40% 面积烧伤动物模型中，心肌线粒体 ROS 水平显著升高^[120]，另有研究证明 ROS 诱导的氧化应激损伤参与了烧伤诱导的肺损伤的发病机制^[121]。因此我们推测烧伤是否是通过产生 ROS 来活化 NLRP3 炎症小体的。

巨噬细胞在免疫稳态的维持和宿主防御反应过程中起着关键作用，当肺脏受到炎症刺激时巨噬细胞可分泌多种炎症因子，促进中性粒细胞浸润，启动炎症反应，加重组织损伤，在肺损伤的发病机制中起着重要作用。肺泡巨噬细胞是肺内主要的巨噬细胞，在肺泡灌洗液中肺泡巨噬细胞约占总细胞数的 90% 以上^[109]，提示肺泡巨噬细胞可能在急性肺损伤中发挥着重要作用。烧伤后肺泡巨噬细胞也被大量活化，抑制肺泡巨噬细胞的功能能够显著改善肺泡屏障失调，减轻肺部炎症^[33]。

因此我们分离培养肺泡巨噬细胞来进行体外实验，探究烧伤血清刺激巨噬细胞 NLRP3 的表达及其活化机制。为了模拟烧伤微环境，我们选用了含烫伤后 24h 血清

的 10% 培养基刺激巨噬细胞。

我们的结果表明，烧伤血清能显著促进肺泡巨噬细胞 NLRP3 和 Caspase-1 的表达，同时我们发现肺泡巨噬细胞上清液中 NLRP3 炎症小体的下游分子，IL-1 β 和 IL-18 的表达也显著升高，提示烧伤血清能激活巨噬细胞中 NLRP3 炎症小体并促进炎症反应的发生。而在应用 BAY11-7082 后，能显著抑制 NLRP3 炎症小体的活化和 IL-1 β 、IL-18 的表达

为了研究 NLRP3 炎症小体活化和 ROS 的关系，我们使用了 ROS 清除剂 N-acetylcysteine (NAC)。NAC 在谷胱甘肽形成过程中起着非常重要的作用，它能够非特异的清除细胞内 ROS 的水平^[122]。我们的研究发现，烧伤血清刺激的巨噬细胞中 ROS 水平显著升高，而应用 NAC 后，可显著降低细胞内 ROS 的生成。进一步试验发现，应用 NAC 后，烧伤血清刺激的肺泡巨噬细胞内 NLRP3 炎症小体的活性显著降低，同时细胞上清中的 IL-1 β 和 IL-18 表达明显下降。

因此，烧伤血清刺激肺泡巨噬细胞中 NLRP3 炎症小体信号通路的活化是 ROS 依赖的过程，其活化显著受到 ROS 的调控。但同时我们也应该注意到，应用 ROS 清除剂后，只是降低了 NLRP3 炎症小体的活化，而并不是清除了其活化，说明还存在有其他机制，可能同时激活了 NLRP3 炎症小体信号通路，因而 NLRP3 炎症小体信号通路的活化可能是部分 ROS 依赖的。

由于我们使用的 ROS 清除剂是非特异的，它既可以清除线粒体来源的 ROS，也可以清除胞质来源的 ROS，因此到底是细胞内何种方式来源的 ROS 激活了 NLRP3 炎症小体，还是总的 ROS 的综合效应，目前仍未清楚。明确各自来源的 ROS 的作用还需要进一步研究。

肺泡巨噬细胞是肺内巨噬细胞的重要组成部分，但同时在急性肺损伤过程中部分骨髓来源的循环中的巨噬细胞也迁移至肺组织中发挥作用。因此我们同时还使用了小鼠来源的巨噬细胞系 RAW264.7 细胞进行了同样过程的研究（数据没有展示），而这部分研究结果与烧伤血清刺激肺泡巨噬细胞的结果保持一致。说明，骨髓来源的巨噬细胞中 NLRP3 炎症小体的活化也在烧伤诱导的急性肺损伤中发挥着重要作用。

综上所述，本研究证实了烧伤后可激活肺泡巨噬细胞中的 NLRP3 炎症小体信号通路，而活化的 NLRP3 炎症小体可进一步促进 IL-1 β 和 IL-18 等炎症启动因子的表

达，进而扩大炎症反应，导致肺损伤。除此之外，烧伤诱导的 NLRP3 炎症小体活化是部分 ROS 依赖的过程。抑制 NLRP3 炎症小体的活性或清除细胞内过量的 ROS，均可有效减轻肺损伤（见图 12）。这些结果提示通过调节 NLRP3 炎症小体信号通路或 ROS 的活性，能够为烧伤后肺损伤提供潜在的治疗策略。

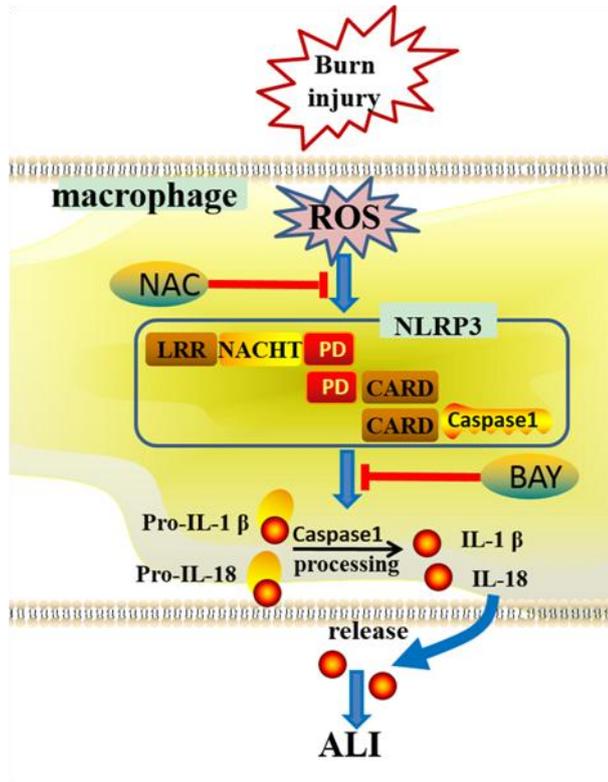


图 12 ROS 介导的 NLRP3 炎症小体活化在烧伤诱导的急性肺损伤中的机制模式图

小 结

本研究通过建立 30% 总体表面积烫伤大鼠肺损伤模型及烧伤血清刺激肺泡巨噬细胞模型，探究了严重烧伤后 NLRP3 炎症小体信号通路是否活化及其对肺损伤的作用，并进一步研究了烧伤后 NLRP3 炎症小体活化的机制。

主要结论：

1. 大鼠烫伤后可引起急性肺损伤；烫伤后 IL-1 β 和 IL-18 表达显著升高；大鼠严重烫伤 24-48h 肺组织中 NLRP3 炎症小体大量活化。
2. BAY11-7082 可抑制 NLRP3 炎症小体的活化；减轻严重烫伤引起肺部病理损害；降低肺部的炎症水平。
3. NLRP3 炎症小体参与烫伤后肺损伤的过程可能是通过其活化释放 IL-1 β 和 IL-18，进而促进炎症反应的发生而实现的。
4. 大鼠肺泡巨噬细胞在烧伤血清刺激下，ROS 表达增高；抑制巨噬细胞 ROS 水平，可明显降低 NLRP3 炎症小体信号通路活化，减轻炎症反应。
5. 烧伤诱导的 NLRP3 炎症小体活化是部分 ROS 依赖的过程。抑制巨噬细胞内 ROS 或 NLRP3 活化，可以减轻肺损伤。这些结果为烧伤后肺损伤的预防和救治提供了科研依据。

参考文献

- [1] Rocha J, Eduardo-Figueira M, Barateiro A, Fernandes A, Brites D, Pinto R, Freitas M, Fernandes E, Mota-Filipe H, Sepodes B. Erythropoietin reduces acute lung injury and multiple organ failure/dysfunction associated to a scald-burn inflammatory injury in the rat. *Inflammation*, 2015, 38(1):312-26.
- [2] Yang X, Bai H, Cai W, Liu J, Wang Y, Xu Y, Li J, Zhou Q, Han J, Zhu X, Dong M, Hu D. Inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger 1 by cariporide alleviates burn-induced multiple organ injury. *The Journal of surgical research*, 2013, 185(2):797-804.
- [3] Liang X, Wang RS, Wang F, Liu S, Guo F, Sun L, Wang YJ, Sun YX, Chen XL. Sodium butyrate protects against severe burn-induced remote acute lung injury in rats. *PloS one*, 2013, 8(7):e68786.
- [4] Fang Y, Xu P, Gu C, Wang Y, Fu XJ, Yu WR, Yao M. Ulinastatin improves pulmonary function in severe burn-induced acute lung injury by attenuating inflammatory response. *The Journal of trauma*, 2011, 71(5):1297-304.
- [5] Edgar DW, Fish JS, Gomez M, Wood FM. Local and systemic treatments for acute edema after burn injury: a systematic review of the literature. *Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association*, 2011, 32(2):334-47.
- [6] Dushianthan A, Grocott MP, Postle AD, Cusack R. Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury. *Postgraduate medical journal*, 2011, 87(1031):612-22.
- [7] Fanelli V, Ranieri VM. Mechanisms and clinical consequences of acute lung injury. *Annals of the American Thoracic Society*, 2015, 12 Suppl 1(S3-8).
- [8] Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. *The Journal of clinical investigation*, 2012, 122(8):2731-40.
- [9] Uhal BD. Cell cycle kinetics in the alveolar epithelium. *The American journal of physiology*, 1997, 272(6 Pt 1):L1031-45.
- [10] Wiener-Kronish JP, Albertine KH, Matthay MA. Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to *Escherichia coli* endotoxin. *The Journal of clinical investigation*, 1991, 88(3):864-75.

- [11] Sawa T. The molecular mechanism of acute lung injury caused by *Pseudomonas aeruginosa*: from bacterial pathogenesis to host response. *Journal of intensive care*, 2014, 2(1):10.
- [12] Sznajder JJ. Strategies to increase alveolar epithelial fluid removal in the injured lung. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 1999, 160(5 Pt 1):1441-2.
- [13] Perl M, Lomas-Neira J, Venet F, Chung CS, Ayala A. Pathogenesis of indirect (secondary) acute lung injury. *Expert review of respiratory medicine*, 2011, 5(1):115-26.
- [14] Rogol PR. Intact epithelial barrier function is critical for resolution of alveolar edema in humans. *The American review of respiratory disease*, 1991, 144(2):468.
- [15] Baker CS, Evans TW, Randle BJ, Haslam PL. Damage to surfactant-specific protein in acute respiratory distress syndrome. *Lancet (London, England)*, 1999, 353(9160):1232-7.
- [16] Bardales RH, Xie SS, Schaefer RF, Hsu SM. Apoptosis is a major pathway responsible for the resolution of type II pneumocytes in acute lung injury. *The American journal of pathology*, 1996, 149(3):845-52.
- [17] Guinee D, Jr., Brambilla E, Fleming M, Hayashi T, Rahn M, Koss M, Ferrans V, Travis W. The potential role of BAX and BCL-2 expression in diffuse alveolar damage. *The American journal of pathology*, 1997, 151(4):999-1007.
- [18] Kiener PA, Davis PM, Rankin BM, Klebanoff SJ, Ledbetter JA, Starling GC, Liles WC. Human monocytic cells contain high levels of intracellular Fas ligand: rapid release following cellular activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 1997, 159(4):1594-8.
- [19] Serrao KL, Fortenberry JD, Owens ML, Harris FL, Brown LA. Neutrophils induce apoptosis of lung epithelial cells via release of soluble Fas ligand. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*, 2001, 280(2):L298-305.
- [20] Perl M, Chung CS, Perl U, Thakkar R, Lomas-Neira J, Ayala A. Therapeutic accessibility of caspase-mediated cell death as a key pathomechanism in indirect acute lung injury. *Critical care medicine*, 2010, 38(4):1179-86.
- [21] Matute-Bello G, Frevert CW, Liles WC, Nakamura M, Ruzinski JT, Ballman K, Wong VA, Vathanaprida C, Martin TR. Fas/Fas ligand system mediates epithelial injury, but not pulmonary host defenses, in response to inhaled bacteria. *Infection and immunity*, 2001, 69(9):5768-76.
- [22] Maniatis NA, Kotanidou A, Catravas JD, Orfanos SE. Endothelial pathomechanisms in acute lung

injury. *Vascular pharmacology*, 2008, 49(4-6):119-33.

[23] Maniatis NA, Orfanos SE. The endothelium in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Current opinion in critical care*, 2008, 14(1):22-30.

[24] Standiford TJ, Ward PA. Therapeutic targeting of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, 2016, 167(1):183-91.

[25] Bhatia M, Zemans RL, Jeyaseelan S. Role of chemokines in the pathogenesis of acute lung injury. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 2012, 46(5):566-72.

[26] Hofstra JJ, Haitisma JJ, Juffermans NP, Levi M, Schultz MJ. The role of bronchoalveolar hemostasis in the pathogenesis of acute lung injury. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 2008, 34(5):475-84.

[27] Herold S, Gabrielli NM, Vadasz I. Novel concepts of acute lung injury and alveolar-capillary barrier dysfunction. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*, 2013, 305(10):L665-81.

[28] Zhou X, Dai Q, Huang X. Neutrophils in acute lung injury. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 2012, 17(2278-83).

[29] Werner F, Kojonazarov B, Gassner B, Abesser M, Schuh K, Volker K, Baba HA, Dahal BK, Schermuly RT, Kuhn M. Endothelial actions of atrial natriuretic peptide prevent pulmonary hypertension in mice. *Basic research in cardiology*, 2016, 111(2):22.

[30] Kapitsinou PP, Rajendran G, Astleford L, Michael M, Schonfeld MP, Fields T, Shay S, French JL, West J, Haase VH. The endothelial PHD2/HIF-2 axis regulates pulmonary artery pressure in mice. *Molecular and cellular biology*, 2016.

[31] Glas GJ, Van Der Sluijs KF, Schultz MJ, Hofstra JJ, Van Der Poll T, Levi M. Bronchoalveolar hemostasis in lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 2013, 11(1):17-25.

[32] Aggarwal NR, King LS, D'Alessio FR. Diverse macrophage populations mediate acute lung inflammation and resolution. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*, 2014, 306(8):L709-25.

[33] Niesler U, Palmer A, Radermacher P, Huber-Lang MS. Role of alveolar macrophages in the

- inflammatory response after trauma. *Shock (Augusta, Ga)*, 2014, 42(1):3-10.
- [34] Naidu BV, Woolley SM, Farivar AS, Thomas R, Fraga CH, Goss CH, Mulligan MS. Early tumor necrosis factor-alpha release from the pulmonary macrophage in lung ischemia-reperfusion injury. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 2004, 127(5):1502-8.
- [35] Filgueiras LR, Jr., Martins JO, Serezani CH, Capelozzi VL, Montes MB, Jancar S. Sepsis-induced acute lung injury (ALI) is milder in diabetic rats and correlates with impaired NFkB activation. *PLoS one*, 2012, 7(9):e44987.
- [36] Liener UC, Knoferl MW, Strater J, Barth TF, Pauser EM, Nussler AK, Kinzl L, Bruckner UB, Gebhard F. Induction of apoptosis following blunt chest trauma. *Shock (Augusta, Ga)*, 2003, 20(6):511-6.
- [37] Park DR, Thomsen AR, Frevert CW, Pham U, Skerrett SJ, Kiener PA, Liles WC. Fas (CD95) induces proinflammatory cytokine responses by human monocytes and monocyte-derived macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 2003, 170(12):6209-16.
- [38] Lee WL, Downey GP. Neutrophil activation and acute lung injury. *Current opinion in critical care*, 2001, 7(1):1-7.
- [39] Zhao X, Dib M, Wang X, Widegren B, Andersson R. Influence of mast cells on the expression of adhesion molecules on circulating and migrating leukocytes in acute pancreatitis-associated lung injury. *Lung*, 2005, 183(4):253-64.
- [40] Rosen GM, Pou S, Ramos CL, Cohen MS, Britigan BE. Free radicals and phagocytic cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1995, 9(2):200-9.
- [41] Banan A, Zhang L, Fields JZ, Farhadi A, Talmage DA, Keshavarzian A. PKC-zeta prevents oxidant-induced iNOS upregulation and protects the microtubules and gut barrier integrity. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*, 2002, 283(4):G909-22.
- [42] Perl M, Lomas-Neira J, Chung CS, Ayala A. Epithelial cell apoptosis and neutrophil recruitment in acute lung injury-a unifying hypothesis? What we have learned from small interfering RNAs. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*, 2008, 14(7-8):465-75.
- [43] Jenne CN, Urrutia R, Kubes P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *International journal of laboratory hematology*, 2013, 35(3):254-61.

- [44] Grommes J, Alard JE, Drechsler M, Wantha S, Morgelin M, Kuebler WM, Jacobs M, von Hundelshausen P, Markart P, Wygrecka M, Preissner KT, Hackeng TM, Koenen RR, Weber C, Soehnlein O. Disruption of platelet-derived chemokine heteromers prevents neutrophil extravasation in acute lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2012, 185(6):628-36.
- [45] Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, Nguyen JX, Marques MB, Monestier M, Toy P, Werb Z, Looney MR. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *The Journal of clinical investigation*, 2012, 122(7):2661-71.
- [46] Reiss LK, Uhlig U, Uhlig S. Models and mechanisms of acute lung injury caused by direct insults. *European journal of cell biology*, 2012, 91(6-7):590-601.
- [47] Crisan TO, Netea MG, Joosten LA. Innate immune memory: implications for host responses to damage-associated molecular patterns. *European journal of immunology*, 2016.
- [48] Gensel JC, Wang Y, Guan Z, Beckwith KA, Braun KJ, Wei P, McTigue DM, Popovich PG. Toll-Like Receptors and Dectin-1, a C-Type Lectin Receptor, Trigger Divergent Functions in CNS Macrophages. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2015, 35(27):9966-76.
- [49] Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, van der Poll T. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence*, 2014, 5(1):36-44.
- [50] Tsuchiya K, Hara H. The inflammasome and its regulation. *Critical reviews in immunology*, 2014, 34(1):41-80.
- [51] von Moltke J, Ayres JS, Kofoed EM, Chavarria-Smith J, Vance RE. Recognition of bacteria by inflammasomes. *Annual review of immunology*, 2013, 31(73-106).
- [52] Janowski AM, Kolb R, Zhang W, Sutterwala FS. Beneficial and Detrimental Roles of NLRs in Carcinogenesis. *Frontiers in immunology*, 2013, 4(370).
- [53] Broderick L, De Nardo D, Franklin BS, Hoffman HM, Latz E. The inflammasomes and autoinflammatory syndromes. *Annual review of pathology*, 2015, 10(395-424).
- [54] Liu Q, Li J. [NLRP3 inflammasome and diabetes]. *Sheng wu yi xue gong cheng xue za zhi = Journal of biomedical engineering = Shengwu yixue gongchengxue zazhi*, 2014, 31(6):1414-8.
- [55] Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes research and clinical practice*, 2014, 105(2):141-50.

- [56] Tan MS, Yu JT, Jiang T, Zhu XC, Tan L. The NLRP3 inflammasome in Alzheimer's disease. *Molecular neurobiology*, 2013, 48(3):875-82.
- [57] Lu A, Wu H. Structural mechanisms of inflammasome assembly. *The FEBS journal*, 2015, 282(3):435-44.
- [58] Takahashi M. NLRP3 inflammasome as a novel player in myocardial infarction. *International heart journal*, 2014, 55(2):101-5.
- [59] Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, Dixit VM. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, 2006, 440(7081):228-32.
- [60] Kanneganti TD, Ozoren N, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Franchi L, Whitfield J, Barchet W, Colonna M, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A, Grant EP, Akira S, Nunez G. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature*, 2006, 440(7081):233-6.
- [61] Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hanneschlager N, Endres S, Hartmann G, Tardivel A, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Mocsai A, Tschopp J, Ruland J. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature*, 2009, 459(7245):433-6.
- [62] Dostert C, Guarda G, Romero JF, Menu P, Gross O, Tardivel A, Suva ML, Stehle JC, Kopf M, Stamenkovic I, Corradin G, Tschopp J. Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. *PloS one*, 2009, 4(8):e6510.
- [63] Gurcel L, Abrami L, Girardin S, Tschopp J, van der Goot FG. Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell*, 2006, 126(6):1135-45.
- [64] Yamasaki K, Muto J, Taylor KR, Cogen AL, Audish D, Bertin J, Grant EP, Coyle AJ, Misaghi A, Hoffman HM, Gallo RL. NLRP3/cryopyrin is necessary for interleukin-1beta (IL-1beta) release in response to hyaluronan, an endogenous trigger of inflammation in response to injury. *The Journal of biological chemistry*, 2009, 284(19):12762-71.
- [65] Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, Fitzgerald KA, Latz E, Moore KJ, Golenbock DT. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nature immunology*, 2008, 9(8):857-65.
- [66] Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation

through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science (New York, NY)*, 2008, 320(5876):674-7.

[67] Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature*, 2008, 453(7198):1122-6.

[68] Suarez R, Buelvas N. [Inflammasome: activation mechanisms]. *Investigacion clinica*, 2015, 56(1):74-99.

[69] Kahlenberg JM, Dubyak GR. Differing caspase-1 activation states in monocyte versus macrophage models of IL-1beta processing and release. *Journal of leukocyte biology*, 2004, 76(3):676-84.

[70] Perregaux DG, Gabel CA. Human monocyte stimulus-coupled IL-1beta posttranslational processing: modulation via monovalent cations. *The American journal of physiology*, 1998, 275(6 Pt 1):C1538-47.

[71] Perregaux DG, Laliberte RE, Gabel CA. Human monocyte interleukin-1beta posttranslational processing. Evidence of a volume-regulated response. *The Journal of biological chemistry*, 1996, 271(47):29830-8.

[72] Cruz CM, Rinna A, Forman HJ, Ventura AL, Persechini PM, Ojcius DM. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *The Journal of biological chemistry*, 2007, 282(5):2871-9.

[73] Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nature immunology*, 2010, 11(2):136-40.

[74] Brown DI, Griendling KK. Nox proteins in signal transduction. *Free radical biology & medicine*, 2009, 47(9):1239-53.

[75] Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS, Sadler JJ, Colegio OR, Tephly LA, Carter AB, Rothman PB, Flavell RA, Sutterwala FS. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(26):9035-40.

[76] Guarda G, Zenger M, Yazdi AS, Schroder K, Ferrero I, Menu P, Tardivel A, Mattmann C, Tschopp J. Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 2011, 186(4):2529-34.

- [77] Gwyer Findlay E, Hussell T. Macrophage-mediated inflammation and disease: a focus on the lung. *Mediators of inflammation*, 2012, 2012(140937).
- [78] Heng TS, Painter MW. The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells. *Nature immunology*, 2008, 9(10):1091-4.
- [79] Peeters PM, Perkins TN, Wouters EF, Mossman BT, Reynaert NL. Silica induces NLRP3 inflammasome activation in human lung epithelial cells. *Particle and fibre toxicology*, 2013, 10(3).
- [80] Tran HB, Lewis MD, Tan LW, Lester SE, Baker LM, Ng J, Hamilton-Bruce MA, Hill CL, Koblar SA, Rischmueller M, Ruffin RE, Wormald PJ, Zalewski PD, Lang CJ. Immunolocalization of NLRP3 Inflammasome in Normal Murine Airway Epithelium and Changes following Induction of Ovalbumin-Induced Airway Inflammation. *Journal of allergy*, 2012, 2012(819176).
- [81] Taubenberger JK, Morens DM. The pathology of influenza virus infections. *Annual review of pathology*, 2008, 3(499-522).
- [82] Allen IC, Scull MA, Moore CB, Holl EK, McElvania-TeKippe E, Taxman DJ, Guthrie EH, Pickles RJ, Ting JP. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity*, 2009, 30(4):556-65.
- [83] Thomas PG, Dash P, Aldridge JR, Jr., Ellebedy AH, Reynolds C, Funk AJ, Martin WJ, Lamkanfi M, Webby RJ, Boyd KL, Doherty PC, Kanneganti TD. The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1. *Immunity*, 2009, 30(4):566-75.
- [84] Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F, Reis e Sousa C. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science (New York, NY)*, 2006, 314(5801):997-1001.
- [85] Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, Latz E. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature immunology*, 2008, 9(8):847-56.
- [86] Smith RE, Strieter RM, Phan SH, Kunkel SL. C-C chemokines: novel mediators of the profibrotic inflammatory response to bleomycin challenge. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 1996, 15(6):693-702.
- [87] Gasse P, Riteau N, Charron S, Girre S, Fick L, Petrilli V, Tschopp J, Lagente V, Quesniaux VF,

Ryffel B, Couillin I. Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2009, 179(10):903-13.

[88] Decramer M, Janssens W, Miravittles M. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* (London, England), 2012, 379(9823):1341-51.

[89] Birrell MA, Eltom S. The role of the NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of airway disease. *Pharmacology & therapeutics*, 2011, 130(3):364-70.

[90] Aaron SD, Angel JB, Lunau M, Wright K, Fex C, Le Saux N, Dales RE. Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2001, 163(2):349-55.

[91] Lappalainen U, Whitsett JA, Wert SE, Tichelaar JW, Bry K. Interleukin-1beta causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 2005, 32(4):311-8.

[92] Botelho FM, Bauer CM, Finch D, Nikota JK, Zavitz CC, Kelly A, Lambert KN, Piper S, Foster ML, Goldring JJ, Wedzicha JA, Bassett J, Bramson J, Iwakura Y, Sleeman M, Kolbeck R, Coyle AJ, Humbles AA, Stampfli MR. IL-1alpha/IL-1R1 expression in chronic obstructive pulmonary disease and mechanistic relevance to smoke-induced neutrophilia in mice. *PloS one*, 2011, 6(12):e28457.

[93] Kang MJ, Homer RJ, Gallo A, Lee CG, Crothers KA, Cho SJ, Rochester C, Cain H, Chupp G, Yoon HJ, Elias JA. IL-18 is induced and IL-18 receptor alpha plays a critical role in the pathogenesis of cigarette smoke-induced pulmonary emphysema and inflammation. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950), 2007, 178(3):1948-59.

[94] Rovina N, Dima E, Gerassimou C, Kollintza A, Gratiou C, Roussos C. Interleukin-18 in induced sputum: association with lung function in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory medicine*, 2009, 103(7):1056-62.

[95] Churg A, Zhou S, Wang X, Wang R, Wright JL. The role of interleukin-1beta in murine cigarette smoke-induced emphysema and small airway remodeling. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 2009, 40(4):482-90.

[96] Land WG. Transfusion-Related Acute Lung Injury: The Work of DAMPs. *Transfusion medicine and hemotherapy* : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und

Immunhamatologie, 2013, 40(1):3-13.

[97] dos Santos CC, Slutsky AS. The contribution of biophysical lung injury to the development of biotrauma. Annual review of physiology, 2006, 68(585-618).

[98] Besnard AG, Guillou N, Tschopp J, Erard F, Couillin I, Iwakura Y, Quesniaux V, Ryffel B, Togbe D. NLRP3 inflammasome is required in murine asthma in the absence of aluminum adjuvant. Allergy, 2011, 66(8):1047-57.

[99] Rampini SK, Selchow P, Keller C, Ehlers S, Bottger EC, Sander P. LspA inactivation in Mycobacterium tuberculosis results in attenuation without affecting phagosome maturation arrest. Microbiology (Reading, England), 2008, 154(Pt 10):2991-3001.

[100] Tolle LB, Standiford TJ. Danger-associated molecular patterns (DAMPs) in acute lung injury. The Journal of pathology, 2013, 229(2):145-56.

[101] Zhang WF, Zhu XX, Hu DH, Xu CF, Wang YC, Lv GF. Intensive insulin treatment attenuates burn-initiated acute lung injury in rats: role of the protective endothelium. Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association, 2011, 32(3):e51-8.

[102] Gloor B, Blinman TA, Rigberg DA, Todd KE, Lane JS, Hines OJ, Reber HA. Kupffer cell blockade reduces hepatic and systemic cytokine levels and lung injury in hemorrhagic pancreatitis in rats. Pancreas, 2000, 21(4):414-20.

[103] Krzyzaniak M, Cheadle G, Peterson C, Loomis W, Putnam J, Wolf P, Baird A, Eliceiri B, Bansal V, Coimbra R. Burn-induced acute lung injury requires a functional Toll-like receptor 4. Shock (Augusta, Ga), 2011, 36(1):24-9.

[104] Marko P, Layon AJ, Caruso L, Mazingo DW, Gabrielli A. Burn injuries. Current opinion in anaesthesiology, 2003, 16(2):183-91.

[105] Clark CJ, Pollock AJ, Reid WH, Campbell D, Gemmell C. Role of pulmonary alveolar macrophage activation in acute lung injury after burns and smoke inhalation. Lancet, 1988, 2(8616):872-4.

[106] Orman MA, Nguyen TT, Ierapetritou MG, Berthiaume F, Androulakis IP. Comparison of the cytokine and chemokine dynamics of the early inflammatory response in models of burn injury and infection. Cytokine, 2011, 55(3):362-71.

[107] Rana SN, Li X, Chaudry IH, Bland KI, Choudhry MA. Inhibition of IL-18 reduces

myeloperoxidase activity and prevents edema in intestine following alcohol and burn injury. *Journal of leukocyte biology*, 2005, 77(5):719-28.

[108] Li X, Kovacs EJ, Schwacha MG, Chaudry IH, Choudhry MA. Acute alcohol intoxication increases interleukin-18-mediated neutrophil infiltration and lung inflammation following burn injury in rats. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*, 2007, 292(5):L1193-201.

[109] Wu J, Yan Z, Schwartz DE, Yu J, Malik AB, Hu G. Activation of NLRP3 inflammasome in alveolar macrophages contributes to mechanical stretch-induced lung inflammation and injury. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 2013, 190(7):3590-9.

[110] Jordan JA, Guo RF, Yun EC, Sarma V, Warner RL, Crouch LD, Senaldi G, Ulich TR, Ward PA. Role of IL-18 in acute lung inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 2001, 167(12):7060-8.

[111] Shao W, Yeretssian G, Doiron K, Hussain SN, Saleh M. The caspase-1 digestome identifies the glycolysis pathway as a target during infection and septic shock. *The Journal of biological chemistry*, 2007, 282(50):36321-9.

[112] Sun Q, Gao W, Loughran P, Shapiro R, Fan J, Billiar TR, Scott MJ. Caspase 1 activation is protective against hepatocyte cell death by up-regulating beclin 1 protein and mitochondrial autophagy in the setting of redox stress. *The Journal of biological chemistry*, 2013, 288(22):15947-58.

[113] Osuka A, Hanschen M, Stoecklein V, Lederer JA. A protective role for inflammasome activation following injury. *Shock (Augusta, Ga)*, 2012, 37(1):47-55.

[114] Stanojic M, Chen P, Harrison RA, Wang V, Antonyshyn J, Zuniga-Pflucker JC, Jeschke MG. Leukocyte infiltration and activation of the NLRP3 inflammasome in white adipose tissue following thermal injury. *Critical care medicine*, 2014, 42(6):1357-64.

[115] Diao L, Marshall AH, Dai X, Bogdanovic E, Abdullahi A, Amini-Nik S, Jeschke MG. Burn plus lipopolysaccharide augments endoplasmic reticulum stress and NLRP3 inflammasome activation and reduces PGC-1 α in liver. *Shock (Augusta, Ga)*, 2014, 41(2):138-44.

[116] Liu Y, Lian K, Zhang L, Wang R, Yi F, Gao C, Xin C, Zhu D, Li Y, Yan W, Xiong L, Gao E, Wang H, Tao L. TXNIP mediates NLRP3 inflammasome activation in cardiac microvascular endothelial cells as a novel mechanism in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Basic research in*

cardiology, 2014, 109(5):415.

[117] Rajendrasozhan S, Yang SR, Edirisinghe I, Yao H, Adenuga D, Rahman I. Deacetylases and NF-kappaB in redox regulation of cigarette smoke-induced lung inflammation: epigenetics in pathogenesis of COPD. *Antioxidants & redox signaling*, 2008, 10(4):799-811.

[118] Trabold B, Pawlik M, Nietsch R, Bitzinger DI, Gruber M, Ittner KP, Lubnow M. Bosentan reduces oxidative burst in acid aspiration-induced lung injury in rats. *Injury*, 2009, 40(9):946-9.

[119] Staitieh BS, Egea EE, Fan X, Azih N, Neveu W, Guidot DM. Activation of Alveolar Macrophages with Interferon-gamma Promotes Antioxidant Defenses via the Nrf2-ARE Pathway. *Journal of clinical & cellular immunology*, 2015, 6(5).

[120] Yao X, Wigginton JG, Maass DL, Ma L, Carlson D, Wolf SE, Minei JP, Zang QS. Estrogen-provided cardiac protection following burn trauma is mediated through a reduction in mitochondria-derived DAMPs. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*, 2014, 306(6):H882-94.

[121] Tian KY, Liu XJ, Xu JD, Deng LJ, Wang G. Propofol inhibits burn injury-induced hyperpermeability through an apoptotic signal pathway in microvascular endothelial cells. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica* [et al], 2015, 0(0).

[122] Yu HC, Bai L, Yue SQ, Wang DS, Wang L, Han H, Dou KF. Notch signal protects non-parenchymal cells from ischemia/reperfusion injury in vitro by repressing ROS. *Annals of hepatology*, 2013, 12(5):815-21.

个人简历和研究成果

个人简历

韩士超，男，1989年9月25日出生，汉族，预备党员。

工作及学习经历

2008.09-2013.07	第四军医大学学员旅	学士学位
2013.09-至今	第四军医大学烧伤与皮肤外科	攻读硕士学位

发表文章情况

1. Han S, Cai W, Yang X, Jia Y, Zheng Z, Wang H, Li J, Li Y, Gao J, Fan L, Hu D (2015) ROS-Mediated NLRP3 Inflammasome Activity Is Essential for Burn-Induced Acute Lung Injury. *Mediators of inflammation*, 2015:720457 doi:10.1155/2015/720457.
2. Li Z, Han S, Wang X, Han F, Zhu X, Zheng Z, Wang H, Zhou Q, Wang Y, Su L, Shi J, Tang C, Hu D (2015) Rho kinase inhibitor Y-27632 promotes the differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into keratinocyte-like cells in xeno-free conditioned medium. *Stem cell research & therapy* 6:17 doi:10.1186/s13287-015-0008-2. (共同第一作者)
3. Cai W, Yang X, Han S, Guo H, Zheng Z, Wang H, Guan H, Jia Y, Gao J, Yang T, Zhu X, Hu D. Notch1 Pathway Protects against Burn-Induced Myocardial Injury by Repressing Reactive Oxygen Species Production through JAK2/STAT3 Signaling. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 2016:5638943. (共同第一作者)
4. Li C, Zhu HY, Bai WD, Su LL, Liu JQ, Cai WX, Zhao B, Gao JX, Han SC, Li J, Hu DH (2015) MiR-10a and miR-181c regulate collagen type I generation in hypertrophic scars by targeting PAI-1 and uPA. *FEBS letters* 589:380-389 doi:10.1016/j.febslet.2014.12.024.
5. Li Y, Yang L, Zheng Z, Shi J, Wu X, Guan H, Jia Y, Tao K, Wang H, Han S, Gao J, Zhao B, Su L, Hu D (2015) MRP1 knockdown down-regulates the deposition of collagen and leads to a reduced hypertrophic scar fibrosis. *Journal of molecular histology* doi:10.1007/s10735-015-9629-0.

致 谢

论文完成之际，首先我要向我的恩师胡大海教授表达衷心的感谢和诚挚的敬意。这篇论文包含的不仅仅是我三年的工作，同时还凝聚了胡大海教授的关怀和爱护，正是因为胡主任的指导和给予我任性选题的自由，才让我找到了属于自己的北极星，并总是在我疑惑和迷惘的时候指引我继续前行，也正是胡大海教授一丝不苟的科研精神和对未知领域的热情探索感染着我，使我在科研和医学的道路上越走越宽。在此毕业之际，我要感恩胡主任给了我科研生命，教会我坦诚、耐心、勤奋和脚踏实地。

本课题的工作是在西京烧伤与皮肤外科实验室完成的，衷心的感谢陈璧教授、徐明达教授、官浩副教授、朱雄翔副教授、韩军涛副教授、苏琳琳副教授、董茂龙副教授、谢松涛副教授、石继红副教授、陶克副教授、郑朝副教授等为课题的完成提供了良好的实验平台并在我的课题完成过程中提供的指导。

感谢可爱的已毕业和即将毕业的师兄弟们，樊磊硕士、杨龙龙博士、李超博士、韩夫博士、刘洋博士、李小强博士、王姝月硕士、黎跃华硕士、杨晨硕士以及我的同门加好友高建新博士，每当我在生活上，工作中，遇到困难时，总会喊师兄帮忙。谢谢你们耐心，包容和宠爱。感谢我的同窗赵欢，是你的包容、体贴和支持，给了我前进的动力和正确的方向。感谢各位实验员老师，是你们给了我一个家，分享我的喜怒哀乐，在收获学业的同时体会了沉甸甸的友情。

感谢烧伤与皮肤外科的每一位老师和工作人员，我为自己能够生活和工作在这样一个团结融洽的集体感到无比荣幸。

感谢每一只为科研奉献自己生命的可爱的老鼠，希望我的努力配得上你们的牺牲。

最后感谢我的家人，作为我的物质和精神支柱，给了我前进的动力。