

· 基础研究 ·

纳米级炭黑颗粒通过激活 NLRP3 炎性小体诱导小鼠急性肺炎反应

李小燕, 孙 浩, 李晓波, 陈 瑞*

东南大学环境医学工程教育部重点实验室, 江苏 南京 210009

[摘要] 目的:探讨 NLRP3 炎性小体在纳米级炭黑颗粒致急性肺炎中的作用。方法:采用动物全身动态暴露系统建立 C57BL/6 小鼠低剂量分别连续动态吸入纳米级炭黑颗粒 3 d 及 7 d 模型,利用 ELISA 法检测血清及肺泡灌洗液中白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)含量,并收集小鼠全血,行血常规检查。小鼠处死后解剖,通过 HE 法检测小鼠肺组织病理损伤情况,通过免疫组织化学染色法检测小鼠肺组织 NLRP3 蛋白表达,之后利用 NLRP3 基因敲除小鼠做进一步验证。结果:HE 染色结果表明,短期暴露于纳米级炭黑颗粒,小鼠出现急性肺部炎症,主要表现为肺泡间隔增宽、炎性细胞浸润,且暴露组与对照组相比病理评分差异具有统计学意义,免疫组化结果表明,暴露组 NLRP3 阳性细胞数明显多于对照组,暴露组肺泡灌洗液中 IL-1 β 水平明显高于对照组。结论:NLRP3 炎性小体的激活参与了纳米级炭黑颗粒短期暴露引起的小鼠急性肺炎。

[关键词] NLRP3 炎症小体;纳米炭黑颗粒;IL-1 β ;急性肺炎

[中图分类号] RX51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)05-643-05

doi:10.7655/NYDXBNS20190503

Activation of NLRP3 inflammasome contributes to carbon black nanoparticles - induced pulmonary inflammation

Li Xiaoyan, Sun Hao, Li Xiaobo, Chen Rui*

Key Laboratory of Environmental Medicine Engineering Ministry of Education, School of Public Health, Southeast University, Nanjing 21009, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the role NLRP3 inflammasome in acute pulmonary inflammation induced by carbon black nanoparticles (CBNPs). **Methods:** C57BL/6 mice were exposed to carbon black nanoparticles for 3 days and 7 days, respectively. IL-1 β levels in serum and BAL fluid were detected by ELISA, and whole blood of mice was collected for routine blood test. The pathological damage of lung tissues was detected by H&E staining, and the expression of NLRP3 protein in lung tissues was detected by immunohistochemical (IHC) staining. Then, all the experiments were repeated in NLRP3 knock out mice and wild type mice. **Results:** HE staining showed that acute pulmonary inflammation including enlarged alveolar septum and infiltrations of inflammatory cells were observed in mice after short-term carbon black nanoparticles exposure. There were significant differences in pathological scores between the exposure group and the control group. IHC staining results showed that the expression level of NLRP3 in mice exposed to CBNPs was significantly higher than control. The level of IL-1 β in BALF and serum of mice exposed to CBNPs were significantly higher than control. **Conclusion:** NLRP3/caspase-1 signaling pathway contributes to pulmonary inflammation induced by CBNPs short-term exposure.

[Key words] NLRP3 inflammasome; CBNPs; IL-1 β ; acute pulmonary inflammation

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(05): 643-647]

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81730088);国家自然科学基金重大研究计划(91643109)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 101011816@seu.edu.cn

炭黑(carbon black)是碳氢化合物热分解工业生产的产物,是大气细颗粒物的主要碳元素组分,由于商业炭黑近年来广泛用于制造各类工业产品,因此职业接触炭黑的机会有所增加。纳米级炭黑颗粒作为大气细颗粒物组分之一,其对呼吸系统的毒性作用和相关功能的影响逐渐引起人们重视。有研究表明,纳米级炭黑颗粒暴露与肺泡上皮细胞增殖和肺纤维化相关^[1]。在炭黑长期暴露的大鼠模型中,由于炭黑颗粒的肺超载和随后慢性炎症的发生,可导致肺部肿瘤的发生发展^[2]。

NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(nod-like receptor pyrin domain-containing 3, NLRP3)炎症小体是由NLRP3分子、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ACS)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶1(Caspase-1)组成的一种存在于细胞浆中的蛋白复合体,是固有免疫系统的重要组成部分,主要表达于巨噬细胞、单核细胞等固有免疫细胞。一旦被激活,NLRP3就会募集ASC,从而促进Caspase-1的成熟,并促进下游细胞因子的成熟和释放,如白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 和IL-18,从而引起机体的炎症反应,参与各种疾病的发生发展过程^[3-4]。近年来许多研究表明,NLRP3炎症小体的激活与肺部的急性和慢性炎症反应及许多呼吸道疾病的发展息息相关^[5-6]。本研究旨在利用动物模型探讨NLRP3炎症小体的激活在炭黑颗粒暴露致炎症反应中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用清洁级(SPF)6~8周龄雄性C57BL/6小鼠,购于扬州大学实验动物中心,体重约20 g。选取80只C57BL/6小鼠,随机分为4组(对照3 d组,暴露3 d组,对照7 d组,暴露7 d组),每组20只。将暴露组小鼠置于装有气溶胶发生器的动态吸入暴露系统中(北京慧荣和科技发展有限公司),连续动态吸入纳米级炭黑颗粒3 d或7 d(从上午9时到下午3时,每天6 h),相应的对照组同时暴露于过滤后的洁净空气中。实验用NLRP3基因全身敲除小鼠以及野生型小鼠受赠于南京医科大学,在SPF级实验动物中心培育后取6~8周龄雄鼠用于后续实验。选取基因敲除雄鼠40只,随机分为2组(NLRP3^{-/-}暴露组,NLRP3^{-/-}对照组),每组20只;另取野生型雄鼠40只,随机分为2组(WT暴露组,WT对照组),每组20只。其中暴露组小鼠连续动态染毒3 d,每天6 h,对照组

暴露于清洁空气。

1.2 方法

1.2.1 ELISA

动物建模结束后,腹腔注射1%戊巴比妥钠麻醉小鼠,眼眶内眦取血后,取180 μ L血样于含20 μ L抗凝剂的1.5 mL离心管中用于测量血常规;剩余血样静置后1 200 g离心10 min,取上层血清待用。将小鼠仰卧位固定,钝性分离颈部皮肤和肌肉,暴露小鼠气管,插入一次性留置针注入1 mL提前预冷的PBS对小鼠全肺进行肺泡灌洗,收集肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)。按照ELISA试剂盒说明书检测小鼠血清及肺泡灌洗液中IL-1 β 含量。

1.2.2 HE染色

小鼠处死后解剖,取小鼠左肺,4%多聚甲醛固定48 h后,石蜡包埋,切成5 μ m连续切片,染色后,进行常规的病理学检查。肺泡炎评分标准如下:①无明显肺泡炎,计1分;②轻度肺泡炎伴肺间质水肿、炎性细胞浸润,肺泡间隔增厚,仅局部或局限性病变,胸膜下面积不超过肺的20%,计2分;③中度肺泡炎伴胸膜下区更为明显,伴有受累。肺面积>20%但<50%,计3分;④严重肺泡炎,病变超过肺的50%,伴有炎症,肺泡腔内的细胞和实变,计4分^[7]。

1.2.3 免疫组织化学染色

将组织石蜡切片依次放入三氯甲烷、无水乙醇、95%乙醇、70%乙醇、双蒸水梯度脱蜡后;将切片放入柠檬酸盐缓冲液微波加热进行抗原修复;将切片浸泡于现配的3% H₂O₂以封闭内源性过氧化物酶;血清封闭;每张切片滴加100 μ L NLRP3一抗4 $^{\circ}$ C湿盒过夜;孵育过夜后滴加二抗试剂盒中酶标山羊抗小鼠/兔IgG聚合物80 μ L,室温避光孵育1 h;每张切片滴加100 μ L DAB工作液显色,TBS冲洗3遍,苏木素染液浸泡、梯度脱水、中性树脂胶封片晾干,镜下观察,光学显微镜(\times 200)下随机选取4个非重叠区域进行肺组织内NLRP3蛋白的表达评估。

1.2.4 荧光实时定量PCR

称取大约0.1 g冷冻于液氮的小鼠肺组织,加入1 mL TRIzol后利用组织研磨机充分研磨,酚抽提法提取小鼠肺组织总RNA。使用逆转录试剂盒(Toyobo公司,日本)将总RNA逆转录为cDNA后,加入PCR反应体系,对目标基因进行扩增。引物序列如下:NLRP3正向:5'-ACTTGCAGAAGCTGGGGTTG-3',反向:5'-AGTTTACAGTCCGGGTGCAG-3';Caspase-1正向:5'-TGCCCAGAGCACAAGACTTC-3',反向:5'-TCCTTGTTTCTCTCCACGGC-3';CYC正向:5'

-CCCACCGTGTCTTCGACAT-3', 反向: 5'-CCAGT-GCTCAGAGCACGAAA-3'。

1.3 统计学方法

计量资料均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 利用统计软件SPSS 16.0进行数据分析, 两组之间比较采用 t 检验, 多组比较采用方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 纳米级炭黑颗粒致小鼠急性肺炎

HE染色结果显示, 纳米级炭黑颗粒暴露3 d或7 d后小鼠均出现不同程度的肺病理改变且主要表现为肺泡间隔增宽, 炎性细胞浸润(图1A)。暴露组病理学评分与相应的对照组相比明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且病理学评分随着暴露时长增加而增加(图1B)。血常规结果显示, 与对照组相比, 暴露7 d后小鼠外周血中性粒细胞百分数值增加, 这与病理学结果炎性细胞浸润一致(图1C)。

2.2 纳米级炭黑颗粒暴露对肺组织中NLRP3表达的影响

免疫组织化学染色结果显示, 对照组小鼠肺组织未见或少量表达NLRP3, 而暴露组小鼠肺组织NLRP3阳性细胞计数多于相应的对照组, 差异具有统计学意义($P < 0.001$, 图2B)。qRT-PCR结果显示, 与对照组相比, 纳米级炭黑颗粒暴露组小鼠肺组织NLRP3、Caspase-1基因转录水平均上调(图

2C、D)。

2.3 肺泡灌洗液及血清中细胞因子IL-1 β 水平

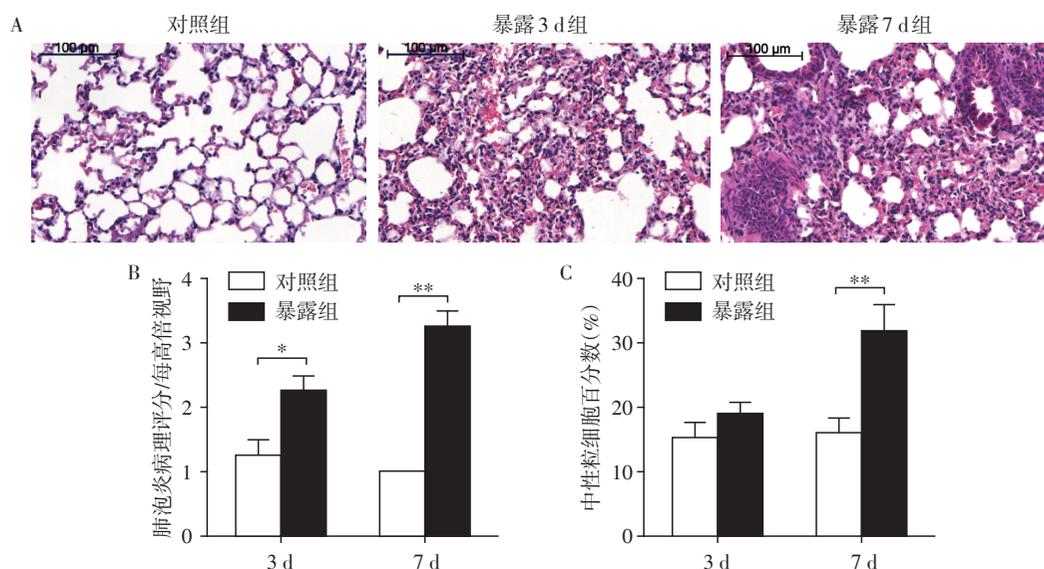
纳米级炭黑暴露3 d或7 d后, 暴露组小鼠肺泡灌洗液及血清中IL-1 β 含量均高于对照组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 图3)。

2.4 NLRP3基因敲除对纳米级炭黑颗粒诱导急性肺炎的影响

为了进一步验证NLRP3炎症小体在纳米级炭黑颗粒诱导的肺部炎症中的作用, 将NLRP3全身敲除小鼠和野生型小鼠暴露于纳米级炭黑颗粒3 d, 野生型小鼠肺组织中NLRP3阳性细胞数目显著增加, 而在NLRP3^{-/-}小鼠肺组织中未见明显变化(图4A)。此外, 与野生型小鼠相比, 纳米级炭黑暴露3 d后, NLRP3^{-/-}小鼠的肺泡灌洗液和血清中的IL-1 β 水平未见显著变化(图4B)。HE染色所示, NLRP3^{-/-}小鼠的病理学改变在暴露于对照空气和纳米级炭黑的小鼠之间没有差异(图4C)。综上所述, NLRP3炎症小体的激活参与纳米级炭黑暴露引起的急性肺部炎症反应。

3 讨论

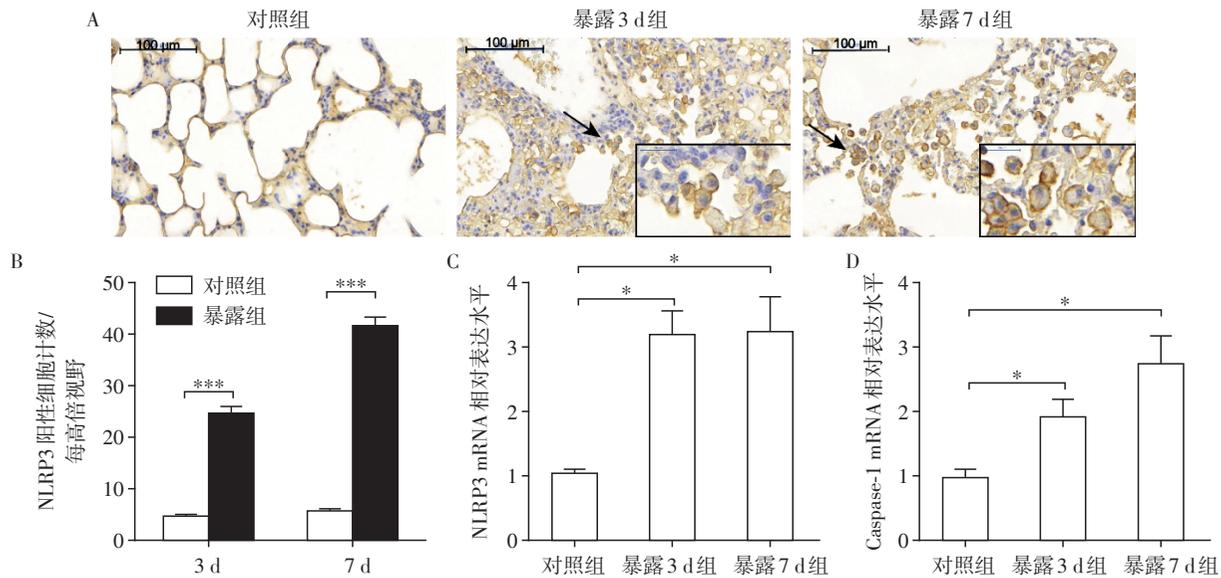
纳米级炭黑是一种碳基纳米材料, 广泛应用于各种工业和环境, 其对健康的影响已被广泛研究。有研究表明, 气管滴注纳米级炭黑(70 μ L, 100 μ g/mL)不会加重小鼠过敏性气道炎症^[8]。然而近期研究发现, 炭黑工人血清中炎症细胞因子(IL-6、IL-8)水平明



A: 纳米级炭黑颗粒暴露后, 小鼠均出现不同程度的急性肺炎($\times 200$); B: 肺炎病理学评分($n=10$); C: 纳米级炭黑颗粒暴露对小鼠外周血中性粒细胞的影响($n=10$)。两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图1 纳米级炭黑颗粒暴露致小鼠急性肺炎

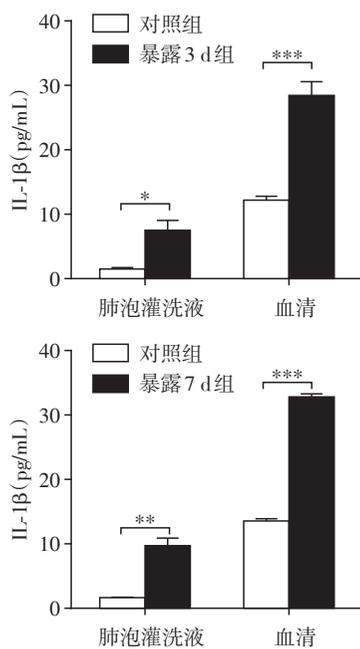
Figure 1 Acute inflammation induced by CBNP exposure



A: 纳米级炭黑颗粒暴露后,小鼠肺组织NLRP3表达上调($\times 200$); B: NLRP3阳性细胞计数($n=10$); C: 小鼠肺组织NLRP3和Caspase-1基因转录水平的变化($n=10$)。两组比较, $P < 0.05$, $***P < 0.001$ 。

图2 纳米级炭黑颗粒暴露对肺组织中NLRP3表达的影响

Figure 2 The expression of NLRP3 in lung induced by CBNPs



两组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ ($n=10$)。

图3 小鼠肺泡灌洗液及血清中IL-1β含量

Figure 3 The level of IL-1β in BALF and serum

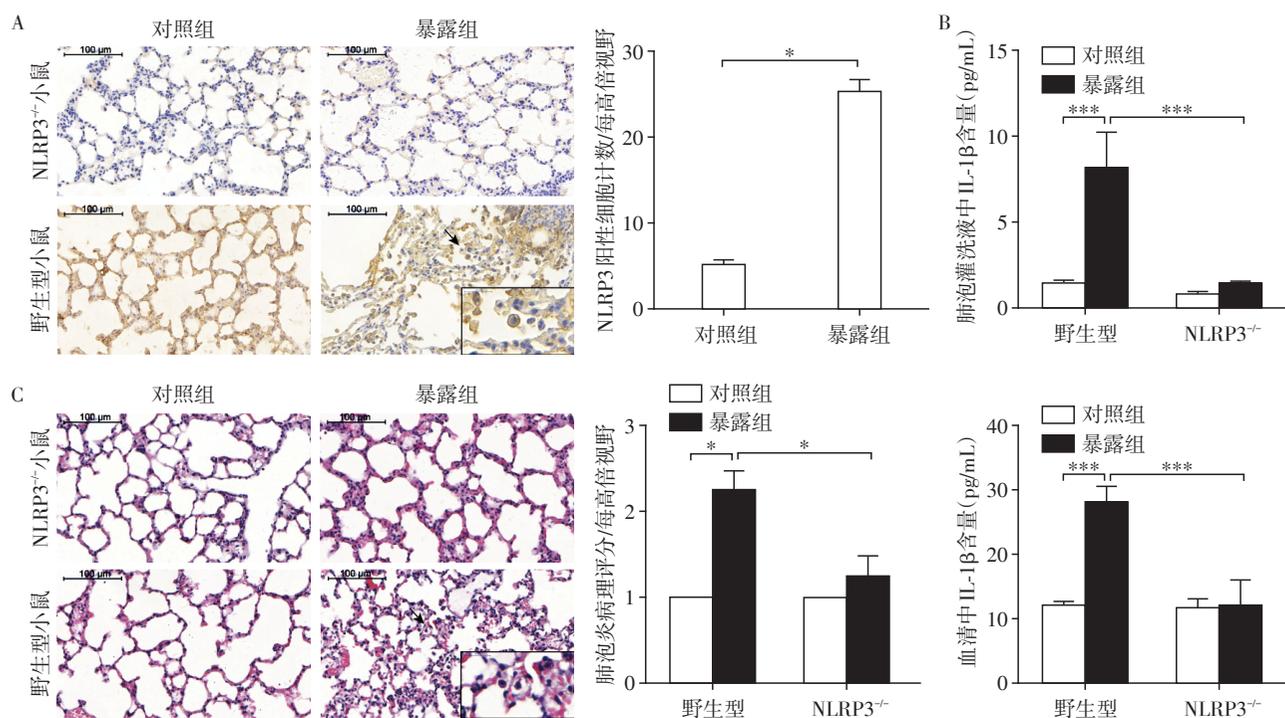
显增加^[9],气管滴注纳米炭黑颗粒(50 μL , 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$)后,小鼠肺部可检测出明显的病理改变^[10]。因此,暴露浓度和暴露方式的差异可能导致不同的毒性效应。为模拟工人暴露于炭黑颗粒的实际情况,本实验建立了低剂量纳米炭黑颗粒(0.730 mg/m^3)动态吸入动物模型。本研究中的小鼠实际暴露浓度,换算为人体等效的浓度略低于个人空气采样器检测

到的炭黑工人实际个体暴露浓度(14.9 mg/m^3)^[9]。Dostert等^[11]研究发现石棉暴露通过激活NLRP3炎症小体诱导小鼠肺部炎症反应,一项关于香烟吸入致慢性阻塞性肺疾病的研究发现,在接触香烟暴露的小鼠和慢性阻塞性肺疾病的患者中均观察到了IL-1 β 水平增加,且在加入Caspase-1抑制剂后改善了小鼠肺气肿的程度,证明NLRP3/Caspase-1通路在香烟暴露诱导的慢性阻塞性肺疾病中发挥重要作用^[12]。在本研究中,无论暴露3 d还是7 d,低剂量的纳米级炭黑颗粒暴露均诱导了C57BL/6小鼠的急性肺部炎症的发生。并且纳米级炭黑暴露后,肺组织中的NLRP3表达上调,血清及肺泡灌洗液中的IL-1 β 均表现为不同程度的增加。这表明炭黑诱导的急性肺炎与NLRP3炎症小体密切相关。

为进一步证实NLRP3炎症小体的重要性,建立了一个NLRP3全身敲除小鼠的纳米级炭黑3 d暴露模型,暴露结束后采用免疫组化染色检测肺组织中NLRP3的表达。结果显示,与野生型小鼠比较,纳米级炭黑暴露后,NLRP3^{-/-}小鼠的病理学评分和肺组织中NLRP3表达未见明显改变。因此得出结论,纳米级炭黑通过激活NLRP3炎症小体和促进下游IL-1 β 释放促进急性肺炎的发生发展。

[参考文献]

[1] El-Sayed YS, Shimizu R, Onoda A, et al. Carbon black nanoparticle exposure during middle and late fetal devel-



A: NLRP3基因敲除小鼠与野生型小鼠肺组织切片NLRP3表达情况(免疫组化, $\times 200$, $n=10$); B: NLRP3基因敲除小鼠与野生型小鼠肺泡灌洗液及血清中IL-1 β 含量($n=10$); C: NLRP3基因敲除小鼠与野生型小鼠肺组织HE染色结果($\times 200$, $n=10$)。两组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

图4 NLRP3基因敲除对纳米级炭黑颗粒诱导的急性肺炎的影响

Figure 4 NLRP3 deficiency attenuates inflammation

- opment induces immune activation in male offspring mice [J]. *Toxicology*, 2015, 327(1): 53-61
- [2] Chaudhuri I, Fruijtter-Polloth C, Ngiewih Y, et al. Evaluating the evidence on genotoxicity and reproductive toxicity of carbon black: a critical review [J]. *Crit Rev Toxicol*, 2018, 48(2): 143-169
- [3] 宋宁, 陈相健, 王子盾, 等. NLRP3炎症小体参与HSV-1诱导病毒性心肌炎的实验研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2014, 34(6): 699-704
- [4] Mangan M, Olhava EJ, Roush WR, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(9): 688
- [5] Mangan M, Olhava EJ, Roush WR, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(9): 688
- [6] Sun B, Wang X, Ji Z, et al. NADPH oxidase-dependent NLRP3 inflammasome activation and its important role in lung fibrosis by multiwalled carbon nanotubes [J]. *Small*, 2015, 11(17): 2087-2097
- [7] Szapiel SV, Elson NA, Fulmer JD, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120(4): 893-899
- [8] Lindner K, Webering S, Stroebele M, et al. Low dose carbon black nanoparticle exposure does not aggravate allergic airway inflammation in mice irrespective of the presence of surface polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2018, 8(4): e213
- [9] Zhang R, Dai Y, Zhang X, et al. Reduced pulmonary function and increased pro-inflammatory cytokines in nanoscale carbon black-exposed workers [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2014, 11: 73
- [10] Chuang HC, Hsiao TC, Lee CH, et al. Effects of physical characteristics of carbon black on metabolic regulation in mice [J]. *Environ Pollut*, 2018, 232: 494-504
- [11] Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, et al. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica [J]. *Science*, 2008, 320(5876): 674-677
- [12] Churg A, Zhou S, Wang X, et al. The role of interleukin-1beta in murine cigarette smoke-induced emphysema and small airway remodeling [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009, 40(4): 482-490

[收稿日期] 2019-02-19