

活性氧介导脂多糖联合三磷酸腺苷诱导的人肺动脉内皮细胞炎症小体活化

王再亮,孔辉,曾晓宁,刘文睿,闫晓培,王艳丽,解卫平,王虹*

(南京医科大学第一附属医院呼吸科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)联合三磷酸腺苷(adenosine triphosphate,ATP)对人肺动脉内皮细胞(human pulmonary artery endothelial cells,HPAECs)NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 3,NLRP3)炎症小体活化的影响及其相关机制。方法:LPS联合或不联合ATP建立HAPECs炎症损伤模型;CCK-8法测定细胞活力;ELISA法检测细胞上清白细胞介素(interleukin,IL)-1 β 及IL-18含量;Western blot法评价半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(caspase-1)、p-p38及p-p65水平;DCFH-DA荧光探针法观察细胞内外活性氧(reactive oxygen species,ROS)变化;Annexin V/PI标记流式细胞术检测细胞凋亡。结果:LPS单独作用对细胞活力无显著影响,联合ATP后细胞活力显著下降,细胞上清IL-1 β 及IL-18含量增加,caspase-1、p-p38及p-p65表达水平上调,细胞内外ROS升高,细胞凋亡率升高;ROS清除剂乙酰半胱氨酸可抑制上述效应。结论:LPS联合ATP激活HPAECs内NLRP3炎症小体,介导细胞凋亡与ROS水平升高密切相关。

[关键词] 肺动脉内皮细胞;脂多糖;三磷酸腺苷;炎症小体

[中图分类号] R563

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)07-968-07

doi:10.7655/NYDXBNS20150714

Lipopolysaccharide combined with adenosine triphosphate induces inflammasome activation in human pulmonary artery endothelial cells by reactive oxygen species

Wang Zailiang, Kong Hui, Zeng Xiaoning, Liu Wenrui, Yan Xiaopei, Wang Yanli, Xie Weiping, Wang Hong*

(Department of Respiration, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate whether lipopolysaccharide(LPS) combined with adenosine triphosphate(ATP) activates Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) inflammasome in human pulmonary artery endothelial cells (HPAECs), and the underlying mechanism. **Methods:** HPAECs were stimulated by LPS with or without ATP to establish inflammation damage model. Cell vitality was assessed by cell counting kit-8. The levels of IL-1 β and IL-18 in supernatant were analyzed by ELISA. The expressions of caspase-1, p-p38 and p-p65 were determined by Western blot. Reactive oxygen species (ROS) was detected by DCFH-DA fluorescent probe. Cell apoptosis was evaluated by annexin V and PI staining assay. **Results:** LPS alone had no effects on HPAECs. By combined with ATP, LPS significantly inhibited cell viability. The levels of IL-1 β and IL-18 in supernatant, the expressions of caspase-1, p-p38 and p-p65 in cytoplasm, the concentrations of intracellular and extracellular ROS as well as cell apoptosis were up-regulated in HPAECs activated by LPS combined with ATP. These effects were inhibited by ROS scavenger N-acetylcysteine. **Conclusion:** High level ROS plays an important role in LPS combined with ATP-induced NLRP3 inflammasome activation as well as apoptosis of HPAECs.

[Key words] human pulmonary artery endothelial cells; LPS; ATP; inflammasome

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(07):968-974]

NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 3,NLRP3)

炎症小体是一种存在于细胞浆中的由多种蛋白组成的复合体,在固有免疫中发挥重要作用^[1]。研究发现多种应激信号均可激活NLRP3炎症小体,主要包括病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns,PAMPs)信号、损伤相关分子模式(damage-

[基金项目] 江苏省呼吸病临床医学研究中心

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

associated molecular patterns, DAMPs) 信号及环境刺激物^[2]。PAMPs 包括脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、鞭毛蛋白和单链 RNA 等, DAMPs 有胞外三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)、尿酸盐和 β -淀粉样蛋白等, 环境刺激物如二氧化硅、石棉和白矾等^[2]。NLRP3 通过凋亡相关斑点样蛋白招募并激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(caspase-1), 进而促进白细胞介素-1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β)及白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)成熟与分泌^[3], 在机体抵御病原、控制感染等过程中发挥至关重要的作用。然而, 一旦该过程出现紊乱失控, 诱导大量趋化因子、黏附分子及致炎细胞因子等产生, 可致过度的炎症反应, 引起包括肺血管内皮细胞在内的组织细胞损伤。

目前已证实, NLRP3 炎症小体在肺部感染、哮喘、慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 以及肺纤维化等肺部疾病的发生发展中扮演重要角色^[4]。呼吸道长期暴露于有害微生物及大气污染物等炎性刺激下, 一旦炎症反应失衡, 气道上皮细胞、肺泡上皮细胞及肺血管内皮细胞受损并产生功能障碍, 引起细支气管、肺泡及肺血管进一步损伤, 最终发展为急慢性肺部疾病。LPS 作为革兰阴性菌细胞壁的主要成分, 可诱导宿主产生内毒素血症。研究发现, LPS 联合 ATP 可诱导巨噬细胞 NLRP3 炎症小体活化^[5]; LPS 刺激人肺动脉内皮细胞(human pulmonary artery endothelial cells, HPAECs)可引起显著炎症反应, 导致内皮细胞微管重构、通透性增高、屏障功能障碍^[6]。然而, HPAECs 损伤与炎症小体活化是否存在相关性及其活化后对 HPAECs 自身的影响迄今尚无报道。

本研究在离体水平建立内皮细胞损伤模型, 旨在探讨 LPS 联合或不联合 ATP 作用对 HPAECs 内 NLRP3 炎症小体活化的影响及相关机制, 为深入理解肺部感染、急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)等疾病中内皮细胞损伤凋亡的病理生理机制、探究新的临床治疗靶标提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

原代 HPAECs 及内皮细胞培养基购自美国 Sciencell 公司, LPS、ATP、乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC) 及 2', 7'-二氯二氢荧光素二乙酯(2', 7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA) 均购

自美国 Sigma 公司, 细胞计数试剂(cell counting kit-8, CCK-8) 购自上海和元生物技术有限公司, caspase-1 抗体购自美国 Santa Cruz 公司, p-p38、p-p65 抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司, GAPDH 抗体购自美国 Bio-world 中国分公司, IL-1 β ELISA 检测试剂盒购自美国 R&D 公司, IL-18 ELISA 检测试剂盒购自上海依科赛公司, 膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC) 及碘化丙啶(propidium iodide, PI) 购自美国 BD 公司。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养与实验分组

HPAECs 用含 1% 双抗、1% 内皮细胞生长因子及 5% 胎牛血清的内皮细胞培养基, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。细胞以 1×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔板或 96 孔板中, 待细胞铺板面积达到 70%~80% 后进行以下处理: ①对照组: 不加 LPS 或 ATP 处理; ②LPS+ATP 组: LPS 1 μ g/mL 作用 5.5 h 后, ATP 5 mmol/L 作用 0.5 h; ③LPS 组: LPS 1 μ g/mL 单独作用 6 h; ④ATP 组: ATP 5 mmol/L 单独作用 0.5 h; ⑤NAC+LPS+ATP 组: NAC 10 mmol/L 预作用 0.5 h 后, LPS 1 μ g/mL 作用 5.5 h, ATP 5 mmol/L 作用 0.5 h; ⑥NAC 组: NAC 10 mmol/L 单独作用 0.5 h。

1.2.2 CCK-8 细胞活力检测

96 孔板中的细胞经相应处理后, 弃上清, 每孔加入含 10 μ L CCK-8 溶液的空白培养基 100 μ L, 置于培养箱孵育 4~6 h, 用酶标仪读取 450 nm 波长处的光密度(optical density, OD) 值, 根据对照组 OD 值计算各组细胞活力。

1.2.3 Western blot 检测

细胞经相应处理后, 经磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS) 洗 2 遍, 用胰酶消化后收集细胞, 用裂解液提取总蛋白, 制备聚丙烯酰胺凝胶, 70/120 V 恒压电泳, 300 mA 恒流转移至聚偏二氟乙烯膜上, 5% 脱脂奶粉-洗涤缓冲液室温封闭 1 h, 加入 caspase-1、p-p38、p-p65 及 GAPDH 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗涤缓冲液洗涤后, 羊抗兔二抗室温孵育 1 h, 化学发光液显影曝光摄像, Bio-Rad 软件分析蛋白条带灰度值。

1.2.4 ELISA 检测

细胞经相应处理后, 收集培养上清液, 1 500 r/min 离心, 取上清, ELISA 法测定 IL-1 β 及 IL-18 浓度。操作步骤按说明书进行。用酶标仪读取 450 nm 波长处的 OD 值, 根据标准品的浓度及 OD 值绘制标准

曲线并计算样品浓度。

1.2.5 细胞内外 ROS 检测

细胞按相应处理后,收集上清,PBS洗2遍,加入含 DCFH-DA 的空白培养基 37℃避光孵育 30 min, PBS洗2遍,4%多聚甲醛固定 30 min, PBS洗2遍,激光共聚焦显微镜摄片,软件分析荧光强度;收集各组上清,加入 DCFH-DA 37℃避光孵育 30 min,荧光酶标仪读取荧光强度。

1.2.6 细胞凋亡检测

细胞按相应处理后,弃上清,PBS洗2遍,用不含乙二胺四乙酸的胰酶消化后收集细胞,1 500 r/min 离心,弃上清,PBS重悬细胞,再次离心,弃上清,Annexin V 缓冲液重悬细胞,加入 5 μL Annexin V-FITC,混匀后加入 5 μL PI,室温避光孵育 10 min,流式分析仪检测各组细胞凋亡率。

1.3 统计学方法

结果以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用 SPSS20.0 统计软件进行分析处理,两组间差异分析采用成组 *t* 检验,多组间差异分析选用单因素方差分析结合最小显著差法进行。 $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS 联合或不联合 ATP 对 HPAECs 活力的影响

不同浓度 LPS(1、5、10 μg/mL)单独作用 6 h 对 HPAECs 活力无明显影响,LPS(1 μg/mL)联合 ATP (5 mmol/L)作用 0.5 h 细胞活力降至(71.08 ± 0.88)%,

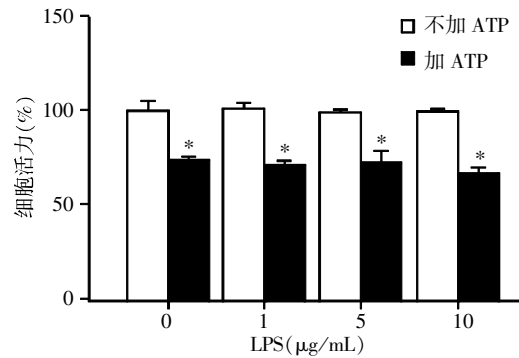
与对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$,图 1)。

2.2 LPS 联合 ATP 可激活 HPAECs 炎症小体

与对照组相比,LPS+ATP 组 caspase-1 表达水平显著上调,细胞培养上清液中 IL-1β 和 IL-18 的含量显著升高,LPS 或 ATP 单独作用组无上述变化。对照组 IL-1β 和 IL-18 的含量分别为 (7.05 ± 1.13) pg/mL 和 (10.78 ± 2.47) pg/mL,LPS+ATP 组 IL-1β 和 IL-18 的含量分别为(17.25 ± 2.96) pg/mL 和(19.81 ± 5.27) pg/mL,两组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$,图 2)。

2.3 抑制 ROS 产生可阻断 HPAECs 炎症小体活化

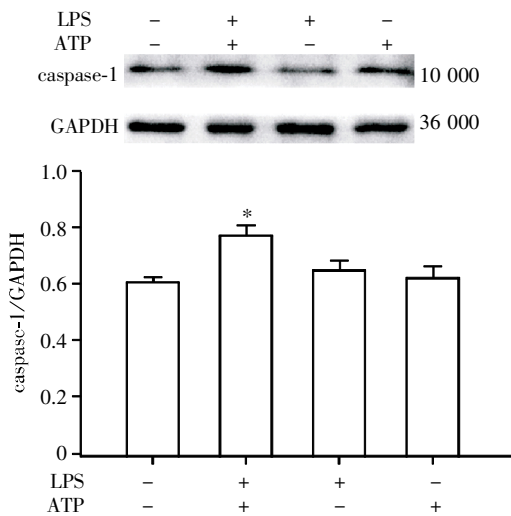
与对照组相比,LPS+ATP 组细胞内外 ROS 水平均显著升高,应用 ROS 清除剂 NAC 10 mmol/L 预作用 0.5 h,显著抑制 ROS 产生(图 3A),下调 cas-



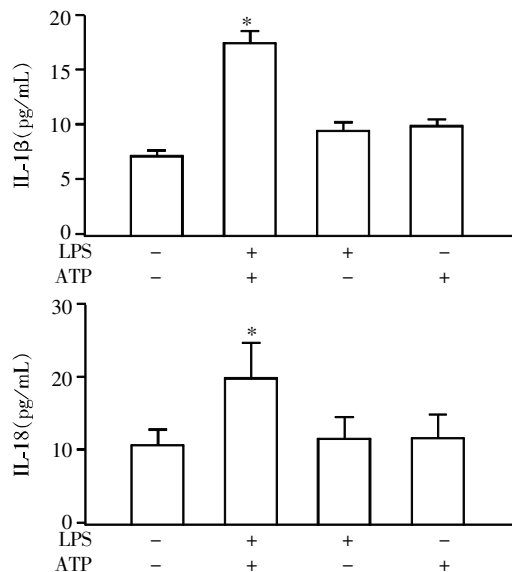
与对照组(不加 ATP 组)相比,* $P < 0.05$ 。

图 1 LPS 联合或不联合 ATP 对 HPAECs 活力的影响
Figure 1 Effects of LPS alone or combining with ATP on the cell viability of HPAECs

A



B



A: Western blot 检测 caspase-1 蛋白水平;B: ELISA 检测细胞上清 IL-1β 及 IL-18 含量。与对照组相比,* $P < 0.05$ 。

图 2 LPS 联合 ATP 活化 HPAECs 炎症小体

Figure 2 NLRP3 inflammasome could be activated in HPAECs by LPS combined with ATP

pase-1 表达水平,细胞上清中 IL-1 β 与 IL-18 的含量显著下降。LPS+ATP 组 IL-1 β 与 IL-18 的含量分别为 (16.96 \pm 5.45) pg/mL 和 (21.24 \pm 2.83) pg/mL, NAC+LPS+ATP 组 IL-1 β 与 IL-18 的含量分别为 (10.49 \pm 1.26) pg/mL 和 (14.85 \pm 1.88) pg/mL, 两组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3B)。

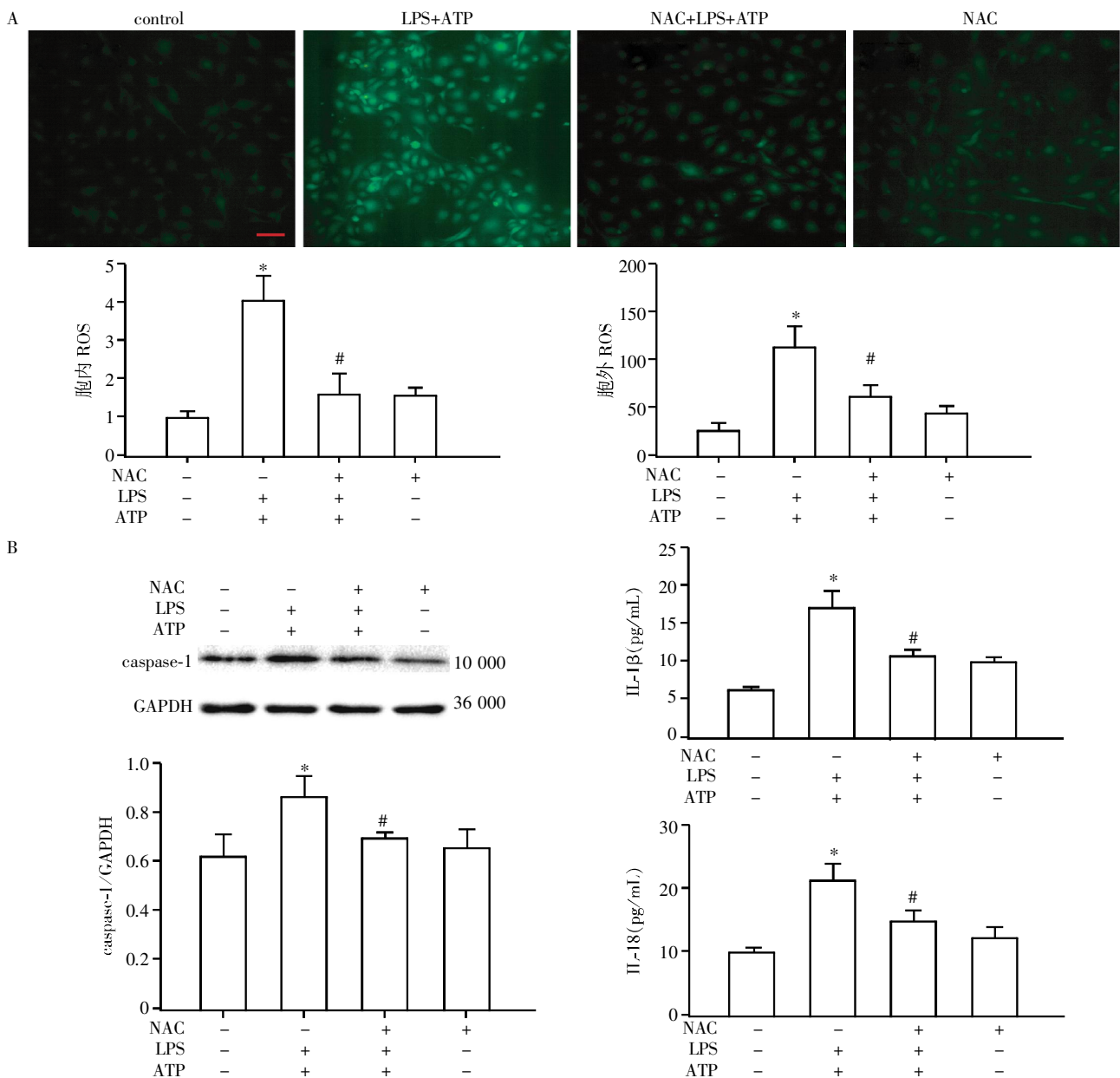
2.4 抑制 ROS 产生可抑制 HPAECs 细胞凋亡

与对照组相比, LPS+ATP 组细胞凋亡率显著升高, 应用 ROS 清除剂 NAC 10 mmol/L 预作用 0.5 h, 凋亡率显著下降。对照组凋亡率为 (7.54 \pm 0.45)%,

LPS+ATP 组凋亡率为 (19.27 \pm 5.29)% , 两组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); NAC+LPS+ATP 组凋亡率为 (12.55 \pm 1.29)% , 与 LPS+ATP 组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4A)。

2.5 抑制 ROS 产生可抑制 NF- κ B (p65) 与 p38 MAPK 磷酸化水平

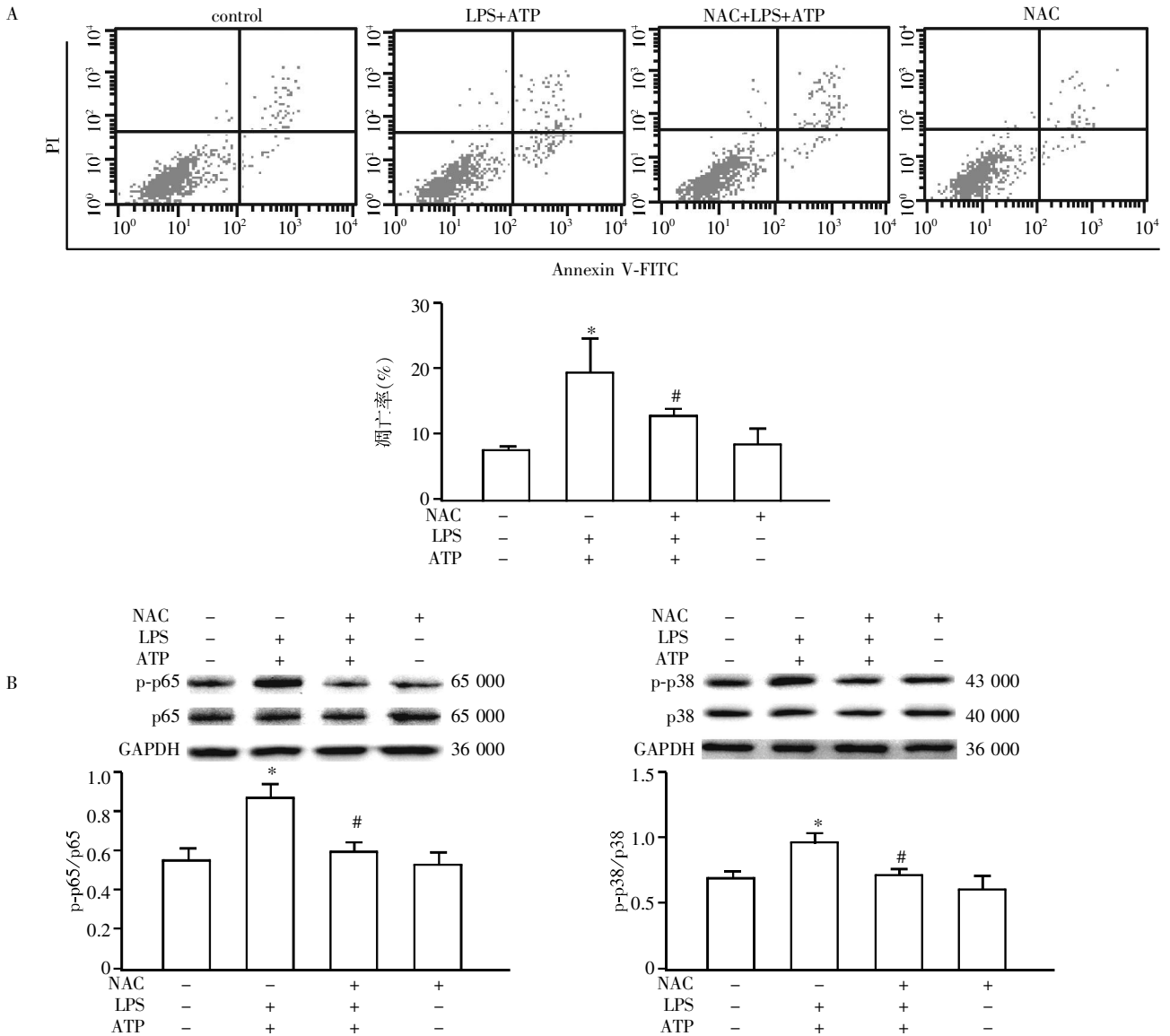
与对照组相比, LPS+ATP 组 NF- κ B(p65) 与 p38 MAPK 磷酸化水平显著升高, 应用 ROS 清除剂 NAC 10 mmol/L 预作用 0.5 h, 显著抑制 NF- κ B(p65) 与 p38 MAPK 磷酸化 ($P < 0.05$, 图 4B)。



A; DCFH-DA 荧光探针检测细胞内外 ROS 水平, Bar=50 μ m; B; Western blot 检测 caspase-1 蛋白水平, ELISA 检测细胞上清 IL-1 β 及 IL-18 含量。与对照组相比, * $P < 0.05$; 与 LPS+ATP 组相比, # $P < 0.05$ 。

图 3 抑制 ROS 产生可阻断炎症小体活化、抑制细胞凋亡

Figure 3 Scavenging ROS could inhibit inflammasome activation and apoptosis



A: Annexin V-FITC/PI 流式检测细胞凋亡率; B: Western blot 检测 NF-κB (p65) 及 p38 MAPK 磷酸化水平。与对照组相比, * $P < 0.05$; 与 LPS+ATP 组相比, # $P < 0.05$ 。

图 4 抑制 ROS 产生可阻断炎症小体活化、抑制细胞凋亡

Figure 4 Scavenging ROS could inhibit inflammasome activation and apoptosis

3 讨论

生理状态下, 内皮细胞附着于肺血管内侧, 作为屏障维持血液的正常流动, 由于其是暴露于循环血中外来病原的第一层细胞, 故对细菌、病毒等多种应激高度敏感^[7]。在感染、缺氧等炎症刺激下, 肺血管内皮细胞可出现损伤、功能障碍, 如抗凝抗炎特性改变、血管舒缩功能紊乱、生长与重构失调等^[8], 在 ARDS、COPD 及肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension, PAH) 等疾病中发挥重要作用。研究证实, 肺血管内皮细胞功能障碍所致的蛋白液性渗出、炎症细胞集聚, 可破坏气血屏障、引起通气功能

下降, 是 ARDS 的重要病理生理过程^[9]。同时, 内皮功能障碍不仅存在于重度 COPD 患者, 亦见于轻中度 COPD 患者甚至肺功能正常的健康吸烟者^[10]。目前认为, HPAECs 损伤、功能障碍、凋亡是 PAH 发生发展的始动环节, 其分泌的内皮源性收缩与舒张血管因子失调导致血管张力及内环境失衡, 引起凝血、血管舒缩功能障碍, 诱导肺血管平滑肌细胞及凋亡抵抗型内皮细胞异常增生, 引起肺血管丛状样变、管腔狭窄、阻力增加, 最终导致 PAH 的形成^[11-14]。本研究结果发现 LPS 联合 ATP 作用 HPAECs, 使其细胞活力下降、凋亡增多, 表明炎症等应激可显著诱导肺动脉内皮损伤。因此, 靶向肺动脉内皮保护是

防治 ARDS、PAH 等疾病的有效手段。

炎症小体作为天然免疫及应激系统的重要组成部分,其活化参与肺炎、哮喘、COPD、肺纤维化等多种肺部疾病的病理进程^[4],在介导炎症级联反应、疾病转归中发挥关键作用。研究发现,在金黄色葡萄球菌产物 α -溶血素诱导的小鼠重症肺炎模型中,NLRP3 基因敲除鼠肺炎程度较轻,提示阻断 NLRP3 炎症小体活化可作为重症肺炎的辅助治疗^[15];卵清蛋白诱导的小鼠支气管哮喘模型中,树突状细胞向淋巴窦迁移、Th2 淋巴细胞活化及 Th2 相关细胞因子、趋化因子分泌等过程均依赖于 NLRP3 炎症小体的活化^[16];COPD 患者肺组织中,ATP、尿酸盐结晶、ROS 等炎症小体激动因子水平较正常人显著升高^[17-18],COPD 急性加重期患者血清中 NLRP3 炎症小体下游效应因子 IL-1 β 及 IL-18 的含量较稳定期患者显著升高^[19-20]。本研究发现,LPS 联合 ATP 显著升高 HPAECs caspase-1、IL-1 β 及 IL-18 表达水平,LPS 单独作用不足以产生上述效应,表明胞外 ATP 诱导 NLRP3 炎症小体活化需要 LPS 的启动作用。炎症小体活化是内皮细胞炎症损伤的重要机制,可作为治疗 ARDS、PAH 等疾病的重要靶标。

NLRP3 炎症小体一直是生命科学各大领域的研究热点,但其活化的具体机制仍有待进一步阐释,可能与 ROS 过量产生、钾离子外流等过程有关^[21]。氧化应激是机体固有免疫应对 LPS 等外来致病原的重要过程,会产生大量 ROS,引起内皮细胞损伤及屏障功能障碍^[5]。ROS 作为机体氧化代谢的正常产物,生理状态下参与细胞生命活动,调控激酶活化、基因表达及细胞增殖等过程^[22];高水平的 ROS 可导致内皮细胞通透性增加及屏障功能障碍,干扰胞内信号转导、影响细胞增殖、诱导凋亡,与蛋白质、脂类及核酸等胞内组分氧化变性有关^[23]。研究发现 ROS 在 NLRP3 炎症小体活化过程中起到关键作用,可能与磷脂酰肌醇-3-羟激酶激活、硫氧还蛋白氧化有关,其具体机制尚有待进一步澄清^[24]。本研究结果显示,LPS 联合 ATP 诱导 HPAECs 炎症小体活化过程中,胞内外 ROS 水平显著上调;应用 NAC 清除 ROS 后,炎症小体活化被显著抑制,caspase-1 及效应因子 IL-1 β 、IL-18 水平显著降低,揭示抑制 ROS 产生是阻断炎症小体活化的有效途径。同时,作为炎症反应的重要信号通路,NF- κ B 及 MAPK 在炎症小体活化过程中发挥重要调控作用^[25-26],并参与 LPS 诱导肺微血管内皮细胞凋亡过程^[27-28]。本文结果发

现,ROS 清除剂 NAC 可逆转 LPS 联合 ATP 诱导的 NF- κ B 及 p38 MAPK 磷酸化水平上调效应,同时抑制细胞凋亡,表明 LPS 联合 ATP 介导的 ROS 升高可能通过 NF- κ B 及 p38 MAPK 通路激活 NLRP3 炎症小体并诱导细胞凋亡。

综上所述,本研究发现 LPS 联合 ATP 可引起 HPAECs 损伤、诱导其凋亡,其机制与炎症小体活化相关;其中 ROS 起到了关键作用,可能通过激活 NF- κ B、p38 MAPK 信号通路实现。本研究结果为靶向内皮细胞保护提供了新靶点,提示抑制炎症小体活化、氧化应激可能成为治疗 ARDS、PAH 等疾病的新策略。

[参考文献]

- [1] Jin C, Flavell RA. Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation[J]. *J Clin Immunol*, 2010, 30(5): 628-631
- [2] Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(3): 210-215
- [3] Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes [J]. *Cell*, 2010, 140(6): 821-832
- [4] Brusselle GG, Provoost S, Bracke KR, et al. Inflammasomes in respiratory disease: from bench to bedside [J]. *Chest*, 2014, 145(5): 1121-1133
- [5] Liao PC, Chao LK, Chou JC, et al. Lipopolysaccharide/adenosine triphosphate-mediated signal transduction in the regulation of NLRP3 protein expression and caspase-1-mediated interleukin-1 β secretion [J]. *Inflamm Res*, 2013, 62(1): 89-96
- [6] Kratzer E, Tian Y, Sarich N, et al. Oxidative stress contributes to lung injury and barrier dysfunction via microtubule destabilization [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 47(5): 688-697
- [7] Dauphinee SM, Karsan A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells [J]. *Lab Invest*, 2005, 86(1): 9-22
- [8] Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress [J]. *Circ Res*, 2000, 87(10): 840-844
- [9] Stewart DJ, Mei SHJ. Cell-based therapies for lung vascular diseases: lessons for the future [J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2011, 8(6): 535-540
- [10] Bei Y, Duong Quy S, Hua Huy T, et al. Activation of RhoA/Rho-kinase pathway accounts for pulmonary endothelial dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Physiol Rep*, 2013, 1(5): e00105
- [11] Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling cellular and molecular

mechanisms[J]. *Circ Res*,2006,99(7):675-691

[12] Sakao S,Taraseviciene-Stewart L,Wood K,et al. Apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells stimulates vascular smooth muscle cell growth[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*,2006,291(3):362-368

[13] Humbert M,Montani D,Perros F,et al. Endothelial cell dysfunction and cross talk between endothelium and smooth muscle cells in pulmonary arterial hypertension [J]. *Vascul Pharmacol*,2008,49(4):113-118

[14] Budhiraja R,Tuder RM,Hassoun PM. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension[J]. *Circulation*,2004,109(2):159-165

[15] Kebaier C,Chamberland RR,Allen IC,et al. Staphylococcus aureus α -hemolysin mediates virulence in a murine model of severe pneumonia through activation of the NLRP3 inflammasome [J]. *J Infect Dis*,2012,205(5):807-17

[16] Besnard AG,Guillou N,Tschopp J,et al. NLRP3 inflammasome is required in murine asthma in the absence of aluminum adjuvant[J]. *Allergy*,2011,66(8):1047-1057

[17] Lommatzsch M,Cicko S,Muller T,et al. Extracellular adenosine triphosphate and chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*,2010,181(9):928-934

[18] Brusselle GG,Joos GF,Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Lancet*,2011,378(9795):1015-1026

[19] Botelho FM,Bauer CMT,Finch D,et al. IL-1 α /IL-1R1 expression in chronic obstructive pulmonary disease and mechanistic relevance to smoke-induced neutrophilia in mice[J]. *PLoS One*,2011,6(12):e28457

[20] Imaoka H,Hoshino T,Takei S,et al. Interleukin-18 production and pulmonary function in COPD[J]. *Eur Respir J*,2008,31(2):287-297

[21] Gao J,Liu RT,Cao S,et al. NLRP3 inflammasome: activation and regulation in age-related macular degeneration [J]. *Mediators Inflamm*,2015,2015:690243

[22] Taniyama Y,Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature molecular and cellular mechanisms [J]. *Hypertension*,2003,42(6):1075-1081

[23] Wong CM,Bansal G,Pavlickova L,et al. Reactive oxygen species and antioxidants in pulmonary hypertension [J]. *Antioxid Redox Signal*,2013,18(14):1789-1796

[24] Martinon F. Signaling by ROS drives inflammasome activation[J]. *Eur J Immunol*,2010,40(3):616-619

[25] Bauernfeind FG,Horvath G,Stutz A,et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression[J]. *J Immunol*,2009,183(2):787-791

[26] Palová-Jelínková L,Dáňová K,Draařová H,et al. Pepsin digest of wheat gliadin fraction increases production of IL-1 β via TLR4/MyD88/TRIF/MAPK/NF- κ B signaling pathway and an NLRP3 inflammasome activation [J]. *PLoS One*,2013,8(4):e62426

[27] Liu H,Chen X,Han Y,et al. Rho kinase inhibition by fasudil suppresses lipopolysaccharide-induced apoptosis of rat pulmonary microvascular endothelial cells via JNK and p38 MAPK pathway[J]. *Biomed Pharmacother*,2014,68(3):267-275

[28] Li Y,Gao Y,Zeng Z,et al. Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/Mas axis prevents lipopolysaccharide-induced apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells by inhibiting JNK/NF- κ B pathways [J]. *Sci Rep*,2015,5:8209

[收稿日期] 2015-02-17

