

NLRP3 炎症小体在小鼠热应激损伤中的作用

张宏男^{1a, 1b}, 陈振辉^{1b, 1c}, 范宏英^{1b, 1c}, 朱嘉伟^{1a, 1b}, 郭进强^{1b, 1d}, 覃旻^{1b, 1d}, 王致², 孟晓静^{1a, 1b}

1. 南方医科大学公共卫生学院 a. 职业卫生与职业医学系 b. 广东省热带病研究重点实验室
c. 微生物学系 d. 预防医学实验教学中心, 广东 广州 510515
2. 广州市职业病防治院, 广东 广州 510000

摘要:

[背景] 热应激 (HS) 可导致机体重要脏器损伤甚至引起死亡, 全身性炎症反应是其主要原因之一。NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体在介导组织损伤引起的无菌性炎症中起重要作用, 但其在 HS 损伤中的作用及机制尚不清楚。

[目的] 探讨 NLRP3 炎症小体在 HS 小鼠系统性炎症反应和多器官损伤中的作用。

[方法] 设立野生型 C57BL/6 雄性小鼠对照组、HS 组, 以及 NLRP3 敲除 HS 组 (Nlrp3^{-/-}HS 组), 每组 8 只。利用温度 (41.0±0.5) °C、湿度 (65±5) % 的高温环境模拟舱对 HS 组和 Nlrp3^{-/-}HS 组小鼠进行 HS。每隔 15~20 min 监测肛温以及记录一般精神身体状况。当 HS 组小鼠肛温均超过 42.0 °C, 立即将两组小鼠移至正常室温环境, 于室温恢复 4 h, 解剖三组小鼠。HE 染色观察小鼠肝、肾、脾、脑和肠组织的病理改变; 采用 ELISA 试剂盒检测各组的血清肿瘤坏死因子 α (TNF-α)、白细胞介素 (IL) -1β 和 IL-6 的水平; 采用内毒素检测试剂盒检测血清内毒素水平; 采用免疫印迹法检测肠组织 Occludin、紧密连接蛋白-1 (ZO-1) 的表达水平, 以及脑、肝脏和肠道组织 NLRP3、半胱天冬酶 (caspase) -1、IL-1β 的蛋白表达水平。

[结果] 受热 90 min 时, HS 组小鼠的肛温 [(42.1±0.2) °C] 高于对照组 [(36.6±0.2) °C], Nlrp3^{-/-}HS 组小鼠肛温 [(40.1±0.7) °C] 和体重减轻量 [(1.3±0.2) g] 低于 HS 组 ($P<0.05$)。HE 染色显示 HS 组小鼠的肝、肾、脾、脑和肠组织有不同程度的损伤, 而 Nlrp3^{-/-}HS 组小鼠的各个组织病理损伤程度减轻。与对照组相比, HS 组小鼠血清的 TNF-α、IL-1β 和内毒素水平均升高, 肠道 Occludin、ZO-1 表达量降低, Nlrp3^{-/-}HS 组小鼠的 IL-1β 分泌量较 HS 组减少, 肠道 Occludin、ZO-1 表达量增多 ($P<0.05$); HS 组小鼠脑、肝脏和肠道组织的 NLRP3、caspase-1、IL-1β 蛋白水平与对照组相比升高 ($P<0.05$), Nlrp3^{-/-}HS 组小鼠的 NLRP3、caspase-1 和 IL-1β 表达量较 HS 组降低 ($P<0.05$)。

[结论] NLRP3 炎症小体活化参与了急性 HS 所致的系统性炎症反应以及多器官功能损伤。

关键词: 热应激; 体温; 炎症因子; 炎症反应; NLRP3 炎症小体

Effects of NLRP3 inflammasome on heat stress-induced damage in mice ZHANG Hong-nan^{1a, 1b}, CHEN Zhen-hui^{1b, 1c}, FAN Hong-ying^{1b, 1c}, ZHU Jia-wei^{1a, 1b}, GUO Jin-qiang^{1b, 1d}, QING Min^{1b, 1d}, WANG Zhi², MENG Xiao-jing^{1a, 1b} (1.a. Department of Occupational Health and Occupational Medicine b. Guangdong Province Key Laboratory of Tropical Disease Research c. Department of Microbiology d. Experimental Teaching Center of Preventive Medicine, School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China; 2. Guangzhou Occupational Disease Prevention Hospital, Guangzhou, Guangdong 510000, China)

Abstract:

[Background] Heat stress (HS)-caused systemic inflammation response can lead to injuries to vital organs and even death in patients. NOD-like receptor family pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) plays an important role in mediating aseptic inflammation caused by tissue injury, but its role in HS-induced damage is not clear.

[Objective] This experiment explores the role of NLRP3 inflammasome in systemic inflammatory response and multiple organ damage in mice after HS.

[Methods] This experiment included three groups: control group (wild type C57BL/6 male mice without HS), HS group (wild type C57BL/6 male mice with HS), and Nlrp3^{-/-}HS group (NLRP3 knockout C57BL/6 male mice with HS), with eight mice in each group. HS was induced by exposure to an ambient temperature of (41.0±0.5) °C with relative humidity of (65±5)%. Anal temperature and general

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.19899

基金项目

国家自然科学基金 (81773473); 广东省热带病研究重点实验室开放课题 (KLTDR201806)

作者简介

张宏男 (1993—), 女, 硕士生;
E-mail: zhn1353828@163.com

通信作者

孟晓静, E-mail: xiaojingmeng@smu.edu.cn

利益冲突 无申报

收稿日期 2019-12-27

录用日期 2020-03-30

文章编号 2095-9982(2020)05-0453-08

中图分类号 R114

文献标志码 A

引用

张宏男, 陈振辉, 范宏英, 等. NLRP3 炎症小体在 HS 小鼠热应激损伤中的作用 [J]. 环境与职业医学, 2020, 37 (5): 453-460.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19899

Funding

This study was funded.

Correspondence to

MENG Xiao-jing, E-mail: xiaojingmeng@smu.edu.cn

Competing interests None declared

Received 2019-12-27

Accepted 2020-03-30

To cite

ZHANG Hong-nan, CHEN Zhen-hui, FAN Hong-ying, et al. Effects of NLRP3 inflammasome on heat stress-induced damage in mice [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(5): 453-460.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19899

mental and physical conditions were recorded every 15-20 min. When the anal temperature of the mice in the HS group rose above 42.0°C, the HS group and the Nlrp3^{-/-}HS group were removed to room temperature and then anesthetized and dissected after 4 h. Selected organs of the mice, such as liver, kidney, spleen, brain, and intestine, were stained with HE for histopathological examination. Levels of serum tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , and IL-6 were measured with ELISA kit; level of endotoxin was detected with endotoxin kit; expression levels of intestinal Occludin and zonula occludens-1 (ZO-1), as well as NLRP3, caspase-1, and IL-1 β in brain, liver, and intestine tissues were analyzed by Western blotting.

[Results] After the heat exposure for 90 min, the HS group showed higher anal temperature [(42.1 $\pm$ 0.2)°C] than the control group [(36.6 $\pm$ 0.2)°C], and the Nlrp3^{-/-}HS group showed lower anal temperature [(40.1 $\pm$ 0.7)°C] and less body weight loss [(1.3 $\pm$ 0.2)g] than the HS group (P <0.05). The pathological results after HE staining showed different degrees of injury to liver, kidney, spleen, brain, and intestine in the HS group, while only mild histopathological changes in the Nlrp3^{-/-}HS group. The levels of serum TNF- α , IL-1 β , and endotoxin were higher and the expression levels of intestinal Occludin and ZO-1 were lower in the HS group than those in the control group, and the level of IL-1 β was lower and the expression levels of intestinal Occludin and ZO-1 were higher in the Nlrp3^{-/-}HS group than those in the HS group (P <0.05). The expression levels of NLRP3, caspase-1, and IL-1 β in brain, liver, and intestine tissues of mice in the HS group were higher than those in the control group (P <0.05), while the levels in the Nlrp3^{-/-}HS group were lower than those in the HS group (P <0.05).

[Conclusion] The activation of NLRP3 inflammasome plays a key role in systemic inflammatory response and multiple organ function damage during acute HS exposure.

Keywords: heat stress; body temperature; inflammatory cytokine; inflammatory response; NLRP3 inflammasome

中暑是由于运动或暴露于高热环境时,体内热量积聚超过散热量而导致核心体温上升,发生的热应激(heat stress, HS)反应,其特征是体温迅速上升至40°C以上,并伴有中枢神经系统的改变^[1]。中暑反应进展迅速,累及身体大部分器官,包括心脏、肺、肝脏、肾脏、胃肠道和肌肉,可导致多器官功能障碍甚至死亡^[2]。

有研究将中暑导致的组织损伤和死亡归因于炎症因子的过度激活,循环促炎因子水平与中暑的严重程度和预后相关^[3]。近年来研究表明,肠上皮屏障功能障碍在中暑的病理生理过程中起着重要的作用^[4-6],紧密连接蛋白——闭锁小带蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1)和闭锁蛋白(Occludin)是维持肠道屏障完整性的重要蛋白^[6],肠道屏障破坏之后,其表达量降低。肠源性内毒素透过受损的肠道屏障易位导致的全身炎症反应是中暑临床进展中的关键事件^[7-8]。炎症小体作为胞浆内多蛋白复合物,可以通过独特的模式识别受体(pattern-recognition receptors, PRRs)识别多种外源性(包括脂多糖、细菌鞭毛等)和内源性危险信号(包括活性氧、K⁺外流和Ca²⁺内流等),并激活其下游级联反应,剪切出成熟的炎症细胞因子并释放^[9],驱动免疫细胞炎症反应,在先天免疫防御中发挥重要作用,其作用失调介导了感染性疾病、自身免疫性疾病和肿瘤等众多疾病的发生发展^[10]。HS相关的炎症反应是全身性的,炎症小体在多个器官中广泛表达。NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor family, pyrin domain-containing protein 3, NLRP3)炎症小体是目前研究较为深入的炎症小

体,在临床上多种疾病的发病机制研究中均有报道,它可通过识别危险相关分子模式来激活炎症反应,是启动先天性免疫反应的重要手段。NLRP3炎症小体是由NLRP3、细胞凋亡相关斑点样蛋白(ASC)以及半胱天冬酶前体(pro-caspase)-1组成的多聚体蛋白复合物,水解出半胱天冬酶(caspase)-1,进一步剪切释放白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 成熟体。因其具有广泛的病原相关模式分子从而与体内多种应激反应相联系^[11],如在HS导致肝损伤中的作用多见报道^[12-14],也有研究指出NLRP3在小鼠腹腔巨噬细胞、肝组织和下丘脑HS过程中的作用^[15],但NLRP3在HS后全身系统反应的改变未见确切报道。

本研究通过观察野生型C57BL/6小鼠在急性HS后重要器官炎症表现、肠道损伤情况、内毒素水平以及NLRP3炎症小体的表达情况,并对比相同条件下NLRP3敲除C57BL/6小鼠的表现,初步探讨NLRP3炎症小体的活化在HS导致的全身性炎症反应和多器官损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

无特定病原体级雄性C57BL/6小鼠16只,4周龄,体重14.0~15.0g,购自南方医科大学实验动物中心,实验许可证号为SCXK(粤)2011-0015。C57BL/6 NLRP3敲除鼠(Nlrp3^{-/-})为第四军医大学赠送,共8只。饲养条件:室温(25 $\pm$ 1)°C,湿度(50 $\pm$ 5)%,自由饮水及进食。本次实验严格遵循《关于动物伦理与福利的作者指南共识》。

1.2 主要仪器与试剂

动物高温环境模拟舱(南方医科大学公共卫生学院),电子分析天平(Mettler-Toledo,瑞士),冷冻高速离心机(Beckman,美国),小型多功能高速离心机(Eppendorf,德国),多功能酶标仪(Thermo Fisher Scientific,美国),垂直电泳仪、转印槽(Bio-Rad,美国),奥德赛双色红外荧光扫描成像系统(LI-COR,美国)。

Western及IP蛋白提取试剂盒、蛋白酶抑制剂混合剂(凯基,江苏),聚偏二氟乙烯膜(Millipore,德国),兔抗NLRP3抗体(免疫印迹用)(Novus,美国),兔抗caspase-1抗体(CST,美国),鼠抗IL-1 β 抗体(R&D,美国),ZO-1和Occludin(Proteintech,美国),鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)单克隆抗体(Proteintech,美国),IRDye 800CW羊抗兔荧光二抗、IRDye 700CW羊抗鼠荧光二抗、IRDye 800CW猴抗羊荧光二抗(LI-COR,美国)。小鼠肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、IL-1 β 、IL-6 ELISA试剂盒(上海依科赛生物,中国),内毒素检测试剂盒(厦门鹭试,中国)。

1.3 动物分组与造模

适应性饲养14 d后,使用随机数字表法将野生型小鼠和Nlrp^{-/-}鼠按体重相近者随机分组,分为野生型小鼠室温对照组、HS组和Nlrp^{-/-}HS组,每组各8只。三组小鼠称取受热前体重,将两HS组转移至温度(41 $\pm$ 0.5)°C、湿度(65 $\pm$ 5)%的高温模拟舱进行HS。每隔15~20 min监测肛温并记录一般精神身体状况,当HS组小鼠肛温均超过42.0°C,立即将两组小鼠移至正常室温环境,记录出仓时的体重,给予水和食物进行复温,每隔20 min记录肛温。HS结束4 h后,各组小鼠经三溴乙烷(2 mg·kg⁻¹)腹腔麻醉,取血,固定后剪开颅骨,将大脑和小脑、脑干完整取出,取距离盲肠5 cm的回结肠,用无菌的镊子取出盲肠内容物以及粪便颗粒,分别取部分肝脏、肾脏、脾脏以及肠道在液氮瓶中进行速冻,并于-80°C的冷冻保存,另一部分通过4%多聚甲醛固定后行HE染色。

1.4 血清炎症因子检测

将经腹主动脉以及心脏采取的血液注入无菌1.5 mL离心管内,置于4°C冰箱,静置4 h以上,待血液分层,置于超高速冷冻离心机,4°C以4 000 $\times$ g离心15 min,吸取上层血清,每100 μ L分装于无菌1.5 mL离心管,-80°C冰箱保存。按照ELISA试剂盒说明书

检测炎症因子TNF- α 、IL-1 β 和IL-6。

1.5 内毒素检测

根据试剂盒说明书,利用试剂盒提供的细菌内毒素检测用水配制细菌内毒素标准品溶液、显色试剂、显色基质、偶氮化试剂。小鼠血清样品及标准品均依次加入显色试剂,显色基质,偶氮化试剂1、2、3,孵育后于545 nm波长处读取光密度并换算浓度。

1.6 HE染色观察各器官组织病理形态变化

肝脏、肾脏、脾脏和肠道组织块用4%多聚甲醛固定24 h后,经过梯度乙醇脱水、透明、石蜡包埋、切片、烘干、脱蜡后,HE染色并观察。

1.7 免疫印记法检测蛋白表达水平

取小鼠脑组织、肝脏、回结肠组织,按照蛋白提取试剂盒说明书进行蛋白提取,考马斯亮蓝G250溶液定量检测各组蛋白浓度,将各组蛋白调整到同一浓度,加入5 $\times$ 上样缓冲液,充分混匀,99°C加热10 min,瞬时离心后漩涡混匀于-80°C保存。提前制备合适浓度十二烷基硫酸钠凝胶,电泳结束后将分离胶上的蛋白转印到聚偏二氟乙烯膜上,5%脱脂奶粉室温封闭60 min, TBST溶液漂洗,加入一抗(一抗稀释比:NLRP3, 1:1 000; caspase-1, 1:1 000; IL-1 β , 1:500; GAPDH, 1:10 000; ZO-1, 1:1 000; Occludin, 1:1 000),4°C孵育过夜, TBST溶液漂洗5 min, 3次,加入二抗(二抗稀释比例均为1:10 000), TBST溶液漂洗5 min, 3次,奥德赛双色红外荧光扫描成像仪扫描拍摄,Image J进行灰度值分析。

1.8 统计学分析

检测数据均以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,应用GraphPad Prism 6.0进行统计分析,多组均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较采用LSD-*t*检验(方差齐)或Dunnett-*t*检验(方差不齐)。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况

对照组小鼠进食进水正常,无异常表现。置于温度为(41 $\pm$ 0.5)°C、湿度为(65 $\pm$ 5)%的环境中,在40 min时HS组小鼠肛温开始超过41.0°C,伴随出现躁动、皮毛潮湿、唾液分泌增加等症状,部分小鼠出现惊跳、攀爬鼠笼行为;在60 min时小鼠活动减少,多处于静卧状态,部分小鼠出现抽搐、精神萎靡甚至浅昏迷等症状,肛温骤升;在90 min时HS组小鼠肛温

为 $(42.1 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ ，较对照组高，Nlrp3^{-/-}HS 组小鼠肛温为 $(40.1 \pm 0.7)^\circ\text{C}$ ，低于 HS 组 ($P < 0.05$)，升高相对缓慢。出仓复温时，HS 组小鼠体重减轻 $(2.3 \pm 0.3) \text{ g}$ ，较 Nlrp3^{-/-}HS 组 $[(1.3 \pm 0.2) \text{ g}]$ 小鼠高 ($P < 0.05$) (表 1)。随后，小鼠的肛温迅速下降，60~120 min 内保持在 35°C 以下，之后缓慢上升。约 4 h 后，HS 组小鼠肛温恢复至正常水平 $(36.8 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ ，皮毛潮湿，聚团静卧；Nlrp3^{-/-}HS 组小鼠恢复至 $(36.7 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ ，皮毛仍见湿润，活动减少。

表 1 三组小鼠肛温以及体重改变情况 ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Changes of anal temperature and body weight of mice before and after heat stress ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

指标 Index	对照 Control	HS	Nlrp3 ^{-/-} HS
热应激前体重/g Pre-heat stress body weight	22.1±0.2	22.1±0.3	22.0±0.3
热应激后体重/g Post-heat stress body weight	22.1±0.3	19.8±0.4	20.7±0.3
暴露结束时肛温/°C Anal temperature at the end of heat exposure	36.6±0.2	42.1±0.2 ^{ab}	40.1±0.7
体重减轻/g Body weight loss	0.4±0.2	2.3±0.3 ^b	1.3±0.2

[注] a：与对照组比较， $P < 0.05$ ；b：与 Nlrp3^{-/-}HS 组比较， $P < 0.05$ 。

[Note] a: Compared with the control group, $P < 0.05$; Compared with the Nlrp3^{-/-}HS group, $P < 0.05$.

2.2 重要器官组织的病理变化

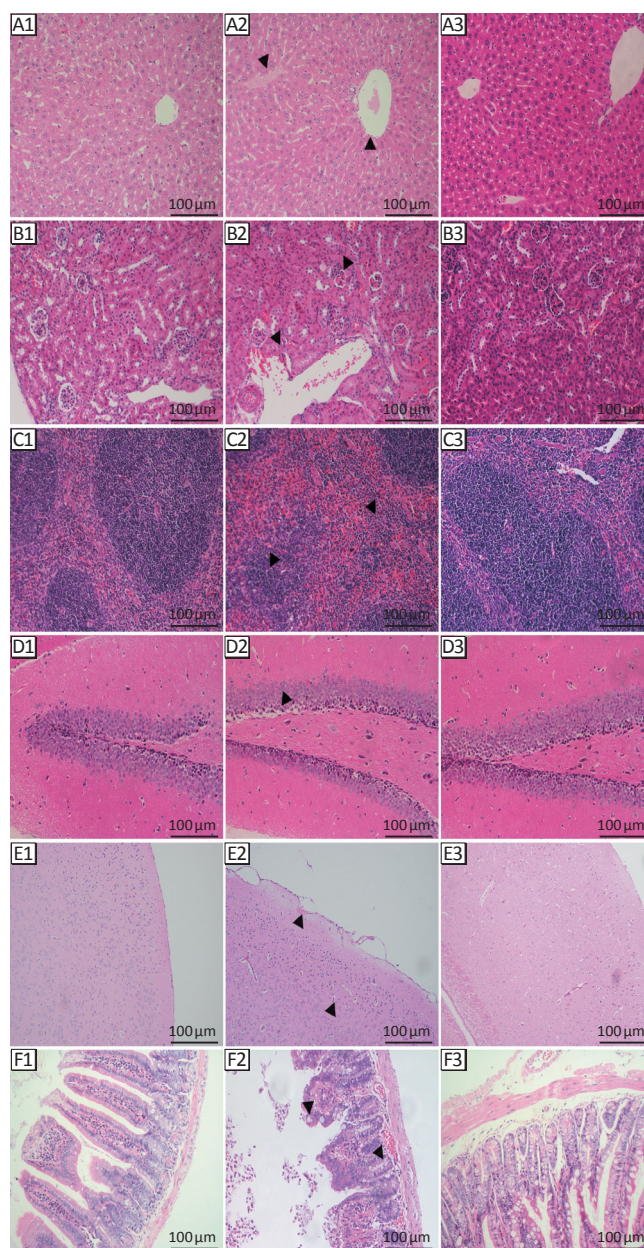
光镜下观察，HS 组小鼠肝脏主要表现为肝细胞肿胀，中央静脉血细胞淤积阻塞、扩张；肾脏皮质紊乱，肾间质血管扩张，肾小球玻璃样变；脾脏脾小结结构紊乱，形状不规则，红白髓比例失调，红髓增多，白髓呈碎片分布，炎性细胞浸润；海马齿状回 (DG) 区出现不同程度的神经元胞体缩小，核固缩，数量减少，大脑皮层血管扩张，血液淤积；肠绒毛坏死脱落，炎症细胞浸润，间质血管扩张。而 Nlrp3^{-/-}HS 组小鼠上述情况均有所减轻 (图 1)。

2.3 血清中炎症因子及内毒素水平

HS 后 4 h，HS 组小鼠的血清 TNF- α 、IL-1 β 和内毒素水平比对照组小鼠升高；Nlrp3^{-/-}HS 组 IL-1 β 水平较 HS 组降低 ($P < 0.05$)，内毒素水平与 HS 组相比没有明显改变；IL-6 水平在各组之间无明显变化 (图 2)。

2.4 肠道 Occludin 和 ZO-1 的表达

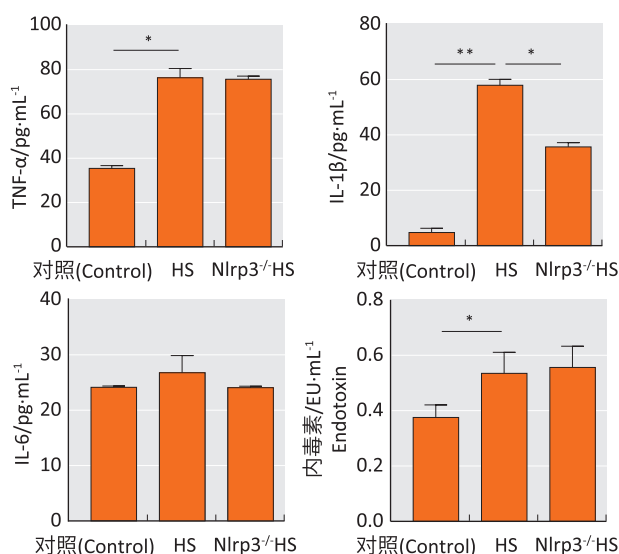
Nlrp3^{-/-}HS 组小鼠的肠壁完整性较 HS 组升高，表现为 ZO-1 和 Occludin 表达量较 HS 组高 ($P < 0.05$)，而 HS 组的 ZO-1 和 Occludin 表达量低于对照组 ($P < 0.05$)，见图 3。



[注] A：肝脏；B：肾脏；C：脾脏；D：海马；E：大脑皮层；F：肠道。1：对照；2：HS；3：Nlrp3^{-/-}HS。黑色箭头代表病理改变，具体依次为淤积扩张的中央静脉；肾小球皮质紊乱，间质血管扩张，肾小球玻璃样变；脾小体缩小，分布不规则，红白髓比例增大；海马 DG 区神经元核固缩；大脑皮层血管扩张，血液淤积；小鼠肠道绒毛脱落，间质血管扩张。

[Note] A: Liver; B: Kidney; C: Spleen; D: Hippocampus; E: Cortex; F: Intestine. 1: Control; 2: HS; 3: Nlrp3^{-/-}HS. The black arrows indicate typical pathological changes, including dilated central vein; disordered glomerular cortex, dilated interstitial vessels, and glomerular vitreous degeneration; shrinking splenic corpuscles with irregular distribution, and increased red/white pulp ratio; pyknosis of neuronal nuclei in DG region of hippocampus; dilation of cerebral cortical vessels and blood stasis; and exfoliation of intestinal villi and dilatation of interstitial vessels in mice.

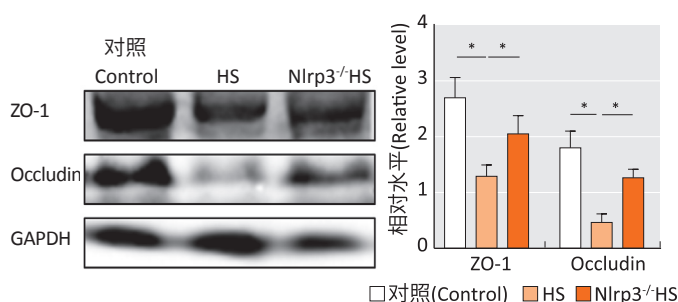
图 1 热应激后小鼠各器官与组织的病理改变 (HE 染色)
Figure 1 Pathological changes of selected organs and tissues in mice after heat stress (HE staining)



[注 (Note)] *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

图2 热应激4h后各组小鼠血清中主要炎症因子和内毒素水平的变化 ($n=8$)

Figure 2 Serum levels of inflammatory factors and endotoxin in mice at 4h after heat stress ($n=8$)

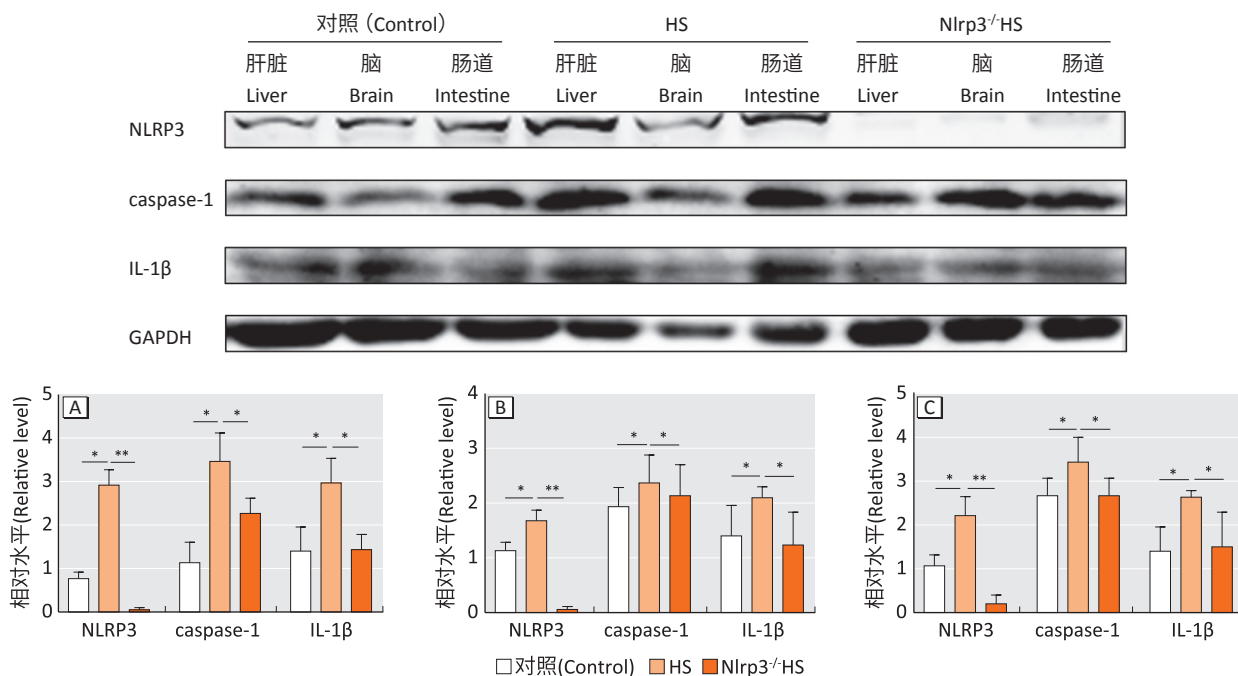


[注 (Note)] *: $P < 0.05$ 。

图3 热应激后各组小鼠肠道组织 ZO-1 和 Occludin 的表达
Figure 3 Expressions of ZO-1 and Occludin of intestine in mice after heat stress

2.5 NLRP3 炎症小体的变化

与对照组相比, HS 导致小鼠肝、脑和肠道组织中 NLRP3、caspase-1 和 IL-1β 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), 而 Nlrp3^{-/-}HS 组小鼠在同样的 HS 条件下, 其 NLRP3、caspase-1 和 IL-1β 表达量较 HS 组低 ($P < 0.05$), 见图 4。



[注 (Note)] *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

图4 热应激条件下各组小鼠肝脏 (A)、脑组织 (B) 和肠道组织 (C) 中 NLRP3、caspase-1 和 IL-1β 蛋白表达
Figure 4 Expressions of NLRP3, caspase-1, and IL-1β in liver (A), brain (B), and intestine (C) in mice after heat stress

3 讨论

中暑与全身炎症反应综合征的临床表现相似, 已有研究证明 HS 导致的损伤主要是由于肠道功能障碍, 通透性增加, 血清内毒素水平升高^[16], 炎症因子释放从而诱发全身炎症反应和多器官功能障碍^[6, 17]。系统炎症性细胞因子, 如 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 等已经被广泛证明与 HS 损伤的严重程度有关^[18-19]。NLRP3 炎症小

体作为产生 IL-1β 的经典途径之一, 通过形成多蛋白复合体, 触发 caspase-1 的自我剪切, 随后分泌成熟 IL-1β。大量文献证实 NLRP3 炎症小体过度激活与慢性炎症疾病有关, 例如阿尔茨海默病、糖尿病^[20]等, 在脓毒症患者中表达尤为强烈。HS 恢复期同样面临多种多样的器官炎症反应, 影响预后^[21], 其机制尚未完全清楚。所以本次研究主要探究 NLRP3 炎症小体激活是

否在 HS 导致的全身性炎症反应和多器官功能障碍中发挥作用。

通过前期摸索和对比其他文献研究中不同的环境条件^[15, 22], 本研究成功构建了 C57BL/6 小鼠 HS 状态下的热射病模型。将小鼠置于 $(41 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 湿度 $(65 \pm 5)\%$ 的环境后, 其肛温超过 42°C , 伴明显的中枢神经系统损伤症状, 如抽搐和昏迷, 可判断为热射病^[6, 23-24], 此时 Nlrp3^{-/-}HS 组小鼠肛温仍低于 HS 组, 且维持较为稳定, 精神状态较 HS 组好, 故快速复温。对比对照组可发现 HS 组小鼠体重明显降低, 一般精神状态极差。出仓后 2 h 内, HS 组小鼠肛温均低于 35°C 伴寒战, 精神萎靡, 后缓慢恢复至正常体温。病理切片显示, 相对于对照组, HS 组小鼠的肝脏呈现一定程度的损伤, 包括中央静脉扩张, 肝细胞肿胀。与以前的报道一致, 在患者和动物模型中, 肝损伤在 HS 开始时不存在, 在 HS 恢复期间出现^[12]。同样的, 本研究观察到 HS 组小鼠肾脏皮质区间质炎症反应, 肾小球出现一定程度玻璃样变, 与前期临床病例报道^[25]中 HS 后期慢性肾炎改变一致。另外作为脾脏实质主要组成部分的脾小结结构紊乱, 大小不一, 聚集主要淋巴细胞的白髓呈现碎片样分布, 红髓比例增多, 提示 HS 恢复期小鼠脾脏亦出现严重的损伤。HS 小鼠前期表现为惊厥、惊跳, 后为静卧、抽搐甚至丧失意志乃至浅昏迷, 表明脑部重要区域神经元受到一定程度的损伤, 本研究在海马 DG 区观察到神经元的损伤, 脑皮质区血管扩张, 血液淤积, 散在神经元损伤, 未见明显坏死灶。HS 组肠道结构损伤, 表现为基质外软组织水肿, 血管扩张, 肠道绒毛损伤脱落。同样的 HS 条件下, 对比 HS 组, Nlrp3^{-/-}HS 组肝索结构更为清晰, 中央静脉有扩张但未见明显炎症细胞浸润; 肾间质未见明显充血, 肾小球结构尚可; 脾脏可见少许红细胞淤积, 红白髓界限仍存在; 海马区 and 大脑皮质也可观察到一定数目的神经元损伤, 但血管炎症反应较轻; 肠组织中可见血液有淤积, 但绒毛未见脱落。检测血清发现 HS 组系统炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 升高。有研究表明 IL-6 与中暑损伤严重程度相关并调节发热过程^[18, 26], 亦有报道也发现 IL-6 和 TNF- α 受体敲除的小鼠在中暑衰竭后的死亡率高于野生型小鼠^[3], 本实验中三组之间 IL-6 水平未见明显变化, 可能与小鼠处于 HS 恢复期, 未发生严重不可逆损伤有关。本研究检测了 HS 后 4 h 内毒素表达水平, HS 组明显上升, 但与 Nlrp3^{-/-}HS 组内毒素水平相比无明显差别, HS 组小鼠

肠道主要紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 表达较对照组明显降低, 而 Nlrp3^{-/-}HS 组肠道 ZO-1 和 Occludin 表达有所上升, 这与文献中报道 NLRP3 炎症小体敲除小鼠在同等炎症模型下, ZO-1 合成升高^[27]结果一致。也有文献中指出温度从 37°C 升高至 41°C 可引起 Occludin 代偿性增加, 具有保护性, 但尚不能确定是否包含其他调控机制^[28], 另外内毒素与肠道紧密连接蛋白表达之间相关性都值得进一步研究探索。HS 组小鼠脑、肝和肠组织中 NLRP3、caspase-1 和 IL-1 β 表达均升高, 而 Nlrp3^{-/-}HS 组小鼠的各组织中 caspase-1 和 IL-1 β 蛋白表达降低, 这与血清炎症因子 IL-1 β 表达降低一致。

本次实验观察到几个值得探究的时间点。核心体温 (本次实验采用肛温监测) 峰值时期所出现的异常中枢神经系统现象可能与 NLRP3 炎症小体激活的时程不一样, 综合前期实验结果和文献报道^[12, 15], NLRP3 炎症小体及炎症因子在 HS 后 2~6 h 内表达都有升高, 故本次实验取材时间点选在了 HS 后 4 h。Biedenkapp 等^[18]在研究中也发现 HS 后恢复 2 h 之内脑组织炎症因子基因表达较核心体温峰值期高, 但需结合具体温度条件讨论不同变化。最有用的方法是利用针对下丘脑的炎症因子、细胞因子或者趋化因子信号的药理或遗传干扰 (如阻断 caspase-1 或者 IL-1 β), 以证明这些因素在调节 HS 的生理和行为后果中的因果作用。

通过本次实验我们发现 HS 反应进展迅速, 即使脱离 HS 环境, HS 导致的损伤进程也会持续存在一定时间。有研究中指出 30% 的中暑幸存者在全身降温后仍会出现残疾和神经功能障碍^[29], 预防中暑 (适应环境、减少暴露、及时消除 HS 条件等) 胜于治疗中暑^[30], 另外, 对比已有文献报道的不同 HS 实验中器官损伤情况, 本次实验中及时有效的复温, 其器官损伤程度相对减缓, 说明采取早期脱离热环境、降低核心温度等措施, 可及时消除 HS 对机体的损伤, 从而降低死亡率和后遗症的发生率, 研究 HS 不同时期机体损伤的病理过程将为中暑的预防和治疗提供基础。

本次实验提示在温度为 $(41 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 、湿度为 $(65 \pm 5)\%$ 的环境中受热 60~90 min 可诱导成年野生型雄性 C57BL/6 小鼠发生热射病, 敲除 NLRP3 可以减缓 HS 反应进程, 通过减轻系统性炎症反应, 维持肠道的完整性并减轻多器官损伤, 说明 NLRP3 炎症小体的激活参与了 HS 导致的损伤。目前尚不清楚 HS 过程完整的调控机制, 本研究结果为 NLRP3 炎症小体在 HS 期间的炎症反应和多器官损伤中的作用提供了重要的证据。下一步需

要继续探讨 NLRP3 炎症小体激活在 HS 损伤中的具体信号通路, 为中暑的预防和治疗提供基础和依据。

参考文献

- [1] BOUCHAMA A, KNOCHEL JP. Heat stroke [J]. *N Engl J Med*, 2002, 346 (25) : 1978-1988.
- [2] AL MAHRI S, BOUCHAMA A. Heatstroke [J]. *Handb Clin Neurol*, 2018, 157 : 531-545.
- [3] LEON LR, BOUCHAMA A. Heat stroke [J]. *Compr Physiol*, 2015, 5 (2) : 611-647.
- [4] YI G, LI L, LUO M, et al. Heat stress induces intestinal injury through lysosome- and mitochondria-dependent pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (25) : 40741-40755.
- [5] CHENG K, SONG Z, LI S, et al. Effects of resveratrol on intestinal oxidative status and inflammation in heat-stressed rats [J]. *J Therm Biol*, 2019, 85 : 102415.
- [6] YE N, YU T, GUO H, et al. Intestinal injury in heat stroke [J]. *J Emerg Med*, 2019, 57 (6) : 791-797.
- [7] HALL DM, BUETTNER GR, OBERLEY LW, et al. Mechanisms of circulatory and intestinal barrier dysfunction during whole body hyperthermia [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 280 (2) : H509-H521.
- [8] SNIPE RM, KHOO A, KITIC CM, et al. The Impact of mild heat stress during prolonged running on gastrointestinal integrity, gastrointestinal symptoms, systemic endotoxin and cytokine profiles [J]. *Int J Sports Med*, 2018, doi : 10.1055/s-0043-122742.
- [9] EVAVOLD C L, KAGAN J C. Inflammasomes : threat-assessment organelles of the innate immune system [J]. *Immunity*, 2019, 51 (4) : 609-624.
- [10] YANG Q, LIU R, YU Q, et al. Metabolic regulation of inflammasomes in inflammation [J]. *Immunology*, 2019, 157 (2) : 95-109.
- [11] YUE S, ZHU J, ZHANG M, et al. The myeloid heat shock transcription factor 1/B-catenin axis regulates NLR family, pyrin domain-containing 3 inflammasome activation in mouse liver ischemia/reperfusion injury [J]. *Hepatology*, 2016, 64 (5) : 1683-1698.
- [12] GENG Y, MA Q, LIU Y N, et al. Heatstroke induces liver injury via IL-1 β and HMGB1-induced pyroptosis [J]. *J Hepatol*, 2015, 63 (3) : 622-633.
- [13] QU J, WANG W, ZHANG Q, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammation of chicken liver tissue by selenomethionine via TLR4-NF- κ B-NLRP3 signaling pathway [J]. *Biol Trace Element Res*, 2019, doi : 10.1007/s12011-019-01841-0.
- [14] ARAÚJO A M, ENEA M, CARVALHO F, et al. Hepatic metabolic derangements triggered by hyperthermia : an *in vitro* metabolomic study [J]. *Metabolites*, 2019, 9 (10) : 228.
- [15] 谷晓蕾. Nlrp3 炎症小体在热应激损伤中的作用研究 [D]. 上海 : 第二军医大学, 2016.
- [16] XIAO G, YUAN F, GENG Y, et al. Eicosapentaenoic acid enhances heatstroke-impaired intestinal epithelial barrier function in rats [J]. *Shock*, 2015, 44 (4) : 348-356.
- [17] LIM C L. Heat sepsis precedes heat toxicity in the pathophysiology of heat stroke—a new paradigm on an ancient disease [J]. *Antioxidants*, 2018, 7 (11) : 149.
- [18] BIEDENKAPP J C, LEON L R. Increased cytokine and chemokine gene expression in the CNS of mice during heat stroke recovery [J]. *Am J Physiol-Regulat, Integrat Comparat Physiol*, 2013, 305 (9) : R978-R986.
- [19] CUI Y, HAO Y, LI J, et al. Chronic heat stress induces immune response, oxidative stress response, and apoptosis of finishing pig liver : a proteomic approach [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17 (5) : 393.
- [20] CAMELL C, GOLDBERG E, DIXIT V D. Regulation of Nlrp3 inflammasome by dietary metabolites [J]. *Semin Immunol*, 2015, 27 (5) : 334-342.
- [21] ABUAJAMIEH M, KVIDERA S K, MAYORGA E J, et al. The effect of recovery from heat stress on circulating bioenergetics and inflammatory biomarkers [J]. *J Anim Sci*, 2018, 96 (11) : 4599-4610.
- [22] XIA Z N, ZONG Y, ZHANG Z T, et al. Dexmedetomidine protects against multi-organ dysfunction induced by heatstroke via sustaining the intestinal integrity [J]. *Shock*, 2017, 48 (2) : 260-269.
- [23] HERBST J, MASON K, BYARD R W, et al. Heat-related deaths in Adelaide, South Australia : review of the literature and case findings—an Australian perspective [J]. *J Forensic Leg Med*, 2014, 22 : 73-78.
- [24] EPSTEIN Y, YANOVICH R. Heatstroke. Reply [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381 (12) : 1187.
- [25] SATO Y, RONCAL-JIMENEZ CA, ANDRES-HERNANDO A, et

- al. Increase of core temperature affected the progression of kidney injury by repeated heat stress exposure [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2019, 317 (5) : F1111-F1121.
- [26] YAN YE, ZHAO YQ, WANG H, et al. Pathophysiological factors underlying heatstroke [J]. *Med Hypotheses*, 2006, 67 (3) : 609-617.
- [27] MARONI L, AGOSTINELLI L, SACCOMANNO S, et al. Nlrp3 activation induces IL-18 synthesis and affects the epithelial barrier function in reactive cholangiocytes [J]. *Am J Pathol*, 2017, 187 (2) : 366-376.
- [28] DOKLADNY K, YE D, KENNEDY JC, et al. Cellular and molecular mechanisms of heat stress-induced up-regulation of occludin protein expression : regulatory role of heat shock factor-1 [J]. *Am J Pathol*, 2008, 172 (3) : 659-670.
- [29] CHAUHAN NR, KAPOOR M, PRABHA SINGH L, et al. Heat Stress-induced neuroinflammation and aberration in monoamine levels in hypothalamus are associated with temperature dysregulation [J]. *Neuroscience*, 2017, 358 : 79-92.
- [30] LEYK D, HOITZ J, BECKER C, et al. Health risks and interventions in exertional heat stress [J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2019, 116 (31/32) : 537-544.
- (英文编辑：汪源；责任编辑：王晓宇)

· 告知栏 ·

欢迎关注《环境与职业医学》微信公众号

《环境与职业医学》微信公众号已正式上线，该平台包括“读者”“作者”和“我们”三个主菜单，主要提供稿件状态查询、当期最新内容及稿件撰写要求等内容，同时也发布国内外最新研究动态及发展前沿等资讯，满足读者网络时代碎片化阅读的需求。本平台旨在为编者、作者、读者之间搭建一个分享、学习、互动的平台，以此推动《环境与职业医学》的健康发展。

请直接扫描右侧二维码或在公众号中搜索“环境与职业医学”（微信号：JEOM），即可关注本刊微信公众号。

