

二氧化硅上调活性氧诱导 NLRP3 依赖的巨噬细胞焦亡机制

殷浩宇^{1,2a}, 田家齐^{1,2a}, 马兰^{1,2a}, 张敬^{2a,3}, 李炜修^{2a}, 彭延杰^{2b}, 张美华^{2b}, 翟庆峰¹, 张林^{2a}

1. 潍坊医学院公共卫生学院, 山东 潍坊 261053

2. 山东大学附属山东省妇幼保健院 a. 临床医学研究中心 b. 国家卫健委生育调控技术重点实验室, 山东济南 250001

3. 华北理工大学公共卫生学院, 河北 唐山 063000

摘要:

[背景] 巨噬细胞是天然免疫系统的重要组成部分, 其在抵抗呼吸道途径外来异物入侵和维持肺组织内环境稳态中发挥重要作用。

[目的] 探讨不同粒径的二氧化硅(SiO₂)粉尘诱导巨噬细胞焦亡发生机制。

[方法] 将巨噬细胞 RAW-ASC 分为空白组、脂多糖(LPS)组(1 μg·mL⁻¹ LPS)、纳米 SiO₂ 组(1 μg·mL⁻¹ LPS + 100 μg·mL⁻¹ 纳米 SiO₂)、微米 SiO₂ 组(1 μg·mL⁻¹ LPS + 750 μg·mL⁻¹ 微米 SiO₂)和阳性对照组[1 μg·mL⁻¹ LPS+3 mmol·L⁻¹ 三磷酸腺苷(ATP)]。除空白组外, 其他组细胞均以 LPS 预处理 6 h, 再以 SiO₂ 或 ATP 处理 4 h。锚定焦亡通路分子靶点 NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)、活性氧(ROS)施加特异性干预剂[NLRP3 抑制剂 MCC950、ROS 清除剂 N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)]。CCK-8 法检测细胞活性; 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)染色检测细胞增殖能力; 试剂盒法检测细胞上清乳酸脱氢酶(LDH)水平; 钙黄绿素/碘化丙啶(Calcein AM/PI)荧光双染评估细胞破裂状况; 二氯二氢荧光素-乙酰乙酸酯(DCFH-DA)荧光探针法检测细胞内 ROS 水平; Western blotting 检测焦亡相关标志 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)、gasdermin D(GSDMD)、白介素-1β(IL-1β)的蛋白表达水平。

[结果] 与空白组相比, 100 μg·mL⁻¹ 纳米 SiO₂ 及 750 μg·mL⁻¹ 微米 SiO₂ 处理, 分别使细胞活性降低至 40%和 68%(*P* < 0.05), 细胞增殖率降低至 30%和 33%(*P* < 0.01), 并且诱导细胞破裂与 ROS 释放, 上调 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、IL-1β 蛋白表达水平(*P* < 0.05), 诱导巨噬细胞发生焦亡。添加特异性干预剂 MCC950(10 μmol·L⁻¹)和 NAC(10 mmol·L⁻¹)后, 巨噬细胞内 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1β 表达水平均较未干预组下降(*P* < 0.05)。此外, NAC 还可有效降低细胞内 ROS 水平(*P* < 0.05)。

[结论] 纳米及微米级 SiO₂ 粉尘均具细胞毒性, 表现为上调巨噬细胞 ROS 水平, 激活 NLRP3 炎性小体并介导细胞焦亡, 促进炎性细胞因子释放等, 相关研究结果有助于揭示 SiO₂ 粉尘诱导的巨噬细胞焦亡分子机制。

关键词: 二氧化硅; 巨噬细胞; 活性氧; NOD 样受体蛋白 3; 细胞焦亡

Mechanism of silica-induced ROS over synthesis in NLRP3-dependent macrophage pyroptosis

YIN Haoyu^{1,2a}, TIAN Jiaqi^{1,2a}, MA Lan^{1,2a}, ZHANG Jing^{2a,3}, LI Weixiu^{2a}, PENG Yanjie^{2b}, ZHANG Meihua^{2b}, ZHAI Qingfeng¹, ZHANG Lin^{2a} (1. School of Public Health, Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261053, China; 2.a. Research Center for Clinical Medical Sciences b. Key Laboratory of Birth Regulation and Control Technology of National Health Commission of China, Maternal and Child Health Care Hospital of Shandong Province, Shandong University, Jinan, Shandong 250001, China; 3. School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract:

[Background] Macrophages are essential components of the natural immune system. They play a significant role in resisting foreign bodies in the respiratory tract and maintaining the homeostasis of the internal environment of lung tissue.

[Objective] To investigate the mechanism of macrophage pyroptosis induced by silica dust with



DOI 10.11836/JEOM21363

基金项目

国家自然科学基金(82003405); 山东省自然科学基金(ZR2020QH290); 山东省医药卫生科技发展计划项目(2018WS059)

作者简介

殷浩宇(1997—), 女, 硕士生;
E-mail: yinhaoyu2020@163.com

通信作者

张林, E-mail: zhanglin8901@163.com
翟庆峰, E-mail: sdzzqfff@163.com

伦理审批 不需要

利益冲突 无申报

收稿日期 2021-08-15

录用日期 2022-02-10

文章编号 2095-9982(2022)04-0446-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

► 引用

殷浩宇, 田家齐, 马兰, 等. 二氧化硅上调活性氧诱导 NLRP3 依赖的巨噬细胞焦亡机制[J]. 环境与职业医学, 2022, 39(4): 446-452.

► 本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM21363

Funding

This study was funded.

Correspondence to

ZHANG Lin, E-mail: zhanglin8901@163.com
ZHAI Qingfeng, E-mail: sdzzqfff@163.com

Ethics approval Not required

Competing interests None declared

Received 2021-08-15

Accepted 2022-02-10

► To cite

YIN Haoyu, TIAN Jiaqi, MA Lan, et al. Mechanism of silica-induced ROS over synthesis in NLRP3-dependent macrophage pyroptosis[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(4): 446-452.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM21363

different particle sizes.

[Methods] The modified murine macrophage cell line, RAW-ASC cells, was cultured and divided into a blank control group, a lipopolysaccharide (LPS) group ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS), a nano-SiO₂ group ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS+ $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ nano-SiO₂), a micro-SiO₂ group ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS+ $750 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ micro-SiO₂), and a positive control group [$1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS+ $3 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ adenosine triphosphate (ATP)]. Apart from the blank control group, cells in other groups were pretreated with LPS for 6 h, and then exposed to SiO₂ or ATP for 4 h. According to the molecular target NOD-like receptor pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) and reactive oxygen species (ROS), we applied MCC950 (NLRP3 inhibitor) and N-acetyl cysteine (NAC, ROS scavenger) to macrophages. CCK-8 assay was used to detect cell viability; 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) staining was used to detect cell proliferation; lactate dehydrogenase (LDH) assay kit was used to detect LDH in supernatant; calcein AM/PI fluorescent double-staining was applied to evaluate cell rupture; 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescent probe was used to measure the content of ROS; Western blotting was used to measure the expressions of NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC), Caspase-1, gasdermin D (GSDMD), and interleukin-1 β (IL-1 β).

[Results] Compared with the blank group, $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ nano-SiO₂ and $750 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ micro-SiO₂ dust exposure reduced the cell viability to 40% and 68% ($P < 0.05$), and the cell proliferation rate to 30% and 33% ($P < 0.01$), respectively; they also induced cell lysis and ROS release, upregulated NLRP3, ASC, Caspase-1, GSDMD, and IL-1 β at protein level ($P < 0.05$), and induced macrophage pyroptosis. After intervening with MCC950 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and NAC ($10 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), the expressions of NLRP3, ASC, Caspase-1, and IL-1 β decreased ($P < 0.05$), and, specifically, NAC effectively reduced ROS levels ($P < 0.05$).

[Conclusion] Both nano- and micro-SiO₂ dust have cytotoxicity, can upregulate ROS level, activate NLRP3 inflammasome, and promote the release of cytokines, leading to pyroptosis. These results are helpful to reveal the molecular mechanism of macrophage pyroptosis induced by SiO₂ dust.

Keywords: silica; macrophage; reactive oxygen species; NOD-like receptor pyrin domain-containing protein 3; pyroptosis

巨噬细胞是肺部免疫防御的主要参与者之一,其中散布于肺间质的肺泡巨噬细胞主要负责吞噬经呼吸道途径进入机体的颗粒、纤维、病毒等外来异物,在维持肺组织微环境稳态中发挥重要作用^[1]。通常,游离二氧化硅(SiO₂)粉尘进入肺泡腔后,首先被巨噬细胞吞噬。在试图降解SiO₂粉尘过程中,巨噬细胞供能需求增加,线粒体呼吸作用增强,活性氧(reactive oxygen species, ROS)作为呼吸作用副产物被大量合成、释放并影响细胞正常生物学进程。持续不断的粉尘刺激可诱导细胞破裂,造成细胞内容物释放,其中趋化细胞因子可募集外周血炎症细胞,在肺间质形成局部炎症微环境^[2],相关生物学改变是诱发慢性阻塞性肺疾病、哮喘、矽肺等常见肺部疾患的病理基础。

作为机体天然免疫反应的重要构成部分,巨噬细胞依赖其表面模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)捕获SiO₂粉尘,此过程可触发一系列信号转导反应,诱发典型的细胞焦亡过程:PRR通过胞质传导外源异物入侵信号至NOD样受体蛋白3(NOD-like receptor pyrin domain-containing protein 3, NLRP3),后者募集凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1前体(pro-cysteinyl aspartate specific proteinase-1, pro-Caspase-1)组装炎症小体并对pro-Caspase-1进行切割,活化的Caspase-1(P20)进一步切割白细胞介素-1 β 前体(pro-interleukin-1 β , pro-IL-1 β)及

gasdermin D(GSDMD)。由GSDMD P30亚基(Gasdermin D-N terminal, GSDMD-NT)聚合形成的高价中空环状低聚物可嵌套入细胞膜形成非选择性离子孔道,诱导细胞内活化的IL-1 β (cleaved-interleukin-1 β , cleaved-IL-1 β)等炎性细胞因子外释^[3]。然而,PRR是通过何种途径介导外源信号至NLRP3的还不清楚,作为影响细胞内诸多生物学代谢过程的ROS是潜在的关联靶点^[4],但针对ROS在SiO₂粉尘诱导巨噬细胞焦亡中的作用报道甚少。鉴于此,本研究使用SiO₂粉尘对小鼠巨噬细胞RAW-ASC进行染毒,检测ROS水平,评估巨噬细胞焦亡状况,探讨其发生机制,相关研究结果有助于揭示SiO₂粉尘诱导的巨噬细胞焦亡分子机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

DMEM高糖培养基、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(武汉赛维尔生物科技有限公司,中国);胎牛血清(BI,以色列);纳米级SiO₂、三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)、青霉素-链霉素双抗、PBS、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,中国);微米级SiO₂、NLRP3抑制剂MCC950(Sigma,美国);NLRP3抗体、Caspase-1抗体、ASC抗体、IL-1 β 抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公

司, 中国); 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、放射免疫沉淀法 (radioimmunoprecipitation assay, RIPA) 细胞裂解液、CCK-8 试剂盒、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 检测试剂盒、钙黄绿素/碘化丙啉 (Calcein AM/PI) 细胞活力与细胞毒性检测试剂盒、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)-555 细胞增殖检测试剂盒、ROS 检测试剂盒、N-乙酰半胱氨酸 (N-acetyl-L-cysteine, NAC) (碧云天生物技术有限公司, 中国)。共聚焦高内涵成像系统 (Molecular Devices, 美国), 化学发光凝胶成像系统 (ProteinSimple, 美国), 多功能微孔板酶标仪 (BioTek Instruments, 美国), CO₂ 恒温培养箱 (Thermo Fisher, 美国)。

1.2 细胞培养

小鼠巨噬细胞系 RAW-ASC 购自 Invivogen (美国)。配制含体积分数为 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 高糖培养基, 将细胞置于 37 °C、5% (体积分数) CO₂ 培养箱内, 每 2~3 d 传代 1 次。取生长良好的对数期细胞进行后续实验。

1.3 细胞分组及处理

根据细胞焦亡分为激发和激活不同阶段的发生特点^[5], 本研究先以 LPS 诱导巨噬细胞使其进入激发阶段, 再以 SiO₂ 进行处理观察巨噬细胞焦亡激活状况, 其中在巨噬细胞焦亡激活阶段设置 ATP 细胞焦亡阳性对照组, 实验方案及分组如下: 将 RAW-ASC 巨噬细胞以 2×10^4 个·孔⁻¹ 的密度接种于 96 孔板中, 设空白组、LPS 组 ($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS)、纳米 SiO₂ 组 ($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS + $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 纳米 SiO₂)、微米 SiO₂ 组 ($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS + $750 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 微米 SiO₂) 和 ATP 组 ($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS + $3 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP)。除空白组外, 其他组均以含 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 的 DMEM 高糖培养基预处理 6 h 诱导细胞进入焦亡激发阶段, 而后加入 SiO₂ 或 ATP 继续培养 4 h。此外, 为抑制 NLRP3 表达, 在施加 LPS 干预前添加 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MCC950 预处理细胞 1 h; 为及时清除 SiO₂ 粉尘诱发的细胞内 ROS, 在施加 SiO₂ 干预前添加 $10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NAC 预处理细胞 30 min。

1.4 CCK-8 法检测细胞活力

按“1.3”步骤处理细胞后, 加入 CCK-8 试剂 (每孔 10 μL) 后于细胞培养箱内孵育 2 h, 使用多功能微孔板酶标仪在 450 nm 处检测光密度 (D) 值。

1.5 EdU 染色检测细胞增殖能力

按“1.3”步骤处理细胞后, 将 37 °C 预热的 2×EdU 工作液等体积加入 96 孔板中, 孵育 2 h, 按说明书步骤对细胞进行固定、通透和洗涤, 每孔加入 50 μL

Click 反应液, 室温避光孵育 30 min。吸除 Click 反应液, 洗涤细胞 3 次, 每孔加 1×Hoechst 33342 溶液 100 μL , 室温避光孵育 10 min, 置共聚焦高内涵成像系统拍摄, EdU 可将处于增殖状态的细胞标记为红色荧光。

1.6 试剂盒法检测细胞上清 LDH 水平

按“1.3”步骤处理细胞后, 使用多孔板离心机以 $400 \times g$ 离心 5 min。取各孔上清液 120 μL 分别加入到新的 96 孔板中, 每孔加入 60 μL LDH 工作液, 混匀, 室温避光孵育 30 min, 使用多功能微孔板酶标仪在 490 nm 处测定光密度值 D, 并以 620 nm 作为参考波长进行双波长测定。

1.7 Calcein AM/PI 荧光双染检测细胞破裂状况

按“1.3”步骤处理细胞后, 吸除培养液, 每孔加入 100 μL Calcein AM/PI 检测工作液, 37 °C 避光孵育 30 min, 置共聚焦高内涵成像系统进行拍摄, Calcein AM 被活细胞中的内源性酯酶水解生成不能通透细胞膜的 Calcein, 发绿色荧光; PI 染色细胞膜完整性被破坏的死细胞, 发红色荧光。

1.8 荧光探针法检测细胞内 ROS 水平

按“1.3”步骤处理细胞后, 吸除培养液, 每孔加入 100 μL 稀释好的二氯二氢荧光素-乙酰乙酸酯 (2',7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA), 37 °C 孵育 20 min, 以无血清细胞培养基洗涤细胞 3 次, 细胞内 ROS 将无荧光的 DCFH 氧化为有荧光的二氯荧光素 (dichlorofluorescein, DCF), 使用多功能微孔板酶标仪检测 DCF 荧光强度 (激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm)。

1.9 Western blotting 检测细胞焦亡相关蛋白表达

将 RAW-ASC 细胞以每孔 2×10^6 个的密度接种于 6 孔板中, 参考步骤“1.3”进行分组与处理后, 吸除培养液, 用 4 °C 预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次, 每孔加入 150 μL 含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 冰上裂解 3 min, 超声破碎, 离心, 按 BCA 蛋白检测试剂盒说明书步骤定量检测蛋白。采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 转膜, 加 5% (体积分数) 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 含 0.05% Tween20 的 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 一抗 4 °C 孵育过夜, 抗体稀释比例均为 1:2000。次日 TBST 洗涤 3 次后加入二抗 (1:3000), 室温孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次后用增强型化学发光试剂 (enhanced chemiluminescence, ECL) 化学发光法检测蛋白信号并显影, 用 Image J 1.52 软件对蛋白的相对表达水平进行定量分析。

1.10 统计学分析

使用 Excel 2019 汇总形成数据库, SPSS23.0 与

R3.6.3 软件进行统计分析。经检验符合正态分布且方差齐的计量资料以均数±标准差表示；多组比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD 检验；干预与否两组间比较采用两样本 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

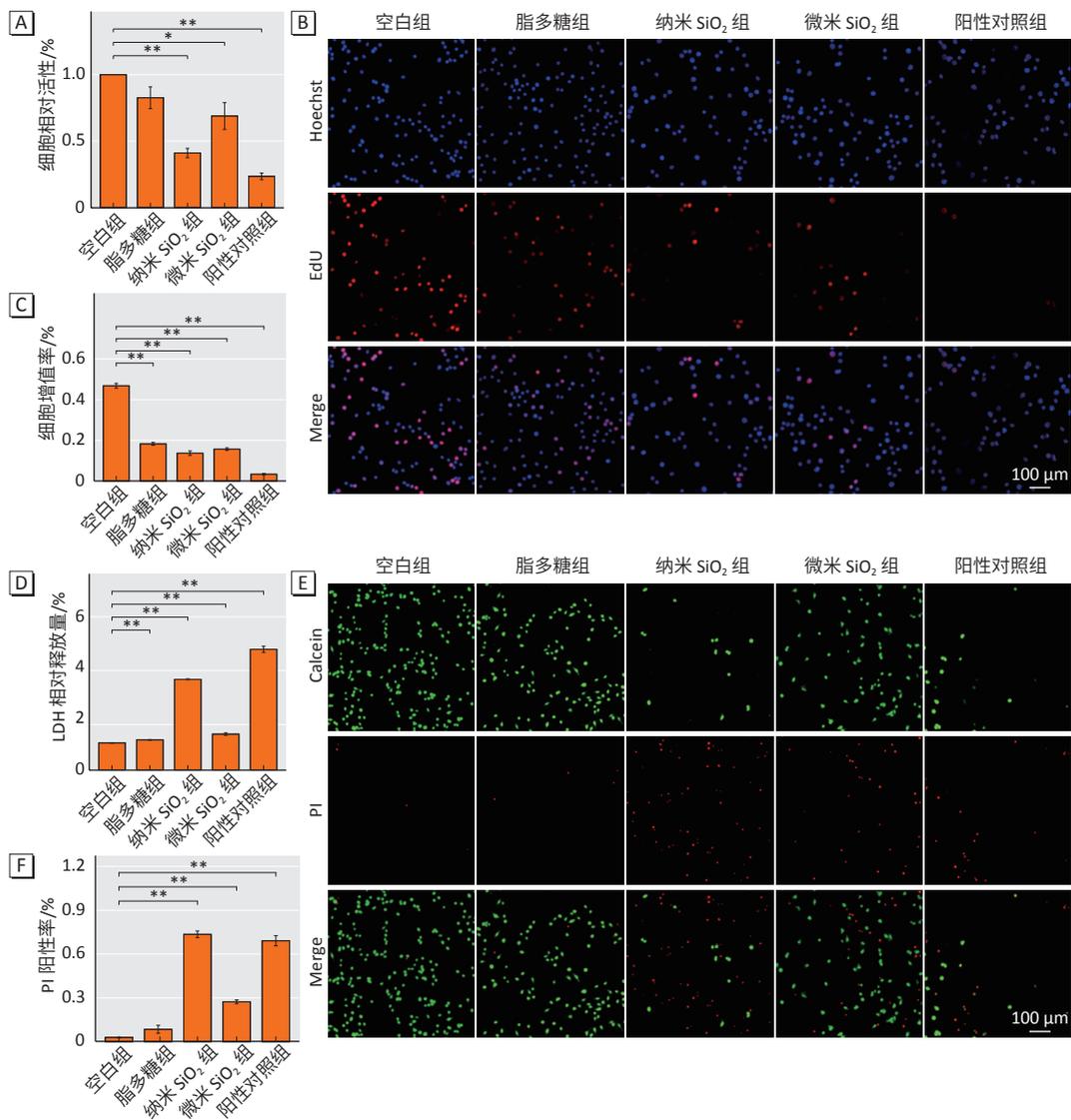
2.1 SiO₂ 粉尘对巨噬细胞活性及增殖能力的影响

CCK-8 结果显示，各组间细胞活性有差异 ($F=25.625, P<0.01$)；与空白组相比，纳米和微米 SiO₂ 及 ATP 处理使细胞活性降低至 40%、68%和 23% ($P<0.05$) (图 1A)。EdU 标记的红色荧光提示各组间细胞增殖水平差异有统计学意义 ($F=345.978, P<0.01$)，LPS、纳米

SiO₂、微米 SiO₂、ATP 处理使细胞增殖率降低为空白组的 39%、30%、33%和 7% (均 $P<0.01$) (图 1B、1C)。

2.2 SiO₂ 粉尘对巨噬细胞完整性的影响

各组间 LDH 释放水平差异有统计学意义 ($F=656.141, P<0.01$)；与空白组相比，纳米、微米 SiO₂ 及 ATP 处理均可上调巨噬细胞上清液 LDH 水平 (均 $P<0.01$)。 (图 1D)。Calcein AM/PI 荧光双染显示，各组间 PI 阳性率差异有统计学意义 ($F=205.259, P<0.01$)；SiO₂ 粉尘及 ATP 处理后，Calcein 着色活细胞数目降低，PI 阳性细胞占比升高 (均 $P<0.01$)，尤以 ATP 组和纳米 SiO₂ 组升高幅度最大；但 PI 阳性细胞比例在 LPS 组与空白组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 1E、1F。



[注] A: CCK-8 法检测细胞活力；B: EdU 染色显示细胞增殖水平，Hoechst 显示活细胞，EdU 显示增殖细胞，Merge 为 Hoechst 和 EdU 的合成图像；C: 细胞增殖水平的定量分析与比较；D: 细胞上清中 LDH 释放水平；E: Calcein AM/PI 染色显示细胞完整性，Calcein 显示完整细胞，PI 显示破裂细胞，Merge 为 Calcein 和 PI 的合成图像；F: PI 阳性率的定量分析与比较；B、E 使用共聚焦高内涵成像系统拍摄 ($\times 20$)。*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ 。

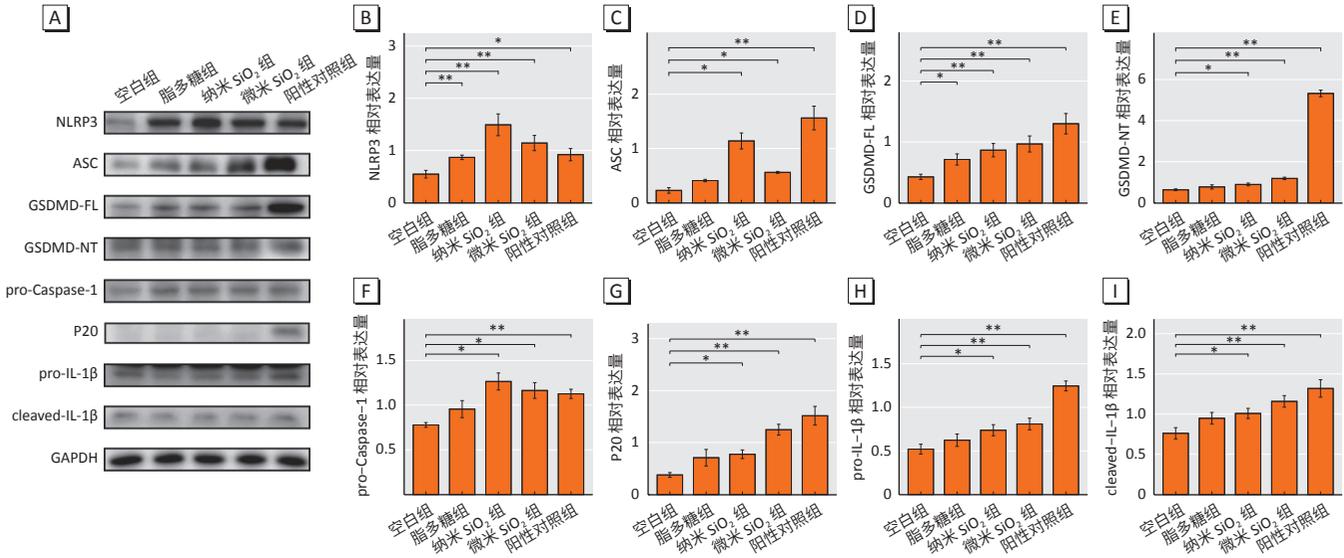
图 1 SiO₂ 粉尘对细胞活力、增殖能力及完整性的影响 ($n=6$)

Figure 1 Effects of SiO₂ dust on cell viability, proliferation, and integrity ($n=6$)

2.3 SiO₂ 粉尘诱导巨噬细胞发生焦亡

Western blotting 结果(图 2)显示, 各组间细胞焦亡相关标志 NLRP3($F=7.301$)、ASC($F=90.808$)、全长 GSDMD(gasdermin D-full length, GSDMD-FL)($F=5.158$)、GSDMD-NT($F=338.894$)、pro-Caspase-1($F=4.014$)、P20($F=9.656$)、pro-IL-1 β ($F=19.521$)、cleaved-IL-1 β ($F=7.187$)

的蛋白表达水平差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与空白组相比, SiO₂ 粉尘与 ATP 处理会使上述蛋白表达水平升高; 其中 ATP 组除 NLRP3 和 pro-Caspase-1 外其他蛋白表达水平最高, 纳米和微米 SiO₂ 组次之($P < 0.05$); LPS 组除 NLRP3 和 GSDMD-FL 外, 其他蛋白表达水平均差异无统计学意义($P > 0.05$)。



[注] A: Western blotting 电泳图; B-I: 蛋白的相对表达水平。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 。

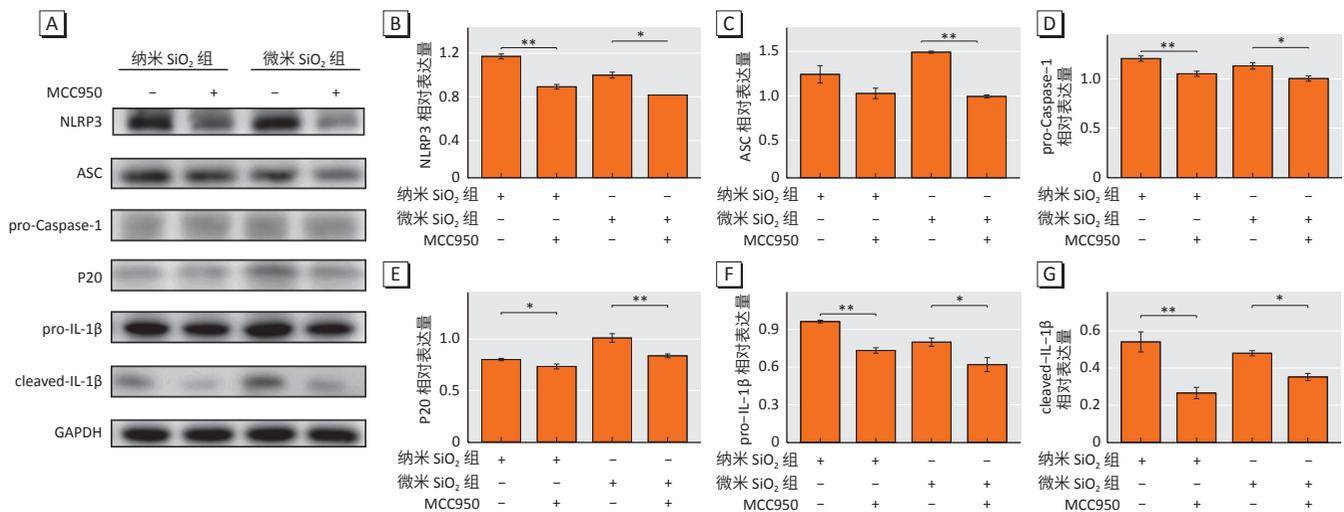
图 2 SiO₂ 粉尘处理的巨噬细胞内焦亡相关蛋白表达水平 ($n=3$)

Figure 2 Expression levels of pyroptosis-related proteins in silica-exposed macrophages ($n=3$)

2.4 SiO₂ 粉尘诱导的巨噬细胞焦亡呈现 NLRP3 依赖性

通过 MCC950 抑制 NLRP3 表达, 与 MCC950 未处理组相比, SiO₂ 粉尘干预后 NLRP3、ASC、pro-Caspase-

1、P20、pro-IL-1 β 、cleaved-IL-1 β 蛋白表达水平下降 ($P < 0.05$); 其中, 纳米 SiO₂ 组 ASC 蛋白表达水平虽下降, 但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 3。



[注] A: Western blotting 电泳图; B-G: 蛋白的相对表达水平。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 。

图 3 MCC950 抑制 NLRP3 后 SiO₂ 粉尘处理的巨噬细胞内焦亡相关蛋白表达水平 ($n=3$)

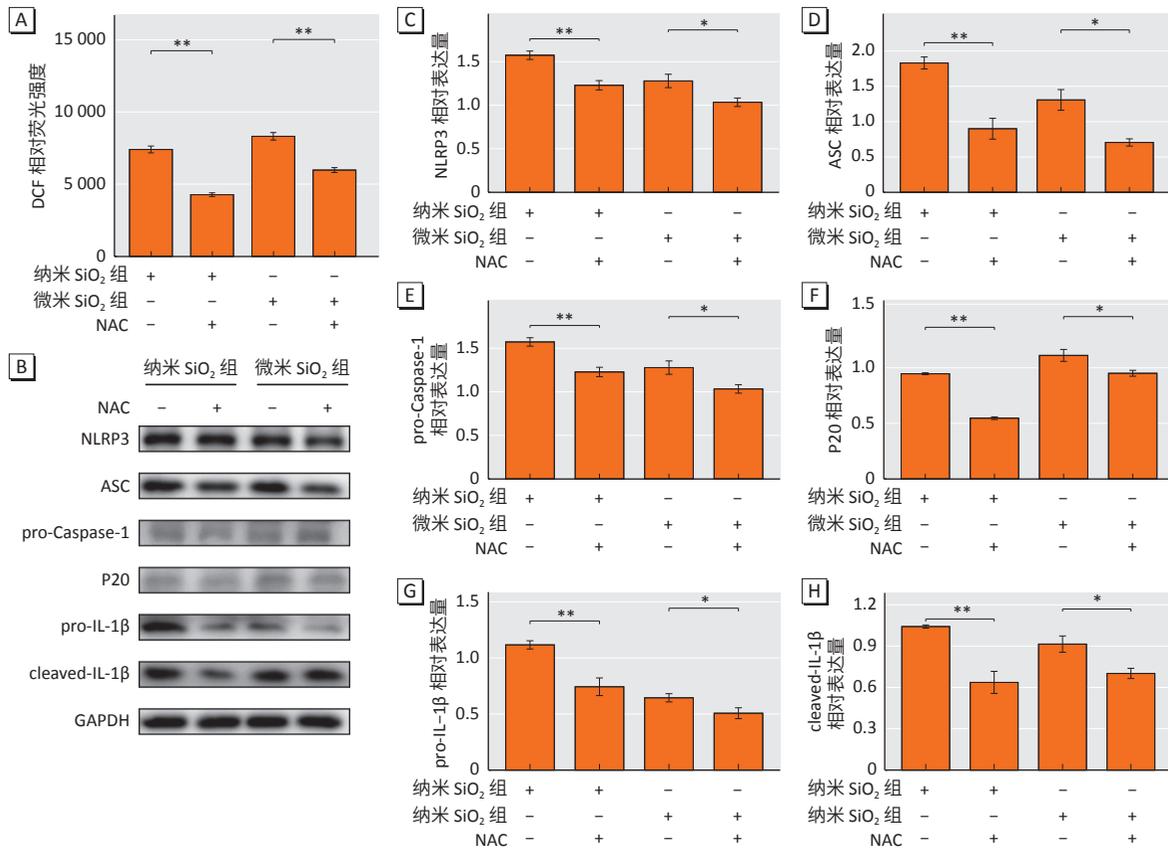
Figure 3 Expression levels of pyroptosis-related proteins in silica-exposed macrophages after inhibiting NLRP3 by MCC950 ($n=3$)

2.5 ROS 促进 SiO₂ 粉尘诱导的巨噬细胞焦亡

与空白组相比, 纳米和微米 SiO₂ 处理巨噬细胞后

ROS 水平升高($P < 0.05$)。使用 ROS 清除剂 NAC 对细胞进行预处理, 纳米 SiO₂ 组和微米 SiO₂ 组细胞内 ROS

水平下降($P < 0.05$)；Western blotting 结果显示，巨噬细胞焦亡标志 NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、P20、pro-IL-1 β 、cleaved-IL-1 β 蛋白表达水平均降低($P < 0.05$)。见图 4。



[注] A: DCFH-DA 荧光探针法检测细胞内 ROS 含量, DCF 荧光可反应细胞内 ROS 水平; B: Western blotting 电泳图; C~H: 蛋白的相对表达水平。
*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 。

图 4 使用 ROS 清除剂 NAC 后 SiO₂ 粉尘处理的巨噬细胞内焦亡相关蛋白水平 (n=3)

Figure 4 Expression levels of pyroptosis-related proteins in silica-exposed macrophages after eliminating ROS by NAC (n=3)

3 讨论

据报道, SiO₂ 粉尘可引起小胶质细胞、J774 A.1 巨噬细胞等细胞发生焦亡^[6]。SiO₂ 粉尘类似病原相关分子模式, 可被巨噬细胞表面的 PRRs 识别, 激发级联信号, 通过核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 等转录因子促进基因转录, 编码细胞因子、干扰素等。此外, 还会激活 NLRP3 炎性小体, 此过程中活化的 Caspase-1 切割炎性细胞因子前体及 GSDMD, 后者得到的 P30 片段嵌入细胞膜形成膜孔, 使细胞内炎性细胞因子外释, 细胞内外渗透压改变, 最终导致细胞肿胀、破裂, 因此 GSDMD 膜孔形成和炎性细胞因子外释可作为细胞焦亡的标志性事件^[7-8]。研究证实, 经典细胞焦亡可分为激发和激活两阶段, 而 LPS 除了介导 Caspase-1 依赖的经典细胞焦亡的激发阶段外, 还存在非经典途径, 即 LPS 可直接激活人体细胞内的 Caspase-4/5 或小鼠体内的 Caspase-11, 进而诱导细胞焦亡^[9]。因此, 鉴于细胞焦亡分为激发和激活不同阶段的特点, 本研究分

别施加 LPS 和 SiO₂ 以观察其诱导巨噬细胞激发和激活状况。此外, LPS 与 ATP 共处理可激活 NLRP3 炎性小体, 诱导细胞焦亡, 是公认的细胞焦亡阳性对照^[10]。

本研究中, 经不同粒径 SiO₂ 粉尘及 ATP 处理后, 巨噬细胞活力下降; 细胞增殖能力受到抑制; 细胞释放的 LDH 含量增加, 其中 ATP 组最高, 纳米 SiO₂ 组与之接近; 在 Calcein AM/PI 荧光双染中, SiO₂ 粉尘及 ATP 处理均上调 PI 阳性细胞占比; 上述实验结果说明 SiO₂ 粉尘可抑制细胞活力和增殖能力, 诱导细胞裂解与死亡。Western blotting 结果显示, 暴露于 SiO₂ 粉尘及 ATP 会使细胞内焦亡标志 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 表达水平升高, 结合细胞活力、增殖能力与完整性变化, 提示 SiO₂ 粉尘会激活 NLRP3 炎性小体, 形成 GSDMD 膜孔并释放炎性细胞因子 IL-1 β , 诱导巨噬细胞焦亡。此外, LPS 处理亦会降低细胞增殖率, 上调 NLRP3 表达水平, 但并未使细胞内 GSDMD-NT 和 IL-1 β 表达水平升高, 说明 LPS 处理的细胞中未形

成 GSDMD 膜孔, 同时也未促进炎性细胞因子释放, 即 LPS 未能激活巨噬细胞焦亡。

NLRP3 炎性小体作为目前研究较深入的一种炎性小体, 在细胞焦亡过程中发挥重要作用, 并且参与炎症和代谢性疾病等病程发展^[11-12]。本研究中, 抑制 NLRP3 表达可有效抑制细胞焦亡, 阻止炎性细胞因子释放, 说明 NLRP3 的激活在细胞焦亡过程中发挥重要作用。

研究发现, 大部分 NLRP3 炎性小体激活剂都可通过刺激线粒体促进线粒体呼吸作用和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶产生 ROS^[13]。正常情况下, NLRP3 存在于胞质和内质网中, 但在某些刺激下, NLRP3 会转移至线粒体并增加, 促使线粒体 ROS 生成, 过量 ROS 超出机体清除能力, 诱导 NLRP3 炎性小体组装活化^[14]。与 Zou 等^[15]的研究报道类似, 本研究结果显示, SiO₂ 粉尘暴露会诱导 RAW-ASC 巨噬细胞内 ROS 水平升高, 以 NAC 处理细胞, 不仅降低了 ROS 水平, 还使细胞内 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达水平下降, 说明过量 ROS 可激活 NLRP3 炎性小体, 诱导细胞发生焦亡, 清除 ROS 可降低细胞焦亡水平。

然而, 本研究还存在一定不足之处: 研究仅使用 MCC950 对 NLRP3 的表达进行抑制, 未能观察到阻断 NLRP3 后巨噬细胞焦亡状况, 因此, 进一步的研究需要考虑敲除 NLRP3 后巨噬细胞焦亡水平变化。

综上所述, SiO₂ 粉尘暴露可上调 RAW-ASC 巨噬细胞内的 ROS 水平, 诱导 NLRP3 依赖的巨噬细胞焦亡, 促进炎性细胞因子 IL-1 β 释放。本研究结果可为探索巨噬细胞焦亡机制及相关疾病预防和临床诊疗提供新的思路和科学依据。

参考文献

[1] GEISER M. Update on macrophage clearance of inhaled micro-

- nanoparticles[J]. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 2010, 23(4): 207-217.
- [2] WYNN TA, RAMALINGAM TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease[J]. *Nat Med*, 2012, 18(7): 1028-1040.
- [3] JEANNIN P, JAILLON S, DELNESTE Y. Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells[J]. *Curr Opin Immunol*, 2008, 20(5): 530-537.
- [4] D'AUTRÉAUX B, TOLEDANO MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(10): 813-824.
- [5] CHANG YY, JEAN WH, LU CW, et al. Nicardipine inhibits priming of the NLRP3 inflammasome via suppressing LPS-induced TLR4 expression[J]. *Inflammation*, 2020, 43(4): 1375-1386.
- [6] DU Q, GE D, MIRSHAFIEE V, et al. Assessment of neurotoxicity induced by different-sized Stöber silica nanoparticles: induction of pyroptosis in microglia[J]. *Nanoscale*, 2019, 11(27): 12965-12972.
- [7] TAN S, CHEN S. The mechanism and effect of autophagy, apoptosis, and pyroptosis on the progression of silicosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 8110.
- [8] LAMKANFI M, DIXIT VM. Inflammasomes and their roles in health and disease[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2012, 28: 137-161.
- [9] SHI J, ZHAO Y, WANG Y, et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS[J]. *Nature*, 2014, 514(7521): 187-192.
- [10] SHEN R, YIN P, YAO H, et al. Punicalin ameliorates cell pyroptosis induced by LPS/ATP through suppression of ROS/NLRP3 pathway[J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 711-718.
- [11] LEE S, SUH GY, RYTER SW, et al. Regulation and function of the nucleotide binding domain leucine-rich repeat-containing receptor, pyrin domain-containing-3 inflammasome in lung disease[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, 54(2): 151-160.
- [12] SOHN SH, LEE JM, PARK S, et al. The inflammasome accelerates radiation-induced lung inflammation and fibrosis in mice[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2015, 39(2): 917-926.
- [13] BRUCHARD M, MIGNOT G, DERANGÈRE V, et al. Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the NLRP3 inflammasome and promotes tumor growth[J]. *Nat Med*, 2013, 19(1): 57-64.
- [14] KIM YK, KOPPULA S, SHIM DW, et al. Inhibitory effect and mechanism of *Arctium lappa* extract on NLRP3 inflammasome activation[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 6346734.
- [15] ZOU Y, LUO X, FENG Y, et al. Luteolin prevents THP-1 macrophage pyroptosis by suppressing ROS production via Nrf2 activation[J]. *Chem Biol Interact*, 2021, 345: 109573.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 陈姣, 丁瑾瑜)