

张行行,赵麓,孙欠欠,等. PM2.5暴露对大鼠心脏功能及NLRP3炎性小体表达的影响[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(4): 445-453.

Zhang HH, Zhao L, Sun QQ, et al. Effects of PM2.5 exposure on cardiac functions and the NLRP3 inflammasome in rats and its mechanism [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(4): 445-453.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.04.004

PM2.5暴露对大鼠心脏功能及NLRP3炎性小体表达的影响

张行行¹,赵麓¹,孙欠欠¹,赵安东¹,周甜雨¹,王川^{1,2},刘继平^{1,2},王斌^{1,2*}

(1. 陕西中医药大学,陕西 咸阳 712046;2. 陕西省中医药管理局中药药效机制与物质基础重点实验室,陕西 咸阳 712046)

【摘要】 目的 探究气道吸入不同浓度PM2.5混悬液是否能激活大鼠心肌组织NLRP3炎性小体引起心脏功能的损伤,为寻找相关药物干预提供参考。**方法** SD大鼠随机分为对照组,低(7.5 mg/kg)、中(15 mg/kg)、高(30 mg/kg)剂量染毒组,每组7只。染毒组通过非暴露式气管滴注相应剂量混悬液(1 mL/kg),6 d 1次,持续2个月,对照组大鼠滴注等量生理盐水,滴注期间每日记录大鼠生理状况。末次滴注完成后,禁食12 h,1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉,以心肌组织病理切片、心肌细胞凋亡状况、心肌谱酶变化反应心脏功能状况;以心肌组织Bcl-2、Bax蛋白;NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白及mRNA表达,血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-18表达水平反应心肌组织NLRP3炎性小体的活化状况。**结果** 滴注不同剂量PM2.5混悬液后,各染毒组大鼠不同程度毛色变黄、无光泽,活动减少,饮食、体重无明显影响,心肌组织出现不同程度的横纹断裂、细胞减少、排列无规则、细胞核固缩、水肿的现象。与对照组相比,染毒组大鼠心肌组织中CK、LDH、AST水平,Bcl-2、IL-1 β 蛋白表达、NLRP3、IL-1 β 、Caspase-1 mRNA表达,血清中IL-1 β 、IL-6、IL-18、TNF- α 水平均显著升高,Bax蛋白表达、Bcl-2/Bax值显著降低;中剂量组和高剂量组大鼠心肌细胞凋亡显著增加,NLRP3、Caspase-1蛋白表达显著升高;低剂量组大鼠心肌组织细胞凋亡,NLRP3、Caspase-1蛋白表达与对照组无显著性差异。**结论** PM2.5暴露可造成心肌细胞结构损伤、激活NLRP3炎性小体,促进炎症因子和凋亡蛋白表达,引起心肌组织功能的损伤。

【关键词】 PM2.5;NLRP3;心肌损伤;气管滴注;细胞凋亡

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 04-0445-09

Effects of PM2.5 exposure on cardiac functions and the NLRP3 inflammasome in rats and its mechanism

ZHANG Hanghang¹, ZHAO Lu¹, SUN Qianqian¹, ZHAO Andong¹, ZHOU Tianyu¹,
WANG Chuan^{1,2}, LIU Jiping^{1,2}, WANG Bin^{1,2*}

(1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China. 2. Key Laboratory of Pharmacodynamic Mechanism and Material Basis of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046)

Corresponding author: WANG Bin. E-mail: wangbin812@126.com

【Abstract】 Objective To investigate whether airway inhalation of a PM2.5 suspension at various concentrations activates the NLRP3 inflammasome in rat myocardial tissue to induce cardiac damage and provide a reference to research

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81473385),陕西中医药大学学科创新项目(2019-YL13)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(81473385), Disciplinary Innovation Project of Shaanxi University of Chinese Medicine (2019-YL13).

【作者简介】 张行行(1996—),男,在读硕士研究生,研究方向:心脑血管疾病药理学。Email:1453819538@qq.com

【通信作者】 王斌(1978—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:心脑血管疾病药理学。Email:wangbin812@126.com

drug treatments. **Methods** SD rats were randomly divided into a control group (Sham) and low (Low, 7.5 mg/kg), middle (Middle, 15 mg/kg), and high (High, 30 mg/kg) exposure groups with seven in each group. The exposure groups were instilled with the corresponding dose of suspension (1 mL/kg) through a non-exposed trachea once every 6 days for 2 months, and rats in the Sham group were instilled with the same amount of normal saline. Physiological status was recorded daily. After the last infusion, the rats were fasted for 12 hours and then anesthetized with 1% sodium pentobarbital (50 mg/kg). The cardiac function status was reflected by pathological sections of myocardial tissue, myocardial cell apoptosis, and changes in myocardial enzymes. Bcl-2 and Bax protein expression, and NLRP3, Caspase-1, and IL-1 β protein and mRNA expression in myocardial tissue, and serum IL-1 β , IL-6, TNF- α , and IL-18 levels reflected the NLRP3 inflammasome activation status in myocardial tissue. **Results** After instillation of various doses of PM2.5 suspension, the rats in exposure groups became yellow, dull, and had decreased activity to varying degrees. There was no significant effect on diet or body weight. Decreased, irregular arrangement, nuclear pyknosis, edema. Compared with the Sham group, CK, LDH, and AST levels in myocardial tissue, Bcl-2 and IL-1 β protein expression, NLRP3, IL-1 β , and Caspase-1 mRNA expression, serum of IL-1 β and IL-6. IL-18 and TNF- α levels were significantly increased, Bax protein expression, and the Bcl-2/Bax ratio were decreased significantly. Cardiomyocyte apoptosis in Middle and High groups was significantly increased, and NLRP3 and Caspase-1 protein expression was significantly increased. Significantly increased; myocardial tissue apoptosis in the Low group and NLRP3 and Caspase-1 protein expression were not significantly different from those in the Sham group. **Conclusions** PM2.5 exposure causes structural damage in myocardial cells, activates the NLRP3 inflammasome, promotes expression of proinflammatory factors and apoptotic proteins, and disrupts myocardial tissue functions.

【Keywords】 PM2.5; NLRP3; myocardial injury; tracheal instillation; apoptosis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

大气 PM2.5, 主要由细菌、矿物粉尘、金属离子和有机物等组成, 粒径极小, 可通过鼻腔黏膜组织经呼吸道到达肺组织, 粒径较大成分堆积在肺泡表面, 引起肺损伤和通透性改变, 粒径 $\leq 0.1 \mu\text{m}$ 的超微颗粒物可透过肺泡屏障, 进入血液, 随肺循环流向心脏, 继而引起严重的心血管疾病^[1]。心脏与肺关系密切, 一方面, 心肺位置毗邻, 《难经》记载“心肺独居膈之上”, 与现代解剖学认识一致^[2]; 另一方面, 心肺经络相通, 病理相关, 《黄帝内经》记载“心肺脉络相同, 肺主气, 脉朝百脏; 心主血, 为主神之官, 血气交错, 才能颐养全身”, 更加证实了心肺之间相辅相成, 互相维持生理的平衡^[3]。病理学相关研究也证明, 肺主气功能影响心主血功能, 肺病大都累及心脏, 故 PM2.5 经肺进入全身循环后必然会引起心脏损伤。多项临床调查发现, 心血管科住院率和死亡率与大气中 PM2.5 浓度成正比, 而心血管疾病中 75% 是由于心脏损伤引起的^[4]。炎症反应是 PM2.5 损伤心脏的主要原因之一, 然而其具体机制尚未明确。因此, 明确 PM2.5 损伤心脏机制以寻求药物干预, 对预防该类疾病有非常重要意义。

NLRP3 炎性小体是由 NLRP3 受体、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC) 和半胱天冬酶 1 前体 (pro-

Caspase-1) 3 部分组成的复合物。NLRP3 的 LRR 端可在多种内外源性因素刺激下活化, 并募集 Caspase-1, 经过一系列的募集与剪切, 刺激炎症反应上游白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-18 (IL-18) 等炎症因子的成熟和释放, 进一步激活下游炎症因子和凋亡蛋白的表达^[5]。目前, 对 PM2.5 是否能激活机体 NLRP3 炎性小体的研究, 主要集中在对肺、脾的研究, 鲜见对心肌组织的相关研究, PM2.5 是否能激活大鼠心脏 NLRP3 炎性小体, 引起心脏损伤尚不明确。因此, 本研究以气管滴注不同浓度 PM2.5 混悬液进行染毒, 探讨 PM2.5 对心脏功能及 NLRP3 炎性小体活化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

8 周龄 SPF 级 SD 大鼠 28 只, 雄性, (220 ± 20) g, 由成都达硕实验动物有限公司【SCXK(川)2020-030】提供, 饲养于陕西中医药大学实验动物中心【SYXK(陕)2021-001】。保持饲养室室温 25°C , 湿度 $55\% \pm 5\%$, 食物与饮水充足, 正常昼夜交替。实验过程中对动物的处置符合实验动物伦理相关规定和管理条例 (SUCMDL20220601002)。

1.1.2 主要试剂与仪器

苏木素-伊红(HE)染液(南昌雨露实验器材有限公司, G1001); 乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒(南京建成生物科技有限公司, A020-1-2、A032-1-1、20160421); NOD 样受体热蛋白结构域 3(NLRP3); 白细胞介素-1 β (IL-1 β)抗体(博士德生物工程有限公司, BA3677、BS-0812R); 半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1)、Bcl-2、Bax、HRP-Goat anti mouse 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司, 22915-1-AP、26593-1-AP、50599-2-Ig、SA00001-1); HRP-Goat anti Rabbit (jackson, 111-035-003); 白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 18(IL-18)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) ELISA 试剂盒(江苏酶免实业有限公司, 0047R2、0190R2、0180R2、0194R2); 50 $\times$ TAE、RNA 琼脂糖、Buffer(碧云天生物技术有限公司); 提取及转录相关试剂盒(索莱宝); CHCl₃、异丙醇、C₂H₅OH 溶剂(国药集团化学试剂有限公司, 667-66-3、80109218、10009218); 4S GelRed 核酸染料(生工生物工程有限公司, A616697)。

TH-1000C II 智能大流量空气颗粒采样器(武汉市天虹有限责任公司, 中国); DNP-9052 恒温箱(上海精宏试验设备有限公司, 中国); PW-812 洗板机(深圳市汇松科技发展有限公司, 中国); Multiskan FC 酶标仪(赛默飞); XH-C 漩涡混合器(江苏大唐医疗器械有限公司, 中国); Scientz-10N 型真空冷冻干燥机(宁波新艺生物科技股份有限公司, 中国); TKY-TKB 摊片烤片机(湖北泰维科技实业有限公司, 中国); RM2235 石蜡切片机(LEICA, 德国); OLUMPUS BX53 光学显微镜(日本); XM-P102H 型超声波清洗机(昆山超声仪器有限公司, 中国); UPHW-II-90T 超纯水机(成都超纯科技有限公司, 中国); BIONEER Exicycler96 荧光定量 PCR 仪(韩国); SH01D 高速离心机(上海知信实验仪器技术有限公司, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 采集 PM2.5 颗粒与染毒溶液配制

将 PM2.5 颗粒采集器固定于陕西中医药大学大四号教学楼楼顶空旷处, 四周无遮挡物, 楼高 6 层, 约 20 m。此次收集采用的是玻璃纤维膜, 通过采集器将 PM2.5 颗粒附着于玻璃纤维膜上, 将膜裁剪为 1 cm² 方块, 置于烧杯中, 加入纯水没过, 低温超

声 60 min, 洗脱滤膜, 1800 尼龙滤网过滤除去不溶性大颗粒, 滤液真空冷冻干燥 3 d, 转移至 60 $^{\circ}$ C 烘箱继续干燥 24 h 后, 洁净台分装至无菌离心管, -20 $^{\circ}$ C 保存。滴注前, 称取适量溶于生理盐水, 超声震荡 15 min, 注意现用现配。

1.2.2 动物分组及染毒

适应性饲养结束后, 采用随机数字表法将 28 只雄性 SD 大鼠分为 4 组: 对照组、高剂量组(30 mg/kg)、中剂量组(15 mg/kg)和低剂量组(7.5 mg/kg), 每组 7 只, 采用非暴露式气管滴注 PM2.5 混悬液进行染毒, 对照组滴注等量生理盐水, 每 6 d 1 次, 共 10 次, 滴注体积为 1 mL/kg。PM2.5 染毒剂量与时间参考 Zhang 等^[6]研究结果。染毒期间观察各组大鼠毛发、精神、饮食、活动状况。模型周期结束后, 禁食 12 h, 1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉, 腹主动脉取血处死, 摘取心脏组织, 用预冷的生理盐水清洗干净, 部分固定于 4%多聚甲醛, 另一部分 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 HE 染色观察心肌组织病理学变化

大鼠取血处死后, 剪开胸腔, 摘取心脏组织, 用预冷的生理盐水清洗干净, 吸水纸吸干表面多余水分, 浸于 4%多聚甲醛溶液中, 固定后, 经脱水、包埋、切片、脱蜡、染色、制片, 显微镜下选取固定位置拍照, 观察不同心肌组织病理损伤。

1.2.4 比色法检测心肌组织中心肌酶谱水平

从低温冰箱中取出心肌组织, 冰上消解后, 预冷的组织剪剪取适量, 按 1:5 与生理盐水匀浆, 3500 r/min 低温离心 10 min($r=12$ cm), 取上清液, 按照试剂盒说明书步骤分别检测心肌组织中 CK、LDH、AST 水平。

1.2.5 TNUEL 法检测心肌组织细胞凋亡

前处理与 1.2.3 一致, 切片经乙醇脱蜡、水化后, 与蛋白酶 K 共孵育, 37 $^{\circ}$ C, 20 min, 漂洗后加过氧化物酶封闭 30 min, 加入 TUNEL 反应液 50 μ L, 暗湿盒反应(37 $^{\circ}$ C, 1 h), PBS 再次洗涤后, 加入 DAPI 染液, 封闭小室 37 $^{\circ}$ C 避光反应 30 min, 加入抗荧光素淬灭剂, 封片, 显微镜下观察荧光强度, 拍照。利用 Image J 软件分析, 测定累积平均荧光强度。

1.2.6 ELISA 检测血清中 IL-1 β 、IL-6、IL-18、TNF- α 表达

血液样本常温静置 30 min, 待血清与血浆自然分层后, 3500 r/min 离心 10 min, 分装至 4 $^{\circ}$ C 预冷的离心管, 按操作说明测定各指标含量。

1.2.7 Western Blot 检测心肌组织 NLRP3 炎性小体和凋亡蛋白表达

利用 RIPA 裂解液提取蛋白并测定浓度,将蛋白样品上样、转膜、封闭后,分别加入内参和目的蛋白一抗,冰箱过夜,第 2 天 PBS 洗涤,再加二抗,孵育、洗膜,曝光、拍照,用 Image J 软件计算灰度值。

1.2.8 Real time PCR 检测心肌组织 NLRP3、IL-1 β 、Caspase-1 mRNA 表达

取心肌组织匀浆 80 mg,加入 1 mL TriQuick Reagent 提取总 RNA,将 RNA 转录为 cDNA,再与 cDNA 2 μ L,上下游引物各 1 μ L,ddH₂O 补至 10 μ L 体系,进行 qPCR 扩增:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,94 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,45 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。根据扩增曲线溶解曲线,采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 法计算分析各 mRNA 相对表达。所有引物由江西阿普斯戴尔生物科技有限公司设计合成,各引物序列见表 1。

表 1 引物序列信息

Table 1 Primer sequence information	
基因 Gene	引物序列 Prime sequence
NLRP3	5'-GGGCGCTTTTAGTGTAGGGT-3'
	5'-CCCATCAGGTCACCAAGAGG-3'
IL-1 β	5'-ACTATGGCAACTGTCCCTGAAC-3'
	5'-GTGCTTGGGTCCTCATCCTG-3'
Caspase-1	5'-ACCCACTCGTACACGTCTTG-3'
	5'-AGGTCAACATCAGCTCCGAC-3'
Actin	5'-GAAGATCAAGATCATTGCTCC-3'
	5'-TACTCTGCTTGCTGATCCA-3'

1.3 统计学分析

TNUEL 染色采用 Image J 软件分析,所有实验

数据采用 SPSS 26.0 软件进行分析处理,所得结果以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用单因素方差分析比较组间数据;两两比较,数据方差齐用 LSD 法,方差不齐用 Tamhane' T2 法, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 PM2.5 对大鼠心肌组织病理形态学变化的影响

染毒过程中,对照组大鼠生理活动正常,无明显病理表现,但解剖时,肺组织呈现部分水肿现象,染毒组大鼠不同程度的毛色暗黄、呼吸沉浮伴有咳嗽,时见大鼠有抓挠颈部动作,性情暴躁,抓取过程中表现处明显的抵抗现象,解剖时,肺组织有明显水肿、PM2.5 颗粒物堆积、病变,且随染毒剂量的增加,上述现象明显加重。各组 HE 染色结果显示,对照组大鼠心肌细胞排列整齐、密集、规整,纹状清晰,无明显病理改变;低剂量组和中剂量组大鼠心肌细胞横纹间隙变大,排列变得不规整,少量炎性细胞浸润;高剂量组大量大鼠心肌细胞水肿,大量炎性细胞浸润,横纹断裂,走向不规整,组织坏死严重(见图 1)。

2.2 不同浓度 PM2.5 对心肌组织 CK、LDH 和 AST 蛋白表达的影响

与对照组相比,低剂量组、中剂量组和高剂量组心肌组织 CK、LDH、AST 水平均显著升高 ($P < 0.05$),且与染毒剂量呈正相关(见图 2)。

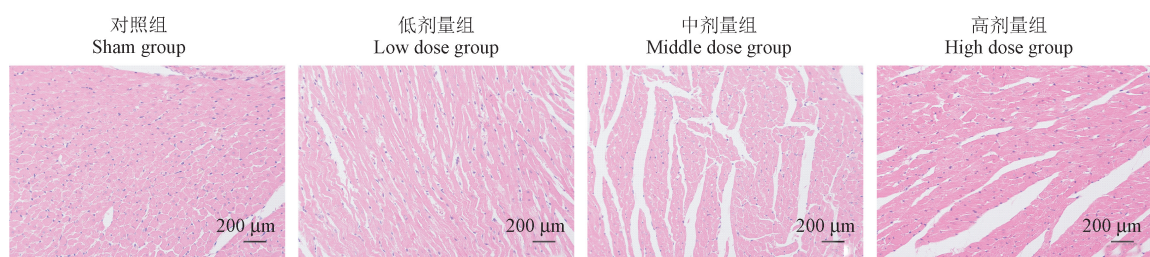


图 1 不同浓度 PM2.5 对大鼠心肌组织病理变化的影响 ($n = 3$)

Figure 1 Effects of different concentrations of PM2.5 on the pathological changes of rat myocardial tissue ($n = 3$)

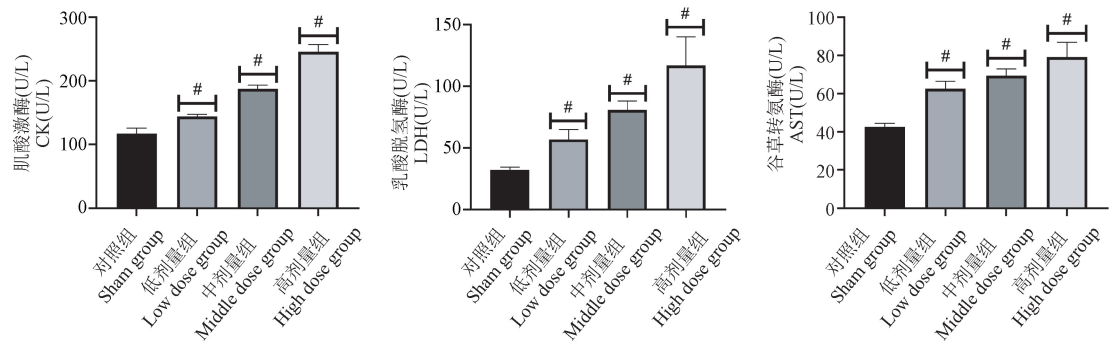
2.3 不同浓度 PM2.5 对大鼠心肌细胞凋亡的影响

对心肌组织进行 TUNEL 染色,红色荧光代表凋亡细胞,蓝色荧光代表正常细胞核。结果显示,与对照组平均荧光强度相比,中剂量组、高剂量组平均红色荧光强度显著升高 ($P < 0.05$),低剂量组与对照组平均荧光强度无显著性差异 ($P > 0.05$)。提示心肌

细胞凋亡程度与染毒浓度呈正相关(见图 3)。

2.4 不同浓度 PM2.5 对血清中 IL-1 β 、IL-6、IL-18 和 TNF- α 表达的影响

与对照组相比,染毒组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、IL-18 和 TNF- α 水平均显著升高 ($P < 0.05$),且与染毒剂量呈正相关,提示机体炎症反应增加(见图 4)。



注:滴注 2 个月后,与对照组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。(下图同)
图 2 不同浓度 PM2.5 对心肌组织 CK、LDH 和 AST 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Note. After 2 months of instillation, compared with the sham group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 2 Effects of different concentrations of PM2.5 on the contents of CK, LDH and AST in myocardial tissue($\bar{x} \pm s, n = 5$)

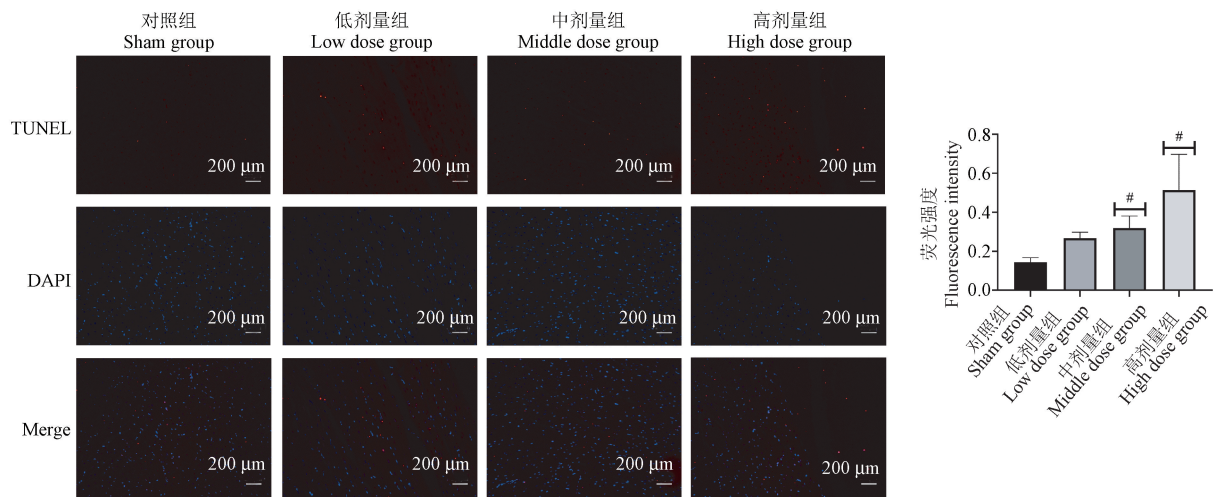


图 3 不同浓度 PM2.5 对心肌细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Figure 3 Effects of different concentrations of PM2.5 on cardiomyocyte apoptosis($\bar{x} \pm s, n = 5$)

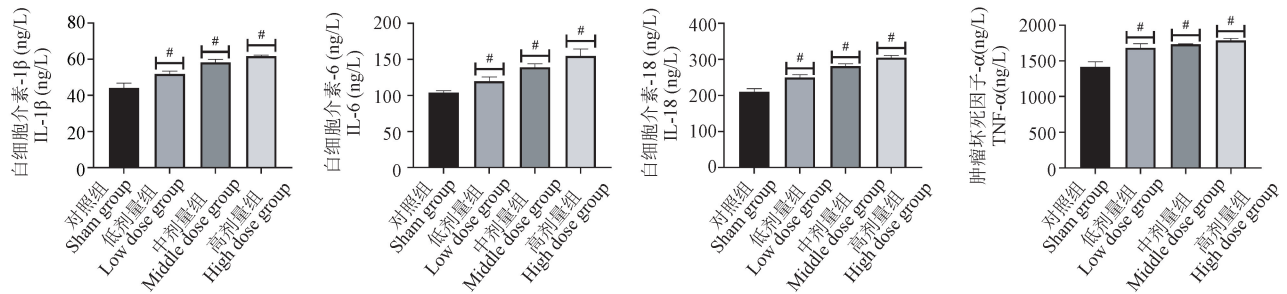


图 4 不同浓度 PM2.5 对血清中 IL-1β、IL-6、IL-18 和 TNF-α 的影响($\bar{x} \pm s, n = 7$)
Figure 4 Effects of different concentrations of PM2.5 on the expressions of IL-1β、IL-6、IL-18 and TNF-α in serum($\bar{x} \pm s, n = 7$)

2.5 不同浓度 PM2.5 对心肌组织 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响

根据图 5 统计图结果可知,与对照组相比,染毒

组大鼠心肌组织 Bcl-2 表达、Bcl-2/Bax 值显著下降($P < 0.05$),Bax 蛋白表达显著升高($P < 0.05$)(见图 5)。

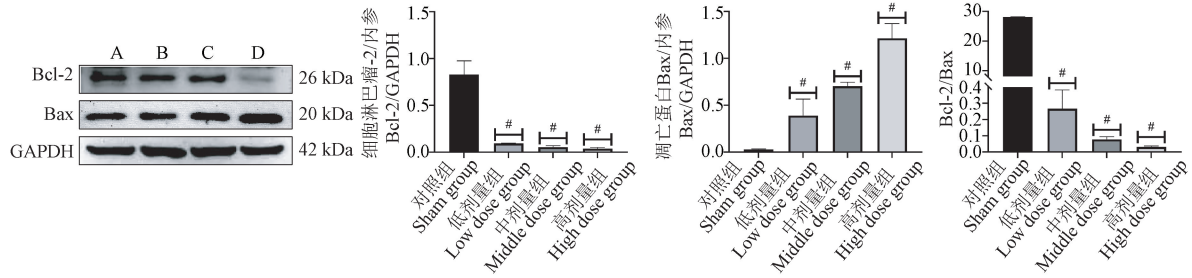
2.6 不同浓度 PM2.5 对心肌组织 NLRP3、IL-1 β 、Caspase-1 蛋白表达的影响

根据图 6 统计图结果可知,与对照组相比较,中剂量组、高剂量组大鼠心肌组织 NLRP3、IL-1 β 、Caspase-1 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.05$);低剂量组大鼠心肌组织 IL-1 β 、Caspase-1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$),NLRP3 蛋白表达无显著性差异 ($P >$

0.05) (见图 6)。

2.7 不同浓度 PM2.5 对心肌组织 NLRP3、IL-1 β 、Caspase-1 mRNA 表达的影响

与对照组相比,各染毒组心肌组织 NLRP3、IL-1 β 、Caspase-1 mRNA 表达均显著升高 ($P < 0.05$),且与染毒浓度呈正相关,这与 NLRP3、IL-1 β 、Caspase-1 蛋白表达结果一致 (见图 7)。



注:A:对照组;B:低剂量组;C:中剂量组;D:高剂量组。(下同)

图 5 不同浓度 PM2.5 对心肌组织 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. A. Sham group. B. Low dose group. C. Middle dose group. D. High dose group. (The same in the following figures)

Figure 5 Effects of different concentrations of PM2.5 on the expression of Bcl-2 and Bax proteins in myocardial tissue ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

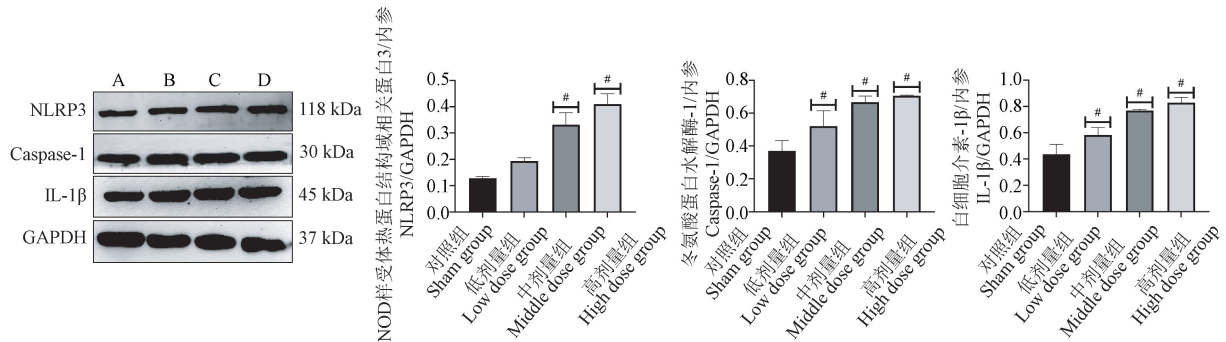


图 6 不同浓度 PM2.5 对心肌组织 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Figure 6 Effects of different concentrations of PM2.5 on the expression of NLRP3, IL-1 β and Caspase-1 in myocardial tissue ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

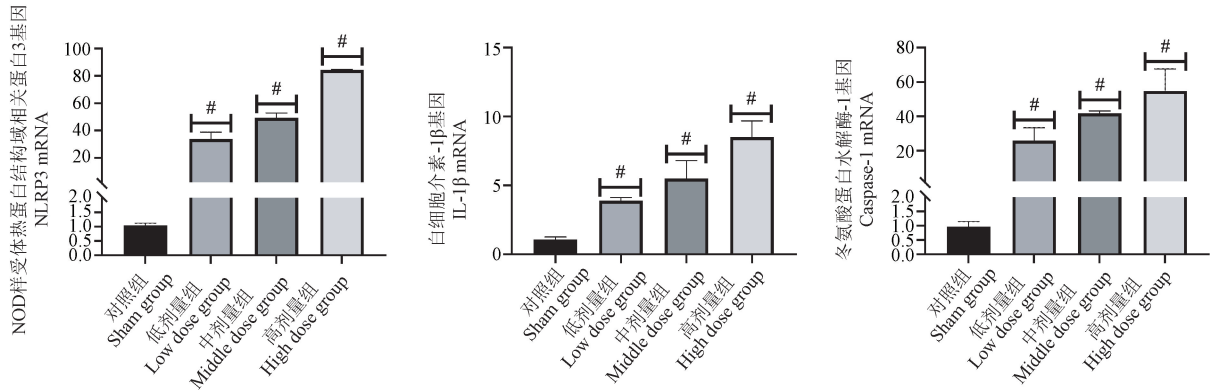


图 7 不同浓度 PM2.5 对心肌组织 NLRP3、IL-1 β 、Caspase-1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Figure 7 Effects of different concentrations of PM2.5 on the expression of NLRP3, IL-1 β and Caspase-1 mRNA in myocardial tissue ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3 讨论

PM2.5 由于其粒径极小,极易通过呼吸道沉积在肺部,最先引起肺损伤,再通过肺循环进入全身循环,心脏与肺通过肺循环紧密联系,也是 PM2.5 造成损伤的第二大器官,PM2.5 堆积会引起心脏收缩、心肌细胞通透性等功能异常,继而引发心血管疾病,如心律失常、心力衰竭、急性冠状动脉综合征等^[7]。郑灿军等^[8]研究表明,PM2.5 可直接影响大鼠心肌细胞的搏动频率;焦周光等^[9]以大鼠心肌细胞 H9C2 为研究对象,结果发现,水溶性成分对其表现出微弱的抑制生长作用,但能对 H9C2 细胞造成损伤,引起 LDH 外漏与胞内 SOD 活力降低,并引发一系列的炎症反应。

心脏功能与其细胞内大分子酶类物质密切相关,如 CK-MB、cTnI、AST、ALT、LDH 等,当心肌组织受到刺激或损伤后,心肌细胞膜的磷脂双分子层结构变得不稳定,通透性增加,引起胞内生物大分子排除,致使组织中浓度升高,因此,检测心肌组织中这些大分子物质水平对诊断心肌缺血及评价心肌组织是否正常具有重要的意义^[10]。本次研究中 PM2.5 染毒组大鼠心肌组织 CK、LDH、AST 水平均显著升高,提示滴注 PM2.5 可损伤心肌细胞,改变心肌细胞膜的完整性和通透性。

相关研究表明,PM2.5 成分复杂,主要通过炎症反应、氧化应激、心肌细胞凋亡、DNA 损伤和内皮素紊乱等途径破坏心脏组织结构、损伤心脏基本功能^[11],其中炎症反应是目前研究的重点,NLRP3 炎症小体是炎症反应上游的关键蛋白复合物,可刺激下游多种炎症因子和通路表达^[12]。NLRP3 炎症小体的前端为受体蛋白 NLRP3 蛋白,主要负责接收刺激信号,活化后可招募负责衔接功能的凋亡相关斑点蛋白 (apoptosis associated speck-like protein containing a card domain, ASC),剪切并催化前体半胱天冬氨酸酶-1 (pro-caspase-1) 成熟为 Caspase-1,促进 IL-1 β 、IL-18 表达,进而刺激下游多种炎症介质和通路的活化,引发一系列炎症联级反应^[13-14];另外,NLRP3 激活后可促使 Caspase-8 活化,继而水解凋亡蛋白 Bid,Bid 可迁移至线粒体,调控凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 及细胞色素 C 的合成和释放,Bcl-2 能抑制非正常的细胞凋亡,而 Bax 能促进细胞凋亡减轻组织负担,组织中 Bcl-2/Bax 值能在一定程度上代表该组织细胞凋亡水平^[15-16]。本次研究结果

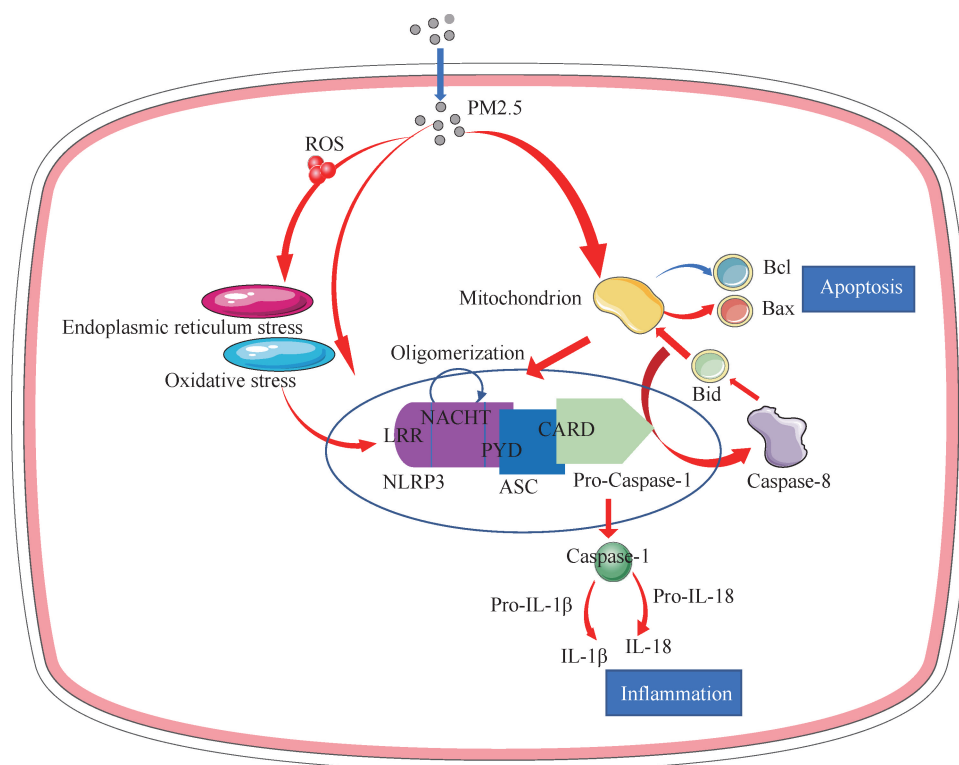
显示,PM2.5 染毒组心肌组织 NLRP3、IL-1 β 、Caspase-1 蛋白和 mRNA 均有不同程度的升高,Bcl-2/Bax 值下降,表明气管滴注 PM2.5 可激活心肌组织 NLRP3 炎症小体,诱导细胞凋亡。但其机制尚不明确,基于课题组前期研究与查阅文献^[17-18]推测 PM2.5 可能通过 3 种途径激活 NLRP3 炎症小体:(1)NLRP3 炎症小体的 LRR 端能直接识别矿物颗粒粉尘,并激活相关信号通路,活化 NLRP3 炎症小体;(2)PM2.5 中的金属元素(镍、锌等)可直接诱导 ROS 生成,而 ROS 是 NLRP3 炎症小体的直接刺激物,另一方面可引起氧化应激和内质网应激再次激活 NLRP3 炎症小体;(3)PM2.5 能引起大鼠心脏线粒体肿胀、结构受损,进一步增加 ROS 的生成,减少 ATP 生成,激活 NLRP3 炎症小体(见图 8)。

本实验也存在不足之处:(1)考察了 PM2.5 暴露后心肌酶谱和心肌细胞凋亡水平,未涉及心电图、心超射血分数、左室压 dp/dt 等心脏功能指标。因此,PM2.5 暴露对心肌功能的影响需进一步研究。(2)NLRP3 炎症小体表达与细胞焦亡关系密切相关,多项研究表明,NLRP3 炎症小体被激活后可切割消素 D(GSDMD)的 N 端序列,促使大量成熟的 IL-1 β 、IL-18 释放到胞外,募集炎症细胞,扩大炎症反应,诱发细胞焦亡,进一步加重心肌损伤的发展^[19-20]。在本实验中,考察的是 PM2.5 暴露引起 NLRP3 炎症小体表达与心肌细胞凋亡的关系,未考察对心肌细胞焦亡的影响。(3)尚未考察 NLRP3 在 PM2.5 暴露诱导心肌损伤中的作用;NLRP3 炎症小体作为 PM2.5 暴露损伤心肌组织的上游关键蛋白,其激活可引发炎症反应、心肌细胞凋亡等一系列损伤;还是 PM2.5 暴露后引起的多项反应诱导 NLRP3 炎症小体活化,其表达水平是否能代表心肌损伤水平。

综上所述,本研究以气管滴注建立 PM2.5 染毒模型,结果显示,PM2.5 染毒能不同程度诱导心肌细胞结构损伤,促进凋亡,升高心肌组织 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白和基因的表达,降低 Bcl-2/Bax 值,升高血清中炎症因子 IL-1 β 、IL-6、IL-18 和 TNF- α 水平,提示 PM2.5 暴露能活化心肌组织 NLRP3 炎症小体,促进炎症反应和心肌细胞凋亡,但其激活 NLRP3 炎症小体的具体机制还有待进一步研究。

参 考 文 献 (References)

- [1] Liu J, Han Y, Tang X, et al. Estimating adult mortality attributable to PM_{2.5} exposure in China with assimilated PM_{2.5}

图 8 PM_{2.5} 激活心脏 NLRP3 机制Figure 8 Mechanism of PM_{2.5} activation of cardiac NLRP3

- concentrations based on a ground monitoring network [J]. *Sci Total Environ*, 2016, 568: 1253–1262.
- [2] 毕张扬, 苏健, 张伟. 基于“气血理论”探讨心肺“生运气血”与肺间质纤维化论治 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2020, 22(11): 84–87.
- Bi ZY, Su J, Zhang W. Exploration of the relationship between the generation and transportation of qi and blood and the treatment of pulmonary fibrosis based on the theory of qi and blood [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2020, 22(11): 84–87.
- [3] 董国菊. 基于“心肺相关”探讨射血分数保留心力衰竭的“心肺同治” [EB/OL]. (2021–10–20) [2022–04–27]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2787.R.20220426.1452.002.html>.
- Dong GJ. Cardiopulmonary co-treatment on heart failure with preserved ejection fraction based on concept of cardiopulmonary correlation [EB/OL]. (2021–10–20) [2022–04–27]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2787.R.20220426.1452.002.html>.
- [4] Hoek G, Krishnan RM, Beelen R, et al. Long-term air pollution exposure and cardio-respiratory mortality: a review [J]. *Environ Health*, 2013, 12(1): 43.
- [5] Kelley N, Jeltama D, Duan Y, et al. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13): 3328.
- [6] Zhang Q, Li Q, Ma J, et al. PM_{2.5} impairs neurobehavior by oxidative stress and myelin sheaths injury of brain in the rat [J]. *Environ Pollut*, 2018, 242: 994–1001.
- [7] 李腾, 杜雪, 郑昕. PM_{2.5}与心血管疾病的相关性研究进展 [J]. *中华内科杂志*, 2019, 58(4): 321–323.
- Li T, Du X, Zheng X. Research progression on the correlation between fine particulate matter (PM_{2.5}) and cardiovascular [J]. *Chin J Intern Med*, 2019, 58(4): 321–323.
- [8] 郑灿军, 王菲菲, 郭新彪. 大气 PM_{2.5}对原代培养大鼠心肌细胞的毒性 [J]. *环境与健康杂志*, 2006, 23(1): 17–20.
- Zheng CJ, Wang FF, Guo XB. Study on the toxicity of ambient PM_{2.5} to primary cultured myocardial cells of neonatal rats [J]. *J Environ Health*, 2006, 23(1): 17–20.
- [9] 焦周光, 胡凌飞, 李娜, 等. 大气 PM_{2.5}对大鼠心肌细胞的毒性作用 [J]. *环境科学研究*, 2018, 31(9): 1636–1644.
- Jiao ZG, Hu LF, Li N, et al. Toxic effects on rat cardiac myocytes from atmospheric PM_{2.5} particles [J]. *Res Environ Sci*, 2018, 31(9): 1636–1644.
- [10] Zhang W, Li Y, Ge Z. Cardioprotective effect of crocetin by attenuating apoptosis in isoproterenol induced myocardial infarction rat model [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93: 376–382.
- [11] 朱文涛, 胡雨晨, 蔡佳洁, 等. 大气 PM_{2.5}对心血管系统损伤机制的研究进展 [J]. *环境与职业医学*, 2020, 37(9): 929–935.
- Zhu WT, Hu YC, Cai JJ, et al. Review on mechanisms of PM_{2.5} in cardiovascular system injuries [J]. *J Environ Occup Med*,

- 2020, 37(9): 929–935.
- [12] Li Z, Guo J, Bi L. Role of the NLRP3 inflammasome in autoimmune diseases [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 130: 110542.
- [13] Elliott EI, Sutterwala FS. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly [J]. Immunol Rev, 2015, 265(1): 35–52.
- [14] Blevins HM, Xu Y, Biby S, et al. The NLRP3 inflammasome pathway: a review of mechanisms and inhibitors for the treatment of inflammatory diseases [J]. Front Aging Neurosci, 2022, 14: 879021.
- [15] Tian Y, Li H, Liu X, et al. Pharmacological inhibition of Caspase-8 suppresses inflammation-induced angiogenesis in the Cornea [J]. Biomolecules, 2020, 10(2): 210.
- [16] Chung H, Vilaysane A, Lau A, et al. NLRP3 regulates a non-canonical platform for Caspase-8 activation during epithelial cell apoptosis [J]. Cell Death Differ, 2016, 23(8): 1331–1346.
- [17] 杨根梦, 洪仕君, 王一航, 等. Keap1/Nrf2/p62 和 NLRP3 炎症小体与自噬调节作用的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 103–107.
- Yang GM, Hong SJ, Wang YH, et al. Progress of research in the regulation of Keap1/Nrf2/p62, NLRP3 inflammasome and autophagy [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(3): 103–107.
- [18] Qiu Z, Lei S, Zhao B, et al. NLRP3 inflammasome activation-mediated pyroptosis aggravates myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic rats [J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017: 17.
- [19] Sborgi L, Rühl S, Mulvihill E, et al. GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death [J]. EMBO J, 2016, 35(16): 1766–1778.
- [20] Shi J, Zhao Y, Wang K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death [J]. Nature, 2015, 526(7575): 660–665.

[收稿日期] 2022-08-19

综述: 人源性组织异种移植动物模型在结直肠癌研究中的应用

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球排位第三的常见恶性肿瘤,近年来,结直肠癌在全球范围的疾病负担仍在持续加剧。最新数据表明,我国结直肠癌的新发人数仅次于肺癌,成为第二大癌症。针对结直肠癌发病机制和治疗药物的研究对于提高结直肠癌患者的生存率至关重要。

能够模拟人类结直肠癌复杂性的动物疾病模型对于结直肠癌研究十分重要。本文总结了目前已经掌握的结直肠癌小鼠模型构建方法有致癌物诱导模型、基因工程诱导模型、结直肠癌细胞株异种移植模型(CDX)和人源性肿瘤组织异种移植(PDX)小鼠模型。但是,由于肿瘤细胞株在体外长期培养容易产生基因变异;CDX模型不能模拟肿瘤微环境;CDX模型也不能反应肿瘤患者的个体差异。因此,科学家始终致力于开发新的小鼠模型用于结直肠癌精准治疗的研究。

结直肠癌PDX模型,是将患者的新鲜肿瘤组织接种在特定小鼠的体内形成的模型。目前,结直肠癌PDX模型技术逐渐成熟,正在成为结直肠癌研究中一种重要的小鼠模型。PDX模型的组织病理学特征与对应的患者肿瘤在肿瘤分化程度、肿瘤细胞分子特征、粘液分泌以及基质成分等方面高度一致。肿瘤的遗传和表观遗传学特征也被保留了下来。而且,结直肠癌PDX模型构建成功率高于大部分肿瘤类型,成瘤率在75%左右。结直肠癌PDX模型已经成功用于肿瘤异质性、克隆动力学和肿瘤微环境的相关研究。最近研究表明,结直肠癌PDX的药物试验结果与药物临床结果具有较高的一致性。因此,结直肠癌PDX用于新药或新型治疗方案的研发具有极大的应用潜力。未来,结直肠癌PDX模型很有可能在结直肠癌转化研究中发挥着重要作用。

综上所述,本文全面概括了目前用于结直肠癌研究的动物模型,阐述了其发展历程以及各种动物模型的优缺点。加深对PDX动物模型的了解将有利于研究者选择合适的动物模型,从而有利于CRC的机制探索以及药物开发等CRC相关研究的顺利开展。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2023, 6(1):26-40; doi: 10.1002/ame2.12299)。