

基于 *NLRP3* 基因研究其调节非酒精性脂肪性肝病小鼠炎症反应的作用机制

邵益丹, 史婷婷, 席建军, 赵艳梅, 邹玺, 庄让笑* (杭州市西溪医院, 杭州 310012)

摘要: 目的 利用 *NLRP3* 基因敲除小鼠, 研究 *NLRP3* 基因在调节高脂高果糖饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)小鼠炎症反应方面的作用机制。方法 利用雄性纯合子(*NLRP3*^{-/-})小鼠, 以高脂高果糖饮食诱导 *NLRP3* 基因敲除(knock-out, KO)小鼠和野生型(wild-type, WT)小鼠建立 NAFLD 模型, 分别设为 KO 高脂高果糖饮食组(KO-HFD 组)和 WT 高脂高果糖饮食组(WT-HFD 组), 同时设 WT 组和 KO 组。通过观察各组小鼠体质量变化, 血清和组织样本 ALT、AST、TG、TC、MDA、SOD、脂质沉积、细胞凋亡率、IL-1 β 、IL-18、TNF- α 、NF- κ B、*NLRP3*、Caspase-1 和 ASC 等的变化, 初步研究 *NLRP3* 基因调节 NAFLD 小鼠炎症反应的作用机制。结果 随着时间的推移, 各组小鼠体质量逐步增加, 但 KO-HFD 组相比 WT-HFD 组增加较少; 各组血清 ALT、AST、TG 和 TC 水平逐步升高, 但 KO-HFD 组相比 WT-HFD 组增幅较小; 各组肝组织 MDA 水平逐步升高, SOD 水平逐步降低, 但 KO-HFD 组相比 WT-HFD 组变化幅度较小; 油红 O 染色和 Tunel 切片结果显示, 各组肝细胞内脂质沉积和细胞凋亡程度均逐渐增大, 但 KO-HFD 组相比 WT-HFD 组变化较少; 各组血清和肝组织炎症因子 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 、NF- κ B 水平升高, 但 KO-HFD 组 20 周相比 WT-HFD 组 20 周变化较少, 且差异具有统计学意义; WT-HFD 组小鼠肝组织 *NLRP3* 炎性小体及相关炎症因子蛋白 *NLRP3*、Caspase-1、ASC、IL-1 β 和 IL-18 的表达水平相较 KO-HFD 组升高; WT-HFD 组的 *NLRP3*、ASC、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 的 mRNA 转录水平逐步升高, 而 KO-HFD 组基本未出现变化。结论 *NLRP3* 基因在 NAFLD 小鼠模型中可能被激活, 导致 *NLRP3* 炎性小体相关蛋白表达的增加, 促进下游炎症因子的合成和分泌, 造成明显的炎症反应和肝脏损伤, 进而推动 NAFLD 疾病的进展。

关键词: *NLRP3*; 炎性小体; 非酒精性脂肪性肝病; 炎症反应

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2023)21-2945-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20221874

引用本文: 邵益丹, 史婷婷, 席建军, 等. 基于 *NLRP3* 基因研究其调节非酒精性脂肪性肝病小鼠炎症反应的作用机制[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(21): 2945-2951.

Research on the Mechanism of *NLRP3* Gene's Regulation on Inflammatory Response in Non-alcoholic Fatty Liver Disease Mice

SHAO Yidan, SHI Tingting, XI Jianjun, ZHAO Yanmei, ZOU Xi, ZHUANG Rangxiao* (Hangzhou Xixi Hospital, Hangzhou 310012, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the mechanism of *NLRP3* gene's regulation on inflammatory response in non-alcoholic fatty liver disease(NAFLD) mice induced by high-fat and high-fructose diet using *NLRP3* gene knockout mice. **METHODS** Use male homozygous(*NLRP3*^{-/-}) mice, and the high-fat and high-fructose diet was used to establish NAFLD model in *NLRP3* knockout(KO) mice and wild-type(WT) mice, divided into KO high-fat and high-fructose diet(KO-HFD) group and WT high-fat and high-fructose diet(WT-HFD) group, while the WT and KO groups were also established. The body weight of mice in each group were observed. The changes of ALT, AST, TG, TC, MDA, SOD, lipidosis, apoptosis rate, IL-1 β , IL-18, TNF- α , NF- κ B, *NLRP3*, Caspase-1 and ASC in serum and tissue samples were tested to study the mechanism of the *NLRP3* gene regulating the inflammatory response in NAFLD mice. **RESULTS** As time goes on, the mice weight of each group increased gradually, but the KO-HFD group increased less than the WT-HFD group. Each group's level of ALT, AST, TG, TC in serum increased gradually, but the KO-HFD group increased less than the WT-HFD group. The level of MDA in liver tissues of each group was gradually increased and the level of SOD was gradually decreased, but the change range of KO-HFD group was smaller than that of WT-HFD group. The results of oil red O staining and Tunel section showed that the degree of lipid deposition and apoptosis in hepatocytes increased gradually in all groups, but the changes in KO-HFD group were less than that in WT-HFD group. The levels of serum and liver inflammatory factors IL-1 β , IL-18, TNF- α and NF- κ B increased in all groups, but the changes of KO-HFD group 20 weeks

基金项目: 浙江省科技计划项目(2018C37085)

作者简介: 邵益丹, 男, 硕士, 副主任药师
zhuangrangxiao@163.com

E-mail: 40773425@qq.com

*通信作者: 庄让笑, 男, 主任药师

E-mail:

were less than those of WT-HFD group 20 weeks, and the difference was statistically significant. The expression levels of NLRP3 inflammasomes and related inflammatory cytokines NLRP3, Caspase-1, ASC, IL-1 β and IL-18 in liver tissues of WT-HFD group were higher than those of KO-HFD group. The mRNA transcription levels of NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1 β and IL-18 in WT-HFD group were gradually increased, while there was no change in KO-HFD group. **CONCLUSION** The *NLRP3* gene may be activated in NAFLD mice model, resulting in increased expression of NLRP3 inflammasome-associated protein, promoting the synthesis and secretion of downstream inflammatory factors, resulting in significant inflammatory response and liver damage, and promoting the progression of NAFLD disease.

KEYWORDS: *NLRP3*; inflammasome; non-alcoholic fatty liver disease; inflammatory response

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是以除外过量饮酒史和其他明确肝损因素导致的慢性肝脏脂质代谢综合征。NAFLD 的致病因素包括胰岛素抵抗、脂质代谢紊乱、氧自由基、炎症和铁超载等,部分可进展到非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH),进而发展为肝纤维化和肝硬化,最终导致肝衰竭和肝癌^[1]。

炎症反应是细胞对微生物感染,外界刺激以及自身组织损伤做出的复杂生物学反应^[2]。不受控制的炎症反应会引起组织和细胞的各种病变,诱发自体免疫性疾病及其他炎症性疾病。NLRP3 炎性小体是炎症反应的重要组成部分,是由 Nod 样受体家族蛋白 3 (nod-like receptor family, pyrin domain-containing 3, NLRP3)和凋亡凝集样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC)及 Caspase-1 前体组成的蛋白复合物,可以识别病原和疾病相关分子^[3-5],在病原体感染自身炎症反应、神经退行性疾病、肿瘤和 2 型糖尿病等多种疾病中发挥重要作用^[6-9]。白介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)是一种炎性细胞因子,当机体出现组织损伤、环境应激、感染或慢性炎症时 NLRP3 炎性小体被激活,可导致 IL-1 β 等炎性细胞因子的大量产生和分泌^[10]。

上述研究提示, *NLRP3* 基因在 NAFLD 的炎症反应过程中可能发挥了重要作用。本实验基于 *NLRP3* 基因敲除小鼠,通过高脂高果糖饮食诱导 NAFLD 小鼠模型^[11],研究 *NLRP3* 基因在调节 NAFLD 小鼠炎症反应方面的作用机制。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Mini protean 3 cell 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); PS-9 电转仪(大连竞迈生物科技有限公司); MK3 酶标仪(芬兰雷勃公司); P 型移液器(美国吉尔森公司); Tanon-5200 成像系统(上海 Tanon 公司); ABI-7300 Real-Time PCR 检测仪(美国 ABI 公司); TG-16M 低温冷冻离心机(上海卢湘仪离心

机仪器有限公司); K30 旋涡振荡器(上海青浦沪西仪器厂); PRO200 匀浆机(美国 FLUKO 仪器仪表公司); HI1210 水浴缸、SQ2125 石蜡切片机、PPTHK-21B 摊片机(德国 Leica 公司);ECLIPSE Ni 正置显微镜、DS-Ri2 显微图像分析系统(日本 Nikon 公司)。

1.2 试剂和耗材

测试试剂和耗材见表 1。

表 1 试剂清单
Tab. 1 Reagent list

试剂名称	厂家	货号
谷丙转氨酶试剂盒	南京建成	C009-1
谷草转氨酶试剂盒	南京建成	C010-1
甘油三酯试剂盒	南京建成	A110-2
总胆固醇试剂盒	南京建成	A111-1
超氧化物歧化酶试剂盒	南京建成	A001
NF- κ B 试剂盒	Cucabia	CSB-EL015761MO
油红 O	上海源叶	S19039
苏木素	BASO	714094
石蜡	上海国药集团	69018961
Trizol	Invitrogen	1596-026
SYBR Green PCR 试剂盒	Thermo	#K0223
逆转录试剂盒	Fermentas	#K1622
胰蛋白酶	Gibco	25200072
Tunel 试剂盒	Roche 公司	11684817910
DAB 浓缩型试剂盒	上海长岛生物	FL-6001
BCA 蛋白定量试剂盒	Thermo	PICPI23223
蛋白预染 Marker	Fermentas	SM1811
NLRP3 抗体	Abcam	Ab263899
ASC 抗体	Proteintech	67494-1-Ig
Caspase-1 抗体	Abcam	Ab138483
IL-1 β 抗体	Abcam	Ab25460
IL-18 抗体	Abcam	Ab207323
GAPDH	CST	#5174
羊抗兔 HRP 标记二抗	碧云天	A0208
羊抗小鼠 HRP 标记二抗	碧云天	A0216

1.3 动物

清洁级 C57/BL6 雄性野生型(wild-type, WT)和 *NLRP3* 基因敲除(knock-out, KO)(*NLRP3*^{-/-})小鼠各 12 只,体质量(25 $\pm$ 2)g,购于上海南方模式生物科技股份有限公司,实验动物生产许可证号:

SCXK(沪)2019-0002。饲养于上海睿太莫斯生物科技有限公司,实验动物使用许可证号:SYXK(沪)2021-0007。明暗循环 12 h·d⁻¹,室内温度 20~26℃,相对湿度 40%~70%,自由饮水和饮食,笼盒、垫料、饲料及饮用水均经高温高压消毒处理。

2 方法

2.1 NAFLD 模型组/对照组的建立和样本制备

2.1.1 分组和建模 清洁级 C57/BL6 雄性 WT 和 *NLRP3* KO 小鼠各 12 只,适应性饲养 5 d 后,随机分为 WT 组 6 只、KO 组 6 只、WT 高脂高果糖饮食组(WT-HFD)6 只和 KO 高脂高果糖饮食组(KO-HFD)6 只。WT 组和 KO 组给予基础饲料和普通饮用水,WT-HFD 组和 KO-HFD 组给予高脂饲料和果糖饮用水。

2.1.2 样本制备 每周称重并观察各组小鼠的一般情况,在第 0 周处理 WT 组和 KO 组各 3 只,在造模后第 8 周末处理 WT-HFD 组和 KO-HFD 组小鼠各 3 只,20 周末后一并处理剩余小鼠,动物处理前禁食 12 h,以 3%的戊巴比妥钠[0.2 mL·(100 g)⁻¹]腹腔注射麻醉,称重,腹主动脉采血;迅速取出肝脏,取最大叶用 10%中性甲醛固定,做肝组织病理学观察,其余肝组织-80℃冻存备用。

2.2 血清生化和肝组织病理学检测

2.2.1 血清生化检测 腹主动脉采血,加入 2 mL 的尖底 EP 管中室温静置 2 h,627 ×g 离心 5 min 后取上清液,按照说明书对血清的 ALT、AST、TG 和 TC 水平进行测定。

2.2.2 肝组织抗氧化指标检测 取-80℃保存的肝组织 100 mg 放入 1.5 mL 的 EP 管中,加入 1 mL PBS 溶液,用匀浆机在冰上对肝组织进行匀浆,然后 4℃下 10 033 ×g 离心 5 min,取上清得到肝组织匀浆,放-20℃保存备用。按试剂盒说明书对肝组织匀浆中的 MDA、SOD 水平进行测定。

2.2.3 肝组织油红 O 染色检测 取-80℃保存的肝组织于-20℃复温 30 min,切块并用石蜡包埋,用冷冻切片机切成 7 μm 薄片,贴于多聚赖氨酸处理过的载玻片上,放入 4℃预冷的丙酮固定 15 min,用 4%甲醛固定 10 min,再用蒸馏水清洗,用 60%异丙醇浸洗,然后用油红 O 溶液染色 10 min,再用 60%异丙醇分色至背景无色,蒸馏水清洗后用 Mayer 苏木精复染,最后用蒸馏水洗净后用甘油明胶封片。得到的油红 O 染色样本在显

微镜观察肝组织脂肪沉积情况。

2.2.4 肝组织 TUNEL 检测 取肝组织用中性甲醛固定 48 h,用乙醇逐级脱水后,置入无水乙醇和二甲基苯的等体积混合液 2 h,并置入纯二甲苯 2 h 2 次,后进行石蜡包埋,再在-20℃冷冻>30 min,用切片机 4 μm 切片,脱蜡并用乙醇逐级水化,用胰蛋白酶消化 40 min, PBS 清洗 3 次。加 50 μL TUNEL 反应液 37℃反应 1 h, PBS 清洗 3 次。加 50 μL POD 液 37℃反应 30 min, PBS 清洗 3 次。用 DAB 染色 10 min 后用水冲洗,用苏木素复染。用乙醇逐级脱水,用二甲苯透明 2 次,最后用中性树胶封片得到 TUNEL 切片,在显微镜下观察肝细胞坏死程度。

2.3 血清和肝组织炎症因子表达水平检测

2.3.1 血清炎症因子水平检测 按“2.1.2”和“2.2.1”项下方法制备血清样本,按照 ELISA 试剂盒说明书处理并确定样本稀释倍数,并据此稀释血清样本后进行加样,37℃孵育 30 min 后用洗涤液清洗,加入相应的酶标试剂 50 μL 后,37℃继续孵育 30 min 后用洗涤液清洗,再加入显色试剂显色 15 min,然后加入终止液终止反应,并立即使用酶标仪在 450 nm 处测定吸收值,照此对血清 IL-1β、IL-18、TNF-α 和 NF-κB 水平进行测定。

2.3.2 肝组织炎症因子水平检测 按“2.2.2”项下方法制备的-20℃肝组织匀浆液,按“2.3.1”项下方法确定稀释倍数并加样处理,对肝组织 IL-1β、IL-18、TNF-α 和 NF-κB 水平进行测定。

2.4 肝组织 NLRP3 炎性小体及相关因子蛋白表达水平检测

取 RIPA 裂解液处理并离心所得的肝组织裂解液,经 SDS-PAGE 电泳,转膜,进行封闭和杂交, ECL 化学发光显色后成像分析,用 Image J 软件处理测定条带灰度值,分析肝组织中 NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1β 和 IL-18 蛋白表达水平的变化。

2.5 肝组织 NLRP3 炎性小体及相关因子 mRNA 的表达水平检测

取-80℃冻存的肝组织,切成绿豆大小的组织块,置于 EP 管中用液氮速冻,加入用 Trizol 试剂裂解对肝组织,提取 RNA 并测定 RNA 纯度及浓度,再进行 cDNA 反转录和扩增,引物序列见表 2,用荧光定量 PCR 仪进行测定,分析肝组织中 NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1β、IL-18 的 mRNA 转录水平的变化。

表 2 引物序列表

Tab. 2 Primer sequence list

基因	引物序列	引物长度/ bp
<i>NLRP3</i>	5'-GCT GCC CTT CCC ATC ATA TC-3' 5'-AGG CTG CCA CAA ACC TTC-3'	297
<i>Caspase-1</i>	5'-CGT CTT GCC CTC ATT ATC-3' 5'-CAC CTC TTT CAC CAT CTC-3'	159
<i>ASC</i>	5'-ATA TAA CTG GTG CCG TGC AAT C-3' 5'-TAC AAT GGC ATT AGC GCC TTT C -3'	284
<i>IL-1β</i>	5'-CGTGTTCAGGACACAACAAG-3' 5'-TACAGGCGAGGTCATCACAAG-3'	210
<i>IL-18</i>	5'-CTG CCC AGA ACA TCA TCC-3' 5'-CTC AGA TGC CTG CTT CAC-3'	197
<i>GAPDH</i>	5'-CTG CCC AGA ACA TCA TCC-3' 5'-CTC AGA TGC CTG CTT CAC-3'	197

3 结果

3.1 体质量变化趋势

高脂高果糖饮食诱导组(KO-HFD、WT-HFD)较普通饮食组(KO、WT)小鼠的体质量增长速度更快。同时, KO 组较 WT 组小鼠的体质量增长更慢, KO-HFD 组较 WT-HFD 组小鼠的体质量增长更慢, 体质量变化趋势见图 1。

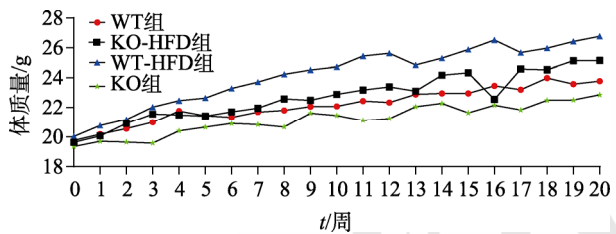


图 1 体质量变化趋势

Fig. 1 Trend of body weight

3.2 血清生化和肝组织病理学检测结果

3.2.1 血清生化指标检测结果 高脂高果糖饮食诱导下小鼠血清 ALT、AST、TG 和 TC 水平显著升高,但 KO-HFD 组较 WT-HFD 组升高幅度更小。结果见表 3。

表 3 血清生化检测结果

Tab. 3 Results of serum biochemical tests

组别	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹
KO 组	48.86±4.99	28.77±4.67	0.65±0.05	1.83±0.10
KO-HFD 组 8 周	60.62±1.75 ¹⁾³⁾	45.21±2.17 ¹⁾³⁾	1.02±0.01 ¹⁾³⁾	2.94±0.09 ¹⁾³⁾
KO-HFD 组 20 周	79.73±4.62 ¹⁾⁴⁾	61.58±2.29 ¹⁾⁴⁾	1.50±0.02 ¹⁾⁴⁾	4.10±0.04 ¹⁾⁴⁾
WT 组	48.34±3.66	25.32±2.36	0.71±0.09	1.74±0.14
WT-HFD 组 8 周	84.67±11.83 ²⁾	50.69±2.96 ²⁾	1.16±0.05 ²⁾	2.29±0.09 ²⁾
WT-HFD 组 20 周	152.25±1.01 ²⁾	80.06±2.92 ²⁾	2.34±0.06 ²⁾	5.63±0.16 ²⁾

注: 与 KO 组比较, ¹⁾ $P<0.001$; 与 WT 组比较, ²⁾ $P<0.001$; 与 WT-HFD 组 8 周比较, ³⁾ $P<0.001$; 与 WT-HFD 组 20 周比较, ⁴⁾ $P<0.001$ 。

Note: Compared with KO group, ¹⁾ $P<0.001$; compared with WT group, ²⁾ $P<0.001$; compared with WT-HFD group 8 weeks, ³⁾ $P<0.001$; compared with WT-HFD group 20 weeks, ⁴⁾ $P<0.001$ 。

3.2.2 肝组织抗氧化指标检测结果 高脂高果糖

饮食诱导下小鼠肝组织内 MDA 升高, SOD 水平下降, 且差异有统计学意义。MDA 水平在 KO-HFD 组中较 WT-HFD 组升高幅度更小, SOD 水平在 KO-HFD 组中较 WT-HFD 组下降幅度更小。结果见表 4。

表 4 肝组织抗氧化指标检测结果

Tab. 4 Results of liver antioxidant index tests

组别	MDA/nmol·mL ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹
KO 组	5.00±0.45	102.1±11.9
KO-HFD 组 8 周	9.19±1.08 ¹⁾³⁾	70.95±5.48 ¹⁾³⁾
KO-HFD 组 20 周	12.93±4.37 ¹⁾⁴⁾	58.46±1.94 ¹⁾⁴⁾
WT 组	4.99±0.30	106.44±10.33
WT-HFD 组 8 周	9.77±0.54 ²⁾	37.32±4.40 ²⁾
WT-HFD 组 20 周	19.79±0.20 ²⁾	27.87±1.11 ²⁾

注: 与 KO 组比较, ¹⁾ $P<0.001$; 与 WT 组比较, ²⁾ $P<0.001$; 与 WT-HFD 组 8 周比较, ³⁾ $P<0.001$; 与 WT-HFD 组 20 周比较, ⁴⁾ $P<0.001$ 。

Note: Compared with KO group, ¹⁾ $P<0.001$; compared with WT group, ²⁾ $P<0.001$; compared with WT-HFD group 8 weeks, ³⁾ $P<0.001$; compared with WT-HFD group 20 weeks, ⁴⁾ $P<0.001$ 。

3.2.3 肝组织油红 O 染色结果 油红 O 染色结果显示, WT-HFD 组的肝细胞脂质沉积随着造模时间的延长逐步增多, 而 KO-HFD 组的脂质沉积的程度相对较轻, 结果见图 2。

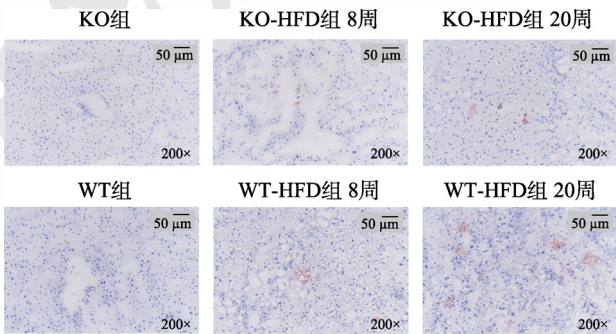


图 2 油红 O 染色结果

Fig. 2 Results of red oil O staining

3.2.4 肝组织 Tunel 切片检测结果 Tunel 切片经 Image J 软件处理结果显示, 随着造模时间的延长, KO-HFD 组和 WT-HFD 组小鼠肝细胞凋亡率均逐渐升高, 且 KO-HFD 组凋亡率低于 WT-HFD 组, 见图 3。

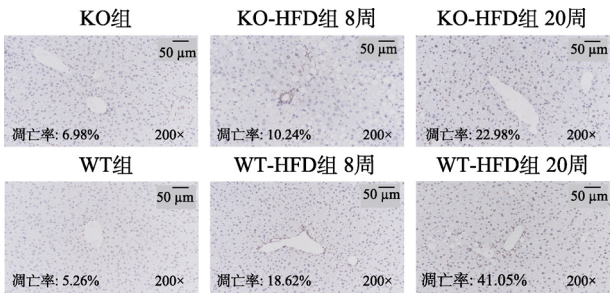


图 3 Tunel 切片结果

Fig. 3 Results of Tunel slice

3.3 血清和肝组织炎症因子表达水平检测结果

ELISA 法测定结果显示, KO-HFD 组和 WT-HFD 组小鼠血清中的炎症因子 IL-18、TNF- α 和 NF- κ B 水平均出现不同程度的增高,在第 20 周后各组的血清炎症因子水平较 KO 组和 WT 组的差异,均具有统计学意义。同时, KO 组相比 WT 组的炎症因子水平增长明显较慢。在肝组织中的情况与血清中的类似,且差异更为显著。结果见图 4~5。

3.4 肝组织中 NLRP3 炎性小体及相关因子蛋白表达水平检测结果

Western blotting 条带及其 Image J 处理结果显示, NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 蛋白表达水平在 KO-HFD 组中较低,在 WT-HFD 组中随着造模时间的延长而增加,且两者之间的部分差异具有统计学意义,结果见图 6。

3.5 肝组织中 NLRP3 炎性小体及相关因子 mRNA 转录水平检测结果

Real-time PCR 法测定结果显示, KO-HFD 组的 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 的 mRNA 转录水平未出现明显变化,而 WT-HFD 组随着造模时间的延长出现增长趋势,且其中的 Caspase-1 mRNA 的变化具有统计学意义,结果见图 7。

4 讨论

本实验利用高脂高果糖饮食诱导 NLRP3 KO 小鼠和 WT 小鼠形成 NAFLD,对比研究 NLRP3 基因在形成 NAFLD 相关炎症过程中的作用。

在持续 20 周的研究中,各组小鼠的体质量、血清 TG 和 TC 水平均出现增长,但 KO-HFD 组较 WT-HFD 组的增长幅度较小,提示 NLRP3 基因和高脂高果糖 2 个因素共同促进了小鼠体内的胰岛素抵抗和脂肪的异常堆积,进而导致体质量的异常增长,而 NLRP3 基因的敲除,可能改善了小鼠上述情况。

同时,通过肝组织油红 O 染色的结果,进一步证明 KO-HFD 组和 WT-HFD 组的肝脏脂质逐渐增多,且 WT-HFD 组脂质堆积程度最明显,而 KO-HFD 组可能由于 NLRP3 基因的敲除,一定程度上改善了肝脏内脂质的堆积。

随着小鼠体内脂质的过度堆积,肝组织 MDA 水平升高和 SOD 水平下降,提示肝细胞内脂质氧化应激水平持续升高,造成抗氧化物 SOD 的持续消耗和氧化应激产物 MDA 的持续升高,可能造成了肝脏炎症水平的升高和肝细胞的持续损伤和凋亡。而 NLRP3 基因的敲除,缓解了模型组中 MDA 水平的升高和 SOD 水平的下降,提示 NLRP3 基因

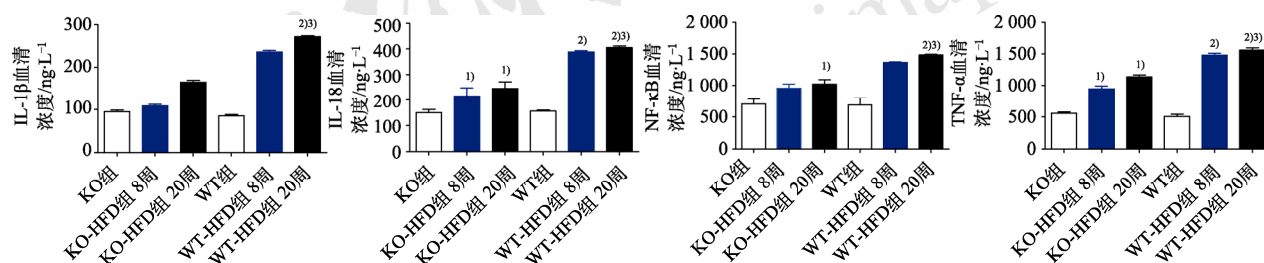


图 4 血清炎症因子水平结果

与 KO 组比较, ¹⁾ $P < 0.001$; 与 WT 组比较, ²⁾ $P < 0.001$; 与 KO-HFD 组 20 周比较, ³⁾ $P < 0.001$ 。

Fig. 4 Results of serum inflammatory factor levels

Compared with KO group, ¹⁾ $P < 0.001$; compared with WT group, ²⁾ $P < 0.001$; compared with KO-HFD group 20 weeks, ³⁾ $P < 0.001$.

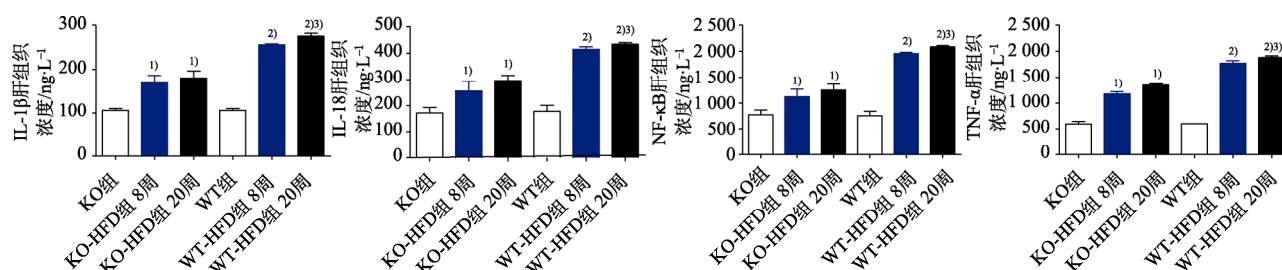


图 5 肝组织炎症因子水平结果

与 KO 组比较, ¹⁾ $P < 0.001$; 与 WT 组比较, ²⁾ $P < 0.001$; 与 KO-HFD 组 20 周比较, ³⁾ $P < 0.001$ 。

Fig. 5 Results of liver tissue inflammatory factor levels

Compared with KO group, ¹⁾ $P < 0.001$; compared with WT group, ²⁾ $P < 0.001$; compared with KO-HFD group 20 weeks, ³⁾ $P < 0.001$.

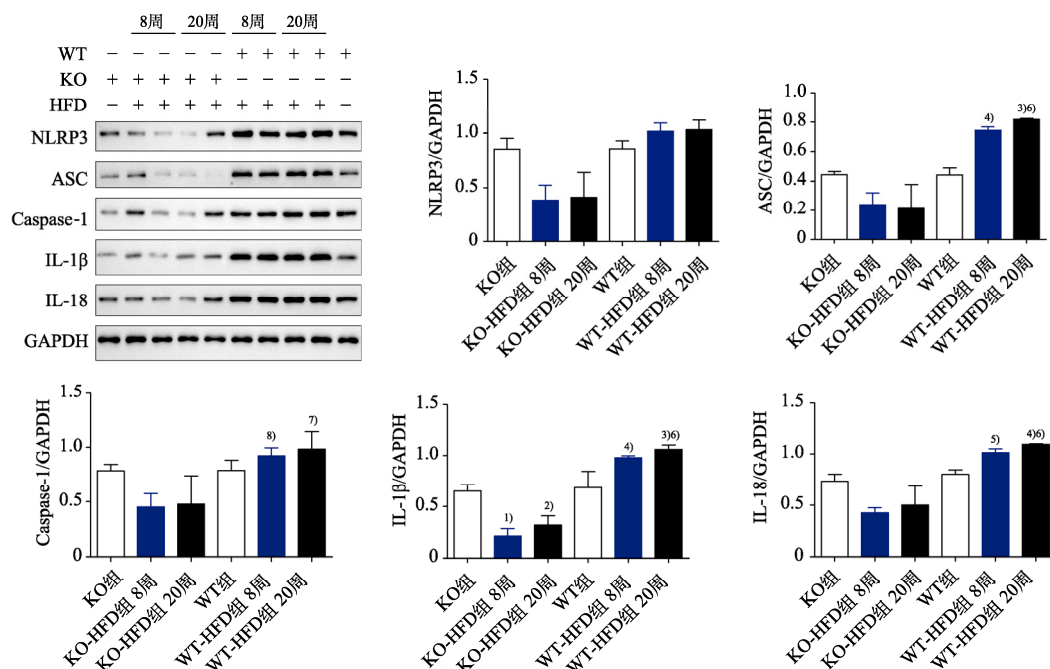


图6 肝组织炎症小体及相关因子蛋白表达水平结果

与 KO 组比较, ¹⁾ $P<0.001$, ²⁾ $P<0.01$; 与 WT 组比较, ³⁾ $P<0.001$, ⁴⁾ $P<0.01$, ⁵⁾ $P<0.05$; 与 KO-HFD 组 20 周比较, ⁶⁾ $P<0.001$, ⁷⁾ $P<0.05$; 与 KO-HFD 组 8 周比较, ⁸⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 6 Results of liver tissue inflammasome and related factors protein expression levels

Compared with KO group, ¹⁾ $P<0.001$, ²⁾ $P<0.01$; compared with WT group, ³⁾ $P<0.001$, ⁴⁾ $P<0.01$, ⁵⁾ $P<0.05$; compared with KO-HFD group 20 weeks, ⁶⁾ $P<0.001$, ⁷⁾ $P<0.05$; compared with KO-HFD group 8 weeks, ⁸⁾ $P<0.05$ 。

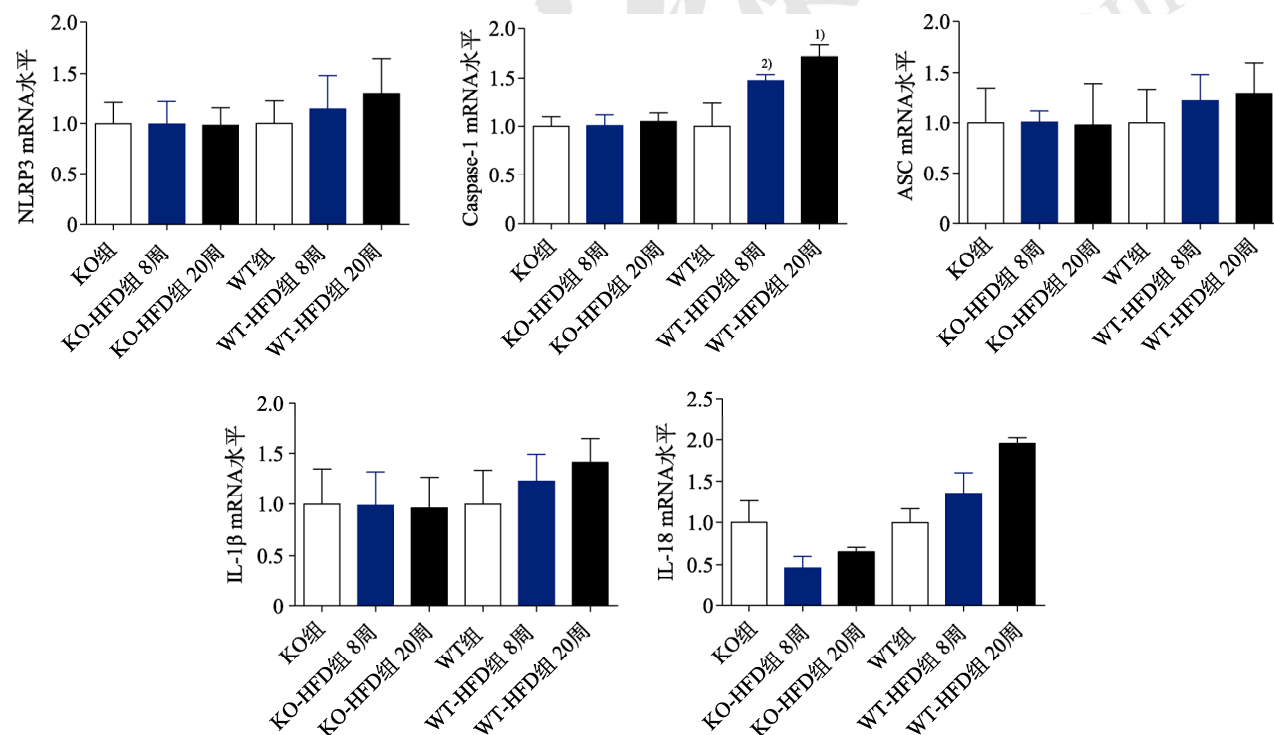


图7 肝组织炎症小体及相关因子 mRNA 表达水平结果

与 WT 组比较, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 7 Results of liver tissue inflammasome and related factors mRNA transcription levels

Compared with WT group, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.05$ 。

的敲除对改善抗氧化水平有一定作用。

进一步研究显示, KO-HFD 组和 WT-HFD 组

血清 ALT 和 AST 水平的异常升高, 以及肝细胞 TUNEL 切片中细胞凋亡率的异常升高, 均从一定程

度上反映肝细胞内持续升高的氧化应激水平,可能导致炎症水平的升高,促进肝细胞的损伤和凋亡,从而造成肝细胞内 ALT 和 AST 的大量释放,而 *NLRP3* 基因的敲除,可能降低了炎症反应水平,缓解了肝细胞的损伤和凋亡。

血清和肝组织炎症相关因子 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 和 NF- κ B 表达水平检测结果显示,模型小鼠炎症相关因子水平均显著升高,且 WT-HFD 组相较 KO-HFD 组的增幅更大,差异均具有统计学意义,提示 *NLRP3* 基因的敲除可能降低了模型组小鼠的炎症水平,进而减少肝细胞的损伤和凋亡。

为进一步验证 *NLRP3* 基因对 NAFLD 小鼠炎症水平的作用机制,本实验对炎症小体 NLRP3、ASC、Caspase-1 和炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 相关蛋白表达水平进行了测定,结果显示上述蛋白表达水平在 WT-HFD 组中较 KO-HFD 组中均逐步增加,其中 ASC、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 的差异具有统计学意义,提示 *NLRP3* 基因的敲除,导致模型小鼠体内出现炎症刺激因素时,炎症小体相关蛋白 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 的表达无法被有效激活,进而限制了 IL-1 β 和 IL-18 的激活,炎症反应受到抑制。而在基因转录水平的实验结果也进一步表明,WT-HFD 组较 KO-HFD 组中的炎症小体 NLRP3、ASC、Caspase-1 和炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 的 mRNA 表达水平总体趋于升高,且其中 Caspase-1 的 mRNA 转录水平的变化具有统计学意义。

综上所述,本实验基于 *NLRP3* 基因研究其对高脂高果糖饮食诱导的小鼠 NAFLD 模型炎症反应的作用机制,初步明确在 NAFLD 发生发展的过程中,由于小鼠肝脏中脂质的异常堆积和血清甘油三酯和总胆固醇的升高,导致脂质过氧化水平持续升高,脂质过氧化产物 MDA 增多,抗氧化活性物质 SOD 的消耗增加含量下降,进而激活炎症小体相关组件 *NLRP3*、ASC、Caspase-1 基因的转录和蛋白合成,促发炎症相关因子 IL-1 β 和 IL-18 的合成和分泌,造成肝细胞的炎性损伤甚至凋亡,造成肝酶 ALT 和 AST 的大量释放,进而推动小

鼠 NAFLD 模型的发生和发展。在此过程中,初步明确了 *NLRP3* 基因的敲除,可一定程度上阻断炎症小体的激活和合成,进而减少炎症因子的合成和分泌,在一定程度上改善 NAFLD 小鼠的炎症水平,减少其肝细胞的炎性损伤和凋亡,甚至减少了炎症水平持续升高导致的胰岛素抵抗。

REFERENCES

- [1] LOOMBA R, FRIEDMAN S L, SHULMAN G I. Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Cell, 2021, 184(10): 2537-2564.
- [2] ABDULKHALEQ L A, ASSI M A, ABDULLAH R, et al. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review[J]. Vet World, 2018, 11(5): 627-635.
- [3] SWANSON K V, DENG M, TING J P Y. The NLRP3 inflammasome: Molecular activation and regulation to therapeutics[J]. Nat Rev Immunol, 2019, 19(8): 477-489.
- [4] YANG Y, WANG H N, KOUADIR M, et al. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(2): 128.
- [5] HUANG Y, XU W, ZHOU R B. NLRP3 inflammasome activation and cell death[J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(9): 2114-2127.
- [6] ANDERSON F L, BIGGS K E, RANKIN B E, et al. NLRP3 inflammasome in neurodegenerative disease[J]. Transl Res, 2023(252): 21-33.
- [7] SHARMA B R, KANNEGANTI T D. NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases[J]. Nat Immunol, 2021, 22(5): 550-559.
- [8] PAN H Y, ZHANG N, ZHOU Y, et al. Effects of MCC950 on activation of NLRP3 inflammasome after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2022, 41(12): 754-758.
- [9] LI J H. Levetiracetam ameliorates cognitive impairment in APP/PS1 mice by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and oxidative stress[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(24): 2979-2986.
- [10] DONG X W, ZHENG Z H, LIN P, et al. ACPAs promote IL-1 β production in rheumatoid arthritis by activating the NLRP3 inflammasome[J]. Cell Mol Immunol, 2020, 17(3): 261-271.
- [11] IM Y R, HUNTER H, DE GRACIA HAHN D, et al. A systematic review of animal models of NAFLD finds high-fat, high-fructose diets most closely resemble human NAFLD[J]. Hepatology, 2021, 74(4): 1884-1901.

收稿日期: 2022-12-04

(本文责编: 曹粤锋)