

• 论 著 •

# 基于 NLRP3 信号通路探讨辛伐他汀抑制 COPD 大鼠肺组织细胞焦亡的作用研究<sup>\*</sup>

张 侯,王丽萍,温春生,王海旭<sup>△</sup>

新疆医科大学第五附属医院呼吸与危重症医学科,新疆乌鲁木齐 830011

**摘 要:**目的 基于核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)信号通路探讨辛伐他汀抑制慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠肺组织细胞焦亡的作用。方法 取 40 只雄性 SD 大鼠,采用香烟熏方式构建 COPD 模型。辛伐他汀药物组(8 只)分别于建模第 1~14 天、第 16~29 天和第 31~59 天在烟熏前使用辛伐他汀以 5 mg/kg 剂量灌胃, NLRP3 下调组(8 只)分别于上述时间点经尾静脉注射 NLRP3-siRNA 转染重组载体,空载组(8 只)同时经尾静脉注射 NC-siRNA 转染重组载体,对照组(8 只)和 COPD 模型组(8 只)同时进行等体积生理盐水灌胃。采用酶联免疫吸附试验检测肺泡灌洗液(BALF)上清液和血清中白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-18、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平,采用苏木精-伊红染色观察大鼠肺组织病理改变,采用末端标记法染色观察肺细胞凋亡情况,采用实时荧光定量 PCR 检测肺组织中 NLRP3、凋亡相关点样蛋白(ASC)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1)、IL-1 $\beta$ 、IL-18、TNF- $\alpha$  mRNA 水平,采用免疫组化法检测肺组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 $\beta$ 、IL-18、TNF- $\alpha$  蛋白水平。结果 与 COPD 模型组和空载组比较,辛伐他汀药物组、NLRP3 下调组肺功能指标均改善, BALF 上清液和血清中 IL-1 $\beta$ 、IL-18、TNF- $\alpha$  水平均降低( $P<0.05$ ),肺组织病理改变减轻,肺组织中细胞凋亡率、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$ 、ASC、IL-18、TNF- $\alpha$  mRNA 和蛋白水平降低( $P<0.05$ )。结论 辛伐他汀可抑制 COPD 大鼠肺组织细胞焦亡,其机制可能与抑制 NLRP3/Caspase-1/IL-1 $\beta$  信号通路,进而抑制 ASC、IL-18、TNF- $\alpha$  表达相关。

**关键词:**辛伐他汀; 慢性阻塞性肺病; 核苷酸结合域样受体蛋白 3; 炎症因子; 细胞焦亡

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2023.11.006

**中图法分类号:**R563.9

**文章编号:**1673-4130(2023)11-1305-07

**文献标志码:**A

## Study on the effect of simvastatin on the pyroptosis of lung tissue cells in COPD rats based on NLRP3 signaling pathway<sup>\*</sup>

ZHANG Yu, WANG Liping, WEN Chunsheng, WANG Haixu<sup>△</sup>

Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of simvastatin on pyroptosis in lung tissue of rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) based on the nucleotidebinding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) signaling pathway. **Methods** Totally 40 male SD rats were enrolled, and COPD model was established by smoking. Simvastatin drug group (8 rats) was given 5 mg/kg simvastatin by gavage before smoking from day 1 to day 14, day 16 to day 29 and day 31 to day 59, respectively. NLRP3 siRNA transfection recombinant vector was injected into the tail vein of the NLRP3 down-regulation group (8 rats) respectively at the above time points, and NC-siRNA transfection recombinant vector was injected into the tail vein of the empty vector group (8 rats) at the same time. The control group (8 rats) and COPD model group (8 rats) were given same volume of normal saline by gavage at the same time. The levels of interleukin (IL) -1 $\beta$ , IL-18 and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the supernatant of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the pathological changes of lung tissue. The apoptosis of lung cells was observed by terminal labeling staining. The mRNA levels of NLRP3, apoptosis-associated dot-like protein (ASC), cysteinyl aspartate specific proteinase-1 (Caspase-1), IL-1 $\beta$ , IL-18, and TNF- $\alpha$  in lung tissue were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The protein levels of NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1 $\beta$ , IL-18 and TNF- $\alpha$  in lung tissue were detected by

<sup>\*</sup> 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2019D01C273)。

作者简介:张侯,女,副主任医师,主要从事呼吸与危重症医学相关研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail:66263982@qq.com。

immunohistochemistry. **Results** Compared with the COPD model group and the empty vector group, the simvastatin drug group and NLRP3 down-regulation group had significant improvements in the lung function indexes and significant reductions in the levels of IL-1 $\beta$ , IL-18 and TNF- $\alpha$  in BALF and serum ( $P < 0.05$ ). The pathological changes of lung tissue were alleviated, and the apoptosis rate and the mRNA and protein levels of NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$ , ASC, IL-18 and TNF- $\alpha$  in lung tissue were decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Simvastatin can inhibit pyroptosis in the lung tissue of COPD rats, which may be related to the inhibition of NLRP3/Caspase-1/IL-1 $\beta$  signaling pathway and the expression of ASC, IL-18 and TNF- $\alpha$ .

**Key words:** simvastatin; chronic obstructive pulmonary disease; nucleotidebinding oligomerization domain-like receptor protein 3; inflammatory factors; pyroptosis

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是一种常见的以持续气流受限为特征的肺部疾病<sup>[1]</sup>。目前 COPD 的常规治疗方法仅能达到控制患者症状、抑制病情进展的作用,无法彻底治愈<sup>[2]</sup>。细胞焦亡是一种新型的程序性细胞死亡,可诱发强烈的炎症反应,是 COPD 进展的重要因素<sup>[3-4]</sup>。辛伐他汀主要用于高胆固醇血症、冠心病的治疗,但随着临床研究的进展,有报道指出辛伐他汀可有效治疗 COPD,降低炎症指标水平<sup>[5]</sup>,同时也有研究发现辛伐他汀对 COPD 大鼠有良好的抗炎作用<sup>[6]</sup>。细胞焦亡常伴随核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)信号通路的激活,促进机体释放多种炎症因子,激活强烈的炎症反应<sup>[7]</sup>;研究发现,NLRP3 信号通路参与调控 COPD 发生发展过程中的细胞焦亡<sup>[8]</sup>。但辛伐他汀能否通过调控 NLRP3 信号通路调节 COPD 机体肺组织细胞焦亡的相关报道较少。鉴于此,本研究选取 SD 大鼠进行动物实验,探究辛伐他汀通过调控 NLRP3 信号通路调节 COPD 机体肺组织细胞焦亡的作用与机制。

1 材料与方法

**1.1 材料** 40 只 SD 大鼠,SPF 级,雄性,体重(200 $\pm$ 10)g。SD 大鼠由新疆医科大学动物实验中心提供[许可证编号:SCXK(新)2020-0003],实验于新疆医科大学动物实验管理中心 SPF 级实验室进行。饲养条件:室温(23 $\pm$ 3) $^{\circ}$ C,相对湿度 40%~65%,光照周期 12 h/12 h,自由进食、饮水。本研究经新疆医科大学动物实验管理中心伦理委员会批准(审批号:IACUC20200118-01)。

**1.2 仪器与试剂** 脂多糖(LPS)、辛伐他汀购自美国 SIGMA 公司,批号 L2630、S6196;NLRP3-siRNA 质粒(正义链:5'-AUCUCUTGAACUAUUAUCAAC-3';反义链:5'-CTUAUATCTCTAGGCUA-3')、NC-siRNA 质粒(正义链:5'-ATUCUAUTCGAUAGC-TATATCUAC-3';反义链:5'-CTUAUAGCU-UAGAGGCUA-3')委托深圳晶美生物工程公司合成;Lipofectamine 2000 脂质体购自美国 Invitrogen 公司,批号 PB1021;大鼠白细胞介素(IL)-1 $\beta$  酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )ELISA 检测试剂盒购自联科生物公司,批号 EK301B、EK382;大鼠 IL-18 ELISA 检测试剂盒购自

武汉华美公司,批号 CSB-E04610r;免疫组化染色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 SP9000;末端标记法(TUNEL)凋亡检测试剂盒购自武汉博士德公司,批号 MK1020;大鼠 NLRP3、半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1)、IL-1 $\beta$ 、凋亡相关点样蛋白(ASC)、IL-18、TNF- $\alpha$ 、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)聚合酶链反应(PCR)引物由合肥知恩生物技术有限公司合成;兔抗大鼠 NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$ 、ASC、IL-18、TNF- $\alpha$  抗体购自美国 BIORSS 公司,批号 bs-10021R、bs-0169R、bs-0812R、bs-6741R、bs-0529R、bs-10802R;TRIzol<sup>TM</sup> 试剂盒(总 RNA 提取试剂盒)购自美国 ABI 公司,批号 15596026。

PFTManeuvers 型动物肺功能测量系统购自美国 Buxco 公司,烟熏箱购自上海玉研科学仪器有限公司,Neofuge 15R 型离心机购自上海力申科学仪器有限公司,E200 型光学显微镜购自尼康仪器(上海)有限公司,xMark<sup>TM</sup> 型酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司,7500 型 PCR 仪购自美国 ABI 公司。

1.3 方法

**1.3.1 COPD 大鼠模型建立及药物干预** 将 40 只大鼠随机分成 5 组:对照组、COPD 模型组、辛伐他汀药物组、NLRP3 下调组和空载组,每组 8 只。

对照组大鼠分别于第 15 天和第 30 天通过气道灌输 200 mL 生理盐水,每天自由饮水摄食,不进行香烟烟熏。第 1~14 天、第 16~29 天和第 31~59 天于每天上午使用与药物等体积的生理盐水对大鼠灌胃(气道灌输生理盐水当天不灌胃)。

COPD 模型组大鼠采用香烟烟熏方式<sup>[9]</sup>构建 COPD 模型,分别于第 15 天和第 30 天通过气道灌输 200 mL LPS(1 mg/mL 溶于生理盐水),轻轻摇摆大鼠 20 s,确保注入的 LPS 在肺部分布均匀。第 1~14 天、第 16~29 天和第 31~59 天将大鼠置于烟熏箱内,暴露于均匀燃烧的 12 支去除滤嘴的香烟烟雾中(焦油量为 12 mg,烟气烟碱量为 1.1 mg,烟气 CO 量为 14 mg),每天上、下午各 1 次,每次间隔约 4 h,每次 1 h。每天上午在烟熏前使用与药物等体积生理盐水灌胃(气道灌输 LPS 当天不烟熏、不灌胃)。

辛伐他汀药物组大鼠 COPD 模型建立方法同 COPD 模型组。第 1~14 天、第 16~29 天和第 31~

59 天于每天上午烟熏前对该组大鼠使用辛伐他汀以 5 mg/kg 剂量灌胃(气道灌输 LPS 当天不烟熏、不灌胃)。

NLRP3 下调组和空载组 COPD 模型建立方法同 COPD 模型组。第 1~14 天、第 16~29 天和第 31~59 天于每天上午烟熏前对大鼠分别经尾静脉注射 NLRP3-siRNA 转染重组载体、NC-siRNA 转染重组载体(气道灌输 LPS 当天不烟熏、不注射)。

1.3.2 肺功能测定 各组大鼠于第 60 天,运用动物肺功能测量系统检测动物肺功能,检测指标:呼吸频率(f)、吸气容积(TVb)、每分钟呼气量(MVb)、吸气峰流速(PIFb)、呼气峰流速(PEFb)、吸气时间(Ti)、呼气时间(Te)、呼气中流速(EF50)。

1.3.3 标本收集 各组大鼠于第 60 天进行标本收集。肺泡灌洗液(BALF)标本:大鼠腹腔麻醉,固定,切开胸腹部,分离气管及肺脏,夹闭右主支气管,以 3.0 mL 的 0.9%生理盐水缓慢灌洗左肺,抽出 1.5 mL,反复灌洗 3 次,总共回收液体 4.0~5.0 mL。收集的 BALF 在 700×g(有效离心半径 11 cm)离心 10 min,上清液单独分装,-80 ℃保存。

血清标本:大鼠腹主动脉取血(尽量多抽),4 ℃,3 000 r/min(有效离心半径 11 cm)离心 10 min,取上清液(即血清)单独分装,-80 ℃保存。

右肺组织:大鼠麻醉处死后迅速摘取右肺中叶组织,分成 2 份,一部分直接固定保存于 10%甲醛溶液中,另一部分直接冻存于-80 ℃冰箱。

1.3.4 ELISA 检测 BALF 上清液和血清中 IL-1β、IL-18、TNF-α 水平 取各组大鼠 BALF 上清液及血清标本,ELISA 分别检测 IL-1β、IL-18、TNF-α 水平,检测方法按检测试剂盒说明书进行。

1.3.5 苏木精-伊红(HE)染色观察大鼠肺组织病理改变 取各组大鼠固定于 10%甲醛溶液的 1/3 右肺组织,石蜡包埋,常规切片(4 μm),脱蜡。染色过程:苏木精染色 5 min 后,分色 2~3 s,反蓝 2~3 min;伊红染色 2 min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片后于光学显微镜下观察肺组织切片。

1.3.6 TUNEL 染色观察肺细胞凋亡 取各组大鼠固定于 10%甲醛溶液的 1/3 右肺组织,石蜡包埋,常规切片(4 μm),TUNEL 染色,具体操作按照检测试剂盒说明书进行。

1.3.7 实时荧光定量 PCR(qPCR)检测肺组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1β、IL-18、TNF-α mRNA 水平 取各组大鼠冻存的右肺组织,液氮包围研磨成粉,4 ℃,12 000 r/min(有效离心半径 11 cm)离心 15 min 取上清液,加异丙醇-20 ℃静置 1 min;4 ℃,12 000 r/min(有效离心半径 11 cm)离心 15 min,沉淀即为总 RNA。采用核酸蛋白定量仪检测 RNA 浓度为 1.8~2.1 合格;反转录合成 cDNA,反应条件为 25 ℃反应 10 min,85 ℃反应 5 s。qPCR 扩增

反应:预变性 95 ℃ 10 min;变性 95 ℃ 15 s,40 个循环;延伸 60 ℃ 1 min。引物信息见表 1。待测基因 mRNA 相对表达水平以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示<sup>[10]</sup>。

表 1 qPCR 检测待测基因 mRNA 的引物信息表

| 引物名称        | 序列(5'-3')             | 产物大小<br>(bp) |
|-------------|-----------------------|--------------|
| NLRP3-F     | TATCTCTCCCGCATCTCGATT | 218          |
| NLRP3-R     | ATCTTAGTCCTGCCAATGGTC |              |
| ASC-F       | CTGTGCTTAGAGACATGGGCA | 166          |
| ASC-R       | TTTGTGACCCTGGAATGAGT  |              |
| Caspase-1-F | AGGAGGGAATATGTGGG     | 119          |
| Caspase-1-R | AACCTTGGGCTTGTCTT     |              |
| IL-1β-F     | CTTTGAAGAAGAGCCCGTCC  | 242          |
| IL-1β-R     | CCAAGGCCACAGGGATTTTG  |              |
| IL-18-F     | GTAAGAGGACTGGCTGTGACC | 155          |
| IL-18-R     | CCTGGCACACGTTTCTGAAAG |              |
| TNF-α-F     | ATGGGCTCCCTCTCATCAGT  | 106          |
| TNF-α-R     | GCTTGGTGGTTTGCTACGAC  |              |
| β-Actin-F   | CCCATCTATGAGGGTTACGC  | 150          |
| β-Actin-R   | TTTAATGTACACGACGATTTC |              |

1.3.8 免疫组化检测肺组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1β、IL-18、TNF-α 蛋白水平 取各组大鼠固定于 10%甲醛溶液的剩余右肺组织,石蜡包埋,常规切片(4 μm),按照免疫组化染色试剂盒操作说明检测各组大鼠右肺组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1β、IL-18、TNF-α 蛋白水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据处理和分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠肺功能比较 与对照组比较,COPD 模型组、空载组大鼠 f、TVb、MVb、PIFb、PEFb、EF50 均升高( $P < 0.05$ ),Ti、Te 延长( $P < 0.05$ );与 COPD 模型组、空载组比较,辛伐他汀药物组、NLRP3 下调组 f、TVb、MVb、PIFb、PEFb、EF50 均降低( $P < 0.05$ ),Ti、Te 缩短( $P < 0.05$ )。见表 2。

2.2 各组大鼠 BALF 上清液和血清中 IL-1β、IL-18、TNF-α 水平比较 与对照组比较,COPD 模型组、空载组大鼠 BALF 上清液和血清中 IL-1β、IL-18、TNF-α 水平升高( $P < 0.05$ );与 COPD 模型组、空载组比较,辛伐他汀药物组、NLRP3 下调组大鼠 BALF 上清液和血清中 IL-1β、IL-18、TNF-α 水平降低( $P < 0.05$ )。见表 3。

2.3 HE 染色观察大鼠肺组织病理改变 镜下观察,对照组大鼠肺组织大体结构正常,少部分支气管上皮细胞轻度增生,黏膜下少量慢性炎症细胞浸润;少部

分肺泡壁增生、增厚,间质散在少量慢性炎症细胞浸润;少部分肺泡萎缩、变小。COPD 模型组和空载组大鼠部分支气管黏膜纤毛柱状上皮增生,部分萎缩、脱落,平滑肌层及黏膜下层见大量慢性炎症细胞散在或灶状浸润,部分支气管管腔扩张;部分肺泡壁增厚,实变,间质较多慢性炎细胞浸润,部分肺泡壁萎缩,肺

泡腔变小,部分肺泡壁断裂、扩张;部分支气管伴行血管扩张、充血;部分间质纤维肉芽组织增生。辛伐他汀药物组和 NLRP3 下调组大鼠支气管黏膜增生及破坏程度、周围炎症细胞浸润程度均稍减轻,肺泡壁增厚、萎缩及扩张程度未见明显改变。见图 1。

表 2 各组大鼠肺功能比较( $\bar{x}\pm s,n=8$ )

| 组别        | f(次/分)                        | TVb(mL)                    | MVb(mL/min)                   | PIFb(mL/s)                 |
|-----------|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| 对照组       | 150.302±43.418                | 0.695±0.294                | 100.603±59.073                | 6.766±3.626                |
| COPD 模型组  | 175.526±51.283 <sup>a</sup>   | 1.135±0.308 <sup>a</sup>   | 161.319±27.459 <sup>a</sup>   | 10.879±1.677 <sup>a</sup>  |
| 空载组       | 174.328±50.069 <sup>a</sup>   | 1.141±0.312 <sup>a</sup>   | 160.287±26.669 <sup>a</sup>   | 10.845±1.682 <sup>a</sup>  |
| NLRP3 下调组 | 110.885±42.196 <sup>abc</sup> | 0.824±0.125 <sup>abc</sup> | 134.665±51.563 <sup>abc</sup> | 8.543±2.167 <sup>abc</sup> |
| 辛伐他汀药物组   | 111.343±42.188 <sup>abc</sup> | 0.826±0.128 <sup>abc</sup> | 135.088±52.273 <sup>abc</sup> | 8.826±2.115 <sup>abc</sup> |
| <i>F</i>  | 4.102                         | 15.883                     | 3.074                         | 5.453                      |
| <i>P</i>  | 0.041                         | <0.001                     | 0.048                         | 0.013                      |

| 组别        | PEFb(mL/s)                 | Ti(s)                      | Te(s)                      | EF50(mL/s)                 |
|-----------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 对照组       | 4.608±2.970                | 0.176±0.035                | 0.333±0.099                | 0.316±0.045                |
| COPD 模型组  | 7.769±1.177 <sup>a</sup>   | 0.346±0.050 <sup>a</sup>   | 0.684±0.115 <sup>a</sup>   | 0.514±0.038 <sup>a</sup>   |
| 空载组       | 7.774±1.169 <sup>a</sup>   | 0.347±0.053 <sup>a</sup>   | 0.685±0.116 <sup>a</sup>   | 0.518±0.054 <sup>a</sup>   |
| NLRP3 下调组 | 6.528±2.450 <sup>abc</sup> | 0.230±0.055 <sup>abc</sup> | 0.541±0.140 <sup>abc</sup> | 0.348±0.043 <sup>abc</sup> |
| 辛伐他汀药物组   | 6.507±2.432 <sup>abc</sup> | 0.229±0.053 <sup>abc</sup> | 0.536±0.124 <sup>abc</sup> | 0.355±0.042 <sup>abc</sup> |
| <i>F</i>  | 3.875                      | 3.660                      | 8.754                      | 4.689                      |
| <i>P</i>  | 0.038                      | 0.040                      | 0.003                      | 0.021                      |

注:与对照组比较,<sup>a</sup>*P*<0.05;与 COPD 模型组比较,<sup>b</sup>*P*<0.05;与空载组比较,<sup>c</sup>*P*<0.05。

表 3 各组大鼠 BALF 上清液和血清中 IL-1β、IL-18、TNF-α 水平比较( $\bar{x}\pm s,n=8$ )

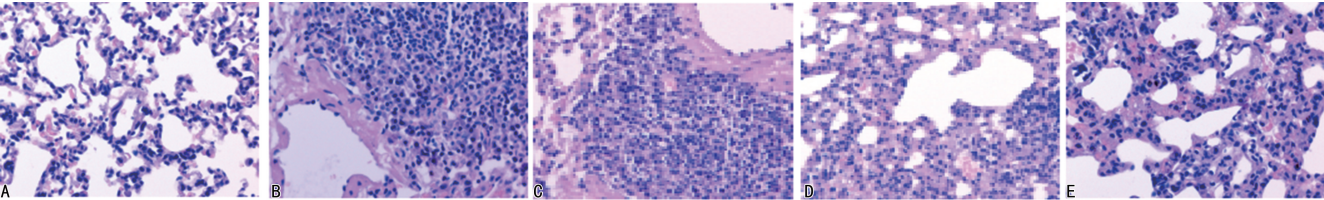
| 组别        | BALF 上清液                     |                               |                            |
|-----------|------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
|           | IL-1β(pg/mL)                 | IL-18(ng/mL)                  | TNF-α(pg/mL)               |
| 对照组       | 48.687±11.347                | 158.743±48.735                | 5.092±1.234                |
| COPD 模型组  | 63.375±12.671 <sup>a</sup>   | 259.300±57.238 <sup>a</sup>   | 7.832±1.221 <sup>a</sup>   |
| 空载组       | 63.428±12.691 <sup>a</sup>   | 257.643±55.339 <sup>a</sup>   | 7.815±1.236 <sup>a</sup>   |
| NLRP3 下调组 | 54.307±12.245 <sup>abc</sup> | 180.629±46.588 <sup>abc</sup> | 6.837±0.821 <sup>abc</sup> |
| 辛伐他汀药物组   | 54.010±12.072 <sup>abc</sup> | 182.456±46.610 <sup>abc</sup> | 6.846±0.819 <sup>abc</sup> |
| <i>F</i>  | 3.968                        | 8.406                         | 12.158                     |
| <i>P</i>  | 0.035                        | 0.003                         | <0.001                     |

| 组别        | 血清                           |                               |                            |
|-----------|------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
|           | IL-1β(pg/mL)                 | IL-18(ng/mL)                  | TNF-α(pg/mL)               |
| 对照组       | 70.990±16.474                | 175.191±59.574                | 8.535±2.090                |
| COPD 模型组  | 109.123±23.573 <sup>a</sup>  | 297.020±113.947 <sup>a</sup>  | 12.957±4.041 <sup>a</sup>  |
| 空载组       | 109.415±22.534 <sup>a</sup>  | 299.884±110.006 <sup>a</sup>  | 12.963±4.152 <sup>a</sup>  |
| NLRP3 下调组 | 86.956±12.674 <sup>abc</sup> | 195.597±36.426 <sup>abc</sup> | 9.712±2.937 <sup>abc</sup> |
| 辛伐他汀药物组   | 87.048±12.555 <sup>abc</sup> | 195.503±36.621 <sup>abc</sup> | 9.899±2.903 <sup>abc</sup> |
| <i>F</i>  | 8.936                        | 6.324                         | 4.785                      |
| <i>P</i>  | 0.001                        | 0.006                         | 0.019                      |

注:与对照组比较,<sup>a</sup>*P*<0.05;与 COPD 模型组比较,<sup>b</sup>*P*<0.05;与空载组比较,<sup>c</sup>*P*<0.05。

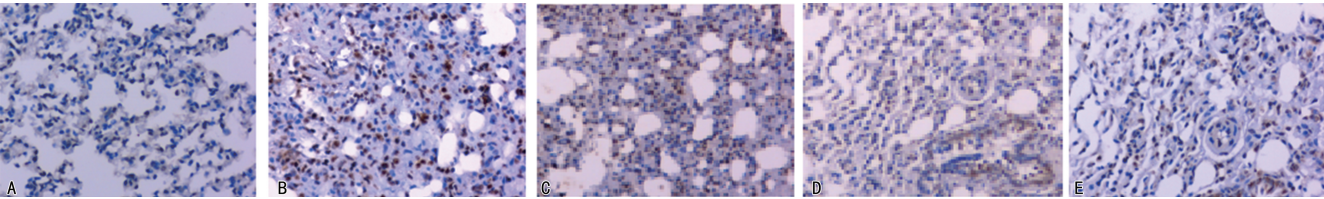
**2.4 TUNEL 染色观察大鼠肺组织细胞凋亡** 与对照组比较, COPD 模型组、空载组大鼠肺组织细胞凋亡率升高( $P<0.05$ ); 与 COPD 模型组、空载组比较,

辛伐他汀药物组和 NLRP3 下调组大鼠肺组织细胞凋亡率降低( $P<0.05$ ), 见表 4、图 2。



注: A、B、C、D、E 分别为对照组、COPD 模型组、空载组、NLRP3 下调组、辛伐他汀药物组大鼠肺组织 HE 染色图。

图 1 大鼠肺组织 HE 染色结果(×200)



注: A、B、C、D、E 分别为对照组、COPD 模型组、空载组、NLRP3 下调组、辛伐他汀药物组大鼠肺组织凋亡图。

图 2 大鼠肺组织细胞凋亡(×200)

表 4 各组凋亡率比较( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别        | <i>n</i> | 凋亡率(%)                      |
|-----------|----------|-----------------------------|
| 对照组       | 8        | 13.833±8.841                |
| COPD 模型组  | 8        | 33.500±13.809 <sup>a</sup>  |
| 空载组       | 8        | 32.983±13.654 <sup>a</sup>  |
| NLRP3 下调组 | 8        | 20.156±5.308 <sup>abc</sup> |
| 辛伐他汀药物组   | 8        | 19.333±5.046 <sup>abc</sup> |
| <i>F</i>  |          | 6.458                       |
| <i>P</i>  |          | 0.009                       |

注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; 与 COPD 模型组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$ ; 与空载组比较, <sup>c</sup> $P<0.05$ 。

**2.5 各组大鼠肺组织 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、ASC、IL-18、TNF-α mRNA 水平比较** 与对照组比

较, COPD 模型组、空载组 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、ASC、IL-18、TNF-α mRNA 水平升高( $P<0.05$ ); 与 COPD 模型组、空载组比较, 辛伐他汀药物组、NLRP3 下调组 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、ASC、IL-18、TNF-α mRNA 水平降低( $P<0.05$ )。见表 5。

**2.6 各组大鼠肺组织 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、ASC、IL-18、TNF-α 蛋白免疫组化评分比较** 与对照组比较, COPD 模型组、空载组 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、ASC、IL-18、TNF-α 蛋白免疫组化评分升高( $P<0.05$ ); 与 COPD 模型组、空载组比较, 辛伐他汀药物组、NLRP3 下调组 NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-18、TNF-α 蛋白免疫组化评分降低( $P<0.05$ )。见表 6。

表 5 各组大鼠肺组织 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、ASC、IL-18、TNF-α mRNA 水平比较( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

| 组别        | NLRP3                      | Caspase-1                  | IL-1β                      | ASC                        | IL-18                      | TNF-α                      |
|-----------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 对照组       | 1.074±0.470                | 1.102±0.453                | 1.121±0.586                | 1.113±0.519                | 1.086±0.482                | 1.081±0.488                |
| COPD 模型组  | 2.007±0.846 <sup>a</sup>   | 2.125±0.970 <sup>a</sup>   | 2.481±1.264 <sup>a</sup>   | 2.526±1.235 <sup>a</sup>   | 2.612±1.386 <sup>a</sup>   | 1.982±0.821 <sup>a</sup>   |
| 空载组       | 2.015±0.843 <sup>a</sup>   | 2.127±0.967 <sup>a</sup>   | 2.489±1.270 <sup>a</sup>   | 2.531±1.242 <sup>a</sup>   | 2.624±1.390 <sup>a</sup>   | 1.978±0.845 <sup>a</sup>   |
| NLRP3 下调组 | 1.288±0.220 <sup>abc</sup> | 1.368±0.241 <sup>abc</sup> | 1.547±0.376 <sup>abc</sup> | 1.487±0.370 <sup>abc</sup> | 1.520±0.261 <sup>abc</sup> | 1.463±0.382 <sup>abc</sup> |
| 辛伐他汀药物组   | 1.294±0.218 <sup>abc</sup> | 1.371±0.234 <sup>abc</sup> | 1.553±0.385 <sup>abc</sup> | 1.485±0.367 <sup>abc</sup> | 1.519±0.263 <sup>abc</sup> | 1.477±0.388 <sup>abc</sup> |
| <i>F</i>  | 5.308                      | 4.962                      | 4.875                      | 5.787                      | 5.763                      | 4.925                      |
| <i>P</i>  | 0.017                      | 0.022                      | 0.023                      | 0.014                      | 0.015                      | 0.022                      |

注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; 与 COPD 模型组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$ ; 与空载组比较, <sup>c</sup> $P<0.05$ 。

表 6 各组大鼠肺组织 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、ASC、IL-18、TNF-α 蛋白免疫组化评分比较( $\bar{x}\pm s$ , 分,  $n=8$ )

| 组别       | NLRP3                     | Caspase-1                 | IL-1β                     | ASC                       | IL-18                    | TNF-α                     |
|----------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 对照组      | 6.667±1.966               | 6.000±1.170               | 6.500±1.225               | 8.000±1.897               | 8.000±1.549              | 7.000±1.549               |
| COPD 模型组 | 12.000±0.032 <sup>a</sup> | 12.000±2.250 <sup>a</sup> | 10.000±1.549 <sup>a</sup> | 10.500±1.549 <sup>a</sup> | 9.500±1.225 <sup>a</sup> | 10.000±1.549 <sup>a</sup> |
| 空载组      | 12.075±0.026 <sup>a</sup> | 12.018±2.243 <sup>a</sup> | 10.096±1.562 <sup>a</sup> | 10.521±1.552 <sup>a</sup> | 9.530±1.221 <sup>a</sup> | 10.048±1.551 <sup>a</sup> |

| 续表 6 各组大鼠肺组织 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、ASC、IL-18、TNF-α 蛋白免疫组化评分比较( $\bar{x} \pm s$ , 分, $n = 8$ ) |                            |                            |                            |                            |                            |                            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 组别                                                                                            | NLRP3                      | Caspase-1                  | IL-1β                      | ASC                        | IL-18                      | TNF-α                      |
| NLRP3 下调组                                                                                     | 7.449±1.626 <sup>abc</sup> | 9.035±1.208 <sup>abc</sup> | 8.511±1.228 <sup>abc</sup> | 9.507±1.224 <sup>abc</sup> | 9.020±0.015 <sup>abc</sup> | 8.030±1.544 <sup>abc</sup> |
| 辛伐他汀药物组                                                                                       | 7.500±1.643 <sup>abc</sup> | 9.000±1.200 <sup>abc</sup> | 8.500±1.225 <sup>abc</sup> | 9.500±1.225 <sup>abc</sup> | 9.000±0.012 <sup>abc</sup> | 8.000±1.549 <sup>abc</sup> |
| F                                                                                             | 24.627                     | 10.596                     | 10.113                     | 3.925                      | 3.183                      | 5.996                      |
| P                                                                                             | <0.001                     | <0.001                     | 0.001                      | 0.041                      | 0.045                      | 0.011                      |

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 COPD 模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与空载组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

3 讨 论

吸烟是 COPD 的主要病因,烟草燃烧后释放大 量有毒物质,可促进肺组织细胞焦亡,促进炎症细胞释 放炎症因子,引起肺部炎症反应,造成肺组织损伤<sup>[11]</sup>。 目前 COPD 的临床治疗主要为家庭氧疗、呼吸肌锻炼 等康复型治疗和药物治疗,但只能达到缓解作用,无 法根本性逆转病变,且目前临床并无特效药,因而仍 需探索更加高效的药物。

本研究结果显示,COPD 模型组和空载组大鼠肺 组织平滑肌层及黏膜下层见大量慢性炎症细胞散在 或灶状浸润,肺泡间质较多慢性炎症细胞浸润,与既 往研究构建 COPD 模型一致<sup>[12]</sup>,证实本研究模型构 建成功。本研究结果表明,辛伐他汀可改善 COPD 大 鼠肺功能,改善肺组织病理情况,抑制肺细胞凋亡,发 挥抑制肺细胞焦亡的功能,且其作用与下调 NLRP3 表 达的效果一致。细胞焦亡可诱导强炎症反应,有报 道指出,辛伐他汀可抑制 COPD 小鼠炎症反应<sup>[13]</sup>,推 测辛伐他汀可能通过抑制炎症反应从而抑制肺细胞 焦亡。

本研究结果表明,辛伐他汀可下调 BALF 上清液 和血清中 IL-1β、IL-18、TNF-α 表达,抑制肺组织 NL- RP3、ASC、Caspase-1、IL-1β、IL-18、TNF-α 表达,发挥 抑制肺细胞焦亡的作用,与下调 NLRP3 表达的作用 相当,推测辛伐他汀是通过抑制 NLRP3 从而抑制其 下游分子表达、减轻炎症反应、减少肺细胞焦亡。细 胞焦亡作为一种新的程序性细胞死亡,在其发生过程 中常伴随 NLRP3 信号通路的激活,当 NLRP3 与 COPD 机体内激活炎症小体的信号分子结合后,促进 NLRP3 炎症小体形成,导致 Caspase-1 激活,活化 Caspase-1 促进 IL-1β、IL-18、TNF-α 释放,诱导细胞 焦亡,引起强炎症反应<sup>[14-15]</sup>。RAO 等<sup>[16]</sup>指出通过激 活 NLRP3 信号通路,促进 IL-1β、IL-18 表达可促进 COPD 气道上皮细胞焦亡;MO 等<sup>[17]</sup>指出,激活 NL- RP3 信号通路,上调 IL-1β、IL-18 水平可诱导 COPD 气道上皮细胞焦亡;TIAN 等<sup>[18]</sup>指出,通过抑制 NL- RP3 炎症小体途径可改善香烟烟雾诱导的 COPD 大 鼠肺炎症及细胞焦亡;李海霞<sup>[19]</sup>指出,通过抑制 NL- RP3 信号通路,可降低 COPD 炎症水平,降低细胞焦 亡作用。本研究结果与上述研究一致,提示辛伐他汀 可能通过抑制 NLRP3/Caspase-1/IL-1β 信号通路,抑 制 ASC、IL-18、TNF-α 表达,发挥抑制 COPD 肺组织

细胞焦亡的作用。

综上所述,辛伐他汀可抑制 COPD 肺组织细胞焦 亡,其机制可能是通过抑制 NLRP3/Caspase-1/IL-1β 信号通路,抑制 ASC、IL-18 和 TNF-α 表达实现的。

参考文献

[1] LIU S,ZHOU Y,ZOU W,et al. Prevalence and charac- teristics of chronic obstructive pulmonary disease in China with a diagnostic criterion of FEV<sub>1</sub>/FVC less than the lower limit of normal:a reanalysis of Chinese epidemio- logical survey of COPD (CESCOPD) study[J]. J Thorac Dis,2021,13(7):4043-4053.

[2] MACLEOD M,PAPI A,CONTOLI M,et al. Chronic ob- structive pulmonary disease exacerbation fundamentals: diagnosis, treatment, prevention and disease impact[J]. Respiriology,2021,26(6):532-551.

[3] ROSENBAUM S R,WILSKI N A,APLIN A E. Fueling the fire:inflammatory forms of cell death and implications for cancer immunotherapy[J]. Cancer Discov,2021,11 (2):266-281.

[4] PENG W J,WU Y Y,ZHANG G,et al. GLIPR1 protects against cigarette smoke-induced airway inflammation via PLAU/EGFR signaling[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis,2021,16(1):2817-2832.

[5] 李乐,杨楠,周奇,等. 辛伐他汀辅助治疗慢性阻塞性肺疾 病有效性和安全性的 Meta 分析[J]. 中国循证医学杂志, 2021,21(2):145-152.

[6] 刘青,孙伯坚,任冬飞,等. 辛伐他汀对慢性阻塞性肺疾病 大鼠的抗炎作用及其机制研究[J]. 实用临床医药杂志, 2021,25(18):15-19.

[7] ZHENG M,KANNEGANTI T D. The regulation of the ZBP1-NLRP3 inflammasome and its implications in py- roptosis,apoptosis,and necroptosis(PANoptosis)[J]. Im- munol Rev,2020,297(1):26-38.

[8] TSAI Y M,CHIANG K H,HUNG J Y,et al. Der f1 in- duces pyroptosis in human bronchial epithelia via the NL- RP3 inflammasome[J]. Int J Mol Med,2018,41(2):757- 764.

[9] RUI C,DEFU L,LINGLING W,et al. Cigarette smoke or motor vehicle exhaust exposure induces PD-L1 upregula- tion in lung epithelial cells in COPD model rats[J]. COPD,2022,19(1):206-215.

[10] KUMAR A,LORAND D. Robust ΔΔCt estimate[J]. Ge- nomics,2021,113(1):420-427.

- cancer (CRITICS): an international, open-label, randomised phase 3 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2018, 19(5): 616-628.
- [7] SHAPIRO J, VAN LANSCHOT J J B, HULSHOF M C M, et al. Neoadjuvant chemoradiotherapy plus surgery versus surgery alone for oesophageal or junctional cancer (CROSS): long-term results of a randomised controlled trial[J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(9): 1090-1098.
- [8] LI C Q, ZHAO S G, ZHENG Y Y, et al. Preoperative pembrolizumab combined with chemoradiotherapy for oesophageal squamous cell carcinoma (PALACE-1) [J]. *Eur J Cancer*, 2021, 144: 232-241.
- [9] ARNAL M J D, ARENAS Á F, ARBELOA Á L. Esophageal cancer: risk factors, screening and endoscopic treatment in Western and Eastern countries[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(26): 7933-7943.
- [10] CUI T T, ZHANG H J, YU T, et al. Pattern of recurrence in 428 patients with thoracic esophageal squamous cell carcinoma after radical surgery and its implication in postoperative radiotherapeutic clinical target volume[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 652365.
- [11] SU M, TANG J M, ZHANG B H, et al. LncRNA GACAT3 promotes esophageal squamous cell carcinoma progression through regulation of miR-149/FOXO1 [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 478.
- [12] HOSCH S B, IZBICKI J R, PICHLMEIER U, et al. Expression and prognostic significance of immunoregulatory molecules in esophageal cancer[J]. *Int J Cancer*, 1997, 74(6): 582-587.
- [13] WU T, WU C X, ZHAO X Y, et al. Extrachromosomal DNA formation enables tumor immune escape potentially through regulating antigen presentation gene expression [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 3590.
- [14] WANG X, KUTSCHAT A P, YAMADA M, et al. Bromodomain protein BRDT directs DeltaNp63 function and super-enhancer activity in a subset of esophageal squamous cell carcinomas[J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(7): 2207-2220.
- [15] DALEY D, MANI V R, MOHAN N, et al. Dectin 1 activation on macrophages by galectin 9 promotes pancreatic carcinoma and peritumoral immune tolerance [J]. *Nat Med*, 2021, 27(12): 2247-2248.
- [16] LI H F, SUN L W, ZHUANG Y, et al. Molecular mechanisms and differences in lynch syndrome developing into colorectal cancer and endometrial cancer based on gene expression, methylation, and mutation analysis[J]. *Cancer Causes Control*, 2022, 33(4): 489-501.
- [17] DU W F, MIAO Y, ZHANG G Q, et al. The regulatory role of neuropeptide gene glucagon in colorectal cancer: a comprehensive bioinformatic analysis [J]. *Dis Markers*, 2022, 2022: 4262600.
- [18] HERLIN G, LUNDELL L, OST A, et al. Quantitative assessment of (99m) tc-depreotide uptake in oesophageal cancer and precursor conditions and its reflection in immunohistochemically detected somatostatin receptors[J]. *Radiol Res Pract*, 2012, 2012: 415616.
- [19] TANG C, KAMIYA T, LIU Y, et al. Inhibition of dectin-1 signaling ameliorates colitis by inducing lactobacillus-mediated regulatory T cell expansion in the intestine[J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 18(2): 183-197.
- [20] WANG S, BAO Z, LIANG Q M, et al. Octreotide stimulates somatostatin receptor-induced apoptosis of SW480 colon cancer cells by activation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , a Wnt/ $\beta$ -catenin pathway modulator [J]. *Hepatogastroenterology*, 2013, 60(127): 1639-1646.
- (收稿日期: 2022-10-12 修回日期: 2023-01-31)
- (上接第 1310 页)
- [11] ZHANG M Y, JIANG Y X, YANG Y C, et al. Cigarette smoke extract induces pyroptosis in human bronchial epithelial cells through the ROS/NLRP3/caspase-1 pathway [J]. *Life Sci*, 2021, 269(1): 119090.
- [12] WANG W, WU W, WANG B, et al. Effect of houttuynia on improving lung injury in chronic obstructive pulmonary disease by regulating the TLR4 signaling pathway[J]. *Food Sci Nutr*, 2021, 9(7): 3389-3396.
- [13] 林德华, 王成枫, 余养生. 辛伐他汀通过调控 NOTCH 信号通路来抑制慢阻肺免疫失衡和炎症反应[J]. *临床肺科杂志*, 2019, 24(5): 839-845.
- [14] HUANG Y, XU W, ZHOU R. NLRP3 inflammasome activation and cell death [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(9): 2114-2127.
- [15] WANG L, CHEN Q, YU Q, et al. TREM-1 aggravates chronic obstructive pulmonary disease development via activation NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis [J]. *Inflamm Res*, 2021, 70(9): 971-980.
- [16] RAO Y, GAI X, XIONG J, et al. Transient receptor potential cation channel subfamily V member 4 mediates pyroptosis in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Front Physiol*, 2021, 12(1): 783891.
- [17] MO R, ZHANG J, CHEN Y, et al. Nicotine promotes chronic obstructive pulmonary disease via inducing pyroptosis activation in bronchial epithelial cells [J]. *Mol Med Rep*, 2022, 25(3): 92.
- [18] TIAN X, XUE Y, XIE G, et al. Epicatechin ameliorates cigarette smoke-induced lung inflammation via inhibiting ROS/NLRP3 inflammasome pathway in rats with COPD [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2021, 429(1): 115674.
- [19] 李海霞. 自拟调肺饮对慢性阻塞性肺疾病稳定期患者 NLRP3 mRNA/NLRP3/IL-1 $\beta$  细胞焦亡通路的影响[J]. *环球中医药*, 2019, 12(8): 1268-1271.
- (收稿日期: 2022-09-30 修回日期: 2023-02-11)