doi:10.11659/jjssx.08E021143

·基础研究·

神经病理性疼痛大鼠中脑导水管周围灰质腹外侧区 NLRP3 炎症小体激活水平研究

傅丹泓[1,2],彭梅静[1,2],黄海英[1,2],高贤伟[1,2] (1.福建中医药大学附属康复医院麻醉科,福建 福州 350003;2.福建省康复技术重点实验室,福建 福州 350003)

[摘 要] **目的** 探讨核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体在神经病理性疼痛大鼠中脑导水管周围灰质腹外侧区(vlPAG)的表达水平及其作用。**方法** 选取SPF级SD大鼠20只,采用随机数字表法分为假手术组(Sham组)与慢性坐骨神经压迫性损伤组(CCI组),每组10只。于手术前后测定2组机械痛阈与热痛阈;Western blot检测2组NLRP3炎症小体各组分蛋白表达水平;RT-PCR检测2组NLRP3炎症小体各组分基因mRNA表达水平;酶联免疫吸附实验(ELISA)检测2组炎症因子白介素-lβ(IL-1β)及白介素-18(IL-18)表达水平;免疫荧光检测2组中NLRP3炎症小体在vlPAG的分布情况,并与小胶质细胞标志物IBA1进行共定位分析。**结果** 与Sham组相比,CCI组术后3 d、7 d、14 d、21 d机械痛阈与热痛阈均明显降低($P<0.001$);与Sham组相比,CCI组核心蛋白NLRP3、效应蛋白Caspase-1 p10及前体蛋白pro-Caspase-1表达水平均明显升高($P<0.001$);与Sham组相比,CCI组NLRP3($P<0.001$)、Caspase-1($P<0.001$)及IL-1β($P<0.01$)mRNA表达水平均明显升高,炎症因子IL-1β($P<0.001$)与IL-18($P<0.01$)表达水平也明显升高;与Sham组相比,CCI组在vlPAG的NLRP3阳性细胞数增加,且与IBA1存在共表达。**结论** 神经病理性疼痛大鼠vlPAG中NLRP3炎症小体被激活且表达水平增高,提示NLRP3炎症小体激活水平与神经病理性疼痛大鼠痛阈下降相关。

[关键词] 神经病理性疼痛;中脑导水管周围灰质腹外侧区;NLRP3炎症小体;炎症因子;慢性坐骨神经压迫性损伤

[中图分类号] R741.02 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-08-27

Activation levels of NLRP3 inflammasomes in the ventrolateral periaqueductal gray of rats with neuropathic pain

FU Dan-hong[1,2], PENG Mei-jing[1,2], HUANG Hai-ying[1,2], GAO Xian-wei[1,2] (1. Department of Anesthesiology, Rehabilitation Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou Fujian 350003, China; 2. Fujian Key Laboratory of Rehabilitation Technology, Fuzhou Fujian 350003, China)

Abstract: Objective To detect the expression levels of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasomes in the ventrolateral periaqueductal gray (vlPAG) of rats with neuropathic pain and its role. **Methods** A total of 20 SPF SD rats were selected and divided into the Sham operation group (the Sham group) and the chronic constriction injury of the sciatic nerve group (the CCI group) by random number table method, with 10 rats in each group. The mechanical pain threshold and thermal pain threshold in the two groups were measured before and after surgery. The protein expression levels of each component of the NLRP3 inflammasomes in the two groups were detected by Western blot. The mRNA expression levels of each component of the NLRP3 inflammasomes in the two groups were detected by RT-PCR. The expression levels of inflammatory factors interleukin-1β (IL-1β) and interleukin-18 (IL-1β) in the two groups were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The distribution of NLRP3 inflammasomes in vlPAG in the two groups was detected by immunofluorescence, and co-localization analysis was performed with the microglia marker IBA1. **Results** Compared with the Sham group, the mechanical pain threshold and thermal pain threshold in the CCI group were significantly decreased 3 days, 7 days, 14 days, and 21 days after surgery ($P<0.001$). Compared with the Sham group, the expression levels of core protein NLRP3, effector protein Caspase-1 p10 and precursor protein pro-Caspase-1 in the CCI group were significantly increased ($P<0.001$). Compared with the Sham group, the mRNA expression levels of NLRP3 ($P<0.001$), Caspase-1 ($P<0.001$) and IL-1β ($P<0.01$) in the CCI group were significantly increased, as well as the expression levels of inflammatory factors IL-1β ($P<0.001$) and IL-18 ($P<0.01$). Compared with the Sham group, the number of NLRP3 positive cells in vlPAG was increased in the CCI group, and NLRP3 was co-expressed with IBA1. **Conclusion** NLRP3 inflammasomes in vlPAG of rats with neuropathic pain are activated and the expression levels are increased, suggesting that the activation levels of NLRP3 inflammasomes are related to the decrease of pain threshold in rats with neuropathic pain.

Keywords: neuropathic pain; ventrolateral periaqueductal gray; NLRP3 inflammasomes; inflammatory factors; chronic constriction injury of the sciatic nerve

[基金项目] 中央引导地方科技发展专项(2018L3009)

[通信作者] 高贤伟,E-mail:13859015958@138.com

核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3,NLRP3)炎症小体是固有免疫系统的重要成分,由核心蛋白NLRP3、连接蛋白ASC与效应蛋白Caspase-1组成,可识别病原体、应激和损伤等刺激,介导炎症因子白介素-lβ(interleukin-1β,IL-1β)与白介素-18(interleukin-18,IL-18)的成熟与释放,在脓毒症、糖尿病、动脉粥样硬化以及炎症性肠病等多种疾病中发挥重要作用[1-3]。神经病理性疼痛是由外周或中枢神经系统损伤引起的疼痛[4-6],也可由带状疱疹、糖尿病、神经损伤及自身免疫性疾病等引起[7]。神经病理性疼痛以自发性疼痛、痛觉过敏和痛觉超敏为特征,发病率为3.3%~8.2%[8],治愈率低,易复发,同时会导致患者焦虑、抑郁等,给患者带来极大的痛苦[9]。有研究发现,NLRP3炎症小体可在神经病理性疼痛中发挥重要作用,该结论在慢性坐骨神经压迫性损伤(chronic constriction injury of the sciatic nerve,CCI)动物模型中得到了初步验证[10-12]。有研究表明,中脑导水管周围灰质腹外侧区(ventrolateral periaqueductal gray,vlPAG)在神经病理性疼痛的发生发展中具有重要作用[13-16]。然而有关NLRP3炎症小体在神经病理性疼痛vlPAG中的变化情况及作用尚不明确。因此,本研究采用CCI大鼠模型对vlPAG中NLRP3炎症小体及其下游炎症因子的变化进行探索,进一步阐明神经病理性疼痛的发生机制,以期为神经病理性疼痛治疗新靶点的开发提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

酶标仪(BioTek公司,美国),超声破碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司,中国),荧光显微镜(Leica公司,德国),RIPA裂解液(上海碧云天生物有限公司,中国),NLRP3兔源一抗、pro-Caspase-1兔源一抗、Caspase-1 p10兔源一抗、ASC兔源一抗、IBA1鼠源一抗(Abcam公司,美国),Western blot山羊抗兔二抗(Cell Signaling Technology公司,美国),免疫荧光二抗(武汉塞维尔生物科技有限公司,中国),ECL发光试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司,中国),4% PFA、10×PBS(武汉塞维尔生物科技有限公司,中国),蔗糖(上海国药有限公司,中国),引物(上海生工生物工程股份有限公司,中国),逆转录及扩增试剂盒(TAKARA公司,日本),酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司,中国)。

1.2 动物及模型制备

本实验严格遵守动物实验相关伦理规定,在保证实验需求的情况下减少动物的使用量,保障动物福利,并尽可能减轻动物所承受的非实验必要的痛苦。

SPF级SD大鼠20只,7周龄,体质量190~210 g,均由上海杰思捷实验动物有限公司提供。每笼4只,自由进食进水,温度22~26 ℃,湿度50%~60%。饲养1周后进行CCI模型制备。采用随机数字表法将20只大鼠分为假手术组(Sham组)与慢性坐骨神经压迫性损伤组(CCI组),每组10只。

CCI组大鼠采用10%水合氯醛5 mL/kg腹腔注射麻醉,随后俯卧位固定四肢,手术区域备皮、消毒、铺巾,作约0.5 cm的手术切口,钝性分离肌肉,暴露右侧坐骨神经中段。坐骨神经主干采用4道4-0尼龙非可吸收线结扎,间距1 mm,结扎线的松紧程度以结扎线可在坐骨神经上轻微滑动并可使右后肢坐骨神经支配的肌肉产生轻微抽搐为准,术毕分层缝合肌肉及皮肤,使用青霉素眼膏涂抹伤口。Sham组仅切开皮肤,钝性分离肌肉,游离相同长度坐骨神经但不作结扎,其他操作同CCI组。所有动物模型制备均由同一操作者完成,以保证模型均一稳定。

1.3 机械痛阈与热痛阈检测

采用双盲法分别于术前及术后3 d、7 d、14 d、21 d测定痛阈。机械痛阈:将大鼠单独置于底部带孔(孔径0.5 cm×0.5 cm)的透明有机玻璃箱内适应30 min,电子von Frey测痛仪以不同压力刺激大鼠患肢足底中部2 s,记录诱发缩足反应时的压力值,间隔10 min,测量3次,取其平均值。热痛阈:将透明有机玻璃箱置于3 mm厚的玻璃板上,用全自动热痛刺激仪(BME-410C型)照射大鼠患肢足底,记录诱发抬腿回避的时间;为防止组织损伤,照射时间不超过50 s。

1.4 Western blot

大鼠于术后21 d麻醉后放血处死,迅速取脑组织,每只大鼠切下相同体积vlPAG置入RIPA裂解液和蛋白酶抑制剂的混合液中(裂解液:脑组织=10 μL:1 mg;蛋白酶抑制剂:裂解液=1:100),充分研磨后4 ℃震荡30 min,随后12 000 r/min离心30 min,取上清,相同条件再次离心,取上清。BCA法测定蛋白浓度。Loadingbuffer混合β-巯基乙醇后加入蛋白上清中,100 ℃变性10 min。用10%十二烷基硫酸钠—

聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白(90 V,30 min;120 V,1.5 h)。200 mA 恒流 2 h 转膜,将蛋白转移到 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h,TBST 清洗 3 次,一抗(NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、Caspase-1 p10、GAPDH,1∶1 000)4 ℃摇床孵育过夜;TBST 清洗 3 次,辣根过氧化物酶标二抗(1∶2 000)室温孵育 1 h;TBST 清洗 3 次,ECL 曝光显色。

1.5 总 RNA 提取及 RT-PCR

取部分 vlPAG 加入 500 μL Trizol 液体中,充分研磨后加入 250 μL 氯仿,剧烈震荡 10 s,4 ℃下 12 000 r/min 离心 20 min,取上清,加入等体积异丙醇,4 ℃下 12 000 r/min离心 20 min,弃去上清,用焦碳酸二乙酯水配制的 75% 乙醇清洗沉淀 2 次,4 ℃下 7 500 r/min 离心 10 min,晾干后使用 20 μL 焦碳酸二乙酯溶解,测定 RNA 浓度。设置逆转录体系,加入 1 000 ng RNA 后逆转录成 cDNA。因 RT-PCR 扩增孔板孔数限制,每组样本取 6 只大鼠进行实验,若出现统计学差异,即认为组间存在统计学差异。根据各基因设置 PCR 扩增体系,点样后离心进行 PCR,扩增引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列
NLRP3	F:5'-GCTGTGTGAGGCACTCCAG-3'
	R:5'-GAAACAGCATTGATGGGTCA-3'
ASC	F:5'-GGACCAACACAGGCAAGCACTC-3'
	R:5'-ACAAGTTCTTGCAGGTCAGGTTCC-3'
Caspase-1	F:5'-ATGGACAAGTCAAGCCGCACAC-3'
	R:5'-TCCCACAAATGCCTTCCCGAATAC-3'
IL-1β	F:5'-TGTGATGAAAGACGGCACAC-3'
	R:5'-CTTCTTCTTTGGGTATTGTTTGG-3'
IL-18	F:5'-GCCTGATATCGACCGAACA-3'
	R:5'-CCTTCCATCCTTCACAGATAGG-3'
GADPH	F:5'-TGTTGCCATCAACGACCCCTT-3'
	R:5'-CTCCACGACATACTCAGCA-3'

1.6 ELISA

新鲜 vlPAG 加入预冷生理盐水,匀浆研磨,冰浴超声破碎。4 ℃下 12 000 r/min 离心 20 min,取上清。检测蛋白浓度后按 ELISA 说明书检测炎症因子 IL-1β 与 IL-18 的表达水平。

1.7 免疫荧光实验

大鼠预冷生理盐水灌流后,预冷 4% PFA 灌流取全脑,4 ℃下 4% PFA 固定 24 h,20% 蔗糖脱水沉底,30% 蔗糖沉底。聚乙二醇和聚乙烯醇水溶性混合物冰冻包埋、切片,预冷 PBS 漂洗,1 × 柠檬酸抗原修复液加热抗原修复,10% BSA 室温封闭 1 h。一抗(1∶1 000)4 ℃孵育过夜,PBS 漂洗 3 次;二抗(1∶2 000)室温孵育 2 h,PBS 漂洗 3 次;DAPI 孵育 30 min,PBS 漂洗,抗猝灭剂封片。于荧光显微镜及低倍镜下观察,根据大鼠大脑解剖图谱找到 vlPAG,摄取不同荧光通道图片。

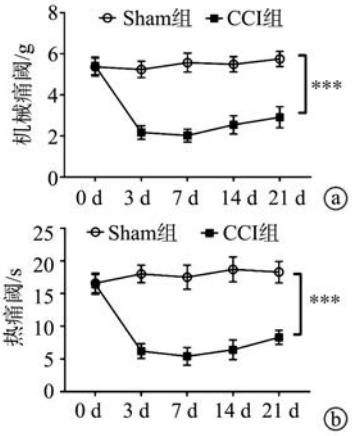
1.8 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。正态分布的计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,重复测量数据采用多因素方差分析。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 机械痛阈与热痛阈比较

与 Sham 组相比,CCI 组术后 3 d、7 d、14 d、21 d 机械痛阈与热痛阈均明显降低,差异有统计学意义($P<0.001$),见图 1。



a:机械痛阈;b:热痛阈 ***:与 Sham 组相比,$P<0.001$

图 1 大鼠机械痛阈与热痛阈

2.2 NLRP3 炎症小体各组分蛋白表达

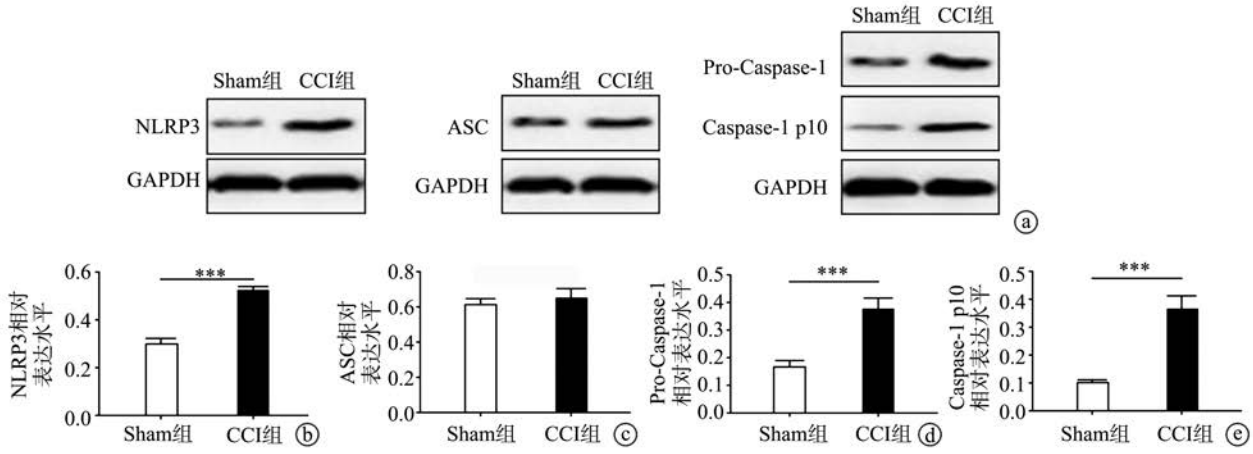
Western blot 显示,与 Sham 组相比,CCI 组 vlPAG 术后 21 d NLRP3 炎症小体核心蛋白 NLRP3、前体蛋白 pro-Caspase-1 与效应蛋白 Caspase-1 p10 表达水平均明显升高($P<0.001$),2 组连接蛋白 ASC 表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 2。

2.3 NLRP3 炎症小体及下游基因 mRNA 表达

RT-PCR 结果显示,与 Sham 组相比,CCI 组 vlPAG 中 NLRP3 炎症小体各组分基因 NLRP3($P<0.001$)、Caspase-1($P<0.001$)、IL-1β($P<0.01$)mRNA 表达水平均明显升高,2 组 ASC 与 IL-18 mRNA 表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 3。

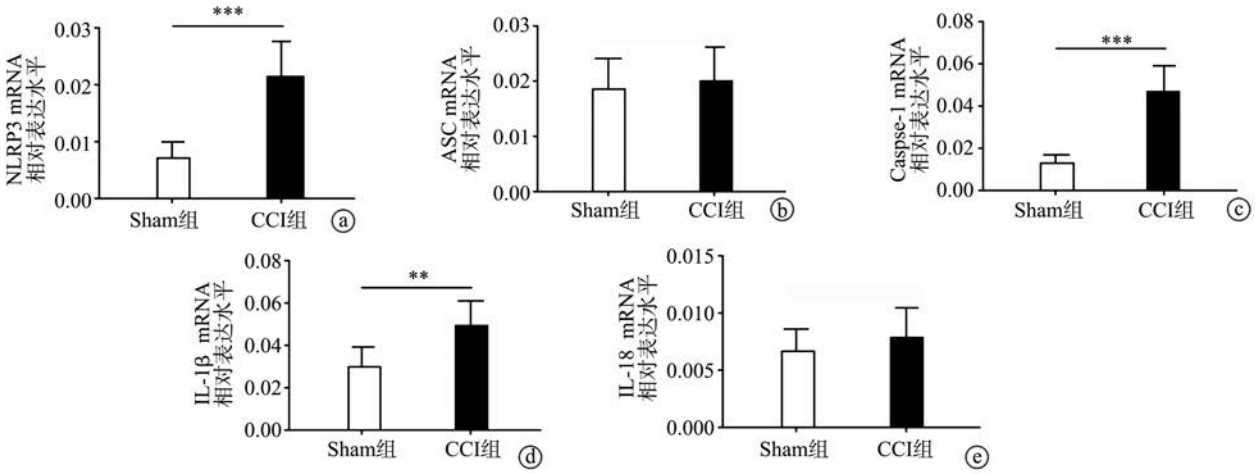
2.4 炎症因子 IL-1β 及 IL-18 表达水平

与 Sham 组相比,CCI 组 vlPAG 术后 21d 炎症小体下游效应炎症因子 IL-1β($P<0.001$)及 IL-18($P<0.01$)表达水平均明显升高(图 4)。



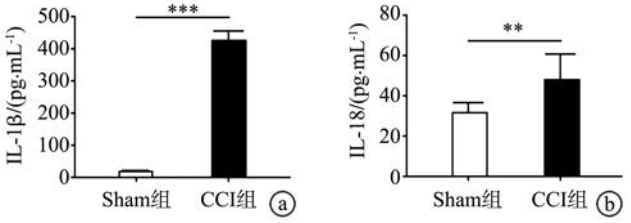
a:Western blot 检测 NLRP3、ASC、pro-Caspase-1 及 Caspase-1 p10 表达水平;b:NLRP3 表达水平;c:ASC 表达水平;d:pro-Caspase-1 表达水平;e:Caspase-1 p10 表达水平 ***:与 Sham 组相比,$P<0.001$

图 2 大鼠术后 21 d NLRP3 炎症小体各组分蛋白表达水平



a~e:NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1β、IL-18 mRNA 表达水平 **:与 Sham 组相比,$P<0.01$;***:与 Sham 组相比,$P<0.001$

图 3 大鼠术后 21 d NLRP3 炎症小体及下游基因 mRNA 表达水平



a:IL-1β 表达水平;b:IL-18 表达水平 **:与 Sham 组相比,$P<0.01$;***:与 Sham 组相比,$P<0.001$

图 4 大鼠术后 21 d IL-1β 及 IL-18 表达水平

2.5 NLRP3 炎症小体的分布情况

与 Sham 组相比,CCI 组激活的小胶质细胞数增加,NLRP3 阳性细胞数也增加,IBA1 与 NLRP3 多数存在共标(图 5)。

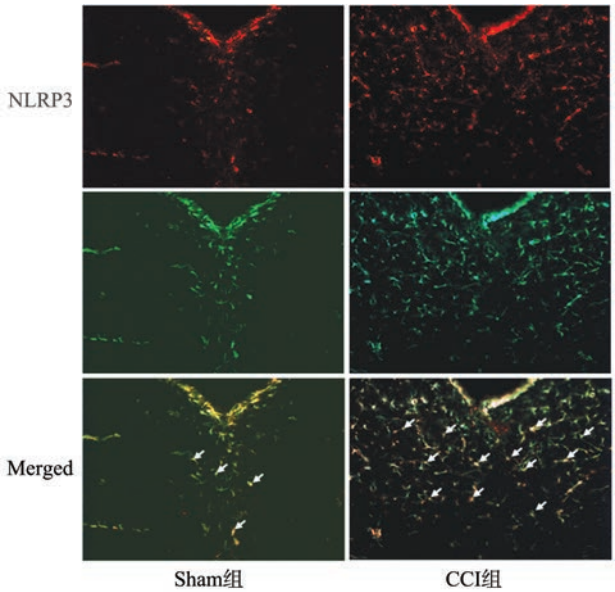


图 5 大鼠术后 21 d IBA1 及 NLRP3 双阳性细胞(×200)

3 讨论

已有研究在CCI模型及其他方法诱导的神经病理性疼痛模型(如紫杉醇诱导模型)中证实,NLRP3炎症小体在神经病理性疼痛中起着重要作用[4,6,17]。也有研究显示,在选择性神经损伤模型中,NLRP3炎症小体并未发挥作用[18],但该研究仅限于脊髓水平,且对NLRP3炎症小体并未进行蛋白水平的验证,结论并不十分可靠;且动物足底注射福尔马林可显著提高野生型和NLRP3基因敲除小鼠的NLRP3炎症小体相关基因的表达水平,说明NLRP3炎症小体在神经病理性疼痛中存在作用。Grace等[11]研究发现,常用于镇痛治疗的吗啡可以通过激活脊髓NLRP3炎症小体释放IL-1β,从而延长神经病理性疼痛的痛觉超敏持续时间,且NLRP3炎症小体激活主要位于脊髓的小胶质细胞。然而目前有关NLRP3炎症小体在神经病理性疼痛中的作用研究都只聚焦于脊髓层面,未涉及中脑水平。

本研究采用慢性坐骨神经压迫性损伤方法制备神经病理性疼痛大鼠模型,在坐骨神经结扎术后第3天,大鼠机械痛阈与热痛阈出现明显下降,表明神经病理性疼痛大鼠模型制备成功。该模型均一稳定,效果明确,可控性强,可较好模拟临床神经病理性疼痛。

Gustin等[19]研究发现,NLRP3炎症小体在小鼠大脑中的表达和功能发挥主要位于小胶质细胞,而非星形胶质细胞,本研究结果与之一致。Chang等[20]发现NLRP3炎症小体介导的小胶质细胞凋亡与心脏骤停后脑损伤的发展密切相关,提示NLRP3炎症小体在中枢神经系统炎症中具有重要调节作用。心脏骤停后脑损伤产生的炎症反应与神经病理性疼痛大鼠产生的炎症同属无菌性炎症反应,因此我们猜测,无菌性炎症在中枢神经系统的进展过程主要由小胶质细胞NLRP3炎症小体激活介导。本研究NLRP3炎症小体3个组分蛋白中,核心蛋白NLRP3与效应蛋白Caspase-1 p10表达水平在CCI组发生了明显变化,这可能与NLRP3炎症小体的激活调节机制有关。NLRP3炎症小体激活机制包括经典激活途径与非经典激活途径。经典激活途径需要LPS结合受体通过TLR4/NF-κB激活NLRP3炎症小体,而非经典激活途径则通过ATP结合P2X7、钾离子通道等调节NLRP3炎症小体[1,21]。秦颖等[16]研究发现,CCI大鼠中P2X7表达增高。程祝强等[22]也发现,P2X7在神经病理性疼痛大鼠中脑导水管周围灰质区的表达增高,然而P2X7作为NLRP3炎症小体激活途径的重要受体,在该研究中却未与小胶质细胞激活的重要标记物IBA1共标,而是与星形胶质细胞激活标记物GFAP共标,也就是说,P2X7在CCI大鼠中脑导水管周围灰质区主要表达于星形胶质细胞。本研究虽未检测P2X7,但作为固有免疫的重要组成部分,P2X7在理论上与小胶质细胞存在共标,所以这项研究结果是比较有趣的现象。有关P2X7在神经病理性疼痛的发生发展过程中所扮演的角色以及其对vlPAG中NLRP3炎症小体激活水平的影响值得进一步深入研究。

NLRP3炎症小体作为固有免疫的重要组成部分,其适度激活有益于清除病毒体以及修复组织损伤,同时启动炎症调节通路,维持机体免疫平衡,而NLRP3持续激活则可能引起炎症瀑布反应,导致组织坏死。本研究初步验证了vlPAG中NLRP3炎症小体在CCI模型中的变化,为神经病理性疼痛的研究提供了新的治疗思路,也为开发神经病理性疼痛新的治疗药物和治疗方法提供了新的靶点。然而有关NLRP3在神经病理性疼痛中发挥作用的具体机制仍有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes[J]. Cell, 2014, 157(5): 1013 - 1022. doi: 10.1016/j.cell.2014.04.007.

[2] Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, et al. Inflammasomes in health and disease[J]. Nature, 2012, 481(7381): 278 - 286. doi: 10.1038/nature10759.

[3] von Moltke J, Ayres JS, Kofoed EM, et al. Recognition of bacteria by inflammasomes[J]. Annu Rev Immunol, 2013, 31: 73 - 106. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712 - 095944.

[4] Bali KK, Kuner R. NoncodingRNAs: key molecules in understanding and treating pain[J]. Trends Mol Med, 2014, 20(8): 437 - 448. doi: 10.1016/j.molmed.2014.05.006.

[5] 樊宇超,卢 帆,杨邦祥,等. 神经病理性疼痛症状问卷中文版及初步验证[J]. 中国疼痛医学杂志, 2018, 24(10): 757 - 762. doi: 10.3969/j.issn.1006 - 9852.2018.10.009.

[6] Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, et al. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes[J]. Neurology, 2008, 70(18): 1630 - 1635. doi: 10.1212/01.wnl.0000282763.29778.59.

[7] Bouhassira D, Attal N. Translational neuropathic pain research: a clinical perspective[J]. Neuroscience, 2016, 338: 27 - 35. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.03.029.

[8] 查磊琼,彭志友,冯智英. 神经病理性疼痛药物治疗新靶点研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志, 2018, 24(6): 402 - 406. doi: 10.3969/j.issn.1006 - 9852.2018.06.002.

[9] 王 琳,刘 雪,刘冰清,等. 神经病理性疼痛的表观遗传学研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志, 2020, 26(4): 287 - 290. doi: 10.3969/j.issn.1006 - 9852.2020.04.010.

[10] Xu L, Wang Q, Jiang W, et al. MiR-34c ameliorates neuropathic pain by targeting NLRP3 in a mouse model of chronic constriction injury[J]. Neuroscience, 2019, 399: 125 - 134. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.12.030.

[11] Grace PM, Strand KA, Galer EL, et al. Morphine paradoxically prolongs neuropathic pain in rats by amplifying spinal NLRP3 inflammasome activation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(24): E3441 - E3450. doi: 10.1073/pnas.1602070113.

[12] Tonkin RS, Bowles C, Perera CJ, et al. Attenuation of mechanical pain hypersensitivity by treatment with Peptide5, a connexin-43 mimetic peptide, involves inhibition of NLRP3 inflammasome in nerve-injured mice[J]. Exp Neurol, 2018, 300: 1 - 12. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.10.016.

doi:10.11659/jjssx.09E021098

·基础研究·

小鼠肠道3型固有淋巴样细胞检测与分析方法研究

余 利,蒋 玲,周 杰,候鹏飞,糜漫天,易 龙 (陆军军医大学军事预防医学系军队营养与食品卫生学教研室/重庆市医学营养研究中心/重庆市营养与食品安全重点实验室,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 建立小鼠肠道(包括小肠和结肠)黏膜固有层3型固有淋巴样细胞(ILC3)检测与分析的方法。**方法** 小鼠麻醉后分离小肠和结肠组织,利用不同的消化液分别获得小肠和结肠固有层淋巴细胞悬液,通过 $CD45^+CD3^-CD90.2^+ROR\gamma t^+$ 流式分析策略检测 ILC3 比例,通过 IL-23 刺激后用流式细胞术分析显示 ILC3 的 IL-22 表达水平。**结果** 小肠和结肠固有层淋巴细胞成功分离,流式细胞术检测显示 ILC3 细胞分群显著并明显表达 IL-22。在小肠和结肠中,ILC3 在淋巴细胞中的占比分别为(8.30±2.42)%和(1.43±0.34)%,$IL\text{-}22^+$ ILC3 在 $ROR\gamma t^+$ ILC3 中的占比分别为(38.98±8.76)%和(85.86±1.72)%。**结论** 本研究成功建立了小鼠小肠和结肠黏膜固有层 ILC3 的检测和分析方法,为相关研究奠定了技术基础。

[关键词] 3型固有淋巴样细胞;小肠;结肠;流式细胞术
[中图分类号] R-33;R329.2;R392-33 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-09-22

Detection and analysis method of group 3 innate lymphoid cells in mice intestine

YU Li, JIANG Ling, ZHOU Jie, HOU Peng-fei, MI Man-tian, YI Long (Department of Nutrition and Food Hygiene, Department of Military Preventive Medicine, Army Medical University/Chongqing Medical Nutrition Research Center/Chongqing Key Laboratory of Nutritionand Food Safety, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish a method for the detection and analysis of group 3 innate lymphoid cells (ILC3) in the lamina propria of intestinal mucosa (including the small intestine and colon) in mice. **Methods** After the mice were anesthetized, the small intestine and colon tissues were separated, and the lymphocyte suspensions in the lamina propria of small intestine and colon were obtained from different digestive solutions. The proportion of ILC3 was detected through $CD45^+CD3^-CD90.2^+ROR\gamma t^+$ flow cytometry strategy. After stimulated with IL-23, the IL-22 expression level in ILC3 was detected by flow cytometry. **Results** The lymphocytes in the lamina propria of

[基金项目] 国家自然科学基金(81872625)
[通信作者] 易 龙,E-mail:longgyin8341@hotmail.com

[13] Mina T, Esmaeal T. Ventrolateral orbital cortex oxytocin attenuates neuropathic pain through periaqueductal gray opioid receptor[J]. Pharmacol Rep, 2018, 70(3): 577-583. doi: 10.1016/j.pharep.2017.12.010.

[14] 娄 超,王桂芝,于剑锋,等. 中脑导水管周围灰质腹外侧区 GABAAα3 及 GABAB 受体在调节急性疼痛中的作用[J]. 临床麻醉学,2017,33(5):488-491. doi:10.3969/j.issn.1004-5805.2017.05.018.

[15] Vijay KS, Louis SP, Carl LF. Neuropathic pain-induced enhancement of spontaneous and pain-evoked neuronal activity in the periaqueductal gray that is attenuated by gabapentin[J]. Pain, 2017, 158(7): 1241-1253. doi:10.1097/j.pain.0000000000000905.

[16] 秦 颖,李鹏涛,肖 智,等. 中脑导水管周围灰质腹外侧区 P2X7 受体在曲马多减轻大鼠神经病理性痛中的作用[J]. 中华麻醉学杂志,2018,38(10):1219-1223. doi:10.3760/cma.j.issn.0254-1416.2018.10.016.

[17] Jia M, Wu C, Gao F, et al. Activation of NLRP3 inflammasome in peripheral nerve contributes to paclitaxel-induced neuropathic pain[J]. Mol Pain, 2017, 13: 1744806917719804. doi: 10.1177/1744806917719804.

[18] Cordero MD, Curto RV, Kirschmann G, et al. Neuropathic pain phenotype does not involve the nlrp3 inflammasome and its end product interleukin-1β in the mice spared nerve injury model[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0133707. doi: 10.1371/journal.pone.0133707.

[19] Gustin A, Kirchmeyer M, Koncina E, et al. NLRP3 inflammasome is expressed and functional in mouse brain microglia but not in astrocytes[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0130624. doi: 10.1371/journal.pone.0130624.

[20] Chang Y, Zhu J, Wang D, et al. NLRP3 inflammasome-mediated microglial pyroptosis is critically involved in the development of post-cardiac arrest brain injury[J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 219. doi: 10.1186/s12974-020-01879-1.

[21] Sutterwala FS, Haasken S, Cassel SL. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation[J]. Ann N Y Acad Sci, 2014, 1319(1): 82-95. doi: 10.1111/nyas.12458.

[22] 程祝强,章 洁,陈洁飞,等. 中脑导水管周围灰质中 P2X7R 调控慢性神经病理性疼痛的研究[J]. 临床麻醉学杂志,2016,32(3):284-287.

(编辑:贺绍梅)