基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003591

NLRP3 炎症小体介导 Th17/Treg 失衡在哮喘小鼠气道炎症中的作用

徐光艳，周凛梅，杨红霞，张建勇
（遵义医科大学附属医院呼吸与危重症医学科，遵义 563003）

【摘 要】**目的：**探讨 NLR 家族的 Pyrin 域蛋白 3（NLR family，pyrin domain containing protein 3，NLRP3）炎症小体介导 Th17/Treg 失衡在哮喘小鼠气道炎症中的作用及其机制。**方法：**将 32 只 BALB/c 雌性小鼠随机分为正常对照组（NS 组）、哮喘模型组（AS 组）、MCC950 干预组（MC 组）及地塞米松组（Dex 组）。AS 组予卵清白蛋白（OVA）致敏和激发。MC 组和 Dex 组分别予以 MCC 950 和地塞米松干预。末次激发 24 h 后麻醉、放血，制备支气管肺泡灌洗液（bronchoalveolar lavage fluid，BALF）细胞计数和 ELISA 检测 IL-17A、IL-1β、IL-10、IL-18、IL-33、IL-35 浓度；流式细胞技术检测小鼠外周血、脾、肺组织 CD4 细胞 IL-17（$CD4^+IL\text{-}17^+$）和 $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ 占 $CD4^+$ 细胞比例分别反映辅助性 T 细胞 17（Th17）和调节性 T 淋巴细胞（Treg）水平；免疫组织化学（immunohistochemistry，IHC）观察肺组织 NLRP3、Caspase-1 蛋白水平。**结果：**与 NS 组比较，AS 组 BALF 细胞计数、IL-17A、IL-1β、IL-18 及 IL-33 浓度均升高（$P<0.01$），而 IL-10、IL-35 浓度降低（$P<0.05$），外周血、肺及脾组织 Th17 比例升高（$P<0.01$），而 Treg 比例降低（$P<0.01$），肺组织 NLRP3、Caspase-1 蛋白水平升高（$P<0.01$）。与 AS 组比较，MC 组及 Dex 组 BALF 细胞计数、IL-17A、IL-1β、IL-18 及 IL-33 浓度均降低（$P<0.01$），IL-10、IL-35 浓度升高（$P<0.05$）；外周血、肺及脾组织 Th17 比例降低（$P<0.01$），Treg 比例升高（$P<0.01$），肺组织 NLRP3、Caspase-1 蛋白水平降低（$P<0.01$）。**结论：**NLRP3 炎症小体可介导 Th17/Treg 失衡，参与哮喘气道炎症的发生，MCC950 可调节 Th17/Treg 平衡，减轻哮喘气道炎症。

【关键词】支气管哮喘；NLR 家族的 Pyrin 域蛋白 3；Th17/Treg；气道慢性炎症
【中图分类号】R332.3 【文献标志码】A 【收稿日期】2023-11-29

Role of NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 inflammasome in airway inflammation in asthmatic mice by mediating T helper 17/regulatory T cell imbalance

Xu Guangyan，Zhou Linmei，Yang Hongxia，Zhang Jianyong
（*Department of Respiratory and Critical Care Medicine，Affiliated Hospital of Zunyi Medical University*）

【**Abstract**】***Objective***：To investigate the role and mechanism of action of NOD-like receptor family pyrin domain containing 3（NLRP3）inflammasome in airway inflammation in asthmatic mice by mediating T helper 17（Th17）/regulatory T（Treg）cell imbalance. ***Methods***：A total of 32 female BALB/c mice were randomly divided into normal control group（NS group），asthma model group（AS group），MCC950 intervention group（MC group），and dexamethasone group（Dex group）. The mice in the AS group were given ovalbumin for sensitization and challenge，and those in the MC group and the Dex group were given MCC950 and dexamethasone，respectively. At 24 hours after the last challenge，the mice were anesthetized and exsanguinated，and bronchoalveolar lavage fluid（BALF）was prepared for cell counting；ELISA was used to measure the concentrations of interleukin-1A（IL-17A），interleukin-1β（IL-1β），interleukin-10（IL-10），interleukin-18（IL-18），interleukin-33（IL-33），and interleukin-35（IL-35）；flow cytometry was used to measure the proportion of $CD4^+IL\text{-}17^+$ cells and $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ cells among $CD4^+$ cells in peripheral blood，spleen，and lung tissue，which reflected the level of Th17 and Treg cells，respectively；immunohistochemistry was used to observe the protein levels of NLRP3 and Caspase-1 in lung tissue. ***Results***：Compared with the NS group，the AS group had significant increases in BALF cell count and the concentrations of IL-17A，IL-1β，IL-18，and IL-33（$P<0.01$），significant reductions in the concentrations of IL-10 and

作者介绍：徐光艳，Email：244961405@qq.com，
研究方向：哮喘的基础与临床，肺肿瘤的基础与临床。
通信作者：张建勇，Email：zjy9453@sina.com。
基金项目：遵义市科技计划资助项目[编号：遵市科合 HZ(2021)24 号]。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240926.1055.026（2024-09-27）

IL-35（$P<0.05$），a significant increase in the proportion of Th17 cells and a significant reduction in the proportion of Treg cells in peripheral blood，lung，and spleen tissue（$P<0.01$），and significant increases in the protein levels of NLRP3 and caspase-1 in lung tissue（$P<0.01$）. Compared with the AS group，the MC group and Dex group had significant reductions in BALF cell count and the concentrations of IL-17A，IL-1β，IL-18，and IL-33（$P<0.01$），significant increases in the concentrations of IL-10 and IL-35（$P<0.05$），a significant reduction in the proportion of Th17 cells and a significant increase in the proportion of Treg cells in peripheral blood，lung，and spleen tissue（$P<0.01$），and significant reductions in the protein levels of NLRP3 and caspase-1 in lung tissue（$P<0.01$）. ***Conclusion***：NLRP3 inflammasome may participate in the onset of airway inflammation in asthma by mediating Th17/Treg imbalance，while MCC950 can regulate Th17/Treg balance and alleviate airway inflammation in asthma.

【Key words】bronchial asthma；NOD-like receptor family pyrin domain containing 3；T helper 17/regulatory T cells；chronic airway inflammation

气道慢性炎症是哮喘的病理基础，很多研究证实 NLR 家族的 NLRP3（NLR family，pyrin domain containing protein 3）炎性小体参与哮喘等气道疾病的炎症过程[1-2]。NLRP3 控制 caspase-1 的活化，调控 IL-1β 等促炎细胞因子的修饰与活化，IL-1β 可以促进 Th17 的分化、维持 Th17 相关细胞因子的产生，也可以促进嗜酸性粒细胞的募集[3]。激活 NLRP3 炎症小体对调节 Th17 和 Treg 的控制有重要的作用[4]。已经证实 Th17/Treg 平衡失调介导哮喘气道炎症，是哮喘重要的发病机制之一[5]。因此，本研究推测 NLRP3 炎症小体参与 Th17/Treg 平衡失调介导的气道炎症发病过程，目前尚未见相关报道。MCC950 是作用强且具有特异性的 NLRP3 炎症小体抑制剂，常常选用 MCC950 作为 NLRP3 相关疾病动物模型的干预剂[6]。本研究拟建立哮喘小鼠模型，通过 NLRP3 抑制剂 MCC950 干预，观察 Th17/Treg 水平及其细胞因子水平、肺组织病理学改变和肺组织 NLRP3、Caspase-1 蛋白水平，探讨 NLRP3 炎症小体介导 Th17/Treg 失衡在哮喘小鼠气道炎症中的作用及其机制，并为哮喘的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

无特定病原体 6～8 周 18～20 g BALB/C 雌性小鼠（莱彼特生物科技有限公司，重庆）伦理批准号 MKLLY（A）-2021-128；OVA（美国 Sigma 公司）；MCC950（美国 MedChemExpress 公司）；NLRP3 抗体（美国 GeneTex 公司）；Anti-Caspase-1 抗体（英国 abcam 公司）；FITC anti-mouse CD4、PE anti-mouse CD25、APC anti-mouse CD127（IL-7Rα）、PerCP anti-mouse CD45、PE anti-mouse IL-17（美国 Biolegend 公司）；小鼠 IL-17A、IL-1β、IL-10、IL-18、IL-33、IL-35 的 ELISA 试剂盒（江莱生物技术有限公司）。

1.2 方法

1.2.1 实验小鼠分组、模型的建立与干预 32 只无特定病原体 6~8 周 BALB/C 雌性小鼠随机分为哮喘模型组（AS 组）、正常对照组（NS 组）、MCC950 干预组（MC 组）及地塞米松组（Dex 组），每组 8 只。参照 Kim DI 等[7]制作哮喘小鼠模型的方法，并根据本课题组[8]多年制作哮喘小鼠模型的方法进行改进，AS 组第 1 天和第 13 天给予小鼠 10% OVA 氢氧化铝凝胶混悬液腹腔注射联合颈部及双侧大腿根部皮下注射以致敏，第 19~23 天每天给予小鼠 10% OVA 雾化吸入激发。NS 组：注射剂 OVA 以 PBS 代替、雾化用生理盐水代替，余处理同哮喘组。MC 组和 Dex 组分别采用 MCC950 和地塞米松干预，具体方法是在 AS 组处理的基础上每次雾化激发前 30 min 分别腹腔注射 MCC950 10 mg/kg[9]和地塞米松 2 mg/kg[10]进行干预。

1.2.2 外周血、支气管肺泡灌洗液、肺和脾组织标本采集与制备 末次激发 24 h 后，腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉，眼眶静脉丛采血用于制作外周血单个核细胞悬液（peripheral blood mononuclear cell，PBMC），然后打开腹腔，腹主动脉处放血，取脾脏备用。打开胸腔，暴露双肺，结扎右肺肺门，取出整个右肺，右肺中叶用于制作单个核细胞悬液；右肺下叶置于 4% 多聚甲醛常温固定，后续免疫组织化学（immunohistochemistry，IHC）检测。暴露颈部气管，在环状软骨上方用静脉留置针插管固定，无菌 PBS 灌洗，收集支气管肺泡灌洗液（bronchoalveolar lavage fluid，BALF），30 min 内行细胞计数，1 200 r/min 4 ℃离心，取沉渣涂片瑞氏吉姆萨染色，其余标本迅速冻存在-80 ℃冰箱内保存备用。

1.2.3 外周血、脾及肺组织单个核细胞悬液的制备 ①PBMC 的制备：加入等量的样本稀释液到采集血液中混匀，小心加至淋巴细胞分离液上层，吸取 PBMC，裂红离心弃上清，800 μL PBS 重悬计数。②脾组织单个核细胞悬液的制备：取新鲜小鼠脾脏，冷 PBS 清洗放到 40 μm 细胞筛网，注射器活塞轻柔

按压研磨，用 3 mL PBS 轻轻冲洗筛网。余步骤同 PBMC。③右肺中叶单个核细胞悬液的制备：先配制酶消化工作液，按照银维谋[11]等的方法用，1 mg/mL 胶原酶（collagenase V）+0.2 mg/mL DNse I，溶于 1640 培养基中，将取出的右肺中叶用冷的 PBS 清洗，加入 1 mL 酶消化工作液；剪碎肺组织，37 ℃摇床消化 30~40 min；其余步骤同脾组织单个核细胞悬液的制备。

1.2.4 外周血、肺及脾单个核细胞悬液流式细胞染色 参照刘红云等[12-13]流式细胞技术检测 Th17 和 Treg 流式细胞染色的方法，按照说明书使用。①Treg 染色：将前面的单个核细胞悬液计数，分装，分别加染色抗体和对照 CD4、CD45、CD25、CD127；4 ℃避光孵育；2% 多聚甲醛 4 ℃避光固定，洗涤、离心弃上清；Staining Buffer 重悬，上机。②Th17 染色：取前面剩余单个核细胞悬液进行计数，按照（1~2）×10⁶/mL 个细胞，加入 1640 培养基+血清铺板；加三联体 Cell activation cocktail with Brefeldin A（PMA+离子霉素+高尔基体阻断剂）混匀后 37 ℃培养 4 ~ 6 h；收集细胞，染色缓冲液重悬；表面染色，分别加入 CD4、CD45、CD69 和对照 CD4、CD45；固定破膜，加入 Cyto-Fast™ Fix Perm Buffer，室温避光孵育，洗涤，Cyto-Fast™ Perm Wash Solution 重悬；胞内染色，加入 Cyto-Fast™ Perm Wash Solution，分别加 IL-17 抗体和 IL-17 对照抗体，室温避光孵育；洗涤、离心、弃上清；加入 Cell Staining Buffer 重悬，上机。

1.2.5 肺组织石蜡切片的制作 肺组织在 4% 的多聚甲醛固定 14 ~ 20 h，分别置于 50% 和 70% 乙醇 12 h 和 4 h，80% 和 90% 乙醇 30min，95% 和 100% 乙醇Ⅰ、Ⅱ各浸泡 45 min，二甲苯透明，浸蜡，包埋，切片。

1.2.6 NLRP3、caspase-1 蛋白水平免疫组化 肺组织石蜡切片常规脱蜡至水，微波抗原修复后自然降到常温，3% 的 H_2O_2 室温避光孵育，封闭用山羊血清封闭，滴加相应一抗孵育冲洗后滴加对应的二抗及 DAB 显色，设空白对照，阴性对照和阳性对照，阳性表达为黄色、淡黄色和棕黄色。用 Leica V4.2 采图系统采图；每组在相同条件下随机选择 5 个直径约 70 μm 完整气道，应用图像分析软件 Image-proplus 6.0，以积分光密度及区域为指标进行定量分析，计算平均积分光密度值（integrated optical density，IOD）。

1.2.7 BALF 中 IL-17A、IL-1β、IL-10、IL-18、IL-33、IL-35 浓度（ELISA） 平衡至室温，按说明书配制标准品工作液浓度梯度分装，设立复孔和空白对照，配制洗涤缓冲液、生物素化抗体工作液和酶结合物工作液即配即用。按操作步骤分别加样、加生物素化抗体、酶结合物工作液、加底物、终止，用 450 nm 波长对各孔吸光度（absorbance，A）值进行测量。采用 ELISAcalc 软件绘制标准曲线，以标准浓度为横坐标（X 轴），对应的 $A_{450\ nm}$ 值为纵坐标（Y 轴），绘制出标准品的线性回归线，按曲线方程计算各样本的浓度值（以 Y 值计算 X 值）再乘以稀释倍数，得出对应的浓度（pg/mL）。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件分析数据，根据资料的属性对各组数据进行统计分析，以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。对多样本均数比较时采用单因素方差分析，有差异者进一步采用 LSD-t 检验行两两比较。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 各组小鼠行为学的变化

AS 组小鼠经过 OVA 致敏和激发后，表现出呼吸急促、时而躁动不安、抓耳挠腮，时而精神萎靡、口唇、眼睑发绀、进食差、不活泼、活动减少；MC 组、Dex 组上述表现较 AS 组明显减轻，NS 组无上述表现。

2.2 BALF 总细胞计数、瑞士-吉姆萨染色白细胞分类计数的变化

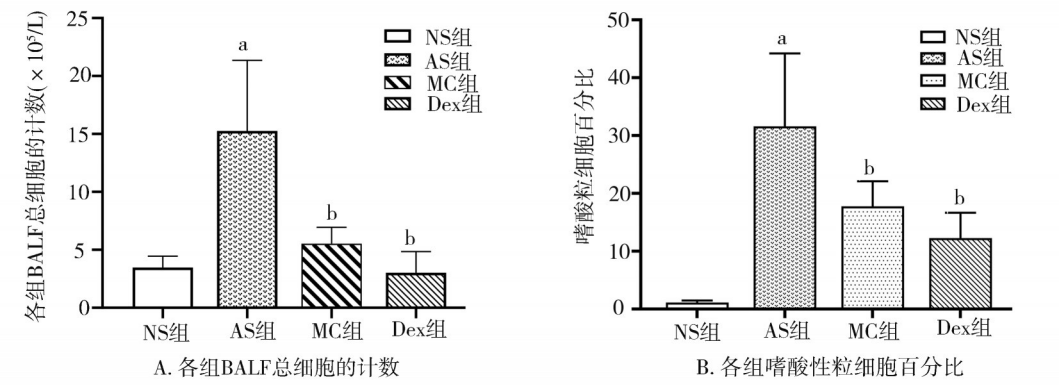
AS 组细胞计数、白细胞计数及嗜酸性粒细胞占白细胞分类计数百分比较 NS 组增高；MC 组、Dex 组较 AS 组降低，均 P<0.01。见表 1、图 1。

2.3 流式细胞技术检测外周血、肺及脾组织单个核细胞悬液 CD4 细胞 Th17 比例和 Treg 比例及 Th17/Treg 比例的变化

参照流式细胞技术[14-15]检测 Th17、Treg 细胞的方法，以 CD4 细胞 IL-17（$CD4^+IL\text{-}17^+$）和 $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ 占 $CD4^+$ 细胞比例分别反映 Th17 和 Treg 水平。AS 组外周血、肺、脾组织单个核细胞悬液中 Th17 较 NS 组高，Treg 较 NS 组低，MC 组、Dex 组 Th17 较 AS 组减低，Treg 较 AS 组升高，P=0.000。见图 2、3、4，表 2。

表 1 各组小鼠 BALF 细胞计数、白细胞计数与分类计数变化[（$\bar{x} \pm s$），n=8]

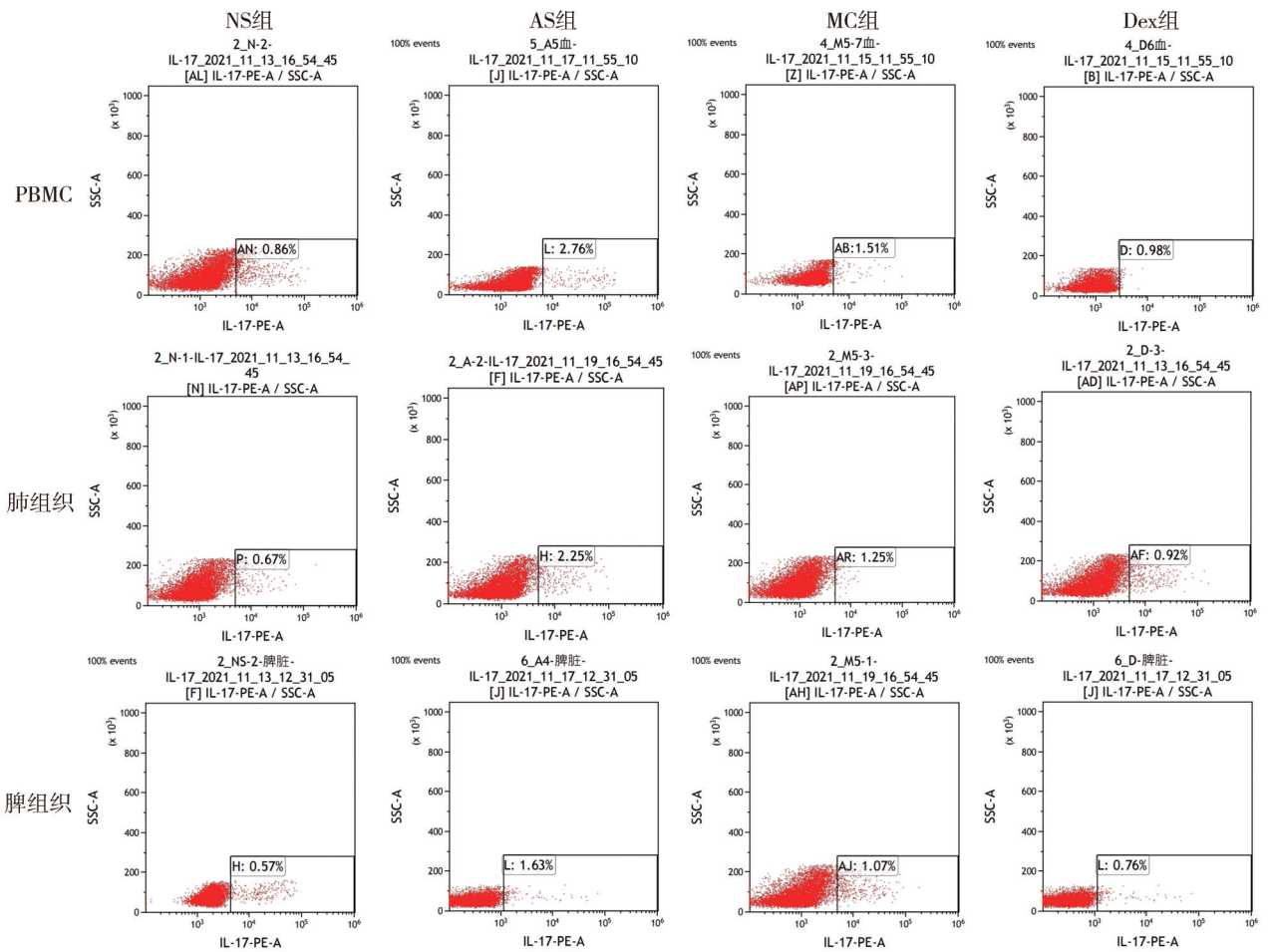
组别	细胞总数（×10⁵/mL）	白细胞总数（×10⁵/mL）	白细胞分数计数百分比（%）			
			嗜酸性粒细胞	淋巴细胞	单核细胞	中性粒细胞
NS 组	3.47 ± 0.98	2.58 ± 0.66	1.14 ± 0.33	19.23 ± 5.47	79.02 ± 2.46	3.36 ± 0.96
AS 组	15.26 ± 6.09[a]	11.78 ± 5.49[a]	31.59 ± 12.61[a]	16.48 ± 6.58[a]	29.30 ± 11.70[a]	22.89 ± 9.14[a]
MC 组	5.53 ± 1.41[b]	4.14 ± 1.13[b]	15.36 ± 2.65[b]	17.43 ± 3.18[b]	44.37 ± 10.07[b]	22.65 ± 4.77[b]
Dex 组	3.03 ± 1.83[b]	2.10 ± 1.44[b]	12.26 ± 4.39[b]	25.51 ± 11.80[b]	39.21 ± 22.50[b]	25.97 ± 12.07[b]
F 值	21.261	23.232	24.933	3.470	16.250	11.180
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000



A. 各组BALF总细胞的计数　　B. 各组嗜酸性粒细胞百分比

注：a，与NS组比较，$P<0.01$；b，与AS组比较，$P=0.000$

图1　各组小鼠BALF细胞计数、嗜酸性粒细胞百分比



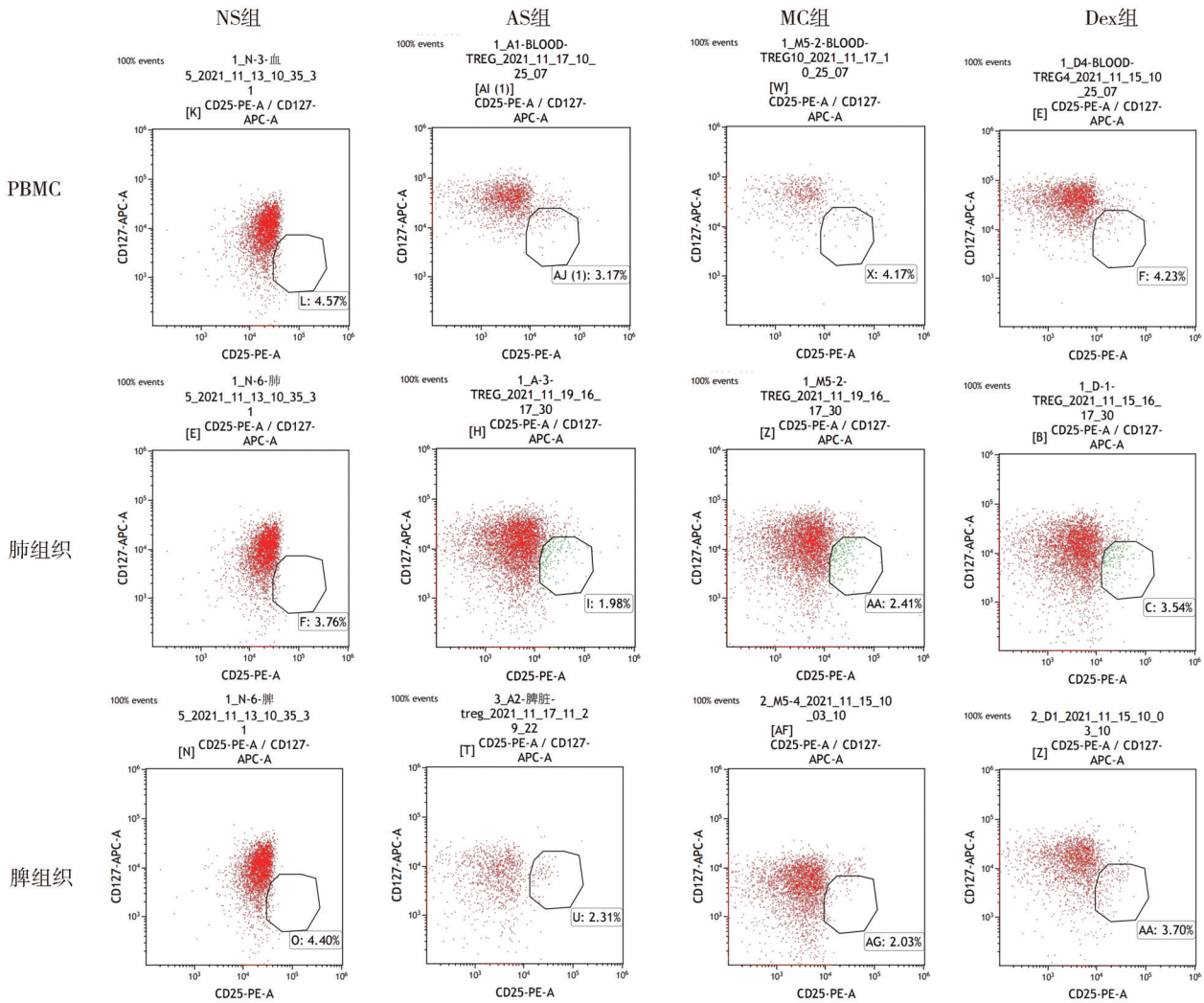
注：右下角方框所示为Th17细胞占$CD4^+$细胞百分比，AS组外周血、肺、脾组织单个核细胞悬液中Th17较NS组高，MC组、Dex组Th17较AS组减低，$P=0.000$

图2　各组小鼠外周血、肺及脾组织单个核细胞悬液Th17占$CD4^+$细胞百分比的流式细胞仪分析图

2.4　肺组织NLRP3、Caspase-1蛋白水平的变化

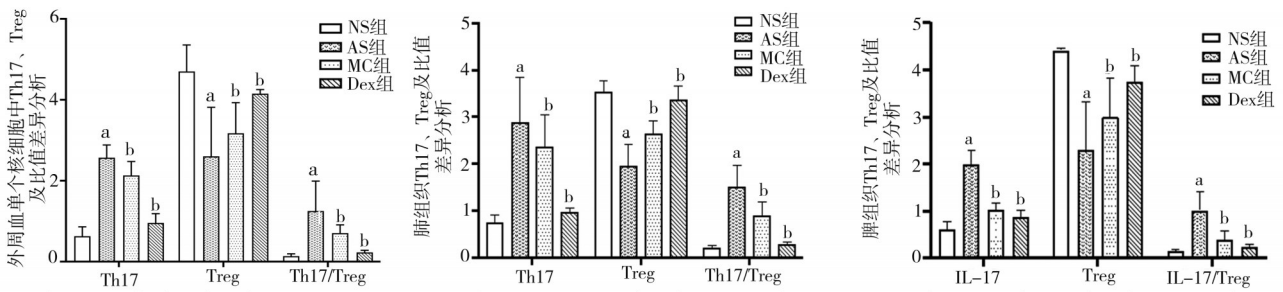
NLRP3主要表达在肺上皮细胞、巨噬细胞及树突状细胞，Caspase-1蛋白在肺和脾脏中大量表达，染色中黄色、棕黄色为其阳性表达，见图5。AS组NLRP3、Caspase-1肺组织蛋白水平较NS组高，MC组、Dex组较AS低，$P=0.000$。见图6，表3。

染色中黄色、棕黄色为其阳性表达，AS组小鼠肺组织中NLRP3、Caspase-1的表达呈强阳性，NS组表达较弱；MCC950及地塞米松干预后上述蛋白的表达强度较AS组进一步减弱。



注：右下角方框所示为Treg细胞占$CD4^+$细胞百分比，AS组外周血、肺、脾组织单个核细胞悬液中Treg较NS组低，MC组、Dex组Treg较AS组升高，P=0.000

图3　各组小鼠外周血、肺及脾组织单个核细胞悬液中Treg占$CD4^+$细胞百分比的流式细胞仪分析图



A. 各组小鼠外周血单个核细胞悬液中Th17、Treg及其比例的变化图

B. 各组小鼠肺组织单个核细胞悬液中Th17、Treg及其比例的变化图

C. 各组小鼠脾组织单个核细胞悬液中Th17、Treg及其比例的变化图

注：a表示与NS组比较；b表示与AS组比较。AS组外周血、肺、脾组织单个核细胞悬液中Th17较NS组高，MC组、Dex组Th17较AS组减低，P=0.000；AS组外周血、肺、脾组织单个核细胞悬液中Treg较NS组低，MC组、Dex组Treg较AS组升高，P=0.000。AS组外周血、肺、脾组织单个核细胞悬液中Th17/Treg比例较NS组高，MC组、Dex组较AS组减低，P=0.000

图4　各组小鼠外周血、肺及脾组织单个核细胞悬液中Th17、Treg及其比例的变化图

2.5　BALF中IL-17A、IL-1β、IL-10、IL-18、IL-33、IL-35浓度变化

AS组BALF的IL-17A、IL-1β、IL-18及IL-33浓度较NS增高，P均<0.01，IL-10、IL-35浓度较NS降低，P<0.05；MC组、Dex组IL-17A、IL-1β、IL-18、IL-33浓度较AS组降低，P均<0.01，IL-10、IL-35浓度较AS组高，P<0.05；见表4。

表2　各组小鼠PBMC悬液、肺、脾组织单个核细胞悬液中Th17、Treg及其比例的变化[($\bar{x}\pm s$)，n=8]

组别	外周血			肺			脾		
	Treg	Th17	Th17/ Treg	Treg	Th17	Th17/Treg	Treg	Th17	Th17/Treg
NS组	4.70 ± 0.66	0.63 ± 0.23	0.14 ± 0.06	3.54 ± 0.23	0.75 ± 0.17	0.21 ± 0.05	4.41 ± 0.05	0.61 ± 0.17	0.14 ± 0.04
AS组	2.60 ± 1.21[a]	2.57 ± 0.31[a]	1.25 ± 0.74[a]	1.96 ± 0.46[a]	2.89 ± 0.97[a]	1.51 ± 0.46[a]	2.29 ± 1.02[a]	1.99 ± 0.30[a]	1.01 ± 0.39[a]
MC组	3.78 ± 0.49[b]	1.72 ± 0.27[b]	0.47 ± 0.14[b]	3.12 ± 0.15[b]	1.75 ± 0.67[b]	0.56 ± 0.22[b]	2.99 ± 0.82[b]	1.02 ± 0.15[b]	0.38 ± 0.19[b]
Dex组	4.15 ± 0.10[b]	0.96 ± 0.23[b]	0.23 ± 0.05[b]	3.38 ± 0.28[b]	0.97 ± 0.09[b]	0.29 ± 0.04[b]	3.75 ± 0.34[b]	0.87 ± 0.15[b]	0.23 ± 0.06[b]
F值	9.890	65.970	13.040	36.810	17.660	32.910	13.160	45.090	16.320
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注：a，与NS组比较，P=0.000；b，与AS组比较，P=0.000

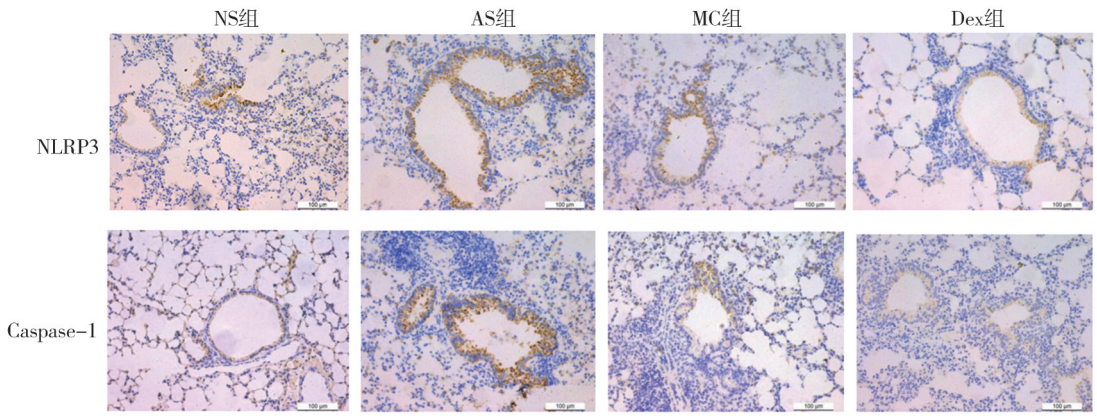
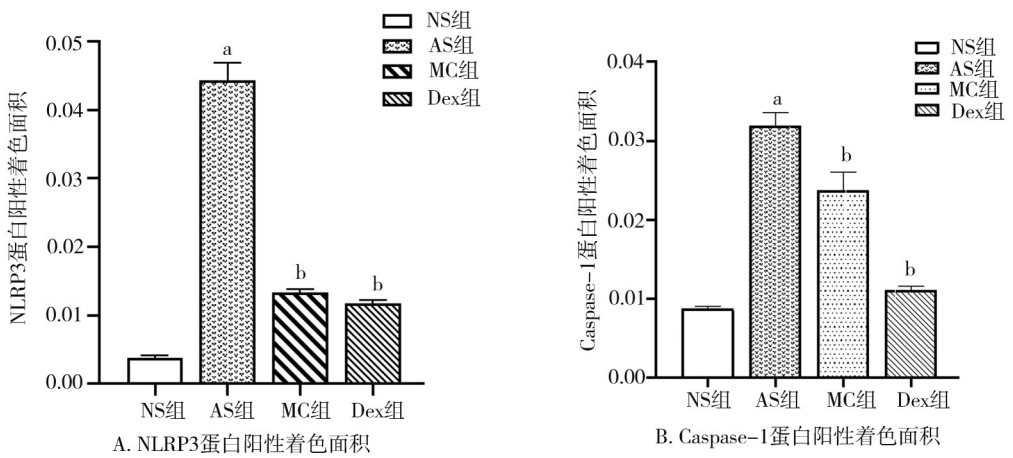


图5　小鼠肺组织NLRP3、Caspase-1免疫组织化学染色结果（200×）



A. NLRP3蛋白阳性着色面积　　B. Caspase-1蛋白阳性着色面积

注：a，与NS组比较，P=0.000；b，与AS组比较，P=0.000

图6　各组小鼠肺组织NLRP3、Caspase-1蛋白表达水平的变化

表3　各组小鼠肺组织NLRP3、Caspase-1蛋白表达水平的变化[($\bar{x}\pm s$)，n=8]

组别	NLRP3蛋白阳性着色面积（IOD）	Caspase-1蛋白阳性着色面积（IOD）
NS组	0.0038 ± 0.0004	0.0058 ± 0.0003
AS组	0.0444 ± 0.0025[a]	0.0319 ± 0.0017[a]
MC组	0.0218 ± 0.0026[b]	0.0237 ± 0.0033[b]
Dex组	0.0117 ± 0.0005[b]	0.0073 ± 0.0005[b]
F值	258.410	66.740
P值	0.000	0.000

注：a，与NS组比较，P<0.01；b，与AS组比较，P<0.01

表4 各组小鼠BALF中IL-17A、IL-1β、IL-10、IL-18、IL-33、IL-35浓度的变化[($\bar{x}\pm s$)，n=8]

组别	IL-17A（pg/mL）	IL-1β（pg/mL）	IL-10（pg/mL）	IL-18（pg/mL）	IL-33（pg/mL）	IL-35（pg/mL）
NS组	29.60 ± 5.23	11.79 ± 2.79	8.80 ± 1.08	30.22 ± 18.30	12.22 ± 1.13	42.61 ± 25.14
AS组	52.93 ± 5.26[a]	23.44 ± 2.89[a]	5.15 ± 0.62[a]	141.49 ± 26.15[a]	22.45 ± 4.38[a]	18.89 ± 4.34[a]
MC组	38.05 ± 3.41[b]	12.48 ± 1.70[b]	7.12 ± 0.83[b]	82.50 ± 18.87[b]	15.22 ± 0.95[b]	30.07 ± 9.23[b]
Dex组	33.26 ± 4.04[b]	11.93 ± 2.58[b]	8.28 ± 1.24[b]	60.15 ± 39.54[b]	13.37 ± 0.88[b]	38.71 ± 10.87[b]
F值	20.370	41.100	28.180	37.640	28.820	5.990
P值	0.000	0.000	<0.05	0.000	0.000	<0.05

注：a，与NS组比较，P<0.01；b，与AS组比较，P<0.05

3 讨 论

哮喘的发病机制复杂，现有的理论不能完全阐明哮喘的发病机制，使哮喘的控制面临巨大的挑战，进一步深入研究哮喘的发病机制有重要意义。研究表明，哮喘患者中存在Th17/Treg细胞平衡失调，NLRP3参与哮喘的发病过程，本研究通过制作小鼠哮喘模型，探讨NLRP3炎症小体介导Th17/Treg失衡在哮喘气道炎症中的作用，使用NLRP3抑制剂MCC950干预哮喘小鼠，观察MCC950干预对哮喘小鼠气道炎症、Th17/Treg失衡的影响，进一步探讨哮喘的发病机制，并为哮喘的治疗提供新的思路。

本研究观察到AS组的小鼠呼吸频率增快、呼吸困难、口唇发绀、烦躁抓耳、活动减少，检测发现BALF细胞计数及EOS百分比和IL-17A、IL-18及IL-33浓度增高，通过对肺组织切片HE染色后观察到以嗜酸性粒细胞为主的气道炎症。成功的哮喘动物模型[16-18]表现为气道炎性指标增加（如BALF的EOS、细胞因子IL-17、IL-18及IL-33等）、肺组织炎症细胞浸润、黏液分泌物增多等及气道反应性增加。评价哮喘动物模型成功的指标包括气道炎症细胞浸润增加和气道反应性增高。气道反应性测定包括无创和有创两种方法，其干扰因素多，实施繁杂，仪器设备昂贵，且不能模拟哮喘自然发病状态，目前应用较少。复习大量国内外哮喘动物模型的相关文献发现，大多数研究将以嗜酸粒细胞浸润为主的气道炎症改变作为判断哮喘小鼠模型成功的主要指标，气道反应性测定少用。

本研究应用流式细胞技术检测AS组外周血、肺及脾组织的单个核细胞悬液中Th17占$CD4^+$细胞的百分比均高于NS组，而Treg占$CD4^+$细胞的百分比均低于NS组，同时Th17/Treg的比值升高。哮喘发生与Th17升高、Treg降低及Th17/Treg平衡失调有关。有研究表明哮喘患者病情的严重程度与患者外周血中Th17细胞IL-17的表达量呈正相关，其痰液的IL-17A水平升高[19-20]。本研究发现在哮喘小鼠中，Th17不仅在外周血中升高，在肺组织、脾组织中同样升高，考虑哮喘的炎症不仅累及肺，还在外周血和脾组织中有表达。研究表明Treg的数目变化或功能缺陷也在哮喘气道炎症中发挥重要作用[21]。本研究进一步采用MCC950干预后Th17比例下降，Treg比例上升，Th17/Treg比例较AS组下降，MCC950干预有助于改善这种平衡失调。文献报道，MCC950干预抑制小鼠气管移植后Th1/Th17反应和促进Treg反应改善闭塞性细支气管炎[22]，未见MCC950改善哮喘Th17/Treg平衡的报道，将为探索哮喘患者NLRP3抑制剂和Th17与Treg调节作用方面的机制和治疗药物提供新思路。

应用ELISA测各组小鼠BALF液中的Th17相关细胞因子IL-17A和Treg相关细胞因子IL-10、IL-35的浓度，结果显示AS组BALF中IL-17A浓度较NS增高，IL-10、IL-35水平均低于NS组，MC组IL-17A浓度较AS组降低，IL-10、IL-35高于AS组。这一结果表明哮喘小鼠中Th17相关细胞因子增加，Treg相关细胞因子降低。研究表明气道中IL-17A、IL-17F等因子的水平与哮喘疾病严重程度和气道反应相关[23-24]。Kearley J[25]等研究发现将$CD4^+CD25^+$Treg输入哮喘小鼠体内，分泌的IL-10可缓解哮喘小鼠气道高反应、减轻嗜酸性粒细胞浸润，本研究使用OVA建立的哮喘小鼠模型中Treg相关细胞因子降低。与此同时使用MCC950干预可以抑制Th17相关细胞因子IL-17A和促进Treg相关细胞因子IL-10、IL-35的产生，可以调节Th17和Treg功能，MCC950可能成为Th17/Treg失衡所致哮喘的潜在治疗药物。由此，本研究得出结论哮喘中Th17/Treg比例升高，并且其相关细胞因子水平也有相应改变，Th17/Treg比例失衡可能是哮喘发病机制之一。经MCC950干预可调节Th17/Treg比例失衡和

调节相关细胞因子的浓度。

应用免疫组化法观察到AS组肺组织NLRP3和Caspase-1蛋白水平高于NS组，ELISA测定显示AS组BALF中IL-1β、IL-18、IL-33浓度较NS组增高，考虑哮喘小鼠中炎症小体NLRP3和Caspase-1及其下游细胞因子浓度增加，炎症小体NLRP3和Caspase-1及其下游细胞因子IL-1β、IL-18、IL-33参与小鼠哮喘的发生发展。应用MCC950干预后MC组IL-1β、IL-18、IL-33浓度较AS组降低。该结果表明NLRP3、Caspase-1及其下游细胞因子的增高与哮喘有关，使用MCC950干预后可使其浓度下降，可能有助于哮喘气道慢性炎症的控制。Rossios C等[26]研究证实患者痰液样本中的NLRP3炎症小体与哮喘病情呈正相关，哮喘病情越重则NLRP3炎症小体表达水平越高。本研究应用MCC950干预后哮喘小鼠BALF液的IL- 1β、IL-33及IL- 18浓度和肺组织NLRP3蛋白水平、Caspase-1蛋白水平较AS组降低，证实MCC950干预可阻滞哮喘小鼠NLRP3及其下游细胞因子IL- 1β、IL-33及IL- 18表达。IL-1β和IL-18可诱导T细胞向Th1和Th17分化，IL-1β可促进Th17细胞分化、维持Th17相关细胞因子的产生，也可促进嗜酸性粒细胞的募集。在炎症条件下，在有IL-2存在的前提下IL-1β可诱导Treg转化为促炎Th17，且在炎症和自身免疫之间建立起功能联系[27]。上述结果证实之前的推测，NLRP3炎症小体参与Th17/Treg平衡失调介导的气道炎症发病过程，NLRP3炎性小体及其下游细胞因子IL-1β、IL-33及IL-18参与哮喘的发生与发展，MCC950可能是NLRP3炎性小体介导的哮喘气道炎症药物治疗的新思路或新途径。

糖皮质激素因对炎症细胞、炎症介质和炎症反应等多途径均有抑制作用而成为目前治疗哮喘的一线用药。Dex作为糖皮质激素的代表药，本研究设立Dex干预组，对比MCC950干预组哮喘小鼠气道炎症的影响，结果显示，Dex干预与MCC950干预相比，Dex组外周血、肺组织及脾组织中Th17较MC低，Treg较MC组高，差异有统计学意义；BALF液中IL-1β、IL-10、IL-17A、IL-33、IL-18表达及肺组织中Caspase-1蛋白水平与MC组差异有统计学意义。Dex组BALF细胞数、嗜酸性粒细胞比例低于MC组，差异有统计学意义，综合分析Dex干预哮喘小鼠优于MCC950，其机制是糖皮质激素作为抗炎药从多个环节全面抑制哮喘气道炎症，MCC950主要作用于NLRP3及其细胞因子所致的气道炎症有关。尽管MCC950对哮喘小鼠作用不如Dex，但非激素类药物类似于白三烯受体的拮抗剂孟鲁司特钠，也为探索哮喘发病机制、新药的研究、联合治疗等提供新的思路。

综上所述，在哮喘小鼠模型中，NLRP3、Caspase-1及NLRP3下游细胞因子IL-1β、IL-18及IL-33升高，Th17产生的细胞因子IL-17A升高，Treg产生的细胞因子IL-10、IL-35降低，Th17/Treg比例升高，NLRP3炎症小体可通过介导Th17/Treg失衡，参与或加重哮喘气道炎症的发生。MCC950可通过下调哮喘小鼠Th17功能，上调Treg功能，从而调节Th17/Treg平衡，降低支气管肺组织IL-17A、IL-1β、IL-18、IL-33、NLRP3及Caspase-1水平，上调支气管肺组织IL-10、IL-35水平，减轻哮喘气道炎症。然而，NLRP3及相关细胞因子的调控以及Th17和Treg之间的转化调控复杂精细，涉及复杂的炎症和免疫异常，许多问题还未得到阐释。因此，进一步研究NLRP3和Th17与Treg在哮喘发病机理中的作用及相互影响，探索NLRP3及相关因子的调控和Th17与Treg之间的转化调控将有助于进一步阐明哮喘的发病机制，为哮喘的治疗提供新的思路。

参 考 文 献

[1] 韩艳奇，高志丹，黄翠萍. NLRP3炎症小体及其在支气管哮喘中的研究进展[J]. 湖北科技学院学报（医学版），2021，7(3)：273-276.

Han YQ, Gao ZD, Huang CP. Research progress on NLRP3 inflammasome and its role in bronchial asthma [J]. Journal of Hubei University of Science and Technology(Medical Edition), 2021, 7(3): 273-276.

[2] 徐万超，虞坚尔，薛 征. NLRP3炎症小体与支气管哮喘关系研究进展[J]. 中国免疫学杂志，2021，37(13)：1643-1647.

Xu WC, Yu JE, Xue Z. A review of relationship between NLRP3 inflammasome and bronchial asthma[J]. Chin J Immunol, 2021, 37(13): 1643-1647.

[3] 惠 超，刘 馨. NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3对哮喘小鼠气道炎症反应及细胞焦亡的调控作用[J]. 中国当代儿科杂志，2021，23(9)：959-964.

Hui C, Liu X. Regulatory effect of NLRP3 on airway inflammatory response and pyroptosis in mice with asthma[J]. Chin J Contemp Pediatr, 2021, 23(9): 959-964.

[4] 张 耀，齐文静，焦红杰，等. 细粒棘球绦虫分泌抗原B调控Th17/Treg抑制过敏性哮喘的研究[J]. 中国病原生物学杂志，2021，16(8)：927-930，933.

Zhang Y, Qi WJ, Jiao HJ, et al. Antigen B secreted by *Echinococcus granulosus* reduces asthma by rebalancing Th17/Treg[J]. J Pathog Biol,

2021,16(8):927-930,933.

[5] 覃松梅,刘 彤,龙胜泽,等. 成人哮喘患者Treg/Th17细胞失衡与呼出气一氧化氮的相关性研究[J]. 中国免疫学杂志,2022,38(2):211-214,222.

Qin SM, Liu T, Long SZ, et al. Correlation between Treg/Th17 imbalance and FeNO in adult patients with asthma[J]. Chin J Immunol, 2022, 38(2):211-214,222.

[6] 周永婷,叶莱英,朱 蕾. NLRP3炎性小体激活调控机制及抑制剂研究新进展[J]. 基础医学与临床,2020,40(8):1113-1118.

Zhou YT, Ye CY, Zhu L. New advances in the activation mechanisms of NLRP3 inflammasome and its inhibitors[J]. Basic Clin Med, 2020, 40(8):1113-1118.

[7] Kim DI, Song MK, Lee K. Comparison of asthma phenotypes in OVA-induced mice challenged via inhaled and intranasal routes[J]. BMC Pulm Med, 2019, 19(1):241.

[8] 杨红霞,石清红,翁敏华,等. 人羊膜间充质干细胞移植对哮喘小鼠气道杯状细胞增生及黏蛋白5ac表达的影响[J]. 中国组织工程研究,2019,23(25):4050-4055.

Yang HX, Shi QH, Weng MH, et al. Effect of human amniotic mesenchymal stem cell transplantation on airway goblet cell proliferation and mucin 5ac expression in asthmatic mice[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2019, 23(25):4050-4055.

[9] Wang LX, Zha BS, Shen QY, et al. Sevoflurane inhibits the Th2 response and NLRP3 expression in murine allergic airway inflammation [J]. J Immunol Res, 2018, 2018:9021037.

[10] 管明龙. 地塞米松通过抑制NLRP3炎症小体的活化减轻哮喘小鼠气道炎症[D]. 合肥:安徽医科大学,2020.

Guan ML. Dexamethasone Alleviate Airway Inflammation of Asthma in Mice by Inhibiting the Activation of NLRP3 Inflammasome[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2020.

[11] 银维谋. CCR4/TARC信号轴参与调控小鼠哮喘模型Treg/Th17细胞向肺内浸润的探讨[D]. 南宁:广西医科大学,2016:1-16.

Yin WM. CCR4/TARC Axis Recruits Regulatory T Cells and Th17Cells into Lung Tissue of Asthma in Mice[D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2016:1-16.

[12] 刘红云,马丽萍,魏 菁,等. 小鼠调节性T细胞的$CD4^+$ $CD25^+$ $CD127^{low/-}$标记分析[J]. 中国实验血液学杂志,2012,20(6):1469-1473.

Liu HY, Ma LP, Wei J, et al. Analysis of $CD4^+$ $CD25^+$ $CD127^{low/-}$ Treg cells in mice[J]. J Exp Hematol, 2012, 20(6):1469-1473.

[13] Gu XY, Chu X, Zeng XL, et al. Effects of $PM_{2.5}$ exposure on the Notch signaling pathway and immune imbalance in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Environ Pollut, 2017, 226:163-173.

[14] 安田丽. 48例多发性骨髓瘤患者外周血中$CD4^+CD25^+CD127^{low/-}$调节性T细胞及淋巴细胞亚群的研究[D]. 兰州:兰州大学,2020.

An TL. Study on $CD4^+CD25^+CD127^{low/-}$regulatory T Cells and Lymphocyte Subsets in Peripheral Blood of 48 Patiets with Multiple Myeloma [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2020.

[15] 何 真. Notch配体Jagged1、Delta4在哮喘小鼠Th17/Treg免疫失衡中的作用[D]. 兰州:兰州大学,2021:1-13.

He Z. Role of Notch Ligands Jagged1 and Delta4 in Th17/Treg Immune Imbalance in Asthmatic Mice[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2021: 1-13.

[16] 高琴琴,丁子桐,李友林,等. 不同剂量卵蛋白诱发BALB/c小鼠支气管哮喘模型的比较[J]. 中国比较医学杂志,2019,29(4):52-57.

Gao QQ, Ding ZT, Li YL, et al. Comparison of asthma models induced by different doses of ovalbumin in BALB/c mice[J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(4):52-57.

[17] 田 丹,许虎峰. 制作简易实验动物雾化箱建立小鼠哮喘模型研究[J]. 实验动物科学,2020,37(5):71-73.

Tian D, Xu HF. Study on building mouse asthma model with self-designed experimental animal atomization box[J]. Lab Anim Sci, 2020, 37(5):71-73.

[18] 吴 瑞,李秀敏,苗明三. 基于数据挖掘的哮喘动物模型应用分析[J]. 中国比较医学杂志,2020,30(3):89-93.

Wu R, Li XM, Miao MS. Application analysis of an asthma animal model based on data mining[J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(3):89-93.

[19] Ramakrishnan RK, Al Heialy S, Hamid Q. Role of IL-17 in asthma pathogenesis and its implications for the clinic[J]. Expert Rev Respir Med, 2019, 13(11):1057-1068.

[20] Zhang Y,Zhang L,Wu J,etal.f-Heme oxygenase-1 exerts protective role in ovalbumininduced neutrophilic airway inflammation by inhibiting Thl7 cell·mediated immune response[J].J Biol Chem, 2013, 288(48):34612—34626.

[21] 汝触会,何 飞,郑 琦,等. 基于PI3K/Akt信号通路探讨芍药甘草汤对哮喘大鼠Treg细胞的作用[J]. 中国中医药科技,2020,27(6):862-865.

Ru CH, He F, Zheng Q, et al. Effects of Shaoyao Gancao Decoction on Treg cells in rats with asthma based on PI3K/akt signal path[J]. Chin J Tradit Med Sci Technol, 2020, 27(6):862-865.

[22] Xu KY, Tong S, Wu CY, et al. Nlrp3 inflammasome inhibitor MCC950 ameliorates obliterative bronchiolitis by inhibiting Th1/Th17 response and promoting Treg response after orthotopic tracheal transplantation in mice[J]. Transplantation, 2020, 104(6):e151-e163.

[23] Lamb D, De Sousa D, Quast K, et al. RORγt inhibitors block both IL-17 and IL-22 conferring a potential advantage over anti-IL-17 alone to treat severe asthma[J]. Respir Res, 2021, 22(1):158.

[24] Yin LL, Ouyang DY, Lin LH, et al. Salidroside regulates imbalance of Th17/Treg and promotes ischemic tolerance by targeting STAT-3 in cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Arch Med Sci, 2019, 17(2):523-534.

[25] Kearley J, Barker JE, Robinson DS, et al. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after *in vivo* transfer of $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells is interleukin 10 dependent[J]. J Exp Med, 2005, 202(11):1539-1547.

[26] Rossios C, Pavlidis S, Hoda U, et al. Sputum transcriptomics reveal upregulation of IL-1 receptor family members in patients with severe asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2018, 141(2):560-570.

[27] Zheng J, Yao L, Zhou YJ, et al. A novel function of NLRP3 independent of inflammasome as a key transcription factor of IL-33 in epithelial cells of atopic dermatitis[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(10):871.

（责任编辑：周一青）