

# 电针预处理对脓毒症急性肺损伤大鼠肺组织中 NEK7-NLRP3 炎症小体激活的影响

张玉洁<sup>1</sup>, 徐淑文<sup>1</sup>, 刘文美<sup>1</sup>, 张新芳<sup>2</sup>, 项水英<sup>3</sup>, 江传玮<sup>2</sup>, 王媛<sup>2</sup>, 刘自兵<sup>2,3</sup>

(1. 安徽中医药大学研究生院, 安徽 合肥 230038; 2. 安徽中医药大学中西医结合学院, 安徽 合肥 230038; 3. 安徽中医药大学针灸推拿学院, 安徽 合肥 230038)

**摘要:**目的 观察电针预处理“足三里”穴和“尺泽”穴对脓毒症急性肺损伤(ALI)大鼠肺组织中 NEK7-NLRP3 炎症小体激活的影响,探讨电针预处理在脓毒症 ALI 中发挥的保护效应及可能机制。方法 将 SD 大鼠随机分为对照组、电针预处理+对照组、模型组、电针预处理+模型组,每组 10 只。各模型组采用腹腔注射脂多糖(LPS)的方法建立脓毒症 ALI 大鼠模型。各电针预处理组于 LPS 造模前 1 周进行连续 7 d 电针预处理,疏密波,频率 4 Hz/20 Hz,强度 1~2 mA,持续 30 min。检测各组大鼠肺功能;HE 染色法观察大鼠肺组织病理学变化;测定大鼠肺组织湿/干质量比值(W/D);ELISA 法检测大鼠血浆及肺组织中炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-18 含量;免疫荧光观察大鼠肺组织中 ASC 蛋白阳性表达;Western blot 法检测大鼠肺组织中 NEK7、NLRP3、Caspase-1 及 IL-1 $\beta$  蛋白的表达。结果 与对照组相比,模型组大鼠用力肺活量(FVC)、第 0.1 秒用力呼气量(FEV<sub>0.1</sub>)、第 0.3 秒用力呼气量(FEV<sub>0.3</sub>)、FEV<sub>0.1</sub>/FVC、FEV<sub>0.3</sub>/FVC 均显著降低( $P<0.001$ );肺泡结构紊乱,肺组织内炎症细胞浸润明显,肺组织充血水肿;W/D 比值显著升高( $P<0.001$ );血浆及肺组织内 IL-1 $\beta$ 、IL-18 含量明显升高( $P<0.001$ );ASC 蛋白阳性表达明显增多( $P<0.001$ );肺组织中炎症小体相关蛋白 NEK7、NLRP3、Caspase-1 及 IL-1 $\beta$  的表达水平均显著升高( $P<0.001$ )。与模型组相比,电针预处理+模型组大鼠 FVC、FEV<sub>0.1</sub>、FEV<sub>0.3</sub>、FEV<sub>0.1</sub>/FVC、FEV<sub>0.3</sub>/FVC 均明显升高( $P<0.05$ , $P<0.001$ );肺组织内炎症细胞浸润及充血水肿有明显改善;W/D 比值显著降低( $P<0.01$ );血浆及肺组织内 IL-1 $\beta$ 、IL-18 含量显著降低( $P<0.01$ , $P<0.001$ );ASC 蛋白阳性表达降低( $P<0.001$ );肺组织中炎症小体相关蛋白 NEK7、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  表达水平均显著降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ , $P<0.001$ )。结论 电针预处理可以减轻肺部炎症反应,改善肺功能,其机制与电针抑制脓毒症 ALI 大鼠肺组织中 NEK7-NLRP3 炎症小体激活相关。

**关键词:**电针预处理;脓毒症急性肺损伤;NEK7;NLRP3 炎症小体

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

文章编号:1672-0482(2023)05-0467-07

DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2023.0467

引文格式:张玉洁,徐淑文,刘文美,等.电针预处理对脓毒症急性肺损伤大鼠肺组织中 NEK7-NLRP3 炎症小体激活的影响[J].南京中医药大学学报,2023,39(5):467-473.

## Effect of Electroacupuncture Preconditioning on Activation of NEK7-NLRP3 Inflammasome in Lung Tissue of Rats with Sepsis Acute Lung Injury

ZHANG Yu-jie<sup>1</sup>, XU Shu-wen<sup>1</sup>, LIU Wen-mei<sup>1</sup>, ZHANG Xin-fang<sup>2</sup>, XIANG Shui-ying<sup>3</sup>, JIANG Chuan-wei<sup>2</sup>, WANG Yuan<sup>2</sup>, LIU Zi-bing<sup>2,3</sup>

(1. Graduate School, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China; 2. College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China; 3. College of Acu-Moxibustion and Massage, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To observe the effect of electroacupuncture (EA) pretreatment at "Zusanli" (ST 36) and "Chize" (LU 5) points on the activation of NEK7-NLRP3 inflammasome in the lung tissue of rats with sepsis acute lung injury (ALI), and to explore the protective effect and possible mechanism of EA pretreatment in septic ALI. **METHODS** According to the principle of randomization, 40 rats were equally divided into 4 groups, namely the control group, EA preconditioning+control group, model group and EA preconditioning+model group. The septic ALI model was established by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS). EA (4 Hz/20 Hz, 1~2 mA) was applied to bilateral ST 36 and LU 5 for 30 min, once a day for 7 consecutive days before modeling. The lung function of the rats was detected; HE staining was used to observe the pathological changes of the lung, and the degree of pulmonary edema in the left lung of rats was detected by the ratio of wet/dry weight of the lung; the secretions of inflammatory factors IL-1 $\beta$  and IL-18 in the plasma and lung tissue were measured by ELISA kits; the positive expression of ASC protein in the lung tissue of rats

收稿日期:2022-11-02

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81373743);安徽省自然科学基金面上项目(2008085MH267);安徽省教育厅自然科学重大及重点项目(KJ2021A0569,2022AH040078);安徽中医药大学自然科学基金(2020zrzd03)

第一作者:张玉洁,女,硕士研究生,E-mail:3530620496@qq.com

通信作者:刘自兵,男,教授,主要从事针刺作用机制研究,E-mail:zibingliu@163.com

was observed by immunofluorescent staining; the expression of NEK7, NLRP3, Caspase-1 and IL-1 $\beta$  protein was assayed by Western blot. **RESULTS** Compared with the control group, the forced vital capacity (FVC), forced expiratory volume at 0.1 second (FEV<sub>0.1</sub>), FEV<sub>0.3</sub>, FEV<sub>0.1</sub>/FVC, FEV<sub>0.3</sub>/FVC were significantly decreased ( $P < 0.001$ ); Inflammatory cell infiltration in the lung tissue was obvious and accompanied by congestion and edema, and the alveolar structure was ruptured; the ratio of W/D was significantly increased ( $P < 0.001$ ); the contents of IL-1 $\beta$  and IL-18 in plasma and lung tissue were significantly increased ( $P < 0.001$ ) while the ASC protein positive expression was increased significantly ( $P < 0.001$ ); the expression levels of inflammasome-related proteins NEK7, NLRP3, Caspase-1 and IL-1 $\beta$  in lung tissue were significantly increased in the model group ( $P < 0.001$ ). After EA intervention, the FVC, FEV<sub>0.1</sub>, FEV<sub>0.3</sub>, FEV<sub>0.1</sub>/FVC, FEV<sub>0.3</sub>/FVC were significantly increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ), and the lung pathology has improved significantly. The other indicators mentioned above were significantly decreased in the EA preconditioning+model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ). **CONCLUSION** EA pretreatment can reduce pulmonary inflammatory response and improve lung function in septic ALI rats, which is relevant with inhibiting the activation of NEK7-NLRP3 inflammasome.

**KEYWORDS:** electroacupuncture pretreatment; septic acute lung injury; NEK7; NLRP3 inflammasome

急性肺损伤 (Acute lung injury, ALI) 是以肺部弥漫性炎症发作及肺泡上皮-毛细血管内皮屏障破坏为特征的临床综合征<sup>[1]</sup>, 可最终进展为急性呼吸窘迫综合征 (Acute respiratory disease syndrome, ARDS)<sup>[2]</sup>。临床中常表现为肺水肿、低氧血症以及需要机械通气的呼吸窘迫急性发作。ALI 是常见的呼吸系统危重疾病, 发病迅速、死亡率高<sup>[3]</sup>。现代研究表明<sup>[4-5]</sup>, 针刺可以抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的表达, 减轻 ALI 肺水肿及肺部病理损伤。ALI 发病机制复杂, 主要包括肺内大量炎性细胞浸润及炎性介质释放。研究发现<sup>[6]</sup> 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NOD-like receptor family pyrin domain-containing protein 3, NLRP3) 炎症小体的激活参与了 ALI 的发病过程。NLRP3 炎症小体是一种多蛋白复合体, 可在多种病原微生物和危险信号刺激下活化, 导致促炎因子 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的成熟和分泌, 加重 ALI 炎症反应<sup>[7-8]</sup>。NIMA 相关激酶 7 (NIMA-related kinase 7, NEK7) 是 NEK 家族的成员之一, 广泛表达于心、脾、肾、肺等多种组织<sup>[9]</sup>。NEK7 能够与 NLRP3 结合, 介导 NLRP3 炎症小体的激活<sup>[10]</sup>。本研究利用脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 制备脓毒症 ALI 大鼠模型, 观察电针预处理“足三里”“尺泽”穴对脓毒症 ALI 大鼠肺组织中 NEK7-NLRP3 炎症小体激活的影响, 探讨电针预处理对 ALI 大鼠发挥的肺保护作用及其可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

健康雄性 SD 大鼠 40 只, 体质量 300~350 g, 由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供, 清洁级, 许可证号: SCXK (鲁) 2019-0003。大鼠分笼饲养, 自由进食, 饮水。适应性饲养 2 周后, 随机分为对照组、电针预处理+对照组、模型组、电针预处理+模型组, 每组 10 只。研究经安徽中医药大学动物实验伦理委员会批准, 批件编号: AHUM-rats-2020009。实验

过程中对大鼠的所有操作均符合中国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

### 1.2 主要试剂及仪器

戊巴比妥钠 (美国 Sigma 公司, P3761), BCA 蛋白定量试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, P0010), IL-1 $\beta$ 、IL-18 ELISA 试剂盒 (武汉基因美科技有限公司, JYM0419Ra、JYM0650Ra), Caspase-1 抗体、NEK7 抗体、ASC 抗体 (北京博奥森生物技术有限公司, AG03071020、AD19562205、AF03162934), NLRP3 抗体 (英国 Abcam 公司, 批号: GR3369573-3), IL-1 $\beta$  抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司),  $\beta$ -actin 单抗、山羊抗小鼠 IgG、山羊抗兔 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司, 19C10509、140193、202700514), 山羊抗兔 IgG (FITC) (上海碧云天生物技术有限公司, 07032210)。

小动物呼吸功能检测仪 (北京贝兰博科技公司, Ani-Res2005), 华佗牌针灸针 (0.3 mm $\times$ 25 mm, 苏州医疗用品厂有限公司), 华佗牌多功能电针治疗仪 (苏州医疗用品厂有限公司, SDZ-V), 光学显微镜 (日本奥林巴斯公司, BX53), 数字切片扫描仪 (匈牙利 3DHISTECH 公司, Panoramic 250Flash II), 酶标仪 (美国雷杜公司, RT-6000), 凝胶成像系统 (北京科创锐新生物科技有限公司, K8160T)。

### 1.3 模型制备

脓毒症 ALI 大鼠模型的制备方法参照文献并结合本课题组之前造模方法进行改良<sup>[11-12]</sup>。模型组及电针预处理+模型组所有大鼠均向腹腔内注射 LPS (5 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>), 对照组及电针预处理+对照组给予等体积生理盐水腹腔注射。

### 1.4 电针预处理方法

于模型制备前 1 周进行电针预处理。选择“足三里”穴及“尺泽”穴, 穴位定位参照《实验针灸学》<sup>[13]</sup>: “足三里”穴位于后肢膝关节后外侧, 腓骨

小头下方大约 5 mm 处;“尺泽”穴位于大鼠前肢肘横纹偏外凹陷处。大鼠固定于鼠板后,将 0.3 mm×25 mm 针灸针直刺入双侧“足三里”穴 5 mm 及“尺泽”穴 3 mm,接入电针仪,正极接“尺泽”穴,负极接同侧“足三里”穴,波形为疏密波,频率 4 Hz/20 Hz,强度 1~2 mA,以引起大鼠四肢轻微颤动为准,每次 30 min,每日 1 次,连续治疗 7 d。电针预处理+对照组大鼠以相同方法进行电针,对照组及模型组大鼠每日以相同方法固定,但不进行其他干预。

### 1.5 检测指标及方法

**肺通气功能检测:**造模 24 h 后,使用 2% 戊巴比妥钠 (30 mg·kg<sup>-1</sup>) 腹腔注射麻醉大鼠,行气管插管,将大鼠置于体描箱中,连接导管、呼吸机和呼吸信号调理器,使用 Ani-Res2005 小动物肺功能分析系统,测量大鼠用力肺活量 (Forced vital capacity, FVC)、第 0.1 秒用力呼气量 (Forced expiratory volume at 0.1 second, FEV<sub>0.1</sub>) 及第 0.3 秒用力呼气量 (FEV<sub>0.3</sub>)、FEV<sub>0.1</sub>/FVC、FEV<sub>0.3</sub>/FVC。

**HE 染色法观察大鼠肺组织病理变化:**腹主动脉取血处死大鼠后,开胸分离大鼠右肺上叶,置 4% 多聚甲醛中 48 h,常规脱水,包埋,切片厚度 5 μm,脱蜡脱水,苏木精-伊红 (HE) 染色,中性树胶封片,于显微镜下观察肺组织病理学变化。

**肺组织湿/干质量比 (W/D) 测定:**取大鼠左肺,用滤纸吸取肺表面水分后称湿质量 (W),放置于 60 °C 恒温干燥箱中干燥 48 h,测量干质量 (D),计算 W/D 比值。

**免疫荧光法观察大鼠肺组织中 ASC 蛋白表达:**对右肺上叶蜡块切片,高压抗原修复,PBS-T 冲洗 3 次,滴加 ASC 一抗 (1:200),37 °C 培养箱孵育 60 min,PBS-T 冲洗 3 次,滴加免疫荧光二抗 (1:400),37 °C 孵育 30 min,PBS-T 冲洗 3 次;用含 DAPI 的抗荧光淬灭封片剂封片,数字切片扫描仪扫描荧光切片,观察并分析采集图片中 ASC 蛋白阳性表

达。

**ELISA 法检测大鼠血浆、右肺中叶组织 IL-1β、IL-18 含量:**肺功能检测完毕后,使用真空干燥抗凝管取大鼠腹主动脉血 5 mL,室温静置 2 h,4 °C、3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,取上层血浆待测。大鼠取血后开胸,取右肺中叶,冲洗干净后,于冰上将取下的肺组织剪碎匀浆并离心,后取上清液,置于 -80 °C 冰箱待测。按照 ELISA 试剂盒说明书提示检测 IL-1β、IL-18 的含量。

**Western blot 法检测大鼠肺组织内 NEK7、NLRP3、Caspase-1、IL-1β 蛋白的表达:**取大鼠右肺下叶组织 0.1 g,加入 600 μL RIPA 细胞裂解液进行裂解,提取总蛋白。使用 BCA 法检测蛋白浓度,分装储存于 -80 °C 冰箱备用。取 50 μg 蛋白总量进行上样,然后电泳、转膜、封闭。参照一抗说明书进行稀释,NEK7 (1:1 000)、NLRP3 (1:1 000)、Caspase-1 (1:500)、IL-1β (1:1 000),4 °C 孵育过夜,加入二抗 (1:20 000) 室温孵育 2 h,用 ECL 发光试剂盒来检测蛋白,β-actin 作为内参,以目的蛋白和内参的灰度值之比表示目的蛋白的相对表达量。

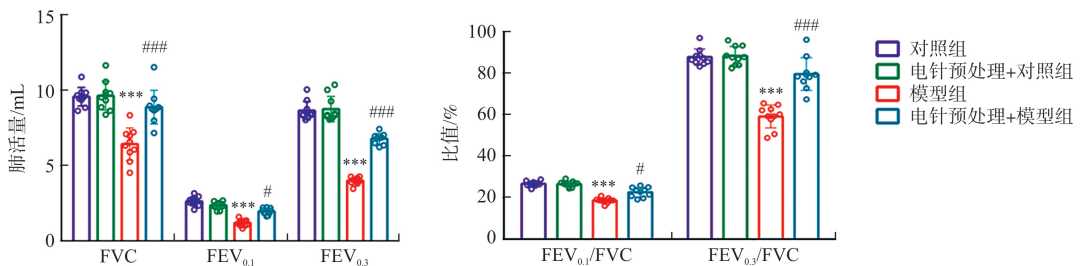
### 1.6 统计学分析

所有数据采用 SPSS23.0 软件进行分析处理,符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA),两组间比较采用 LSD 检验,方差不齐采用 Tamhane's T<sub>2</sub> 检验。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,电针预处理+对照组无统计学差异 (P>0.05),模型组大鼠 FVC、FEV<sub>0.1</sub>、FEV<sub>0.3</sub>、FEV<sub>0.1</sub>/FVC、FEV<sub>0.3</sub>/FVC 均显著降低 (P<0.001);与模型组比较,电针预处理+模型组大鼠 FVC、FEV<sub>0.1</sub>、FEV<sub>0.3</sub>、FEV<sub>0.1</sub>/FVC、FEV<sub>0.3</sub>/FVC 均显著升高 (P<0.05, P<0.001)。见图 1。



注:与对照组比较,\*\*\*P<0.001;与模型组比较,#P<0.05,###P<0.001。 $\bar{x} \pm s, n = 10$ 。

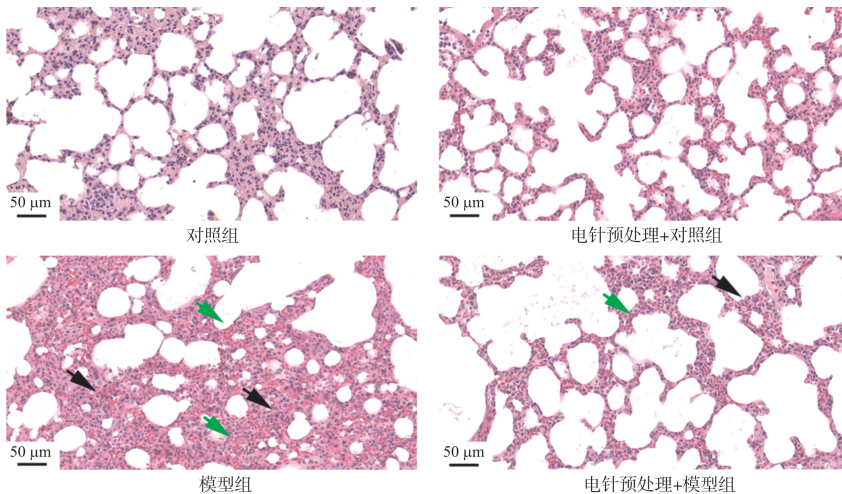
图 1 各组大鼠肺功能比较

Fig. 1 Comparison of lung function of the rats in each group

## 2.2 各组大鼠肺组织形态学比较

对照组、电针预处理+对照组大鼠肺泡结构完整,肺间隔连续、自然,未见肺组织有明显的炎症细胞浸润及充血;模型组大鼠肺泡结构紊乱,肺间隔增

厚,肺组织内炎性浸润明显,且渗出大量红细胞;电针预处理+模型组大鼠肺间隔变薄,炎症细胞浸润减少,红细胞渗出不明显。见图 2。



注:黑色箭头指示为大量炎性细胞浸润;绿色箭头指示为红细胞渗出

图 2 各组大鼠肺组织形态学比较(HE 染色,×200)

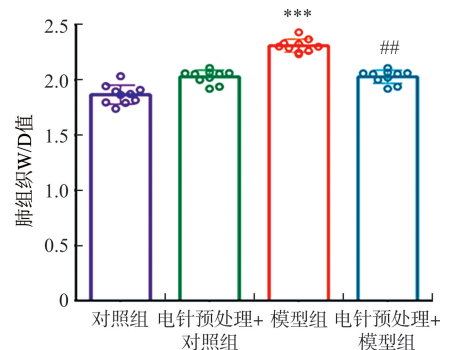
Fig. 2 Comparison of lung histomorphology of rats in each group (HE staining, ×200)

## 2.3 各组大鼠肺组织 W/D 值比较

与对照组相比,电针预处理+对照组大鼠肺组织 W/D 值增高,但差异无统计学意义( $P>0.05$ ),模型组大鼠肺组织 W/D 值明显增高( $P<0.001$ );与模型组比较,电针预处理+模型组 W/D 值显著降低( $P<0.01$ )。见图 3。

## 2.4 各组大鼠血浆及肺组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 含量的比较

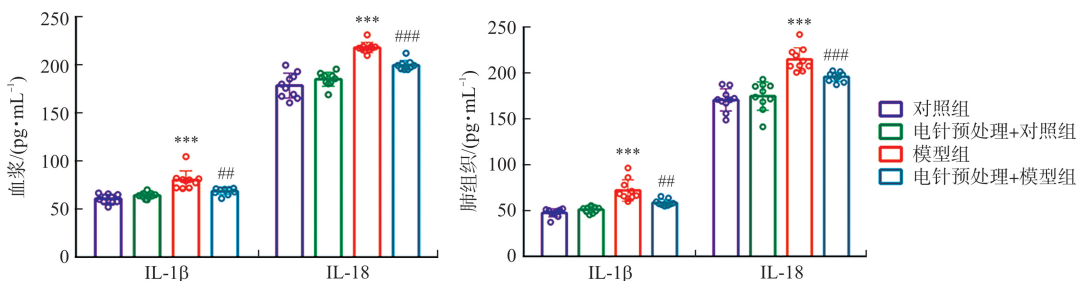
与对照组相比,电针预处理+对照组大鼠血浆及肺组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 含量差异无统计学意义( $P>0.05$ ),模型组大鼠血浆及肺组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 含量明显升高( $P<0.001$ );与模型组比较,电针预处理+模型组大鼠血浆及肺组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 含量显著降低( $P<0.01, P<0.001$ )。见图 4。



注:与对照组比较,\*\*\* $P<0.001$ ;与模型组比较,## $P<0.01$ 。 $\bar{x}\pm s, n=10$ 。

图 3 各组大鼠肺组织 W/D 值比较

Fig. 3 Comparison of wet/dry weight ratio of lung tissue of rats in each group



注:与对照组比较,\*\*\* $P<0.001$ ;与模型组比较,## $P<0.01$ ,### $P<0.001$ 。 $\bar{x}\pm s, n=10$ 。

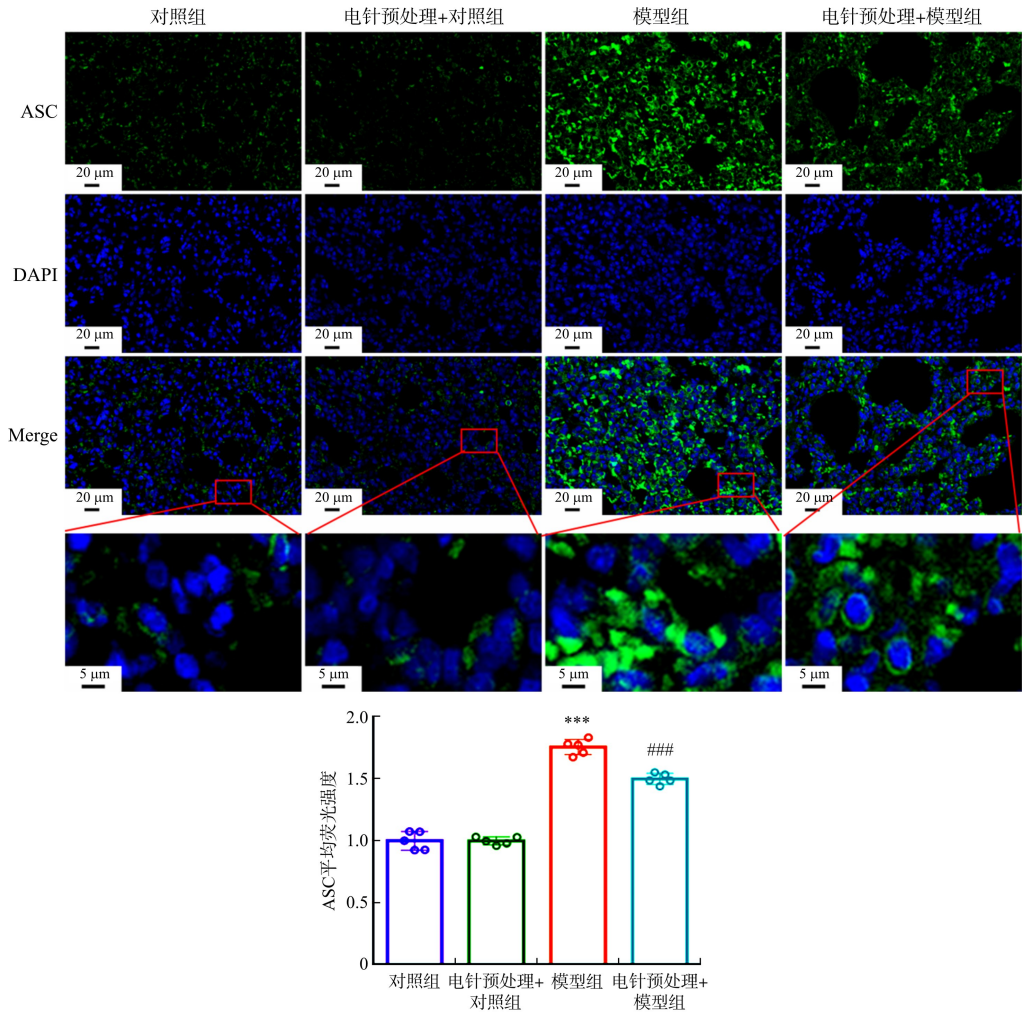
图 4 各组大鼠血浆及肺组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 含量比较

Fig. 4 Comparison of IL-1 $\beta$  and IL-18 in plasma and lung tissue of rats in each group

2.5 各组大鼠肺组织中 ASC 蛋白阳性表达比较

对照组、电针预处理+对照组大鼠肺组织中存在少量 ASC 蛋白,差异无统计学意义 ( $P>0.05$ );模

型组大鼠肺组织中观察到 ASC 蛋白阳性表达明显增多 ( $P<0.001$ );电针预处理+模型组大鼠肺组织中 ASC 蛋白阳性表达显著降低 ( $P<0.001$ )。见图 5。



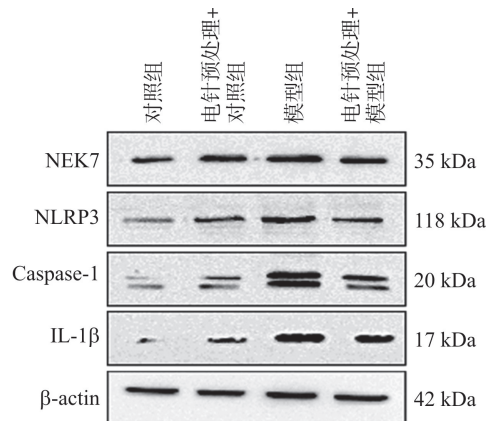
注:细胞核呈蓝色,ASC 蛋白阳性表达呈绿色。与对照组比较,\*\*\*  $P<0.001$ ;与模型组比较,###  $P<0.001$ 。  $\bar{x}\pm s, n=5$ 。

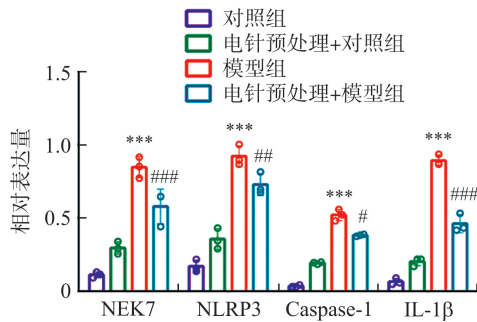
图 5 各组大鼠肺组织中 ASC 蛋白阳性表达比较(免疫荧光,×400)

Fig. 5 Comparison of the positive expression of ASC protein in lung tissue of rats in each group (IF staining, ×400)

2.6 各组大鼠肺组织内 NEK7、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  蛋白相对表达量的比较

与对照组比较,电针预处理+对照组大鼠肺组织内 NEK7、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  蛋白表达量差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ),模型组大鼠肺组织内 NEK7、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  蛋白表达量显著升高 ( $P<0.001$ );与模型组比较,电针预处理+模型组大鼠肺组织内 NEK7、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  蛋白表达量显著降低 ( $P<0.05, P<0.01, P<0.001$ )。见图 6。





注:与对照组比较,\*\*\* $P < 0.001$ ;与模型组比较,# $P < 0.05$ ,  
## $P < 0.01$ ,### $P < 0.001$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 3$ 。

图 6 各组大鼠肺组织中 NEK7、NLRP3、Caspase-1 与 IL-1β 蛋白相对表达量比较

Fig. 6 Comparison of the relative expression levels of NEK7, NLRP3, Caspase-1 and IL-1β in lung tissues of rats in each group

### 3 讨论

ALI 在中医学中属“暴喘”“喘脱”“结胸”等范畴,其病机复杂,多为淫邪侵袭肺系,痰浊内蕴,肺气上逆,表现为呼吸急促,进而出现喘息无力<sup>[14]</sup>。针刺具有便捷、有效、安全等特点,有研究<sup>[15]</sup>表明预电针可以改善 ALI 模型的肺通气功能,抑制促炎因子 IL-1β、TNF-α 及增加抑炎因子 IL-10 的释放,发挥肺保护作用。“足三里”穴是足阳明胃经穴,也是常用的保健要穴,具有固本培元,调补气血的功效;“尺泽”穴为肺经之合穴,常用于治疗肺系病症。马秋富等<sup>[16]</sup>研究显示,高强度电针预处理“足三里”穴在内毒素血症中可以激活迷走-脾反射通路引起抗炎效应;低强度电针“足三里”穴可以通过迷走-肾上腺轴发挥抗炎作用。Zhang 等<sup>[17]</sup>研究发现,电针“足三里”穴能显著减少 ARDS 小鼠肺组织的病理变化,减少肺泡内蛋白液的渗出,提高小鼠存活率。课题组前期研究显示<sup>[18]</sup>,电针“足三里”穴和“尺泽”穴可以抑制脓毒症 ALI 模型大鼠肺泡巨噬细胞向 M1 表型极化,减少炎症因子的释放。ALI 可由多种因素引起,脓毒症是 ALI 常见的诱因<sup>[19]</sup>。肺部过度的炎症反应引发肺泡-毛细血管通透性增加导致弥漫性肺泡损伤,其中肺水肿是 ALI 的关键病理特征之一。本实验中经 LPS 诱导的大鼠表现为呼吸急促,HE 染色显示肺泡结构紊乱,肺组织炎性浸润明显,充血水肿,且 W/D 比值升高,炎症因子分泌增多,提示脓毒症 ALI 模型复制成功。而电针预处理可以改善大鼠肺功能,减轻肺组织炎性病理反应,表明电针预处理可在脓毒症 ALI 中发挥肺保护

效应。

IL-1β 具有强致炎作用,启动炎症反应并引起炎症级联效应,可诱导 IFN-γ 的产生,增加一氧化氮和趋化因子的合成等促进炎症反应<sup>[20]</sup>。在 ALI 模型小鼠中 IL-18 含量明显增加<sup>[21]</sup>。本研究中,模型组大鼠血清及肺组织中 IL-1β、IL-18 含量明显升高,电针预处理后 IL-1β、IL-18 含量均降低,提示电针可以抑制促炎因子的释放,减轻脓毒症 ALI 大鼠的炎性反应。

IL-1β、IL-18 的分泌与炎症细胞中 NLRP3 炎症小体的激活直接相关<sup>[22]</sup>。NLRP3 炎症小体是一种多蛋白复合体,可在多种免疫细胞中表达<sup>[23]</sup>。NLRP3 炎症小体由三部分组成:以 NLRP3 作为受体蛋白、凋亡相关斑点样蛋白(Apoptosis associated speck like protein containing, ASC)作为接头蛋白和半胱天冬蛋白酶的前体 Pro-Caspase-1 为效应蛋白<sup>[24]</sup>。NLRP3 在被 LPS、ATP、尿酸结晶、尼日尼亚菌素等刺激后,募集 ASC,ASC 寡聚化形成 ASC 斑点进一步组装炎症小体;最后,ASC 与 Pro-Caspase-1 结合激活 NLRP3 炎症小体<sup>[25]</sup>。NLRP3 炎症小体活化后介导 Caspase-1 活化,剪切细胞质中的前白细胞介素-1β(Pro-IL-1β)和 Pro-IL-18,形成成熟的 IL-1β 和 IL-18 并释放至细胞外参与炎症反应<sup>[26]</sup>。在 ALI 小鼠模型中,通过抑制 NLRP3 炎症小体的激活,减轻了肺损伤及炎症细胞的浸润<sup>[27-28]</sup>。NEK7 是一种多功能激酶,影响中心体复制、线粒体调节、DNA 修复和有丝分裂纺锤体组装等<sup>[29]</sup>。NEK7 是 NLRP3 炎症小体激活的关键蛋白,其与 NLRP3 中的亮氨酸重复序列域及核苷酸寡聚化结构域结合,介导 NLRP3 炎症小体的寡聚化和激活,促进 ASC 斑点形成和钾离子外流下游 Caspase-1 的激活<sup>[30-31]</sup>。有研究发现<sup>[32]</sup>,采用 NEK7 siRNA 沉默 NEK7 后,显著抑制了 Caspase-1、IL-1β 蛋白的表达和 ASC 斑点形成,影响 NLRP3 炎症小体激活。另有研究<sup>[33]</sup>显示,格列本脲通过干扰 NEK7/NLRP3 结合,抑制 NLRP3 炎症小体激活及 IL-1β 的表达。在本实验中,模型组大鼠肺组织中 ASC 蛋白阳性表达增加,NEK7、NLRP3、Caspase-1、IL-1β 蛋白的表达明显增加,经电针预处理后,大鼠肺组织中 ASC 蛋白阳性表达减少,NEK7、NLRP3、Caspase-1 及 IL-1β 蛋白的表达显著降低,提示电针预处理可能通过抑制 NEK7-NLRP3 炎症小体的激活,减轻脓毒症 ALI 的肺损伤。

综上所述,电针预处理可以减轻脓毒症 ALI 模型大鼠肺部的病理损伤,减轻肺水肿,改善肺功能以及减少肺部的炎症因子分泌和 ASC 蛋白阳性表达,其机制与抑制肺组织中 NEK7-NLRP3 炎症小体的激活相关。但电针预处理抑制 NEK7-NLRP3 炎症小体的上游机制尚需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] LU QY, YU SF, MENG XY, et al. microRNAs: Important regulatory molecules in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(10): 5545.
- [2] LIU C, XIAO K, XIE LX. Advances in the use of exosomes for the treatment of ALI/ARDS[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 971189.
- [3] MEYER NJ, GATTINONI L, CALFEE CS. Acute respiratory distress syndrome[J]. *Lancet*, 2021, 398(10300): 622-637.
- [4] 谢臻灿, 吴双华, 李峥嵘, 等. 电针刺刺激通过 JAK1/STAT3 通路减轻脓毒症大鼠的急性肺损伤[J]. *南方医科大学学报*, 2020, 40(11): 1662-1667.
- [5] XIE CC, WU SH, LI ZR, et al. Electroacupuncture protects septic rats from acute lung injury through the JAK1/STAT3 pathway[J]. *J South Med Univ*, 2020, 40(11): 1662-1667.
- [6] LUO D, LIU L, ZHANG HM, et al. Electroacupuncture pretreatment exhibits lung protective and anti-inflammation effects in lipopolysaccharide-induced acute lung injury via SIRT1-dependent pathways[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 2252218.
- [7] SHI XY, LI T, LIU YT, et al. HSF1 protects sepsis-induced acute lung injury by inhibiting NLRP3 inflammasome activation[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 781003.
- [8] WANG H, SUN XT, LU Q, et al. The mitochondrial redistribution of eNOS is involved in lipopolysaccharide induced inflammasome activation during acute lung injury[J]. *Redox Biol*, 2021, 41: 101878.
- [9] LI JM, BAI Y, TANG YT, et al. A 4-benzene-indol derivative alleviates LPS-induced acute lung injury through inhibiting the NLRP3 inflammasome[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 812164.
- [10] XU J, LU LQ, LI LF. NEK7: A novel promising therapy target for NLRP3-related inflammatory diseases[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2016, 48(10): 966-968.
- [11] SUN ZZ, GONG W, ZHANG Y, et al. Physiological and pathological roles of mammalian NEK7[J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 606996.
- [12] 刘瑞莲. 利多卡因通过 P2X7R/NLRP3/Caspase-1 途径对脂多糖诱导急性肺损伤大鼠的保护作用研究[D]. 广州: 广州医科大学, 2018.
- [13] LIU RL. Protective effect of lidocaine on lipopolysaccharide induced acute lung injury in rat via attenuating P2X7R/NLRP3/caspase-1 pathway[D]. Guangzhou: Guangzhou Medical University, 2018.
- [14] 刘心月, 苏景超, 张新芳, 等. 电针预处理对脂多糖诱导的脓毒症急性肺损伤大鼠肺组织中血管紧张素转化酶 2、血管紧张素(1-7)的影响[J]. *针刺研究*, 2022, 47(8): 684-689.
- [15] LIU XY, SU JC, ZHANG XF, et al. Electroacupuncture preconditioning improves pulmonary function via inhibiting inflammatory response and up-regulating expression of ACE2 and Ang(1-7) in lipopolysaccharide-induced acute lung injury rats[J]. *Acupunct Res*, 2022, 47(8): 684-689.
- [16] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 2版. 北京: 中国中医药出版社, 2007.
- [17] LI ZR. *Experimental Acupuncture*[M]. 2nd ed. Beijing: China press of traditional Chinese medicine, 2007.
- [18] 杨英伟, 李建, 刘恩顺, 等. 204 例 ALI/ARDS 患者中医证候分布与演变特征研究[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(3): 911-913.
- [19] YANG YW, LI J, LIU ES, et al. Study on the TCM syndrome distribution and evolution characteristic of 204 ALI/ARDS patients[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2015, 30(3): 911-913.
- [20] 徐弋茜, 崔翔, 刘坤, 等. 电针和预电针改善急性肺损伤大鼠肺功能的效应差异[J]. *针刺研究*, 2022, 47(7): 580-586.
- [21] XU YQ, CUI X, LIU K, et al. Comparison of effects of routine electroacupuncture and pre-electroacupuncture in improving lung function in acute lung injury rats[J]. *Acupunct Res*, 2022, 47(7): 580-586.
- [22] LIU SB, WANG ZF, SU YS, et al. A neuroanatomical basis for electroacupuncture to drive the vagal-adrenal axis[J]. *Nature*, 2021, 598(7882): 641-645.
- [23] ZHANG YG, ZHENG L, DENG HM, et al. Electroacupuncture alleviates LPS-induced ARDS through  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor-mediated inhibition of ferroptosis[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 832432.
- [24] 张毅. 电针预处理调控 ALI 大鼠肺泡巨噬细胞 M1 极化的作用研究[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2021.
- [25] ZHANG Y. Effect of electro-acupuncture pretreatment on M1 polarization of alveolar macrophages in acute lung injury rats[D]. Hefei: Anhui University of Chinese Medicine, 2021.
- [26] AVECILLAS JF, FREIRE AX, ARROLIGA AC. Clinical epidemiology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: Incidence, diagnosis, and outcomes[J]. *Clin Chest Med*, 2006, 27(4): 549-557.
- [27] NOVICK D, KIM S, KAPLANSKI G, et al. Interleukin-18, more than a Th1 cytokine[J]. *Semin Immunol*, 2013, 25(6): 439-448.
- [28] YANG J, YANG JW, HUANG XF, et al. Glibenclamide alleviates LPS-induced acute lung injury through NLRP3 inflammasome signaling pathway[J]. *Mediators Inflamm*, 2022, 2022: 8457010.
- [29] DUAN YH, WANG JH, CAI J, et al. The leucine-rich repeat (LRR) domain of NLRP3 is required for NLRP3 inflammasome activation in macrophages[J]. *J Biol Chem*, 2022, 298(12): 102717.
- [30] SHAO BZ, XU ZQ, HAN BZ, et al. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: A review[J]. *Front Pharmacol*, 2015, 6: 262.
- [31] SONG H, ZHAO CY, YU ZX, et al. UAF1 deubiquitinase complexes facilitate NLRP3 inflammasome activation by promoting NLRP3 expression[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 6042.
- [32] ZANGIABADI S, ABDUL-SATER AA. Regulation of the NLRP3 inflammasome by posttranslational modifications[J]. *J Immunol*, 2022, 208(2): 286-292.
- [33] PAIK S, KIM JK, SILWAL P, et al. An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation[J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(5): 1141-1160.
- [34] GUAN XX, YANG HH, ZHONG WJ, et al. Fn14 exacerbates acute lung injury by activating the NLRP3 inflammasome in mice[J]. *Mol Med*, 2022, 28(1): 85.
- [35] ZHANG Y, LI XR, GRAILER JJ, et al. Melatonin alleviates acute lung injury through inhibiting the NLRP3 inflammasome[J]. *J Pineal Res*, 2016, 60(4): 405-414.
- [36] FRY AM, BAYLISS R, ROIG J. Mitotic regulation by NEK kinase networks[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2017, 5: 102.
- [37] SHARIF H, WANG L, WANG WL, et al. Structural mechanism for NEK7-licensed activation of NLRP3 inflammasome[J]. *Nature*, 2019, 570(7761): 338-343.
- [38] HE Y, ZENG MY, YANG DH, et al. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux[J]. *Nature*, 2016, 530(7590): 354-357.
- [39] WANG Y, ZENG Z, RAN JR, et al. The critical role of potassium efflux and Nek7 in *Pasteurella multocida*-induced NLRP3 inflammasome activation[J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 849482.
- [40] LIU H, GU CP, LIU MJ, et al. NEK7 mediated assembly and activation of NLRP3 inflammasome downstream of potassium efflux in ventilator-induced lung injury[J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 177: 113998.

(编辑:杨巍敏)