

NLRP1 在异基因造血干细胞移植后非感染性肺损伤中的作用

李明峰 黎雯 丁兰 吴宇璐 刘璐 鞠文 乔建林 徐开林 曾令宇

【摘要】 目的 探索核苷酸结合寡聚化结构域样受体 1 (NLRP1) 在异基因造血干细胞移植 (allo-HSCT) 后非感染性肺损伤中的作用。方法 以 C57BL/6 小鼠和 NLRP1^{-/-} 小鼠为受鼠, 建立 allo-HSCT 模型, 流式细胞术检测骨髓嵌合率, HE 染色后在高倍镜下观察 NLRP1 敲除前后不同时间点 C57BL/6 小鼠肺组织病理学形态, 采用 Western blot 法检测 NLRP1 敲除前后肺组织 NLRP1 及相关炎性蛋白表达情况。结果 ① allo-HSCT 后第 14 天, 供鼠造血干细胞基本完全植入, 嵌合率均大于 96%。② 显微镜下观察示移植后小鼠肺组织出现严重损伤, 可见明显的肺泡壁增厚, 伴肺泡中出现渗出物及炎性细胞浸润。该损伤在移植后 21 d 内呈进行性加重, 而至移植后第 28 天, 上述病理改变则逐渐减轻。移植后 NLRP1 敲除组小鼠在对应时间点肺泡增厚程度、肺泡内渗出及细胞浸润均轻于非敲除组小鼠。③ 与正常对照组比较, 移植组 NLRP1 及 NLRP1 下游的相关炎性蛋白 p20、Mature-IL-1 β 、Mature-IL-18 表达逐渐增高, 移植后第 21 天达到最高, 不同时间点移植组间比较差异均有统计学意义 (P 值均 <0.05), 与病理学改变同步。④ NLRP1 敲除组小鼠中性粒细胞及巨噬细胞的标志蛋白 MPO、p20、Mature-IL-1 β 及 Mature-IL-18 在同一时间点的表达低于非敲除组, 差异均有统计学意义 (P 值均 <0.05)。结论 allo-HSCT 后小鼠出现非感染性肺损伤并伴 NLRP1 表达增高, 敲除 NLRP1 可减轻移植后肺损伤及相关炎性蛋白表达, 提示 NLRP1 可能是移植后非感染性肺损伤的因素之一。

【关键词】 造血干细胞移植; 肺损伤; NLRP1

基金项目: 国家自然科学基金 (81370602)

The function of NLRP1 in noninfectious pulmonary injury following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation Li Mingfeng, Li Wen, Ding Lan, Wu Yulu, Liu Lu, Ju Wen, Qiao Jianlin, Xu Kailin, Zeng Lingyu. Department of Hematology, Xuzhou Medical University, Jiangsu Province Xuzhou 221002, China.

Corresponding author: Zeng Lingyu, Email: zengly2000@163.com

【Abstract】 **Objective** To explore the function of NLRP1 in noninfectious pulmonary injury (nonIPI) after allogeneic stem cell transplantation (allo-HSCT). **Methods** In this study, we established the model of allo-HSCT with C57BL/6 and NLRP1^{-/-} mouse as recipients. Chimera rate was measured by flow cytometry. The HE staining was used to observe the pathology changes in the lungs. NLRP1 and relevant inflammatory proteins were measured by Western Blot. **Results** On the day 14 after allo-HSCT, the chimera rate was more than 96%, HSCs of donors had been successfully transplanted into recipients. HE staining showed that nonIPI occurred after allo-HSCT. The degrees of injuries reached the peak on day 21. In addition, the expressions of MPO, NLRP1, p20, Mature-IL-1 β and Mature-IL-18 had same trends with the degrees of nonIPI. When we knocked out NLRP1 gene of recipients, the degrees of nonIPI reduced and the expressions of MPO, p20, Mature-IL-1 β and Mature-IL-18 were less than in non-knockout group. **Conclusion** allo-HSCT could cause nonIPI and high expressions of MPO, p20, IL-1 β , IL-18, NLRP1. Knocking out NLRP1 gene could alleviate the degrees of nonIPI and reduce the expressions of relevant inflammatory proteins, indicating that NLRP1 might be one of factors contributed to nonIPI after allo-HSCT.

【Key words】 Hematopoietic stem cell transplantation; Lung injury; Nucleotide-binding, leucine-

rich repeat pyrin domain containing protein 1

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81370602)

异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)是治疗恶性血液病的有效手段,但研究显示有40%~60%的患者在接受移植后可以出现感染或非感染性肺损伤,并有50%的患者因此而死亡,因此移植后肺损伤成为影响患者预后的重要因素^[1-4]。目前认为,移植后非感染性肺损伤发生的主要原因是放化疗预处理对肺组织的炎性损伤作用^[5-6],而核苷酸结合寡聚化结构域样受体1(nucleotide-binding, leucine-rich repeat pyrin domain containing protein 1, NLRP1)作为炎性复合体,在炎性相关性疾病的发生、发展过程中发挥重要作用。我们采用C57BL/6小鼠及NLRP1^{-/-}小鼠建立allo-HSCT肺损伤模型,观察NLRP1及相关因子在移植后的表达,以阐明移植后非感染性肺损伤的发生机制。

材料与方法

1. 主要试剂和仪器:抗Caspase-1抗体为美国BioVision公司产品,抗IL-1 β 抗体NLRP1抗体和抗IL-18抗体为美国CST公司产品,抗IL-18抗体为美国Santa Cruz公司产品,山羊抗兔IgG二抗为北京中杉金桥生物技术有限公司产品,抗鼠H2K^b-PE、抗鼠H2K^d-FITC、抗鼠CD45-PerCP/Cy5.5抗体为美国BioLegend公司产品,蛋白显影仪为上海天能科技有限公司产品,⁶⁰Co辐照仪为山东新华医疗器械股份有限公司产品,FACSCalibur流式细胞仪为BD公司产品。

2. 实验动物:C57BL/6小鼠(H2K^b)、BABL/c小鼠(H2K^d)均购于南京大学模式动物研究所;NLRP1^{-/-}小鼠(H2K^b)购于美国杰克逊实验室。小鼠均为8至10周龄的SPF级雄性小鼠,饲养于徐州医科大学血液科实验室IVC系统。

3. 实验分组:①正常C57BL/6组(BN组):5只C57BL/6小鼠不给予任何处理;②正常NLRP1^{-/-}组(NN组):5只NLRP1^{-/-}小鼠不给予任何处理;③C57BL/6 allo-HSCT组(BT组):20只C57BL/6小鼠预先8 h给予⁶⁰Co γ 照射,总剂量8.5 Gy,然后经鼠尾静脉输注BABL/c小鼠骨髓单个核细胞;④NLRP1^{-/-} allo-HSCT组(NT组):20只NLRP1^{-/-}小鼠预先8 h给予⁶⁰Co γ 照射,总剂量8.5 Gy,然后经鼠尾静脉输注BABL/c小鼠骨髓单个核细胞。正常小鼠及allo-HSCT小鼠分别于移植当天和移植后第7、14、21、28

天脱颈处死,取肺组织及骨髓细胞进行后续检测。

4. 移植后受鼠骨髓细胞表型检测:用抗鼠H2K^b-PE、抗鼠H2K^d-FITC、抗鼠CD45-PerCP/Cy5.5抗体标记骨髓单个核细胞,避光常温孵育20 min, PBS洗涤1次后上流式细胞仪检测骨髓细胞表面表型,判断嵌合率。

5. 肺组织形态学观察:取小鼠肺组织,一部分放于冻存管中,-80℃保存,其余PBS冲洗后,固定、脱水、石蜡包埋、切片。用HE染色,在光学显微镜下观察肺组织病理形态变化。

6. 采用Western blot法检测肺组织NLRP1及相关炎性蛋白的表达:取保存在-80℃中的肺组织,用液氮研磨法将其研碎,加入RIPA裂解液与苯甲基磺酰氟,冰上静置20 min,4℃下20 000 \times g离心20 min,吸取上清后加入SDS-PAGE 5 \times 上样缓冲液,混匀后用99℃金属浴加热10 min后进行加样;将蛋白质条带转移至硝酸纤维素膜;用明胶封闭3 h后,加入NLRP1、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18、MPO和 β -actin一抗后,4℃过夜;PBST洗膜3次,加入二抗,室温孵育1 h,再用PBST洗膜3次后进行显影。以目的条带与 β -actin条带的灰度比值表示目的蛋白的相对表达水平。

7. 统计学处理:采用SPSS16.0软件对数据进行统计学分析。符合正态分布的数据以均数 \pm 标准差表示,两组间比较若方差齐采用 t 检验或 t' 检验;多组间比较采用单因素方差分析,与正常组的两两比较采用Dunnnett检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

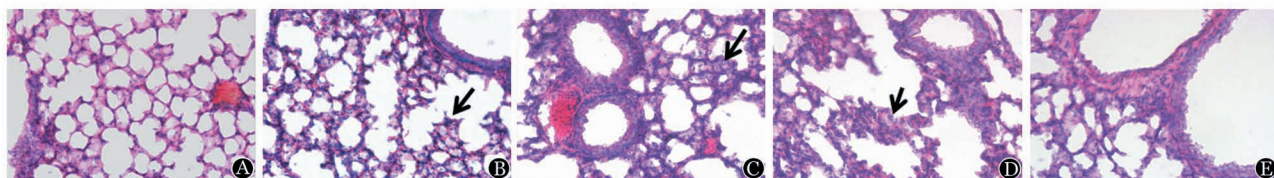
1. allo-HSCT小鼠造血干细胞植入情况:流式细胞术检测结果显示allo-HSCT后第14天,BT组和NT组的供鼠造血干细胞植入,嵌合率均大于96%(表1),提示allo-HSCT模型建立成功。

2. allo-HSCT后小鼠肺组织形态学观察:移植后小鼠肺组织出现严重损伤,可见明显的肺泡壁增厚,伴肺泡中出现渗出物及炎性细胞浸润。该损伤在移植后的21 d内呈进行性加重,而至移植后第28天,上述病理改变则逐渐减轻(图1)。

3. 移植对MPO、p20、Mature-IL-1 β 、Mature-IL-18及NLRP1表达的影响:移植后中性粒细胞及

表 1 移植后不同时间点供鼠骨髓细胞嵌合率(% , $\bar{x}\pm s$)

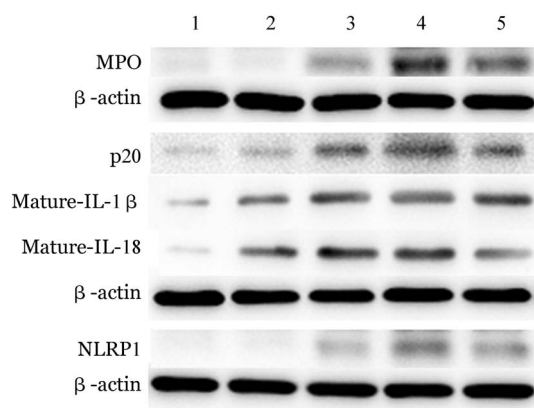
组别	鼠数	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
C57BL/6 移植组	5	92.40±1.37	97.07±0.19	98.90±0.36	98.73±0.38
NLRP1 ^{-/-} 移植组	5	92.43±0.85	96.67±0.43	99.27±0.09	98.80±0.41



A: 正常 C57BL/6 小鼠; B~E: 为移植后第 7、14、21、28 天 C57BL/6 小鼠肺组织(箭头所指为肺泡壁增厚、肺泡内渗出及浸润细胞较多的区域)

图 1 正常 C57BL/6 小鼠及异基因造血干细胞移植后 C57BL/6 小鼠不同时间点肺组织病理形态变化(HE 染色, ×400)

巨噬细胞的标志蛋白 MPO、p20、Mature-IL-1 β 及 Mature-IL-18 表达逐渐增多, 移植后第 21 天达到峰值, 随后下降; NLRP1 表达水平也于第 21 天达到峰值, 随后下降(图 2、表 2)。



1: 正常 C57BL/6 小鼠; 2: 移植后 7 d; 3: 移植后 14 d; 4: 移植后 21 d; 5: 移植后 28 d

图 2 正常及移植后不同时间点 C57BL/6 小鼠肺组织中 MPO、p20、Mature-IL-1 β 、Mature-IL-18 及 NLRP1 的表达

4. 敲除 NLRP1 基因对移植后肺损伤的影响: HE 染色结果显示, NLRP1 敲除组小鼠, 在对应时间点肺泡增厚程度、肺泡内渗出及细胞浸润均轻于非敲除组小鼠(图 3)。

5. 敲除 NLRP1 基因对 MPO、p20、Mature-IL-1 β 、Mature-IL-18 及 NLRP1 表达的影响: 结果显示, NLRP1 敲除组小鼠中性粒细胞及巨噬细胞的标志蛋白 MPO、p20、Mature-IL-1 β 及 Mature-IL-18 在同一时间点的表达低于非敲除组(图 4)。

讨 论

非感染性肺损伤作为 allo-HSCT 后的并发症之

一, 严重影响患者的预后。本研究中, 我们在移植前后给予小鼠含抗生素的高压酸化水、高压灭菌后的饲料, 定期更换消毒后的鼠笼及垫料, 从而避免移植后感染, 消除感染因素导致的肺损伤, 构建 allo-HSCT 后非感染性肺损伤模型。

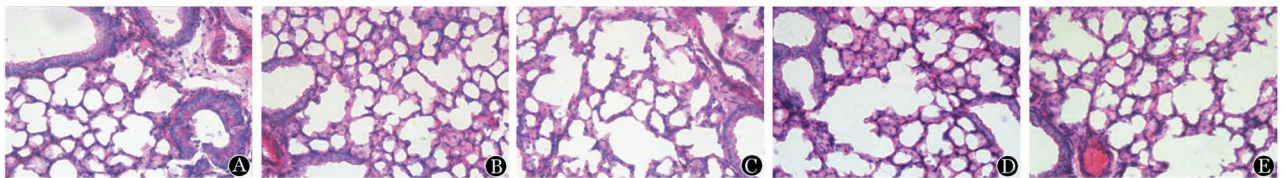
研究发现放射可以损伤肺泡 II 型上皮细胞及内皮细胞^[7]。在辐射作用下细胞中的水可分解为 ROS(一种比氧分子更为活跃的氧分子衍生物, 主要包括羟自由基、超氧阴离子和过氧化氢)。ROS 可与磷酸二酯键、碱基和核糖相互作用引起脂质过氧化和 DNA 损伤, 从而破坏生物膜^[8]。当细胞膜在 ROS 的作用下发生损伤, 有可能引起钾离子外流, 而钾离子外流则是激活 NLRP1 的重要因素^[9-10]。

NLRP1 通过 Nod 样受体识别危险相关分子模式(DAMP)^[11]以及病原相关分子模式(PAMP)^[12], 并通过接头蛋白 ASC 募集 Caspase-1 前体, Caspase-1 的前体相互活化剪切生成有活性的 Caspase-1 片段 p20, 继而活化下游的炎症细胞因子 IL-1 β 及 IL-18^[13]。IL-1 β 作为一种炎症细胞因子, 主要参与了组织破坏、水肿形成等多种病理损伤过程。根据 Bhatia 等^[14]的研究, IL-1 β 可以作用于内皮细胞, 促进 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 、IFN- γ 、PAF 的释放及氮氧化物、蛋白酶、花生四烯酸代谢产物的生成, 引发级联瀑布反应, 造成急性肺损伤。IL-18 则是一种可以诱导多种 Th1 型细胞因子产生的前炎症细胞因子, 具有促进 I 型免疫应答、免疫调节和致炎的作用。IL-18 也可通过 NF- κ B 和 AP1 信号通路促进 IL-2 的表达^[15]。Kitasato 等^[16]通过每日给予小鼠 IL-18, 成功诱导小鼠发生致命性肺损伤。此外, Strieter 等^[17]证实 IL-1 β 还可以诱导内皮细胞表达 MCP-1, 从而刺激中性粒细胞及单核巨噬细胞等炎症细胞游走至相应部位加重炎症损伤^[18]。

表2 移植后不同时间点肺组织中相关蛋白的表达($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	MPO	p20	Mature-IL-1 β	Mature-IL-18	NLRP1
C57BL/6 正常组	5	40 127 \pm 1 567	52 055 \pm 8 381	29 450 \pm 2 703	14 287 \pm 558	24 670 \pm 2 190
C57BL/6 移植组						
移植后第7天	5	34 313 \pm 2 253	75 355 \pm 9 831	76 782 \pm 4 311 ^a	101 313 \pm 3 181 ^a	28 581 \pm 1 297 ^a
移植后第14天	5	122 460 \pm 3 173 ^a	143 538 \pm 14 586 ^a	119 384 \pm 6 866 ^a	146 398 \pm 4 511 ^a	76 883 \pm 1 209 ^a
移植后第21天	5	255 620 \pm 11 665 ^a	221 863 \pm 28 386 ^a	125 911 \pm 4 350 ^a	143 696 \pm 5 054 ^a	151 727 \pm 2 948 ^a
移植后第28天	5	194 020 \pm 3 122 ^a	144 437 \pm 17 104 ^a	124 999 \pm 12 199 ^a	124 999 \pm 12 199 ^a	111 991 \pm 2 546 ^a
F值		852.7	45.31	110.2	720.6	1927
P值		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注:与C57BL/6正常组比较,^aP<0.05



A:正常NLRP1^{-/-}小鼠;B~E:为移植后第7、14、21、28天NLRP1^{-/-}小鼠肺组织

图3 正常及异基因造血干细胞移植后NLRP1^{-/-}小鼠肺组织病理形态变化(HE染色,×400)

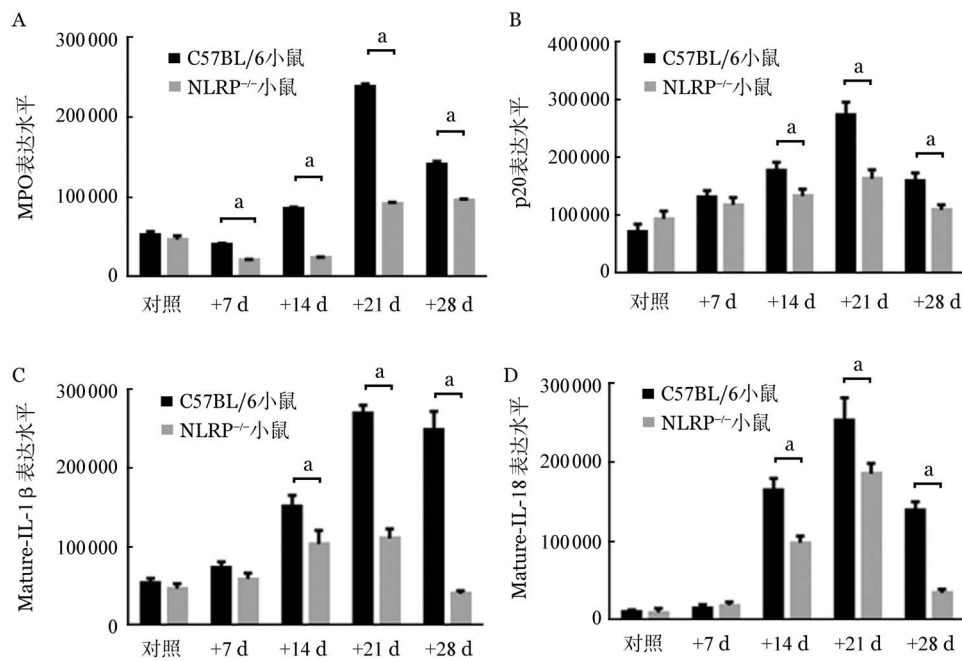


图4 采用Western blot法检测敲除NLRP1基因对移植后不同时间点小鼠MPO(A)、p20(B)、Mature-IL-1 β (C)、Mature-IL-18(D)表达的影响(*P<0.05)

通过研究我们发现,allo-HSCT后小鼠肺组织出现肺泡壁增厚、肺泡内渗出物增多并伴有细胞浸润,在移植后第21天损伤程度最重,其与中性粒细胞和单核巨噬细胞浸润程度、Mature-IL-1 β 及Mature-IL-18的变化具有相同的趋势,和Bhatia、Kitasato、Strieter等^[14,16-17]的研究结果相符。测定肺组织NLRP1,其变化趋势与其下游Caspase-1活性片段p20、Mature-IL-1 β 及Mature-IL-18也具有相同

趋势。提示NLRP1可能通过Caspase-1生成具有活性的Mature-IL-1 β 及Mature-IL-18,并趋化中性粒细胞及单核巨噬细胞等炎性细胞,介导allo-HSCT后非感染性肺损伤的发生。为进一步明确NLRP1与allo-HSCT后非感染性肺损伤的关系,我们又以NLRP1^{-/-}小鼠建立allo-HSCT模型,发现敲除NLRP1后,肺组织病理损伤程度较非敲除组低,NLRP1下游的Caspase-1活性片段p20、Mature-

IL-1 β 及 Mature-IL-18 的表达也较非敲除组低,中性粒细胞及单核巨噬细胞浸润减少。说明敲除 NLRP1 可以减轻移植后肺损伤程度。由此进一步证明 NLRP1 可能参与 allo-HSCT 后非感染性肺损伤的发生。

随着当下对 NLRP1 的深入研究,越来越多可对 NLRP1 信号通路进行负调控的物质得以发现:①凋亡相关蛋白 Bcl 家族中的 Bcl-2 和 Bcl-X(L)已被证明可与 NLRP1 结合,并抑制 Caspase-1 的活化,从而影响其下游炎性细胞因子 IL-1 β 的成熟^[19];② I 型干扰素可以促进转录因子 stat1 第 701 位的氨基酸酪氨酸磷酸化,继而抑制 NLRP1b 的活化^[20];③效应及记忆 T 细胞可通过细胞间接触抑制 NLRP1 活化;④卡波西肉瘤相关疱疹病毒编码的 Orf63 蛋白与 NLRP1 中的 LRR 结构域高度类似,因此能与 NLRP1 结合,但因其缺少 PYD 和 CARD 结构域,所以无法再与胞壁酰二肽结合,而起到抑制 NLRP1 的作用^[21]。

参考文献

- [1] Diab KJ, Yu Z, Wood KL, et al. Comparison of pulmonary complications after nonmyeloablative and conventional allogeneic hematopoietic cell transplant[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2012, 18 (12): 1827-1834. DOI: 10.1016/j.bbmt.2012.06.013.
- [2] Chi AK, Soubani AO, White AC, et al. An update on pulmonary complications of hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Chest*, 2013, 144(6): 1913-1922. DOI: 10.1378/chest.12-1708.
- [3] Peña E, Souza CA, Escuissato DL, et al. Noninfectious pulmonary complications after hematopoietic stem cell transplantation: practical approach to imaging diagnosis [J]. *Radiographics*, 2014, 34(3): 663-683. DOI: 10.1148/rg.343135080.
- [4] Soubani AO, Pandya CM. The spectrum of noninfectious pulmonary complications following hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*, 2010, 3(3): 143-157.
- [5] Mo XD, Xu LP, Liu DH, et al. High-dose cyclophosphamide therapy associated with diffuse alveolar hemorrhage after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Respiration*, 2013, 86(6): 453-461. DOI: 10.1159/000345592.
- [6] Majhail NS, Parks K, Defor TE, et al. Diffuse alveolar hemorrhage and infection-associated alveolar hemorrhage following hematopoietic stem cell transplantation: related and high-risk clinical syndromes[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2006, 12 (10): 1038-1046. DOI: 10.1016/j.bbmt.2006.06.002.
- [7] 申文江, 王绿化. 放射治疗损伤[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2001: 95-103.
- [8] 谢立蓀, 樊旻, 蒋国梁. 超氧化物歧化酶 2 基因及其产物与放射性肺损伤[J]. *上海医学*, 2008, 31(1): 69-72.
- [9] Fink SL, Bergsbaken T, Cookson BT. Anthrax lethal toxin and Salmonella elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis via distinct mechanisms [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105 (11): 4312-4317. DOI: 10.1073/pnas.0707370105.
- [10] Wickliffe KE, Leppla SH, Moayeri M. Anthrax lethal toxin-induced inflammasome formation and caspase-1 activation are late events dependent on ion fluxes and the proteasome[J]. *Cell Microbiol*, 2008, 10 (2): 332-343. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2007.01044.x.
- [11] Marina-García N, Franchi L, Kim YG, et al. Pannexin-1-mediated intracellular delivery of muramyl dipeptide induces caspase-1 activation via cryopyrin/NLRP3 independently of Nod2 [J]. *J Immunol*, 2008, 180(6): 4050-4057.
- [12] Mäkelä SM, Osterlund P, Julkunen I. TLR ligands induce synergistic interferon- β and interferon- λ 1 gene expression in human monocyte-derived dendritic cells [J]. *Mol Immunol*, 2011, 48 (4): 505-515. DOI: 10.1016/j.molimm.2010.10.005.
- [13] Dinarello CA. Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process [J]. *Am J Clin Nutr*, 2006, 83(2): 447S-455S.
- [14] Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome [J]. *J Pathol*, 2004, 202(2): 145-156. DOI: 10.1002/path.1491.
- [15] Greene CM, Meachery G, Taggart CC, et al. Role of IL-18 in CD4+ T lymphocyte activation in sarcoidosis [J]. *J Immunol*, 2000, 165(8): 4718-4724.
- [16] Kitasato Y, Hoshino T, Okamoto M, et al. Enhanced expression of interleukin-18 and its receptor in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 31(6): 619-625.
- [17] Strieter RM, Wiggins R, Phan SH, et al. Monocyte chemotactic protein gene expression by cytokine-treated human fibroblasts and endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 162(2): 694-700.
- [18] Ichinose T, Takano H, Sadakane K, et al. Differences in airway-inflammation development by house dust mite and diesel exhaust inhalation among mouse strains [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003, 187(1): 29-37.
- [19] Taxman DJ, Huang MT, Ting JP. Inflammasome inhibition as a pathogenic stealth mechanism [J]. *Cell Host Microbe*, 2010, 8 (1): 7-11. DOI: 10.1016/j.chom.2010.06.005.
- [20] Guarda G, Braun M, Staehli F, et al. Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation [J]. *Immunity*, 2011, 34 (2): 213-223. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.02.006.
- [21] Gregory SM, Davis BK, West JA, et al. Discovery of a viral NLR homolog that inhibits the inflammasome [J]. *Science*, 2011, 331(6015): 330-334. DOI: 10.1126/science.1199478.

(收稿日期:2016-10-27)

(本文编辑:刘志红)