

# NLRP3炎性小体在白念珠菌脓毒症小鼠组织器官中的表达及作用

王泽田, 刘建军\*, 唐建国\*

复旦大学附属上海市第五人民医院创伤急救危重病医学中心, 上海

Email: 18321127738@163.com, \*scopesky@126.com, \*tangjianguo@5thhospital.com

收稿日期: 2021年2月8日; 录用日期: 2021年3月16日; 发布日期: 2021年3月23日

## 摘要

目的: 研究NLRP3炎性小体信号通路相关分子在白念珠菌脓毒症小鼠重要组织器官中的表达情况, 初步探讨NLRP3炎性小体在白念珠菌脓毒症免疫反应中的作用。方法: 将C57BL/6小鼠分成对照组、脓毒症组(24 h, 48 h), 经尾静脉注射白念珠菌建立白念珠菌脓毒症感染模型, 在感染后的24 h、48 h处死小鼠并检测相关指标。取各组血液、肝、肺和肾组织匀浆在血平板上培养后检测其计数, ELISA法检测细胞因子IL-1 $\beta$ 以及IL-18含量; qRT-PCR检测各组织匀浆中NLRP3、ASC、caspase-1中mRNA表达情况, Western blot及免疫荧光染色监测各组织NLRP3、ASC、caspase-1蛋白表达情况。结果: 白念珠菌菌液(2.5\*10<sup>8</sup> CFU/mL, 1 ml/10g)可导致小鼠发生白念珠菌脓毒症。与健康对照组相比, 脓毒症组中的小鼠3种组织匀浆及血清中IL-1 $\beta$ 、IL-18表达水平升高; 与24 h组相比, 3种组织匀浆中NLRP3 mRNA、ASC mRNA、caspase-1 mRNA表达量在感染48 h后显著升高, 并且肝脏和肾脏中NLRP3 mRNA、ASC mRNA、caspase-1 mRNA在感染后24 h就显著升高; 通过Western blot及免疫组化可见NLRP3、ASC、pro-caspase-1和caspase-1 p20蛋白水平也显著升高, 不同组织中的阳性蛋白的表达量随感染时间而增加。与24 h组相比, 在48 h组中, NLRP3蛋白在肝、肾、肺组织表达量显著升高(p < 0.05); ASC蛋白水平在肾组织中显著升高(p < 0.05); caspase-1 p20蛋白水平在肝、肺组织中显著升高(p < 0.05)。结论: NLRP3炎性小体激活参与了白念珠菌脓毒症的发生和发展, 不同器官组织蛋白表达有一定的差异性, 在肝和肾组织中表达更多, 最终以促进细胞因子IL-1 $\beta$ 和IL-18的释放而发挥促炎作用。

## 关键词

白念珠菌, NLRP3炎性小体, 脓毒症

# Expression and Role of NLRP3 Inflammasome in Tissues and Organs of Mouse with *Candida albicans* Sepsis

\*通讯作者。

文章引用: 王泽田, 刘建军, 唐建国. NLRP3 炎性小体在白念珠菌脓毒症小鼠组织器官中的表达及作用[J]. 亚洲急诊医学病例研究, 2021, 9(2): 5-14. DOI: 10.12677/acrem.2021.92002

## Zetian Wang, Jianjun Liu\*, Jianguo Tang\*

Department of Trauma-Emergency & Critical Care Medicine, Shanghai Fifth People's Hospital, Fudan University, Shanghai

Email: 18321127738@163.com, \*scopesky@126.com, \*tangjianguo@5thhospital.com

Received: Feb. 8<sup>th</sup>, 2021; accepted: Mar. 16<sup>th</sup>, 2021; published: Mar. 23<sup>rd</sup>, 2021

### Abstract

**Objective:** To investigate the expression of NLRP3 inflammatory signaling pathway-related molecules in a mouse model with *Candida albicans* sepsis, and explore the immune reaction mechanism of NLRP3 inflammasome in *Candida albicans* infection. **Methods:** C57BL/6 mice were injected via caudal vein with *Candida albicans* and phosphate buffer (PBS) respectively in sepsis group (24 h, 48 h) and control group. The animals were sacrificed 24 h and 48 h after treatment respectively. The corresponding fungi colony-forming units and the levels of cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18 in serum and tissues were measured. qRT-PCR and Western blot analyses were used to detect NLRP3, ASC, caspase-1 mRNA and proteins in tissue homogenate. The expression of inflammasome was evaluated by immunohistochemistry. **Results:** *Candida albicans* sepsis occurred in mice after injection of *Candida albicans* solution via caudal vein (2.5\*10<sup>8</sup> cfu/ml, 1 ml/10g). Compared with healthy control group, levels of IL-1 $\beta$  and IL-18 increased significantly in all tissue homogenates; compared with 24 h group, the expression levels of NLRP3 mRNA, ASC mRNA and caspase-1 mRNA in three kinds of tissue homogenates significantly increased 48 h after infection, and NLRP3 mRNA, ASC mRNA and caspase-1 mRNA in liver and kidney significantly increased 24 h after infection. The expression of NLRP3, ASC, pro-caspase-1 and caspase-1 p20 protein in different tissues increased with the time of infection. Compared with 24 h group, in 48 h group, NLRP3 protein expression in liver, kidney and lung tissue significantly increased ( $p < 0.05$ ); ASC protein level in kidney tissue significantly increased ( $p < 0.05$ ); caspase-1 p20 protein level in liver and lung tissue significantly increased ( $p < 0.05$ ). **Conclusions:** These results suggest that *Candida albicans* sepsis is highly likely to be associated with activation of NLRP3 inflammasome, as the expression level of NLRP3 inflammasome is seen correlated with the severity of *Candida albicans* infection. Compared with lung tissue, there were more positive proteins in liver and kidney, and ultimately plays a role in promoting inflammatory response by releasing of IL-1 $\beta$  and IL-18.

### Keywords

*Candida albicans*, NLRP3 Inflammasome, Sepsis

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 前言

脓毒症是指因感染引起宿主反应失调而导致危及生命的器官功能障碍，可发展为脓毒性休克和多器官功能障碍综合征，具有较高的病死率[1]。近年来，随着广谱抗生素、皮质类固醇激素、免疫抑制剂的广泛使用，器官移植及心导管手术的开展，白念珠菌脓毒症已成为重要的院内感染[2] [3] [4]。炎症小体(Inflammasome)通过模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)识别病原微生物或者宿主来源的危

险信号分子[5],经活化后介导下游通路的炎症因子表达来调控炎症反应,广泛参与机体炎症反应和免疫应答,属于机体的固有免疫。目前研究最深入的炎症小体是 Nod 样受体蛋白 3 [nucleotide-binding domain (NOD)-like receptor protein 3, NLRP3],在机体多种炎症反应中起重要作用[6],已有研究报道多聚集在细菌性感染,在白念珠菌感染中的作用研究尚少。因此,本研究拟通过建立白念珠菌脓毒症小鼠模型来探讨 NLRP3 炎症小体在白念珠菌所致的脓毒症发病过程中的作用。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 实验材料

#### 2.1.1. 实验菌株和动物

白念珠菌标准菌株 ATCC10231 和 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 100 只(20~25 g, 6~8 周)分别购买于上海鲁微科技有限公司和上海斯莱克实验动物有限公司。动物饲养于复旦大学附属上海市第五人民医院动物实验室,所有的动物实验均执行“中国动物保健理事会”制定实验动物护使用指南规定,并且经复旦大学附属上海市第五人民医院伦理委员会批准了本研究中所涉及的所有相关动物实验。

#### 2.1.2. 设计引物

Primer premier 5.0 引物设计软件设计引物,基因序列来自 GenBank,PCR 引物由上海生工生物工程公司合成。引物序列如下: $\beta$ -actin:上游 5'-TGAGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3';下游 5'-GCTCGTTGCCAATAGTGATGACC-3';NLRP3:上游 5'-GGCTGCTATCTGGAGGAAGCTT-3',下游 5'-CATCTTCAGCAGCAGCCCTT-3';ASC:上游 5'-TGACAGTGCAACTGCGAGAA-3',下游 5'-GTGAGCTCCAAGCCATACGA-3';caspase-1:上游 5'-ACTGACTGGGACCCTCAAGT-3',下游 5'-GCAAGACGTGTACGAGTGGT-3'。

### 2.2. 方法

#### 2.2.1. 白念珠菌菌液制备

注射前 3 天,将白念珠菌 CMCC(F)98001 标准菌从-80℃冰箱取出,菌株接种在 YEPD 液体培养基中,37℃摇菌过夜。第 2 天将 100  $\mu$ l 溶液添加到 SD 琼脂平板上,在 30℃培养 48 h 下出现菌落后,将酵母细胞悬浮于无菌 PBS 中并洗涤 2 次。已有文献研究证实小鼠白念珠菌血流感染的 LD50 菌液浓度为 2.5\*10<sup>8</sup> CFU/mL [7],用麦氏比浊仪法确定菌液的浓度,首先确定 0.8 麦氏相当 2.5\*10<sup>8</sup> CFU/mL 的菌液浓度,上述菌液取 1/10 的浓度 2.5\*10<sup>9</sup> CFU/mL,依次稀释 10 倍的浓度 2.5\*10<sup>7</sup> CFU/mL,2.5\*10<sup>6</sup> CFU/mL。取上述 4 个浓度的菌液等体积的分别经尾静脉注射于 4 组小鼠体内,每组 10 只,注射量为 1 ml/10g,每日观察小鼠发病和死亡情况。

#### 2.2.2. 实验分组及处理

将小鼠随机分成 3 组(健康对照组、白念珠菌感染 24 h 组、白念珠菌感染 48 h 组),各组 20 只,将脓毒症组小鼠经 2%戊巴比妥钠腹腔麻醉后分别经尾静脉注射白念珠菌菌液(2.5\*10<sup>8</sup> CFU/mL, 0.1 ml/10g),对照组小鼠注射等量的无菌 PBS。分别于感染后 24 小时和感染后 48 小时安乐死处死小鼠。分别取血液、肝、肺和肾组织匀浆 10  $\mu$ l 分别加入 90  $\mu$ l 无菌 PBS 溶液稀释后接种于血平板上,37℃ 24~48 h 培养后记录其白念珠菌落计数(CFU)。

#### 2.2.3. 细胞炎症因子的 ELISA

按照 ELISA 试剂盒(英国 R&D 公司)说明书进行操作,检测各组器官组织匀浆中细胞因子(IL-1 $\beta$  和 IL-18)的含量,用酶标仪在 450 nm 波长下检测各组样品的吸光度(OD 值),并通过标准曲线计算各样品中细胞炎症因子的浓度。

#### 2.2.4. 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)

按 Trizol 试剂说明书操作提取总 RNA, 并检测总 RNA 的浓度与纯度值。按逆转录试剂盒(美国 Thermo 公司)说明书进行操作, 以  $\beta$ -actin 作为内参, 根据荧光定量 PCR 试剂盒说明书, 以 2  $\mu$ l cDNA 链为模板 20  $\mu$ l 的总反应体积进行 PCR 扩增, 其中上下游引物各 0.8  $\mu$ l。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min 预变性, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s; 58 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 40 个循环。由  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示目的基因表达的相对表达量。

#### 2.2.5. Western blot

取各组不同时间节点(24 h, 48 h)小鼠组织(肝、肺、肾)各 100 mg 样本置于匀浆器中球状部位, 用干净的组织剪尽量剪碎组织块。按照 RIPA 裂解液(上海生工生物工程公司)说明书操作。目标蛋白经 SDS-PAGE 电泳和 PVDF 转膜后, 置于 5%封闭液中摇动封闭 2 h, 封闭后分别用抗 NLRP3 抗体(1:1000)(美国 Santa Cruz 公司)、ASC (1:500)(美国 Santa Cruz 公司)、caspase-1 (1:100)(美国 Santa Cruz 公司)、 $\beta$ -actin 抗体(1:1000)(北京中杉金桥生物公司)孵育过夜, 经 TBST 洗膜后, 加入相应的二抗(1:20,000)室温孵育 2 h, 然后经 TBST 洗膜后用 ECL 曝光、显影、定影, 用 Image J 1.37c 软件测定蛋白条带的光密度并进行定量分析。

#### 2.2.6. 免疫组化染色检测

各组各时间点(24 h, 48 h)的组织标本切片经常规处理后, 经 PBS 冲洗切片后加一抗(1:100~500), 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。第二日经 PBS 冲洗后加通用型二抗, 室温下孵育 25 min 后, 用 PBS 冲洗 DAB 显色, 10 min 后放在光学显微镜下观察是否显色(阳性细胞为棕黄色颗粒)。用清水冲洗后, 用 HE 染色 2~3 min, 用清水冲洗, 放置 10 min。60 $^{\circ}$ C 温箱 20 min 烤干后中性树胶封片, 后放置 60 $^{\circ}$ C 温箱烤干过夜, 放置荧光显微镜下观察蛋白表达水平并保存图片, 阴性对照片用 PBS 代替一抗。

### 2.3. 统计分析

采用 SPSS22.0 统计软件对数据进行统计学分析, 呈正态分布的计量数据均使用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm S$ ) 表示。计数资料的组间比较采用  $\chi^2$  检验。符合正态分布的计量资料采用两组  $t$  检验, 配对的两组比较采用配对  $t$  检验, 独立的两组数据比较使用两独立样本  $t$  检验, 多组间数据比较用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

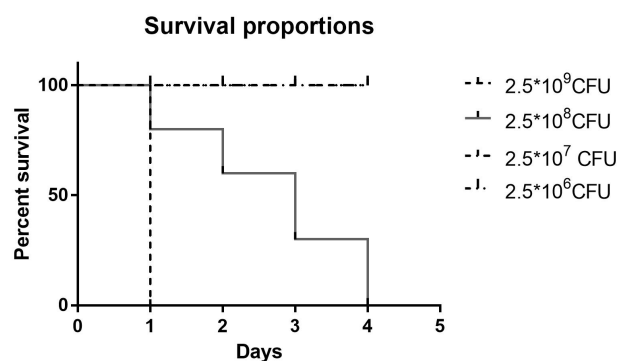
## 3. 结果

### 3.1. 白念珠菌脓毒症小鼠模型的建立

第一组 10 只小鼠( $2.5 \times 10^9$  CFU)在 10 小时内全部死亡。第二组 10 只小鼠( $2.5 \times 10^8$  CFU)在 24 小时内存活 8 只, 48 小时后存活 4 只, 存活的小鼠的各器官组织匀浆均有念珠菌培养阳性。第三组 10 只小鼠和第四组 10 只小鼠( $2.5 \times 10^7$  CFU,  $2.5 \times 10^6$  CFU)小鼠在 24 小时和 48 小时时间点全部存活, 组织匀浆中未能培养出念珠菌。其余两组小鼠感染白念珠菌后出现神志嗜睡, 不思饮食, 活动缓慢, 尾巴毛湿润等症状, 并且随着感染时间延长感染症状进行性加重(图 1)。因此根据小鼠生存率和小鼠感染白念珠菌后的症状, 同时也根据文献报道[8], 我们确定  $2.5 \times 10^8$  CFU 的白念珠菌浓度感染的小鼠建模是成功的, 然后选用作为实验组方法。

### 3.2. 各组小鼠白念珠菌生长情况

血、肝、肾脏、肺组织匀浆中的白念珠菌在感染后 24 h 及 48 h 计数显著升高, 而且感染 48 h 后比感染 24 h 后白念珠菌计数也明显升高(表 1), 表明白念珠菌脓毒症小鼠动物模型成功建立。



**Figure 1.** Percent survival of mice with different concentrations *C. albicans* within 4 days.

**图 1.** 不同浓度白念珠菌菌液感染小鼠后 4 天生存曲线

**Table 1.** The *C. albicans* counts in blood samples and tissue homogenates in each group

**表 1.** 各组小鼠不同组织匀浆中的白念珠菌计数

Group	N	Blood ( $\times 10^5$ /ml)	Liver ( $\times 10^6$ /ml)	Kidney ( $\times 10^6$ /ml)	Lung ( $\times 10^6$ /ml)
Control	20	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
24 h	20	4.04 $\pm$ 0.20 <sup>#</sup>	1.50 $\pm$ 0.21 <sup>#</sup>	0.55 $\pm$ 0.12 <sup>#</sup>	1.60 $\pm$ 0.12 <sup>#</sup>
48 h	20	7.01 $\pm$ 0.13 <sup>#&amp;</sup>	4.30 $\pm$ 0.60 <sup>#&amp;</sup>	2.02 $\pm$ 0.50 <sup>#&amp;</sup>	3.59 $\pm$ 0.20 <sup>#&amp;</sup>

注：与对照组比较：<sup>#</sup> $P < 0.05$ ；与 24 h 组比较：<sup>&</sup> $P < 0.05$ 。

### 3.3. 脓毒症组 IL-1 $\beta$ 和 IL-18 水平明显升高

与对照组相比，细胞因子 IL-1 $\beta$  和 IL-18 在白念珠菌感染 24 h、48 h 后的小鼠各组织匀浆中的表达量显著升高( $P < 0.05$ )；与 24 h 组相比，48 h 组中的血清及肝、肺匀浆中的 IL-1 $\beta$  和血液中的 IL-18 显著降低，而肾匀浆中 IL-1 $\beta$  和肺匀浆中 IL-18 显著升高，见表 2。

**Table 2.** Levels of IL-1 $\beta$  and IL-18 in serum and tissue homogenate of mice with *C. albicans* sepsis

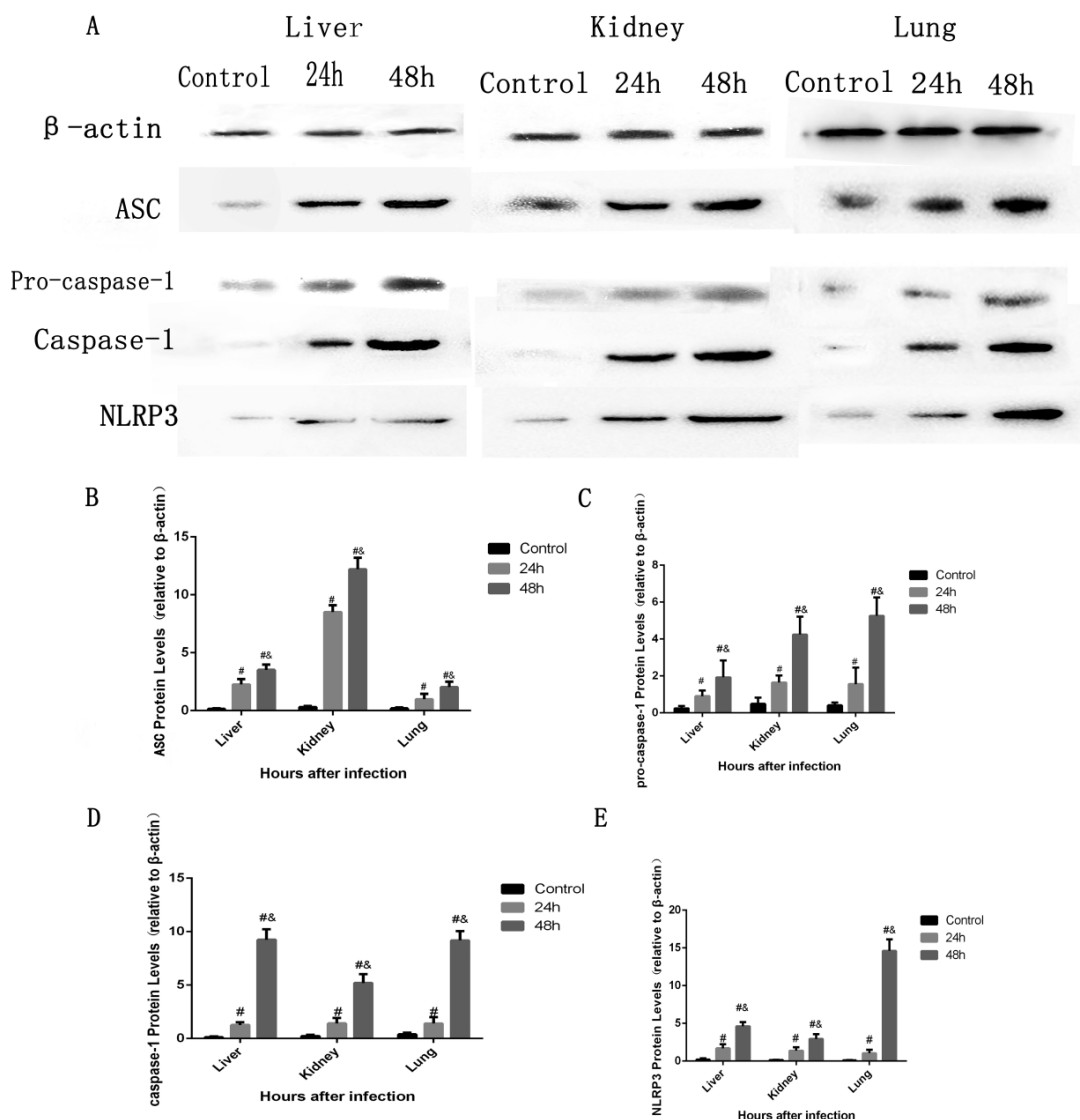
**表 2.** 白念珠菌脓毒症小鼠血清及组织匀浆内的细胞因子 IL-1 $\beta$  和 IL-18 水平

Group	IL-1 $\beta$ (pg/ml)				IL-18 (pg/ml)			
	blood	Liver	lung	kidney	blood	Liver	lung	kidney
Control	8.82 $\pm$ 0.62	0.94 $\pm$ 0.70	9.50 $\pm$ 1.40	7.20 $\pm$ 2.23	2.21 $\pm$ 0.24	35.19 $\pm$ 2.79	32.25 $\pm$ 2.80	30.36 $\pm$ 4.60
24 h	52.91 $\pm$ 3.17 <sup>#</sup>	2350.35 $\pm$ 140.26 <sup>#</sup>	502.07 $\pm$ 18.28 <sup>#</sup>	780.08 $\pm$ 22.40 <sup>#</sup>	9.50 $\pm$ 0.40 <sup>#</sup>	145.06 $\pm$ 8.22 <sup>#</sup>	61.18 $\pm$ 2.08 <sup>#</sup>	140.29 $\pm$ 8.70 <sup>#</sup>
48 h	9.87 $\pm$ 0.60 <sup>#&amp;</sup>	1790.08 $\pm$ 66.08 <sup>#&amp;</sup>	160.88 $\pm$ 8.05 <sup>#&amp;</sup>	2119.97 $\pm$ 91.64 <sup>#&amp;</sup>	7.88 $\pm$ 0.57 <sup>#&amp;</sup>	136.98 $\pm$ 6.36 <sup>#&amp;</sup>	115.56 $\pm$ 6.42 <sup>#&amp;</sup>	135.98 $\pm$ 4.13 <sup>#&amp;</sup>

注：与对照组比较：<sup>#</sup> $P < 0.05$ ；与 24 h 组比较：<sup>&</sup> $P < 0.05$ 。

### 3.4. 脓毒症组 NLRP3 蛋白表达水平的比较

脓毒症 48 h 组目的蛋白表达水平显著高于与脓毒症 24 h 组和对照组，其中肾组织中 ASC 蛋白水平显著升高( $p < 0.05$ )，肝、肺组织中 caspase-1 p20 蛋白水平显著升高( $p < 0.05$ )，肝、肾、肺组织中 pro-caspase-1 蛋白显著升高( $p < 0.05$ )，见图 2。



**注:** A: 对照组、24 h 脓毒症组及 48 h 脓毒症组的各组织匀浆(肺、肝、肾)中  $\beta$ -actin, NLRP3, ASC, caspase-1 p20 蛋白的 Western blotting 结果。B~E: 上述蛋白分别以  $\beta$ -actin 为内参的相对定量表达。数据均以均值  $\pm$  标准差表示。#代表感染 24 小时后与较对照组比较; &代表感染 48 小时后比感染 24 h 后比较。

**Figure 2.** NLRP3, ASC, pro-caspase-1 and caspase-1 p20 inflammasome activation in tissues

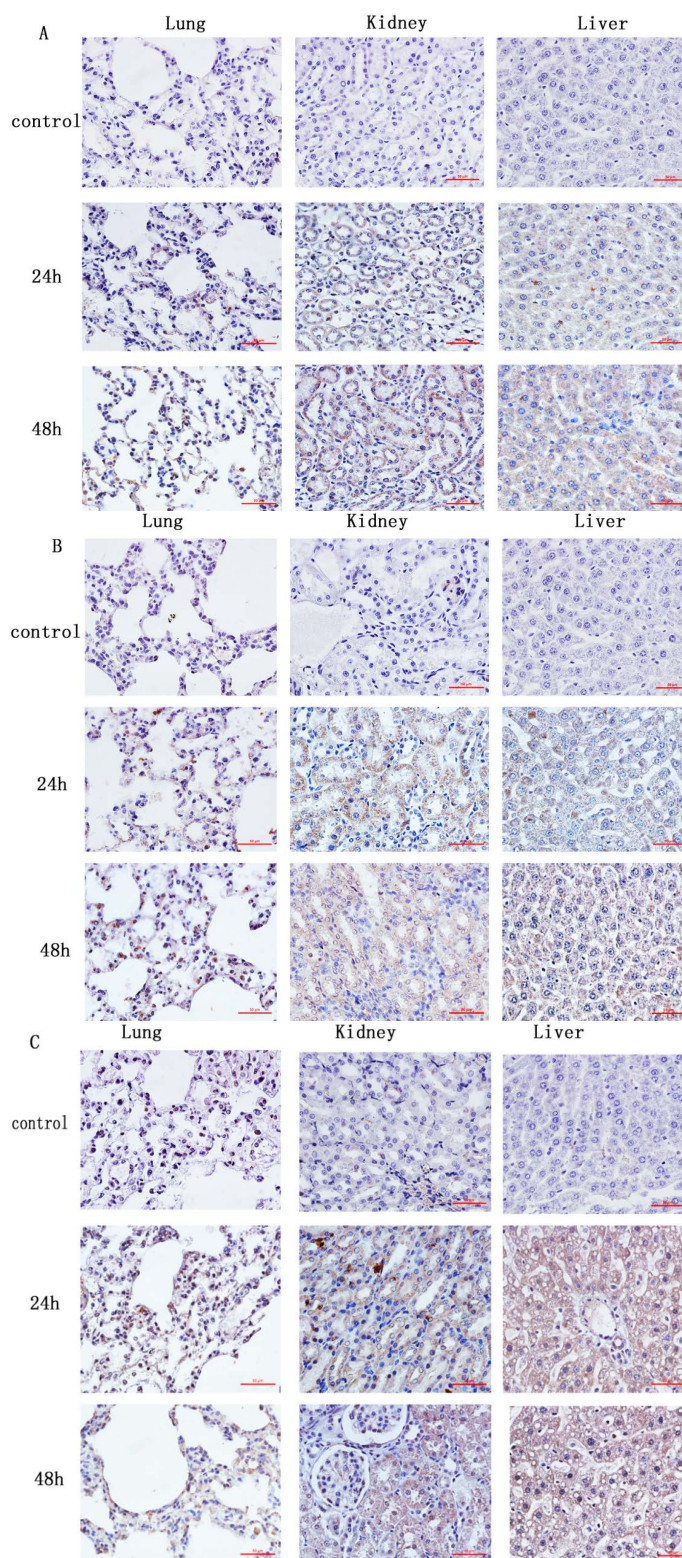
**图 2.** 各组小鼠组织中 NLRP3、ASC、caspase-1 p20、pro-caspase-1 蛋白表达

### 3.5. 脓毒症组 NLRP3、ASC、Caspase-1 免疫组化结果

免疫组化结果显示 NLRP3、ASC 和 caspase-1 蛋白主要在白念珠菌脓毒症组的小鼠肝、肾、肺组织细胞浆质中表达。脓毒症组不同组织中的阳性蛋白的表达量随感染时间而增加, 且与肺组织相比, 肝和肾组织中表达的阳性蛋白更多。见图 3。

### 3.6. 各组小鼠 NLRP3, ASC, Caspase-1 mRNA 的表达量的比较

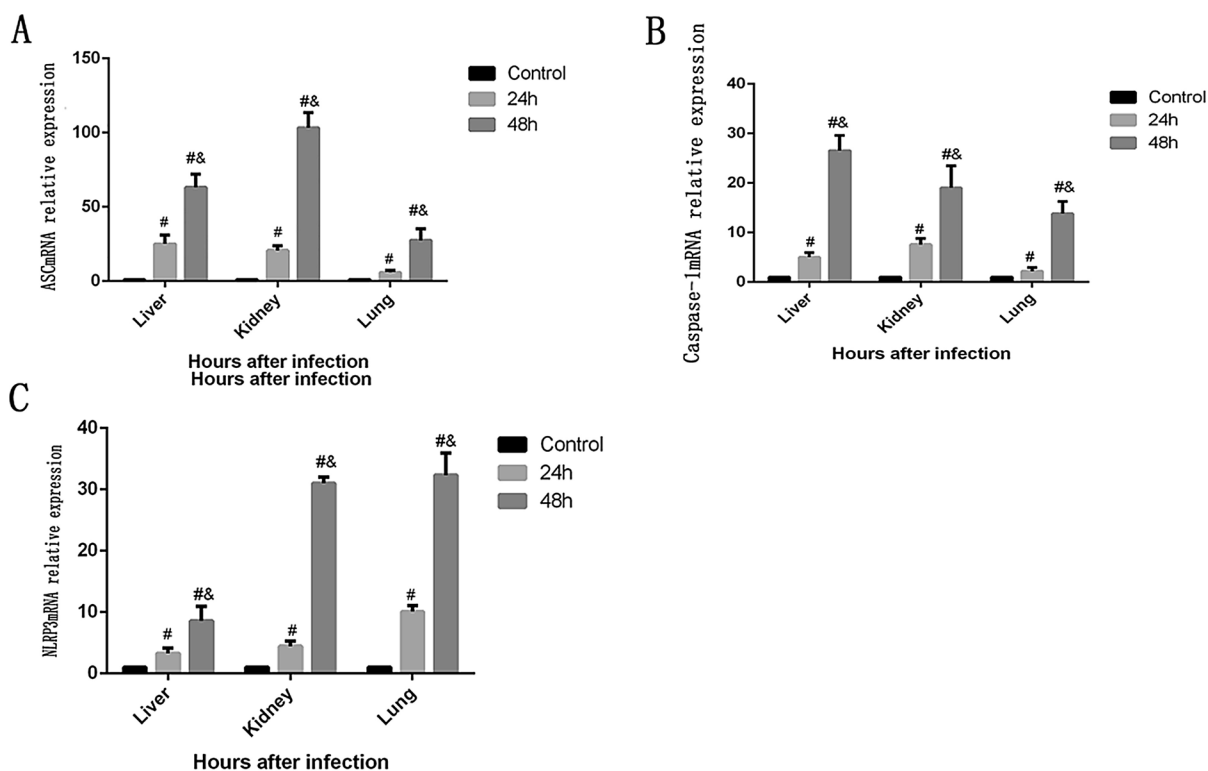
脓毒症组小鼠在感染白念珠菌后肝、肾、肺组织匀浆中 NLRP3、ASC、caspase-1 mRNA 表达水平显著高于健康对照组( $P < 0.05$ ), 并且 48 h 组的 NLRP3、ASC、caspase-1 mRNA 表达水平显著高于 24 h 组( $P < 0.05$ ), 见图 4。



注：A：各组织中 NLRP3 蛋白阳性表达；B：各组织中 ASC 蛋白阳性表达；C：各组织中 caspase-1 蛋白表达

**Figure 3.** Expressions of NLRP3, ASC and caspase-1 inflammasome in the tissues determined by immunohistochemistry ( $\times 400$ )

**图 3.** 免疫组化法检测各组小鼠组织中 NLRP3, ASC 和 caspase-1 蛋白表达( $\times 400$ )



注: A: 肺、肝、肾中 ASC mRNA 的表达量比较; B: 肝、肾、肺组织中 caspase-1 mRNA 的表达量比较; C: 肝、肾、肺组织中 NLRP3 mRNA 的表达量比较。β-actin mRNA 的表达量用做内参。#与对照组比较  $P < 0.05$ ; &代表在各组组织中 48 h 组与 24 h 组比较  $P < 0.05$ 。

Figure 4. NLRP3, ASC and caspase-1 mRNA expression in tissues

图 4. 各组小鼠组织中 NLRP3, ASC 和 caspase-1 mRNA 的表达

## 4. 讨论

念珠菌属于条件致病菌,广泛存在于正常人的皮肤和粘膜。近年来,由于各种侵入性操作、放疗、化疗、广谱抗生素、免疫抑制剂和糖皮质激素的广泛应用,使患者的免疫力下降,侵袭性真菌所致脓毒症的发病率不断增加,其中 50%以上为白念珠菌感染,成为严重威胁人类健康的感染性疾病。目前,白念珠菌致病的机制尚不明确,研究和阐明白念珠菌致病的分子机制,为白念珠菌感染的防治提供新的治疗靶点,以成为白念珠菌感染防治研究亟待解决的重要问题。

本课题组长期致力于白念珠菌所致侵袭性感染的临床和基础研究,积累了一定的科研临床工作基础 [9]-[14]。

NLRP3 炎性小体是目前研究较多的炎性小体,但它在白念珠菌脓毒症中的作用和机制目前尚未清楚。在本项研究中,通过构建白念珠菌脓毒症小鼠模型,应用 q-RT PCR、Western blot 和荧光免疫方法检测各组小鼠组织匀浆中的 NLRP3、ASC、Pro-caspase-1 以及 caspase-1 p20 mRNA 和相关蛋白表达情况,用以验证 NLRP3 炎性小体是否参与了白念珠菌脓毒症中的机体免疫反应。研究结果显示,白念珠菌脓毒症小鼠肝脏、肾脏和肺组织中均有 NLRP3 mRNA、ASC mRNA、caspase-1 mRNA 表达,其表达水平随着感染时间(48 小时)而显著升高,NLRP3 炎性小体的相关产物(NLRP3、ASC、Pro-caspase-1 及 caspase-1 p20)蛋白水平也显著增高,免疫组化结果也证实了白念珠菌感染小鼠后的肝脏、肾脏和肺脏组织细胞浆质中表达 NLRP3、ASC 和 caspase-1 蛋白,而健康对照组几乎不表达 NLRP3 炎性小体相关蛋白。在不同组织中的 NLRP3 炎性小体蛋白表达水平存在一定的差异,部分蛋白表达水平在感染后随着感染时间出现明显



升高,与24 h组相比,48 h后肾脏组织中ASC蛋白水平显著升高,肝脏组织中caspase-1 p20蛋白水平显著升高,而在肺脏组织中变化不明显。免疫组化结果也证实,肝脏肾脏组织中表达的NLRP3相关蛋白比肺脏组织更多。

在已有细菌性脓毒症感染研究中,吴丹等[15]发现金黄色葡萄球菌能够诱导NLRP3炎性小体蛋白表达升高,朱梦梦等[16]也证实了大肠杆菌血流感染与NLRP3炎症小体的激活有关,其表达水平与感染的严重程度有关。通过本研究,我们证实了NLRP3炎症小体除了感知细菌和病毒病原体外,还感知真菌病原体,在宿主防御念珠菌方面起着关键作用。

IL-1 $\beta$ 和IL-18炎症因子是NLRP3炎症小体裂解活化的产物,我们的研究发现白念珠菌脓毒症小鼠的重要器官和组织中细胞因子IL-1 $\beta$ 和IL-18表达水平比对照组显著升高,IL-1 $\beta$ 在肝、肾组织中显著升高。在白念珠菌感染中,NLRP3炎性小体的激活起到重要的调节作用,并且以促进细胞因子IL-1 $\beta$ 和IL-18的释放而发挥促炎作用。

有研究证实,口腔上皮细胞通过释放促炎细胞因子(包括IL-1 $\alpha/\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ )和抗菌肽(如 $\beta$ -防御素)对真菌病原体作出反应。白细胞介素-1 $\alpha$ 、白细胞介素-1 $\beta$ 和白细胞介素-18在宿主抵抗白念珠菌感染中起重要作用,IL-1 $\beta$ 在保护宿主免受侵袭性白念珠菌感染方面的意义已得到明确证明[17]。

因此,我们的研究通过NLRP3炎症小体在小鼠体内白念珠菌血流感染所致脓毒症发病机制之间建立了明确的联系。一项研究表明,与野生型小鼠相比,缺乏IL-1 $\beta$ 的小鼠存活率较低,真菌负荷增加[18]。利用这个模型,我们确定了IL-1 $\beta$ 在宿主防御念珠菌感染中的重要作用。对于白色念珠菌,NLRP3诱导的IL-1 $\beta$ 和IL-6已被证明是抗真菌保护性Th17免疫炎症反应的关键介质。这可能是由于这些细胞因子与体内固有免疫细胞(如树突状细胞和NK细胞)的复杂通路,这种通路可能介导特异性抗体和保护性T细胞的反应。

## 基金项目

上海市闵行区自然科学研究课题(2018MHZ003)。

## 参考文献

- [1] Rhodes, A., Evans, L.E., Alhazzani, W., *et al.* (2017) Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Medicine*, **43**, 304-377. <https://doi.org/10.1007/s00134-017-4683-6>
- [2] Medici, N.P. and Del, P.M. (2015) New Insights on the Development of Fungal Vaccines: From Immunity to Recent Challenges. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **110**, 966-973. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150335>
- [3] 逢金花, 唐建国, 童译庆, 等. 白念珠菌酵母相-菌丝相形态转换机制的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(35): 6950-6954.
- [4] 王晨, 陆刚, 吴春荣, 等. sTREM-1等几种生物标志物在兔白色念珠菌肺炎中的表达[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(10): 1512-1518.
- [5] Rathinam, V.A. and Fitzgerald, K.A. (2016) Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions. *Cell*, **165**, 792-800. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.046>
- [6] Rutanga, J.P. and Nyirahabimana, T. (2016) Clinical Significance of Molecular Diagnostic Tools for Bacterial Bloodstream Infections: A Systematic Review. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, **2016**, Article ID: 6412085. <https://doi.org/10.1155/2016/6412085>
- [7] 童译庆, 王秋月, 李康馨, 等. 早期白假丝酵母血流感染大鼠模型的血浆代谢组学分析[J]. 微生物与感染, 2019, 14(1): 30-38.
- [8] Shrum, B., Anantha, R.V., Xu, S.X., *et al.* (2014) A Robust Scoring System to Evaluate Sepsis Severity in an Animal Model. *BMC Research Notes*, **7**, 233. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-233>
- [9] Tong, Y. and Tang, J. (2017) *Candida albicans* Infection and Intestinal Immunity. *Microbiological Research*, **198**, 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.02.002>

- 
- [10] Lu, G., Wang, C., Wu, C., *et al.* (2019) Identification of Early Biomarkers in a Rabbit Model of Primary *Candida* Pneumonia. *BMC Infectious Diseases*, **19**, 698. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4320-9>
- [11] Yan, L., Wu, C.R., Wang, C., *et al.* (2016) Effect of *Candida albicans* on Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Chinese Medical Journal*, **129**, 1711-1718. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.185862>
- [12] Zhao, X.W., Yan, L., Xu, D., *et al.* (2016) Enterogenous Infection of *Candida albicans* in Immunocompromised Rats under Severe Acute Pancreatitis. *World Journal of Emergency Medicine*, **7**, 294-299. <https://doi.org/10.5847/wjem.j.1920-8642.2016.04.010>
- [13] Tong, Y., Ku, X., Wu, C., *et al.* (2019) Data-Independent Acquisition-Based Quantitative Proteomic Analysis Reveals Differences in Host Immune Response of Peripheral Blood Mononuclear Cells to Sepsis. *Scandinavian Journal of Immunology*, **89**, e12748. <https://doi.org/10.1111/sji.12748>
- [14] 胡万超, 唐建国. 大蒜提取物抗白念珠菌作用机制研究进展[J]. 中国感染与化疗杂志, 2020, 20(2): 221-225.
- [15] 吴丹, 周树生, 胡仕静, 等. NLRP3 炎性小体在金黄色葡萄球菌血流感染小鼠免疫反应中的作用[J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16(4): 411-418.
- [16] 朱梦梦, 周树生, 刘宝. NLRP3 炎症小体在大肠杆菌血流感染免疫反应机制中的作用[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(6): 860-867.
- [17] Hebecker, B., Naglik, J.R., Hube, B., *et al.* (2014) Pathogenicity Mechanisms and Host Response during Oral *Candida albicans* Infections. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, **12**, 867-879. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.916210>
- [18] Hise, A.G., Tomalka, J., Ganesan, S., *et al.* (2009) An Essential Role for the NLRP3 Inflammasome in Host Defense against the Human Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Cell Host & Microbe*, **5**, 487-497. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.05.002>