

网络出版时间: 2018-5-23 14:12 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180522.1500.008.html>

NLRP3 炎症小体在大肠杆菌血流感染免疫反应机制中的作用

朱梦梦, 周树生*, 刘 宝

摘要 目的 探讨 Nod 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体在大肠杆菌(大肠埃希菌)血流感染中的免疫反应机制。方法 对 C57BL/6 小鼠经尾静脉注射大肠杆菌作为感染组,经尾静脉注射磷酸盐缓冲液(PBS)作为对照组,感染组分别于 24 h 和 48 h 分别处死小鼠,对照组在实验开始时即处死小鼠,取各组小鼠的组织标本,分别通过 ELISA 法、实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法、Western blot 法、HE 染色等各种方法检测各项指标的变化。结果 大肠杆菌感染后 24 h 组和 48 h 组小鼠组织 HE 染色可见大量炎症细胞浸润和组织坏死;在血流感染组中所有组织匀浆及血清中白介素 1β (IL- 1β) 及白介素 18 (IL-18) 等细胞因子增多;肝肺组织匀浆中 NLRP3、含 CARD 结构域的凋亡相关斑点样蛋白 (ASC)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1 (caspase-1) mRNA 表达量在感染后 24 h 明显升高,而肾组织匀浆中 NLRP3、ASC、caspase-1 mRNA 在感染后 48 h 明显升高;肝、肺、肾组织中 NLRP3 蛋白、ASC 蛋白在 48 h 组中表达量比在 24 h 组中表达量要明显升高,而 pro-caspase-1 在肝肾组织中 3 组表达量没有明显区别,caspase-1 蛋白在肺肾组织中表达量随时间推移表达量上升。结论 大肠杆菌血流感染与 NLRP3 炎症小体的激活有关,并且 NLRP3 炎症小体的表达水平与感染的严重程度有关,随着感染的加重,NLRP3 炎症小体的表达量增加。此项研究结果可能为大肠杆菌血流感染导致的脓毒症的治疗

提供一个新思路。

关键词 NLRP3 炎症小体;大肠杆菌;血流感染

中图分类号 R 378.21

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)06-0860-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.06.008

血流感染以高死亡率和高发病率著称^[1]。大肠杆菌是一种常见的和致命的导致血流感染的病原菌之一,同时也是血流感染中最常见的致病性革兰氏阴性杆菌^[2]。研究^[3]显示,Nod 样受体蛋白 3 [nucleotide-binding domain (NOD)-like receptor protein 3, NLRP3] 炎症小体可能与多种人类疾病有关。迄今为止,NLRP3 炎症小体是研究最多的炎症小体,由 NLRP3、凋亡相关的点状蛋白含 CARD 结构域的凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis associated speck-like protein containing a CARD, ASC)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1 (cysteine aspartate specific proteinase-1, caspase-1) 组成的蛋白复合物,许多微生物病原体可能通过其产物如:毒素、RNA、DNA 等激活 NLRP3 炎症小体,包括真菌、细菌和病毒等^[4]。caspase-1 的激活导致专门的白介素 1β (interleukin- 1β , IL- 1β) 和白介素 18 (interleukin-18, IL-18) 分泌^[5]。细胞因子 IL- 1β 和 IL-18 可以诱导全身炎症反应和清除病原微生物。NLRP3 炎症小体在多系统的多种炎症反应中起重要作用^[6],但是在单一大肠杆菌血流感染引起的脓毒症中免疫反应机制尚不清楚,该实验通过单种革兰氏阴性细菌(大肠杆菌)血流感染建立脓毒症模型,探讨 NLRP3 炎症小体在免疫反应

2018-02-09 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1608085MH214)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院重症医学科,合肥 230001

作者简介:朱梦梦,女,硕士研究生;

刘 宝,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: DrLiubao@outlook.com

* 对本文具有同等贡献

with Obesity group ($t = 1.80$, $P = 0.096$), but the difference was not statistically significant. ② DHE staining was used to evaluate the O_2^- formation in the kidney. In apigenin group, the content of O_2^- was decreased distinctly compared with Obesity ($t = 2.79$, $P = 0.049$). ③ The protein expression of p-P67 and p-p65 were decreased compared with Obesity ($P < 0.05$) after apigenin treatment. ④ LC3BII/LC3BI and Beclin1 protein levels in kidney were increased significantly compared with the other two groups after apigenin treatment ($P < 0.05$). **Conclusion** Apigenin alleviates the obese rats renal oxidative stress and inflammation state, which may be related to the activation of autophagy pathway.

Key words apigenin; obesity; autophagy; oxidative stress; inflammation

机制,为脓毒症的临床治疗提供一个新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 60 只 SPF 级健康雌性 6 周龄 C57BL/6J 小鼠(20~25 g) 购自安徽省实验动物中心,饲养于 12 h 明暗交替 SPF 级环境中,实验开始前适应环境 1 周。

1.1.2 菌株来源 大肠杆菌标准菌株(ATCC 25922) 由安徽省立医院临床微生物实验室惠赠。

1.1.3 实验主要试剂 IL-1B 和 IL-18 ELISA 测定试剂盒(武汉华美公司); TRIzol(美国 Invitrogen 公司); 反转录试剂盒(美国 Thermo 公司); 荧光定量 PCR 试剂盒(德国凯杰公司); RealTime 专用八连管(美国 ABI 公司); β -actin 单克隆抗体(北京中杉金桥生物公司); NLRP3 单克隆抗体、caspase-1 p20 单克隆抗体(英国 abcam 公司); ASC 单克隆抗体(美国 CST 公司); 通用型二抗、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂(PMSF)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、PVDF 膜、脱脂牛奶、ELC 发光液等 Western blot 相关试剂(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.1.4 实验仪器设备 高速低温离心机(美国 Beckman 公司); LHP 型恒温恒湿培养箱(常州普天仪器制造有限公司); 细菌比浊仪(英国 Oxoid 公司); 酶标仪、WB 电泳仪和电泳槽及湿性转印槽(美国 Bio-Rad 公司); RT-PCR 分析系统(美国 Biosystems 7500); 紫外分光光度计(上海天普分光光度计有限公司); -80 °C 超低温冰柜(日本索尼公司)。

1.1.5 引物 依据 GenBank 中收录的小鼠肌动蛋白(β -actin)、NLRP3、ASC、caspase-1 基因序列,利用 Primer premier 5.0 引物设计软件设计引物用于 RT-PCR 检测,PCR 引物由上海生工公司合成。各引物序列见表 1。

表 1 NLRP3 炎症小体基因引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')
NLRP3	F: GGGAGACCGTGAGGAAAGGA
	R: CCAAAGAGGAATCGGACAACAAA
ASC	F: GTGTTTACTCTCTGGGATGTTTTTG
	R: GTCTGTGGAATTTAGGTGTTGGA
caspase-1	F: CAGGCAAGCCAAATCTTTATCACT
	R: GTGCCATCTTCTTTGTTCTGTTCTT
β -actin	F: TGAGAGGGAAATCGTGCGTGAC
	R: GCTCGTTGCCAATAGTGATGACC

1.2 方法

1.2.1 菌液培养 将冷冻的大肠杆菌接种在血琼脂平板上,琼脂平板在 CO₂ 培养箱中孵育 24 h 后,挑取单个的大肠杆菌菌落转移到 LB 液体培养基中,37 °C 摇菌 12 h。菌液离心后重悬于 PBS 中,菌液稀释至 2×10^9 cfu/ml 作为最适感染浓度^[7]。

1.2.2 模型建立 实验动物分成 3 组(对照组、血流感染 24 h 组、血流感染 48 h 组),每组 20 只,血流感染组小鼠分别麻醉后经尾静脉注射菌液 0.1 ml/10 g,对照组小鼠注射等量的 PBS。血流感染 24 h 组、血流感染 48 h 组分别于感染后 24 h 和感染后 48 h 安乐死处死小鼠,对照组在实验开始时即安乐死处死小鼠。

1.2.3 ELISA 法检测细胞因子 检测血清及肺、肾、肝组织匀浆中 IL-1B 及 IL-18 的含量,严格按照 ELISA 检测试剂盒的操作说明进行操作,分别检测各标本在 480 nm 处的吸光度(optical density, OD)值,用标准品的浓度和 OD 值做标准曲线,根据样本的吸光度值和线性回归方程得出浓度值,样本浓度 = 实测浓度 $\times$ 稀释倍数。

1.2.4 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)法检测 NLRP3、ASC、caspase-1 mRNA 的表达 所有物品经 DEPC 水消毒,分别取血流感染组小鼠和对照组小鼠的组织(肝、肾、肺)50~100 mg 放入匀浆器中,加入 1 ml 预冷的 TRIzol,彻底研磨后按 RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA。取 2 μ l mRNA 按逆转录试剂盒说明书逆转录合成相应的 cDNA,以 β -actin 作为内参, cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为 cDNA 2 μ l,上下游引物各 0.8 μ l,灭菌蒸馏水 6 μ l, ROX Reference Dye II 0.4 μ l,共 20 μ l 的反应体系。反应条件如下:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 30 s,总共进行 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析计算出相对表达量。

1.2.5 Western blot 法检测小鼠组织中 NLRP3、ASC、caspase-1 p20 蛋白表达水平 分别取血流感染组和对照组小鼠组织 100 mg 放于匀浆器底部,分别加入 RIPA 裂解液 1 ml 和蛋白酶抑制剂 10 μ l 在冰上研磨裂解,4 °C、12 000 r/min 离心 20 min,按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书进行蛋白定量后,加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(4:1 体积),100 °C 变性 10 min 后 -20 °C 保存。NLRP3 及 β -actin 蛋白用 10% 分离胶,ASC、caspase-1 p20 蛋白用 12% 分离胶,4 种蛋白都用 5% 浓缩胶。浓缩胶 80 V,分离胶 120 V 进行电泳,根据预染 Marker 指示,转移相应蛋白到 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶封闭液封闭,室温 1 h,封闭后分别用抗 NLRP3、ASC、caspase-1 抗体 1:1 000、 β -actin 抗体 1:1 000 孵育过夜,TBST

洗涤3次,每次15 min,孵育二抗辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 1:20 000,室温1 h, TBST 洗涤3次,每次15 min,用 ECL 曝光、显影,用 Image J 软件分析测定其灰度值。

1.2.6 HE 染色 新鲜的小鼠组织(肝、肾、肺)用福尔马林固定48 h后行石蜡包埋,切片,按 HE 染色步骤染色后置于光镜下观察并摄片,病理炎症评分(PIS)用于 HE 染色后的组织急性炎症评分,主要评估各组织切片 HE 染色后炎症细胞的浸润(主要为中性粒细胞和巨噬细胞)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件、Graphpad Prism 7 软件、Image J 软件进行分析,计量数据采用进行 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间数据比较采用独立样本 t 检验,多组间数据比较采用单因素方差分析。 $P <$

0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大肠杆菌血流感染小鼠组织切片 HE 染色

大肠杆菌血流感染后的小鼠组织(肝、肾、肺)切片 HE 染色显示均有炎症细胞浸润、细胞坏死和组织脓肿,且感染后48 h处死组的炎症细胞浸润、组织细胞坏死较24 h组更为严重,与同时段同组别的肾和肺组织相比,肝组织的炎症反应(炎症细胞浸润、组织细胞坏死)较为严重,见图1。感染组小鼠组织病理炎症评分(PIS评分)明显高于对照组,其中48 h组较24 h组 PIS 评分明显增高,见图2。

2.2 大肠杆菌血流感染小鼠组织及血清中 IL-18 及 IL-1 β 表达水平

IL-18在3组血液、肝脏、肾脏、

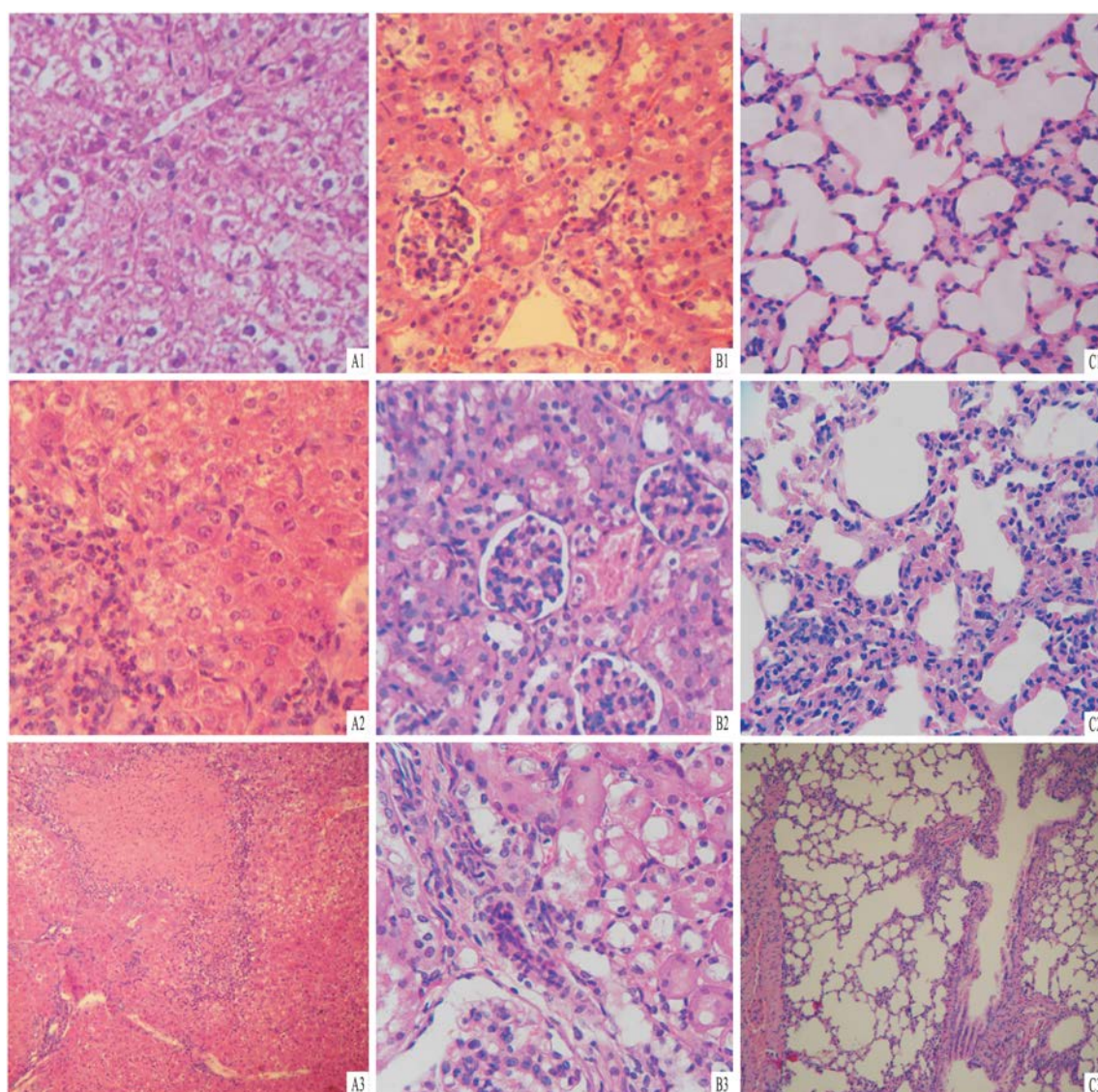


图1 各组小鼠组织切片 HE 染色 $\times 400$

A: 对照组; B: 24 h 组; C: 48 h 组; 1: 肝; 2: 肾; 3: 肺

肺组织中的表达量不完全相同,差异有统计学意义($F=888.486, 581.820, 638.689, 2037.61$, $P<0.05$)。IL-1 β 在3组血液、肝脏、肾脏、肺组织中的表达量不完全相同,差异有统计学意义($F=1316.75, 1339.9, 5269.836, 4588.62$, $P<0.05$)。与对照组比较,24 h组和48 h组肝、肾、肺组织匀浆中的IL-18和IL-1 β 水平均明显升高,其中肺组织中48 h组IL-18表达水平较24 h组明显上升,肾组织中48 h组IL-1 β 表达水平较24 h组明显上升($P<0.05$);24 h组和48 h组血液中IL-18表达水平也明显升高,24 h组血液中IL-1 β 明显升高($P<0.05$),而48 h组血液中IL-1 β 没有明显升高,见表2、图3~4。

2.3 组织匀浆中 NLRP3、ASC、caspase-1 mRNA 表达水平 与对照组相比,感染后24 h肝、肺组织匀浆中NLRP3、ASC、caspase-1 mRNA表达水平明

显增高($P<0.05$),而肾组织匀浆中的NLRP3、ASC、caspase-1 mRNA表达水平在感染后48 h明显升高($P<0.05$),见图5。

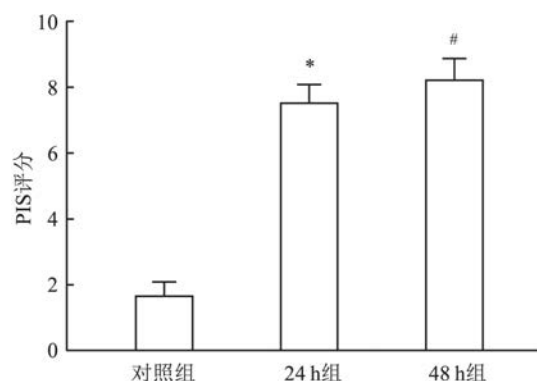


图2 各组小鼠组织切片 HE 染色 PIS 评分
与对照组比较: * $P<0.05$; 与24 h组比较: # $P<0.05$

表2 各组小鼠血液及组织匀浆中 IL-18 及 IL-1 β 表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-18 (pg/ml)				IL-1 β (pg/ml)			
	血	肝	肾	肺	血	肝	肾	肺
对照	2.21 $\pm$ 0.33	32.52 $\pm$ 2.84	35.60 $\pm$ 2.50	31.26 $\pm$ 2.32	9.96 $\pm$ 0.56	0.99 $\pm$ 0.15	8.30 $\pm$ 1.10	9.33 $\pm$ 1.09
24 h	9.81 $\pm$ 0.54*	148.32 $\pm$ 12.95*	149.86 $\pm$ 12.56*	60.65 $\pm$ 1.48*	55.18 $\pm$ 3.86*	2495.17 $\pm$ 191.19*	784.85 $\pm$ 23.37*	526.12 $\pm$ 20.60*
48 h	8.29 $\pm$ 0.38#	145.50 $\pm$ 7.02#	136.68 $\pm$ 4.41#	109.83 $\pm$ 3.95#	9.64 $\pm$ 0.68#	1836.22 $\pm$ 29.16#	2185.52 $\pm$ 79.90#	183.87 $\pm$ 5.12#

与对照组比较: * $P<0.05$; 与24 h组比较: # $P<0.05$

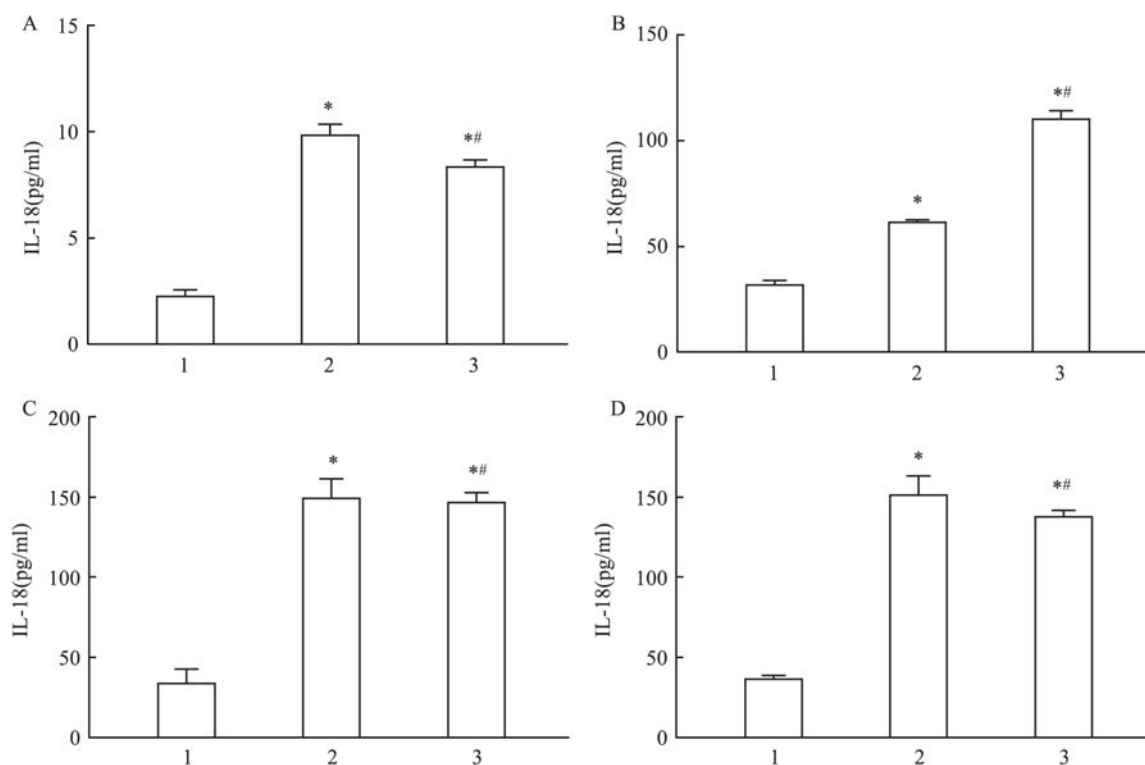
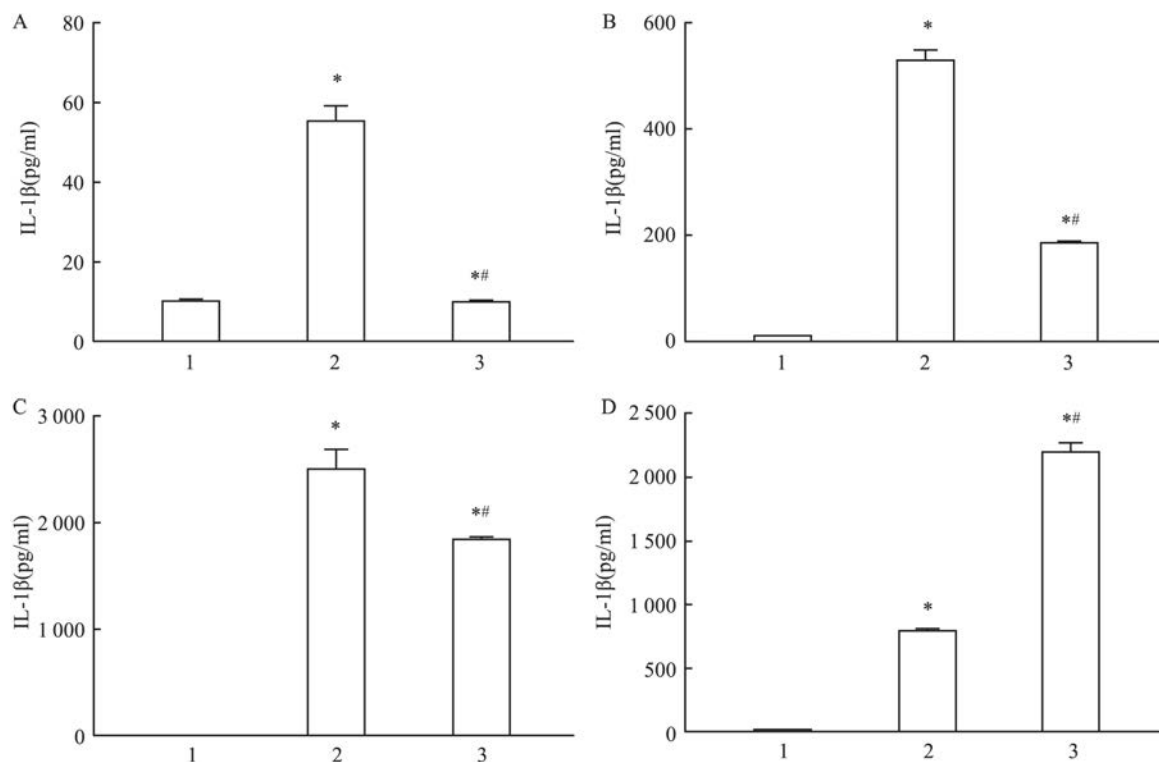


图3 各组小鼠血液及组织匀浆中 IL-18 表达

A: 血液; B: 肺; C: 肝; D: 肾; 1: 对照组; 2: 24 h 组; 3: 48 h 组; 与对照组比较: * $P<0.05$; 与24 h组比较: # $P<0.05$

图4 各组小鼠血液及组织匀浆中 IL-1 β 表达

A: 血液; B: 肺; C: 肝; D: 肾; 1: 对照组; 2: 24 h 组; 3: 48 h 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$ 与 24 h 组比较: # $P < 0.05$

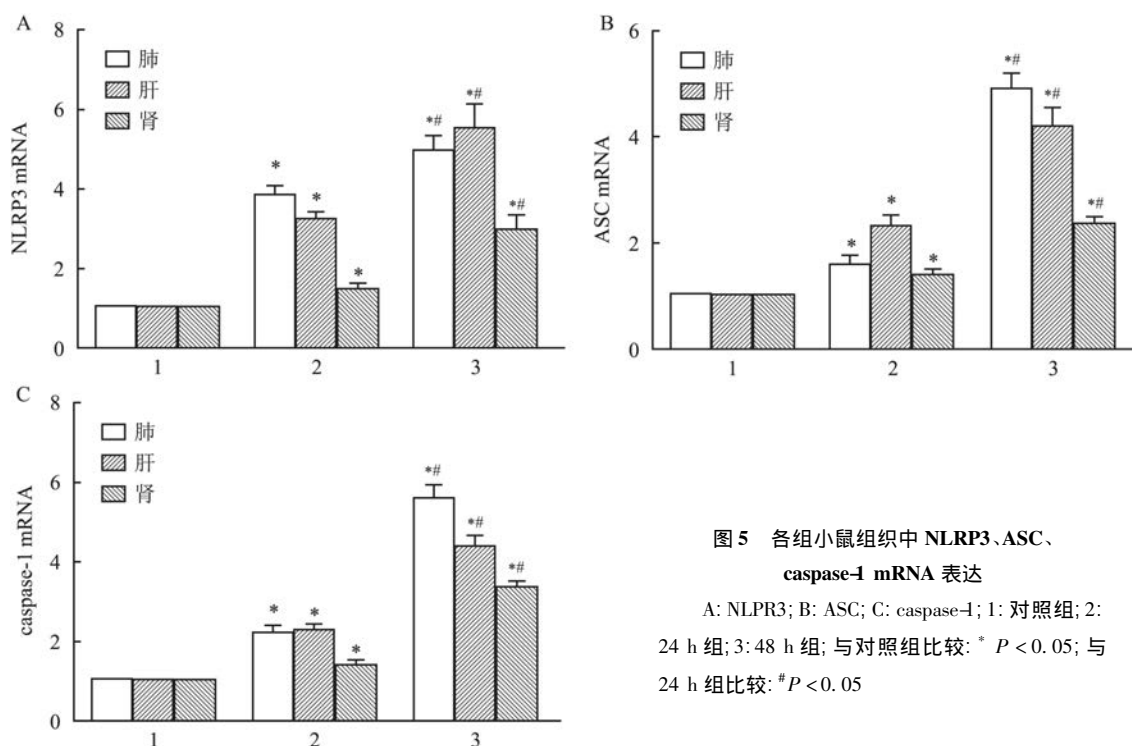


图5 各组小鼠组织中 NLRP3、ASC、caspase-1 mRNA 表达

A: NLRP3; B: ASC; C: caspase-1; 1: 对照组; 2: 24 h 组; 3: 48 h 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 24 h 组比较: # $P < 0.05$

2.4 小鼠组织中 NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1 p20 蛋白表达水平 与正常对照组相比, 24 h 组和 48 h 组蛋白表达水平均有升高 ($P < 0.05$)。肝、肺、肾组织中 NLRP3 蛋白、ASC 蛋白在

48 h 组中表达量比在 24 h 组中表达量要明显升高 ($P < 0.05$), 而 pro-caspase-1 在肝肾组织中 3 组表达量没有明显区别, caspase-1 蛋白在肺肾组织中表达量随时间推移表达量上升, 见图 6 ~ 7。

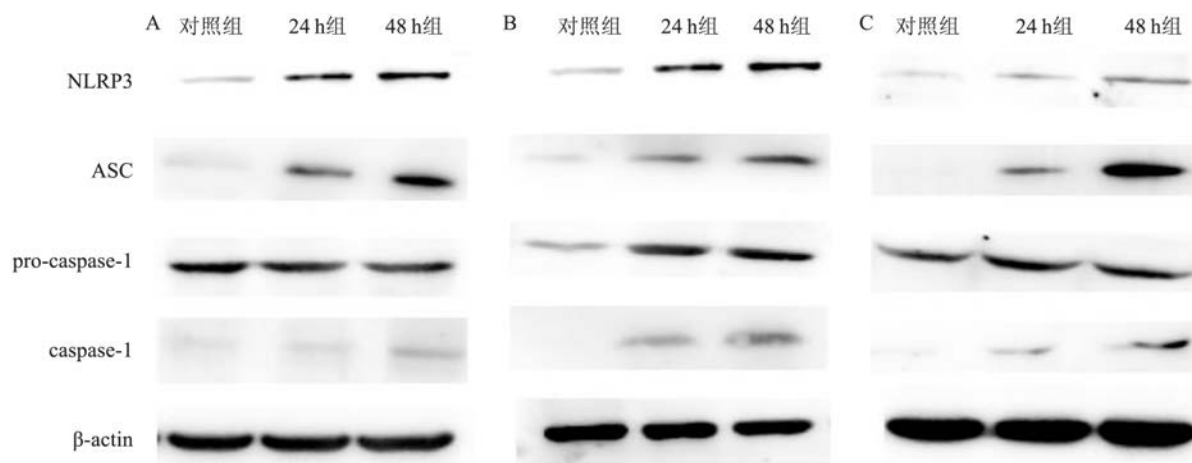


图6 各组小鼠组织中 NLRP3、ASC、caspase-1 蛋白表达

A: 肝; B: 肺; C: 肾

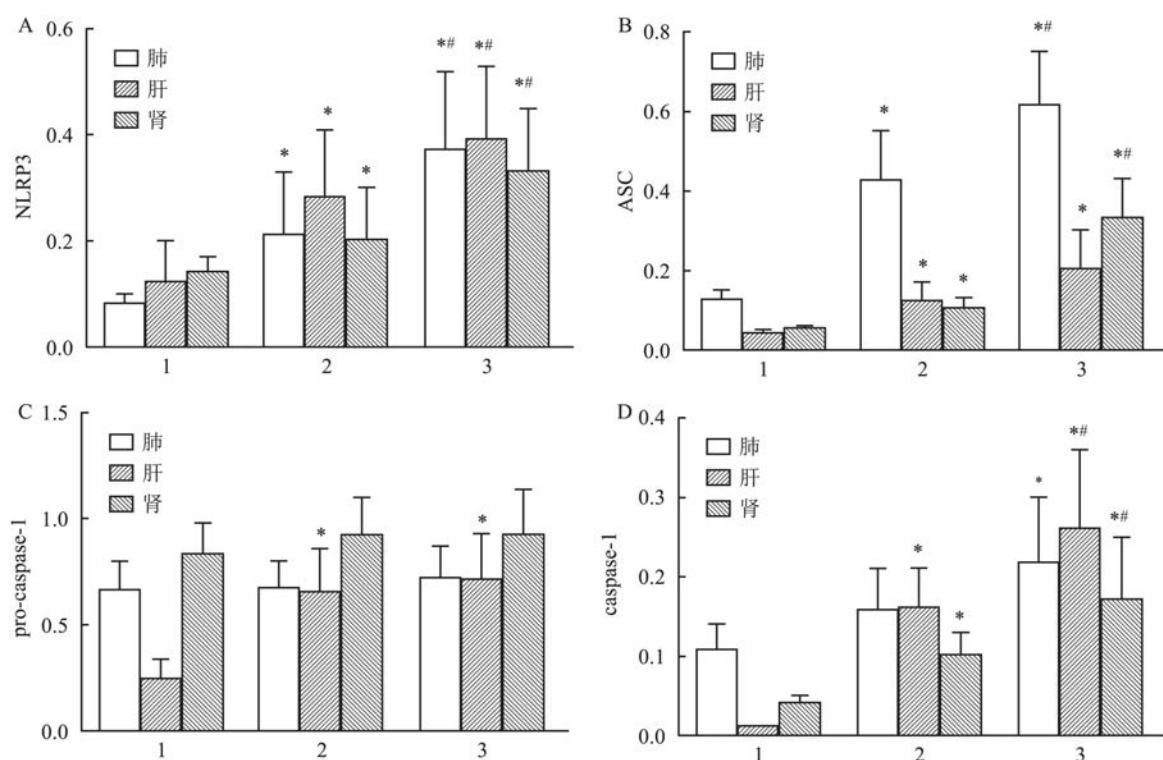


图7 各组小鼠组织中 NLRP3、ASC、caspase-1、pro-caspase-1 蛋白表达

A: NLRP3; B: ASC; C: pro-caspase-1; D: caspase-1; 1: 对照组; 2: 24 h 组; 3: 48 h 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 24 h 组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

血流感染 (bloodstream infection, BSI) 是一种由于血液中微生物, 通常是细菌或真菌的存在引起的危及生命的疾病。由多种细菌导致的细菌血流感染可能是社区获得性的也可能是医源性的, 引起了全世界范围内的高患病率和高死亡率^[6]。一项以人群为基础的研究^[8]显示大肠杆菌一直是 BSI 最常见

的病原菌。炎症小体是导致有生物学活性的 IL-1 β 释放的细胞质多蛋白复合物, 其中最具有代表性的就是 NLRP3 炎症小体^[5]。NLRP3 炎症小体是一种调节促炎细胞因子 IL-18 和 IL-1 β 成熟的多蛋白复合物。NLRP3 炎症小体包括 NOD 样蛋白 NLRP3, 适配器蛋白 ASC 和 caspase-1, 在内源性和外源性刺激下, NLRP3 通过激活 NLRP3 并招募 ASC 和 pro-caspase-1, 导致 caspase-1 激活, 随后将前 IL-1 β 和前

IL-18 加工成其活性形式^[9]。大肠杆菌血流感染可以导致脓毒症,目前脓毒症是 ICU 死亡的主要原因,尽管卫生保健的进步,脓毒症的发病率和死亡率依旧很高。作为炎症小体的成员之一的 NLRP3 炎症小体感知细菌、病毒、真菌等病原体相关分子模式触发炎症反应。活化的 NLRP3 炎症小体可以招募炎症细胞到感染或受伤部位并诱导 IL-1 β 和 IL-18 成熟和分泌。因此, NLRP3 炎症小体在微生物诱导的脓毒症中起重要作用^[10]。

国内目前最常用的脓毒症模型是盲肠结扎-穿孔(cecum ligation-perforation, CLP)模型,主要优点之一是易于标准化,还可以引入多种不同的变量,缺点是难以控制感染的细菌种类。同时,比较常用的脓毒症模型还有腹腔细菌接种、腹腔注射人粪便悬液、细菌或内毒素血症模型、烧伤脓毒症模型、腹膜炎脓毒症等多种脓毒症模型^[11]。本课题组采用的是单种菌株静脉注射建立脓毒症模型,可以人为的控制感染剂量,稳定性和重复性好,更好的研究单一菌株对 NLRP3 炎症小体表达的影响,同时,该模型本身也存在一定的局限性,一过性的输入大量细菌可以引起动物的快速耐受或死亡,与临床感染灶细菌持续释放有一定的出入。本课题组前期研究^[12]建立了简单易行的尾静脉或腹腔注射金黄色葡萄球菌,并成功摸索最适感染浓度,造成稳定的血流感染模型,为其他特定细菌或者多种已知细菌混合感染的研究奠定了基础。

Luo et al^[9]通过 CLP 脓毒症模型发现血红素在脓毒症诱导的 NLRP3 炎症小体调节的急性肺损伤中起重要的保护作用。Zhang et al^[13]研究发现在脓毒症小鼠中通过释放分子 3 抑制心脏成纤维细胞中 NLRP3 炎症小体的活化来改善心肌功能。本课题组前期研究^[14]显示在金葡菌诱导的血流感染中 NLRP3 炎症小体的表达呈上调,这为课题后期的实验研究奠定了基础。

本研究建立了大肠杆菌血流感染的小鼠脓毒症模型,通过 HE 染色证明了感染组小鼠肝、肾、肺组织的炎症反应和细胞坏死,不同组织间炎症反应略有差异,如肝组织中炎症细胞浸润和细胞坏死与同组肝肾组织相比较为严重;一定时间内随着感染后时间的推移,组织的感染越来越严重。Duan et al^[7]的研究与本研究有相似的研究结果,感染后 24 h 肝组织表现出小部分的炎症改变,感染后 2、3 和 5 d 有更大、更多的组织损伤。

IL-18 和 IL-1 β 作为 NLRP3 炎症小体裂解活化

的产物,ELISA 结果显示感染组小鼠血清和组织匀浆中 IL-18 和 IL-1 β 水平均明显升高;Kang et al^[15]研究结果与本研究有着相似之处,鲍曼不动杆菌感染后的小鼠 IL-1 β 表达量升高,结果表明在鲍曼不动杆菌感染的巨噬细胞中, NLRP3 和 ASC 与 caspase-1 活化和 IL-1 β 成熟有关。

通过 RT-qPCR 法和 Western blot 法分别检测到感染组 NLRP3、ASC、caspase-1 mRNA 和蛋白的表达量均有升高,而且不同组织中基因和蛋白的表达量稍有差异,同一组织中不同的基因和不同的蛋白的表达也不同。

综上所述,本实验显示大肠杆菌血流感染导致的脓毒症中 NLRP3 炎症小体的表达呈现升高趋势,且在一定时间范围内有随时间推移表达增高趋势,这表明了 NLRP3 炎症小体在大肠杆菌血流感染中发挥了一定的调节作用。由于临床血流感染微生物的多样性和复杂性, NLRP3 炎症小体在不同细菌、病毒、真菌血流感染中的作用有待进一步研究,同时 NLRP3 炎症小体的作用机制尚需深入研究。

参考文献

- [1] Rathinam V A, Vanaja S K, Waggoner L, et al. TRIF licenses caspase-1-dependent NLRP3 inflammasome activation by gram-negative bacteria[J]. Cell 2012, 150: 606-19.
- [2] Wang S, Zhao S Y, Xiao S Z, et al. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing bloodstream infections in three hospitals in Shanghai, China[J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0147740.
- [3] He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation[J]. Trends Biochem Sci 2016, 41: 1012-21.
- [4] Wang H, Liu S, Wang Y, et al. Nod-like receptor protein 3 inflammasome activation by *Escherichia coli* RNA induces transforming growth factor beta 1 secretion in hepatic stellate cells[J]. Basic Med Sci 2016, 16(2): 126-31.
- [5] Kim J K, Jin H S, Suh H W, et al. Negative regulators and their mechanisms in NLRP3 inflammasome activation and signalling[J]. Immunol Cell Biol 2017, 95: 584-92.
- [6] Rutanga J P, Nyirahabimana T. Clinical significance of molecular diagnostic tools for bacterial bloodstream infections: a systematic review[J]. Interdiscip Perspect Infect Dis 2016, 2016: 6412085.
- [7] Duan J, Xie Y, Yang J, et al. Variation of circulating inflammatory mediators in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bloodstream infection[J]. Med Sci Monit, 2016, 22: 161-71.
- [8] Laupland K B. Incidence of bloodstream infection: a review of population-based studies[J]. Clin Microbiol Infect 2013, 19(6): 492-500.
- [9] Luo Y P, Jiang L, Kang K, et al. Hemin inhibits NLRP3 inflamma-

- some activation in sepsis-induced acute lung injury , involving heme oxygenase-1 [J]. *Int Immunopharmacol* 2014 ,20(1) : 24 – 32.
- [10] Huang Y ,Zhou M ,Li C , et al. Picroside II protects against sepsis via suppressing inflammation in mice [J]. *Am J Transl Res* ,2016 , 8(12) : 5519 – 31.
- [11] 郭松喜 ,王 丹 ,刘春生 等. 脓毒症实验动物模型的研究进展 [J]. *中华肺部疾病杂志* 2015 8(5) : 635 – 7.
- [12] 吴 丹 ,周树生 ,刘 宝 等. 金黄色葡萄球菌经静脉和腹腔诱导小鼠血流感染的炎症反应和病理变化 [J]. *中国免疫学杂志* 2016 32(4) : 556 – 62.
- [13] Zhang W ,Tao A ,Lan T ,et al. Carbon monoxide releasing molecule-3 improves myocardial function in mice with sepsis by inhibiting NLRP3 inflammasome activation in cardiac fibroblasts [J]. *Basic Res Cardiol* 2017 ,112(2) : 16.
- [14] 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 – 8.
- [15] Kang M J ,Jo S G ,Kim D J ,et al. NLRP3 inflammasome mediates IL-1 β production in immune cells in response to *Acinetobacter baumannii* and contributes to pulmonary inflammation in mice [J]. *Immunology* 2017 ,150: 495 – 505.

The role of NLRP3 inflammasome in immune response mechanism of *Escherichia coli* bloodstream infection

Zhu Mengmeng ,Zhou Shusheng ,Liu Bao

(Dept of Critical Care Medicine ,The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the immune reaction mechanism of NLRP3 inflammasome in the *Escherichia coli* bloodstream infection. **Methods** C57BL/6 mice were injected by caudal vein with *Escherichia coli* and phosphate buffer (PBS) respectively as injected group and control group. The infected group mice were executed after 24 hours and 48 hours ,and the control group mice were executed at the beginning of experiment ,taking the tissue samples of the two groups and detecting the changes of each index. The changes of the indexes were detected by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) ,real-time quantitative PCR (RT-qPCR) ,Western blot and HE staining. **Results** Significant inflammatory cell infiltration and tissue necrosis were observed by HE staining in 24 h and 48 h after infection with *Escherichia coli*. The IL-1 β and IL-18 cytokines in tissue homogenate and serum of bloodstream infection group were all increased significantly. The mRNA expression of NLRP3 ,ASC and caspase-1 in liver and lung homogenate increased significantly at 24 h after infection ,while NLRP3 ,ASC and caspase-1 mRNA in kidney homogenate increased significantly at 48 h after infection. The expression of NLRP3 protein and ASC protein in the liver ,lung and kidney tissues of the 48 h group was significantly higher than that in the 24 h group ,but there was no significant difference in pro-caspase-1 expression of liver and kidney tissues between three groups. The expression of NLRP3 protein and ASC protein in liver ,lung and kidney tissues in 48 h group was significantly higher than that in 24 h group ,the expression of pro-caspase-1 protein in liver and kidney tissue in three groups displayed no significant difference ,the expression of caspase-1 protein in lung and kidney tissues was increased with time. **Conclusion** *Escherichia coli* bloodstream infection is associated with the activation of NLRP3 inflammatory , and the expression level of NLRP3 inflammasome was related to the severity of infection ,with the increase of infection ,NLRP3 inflammatory expression increased. The findings may provide a new idea for the treatment of sepsis caused by *Escherichia coli* bloodstream infection.

Key words NLRP3 inflammasome; *Escherichia coli*; bloodstream infection