

论著·基础研究

抑制肺泡上皮细胞焦亡对支气管肺发育不良新生大鼠肺泡化阻滞的改善作用

郑小雁¹, 王星云², 张拥军¹

1. 上海交通大学医学院附属新华医院新生儿科, 上海 200092; 2. 上海交通大学医学院附属同仁医院虹桥国际医学研究院, 上海 200336

[摘要] **目的**·研究 gasdermin D (GSDMD) 抑制剂 necrosulfonamide (NSA) 通过抑制肺上皮细胞焦亡对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的新生大鼠支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 肺泡化阻滞的影响。**方法**·将孕 SD 大鼠随机分为对照组、BPD 组、BPD+NSA 组和 NSA 组, 羊膜腔注射 LPS 建立新生鼠 BPD 模型。取各组出生后第 1、3、7 日新生鼠肺组织, 通过苏木精-伊红 (H-E) 染色观察肺泡化情况; 利用免疫荧光法检测各组新生鼠肺部 GSDMD-N 端蛋白表达情况; 荧光定量 PCR 法检测新生鼠肺组织中炎症因子白介素-1 β (interleukin-1 β , *IL-1 β*) mRNA 水平。体外培养小鼠肺泡上皮细胞系 MLE-12, 给予 LPS 以及腺苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 刺激和 NSA 干预, CCK-8 法检测 MLE-12 细胞活力, Hoechst 33342 和碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色法检测细胞焦亡水平, 免疫荧光法检测 MLE-12 细胞表面活性剂蛋白 C (surfactant protein C, SFTPC) 和 GSDMD-N 端蛋白的表达情况。**结果**·体内实验结果显示: 羊膜腔内注射 LPS 可导致肺发育受阻, 模拟 BPD 的病理改变; 羊膜腔内注射 LPS 建立的 BPD 模型中肺泡上皮细胞 GSDMD-N 端表达升高; NSA 干预明显改善了 BPD 新生鼠的肺发育阻滞并抑制了 *IL-1 β* 的 mRNA 表达 (均 $P<0.05$)。体外实验结果显示: LPS/ATP 刺激下肺泡上皮细胞 MLE-12 活力下降, 发生焦亡; NSA 干预提高了肺泡上皮细胞活力并且抑制了焦亡 (均 $P<0.05$); NSA 上调了 LPS/ATP 刺激下肺泡上皮细胞 SFTPC 的表达, 抑制了 LPS/ATP 刺激下肺泡上皮细胞 GSDMD-N 端表达的上调 (均 $P<0.05$)。**结论**·抑制肺泡上皮细胞焦亡可改善 LPS 诱导的 BPD 新生鼠肺组织病理学改变。

[关键词] 支气管肺发育不良; 细胞焦亡; gasdermin D; 肺泡上皮细胞**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2023.02.005 **[中图分类号]** R722 **[文献标志码]** A

Improvement of alveolarization arrest in newborn rats with bronchopulmonary dysplasia via inhibiting alveolar epithelial cell pyroptosis

ZHENG Xiaoyan¹, WANG Xingyun², ZHANG Yongjun¹

1. Department of Neonatology, Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China; 2. Hongqiao International Institute of Medicine, Tongren Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200336, China

[Abstract] **Objective**·To study the effect of gasdermin D (GSDMD) inhibitor necrosulfonamide (NSA) on alveolarization arrest in lipopolysaccharide (LPS)-induced bronchopulmonary dysplasia (BPD) newborn rats via inhibiting alveolar epithelial cell pyroptosis. **Methods**·Pregnant SD rats were randomly assigned to four groups as follows: control, BPD, BPD with NSA and NSA group, and then were prepared to receive intra-amniotic injection of LPS. Lung tissues of newborn rats on the first, third and seventh day after birth were stained by hematoxylin-eosin (H-E) to observe lung development. The expressions of GSDMD-N-terminal in lungs of newborn rats in each group were detected by immunofluorescence. The mRNA levels of interleukin-1 β (*IL-1 β*) of newborn rats' lungs was detected by real-time PCR. *In vitro*, the mouse alveolar epithelial cell line MLE-12 was cultured and treated with LPS/adenosine triphosphate (ATP) and NSA. The cell viability of MLE-12 cells was detected by CCK-8 method, the pyroptosis was detected by Hoechst 33342 and propidium iodide (PI) staining, and the expressions of surfactant protein C (SFTPC) and GSDMD-N protein in MLE-12 cells were detected by immunofluorescence. **Results**·*In vivo*, intra-amniotic injection of LPS hindered lung development, resulting in the pathological hallmarks of BPD. The GSDMD-N expression of alveolar epithelial cells increased in the BPD rat model established by intra-amniotic injection of LPS, while NSA treatment significantly improved the lung development of BPD rats and inhibited the *IL-1 β* mRNA expression (both $P<0.05$). *In vitro*, the study confirmed that LPS/ATP treatment decreased the viability of alveolar epithelial cells MLE-12 and induced pyroptosis, while NSA treatment increased alveolar epithelial cell

[作者简介] 郑小雁(1996—), 女, 硕士生; 电子信箱: varlarl@163.com。

[通信作者] 张拥军, 电子信箱: zhangyongjun@sjtu.edu.cn。

[Corresponding Author] ZHANG Yongjun, E-mail: zhangyongjun@sjtu.edu.cn.



viability and inhibited pyroptosis (both $P<0.05$). In addition, NSA treatment upregulated the SFTPC expression and inhibited the GSDMD-N expression in LPS/ATP-stimulated alveolar epithelial cells (both $P<0.05$). **Conclusion** Inhibiting the alveolar epithelial cell pyroptosis can improve the alveolar development in BPD newborn rats.

[Key words] bronchopulmonary dysplasia; pyroptosis; gasdermin D (GSDMD); alveolar epithelial cell

支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 是早产儿最常见的慢性呼吸系统疾病, 是在感染、高氧、机械通气等多重应激因素协同作用下, 引发肺损伤与修复的失衡, 最终导致了肺发育受阻^[1]。过去30余年, BPD在新生儿重症监护病房中的发病率持续升高, 且胎龄越小, 发病风险越高^[2-3]。BPD不仅影响了早产儿的生存和预后, 还增加了肺动脉高压、哮喘、慢性阻塞性肺疾病、神经系统发育障碍以及心功能不全等远期并发症的发生风险, 给家庭与医疗系统带来了极大的负担^[4]。然而, 现今仍缺乏特异性的BPD防治措施^[5]。因此, 进一步探究BPD发生和发展的机制, 寻找有效的干预措施刻不容缓。

细胞焦亡是一种炎性含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (cysteiny aspartate specific proteinase, caspase) 依赖性的细胞死亡, 其特征是细胞肿胀、溶解和多种炎症因子的释放。多种炎症小体的激活可活化caspase。活性caspase一方面切割焦亡效应蛋白gasdermin D (GSDMD) 形成GSDMD-N端, 而GSDMD-N端在细胞膜上寡聚形成微孔, 导致细胞渗透压的变化, 进而发生肿胀直至细胞膜破裂; 另一方面裂解白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 前体使其成为成熟的IL-1 β , 并通过GSDMD小孔释放从而引发过度炎症反应, 造成组织损伤^[6-7]。细胞焦亡在BPD的发生和发展中起到的重要作用已经被许多研究证实。NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 炎症小体及NLRP1炎症小体被认为在BPD的发生和发展中发挥着重要作用^[8-9]。此外, 抑制caspase-1活性或IL-1 β 分泌均可改善BPD新生鼠的肺损伤^[9-10]。而作为肺发育主体的肺泡上皮细胞, 其焦亡引发的呼吸系统疾病也被广泛报道^[11-12]。Necrosulfonamide (NSA) 是一种GSDMD特异性抑制剂, 不仅能抑制GSDMD蛋白的切割, 还能抑制GSDMD-N端寡聚化和膜穿孔的形成^[13-14]。但抑制焦亡效应蛋白GSDMD是否可以抑制肺泡上皮细胞的焦亡从而改善BPD, 目前尚不清楚。因此, 本研究拟

探究GSDMD抑制剂NSA对羊膜腔内注射脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的BPD新生大鼠肺发育的影响以及对其肺泡上皮细胞焦亡的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与细胞来源 孕16 d SPF级Sprague Dawley (SD) 大鼠购自上海吉辉实验动物有限责任公司, 动物生产许可证号SCXK (沪) 2017-0012。实验动物饲养及实验操作于上海交通大学医学院附属新华医院实验动物中心进行, 动物使用许可证号SYXK9 (沪) 2013-0106。小鼠肺泡上皮细胞 (MLE-12细胞) 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.1.2 主要试剂 LPS、腺苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 和NSA均购于美国MedChemExpress公司; DMEM/F12培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、青链霉素双抗溶液 (penicillin-streptomycin, PS) 均购自美国Gibco公司; 兔多克隆GSDMD-N端抗体购自江苏亲科生物研究中心有限公司; 抗表面活性剂蛋白C (surfactant protein C, SFTPC) 抗体购自美国Proteintech公司; CCK-8试剂盒、Hoechst 33342荧光染料/碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 双染试剂盒和快速封闭液均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 动物实验

1.2.1 BPD动物模型建立 将孕16 d的SD大鼠平衡体质量等因素后随机分成4组, 分别为对照组、BPD组、BPD+NSA组和NSA组。用1%戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 对大鼠进行腹腔麻醉。待大鼠进入深麻醉状态后, 腹部备皮、消毒、铺巾、逐层剪开皮肤和腹肌层, 将包含胚胎的羊膜囊取出放于湿润的无菌纱布上, 用玻璃针吸取分装的试剂注射入羊膜腔内 (LPS和NSA的溶剂均为无菌生理盐水)。**①对照组:** 每个羊膜腔内注射5 μ L 无菌生理盐水。**②LPS组:**

每个羊膜腔内注射 5 μ L LPS (1 μ g) 溶液。③LPS+NSA 组: 每个羊膜腔内注射共 5 μ L 的 LPS (1 μ g) 和 NSA (2.5 μ g) 混合溶液。④NSA 组: 每个羊膜腔内注射 5 μ L 的 NSA (2.5 μ g) 溶液。试剂注射完毕后, 将羊膜囊回纳入腹腔, 逐层缝合, 手术中保持羊膜囊湿润。术后, 待孕鼠转醒活动后分笼, 标记组别, 待孕鼠生产。

1.2.2 新生鼠肺部组织样本采集 待孕鼠分娩后, 记当日为新生鼠出生后第 0 日 (postnatal day 0, P0), 待出生后 1、3、7 d 采集新生鼠肺组织样本。腹腔麻醉后, 打开新生鼠胸腔暴露肺部, 用冰 PBS 灌洗肺血管, 用缝合线结扎右肺根部和气管, 用 4% 多聚甲醛灌注左侧肺叶, 直至肺尖边缘轻微隆起。摘除左肺上叶将其浸泡在 4% 多聚甲醛中进行固定, 右肺放入 EP 管中迅速置于液氮中冻存, -80°C 保存。

1.2.3 苏木精-伊红染色观察肺组织病理改变 左肺固定 24 h 后, 经过脱水、浸蜡、包埋、切片、苏木精-伊红 (H-E) 染色、封片后, 置于显微镜下观察。各组随机选取 5 个样本, 每个样本取最大肺部横截面的 3 个不同层面的切片, 每张切片随机选取不重叠的 3 个视野拍照保存。采用图像处理软件 Image J 进行图像处理和肺组织形态学分析的计数, 统计指标包括平均肺泡数、平均次级间隔数、平均肺泡内衬间隔 (mean linear intercept, MLI)。MLI 的计算方法如下: 经切片视野中心点画十字交叉线, 测出总长度 (L), 计数线上的所有肺泡数 (N), $\text{MLI} = L/N$ (单位: μm)。

1.2.4 新生鼠肺组织石蜡切片免疫荧光染色 将组织石蜡包埋切片置于含柠檬酸抗原修复缓冲液的修复盒中, 并使用微波热修复方法进行抗原修复。用 PBS 冲洗切片 3 次后, 在室温下用封闭液封闭 30 min, 在切片上滴加按 1:200 稀释的一抗抗 GSDMD-N 端抗体, 切片放于湿盒内 4°C 孵育过夜。PBS 洗涤 3 次后, 切片与 CY3 二抗在室温避光孵育 1 h, 细胞核用 DAPI 试剂染色 5 min。最后, 用荧光显微镜进行观察和摄影。

1.2.5 新生鼠肺组织 *IL-1 β* mRNA 水平检测 TRIzol 法提取各组新生鼠肺组织的总 RNA, 用 Hifair[®] V 反转录酶将 RNA 反转录为 cDNA, 采用 QuantStudio 3 荧光定量 PCR 仪进行 PCR 扩增反应。引物由上海华津生物科技有限公司合成。*IL-1 β* mRNA 上、下游引物序列分别为 5'-CTCACAGCAGCATCTCGACAAGAG-3' 和 5'-TCCACGGGCAAGACATAGGTAGC-3', β -肌动蛋白 (β -actin) 上、下游引物序列分别为 5'-GGA

AATCGT GCGTGACATTA-3' 和 5'-AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG-3'。结果以 β -actin 为内参进行校正。

1.3 细胞实验

1.3.1 MLE-12 细胞培养及处理 培养小鼠肺泡上皮细胞 MLE-12, 培养基为 DMEM/F12、10% FBS、1% PS, 于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。将细胞分为对照组、LPS/ATP 组、LPS/ATP+NSA 组和 NSA 组, 分别加入等量 PBS 和 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。将培养板在培养箱内孵育 4 h, LPS/ATP+NSA 组和 NSA 组再加入 NSA (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 处理 30 min, 最后加入 ATP (5 mmol/L) 再处理 1 h, 收集细胞行进一步检测。

1.3.2 CCK-8 法测定 MLE-12 细胞活力 在 96 孔板中接种 100 μL MLE-12 细胞悬液 (1×10^5 个), 将细胞分为对照组、LPS/ATP 组、LPS/ATP+NSA 组和 NSA 组, 按方法 “1.3.1” 处理细胞。弃去原培养基, 加入 100 μL 培养基, 再向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 在培养箱中培养 2 h, 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度, 计算细胞活力。

1.3.3 Hoechst 33342 和 PI 染色检测 MLE-12 细胞焦亡水平 将细胞接种至 24 孔板, 按方法 “1.3.1” 处理细胞后, 弃去培养基, 用 PBS 漂洗细胞 1 次, 弃去 PBS 洗涤液。然后每孔加入 1 mL 细胞染色缓冲液、5 μL Hoechst 33342 染色液和 5 μL PI 染色液, 4°C 染色 20 min, PBS 漂洗 1 次后在荧光显微镜下观察。

1.3.4 MLE-12 细胞免疫荧光染色 将细胞接种至预先放有玻璃爬片的 12 孔板, 按方法 “1.3.1” 处理细胞后, 去除培养基, 用 PBS 漂洗 3 次。加入 4% 多聚甲醛室温固定 20 min 后 PBS 漂洗 3 次。加入 0.1% Triton 溶液通透 20 min。PBS 漂洗后加入封闭液, 封闭 15 min。加入按 1:200 稀释的抗 GSDMD-N 端或抗 SFTPC 抗体溶液, 4°C 孵育过夜, 0.1% PBST 漂洗 3 次。加入按 1:200 稀释的 Alexa Fluor 488 二抗, 室温避光孵育 1 h, 0.1% PBST 漂洗 3 次。用纸巾吸去爬片上的多余水分, 在载玻片上滴加含 DAPI 的抗荧光淬灭封片剂, 将爬片放置于载玻片上避光孵育 3 min, 荧光显微镜下观察。

1.4 统计学分析

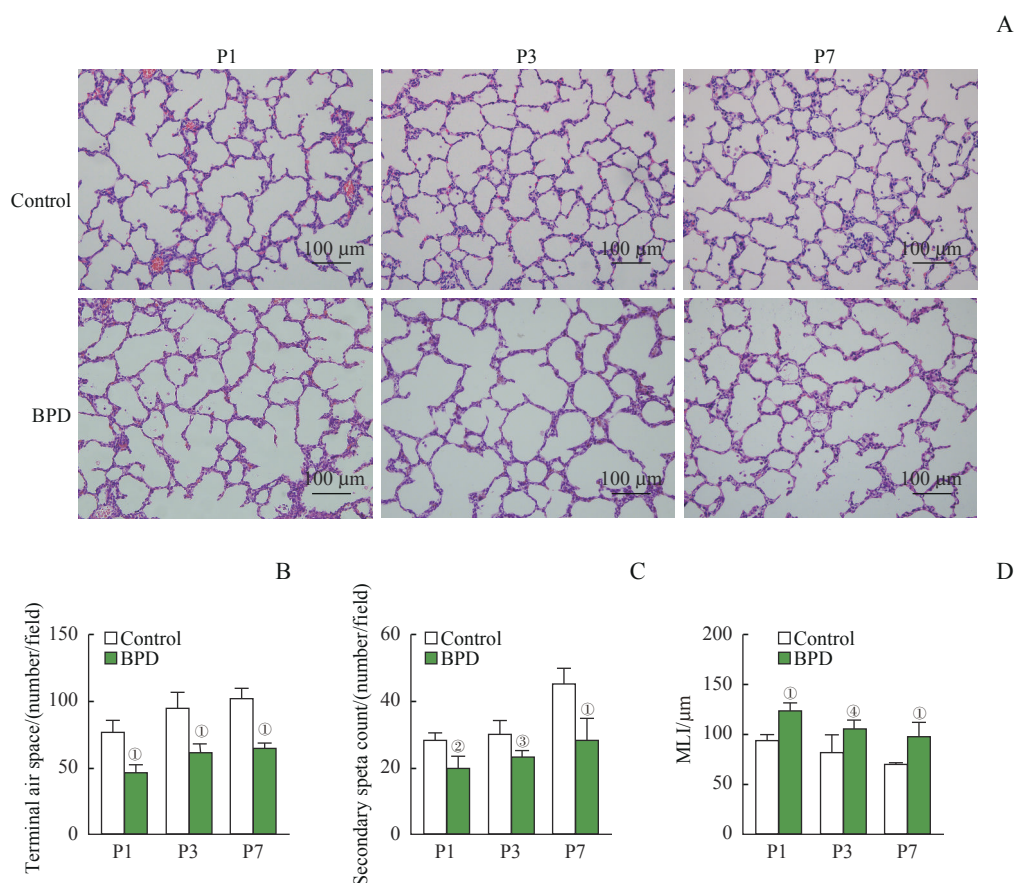
采用 SAS 6.0 软件进行统计学分析, 定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS 导致的新生鼠肺组织病理改变

观察肺部 H-E 染色切片发现, 与对照组比较,

BPD 组肺泡发育明显阻滞, 肺泡增大且结构简单化。P1、P3、P7 的 BPD 组新生鼠平均肺泡数和平均次级间隔数较对照组新生鼠降低, MLI 增大 (均 $P<0.05$), 详见图 1。



Note: A. The representative lung sections stained with H-E staining. B. The quantification of the terminal air spaces of lung tissues from newborn rats. C. The quantification of the secondary septa of lung tissues from newborn rats. D. The quantification of the MLI of lung tissues from newborn rats. ^① $P=0.000$, ^② $P=0.010$, ^③ $P=0.038$, ^④ $P=0.004$, compared with the control group.

图1 羊膜腔内注射 LPS 导致的新生鼠肺发育阻滞观察

Fig 1 Alveolar developmental arrest caused by intra-amniotic LPS injection

2.2 BPD 新生鼠肺泡上皮细胞 GSDMD-N 端的表达

肺部切片免疫荧光染色结果 (图 2) 显示, BPD 组新生鼠肺部 GSDMD-N 端表达较对照组明显升高 (均 $P<0.05$), 表明 BPD 新生鼠肺泡上皮细胞存在细胞焦亡现象。

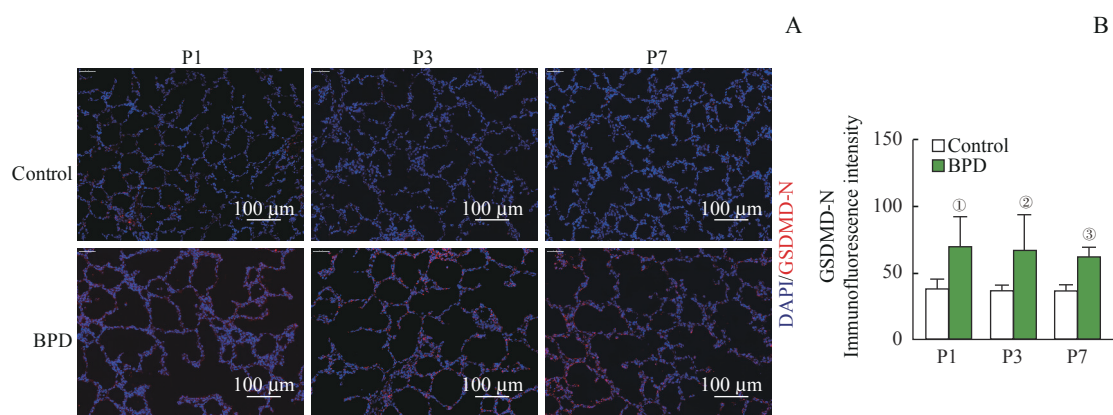
2.3 NSA 干预下新生鼠肺组织的病理改变及 $IL-1\beta$ mRNA 的表达

分析肺部 H-E 染色切片发现, 与对照组相比, BPD 组表现为典型的肺泡简化, 而加入 NSA 干预可以改善这些病理变化。与 BPD 组相比, BPD+NSA 组平均肺泡数、平均次级间隔数增多, MLI 缩小, 肺泡

化阻滞改善 (图 3A~D) (均 $P<0.05$)。实时定量 PCR 结果 (图 3E) 显示, BPD 组新生鼠肺组织中的 $IL-1\beta$ mRNA 水平较对照组增高, 而 NSA 可以抑制肺组织 $IL-1\beta$ mRNA 的表达 (均 $P<0.05$)。

2.4 LPS/ATP 刺激和 NSA 干预后肺泡上皮细胞的活力和焦亡变化

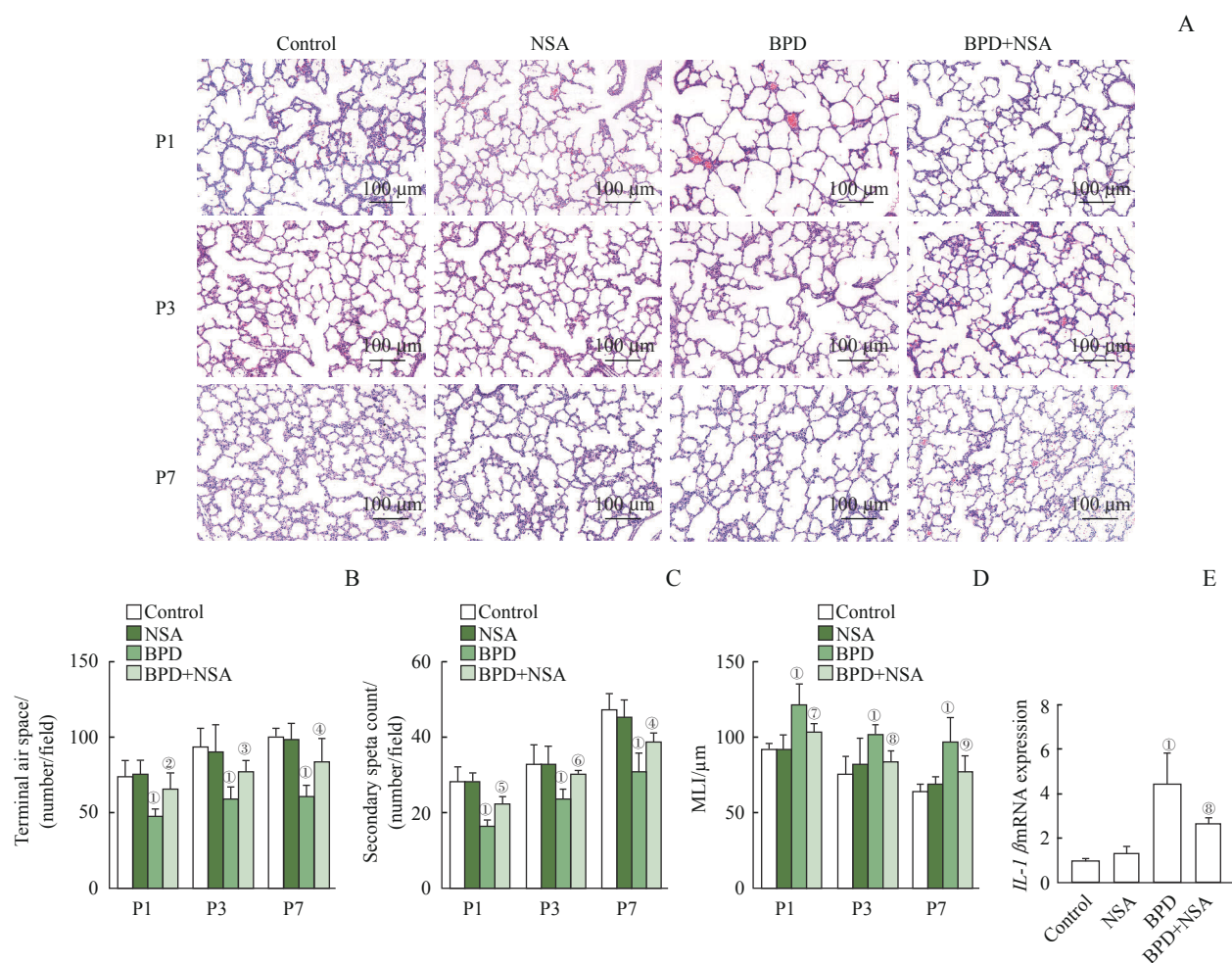
在 LPS/ATP 诱导肺泡上皮细胞焦亡的体外实验中, CCK-8 法、Hoechst 和 PI 染色结果 (图 4) 显示: LPS/ATP 可降低肺泡上皮细胞 MLE-12 的细胞活力, 并且增加焦亡细胞的阳性率; 而 NSA 干预可改善 LPS/ATP 导致的细胞活力下降, 并且抑制 LPS/ATP 诱导的细胞焦亡 (均 $P<0.05$)。



Note: A. Representative immunofluorescence images of GSDMD-N terminal (red) in the lungs of newborn rats. B. Quantitation of GSDMD-N terminal fluorescence intensity. ^① $P=0.007$, ^② $P=0.015$, ^③ $P=0.033$, compared with the control group.

图2 BPD新生鼠肺泡上皮细胞焦亡现象观察

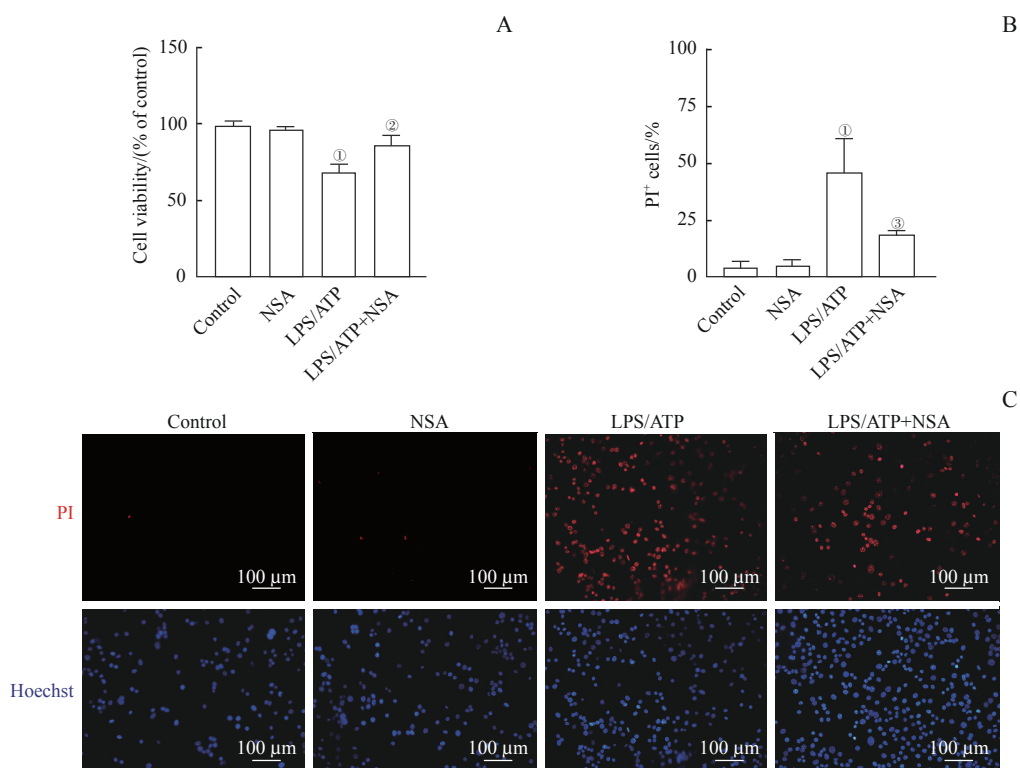
Fig 2 Alveolar epithelial cell pyroptosis in BPD newborn rats



Note: A. The representative lung sections stained with H-E staining. B. The quantification of the terminal air spaces of lung tissues from newborn rats. C. The quantification of the secondary septa of lung tissues from newborn rats. D. The quantification of the MLI of lung tissues from newborn rats. E. Comparison of *IL-1β* mRNA among the groups. ^① $P=0.000$, compared with the control group; ^② $P=0.031$, ^③ $P=0.049$, ^④ $P=0.002$, ^⑤ $P=0.040$, ^⑥ $P=0.020$, ^⑦ $P=0.024$, ^⑧ $P=0.026$, ^⑨ $P=0.014$, compared with the BPD group.

图3 NSA对新生鼠肺部病理状态和IL-1β mRNA表达的影响

Fig 3 Effects of NSA on lung pathology and expression of *IL-1β* mRNA in newborn rats



Note: A. Cell viability of MLE-12 detected by CCK-8 assay. B. Percentages of PI⁺ cells. C. Pyroptotic cells detected by Hoechst 33342 and PI staining. ^① $P=0.000$, compared with the control group; ^② $P=0.003$, ^③ $P=0.008$, compared with the LPS/ATP group.

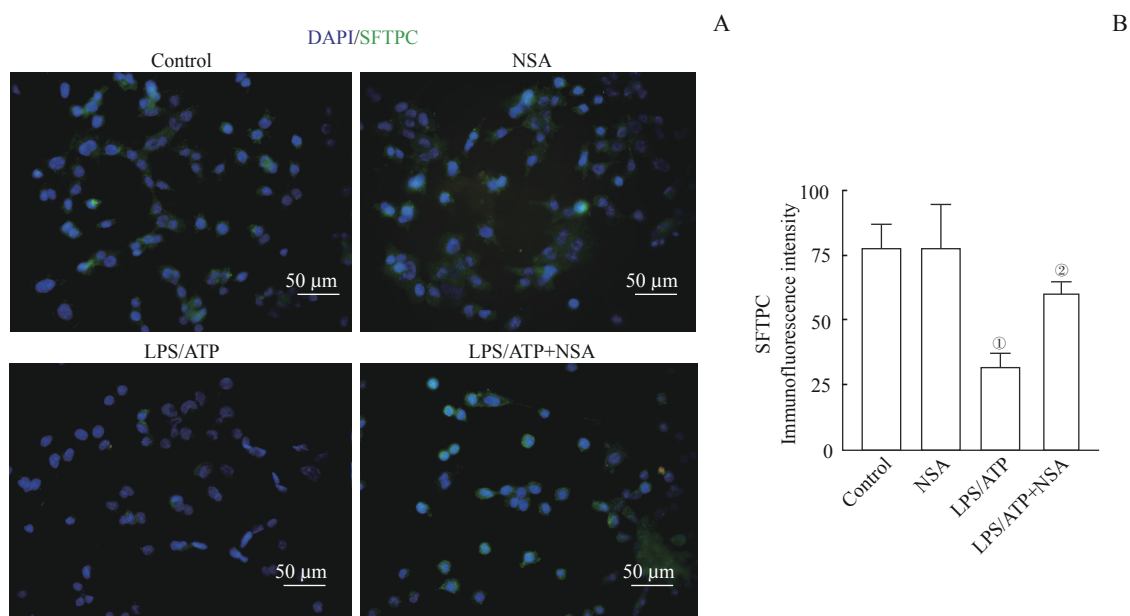
图4 NSA对LPS/ATP诱导的肺泡上皮细胞MLE-12焦亡的抑制作用

Fig 4 Inhibition effect of NSA on LPS/ATP-induced pyroptosis in MLE-12 cells

2.5 LPS/ATP刺激和NSA干预后肺泡上皮细胞SFTPC的表达

免疫荧光标记结果 (图5) 显示, LPS/ATP作用

下MLE-12中SFTPC的表达受到抑制, 而加入NSA干预后SFTPC在MLE-12中的表达增加 (均 $P<0.05$)。



Note: A. Representative immunofluorescence images of SFTPC (green) in MLE-12. B. Quantitation of SFTPC fluorescence intensity. ^① $P=0.002$, compared with the control group; ^② $P=0.035$, compared with the LPS/ATP group.

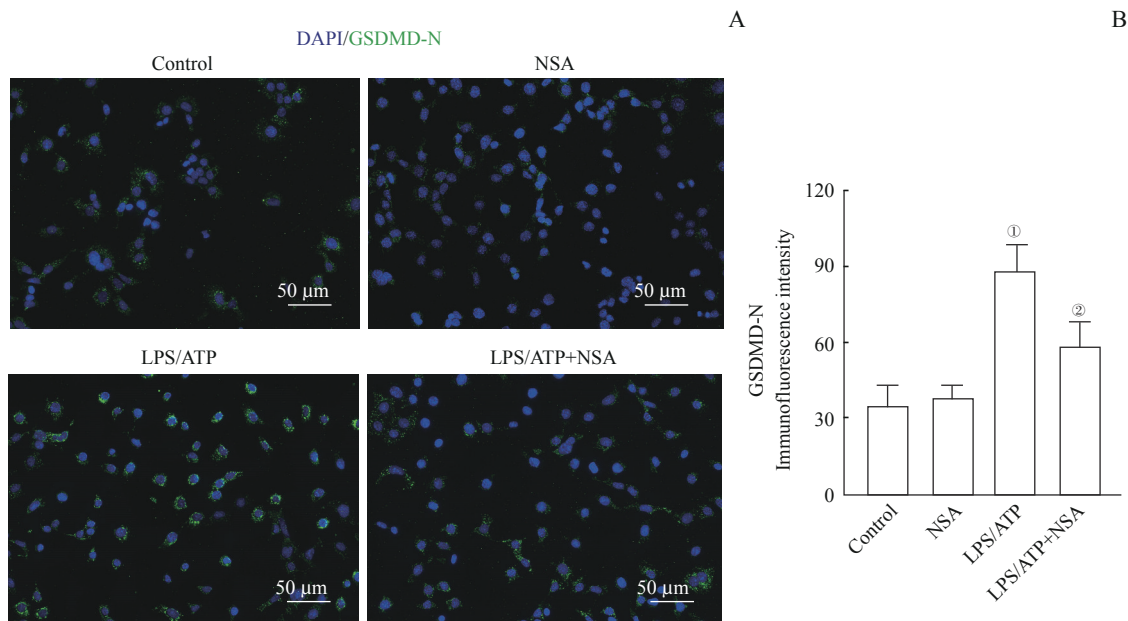
图5 NSA对肺泡上皮细胞MLE-12中SFTPC表达的影响

Fig 5 Effect of NSA treatment on SFTPC expression in MLE-12 cells

2.6 LPS/ATP 刺激和 NSA 干预后肺泡上皮细胞 GSDMD-N 的表达

免疫荧光标记结果 (图 6) 显示, LPS/ATP 作用

下 MLE-12 中 GSDMD-N 端的表达增加, 而加入 NSA 干预后抑制了 MLE-12 中 GSDMD-N 端的表达 (均 $P<0.05$)。



Note: A. Representative immunofluorescence images of GSDMD-N terminal (green) in MLE-12. B. Quantitation of GSDMD-N terminal fluorescence intensity. ^① $P=0.000$, compared with the control group; ^② $P=0.010$, compared with the LPS/ATP group.

图 6 NSA 对肺泡上皮细胞 MLE-12 中 GSDMD-N 端表达的影响

Fig 6 Effect of NSA treatment on GSDMD-N expression in MLE-12 cells

3 讨论

BPD 的发生是多种应激因素共同作用的结果, 而所有 BPD 的诱发因素都会引发肺部损伤性炎症反应, 从而抑制肺发育^[15]。本研究中, 我们首先发现羊膜腔内注射 LPS 能够抑制新生鼠肺部发育并引发肺泡上皮细胞焦亡; 同时, 我们发现应用 GSDMD 抑制剂 NSA 可以改善 BPD 新生鼠的肺泡发育阻滞。本研究还进一步验证了在体外水平 NSA 能够抑制肺泡上皮细胞焦亡, 促进肺泡上皮增殖分化。因此, 我们猜测抑制肺泡上皮细胞焦亡可能可以成为治疗 BPD 的一个有效靶点。

细胞焦亡是一种特殊的细胞程序性坏死, 现逐渐被认为是脊椎动物中一种常见的先天免疫效应。适当的细胞焦亡在杀灭病原菌方面发挥着重要作用^[7]。各种体外和体内的刺激因素均可引发细胞焦亡; 然而, 过度的细胞焦亡会引发多种自身免疫性和自身炎症性疾病, 并且加速疾病进程^[16]。迄今为止, 越来越多的研究也证明了焦亡在呼吸系统疾病起病中的重

要作用。研究^[8-9]表明, 细胞焦亡与 BPD 的发病密切相关, 炎症小体激活在 BPD 中起到关键作用。已有实验证实, 将高表达 GSDMD-N 端的细胞外囊泡移植入新生鼠体内可诱发肺部炎症反应, 抑制肺发育^[17]。更重要的是, 在 BPD 的临床研究中, 发现早产儿气管灌洗液中 IL-1 β 水平的升高与 BPD 的发展密切相关^[8,18]。此外, 相关探索性的动物研究显示, 抑制焦亡通路相关蛋白可以改善 BPD 新生鼠的肺泡发育, 如敲除 *Nlrp3* 基因或抑制 NLRP3 炎症小体的激活^[8,19]、抑制 caspase-1 活性^[9]、敲除 *IL-1 β* 基因或使用 IL-1 β 拮抗剂^[10] 均能有效改善 BPD 新生鼠的肺泡发育。在本研究中, 我们使用羊膜内注射 LPS 诱导建立新生大鼠 BPD 模型, 免疫荧光结果显示 BPD 新生鼠肺泡上皮细胞 GSDMD-N 端表达升高, 证明 BPD 新生鼠肺泡上皮细胞发生焦亡。这些结果表明肺泡上皮细胞焦亡与 BPD 的发生存在相关性, 也为寻找 BPD 的潜在治疗方法提供了线索。

自从细胞焦亡概念提出以来, 炎症性疾病和自身免疫性疾病临床研究逐渐将目光聚焦至焦亡通路, 应

用靶向焦亡通路的药物来治疗炎症、代谢和神经退行性疾病^[20-22]。研究^[13]发现,美国食品药品监督管理局批准的用于治疗乙醇依赖的药物双硫仑能有效抑制GSDMD成孔进而抑制细胞焦亡,并能有效降低脓毒症小鼠的死亡率。另一种选择性的caspase-1抑制剂VX-765 (Belnacasan) 已完成了在癫痫(NCT01048255)中的Ⅱ期临床试验^[23],结果显示VX-765治疗后癫痫发作率降低了15.6% (安慰剂组为7.0%),并且停药后还显示出延迟的有益效应。且在阿尔茨海默病的研究中发现,VX-765能防止小鼠认知障碍的发生^[24]。这些研究显示,抑制细胞焦亡对炎症性疾病具有一定的治疗效果。在本研究中,我们也发现GSDMD抑制剂NSA干预BPD后,新生鼠肺部发育明显改善且IL-1 β mRNA水平明显下调,提示了抑制肺泡上皮细胞焦亡可以改善BPD的肺泡化阻滞。

在BPD发生和发展过程中,聚集在肺内的中性粒细胞、巨噬细胞释放大炎症介质,如IL-1 β 、IL-6、IL-8等,这种炎性的肺泡微环境引发了肺泡上皮细胞的死亡,抑制了肺泡的发育,从而导致了BPD^[25]。Ⅰ型肺泡上皮细胞和Ⅱ型肺泡上皮细胞的损伤都与BPD发病密切相关^[26],而Ⅱ型肺泡上皮细胞具备无限增殖的潜能,不但可分泌肺泡表面活性物质,改善肺顺应性,还可定向分化为Ⅰ型肺泡上皮细胞,修复肺泡结构损伤^[27]。Ⅱ型肺泡上皮细胞的稳态破坏,导致了肺泡修复不全,结构简单化,最终导致BPD的发生。在体外实验中,我们发现,使用NSA可抑制LPS/ATP诱导下的肺泡上皮细胞焦亡,改善细胞活力,同时可以促进Ⅱ型肺泡上皮细胞标志物SFTPC的表达;证明抑制肺泡上皮细胞焦亡可以促进肺泡上皮细胞增殖同时向Ⅱ型肺泡上皮细胞分化,从而改善肺泡发育。

综上,体内外的实验证明,利用NSA抑制GSDMD-N端表达可以抑制肺泡上皮细胞的焦亡,最终改善BPD新生鼠的肺发育。本研究结果可能为BPD的治疗提供了一个新的思路,靶向肺泡上皮细胞焦亡可能可以成为治疗BPD的有效措施。因此,进一步研究细胞焦亡对BPD的作用机制,有助于进一步探究BPD发病机制及治疗措施。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

伦理批准和动物权利声明/Ethics Approval and Animal Right

本研究涉及的所有实验均已通过上海交通大学医学院附属新华医院伦理委员会的审核批准(文件号XHEC-F-2016-210)。所有实验过程均遵照《模式研究部规章制度和标准操作规范》的条例进行。All experimental protocols in this study were reviewed and approved by the Ethical Committee of Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (Approval Letter No. XHEC-F-2016-210, dated 07/03/2016). All experimental animal protocols were carried out by following the guidelines of *Rules and regulations and standard operating specifications of Model Animal Research Center*.

作者贡献/Authors' Contributions

郑小雁、王星云、张拥军参与了实验设计、论文写作及修改;郑小雁负责实验操作和实验数据分析。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

The study was designed by ZHENG Xiaoyan, WANG Xingyun and ZHANG Yongjun. The research implementation and data analysis were conducted by ZHENG Xiaoyan. The manuscript was drafted and revised by ZHENG Xiaoyan, WANG Xingyun and ZHANG Yongjun. All authors have read the last version and revised and consented for submission.

• Received: 2022-11-09

• Accepted: 2023-02-06

• Published online: 2023-02-28

参 考 文 献

- [1] THÉBAUD B, GOSS K N, LAUGHON M, et al. Bronchopulmonary dysplasia [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1): 78.
- [2] STOLL B J, HANSEN N I, BELL E F, et al. Trends in care practices, morbidity, and mortality of extremely preterm neonates, 1993-2012[J]. *JAMA*, 2015, 314(10): 1039-1051.
- [3] BELL E F, HINTZ S R, HANSEN N I, et al. Mortality, in-hospital morbidity, care practices, and 2-year outcomes for extremely preterm infants in the US, 2013-2018[J]. *JAMA*, 2022, 327(3): 248-263.
- [4] ISLAM J Y, KELLER R L, ASCHNER J L, et al. Understanding the short- and long-term respiratory outcomes of prematurity and bronchopulmonary dysplasia[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015, 192(2): 134-156.
- [5] WILLIAMS E, GREENOUGH A. Advances in treating bronchopulmonary dysplasia[J]. *Expert Rev Respir Med*, 2019, 13(8): 727-735.
- [6] SHI J, GAO W, SHAO F. Pyroptosis: gasdermin-mediated programmed necrotic cell death[J]. *Trends Biochem Sci*, 2017, 42(4): 245-254.
- [7] JORGENSEN I, MIAO E A. Pyroptotic cell death defends against

- intracellular pathogens[J]. *Immunol Rev*, 2015, 265(1): 130-142.
- [8] LIAO J, KAPADIA V S, BROWN L S, et al. The NLRP3 inflammasome is critically involved in the development of bronchopulmonary dysplasia[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8977.
- [9] DAPAAH-SIAKWAN F, ZAMBRANO R, LUO S, et al. Caspase-1 inhibition attenuates hyperoxia-induced lung and brain injury in neonatal mice[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2019, 61(3): 341-354.
- [10] STOUCH A N, MCCOY A M, GREER R M, et al. IL-1 β and inflammasome activity link inflammation to abnormal fetal airway development[J]. *J Immunol*, 2016, 196(8): 3411-3420.
- [11] KONG X, GAO M, LIU Y, et al. GSDMD-miR-223-NLRP3 axis involved in B(a)P-induced inflammatory injury of alveolar epithelial cells[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022, 232: 113286.
- [12] WAN X P, LI J Q, WANG Y P, et al. H7N9 virus infection triggers lethal cytokine storm by activating gasdermin E-mediated pyroptosis of lung alveolar epithelial cells[J]. *Natl Sci Rev*, 2022, 9(1): nwab137.
- [13] HU J J, LIU X, XIA S, et al. FDA-approved disulfiram inhibits pyroptosis by blocking gasdermin D pore formation[J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(7): 736-745.
- [14] RATHKEY J K, ZHAO J, LIU Z, et al. Chemical disruption of the pyroptotic pore-forming protein gasdermin D inhibits inflammatory cell death and sepsis[J]. *Sci Immunol*, 2018, 3(26): eaat2738.
- [15] KALIKOT THEKKEVEEDU R, GUAMAN M C, SHIVANNA B. Bronchopulmonary dysplasia: a review of pathogenesis and pathophysiology[J]. *Respir Med*, 2017, 132: 170-177.
- [16] FRANK D, VINCE J E. Pyroptosis *versus* necroptosis: similarities, differences, and crosstalk[J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(1): 99-114.
- [17] ALI A, ZAMBRANO R, DUNCAN M R, et al. Hyperoxia-activated circulating extracellular vesicles induce lung and brain injury in neonatal rats[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 8791.
- [18] CAYABYAB R G, JONES C A, KWONG K Y, et al. Interleukin-1 β in the bronchoalveolar lavage fluid of premature neonates: a marker for maternal chorioamnionitis and predictor of adverse neonatal outcome[J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2003, 14(3): 205-211.
- [19] ZHANG Q, RAN X, HE Y, et al. Acetate downregulates the activation of NLRP3 inflammasomes and attenuates lung injury in neonatal mice with bronchopulmonary dysplasia[J]. *Front Pediatr*, 2021, 8: 595157.
- [20] VAN OPDENBOSCH N, LAMKANFI M. Caspases in cell death, inflammation, and disease[J]. *Immunity*, 2019, 50(6): 1352-1364.
- [21] LU F, LAN Z, XIN Z, et al. Emerging insights into molecular mechanisms underlying pyroptosis and functions of inflammasomes in diseases[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(4): 3207-3221.
- [22] DHANI S, ZHAO Y, ZHIVOTOVSKY B. A long way to go: caspase inhibitors in clinical use[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(10): 949.
- [23] BIALER M, JOHANNESSEN S I, KUPFERBERG H J, et al. Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the Eleventh Eilat Conference (EILAT XI) [J]. *Epilepsy Res*, 2013, 103(1): 2-30.
- [24] FLORES J, NOËL A, FOVEAU B, et al. Pre-symptomatic caspase-1 inhibitor delays cognitive decline in a mouse model of Alzheimer disease and aging[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4571.
- [25] HIRANI D, ALVIRA C M, DANOPOULOS S, et al. Macrophage-derived IL-6 trans-signalling as a novel target in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia[J]. *Eur Respir J*, 2022, 59(2): 2002248.
- [26] HOU A, FU J, YANG H, et al. Hyperoxia stimulates the transdifferentiation of type II alveolar epithelial cells in newborn rats [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 308(9): L861-L872.
- [27] RACKLEY C R, STRIPP B R. Building and maintaining the epithelium of the lung[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(8): 2724-2730.

[本文编辑] 吴 洋

