

纳米氧化锌颗粒通过激活 NLRP3 炎症小体诱导小胶质细胞炎症反应

苗歆雨, 张小强, 卢晓星, 陶一凡, 李琪

东南大学公共卫生学院, 环境医学工程教育部重点实验室, 江苏 南京 210009

摘要:

[背景] 随着纳米颗粒的广泛应用, 其安全性已引起人们关注。已有文章报道纳米颗粒能够诱导炎症因子分泌水平增高, 但纳米颗粒对核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体激活的相关研究较少。

[目的] 探讨纳米氧化锌颗粒 (nano-ZnO) 暴露对小胶质细胞 NLRP3 炎症小体激活及炎症因子分泌的影响。

[方法] 取对数生长期的微胶质细胞 BV2 暴露于不同浓度的 nano-ZnO (0、2.5、5.0、10.0、15.0、20.0 mg·L⁻¹), 采用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 比色法检测各组细胞存活率, 检测乳酸脱氢酶 (LDH) 活性判断细胞膜完整性, 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测各组细胞培养液中白介素 (IL)-1 β 、IL-18 分泌水平, 采用 Western blotting 法测定各组细胞 NLRP3、前半胱天冬酶-1 (pro-caspase-1)、凋亡相关斑点样蛋白 (ASC) 和活化型半胱天冬酶-1 (cleaved caspase-1) 蛋白表达水平。

[结果] 随着 nano-ZnO 暴露浓度的增加, BV2 细胞活力降低 ($r=-0.814$, $P<0.05$), 且与对照组相比, 15.0、20.0 mg·L⁻¹ nano-ZnO 暴露组细胞活力下降 ($P<0.05$)。细胞培养液上清中 LDH 活性随 nano-ZnO 暴露浓度的增加而升高 ($r=0.962$, $P<0.05$)。与对照组相比, 2.5、5.0、10.0、15.0 mg·L⁻¹ nano-ZnO 组细胞均出现 IL-1 β 和 IL-18 分泌水平升高 (均 $P<0.05$), 且具有明显的剂量-效应关系 ($r_{IL-1\beta}=0.919$, $P<0.05$; $r_{IL-18}=0.994$, $P<0.05$)。Western blotting 检测结果显示, 各暴露组 NLRP3、pro-caspase-1、ASC 以及 cleaved caspase-1 的蛋白表达水平均随浓度增加而升高 ($r_{NLRP3}=0.897$, $P<0.05$; $r_{pro-caspase-1}=0.758$, $P<0.05$; $r_{ASC}=0.751$, $P<0.05$; $r_{cleaved caspase-1}=0.723$, $P<0.05$); 且与对照组相比, 5.0、10.0、15.0 mg·L⁻¹ nano-ZnO 暴露致 NLRP3 及 cleaved caspase-1 表达水平升高, 10.0、15.0 mg·L⁻¹ nano-ZnO 暴露致 ASC 及 pro-caspase-1 表达水平升高 (均 $P<0.05$)。

[结论] nano-ZnO 暴露可激活小胶质细胞 NLRP3 炎症小体并进一步诱导炎症因子表达, 增强细胞炎症反应。

关键词: 纳米氧化锌; 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3; 炎症小体; 小胶质细胞; 白介素-18; 白介素-1 β

Contribution of activating NLRP3 inflammasome to zinc oxide nanoparticles induced inflammation in microglia cells MIAO Xin-yu, ZHANG Xiao-qiang, LU Xiao-xing, TAO Yi-fan, LI Qi (School of Public Health, Southeast University, Key Laboratory of Environmental Medicine, Ministry of Education, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract:

[Background] The wide application of nanoparticles has raised public concerns about their safety. Studies have shown that nanoparticles could increase the secretion of pro-inflammatory factors, but the influence of nanoparticles on activation of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome is rarely reported.

[Objective] This experiment investigates the effect of zinc oxide nanoparticle (nano-ZnO) exposure on the activation of NLRP3 inflammasome and the expression of inflammatory cytokines in microglia cells.

[Methods] BV2 cells in logarithmic growth phase were exposed to nano-ZnO at concentrations of 0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, and 20.0 mg·L⁻¹, respectively. Cell viability was determined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. Integrity of cell membrane was evaluated using lactate

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.19808

基金项目

江苏省普通高校研究生科研创新计划资助项目 (SJZZ16_0034)

作者简介

苗歆雨 (1992—), 女, 硕士生;
E-mail: mxy4518@126.com

通信作者

张小强, E-mail: zhangxq7843@126.com

利益冲突 无申报

收稿日期 2019-11-26

录用日期 2020-01-14

文章编号 2095-9982(2020)05-0474-06

中图分类号 R114

文献标志码 A

引用

苗歆雨, 张小强, 卢晓星, 等. 纳米氧化锌颗粒通过激活 NLRP3 炎症小体诱导小胶质细胞炎症反应 [J]. 环境与职业医学, 2020, 37 (5): 474-479.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19808

Funding

This study was funded.

Correspondence to

ZHANG Xiao-qiang, E-mail: zhangxq7843@126.com

Competing interests None declared

Received 2019-11-26

Accepted 2020-01-14

To cite

MIAO Xin-yu, ZHANG Xiao-qiang, LU Xiao-xing, et al. Contribution of activating NLRP3 inflammasome to zinc oxide nanoparticles induced inflammation in microglia cells[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(5): 474-479.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19808

dehydrogenase (LDH) activity. Secretion levels of interleukin (IL)-1 β and IL-18 in the medium of each group were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Expression levels of NLRP3, pro-caspase-1, apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC), and cleaved caspase-1 in each group were determined by Western blotting.

[Results] With the increase of nano-ZnO doses, the cell viability of BV2 cells was decreased ($r=-0.814$, $P<0.05$). Compared with the control group, the cell viabilities in the 15.0 and 20.0 mg·L⁻¹ nano-ZnO groups were reduced ($P<0.05$). The LDH activity in supernatant was enhanced along with the increasing of nano-ZnO concentrations ($r=0.962$, $P<0.05$). Compared with the control group, the secretion levels of IL-1 β and IL-18 were increased in the 2.5, 5.0, 10.0, and 15.0 mg·L⁻¹ nano-ZnO groups, and there were significant dose-response relationships ($r_{IL-1\beta}=0.919$, $P<0.05$; $r_{IL-18}=0.994$, $P<0.05$). The Western blotting results showed that the expression levels of NLRP3, pro-caspase-1, ASC, and cleaved caspase-1 were increased with higher nano-ZnO doses ($r_{NLRP3}=0.897$, $P<0.05$; $r_{pro-caspase-1}=0.758$, $P<0.05$; $r_{ASC}=0.751$, $P<0.05$; $r_{cleaved\ caspase-1}=0.723$, $P<0.05$). Compared with the control group, the expression levels of NLRP3 and cleaved caspase-1 were increased in the 5.0, 10.0, and 15.0 mg·L⁻¹ nano-ZnO groups, and the expression levels of ASC and pro-caspase-1 were increased in the 10.0 and 15.0 mg·L⁻¹ nano-ZnO groups ($P<0.05$).

[Conclusion] Exposure to nano-ZnO could induce the activation of NLRP3 inflammasome, further increase the expression of inflammatory cytokines, and enhance cell inflammation response.

Keywords: zinc oxide nanoparticle; nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3; inflammasome; microglia; interleukin-18; interleukin-1 β

纳米氧化锌颗粒 (zinc oxide nanoparticle, nano-ZnO) 具有特殊的理化性质, 在化妆品、抗菌食品包装材料、食品添加剂等方面的应用日益广泛^[1-4]。但纳米产品的广泛应用增加了机体接触纳米颗粒的机会, 其安全性问题也引起了人们的关注。近年来, 研究者们已经开始探讨纳米颗粒的毒作用特点及其相关的毒性作用机制。研究表明 nano-ZnO 可通过多种方式对机体产生毒性作用, 包括氧化应激、锌离子释放、离子通道功能受损和炎症反应等^[5-6]。nano-ZnO 可通过消化道、呼吸道和皮肤等途径进入机体。值得注意的是, 经各种途径进入血液的纳米颗粒能够增加血脑屏障的通透性, 导致纳米颗粒渗入中枢神经系统, 并导致脑组织损伤^[7-10]。

近年来, 神经退行性疾病的发病率逐年增加, 神经炎症被认为对于神经退行性疾病的发生发展具有关键作用^[11]。相关研究表明, 炎症小体的激活导致炎症因子表达水平升高并进一步引起神经炎症^[12]。炎症小体是细胞内一种能激活 caspase-1 的蛋白复合物, 由感受器模式识别受体、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC) 以及前半胱天冬酶-1 (pro-caspase-1) 等组成^[13]。目前已有关于核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体的研究报道, 其激活可刺激细胞分泌成熟的白介素 (interleukin, IL) -18 和 IL-1 β , 促使活化型半胱天冬酶-1 (cleaved caspase-1) 生成, 并能诱导细胞焦亡^[14]。

研究表明 nano-ZnO 暴露能够引起炎症反应, 但能否通过激活 NLRP3 炎症小体引起小胶质细胞炎症因

子 IL-18 和 IL-1 β 分泌水平增高, 进而导致细胞炎症反应增强的相关研究未见报道。因此, 本研究将小胶质细胞暴露于不同浓度的 nano-ZnO, 研究了 nano-ZnO 对细胞活性、细胞膜完整性、炎症因子 IL-18 和 IL-1 β 表达的影响, 重点探讨了 nano-ZnO 对 NLRP3 炎症小体的激活作用, 以探究 nano-ZnO 引起神经炎症反应的可能机制, 为 nano-ZnO 的安全使用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

BV2 小胶质细胞 (中国医学科学院基础医学研究所细胞中心), nano-ZnO (粒径 20 nm, 南京海泰纳米材料有限公司), DMEM 高糖培养基 (美国 HyClone), 胎牛血清 (美国 Clark bio), 0.25% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸溶液 (美国 HyClone), 四甲基偶氮唑盐 (methylthiazolyl tetrazolium, MTT) (美国 Sigma), 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所), IL-1 β 和 IL-18 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司), 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒 (北京康为世纪生物技术有限公司), NLRP3 抗体及半胱天冬酶 (caspase) -1 抗体 (英国 Abcam), ASC 抗体及 β -actin 抗体 (美国 Santa Cruz), 蛋白免疫印迹电化学发光 (electrochemiluminescence, ECL) 试剂盒 (美国 Santa Cruz)。

1.2 主要仪器

二氧化碳培养箱 (新加坡 Esco), Zetasizer Nano-ZS90 型马尔文粒径分析仪 (英国 Malvern), RT-6000 酶标分析 (美国 Rayto), 5417R 高速冷冻离心机 (德国

Eppendorf), Mini-Protein 3 小型垂直电泳槽 (美国 Bio-Rad), JY600C 电泳仪 (北京六一仪器厂), Tanon 5200 化学发光成像系统 (上海天能科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 nano-ZnO 表征 nano-ZnO 在使用前经 180℃ 干热灭菌 3h, 随后用培养基将 nano-ZnO 配制成 1.0 mg·L⁻¹ 的贮备液, 超声振荡 30 min。用完全培养基将贮备液稀释至 100.0 mg·L⁻¹, 用于 nano-ZnO 的表征分析。使用马尔文粒径分析仪, 采用动态光散射法检测 nano-ZnO 工作液中纳米颗粒的粒径、多分散系数 (polydispersity index, PDI) 以及 Zeta 电位。

1.3.2 BV2 细胞的培养 将 BV2 细胞培养于含 10% 胎牛血清、100 U·mL⁻¹ 青霉素与 100 g·L⁻¹ 链霉素的 DMEM 高糖培养基中, 置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养。每隔 1 d 换液, 每 2 d 传代一次, 传代比例为 1:4。当细胞培养至对数生长期时进行相关实验。

1.3.3 MTT 法测定细胞活力 分别取对数生长期的 BV2 细胞, 调整浓度为 6×10³ 个·孔⁻¹, 接种于 96 孔培养板, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞贴壁后分别加入含不同浓度 (0、2.5、5.0、10.0、15.0、20.0 mg·L⁻¹) nano-ZnO 的完全培养基, 加样量 100 μL, 同时设立空白对照组。培养 24 h 后, 每孔加入 10 μL 的 5 g·L⁻¹ MTT 溶液, 继续培养 4 h, 吸弃上清, 每孔加入 150 μL 的二甲基亚砜, 振荡 10 min, 待结晶充分溶解后, 使用酶标仪在 570 nm 处检测光密度值, 并计算细胞存活率。

1.3.4 细胞培养液上清中 LDH 活性测定 分别取对数生长期的 BV2 细胞, 调整浓度为 5×10⁴ 个·孔⁻¹, 接种于 24 孔培养板, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞贴壁后分别加入含不同浓度 (0、2.5、5.0、10.0、15.0 mg·L⁻¹) nano-ZnO 的完全培养基, 加样量 500 μL。培养 24 h 后, 取上清培养液, 离心后取上清。按 LDH 试剂盒操作说明, 设立标准空白孔, 在 450 nm 处测定光密度值并计算 LDH 活性, 判断细胞膜完整性。

1.3.5 ELISA 法检测 IL-1β、IL-18 水平 分别取对数生长期的 BV2 细胞, 调整细胞浓度为 5×10⁴ 个·孔⁻¹, 接种于 24 孔板。细胞贴壁后, 待细胞贴壁后分别加入含不同浓度 (0、2.5、5.0、10.0、15.0 mg·L⁻¹) nano-ZnO 的完全培养基。培养 24 h 后, 收集细胞培养上清, 3000 r·min⁻¹ 离心 20 min (离心半径 5.5 cm), 取上清。按 ELISA 试剂盒说明书操作, 使用酶标仪在 450 nm 处测定光密度值。根据标准曲线分别确定样品中 IL-1β、IL-18 水平。

1.3.6 Western blotting 法检测 NLRP3 炎症小体相关蛋白表达水平 BV2 细胞经 nano-ZnO 处理 24 h 后弃去培养基, 用预冷 PBS 冲洗两遍, 用放射免疫沉淀法 (radio-immunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液提取蛋白, 4℃、12000 r·min⁻¹ 离心 10 min (离心半径 5.5 cm), 收集上清, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定浓度后, 制胶、上样、电泳、转膜后, 用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 分别加入一抗 NLRP3 抗体、ASC 抗体、caspase-1 抗体和 β-actin 抗体 (1:1000), 4℃ 过夜, 洗膜, 二抗孵育 1.5 h 后, 洗膜并曝光显色。使用 Image J (v1.47) 软件对蛋白条带灰度值进行分析。

1.4 统计学分析

所有实验均为三次独立实验, 实验数据均以均值±标准差表示。应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 多组之间比较采用单因素方差分析 (one-way analysis of variance, ANOVA)。两两比较时, 若方差齐则采用 LSD-t 检验, 若不齐则选择 Dunnett's T3 检验。趋势分析采用 Spearman 相关分析, 结果以相关系数 *r* 表示。检验水准 α=0.05。

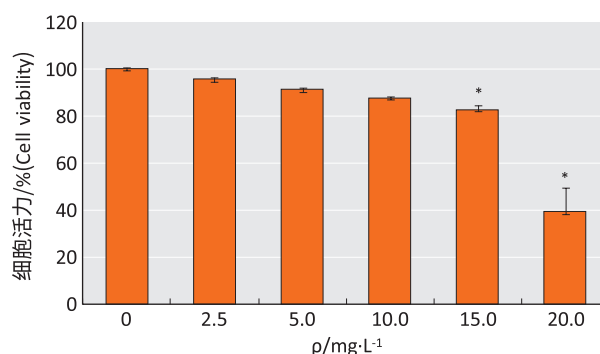
2 结果

2.1 nano-ZnO 表征

马尔文粒度分析仪分析结果显示, nano-ZnO 平均水合粒径为 (178.13±11.23) nm, Zeta 电位为 (-8.23±2.12) mV, PDI 为 0.37±0.08。

2.2 细胞活力

与对照组相比, Nano-ZnO 浓度为 15.0、20.0 mg·L⁻¹ 时, 细胞活力下降明显 (*P*<0.05)。在不同浓度组 nano-ZnO 暴露条件下, 细胞活力随着暴露浓度的增加而减少 (*r*=-0.814, *P*<0.05)。见图 1。



[注] *: 与对照组相比, *P*<0.05。

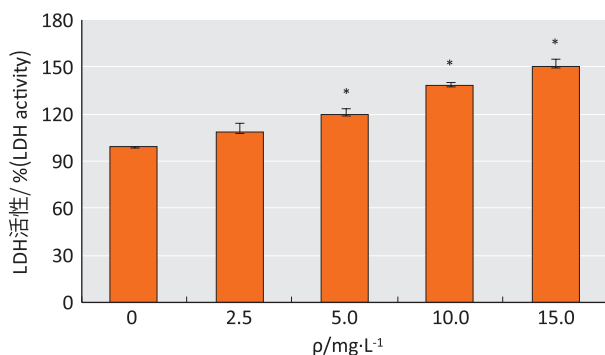
[Note] *: Compared with the control group, *P*<0.05.

图1 不同浓度 nano-ZnO 处理 24 h 的 BV2 细胞活力 (*n*=3)

Figure 1 Cell viability of BV2 cells treated with different concentrations of nano-ZnO for 24 h (*n*=3)

2.3 LDH 活性的变化

与对照组相比, 5.0、10.0 和 15.0 mg·L⁻¹ nano-ZnO 组细胞培养液上清 LDH 活性升高 (均 $P < 0.05$)。在不同浓度 nano-ZnO 暴露条件下, 细胞培养液上清 LDH 活性随浓度增加而增加 ($r = 0.962$, $P < 0.05$)。见图 2。



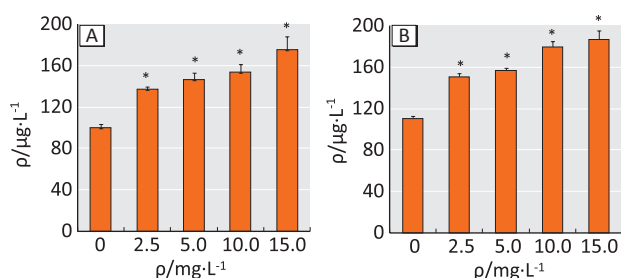
[注] *: 与对照组相比, $P < 0.05$ 。

[Note] *: Compared with the control group, $P < 0.05$.

图2 不同浓度 nano-ZnO 处理 24 h 的 BV2 细胞 LDH 活力 ($n=3$)
Figure 2 LDH activity of BV2 cells treated with different concentrations of nano-ZnO for 24 h ($n=3$)

2.4 IL-1β、IL-18 水平

与对照组相比, 2.5、5.0、10.0、15.0 mg·L⁻¹ nano-ZnO 组细胞均出现 IL-1β 和 IL-18 水平升高 (均 $P < 0.05$), 且具有明显的剂量-效应关系 ($r_{IL-1\beta} = 0.919$, $P < 0.05$; $r_{IL-18} = 0.994$, $P < 0.05$)。见图 3。



[注] *: 与对照组相比, $P < 0.05$ 。

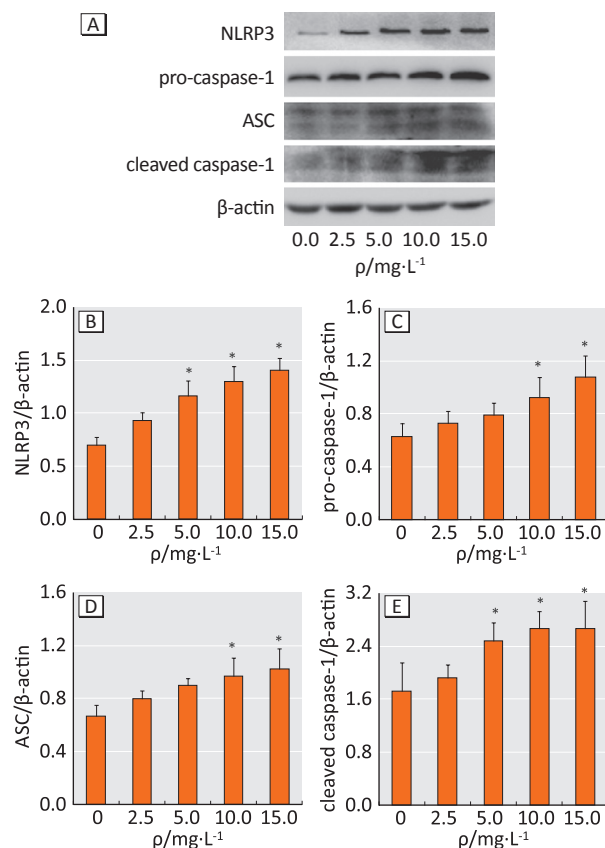
[Note] *: Compared with the control group, $P < 0.05$.

图3 不同浓度 nano-ZnO 处理 24 h 的 BV2 细胞的炎症因子 IL-1β (A) 和 IL-18 (B) 水平的影响 ($n=3$)
Figure 3 The levels of IL-1β (A) and IL-18 (B) in BV2 cells treated with different concentrations of nano-ZnO for 24 h ($n=3$)

2.5 NLRP3 炎症小体相关蛋白水平的变化

与对照组相比, 5.0、10.0、15.0 mg·L⁻¹ nano-ZnO 暴露致 NLRP3 及 cleaved caspase-1 表达水平升高 ($P < 0.05$), 10.0、15.0 mg·L⁻¹ nano-ZnO 暴露致 pro-caspase-1 及 ASC 表达水平升高 ($P < 0.05$), 见图 4。各蛋白表达水平与 nano-ZnO 浓度存在剂量-效应关系 ($r_{NLRP3} = 0.897$, $P < 0.05$; $r_{ASC} = 0.751$, $P < 0.05$; $r_{pro-caspase-1} = 0.758$, $P < 0.05$;

$r_{cleaved\ caspase-1} = 0.723$, $P < 0.05$)。



[注] A: NLRP3、pro-caspase-1、ASC、cleaved caspase-1 蛋白表达 Western blotting 电泳图; B~E: NLRP3、pro-caspase-1、ASC 和 cleaved caspase-1 的 Western blotting 条带灰度值比值。*: 与对照组相比, $P < 0.05$ 。

[Note] A: The expressions of NLRP3, pro-caspase-1, ASC, and cleaved caspase-1 measured by Western blotting; B-E: The densitometric expression levels of NLRP3, pro-caspase-1, ASC, and cleaved caspase-1, respectively, measured by Western blotting. *: Compared with the control group, $P < 0.05$.

图4 不同浓度 nano-ZnO 处理 24 h 时 BV2 细胞 NLRP3 炎症小体相关蛋白表达水平 ($n=3$)
Figure 4 The expressions of NLRP3 inflammasome related proteins in BV2 cells treated with different concentrations of nano-ZnO for 24 h ($n=3$)

3 讨论

nano-ZnO 是使用最多的纳米颗粒之一, 可用于防晒霜、食品添加剂和抗菌材料等产品。纳米颗粒经呼吸道、皮肤和消化道摄入后, 能够随血液循环进入大脑并穿过血脑屏障, 引起神经系统的炎症反应^[15-18]。但目前关于 nano-ZnO 能否通过激活 NLRP3 炎症小体, 进而导致细胞炎症反应增强的相关研究未见报道。小胶质细胞被称为脑中的巨噬细胞^[19], 是中枢神经系统免疫应答的关键调节因子, 参与宿主防御反应^[11]。因此本研究采用 BV2 细胞暴露于 nano-ZnO, 探讨 nano-ZnO 对 NLRP3 炎症小体激活及炎症因子分泌的影响,

判断 NLRP3 炎症小体在 nano-ZnO 导致 BV2 细胞炎症反应水平改变中的可能作用。

纳米颗粒在工作液中的分散状态取决于其尺寸、形状、表面电荷等,并对于其生物效应研究具有重要意义^[20]。本研究通过动态光散射法所测得的纳米颗粒平均粒径大于其实际粒径,这可能是受布朗运动的影响^[21]。PDI 表示颗粒分散的均一程度,本实验数据显示 nano-ZnO 悬浮液 PDI 为 0.37 ± 0.08 ,说明悬浮液中纳米 ZnO 颗粒分散的均一性较好。纳米颗粒的表面电荷也是影响纳米颗粒分散水平的重要因素之一,本研究 nano-ZnO 的平均 Zeta 电位为 (-8.23 ± 2.12) mV,说明颗粒在分散体系内具有较好的分散状态。

本研究结果表明, BV2 细胞暴露于 nano-ZnO 导致细胞存活率下降,并存在剂量-效应关系,且当暴露浓度为 15.0 和 20.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞存活率明显下降,与 Liang^[16] 的研究报道一致。但亦有研究表明,星型胶质细胞暴露于 8.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ nano-ZnO,细胞存活率即明显下降^[22],这可能与细胞种属及所用纳米 nano-ZnO 的理化特点有关。细胞培养上清中 LDH 活性也随着 nano-ZnO 暴露浓度的增加而升高,说明 nano-ZnO 能够在一定浓度条件下引起细胞膜完整性的破坏。

通过对炎症因子 IL-1 β 及 IL-18 分泌水平的研究发现,随着 nano-ZnO 暴露浓度的增加,IL-1 β 及 IL-18 的分泌水平均有升高。目前已经证实激活的 NLRP3 炎症小体能够刺激炎症因子前体转变为成熟的 IL-18 和 IL-1 β 细胞因子^[23-24]。同时,有研究提出了包括纳米材料和纳米颗粒在内的纳米相关分子模式(nanoparticle-associated molecular patterns, NAMP)^[25-26],并认为 NAMP 引发无菌性炎症的重要原因之一是炎症小体的激活^[27-28]。此外,有研究显示,石棉、碳纳米管、纳米二氧化钛等多种晶体和颗粒物可以诱导 NLRP3 炎症小体的激活,并引起炎症反应和炎症因子的释放^[29-30]。因此我们推测 nano-ZnO 激活了 NLRP3 炎症小体并进而导致 IL-18 和 IL-1 β 分泌水平增加。

NLRP3 炎症小体相关蛋白表达的结果表明, nano-ZnO 暴露引起小胶质细胞 NLRP3、ASC、pro-caspase-1 和 cleaved caspase-1 表达水平增加,说明 nano-ZnO 可激活 NLRP3 炎症小体。NLRP3 炎症小体的激活分为两个步骤,信号一激活核因子- κ B 信号通路,诱导 IL-1 β 、IL-18 前体以及 NLRP3、ASC、pro-caspase-1 的转录和翻译发生改变。信号二通过溶酶体损伤、膜通透性改变、活性氧产生等方式将 NLRP3、ASC 和 pro-caspase-1 组

装成一个复杂的炎症小体并激活,同时 pro-caspase-1 转变为 cleaved caspase-1,后者促进炎症因子前体转变为 IL-18 和 IL-1 β 等细胞因子^[23-24]。本研究对 nano-ZnO 暴露导致 NLRP3 炎症小体激活做了探讨,有关其激活的具体机制本课题组将做进一步研究。

参考文献

- [1] VANCE ME, KUIKEN T, VEJERANO EP, et al. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory [J]. Beilstein J Nanotechnol, 2015, 6: 1769-1780.
- [2] WANG HF, DU LJ, SONG ZM, et al. Progress in the characterization and safety evaluation of engineered inorganic nanomaterials in food [J]. Nanomedicine, 2013, 8 (12): 2007-2025.
- [3] KARIMI M, SADEGHI R, KOKINI J. Human exposure to nanoparticles through trophic transfer and the biosafety concerns that nanoparticle-contaminated foods pose to consumers [J]. Trends Food Sci Technol, 2018, 75: 129-145.
- [4] JONES N, RAY B, RANJIT KT, et al. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms [J]. FEMS Microbiol Lett, 2008, 279 (1): 71-76.
- [5] RYU WI, PARK YH, BAE HC, et al. ZnO nanoparticle induces apoptosis by ROS triggered mitochondrial pathway in human keratinocytes [J]. Mol Cell Toxicol, 2014, 10 (4): 387-391.
- [6] CHANG H, HO CC, YANG CS, et al. Involvement of MyD88 in zinc oxide nanoparticle-induced lung inflammation [J]. Exp Toxicol Pathol, 2013, 65 (6): 887-896.
- [7] 刘焕亮. 典型纳米材料致大鼠中枢神经系统和多巴胺能神经元的毒性效应研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2014.
- [8] BRUN E, CARRIÈRE M, MABONDZO A. In vitro evidence of dysregulation of blood-brain barrier function after acute and repeated/long-term exposure to TiO₂ nanoparticles [J]. Biomaterials, 2012, 33 (3): 886-896.
- [9] TIAN L, LIN B, WU L, et al. Neurotoxicity induced by zinc oxide nanoparticles: age-related differences and interaction [J]. Sci Rep, 2015, 5: 16117.
- [10] ZHAO J, XU L, ZHANG T, et al. Influences of nanoparticle zinc oxide on acutely isolated rat hippocampal CA3 pyramidal neurons [J]. NeuroToxicology, 2009, 30 (2):

- 220-230.
- [11] SONG J, ZHANG W, WANG J, et al. Activation of Nrf2 signaling by salvianolic acid C attenuates NF- κ B mediated inflammatory response both *in vivo* and *in vitro* [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 63 : 299-310.
- [12] ZHANG Y, HU W, ZHANG B, et al. Ginsenoside Rg1 protects against neuronal degeneration induced by chronic dexamethasone treatment by inhibiting NLRP-1 inflammasomes in mice [J]. Int J Mol Med, 2019, 40 (4) : 1134-1142.
- [13] LAMKANFI M, DIXIT VM. Inflammasomes and Their Roles in Health and Disease [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2012, 28 : 137-161.
- [14] LU Y, XU S, CHEN H, et al. CdSe/ZnS quantum dots induce hepatocyte pyroptosis and liver inflammation *via* NLRP3 inflammasome activation [J]. Biomaterials, 2016, 90 : 27-39.
- [15] KAO YY, CHENG TJ, YANG DM, et al. Demonstration of an olfactory bulb-brain translocation pathway for ZnO nanoparticles in rodent cells *in vitro* and *in vivo* [J]. J Mol Neurosci, 2012, 48 (2) : 464-471.
- [16] LIANG H, CHEN A, LAI X, et al. Neuroinflammation is induced by tongue-instilled ZnO nanoparticles *via* the Ca²⁺-dependent NF- κ B and MAPK pathways [J]. Part Fibre Toxicol, 2018, 15 : 39.
- [17] BENCSIK A, LESTAEVEL P, CANU IG. Nano- and neurotoxicology : an emerging discipline [J]. Prog Neurobiol, 2018, 160 : 45-63.
- [18] CUPAIOLI FA, ZUCCA FA, BORASCHI D, et al. Engineered nanoparticles. How brain friendly is this new guest? [J]. Prog Neurobiol, 2014, 119-120 : 20-38.
- [19] SINGH V, MITRA S, SHARMA AK, et al. Isolation and characterization of microglia from adult mouse brain : selected applications for *ex vivo* evaluation of immunotoxicological alterations following *in vivo* xenobiotic exposure [J]. Chem Res Toxicol, 2014, 27 (5) : 895-903.
- [20] KUMAR V, KUMARI A, GULERIA P, et al. Evaluating the toxicity of selected types of nanochemicals [J]. Rev Environ Contam Toxicol, 2012, 215 : 39-121.
- [21] ZHANG XF, LIU ZG, SHEN W, et al. Silver nanoparticles : synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17 (9) : 1534.
- [22] WANG J, DENG X, ZHANG F, et al. ZnO nanoparticle-induced oxidative stress triggers apoptosis by activating JNK signaling pathway in cultured primary astrocytes [J]. Nanoscale Res Lett, 2014, 9 (1) : 117.
- [23] GÓMEZ DM, URCUQUI-INCHIMA S, HERNANDEZ JC. Silica nanoparticles induce NLRP3 inflammasome activation in human primary immune cells [J]. Innate Immun, 2017, 23 (8) : 697-708.
- [24] MEZZASOMA L, ANTOGNELLI C, TALESA VN. A novel role for brain natriuretic peptide : inhibition of IL-1 β secretion via Downregulation of NF- κ B/Erk 1/2 and NALP3/ASC/caspase-1 activation in human THP-1 monocyte [J]. Mediators Inflamm, 2017, 2017 : 5858315.
- [25] AKIRA S, UEMATSU S, TAKEUCHI O. Pathogen recognition and innate immunity [J]. Cell, 2006, 124 (4) : 783-801.
- [26] PALLARDY MJ, ISABELLE T, BIOLA-VIDAMMENT A. Why the immune system should be concerned by nanomaterials? [J]. Front Immunol, 2017, 8 : 544.
- [27] GUO H, CALLAWAY JB, TING JP. Inflammasomes : mechanism of action, role in disease, and therapeutics [J]. Nat Med, 2015, 21 (7) : 677-687.
- [28] STROWIG T, HENAO-MEJIA J, ELINAV E, et al. Inflammasomes in health and disease [J]. Nature, 2012, 481 (7381) : 278-286.
- [29] SAYAN M, MOSSMAN BT. The NLRP3 inflammasome in pathogenic particle and fibre-associated lung inflammation and diseases [J]. Part Fibre Toxicol, 2016, 13 (1) : 51.
- [30] DE NARDO D, DE NARDO CM, LATZ E. New insights into mechanisms controlling the NLRP3 inflammasome and its role in lung disease [J]. Am J Pathol, 2014, 184 (1) : 42-54.

(英文编辑：汪源；责任编辑：王晓宇)