

GPR120 基因通过抑制 NLRP3 炎症小体激活对脓毒症肺损伤保护作用的机制

张凯¹ 黄一沁¹ 张自妍¹ 宓林¹ 余纳⁴ 保志军^{2,3Δ}

(¹复旦大学附属华东医院全科医疗科, ²老年医学科, ³消化内科, ⁴病理科 上海 200040)

【摘要】 目的 观察 *GPR120* 基因对脓毒症进展的作用,探索 *GPR120* 基因对胞内多蛋白复合物—NLRP3 (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3) 及巨噬细胞极化的调控作用。方法 收集临床脓症患者血液及胸水样本后,采用流式及 ELISA 实验检测炎症因子及炎症小体相关蛋白表达。利用细菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 处理 C57BL/6 小鼠及单核-巨噬细胞株 Raw264.7 构建体内外脓毒症模型,并通过 *GPR120* 基因激动剂 TUG891 的干预,观察对照组和脓毒症组间 *GPR120* 基因、NLRP3 炎症小体蛋白及巨噬细胞极化蛋白的表达差异。结果 在临床标本中检测发现,与对照组相比脓症患者血清中 IL-1 β 等炎症因子表达明显升高 ($P < 0.001$),胸水中 NLRP3、Caspase-1 及 IL-1 β 等炎症小体蛋白的表达水平也明显升高 (P 均 < 0.05)。体内实验发现 LPS 诱导的急性肺损伤动物模型中肺组织内重度炎症表现,肺组织内 *GPR120* 基因表达下降,小鼠血清中炎症因子表达上调 ($P < 0.01$),炎症小体激活相关蛋白的表达增强,巨噬细胞 M1 型极化增强。通过 TUG891 激活 *GPR120* 基因,可减轻小鼠及细胞的炎症反应,抑制 NLRP3 炎症小体激活,促进巨噬细胞 M2 极化 ($P < 0.01$)。体外实验证实了 LPS 可抑制细胞内 *GPR120* 蛋白的表达并促进炎症蛋白的分泌,而 TUG891 促进 *GPR120* 蛋白水平的上调表达并对炎症因子的分泌具有缓解作用 ($P < 0.05$)。结论 在脓毒症中,*GPR120* 基因激活可抑制 NLRP3 炎症小体的活化,促进巨噬细胞修复型极化,减轻组织炎症损伤,从而延缓脓毒症的快速进展。

【关键词】 脓毒症; 肺损伤; *GPR120* 基因; TUG891; 胞内多蛋白复合物 (NLRP3)

【中图分类号】 R563.2 **【文献标志码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2025.01.006

The mechanism of *GPR120* gene inhibiting NLRP3 inflammasome activation in protection of septic lung injury

ZHANG Kai¹, HUANG Yi-qin¹, ZHANG Zi-yan¹, MI Lin¹, YU Na⁴, BAO Zhi-jun^{2,3Δ}

(¹Department of General Medicine, ²Department of Geriatrics, ³Department of Gastroenterology, ⁴Department of Pathology, Huadong Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the role of the *GPR120* gene in the progression of sepsis, explore the molecular mechanisms through which *GPR120* gene regulates NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) inflammasome activation and macrophage polarization. **Methods** The blood and pleural fluid samples were collected from the sepsis patients and the control group. The expression of inflammatory factors and the associated proteins were detected by flow cytometry and ELISA. C57BL/6 mice and monocyte-macrophage cell line (Raw264.7) were treated with lipopolysaccharide (LPS) to construct the sepsis models. After the intervention of *GPR120* agonist TUG891, the expression of *GPR120* gene, NLRP3 inflammasome protein and macrophage polarization protein were detected between the control group and the sepsis group. **Results** The expression of inflammatory factors, such as IL-1 β in the serum of septic patients, significantly increased compared with

^ΔCorresponding author E-mail: xinyi8681@sina.com

网络首发时间: 2024-11-27 15:45:40 网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/31.1885.r.20241126.1537.002>

the control ($P < 0.001$). And the expression of inflammasome proteins such as NLRP3, Caspase-1 and IL-1 β in the pleural fluid also increased (all $P < 0.05$). *In vivo*, LPS could induce severe inflammation in lung tissue, the *GPR120* gene expression decreased in lung tissue, and inflammatory factors were up-regulated in mouse serum ($P < 0.01$). The inflammasome-associated protein and M1 type polarization of macrophages were enhanced, the TUG891 could reduce the inflammatory response, inhibit the NLRP3 inflammasome activating, and promote the M2 polarization of macrophages ($P < 0.01$). *In vitro*, LPS could inhibit the intracellular *GPR120* expression. The inflammatory factors secreted more in LPS-induced sepsis cells. TUG891 could promote the up-regulation of GPR120 protein and alleviate the secretion of inflammatory factors ($P < 0.05$). **Conclusion** In sepsis, *GPR120* gene activation could inhibit the NLRP3 inflammasome activation, promote macrophage polarization, and reduce the inflammatory damage, thereby delay the rapid progression of sepsis.

【Key words】 sepsis; lung injury; *GPR120* gene; TUG891; NLRP3

脓毒症是指机体对感染的反应失调引起生理生化多种指标异常,可进展为多器官功能障碍,进而导致死亡,其死亡率高达20%~30%^[1-2]。肺通常是脓毒症攻击最早、最严重的靶器官^[3-4],可导致急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征,对肺部造成不可逆转的损害,是脓毒症患者死亡的重要原因之一^[5]。尽管有液体复苏、抗生素和生命支持等多种治疗手段,但效果并不理想,急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征的治疗仍是危重症医学领域亟待解决的重要问题。

脓毒症的病理生理特点是炎症、代谢、分解代谢及免疫抑制等多途径同时、持久性恶化^[6]。发生脓毒症时,感染可促使固有免疫细胞识别多种微生物及细胞应激损伤,诱导胞内多蛋白复合物—NLRP3(NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3)炎症小体形成,激活的炎症小体进一步增强促炎性细胞因子和趋化因子成熟及分泌^[7-8]。过量炎性因子加速局部细胞坏死、焦亡及血管内皮功能障碍,促使机体进入放大炎症损伤的恶性循环^[9-10]。研究发现NLRP3炎症小体在急性肺损伤及脓毒症患者体内被激活^[4,11],而抑制NLRP3炎症小体的激活对脓毒症动物有保护作用^[12],如肉桂醛能够降低注射脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的小鼠体外和肺部NLRP3与IL-1 β 的表达^[13]。另一项研究^[14]表明二氢杨梅素通过抑制NLRP3炎症小体的活化,从而对急性肺损伤产生保护作用。NLRP3炎症小体的异常激活有助于脓毒症的进展^[15],抑制NLRP3炎症小体的组装和过度激活,在预防脓毒症的过度炎症反应中有重要价值,通过调节NLRP3

来治疗脓毒症的药物和方法仍在不断探索。

巨噬细胞具有识别、吞噬、提呈抗原,介导免疫应答及修复损伤等功能。肺泡巨噬细胞可以协同其他免疫细胞调节肺部炎症,在肺部炎症的发展过程中发挥重要作用^[16]。巨噬细胞可以通过极化呈现出不同表型和功能,巨噬细胞的经典活化(M1)和交替活化(M2)表型代表了两种不同的活化状态。M1巨噬细胞主要参与炎症反应,释放促炎分子;M2巨噬细胞主要参与抗炎反应,释放抗炎细胞因子。M1/M2极化是一个紧密协调的过程,反映了巨噬细胞在免疫反应中的复杂性和多样性^[17]。通过检测巨噬细胞M1型标记物诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)和M2型标记物精氨酸酶-1(arginase-1, Arg-1),我们可以观察到巨噬细胞极化的转变^[18]。

G蛋白偶联受体是一类广泛存在于真核生物细胞表面的膜蛋白。其中G蛋白偶联受体120(G-proteincoupled receptor 120, GPR120)主要参与长链脂肪酸的代谢。研究^[19]发现GPR120可以识别 ω -3多不饱和脂肪酸和内源性脂类配体,抑制NLRP3炎症小体激活,改善NLRP3炎症性依赖性炎症和代谢紊乱。GPR120在肺上皮细胞及巨噬细胞中均大量表达^[20-21],提示它可能也是呼吸系统疾病的治疗靶点。

在本研究中,我们拟通过体内外LPS诱导脓毒症模型,探索*GPR120*基因在脓毒症治疗中的功效,探讨巨噬细胞炎症小体激活在其中发挥的作用及相关机制,为脓毒血症肺损伤的保护寻找可能靶点。

资料和方法

临床信息收集及样本处理 收集2020—2022年复旦大学附属华东医院经过临床诊断为脓毒血症患者的血清学样本30例,其中包含有胸水脱落细胞学存档石蜡样本15例;同时收集对照组体检血清学样本32例,对照组的胸水样本来自充血性心力衰竭患者,共计15例。本研究入组试验组和对照组患者均已签署知情同意,研究已通过复旦大学附属华东医院伦理委员会批准(批准号:2020K093)。

试验试剂与材料 SYBR®Green Premix Pro Taq HS qPCR试剂盒购自日本Takara生物公司;总RNA提取试剂盒、PrimeScript™II第一链cDNA合成试剂盒、酶联免疫吸附测定法ELISA试剂盒、免疫组化显色试剂盒均购于生工生物工程(上海)股份有限公司;显影液、RIPA裂解液等均购于上海碧云天生物技术有限公司;PVDF膜购自美国Millipore公司;LPS、TUG891、伊红、苏木素购于德国Sigma公司;盐酸、无水乙醇、异丙醇购于上海国药集团;实验用一抗及二抗购自英国Abcam公司或美国CST公司。

构建脓毒症肺损伤模型鼠 购买维通利华8~9周龄SPF级雄性C57BL/6J小鼠,初始体重18~20g,所有动物实验均按照国家指南进行,并经复旦大学上海医学院实验动物部伦理批准(批准号:20230304Z)。小鼠腹腔注射LPS处理是经典的脓毒症动物建模方法。其优势在于快速、高效、操作简单和可重复性高^[22]。我们将小鼠随机分为正常对照组(Control组)、LPS组和LPS+TUG891组,每组10只。其中,LPS+TUG891组预先给每只小鼠腹腔注射100 μL TUG891(10 mL/kg),连续3天,其他组小鼠注射等量生理盐水。第3天,除对照组外其余小鼠均腹腔注射100 μL LPS(10 mg/kg),对照组小鼠注射等量生理盐水。LPS造模96 h后,采用摘除眼球法采血,脱臼法处死小鼠。分离、收集血清,留取小鼠肺组织,-80℃冰箱内保存。

细胞培养及造模 将巨噬细胞株RAW264.7置于37℃、5% CO₂的无菌培养箱中培养。使用LPS构建脓毒症细胞模型,分为正常对照组、LPS组(500 ng/mL 孵育6 h)、TUG891组(10 μmol/L TUG891 孵育6 h)及LPS+TUG891组(500 ng/mL

LPS+10 μmol/L TUG891 共同孵育6 h)。

伊红-苏木素染色及免疫组化染色 肺组织及胸水细胞块的石蜡切片脱蜡后,将切片依次进行苏木素染色,1%盐酸乙醇分化,50%、70%和80%梯度酒精处理,伊红染色,乙醇及二甲苯依次浸泡,中性胶密封,置于光学显微镜下观察并拍照。

用柠檬酸盐对石蜡切片进行抗原修复,3%过氧化氢溶液室温封闭内源性过氧化物酶,按照说明书稀释抗体,将一抗分别滴加于切片上,4℃冰箱孵育过夜。PBS充分冲洗后,滴加二抗37℃孵育30 min。按照说明书配置DAB显色工作液,室温显色10 min后,用苏木素进行核染色。两位病理专家根据双盲法分别鉴定染色程度。

流式细胞实验 用PBS缓冲液将细胞悬液调整到 1×10^6 /mL的浓度。以说明书推荐的稀释度添加抗体。充分混合并在室温下孵育30 min,PBS洗涤、重悬细胞,通过流式细胞仪获取数据。

向100 μL抗凝全血悬浮液中加入新鲜制备的红细胞裂解缓冲液,以说明书推荐的稀释度添加抗体。充分混合并在室温下孵育30 min,PBS洗涤、重悬细胞,所有检测均重复3次,通过流式细胞仪获取数据。

RNA提取及实时荧光定量PCR(qRT-PCR) 按照说明书使用Trizol法提取总RNA。按照试剂盒说明书进行反转录及qRT-PCR,上机的反应条件为:93℃ 3 min,40个循环;93℃ 1 min,55℃ 2 min。利用SDS2.3软件对数据进行分析处理。每个样本取3个复孔得到的Ct值的平均值,所有试验均重复3次,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算上述基因的相对表达量。GAPDH作为mRNA的内参。

Western blot 使用RIPA裂解缓冲液提取细胞总蛋白,并进行蛋白定量。吸取适量样品液添加到预制胶板上样口,用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,使用PVDF膜进行蛋白转膜。一抗和二抗封闭及孵育后,用ECL(Lablead)进行检测。

酶联免疫吸附测定法 按照相应ELISA试剂盒说明配置标准品,并依次加入样本(100 μL)进行后续试验,每个样本重复3遍。使用酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)在450 nm波长下测定吸光度(D)值,使用CurveExpert软件拟合标准曲线,根据标准曲线的拟合度以及残差平方选择合适

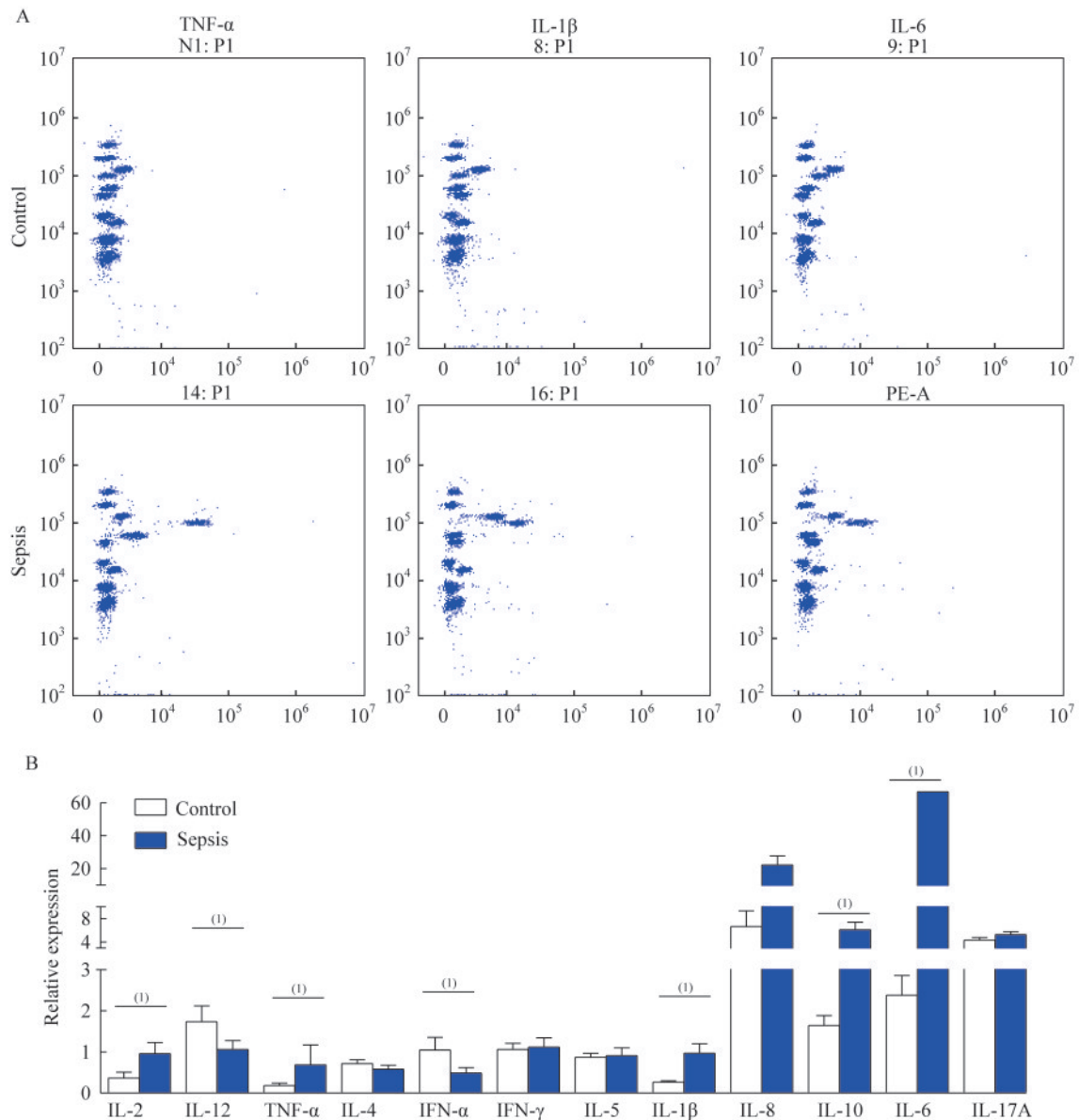
的曲线。

统计学分析 定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据分析,比较不同组别间连续变量的差异,组间比较采用 *t* 检验,再进行 Tukey 多重比较检验,生存分析采用 Kaplan-Meier 法和 Log-rank 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

脓毒症患者的炎症因子及 NLRP3 炎症小体蛋

白表达增加 共收集 30 例脓毒血症患者以及 32 个正常对照血清学样本,两组的性别无差异,年龄有统计学差异 ($P=0.027$)。通过流式细胞术对比脓毒症与正常体检人群血液标本中的多种炎症因子,包括: IL-2、IL-12、IFN- α 、IL-8、IL-4、IL-6、IL-10、TNF- α 、INF- γ 、IL-17A、IL-1 β 及 IL-5; 结果表明 IL-2、IL-6、IL-10、TNF- α 及 IL-1 β 这 5 个炎症因子在试验组中表达明显升高 (P 均 < 0.001 , 图 1), 而 IL-12 和 IFN- α 在试验组中表达明显降低 (P 均 < 0.001 , 图 1)。



All tests repeated 3 times. ⁽ⁱ⁾ $P < 0.001$.

图 1 流式细胞术验证对照组和脓毒症组的炎症因子表达差异

Fig 1 Verifying the expression difference of the inflammatory factors between the control and sepsis groups using flow cytometry

随后我们观察脓毒症组中包含胸水细胞块样本的15例患者临床及胸水特性,对照组为15例充血性心力衰竭患者胸水脱落细胞样本。两组基本信息及临床血液化验结果见表1。

表1 纳入的脓毒症及心力衰竭患者基本特征及临床血液检验结果

Tab 1 The basic characteristics and clinical laboratory blood results of enrolled patients with sepsis and heart failure [n or ($\bar{x} \pm s$)]

Variable	Sepsis(n=15)	Control(n=15)	P
Gender			0.830 0
Male	14	8	
Female	1	7	
Age (y)			0.594 3
<60	1	1	
≥60	14	14	
Underlying disease			<0.000 1
No	5	0	
Cardiac insufficiency	2	15	<0.000 1
Type II diabetes	3	2	0.624 2
Hypertension	3	8	0.058 2
Coronary heart disease	2	2	1
Cirrhosis	0	4	<0.000 1
Others ^a	2	5	0.195 3
C-reactive protein (mg/L)	80.92 ± 35.47	35.33 ± 25.38	0.007 0
IL-6 (pg/mL)	103.26 ± 25.89	19.66 ± 8.75	0.002 1
IL-10 (pg/mL)	35.79 ± 15.25	9.55 ± 6.71	<0.000 1
IL-8 (ng/mL)	2.038 ± 1.25	0.082 ± 0.04	<0.000 1
Procalcitonin (ng/mL)	0.84 ± 0.43	0.48 ± 0.19	0.016 1
Erythrocyte sedimentation rate (mm/h)	39.43 ± 17.56	23.81 ± 9.06	0.004 5
In-hospital mortality	1	1	1
Leucocyte (×10 ⁹ /L)	9.80 ± 3.21	7.68 ± 3.46	0.170 5
Neutrophils (%)	80.20 ± 8.41	76.03 ± 19.02	0.071 6
Lymphocytes (%)	12.44 ± 6.97	20.08 ± 10.58	0.055 7
Red blood cells (×10 ¹² /L)	3.39 ± 0.98	3.07 ± 0.81	0.921 2
Hemoglobin (g/L)	108.6 ± 27.02	93.78 ± 17.97	0.143 6
Platelets (×10 ⁹ /L)	235.69 ± 123.6	254.20 ± 114.93	0.884 8

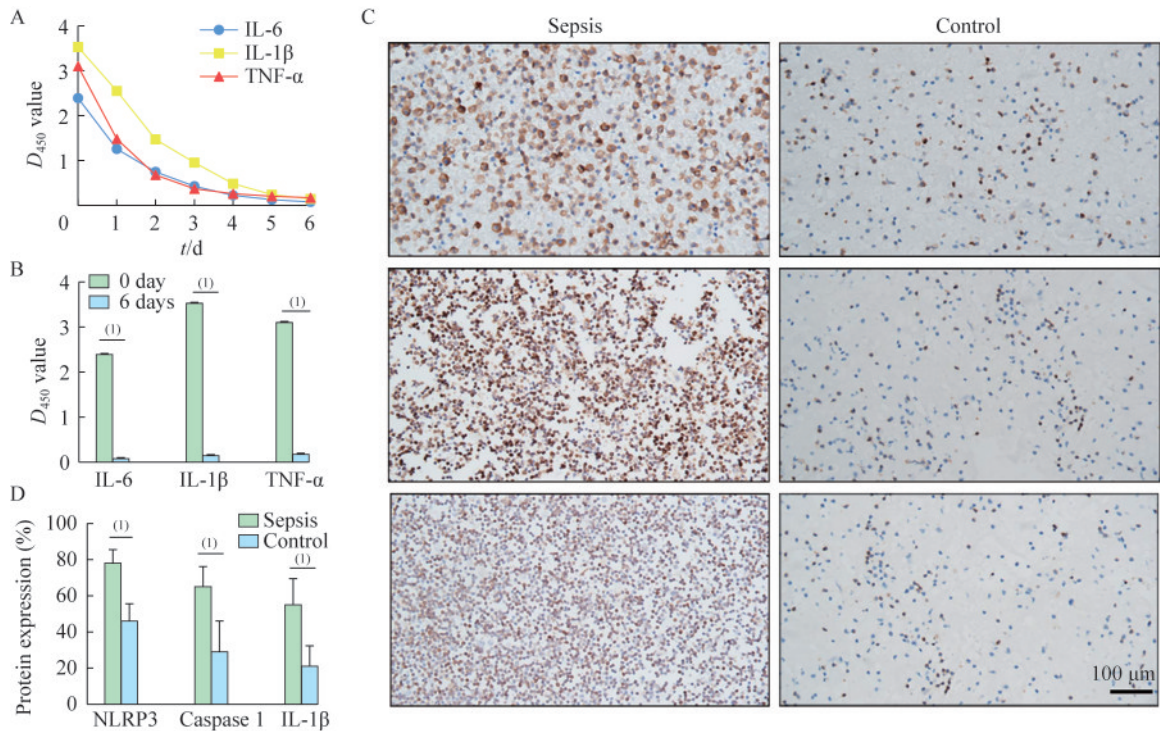
^aOther diseases including renal insufficiency, cerebral infarction, arrhythmia, bronchiectasis and autoimmune diseases (rheumatoid arthritis, connective tissue disease, Sjogren's syndrome).

通过ELISA试验验证脓症患者血清IL-6、TNF- α 及IL-1 β 等炎症因子的表达变化,可见炎性蛋白在发病初期最高(图2A),治疗后血液中炎症因子水平逐渐下降,第6天基本恢复正常($P < 0.001$,图2B)。脓症患者胸水常由全身性炎症导致,其胸水主要为渗出液,可见细胞成分密集,以淋巴细胞、浆细胞、中性粒细胞等炎症细胞为主,散在间皮细胞及组织细胞。免疫组化染色见NLRP3、Caspase-1及IL-1 β 蛋白染色阳性炎症细胞占比高(70% ± 7.58%, 50% ± 11.18%, 60% ± 14.58%)。心衰患者胸水常因血液循环障碍产生,以漏出液为主,细胞数量较稀

疏,以散在淋巴细胞及间皮细胞为主。

免疫组化染色见NLRP3、Caspase-1及IL-1 β 蛋白染色阳性细胞占比较脓毒症组明显降低(46% ± 9.62%, 29% ± 1.71%, 21% ± 11.46%),两组蛋白表达水平差异有统计学意义(P 均<0.001,图2C、2D)。以上结果说明在脓症患者中可检测到NLRP3炎症小体显著激活及多种促炎性因子分泌增加,提示NLRP3炎症小体活化可能是脓毒症发生发展的重要信号通路。

通过GPR120基因调控脓毒症小鼠的肺损伤及炎症激活 首先检测LPS及LPS+TUG891诱导的



A: The expression of inflammatory cytokines IL6, IL-1 β and TNF- α in the sepsis patients blood; B: The expression of inflammatory factors were on the onset day and day 6 in the sepsis group; C: In sepsis group, the exfoliated cells in pleural fluid were increased and the inflammasome-associated proteins were activated; D: The NLRP3/caspase-1/IL-1 β protein expression was analyzed in pleural fluid between the two groups. ⁽¹⁾ $P < 0.001$.

图2 炎症因子及炎症小体相关蛋白炎症在脓毒症患者及对照组的表达差异

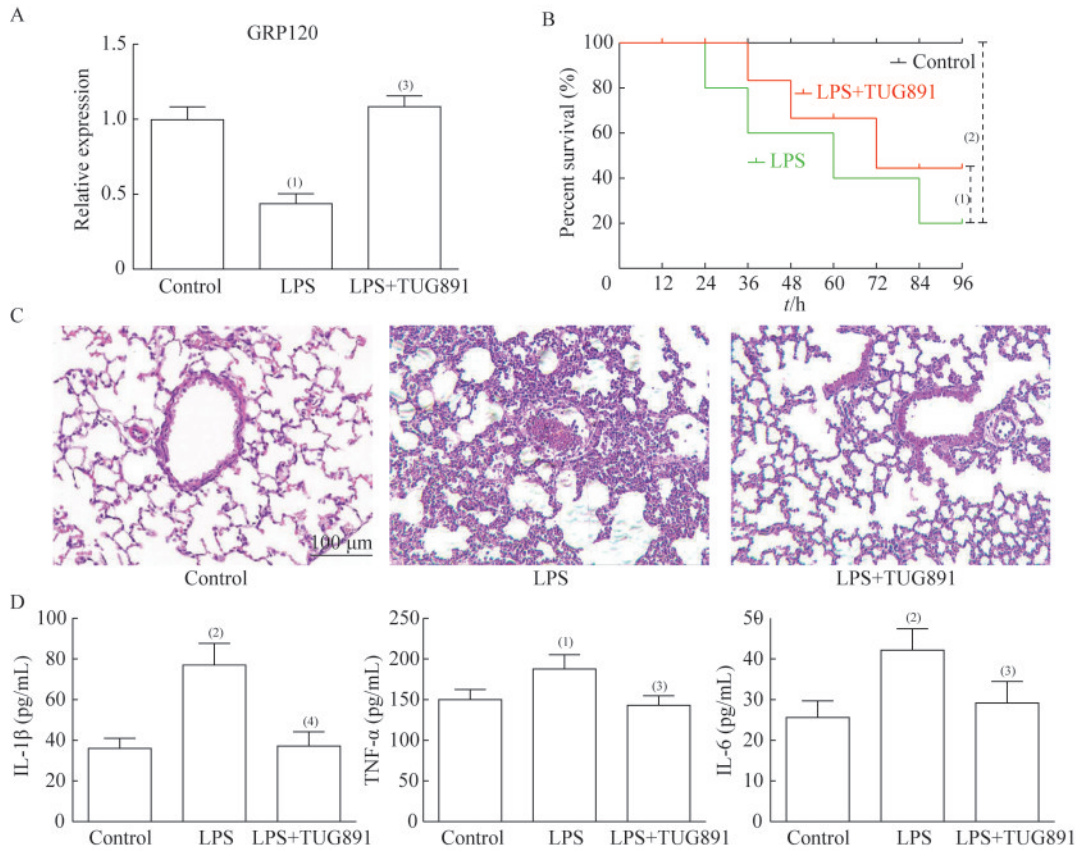
Fig 2 The expressed level of inflammatory factors and inflammasome-associated proteins in the sepsis patients and the control group

小鼠模型对 *GPR120* 基因表达的影响,发现以正常肺组织内 *GPR120* 基因 mRNA 表达为基线,LPS 诱导的脓毒症可导致 *GPR120* 基因表达显著被抑制;加以 *GPR120* 基因激动剂 TUG891 处理后, *GPR120* 基因被重新激活,基本恢复正常水平 ($P < 0.001$,图 3A)。观察对照组、LPS 模型组及 LPS+TUG891 组小鼠的状态,发现对照组生存率为 100%,一般情况良好。LPS 组小鼠在注射 LPS 6 h 后均开始出现倦怠、呼吸急促等全身症状,随时间延长症状逐渐加重,造模 24 h 时出现死亡;LPS+TUG891 组仅部分小鼠出现气促等症状,约 36 h 后出现死亡,且死亡率较 LPS 组降低 ($P < 0.05$,图 3B)。通过 HE 染色观察肺组织损伤情况(图 3C),对照组肺组织结构完整,未见明显炎症细胞浸润。LPS 组可见肺泡部分结构受到破坏、紊乱,肺泡壁增厚水肿,大量炎性细胞浸润。LPS+TUG891 组可见局灶肺泡结构破坏和少量炎症细胞浸润,相比 LPS 组小鼠肺组织炎症显著减轻。血液炎症因子的升高是脓毒症的典型表现,如图 3D 所示,与对照组相比,脓毒症小鼠血清中 IL-1 β 、TNF- α 及 IL-6 表

达均呈显著上调 (P 均 < 0.01);给予 TUG891 干预后小鼠血清中炎症因子表达被抑制 ($P < 0.01$)。

LPS 组小鼠肺组织内炎症小体相关蛋白 Caspase-1、IL-1 β 、NLRP3 以及 M1 极化蛋白 iNOS 表达均显著性升高 (P 均 < 0.001 ,图 4);M2 极化蛋白 Arg-1 表达明显降低 ($P < 0.001$),表明 LPS 可诱导细胞产生 NLRP3 炎症小体激活及促炎型巨噬细胞 M1 极化。而与 LPS 组相比,LPS+TUG891 组炎症小体蛋白及 iNOS 表达下降 (P 均 < 0.001),Arg-1 蛋白水平增高 ($P < 0.001$)。说明 TUG891 可通过上调肺组织 *GPR120* 基因表达,进而抑制脓毒症模型中 NLRP3 炎症小体的激活,增强巨噬细胞抗炎修复型 M2 极化。

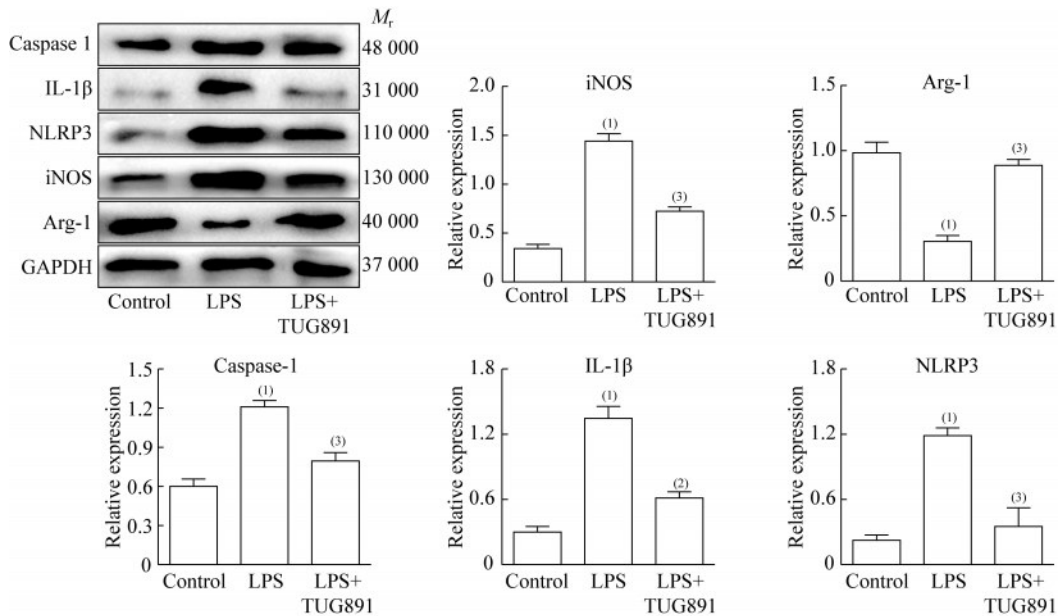
***GPR120* 基因通过调控 NLRP3 炎症小体的激活进而控制细胞炎症** 采用 Raw264.7 细胞构建脓毒症模型,同体内模型一致,脓毒症组细胞增殖活性显著降低,细胞凋亡较其他组增多 ($P < 0.001$,图 5A、5B),提示 LPS 可能诱导细胞发生炎症相关凋亡。检测细胞上清液中的分泌性炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达,LPS 组炎症蛋白分泌增多,LPS+



A: The difference of *GPR120* gene expression in each group; B: Survival rate of mice in each group; C: The pathological changes of lung tissue; D: The expression of inflammatory factors in mice serum. vs. control group, ⁽¹⁾ $P < 0.01$, ⁽²⁾ $P < 0.001$; vs. LPS group, ⁽³⁾ $P < 0.01$, ⁽⁴⁾ $P < 0.001$. All tests repeated 3 times.

图3 LPS诱导的脓毒症及TUG891处理后的小鼠模型中GPR120基因及炎症因子的表达

Fig 3 The expression of GPR120 gene and inflammatory factors in LPS-induced sepsis and TUG891-treated mouse model



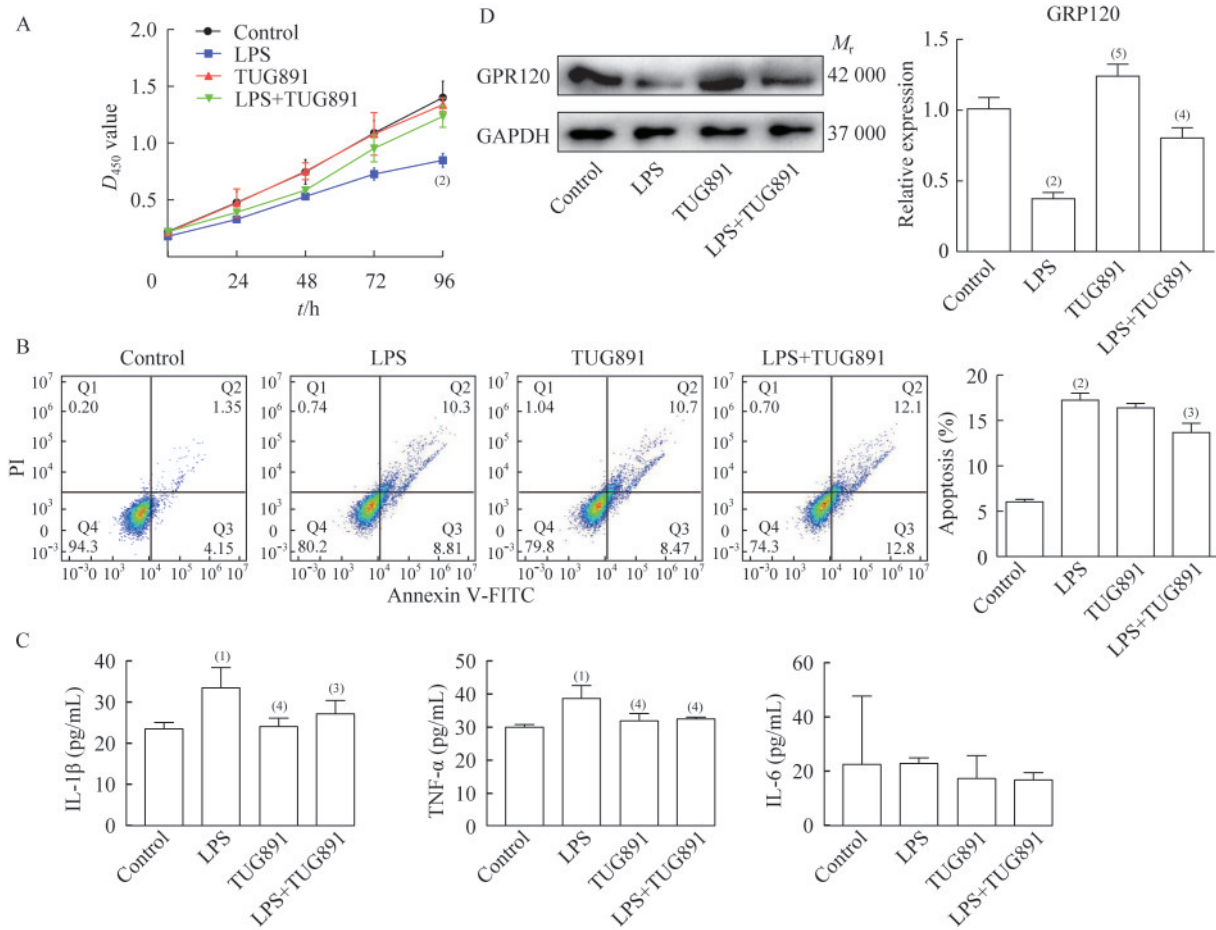
vs. control group, ⁽¹⁾ $P < 0.01$; vs. LPS group, ⁽²⁾ $P < 0.05$, ⁽³⁾ $P < 0.01$. All tests repeated 3 times.

图4 NLRP3炎症小体和细胞极化蛋白的表达

Fig 4 The expression of NLRP3 inflammasome and cell polarization protein

TUG891组炎症因子分泌有所减少(P 均 <0.05 ,图5C)。同时LPS可抑制细胞内GPR120蛋白表达,

给予TUG891后GPR120蛋白水平明显上调(图5D)。



A: Cell proliferation activity; B: The apoptosis level; C: The secreted inflammatory factor D: The *GPR120* gene expression level. vs. control group, ⁽¹⁾ $P<0.05$, ⁽²⁾ $P<0.001$; vs. LPS group, ⁽³⁾ $P<0.05$, ⁽⁴⁾ $P<0.01$, ⁽⁵⁾ $P<0.001$. All tests repeated 3 times.

图5 GPR120激活可抑制LPS诱导的Raw264.7细胞炎症及细胞死亡

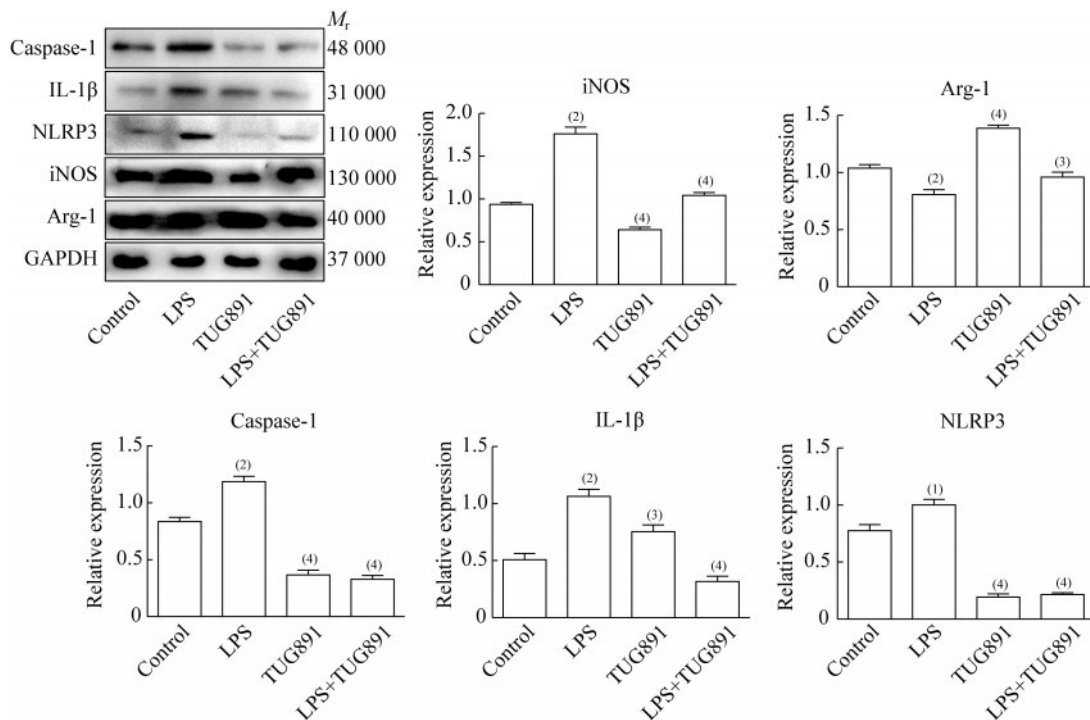
Fig 5 The *GPR120* activating could inhibit LPS-induced inflammation and cell death in Raw264.7 cells

进一步探讨其调控机制发现,LPS处理可显著上调Caspase-1、IL-1 β 和NLRP3的蛋白表达,细胞内NLRP3炎症小体被激活($P<0.001$)。同时LPS组iNOS蛋白水平升高($P<0.001$),Arg-1表达降低($P<0.001$),证明脓毒症组巨噬细胞促炎型M1极化增强,这些改变可导致细胞内炎症因子分泌增多、促进“炎症瀑布”产生,诱导细胞炎性坏死和凋亡;而通过重新增强*GPR120*基因表达,可逆转LPS对这些促炎型调控蛋白表达的激活作用(P 均 <0.05 ,图6)。

讨 论

脓毒症是宿主对感染异常的失调反应,其特点

是炎症、代谢、分解代谢及免疫抑制等多途径同时恶化,持续时间长且难以恢复基础稳态,导致危及生命的多器官功能障碍^[23]。随着老龄化发展,脓毒症的发病率在不断上升,对于合并多种代谢性基础疾病的患者,其内源性因素或伴随疾病可导致脓毒症更加严重^[24]。研究表明脓毒症是一种时间依赖性的综合征,早期识别和有效治疗可使患者明显获益^[25]。目前脓毒症的发展和靶点相关的机制尚不明确,本研究通过增强*GPR120*基因的表达,可一定程度阻断LPS引起的组织及细胞炎症因子失控性分泌,减轻脓毒症相关的组织炎症损伤及凋亡。*GPR120*基因作为调控代谢和免疫紊乱及炎症性疾病的新治疗靶标而备受关注^[26]。多项研究^[27-29]表明,*GPR120*基因可负向调控细胞炎症反



vs. control group, ⁽¹⁾ $P < 0.01$, ⁽²⁾ $P < 0.001$; vs. LPS group, ⁽³⁾ $P < 0.01$, ⁽⁴⁾ $P < 0.001$. All tests repeat 3 times.

图6 GPR120上调可抑制细胞内炎症小体激活及M1极化相关蛋白表达

Fig 6 The up-regulation of GPR120 could inhibit intracellular inflammasome activating and M1 polarization-related protein expression

应,有效减少组织炎症性损伤及细胞凋亡。在巨噬细胞中,GPR120基因可减弱由Toll样受体或TNF信号诱导的炎症反应,并促进M1型巨噬细胞向M2型转变,GPR120基因缺陷的巨噬细胞则失去这种调控反应^[30-31]。在CD4+T细胞中,GPR120上调可触发哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路激活,刺激抗炎细胞因子IL-10的产生^[28]。GPR120基因可通过糖酵解途径加强中性粒细胞对病原体的杀伤作用,增强肠道免疫防御能力。在肺组织中激活的GPR120基因可促进免疫损伤后的细胞存活和组织修复^[32],也可通过阻断支气管黏膜中肥大细胞及树突细胞的活化,改善小鼠哮喘症状^[33]。这些结果与本研究观察到的GPR120基因在脓毒症中的保护作用一致,提示GPR120对于炎症及免疫的负向调控及炎症后组织修复有重要价值。针对GPR120基因的靶向调控药物可从多维度调控脓毒症导致的过度炎症及免疫紊乱,发挥其强效的抗炎及促修复作用。然而由于GPR120基因调控范围广,非选择性的GPR120基因调控可能会抑制机体的免疫防御能力,深入研究GPR120在肺组织中的抗炎作用机制,对研发精准的靶向药物、减少药物毒副作用有重要指导价值。

炎症小体是细胞中一种多亚基蛋白复合物,在调控天然免疫和炎症相关疾病中起到重要作用^[21]。NLRP3炎症小体通过激活Caspase-1,可剪切IL-1β和IL-18的前体蛋白,生成具有生物活性的细胞因子IL-1β和IL-18等,参与到细胞内稳态维持和对外界刺激因素的防御过程中^[14,34]。炎症细胞因子如TNF-α及IL等,常以级联放大的方式释放增加,被称为细胞因子风暴^[1,3]。在脓毒症过程中,多种炎性因子的过度合成、释放,导致原位免疫细胞的进一步激活和原位器官的损伤^[24]。研究发现,NLRP3炎症小体在脓毒症发生发展中有动态而复杂的调控作用:早期感染后适度激活NLRP3炎症小体,可增强固有免疫,抵抗病原体入侵,产生预防脓毒症的作用;但过度的NLRP3炎症小体激活会诱发失调的炎症,其耗尽后的免疫抑制更促使了先天性和适应性免疫功能受损,加速脓毒症急性期的多器官衰竭和死亡^[35-37]。本研究证实,在临床脓毒症患者及LPS诱导的脓毒症模型中均有显著的NLRP3炎症小体激活、多量炎性细胞因子分泌及M1促炎型巨噬细胞增多,通过上调GPR120基因表达,可抑制组织及巨噬细胞的NLRP3炎症小体活化,同时降低促炎因子分泌,促进M2修复型巨噬细胞极化,

减轻炎症相关肺组织损伤。因此通过靶向NLRP3炎症小体阻断其过度激活引起的炎症风暴,可能是脓毒症治疗的潜在新方向。

GPR120配体口袋中存在的芳香族残基,特异性识别含有 ω -3双键的不饱和脂肪酸,激活的GPR120基因通过抑制NLRP3炎症小体激活以及Caspase-1和IL-1 β 分泌,改善NLRP3炎症性依赖性炎症和代谢紊乱^[38]。化合物TUG891是首个具有高选择性和活性的GPR120激动剂^[39-40]。本研究证实TUG891通过激活GPR120基因表达,发挥其抑制促炎介质释放的作用。TUG891也可减轻小鼠炎症性呼吸道疾病症状,促进肺功能修复^[41],然而TUG891是否在脓毒症中有肺保护作用目前还尚不清楚。本研究通过TUG891增强GPR120基因表达后,发现脓毒症模型中NLRP3炎症小体的激活被显著抑制,同时促进巨噬细胞从促炎型M1极化向修复型M2极化转变,进而控制肺组织内的炎症因子失控性分泌、减少细胞炎症损伤及凋亡,具有治疗脓毒症的潜能。

本研究发现GPR120基因在脓毒症诱导肺损伤中具有重要免疫调节作用,通过重新激活GPR120基因可抑制NLRP3炎症小体的过度活化,促进巨噬细胞由M1型转化为M2型,从而在脓毒症中发挥关键性抗炎作用,促进肺组织损伤恢复,为临床脓毒症治疗的药物转化提供新思路 and 靶点。

作者贡献声明 张凯 病例采集,论文构思和撰写,实验实施。黄一心,张自妍 论文修订和指导。宓林,余纳 数据收集,实验实施。保志军 论文修订。

利益冲突声明 保志军是本刊编委,未参与此文的同行评议和终审决策。没有其他利益冲突需要声明。

参 考 文 献

[1] SINGER M, DEUTSCHMAN CS, SEYMOUR CW, *et al.* The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3)[J].*JAMA*, 2016, 315(8): 801-810.
[2] IVANA SRŽIĆ, VIŠNJA NESEK ADAM, DARINKA TUNJIĆ PEJAK. Sepsis definition: what's new in the treatment guidelines[J].*Acta Clin Croat*, 2022, 61(Suppl 1): 67-72.

[3] SHANKAR-HARI M, PHILLIPS GS, LEVY ML, *et al.* Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3)[J].*JAMA*, 2016, 315(8): 775-787.
[4] KUMAR V. Pulmonary innate immune response determines the outcome of inflammation during pneumonia and sepsis-associated acute lung injury[J].*Front Immunol*, 2020, 11: 1722.
[5] MOKRÁ D. Acute lung injury-from pathophysiology to treatment[J].*Physiol Res*, 2020, 69(Suppl 3): S353-S366.
[6] SALOMÃO R, FERREIRA BL, SALOMÃO MC, *et al.* Sepsis: evolving concepts and challenges[J].*Braz J Med Biol Res*, 2019, 52(4): e8595.
[7] HUPPERT LA, MATTHAY MA, WARE LB. Pathogenesis of acute respiratory distress syndrome[J].*Semin Respir Crit Care Med*, 2019, 40(1): 31-39.
[8] ROQUILLY A, MCWILLIAM HEG, CEDRIC J, *et al.* Local modulation of antigen-presenting cell development after resolution of pneumonia induces long-term susceptibility to secondary infections[J].*Immunity*, 2017, 47(1): 135-147.e5.
[9] NEDEVA C. Inflammation and cell death of the innate and adaptive immune system during sepsis[J].*Biomolecules*, 2021, 11(7): 1011.
[10] SHI CS, SHENDEROV K, HUANG NN, *et al.* Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction[J].*Nat Immunol*, 2012, 13(3): 255-263.
[11] ESQUERDO KF, SHARMA NK, BRUNIALTI MKC, *et al.* Inflammasome gene profile is modulated in septic patients, with a greater magnitude in non-survivors[J].*Clin Exp Immunol*, 2017, 189(2): 232-240.
[12] LUO YP, JIANG L, KANG K, *et al.* Hemin inhibits NLRP3 inflammasome activation in sepsis-induced acute lung injury, involving heme oxygenase-1 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 20(1): 24-32.
[13] XU F, WANG F, WEN T, *et al.* Inhibition of NLRP3 inflammasome: a new protective mechanism of cinnamaldehyde in endotoxin poisoning of mice [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2017, 39(5): 296-304.
[14] WANG YC, LIU QX, ZHENG Q, *et al.* Dihydropyridin alleviates sepsis-induced acute lung injury through inhibiting nlrp3 inflammasome-dependent pyroptosis in mice model[J].*Inflammation*, 2019, 42(4): 1301-1310.
[15] VAN LIESHOUT MHP, DE VOS AF, DESSING MC, *et al.* ASC and NLRP3 impair host defense during lethal pneumonia caused by serotype 3 *Streptococcus pneumoniae* in mice[J].*Eur J Immunol*, 2018, 48(1): 66-79.
[16] FAN EKY, FAN J. Regulation of alveolar macrophage

- death in acute lung inflammation [J]. *Respir Res*, 2018, 19(1):50.
- [17] CHENG P, LI S, CHEN H. Macrophages in lung injury, repair, and fibrosis [J]. *Cells*, 2021, 10(2):436.
- [18] Chen X, *et al.* Macrophage polarization and its role in the pathogenesis of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome [J]. *Inflamm Res*, 2020, 69(9):883-895.
- [19] YAN Y, JIANG W, SPINETTI T, *et al.* Omega-3 fatty acids prevent inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome activation [J]. *Immunity*, 2013, 38(6):1154-1163.
- [20] ICHIMURA A, HIRASAWA A, POULAIN-GODEFROY O, *et al.* Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human [J]. *Nature*, 2012, 483(7389):350-354.
- [21] KELLEY N, JELTEMA D, DUAN Y, *et al.* The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13):3328.
- [22] WANG N, LU Y, ZHENG J, *et al.* Of mice and men: Laboratory murine models for recapitulating the immunosuppression of human sepsis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13:956448.
- [23] CAVAILLON JM, SINGER M, SKIRECKI T. Sepsis therapies: learning from 30 years of failure of translational research to propose new leads [J]. *EMBO Mol Med*, 2020, 12(4):e10128.
- [24] CAO M, WANG G, XIE J. Immune dysregulation in sepsis: experiences, lessons and perspectives [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1):465.
- [25] YE L, FENG M, LIN Q, *et al.* Analysis of pathogenic factors on the death rate of sepsis patients [J]. *PLoS One*, 2023, 18(12):e0287254.
- [26] KIMURA I, ICHIMURA A, OHUE-KITANO R, *et al.* Free fatty acid receptors in health and disease [J]. *Physiol Rev*, 2020, 100(1):171-210.
- [27] QIN ZJ, SONG JQ, LIN AL, *et al.* GPR120 modulates epileptic seizure and neuroinflammation mediated by NLRP3 inflammasome [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1):121.
- [28] DI PETRILLO A, KUMAR A, ONALI S, *et al.* GPR120/FFAR4: a potential new therapeutic target for inflammatory bowel disease [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2023, 29(12):1981-1989.
- [29] SILVA BATISTA EDA, NAKANDAKARI SCBR, SILVA ASRDA, *et al.* Omega-3 pleiad: the multipoint anti-inflammatory strategy [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2022, 64(14):4817-4832.
- [30] OH DY, TALUKDAR S, BAE EJ, *et al.* GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects [J]. *Cell*, 2010, 142(5):687-698.
- [31] YAMADA H, UMEMOTO T, KAKEI M, *et al.* Eicosapentaenoic acid shows anti-inflammatory effect via GPR120 in 3T3-L1 adipocytes and attenuates adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2017, 14:33.
- [32] SVEIVEN SN, ANESKO K, MORGAN J, *et al.* Lipid-sensing receptor FFAR4 modulates pulmonary epithelial homeostasis following immunogenic exposures independently of the FFAR4 ligand docosahexaenoic acid (DHA) [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(8):7072.
- [33] SON SE, KOH JM, IM DS. Activation of free fatty acid receptor 4 (FFA4) ameliorates ovalbumin-induced allergic asthma by suppressing activation of dendritic and mast cells in mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(9):5270.
- [34] MARCHETTI C, SWARTZWELTER B, GAMBONI F, *et al.* OLT1177, a β -sulfonyl nitrile compound, safe in humans, inhibits the NLRP3 inflammasome and reverses the metabolic cost of inflammation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(7):E1530-E1539.
- [35] YANG Q, ZHANG XJ, LUO L, *et al.* Clinical application of serum NLRP3 on the diagnosis and prognosis of sepsis patients complicated with acute respiratory distress syndrome [J]. *Front Immunol*, 2023, 14:1205132.
- [36] DANIELSKI LG, GIUSTINA AD, BONFANTE S, *et al.* The NLRP3 inflammasome and its role in sepsis development [J]. *Inflammation*, 2020, 43(1):24-31.
- [37] VIGNERON C, PY BF, MONNERET G, *et al.* The double sides of NLRP3 inflammasome activation in sepsis [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2023, 137(5):333-351.
- [38] MOORE K, ZHANG Q, MURGOLO N, *et al.* Cloning, expression, and pharmacological characterization of the GPR120 free fatty acid receptor from cynomolgus monkey: comparison with human GPR120 splice variants [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2009, 154(4):419-426.
- [39] HUDSON BD, SHIMPUKADE B, MILLIGAN G, *et al.* The molecular basis of ligand interaction at free fatty acid receptor 4 (FFA4/GPR120) [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(29):20345-20358.
- [40] SON SE, KIM NJ, IM DS. Development of free fatty acid receptor 4 (FFA4/GPR120) agonists in health science [J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2021, 29(1):22-30.
- [41] SU XL, LIU YG, SHI M, *et al.* The GPR120 agonist TUG-891 inhibits the motility and phagocytosis of mouse alveolar macrophages [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020:1706168.