

低氧环境下 NLRP3 信号通路促进非酒精性脂肪性肝炎小鼠的肝细胞焦亡

罗善玉¹, 朱强^{1,2}, 闫玉翡¹, 纪宗红¹, 邹华杰¹, 张瑞霞¹, 巴应贵³

青海大学附属医院¹内分泌科,³肾病科,青海 西宁 810000;²宜宾市第五人民医院内分泌科,四川 宜宾 644000

摘要:目的 探讨低氧环境下 NLRP3 信号通路在非酒精性脂肪性肝炎(NASH)肝细胞焦亡中的作用。方法 24只6周龄的雄性 C57BL/6 小鼠,随机分为低氧对照组(A组)、低氧 NASH 模型组(B组)、低氧 NASH 模型+NLRP3 抑制剂组(C组)、低氧 NASH 模型+Caspase-1 抑制剂组(D组),6只/组。小鼠在模拟海拔 5000 m 的低压氧舱中饲养6周。A组小鼠喂食基础饲料,B、C、D组小鼠喂食蛋氨酸胆碱缺乏(MCD)饲料,其中C、D组小鼠分别每隔1d腹腔注射 NLRP3 抑制剂(20 mg/kg)、Caspase-1 抑制剂(25 mg/kg)。实验终点时处死小鼠,收集小鼠血清和肝脏组织,检测小鼠血清空腹血糖(FBG)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)水平;HE染色、Masoon染色及透射电镜观察小鼠肝脏组织病理变化;ELISA法检测小鼠血清 IL-1 β 、IL-18水平;免疫组化和 Western blotting 法检测小鼠肝脏组织 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、消皮素D(GSDMD)蛋白表达水平。结果 与A组相比,B组小鼠血清 FBG、TC、TG、ALT、AST水平均增加($P<0.05$);肝脏脂质含量、炎性细胞浸润及胶原纤维沉积均增加;肝脏组织 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、GSDMD 蛋白表达水平均增加($P<0.05$);肝组织线粒体肿胀严重,嵴断裂,基质局部溶解、空泡化,部分线粒体外膜破裂,胞浆中可见部分核糖体丢失,核膜模糊,部分粗面内质网扩张成囊状。与B组相比,C、D组小鼠血清 TC、TG、ALT、AST水平明显降低($P<0.05$),FBG差异无统计学意义($P>0.05$);肝脏脂质含量、炎性细胞浸润及胶原纤维沉积均显著减少;肝脏组织 NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 蛋白表达水平均降低($P<0.05$);肝组织线粒体肿胀、嵴断裂、空泡化程度减轻,部分线粒体外膜破裂,胞浆中可见部分核糖体丢失,粗面内质网形态结构正常。结论 低氧环境下,NLRP3 信号通路在促进 NASH 肝细胞焦亡中起关键作用,而通过抑制该通路可以有效减轻肝脏炎症,为 NASH 的治疗提供了潜在的治疗靶点。

关键词:低氧;非酒精性脂肪性肝炎;肝细胞焦亡;NLRP3 炎症通路

NLRP3 signaling pathway promotes hepatocyte pyroptosis in mice with nonalcoholic steatohepatitis in hypoxic environment

LUO Shanyu¹, ZHU Qiang^{1,2}, YAN Yufei¹, JI Zonghong¹, ZOU Huajie¹, ZHANG Ruixia¹, BA Yinggui³

¹Department of Endocrinology, ³Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810000, China; ²Department of Endocrinology, Yibin Fifth People's Hospital, Yibin 644000, China

Abstract: Objective To investigate the regulatory role of the NLRP3 signaling pathway in hepatocyte pyroptosis in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) under hypoxia. **Methods** Twenty-four male C57BL/6 mice were randomized equally into hypoxic control (A), hypoxic NASH model (B), hypoxic NASH+NLRP3 inhibitor (C), and hypoxic NASH+caspase-1 inhibitor (D) groups. In groups B-D, the mice were fed a methionine choline-deficient (MCD) diet under hypoxic conditions (to simulate a 5000 m altitude) for 6 weeks; the mice in groups C and D received intraperitoneal injections of the respective inhibitors every other day. **Results** Compared with those in group A, the mice in group B showed significantly elevated serum levels of FBG, TC, TG, ALT and AST, increased liver lipid content, inflammatory cell infiltration and collagen fiber deposition, and enhanced hepatic expressions of NLRP3, caspase-1, IL-1 β and GSDMD proteins, with obvious swelling, cristae breakage, vacuolization, and outer membrane disruption of the mitochondria, ribosome loss in the cytoplasm, destruction of the nuclear membrane, and pathological changes of the rough endoplasmic reticulum. Treatment with NLRP3 inhibitor and caspase-1 inhibitor both significantly lowered serum levels of TC, TG, ALT and AST (but without significantly affecting FBG) in the mouse models, and reduced liver lipid content, inflammatory cell infiltration, collagen deposition, and expression levels of NLRP3, caspase-1, GSDMD and IL-1 β . The treatments also significantly improved pathological changes in the mitochondria, ribosomes and endoplasmic reticulum in liver tissues of the mice. **Conclusion** NLRP3 signaling pathway plays a key role in promoting hepatocyte pyroptosis in NASH mice under hypoxic condition, and inhibiting this pathway can effectively reduce liver inflammation, suggesting its potential as a therapeutic target for NASH treatment.

Keywords: hypoxia; nonalcoholic steatohepatitis; hepatocyte pyroptosis; NLRP3 inflammatory pathway

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是一种由于胰岛素

抵抗、遗传易感性等因素引起的慢性肝脏损伤性疾病,可进展为非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、肝硬化甚至肝癌^[1,2]。随着全球 NAFLD 发病率的上升,已成为公共卫生的重大挑战^[3,4]。核苷酸结合寡聚化结构域样受体3(NLRP3)炎症小体在 NASH 的发展中扮演着关键角色^[5-7],其激活可触发由消皮素D(GSDMD)介导的细胞

收稿日期:2024-11-11

基金项目:青海省科技计划项目(2022-ZJ-763)

作者简介:罗善玉,在读硕士研究生,E-mail: luoshanyu9805@163.com

通信作者:张瑞霞,主任医师,博士生导师,E-mail: qhzrx@126.com;

巴应贵,主任医师,硕士生导师,E-mail: bayinggui@163.com

焦亡,这一过程可通过炎症小体激活 Caspase-1 的经典途径或脂多糖(LPS)激活 Caspase-4/5/11 的非经典途径实现^[8-10]。

研究发现,在 NASH 患者和小鼠模型中,NLRP3 表达显著上调,伴随 Caspase-1 和 IL-1 β 水平升高^[11]。NLRP3 基因缺陷的小鼠可避免肝损伤和纤维化,而 NLRP3 基因敲入的小鼠则出现严重肝脏炎症和早期肝硬化^[12]。研究表明,抑制 Caspase-1、GSDMD 的激活或阻断 NLRP3 可减轻肝脏炎症和纤维化^[10]。此外,某些中药制剂通过抑制 NLRP3 通路改善 NASH 和肝纤维化^[13,14]。尽管 NLRP3 炎症通路在 NASH 中的重要性已得到确认,但低氧对 NASH 的影响研究不足。肝脏对低氧极为敏感,低氧可能导致肝脏微循环障碍,引发肝细胞损伤和脂肪变性。在严重低氧下细胞内结构如线粒体受损,触发肝细胞程序性死亡^[15,16]。目前,关于低氧对 NASH 影响的研究有限,特别是低氧环境下 NLRP3 炎症通路与肝细胞焦亡的关系及机制尚不明确^[17,18]。本研究旨在探讨低氧环境下 NLRP3 炎症通路对肝细胞焦亡的影响及其机制,为 NASH 治疗提供新思路,并揭示低氧在 NASH 发病中的作用,为防治策略提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物与分组 24 只 6 周龄 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠,购自江苏华创信诺医药科技有限公司,实验动物许可证号:SCXK(苏)2020-0009。小鼠饲养于青海大学高原医学中心实验室,适应性饲养 1 周后随机分为低氧对照组(A 组)、低氧 NASH 模型组(B 组)、低氧 NASH 模型+NLRP3 抑制剂组(C 组)、低氧 NASH 模型+Caspase-1 抑制剂组(D 组),6 只/组。本研究经青海大学附属医院伦理委员会批准(伦理批号:P-SL-2023-275)。

1.1.2 主要试剂 NLRP3 抑制剂、Caspase-1 抑制剂(MCE);NLRP3、Caspase-1、GSDMD 兔一抗、HRP-羊抗兔二抗、BCA 蛋白定量试剂盒(proteintech);羊抗鼠二抗、IL-1 β 、IL-18 ELISA 试剂盒(Elabscience)。

1.1.3 主要实验仪器 包埋机(常州郊区中威电子仪器厂);显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司);刀片(日本羽毛安全剃刀株式会社);脱水机(常州市中威电子仪器有限公司);离心机(北京大龙兴创实验仪器公司);酶标仪(德国 TECAN 公司);透射电子显微镜(日本电子 JEOL);干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);电泳仪、转膜仪(Bio-rad);低压氧舱(中航风雷);转轮式切片机(德国徕卡公司)。

1.2 研究方法

1.2.1 造模及取材 小鼠于低压氧舱(海拔 5000 m,温度 22~25 °C,相对湿度 60%±10% 饲养 6 周,保持 12 h 昼夜交替,自由进食和饮水。A 组小鼠予以基础饲料(北京

科澳协力饲料公司)饲养,B、C、D 组小鼠予以蛋氨酸胆碱缺乏(北京科澳协力饲料公司,MCD)饲料饲养,其中 C、D 组小鼠分别每隔 1 d 腹腔注射 NLRP3 抑制剂(20 mg/kg)、Caspase-1 抑制剂(25 mg/kg)。实验终点时麻醉后摘取眼球取血,离心(4 °C、3000 r/min、15 min),收集血清于-80 °C 冰箱留置待用。颈椎脱臼处死小鼠,剪开小鼠腹部暴露腹腔取出肝脏组织,分别留取石蜡包埋组织样本,剩余部分迅速液氮冷冻后转入-80 °C 冰箱待用。

1.2.2 生化指标检测 采用全自动生化分析仪测定血清 FBG、TC、TG、ALT 和 AST 水平。

1.2.3 ELISA 法 按照说明书操作,向 96 孔板中加入标准品和样品(50 μ L/孔),37 °C 恒温箱中孵育 2 h,PBS-T 洗液(pH 7.4)清洗 ELISA 板 3 次,加入生物素标记抗体(50 μ L/孔),37 °C 的恒温箱再次孵育 1 h,清洗 3 次后,添加底物溶液(100 μ L/孔)、避光孵育 15~30 min,添加终止溶液(50 μ L/孔)终止显色反应,采用酶标仪进行精确测定吸光度 $A_{450\text{nm}}$ 值。通过计算得出样本中 IL-1 β 、IL-18 的确切浓度值。

1.2.4 HE 染色 组织经 4% 多聚甲醛固定 24 h,常规脱水透明(75%、85%、95%、无水乙醇各 1 h,二甲苯 I、II 各 15 min),浸蜡包埋,切片(4 μ m 厚)与贴片,二甲苯脱蜡(I、II 各 10 min),梯度乙醇水化(100%、95%、85%、75% 乙醇各 5 min),苏木精染色(5 min),1% 盐酸酒精分化(5 s),伊红染色(3 min),二甲苯(I、II 各 5 min)、梯度乙醇(100%、95%、85%、75% 各 3 min)脱水,切片晾干,中性树胶封片,光学显微镜镜检,图像采集分析。

1.2.5 Masson 染色 组织切片脱蜡至水,1% 重铬酸钾溶液 37 °C 过夜孵育,切片置 60 °C 烘箱加热 30 min,Weigert 铁苏木精染色 10 min,0.2% 盐酸酒精分化 5 s,丽春红品红染色 10 min,磷钼酸溶液褪色 5 min,苯胺蓝染色 5 min,1% 醋酸分化 1 min,梯度酒精脱水(95%、无水乙醇各 2 min),二甲苯透明(I、II 各 5 min),中性树胶封片并在光学显微镜下观察。

1.2.6 免疫组织化学染色 组织切片(4 μ m 厚)经二甲苯脱蜡(I、II 各 10 min)水化(100%、95%、85%、75% 乙醇各 5 min),柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)抗原修复(95 °C,15 min),3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶(室温,10 min),5% BSA 封闭非特异性结合(室温,30 min),加入一抗(NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、GSDMD,稀释比例=1:100)孵育(4 °C 过夜),加入 HRP 标记二抗(稀释比例=1:100)孵育(37 °C,30 min),二氨基苯联胺(DAB)显色(室温,3~5 min),苏木素复染(3 min),梯度乙醇(75%、85%、95%、100% 各 3 min)、二甲苯(I、II 各 5 min)脱水,中性树胶封片,光学显微镜下观察切片,Image J 软件分析,得出结果。

1.2.7 Western blotting 检测 组织称质量后加 RIPA 裂解液(组织:RIPA 裂解液=1:10)充分裂解(冰上 30 min),

离心(10 min, 4 °C, 12 000 r/min),提取上清,BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,加入5×Loading Buffer(蛋白:Loading Buffer=4:1),水浴变性(100 °C, 10 min),制胶(分离胶10%,浓缩胶5%),上样(20 μg/孔),电泳(浓缩胶:80 V, 20 min,分离胶:110 V至bromophenol blue至胶底部),转膜(PVDF膜, 200 mA, 90 min),5%脱脂奶粉封闭(室温, 60 min),加入一抗(NLRP3、IL-1β稀释比例=1:1000; Caspase-1、GSDMD稀释比例=1:5000)孵育(4 °C, 过夜),TBST洗涤(3次, 10 min/次),加入HRP标记二抗(稀释比例=1:10 000)孵育(室温, 1 h),TBST洗涤(3次, 10 min/次),加入ECL发光液显影,Image J软件定量分析,得出结果。

1.2.8 透射电镜 肝组织样品切取1 mm³大小,经3%戊二醛预固定(4 °C, 2 h),PBS洗涤3次,1%四氧化锇二次固定(4 °C, 2 h),PBS洗涤3次,梯度丙酮脱水(30%、50%、70%、80%、90%、100%各15 min),纯丙酮与Epon

812包埋剂(1:1)渗透(室温, 1 h),纯包埋剂包埋(37 °C, 12 h; 45 °C, 12 h; 60 °C, 48 h),超薄切片机切片(70 nm厚),醋酸铀染色(20 min)、柠檬酸铅染色(10 min),透射电镜下观察拍照。

1.3 统计学分析

采用SPSS 25.0统计软件进行数据分析,符合正态分布的计量资料采用均数±标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析,事后两两比较采用LSD检验, P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠生化指标

与A组小鼠相比,B组小鼠FBG、TC、TG、ALT、AST水平均有不同程度的升高(P<0.05)。与B组小鼠相比,C、D组小鼠TC、TG、ALT、AST水平均有不同程度的降低(P<0.05),FBG无明显变化(P>0.05,表1)。

表1 各组小鼠生化指标水平

Tab.1 Levels of biochemical indicators of the mice from each group (Mean±SD)

Indicator	Group A	Group B	Group C	Group D	F	P
FBG (mmol/L)	4.33±0.99	16.57±2.41*	14.98±2.40	15.70±2.22	45.37	<0.001
TC (mmol/L)	1.15±0.30	2.43±0.65*	1.76±0.26 [#]	1.78±0.71 [#]	6.02	0.004
TG (mmol/L)	0.59±0.06	2.42±0.36*	1.83±0.22 [#]	1.64±0.27 [#]	54.57	<0.001
AST (U/L)	141.50±21.22	241.90±31.35*	193.32±12.09 [#]	201.98±12.54 [#]	23.56	<0.001
ALT (U/L)	33.77±5.08	52.37±7.74*	39.60±7.77 [#]	42.82±7.57 [#]	7.15	0.002

FBG:Fasting blood glucose;TC: Total cholesterol;TG:Triglycerides; AST:Aspartate aminotransferase; ALT: Alanine aminotransferase.

*P<0.05 vs Group A, [#]P<0.05 vs Group B.

2.2 小鼠血清L-1β、IL-18水平

与A组小鼠相比,B组小鼠IL-1β、IL-18水平均有

不同程度的升高(P<0.05)。与B组小鼠相比,C、D组小鼠IL-1β、IL-18水平均有不同程度的降低(P<0.05,表2)。

表2 各组小鼠血清L-1β、IL-18水平

Tab.2 Serum levels of L-1β and IL-18 of the mice from each group (Mean±SD, pg/mL)

Groups	IL-1β	IL-18
Group A	21.66±6.67	43.99±11.79
Group B	48.31±11.65*	168.48±28.93*
Group C	36.84±6.53 [#]	92.21±15.47 [#]
Group D	32.56±8.26 [#]	97.02±19.98 [#]
F	10.01	39.13
P	<0.001	<0.001

*P<0.05 vs Group A, [#]P<0.05 vs Group B.

2.3 小鼠肝组织HE染色

A组小鼠的肝脏组织结构较为清晰,仅观察到少量脂肪空泡,未观察到炎症细胞的浸润现象;B组小鼠的肝脏组织结构出现紊乱,脂质沉积区域扩大,脂肪空泡

数量增多,细胞浆呈现疏松化,伴少量气球样变性及炎症细胞的浸润;C组和D组小鼠的肝脏组织结构相对清晰,细胞浆的疏松化、气球样变性以及炎症细胞的浸润程度均有显著减轻,且仅见到少量的脂肪空泡(图1)。

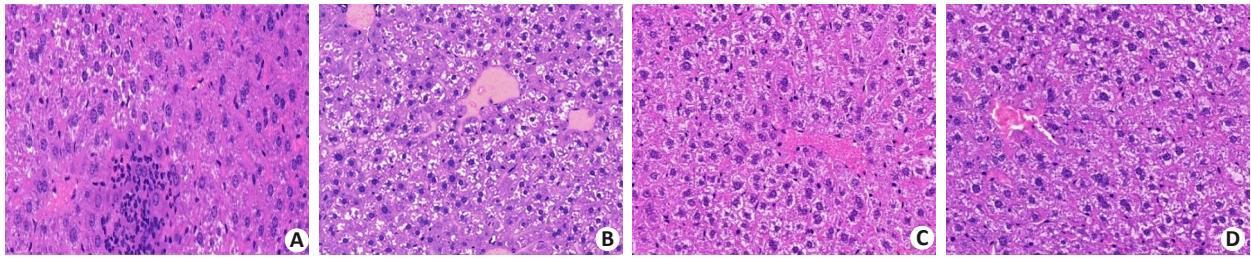


图1 各组小鼠肝组织HE染色结果

Fig.1 HE staining of the liver tissues in each group (Original magnification: $\times 400$).

2.4 小鼠肝组织Masson染色

A组小鼠肝组织几乎不可见蓝色胶原纤维沉积;B组小鼠肝组织可见明显增多的蓝色胶原纤维沉积,提示

有肝纤维化的存在;C组、D组的蓝色胶原纤维沉积减少(图2)。

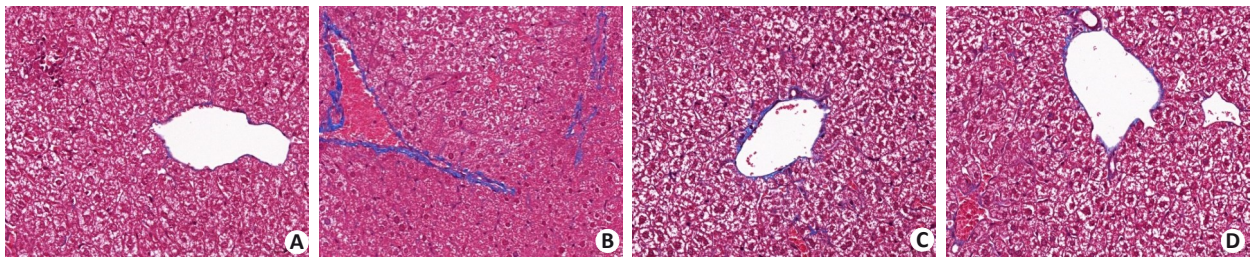


图2 各组小鼠肝组织Masson染色结果

Fig.2 Masson staining of the liver tissue in each group ($\times 400$).

2.5 小鼠肝组织相关蛋白表达水平

与A组小鼠相比,B组小鼠肝脏组织中NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、GSDMD蛋白表达水平明显增加($P < 0.05$);与B组小鼠相比,C组、D组小鼠肝脏组织中NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 蛋白表达水平降低($P < 0.05$,图3~6)。

2.6 小鼠肝组织透射电镜

A组小鼠肝组织线粒体肿胀,嵴结构不清晰,粗面内质网形态结构未见明显异常;B组小鼠肝组织线粒体肿胀严重,嵴断裂,基质局部溶解、空泡化,部分线粒体外膜破裂,胞浆中可见部分核糖体丢失,核膜模糊,部分粗面内质网(RER)扩张成囊状;C组、D组小鼠肝组织,线粒体肿胀、嵴断裂、空泡化程度减轻,部分线粒体外膜破裂,胞浆中可见部分核糖体丢失,粗面内质网形态结构正常(RER,图7)。

3 讨论

NASH全球发病率不断上升,尤其在肥胖和代谢综合征高发地区^[19-21]。其病理进展涉及胰岛素抵抗、氧化应激、炎症反应、细胞焦亡等多种因素,尤以炎症反应和细胞焦亡为关键环节。细胞焦亡主要通过NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 信号通路实现,NLRP3炎症小体的激活与IL-1 β 的成熟释放是此过程的关键步骤^[22,23]。既往研究表明,NLRP3炎症小体在NASH小鼠肝脏中的激

活与肝损伤和脂质代谢异常密切相关^[24]。在NASH小鼠模型中,该通路蛋白的表达显著升高^[11]。使用NLRP3特异性抑制剂MCC950和Caspase-1抑制剂可有效减轻肝损伤^[25-27],表明NASH发病与该信号通路激活密切相关。

低氧环境对肝脏的损害涉及多个方面,包括细胞凋亡、炎症反应、氧化应激和代谢紊乱^[28]。研究显示,低氧可通过TNF- α /caspase-8/caspase-3通路致肝损伤^[29],HIF-2 α 过表达损伤线粒体功能,促进脂肪变性^[30,31],表明低氧环境在肝损伤中发挥重要作用。基于此,本研究提出假设:低氧可能通过激活NLRP3信号通路诱导肝细胞焦亡,从而加剧NASH的病理损害。本研究结果显示,低氧NASH模型组小鼠的AST和ALT水平明显升高,表明存在明显肝功能损伤。这与先前的研究一致^[15]。值得注意的是,给予NLRP3抑制剂或Caspase-1抑制剂后,肝功能指标明显改善,证实了NLRP3信号通路在低氧NASH中的关键作用,这与Henao-Mejia J等在常氧环境中的发现相符^[32]。进一步比较发现,低氧NASH模型组TC、TG、FBG水平均显著升高,表明存在明显的糖脂代谢异常,与既往研究结果一致^[33]。抑制剂干预后TC、TG水平明显降低,表明抑制NLRP3信号通路对NASH的脂质代谢紊乱具有明显的改善作用。然而,尽管有研究报道NLRP3抑制剂可改善胰岛素抵抗^[34],但本研究FBG水平在抑制剂干预后无显著变化,

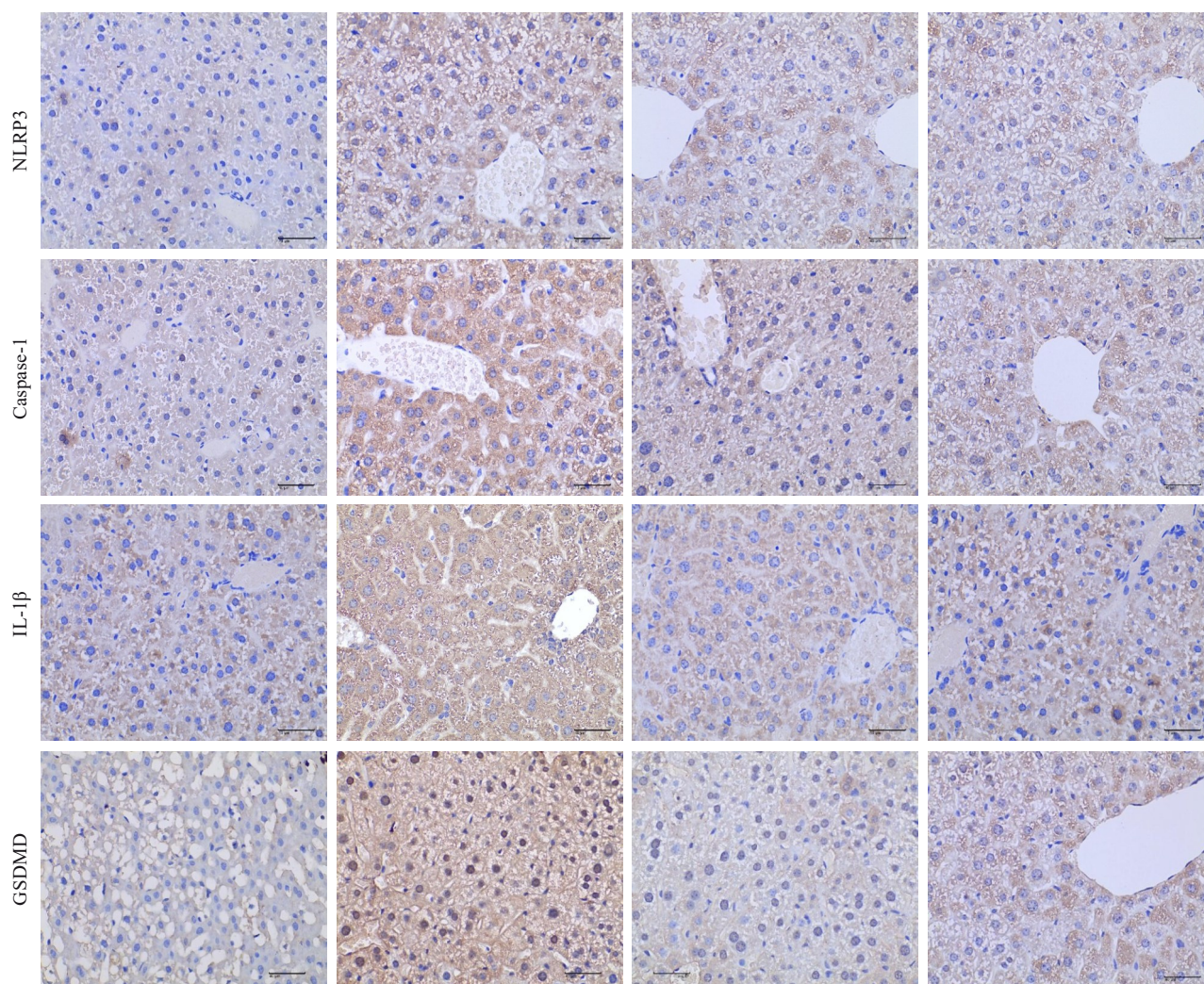


图3 各组小鼠肝组织免疫组化染色结果
Fig.3 Masson staining of the liver tissue in each group (×400).

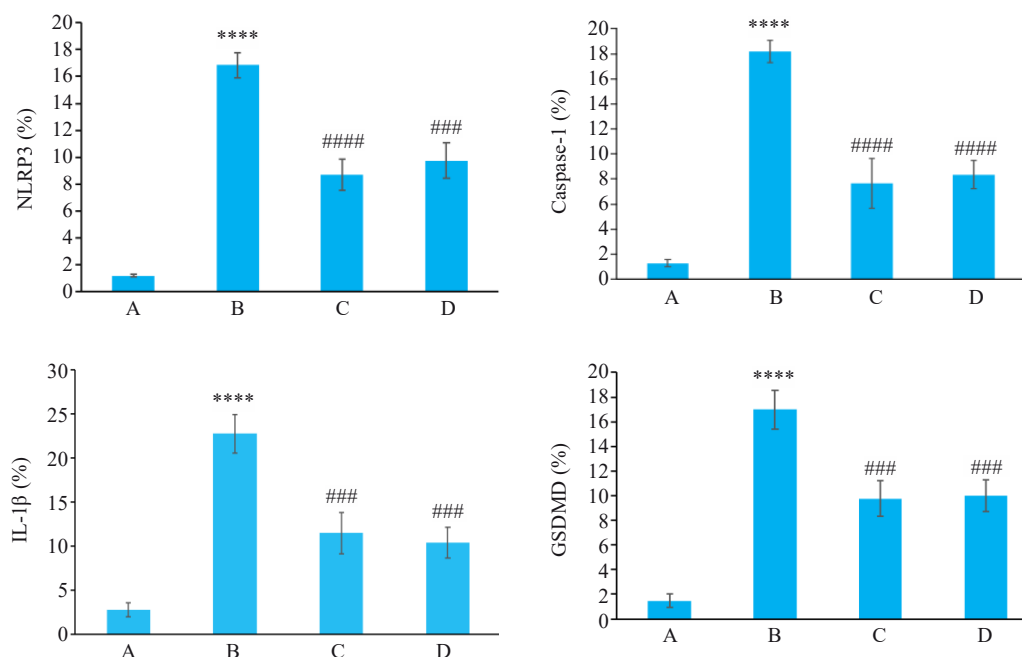


图4 各组小鼠肝组织NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1β阳性表达面积
Fig.4 Comparison of relative expression levels of NLRP3, caspase-1, GSDMD, and IL-1β in the liver tissues among the groups. **** $P < 0.0001$ vs Group A, #### $P < 0.0001$ vs Group B, ### $P < 0.001$ vs Group B.

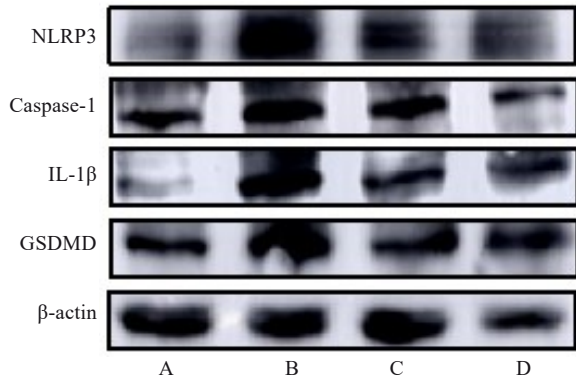


图5 各组小鼠肝组织蛋白免疫印迹条带图
Fig. 5 Protein bands in Western blotting in each group.

这可能与低氧环境下HIF-1 α 持续激活糖异生通路有关^[35]。具体而言,在低氧环境下,HIF-1 α 作为关键信号媒介,上调葡萄糖转运体(GLUT1)表达并促进糖酵解酶活性,增强肝脏糖异生功能,维持血糖稳定。同时,低

氧可能导致肝细胞胰岛素抵抗,使肝脏糖异生更为活跃^[36]。因此,即使抑制NLRP3信号通路,低氧环境的持续影响仍可能维持较高的FBG水平。这种低氧特异性的代谢调控机制使血糖调节更为复杂,也为未来研究提供了新方向。本研究检测了炎症因子水平,结果显示低氧NASH模型中IL-1 β 和IL-18含量明显升高,抑制剂干预后显著下降。蛋白表达分析进一步证实,低氧NASH模型中NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 及GSDMD表达显著上调,抑制剂干预后明显下降。这些结果与既往NLRP3炎症小体研究发现一致^[37],证实了低氧环境下NLRP3介导的炎症通路被激活,并诱导肝细胞焦亡。肝细胞超微结构的病理改变与氧化应激和能量代谢障碍直接相关。透射电镜观察发现,低氧NASH模型组肝细胞线粒体肿胀严重,嵴断裂,基质局部溶解,部分线粒体外膜破裂,部分粗面内质网扩张成囊状,胞浆中可见部分核糖体丢失等超微结构损伤,提示存在严重的氧化应激和能量障碍。结合GSDMD焦亡蛋白表达上调,表

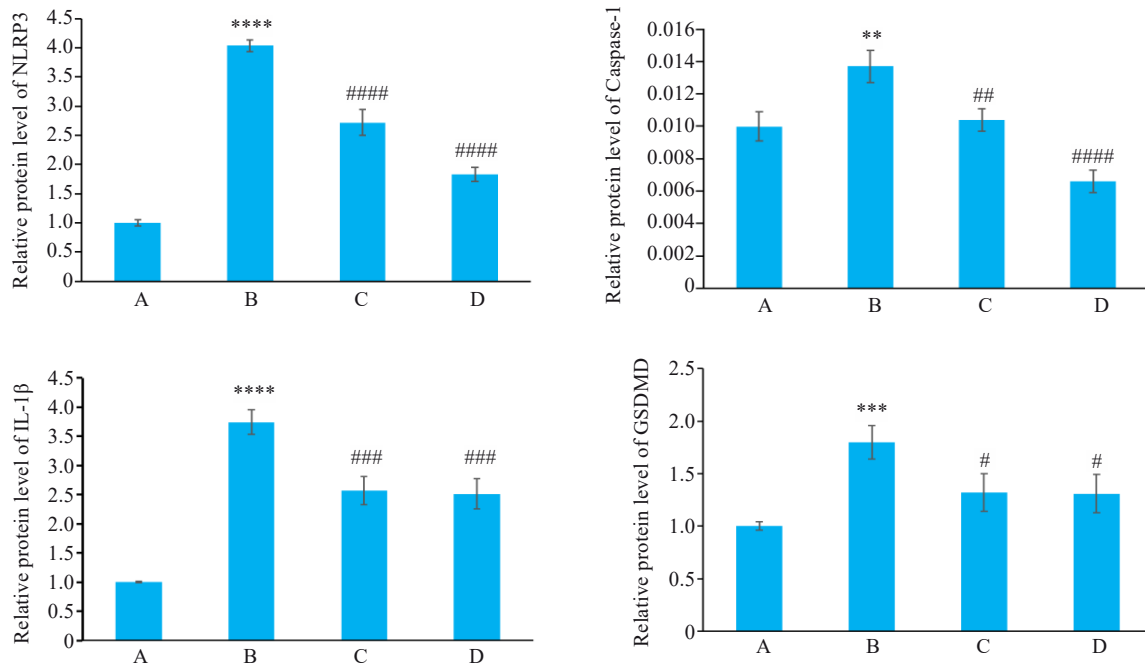


图6 各组小鼠NLRP3、caspase-1、GSDMD、IL-1 β 蛋白表达结果
Fig. 6 Relative protein expression levels of NLRP3, caspase-, GSDMD, and IL-1 β in each group. **** $P < 0.0001$ vs Group A, *** $P < 0.001$ vs Group A, ** $P < 0.01$ vs Group A, **** $P < 0.0001$ vs Group B, *** $P < 0.001$ vs Group B, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs Group B.

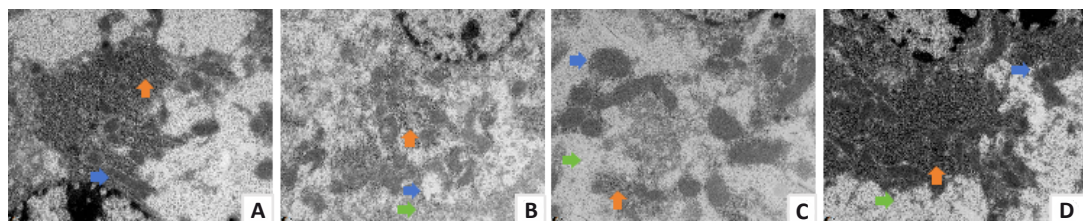


图7 各组小鼠肝组织透射电镜结果
Fig. 7 Transmission electron microscopy of the liver tissue in each group. \uparrow : Rough endoplasmic reticulum (RER); \uparrow : Mitochondria; \uparrow : Vacuolization ($\times 25\ 000$).

明细胞处于严重应激状态,可能发生了焦亡。抑制剂干预后,这些超微结构损伤明显减轻。总的来说,本研究首次在低氧NASH模型中验证了NLRP3炎症小体-焦亡轴的核心作用,其与常规NASH模型的相似性支持该通路作为普适性治疗靶点的潜力,而低氧特异性调控机制的发现则为高原地区或慢性缺氧患者的精准干预提供了新思路。未来研究需进一步解析低氧与NLRP3激活的分子互作网络,并探索联合靶向炎症小体与线粒体保护的治疗策略。

综上所述,本研究发现,在低氧环境下,NASH模型小鼠展现出生化指标、血清中炎症因子水平的显著升高,同时伴随细胞焦亡现象及线粒体损伤。应用NLRP3及Caspase-1特异性抑制剂后,生化指标下降,病理损伤明显改善。这些发现表明,低氧环境通过激活NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 信号轴触发肝细胞焦亡,加重肝细胞损伤。此研究揭示了NLRP3信号通路在低氧诱发的代谢紊乱及肝脏病理进展中的重要作用,为理解NASH病理机制提供新视角,并将该信号通路确立为潜在治疗靶点,对开发针对低氧环境下NASH的治疗策略具有重要指导意义。虽然本研究已阐明NLRP3信号通路的关键作用,但低氧条件下NASH复杂病理网络的精确调控机制仍需深入探索,未来研究有望发掘更多参与此病理过程的信号通路,为NASH治疗开辟新策略。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] Rinella ME, Neuschwander-Tetri BA, Siddiqui MS, et al. AASLD Practice Guidance on the clinical assessment and management of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Hepatology*, 2023, 77(5): 1797-835.
- [2] 范建高,徐小元,南月敏,等.代谢相关(非酒精性)脂肪性肝病防治指南(2024年版)[J]. *实用肝脏病杂志*, 2024, 27(4): 494-510.
- [3] Riazi K, Azhari H, Charette JH, et al. The prevalence and incidence of NAFLD worldwide: a systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2022, 7(9): 851-61.
- [4] 吴挺丰,廖献花,钟碧慧.中国部分地区非酒精性脂肪肝病的流行情况[J]. *临床肝胆病杂志*, 2020, 36(6): 1370-3.
- [5] Dick MS, Sborgi L, Rühl S, et al. ASC filament formation serves as a signal amplification mechanism for inflammasomes[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11929.
- [6] Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling[J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16(7): 407-20.
- [7] Wei Q, Zhu R, Zhu J, et al. E2-induced activation of the NLRP3 inflammasome triggers pyroptosis and inhibits autophagy in HCC cells[J]. *Oncol Res*, 2019, 27(7): 827-34.
- [8] Yu P, Zhang X, Liu N, et al. Pyroptosis: mechanisms and diseases[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 128.
- [9] 张文杰,孙迪阳,王培.炎症小体介导的细胞焦亡在非酒精性脂肪肝病中的作用及机制[J]. *药实践杂志*, 2020, 38(1): 9-13, 41.
- [10] Gaul S, Leszczynska A, Alegre F, et al. Hepatocyte pyroptosis and release of inflammasome particles induce stellate cell activation and liver fibrosis[J]. *J Hepatol*, 2021, 74(1): 156-67.
- [11] Knorr J, Wree A, Tacke F, et al. The NLRP3 inflammasome in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Semin Liver Dis*, 2020, 40(3): 298-306.
- [12] Wree A, McGeough MD, Peña CA, et al. NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD[J]. *J Mol Med*, 2014, 92(10): 1069-82.
- [13] Yong QH, Huang CY, Chen BN, et al. Gentiopicroside improves NASH and liver fibrosis by suppressing TLR4 and NLRP3 signaling pathways[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 177: 116952.
- [14] Lin YP, Fang QL, Fu SN, et al. The alleviating effect of *Scutellaria amoena* extract on the regulation of gut microbiota and its metabolites in NASH rats by inhibiting the NLRP3/ASC/caspase-1 axis[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1143785.
- [15] 蔡浩.慢性低氧对小鼠非酒精性脂肪性肝病的调控机制研究[D].西宁:青海大学,2021.
- [16] 颜然然,沈利娟,林凯歌,等.非酒精性脂肪性肝病进程中低氧的作用及其机制研究进展[J]. *生理科学进展*, 2024, 55(2): 171-8.
- [17] Elisabetta M, Salvatore S, Beatrice F, et al. Hypoxia-inducible factor 2 α drives nonalcoholic fatty liver progression by triggering hepatocyte release of histidine-rich glycoprotein[J]. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 2018, 67(6): 2196-214.
- [18] Cui Y, Guo C, Xia Z, et al. Exploring the therapeutic potential of a nano micelle containing a carbon monoxide-releasing molecule for metabolic-associated fatty liver disease by modulating hypoxia-inducible factor-1 α [J]. *Acta Biomater*, 2023, 169:500-16.
- [19] Xu P, Liu M, Liu M, et al. Management of non-alcoholic fatty liver disease-associated hepatocellular carcinoma[J]. *Biosci Trends*, 2024, 18(5): 431-43.
- [20] Lu F, Liu J, She B, et al. Global trends and inequalities of liver complications related to metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease: an analysis from 1990 to 2021[J]. *Liver Int*, 2025, 45(4): e16120.
- [21] Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(1): 11-20.
- [22] 周青丽,许真源,张素妍,等.NOD样受体蛋白3炎症小体在非酒精性脂肪性肝炎中的作用[J]. *临床肝胆病杂志*, 2019, 35(6): 1380-3.
- [23] 张议文,张凯悦,李盼盼,等.NLRP3炎症小体在慢性肝病及肝损伤中的研究进展[J]. *生命科学*, 2023, 35(5): 618-28.
- [24] 陈聪杰.NLRP3炎症小体介导的非酒精性脂肪性肝炎小鼠肝损伤和脂质代谢的实验研究[D].福州:福建医科大学,2021.
- [25] Feng Y, Li W, Wang Z, et al. The p-STAT3/ANXA2 axis promotes caspase-1-mediated hepatocyte pyroptosis in non-alcoholic steatohepatitis[J]. *J Transl Med*, 2022, 20(1): 497.
- [26] Wang L, Hauenstein AV. The NLRP3 inflammasome: Mechanism of action, role in disease and therapies[J]. *Mol Aspects Med*, 2020, 76: 100889.
- [27] Calcagno DM, Chu A, Gaul S, et al. NOD-like receptor protein 3 activation causes spontaneous inflammation and fibrosis that mimics human NASH[J]. *Hepatology*, 2022, 76(3): 727-41.
- [28] Mesarwi OA, Loomba R, Malhotra A. Obstructive sleep apnea,

- hypoxia, and nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 199(7): 830-41.
- [29] 张子昂, 董倩, 官瑞丽, 等. 盐酸小檗碱通过抑制 TNF- α /caspase-8/caspase-3 信号通路减轻急性低氧暴露引起的肝损伤[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2022, 38(1): 48-53.
- [30] Chen J, Chen J, Fu H, et al. Hypoxia exacerbates nonalcoholic fatty liver disease *via* the HIF-2 α /PPAR α pathway[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2019, 317(4): E710-22.
- [31] Holzner LMW, Murray AJ. Hypoxia-inducible factors as key players in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis[J]. *Front Med: Lausanne*, 2021, 8: 753268.
- [32] Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity[J]. *Nature*, 2012, 482(7384): 179-85.
- [33] 李红山, 奚瑛斐, 何哲耘. 中药组分 HJJB 方对小鼠非酒精性脂肪性肝炎的防治作用及其对肠道菌群的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(10): 6014-8.
- [34] Koenen TB, Stienstra R, van Tits LJ, et al. Hyperglycemia activates caspase-1 and TXNIP-mediated IL-1 β transcription in human adipose tissue[J]. *Diabetes*, 2011, 60(2): 517-24.
- [35] 张成慧, 邹云红, 王溯源, 等. 糖代谢对高原环境的适应与疾病[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2024, 55(6): 1460-8.
- [36] Fu C, Jiang L, Zhu F, et al. Chronic intermittent hypoxia leads to insulin resistance and impaired glucose tolerance through dysregulation of adipokines in non-obese rats[J]. *Sleep Breath*, 2015, 19(4): 1467-73.
- [37] 林华龙. NLRP3 炎症小体的活化机制探究及抑制剂发现. 合肥: 中国科学技术大学, 2023.

(编辑:余诗诗)