

• 论 著 •

MCC950 通过抑制 NLRP3 炎症小体通路引发的
焦亡缓解原发性痛经 *汪少华 潘思安 薛 晓 袁菡钰 李 娟 岳增辉[△] 刘 余[△]
(湖南中医药大学针灸推拿与康复学院, 长沙 410208)

摘 要 目的: 研究原发性痛经 (primary dysmenorrhoea, PDM) 中子宫损伤的机制, 并探讨 MCC950 治疗或缓解 PDM 的机制。方法: 采用随机数表法将 30 只健康未孕雌性大鼠分为对照组、模型组 (PDM 组) 和 MCC950 组, 每组 10 只。PDM 组和 MCC950 组联合注射苯甲酸雌二醇和催产素建立 PDM 大鼠模型; MCC950 组对大鼠腹腔注射 NLRP3 选择性抑制剂 MCC950; 对照组注射相同剂量的 0.9% 氯化钠注射液。用大鼠扭体次数、扭体评分和扭体潜伏期来评估 PDM 模型和症状; ELISA 法检测大鼠血清中 PGE2 和 PGF2 α 的水平, 也用于评价 PDM 模型和症状; 用光学显微镜观察大鼠子宫组织形态, 评估其损伤程度; Western blot 法检测大鼠子宫组织中 NF- κ B p65、磷酸化 NF- κ B p65、NLRP3 炎症小体成分蛋白、GSDMD、GSDMD-N、IL-1 β 、IL-18 的表达水平, 探讨子宫组织焦亡的分子机制。结果: 与对照组相比, 模型组大鼠扭体次数、扭体评分显著升高; 子宫病理损伤评分显著升高; 血清 PGF2 α 水平和 PGF2 α /PGE2 比值显著升高; 子宫组织 NF- κ B p65、phospho-NF- κ B p65、NLRP3、ASC、caspase-1、cleaved caspase-1、GSDMD、GSDMD-N、IL-1 β 和 IL-18 蛋白表达显著上升 ($P < 0.05$)。与 PDM 组相比, MCC950 组大鼠扭体反应、扭体评分显著降低, 扭体潜伏期显著延长; 子宫病理损伤评分显著降低; 血清 PGF2 α 水平和 PGF2 α /PGE2 比值显著降低; 子宫组织 NF- κ B p65、phospho-NF- κ B p65、NLRP3、ASC、caspase-1、cleaved caspase-1、GSDMD、GSDMD-N、IL-1 β 和 IL-18 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$)。结论: MCC950 可抑制 PDM 大鼠子宫组织 NLRP3 炎症小体活化和焦亡, 减少组织损伤, 减轻疼痛症状, 从而缓解 PDM。

关键词 原发性痛经; 焦亡; NLRP3 炎症小体; 组织损伤; 大鼠

MCC950 relieves primary dysmenorrhea via inhibiting NLRP3 inflammasome pathway-mediated pyroptosis *

WANG Shaohua, PAN Si-an, XUE Xiao, YUAN Hanyu, LI Juan, YUE Zenghui[△], LIU Yu[△]

(College of Acupuncture-Moxibustion, Tui-na and Rehabilitation, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

Abstract Objective: To investigate the mechanism of uterine injury in primary dysmenorrhoea (PDM) and explore the mechanism by which MCC950 may treat or relieve PDM. **Methods:** Thirty rats were divided into control group, model group (PDM group) and MCC950 group with 10 rats in each group using random number table. PDM group model was established by combined injection of estradiol benzoate and oxytocin. Rats in MCC950 group were intraperitoneally injected with NLRP3 selective inhibitor MCC950. PDM model and symptoms were assessed using rat writhing times, writhing scores, and writhing incubation periods. In addition, ELISA was used to measure PGE2 and PGF2 α levels in rat serum, which was also used to evaluate the degree of PDM and symptoms. The histomorphology of the rat uterus was observed by optical microscopy to evaluate damage. The expression levels of NF- κ B p65, phosphorylated NF- κ B p65, NLRP3 inflammasome compo-

* 基金项目: 国家自然科学基金 (82004490); 湖南省自然科学基金青年项目 (2021JJ40402); 湖南省教育厅创新平台开放基金项目 (20K091); 湖南中医药大学研究生创新课题 (2022CX100)

[△] 通信作者 刘余 125790602@qq.com; 岳增辉 624755064@qq.com



nent proteins, GSDMD, GSDMD-N, IL-1 β , and IL-18 were measured by Western blot analysis to determine the molecular mechanism of pyroptosis in rat uterine tissue. **Results:** Compared with the control group, the writhing times and writhing scores of rats in the PDM group were significantly increased. Pathological injury score of uterus were significantly increased. Serum PGF2 α and PGF2 α /PGE2 were significantly increased. Expressions of NF- κ B p65, phospho-NF- κ B p65, NLRP3, ASC, caspase-1, cleaved caspase-1, GSDMD, GsdMD-N, IL-1 β , and IL-18 in uterine tissue were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the PDM group, writhing times and writhing scores of rats in the MCC950 group were significantly decreased, while twisting latency was significantly prolonged. The pathological injury score of uterus was significantly decreased. Serum PGF2 α and PGF2 α /PGE2 were significantly decreased. Expressions of NF- κ B p65, phospho-NF- κ B p65, NLRP3, ASC, caspase-1, cleaved caspase-1, GSDMD, GsdMD-N, IL-1 β , and IL-18 in uterine tissue were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** MCC950 can inhibit the activation and pyroptosis of NLRP3 inflammasome in uterine tissue of PDM rats, reduce tissue damage, alleviate pain, and thus relieve PDM.

Keywords primary dysmenorrhoea; pyroptosis; NLRP3 inflammasome; tissue damage; rat

原发性痛经 (primary dysmenorrhoea, PDM) 被定义为没有盆腔器质性病变的月经期疼痛性疾病, 通常以痉挛性耻骨上疼痛为特征^[1,2]。PDM 影响 50%~90% 年轻女性的生活, 包括人际关系、学习和工作, 而且引发焦虑^[3,4]。目前治疗 PDM 的一线药物为非甾体抗炎药 (non steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs), 存在着恶心、呕吐、食欲减退甚至消化道溃疡等不良反应^[5,6]。目前, 没有足够的证据说明单独使用 NSAIDs 是最有效且安全的^[7]。因此, 寻找安全有效治疗或缓解 PDM 的药物是有必要的。

核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 蛋白复合物家族在 B 细胞成熟过程中被诱导, 并作为二聚体发挥作用^[8]。NF- κ B 家族包括五种蛋白质二聚体, 存在于典型的 p50/p65 型中^[9]。p50/p65 二聚体可在淋巴细胞和巨噬细胞中触发 NF- κ B 诱导的转录作用, 从而在炎症的病理生理过程中发挥作用^[10,11]。在对外源性信号的反应中, I κ B 的翻译后修饰导致 I κ B 磷酸化, 导致 NF- κ B 二聚体进入细胞核并激活靶基因, 从而进一步加剧炎症^[12]。总之, NF- κ B 是介导炎症反应的关键因子。

含核苷酸结合寡聚化结构域核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein3, NLRP3) 炎症小体是由 NLRP3、半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶-1 (cysteiny aspartate specific proteinase-1, caspase-1) 和含有半胱天冬酶募集结构域的凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated specklike protein containing a caspase recruitment domain, ASC) 组装而成的细胞质多蛋白复合物^[13,14]。PDM 中出现 NLRP3 蛋白寡聚化, NLRP3 选择性抑制剂 MCC950 通过 NF- κ B/

COX-2/PG 通路抑制 PDM 大鼠子宫组织 NLRP3 炎症小体激活并减轻炎症^[15]。NLRP3 的寡聚化驱动 caspase-1 依赖性的蛋白裂解以及 IL-1 β 和 IL-18 的成熟和释放^[16,17]。激活的 caspase-1 将 gasdermin D (GSDMD) 裂解成 GSDMD-N 末端 (GSDMD-N), GSDMD-N 进入质膜, 导致细胞膜破裂, 最后细胞焦亡^[18]。因此, NLRP3 炎症小体作为炎症反应的核心, 参与了 PDM 的发生发展, 可能是治疗或缓解 PDM 的新靶点。

PDM 中发生了 NLRP3 炎症小体的激活, 但 PDM 大鼠子宫组织损伤的机制尚不完全清楚。因此, 为进一步研究 PDM 大鼠子宫损伤的机制, 本研究使用苯甲酸雌二醇和催产素构建 PDM 大鼠模型, 探讨 MCC950 治疗或缓解 PDM 的机制。

方 法

1. 实验动物和分组

健康未孕雌性 SPF 级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 30 只, 6~8 周龄, 体质量 180~220 g, 购自北京华阜康生物科技有限公司, 饲养在湖南中医药大学实验动物中心, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2019-0008。大鼠被饲养在 20℃~25℃ 的适宜温度下, 自由饮水和进食。1 周后采用随机数表法将 30 只大鼠随机分为 3 组: 对照组、模型组 (PDM 组) 和 MCC950 组, 每组 10 只。所有动物实验均经湖南中医药大学实验动物伦理委员会审查批准 (伦理批号 LL2021040703), 符合中国国家标准《实验动物-动物福利伦理审查指南》(GB/T 35892-2018)。



2. 材料和方法

(1) 主要药品和仪器

苯甲酸雌二醇 [生产批号: (2020) 11025, 宁波第二激素厂, 中国]; 催产素 (货号: P1029, 批次: 07; 分子式: $C_{45}H_{70}N_{12}O_{14}S_2$; 分子量: 1067.2; 纯度: 98.52%) 和 MCC950 (货号: S7809, 批次: 07; 分子式: $C_{20}H_{23}N_2O_5S \cdot Na$; 分子量: 426.46; 纯度: 99.40%) 均购自美国 Selleck; 大鼠 PGE2 ELISA 试剂盒 (生产批号: 20211111-J2944) 和大鼠 PGF2 α ELISA 试剂盒 (生产批号: 20211111-J3106) 均购自湖南艾方生物科技有限公司; NF- κ B p65 抗体 (货号: GB12142), phospho-NF- κ B p65 抗体 (货号: GB11142-1), HRP-山羊抗鼠二抗 (货号: GB-23301) 和 HRP-山羊抗兔二抗 (货号: GB23303) 均购自武汉赛维尔生物科技有限公司; NLRP3 抗体 (货号: ab263899), GSDMD 抗体 (货号: ab-219800) 和 N-terminal GSDMD 抗体 (货号: ab215-203) 均购自英国 abcam; caspase-1 抗体 (货号: #2225), cleaved caspase-1 抗体 (货号: #89332) 和 IL-1 β 抗体 (货号: #12242) 均购自美国 Cell Signaling Technology; ASC 抗体 (货号: bs-6741R) 购自美国 Bioss Antibodies; IL-18 抗体 (货号: 10663-1-AP) 购自美国 Proteintech; β -actin (货号: AF5001) 购自上海碧云天生物技术有限公司。

酶标仪 (型号: RT-6100, Rayto, 美国), 光学显微镜 (型号: BA410E, Motic, 中国), 切片机 (型号: UC7, Leica, 德国), 高速冷冻离心机 (型号: Sorvall ST 16R, Thermo Fisher, 美国), 电泳槽 (Bio-rad, 美国), 化学发光仪 (型号: 6300, CLINX, 中国), 灰度分析软件 (alphaEaseFC, Alpha Innotech, 美国)。

(2) PDM 大鼠模型的建立

采用苯甲酸雌二醇和催产素联合给药建立大鼠 PDM 模型。雌激素通过调节细胞增殖、血管生成和增加催产素受体 (oxytocin receptor, OTR) mRNA 表达来提高子宫敏感性^[19,20]。催产素能有效诱导子宫收缩, 引起子宫相对缺血和缺氧, 导致疼痛^[21]。对照组大鼠皮下注射 0.9% 氯化钠注射液, 连续注射 10 天, 第 11 天腹腔注射 0.9% 氯化钠注射液。另外两组大鼠每日早上 9 时皮下注射苯甲酸雌二醇 (剂量: 第 1 天 2 mg/kg, 第 2~9 天 0.8 mg/kg, 第 10 天 2 mg/kg)。苯甲酸雌二醇的剂量和时间参考其体内药代动力学研究^[22]。第 11 天上午 9 时, PDM 组和 MCC950 组每只大鼠腹腔注射 2 U 催产素 (浓度 5 mg/ml, 体积 0.4 ml)。MCC950 组第 11 天在注

射苯甲酸雌二醇 30 min 后腹腔注射 10 mg/kg 的 MCC950 (浓度 5 mg/ml)。

(3) 大鼠扭体反应的测定

大鼠扭体反应参考 Wei 等^[23]的报道。记录大鼠在注射催产素后 30 min 内的扭体次数和扭体潜伏期。扭体潜伏期是从注射催产素到第 1 次扭体的时间。发生扭体反应后, 使用 2% 的戊巴比妥钠麻醉大鼠, 腹主动脉采血, 切除子宫组织。最后, 对老鼠实施安乐死。用无菌手术剪刀将约 5 mm×5 mm×5 mm 大小的子宫组织置于 4% 多聚甲醛溶液中固定。其余的组织被放置在液氮中进行后续检查。扭体评分标准: 正常运动、探索行为以及躯干和后肢伸展记 0 分; 腹部凹陷、身体倾斜记 1 分; 后肢伸展、后爪背屈、骨盆旋转的身体伸展记 2 分; 腹肌收缩、后肢向后伸展、身体有僵直的扭转评分记 3 分。

(4) 显微镜检查

采用随机数表法每组选取 5 只大鼠, 从每只大鼠的同侧采集同一节段的子宫组织进行显微镜观察。将大鼠子宫组织在 4% 多聚甲醛中室温固定 24 h, 脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 以厚度 5 μ m 切片。组织随后用二甲苯和乙醇脱蜡, 干燥并用苏木精-伊红染色。用中性树胶封片后, 光学显微镜观察大鼠子宫的组织形态结构。大鼠子宫病理损伤评分参考 Wei 等^[24]的实验。根据显微镜下子宫的形态特征, 无病理的子宫记为 0 分; 子宫内膜变性坏死记为 1 分; 固有层水肿记为 2 分; 固有层腺体增加记为 3; 炎性细胞浸润固有层评分记为 4 分; 子宫肌层炎症评分记为 5 分。

(5) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测大鼠血清 PG 变化

取腹主动脉的血液在室温下自然凝固 10~20 min, 离心 20 min 左右 (2000~3000 r/min), 仔细收集血液上清液。根据 ELISA 试剂盒的说明进行血清中 PGE2 和 PGF2 α 的测定。

(6) Western blot 检测

采用随机数表法每组选取 5 只大鼠, 取大鼠同侧同段子宫组织约 30 mg, 用匀浆器低温研磨。加入预冷的 RIPA 裂解缓冲液、蛋白酶抑制剂和磷酸化酶抑制剂, 置于冰上 30 min。4℃, 12,000 r/min 离心 10 min, 除去含有蛋白的上清, 加入样品缓冲液, 在沸水浴中加热 10 min, 使蛋白完全变性。采用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白质标准曲线, 计算蛋白质浓度。经电泳、PVDF 膜转移和阻断后, 用 Tris 缓冲盐水 Tween-20 (TBST) 稀释特异性一抗。膜与以下主要抗体在 4℃ 孵育过夜: NF- κ B

p65 (1:2000), phospho-NF- κ B p65 (1:3000), NLRP3 (1:1000), caspase-1 (1:3000), cleaved caspase-1 (1:3000), ASC (1:3000), IL-1 β (1:3000), IL-18 (1:3000), β -actin (1:2000), GSDMD (1:1000) 和 GSDMD-N (1:1000)。然后, 用 TBST 冲洗膜, 并与稀释的二抗孵育 60 min, ECL 法曝光。

3. 统计学分析

所有实验数据均采用 IBM SPSS Statistics 26.0 统计软件进行分析。所有数据的统计描述均采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示。如果数据满足正态性和方差齐性, 则使用单因素方差分析; 若不满足正态性, 使用 Kruskal-Wallis H 检验。显著性水平 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. MCC950 可减少 PDM 大鼠的扭体次数, 延长扭体潜伏期

在注射催产素 30 min 内, 对照组没有扭体反应。与对照组相比, PDM 组大鼠的扭体次数 ($P < 0.001$, 见图 1A) 和评分 ($P < 0.001$, 见图 1B) 明显增加, 说明 PDM 大鼠模型构建成功。与 PDM 组相比, MCC950 组的扭体次数 ($P < 0.05$, 见图 1A) 和评分 ($P < 0.05$, 见图 1B) 显著降低。由于无扭体反应, 对照组无扭体潜伏期。与 PDM 组相比, MCC950 组扭体潜伏期明显延长 ($P < 0.05$, 见图 1C)。

2. MCC950 可减轻 PDM 大鼠子宫内膜细胞损伤, 降低子宫病理损伤评分

对大鼠子宫进行 HE 染色, 观察 MCC950 对大鼠子宫内膜细胞损伤的保护作用。光学显微镜下, 对照组子宫未见明显组织学改变。子宫内膜上皮细胞排列整齐, 柱状, 生理性变性少, 未见明显炎症细胞浸润。PDM 组子宫内膜上皮细胞大量空泡化坏死, 多螺旋小动脉充血, 可见中性粒细胞浸润。MCC950 组子宫上皮出现少量空泡变性坏死, 无充血, 有少量中性粒细胞浸润 (见图 2A-C)。病理评分以显微镜评价为基础, 对符合标准的评分进行累积评价。与对照组相比, PDM 组子宫组织病理学损伤评分显著升高 ($P < 0.01$, 见图 2D)。与 PDM 组相比, MCC950 组病理评分明显降低 ($P < 0.05$, 见图 2D)。综上所述, MCC950 对 PDM 大鼠子宫损伤有保护作用。

3. MCC950 下调 PDM 大鼠血清中 PGF2 α 含量及 PGF2 α /PGE2 比值

前列腺素 (prostaglandin, PG) 是 PDM 的发病机制之一。此外一项人体试验表明, PGF2 α 抑制剂对治疗 PDM 有效^[25]。因此, PG 可以用来评价 PDM 动物模型的成功与否。与对照组相比, PDM 组大鼠血清中 PGF2 α ($P < 0.01$, 见图 3A) 及 PGF2 α /PGE2 比值 ($P < 0.001$, 见图 3B) 显著升高。与 PDM 组比较, MCC950 组大鼠血清中 PGF2 α ($P < 0.05$, 见图 3A) 及 PGF2 α /PGE2 比值 ($P < 0.001$, 见图 3B) 明显降低。

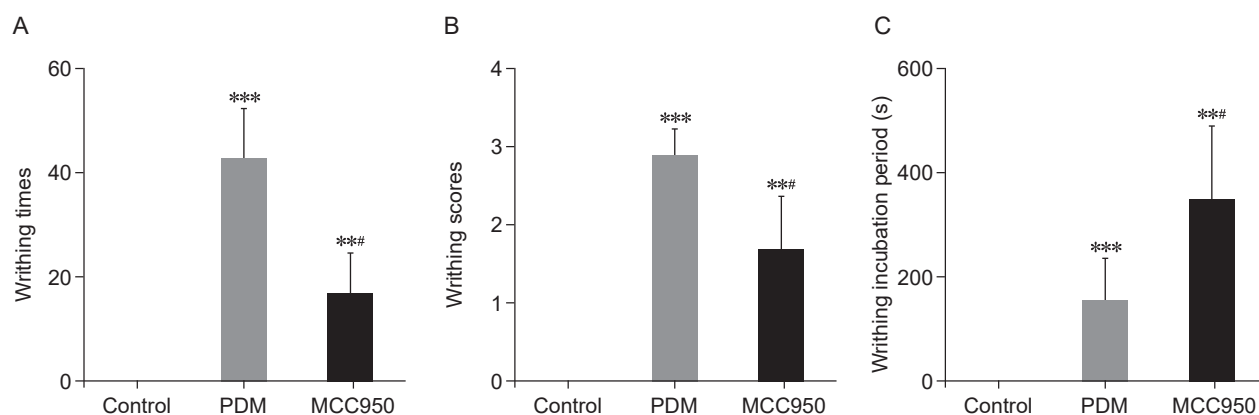


图 1 各组大鼠注射催产素 30 min 后扭体次数、扭体评分及扭体潜伏期比较 ($n = 10$, $\bar{x} \pm SD$) (A) 扭体次数; (B) 30 min 内的最高得分为大鼠扭体评分; (C) 扭体潜伏期: 注射催产素后第 1 次扭体反应的时间
所有实验均为随机双盲设计, 数据均使用 Kruskal-Wallis H 检验
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与 PDM 组相比

Fig. 1 Comparison of writhing times, writhing scores and writhing incubation periods 30 min after oxytocin injection in each group ($n = 10$, $\bar{x} \pm SD$) (A) Writhing times; (B) Writhing scores in 30 min; (C) Writhing latency, time until the first writhing response after the injection of oxytocin (s). All experiments were randomized and double-blinded, The data were analysed by the Kruskal-Wallis H test.
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared with group control; # $P < 0.05$, compared with group PDM.

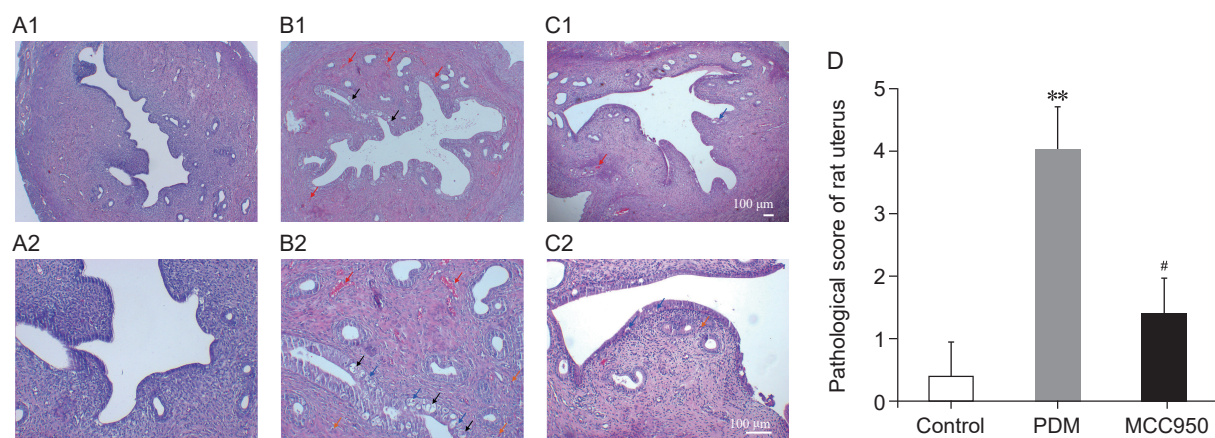


图 2 各组大鼠子宫组织病理学变化及病理损伤评分比较 ($n = 5$, $\bar{x} \pm SD$)
(A1, A2) 对照组; (B1, B2) PDM 组; (C1, C2) MCC950 组; (D) 各组 HE 染色病理损伤评分比较
HE 评分采用 Kruskal-Wallis H 检验; (A1, B1, C1) 为 40 倍放大; (A2, B2, C2) 为 100 倍放大, 标尺 = 100 μm
蓝色、黑色、红色和橙色箭头分别表示空泡样变性、死亡细胞、充血和中性粒细胞浸润
** $P < 0.01$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与 PDM 组相比

Fig. 2 Histopathological changes and comparison of pathological damage scores in the uterine tissue of rats in each group ($n = 5$, $\bar{x} \pm SD$)
(A1, A2) Control group; (B1, B2) PDM group; (C1, C2) MCC950 group; (D) Comparison of pathological damage in each group by HE staining (the HE score was analyzed by the Kruskal-Wallis H test); (A1, B1, C1) The images were taken at 40 $\times$ magnification; (A2, B2, C2) The images were taken at 100 $\times$ magnification. Scale bar = 100 μm
The blue, black, red, and orange arrows referred to vacuolar degeneration, dead cells, hyperaemia, and neutrophil infiltration, respectively.

** $P < 0.01$, compared with group control; # $P < 0.05$, compared with group PDM.

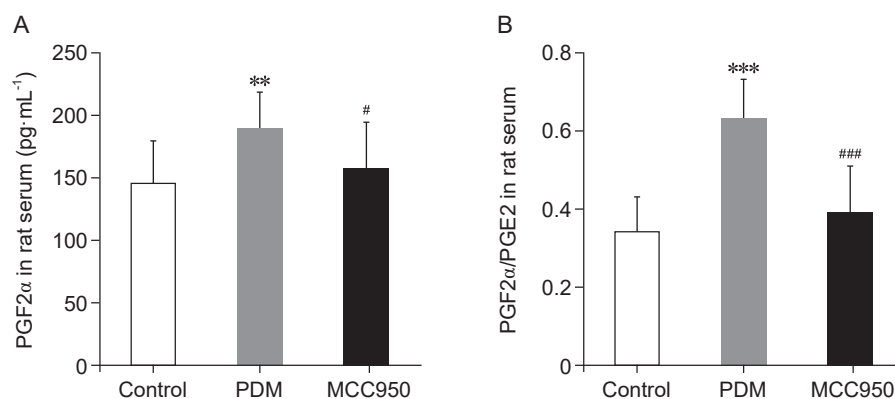


图 3 各组大鼠血清中 PGF2 α 及 PGF2 α /PGE2 比值的比较 ($n = 10$, $\bar{x} \pm SD$)
(A) 大鼠血清 PGF2 α 含量; (B) 大鼠血清 PGF2 α /PGE2 比值比较
ELISA 法检测血清中 PGF2 和 PGE2 水平, 使用单因素方差分析 (one-way ANOVA)
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$, 与 PDM 组相比

Fig. 3 Comparison of PGF2 α and the ratio of PGF2 α /PGE2 in serum of rats in each group ($n = 10$, $\bar{x} \pm SD$)
(A) PGF2 α content in rat serum; (B) Comparison of PGF2 α /PGE2 ratio in rat serum.
ELISA was used to measure PGF2 and PGE2 levels in serum, and the data were analyzed by one-way ANOVA
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared with group control; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$, compared with group PDM.

4. MCC950 抑制 PDM 大鼠子宫组织 NF- κ B 的激活
采用 Western blot 法测定大鼠子宫组织中 NF- κ B 的含量。与对照组相比, PDM 大鼠子宫组织中 NF- κ B p65 和磷酸化 NF- κ B p65 (phospho-p65) 蛋白的表达水平显著升高 ($P < 0.001$, 见图 4)。此外, 与 PDM 组相比, MCC950 组大鼠子宫组织 NF- κ B p65

($P < 0.01$) 和磷酸化 NF- κ B p65 ($P < 0.001$, 见图 4) 水平明显降低。

5. MCC950 抑制 NLRP3 炎症小体蛋白的表达和下游 cleaved caspase-1 的释放

为了证实 MCC950 对炎症小体及其下游 caspase 的作用, 通过 Western blot 分析了炎症小体蛋白和

cleaved caspase-1 (见图 5A)。与对照组相比, PDM 组大鼠子宫组织 NLRP3 ($P < 0.001$, 见图 5B)、ASC ($P < 0.001$, 见图 5C)、caspase-1 ($P < 0.01$, 见图 5D)、cleaved caspase-1 ($P < 0.01$, 见图 5E) 蛋白表达水平显著升高。与 PDM 组比较, MCC950 组 NLRP3 ($P < 0.001$, 见图 5B)、ASC ($P < 0.01$, 见图 5C)、caspase-1 ($P < 0.05$, 见图 5D)、cleaved caspase-1 ($P < 0.05$, 见图 5E) 蛋白表达水平显著降低。

6. MCC950 下调焦亡蛋白和炎症因子的表达

为了确定 PDM 大鼠子宫组织损伤和焦亡的原因, 通过 Western blot 检测 GSDMD、GSDMD-N、IL-1 β 和 IL-18 的蛋白表达水平 (见图 6A)。与对照组相比, PDM 组大鼠子宫组织中 GSDMD ($P < 0.001$, 见图 6B)、IL-1 β ($P < 0.001$, 见图 6C)、GSDMD-N ($P < 0.01$, 见图 6D)、IL-18 ($P < 0.001$, 见图 6E) 蛋白表达水平明显升高。与 PDM 组比较, MCC950 组大鼠子宫组织中 GSDMD ($P < 0.001$, 见图 6B)、IL-1 β ($P < 0.001$, 见图 6C)、GSDMD-N ($P < 0.05$, 见图 6D)、IL-18 ($P < 0.001$, 见图 6E) 蛋白表达水平显著降低。

讨 论

NLRP3 炎症小体活化而引起的炎症是许多疾病的基础^[26]。NLRP3 炎症小体介导炎症、组织损伤和妇科疾病如子宫内膜异位症、妇科肿瘤和多囊

卵巢综合征等^[27]。NLRP3 炎症小体的组装是由模式识别受体对危险相关分子模式和病原体相关分子模式做出反应决定的^[13]。本研究结果显示, PDM 大鼠子宫组织中 NLRP3 炎症小体组件蛋白表达上升, NF- κ B 和磷酸化 NF- κ B 的表达也上升。NLRP3 炎症小体的激活包括两个过程: 一是上调 NLRP3 的炎症小体成分 (包括 NLRP3、ASC 和 caspase-1), 并对 NLRP3 进行翻译后修饰, 获得激活条件; 二是对 NLRP3 激活子的识别和 NLRP3 炎症小体的形成^[28]。在 PDM 中, NLRP3 炎症小体激活可能由 toll 样受体等模式识别受体引起, 导致 NF- κ B 激活和基因转录, 或由线粒体功能障碍引起^[29-31]。因此 PDM 中出现 NLRP3 炎症小体和 NF- κ B 通路的活化。本研究结果显示 PDM 大鼠子宫组织 GSDMD 和 GSDMD-N 显著升高。NLRP3 炎症小体激活后, caspase-1 被剪切形成具有活性的 cleaved caspase-1, 基因敲除实验证实了这一点^[32]。cleaved caspase-1 剪切 GSDMD 形成 GSDMD-N, GSDMD-N 在细胞膜上形成孔, 引起焦亡^[18]。此外, ASC 可以增加 GSDMD 的含量, 促进 GSDMD 活化^[33]。相反, 靶向敲低 GSDMD 基因阻断了细胞焦亡, 而在增加外源性 GSDMD 表达后, 焦亡被重新激活^[34]。这些实验表明 GSDMD 是焦亡的执行蛋白。因此可以推断, 在 PDM 大鼠子宫组织中, NLRP3 炎症小体发生活化并引发了焦亡。此外, 本研究结果显示, 在 PDM 大鼠子宫组织中, IL-1 β 和 IL-18 蛋白表达

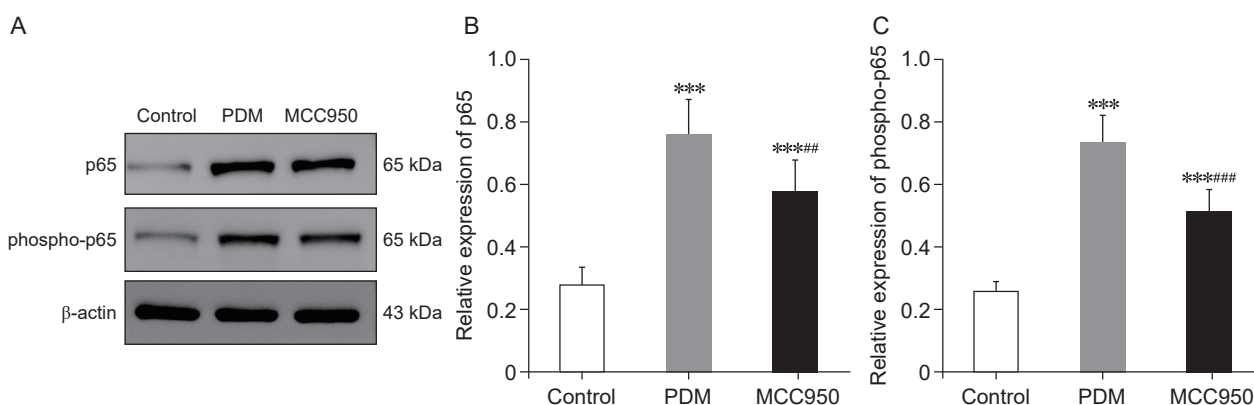


图 4 各组大鼠子宫组织 NF- κ B p65 及磷酸化 NF- κ B p65 蛋白表达水平比较 ($n = 5$, $\bar{x} \pm SD$)
(A) 大鼠子宫组织 p65 和 phospho-p65 的蛋白印迹图; (B, C) 分别为 p65 和 phospho-p65 的相对表达量。数据采用 one-way ANOVA

*** $P < 0.001$, 与对照组相比; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, 与 PDM 组相比

Fig. 4 Comparison of protein expression levels of NF- κ B p65 and phosphorylated NF- κ B p65 in the uterine tissue of rats in each group ($n = 5$, $\bar{x} \pm SD$)
(A) Western blot of p65 and phospho-p65 in rat uterine tissue; (B, C) Relative expression levels of p65 and phospho-p65. The data were analyzed by one-way ANOVA.

*** $P < 0.001$, compared with group control; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, compared with group PDM.

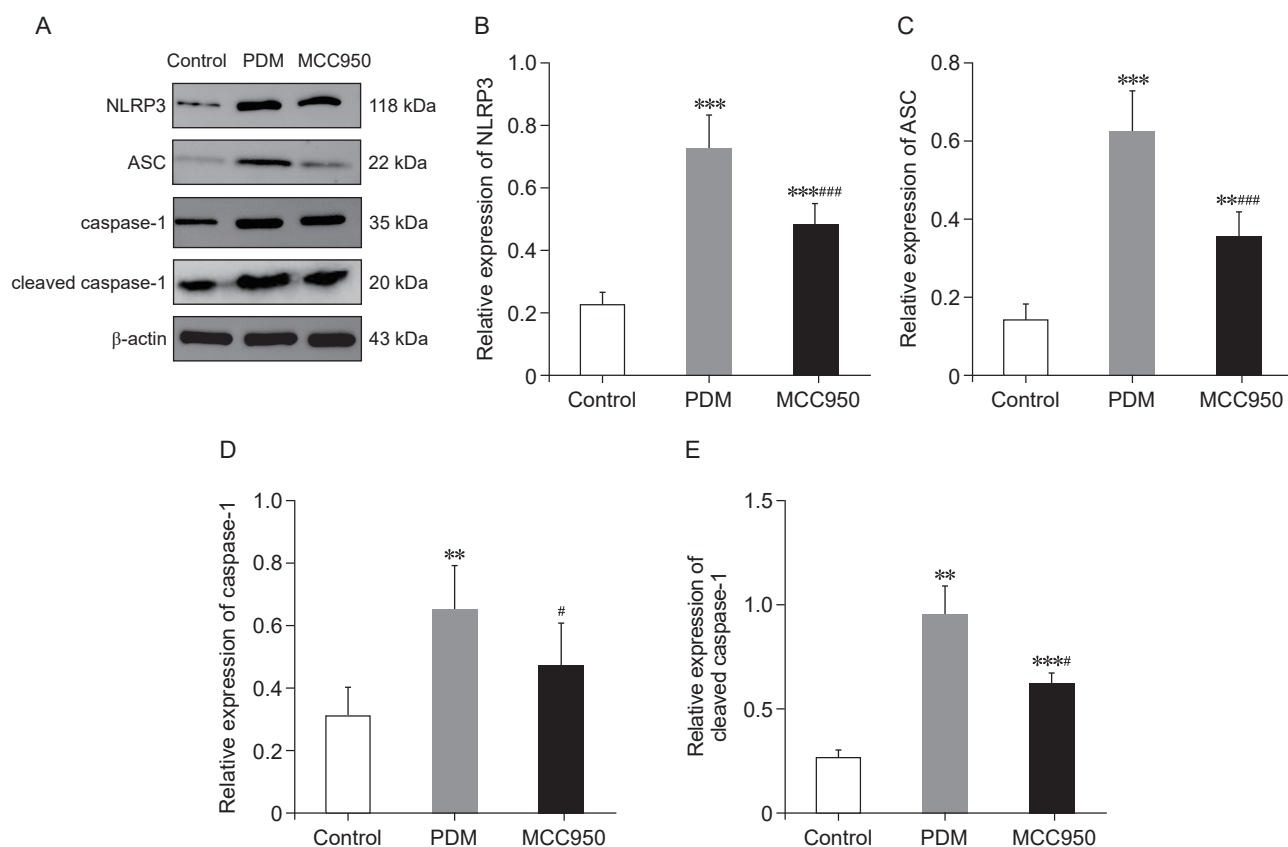


图 5 各组大鼠子宫组织 NLRP3 炎症小体组件 NLRP3、ASC、caspase-1、cleaved caspase-1 蛋白表达水平的比较 ($n = 5$, $\bar{x} \pm SD$)

(A) 大鼠子宫组织 NLRP3、ASC、caspase-1、cleaved caspase-1 的蛋白印迹图; (B-E) 分别为 NLRP3、ASC、caspase-1 和 cleaved caspase-1 的相对表达量。数据采用 one-way ANOVA

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$, 与 PDM 组相比

Fig. 5 Comparison of the protein expression levels of the NLRP3 inflammasome components NLRP3, ASC, caspase-1 and cleaved caspase-1 in the uterine tissue of rats in each group ($n = 5$, $\bar{x} \pm SD$)

(A) Western blot of NLRP3, ASC, caspase-1 and cleaved caspase-1 in rat uterine tissue; (B-E) Relative expression levels of NLRP3, ASC, caspase-1 and cleaved caspase-1. The data were analyzed by one-way ANOVA.

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared with group control; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$, compared with group PDM.

升高。PDM 模型大鼠血清中 PGF2 α 以及 PGF2 α /PGE2 表达明显升高。Lim 等的研究表明^[35], 分娩时人的子宫收缩, NLRP3 蛋白表达增加, PGF2 α 表达也增加。靶向敲除 NLRP3 后, PGF2 α 表达明显降低。PG 中特别是可引起子宫收缩的 PGF2 α , 参与了 PDM 的发病^[36]。随着 PGF2 α /PGE2 比值升高, 导致子宫平滑肌收缩加重^[37], 从而加重 PDM。这些结果提示, NLRP3 激活引起的 PG 升高是 PDM 的发病机制之一。细胞死亡命名委员会将细胞焦亡定义为依赖 caspase-1 导致染色质碎裂、质膜透化的细胞肿胀和炎性内容物 IL-1 β 和 IL-18 释放的程序性细胞死亡^[38]。通常, 细胞焦亡会引起组织损伤, 炎症物质 IL-1 β 和 IL-18 本身就是致痛源^[39-41]。因此, PDM 的组织损伤和疼痛可能是由焦亡过程中释放的

IL-1 β 和 IL-18 介导的。

MCC950 是一种选择性 NLRP3 抑制剂, 对全身多个器官具有药理作用^[42]。MCC950 作用于 NLRP3 蛋白 NACHT 结构域的 Walker B 位点, 从而阻断 ATP 水解和 NLRP3 活化^[43]。NLRP3 是一种包含氨基端 pyrin 结构域、羧基端富含亮氨酸重复结构域和中央 NACHT 结构域的三联蛋白。刺激诱导 NLRP3 寡聚化通过 NLRP3 蛋白中央 NACHT 结构域的同型相互作用招募 ASC, ASC 中的 caspase 招募结构域招募 caspase-1^[28]。在生理条件下, NLRP3 中 LRR-LRR 与 PYD 的相互作用保持稳定, 避免过早激活^[44]。最近的报道显示^[45], MCC950 与天然 NLRP3 蛋白形成稳定的十聚体, 提示 MCC950 可以有效结合 NLRP3 并发挥抑制作用。本研究结

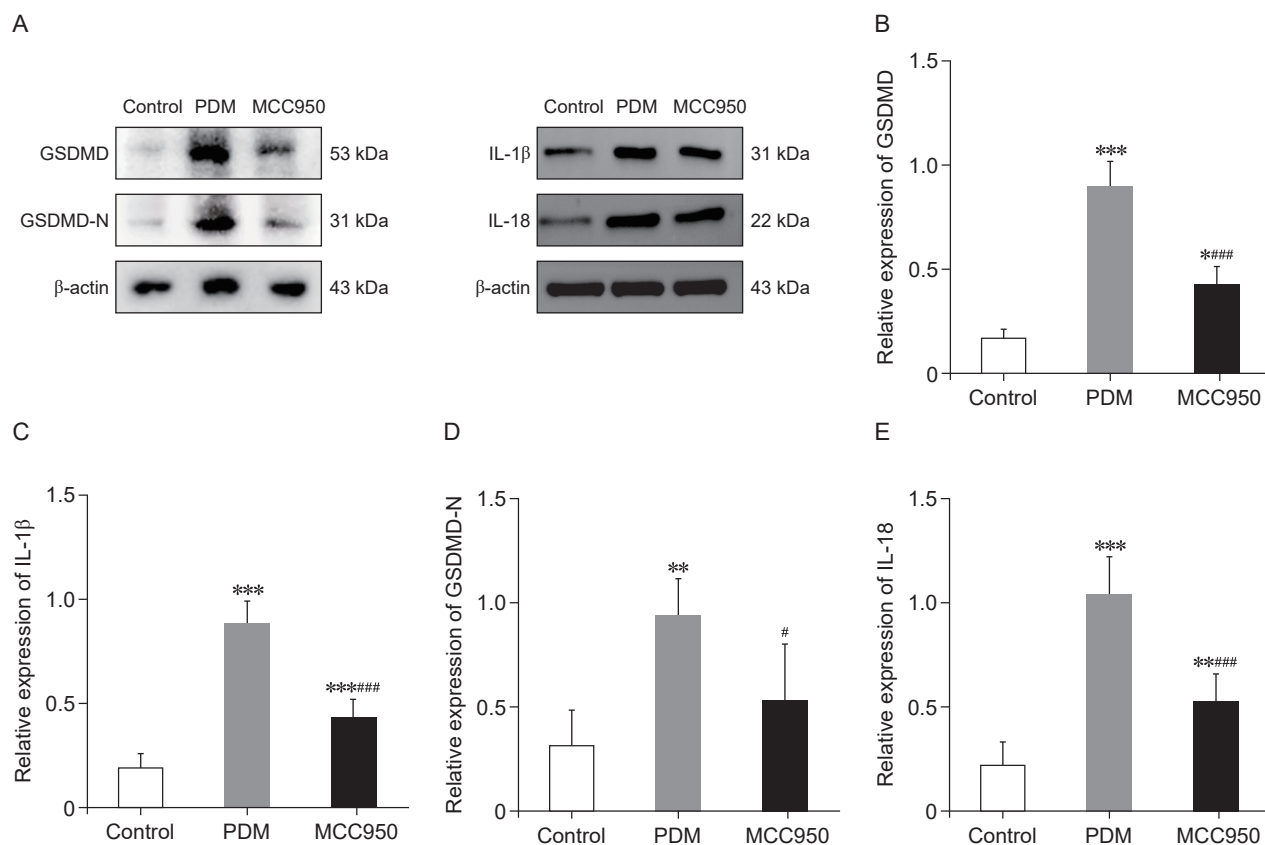


图 6 各组大鼠子宫组织中焦亡蛋白及炎症因子的比较 ($n = 5$, $\bar{x} \pm SD$) (A) 大鼠子宫组织 GSDMD、GSDMD-N、IL-1 β 和 IL-18 的蛋白印迹图; (B-E) 分别为 GSDMD、IL-1 β 、GSDMD-N 和 IL-18 的相对表达量。数据采用 one-way ANOVA

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, #### $P < 0.001$, 与 PDM 组相比

Fig. 6 Comparison of pyroptotic proteins and inflammatory factors in the uterine tissue of rats in each group ($n = 5$, $\bar{x} \pm SD$)

(A) Western blot of GSDMD, GSDMD-N, IL-1 β and IL-18 in rat uterine tissue; (B-E) Relative expression levels of GSDMD, IL-1 β , GSDMD-N and IL-18. The data were analyzed by one-way ANOVA.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared with group control; # $P < 0.05$, #### $P < 0.001$, compared with group PDM.

果显示, MCC950 干预后 NF- κ B 通路和 NLRP3 炎症小体组件蛋白的表达均下降。NLRP3 蛋白是 NLRP3 炎症小体的传感器^[46]。抑制 NLRP3 蛋白后, ASC 和 caspase-1 的招募能力下降, NLRP3 炎症小体受到抑制, 不能有效产生 cleaved caspase-1, 进而抑制 IL-1 β 的分泌。MCC950 能有效抑制 NLRP3 蛋白激活, 但 MCC950 干预如何抑制 NF- κ B 的转录还不清楚。有证据表明, NLRP3 下游因子 IL-1 β 可通过磷酸化位点 Ser316、Ser529 和 Ser536 激活 NF- κ B 信号转导^[47,48], 这可能与 MCC950 干预抑制 NF- κ B 有关。由于 NLRP3 炎症小体和 cleaved caspase-1 被抑制, 导致下游 GSDMD 的数量和活性降低, 因此 MCC950 干预抑制 PDM 大鼠的子宫焦亡和炎症物质的释放。本研究结果表明, MCC950 抑制了 PGF2 α 的表达。由于 NLRP3 被直接抑制, PGF2 α 的产生也减少。与对照组相比, MCC950 组行为和部

分 Western blot 蛋白表达差异有统计学意义, 子宫病理损伤评分、血清 PG 和部分 Western blot 蛋白表达差异无统计学意义, 说明经过 MCC950 的干预后, PDM 大鼠得到缓解。

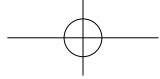
本研究存在潜在的局限性: 首先, 没有测量基因水平上的表达, 没有分离子宫细胞以获得更精准的药物治疗。此外, PDM 中 NLRP3 炎症小体激活的启动机制目前尚不清楚。因此, 未来可以从以下方面开展研究: ①从遗传学角度出发, 不排除基因编辑; ②从子宫或其他组织中分离细胞并施加药物干预, 以获得更精准的靶点; ③确定 PDM 中 NF- κ B 通路和 NLRP3 炎症小体激活的机制。

综上所述, MCC950 可抑制 PDM 中 NF- κ B 通路和 NLRP3 炎症小体的活化, 减少焦亡和组织损伤, 从而缓解 PDM。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] ACOG Committee Opinion No. 760 Summary: dysmenorrhea and Endometriosis in the Adolescent[J]. *Obstet Gynecol*, 2018,132(6):1517-1518.
- [2] Burnett M, Lemyre M. No. 345-primary dysmenorrhea consensus guideline[J]. *J Obstet Gynaecol Can*, 2017, 39(7):585-595.
- [3] 李珊, 李俊丽. 痛经女学生心理情绪和焦虑状况分析[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2011, 17(2):104-106.
- [4] Kho KA, Shields JK. Diagnosis and management of primary dysmenorrhea[J]. *JAMA*, 2020, 323(3):268-269.
- [5] Zahradek HP, Hanjalic-Beck A, Groth K. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and hormonal contraceptives for pain relief from dysmenorrhea: a review[J]. *Contraception*, 2010, 81(3):185-196.
- [6] Marjoribanks J, Proctor ML, Farquhar C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for primary dysmenorrhea[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2003, (4): CD001751.
- [7] Marjoribanks J, Ayeleke RO, Farquhar C, *et al.* Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for dysmenorrhea[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2015, 2015(7): CD001751.
- [8] Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. 30 years of NF- κ B: a blossoming of relevance to human pathobiology[J]. *Cell*, 2017, 168(1-2):37-57.
- [9] Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF- κ B signaling[J]. *Cell*. 2008, 132(3):344-362.
- [10] Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions[J]. *Genes Dev*, 2012, 26(3):203-234.
- [11] Lawrence T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, 1(6):a001651.
- [12] D'Ignazio L, Bandarra D, Rocha S. NF- κ B and HIF crosstalk in immune responses[J]. *FEBS J*, 2016, 283(3):413-424.
- [13] Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling[J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16(7):407-420.
- [14] Zamani P, Oskuee RK, Atkin SL, *et al.* MicroRNAs as important regulators of the NLRP3 inflammasome[J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2020, 150:50-61.
- [15] Tang B, Liu D, Chen L, *et al.* NLRP3 inflammasome inhibitor MCC950 attenuates primary dysmenorrhea in mice via the NF- κ B/COX-2/PG pathway[J]. *J Inflamm (Lond)*, 2020, 17:22.
- [16] Broz P, von Moltke J, Jones JW, *et al.* Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing[J]. *Cell Host Microbe*, 2010, 8(6):471-483.
- [17] Liu D, Zeng X, Li X, *et al.* Role of NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of cardiovascular diseases[J]. *Basic Res Cardiol*, 2017, 113(1):5.
- [18] Liu X, Zhang Z, Ruan J, *et al.* Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores[J]. *Nature*, 2016, 535(7610):153-158.
- [19] King AE, Critchley HO. Oestrogen and progesterone regulation of inflammatory processes in the human endometrium[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010, 120(2-3):116-126.
- [20] Murata T, Narita K, Ichimaru T. Rat uterine oxytocin receptor and estrogen receptor α and β mRNA levels are regulated by estrogen through multiple estrogen receptors[J]. *J Reprod Dev*, 2014, 60(1):55-61.
- [21] Luca AM, Carvalho JCA, Ramachandran N, *et al.* The effect of morbid obesity or advanced maternal age on oxytocin-induced myometrial contractions: an *in vitro* study Effet de l'obésité morbide ou de l'âge maternel avancé sur les contractions myométriales induites par l'oxytocine: une étude *in vitro*[J]. *Can J Anaesth*, 2020, 67(7):836-846.
- [22] Mannino CA, South SM, Inturrisi CE, *et al.* Pharmacokinetics and effects of 17 β -estradiol and progesterone implants in ovariectomized rats[J]. *J Pain*, 2005, 6(12):809-816.
- [23] Wei Y, Ma T, Wang H, *et al.* Extracts of compound Muniziqi granule suppressed uterus contraction and ameliorated oxytocin-induced primary dysmenorrhea[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 223:33-40.
- [24] Wei A, Feng H, Jia XM, *et al.* Ozone therapy ameliorates inflammation and endometrial injury in rats with pelvic inflammatory disease[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107:1418-1425.
- [25] Böttcher B, Laterza RM, Wildt L, *et al.* A first-in-human study of PDC31 (prostaglandin F $_{2\alpha}$ receptor inhibitor) in primary dysmenorrhea[J]. *Hum Reprod*, 2014, 29(11):2465-2473.
- [26] Zhong Z, Liang S, Sanchez-Lopez E, *et al.* New mitochondrial DNA synthesis enables NLRP3 inflammasome activation[J]. *Nature*, 2018, 560(7717):198-203.
- [27] Yu SY, Li XL. Pyroptosis and inflammasomes in obstetrical and gynecological diseases[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2021, 37(5):385-391.
- [28] Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics[J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19(8):477-489.
- [29] Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, *et al.* Cutting edge: NF- κ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression[J]. *J Immunol*, 2009, 183(2):787-791.



- [30] Shimada K, Crother TR, Karlin J, *et al.* Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis[J]. *Immunity*, 2012, 36(3):401-414.
- [31] Zhou R, Yazdi AS, Menu P, *et al.* A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation[J]. *Nature*, 2011, 469(7329):221-225.
- [32] Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, *et al.* NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice[J]. *Nature*, 2013, 493(7434):674-678.
- [33] He WT, Wan H, Hu L, *et al.* Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for IL-1 β secretion[J]. *Cell Res*, 2015, 25(12):1285-1298.
- [34] Ding J, Wang K, Liu W, *et al.* Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family[J]. *Nature*, 2016, 535(7610):111-116.
- [35] Lim R, Lappas M. NOD-like receptor pyrin domain-containing-3 (NLRP3) regulates inflammation-induced pro-labor mediators in human myometrial cells[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2018, 79(4):e12825.
- [36] Iacovides S, Avidon I, Baker FC. What we know about primary dysmenorrhea today: a critical review[J]. *Hum Reprod Update*, 2015, 21(6):762-778.
- [37] 谢丹, 居明乔, 曹鹏, 等. 炎症因子和原发性痛经相关性的研究进展 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2014, 19(3):346-350.
- [38] Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(3):486-541.
- [39] Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(2):99-109.
- [40] Gajtkó A, Bakk E, Hegedűs K, *et al.* IL-1 β induced cytokine expression by spinal astrocytes can play a role in the maintenance of chronic inflammatory pain[J]. *Front Physiol*, 2020, 11:543331.
- [41] Pilat D, Piotrowska A, Rojewska E, *et al.* Blockade of IL-18 signaling diminished neuropathic pain and enhanced the efficacy of morphine and buprenorphine[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2016, 71:114-124.
- [42] Corcoran SE, Halai R, Cooper MA. Pharmacological inhibition of the nod-like receptor family pyrin domain containing 3 inflammasome with MCC950[J]. *Pharmacol Rev*, 2021, 73(3):968-1000.
- [43] Coll RC, Hill JR, Day CJ, *et al.* MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition[J]. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(6):556-559.
- [44] Andreeva L, David L, Rawson S, *et al.* NLRP3 cages revealed by full-length mouse NLRP3 structure control pathway activation[J]. *Cell*, 2021, 184(26):6299-6312.e22.
- [45] Hochheiser IV, Pils M, Hagelueken G, *et al.* Structure of the NLRP3 decamer bound to the cytokine release inhibitor CRID3[J]. *Nature*, 2022, 604(7904):184-189.
- [46] Rathinam VA, Fitzgerald KA. Inflammasome complexes: emerging mechanisms and effector functions[J]. *Cell*, 2016, 165(4):792-800.
- [47] Zgórzyńska E, Stulczewski D, Dziedzic B, *et al.* Docosahexaenoic fatty acid reduces the pro-inflammatory response induced by IL-1 β in astrocytes through inhibition of NF- κ B and AP-1 transcription factor activation[J]. *BMC Neurosci*, 2021, 22(1):4.
- [48] Wang B, Wei H, Prabhu L, *et al.* Role of novel serine 316 phosphorylation of the p65 subunit of NF- κ B in differential gene regulation[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(33):20336-20347.

《中国疼痛医学杂志》编辑部

地址: 北京市海淀区学院路 38 号, 北京大学医学部

联系电话: 010-82801712; 010-82801705

电子邮箱: pain1712@126.com

杂志官网: <http://casp.ijournals.cn> 在线投稿

微信公众平台号: 中国疼痛医学杂志 (cjpm1712)

