

骨髓间充质干细胞外泌体抑制NLRP3和AIM2炎症小体激活改善体外循环急性肺损伤

朱丰正¹, 张涛元², 温常暖³, 杨苏民^{1*}

¹青岛大学医学院, 山东 青岛

²西安市胸科医院麻醉手术科, 陕西 西安

³空军军医大学附属第一医院西京医院, 心血管外科, 陕西 西安

收稿日期: 2025年5月3日; 录用日期: 2025年5月27日; 发布日期: 2025年6月4日

摘要

目的: 探究骨髓间充质干细胞外泌体对体外循环所致急性肺损伤的作用及机制。方法: 大鼠分为假手术组(Sham组), 体外循环1小时建立急性肺损伤模型(ALI组)及骨髓间充质干细胞外泌体治疗组(BMMSC-Exo组), HE染色评估肺组织病理改变; ELISA检测肺泡灌洗液中炎症因子TNF- α 、IL-6的表达情况。体外培养AM NR8383肺泡巨噬细胞系, 按处理方式不同分为对照组(Control组)、LPS模拟肺损伤组(LPS组)以及外泌体治疗组(BMMSC-Exo组), 激动剂组, 激动剂 + 外泌体治疗组, 通过Western blot检测炎症小体蛋白、Cleaved caspase 1的表达情况, 通过ELISA检测IL-1 β 和IL-18的释放情况。结果: 与Sham组相比, ALI组肺组织炎症浸润增加, 肺组织损伤评分明显升高($P < 0.05$), 肺泡灌洗液中TNF- α 、IL-6的表达增加($P < 0.05$); BMMSC-Exo组则可见肺部炎症缓解, 肺组织损伤评分则较损伤组明显降低($P < 0.05$), 肺泡灌洗液中TNF- α 、IL-6的表达减少($P < 0.05$)。体外研究提示: LPS组肺泡巨噬细胞中炎症小体NLRP3和AIM2的蛋白表达均增加; 而BMMSC-Exo组中NLRP3和AIM2的蛋白表达均明显降低; 炎症小体激动剂组增加Cleaved caspase 1、IL-18及IL-1 β 的表达, 而给予外泌体处理后, 上述蛋白的表达均被明显抑制($P < 0.05$)。结论: 体外循环所致急性肺损伤中炎症小体NLRP3和AIM2的表达增加, 骨髓间充质干细胞外泌体可通过阻断炎症小体的激活, 从而减少其下游蛋白及炎症因子的释放, 从而改善体外循环所致急性肺损伤炎症反应。

关键词

骨髓间充质干细胞外泌体, 急性肺损伤, 炎症小体

Exosome from BMMSC Attenuates Cardiopulmonary Bypass-Induced Acute Lung Injury via Inhibiting NLRP3 and AIM2 Inflammasome Activation

*通讯作者。

文章引用: 朱丰正, 张涛元, 温常暖, 杨苏民. 骨髓间充质干细胞外泌体抑制 NLRP3 和 AIM2 炎症小体激活改善体外循环急性肺损伤[J]. 临床医学进展, 2025, 15(6): 112-119. DOI: 10.12677/acm.2025.1561705

Fengzheng Zhu¹, Taoyuan Zhang², Changnuan Wen³, Sumin Yang^{1*}

¹Medical College of Qingdao University, Qingdao Shandong

²Department of Anesthesia and Surgery, Xi'an Chest Hospital, Xi'an Shaanxi

³Department of Cardiovascular Surgery, Xijing Hospital, The First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an Shaanxi

Received: May 3rd, 2025; accepted: May 27th, 2025; published: Jun. 4th, 2025

Abstract

Objective: To investigate the effect and mechanism of exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells on acute lung injury induced by cardiopulmonary bypass (CPB). **Methods:** The rats were divided into Sham operation group, acute lung injury (ALI) model established by cardiopulmonary bypass (CPB) for 1 hour (ALI group) and bone marrow mesenchymal stem cell exosome treatment group (BMMSCS-Exo group). The pathological changes of lung tissue were evaluated by HE staining. ELISA was used to detect the expression of TNF- α and IL-6 in bronchoalveolar lavage fluid. AM NR8383 alveolar macrophage cell line was cultured *in vitro*. According to different treatment methods, the cells were divided into Control group (Control group), LPS simulated lung injury group (LPS group) and exosome treatment group (BMMSCS-Exo group), agonist group, agonist + exosome treatment group. Western blot was used to detect the expression of inflammasome proteins and Cleaved caspase 1, and ELISA was used to detect the release of IL-1 β and IL-18. **Results:** Compared with the Sham group, the ALI group had significantly increased inflammatory infiltration in lung tissue, significantly increased lung injury score ($P < 0.05$), and significantly increased expression of TNF- α and IL-6 in alveolar lavage fluid ($P < 0.05$). Compared with the injury group, the BMSC-Exo group had significantly reduced lung inflammation, significantly reduced lung tissue injury scores ($P < 0.05$), and significantly reduced expression of TNF- α and IL-6 in alveolar lavage fluid ($P < 0.05$). *In vitro* study showed that the protein expression of NLRP3 and AIM2 in alveolar macrophages increased in the LPS group. However, the protein expression of NLRP3 and AIM2 in BMMSCS Exo group was significantly decreased. The inflammasome agonist group increased the expression of Cleaved caspase 1, IL18, and IL-1 β , while exosome treatment significantly inhibited the expression of these proteins ($P < 0.05$). **Conclusion:** The expression of inflammasome NLRP3 and AIM2 is increased in cardiopulmonary bypass (CPB)-induced acute lung injury. Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells can reduce the release of downstream proteins and inflammatory factors by blocking the activation of inflammasome, thereby improving the inflammatory response of CPB induced acute lung injury.

Keywords

Exosomes Derived from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, Acute Lung Injury, Inflammasome

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

急性肺损伤是体外循环术后常见并发症，致死率高且严重影响患者预后[1][2]。炎症反应在急性肺损伤中发挥极为重要的作用[3]。研究表明作为肺部主要的免疫细胞肺泡巨噬细胞的炎症小体被激活后释放大炎症因子，触发炎症反应加重不同类型急性肺损伤进展[4]。当前体外循环所致急性肺损伤的治疗方法包括支持性护理、药物治疗、保护性肺通气和 ECMO 支持等[5]，但是治疗效果仍然不满意[6]。近来研

究表明骨髓间充质干细胞来源的外泌体已成为取代干细胞的有效治疗手段,可改善急性肺损伤[7],但其具体机制尚未阐明。因此本研究探究骨髓间充质干细胞的外泌体对体外循环急性肺损伤并进一步探究其对肺泡巨噬细胞炎症小体的影响。

2. 材料与方法

2.1. 材料

AM NR8383 肺泡巨噬细胞系购自上海中科院细胞库;DMEM 培养基、胎牛血清以及双抗购自美国 Gibco 公司;NIRP3、AIM、Cleaved caspase 1 及 β -actin 抗体,ELISA 检测试剂盒(IL-6, TNF- α , IL-18, IL-1 β)购自武汉 Abclonal 公司;ATP、poly(dA:dT)购自美国 InvivoGen 公司。

2.2. 仪器

超速离心机(Optima XPN-100)购自美国 Beckman Coulter 公司;细胞恒温二氧化碳培养箱(型号:WJ-80G-III)购自上海超泓仪器设备有限公司;高速冷冻离心机(型号:H3-18KR)购自湖南可成仪器设备有限公司;蛋白印迹配套设备(型号:伯乐 bio-rad)购自美国 Bio-rad 公司。

2.3. 试验方法

2.3.1. 体外循环急性肺损伤

该方案参照既往研究设计了一种简易大鼠体外循环(Cardiopulmonary Bypass, 体外循环)模型,整个实验过程中不需要心脏停跳,也不需要开胸,无需输血,基本无需正性肌力药物。大鼠术前禁食 6 h、不禁水。进行麻醉诱导与维持;体外循环建立 1 小时用呼吸机辅助呼吸并监测大鼠体征,结束后待大鼠情况稳定,置于独立温箱;对照组大鼠仅麻醉、通气、插管,不进行体外循环。

2.3.2. 骨髓间充质干细胞的提取

6~8 周龄成年 SD 大鼠脱颈处死后,在无菌状态下分离股骨,DMEM 培养液冲出骨髓,800 r/min 离心 10 min 后用完全培养液(低糖 DMEM、20% FBS)重悬,并接种到培养瓶中,放置 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的细胞孵箱中培养,待细胞融合超过培养瓶底 80%时,0.25%胰蛋白酶消化并传代。为了保证 BMMSC 的纯度,采用第 3 代 BMMSC 进行后续实验。并通过流式细胞术对 BMMSC 的表型(CD34, CD44, CD45, CD90)进行检测。

2.3.3. 外泌体的提取

收集 BMMSC 细胞培养基,3000 g 离心 15 min 去除细胞碎片,上清用 6~7 倍体积 PBS 稀释,13,000 g 离心 30 min 后经 0.22 μ m 滤膜过滤去除大颗粒。收集的上清使用 P50A72-986 转子,4℃ 100,000 g 离心 70 min 获得外泌体 pellet, pellet 用 PBS 重悬后 4℃ 100,000 g 再次离心 70 min,最后加 100 μ l PBS 重悬 pellet 获得外泌体。

2.3.4. 细胞处理

长势良好的 AM NR8383 肺泡巨噬细胞系分别置于不同的细胞培养板中进行培养。Control 组(不作处理,正常培养);LPS 组(500 μ g/L, 24 h);BMMSC-Exo 组(100 μ g, 24 h);激动剂处理组(ATP, 30 min/poly(dA:dT), 8 h)。

2.3.5. Western Blot 实验

细胞在裂解缓冲液中匀浆裂解,4℃, 12,000 r/min 离心 15 min。收集裂解物,蛋白浓度用 BCA 法进行测定。取 20 μ g 总蛋白在 1 $\times$ SDS 缓冲液中煮 7 min,进行 SDS-PAGE 电泳并电转移至硝酸纤维素膜上。硝

酸纤维素膜用含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1.5 h, 然后依次滴加 1:1000 的各种一抗, 4℃ 过夜后 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。然后用 1:5000 的 IgG 二抗孵育 2 h, 然后用 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。最后用 ECL 发光液进行曝光显影, Bio-RAD 照相系统(美国)进行照相并用其附带的软件分析蛋白的相对表达量。

2.3.6. 炎症因子的监测

根据 ELISA 试剂盒说明, 检测 TNF- α 、IL-6、IL-18、IL-1 β 炎症因子的释放情况。

2.3.7. HE 染色

处死大鼠取肺组织, 经过包埋切片、脱蜡并水化、苏木精染色、脱水, 透明, 封片等步骤。显微镜下观察肺组织切片并拍照。并参照 Szapiel 及 Lee 等人的相关标准对在低倍及高倍镜视野下随机选取 5 个以上的区域对病理组织切片根据组织病理表现结果进行评分: 0 分: 无肺炎, 1 分: 轻度肺炎, 肺隔因细胞浸润增宽, 病变范围局限在全肺的 20% 以下; 2 分: 中度肺炎, 病变范围占全肺的 20%~50%; 3 分, 呈弥漫性分布, 病变范围大于 50%。

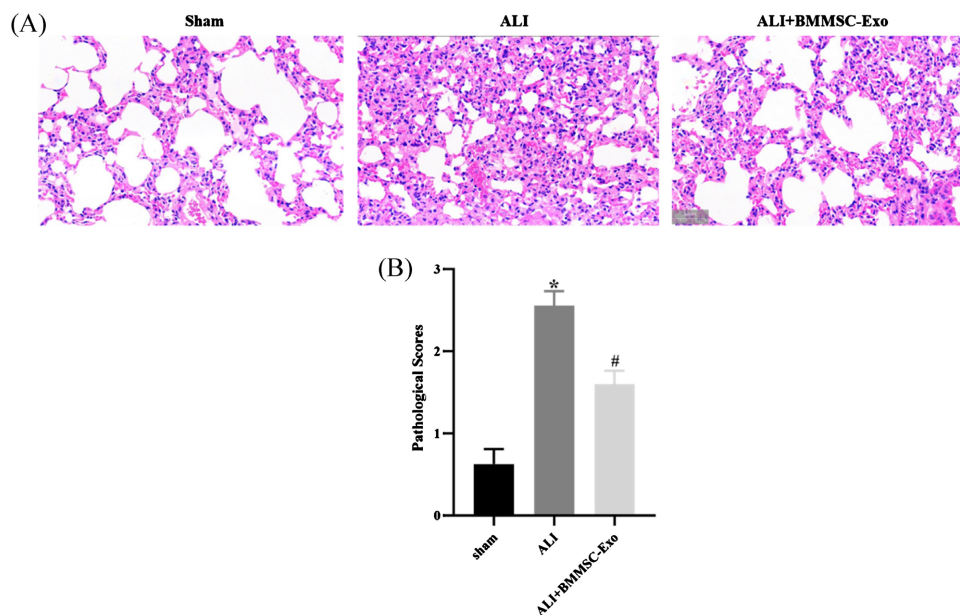
2.4. 统计学处理

SPSS22.0 统计学软件对数据进行统计分析, 两组间差异的比较采用 *t* 检验, 结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

3. 结果

3.1. 骨髓间充质干细胞外泌体改善体外循环急性肺损伤

HE 染色结果表明, 假手术组肺组织中肺泡壁稍薄, 肺泡间隔内未发现充血且肺泡间隔无增宽, 无炎性细胞浸入; 体外循环所致急性肺损伤组肺泡壁毛细血管扩张严重, 肺泡壁充血, 肺泡内可见大量炎性细胞浸润, 肺泡间隔增厚, 肺泡塌陷, 间质水肿; 外泌体治疗组则可见炎症缓解并参见图 1(A)。此外, 我们对病理组织切片根据组织病理表现结果进行评分(见图 1(B))。评分结果显示, 与假手术组相比, 体外



Note: Compared with Sham group, * $P < 0.05$, compared with ALI group, # $P < 0.05$.

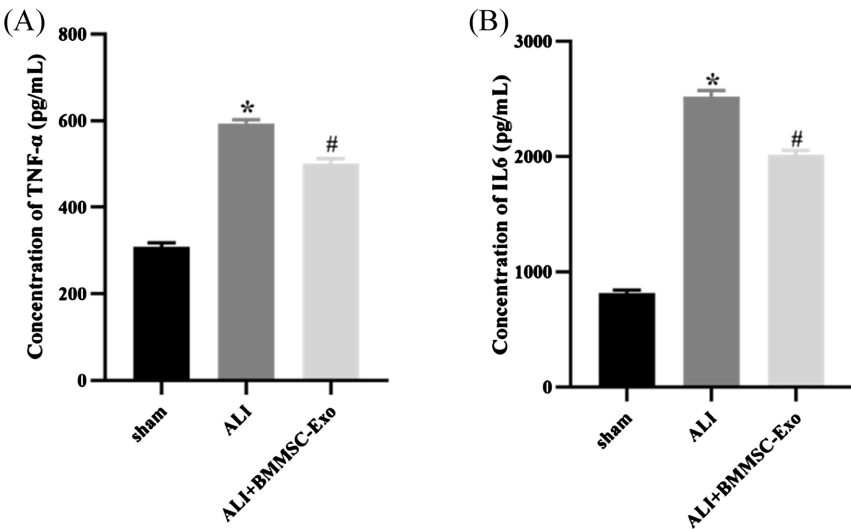
Figure 1. The HE staining and pathological scores results of each group

图 1. 各组 HE 染色及病理评分结果

循环所致急性肺损伤组大鼠肺组织损伤评分明显升高($P < 0.05$), 而外泌体治疗组肺组织损伤评分则较损伤组明显降低($P < 0.05$)。以上结果表明骨髓间充质干细胞外泌体可改善体外循环所致的急性肺损伤。

3.2. 骨髓间充质干细胞外泌体减少体外循环急性肺损伤炎症反应

根据图 2 中 ELISA 结果显示, 与假手术组相比, 体外循环所致急性肺损伤组肺泡灌洗液中 TNF- α 及 IL6 的表达均上调($P < 0.05$); 而外泌体治疗组中 TNF- α 及 IL-6 的表达均明显下调($P < 0.05$), 这表明骨髓间充质干细胞减少体外循环所致急性肺损伤的炎症反应。



Note: Compared with Sham group, * $P < 0.05$, compared with ALI group, # $P < 0.05$.

Figure 2. The ELISA results of each group

图 2. 各组 ELISA 结果

3.3. 骨髓间充质干细胞外泌体减少肺泡巨噬细胞炎症小体 NLRP3 和 AIM2 的表达

为了探究骨髓间充质干细胞外泌体改善体外循环急性肺损伤的具体机制, 我们对 AM NR8383 肺泡巨噬细胞系 LPS 处理 24 小时来体外模拟体外循环急性肺损伤模型, 并给予外泌体处理, 进行 Western blot 实验。在图 3 中可见, 与对照组相比, LPS 处理组肺泡巨噬细胞中炎症小体 NLRP3 和 AIM2 的蛋白表达

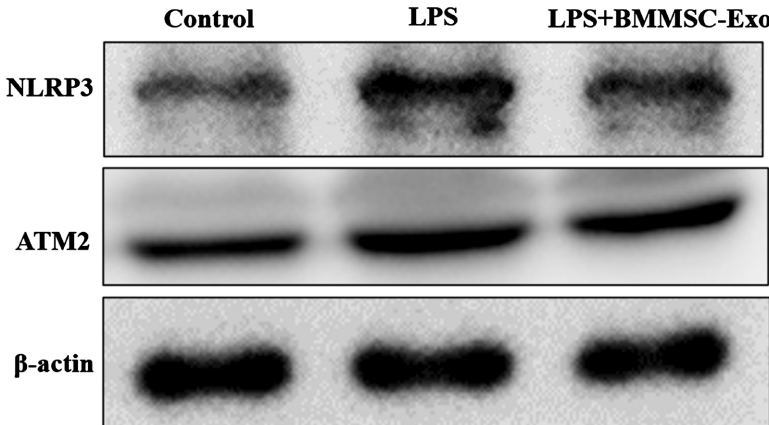


Figure 3. The effects of BMMSC-Exo on inflammasomes NLRP3 and AIM2 in AM NR8383 cells

图 3. 外泌体对 AM NR8383 肺泡巨噬细胞炎症小体 NLRP3 和 AIM2 的蛋白表达的影响

均增加；而外泌体治疗组中 NLRP3 和 AIM2 的蛋白表达均明显降低，这表明骨髓间充质干细胞减少 LPS 诱导的肺泡巨噬细胞炎症小体 NLRP3 和 AIM2 的表达。

3.4. 骨髓间充质干细胞外泌体阻断肺泡巨噬细胞炎症小体 NLRP3 和 AIM2 的激活

为了进一步明确骨髓间充质干细胞外泌体对炎症小体 NLRP3 和 AIM2 的激活情况，我们分别给予 AM NR8383 肺泡巨噬细胞系 ATP (NLRP3 的激活剂)处理 30 分钟，poly(dA:dT) (AIM2 的激活剂)处理 8 小时来激活炎症小体，并给予外泌体处理，进行 western blot 实验炎症小体下游蛋白 Cleaved caspase 1 及炎症因子 IL18 及 IL1 β 的释放情况。在图 4(A)中可见，ATP 及 poly(dA:dT)均增加 Cleaved caspase 1 的蛋白表达，而给予外泌体处理后，Cleaved caspase 1 的蛋白表达均下调。同时，从图 4(B)中可见，ATP 及 poly(dA:dT)均增加 IL18 及 IL1 β 的释放($P < 0.05$)，而给予外泌体处理后，二者的释放均被明显抑制($P < 0.05$)。这些均表明骨髓间充质干细胞外泌体可阻断炎症小体 NLRP3 和 AIM2 的激活，从而减少其下游蛋白炎症因子的释放，改善炎症反应。

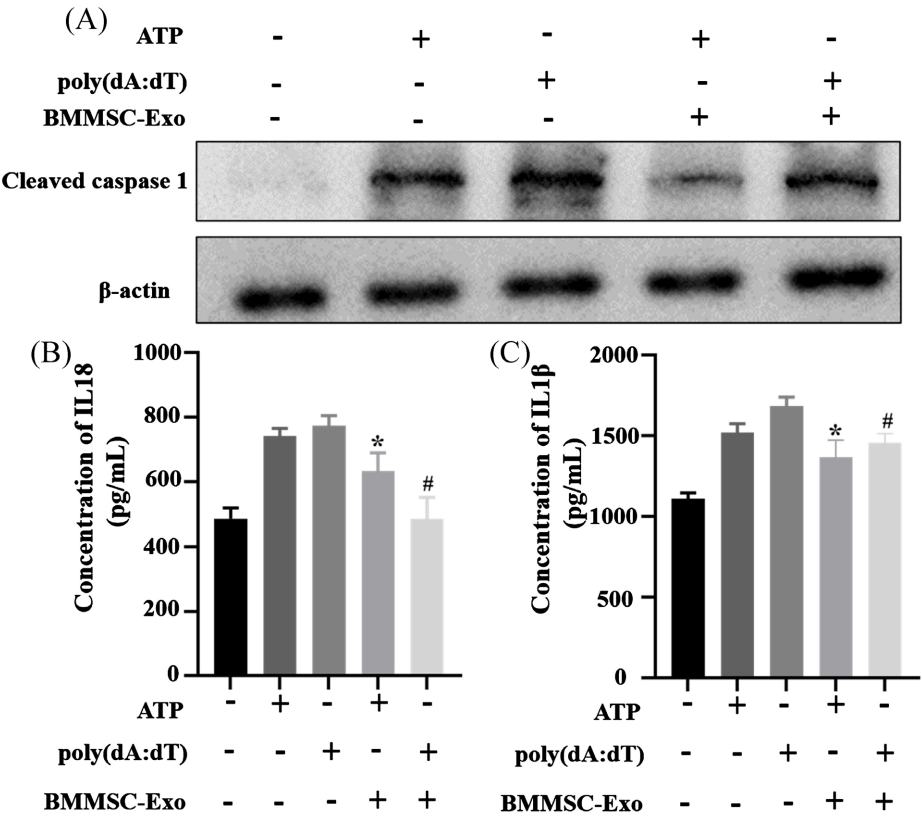


Figure 4. Effect of exosomes on the activation of inflammasome NLRP3 and AIM2 in AM NR8383 alveolar macrophages

图 4. 外泌体对 AM NR8383 肺泡巨噬细胞炎症小体 NLRP3 和 AIM2 激活的影响

4. 讨论

急性肺损伤是体外循环术后常见并发症，严重影响患者预后[8]。尽管当前体外循环导致急性肺损伤的治疗方法很多，但是治疗效果仍然欠佳[9]。研究表明骨髓间充质干细胞来源的外泌体已成为取代其来源细胞的有效治疗手段，可显著改善不同类型急性肺损伤[7]，但其具体机制尚未阐明。

在本研究中, 我们表明骨髓间充质干细胞外泌体可改善体外循环所致急性肺损伤病理改变; 进一步发现外泌体可改善急性肺损伤造成的炎症反应。巨噬细胞炎症反应参与急性肺损伤的进程。急性刺激下, 作为肺部驻足的主要的免疫细胞, 肺泡巨噬细胞的炎症小体被激活后释放大量炎症因子, 触发炎症反应从而加重急性肺损伤进展[10] [11]。炎症小体分为 NLR 家族(例如 NLRP3)和非 NLR 家族(例如 AIM2) [12], 在识别外源性和内源性刺激信号时组装的蛋白质复合物, 并进一步激活经典半胱天冬酶-1 (Caspase 1), 分泌促炎因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)和 IL-18, 从而参与免疫和炎症反应[13]。炎症小体激活与多种肺部疾病有关, 包括急性肺损伤[14] [15]。在急性肺损伤时, 肺实质和驻留免疫细胞中的炎症小体激活, 分泌 IL-1 β 和 IL-18, 进一步驱动肺部炎症反应。在动物模型中, 阻断这种不良的炎症反应已被证明是有益的[16], 并且逐渐成为研究焦点。

在我们的研究中, 我们通过对 AM NR8383 肺泡巨噬细胞系 LPS 处理来体外模拟体外循环急性肺损伤模型, 给予外泌体处理后发现, LPS 处理组肺泡巨噬细胞中炎症小体 NLRP3 和 AIM2 的蛋白表达均增加; 而外泌体治疗组中 NLRP3 和 AIM2 的蛋白表达均明显降低, 这提示骨髓间充质干细胞可能参与阻断肺泡巨噬细胞炎症小体 NLRP3 和 AIM2 的表达。进一步, 我们通过分别给予 NLRP3 和 AIM2 的激活剂处理来激活炎症小体, 并给予外泌体处理, 发现外泌体显著下调炎症小体下游蛋白 Cleaved caspase 1 的表达, 减少炎症因子 IL18 及 IL1 β 的释放。这些均进一步证实骨髓间充质干细胞外泌体可阻断炎症小体 NLRP3 和 AIM2 的激活, 从而减少其下游蛋白炎症因子的释放, 改善炎症反应。

综上所述, 骨髓间充质干细胞外泌体可通过阻断炎症小体的激活, 从而减少其下游蛋白及炎症因子的释放, 从而改善体外循环所致急性肺损伤炎症反应。

基金项目

山东省自然科学基金(ZR2021QH148)。

参考文献

- [1] 中国生物医学工程学会体外循环分会. 2020 年中国心外科手术和体外循环数据白皮书[J]. 中国体外循环杂志, 2021, 19(5): 257-260.
- [2] Ismail, A., Semien, G., Sharma, S., Collier, S.A. and Miskolczi, S.Y. (2024) Cardiopulmonary Bypass. StatPearls Publishing.
- [3] McVey, M.J., Steinberg, B.E. and Goldenberg, N.M. (2021) Inflammasome Activation in Acute Lung Injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, **320**, L165-L178. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00303.2020>
- [4] Zhong, W., Liu, T., Yang, H., Duan, J., Yang, J., Guan, X., et al. (2023) TREM-1 Governs NLRP3 Inflammasome Activation of Macrophages by Firing up Glycolysis in Acute Lung Injury. *International Journal of Biological Sciences*, **19**, 242-257. <https://doi.org/10.7150/ijbs.77304>
- [5] O'Gara, B. and Talmor, D. (2018) Perioperative Lung Protective Ventilation. *British Medical Journal*, **362**, k3030. <https://doi.org/10.1136/bmj.k3030>
- [6] 沈嘉渝, 张尔永, 胡佳. 体外循环急性肺损伤与肺保护策略的研究进展[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2019, 26(2): 186-191.
- [7] Tieu, A., Hu, K., Gnyra, C., Montroy, J., Fergusson, D.A., Allan, D.S., et al. (2021) Mesenchymal Stromal Cell Extracellular Vesicles as Therapy for Acute and Chronic Respiratory Diseases: A Meta-Analysis. *Journal of Extracellular Vesicles*, **10**, e12141. <https://doi.org/10.1002/jev2.12141>
- [8] Nteliopoulos, G., Nikolakopoulou, Z., Chow, B.H.N., Corless, R., Nguyen, B. and Dimarakis, I. (2022) Lung Injury Following Cardiopulmonary Bypass: A Clinical Update. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, **20**, 871-880. <https://doi.org/10.1080/14779072.2022.2149492>
- [9] Hessel, E.A. (2019) What's New in Cardiopulmonary Bypass. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, **33**, 2296-2326. <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2019.01.039>

-
- [10] Zhang, T., Lu, L., Li, M., Zhang, D., Yu, P., Zhang, X., *et al.* (2022) Exosome from BMSC Attenuates Cardiopulmonary Bypass-Induced Acute Lung Injury via Yap/ β -Catenin Pathway: Downregulation of Pyroptosis. *Stem Cells*, **40**, 1122-1133. <https://doi.org/10.1093/stmcls/sxac063>
- [11] Hou, L., Yang, Z., Wang, Z., Zhang, X., Zhao, Y., Yang, H., *et al.* (2018) NLRP3/ASC-Mediated Alveolar Macrophage Pyroptosis Enhances HMGB1 Secretion in Acute Lung Injury Induced by Cardiopulmonary Bypass. *Laboratory Investigation*, **98**, 1052-1064. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0073-0>
- [12] Xie, M., Yu, Y., Kang, R., Zhu, S., Yang, L., Zeng, L., *et al.* (2016) PKM2-Dependent Glycolysis Promotes NLRP3 and AIM2 Inflammasome Activation. *Nature Communications*, **7**, Article No. 13280. <https://doi.org/10.1038/ncomms13280>
- [13] Latz, E., Xiao, T.S. and Stutz, A. (2013) Activation and Regulation of the Inflammasomes. *Nature Reviews Immunology*, **13**, 397-411. <https://doi.org/10.1038/nri3452>
- [14] Jiao, Y., Zhang, T., Zhang, C., Ji, H., Tong, X., Xia, R., *et al.* (2021) Exosomal miR-30d-5p of Neutrophils Induces M1 Macrophage Polarization and Primes Macrophage Pyroptosis in Sepsis-Related Acute Lung Injury. *Critical Care*, **25**, Article No. 356. <https://doi.org/10.1186/s13054-021-03775-3>
- [15] Zhong, W., Yang, H., Guan, X., Xiong, J., Sun, C., Zhang, C., *et al.* (2018) Inhibition of Glycolysis Alleviates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in a Mouse Model. *Journal of Cellular Physiology*, **234**, 4641-4654. <https://doi.org/10.1002/jcp.27261>
- [16] Zeng, J., Liu, J., Huang, J., Fu, S., Wang, X., Xi, C., *et al.* (2023) Aloperine Alleviates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation. *International Immunopharmacology*, **120**, Article 110142. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.110142>