

SS-31 抑制 O₃ 介导的小鼠气道高反应和黏液高分泌

谢梅琴¹, 李忱菲², 刘琪², 翁佳丽², 张海², 李锋², 范晓云¹

摘要 目的 探讨线粒体靶向抗氧化肽 SS-31 是否能够抑制臭氧(O₃)介导的小鼠肺部气道高反应性和黏液高分泌。方法 将8周C57BL/6健康小鼠随机分为磷酸缓冲盐溶液组(PBS组)+空气组(Air组)、SS-31+Air组、PBS+O₃组、SS-31+O₃组。O₃暴露前1h,C57BL/6小鼠接受腹腔注射SS-31(10 mg/kg),小鼠单次暴露于O₃环境,浓度5.01×10⁻⁶ mol/m³时间持续3h。24h后,测定小鼠的气道高反应(AHR)、支气管肺泡灌洗液(BALF)细胞计数,肺组织过碘酸雪夫染色(PAS)、肺组织丙二醛(MDA)、白介素(IL)-1β、IL-6、IL-18、单核细胞趋化因子-1(MCP-1)及黏液分子(MUC5B)的mRNA表达水平,Western blot检测NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)、半胱氨酸蛋白酶-1前体(pro-Caspase 1)/血清半胱氨酸蛋白酶-1剪切体Caspase 1(p20)、Gasdermin家族蛋白D(GSDMD)/Gasdermin家族蛋白D剪切体(Cleaved GSDMD)蛋白水平。结果 O₃暴露引起小鼠气道高反应和黏液分泌增加。而SS-31能够抑制O₃介导的气道高反应和黏液分泌,降低O₃诱导的氧化应激水平和炎症因子mRNA水平表达,下调NLRP3表达水平、Caspase 1和GSDMD活化形式。结论 SS-31通过抑制NLRP3/Caspase 1/GSDMD信号通路以抑制O₃介导的小鼠气道高反应和黏液高分泌。

关键词 SS-31; 臭氧; 氧化应激; 气道高反应; 黏液高分泌
中图分类号 R 364.5; R 392.11; R 392.12; R 562.23; R 563.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)06-0908-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.005

臭氧(O₃)是一种典型的二级空气污染物,主要是由氮氧化物和挥发性有机化合物在光合作用下形成。中国是全球臭氧水平最高的国家之一,随着气

候变暖,夏季O₃在空气中的含量大幅增加。研究^[1]表明,O₃与人体健康相互关联,短期O₃暴露与呼吸系统的病死率和发病率增加有关,而长期O₃暴露会导致一些慢性呼吸系统疾病,如非嗜酸粒细胞性哮喘和慢性阻塞性肺疾病。O₃暴露可引起气道上皮细胞急性损伤、炎症、气道高反应性和黏液高分泌,从而导致气道发生刺激性反应,包括咳嗽、支气管收缩和炎症细胞浸润并导致小气道功能异常^[2]。

线粒体是负责能量代谢的细胞器,在维持细胞功能中起着重要作用^[3]。最近的研究^[4]表明,O₃可引起线粒体功能障碍,并触发机体的炎症反应和氧化应激反应。炎症小体NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3,NLRP3)可由多种危险情况触发,包括感染和代谢失调,活性氧(reactive oxygen species,ROS)诱导的半胱氨酸残基氧化可能促进半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase 1)介导的Gasdermin家族蛋白D(Gasdermin D,GSDMD)裂解和激活^[5]。SS-31是一种新型的线粒体靶向抗氧化复合物,可以消除ROS,减轻线粒体功能障碍和氧化损伤。目前尚不清楚SS-31是否能抑制O₃诱导的气道高反应和黏液高分泌。因此,该研究旨在探究SS-31能否通过抑制NLRP3/Caspase 1/GSDMD信号通路在O₃介导的气道高反应性和黏液高分泌模型中发挥保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 所有相关实验均得到了实验动物伦理委员会的批准。6~8周龄SPF级雄性C57BL/6小鼠,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,饲养于上海交通大学医学院附属胸科医院实验动物中心。实验前适应性喂养1周,给予适宜的环境及充足的食物和水。

1.2 仪器与试剂 臭氧产生仪购自德国比森多夫公司;气道高反应仪购自英国EMMS公司;酶标仪购自美国Thermo Fisher公司;蛋白印迹自动成像仪购自美国Bio-Rad公司;SS-31购自上海强耀生物科技有限公司;乙酰胆碱(acetylcholine,Ach)购自Sig-

2023-03-11 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81870031);上海交通大学“交大之星”计划医工交叉研究基金重点项目(编号:YG2019ZDA24)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院老年呼吸与危重症医学科,合肥 230022

²上海交通大学医学院附属胸科医院呼吸与危重症医学科,上海 200030

作者简介:谢梅琴,女,硕士研究生;

范晓云,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: 13956988552@126.com

ma-Aldrich 上海贸易有限公司; 刘氏染液和 PAS 染液均购自珠海贝索生物技术有限公司; TRIzol 试剂、Prime Script™ RT Master Mix Kit、Power Green qPCR mix 均购自大连 TaKaRa 公司; 丙二醛(malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒、谷胱甘肽(glutathione, GSH)/谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG) 检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5×) 均购自上海碧云天生物技术有限公司; β -actin、白介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6、IL-18、单核细胞趋化因子-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 和 MUC5B 均购自上海迈浦生物科技有限公司; GAPDH、 β -actin、NLRP3、pro-Caspase 1、GSDMD、Cleaved GSDMD 均购自美国 Cell Signaling 公司; Caspase 1(p20) 购自上海远慕生物科技有限公司。

1.3 动物分组与处理 将 32 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为磷酸盐缓冲液(PBS) + Air 组、SS-31 + Air 组、PBS + O₃ 组、SS-31 + O₃ 组, 每组各 8 只。各组在空气或 O₃ 暴露前 1 h 腹腔注射 PBS 或 SS-31 (10 mg/kg, 溶于 PBS)。将 PBS + O₃ 组和 SS-31 + O₃ 组放在一个由发电机产出 5.01×10^{-6} mol/m³ 浓度 O₃ 的全身暴露室(65 cm × 45 cm × 37 cm) 中, 暴露 3 h。PBS + Air 组和 SS-31 + Air 组小鼠暴露在过滤后的空气中。

1.4 气道反应检测 24 h 后将 0.2 ml 的 1% 戊巴比妥注射到小鼠腹腔, 通过气管切开、气管插管, 连接小鼠气道与气道高反应检测仪。首先暴露于雾化 PBS(建立基线), 逐渐增加雾化 Ach 浓度(0、8、16、32、64、128、256 mg/ml)。每一剂量 Ach 持续 30 s, 记录呼吸测量值并在雾化开始 7 min 内取平均值作为参考数据。记录肺阻力(lung resistance, RL) 值计算比基线增加 100% 所需的乙酰胆碱浓度(PC₁₀₀), 并以 -logPC₁₀₀ 作为支气管反应性的衡量指标。

1.5 支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 气道高反应检测完后, 用过量的戊巴比妥处死小鼠。经气管内管向小鼠气道内灌注 2 ml PBS, 回收 BALF。然后将 BALF 放于 4 °C 下以 1 000 r/min 离心 10 min。上清液放于 -80 °C 下保存, 以供进一步测定。取 0.2 ml PBS 重悬细胞颗粒, 进行总细胞计数, 再用刘氏染色液染色, 400 倍镜下计数至少 500 个细胞。

1.6 组织病理学分析 取小鼠左肺, 用 10% 福尔马林灌注固定, 用石蜡包埋。石蜡切片, 制备约 4 μ m 厚的肺组织切片进行 PAS 染色, 评估支气管周

围的黏液分泌情况, 0 级(无杯状细胞)、1 级(< 25%)、2 级(25% ~ 50%)、3 级(51% ~ 75%) 和 4 级(> 75%)。计算每只小鼠的平均杯状细胞增生评分。

1.7 氧化应激水平检测 取适量新鲜的肺组织, 加入细胞/组织裂解液匀浆后 4 °C 9 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液。然后用 BCA 检测试剂盒测定蛋白质浓度, 酶标仪测定 532 nm 处吸光度, 计算 MDA 的含量。

用蛋白去除试剂将肺组织 10 mg 均质, 取混合物 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。总的水平测定了肺组织中的 GSH 和 GSSG 波长为 412 nm, 计算 GSH/GSSG 的值。

1.8 炎症因子检测 采用 qRT-PCR 方法检测炎症因子(IL-1 β 、IL-6、IL-18 和 MCP-1) 和黏液蛋白(MUC5B) 的 mRNA 水平。根据产品说明, 用 TRIzol 试剂从组织中提取总 RNA, 测定总 RNA 的浓度。利用 HiScript II qRT SuperMix II 合成了单链互补 DNA(cDNA), 将得到的 cDNA 作为后续 qRT-PCR 分析的模板。RT-PCR 过程采用 ChamQ 通用 SYBR qPCR 主混合物和 ABI ViiATM7 系统进行。引物序列见表 1。

表 1 炎症因子和黏液蛋白分子的引物序列

基因名称	引物序列(5' - 3')
IL-1 β	F: ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA R: GTCGAGATTCTAGCTGGA
IL-6	F: CTCCAACAGACCTGTCTATAC R: CCATGACACAACCTTTTCTCA
IL-18	F: AGACCTGGAATCAGACAACITTT R: TCAGTCATATCCTCGAACACAG
MCP-1	F: TTTTGTGACCAAGCTCAAGAG R: TTCTGATCTCATTTGGTTCCGA
MUC5B	F: AGTGCTTCGTGAGGTTGGCTTTATC R: GCTTGTCTGGCTCCTTCTCTGAAC
β -actin	F: ATTGCTGACAGGATGCAGA R: GAGTACTTGCGCTCAGGAGGA

1.9 Western blot 分析 采用 Western blot 检测 NLRP3、pro-Caspase 1、Caspase 1(p20)、GSDMD 和 Cleaved GSDMD 的表达。取适量小鼠肺组织, RIPA 缓冲液匀浆提取总蛋白, 使用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。总蛋白质样品分离使用 10% SDS-PAGE 电泳后, 将蛋白转移到 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 放入一抗稀释液(1 : 1 000) 中, 4 °C 摇床过夜。使用 HRP 偶联的山羊抗兔和抗鼠二抗(1 : 3 000) 在室温下孵育 2 h。TBST 洗涤膜后, 用 ECL 检测系统观察条带。

1.10 统计学处理 使用 GraphPad Prism 9.41 软件制图并进行单因素方差分析,所有数值采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。假设检验水准按 $\alpha = 0.05$ 判定, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SS-31 对 O₃ 介导的气道高反应和 BALF 炎症细胞数量的影响 与 PBS + Air 组相比, O₃ 暴露诱导了明显的气道高反应; 与 PBS + Air 组相比, SS-31 + Air 组的气道反应性没有明显变化。与 PBS + O₃ 组相比, SS-31 预处理抑制 O₃ 引起气道高反应。O₃ 降低了 -logPC₁₀₀ (1.957 ± 0.302, $P < 0.05$), 而 SS-31 预处理升高了 -logPC₁₀₀ (2.421 ± 0.136, $P < 0.01$)。O₃ 增加了小鼠 BALF 中的细胞总数 (34.750 ± 3.655, $P < 0.01$)、巨噬细胞数 (20.733 ± 3.355, $P < 0.05$)、中性粒细胞数 (8.708 ± 1.960, $P < 0.01$)、嗜酸粒细胞数 (0.929 ± 0.405, $P < 0.05$) 及淋巴细胞数 (4.381 ± 0.887, $P < 0.05$) 均增高。SS-31 预处理增加了小鼠 BALF 中的细胞总数 (28.875 ± 4.299, $P < 0.01$)、中性粒细胞数 (6.345 ± 1.336, $P < 0.01$)、嗜酸粒细胞数 (0.601 ± 0.214, $P < 0.05$) 及淋巴细胞数 (2.615 ± 1.314, $P < 0.01$) 均降低。见图 1。

2.2 SS-31 对 O₃ 介导的气道黏液产生的影响 与 PBS + Air 组相比, O₃ 暴露诱导明显的气道上皮黏液分泌, 杯状细胞增生积分增加 (0.611 ± 0.251, $P < 0.001$)。与 PBS + Air 组相比, SS-31 + Air 组的气道上皮黏液分泌没有明显变化。与 PBS + O₃ 组相比, SS-31 预处理抑制 O₃ 引起的气道黏液高分泌, 且气道上皮杯状细胞增生积分下降 (0.167 ± 0.183, $P < 0.001$)。见图 2。

2.3 SS-31 对 O₃ 介导的肺部氧化应激水平的影响

O₃ 增加了小鼠肺组织 MDA 水平 (67.67 ± 58.45, $P < 0.01$), SS-31 预处理降低 O₃ 暴露诱导的 MDA 水平 (51.08 ± 33.73, $P < 0.001$)。O₃ 降低了 GSH/GSSG 的比值 (0.51 ± 0.184, $P < 0.05$), SS-31 预处理提高了 GSH/GSSG 的比值 (1.486 ± 0.819, $P < 0.01$)。见图 3。

2.4 SS-31 对 O₃ 介导的炎症因子和黏液蛋白水平的影响

与 PBS + Air 组相比, PBS + O₃ 组小鼠肺组织炎症因子, 包括 IL-1 β (2.039 ± 0.992, $P < 0.001$)、IL-6 (3.055 ± 0.713, $P < 0.001$)、IL-18 (1.832 ± 0.362, $P < 0.05$)、MCP-1 (1.843 ± 0.409, $P < 0.01$) 和黏液蛋白 MUC5B (2.434 ± 1.786, $P < 0.05$) 的 mRNA 水平增加。SS-31 预处理抑制 O₃ 暴露诱导的炎症因子 IL-1 β (1.238 ± 0.646, $P < 0.05$)、IL-6 (1.702 ± 0.71, $P < 0.01$)、IL-18 (0.739 ± 0.321, $P < 0.001$)、MCP-1 (1.141 ± 0.473, $P < 0.05$) 和黏液蛋白 MUC5B (0.964 ± 0.553, $P < 0.05$) mRNA 水平的表达。见图 4。

2.5 SS-31 对 O₃ 引起的 NLRP3 的表达及 Caspase 1 和 GSDMD 的活化水平的影响

与 PBS + Air 组相比, PBS + O₃ 组小鼠肺组织炎症小体 NLRP3 表达水平增加 (1.007 ± 1.131, $P < 0.05$), Caspase 1 (1.118 ± 0.226, $P < 0.05$) 和 GSDMD (0.967 ± 0.272, $P < 0.05$) 的活化增强。SS-31 预处理降低 O₃ 暴露引起的 NLRP3 (0.736 ± 0.177, $P < 0.05$) 及 Caspase 1 (0.698 ± 0.174, $P < 0.01$) 和 GSDMD (0.592 ± 0.205, $P < 0.01$) 的活化水平。见图 5。

3 讨论

ROS在氧化应激、气道炎症、上皮细胞损伤、黏

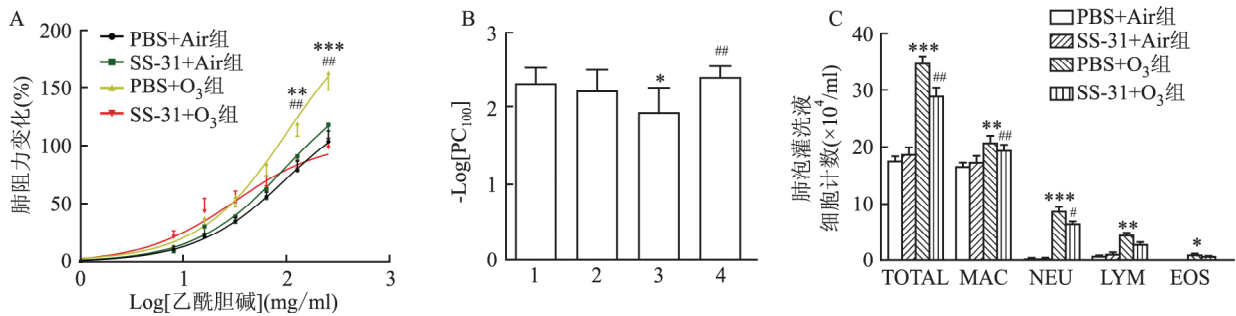


图1 SS-31 抑制了 O₃ 诱导的气道高反应和 BALF 炎症细胞数

A: 乙酰胆碱浓度的增加对肺阻力 (RL) 平均百分比的改变; B: 气道高反应指标 -LogPC₁₀₀; C: 肺泡灌洗液炎症细胞数量改变总细胞 (TOTAL)、巨噬细胞 (MAC)、淋巴细胞 (LYM)、中性粒细胞 (NEU) 和嗜酸粒细胞 (EOS); 1: PBS + Air 组; 2: SS-31 + Air 组; 3: PBS + O₃ 组; 4: SS-31 + O₃ 组; 与 PBS + Air 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 PBS + O₃ 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

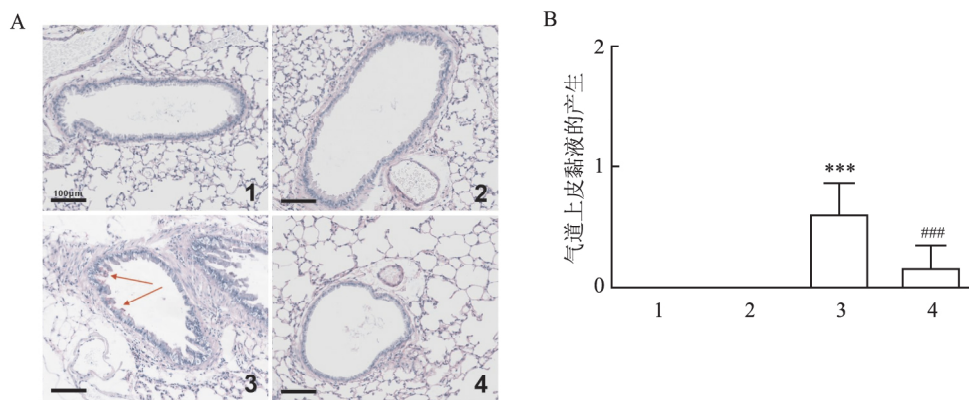


图2 SS-31 抑制 O₃ 介导小鼠气道黏液产生

A: 肺组织 PAS 染色 ×20; B: PAS 染色气道上皮阳性细胞数量评分; 1: PBS + Air 组; 2: SS-31 + Air 组; 3: PBS + O₃ 组; 4: SS-31 + O₃ 组; 与 PBS + Air 组比较: *** $P < 0.001$; 与 PBS + O₃ 组比较: ### $P < 0.001$

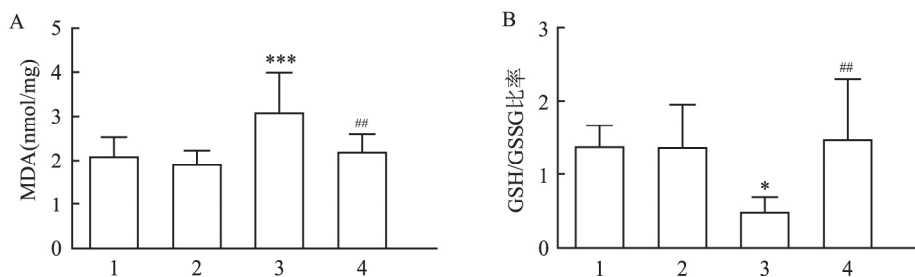


图3 SS-31 对 O₃ 诱导的肺部氧化应激的影响

A: 肺部 MDA 表达水平变化; B: 肺部 GSH/GSSG 比值变化; 1: PBS + Air 组; 2: SS-31 + Air 组; 3: PBS + O₃ 组; 4: SS-31 + O₃ 组; 与 PBS + Air 组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; 与 PBS + O₃ 组比较: ## $P < 0.01$

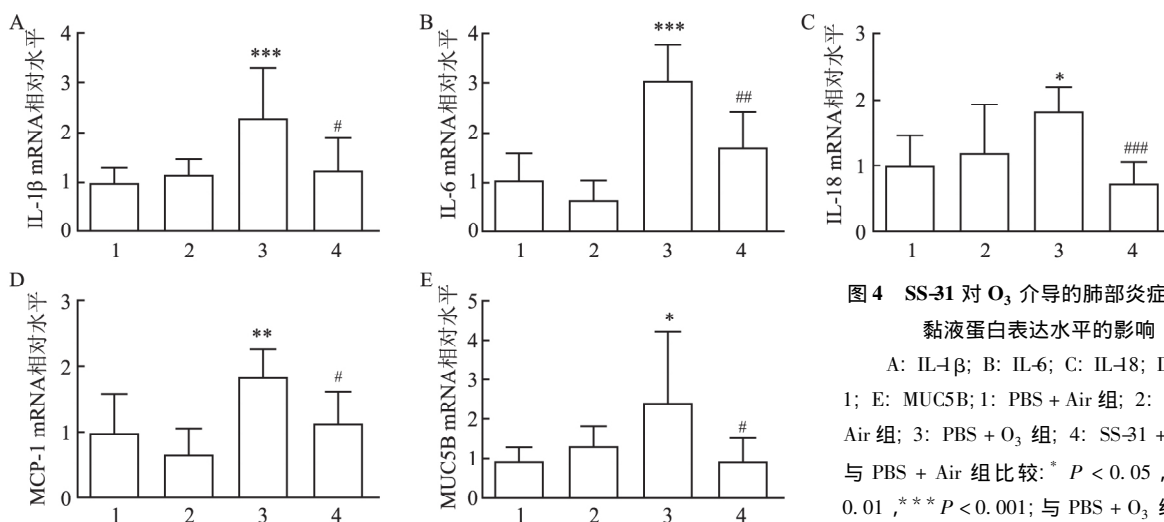


图4 SS-31 对 O₃ 介导的肺部炎症因子和黏液蛋白表达水平的影响

A: IL-1β; B: IL-6; C: IL-18; D: MCP-1; E: MUC5B; 1: PBS + Air 组; 2: SS-31 + Air 组; 3: PBS + O₃ 组; 4: SS-31 + O₃ 组; 与 PBS + Air 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 PBS + O₃ 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

液分泌等过程中起着关键作用。炎症细胞在吞噬过程中产生大量 ROS,同时,组织细胞如上皮细胞、平滑肌细胞在炎症状态下也可以产生 ROS^[6]。线粒体及其电子传递链是产生 ROS 的主要细胞器之一。

O₃ 诱导的氧化应激可能参与炎症小体 NLRP3 复合物的激活。小鼠急性臭氧暴露和慢性臭氧暴露均通过 Caspase 激活的炎症小体 NLRP3 激活 ROS 并诱导肺部炎症和氧化应激,该过程的发生、发展需要通

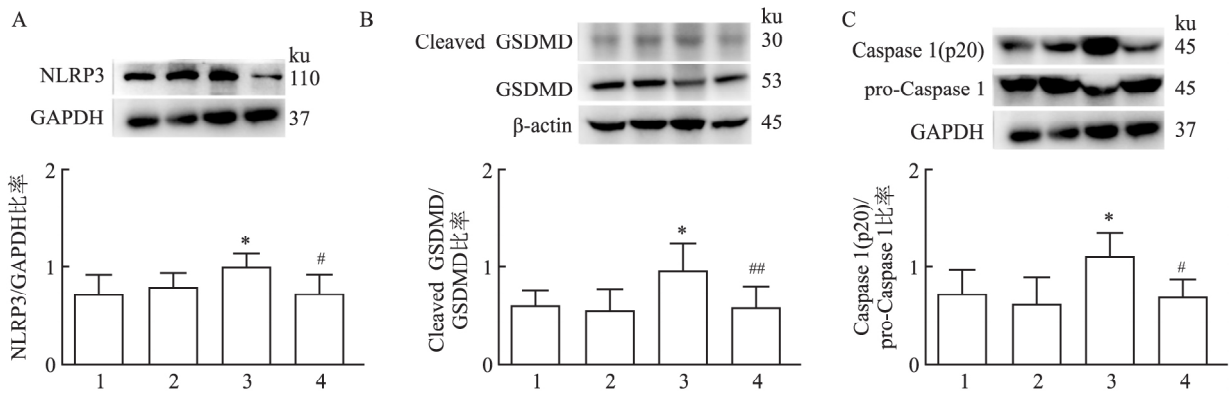


图5 NLRP3/Caspase 1/GSDMD 蛋白表达水平

A: NLRP3 蛋白表达水平变化; B: Caspase 1 (p20) /pro-Caspase 蛋白表达水平变化; C: GSDMD 蛋白表达水平变化; 1: PBS + Air 组; 2: SS-31 + Air 组; 3: PBS + O₃ 组; 4: SS-31 + O₃ 组; 与 PBS + Air 组比较: * P < 0.05; 与 PBS + O₃ 组比较: # P < 0.05, ## P < 0.01

过炎症小体 NLRP3 激活 Caspase 1, 促进 pro-IL-1β 和 pro-IL-18 向成熟的 IL-1β 和 IL-18 的转化, 裂解的 GSDMD 穿透细胞膜^[7]。在烟草暴露模型中, 烟草能够激活炎症小体 NLRP3, 提高 Caspase 1、IL-1β 和 IL-18 的表达水平, 并增强 Caspase 1 的活性^[8]。因此, 该研究使用 MDA 为氧化应激的标志物(膜脂质过氧化物指数), SS-31 抑制 O₃ 介导的肺组织 MDA 水平。同时 SS-31 也降低炎症小体 NLRP3 蛋白水平和 Caspase 1、GSDMD 活性水平表达增加。

气道高反应性是哮喘和气道炎症的一个重要特征, 一些外部环境因素, 如烟草、细菌和病毒感染, 是气道高反应的高危因素。了解气道高反应性的发生机制对于阐明哮喘的发病是至关重要的, 而气道高反应性的程度与哮喘的严重程度密切相关。然而, 迄今为止, 导致气道高反应的潜在分子机制尚未完全了解。近期研究^[9]表明, 臭氧暴露可增加急性期细胞因子, 包括 IL-1、IL-6、IL-8、IL-18 和一些趋化因子。IL-6 可以通过选择性地调节急慢性炎症中的趋化因子和细胞因子, 在炎症反应中招募白细胞。IL-1 和 TNF-α 等促炎细胞因子的合成和释放可以增加对 Ach 和气道中性粒细胞和肺泡巨噬细胞的反应性^[10]。氧化应激可导致炎症反应加重并且诱导气道高反应。在对小鼠急性 O₃ 暴露模型的研究中, 线粒体靶向抗氧化剂 SS-31 能够抑制由 O₃ 介导的气道高反应和 BALF 中炎症细胞, 降低肺组织炎症因子(IL-1β、IL-6、IL-18 和 MCP-1) mRNA 表达水平。

气道黏液高分泌是哮喘重要的病理特征。气道黏液主要是由糖蛋白、脂质、非糖蛋白、无机盐、水组成。在 O₃ 刺激下, 小鼠气道黏液分泌增多, 会引起纤毛功能障碍, 阻塞气道, 影响有效呼吸运动^[11]。

MUC5B 是由杯状细胞产生, 研究表明哮喘气道上皮杯状细胞增生明显, 肺组织中 MUC5B mRNA 也会明显升高。然而, O₃ 诱导的非嗜酸性粒细胞哮喘增强气道黏液分泌的潜在分子机制目前尚不清楚。有研究^[12]表明, O₃ 诱导的氧化应激可能参与黏液蛋白的分泌。MCP-1 是 CC 趋化因子家族的一员, 是一种重要的促炎细胞因子, 主要是由肺上皮细胞产生, 介导单核细胞到达受损组织, 参与增加血管通透性, 加重组织炎症。研究表明, 在烟草刺激下, MCP-1 可以通过其受体 CCR2 诱导趋化并激活支气管上皮细胞黏蛋白相关作用的激酶如 MAPK, MCP-1 表达增强与黏液蛋白 MUC5AC 和 MUC5B 蛋白表达增加有关^[13]。而 PM2.5 可通过刺激气道上皮细胞而引起黏液的过度分泌, 同时, 黏液蛋白 MUC5B 在控制 PM2.5 诱导的炎症反应中起着关键作用, 具有控制炎症和维持免疫稳定性的功能^[14]。此外, 炎症小体 NLRP3 可以调节气道上皮细胞功能, NLRP3 可介导鼻病毒诱导的炎症、焦亡和黏液分泌^[15]。该研究表明 O₃ 不仅介导气道黏液高分泌, 而且促进小鼠肺组织的黏液蛋白 MUC5B、炎症小体 NLRP3 和 IL-1β 的表达。

参考文献

- [1] Niu Y, Yang T, Gu X, et al. Long-term ozone exposure and small airway dysfunction: the China Pulmonary Health (CPH) study [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2022, 205(4): 450-8.
- [2] Sokolowska M, Quesniaux V F J, Akdis C A, et al. Acute respiratory barrier disruption by ozone exposure in mice [J]. Front Immunol, 2019, 10: 2169.
- [3] Yang D Q, Zuo Q N, Wang T, et al. Mitochondrial-targeting antioxidant SS-31 suppresses airway inflammation and oxidative stress induced by cigarette smoke [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021,

- 2021: 6644238.
- [4] Wiegman C H , Li F , Ryffel B , et al. Oxidative stress in ozone-induced chronic lung inflammation and emphysema: a facet of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Front Immunol* , 2020 , 11: 1957.
- [5] Yang S K , Han Y C , He J R , et al. Mitochondria targeted peptide SS-31 prevent on cisplatin-induced acute kidney injury *via* regulating mitochondrial ROS-NLRP3 pathway [J]. *Biomed Pharmacother* , 2020 , 130: 110521.
- [6] Kirkham P A , Barnes P J. Oxidative stress in COPD [J]. *Chest* , 2013 , 144(1) : 266 - 73.
- [7] Gasse P , Riteau N , Charron S , et al. Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis [J]. *Am J Resp Crit Care* , 2009 , 179(10) : 903 - 13.
- [8] Zhang M Y , Jiang Y X , Yang Y C , et al. Cigarette smoke extract induces pyroptosis in human bronchial epithelial cells through the ROS/NLRP3/caspase-1 pathway [J]. *Life Sci* , 2021 , 269: 119090.
- [9] Mishra V , Diangelo S L , Silveyra P. Sex-specific IL-6-associated signaling activation in ozone-induced lung inflammation [J]. *Biol Sex Differ* , 2016 , 7: 16.
- [10] Townley R G , Horiba M. Airway hyperresponsiveness: a story of mice and men and cytokines [J]. *Clin Rev Allerg Immu* , 2003 , 24(1) : 85 - 110.
- [11] 陈竹彭 , 陶琼 , 等. 清气化痰汤对哮喘小鼠肺组织TLR4 和 MUC5AC 表达影响 [J]. *安徽医科大学学报* , 2018 , 53(8) : 1203 - 9 , 1216.
- [12] Wang X , Wang Z , Tang D. Aerobic exercise alleviates inflammation , oxidative stress , and apoptosis in mice with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Int J Chronic Obstr* , 2021 , 16: 1369 - 79.
- [13] Monzon M E , Forteza R M , Casalino-matsuds S M. MCP-1 / CCR2B-dependent loop upregulates MUC5AC and MUC5B in human airway epithelium [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* , 2011 , 300(2) : L204 - 15.
- [14] Zhou L , Liu H , Zhang R , et al. MUC5B regulates the airway inflammation induced by atmospheric PM2.5 in rats and A549 cells [J]. *Ecotox Environ Safe* , 2021 , 221: 112448.
- [15] Liu T , Zhou Y T , Wang L Q , et al. NOD-like receptor family , pyrin domain containing 3 (NLRP3) contributes to inflammation , pyroptosis , and mucin production in human airway epithelium on rhinovirus infection [J]. *J Allergy Clin Immun* , 2019 , 144(3) : 777 - 87 , e9.

SS-31 inhibits O₃-mediated airway hyperresponsiveness and mucus hypersecretion in mice

Xie Meiqin¹ , Li Chenfei² , Liu Qi² , Weng Jiali² , Zhang Hai² , Li Feng² , Fan Xiaoyun¹
 (¹*Geriatric Respiratory and Critical Care , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022;* ²*Respiratory and Critical Care , Shanghai Chest Hospital , Shanghai Jiao Tong University of Medicine , Shanghai 200030*)

Abstract Objective To investigate whether Mitochondria-targeted antioxidant peptide SS-31 can inhibit the ozone (O₃) -induced mice lung airway hyperresponsiveness and mucus hypersecretion. **Methods** Eight-week C57BL/6 mice were randomized into four groups , including phosphate buffer saline (PBS) + Air group , SS-31 + Air group , PBS + O₃ group and SS-31 + O₃ group. C57BL/6 mice were injected intraperitoneally with SS-31 (10 mg/kg) one hour before ozone exposure , and then single-exposed to ozone at a concentration of 5.01 × 10⁻⁶ mol/m³ for 3 hours. After 24 hours , airway hyperresponsiveness(AHR) and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cells numbers were measured. Lung tissue schiff periodic acid schiff (PAS) staining , malondialdehyde (MDA) , inflammatory factors (interleukin , IL) -1β , IL-6 , IL-18 and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)) and mucin factor (MUC5B) were detected , and the protein expression levels of NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3) , pro-Caspase 1/Caspase 1 (p20) , Gasdermin D (GSDMD) and Cleaved GSDMD were determined by Western blot. **Results** O₃ exposure caused both mice lung airway hyperresponsiveness and mucus hypersecretion. However , SS-31 could inhibit the O₃-induced airway hyperresponsiveness and mucus secretion , reduce the levels of oxidative stress and inflammatory factor mRNA expression , and downregulate the protein expression level of NLRP3 and the activated forms of Caspase 1 and GSDMD. **Conclusion** SS-31 could suppress O₃-induced mice airway hyperresponsiveness and mucus hypersecretion by inhibiting the NLRP3/Caspase 1/GSDMD signaling pathway.

Key words SS-31; ozone; oxidative stress; airway hyperresponsiveness; mucus hypersecretion