

· 基础研究 ·

百草枯染毒肺泡上皮细胞中 KCa3.1 对 NLRP3 炎症小体的调控作用

孟潇潇 朱勇 杨雯雨 张嘉祥 王瑞兰 田锐

上海交通大学附属第一人民医院急诊危重病科, 201620

通信作者: 田锐, Email: thunder021@hotmail.com

【摘要】目的 探讨百草枯(PQ)染毒肺泡上皮细胞内 KCa3.1 对 NLRP3 炎症小体的调控作用。**方法** 体外培养 A549 细胞,分为对照组、TRAM-34(KCa3.1 的特异性抑制剂)组、PQ 组及 PQ+TRAM-34 组。免疫荧光检测细胞中 KCa3.1 的变化。Western Blot 检测 NLRP3 炎症小体相关蛋白及 NIMA 相关激酶 7(NEK7)蛋白的表达。细胞钾离子浓度变化比色法定量检测试剂盒检测钾离子的变化。**结果** 免疫荧光结果提示 A549 细胞染毒后, KCa3.1 表达明显增加。Western Blot 结果提示 PQ 处理后, A549 细胞内 NLRP3 炎症小体(相关蛋白 NLRP3、ASC、Caspase-1)及 NEK7 蛋白表达明显升高;抑制 KCa3.1 后, NLRP3 炎症小体及 NEK7 表达减少;且差异具有统计学意义[NLRP3 蛋白(NLRP3/ β -actin, 对照组比抑制剂组比染毒组比染毒+抑制剂组): (0.02 ± 0.00) vs (0.03 ± 0.00) vs (0.74 ± 0.00) vs (0.32 ± 0.01)]; ASC 蛋白(ASC/ β -actin, 对照组比抑制剂组比染毒组比染毒+抑制剂组): (0.12 ± 0.01) vs (0.11 ± 0.03) vs (0.46 ± 0.02) vs (0.17 ± 0.03)]; Caspase-1 蛋白(Caspase-1/ β -actin, 对照组比抑制剂组比染毒组比染毒+抑制剂组): (0.05 ± 0.00) vs (0.04 ± 0.00) vs (0.34 ± 0.03) vs (0.15 ± 0.01)]; NEK7 蛋白(NEK7/ β -actin, 对照组比染毒组比染毒+抑制剂组): (0.38 ± 0.03) vs (0.83 ± 0.02) vs (0.51 ± 0.01) , 均 $P < 0.01$]。比色法检测结果提示 PQ 处理后细胞内钾离子明显下降, 抑制 KCa3.1 后细胞内钾离子下降明显减少;且差异有统计学意义(对照组比染毒组比染毒+抑制剂组): (1.00 ± 0.00) vs (0.60 ± 0.05) vs (0.86 ± 0.02) , 均 $P < 0.01$]。**结论** PQ 中毒后, 可能激活 KCa3.1 促使细胞内钾离子外流, 上调 NEK7 表达, 从而激活 NLRP3 炎症小体, 促进肺纤维化的发生。

【关键词】 百草枯;肺纤维;中毒;NLRP3 炎症小体;中电导钙激活钾通道 3.1;NIMA 相关激酶 7;钾离子外流;肺泡上皮细胞

基金项目: 国家自然科学基金(81901951)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2020.06.013

The role of KCa3.1 activating NLRP3 inflammasome in paraquat treated-alveolar epithelial cells

Meng Xiaoxiao, Zhu Yong, Yang Wenyu, Zhang Jiayang, Wang Ruilan, Tian Rui

Department of Critical Care Medicine, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 201620, China

Corresponding author: Tian Rui, Email: thunder021@hotmail.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of KCa3.1 activating NLRP3 inflammasome in paraquat PQ treated-alveolar epithelial cells. **Methods** The A549 cells were cultured in vitro and divided into the control group, TRAM-34 (specific inhibitor of KCa3.1) group, PQ group and PQ+TRAM-34 group. The expression of KCa3.1 was detected by immunofluorescence in A549 cells. Western blot was used to detect the level of the proteins related with the NLRP3 inflammasome and NEK7 protein. And the level of cell potassium was detected by cell potassium concentration kit. **Results** The level of KCa3.1 was significantly increased in A549 cells after PQ treatment by immunofluorescence. The expressions of NLRP3 inflammasome-related proteins (NLRP3, ASC and Caspase-1) and NEK7 protein were increased

after PQ treatment, and the expressions of NLRP3 inflammasome-related proteins and NEK7 protein were decreased after inhibition of KCa3.1, and the difference was statistically significant [NLRP3/ β -actin (control group vs TRAM-34 group vs PQ group vs PQ+TRAM-34 group): [(0.02±0.00) vs (0.03±0.00) vs (0.74±0.00) vs (0.32±0.01)], ASC/ β -actin (control group vs TRAM-34 group vs PQ group vs PQ+TRAM-34 group): [(0.12±0.01) vs (0.11±0.03) vs (0.46±0.02) vs (0.17±0.03)]; Caspase-1/ β -actin (control group vs TRAM-34 group vs PQ group vs PQ+TRAM-34 group): [(0.05±0.00) vs (0.04±0.00) vs (0.34±0.03) vs (0.15±0.01)]; NEK7/ β -actin (control group vs PQ group vs PQ+TRAM-34 group): [(0.38±0.03) vs (0.83±0.02) vs (0.51±0.01)], $P < 0.01$]. The potassium level was decreased after PQ treatment and the degree could be declined by the KCa3.1 inhibitor by colorimetric detection with statistically significant difference (control group vs PQ group vs PQ+TRAM-34 group): [(1.00±0.00) vs (0.60±0.05) vs (0.86±0.02)], $P < 0.01$]. **Conclusions** The KCa3.1 could promote the outflow of intracellular potassium and up-regulate the expression of NEK7, thereby activate the NLRP3 inflammatory in PQ-induced pulmonary fibrosis.

【Key Words】 Paraquat, Pulmonary fibrosis; Poisoning; NLRP3 inflammatory; KCa3.1; Never-in-mitosis A related kinase; Potassium outflow; Alveolar epithelial cell

Fund Program: National Natural Science Foundation of China (81901951)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2020.06.013

百草枯 (paraquat, PQ) 是广泛使用的有机杂环类接触性脱叶剂及除草剂, 中毒后患者病死率极高, 而肺广泛纤维化是 PQ 中毒患者死亡的主要原因^[1-2]。但是 PQ 中毒引起肺纤维化的机制仍未完全阐明。炎症小体是由识别分子 (NLR、ALR 等家族分子)、接头分子 (凋亡相关点状蛋白 ASC)、效应分子 (caspase-1 或 caspase-11) 组成的蛋白复合体, 在病原微生物或环境因素等作用下激活, 进一步活化 caspase-1, 促进 IL-1 β 和 IL-18 的成熟释放, 参与机体的免疫、炎性反应等过程^[3]。近年发现 NLRP3 炎症小体的异常激活参与调控组织器官纤维化的发生发展^[4-5], PQ 中毒后会导致 NLRP3 炎症小体的异常激活^[6], 但是 PQ 如何激活 NLRP3 炎症小体尚不清楚, 本研究旨在探讨 KCa3.1 调控 NLRP3 炎症小体激活在百草枯致肺纤维化中的作用, 为寻找 PQ 中毒的治疗靶点提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

PQ 标准品 (美国 Sigma 公司), 胎牛血清 (美国 GIBCO 公司), F-12K 培养基 (美国 GIBCO 公司), 0.25% 胰酶 (杭州吉诺生物技术有限公司), BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), NLRP3 蛋白抗体 (美国 Santa Cruz 公司), ASC 蛋白抗体 (美国 Santa Cruz 公司), Caspase-1 抗体 (美国 Santa Cruz 公司), KCa3.1 蛋白抗体 (美国 Sigma 公司), NIMA 相关激酶 7 (never-in-

mitosis A related kinase 7, NEK7) 蛋白抗体 (美国 Abcam), KCa3.1 抑制剂 TRAM-34 (美国 Sigma 公司), 钾离子化学比色法检测试剂盒 (美国 GenMed Scientifics 公司), DAPI 染色液 (上海碧云天生物技术有限公司), ECL 发光剂 (美国 Thermo 公司)。

1.2 A549 细胞的培养

A549 (肺泡上皮细胞) 细胞购于美国 ATCC 公司。A549 细胞培养在含 10% FBS 的 F-12K 培养基中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养, 隔天换液, 待细胞长到 80%~90% 单层后, 用 0.25% 胰酶消化, 1:2 传代培养。选取对数期细胞进行试验处理。

1.3 细胞处理及分组

TRAM-34 是 KCa3.1 的特异性抑制剂^[7]。细胞以 1×10^5 /mL 接种于六孔板中, 置于培养箱中培养 24 h, 弃培养基, 加入 1 mL 新鲜无血清培养基。细胞分为 4 组: 对照组、TRAM-34 组、PQ 组及 PQ+TRAM-34 组。对照组: 无特殊处理。TRAM-34 组: 加入 TRAM-34 (10 μ mol/L) 处理 24 h。PQ 组: 根据课题组前期研究选择半数致死量的 PQ 浓度 (800 μ mol/L) 作为干预浓度^[8], 800 μ mol/L 的 PQ 溶液处理细胞 24 h。PQ+TRAM-34 组: TRAM-34 预处理 24 h 后, 800 μ mol/L 的 PQ 溶液处理细胞 24 h。

1.4 免疫荧光检测 KCa3.1 的表达

浸泡玻片 (无水乙醇), 玻片置于多聚-L-赖氨酸中, 37 $^{\circ}$ C 温箱 15 min, PBS 冲洗。将细胞以 1×10^5 /每孔铺在玻片上, 置于六孔板内, 培养箱培养 24 h。加入固定液固定 10 min, PBS 洗涤 5

min × 3 次,封闭液封闭 60 min。一抗孵育 (KCa3.1 浓度为 1:100),4℃ 过夜。洗涤液洗涤 5 min × 3 次,荧光标记的二抗孵育 60 min,洗涤液洗涤 5 min × 3 次。向载玻片上加入封片液 (具有抗荧光淬灭作用),轻轻加盖玻片,避光移至荧光共聚焦显微镜下观察。

1.5 Western Blot 方法测定细胞中相关蛋白的表达

按照 1.3 实验方法处理细胞后,收集细胞中的蛋白,采用 BCA 法检测蛋白浓度。每个加样空加入 12 μg 样品,电泳,恒流 (300 mA) 转膜 1 h,加入封闭液,封闭 1 h,分别加一抗 (其中 NLRP3 浓度为 : 1 : 1 000, ASC 浓度为 : 1 : 800, Caspase-1 浓度为 : 1 : 800, NEK7 浓度为 : 1 : 1 000)。4℃ 摇床,过夜,洗膜,加入二抗,室温摇床 2 h;洗膜,免疫荧光化学发光法 (ECL) 检测。

1.6 细胞内钾离子的变化

细胞钾离子浓度变化比色法定量检测试剂盒是利用四苯硼钠在碱性条件下与钾离子作用生成白色浑浊复合物,在分光光度仪下检测吸光峰值的变化而测定样品中总钾离子浓度。按照 1.3 实验方法处理细胞后,加入清理液轻轻洗涤细胞,加入胰酶消化,再次加入清理液,混匀,4℃ 300 g 离心 5 min,弃上清液,加入裂解液,震荡,4℃ 静置 30 min,4℃ 16 000 g 离心 10 min,取上清液。按照说明书,加入反应液,分光光度仪测定 OD 值,计算样品钾浓度。

1.7 统计学方法

所有数据的分析采用 SPSS 20.0 统计软件,采用均数 ± 标准差 (Mean ± SD) 表示,多组之间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计意义。

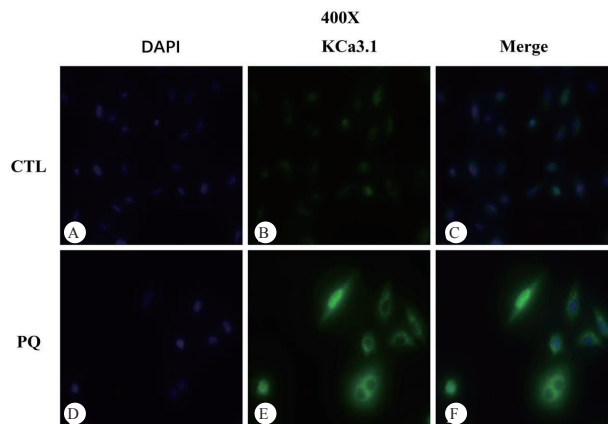
2 结果

2.1 PQ 染毒后 KCa3.1 表达明显增加

体外培养 A549 细胞,分为对照组与染毒组。免疫荧光下检测 A549 细胞中 KCa3.1 的表达,染毒组可见绿染的 KCa3.1 表达明显增加,见图 1。

2.2 抑制 KCa3.1 后, NLRP3 炎症小体激活下降

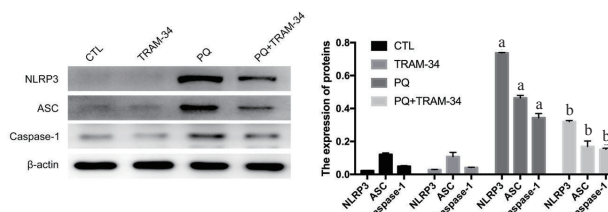
构建 PQ 染毒肺泡上皮细胞 (A549 细胞) 模型,同时给与 KCa3.1 抑制剂 TRAM-34,观察细胞 NLRP3 炎症小体激活变化。结果显示, PQ 处理后, A549 细胞内 NLRP3 炎症小体明显激活,阻断 KCa3.1 后, NLRP3、ASC、Caspase-1 表达明



DNA 表达呈蓝色荧光, KCa3.1 表达呈绿色荧光。对照组 (A-C) 见少量的 KCa3.1 形成。染毒组 (D-F) 经 PQ 刺激后, KCa3.1 表达明显增多。(× 400)

图 1 免疫荧光检测 A549 细胞中 KCa3.1 的变化

Fig 1 The expression of KCa3.1 in A549 cells by immun of luorescence



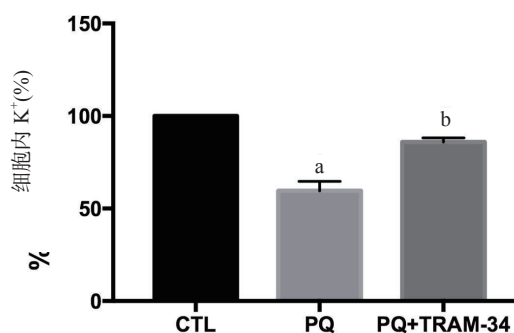
与 CTL 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 PQ 组比较, ^b $P < 0.05$

图 2 Western blot 检测 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达变化
Fig 2 The expression of NLRP3, ASC, Caspase-1 detected by Western blot

显减少 (图 2), 说明 KCa3.1 参与调控 PQ 中毒诱导的 NLRP3 炎症小体激活。

2.3 抑制 KCa3.1 后, 钾离子浓度下降

利用细胞钾离子化学比色法检测试剂盒检测细胞内钾离子变化。结果显示, PQ 处理后细胞内钾离子明显下降, 而抑制 KCa3.1 后细胞内钾离子下降明显减少 (图 3), 说明 KCa3.1 通道参与 PQ 诱导的细胞内钾离子外流。



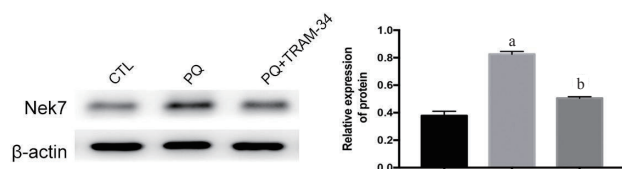
与 CTL 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 PQ 组比较, ^b $P < 0.05$

图 3 A549 细胞内钾离子变化

Fig 3 The level of potassium in A549 cell

2.4 PQ 中毒后 NEK7 表达明显增加, 并可能受 KCa3.1 调控

采用 Western Blot 检测 NEK7 的表达。结果显示, 与对照组相比, PQ 组中 NEK7 表达明显升高, 抑制 KCa3.1 后 NEK7 表达明显下降 (图 4), 说明 NEK7 可能参与 PQ 中毒诱导的肺纤维化, 并可能受 KCa3.1 调节。



与 CTL 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 PQ 组比较, ^b $P < 0.05$

图 4 Western blot 检测 NEK7 蛋白表达变化

Fig4 The expression of NEK7 detected by Western blot

3 讨论

PQ 是全球广泛使用的一种高毒类杂环除草剂, 是发展中国家急性中毒患者死亡的主要原因。PQ 中毒后, 肺是其作用的主要靶器官, 中毒后 6 h 内 90% 蓄积于肺内, 迅速破坏肺的实质细胞, 引起广泛的肺间质纤维化, 患者死于急性呼吸衰竭^[9-10]。目前 PQ 中毒没有特异性解毒药物, 治疗措施非常有限, 患者病死率高达 50% ~ 80% 以上。前期工作中发现, 在 PQ 中毒早期 (2 h) 大鼠肺组织中出现蓝染的胶原纤维, 提示在中毒早期即有肺纤维化的启动^[11]。如何阻止 PQ 中毒后早期肺间质纤维化的发生, 是降低 PQ 中毒患者病死率的关键, 也成为困扰临床工作者的难题。

炎症小体是 2002 年被首次发现, 现已成为炎症等领域的研究热点。当细胞受到信号刺激时, 炎症小体可以被招募及激活, 无活性 capsase-1 前体裂解成为有活性的 capsase-1, 且对 IL-1 β 和 IL-18 前体加工, 促进其成熟分泌至细胞外, 参与炎症反应^[12-13]。近年来, 炎症小体与肺部疾病的关系得到重视, 而 NLRP3 炎症小体是以 NLRP3 蛋白作为模式识别受体的炎症小体, 目前是研究较多、且与肺部疾病相关性较多的炎症小体。研究发现特发性肺纤维化患者肺泡灌洗液中, NLRP3、IL-1 β 、IL-6 及 capsase-1 水平明显升高^[14], 抑制 NLRP3 炎症小体可减轻肺纤维化的程度^[14]。在不同原因 (博来霉素、石棉等) 诱导的肺纤维化模型中, 肺组织及肺部巨噬细胞中有 NLRP3 炎症小体的激活^[15]。相关研究显示, NLRP3 炎症小体的异常激活对百草枯引起的

急性肺损伤至关重要^[6]。本研究也证实了百草枯染毒的肺泡上皮细胞内 NLRP3 炎症小体被激活。但是在 PQ 中毒后, NLRP3 炎症小体如何激活尚不清楚。

NLRP3 炎症小体的激活是一个受多因素、多途径调控的复杂过程。研究显示, 经典的 NLRP3 炎症小体激活由两种信号共同作用, 第一信号激活 TLR4 信号通路, 促进核转录因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 激活介导 IL-1 β 等前体的产生, 相当于物质储备阶段; 第二信号则促进 NLRP3/ASC/pro-caspase-1 蛋白复合体的组装活化 caspase-1, 促进 IL-1 β 等成熟释放^[16-17]。目前关于 NLRP3 炎症小体激活机制的研究集中在第二信号, 主要包括细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 升高、溶酶体破裂和细胞内钾离子外流, 而钾离子外流是这三个激活因子的共同途径^[18-19], 而其中 K^+ 外流即可由 KCa3.1 引发。KCa3.1 广泛表达于哺乳动物的各个器官组织, 由细胞内 Ca^{2+} 激活, 可促使 K^+ 外流, 进而调节细胞膜电位和细胞内钙信号参与细胞分泌、周期调控、迁移和增殖等多种细胞活动^[20]。本研究发现, PQ 中毒后, 大鼠肺组织 KCa3.1 表达明显增加, 给予 KCa3.1 特异性抑制剂 TRAM-34 后, 纤维化程度明显减轻^[21]。文献报道提示: 在单核细胞内抑制 KCa3.1 的激活, 阻止钾离子外流引起的 NLRP3 炎症小体的激活, 减少炎症因子的释放^[22]。笔者推测, PQ 中毒后 NLRP3 炎症小体的异常激活是否与 KCa3.1 有关。本研究发现, 在 PQ 染毒的肺泡上皮细胞内抑制 KCa3.1 后, 细胞内钾离子外流减少, NLRP3 炎症小体激活下降。因此, PQ 中毒后, 可能存在 KCa3.1 通道激活促进钾离子外流, 进一步激活 NLRP3 炎症小体。

NIMA 相关激酶 7 (never-in-mitosis A related kinase 7, NEK7) 是一种具有调控细胞周期、促进细胞有丝分裂功能的丝氨酸/苏氨酸激酶。NEK7 在人体多种组织如心、脑、肺、肝等广泛表达^[23]。Gabriel 等^[24] 研究发现, NEK7 是细胞内钾离子外流激活 NLRP3 炎症小体的关键蛋白。LPS 预处理的小鼠巨噬细胞, 再给予 ATP 处理, 可以明显增加 NEK7 和 NLRP3 相结合, 进而促进 NLRP3 炎症小体复合体的组装和激活, 而在 NEK7 基因敲除的小鼠巨噬细胞中, 可明显抑制 NLRP3 炎症小体的激活, 使 caspase-1 呈现低活化、IL-1 β 表达明显下降, 进

一步提示 NEK7 对 NLRP3 炎症小体的异常激活具有调控作用。本研究发现 PQ 染毒后, A549 细胞中 NEK7 表达显著升高, 给予 TRAM-34 抑制 KCa3.1 后, 与 PQ 组相比, NEK7 表达下降, 提示: 在 PQ 中毒中, 可能存在 KCa3.1 激活促使细胞内钾离子外流, 上调 NEK7 表达, 进一步激活 NLRP3 炎症小体。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Dinis-Oliveira RJ, Duarte JA, Sánchez-Navarro A, et al. Paraquat poisonings: mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment[J]. *Crit Rev Toxicol*, 2008, 38(1): 13-71. DOI:10.1080/10408440701669959.
- [2] 黄昌保, 田若辰, 白丽娜, 等. 百草枯在大鼠体内的毒物代谢动力学研究 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2019, 28(12): 1517-1519. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2019.12.011.
- [3] Guo HT, Callaway JB, Ting Jenny PY. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics[J]. *Nat Med*, 2015, 21(7): 677-687. DOI:10.1038/nm.3893.
- [4] Brusselle GG, Provoost S, Bracke KR, et al. Inflammasomes in respiratory disease[J]. *Chest*, 2014, 145(5): 1121-1133. DOI:10.1378/chest.13-1885.
- [5] Tian R, Zhu Y, Yao JY, et al. NLRP3 participates in the regulation of EMT in bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 357(2): 328-334. DOI:10.1016/j.yexcr.2017.05.028.
- [6] Jiang YL, Yang WC, Gui SY. Procyanidin B2 protects rats from paraquat-induced acute lung injury by inhibiting NLRP3 inflammasome activation[J]. *Immunobiology*, 2018, 223(10): 555-561. DOI:10.1016/j.imbio.2018.07.001.
- [7] Torriani G, Trofimenko E, Mayor J, et al. Identification of clotrimazole derivatives as specific inhibitors of arenavirus fusion[J]. *J Virol*, 2019, 93(6): e01744-18. DOI:10.1128/jvi.01744-18.
- [8] Zhu Y, Tan JT, Xie H, et al. HIF-1 α regulates EMT via the Snail and β -catenin pathways in paraquat poisoning-induced early pulmonary fibrosis[J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(4): 688-697. DOI:10.1111/jcmm.12769.
- [9] Elenga N, Merlin C, Le Guern R, et al. Clinical features and prognosis of paraquat poisoning in French Guiana[J]. *Medicine*, 2018, 97(15): e9621. DOI:10.1097/md.00000000000009621.
- [10] 符红娜, 聂时南. 百草枯致肺纤维化的上皮-间质转化的机制研究进展 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2019, 28(6): 803-805. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2019.06.033.
- [11] Xie H, Wang RL, Tang X, et al. Paraquat-induced pulmonary fibrosis starts at an early stage of inflammation in rats[J]. *Immunotherapy*, 2012, 4(12): 1809-1815. DOI:10.2217/imt.12.122.
- [12] Lasithiotaki I, Giannarakis I, Tsitoura E, et al. NLRP3 inflammasome expression in idiopathic pulmonary fibrosis and rheumatoid lung[J]. *Eur Respir J*, 2016, 47(3): 910-918. DOI:10.1183/13993003.00564-2015.
- [13] 何岱昆, 邵义如, 周芳庆, 等. 核转录因子- κ B 参与光气吸入性肺损伤 NLRP3 炎症小体的表达 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2018, 27(6): 624-630. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2018.06.012.
- [14] Lasithiotaki I, Giannarakis I, Tsitoura E, et al. NLRP3 inflammasome expression in idiopathic pulmonary fibrosis and rheumatoid lung[J]. *Eur Respir J*, 2016, 47(3): 910-918. DOI:10.1183/13993003.00564-2015.
- [15] Song C, He LJ, Zhang J, et al. Fluorofenidone attenuates pulmonary inflammation and fibrosis via inhibiting the activation of NALP3 inflammasome and IL-1 β /IL-1R1/MyD88/NF- κ B pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(11): 2064-2077. DOI:10.1111/jcmm.12898.
- [16] de Zoete MR, Palm NW, Zhu S, et al. Inflammasomes[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, 6(12): a016287. DOI:10.1101/cshperspect.a016287.
- [17] He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation[J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(12): 1012-1021. DOI:10.1016/j.tibs.2016.09.002.
- [18] Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G, et al. K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter[J]. *Immunity*, 2013, 38(6): 1142-1153. DOI:10.1016/j.immuni.2013.05.016.
- [19] Cunha LD, Silva ALN, Ribeiro JM, et al. AIM2 engages active but unprocessed caspase-1 to induce noncanonical activation of the NLRP3 inflammasome[J]. *Cell Rep*, 2017, 20(4): 794-805. DOI:10.1016/j.celrep.2017.06.086.
- [20] Wulff H, Castle NA. Therapeutic potential of KCa3.1 blockers: recent advances and promising trends[J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2010, 3(3): 385-396. DOI:10.1586/ecp.10.11.
- [21] Xie H, Lu J, Zhu Y, et al. The KCa3.1 blocker TRAM-34 inhibits proliferation of fibroblasts in paraquat-induced pulmonary fibrosis[J]. *Toxicol Lett*, 2018, 295: 408-415. DOI:10.1016/j.toxlet.2018.07.020.
- [22] Eugenia Schroeder M, Russo S, Costa C, et al. Pro-inflammatory Ca⁺⁺-activated K⁺ channels are inhibited by hydroxychloroquine[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 1892. DOI:10.1038/s41598-017-01836-8.
- [23] Fry AM, O' Regan L, Sabir SR, et al. Cell cycle regulation by the NEK family of protein kinases[J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(19): 4423-4433. DOI:10.1242/jcs.111195.
- [24] He Y, Zeng MY, Yang DH, et al. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux[J]. *Nature*, 2016, 530(7590): 354-357. DOI:10.1038/nature16959.

(收稿日期: 2020-02-19)

(本文编辑: 何小军)