

脑心通调控 NLRP3/Caspase-1 通路抑制脂多糖诱导的 BV2 细胞焦亡

王栋^{1,2}, 苏晓慧², 戚明珠², 王艳秋², 孔祥英^{2*}, 林娜^{1,2*}

(1. 贵州中医药大学, 贵阳 550025; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:** 探索脑心通醇提物对脂多糖(LPS)诱导的小胶质细胞 BV2 焦亡的影响,并通过 NOD 样受体热蛋白结构域 3(NLRP3)/半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)通路阐释其可能的作用机制。**方法:** LPS($1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)体外诱导 BV2 细胞的同时,加入不同质量浓度脑心通醇提物($2, 10, 50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)干预后,分别采用 MTS 法检测细胞活性,实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测白细胞介素- 1β (IL- 1β),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和 NLRP3 的 mRNA 水平;免疫荧光法检测 NLRP3 蛋白表达的情况;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 NLRP3/Caspase-1 通路关键蛋白表达。**结果:** 与空白组比较,LPS($1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)能明显降低 BV2 细胞活性,显著升高 IL- 1β , TNF- α 及 NLRP3 mRNA 表达水平($P < 0.01$),且可提升 NLRP3 蛋白表达水平以及 Caspase-1 剪切体和前体蛋白的比值(Caspase-1 p20/Caspase-1)。与 LPS 组比较,脑心通醇提物($2, 10, 50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)干预后,逆转了 LPS 导致的细胞活性降低($P < 0.01$), $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 脑心通醇提物可显著降低 IL- 1β , TNF- α 及 NLRP3 mRNA 表达水平($P < 0.05, P < 0.01$),显著降低 LPS 诱导的 NLRP3 的高表达以及 Caspase-1 p20/Caspase-1($P < 0.01$)。 **结论:** 脑心通能明显抑制 LPS 诱导的小胶质细胞焦亡,其作用机制与 NLRP3/Caspase-1 通路密切相关。

[关键词] 脑心通; 小胶质细胞; 脂多糖; 焦亡; 炎症小体; 补阳还五汤

[中图分类号] R2-0;R289;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)10-0029-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201037

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200206.1708.008.html>

[网络出版时间] 2020-02-06 17:14

Naoxintong Inhibits LPS Induced BV2 Cell Pyroptosis by NLRP3/Caspase-1 Signaling Pathway

WANG Dong^{1,2}, SU Xiao-hui², QI Ming-zhu², WANG Yan-qiu², KONG Xiang-ying^{2*}, LIN Na^{1,2*}

(1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Naoxintong ethanol extract (NXT) on pyroptosis of BV2 microglia cells induced by lipopolysaccharide (LPS), and to explain the mechanism of pyroptosis based on NOD like receptor thermoprotein domain 3 (NLRP3) /cysteine-proteinase-1 (Caspase-1) pathway. **Method:** BV2 cells was treated with different concentrations of NXT ($2, 10, 50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) after induced by LPS ($1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) *in vitro*. Real-time PCR was used to detect mRNA expression of pro-inflammatory cytokine such as interleukin 1 beta (IL- 1β), tumor necrosis factor (TNF) - α , and NLRP3. Western bolt and immunofluorescence were used to observe the protein expression of NLRP3/Caspase-1 signaling pathway. **Result:** Compared with control group, after

[收稿日期] 20191223(015)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81673630);北京市自然科学基金面上项目(7162139);国家科技重大新药创制项目(2019ZX09731-002)

[第一作者] 王栋,在读硕士,从事中药药理学研究,E-mail:wangdong9998@163.com

[通信作者] *孔祥英,博士,研究员,硕士生导师,从事中药药理学研究,E-mail:kongu0051@163.com;

*林娜,博士,首席研究员,博士生导师,从事药性理论研究,E-mail:linna888@163.com

LPS ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) stimulation, BV2 cells viability was decreased. The mRNA expression levels of IL-1 β , TNF- α and NLRP3 were significantly elevated ($P < 0.01$), the protein levels of NLRP3 and Caspase-1 p20/Caspase-1 were also increased. After given NXT (2, 10, 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), BV2 cells viability reversed which induced by LPS. Compared with LPS group, the mRNA expression of IL-1 β , TNF- α and NLRP3 reduced obviously with given 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NXT ($P < 0.05$, $P < 0.01$), significantly inhibited NLRP3 high protein expression and Caspase-1 p20/Caspase-1 expression ($P < 0.01$). **Conclusion:** NXT can inhibit LPS induced pyroptosis of BV2 cells and the mechanism may closely related to NLRP3/Caspase-1 signaling pathway.

[**Key words**] Naoxintong; microglia; lipopolysaccharide; pyroptosis; inflammasome; Buyang Huanwu Tang

脑缺血后各种有效治疗手段尽管能迅速恢复血供,对于减少脑梗死面积、改善神经功能具有重要意义,但脑缺血再灌注会引起离子动态平衡紊乱和能量障碍等,快速激活小胶质细胞,加剧脑损伤,因此小胶质细胞介导的炎症反应是脑缺血损伤的重要病理过程^[1-2]。细胞焦亡又称细胞炎性坏死,在炎症的发生发展中发挥极其重要作用。研究证实细胞焦亡为缺血性脑损伤关键的病理环节,而且是药物干预脑卒中的潜在生物学途径^[3]。

脑心通源自于经典名方补阳还五汤,由黄芪、赤芍、丹参、当归和川芎等 16 味中药组成。该方重用黄芪为君药,辅以大量活血化瘀中药及动物药,具有益气活血止痛通络之功^[4]。临床上主要治疗气滞血瘀、脉络瘀阻所致的脑卒中、冠心病等心脑血管疾病^[5]。其剂型脑心通胶囊是我国在心脑血管疾病防治领域中的基础用药,也是我国年销售超过 10 亿元的中药大品种之一^[6]。现代研究证实脑心通不仅对缺血性脑血管疾病疗效显著,且具有明显的脑保护作用^[7],抑制脑缺血再灌注损伤的炎症反应是其重要作用途径,但是否能抑制脑缺血后细胞焦亡未见报道。鉴此,本研究采用脂多糖(LPS)诱导 BV2 细胞系建立体外小胶质细胞炎症模型,观察脑心通醇提物对相关炎症因子的影响以及对 NOD 样受体热蛋白结构域 3/半胱氨酸蛋白酶-1(NLRP3/Caspase-1)通路的干预情况,探讨脑心通对小胶质细胞炎症的作用机制,为该药的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞 BV2 小胶质细胞,由中国中医科学院中药研究所陈颖馈赠,传代至第 6 代进行实验。

1.2 药物与试剂 脑心通微粉(2016 年 12 月采样于步长制药,由黄芪、赤芍、丹参、当归、川芎、桃仁、西红花、乳香、没药、鸡血藤、牛膝、桂枝、桑枝、地龙、全蝎、水蛭组成);DMEM 培养基,胎牛血清(美国

Gibco 公司,批号分别为 C11995500BT,16000-044); 荧光染料 4',6-联脒-2-苯基吡啶二盐酸盐(DAPI), LPS(美国 Sigma 公司,批号分别为 D9542-5MG, L3755);曲拉通 X-100,RIPA 裂解液,5 \times SDS-PAGE 变性蛋白上样缓冲液,Bradford 法蛋白质定量试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司,批号分别为 A1009, C1053, B1012, P1510); CellTiter 96[®] AQueous 单溶液细胞增殖检测试剂盒(MTS,美国 Promega 公司,批号 G3582); NLRP3 抗体(美国 Abcam 公司,批号 ab214185);Caspase-1 及 Caspase-1 p20 抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 SC-392736,SC-398715);兔抗二抗,小鼠抗二抗(美国 EarthOx 公司,批号分别为 E030120,E030110);荧光二抗(美国 Life 公司,批号 A21203);4% 组织细胞固定液(北京索莱宝科技有限公司,批号 P1110);trizol,逆转录试剂盒(美国 Thermo 公司,批号分别为 K1622,15596026)。

1.3 仪器 LX-100 型手掌型离心机(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司);ABI7500 型实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)仪,3111 型二氧化碳培养箱,MK3 型全自动酶标仪(美国 Thermo 公司);CKX41 型倒置显微镜,CKX31 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);3K15 型低温高速离心机(美国 Sigma 公司);Powerpa[™] Basic 型电泳仪,Mini Trans-Blot Cell 型转移电泳槽(美国 Bio-Rad 公司);Fusion FX 型凝胶成像仪(法国 Vilber 公司)。

2 方法

2.1 脑心通醇提物的制备 取脑心通微粉 50 g,加入 95% 乙醇 400 mL 回流提取 2 h(料液比 1:8),布氏漏斗过滤。滤渣用 60% 乙醇 400 mL 回流提取 2 h,布氏漏斗过滤。合并两次滤液,55 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发后置于蒸发皿中,在水浴锅上挥去残余有机溶剂,烘干,最终得到脑心通醇提物 14.623 g^[8]。脑心通醇提物给药前使用二甲基亚砜溶解,配成 500 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 母

液待用。

2.2 细胞培养 复苏 BV2 细胞,使用 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清),于 37 ℃,5% CO₂ 恒温培养箱中培养。待细胞长至 70% ~ 80% 对数生长期时,进行消化传代,培养 3 ~ 4 代后用于实验,实验时采用对数生长期细胞。

2.3 MTS 法检测细胞存活率 取传代后的细胞悬液,接种于 96 孔板,次日于倒置显微镜下观察细胞状态和密度,当细胞达 70% ~ 80% 时,给予系列浓度脑心通醇提取物(0.75, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 mg·L⁻¹),空白组加入正常培养基,每组 3 个复孔。置于培养箱内培养 24 h 后,弃上清,加入新的培养基及 20 μL 单溶液细胞增殖检测试剂盒中的 MTS 检测液。培养 1 h 后,使用酶标仪检测 490 nm 波长处的吸光度 A,并按公式计算细胞活性。细胞生存率 = A_{药物组} / A_{空白组} × 100%。

测得药物对细胞存活率后,另取传代后的细胞悬液,接种于 96 孔板,次日于倒置显微镜下观察细胞状态和密度,当细胞密度达 70% ~ 80% 时,使用 LPS(1 mg·L⁻¹) 诱导细胞,同时给予脑心通醇提取物对细胞无抑制作用的剂量(2, 10, 50 mg·L⁻¹),空白组给予正常培养基。细胞培养、给药后处理及检测方法同上。

2.4 Real-time PCR 检测炎症因子及 NLRP3 mRNA 的表达 取对数生长期细胞,种 6 孔板,当细胞密度达 70% ~ 80% 时,使用 LPS(1 mg·L⁻¹) 诱导细胞 9 h,同时给予脑心通醇提取物(2, 10, 50 mg·L⁻¹),空白组给予正常培养基。收集细胞后使用 trizol 法提取各组细胞总 RNA,并测定浓度。使用反转录试剂盒进行反转录,条件为 42 ℃ 60 min, 25 ℃ 5 min, 70 ℃ 5 min, -20 ℃ 保存。进行 Real-time PCR 反应,条件为 50 ℃ 2 min, 预变性 95 ℃ 10 min, 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 40 个循环。所得数据采用 2^{-ΔΔC_t} 法比较各组 mRNA 的表达。

白细胞介素-1β(IL-1β), 肿瘤坏死因子-α(TNF-α) 和 NOD 样受体热蛋白结构域 3(NLRP3) PCR 引物由赛默飞世尔科技北京合成部设计合成,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,引物序列见表 1。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达 细胞处理及分组同 2.4 项,24 h 后,收集细胞,各组加入 RIPA 裂解液,冰上裂解 1 h,离心后收集上清,提取细胞蛋白。使用 Bradford 法测定各组蛋白浓度后,加入 SDS-PAGE 变性蛋白上样缓冲液,煮沸 5 min 使蛋白变性。各孔上样蛋白样品 50 μg,

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
NLRP3	上游 CCTGGGGGACTTTGGAATCA	113
	下游 GATCCTGACAACACGCGGA	
IL-1β	上游 GAAATGCCACCTTTTGACACTG	115
	下游 TGGATGCTCTCATCAGGACAG	
TNF-α	上游 ATGGCCTCCCTCTCATCAGT	96
	下游 TTTGCTACGACGTGGGCTAC	
GAPDH	上游 AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	94
	下游 GGGGTCGTTGATGGCAACA	

电泳及转膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 抗体 NLRP3 (1:2 000), Caspase-1 (1:100), Caspase-1 p20 (1:100), β-actin (1:1 万) 4 ℃ 孵育过夜; 1 × TBST 洗 3 次, 每次 5 min, 二抗 (1:5 000) 室温孵育 2 h; 1 × TBST 洗 3 次, 每次 5 min; ECL 发光液孵育 1 min 后置于凝胶成像仪中显影。采用 Image J 1.44 软件测定条带的灰度值。

2.6 免疫荧光法检测 NLRP3 的表达 圆玻片使用多聚赖氨酸包被后, PBS 洗 3 遍待用, 取对数生长期细胞消化后种 24 孔板, 当细胞密度达到 70% ~ 80% 时给药, 分组同 2.4 项。培养 9 h 后 PBS 洗 3 遍, 4% 细胞组织固定液固定 15 min, 倒置于 -20 ℃ 冰箱待用。复温后 PBS (含 0.1% 曲拉通 X-100) 洗 3 遍, 每遍 5 min; 5% BSA 封闭后加入 NLRP3 抗体 (1:200) 过夜; PBS 洗 3 遍, 每遍 10 min; 荧光二抗 (1:200) 室温 2 h, PBS 洗 3 遍, 每遍 10 min, 加入 DAPI (1:2 000) 3 min, PBS 洗 3 遍, 每遍 10 min; 使用荧光封片剂封片, 在荧光显微镜下采集图片, 使用 Image J 1.44 软件测量各组平均吸光度 AA。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行数据统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析, 两两比较采用 LSD 法, P < 0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对 BV2 细胞活性的影响 不同浓度的脑心通醇提取物作用于 BV2 细胞 24 h 后, 通过 MTS 法检测细胞活性。与空白组比较, 100 及 200 mg·L⁻¹ 脑心通醇提取物组细胞活性显著下降 (P < 0.01), 而 50 mg·L⁻¹ 及其以下剂量组对 BV2 细胞无明显影响, 见表 2。因此本实验选择 2, 10, 50 mg·L⁻¹ 等不影响细胞活性的浓度, 观察研究脑心通醇提取物对细胞焦亡的影响。

表 2 脑心通醇提取物对 BV2 细胞活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of Naoxintong ethanol extract (NXT) on BV2 cells viability ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞存活率/%
空白	-	100.00
脑心通醇提取物	0.75	105.72 ± 2.65
	1.56	102.74 ± 5.00
	3.13	96.26 ± 2.16
	6.25	98.31 ± 4.88
	12.5	102.53 ± 2.69
	25	101.82 ± 2.25
	50	94.29 ± 4.35
	100	86.79 ± 1.29 ¹⁾
	200	52.61 ± 3.88 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对 LPS 诱导的 BV2 细胞活性的影响 LPS 诱导 BV2 细胞的同时给予 2, 10, 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 脑心通醇提取物干预 24 h 后,结果显示,与空白组比较,LPS 组细胞存活率降低,而给予不同浓度脑心通干预以后,可浓度依赖性的提高 BV2 细胞活性,与 LPS 组比较差异具有统计学意义($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 脑心通醇提取物对 LPS 诱导的 BV2 细胞活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of NXT on BV2 cells viability after activating by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞存活率/%
空白	-	100.00
LPS	-	89.64 ± 7.24
脑心通醇提取物	2	110.71 ± 5.42 ¹⁾
	10	112.35 ± 3.10 ¹⁾
	50	126.59 ± 1.91 ¹⁾

注:与 LPS 组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 对 LPS 诱导 BV2 细胞炎症因子 mRNA 的影响 与空白组比较,LPS 诱导后,IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达显著升高($P < 0.01$);而脑心通醇提取物作用后可剂量依赖性的抑制 LPS 诱导的 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 的高表达,脑心通醇提取物 10, 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 可显抑制 TNF- α 的 mRNA 水平,而仅 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 脑心通醇提取物对 IL-1 β 的 mRNA 的抑制作用有显著性差异($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 4。

3.4 脑心通醇提取物对 LPS 诱导 BV2 细胞 NLRP3/Caspase-1 通路的影响

3.4.1 对 NLRP3 mRNA 表达的影响 LPS 诱导 BV2 细胞后,NLRP3 的 mRNA 水平显著增加($P < 0.01$),而脑心通醇提取物作用后,可浓度依赖性的抑

表 4 脑心通醇提取物对 LPS 诱导的 BV2 细胞 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of NXT on mRNA expression of IL-1 β and TNF- α in BV2 cells induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	IL-1 β	TNF- α
空白	-	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.05
LPS	-	2.80 ± 0.06 ¹⁾	4.03 ± 0.42 ¹⁾
脑心通醇提取物	2	2.99 ± 0.11	2.98 ± 0.26
	10	2.43 ± 0.07	1.44 ± 0.04 ²⁾
	50	1.97 ± 0.16 ³⁾	0.98 ± 0.25 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 LPS 组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 5 ~ 7 同)。

制 NLRP3 的 mRNA 表达水平,10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 5。

表 5 脑心通醇提取物对 LPS 诱导的 BV2 细胞 NLRP3 mRNA 表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

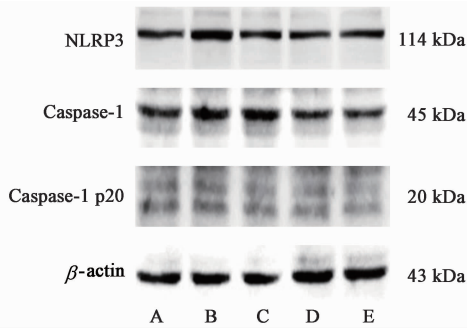
Table 5 Effect of NXT on mRNA expressions of NLRP3 in BV2 cells induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	NLRP3
空白	-	1.00 ± 0.05
LPS	-	1.40 ± 0.40 ¹⁾
脑心通醇提取物	2	1.17 ± 0.11
	10	1.16 ± 0.22 ²⁾
	50	1.11 ± 0.08 ²⁾

3.4.2 对 NLRP3/Caspase-1 炎症小体通路关键蛋白表达的影响 LPS 诱导后,BV2 细胞 NLRP3 蛋白的表达以及 Caspase-1 p20/Caspase-1 均升高。脑心通醇提取物作用后,能显著降低 NLRP3 蛋白表达水平,并下调 Caspase-1 p20/Caspase-1 值($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 1,表 6。免疫荧光结果显示,LPS 诱导后 BV2 细胞 NLRP3 荧光强度较空白组显著增强($P < 0.01$)。而给予脑心通醇提取物干预后 NLRP3 的荧光强度显著降低,以 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用最明显($P < 0.01$)。见图 2,表 7。

4 讨论

脑卒中是影响我国群众健康的重大疾病,具有高发病率、高致死率、高致残率、高复发率的特点,成为我国成年人致死致残的首位病因,也是导致全球人类死亡的第二大疾病^[9-11]。缺血性脑卒中作为临床上常见的疾病,目前早期的临床有效治疗手段,如药物溶栓或手术取栓等,均可迅速恢复脑组织的血流供应^[12]。然而随着脑供血的迅速恢复,即缺血后



A. 空白组; B. LPS 组; C. 脑心通醇提取物 2 mg·L⁻¹ 组; D. 脑心通醇提取物 10 mg·L⁻¹ 组; E. 脑心通醇提取物 50 mg·L⁻¹ 组

图 1 LPS 诱导的 BV2 细胞 NLRP3/Caspase-1 通路蛋白表达电泳
Fig.1 Electrophoresis of NLRP3/Caspase-1 pathway in BV2 cells induced by LPS

再灌注, 反而可进一步加重组织的损伤, 增加致残

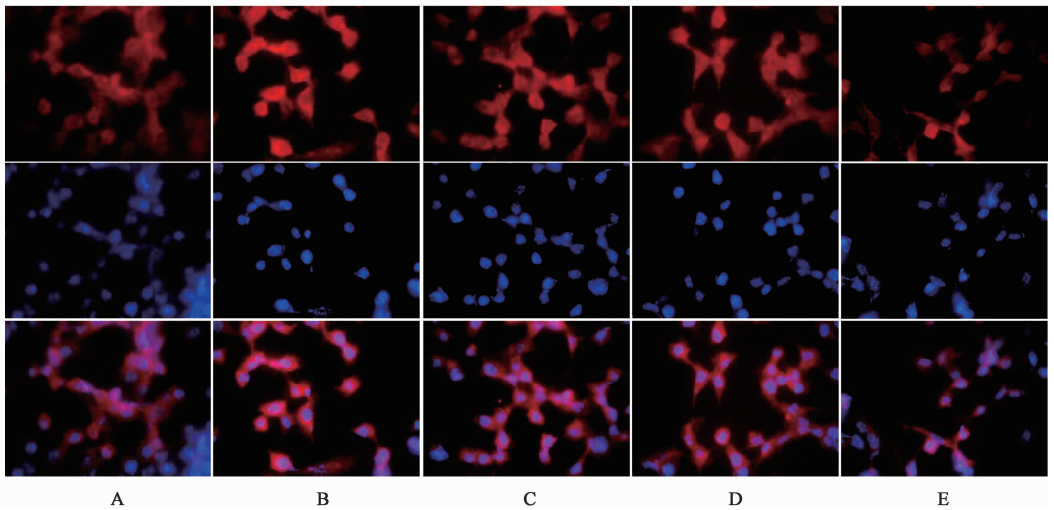
表 6 脑心通醇提取物对 LPS 诱导的 BV2 细胞 NLRP3 和 Caspase-1 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of NXT on protein expressions of NLRP3 and Caspase-1 in BV2 cells induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	NLRP3 / β -actin	Caspase-1 p20 /Caspase-1
LPS	-	1.18 ± 0.01	1.41 ± 0.15
脑心通醇提取物	2	0.96 ± 0.01 ²⁾	1.33 ± 0.08
	10	0.71 ± 0.14 ³⁾	1.15 ± 0.13 ²⁾
	50	0.70 ± 0.12 ³⁾	0.91 ± 0.23 ³⁾

注: 空白组各蛋白表达设为 1。

风险^[1]。小胶质细胞激活, 大量释放炎症因子, 无论在急性脑卒中发生后, 还是脑缺血再灌注损伤后, 均可导致脑组织损伤^[2]。



A. 空白组; B. LPS 组; C. 脑心通醇提取物 2 mg·L⁻¹ 组; D. 脑心通醇提取物 10 mg·L⁻¹ 组; E. 脑心通醇提取物 50 mg·L⁻¹ 组

图 2 脑心通醇提取物对 LPS 诱导的 BV2 细胞 NLRP3 表达水平的影响 (免疫荧光, ×1 000)

Fig.2 Effect of NXT on protein expressions of NLRP3 in BV2 cells induced by LPS (IF, ×1 000)

表 7 脑心通醇提取物对 LPS 诱导的 BV2 细胞 NLRP3 蛋白相对平均荧光强度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Effect of NXT on fluorescence intensity of NLRP3 in BV2 cells induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	相对荧光强度
空白	-	1.00
LPS	-	1.31 ± 0.11 ¹⁾
脑心通醇提取物	2	1.07 ± 0.06 ³⁾
	10	1.00 ± 0.06 ³⁾
	50	0.69 ± 0.09 ³⁾

细胞焦亡是一种促炎性的细胞程序性死亡的新方式, 其发生依赖于 Caspase-1 介导的经典炎症小体途径^[13]。炎症小体是由细胞质内模式识别受体

(PRRs) 参与组装形成的多蛋白复合体, 识别多种刺激后, 由 NOD 样受体蛋白 (NLRP1, NLRP3, NLRC4 等), 凋亡相关斑点样蛋白 (ASC) 及 Caspase-1 前体蛋白通过结构域组装, 并分解产生活性的 Caspase-1。IL-1 β 等前体再通过 Caspase-1 的切割成为活性形式并运送到细胞外, 导致炎症反应^[14]。继而诱导其他炎症细胞因子和黏附分子, 又进一步级联扩大炎症反应, 导致组织损伤。因此, 本实验采用 LPS 诱导 BV2 细胞的方法来模拟小胶质细胞炎症反应, 建立体外小胶质细胞炎症模型。结果显示 LPS 刺激 BV2 细胞后, 激活了 NLRP3 蛋白表达, 活化 Caspase-1 比例即 Caspase-1 p20/Caspase-1 升高, 从而引起 IL-1 β 和 TNF- α 表达水平升高, 提示 LPS 可通过激活 NLRP3 炎症小体从而诱导典型的细胞焦亡。

脑心通胶囊是我国在心脑血管疾病防治领域中的基础用药,具有益气活血、化瘀通脉的功效。有研究报道脑心通可抑制心肌缺血小鼠 NLRP3 炎症小体的激活^[15]。现代研究表明,黄芪-川芎、川芎-当归均对缺血性卒中有抗炎作用^[16-17]。同时还有研究报道黄芪的主要有效成分黄芪甲苷能通过过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ (PPAR γ)/核转录因子- κ B (NF- κ B)/NLRP3 通路抑制焦亡,减轻神经炎症导致的抑郁行为^[18]。以上研究均提示了脑心通可能通过抑制 NLRP3 炎症小体异常活化的细胞焦亡而发挥抑制脑内炎症作用。基于本实验的研究结果显示,脑心通醇提物不仅能够剂量依赖性的逆转 LPS 导致的细胞活性降低,而且能剂量依赖性的降低 LPS 导致的 IL-1 β , TNF- α 及 NLRP3 mRNA 高表达。同样,脑心通醇提物高剂量组也能显著降低 LPS 诱导的 NLRP3 的高表达以及 Caspase-1 p20 与 Caspase-1 的比值。

综上,本研究证实脑心通能抑制 NLRP3 炎症小体的激活,降低 Caspase-1 的活化体的产生和减少炎症因子表达,从而发挥抗小胶质细胞焦亡作用。同时,提示了脑心通发挥抗神经炎症作用可能是通过 NLRP3/Caspase-1 通路实现的,为脑心通治疗缺血性卒中提供重要的生物学依据。

[参考文献]

[1] 曹冰倩,谭峰. 细胞焦亡对脑梗死神经修复的影响[J]. 深圳中西医结合杂志,2019,29(5):179-182.

[2] 赵清,杨丽玲,杜怡峰. 步长脑心通对大鼠急性脑缺血再灌注小胶质细胞炎症反应和神经细胞凋亡的影响[J]. 山东大学学报:医学版,2010,48(11):46-49.

[3] ABULAFIA D P, DE RIVERO VACCARI J P, LOZANO J D, et al. Inhibition of the inflammasome complex reduces the inflammatory response after thromboembolic stroke in mice[J]. J Cereb Blood Flow Metab,2009,29(3):534-544.

[4] 赵涛,王一民,刘娜,等. 从补阳还五汤到脑心通胶囊——脑心同治的思路探讨[J]. 世界中西医结合杂志,2012,7(10):900-903.

[5] 何子龙,赵晔,张毅,等. 脑心通胶囊肠吸收液保护过氧化氢致 HPc2 心肌细胞损伤的作用机制及有效药味筛选[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(4):29-35.

[6] 赵步长,赵涛,宋琳琳,等. 脑心通胶囊的类阿司匹林

作用及其在防治心脑血管疾病中的应用[J]. 中医杂志,2016,57(15):1337-1341.

[7] 李伟霞,张书琦,赵艺丹,等. 脑心通胶囊化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国中药杂志,2018,43(10):1998-2005.

[8] 杨岳,李慧影,张璐莎,等. 脑心通胶囊提取物通过增强 CXCR4 表达促进心脏干细胞迁移[J]. 天津中医药大学学报,2016,35(2):99-103.

[9] 王陇德,刘建民,杨弋,等. 我国脑卒中防治仍面临巨大挑战——《中国脑卒中防治报告 2018》概要[J]. 中国循环杂志,2019,34(2):105-119.

[10] MURRAY C J, LOPEZ A D. Measuring the global burden of disease [J]. N Engl J Med,2013,369(5):448-457.

[11] LOZANO R, NAGHAVI M, FOREMAN K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. Lancet,2012,380(9859):2095-2128.

[12] PRABHAKARAN S, CASTONGUAY A C, GUPTA R, et al. Complete reperfusion mitigates influence of treatment time on outcomes after acute stroke [J]. J Neurointerv Surg,2017,9(4):366-369.

[13] 唐标,邓常清. 细胞焦亡与脑卒中[J]. 生理学报,2018,70(1):93-98.

[14] 孙玉洁,张楠楠,赵萌. 白藜芦醇对大鼠脑组织缺血再灌注过程中细胞焦亡的调控作用及对小胶质细胞 NLRP3 炎症小体、Caspase-1 及 ZO-1 的影响[J]. 海南医学院学报,2019,25(17):1291-1294.

[15] WANG Y, YAN X, MI S et al. Naoxintong attenuates ischaemia/reperfusion injury through inhibiting NLRP3 inflammasome activation[J]. J Cell Mol Med,2017,21(1):4-12.

[16] 吴作敏,郭丽娜,王单单,等. 黄芪-川芎药对治疗脑卒中的网络药理学研究[J]. 药物评价研究,2019,42(9):1749-1756.

[17] 刘亚鹭,徐士欣,张军平,等. 川芎-当归药对有效成分在缺血性脑卒中应用的研究进展[J]. 华西药学杂志,2018,33(6):550-553.

[18] SONG M, RUAN J, ZHANG R et al. Astragaloside IV ameliorates neuroinflammation-induced depressive-like behaviors in mice via the PPAR γ /NF- κ B/NLRP3 inflammasome axis [J]. Acta Pharmacol Sin,2018,39(10):1559-1570.

[责任编辑 孙丛丛]