

齐墩果酸抑制 NLRP3 炎症小体对蛛网膜下腔出血大鼠早期脑损伤的改善作用

韩雨薇, 王晨辰, 李晓明*

中国人民解放军北部战区总医院 神经外科, 辽宁 沈阳 110016

摘要: **目的** 探讨齐墩果酸抑制 NLRP3 炎症小体对蛛网膜下腔出血大鼠早期脑损伤的改善作用。**方法** 颈内动脉穿刺法构建蛛网膜下腔出血模型。成年雄性大鼠随机分为3组: 假手术组、模型组、齐墩果酸 20 mg/kg 组, 24 h 后观察脑组织细胞凋亡情况; 并利用 Western blotting 和 ELISA 方法检测 NLRP3、caspase1、IL-1 β 和 TNF- α 的表达水平。**结果** 齐墩果酸 20 mg/kg 可以明显减少凋亡细胞的产生, 能够降低 NLRP3、caspase1、IL-1 β 和 TNF- α 的表达 ($P < 0.01$)。**结论** 齐墩果酸能够抑制 NLRP3 炎症小体的形成, 从而改善蛛网膜下腔出血后的脑损伤。

关键词: 齐墩果酸; 蛛网膜下腔出血; NLRP3; 凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2019)09-2583-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.09.002

Improvement of oleanolic acid against brain cells in rats with subarachnoid hemorrhage by the suppression of NLRP3 inflammatory bodies

HAN Yu-wei, WANG Chen-chen, LI Xiao-ming

Department of Neurosurgery, General Hospital of Northern Theater Command of PLA, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective To investigate the improvement of oleanolic acid against brain cells in rats with subarachnoid hemorrhage by the suppression of NLRP3 inflammatory bodies. **Methods** The subarachnoid hemorrhage model was constructed by internal carotid artery puncture. SD rats were randomly divided into sham group, model group, and oleanolic acid 20 mg/kg group. The apoptosis of subarachnoid hemorrhage cells was observed, and NLRP3, caspase1, IL-1 β , and TNF- α levels were detected by Western blotting and ELISA methods. **Results** Oleanolic acid 20 mg/kg could significantly decrease the production of apoptotic cells, and reduce the expression of NLRP3, caspase1, IL-1 β , and TNF- α ($P < 0.01$). **Conclusion** Oleanolic acid can inhibit the formation of NLRP3 inflammatory bodies, and can improve the brain damage after subarachnoid hemorrhage.

Key words: oleanolic acid; subarachnoid hemorrhage; NLRP3; apoptosis

早期脑损伤是蛛网膜下腔出血患者高发病率和死亡率的重要原因^[1]。已经研究了许多药物在蛛网膜下腔出血后抑制早期脑损伤的有效性, 并且那些作用于多种途径的药物具有更好的治疗效果。齐墩果酸广泛存在于食品和药用植物中, 具有许多生物活性, 包括抗炎、抗肿瘤和神经保护作用^[2-4]。前期研究证明齐墩果酸对蛛网膜下腔出血后的早期脑损伤具有显著的保护作用, 改善脑水肿, 保护血脑屏障^[5]。因此, 本研究采用大鼠蛛网膜下腔出血模型,

探讨了齐墩果酸对蛛网膜下腔出血后 Nod 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体形成的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

齐墩果酸质量分数为 98%, 购自天津士兰科技有限公司, 批号 20150311; NLRP3、caspase-1 抗体购自 Abcam 公司; IL-1 β 、 β -actin 购自 Santa Cruz 公司; BCA 蛋白定量试剂盒、TUNEL 染色试剂盒、RIPA 裂解液、5 $\times$ loading buffer 均购自碧云天公司;

收稿日期: 2019-05-31

基金项目: 辽宁省科技攻关计划项目 (2015225022)

作者简介: 韩雨薇, 药师, 硕士, 研究方向为药理学。E-mail: hanmenny@163.com

*通信作者 李晓明, 博士, 主任医师。Tel: (024)28851284 E-mail: lxm5668sw@yahoo.com

IL-1 β ELISA 试剂盒购于欣博盛公司。

1.2 实验动物和分组

雄性 SD 大鼠, 体质量 250~300 g, 购自北部战区总医院实验动物中心, 实验动物生产许可证号 SCXK (辽) 2014-0002。动物饲养于恒温室中, 12 h/12 h 光暗交替, 实验前自由进食进水。给予充足食物和水。动物实验严格按照“National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”标准进行。根据之前的研究, 齐墩果酸在模型制作完成 1 h 后, 灌胃给药, 剂量为 20 mg/kg^[5]。72 只大鼠随机分成 3 组: 假手术组 ($n=18$)、模型组 ($n=30$)、齐墩果酸组 ($n=24$)。

1.3 模型建立

蛛网膜下腔出血大鼠模型建立如之前所述^[6]。10%水合氯醛麻醉后, 暴露出右侧颈动脉, 结扎颈外动脉, 止血夹阻断颈总动脉和颈内动脉, 颈外动脉剪一小口, 鱼线从中穿入并推进至大脑前动脉和中动脉分叉处, 然后刺破, 即成功建立蛛网膜下腔出血模型。假手术组不刺破, 其余操作相同。

1.4 对蛛网膜下腔出血大鼠脑组织细胞凋亡的影响

每组动物各取 4 只, 手术 24 h 后进行生理盐水灌注, 多聚甲醛灌注, 取脑组织包埋蜡块。将蜡块切成 4 mm 厚的切片, 二甲苯中脱蜡 10 min $\times$ 2, 无水乙醇 5 min, 90%乙醇 2 min, 70%乙醇 2 min, 蒸馏水 2 min。滴加蛋白酶 K, 37 °C, 20 min。PBS 洗涤 3 次, 滴加 TUNEL 检测液, 37 °C 避光孵育 60 min。PBS 洗涤 3 次, 滴加抗荧光猝灭封片液封片, 荧光显微镜下观察。

1.5 对蛛网膜下腔出血大鼠 NLRP3 的影响

取脑组织加入 1 mL 裂解液, 匀浆裂解 30 min, 4 °C, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清; BCA 法测定蛋白浓度, 加入 5 $\times$ loading buffer, 100 °C 煮沸 5 min; 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 每孔加入 40 μ g 总蛋白样品; 5%脱脂牛奶室温封闭 1 h; 一抗 NLRP3 (Abcam, 1:500)、caspase 1 (CST, 1:500)、IL-1 β (CST, 1:500)、TNF- α (CST, 1:500) 和 β -actin (Santa, 1:1 000) 4 °C 过夜; 1:8 000 稀释二抗, 温孵育 1 h; Pro-light HRP 发光试剂盒检测, 用 X-ray 显影。

1.6 对蛛网膜下腔出血大鼠 caspase-1 和 IL-1 β 表达的影响

Western blotting 检测, 方法同 1.5 项, caspase 1 (CST, 1:500)、IL-1 β (CST, 1:500) 和 β -actin

(Santa, 1:1000)。取各组大鼠血清, 按照欣博盛大鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒说明书步骤进行操作。

1.7 对蛛网膜下腔出血大鼠 TNF- α 表达的影响

Western blotting 检测, 方法同 1.5 项, TNF- α (CST, 1:500) 和 β -actin (Santa, 1:1000)。取各组大鼠血清, 按照欣博盛大鼠 TNF- α ELISA 试剂盒说明书步骤进行操作。

1.8 统计学分析

GraphPad Prism 4.0 软件进行统计学分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。均采用单因素方差分析进行比较; 组间比较采用 one-way ANOVA 分析。

2 结果

2.1 对蛛网膜下腔出血大鼠脑组织细胞凋亡的影响

与假手术组比较, 模型组脑组织细胞凋亡数目增加; 与模型组比较, 齐墩果酸组脑组织细胞凋亡数目明显减少, 结果表明齐墩果酸可以明显抑制细胞凋亡的发生, 见图 1。

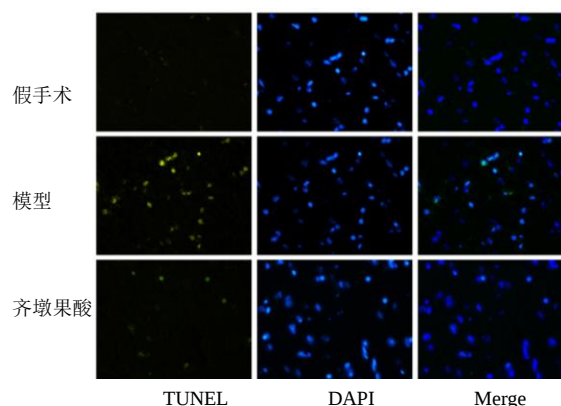


图1 齐墩果酸对蛛网膜下腔出血大鼠脑组织细胞凋亡的影响
Fig. 1 Effects of oleanolic acid against apoptosis of brain cells in rats with subarachnoid hemorrhage

2.2 对蛛网膜下腔出血大鼠 NLRP3 的影响

Western blotting 结果显示, 与假手术组比较, 模型组的 NLRP3 水平明显增加 ($P<0.001$); 与模型组比较, 齐墩果酸组 NLRP3 水平明显降低 ($P<0.01$), 见图 2、表 1。免疫组化结果也表明齐墩果酸能够显著减少 NLRP3 的表达, 见图 3。

2.3 对蛛网膜下腔出血大鼠 caspase-1 和 IL-1 β 表达的影响

Western blotting 结果显示, 与假手术组比较, 模型组的 caspase-1 水平明显增加 ($P<0.001$); 与模型组比较, 齐墩果酸组 caspase-1 水平明显降低 ($P<0.01$), 见图 4、表 2。

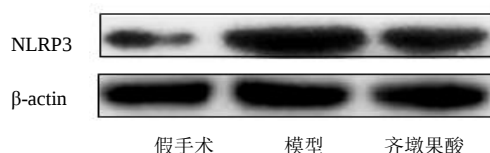


图 2 Western blotting 检测齐墩果酸对蛛网膜下腔出血大鼠 NLRP3 的影响

Fig. 2 Effects of oleanolic acid against NLRP3 in rats with subarachnoid hemorrhage detected by Western blotting

表 1 齐墩果酸对蛛网膜下腔出血大鼠 NLRP3 的影响

Table 1 Effects of oleanolic acid against NLRP3 in rats with subarachnoid hemorrhage

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	NLRP3 水平
假手术	—	1.015 0 ± 0.225 0
模型	—	3.542 0 ± 0.614 5 ^{###}
齐墩果酸	20	2.468 0 ± 0.325 6 ^{**}

与假手术组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$

^{###} $P < 0.001$ vs sham group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group

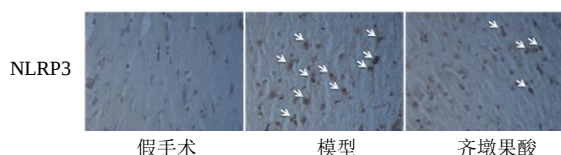


图 3 免疫组化检测齐墩果酸对蛛网膜下腔出血大鼠 NLRP3 的影响

Fig. 3 Effects of oleanolic acid against NLRP3 in rats with subarachnoid hemorrhage by immunohistochemistry

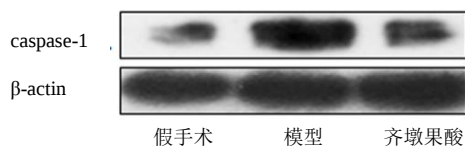


图 4 齐墩果酸对蛛网膜下腔出血大鼠 caspase-1 的影响

Fig. 4 Effects of oleanolic acid against caspase-1 in rats with subarachnoid hemorrhage

表 2 齐墩果酸对蛛网膜下腔出血大鼠 caspase-1 的影响

Table 2 Effects of oleanolic acid against caspase-1 in rats with subarachnoid hemorrhage

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	caspase-1 水平
假手术	—	1.056 0 ± 0.369 4
模型	—	3.469 0 ± 0.768 9 ^{###}
齐墩果酸	20	1.897 0 ± 0.579 1 ^{**}

与假手术组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$

^{###} $P < 0.001$ vs sham group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group

Western blotting 和 ELISA 结果显示, 与假手术组比较, 模型组的 IL-1 β 水平明显增加 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 齐墩果酸组 IL-1 β 水平明显降低 ($P < 0.01$), 见图 5、表 3。

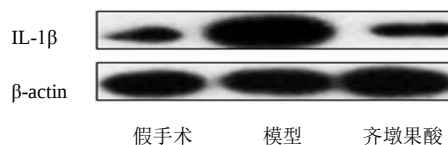


图 5 齐墩果酸对蛛网膜下腔出血大鼠 IL-1 β 的影响

Fig. 5 Effects of oleanolic acid against IL-1 β in rats with subarachnoid hemorrhage

表 3 齐墩果酸对蛛网膜下腔出血大鼠 IL-1 β 的影响

Table 3 Effects of oleanolic acid against IL-1 β in rats with subarachnoid hemorrhage

组别	剂 量 (mg·kg ⁻¹)	IL-1 β 水平	
		Western blotting	ELISA
假手术	—	0.987 0 ± 0.105 6	7.460 0 ± 0.396 5
模型	—	4.212 0 ± 0.654 1 ^{###}	36.840 0 ± 0.998 2 ^{###}
齐墩果酸	20	2.359 0 ± 0.296 5 ^{**}	17.020 0 ± 0.591 3 ^{**}

与假手术组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$

^{###} $P < 0.001$ vs sham group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group

2.4 对蛛网膜下腔出血大鼠炎症因子 TNF- α 表达的影响

Western blotting 和 ELISA 结果显示, 与假手术组比较, 模型组的 TNF- α 水平明显增加 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 齐墩果酸组 TNF- α 水平明显降低 ($P < 0.01$), 见图 6、表 4。

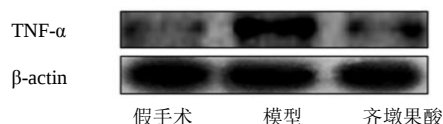


图 6 齐墩果酸对蛛网膜下腔出血大鼠 TNF- α 的影响

Fig. 6 Effects of oleanolic acid against TNF- α in rats with subarachnoid hemorrhage

3 讨论

蛛网膜下腔出血是一种复杂的具有高死亡率和高发率的疾病^[7]。早期脑损伤是由初始动脉瘤性出血引起并且在蛛网膜下腔出血后 72 h 内发生的, 是与预后密切相关的主要因素^[8]。齐墩果酸广泛存在于食品和药用植物中, 具有许多生物活性, 包括

表4 齐墩果酸对蛛网膜下腔出血大鼠 TNF- α 的影响
Table 4 Effects of oleanolic acid against TNF- α in rats with subarachnoid hemorrhage

组别	剂 量 (mg·kg ⁻¹)	TNF- α 水平	
		Western blotting	ELISA
假手术	—	1.034 0±0.298 7	22.584 0±0.667 3
模型	—	4.097 0±0.681 2 ^{####}	48.960 0±0.734 1 ^{####}
齐墩果酸	20	1.873 0±0.595 5 ^{**}	31.254 0±0.587 1 ^{**}

与假手术组比较: ^{####} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$

^{####} $P < 0.001$ vs sham group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group

抗炎、抗肿瘤、抗糖尿病和神经保护作用。前期研究发现齐墩果酸对蛛网膜下腔出血后的早期脑损伤具有显著的保护作用,改善脑水肿,提高神经功能学评分^[5]。但齐墩果酸对炎症小体的影响尚不清楚,所以本文采用大鼠蛛网膜下腔出血模型,探讨齐墩果酸对 NLRP3 炎症小体形成的影响。

研究表明细胞质内模式识别受体 NLRP3 在炎症反应中发挥着关键作用,并且在蛛网膜下腔出血后引起的神经炎症中也发挥着重要的调控作用^[9]。NLRP3 炎症小体为多蛋白复合物,主要是由 Nod 样受体、caspase-1 和衔接蛋白 ASC 组成^[10]。NLRP3 炎症小体形成,迅速导致 caspase-1 激活,活化的 caspase-1 裂解 IL-1 β 前体,并促使其活化成熟,诱导炎症生发,是炎症反应的关键因素^[11]。

几项关于蛛网膜下腔出血、缺血性中风和阿尔茨海默病的研究表明 NLRP3 炎症是神经炎症和细胞凋亡的关键组成部分^[12-14]。NLRP3 炎症小体已被证明在炎症反应中发挥关键作用,导致蛛网膜下腔出血后神经炎症的发生^[9]。IL-1 β 可诱导神经炎症和神经变性^[15]。本研究发现蛛网膜下腔出血 24 h 后 NLRP3 炎症小体和 caspase-1 被激活,IL-1 β 和 TNF- α 表达水平显著增强,齐墩果酸 20 mg/kg 给药能够抑制炎症小体的形成及相关炎性介质的表达。此外,蛛网膜下腔出血可刺激炎症反应并导致细胞凋亡。TUNEL 染色结果表明齐墩果酸给药可以减弱蛛网膜下腔出血诱导的细胞凋亡。

综上所述,齐墩果酸对蛛网膜下腔出血诱导的 NLRP3 炎症小体的形成和细胞凋亡有显著的抑制作用,为齐墩果酸治疗蛛网膜下腔出血后的早期脑损伤提供了一种新的潜在机制。

参考文献

- [1] Cahill J, Zhang J H. Subarachnoid hemorrhage: is it time for a new direction? [J]. *Stroke*, 2009, 40(3 Suppl): S86-S87.
- [2] Caltana L, Rutolo D, Nieto M L, *et al.* Further evidence for the neuroprotective role of oleanolic acid in a model of focal brain hypoxia in rats [J]. *Neurochem Int*, 2014, 79: 79-87.
- [3] Córdova C, Gutiérrez B, Martínez-García C, *et al.* Oleanolic acid controls allergic and inflammatory responses in experimental allergic conjunctivitis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e91282.
- [4] Pollier J, Goossens A. Oleanolic acid [J]. *Phytochemistry*, 2012, 77: 10-15.
- [5] 韩雨薇, 刘秀娟, 高 阳, 等. 齐墩果酸对蛛网膜下腔出血大鼠早期脑损伤的保护作用 [J]. *现代药物与临床*, 2017, 32(5): 762-766.
- [6] Abraham M K, Chang W W. Subarachnoid hemorrhage [J]. *Emerg Med Clin North Am*, 2016, 34(4): 901-916.
- [7] Cahill J, Calvert J W, Zhang J H. Mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006, 26(11): 1341-1353.
- [8] Hasegawa Y, Suzuki H, Sozen T, *et al.* Apoptotic mechanisms for neuronal cells in early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2011, 110(Pt 1): 43-48.
- [9] Shao A, Wu H, Hong Y, *et al.* Hydrogen-rich saline attenuated subarachnoid hemorrhage-induced early brain injury in rats by suppressing inflammatory response: possible involvement of NF-kappaB pathway and NLRP3 inflammasome [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(5): 3462-3476.
- [10] Lamkanfi M, Dixit V M. Modulation of inflammasome pathways by bacterial and viral pathogens [J]. *J Immunol*, 2011, 187(2): 597-602.
- [11] Lamkanfi M, Kanneganti T D. Nlrp3: an immune sensor of cellular stress and infection [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(6): 792-795.
- [12] Ma Q, Chen S, Hu Q, *et al.* NLRP3 inflammasome contributes to inflammation after intracerebral hemorrhage [J]. *Ann Neurol*, 2014, 75(2): 209-219.
- [13] Yang F, Wang Z, Wei X, *et al.* NLRP3 deficiency ameliorates neurovascular damage in experimental ischemic stroke [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2014, 34(4): 660-667.
- [14] Daniels M J, Rivers-Auty J, Schilling T, *et al.* Fenamate NSAIDs inhibit the NLRP3 inflammasome and protect against Alzheimer's disease in rodent models [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12504.
- [15] Felderhoff-Mueser U, Schmidt O I, Oberholzer A, *et al.* IL-18: a key player in neuroinflammation and neurodegeneration? [J]. *Trends Neurosci*, 2005, 28(9): 487-493.