

竹节参总皂苷通过 NLRP1 和 NLRP3 炎症小体途径减轻衰老大鼠神经细胞凋亡的作用研究

邓丽丽^{1,2}, 王佳文¹, 袁丁², 张长城¹, 刘朝奇¹, 周志勇¹, 何毓敏¹, 王婷^{1*}

1. 三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002

2. 三峡大学仁和医院, 湖北 宜昌 443001

摘要: **目的** 基于核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 1 (NLRP1) 和 NLRP3 炎症小体途径探讨竹节参总皂苷 (SPJ) 减轻衰老大鼠神经细胞凋亡的作用。 **方法** 以自然衰老大鼠为研究对象, 将 SPF 级 SD 雄性大鼠随机分为对照组 (9 月龄)、模型组 (24 月龄) 和 SPJ 低、中、高剂量组, 从 18 月龄开始, SPJ 低、中、高剂量组分别 ig 给予 SPJ 10、30、60 mg/kg, 衰老模型组 ig 等量生理盐水, 给药至 24 月龄, 每周停药 2 d, 持续给药 6 个月。TUNEL 法检测衰老大鼠皮层和海马区神经细胞凋亡情况, Western blotting 法检测衰老大鼠皮层和海马区白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-18、凋亡相关微粒蛋白 (ASC)、NLRP1、NLRP3、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1 (Caspase-1) 表达量的变化。 **结果** TUNEL 实验结果显示, 对照组中仅见极少数凋亡细胞; 与对照组相比, 模型组中凋亡细胞数明显增加。与模型组相比, SPJ 组大鼠大脑皮层和海马 CA1、CA3、DG 区凋亡细胞数明显下降。Western blotting 结果表明, 大鼠大脑皮层和海马组织中 IL-1 β 、ASC、NLRP3、NLRP1、Caspase-1、IL-18 的蛋白表达水平均随着年龄的增长而逐渐上调; 给药 6 个月后, SPJ 各剂量组均能下调 IL-1 β 、IL-18、ASC、NLRP3、NLRP1、Caspase-1 蛋白的表达水平。 **结论** SPJ 对衰老大鼠脑组织 (皮层和海马) 神经元损伤具有保护作用, 其机制可能与其调节 NLRP1 和 NLRP3 炎症小体途径, 从而减轻炎症反应有关。

关键词: 竹节参总皂苷; 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 1; 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3; 炎症反应; 大脑皮层; 海马组织; 凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)23-4941-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.23.019

Effects of saponins from *Panax japonicus* on neuronal apoptosis of natural aging rats by NLRP1 and NLRP3 inflammasome pathway

DENG Li-li^{1,2}, WANG Jia-wen¹, YUAN Ding², ZHANG Chang-cheng¹, LIU Zhao-qi¹, ZHOU Zhi-yong¹, HE Yu-min¹, WANG Ting¹

1. College of Medical Science, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

2. Ren-He Hospital of China Three Gorges University, Yichang 443001, China

Abstract: Objective To observe the effects of saponins from *Panax japonicus* on neuronal apoptosis of natural aging rats and its mechanisms based on NLRP1 and NLRP3 inflammasome pathway. **Methods** Male SD rats in a SPF grade were randomly divided into five groups: control group (9-month-old rats), model group (24-month-old rats), and SPJ treatment group (10, 30, and 60 mg/kg). From the beginning of 18 months, animals were treated with SPJ (or normal saline) by ig until 24 months, and stopped 2 d each week for six months of continuous administration. The neural apoptosis situation of cortex and hippocampus in aging rats were observed by TUNEL method. The protein expression of IL-1 β , ASC, NLRP3, NLRP1, Caspase-1, and IL-18 of the cerebral cortex and hippocampal were detected by Western blotting. **Results** TUNEL results showed that there were a very small number of apoptotic cells in the cortex and hippocampus in control group. Compared with control group, the model group significantly increased the number of apoptotic cells. Compared with model group, the number of apoptotic cells was significantly decreased in rat cortex and hippocampus (CA1, CA3, and DG) after treated with SPJ (10, 30, and 60 mg/kg). Western blotting results showed a significant age-related increase in the

收稿日期: 2017-05-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81374001)

作者简介: 邓丽丽 (1985—), 女, 研究生, 研究方向为中药药理学。Tel: 18271312980 E-mail: dlllovepeng@163.com

*通信作者 王婷 (1979—), 女, 博士, 教授, 研究方向为中药药理学。E-mail: tingting0301@126.com

expression of IL-1 β , ASC, NLRP3, NLRP1, Caspase-1, and IL-18, while SPJ concentration-dependently decreased the levels of IL-1 β , ASC, NLRP3, NLRP1, Caspase-1, and IL-18 after six-month treatment. **Conclusion** In conclusion, saponins from *P. japonicus* has protective effects on the brain (cortex and hippocampus) of aging rats. The mechanism is likely to be that saponins from *P. japonicus* can reduce nerve inflammation by regulating NLRP1 and NLRP3 inflammasome pathway.

Key words: total saponin from *Panax japonicus* C. A. Mey; NLRP1; NLRP3; inflammation; cortex; hippocampus; apoptosis

神经退行性疾病是一类严重威胁人类健康的疾病, 已导致全球 3 000 多万人残疾和死亡^[1], 其发病原因复杂, 机制也尚未完全清楚。近年来研究发现^[2], 炎症小体介导的炎症途径与中枢神经系统疾病的发生密切相关。炎症小体通过凋亡相关微粒蛋白 (ASC) 招募半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1 (Caspase-1) 前体, Caspase-1 可通过与炎症小体结合而激活, 对白细胞介素 1 β 前体 (pro-interleukin-1 beta, pro-IL-1 β) 和 pro-IL-18 等炎症因子前体进行切割和加工, 使其成熟并释放到胞外, 引起神经炎症反应, 促进细胞凋亡, 导致大脑病变^[3]。

竹节参 *Rhizoma Panax Japonicus* 是五加科人参属植物竹节参 *Panax japonicus* C. A. Mey. 的干燥呈竹鞭状根茎, 是我国常用的中药, 具有抗炎、抗氧化、抗衰老等多种药理作用^[4]。本课题组前期研究^[5]表明, 竹节参总皂苷 (SPJ) 能减轻 D-半乳糖诱导的神经元损伤, 改善认知能力, 但竹节参是否是通过核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 1 (NLRP1) 和 NLRP3 炎症小体途径减少衰老大鼠神经细胞凋亡还有待进一步研究。因此, 本研究拟在前期研究基础上, 研究 SPJ 对自然衰老大鼠脑组织炎症反应的调节作用, 为竹节参的临床应用提供理论基础和实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 由三峡大学实验动物中心提供, 许可证号 SCXK(E) 2012-0001。实验动物饲养于温度为 (23 $\pm$ 3) $^{\circ}$ C、相对湿度为 (60 $\pm$ 5) %、12 h 明暗交替的 SPF 级动物房中, 自由饮水和摄食。

1.2 药物及试剂

竹节参药材购于湖北省恩施市竹节参种植基地, 由湖北省天然产物研究与利用重点实验室邹坤教授鉴定为五加科人参属植物竹节参 *Panax japonicus* C. A. Mey. 的干燥呈竹鞭状根茎。SPJ 的提取方法与课题组前期研究一致^[6]。RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度定量试剂盒、ECL 显色液、磷酸蛋白酶抑制剂购于碧云天生物技术研究; β -actin 抗体, 美国 Proteintech 公司; NLRP3、NLRP1 抗体, 美国

Abcam 公司; Caspase-1 抗体, 美国 Bioworld technology 公司; ASC、IL-18、IL-1 β 抗体, 美国 Santa Cruz 公司。

1.3 仪器

TP1020 全自动脱水机, 德国 Leica 公司; ULTRACUT R 超薄切片机, 奥地利莱卡公司; PowerPac200 Western blotting 电泳仪, 美国伯乐公司; Bioshine ChemiQ4800 mini 化学发光成像系统, 上海欧翔科学仪器有限公司; CKX41 倒置显微镜, 日本奥林巴斯公司。

2 方法

2.1 分组及给药

将 SPF 级 SD 大鼠随机分为 5 组, 即对照组 (9 月龄), 模型组 (24 月龄), SPJ 低、中、高剂量 (10、30、60 mg/kg) 组, 每组 15 只。大鼠从 18 月龄开始, SPJ 各剂量组分别 ig 药物至 24 月龄, 每天给药 1 次, 每周停药 2 d, 连续 6 个月。足月的大鼠腹腔麻醉后, 每组 8 只断头处死, 快速分离海马和皮层, 样品迅速过液氮, 储存于 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱中; 其余大鼠用 4% 多聚甲醛经心脏灌注固定, 固定完毕后, 将标本取出, 常规梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡、包埋制成石蜡切块, 切片。

2.2 TUNEL 法检测神经细胞凋亡

采用 TUNEL 法检测衰老大鼠皮层和海马区神经细胞凋亡情况, 标记凋亡细胞核的 DNA 3'-OH 末端。每组随机选取 5 只大鼠海马组织切片, 操作按检测试剂盒说明书进行, 胞核中有棕色颗粒者为凋亡细胞。显微镜下观察结果、拍照并进行分析。

2.3 Western blotting 法检测 IL-1 β 、IL-18、ASC、NLRP1、NLRP3、Caspase-1 蛋白表达

-80 $^{\circ}$ C 取组织样本, 快速称取组织约 50 mg, 尽可能将其剪切成细小的碎片, 加入预冷的 PBS 洗涤 3 次, 离心去上清, 加入 600 μ L RIPA 裂解液 (裂解液中已按比例加入蛋白磷酸酶抑制剂和 PMSF), 在玻璃匀浆器内充分匀浆 (匀浆需在冰上或 4 $^{\circ}$ C 进行), 冰浴 30 min, 并每隔 10 min 最高速剧烈漩涡 15~30 s。4 $^{\circ}$ C、11 165 r/min 离心 10 min, 上清即

为组织总蛋白，将上清转移至预冷的离心管中，BCA 法对蛋白进行定量，加入 loading buffer，煮沸变性，SDS-PAGE 凝胶电泳并转 PVDF 膜，转膜完毕后，将 PVDF 膜放入 5% 脱脂奶粉封闭液中，室温孵育 1 h，加入一抗 (IL-1 β , 1 : 500; IL-18, 1 : 500; ASC, 1 : 1 000; NLRP3, 1 : 1 000; NLRP1, 1 : 1 000; Caspase-1, 1 : 1 000)，4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵育过夜。TBST 洗涤 3 次，每次 10 min，加入相应的 HRP 标记的二抗 (兔抗, 1 : 3 000; 鼠抗, 1 : 3 000; 羊抗, 1 : 4 000)，室温孵育 1 h，TBST 洗涤 3 次，每次 10 min，使用 ECL 化学发光显色剂，在化学发光成像系统中显影成像。

2.4 统计学分析

采用 Image-Pro Plus 6.0、GraphPad Prism 5 和

SPASS 18.0 软件分析数据，实验结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示，运用单因素方差分析 (One-way ANOVA) Tukey-Kramer 检验法对组间差异的显著性进行检验。

3 结果

3.1 SPJ 对自然衰老大鼠皮层及海马区神经元凋亡的影响

采用 TUNEL 法观察大鼠大脑皮层和海马区神经细胞凋亡情况，经 TUNEL 法染色和苏木精复染后凋亡细胞核呈棕色，正常细胞核呈蓝色。实验结果表明，对照组大鼠皮层及海马区仅见极少数凋亡细胞；与对照组相比，模型组大鼠皮层及海马区凋亡细胞数明显增加。给予 SPJ 干预 6 个月后，与模型组比较，大鼠皮层和海马 CA1、CA3、DG 区凋亡细胞数明显下降，结果见图 1。

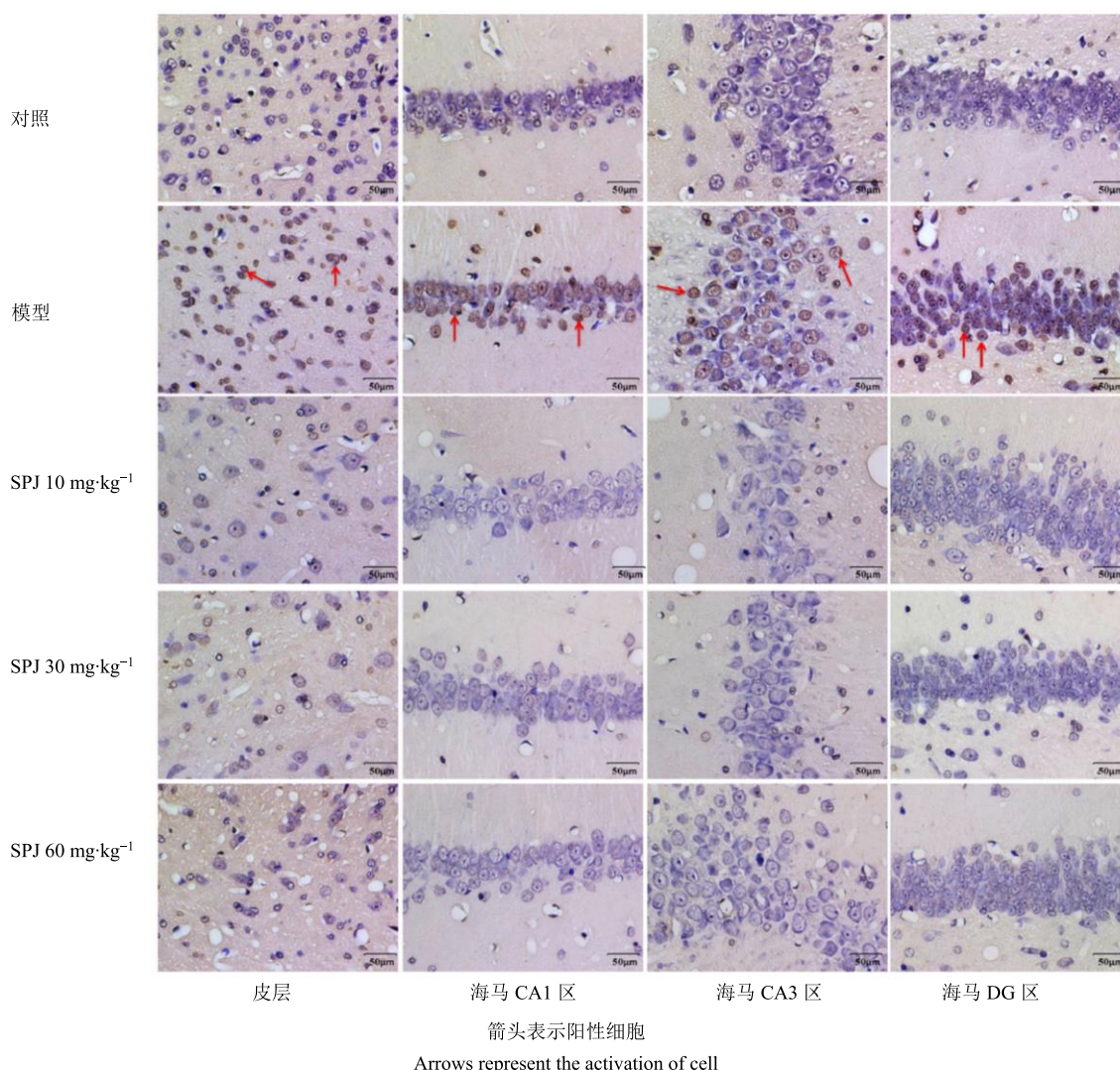


图 1 SPJ 对衰老大鼠皮层和海马区神经细胞凋亡的影响 ($\times 400$)

Fig. 1 Effect of SPJ on neural apoptosis situation of cortex and hippocampus of aging rats ($\times 400$)

3.2 SPJ 对自然衰老大鼠海马及皮层 ASC、NLRP1、NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 蛋白表达的影响

采用 Western blotting 法检测各组大鼠海马和皮层组织中 ASC、NLRP1、NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 蛋白的表达水平。实验结果 (图 2、3) 表明, 大鼠皮层和海马组织中 ASC、NLRP1、NLRP3、

Caspase-1、IL-1 β 及 IL-18 蛋白的表达量均随着月龄的增长而逐渐增加; 与对照组比较, 模型组大鼠皮层和海马组织中 ASC、NLRP1、NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 及 IL-18 的蛋白表达水平均显著增加 ($P < 0.01$)。给予 SPJ 干预 6 个月后, 与模型组比较, SPJ 高、中、低剂量均能下调 ASC、NLRP1、NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 及 IL-18 蛋白的表达水平 ($P < 0.05$ 、0.01)。

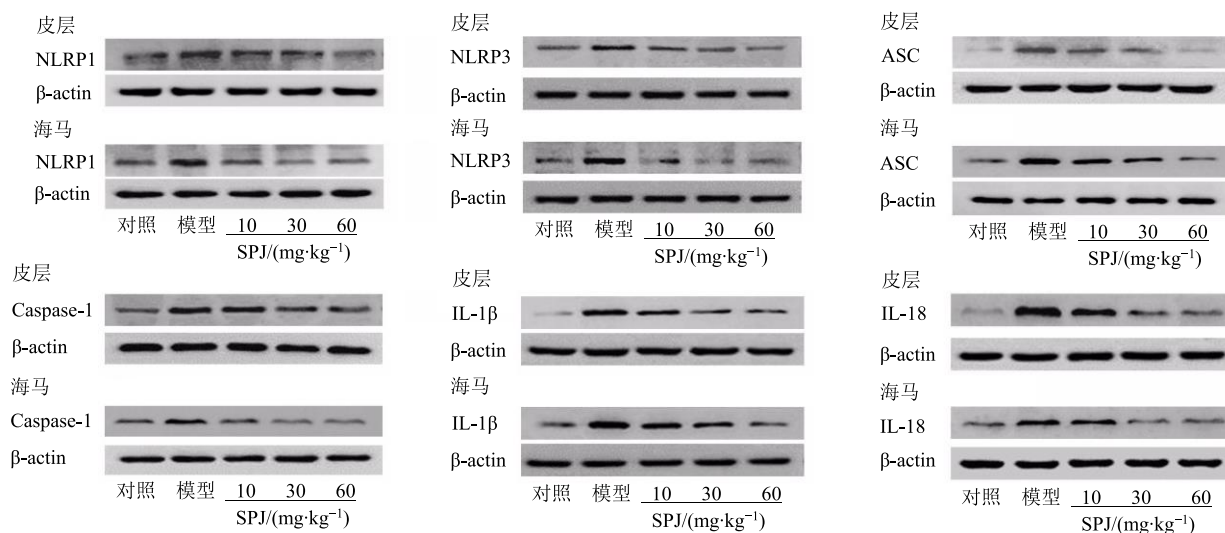
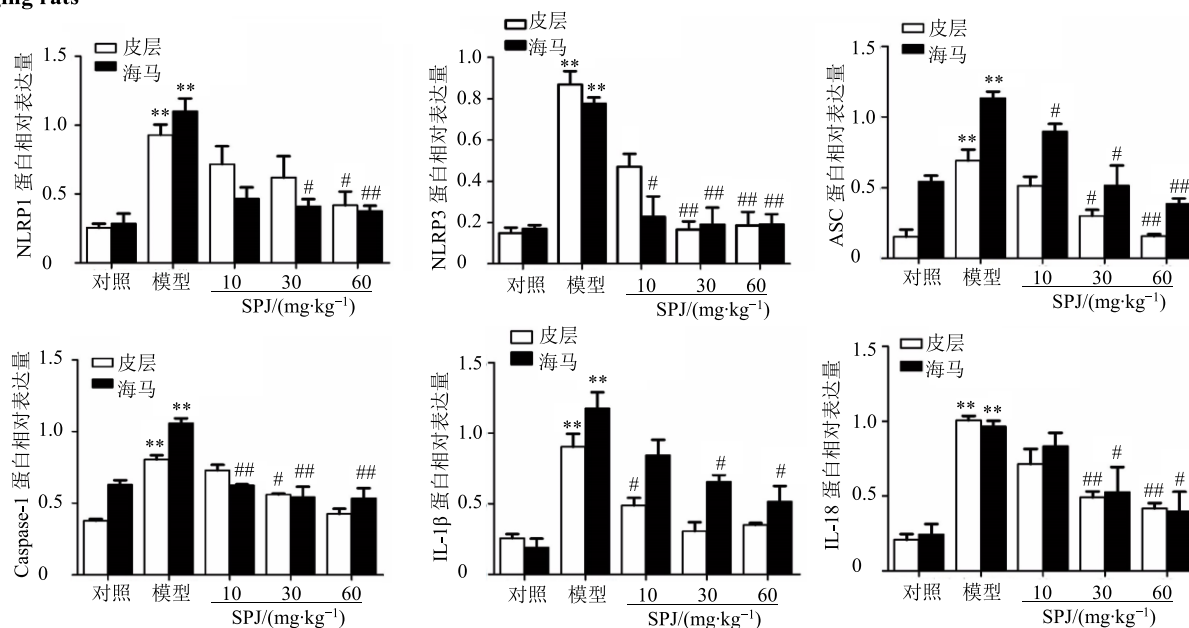


图2 SPJ 对衰老大鼠脑组织皮层和海马 ASC、NLRP1、NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 及 IL-18 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effects of SPJ on protein expression of ASC, NLRP1, NLRP3, Caspase-1, IL-1 β , and IL-18 in cortex and hippocampus of aging rats



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group

图3 SPJ 对衰老大鼠脑组织皮层和海马区 ASC、NLRP1、NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 及 IL-18 蛋白表达影响的半定量分析 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 3 Semi-quantitative evaluation of effects of SPJ on the expression of ASC, NLRP1, NLRP3, Caspase-1, IL-1 β , and IL-18 in cortex and hippocampus of aging rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

4 讨论

SPJ 从竹节参根茎中提取分离而得, 是竹节参的主要活性成分。近年来一些研究发现, SPJ 具有良好的抗炎和抗氧化活性^[6-7]。本实验结果表明, SPJ 可减少神经细胞凋亡和炎症反应, 这些作用可能是通过调控 NLRP1 和 NLRP3 介导的信号通路实现的。

炎症小体是 1 个多蛋白复合物, 能够产生具有活性的 Caspase-1, 促进细胞炎症因子前体 pro-IL-18 和 pro-IL-1 β 的切割成熟, 还可以调节 Caspase-1 导致细胞程序性死亡, 引起机体的炎症反应^[8]。炎症小体的异常活化能够导致多种炎症性疾病, 包括痛风、神经退行性疾病和基因遗传周期性发热综合征^[9]。NLRP1 和 NLRP3 在神经退行性疾病的发生发展中起重要作用。Tan 等^[10]研究表明有内侧颞叶癫痫的患者大脑 NLRP1 被激活, 并促进神经细胞凋亡。Hu 等^[11]研究发现, 长期糖皮质激素暴露可通过 NLRP1 炎症小体活化途径增加大脑炎症反应。还有文献报道表明^[12], 糖皮质激素可调节巨噬细胞中 NLRP3 对细胞外 ATP 的敏感性, 显著增加 ATP 介导的促炎细胞因子如 IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和 IL-6 的释放。Heneka 等^[13]研究表明, NLRP3 的过表达会加剧 AD 的发病进程。本研究结果显示, 衰老大鼠皮层和海马中 NLRP1 和 NLRP3 的蛋白表达水平均增加, 给予 SPJ 干预后, 可下调 NLRP1 和 NLRP3 蛋白表达水平。接头蛋白 ASC 是炎症小体的重要组成部分, 能够通过与 NLRPs 结合产生 Caspase-1^[14]。炎症小体是活化 Caspase-1 及释放 IL-1 β 和 IL-18 必不可少的物质, 且其参与介导开放更大的炎症应答信号通路, 促进细胞死亡^[15]。本研究结果表明, 大鼠皮层和海马组织中 ASC、Caspase-1、IL-1 β 及 IL-18 蛋白表达水平均随着年龄的增长而逐渐增加, 而 SPJ 能抑制 ASC、Caspase-1、IL-1 β 及 IL-18 蛋白的表达, 因此推断抑制 NLRP1 和 NLRP3 信号通路介导的炎症反应是 SPJ 发挥抗炎作用的机制之一。

参考文献

- [1] Maiese K. Targeting molecules to medicine with mTOR, autophagy and neurodegenerative disorders [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2016, 82(5): 1245-1266.
- [2] de Rivero Vaccari J P, Dietrich W D, Keane R W. Activation and regulation of cellular inflammasomes: gaps in our knowledge for central nervous system injury [J]. *J Cerebr Blood F Met*, 2014, 34(3): 369-375.
- [3] Pennisi M, Crupi R, Di Paola R, et al. Inflammasomes,

hormesis, and antioxidants in neuroinflammation: Role of NLRP3 in Alzheimer disease [J]. *J Neurosci Res*, 2016, 95(7): 1360-1372.

- [4] He H, Xu J, Xu Y, et al. Cardioprotective effects of saponins from *Panax japonicus* on acute myocardial ischemia against oxidative stress-triggered damage and cardiac cell death in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 140(1): 73-82.
- [5] Wang T, Di G, Yang L, et al. Saponins from *Panax japonicus* attenuate D-galactose-induced cognitive impairment through its anti-oxidative and anti-apoptotic effects in rats [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2015, 67(9): 1284-1296.
- [6] 贺海波, 许 佳, 徐媛青, 等. 竹节参总皂苷预处理对冠脉结扎致大鼠急性心肌缺血损伤的影响 [J]. *中药材*, 2012, 35(5): 744-749.
- [7] 代艳文, 袁 丁, 万静枝, 等. 竹节参总皂苷通过 NF- κ B 通路对 LPS 致 RAW264.7 细胞炎症的保护作用研究 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(11): 2076-2080.
- [8] Simanski M, Rademacher F, Schroder L, et al. The inflammasome and the epidermal growth factor receptor (EGFR) are involved in the staphylococcus aureus-mediated induction of IL-1 α and IL-1 β in human keratinocytes [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147118.
- [9] Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Wu J, et al. Anti-inflammatory compounds parthenolide and Bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(13): 9792-9802.
- [10] Tan C C, Zhang J G, Tan M S, et al. NLRP1 inflammasome is activated in patients with medial temporal lobe epilepsy and contributes to neuronal pyroptosis in amygdala kindling-induced rat model [J]. *J Neuroinflammation*, 2015, doi: 10.1186/s12974-014-0233-0.
- [11] Hu W, Zhang Y, Wu W, et al. Chronic glucocorticoids exposure enhances neurodegeneration in the frontal cortex and hippocampus via NLRP-1 inflammasome activation in male mice [J]. *Brain Behav Immun*, 2016, doi: 10.1016/j.bbi.2015.09.019.
- [12] Busillo J M, Azzam K M, Cidlowski J A. Glucocorticoids sensitize the innate immune system through regulation of the NLRP3 inflammasome [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(44): 38703-38713.
- [13] Heneka M T, Kummer M P, Stutz A, et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice [J]. *Nature*, 2013, 493(7434): 674-678.
- [14] Mariathasan S, Newton K, Monack D M, et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf [J]. *Nature*, 2004, 430(6996): 213-218.
- [15] Franchi L, Eigenbrod T, Munoz-Planillo R, et al. The inflammasome: A caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(3): 241-247.