

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.28.001

清热化痰解毒方预处理对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用及其对 TXNIP/NLRP3 通路的影响

王 涛,刘宏祥[△],王 颖,齐 姣,史小盼,王 丹
(河北大学附属医院中西医结合科,河北保定 071000)

[摘要] **目的** 探究清热化痰解毒方预处理对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用及其对硫氧还蛋白结合蛋白(TXNIP)/NALP3 炎性体(NALP3)通路的影响。**方法** 大鼠按照随机数字表法分为假手术组,模型组(大脑中动脉线栓法制备),尼莫地平预处理组(8.0 mg/kg),清热化痰解毒方低、中、高剂量预处理组,造模后对各组大鼠神经功能缺损进行评定,HE 染色法观察各组大鼠脑组织病理学变化,RT-PCR、Western blot 检测关节组织中 TXNIP、NLRP3、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、半胱天冬酶 1(caspase-1)表达。**结果** 与假手术组相比,模型组神经功能缺损评分、大鼠脑梗死面积、NLRP3、IL-1 β 、ASC、caspase-1 mRNA 及 TXNIP、NLRP3、IL-1 β 、ASC、caspase-1 蛋白表达明显升高($P<0.05$)。与模型组相比,尼莫地平组、清热化痰解毒方各组能明显降低神经功能缺损评分、大鼠脑梗死面积,呈剂量依赖性($P<0.05$);与模型组相比,尼莫地平组、清热化痰解毒方各剂量组 NLRP3、IL-1 β 、ASC、caspase-1 mRNA 表达及 TXNIP、NLRP3、IL-1 β 、ASC、caspase-1 蛋白表达水平、蛋白阳性表达率明显降低,呈剂量依赖性,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 清热化痰解毒方预处理对脑缺血再灌注损伤大鼠大脑具有保护作用,可能与抑制 TXNIP/NLRP3 通路蛋白表达有关。

[关键词] 清热化痰解毒方;脑缺血;再灌注损伤;硫氧还蛋白结合蛋白;NALP3 炎性体;作用机制

[中图法分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)28-3605-05

Protective effects of Qingre Huayu Jiedu Decoction on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats and its effect on TXNIP/NLRP3 pathway

WANG Tao, LIU Hongxiang[△], WANG Ying, QI Jiao, SHI Xiaopan, WANG Dan
(Department of Chinese and Western Medicine, Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding, Hebei 071000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect of Qingre Huayu Jiedu decoction on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats and its effect on thioredoxin-interacting protein (TXNIP)/NALP3-containing proteins-3 (NALP3) pathway. **Methods** Rats were randomly divided into sham operation group, model group (prepared by middle cerebral artery suture-occluded method), Nimodipine pretreatment group (8.0 mg/kg), Qingre Huatan Jiedu Decoction low, middle and high dose pretreatment group. The neurological deficits of each group were evaluated after modeling. HE staining was used to observe the pathological changes of brain tissue in each group. RT-PCR and Western blot were used to detect TXNIP, NLRP3, IL-1 β , Apoptosis-related spot-like protein (ASC) and caspase-1 expression in joint tissues. After making the model, the neurological deficit in each group was evaluated, the pathological changes of brain tissue in each group were observed by HE staining, RT-PCR and Western blot were used to detect the expressions of TXNIP, NLRP3, IL-1 β , apoptosis related speckle like protein (ASC) and caspase-1 in joint tissues. **Results** Compared with the sham operation group, the neurological deficit scores, cerebral infarct size, NLRP3, IL-1 β , ASC, caspase-1 mRNA expression and TXNIP, NLRP3, IL-1 β , ASC, caspase-1 protein expression in the model group were significantly elevated ($P<0.05$). Compared with the model group, the neurological deficit scores and the infarct size of rats in the nimodipine group and Qingre Huayu Jiedu Decoction group were significantly decreased in a dose-dependent manner ($P<0.05$). Compared with the model group, the expressions of NLRP3, IL-1 β , ASC and caspase-1 mRNA and the positive expression rates of TXNIP, NLRP3, IL-1 β , ASC and caspase-1 protein in Nimodipine group and Qingre Huayu Jiedu Decoction group were significantly decreased

in a dose-dependent manner. **Conclusion** Pretreatment with Qingre Huayu Jiedu Decoction has protective effects on the brain of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury, which may be related to the inhibition of TXNIP/NLRP3 pathway protein expression.

[Key words] Qingre Huatan Jiedu prescription; brain ischemia; reperfusion injury; Thioredoxin-interacting protein; NALP3 inflammasome; mechanism of action

缺血性脑卒中属于临床常见脑损伤疾病,近年来发病率逐渐升高,对人类健康造成严重的威胁,给患者带来经济、心理负担^[1]。近年来中药在治疗脑出血方面取得较好的疗效,其中清热化痰解毒方具有清热解毒效果,在脑缺血治疗中应用较多^[1]。硫氧还蛋白结合蛋白(TXNIP)是机体内重要的氧化应激因子,在心肌缺血及脑缺血中研究较多,有文献报道机体处于疾病状态时,其能够结合 NALP3 炎性体,激活 NALP3 信号通路,进而激活炎症反应导致脑梗死^[2]。然而清热化痰解毒方对 TXNIP/NLRP3 通路的作用机制,目前尚不清楚。本研究通过制备脑缺血再灌注损伤大鼠模型,观察清热化痰解毒方预处理后对大鼠神经功能及 TXNIP/NLRP3 通路的影响,以探究清热化痰解毒方的药理机制。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF 清洁级 SD 大鼠 90 只,8 周龄,体重 200~260 g,由北京生命科学研究动物实验中心提供,合格证号 SYXK(京)2015-0002,所有动物均严格按照动物饲养规则喂养,温度为 25℃,湿度为 60%。本研究经北京动物伦理委员会批准同意,批号为 IACUC-01(20160917)。

1.2 药品及试剂 清热化痰解毒方(主要成分:瓜蒌 10 g,郁金 10 g,石菖蒲 10 g,蒲公英 10 g,丹参 10 g,桔梗 10 g,杏仁 10 g,射干 10 g,川贝 10 g,黄芩 10 g,均购自于张仲景大药房);尼莫地平注射液(山东新华制药股份有限公司;批号 D14202003034;规格 10 mL/2 mg);三苯基氯化四氮唑(Amresco 公司,批号 298964);TXNIP、NLRP3 兔抗鼠单抗(英国 Abcam 公司,批号分别为 14623S、14781S);凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、半胱天冬酶 1(caspase-1)兔抗鼠单抗(美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 752610、752916、753304);羊抗鼠 IgG 二抗(上海容创生物科技有限公司,批号 RJC1793);苏木素染液、伊红染液(美国 Sigma 公司,批号 YYJK-923、230251);BCA 试剂盒(上海经科化学科技有限公司);RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司);反转录试剂盒(美国 Genecopoeia 公司);尼康 SMZ745 光学显微镜(上海普赫生物科技有限公司);CFX96 PCR 仪(美国 BioRad 公司);GIS-500 凝胶成像仪(杭州 Miulab 公司)。

1.3 方法

1.3.1 动物分组与给药 所有大鼠按照随机数字表法分为假手术组、模型组、尼莫地平预处理组(8.0

mg/kg),清热化痰解毒方低、中、高剂量预处理组,每组 15 只预处理组大鼠在进行造模前 3 天开始每天 2 次(每天上午 9:00 和下午 16:00)灌胃给药,最后一次给药于造模前 3 h,共计给药 7 次,假手术组、模型组大鼠均灌胃等量 0.9%生理盐水。预处理对应给药剂量为成人的 6.25 倍,所有大鼠平均体质量 220 g,则大鼠每天给药剂量为 6.5 mg/kg,设置清热化痰解毒方低、中、高剂量药物剂量为 6.5、13.0、26.0 mg/kg,尼莫地平给药剂量为 8.0 mg/kg。

1.3.2 脑缺血再灌注损伤模型大鼠制备 于大鼠腹腔注射 10% 3.5 mg/kg 水合氯醛麻醉,参考文献[3],依次使右颈总动脉及颈外、颈内动脉暴露,在颈外动脉远端处结扎,在其残端处插入直径为 0.24 mm 栓线,穿过颈总动脉进入内动脉,进而阻断大脑中动脉血流,持续 10 min 后,完成预缺血处理。3 d 后重新麻醉大鼠,并推进栓线,2 h 后将栓线完全抽出,模型制备结束。假手术组大鼠仅进行右颈总动脉分离处理。

1.3.3 大鼠神经功能缺损评分 造模后待大鼠醒后观察其行为变化,参照 LONGA^[4]分级法对神经功能进行评定,大鼠无神经功能缺损为 0 分;出现不能完全伸展对侧前爪等轻度神经功能缺损为 1 分;行走出现对侧旋转等轻中度神经功能缺损为 2 分;行走出现对侧倾倒等轻重度神经功能缺损为 3 分;意识完全丧失,不能行走为 4 分。重复评定 3 次,取平均值作为最终评分,评分为 1~3 分说明模型制备成功。

1.3.4 大鼠脑梗死面积测定 造模后 24 h,随机选取 6 只大鼠,断头取脑后,将额极、枕极切除,沿冠状切面切割为 5 片,置于 2%三苯基氯化四氮唑(TTC)磷酸盐缓冲液中,放置 37℃恒温水浴锅中,黑暗下孵育 30 min,染色均匀后,弃去 TTC,将脑切片放置于 4%多聚甲醛中,4℃固定 24 h,拍照后,采用 Image pro 软件进行分析处理,计算大鼠脑梗死面积。脑梗死面积=全脑梗死面积/全脑片面积 $\times 100\%$ 。

1.3.5 苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠脑组织病理学变化^[5] 造模后选取 6 只大鼠,处死后将脑组织放置于 4%多聚甲醛溶液固定,制备石蜡切片,在二甲苯中固定 30 min,随后在质量分数为 100%、95%、85%、75%的乙醇溶液中分别脱水 5 min;蒸馏水冲洗后,加入苏木素染色 10 min,随后置于 1%盐酸 5 s 后,蒸馏水进行冲洗。滴加伊红染液进行复染 5 min,在不同浓度的乙醇溶液中脱水 2 min,加入二甲苯进行透明处理,滴加中性树脂封片,置于光学显微镜下进行

观察。

1.3.6 RT-PCR 法检测脑皮质中 NLRP3、ASC、IL-1 β 、caspase-1 mRNA 表达 大鼠处死后取大鼠缺血侧脑皮质,参照 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,用反转录试剂盒反转录为 cDNA,PCR 引物序列见下表 1。反应体系为 20 μ L:2 $\times$ SYBR Mix 10.0 μ L,H₂O 8.0 μ L,上、下游引物各 0.5 μ L,10 $\times$ cDNA 模板 1.0 μ L。反应条件设定为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 10 s、60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,40 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。以 GADPH 作为内参基因根据 2^{- $\Delta\Delta$ C_t}算法计算各组 mRNA 表达水平。

表 1 PCR 引物序列

基因名称	方向	序列(5'-3')	引物长度 (bp)
NLRP3	正向	ATTACCCGCCGACAATAGG	139
	反向	CATGAGTCAGCTAGGCTAGAA	
ASC	正向	GATGCTCTGTACGGGAAGGTC	116
	反向	TCCAGTTCCAGGCTGGTGT	
caspase-1	正向	TAGCAGAGTCGTAAGACATG	122
	反向	GGGGCTTCTTTGAAGGCACAT	
IL-1 β	正向	TGCATGCTCTCGCTAGGACAG	119
	反向	TAGTGGTGGTCCGAGATT	
GADPH	正向	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	130
	反向	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG	

1.3.7 Western blot 检测脑皮质中 TXNIP、NLRP3、ASC、IL-1 β 、caspase-1 蛋白表达 将缺血侧脑皮质剪碎,添加蛋白裂解液置于冰上放置 30 min,离心后收集上清液,参照 BCA 试剂盒测定脑皮质蛋白总浓度,配制 10%分离胶和 5%浓缩胶,取 50 μ g 蛋白上样进行电泳和转膜反应,结束后用 TBST 溶液清洗,加入 5%脱脂牛奶室温下进行 1 h 封闭,TBST 溶液清洗后,加入一抗(TXNIP、NLRP3、ASC、IL-1 β 、caspase-1 抗体,稀释倍数 1:500),4 $^{\circ}$ C 过夜,TBST 溶液清洗后加入羊抗鼠 IgG 二抗(稀释倍数 1:10 000),室温下孵育 2 h,TBST 清洗后 ECL 显色后置于凝胶成像仪中观察各组蛋白表达情况。

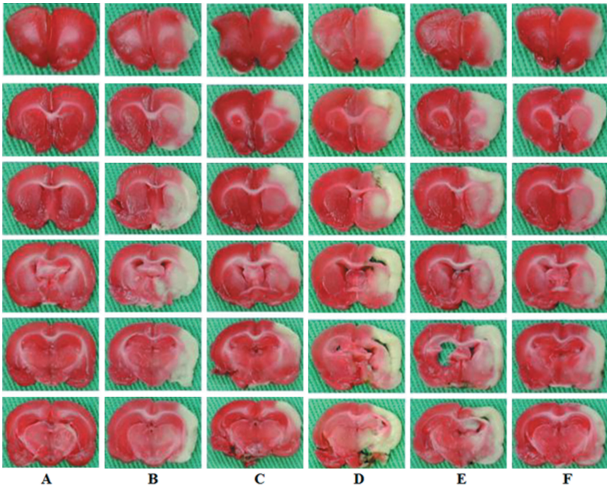
1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 清热化痰解毒方对大鼠神经功能缺损评分的影响 假手术组,模型组,尼莫地平组,清热化痰解毒方低、中、高剂量组大鼠神经功能缺损评分分别为 0、(2.56 $\pm$ 0.48)、(1.47 $\pm$ 0.29)、(2.02 $\pm$ 0.31)、(1.75 $\pm$ 0.27)、(1.35 $\pm$ 0.19)分。与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺损评分升高,差异有统计学意

义(*P*<0.05);与模型组比较,尼莫地平组,清热化痰解毒方低、中、高剂量组神经功能缺损评分均下降,呈剂量依赖性,差异有统计学意义(*P*<0.05)。

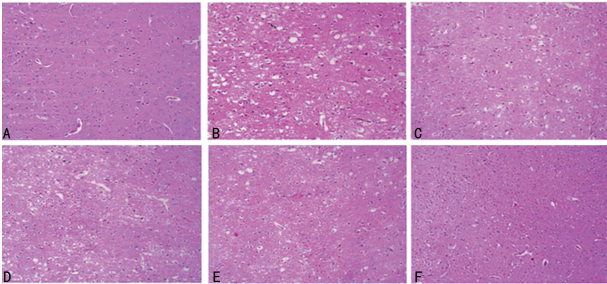
2.2 清热化痰解毒方对大鼠脑梗死面积的影响 假手术组,模型组,尼莫地平组,清热化痰解毒方低、中、高剂量组大鼠脑梗死面积分别为 0、(33.47 $\pm$ 3.21)%、(9.38 $\pm$ 1.26)%、(26.36 $\pm$ 3.19)%、(15.74 $\pm$ 3.27)%、(11.26 $\pm$ 2.13)%。与假手术组比较,模型组大鼠脑梗死面积升高,差异有统计学意义(*P*<0.05);与模型组比较,尼莫地平组和清热化痰解毒方低、中、高剂量组大鼠脑梗死面积均下降,呈剂量依赖性,差异有统计学意义(*P*<0.05),见图 1。



A:假手术组;B:模型组;C:尼莫地平组;D:清热化痰解毒方低剂量组;E:清热化痰解毒方中剂量组;F:清热化痰解毒方高剂量组

图 1 各组大鼠脑组织 TTC 染色情况

2.3 清热化痰解毒方对大鼠脑皮质组织病理学的影响 假手术组大鼠皮质细胞未出现明显病理学损害,细胞形态规则,排列紧密。模型组大鼠皮质细胞出现明显破裂、排列紊乱,细胞核固缩,且周围出现较大空泡,细胞明显坏死;清热化痰解毒方各剂量组细胞损害有所降低,随着药物处理浓度的升高,细胞出现肿胀减轻,坏死细胞数量逐渐减少,见图 2。



A:假手术组;B:模型组;C:尼莫地平组;D:清热化痰解毒方低剂量组;E:清热化痰解毒方中剂量组;F:清热化痰解毒方高剂量组

图 2 清热化痰解毒方对大鼠脑皮质组织病理学的影响(HE $\times$ 100)

2.4 清热化痰解毒方对脑皮质中 NLRP3、ASC、IL-1 β 、caspase-1 mRNA 的影响 与假手术组比较,模型组大鼠脑皮质中 NLRP3、ASC、IL-1 β 、caspase-1 mR-

NA 表达升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,尼莫地平组,清热化痰解毒方低、中、高剂量组 NLRP3、IL-1 β 、ASC、caspase-1 mRNA 表达降低,呈剂量依赖性,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

2.5 清热化痰解毒方对脑皮质中 TXNIP、NLRP3、ASC、IL-1 β 、caspase-1 蛋白的影响 与假手术组比较,模型组大鼠脑皮质中 TXNIP、NLRP3、ASC、IL-1 β 、caspase-1 蛋白表达升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,尼莫地平组,清热化痰解毒方低、中、高剂量组 TXNIP、NLRP3、IL-1 β 、ASC、caspase-1 蛋白表达降低,呈剂量依赖性,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 3、表 3。

2.6 清热化痰解毒方对脑皮质中 TXNIP、NLRP3、ASC、IL-1 β 、caspase-1 蛋白阳性表达率的影响 与假手术组比较,模型组大鼠脑皮质中 TXNIP、NLRP3、ASC、IL-1 β 、caspase-1 蛋白阳性表达率升高,差异有

统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,尼莫地平组,清热化痰解毒方低、中、高剂量组 TXNIP、NLRP3、IL-1 β 、ASC、caspase-1 蛋白阳性表达率降低,呈剂量依赖性,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

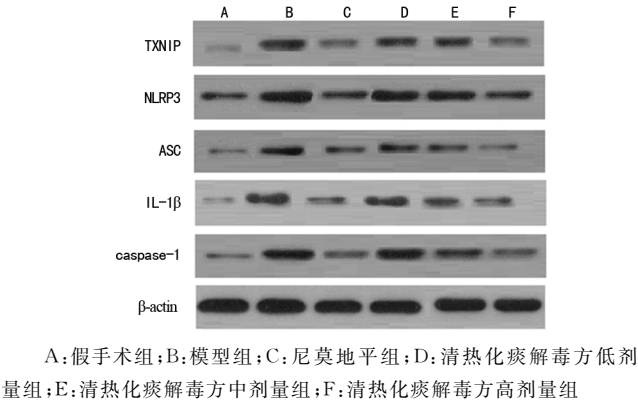


图 3 清热化痰解毒方对脑皮质中 TXNIP、NLRP3、ASC、IL-1 β 、caspase-1 蛋白的影响

表 2 清热化痰解毒方对脑皮质中 NLRP3、ASC、IL-1 β 、caspase-1 mRNA 表达影响($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量(mg/kg)	n	NLRP3	ASC	IL-1 β	caspase-1
假手术组		15	0.37 $\pm$ 0.06	0.24 $\pm$ 0.05	0.33 $\pm$ 0.06	0.17 $\pm$ 0.03
模型组		15	1.18 $\pm$ 0.23 ^a	0.97 $\pm$ 0.12 ^a	1.06 $\pm$ 0.18 ^a	0.91 $\pm$ 0.06 ^a
尼莫地平组	8.0	15	0.55 $\pm$ 0.09 ^c	0.38 $\pm$ 0.06 ^c	0.45 $\pm$ 0.09 ^c	0.42 $\pm$ 0.13 ^c
清热化痰解毒方低剂量组	6.5	15	0.85 $\pm$ 0.21 ^{ab}	0.71 $\pm$ 0.16 ^{ab}	0.79 $\pm$ 0.16 ^{ab}	0.71 $\pm$ 0.14 ^{ab}
清热化痰解毒方中剂量组	13.0	15	0.56 $\pm$ 0.19 ^c	0.56 $\pm$ 0.12 ^c	0.54 $\pm$ 0.13 ^c	0.49 $\pm$ 0.07 ^c
清热化痰解毒方高剂量组	26.0	15	0.44 $\pm$ 0.05 ^c	0.41 $\pm$ 0.07 ^c	0.38 $\pm$ 0.05 ^c	0.39 $\pm$ 0.06 ^c

^a: $P<0.01$,与假手术组比较;^b: $P<0.05$,^c: $P<0.01$,与模型组比较

表 3 清热化痰解毒方对脑皮质中 TXNIP、NLRP3、ASC、IL-1 β 、caspase-1、 β -actin 蛋白表达影响($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量(mg/kg)	n	TXNIP	NLRP3	ASC	IL-1 β	caspase-1
假手术组		15	0.26 $\pm$ 0.04	0.35 $\pm$ 0.05	0.22 $\pm$ 0.04	0.29 $\pm$ 0.03	0.31 $\pm$ 0.05
模型组		15	1.34 $\pm$ 0.29 ^a	1.57 $\pm$ 0.16 ^a	0.98 $\pm$ 0.06 ^a	1.12 $\pm$ 0.32 ^a	1.18 $\pm$ 0.16 ^a
尼莫地平组	8.0	15	0.41 $\pm$ 0.09 ^c	0.47 $\pm$ 0.14 ^c	0.35 $\pm$ 0.06 ^c	0.41 $\pm$ 0.09 ^c	0.39 $\pm$ 0.07 ^c
清热化痰解毒方低剂量组	6.5	15	0.99 $\pm$ 0.21 ^b	1.01 $\pm$ 0.16 ^b	0.73 $\pm$ 0.04 ^b	0.88 $\pm$ 0.17 ^b	0.87 $\pm$ 0.12 ^b
清热化痰解毒方中剂量组	13.0	15	0.68 $\pm$ 0.12 ^c	0.59 $\pm$ 0.08 ^c	0.52 $\pm$ 0.09 ^c	0.74 $\pm$ 0.19 ^c	0.66 $\pm$ 0.15 ^c
清热化痰解毒方高剂量组	26.0	15	0.45 $\pm$ 0.07 ^c	0.41 $\pm$ 0.04 ^c	0.37 $\pm$ 0.06 ^c	0.52 $\pm$ 0.08 ^c	0.41 $\pm$ 0.06 ^c

^a: $P<0.01$,与假手术组比较;^b: $P<0.05$,^c: $P<0.01$,与模型组比较

表 4 清热化痰解毒方对脑皮质中 TXNIP、NLRP3、ASC、IL-1 β 、caspase-1 蛋白阳性表达率的影响($\bar{x}\pm s$,%)

组别	剂量(mg/kg)	n	TXNIP	NLRP3	ASC	IL-1 β	caspase-1
假手术组		15	14.78 $\pm$ 2.04	15.73 $\pm$ 2.64	22.37 $\pm$ 3.56	20.51 $\pm$ 3.05	18.43 $\pm$ 3.71
模型组		15	80.56 $\pm$ 10.49 ^a	82.74 $\pm$ 10.37 ^a	76.91 $\pm$ 7.37 ^a	74.96 $\pm$ 7.87 ^a	72.03 $\pm$ 5.96 ^a
尼莫地平组	8.0	15	21.53 $\pm$ 2.79 ^c	23.79 $\pm$ 3.84 ^c	26.85 $\pm$ 5.44 ^c	51.72 $\pm$ 3.99 ^c	38.66 $\pm$ 2.68 ^c
清热化痰解毒方低剂量组	6.5	15	67.78 $\pm$ 8.21 ^b	64.27 $\pm$ 7.83 ^c	57.82 $\pm$ 5.41 ^c	47.08 $\pm$ 4.12 ^c	66.49 $\pm$ 4.28 ^c
清热化痰解毒方中剂量组	13.0	15	50.57 $\pm$ 7.82 ^c	49.16 $\pm$ 6.52 ^c	37.93 $\pm$ 3.68 ^c	38.19 $\pm$ 4.22 ^c	56.59 $\pm$ 4.75 ^c
清热化痰解毒方高剂量组	26.0	15	40.36 $\pm$ 5.36 ^c	28.53 $\pm$ 2.71 ^c	22.47 $\pm$ 3.91 ^c	23.57 $\pm$ 6.05 ^c	28.96 $\pm$ 3.46 ^c

^a: $P<0.01$,与假手术组比较;^b: $P<0.05$,^c: $P<0.01$,与模型组比较

3 讨 论

脑缺血发生率、致死率较高,以往临床上治疗脑缺血常用的方式为溶栓,但其容易引发缺血再灌注损伤,加重病情。TXNIP 介导的 NLRP3 信号通路在缺血性灌注损伤中发挥重要作用^[6-7]。目前在早期心肌缺血再灌注损伤中已对 TXNIP/NLRP3 信号通路进行研究,抑制该通路后能够保护小鼠缺血再灌注心肌受损^[8],但在脑缺血再灌注损伤中研究较少,本研究通过对脑缺血再灌注损伤大鼠采用清热化痰解毒方预处理,观察大鼠神经功能及 TXNIP/NLRP3 通路的变化,以探究清热化痰解毒方治疗的分子机制,为脑缺血再灌注损伤治疗提供一定的参考。

NLRP3 是机体内识别免疫系统病原体的重要蛋白,其能够在 ATP、病毒、尿酸钠诱导下激活,促进其 C 端结构 LRR 与配体结合,改变 NALP3 结构,促进 ASC、caspase-1 集合形成复合物活化 caspase-1,促使 IL-1 β 成熟并分泌至细胞外引发炎症反应,进而在多个系统、器官中发挥致病作用^[7-9]。王敏等^[10]研究显示在脑组织小胶质细胞及血管内皮细胞中均有 NLRP3 炎性体表达。在心肌缺血模型研究中显示心肌纤维细胞中 NLRP3 表达水平升高会加剧缺血性再灌注损伤程度^[11]。而在脑缺血再灌注损伤发生中 NLRP3 信号通路的作用尚不明确。本研究结果显示 NLRP3 信号通路中 NLRP3、ASC、IL-1 β 、caspase-1 表达均升高,提示 NLRP3 炎性体可能参与脑缺血再灌注损伤的发生,通过给予尼莫地平、大鼠清热化痰解毒方预处理显示 NLRP3、ASC、IL-1 β 、caspase-1 表达成剂量依赖性降低,并且大鼠脑神经缺损评分及脑梗死面积也降低,说明清热化痰解毒方可通过抑制 NLRP3 减轻脑缺血再灌注损伤程度,进而对大鼠脑组织发挥保护作用,效果与尼莫地平相似。

TXNIP 属于机体抗氧化应激反应硫氧还蛋白中重要一员,主要发挥氧化应激作用,近期有研究发现在机体处于疾病状态下,TXNIP 可结合 NLRP3 使其发生活化,进而激活 NLRP3 信号通路^[12]。本研究结果显示,大鼠 TXNIP/NLRP3 信号通路中关键蛋白 mRNA、蛋白及蛋白阳性表达率均降低,提示清热化痰解毒方可能抑制 TXNIP 的表达进而抑制 NLRP3 信号通路,说明 TXNIP/NLRP3 信号通路可能参与脑缺血再灌注损伤的发生。

综上所述,本研究结果提示清热化痰解毒方预处理能够抑制 TXNIP/NLRP3 通路,减轻大鼠脑缺血再灌注损伤,这可能为其作用机制之一,为临床脑缺

血再灌注损伤治疗提供了一定的参考。但本研究也存在一定的不足,并未在研究中设计通路抑制剂进行验证,这还有待后续深入研究。

参考文献

- [1] 刘文华. 化瘀解毒法对 MCAO 大鼠脑损伤和高凝血状态的作用及机理研究[D]. 长沙:湖南中医药大学,2015.
- [2] 杨勇,张华. TXNIP 激活 NLRP3 炎性小体在子痫前期发病中的作用[J]. 重庆医科大学学报,2016,41(7):658-662.
- [3] 马贤德,孙宏伟,柴纪严,等. 线栓法制备大鼠脑缺血再灌注模型的方法研究[J]. 中华中医药学刊,2009,27(6):1200-1201.
- [4] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. cummins RReversible middle artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke,1989,20(1):84-91.
- [5] 马峰,刘仲样. 病理技术 HE 染色用于病理诊断中的价值分析[J]. 中国实验诊断学,2015,19(12):2103-2104.
- [6] 毛善虎,郁红礼,吴皓,等. 掌叶半夏凝集素蛋白刺激巨噬细胞的致炎作用研究[J]. 中国中药杂志,2017,42(13):2497-2502.
- [7] KNAUF F, ASPLIN J R, GRANJA I, et al. NALP3-mediated inflammation is a principal cause of progressive renal failure in oxalate nephropathy[J]. Kidney Int, 2013, 84(5):895-901.
- [8] 焦春利,徐鹏,曹雪滨. 运动预适应调控力竭运动大鼠 NLRP3 炎性体 信号通路保护心肌的机制研究[J]. 中华危重病急救医学,2016,28(7):618-623.
- [9] 房树标,王永辉,李艳彦,等. 基于 NLRP3 炎性体信号通路研究桂枝芍药汤治母汤治疗痛风性关节炎的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(9):91-95.
- [10] 王敏,杨帆,庞博,等. NOD 样受体蛋白 3 炎性体在大鼠脑缺血再灌注损伤中的作用[J]. 中华神经外科杂志,2015,31(1):71-75.
- [11] TOLDO S, MARCHETTI C, MAURO A G, et al. Inhibition of the NLRP3 inflammasome limits the inflammatory injury following myocardial ischemia-reperfusion in the mouse[J]. Circulation,2015,132(3):215-220.
- [12] ZHAO Y, LI Q, ZHAO W J, et al. Astragaloside IV and cycloastragenol are equally effective in inhibition of endoplasmic reticulum stress-associated TXNIP/NLRP3 inflammasome activation in the endothelium[J]. J Ethnopharmacol,2015,169(20):210-218.

(收稿日期:2018-05-11 修回日期:2018-06-17)