辛温开窍中药对脑梗死大鼠 NLRP3 炎性反应通路的影响

张伦忠[1]，赵曼丽[1]，韩慧蓉[2]，王泽颖[1]，姜林芳[1]，贾玉勤[1]，刘海英[1]
(1. 山东省潍坊市中医院，山东 潍坊 261041；2. 潍坊医学院，山东 潍坊 261053)

[摘要]　目的　观察辛温开窍中药对脑梗死大鼠 NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1(Caspase－1)、白细胞介素－1β(IL－1β)、IL－18 的影响，探讨脑卒中的炎性反应通道及辛温开窍中药对缺血大鼠脑组织炎症反应的影响。方法　将健康成年雄性 SD 大鼠 120 只随机分为假手术组、缺血组、常规中药组和辛温开窍组，每组 30 只。除假手术组外，其余组均选择从颈总动脉插入线栓直达颈内动脉末端栓塞一侧大脑中动脉法制备脑梗死模型。在术前连续 3 d(每天 2 次)及术后(每 6 h 1 次)给予各组大鼠灌胃，常规中药组灌胃常规中药方煎剂，辛温开窍组灌胃常规中药方煎剂和麝香 0.5 g，假手术组和缺血组灌胃生理盐水。分别于术后 24 h 和 48 h 取缺血区脑组织，采用 Western Blot 检测 NLRP3、Caspase－1 表达水平，采用酶联免疫法(ELISA)检测 IL－18、IL－1β 表达水平，采用组织免疫荧光染色法检测 NLRP3 表达情况。结果　术后 24 h 和 48 h，缺血组、常规中药组和辛温开窍组大鼠脑组织中 NLRP3、Caspase－1、IL－18、IL－1β 表达水平均显著高于假手术组(P 均 <0.05)，但常规中药组和辛温开窍组均显著低于缺血组(P 均 <0.05)，且辛温开窍组均显著低于常规中药组(P 均 <0.05)。结论　脑组织缺血后存在炎性因子的表达和 NLRP3 炎性通道反应；辛温开窍中药可显著下调缺血脑组织 NLRP3、Caspase－1、IL－1β 和 IL－18 蛋白表达水平，可能与麝香快速通过血脑屏障，抑制缺血后脑组织 NLRP3 炎症通道有关。

[关键词]　辛温开窍法；NOD 样受体蛋白 3；半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1；白细胞介素－1β
doi：10.3969/j.issn.1008－8849.2019.17.004
[中图分类号]　R－332　[文献标识码]　A　[文章编号]　1008－8849(2019)17－1838－05

The effect of pungent and warm natured resuscitation drugs on the inflammatory reaction of NLRP3 in rats with cerebral infarction

Zhang Lunzhong[1], Zhao Manli[1], Han Huirong[2], Wang Zeying[1], Jiang Linfang[1], Jia Yuqin[1], Liu Haiying[1]
(1. Weifang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Weifang 261041, Shandong, China; 2. Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong, China)

Abstract: Objective It is to investigate the effect of pungent and warm natured resuscitation drugs on the nod-like receptor protein-3(NLRP3), Caspase-1, interleukin-1β(IL-1β), IL-18 in in rats with cerebral infarction, thus to explore the inflammatory response pathway of stroke and the effect of pungent and warm natured resuscitation drugs on the inflammatory response of ischemic rat brain tissue. **Methods** 120 healthy adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham operation group, ischemia group, conventional Chinese medicine group and pungent and warm natured resuscitation drug group, with 30 rats in each group. Except for the sham operation group, the cerebral infarction models were prepared from the common carotid artery insertion line to the end of the internal carotid artery embolization side of the middle cerebral artery in the other groups. The conventional Chinese medicine group was given conventional Chinese medicine decoction, and the drug group was given pungent and warm natured resuscitation decoction and musk 0.5 g, sham operation group and ischemia group were normal saline, all by intragastrically administration for 3 days before operation(2 times a

[作者简介]　张伦忠，男，硕士生导师，教授，主任医师，研究方向为脑血管病的中西医治疗。
[基金项目]　山东省科技发展计划项目(2013G0021823)

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

day) and after operation (every 6 hours). The brain tissue of ischemic area was taken at 24 h and 48 h after operation. The expression levels of NLRP3 and Caspase-1 were detected by Western Blot. The expression levels of IL-18 and IL-1β were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of NLRP3 was detected by tissue immunofluorescence staining. **Results** At 24 h and 48 h after operation, the expression levels of NLRP3, Caspase-1, IL-18 and IL-1β in the ischemic group, conventional Chinese medicine group and drug group were significantly higher than those in the sham operation group ($P<0.05$). However, the indexes in the conventional Chinese medicine group and drug group were significantly lower than those in the ischemic group ($P<0.05$), and the indexes in the drug group was significantly lower than those in the conventional Chinese medicine group ($P<0.05$). **Conclusion** There was expression of inflammatory factors and NLRP3 inflammatory channel reaction after cerebral ischemia; pungent and warm natured resuscitation drugs can significantly down-regulate the expression levels of NLRP3, Caspase-1, IL-1β and IL-18 in ischemic brain tissue, the mechanism may be related with musk qulickly passing through the blood-brain barrier and inhibiting of NLRP3 inflammatory channels in ischemic brain tissue.

Key words: pungent and warm natured resuscitation method; NLRP3; Caspase-1; IL-1β; IL-18

固有免疫被认为是机体防御的第一道防线，又称非特异性免疫，参与免疫反应的细胞包括吞噬细胞、上皮细胞和树突状细胞等。其中吞噬细胞是通过模式识别体(pattern recognition receptor，PRR)来识别和吞噬病原体，或分泌多种炎性细胞因子[1]以促进炎症反应。在PRR中，Toll样受体(TLR)和NOD样受体(NLR)分别作为胞外和胞内模式识别受体最受关注，更多的PRR为胞内NLR[2]。NOD样受体蛋白3(Nod-Like Receptor Protein-3，NLRP3)是胞浆内模式识别受体NOD样受体家族一员，主要功能是活化半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶1(Caspase-1)来间接调控白细胞介素-1β(IL-1β)、IL-18等的成熟和分泌[3]。当细胞受到感染等刺激时，被激活的NLRP3能够通过凋亡相关点样蛋白招募pro-caspase-1，并形成NLRP3炎性体。在炎性体的作用下，pro-caspase-1被激活成为Caspase-1，而Caspase-1将IL-18和IL-1β的前体进一步裂解成为具有重要生物活性的炎症因子，并参与多种炎症反应过程。近年来的临床试验证明动脉粥样硬化[4-5]、心脑血管事件、阿尔茨海默病[6]、2型糖尿病[7]、炎性肠病等的发病与发展与NLRP3炎性反应通路都密切相关。急性脑梗死属于中医学“中风”病的范畴，中医对脑梗死多是整体立法上的辨证论治，注重全身气血的调节，但是临床疗效却不尽如人意。笔者在临床中发现整体辨证论治的同时从局部立法，应用通窍中药治疗可引药直达其所，临床疗效更佳。为进一步明确脑梗死后脑组织的炎性反应机制及辛温开窍法治疗急性脑梗死的作用机制，为构建完整的中医脑病体系、提高中医药治疗脑病急危重症的疗效提供依据，笔者在整体辨证基础上结合急性脑梗死发病后的脑组织病理生理反应，以炎症因子为指标进行了实验研究，现将结果报道如下。

1 实验资料

1.1 实验动物及分组 健康成年雄性SD大鼠120只，体质量250~280 g，购自山东省朋悦动物繁育有限公司，实验动物许可证号：SCXK(鲁)2014-0007。大鼠饲料由潍坊医学院实验动物中心提供，室温控制在20~25 ℃，环境符合12h昼夜循环。将120只大鼠随机分为假手术组、缺血组、常规中药组、辛温开窍组，每组30只。

1.2 药物及试剂 常规中药以化痰泄浊、活血通络为主，组方：陈皮15 g、半夏9 g、竹茹12 g、茯苓20 g、桃仁15 g、红花12 g、当归20 g、川芎12 g、郁金12 g、大黄9 g、甘草6 g，由潍坊市中医院煎药室浓煎取汁共100 mL。β-actin一抗(Protein Tech Group，USA)；Caspase-1一抗(Protein Tech Group，USA)；NLRP3一抗(Protein Tech Group，USA)；DAPI染色液(Roche，Mannheim，Germany)；5×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(碧云天生物技术有限公司)；ELISA试剂盒(R&D Systems，USA)；HRP-羊抗鼠/抗兔(Protein Tech Group，USA)；RIPA，RIPA+EDTA(碧云天生物技术有限公司)。

1.3 大鼠模型制备 取直径为0.24 mm(线头直径为0.3 mm)的尼龙线。使用前，在距离线头20 mm处做标记，乙醇消毒后浸泡于肝素盐水中(1∶2 500 IU)。采用0.8%戊巴比妥钠30 mg/kg腹腔注射麻醉大鼠，于大鼠颈部正中切口，钝性分离出右侧颈总动脉、颈内动脉及颈外动脉，在颈外动脉、颈总动脉的近心端结扎，于远心端靠近颈总动脉分叉处打一

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

活结，两结之间置线备用。在两结扎线之间做一直径约 0.1 mm 的“V”字型微切口，将尼龙线栓自切口处小心插入(圆头一端在前)，将备用线结收紧，松开远心端活结，将尼龙线沿着颈内动脉送入颅内，插入深度约 20 mm 时遇阻力而停止，以阻断大脑中动脉血流。将尼龙线固定，逐层缝合后将大鼠放于 25 ℃温箱内，待苏醒后放回笼中。

1.4　干预方法　在术前连续 3 d(每天 2 次)及术后(每 6 h 1 次)给予各组大鼠灌胃，常规中药组灌胃常规中药方煎剂，辛温开窍组灌胃常规中药方煎剂和麝香 0.5 g，假手术组和缺血组灌胃生理盐水，均每次 2 mL。

1.5　检测指标　分别于术后 24 h 和 48 h 每组各随机处死大鼠 15 只，取脑组织，然后将缺血区域和正常区域的皮质修剪成 1 mm^3 大小的小块，洗涤血液并去除脑膜组织，用 2.5% 戊二醛固定液在离心管内固定，以确保固定剂完全浸没组织块。固定 48 h 后，完成电镜标本制备及拍片。Western Blot 检测脑组织中 NLRP3、Caspase－1 表达情况，酶联免疫法(ELISA)检测脑组织中炎性因子 IL－18 和 IL－1β 表达水平，组织免疫荧光染色检测 NLRP3 表达情况(NLRP3 在图像中呈现绿色荧光)。

1.6　统计学方法　采用 SPSS 17.0 软件进行数据统计分析，数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，比较采用 t 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　　果

2.1　各组大鼠大脑皮质中 NLRP3、Caspase－1 表达情况　术后 24 h 和 48 h，缺血组大鼠损伤脑组织中 NLRP3、Caspase－1 蛋白表达水平均明显高于假手术组(P 均 <0.05)，常规中药组和辛温开窍组 NLRP3、Caspase－1 蛋白表达水平均明显低于缺血组(P 均 <0.05)，且辛温开窍组均明显低于常规中药组(P 均 <0.05)。见图 1 和图 2。

2.2　各组大鼠大脑皮质中 IL－1β、IL－18 表达水平　术后 24 h 和 48 h，缺血组大鼠损伤脑组织中 IL－1β、IL－18 蛋白表达水平均明显高于假手术组(P 均 <0.05)，常规中药组和辛温开窍组 IL－1β、IL－18 蛋白表达水平均明显低于缺血组(P 均 <0.05)，且辛温开窍组均明显低于常规中药组(P 均 <0.05)。见图 3。

2.3　各组大鼠脑组织免疫荧光染色情况　组织免疫荧光染色结果与 Western Blot 实验结果一致，常规中药组和辛温开窍组 NLRP3 绿色荧光量均明显少于缺血组，且辛温开窍组更少。见图 4 和图 5。

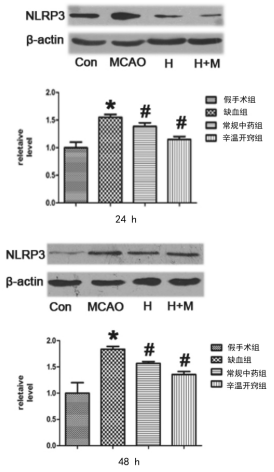

图 1　术后 24 h 和 48 h 各组大鼠损伤区大脑皮质中 NLRP3 蛋白表达情况

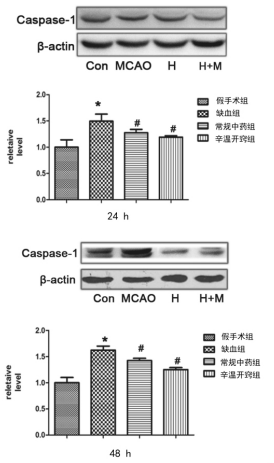

图 2　术后 24 h 和 48 h 各组大鼠损伤区大脑皮质中 Caspase－1 蛋白表达情况

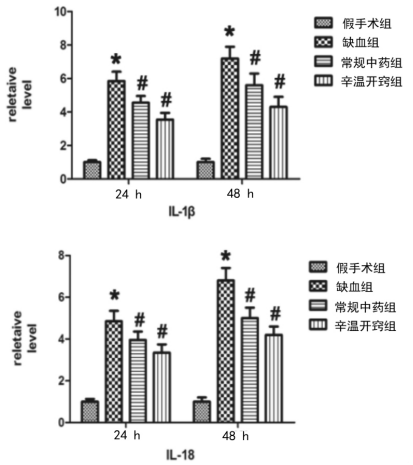

图 3　术后 24 h 和 48 h 各组损伤区大脑皮质中 IL－1β、IL－18 表达水平

3　讨　　论

NLRP3 炎症小体在树突状细胞、单核细胞和巨噬细胞中广泛表达，其是由NLR、ASC和无活性的

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

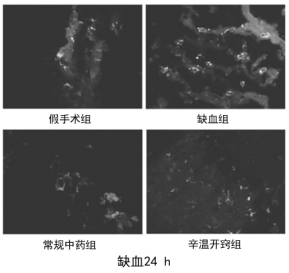

图4 术后24 h各组大鼠损伤区大脑皮质NLRP3免疫荧光染色表现

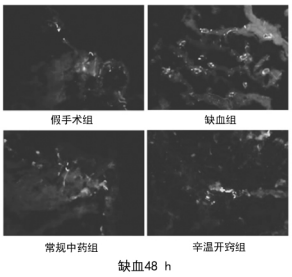

图5 术后48 h各组大鼠损伤区大脑皮质NLRP3免疫荧光染色表现

半胱天冬酶-1前体[8]组成的复合体，这种复合体对Caspase的激活起着非常重要作用，被命名为“炎性体”。NLRP3炎症小体的活化分为2步[9]：首先，激活剂通过细胞膜上的Toll样受体启动NF-κB信号通路，并引起pro-IL-1β和pro-IL-18前体表达增多；其次，激活剂通过多种分子机制进入细胞质并介导NLRP3、ASC和半胱天冬酶-1的聚集，以激活NLRP3炎性体，并促进pro-IL-1β和pro-IL-18向IL-1β和IL-18转化[10]。因此NLRP3炎症小体在适应性免疫应答中发挥着重要作用，并形成经典的NLRP3炎症复合物通路。另外半胱氨酸蛋白酶可以启动并执行一系列导致炎症或细胞凋亡的细胞程序，它们通常以无活性的酶原形式存在，并且在高效细胞活性的蛋白水解活化中起作用。其催化活性与信号依赖性炎症介质的激活密切相关，并间接处理细胞因子IL-1β和IL-18前体[11]。IL-1β是脑缺血损伤炎症级联的关键因子，是重要的促炎介质，并通过多种途径影响脑缺血再灌注损伤过程[12]。在生理条件下，脑内IL-1β水平很低，脑缺血后脑组织中IL-1β表达上调，可刺激细胞黏附分子的产生，引起嗜中性粒细胞聚集，诱导多种细胞因子表达[13]。IL-18主要由单核-巨噬细胞产生，其作为前炎性细胞因子可促进T细胞增加[14]，增强$CD8^+$ T细胞和自然杀伤细胞的细胞毒性作用。

本实验结果显示，术后24 h和48 h，缺血组大鼠损伤脑组织中NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18蛋白表达水平均明显高于假手术组，提示急性脑梗死大鼠缺血后存在NLRP3炎症反应，IL-1β和IL-18参与急性脑梗死炎症过程，与急性脑梗死的发生发展密切相关，这与文献[15]报道一致。常规中药组和辛温开窍组干预后NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18蛋白表达水平均明显低于缺血组，且辛温开窍组均明显低于常规中药组，提示辛温开窍中药可显著抑制急性脑梗死大鼠NLRP3炎性通道，减轻炎性反应。分析与中药麝香的加入，使整个方剂君臣佐使和药物作用途径及靶点发生改变有关：麝香辛香走窜，主要功效为开窍醒神、活血通络。《本草纲目》指出“盖麝香走窜，能通诸窍之不利，开经络之壅遏。”麝香通达十二经络，善于通关利窍，可携药直达病所，能够加强化痰通络药物的局部作用。麝香的主要成分有麝香酮、麝香醇，这两种成分能明显减轻脑水肿，提高中枢神经系统对缺氧的耐受性，能改善微循环和抑制炎症，尤其是对炎症早期作用最明显[16]。目前药理研究显示，天然麝香和人造麝香对缺血脑组织均有保护作用，其作用机制可能与抑制脑组织中基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达，降低兴奋性氨基酸毒性，减少脑组织血脑屏障的细胞外基质降解，改善血脑屏障的通透性，减轻血脑屏障损伤和缺血后脑水肿等作用有关[17-18]。

综上所述，急性期脑梗死大鼠脑组织中存在NLRP3炎性通路反应；常规化痰通络中药可显著降低损伤区大脑皮质中NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18表达水平；加用麝香后，NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18表达水平更低，提示辛温开窍法能显著减轻缺血脑组织的炎性反应，可能与麝香快速通过血脑屏障，携带药物直达其所，抑制缺血后脑组织NLRP3炎症通道有关。

[参 考 文 献]

[1] Medzhitov R，Janeway C Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways[J]. Immunol Rev，2000，173：89-97

[2] Ting JP，Lovering RC，Alnemri ES，et al. The NLR gene family: a standard nomenclature[J]. Immunity，2008，28(3)：285-287

[3] 李金凤，谢笛，何平平，等. NLRP3炎性体与代谢性疾病的研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展，2014，41(5)：425-434

[4] Paramel Varghese G，Folkersen L，Strawbridge RJ，et al. NLRP3 inflammasome expression and activation in human atherosclerosis[J]. J Am Heart Assoc，2016，5(5)：

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

e003031

[5] Rajamaki K, Mayranpaa MI, Risco A, et al. p38δMAPK: A novel regulator of NLRP3 inflammasome activation with increased expression in coronary atherogenesis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016, 36(9): 1937 – 1946

[6] Salminen A, Ojala J, Suuronen T, et al. Amyloid-beta oligomers setfire to inflammasomes and induce Alzheimer's pathology [J]. J Cell Mol Med, 2008, 12(6A): 2255 – 2262

[7] Guo H, Callaway IB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism ofaction, role in disease, and therapeutics [J]. Nat Med, 2015, 21(7): 677 – 687

[8] Sharma D, Kanneganti TD. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation [J]. J Cell Biol, 2016, 213(6): 617 – 629

[9] Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body [J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27: 229 – 265

[10] Vanaja SK, Rathinam VA, Fitzgerald KA. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights [J]. Trends Cell Biol, 2015, 25(5): 308 – 315

[11] Jarry A, Vallette G, Cassagnau E, et al. Interleukin 1 and interleukin 1beta converting enzyme (caspase 1) expression in the human colonic epithelial barrier. Caspase 1 downregulation in colon cancer [J]. Gut, 1999, 45(2): 246 – 251

[12] Mao K, Chen S, Chen M, et al. Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock [J]. Cell Res, 2013, 23(2): 201 – 212

[13] Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions atthe blood-brain barrier [J]. Nat Rev Neurosci, 2006, 7(1): 41 – 53

[14] Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro IL-beta [J]. Mol Cell, 2002, 10(2): 417 – 426

[15] Fann DY, Lee SY, Manzanero S, et al. Pathogenesis of acute stroke and the role of inflammasomes [J]. Ageing Res Rev, 2013, 12(4): 941 – 966

[16] Panchal HJ, Suhagia BN. Simultaneous determination of atorvastatin calcium and ramipril in capsule dosage forms by high-performance liquid chromatography and high-performance thin layer chromatography [J]. J AOAC Int, 2010, 93(5): 1450 – 1457

[17] 颜正华. 中药学 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 135 – 841

[18] 倪彩霞, 曾南, 许福会, 等. 芳香开窍药对脑缺血再灌注损伤大鼠血脑屏障影响的实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(18): 2562 – 2566

[收稿日期] 2018 – 07 – 05

(上接第 1837 页)

[4] 袁芳. 山楂叶总黄酮对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞凋亡及 bcl – 2、Bax、caspase – 3 蛋白表达影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(8): 42 – 45

[5] Reimer KA, Hill ML, Jennings RB. Prolonged depletion of ATP and of the adenine nucleotide pool due to delayed resynthesis of adenine nucleotides following reversible myocardial ischemic injury in dogs [J]. J Mel Cell Cardiol, 1981, 13(2): 229 – 239

[6] Reimer KA, Murry CE, Yamasawa I, et al. Four brief periods of myocardial ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis [J]. Am J Physiol, 1986, 251(6Pt2): 306 – 315

[7] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 285(2): H579 – 588

[8] 谢亚芹, 李秀芬, 赵娟, 等. 瑞舒伐他汀预处理对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞自噬的影响 [J]. 山东医药, 2018, 58(40): 38 – 40

[9] 乔蕾, 武秋林, 孔春艳, 等. 大蒜素后处理对大鼠心肌缺血 – 再灌注损伤的影响 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2018, 53(5): 595 – 598

[10] Guan Y, Yin Y, Zhu YR, et al. Dissection of mechanisms of a chinese medicinal formula: danhong injection therapy for myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo and in vitro [C]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 972370

[11] Ma XJ, Yin SJ, Jin JC, et al. Synergistic protection of Danhong injection(丹红注射液) and ischemic postconditioning on myocardial reperfusion injury in minipigs [J]. Chin J Integr Med, 2010, 16(6): 531 – 536

[12] Yang X, Orgah J, Wang D, et al. Danhong injection reduces vascular remodeling and up-regulates the Kallikrein-kinin system in spontaneously hypertensive rats [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 4308

[13] 段真珍, 于佳慧, 李玉红, 等. 丹红注射液减轻 DPPH 所致离体心脏功能损伤的作用研究 [J]. 天津中医药大学学报, 2014, 33(5): 283 – 286

[14] Chen J, Cao W, Asare PF, et al. Amelioration of cardiac dysfunction and ventricular remodeling after myocardial infarction by danhong injection arecritically contributed by anti-TGF-β-mediated fibrosis and angiogenesis mechanisms [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 194: 559 – 570

[收稿日期] 2017 – 11 – 30

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net