

doi:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2024.03.001

· 论 著 ·

藁本内酯抑制缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑组织凋亡相关蛋白的表达

郭晓杰¹, 吴丽², 尹焕培¹ (1. 河南省第二人民医院, 郑州 450000; 2. 郑州市中心医院, 郑州 450000)

[摘要]目的: 通过检测体内外缺氧缺血条件下 NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)、天冬氨酸蛋白水解酶 1(Caspase1)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、GSDMD-N 蛋白水平评价藁本内酯(LGSL)对缺氧缺血性脑损伤(HIBD)新生大鼠的神经保护作用。方法: 选取 7 日龄 SD 雄性大鼠随机分为假手术组(Sham 组)、HIBD 组和 LGSL 组各 10 只, 采用左颈总动脉双重结扎构建 HIBD 模型, 体外建立小胶质细胞氧糖剥夺(OGD)模型(OGD/R)。采用 CCK-8 评估不同浓度 LGSL 干预 24 h 对 OGD/R 小胶质细胞活力的影响; 通过免疫印迹评估 20 μ M LGSL 对体内外缺氧缺血条件下 NLRP3、Caspase1、IL-1 β 、GSDMD-N 表达的影响。结果: 在体内外模型中, NLRP3、IL-1 β 、Caspase1 及 GSDMD-N 表达均上调($P<0.05$); 20 μ M LGSL 干预 24 h 后, NLRP3、IL-1 β 、Caspase1 及 GSDMD-N 表达均下调($P<0.05$)。结论: LGSL 可以显著抑制新生大鼠体内外因缺氧缺血引起的神经炎症反应。

[关键词] 缺氧缺血性脑损伤; 新生大鼠; 小胶质细胞; 藁本内酯; Nod 样受体蛋白 3

[中图分类号] R722.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1672-108X(2024)03-0001-05

Inhibition of Ligustilide on Expression of Apoptosis-Related Proteins in Neonatal Rats with Hypoxic Ischemic Brain Damage

Guo Xiaojie¹, Wu Li², Yin Huanpei¹ (1. Henan Second Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450000, China; 2. Zhengzhou Central Hospital, Zhengzhou 450000, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the neuroprotective effect of ligustilide (LGSL) on neonatal rats with hypoxic ischemic brain damage (HIBD) by measuring NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), aspartate proteolytic enzyme 1 (Caspase1), interleukin-1 β (IL-1 β) and GSDMD-N protein levels induced by ischemia and hypoxia *in vivo* and *in vitro*. **Methods:** Seven-day-old male SD rats were randomly divided into the Sham-operated group (Sham group), HIBD group, LGSL group, with 10 rats in each group. The HIBD model was constructed by double ligation of the left common carotid artery, and the microglia oxygen-glucose deprivation (OGD/R) model was established *in vitro*. CCK-8 was used to evaluate the effects of different concentrations of LGSL on microglia activity after OGD/R stimulation for 24 h. Effects of 20 μ M LGSL on expression of NLRP3, Caspase 1, IL-1 β and GSDMD-N were evaluated by Western blotting. **Results:** Expressions of NLRP3, IL-1 β , Caspase 1 and GSDMD-N were all up-regulated *in vivo* and *in vitro* ($P<0.05$). After 20 μ M LGSL intervention for 24 h, the expressions of NLRP3, IL-1 β , Caspase 1 and GSDMD-N were down-regulated ($P<0.05$).

Conclusion: LGSL can significantly inhibit neuroinflammatory responses induced by ischemia and hypoxia both *in vivo* and *in vitro*.

[Keywords] hypoxic ischemic brain damage; neonatal rats; microglia cell; ligustilide; NOD-like receptor protein 3

缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是新生儿死亡和致残的主要原因^[1-2]。缺氧缺血引起炎症级联反应是新生儿脑损伤的重要生理因素^[3]。NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)是一种先天性免疫调控蛋白,广泛表达于神经细胞中,在神经适应性免疫调控中扮演着关键角色^[4]。缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)后,小胶质细胞和海马组织中 NLRP3 表达量迅速上升^[5-6]。藁本内酯(ligustilide, LGSL)是从草本植物川芎中提取的生物活性物质^[7]。研究^[8-11]表明, LGSL 对中风或阿尔兹海默症患者的脑损伤具有保护作用。Wang J 等^[12]发现, LGSL 能够抑制脂多糖诱导大鼠原代小胶质细胞内的炎症反应。因此,本研究探讨 LGSL 对缺氧缺血诱导体内外 NLRP3 表达的影响,为 HIBD 的预防和治疗提供参考。

1 材料和方法

1.1 动物和细胞

SFP 级 7 日龄雄性 SD 大鼠[北京华阜康生物科技股份有限公司, 动物许可证号: SCXK(京)2020-0004]; 大鼠

HAPI 小胶质细胞(ATCC, AC340723)。

1.2 试剂与耗材

LSGL(YZ-5397S)、DMEM 培养基(无糖)、D-葡萄糖、二甲基亚砜、CCK-8(CA1210), 索莱宝生物科技有限公司(中国北京); NLRP3(19771-1-AP)、天冬氨酸蛋白水解酶 1(Caspase1, 22915-1-AP)、白细胞介素(IL)-1 β (26048-1-AP)、 β -actin、辣根过氧化物酶标记兔二抗(SA00001-2)、辣根过氧化物酶标记鼠二抗(SA00001-1), Proteintech(中国武汉); GSDMD-N(DF13758), Affinity 生物有限公司(中国常州); 对乙酰氨基苯磺酰氯(ASC, ab283684), Abcam(英国剑桥); 磷酸盐缓冲液(PBS)、胰酶、胎牛血清(FBS), Gibco(美国加利福尼亚)。

1.3 HIBD 大鼠模型构建

参考 Rice-Vannucci 方法^[13]建立 HIBD: 首先采用异氟烷进行麻醉, 接着剥离左颈总动脉并进行双重结扎, 随后进行术后缝合, 完成后将大鼠放入保温箱至清醒。接着将其置于 37 $^{\circ}$ C 恒温缺氧箱(92% N₂ 和 8% O₂ 混合气体)以 5 L/min 流速充入密闭箱内 60 min, 假手术组

(Sham 组) 仅分离左颈总动脉, 只穿线不结扎。LGSL 组在造模结束后立即采用灌胃方式进行药物干预。

1.4 分组干预

建模后, 取存活的新生大鼠随机分为三组各 10 只: Sham 组、HIBD 组、LGSL 组。LGSL 干预方法: HIBD 大鼠模型建立后, 取 LGSL (纯度 $\geq 99.5\%$) 溶于 0.9% 氯化钠溶液中以 10 mg/kg 灌胃, q8h, 连续 7 d; Sham 组和 HIBD 组给予等体积 0.9% 氯化钠溶液。14 d 后, 将所有大鼠处死。

1.5 小胶质细胞氧糖剥夺 (OGD) 模型构建

小胶质细胞采用含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中进行常规传代培养。小胶质细胞 OGD 模型 (OGD/R) 建立^[14]: 弃去正常培养基, PBS 清洗 2 次, 加无糖无血清 DMEM 培养基, 将细胞置于充满 92% N₂ 和 8% CO₂ 的厌氧袋中孵育 2 h, 随后弃去无糖无血清 DMEM 培养基, 换为正常培养基在 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中继续培养。

1.6 细胞计数

将小胶质细胞接种于 96 孔板, 培养过夜; 然后分别加入不同浓度 LGSL 培养 24 h; 随后置于 OGD 环境下 37 °C 培养 4 h; 更换为标准的含有 LGSL 的复氧培养基, 37 °C 培养 8 h; 最后, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 37 °C 孵育 2 h; 置于酶标仪检测 450 nm 处检测吸光度。

1.7 蛋白印迹

向处理后的各组细胞内加入 RIPA 细胞裂解液, 提取总蛋白; 使用 BCA 试剂盒进行蛋白定量, 配平并变性; 将蛋白样品和 Marker 按照每孔 10 μ L 预制电泳胶中。进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE, 125 V, 60 min); 转膜 (400 mA, 90 min), 5% 脱脂

奶粉封闭过夜, 孵育 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β (1 : 1 000 稀释) 和 β -actin (1 : 10 000 稀释), 37 °C, 3 h; 对苯二甲酸丁二醇酯 (PBST) 洗膜 (5 min/s, 3 s); 分别加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗大鼠 IgG (1 : 3 000) 和山羊抗兔 IgG (1 : 10 000) 二抗孵育 1 h, ECL 化学发光显色并置于 Bio-Rad Gel Doc XRB 凝胶成像仪 (伯乐, 美国加州) 记录结果, 使用 Image J 测定目的条带的灰度值。其中, 条带相对表达量以其灰度值与相应 β -actin 条带灰度值的比值表示。

1.8 统计学方法

应用 GraphPad Prism Version 7.00 软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素变异系数分析或多重比重法分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模型建立情况评估

实验前, 大鼠均肤色红润、呼吸均匀、行为正常。手术结束, HIBD 组大鼠呼吸节律改变, 活动力降低。30 min 后恢复正常。缺氧处理过程中, 缺氧 10 min 时, 大鼠呼吸急促、情绪烦躁; 缺氧 60 min 时, 张口呼吸, 自主活动停止并伴随夹尾左旋。缺氧 90 min 时, 部分出现不自主抽搐, 持续 10~30 s 不等。与既往文献^[12-14]记载的呼吸和行为变化一致, 即造模成功。

2.2 LGSL 抑制 HIBD 大鼠脑组织凋亡相关蛋白的表达

与 Sham 组相比, HIBD 大鼠脑组织凋亡相关蛋白 NLRP3、IL-1 β 、Caspase-1 及 GSDMD-N 表达上调 ($P < 0.05$); LGSL 干预后, LGSL 组大鼠脑组织凋亡相关蛋白表达量低于 HIBD 组 ($P < 0.05$), 而与 Sham 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1。

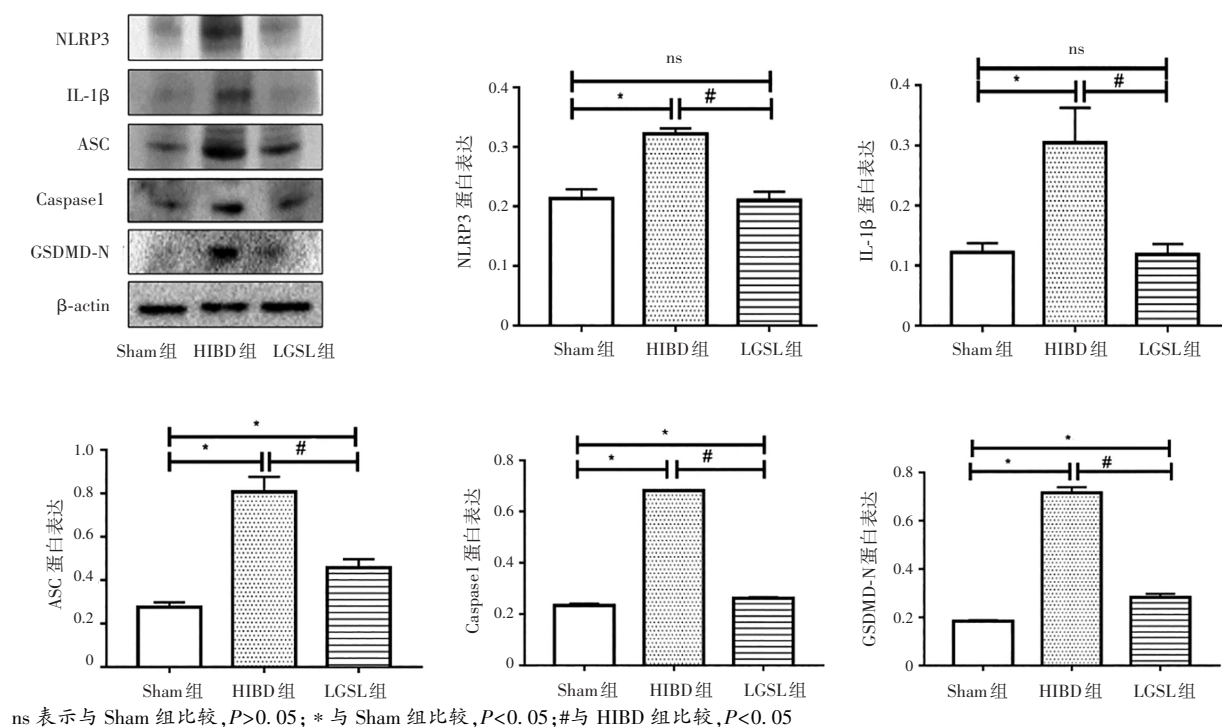


图 1 LGSL 抑制 HIBD 大鼠脑组织凋亡相关蛋白的表达

2.3 不同浓度 LGSL 对 OGD/R 小胶质细胞活力的影响

CCK-8 结果显示, OGD 刺激显著抑制小胶质细胞的活力($P<0.05$)。不同浓度的 LGSL 干预实验结果显示, 20 μM LGSL 能够抑制 OGD 诱导的细胞活力降低($P<0.05$), 同时随着 LGSL 浓度的升高, 细胞活力不断升高($P<0.05$)。见图 2。

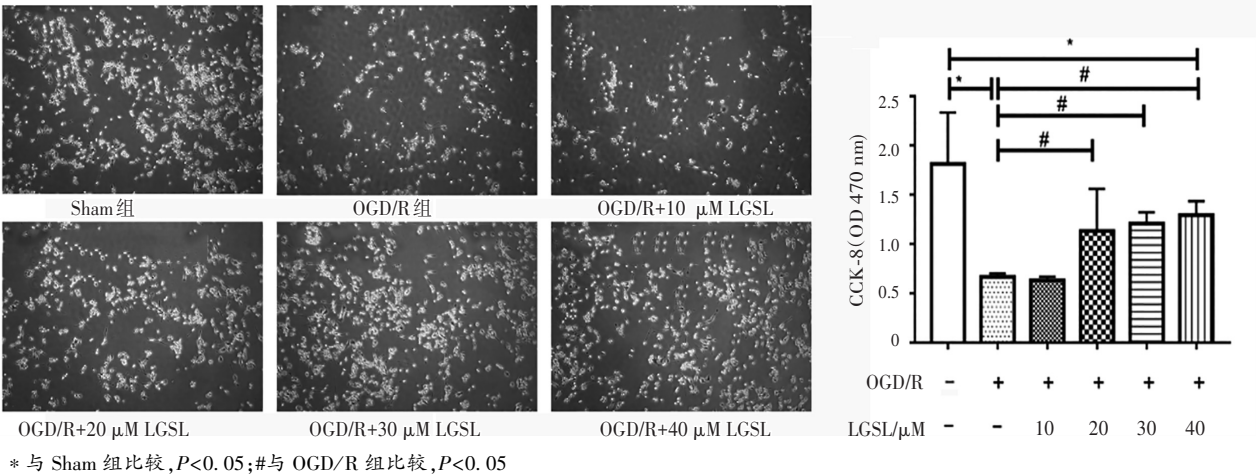


图 2 不同浓度 LGSL 对 OGD 小胶质细胞活力的影响

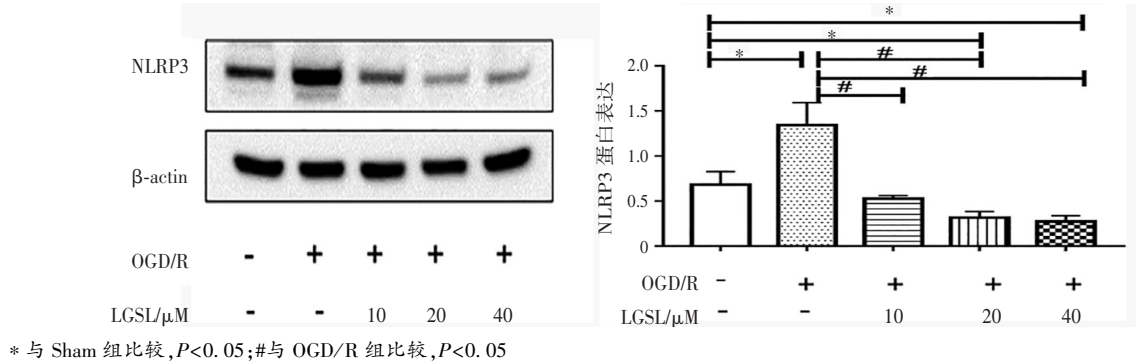


图 3 不同浓度 LGSL 对 OGD 刺激后 NLRP3 表达的影响

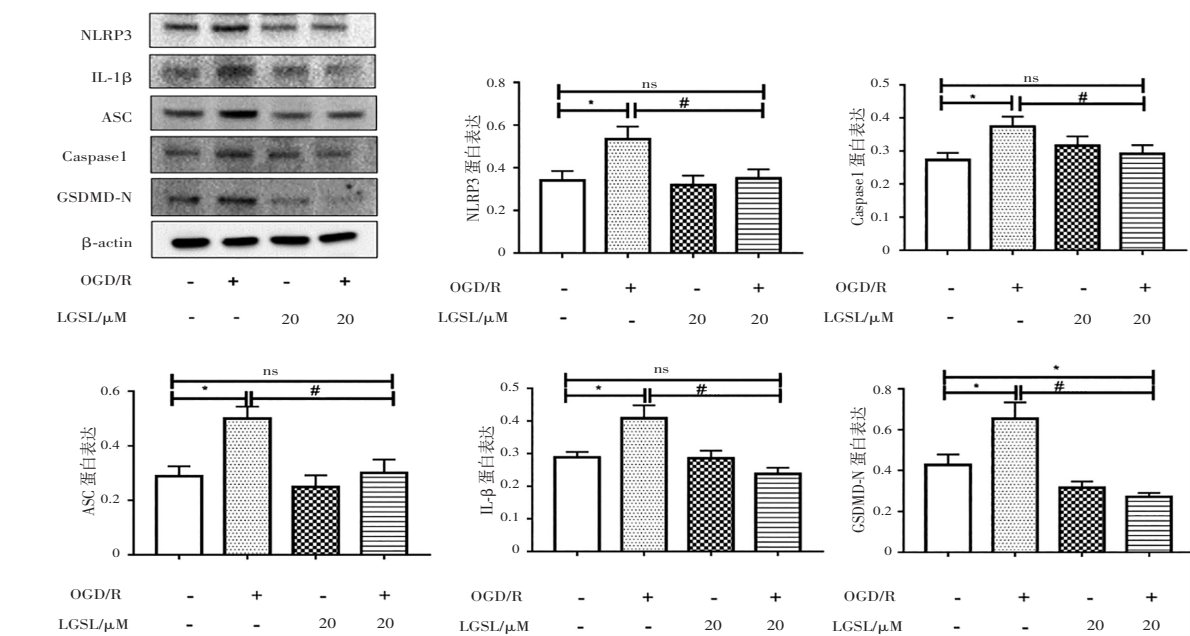


图 4 LGSL 对 OGD/R 小胶质细胞凋亡相关蛋白表达的影响

3 讨论

本实验结果证实,在体内 HIBD 新生大鼠模型和体外 OGD/R 细胞中, NLRP3、IL-1 β 、Caspase1、ASC 及 GSDMD-N 表达均显著上调,而在 LGSL 干预后得到改善。HIBD 严重威胁新生儿生命健康安全^[15]。研究^[16-17]表明, HIBD 的病理过程与炎症反应密切相关且持续的炎症反应进一步加剧脑损伤。在神经系统中, HIBD 诱导 NLRP3 自组装激活,产生一系列的信号级联反应,包括 Caspase1、ASC、IL-1 β 等活化^[18]。HIBD 早期神经系统损伤与 NLRP3/Caspase1/GSDMD 信号通路激活密切相关^[19]。Ismael S 等^[20]发现, NLRP3 缺陷或其选择性抑制剂可以缓解缺血性卒中患者的脑损伤。人参和当归是常见的中药对药,用于中风的治疗已有上千年历史,临床实践证实了其对神经系统疾病的显著疗效^[21]。LGSL 是从当归中提取的有效活性物质,已有应用于衰老^[22]、癌症^[23]和包括阿尔茨海默病^[11]和中风^[24]在内的一些中枢神经系统疾病治疗案例的报道。同时,在动脉粥样硬化 ApoE^{-/-}模型小鼠体内, LGSL 能够抑制炎症反应^[25]。本研究首次证实了 LGSL 能够抑制 HIBD 模型大鼠体内 NLRP3、IL-1 β 、Caspase1、ASC 及 GSDMD-N 的表达。

体外研究^[26]表明, NLRP3/Caspase1 信号通路激活促进小胶质细胞发生炎症反应。相反,抑制 NLRP3 以及下游调控因子的激活可显著抑制小胶质细胞的炎症反应^[27]。当缺氧缺血刺激后, NLRP3 迅速激活 Caspase1,活化的 Caspase1 剪切 GSDMD-N,介导 IL-1 β 和 IL-18 释放,从而诱导细胞凋亡,造成神经损伤^[28]。本研究进一步证明 LGSL 抑制 OGD/R 小胶质细胞内 NLRP3、IL-1 β 、Caspase1、ASC 及 GSDMD-N 表达上调。因此, LGSL 能抑制新生大鼠体内因缺氧缺血引起的神经炎症反应,本研究可为 LGSL 用于新生儿 HIE 的治疗提供理论支持。

参考文献:

- [1] LI N, MU Y P, LIU C Y, et al. Effect of astragaloside IV on the expression of NOD-like receptor protein 3 inflammasome in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage [J]. Chinese journal of contemporary pediatrics, 2021, 23(4): 402-409.
- [2] 庄静,陈全景. 新生儿缺氧缺血性脑损伤中微小 RNA 的研究进展[J]. 儿科药杂志, 2021, 27(12): 53-57.
- [3] LI B, CONCEPCION K, MENG X, et al. Brain-immune interactions in perinatal hypoxic-ischemic brain injury [J]. Progress in neurobiology, 2017, 159(10): 50-68.
- [4] KORGAONKAR A A, NGUYEN S, LI Y, et al. Distinct cellular mediators drive the Janus faces of Toll-like receptor 4 regulation of network excitability which impacts working memory performance after brain injury [J]. Brain Behav Immun, 2020, 88(3):381-395.
- [5] SERDAR M, KEMPE K, RIZAZAD M, et al. Early pro-inflammatory microglia activation after inflammation-sensitized hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats [J]. Frontiers in cellular neuroscience, 2019, 13: 237. doi: 10.3389/fncel.2019.00237.
- [6] YSTGAARD M B, SEJERSTED Y, LØBERG E M, et al. Early upregulation of NLRP3 in the brain of neonatal mice exposed to hypoxia-ischemia: no early neuroprotective effects of NLRP3 deficiency [J]. Neonatology, 2015, 108(3): 211-219.
- [7] CHI K, FU R H, HUANG Y C, et al. Therapeutic effect of ligustilide-stimulated adipose-derived stem cells in a mouse thromboembolic stroke model [J]. Cell transplantation, 2016, 25(5): 899-912.
- [8] ZHU W L, ZHENG J Y, CAI W W, et al. Ligustilide improves aging-induced memory deficit by regulating mitochondrial related inflammation in SAMP8 mice [J]. Aging, 2020, 12(4): 3175-3189.
- [9] KUANG X, CHEN Y S, WANG L F, et al. Klotho upregulation contributes to the neuroprotection of ligustilide in an Alzheimer's disease mouse model [J]. Neurobiology of aging, 2014, 35(1): 169-178.
- [10] HUANG J, LU X Q, ZHANG C, et al. Anti-inflammatory ligustilides from *Ligusticum chuanxiong* Hort [J]. Fitoterapia, 2013, 91(8): 21-27.
- [11] KUANG X, WANG L F, YU L, et al. Ligustilide ameliorates neuroinflammation and brain injury in focal cerebral ischemia/reperfusion rats: involvement of inhibition of TLR4/oxalodioxin 6 signaling [J]. Free radical biology & medicine, 2014, 71(3): 165-175.
- [12] WANG J, DU J R, WANG Y, et al. Z-ligustilide attenuates lipopolysaccharide-induced proinflammatory response via inhibiting NF-kappa B pathway in primary rat microglia [J]. Acta pharmacologica Sinica, 2010, 31(7): 791-797.
- [13] VANNUCCI R C, VANNUCCI S J. Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model [J]. Developmental neuroscience, 2005, 27(2-4): 81-86.
- [14] HU J, ZENG C, WEI J, et al. The combination of panax ginseng and angelica sinensis alleviates ischemia brain injury by suppressing NLRP3 inflammasome activation and microglial pyroptosis [J]. Phytomedicine, 2020, 76: 153251. doi: 10.1016/j.phymed.2020.153251.
- [15] LOGITHARAJAH P, RUTHERFORD M A, COWAN F M. Hypoxic-ischemic encephalopathy in preterm infants: antecedent factors, brain imaging, and outcome [J]. Pediatric research, 2009, 66(2): 222-229.
- [16] ZHU J J, YU B Y, HUANG X K, et al. Neferine protects against hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats by suppressing NLRP3-mediated inflammasome activation [J]. Oxidative medicine and cellular longevity, 2021: 6654954. doi: 10.1155/2021/6654954.
- [17] FLEISS B, GRESSENS P. Tertiary mechanisms of brain damage: a new hope for treatment of cerebral palsy? [J]. Lancet Neurol, 2012, 11(6): 556-566.
- [18] CHEN Z, HU Y, LU R, et al. MicroRNA-374a-5p inhibits neuroinflammation in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy via regulating NLRP3 inflammasome targeted Smad6 [J]. Life Sci, 2020, 252:117664. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117664.
- [19] WANG K, SUN Q, ZHONG X, et al. Structural mechanism for GSDMD targeting by autoprocessed caspases in pyroptosis [J]. Cell, 2020, 180(5): 941-955.
- [20] ISMAEL S, ZHAO L, NASOOHI S, et al. Inhibition of the NLRP3-inflammasome as a potential approach for neuroprotection after stroke [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 5971.
- [21] LUO C, BIAN X, ZHANG Q, et al. Shengui Sansheng San ameliorates cerebral energy deficiency via citrate cycle after

- ischemic stroke [J]. *Frontiers in pharmacology*, 2019, 10: 386. doi: 10.3389/fphar.2019.00386.
- [22] LI J J, ZHU Q, LU Y P, et al. Ligustilide prevents cognitive impairment and attenuates neurotoxicity in D-galactose induced aging mice brain [J]. *Brain research*, 2015, 1595: 19-28. doi: 10.1016/j.brainres.2014.10.012
- [23] MA J, XU Y, ZHENG Q, et al. Ligustilide inhibits the activation of cancer-associated fibroblasts [J]. *Life Sci*, 2019, 218: 58-64. doi: 10.1016/j.lfs.2018.12.032.
- [24] LONG F Y, SHI M Q, ZHOU H J, et al. Klotho upregulation contributes to the neuroprotection of ligustilide against cerebral ischemic injury in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 820: 198-205. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.12.019.
- [25] LI J, HUA Y, JI P, et al. Effects of volatile oils of angelica sinensis on an acute inflammation rat model [J]. *Pharmaceutical biology*, 2016, 54(9): 1881-1890.
- [26] HASEGAWA T, NAKASHIMA M, SUZUKI Y, et al. Nuclear DNA damage-triggered NLRP3 inflammasome activation promotes UVB-induced inflammatory responses in human keratinocytes [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2016, 477(3): 329-335.
- [27] YE Y, JIN T, ZHANG X, et al. Meisoindigo protects against focal cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and regulating microglia/macrophage polarization via TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Frontiers in cellular neuroscience*, 2019, 13: 553. doi: 10.3389/fncel.2019.00553.
- [28] YANG Y, WANG H, KOUADIR M, et al. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors [J]. *Cell death & disease*, 2019, 10(2): 128.
- (编辑:刘雄志)
(收稿日期:2022-10-10 修回日期:2023-06-15)

doi:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2024.03.002

• 论著 •

基于网络药理学探讨赖氨肌醇维生素 B₁₂ 口服液治疗小儿厌食症的作用机制

赵亚萍¹, 徐盼玲², 王萌萌¹ (1. 杭州市儿童医院, 杭州 310014; 2. 安徽医科大学第一附属医院, 合肥 230022)

[摘要]目的:从网络药理学角度探讨赖氨肌醇维生素 B₁₂ 口服液治疗小儿厌食症的机制。方法:通过查阅药品说明书,明确赖氨肌醇维生素 B₁₂ 口服液的成分,并通过 Swiss Target Prediction 网站预测成分的相关靶点,与小儿厌食症靶点进行交集映射,获得其治疗小儿厌食症的作用靶点。利用蛋白相互作用(PPI)网络筛选核心靶点,并进行分子对接验证。基于共有靶点,采用功能注释生物信息学芯片进行分析,得到赖氨肌醇维生素 B₁₂ 口服液治疗小儿厌食症的关键通路。结果:赖氨肌醇维生素 B₁₂ 口服液中的主要成分为盐酸赖氨酸、肌醇和维生素 B₁₂,共预测出 40 个靶基因,其中有 13 个靶基因与小儿厌食症的关系密切,主要涉及谷氨酸受体信号通路、神经活性配体-受体相互作用等相关分子环节。结论:赖氨肌醇维生素 B₁₂ 口服液可能发挥类似于谷氨酸的作用,通过激活突触后膜的谷氨酸受体,提高神经兴奋性,从而改善患儿的厌食症状,体现了多成分、多靶点协同起效的作用特点。

[关键词]网络药理学;分子对接;赖氨肌醇维生素 B₁₂ 口服液;小儿厌食症;分子机制

[中图分类号]R969

[文献标识码]A

[文章编号]1672-108X(2024)03-0005-04

Mechanism of Lysine, Inositol and Vitamin B₁₂ Oral Solution in the Treatment of Anorexia in Children Based on Network Pharmacology

Zhao Yaping¹, Xu Panling², Wang Mengmeng¹ (1. Hangzhou Children's Hospital, Hangzhou 310014, China; 2. The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China)

[Abstract]Objective: To explore the mechanism of lysine, inositol and vitamin B₁₂ oral solution in the treatment of anorexia in children based on network pharmacology. Methods: By referring to drug instructions, the components of lysine, inositol and vitamin B₁₂ oral solution were excavated, the correlation targets of components were predicted through Swiss Target Prediction website, and the intersection mapping was made with the targets of anorexia, so as to obtain the therapeutic targets of anorexia in children. Protein-protein interaction (PPI) was used to screen core targets and molecular docking verification was carried out. Based on common targets, functional annotation bioinformatics chip was used for analysis, and the key pathway of lysine, inositol and vitamin B₁₂ oral solution in the treatment of anorexia in children was obtained. Results: Lysine hydrochloride, inositol and vitamin B₁₂ were the main components in

基金项目:浙江省中医药科技计划项目,编号 2023ZR123。

作者简介:赵亚萍(1989.03-),女,硕士,住院医师,主要从事儿童生长发育疾病康复研究,E-mail: zyp3182183@163.com。

通信作者:王萌萌(1996.03-),女,硕士,住院医师,主要从事中西医结合治疗儿童生长发育疾病研究,E-mail: 18317912082@163.com。