

· 实验研究 ·

核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 炎性小体在心肺转流大鼠围术期神经认知障碍中的作用

付益计 李丹丹 宋丹丹 孙莹杰

【摘要】 目的 探讨核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎性小体在心肺转流 (CPB) 大鼠围术期神经认知障碍 (PND) 中的作用。**方法** 成年雄性 SD 大鼠 30 只, 体重 350~450 g, 进行 Morris 水迷宫训练 5 d 后随机分为三组, 每组 10 只: 假手术组 (S 组)、CPB 组 (C 组) 和 CPB+NLRP3 炎性小体抑制剂 Ac-YVAD-cmk 组 (Y 组)。S 组进行双侧隐动脉、右大隐静脉和右颈内静脉穿刺置管, 但不进行 CPB; C 组穿刺置管后行 CPB 60 min; Y 组在 CPB 前 30 min 给予 Ac-YVAD-cmk 8 mg/kg 腹腔注射, 穿刺置管后行 CPB 60 min。术后第 3 天采用 Morris 水迷宫实验评估大鼠认知功能, ELISA 法检测血浆和海马组织 IL-1 β 和 IL-18 浓度, Western blot 法检测海马组织 NLRP3、凋亡相关点样蛋白 (ASC) 和半胱氨酸蛋白酶-1 前体 (pro-caspase-1) 蛋白含量, TUNEL 法检测海马组织凋亡情况, 计算凋亡指数。**结果** 与 S 组比较, C 组和 Y 组逃避潜伏期明显延长 ($P < 0.05$), 120 s 穿越原平台次数明显减少 ($P < 0.05$), 血浆和海马组织 IL-1 β 和 IL-18 浓度、NLRP3、ASC 和 pro-caspase-1 蛋白含量以及凋亡指数明显升高 ($P < 0.05$)。与 C 组比较, Y 组逃避潜伏期明显缩短 ($P < 0.05$), 120 s 穿越原平台次数明显增多 ($P < 0.05$), 血浆和海马组织 IL-1 β 和 IL-18 浓度、NLRP3、ASC 和 pro-caspase-1 蛋白含量以及凋亡指数明显降低 ($P < 0.05$)。**结论** CPB 后大鼠 PND 可能与 NLRP3 炎性小体的激活有关, 使用 NLRP3 炎性小体抑制剂可减轻大鼠 PND 的发生。

【关键词】 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 炎性小体; 围术期神经认知障碍; 白细胞介素-1 β ; 心肺转流

Effect of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 inflammasome on perioperative neurocognitive disorders in rats after cardiopulmonary bypass FU Yiji, LI Dandan, SONG Dandan, SUN Yingjie. Jinzhou Medical University Postgraduate Training Base of General Hospital of Northern Theater Command, Jinzhou 121001, China

Corresponding author: SONG Dandan, Email: songdandan6@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome on perioperative neurocognitive disorders (PND) in rats after cardiopulmonary bypass (CPB). **Methods** Thirty adult male SD rats (350–450 g) were randomly divided into three groups after 5 days of Morris water maze training: sham-operated group (group S), CPB group (group C), and CPB+NLRP3 inflammasome inhibitor Ac-YVAD-cmk group (group Y). Rats in group S received puncturation and catheterization of bilateral saphenous arteries, right great saphenous vein and right internal jugular vein, without CPB. Rats in group C received CPB for 60 min after puncturation and catheterization. Rats in group Y received intraperitoneal injection of Ac-YVAD-cmk 8 mg/kg 30 min before CPB, and then the same as group C. Three days after operation, Morris water maze test was performed to evaluate the cognitive function of rats. The levels of IL-1 β and IL-18 in plasma and hippocampus were detected by ELISA. The expression of NLRP3, ASC, and pro-caspase-1 in hippocampus were detected by Western blot. Apoptotic index in hippocampus was detected by TUNEL. **Results** Compared with group S, the escape latency was prolonged, the number of crossing the original platform was decreased, the apoptotic index in hippocampus was increased, the levels of IL-1 β and IL-18 in plasma and hippocampus were increased, as well as the expression of NLRP3, ASC, and pro-caspase-1 in hippocampus were increased in group C and group Y ($P < 0.05$). Compared with group C, escape latency was shortened, number of crossing the original platform was increased, the apoptotic index in hippocampus was decreased, the levels of IL-1 β and IL-18 in

DOI: 10.12089/jca.2020.08.014

基金项目: 辽宁省自然科学基金项目 (20170540934)

作者单位: 121001 辽宁省锦州市, 锦州医科大学北部战区总医院研究生培养基地 (付益计、李丹丹); 北部战区总医院麻醉科 (宋丹丹、孙莹杰)

通信作者: 宋丹丹, Email: songdandan6@163.com

plasma and hippocampus were decreased, as well as the expression of NLRP3, ASC, and pro-caspase-1 in hippocampus were decreased in group Y ($P < 0.05$). **Conclusion** PND in rats after CPB may be associated with activation of NLRP3 inflammasome.

【Key words】 Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 inflammasome; Perioperative neurocognitive disorders; IL-1 β ; Cardiopulmonary bypass

核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 炎性小体是由 NLR、半胱氨酸蛋白酶-1 前体 (pro-caspase-1) 和凋亡相关点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain, ASC) 组装而成的复合体,可在巨噬细胞/单核细胞和小胶质细胞内被激活,通过释放 IL-1 β 和 IL-18,募集更多的炎性因子,导致一系列的组织损伤和细胞凋亡^[1-2]。NLRP3 炎性小体在多种中枢系统疾病中发挥重要作用,如帕金森病、阿尔茨海默病、多发性硬化症等。研究显示, NLRP3 炎性小体参与心肺转流 (cardiopulmonary bypass, CPB) 后的急性肺损伤^[3],但是 NLRP3 炎性小体是否参与 CPB 后围术期神经认知障碍 (perioperative neurocognitive disorders, PND) 却鲜有报道。本研究采用 CPB 大鼠模型^[4],探讨 NLRP3 炎性小体在 CPB 大鼠 PND 中的作用。

材料与方法

实验仪器与试剂 RP-ASB 滚压式血泵;大鼠专用膜式氧合器; NLRP3 炎性小体抑制剂 Ac-YVAD-cmk; IL-1 β 和 IL-18 的 ELISA 试剂盒; TUNEL 凋亡检测试剂盒、兔抗大鼠 NLRP3 单克隆抗体、兔抗大鼠 caspase-1 单克隆抗体和生物素标记山羊抗兔 IgG; 兔抗大鼠 ASC 多克隆抗体。

实验动物 本实验获北部战区总医院实验动物中心许可,实验操作严格遵循有关动物保护规定。健康清洁级成年雄性 SD 大鼠 30 只,体重 350~450 g,由北部战区总医院实验动物中心提供,动物许可证编号:SCXK(辽)2015-0001。

分组与处理 采用随机数字表法将大鼠分为三组,每组 10 只:假手术组(S组)、CPB组(C组)和 CPB+NLRP3 炎性小体抑制剂 Ac-YVAD-cmk 组(Y组)。S组大鼠进行机械通气和动静脉穿刺置管,但不进行 CPB。C组大鼠建模行 CPB,参考文献[4-6]介绍的方法略加改良:2%戊巴比妥 50 mg/kg 腹腔注射麻醉后,行气管插管并用小动物呼吸机机械通气,随后左隐动脉穿刺置管监测血压、左大隐静脉穿刺置管输液、右隐动脉联合右颈内静脉穿

刺置管建立 CPB。CPB 开始后逐渐增加滚压泵流量至 100~120 ml $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ min⁻¹,转流 1 h。转流期间维持大鼠肛温 34.0~36.0 $^{\circ}$ C, MAP $\geq$ 70 mmHg, 激活全血凝固时间 (ACT) $>$ 400 s。Y组大鼠在 CPB 前 30 min,腹腔注射 Ac-YVAD-cmk 溶液 8 mg/kg,其余处置同 C 组。大鼠术中行 4 次血气分析(动静脉穿刺置管即刻、CPB 10、50 min、CPB 结束后 30 min),根据血气分析结果补充电解质并维持酸碱平衡。根据大鼠尿量并参考动脉压和 CVP,使用羟乙淀粉溶液补充液体量。术后大鼠完全苏醒时拔除气管导管,拔管后大鼠自主活动并自由进食水。

Morris 水迷宫测试 术前大鼠进行定位航行训练 5 d,每天上下午各 2 次。Morris 水迷宫是一个圆形黑色不锈钢水池,直径 180 cm,高 50 cm,池壁上标有东南西北 4 个入水点,将水池等分为 4 个象限。目标象限的中央放置一直径 9 cm、高 27 cm 的圆形透明平台,平台淹没在水面下 1 cm,整个实验期间其位置保持不变。水面加染料搅拌均匀以隐藏平台。水温保持 23~26 $^{\circ}$ C,大鼠训练或测试完毕后用吹风机吹干。术后第 3 天使用小动物行为记录分析系统对大鼠进行逃避潜伏期和 120 s 穿越原平台次数测试。

血浆和海马组织 IL-1 β 和 IL-18 浓度的测定 水迷宫测试结束后 2 h,采用戊巴比妥麻醉大鼠,经腔静脉抽血 3~5 ml,离心后保存血浆。抽血后的大鼠心脏灌洗,取海马组织冰上研磨,加入 NP-40 裂解液离心后保存组织匀浆上清液。按照 ELISA 检测说明书,检测血浆和海马组织 IL-1 β 和 IL-18 浓度。

海马组织 NLRP3、ASC 和 pro-caspase-1 蛋白含量的测定 冰上研磨海马组织,加入 RIPA 裂解液后离心保存上清液,取等量蛋白 SDS-PAGE 电泳,湿转法转膜至 PVDF 膜并封闭, NLRP3、ASC、pro-caspase-1 和 GAPDH 一抗 4 $^{\circ}$ C 滞留 1 晚后再次清洗,加生物素标记二抗孵育,用化学发光剂显影, Image J 软件分析目的蛋白和内参灰度值。

海马组织细胞凋亡的检测 取大鼠一侧海马组织,用 4% 多聚甲醛溶液固定,采用 TUNEL 法检测细胞凋亡,按照说明书进行石蜡包埋、切片、染

色、洗涤, DAPI 复染, 透明封片。采用 Image-Pro Plus 5.1 图形分析软件计算凋亡细胞数和总细胞数, 计算凋亡指数=凋亡细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

统计分析 采用 SPSS 19.0 软件处理。正态分布计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

与 S 组比较, C 组和 Y 组逃避潜伏期明显延长, 120 s 穿越原平台次数明显减少($P<0.05$)。与 C 组比较, Y 组逃避潜伏期明显缩短, 120 s 穿越原平台次数明显增多($P<0.05$)(表 1)。

表 1 三组大鼠逃避潜伏期和 120 s 穿越原平台次数的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	逃避潜伏期 (s)	120 s 穿越原平台次数 (次)
S 组	10	10.1 $\pm$ 1.9	10.8 $\pm$ 2.4
C 组	10	33.8 $\pm$ 3.9 ^a	2.5 $\pm$ 1.5 ^a
Y 组	10	21.7 $\pm$ 2.4 ^{ab}	6.9 $\pm$ 1.6 ^{ab}

注:与 S 组比较, ^a $P<0.05$;与 C 组比较, ^b $P<0.05$

与 S 组比较, C 组和 Y 组海马组织 NLRP3、ASC 和 pro-caspase-1 蛋白含量明显升高($P<0.05$)。与 C 组比较, Y 组海马组织 NLRP3、ASC 和 pro-caspase-1 蛋白含量明显降低($P<0.05$)(图 1)。

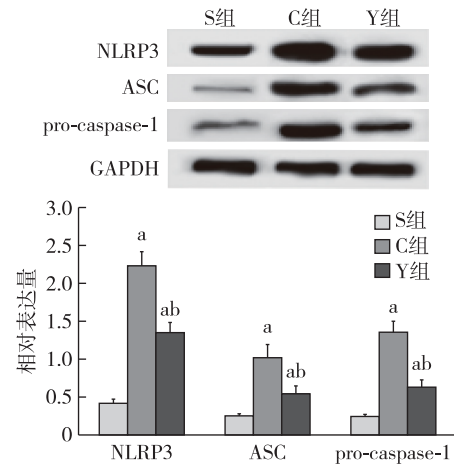
与 S 组比较, C 组和 Y 组血浆和海马组织 IL-1 β 和 IL-18 浓度明显升高($P<0.05$)。与 C 组比较, Y 组血浆和海马组织 IL-1 β 和 IL-18 浓度明显降低($P<0.05$)(表 2)。

S 组、C 组、Y 组凋亡指数分别为(4.6 $\pm$ 1.4)%、(22.8 $\pm$ 3.2)%和(11.5 $\pm$ 2.3)%。与 S 组比较, C 组和 Y 组凋亡指数明显升高($P<0.05$)。与 C 组比较, Y 组凋亡指数明显降低($P<0.05$)。

表 2 三组大鼠血浆和海马组织 IL-1 β 和 IL-18 浓度的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	血浆 IL-1 β (pg/ml)	血浆 IL-18 (pg/ml)	海马组织 IL-1 β (pg/mg)	海马组织 IL-18 (pg/mg)
S 组	10	69.3 $\pm$ 12.6	210.2 $\pm$ 19.1	10.9 $\pm$ 2.8	42.1 $\pm$ 16.4
C 组	10	179.9 $\pm$ 15.9 ^a	583.4 $\pm$ 39.0 ^a	39.5 $\pm$ 5.7 ^a	128.5 $\pm$ 24.6 ^a
Y 组	10	107.2 $\pm$ 11.7 ^{ab}	445.7 $\pm$ 41.4 ^{ab}	28.5 $\pm$ 5.4 ^{ab}	92.4 $\pm$ 16.7 ^{ab}

注:与 S 组比较, ^a $P<0.05$;与 C 组比较, ^b $P<0.05$



注:与 S 组比较, ^a $P<0.05$;与 C 组比较, ^b $P<0.05$

图 1 三组大鼠海马组织 NLRP3、ASC 和 pro-caspase-1 蛋白含量的比较

讨 论

PND 是 CPB 心脏手术后常见的神经系统并发症, 发生率可达 50% 以上, 主要表现为认知和记忆功能损害^[7]。Morris 水迷宫是经典的研究啮齿类动物认知和记忆的装置, 广泛应用于动物行为学实验。本研究水迷宫测试结果显示, 与 S 组比较, C 组大鼠 CPB 后大鼠逃避潜伏期延长、穿越原平台次数减少, 且海马凋亡指数升高, 表明 CPB 后大鼠发生 PND, 与相关研究结果一致^[4]。与 S 组比较, C 组大鼠 CPB 后 NLRP3、ASC 和 pro-caspase-1 蛋白含量升高, 血浆和海马组织 IL-1 β 和 IL-18 浓度升高, 表明 CPB 激活 NLRP3 炎性小体使 IL-1 β 和 IL-18 释放增加, 引起大鼠 PND。另外, 参照文献^[8]对 Y 组大鼠使用 NLRP3 炎性小体抑制剂 Ac-YVAD-cmk, 与 C 组比较, Y 组大鼠 CPB 后水迷宫测试结果得以改善且海马组织凋亡指数降低, 同时 NLRP3 炎性小体相关的蛋白表达量和产物 IL-1 β 和 IL-18 浓度也都降低, 再次说明 NLRP3 炎性小体参与 CPB 后大鼠 PND 的发生。

PND 的病理生理机制尚不明确,也缺乏有效的生物学标志物^[9]。炎症反应是公认的重要机制之一^[10]。CPB 心脏手术的创伤和应激、血液中的有形成分与人工材料大面积接触、缺血-再灌注损伤等,可激活炎症细胞和胶质细胞,引发全身炎症反应和中枢神经系统炎症反应,导致 PND^[11-12]。脑内炎症也是众多神经系统退行性疾病的共同病理特征。最近的研究表明,阿尔茨海默病、多发性硬化病、脑卒中中和抑郁症等神经系统炎症相关疾病的发展过程中,NLRP3 炎性小体发挥了关键作用^[1-2,13]。Heneka 等^[14]研究表明,基因敲除 NLRP3 (-/-) 或 Casp1 (-/-) 的阿尔茨海默病小鼠可免于空间记忆丧失和阿尔茨海默病相关的其他后遗症,并显示脑部 caspase-1 和 IL-1 β 的激活减少以及 β -淀粉样蛋白的清除增强。Zhang 等^[15]利用大黄酚改善小鼠脑缺血-再灌注损伤,以及 He 等^[16]利用白藜芦醇对抗大鼠脑缺血-再灌注损伤,均发现通过抑制 NLRP3 炎性小体发挥作用。有研究表明,抑郁症患者 NLRP3 和 caspase-1 在血细胞中的基因表达增加,NLRP3 炎性小体活化增强^[17]。Zhang 等^[18]使用炎性小体抑制剂 VX-765 预处理抑郁症模型小鼠,发现可降低血清和海马组织 IL-1 β ,明显减轻抑郁行为,证实 NLRP3 炎性小体是抑郁症的发病机制之一。本研究则显示,CPB 后大鼠血浆和海马组织 IL-1 β 和 IL-18 浓度升高,海马组织 NLRP3、ASC 和 pro-caspase-1 蛋白含量升高,表明 NLRP3 炎性小体可能是 CPB 后大鼠 PND 的发病机制之一。然而,本研究未能使用基因敲除大鼠进一步加以证实,是本研究的不足之处。

综上所述,CPB 后大鼠 PND 可能与 NLRP3 炎性小体的激活有关,使用 NLRP3 炎性小体抑制剂可减轻大鼠 PND 的发生。鉴于调控 NLRP3 炎性小体的天然药物和小分子物质众多,因此,揭示 NLRP3 炎性小体在 PND 中的靶点作用,将对 PND 的研究有重要临床意义。

参 考 文 献

- [1] Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19(8): 477-489.
- [2] Mamik MK, Power C. Inflammasomes in neurological diseases: emerging pathogenic and therapeutic concepts. *Brain*, 2017, 140(9): 2273-2285.
- [3] Hou L, Yang Z, Wang Z, et al. NLRP3/ASC-mediated alveolar macrophage pyroptosis enhances HMGB1 secretion in acute lung injury induced by cardiopulmonary bypass. *Lab Invest*, 2018, 98(8): 1052-1064.
- [4] 刘冬, 郑翔, 孙莹杰, 等. κ 阿片受体激动剂对心肺转流大鼠术后认知功能及 $\alpha 7$ nAChR 表达的影响. *临床麻醉学杂志*, 2018, 34(10): 995-999.
- [5] 段铭杰, 孙莹杰, 郑翔, 等. 改良穿刺法建立大鼠无血预充非停跳体外循环后认知功能障碍模型. *中国体外循环杂志*, 2017, 15(3): 179-184.
- [6] Song D, Liu X, Diao Y, et al. Hydrogen rich solution against myocardial injury and aquaporin expression via the PI3K/Akt signaling pathway during cardiopulmonary bypass in rats. *Mol Med Rep*, 2018, 18(2): 1925-1938.
- [7] Salameh A, Dhein S, Dähnert I, et al. Neuroprotective strategies during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(11): E1945.
- [8] Zhang Y, Liu L, Peng YL, et al. Involvement of inflammasome activation in lipopolysaccharide-induced mice depressive-like behaviors. *CNS Neurosci Ther*, 2014, 20(2): 119-124.
- [9] 翟菲菲, 黄宇光. 围术期神经认知障碍: 从术后到术前, 从临床指标到生物学指标. *临床麻醉学杂志*, 2019, 35(4): 317-318.
- [10] Alam A, Hana Z, Jin Z, et al. Surgery, neuroinflammation and cognitive impairment. *E Bio Medicine*, 2018, 37: 547-556.
- [11] Nollert G, Reichart B. Cardiopulmonary bypass and cerebral injury in adults. *Shock*, 2001, 16 Suppl 1: 16-19.
- [12] Berger M, Terrando N, Smith SK, et al. Neurocognitive function after cardiac surgery: from phenotypes to mechanisms. *Anesthesiology*, 2018, 129(4): 829-851.
- [13] Kumar V. Inflammasomes: Pandora's box for sepsis. *J Inflamm Res*, 2018, 11: 477-502.
- [14] Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature*, 2013, 493(7434): 674-678.
- [15] Zhang N, Zhang X, Liu X, et al. Chrysophanol inhibits NALP3 inflammasome activation and ameliorates cerebral ischemia/reperfusion in mice. *Mediators Inflamm*, 2014, 2014: 370530.
- [16] He Q, Li Z, Wang Y, et al. Resveratrol alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting NLRP3 inflammasome activation through Sirt1-dependent autophagy induction. *Int Immunopharmacol*, 2017, 50: 208-215.
- [17] Alcocer-Gómez E, de Miguel M, Casas-Barquero N, et al. NLRP3 inflammasome is activated in mononuclear blood cells from patients with major depressive disorder. *Brain Behav Immun*, 2014, 36: 111-117.
- [18] Zhang Y, Liu L, Liu YZ, et al. NLRP3 Inflammasome mediates chronic mild stress-induced depression in mice via neuroinflammation. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2015, 18(8): pyv006.

(收稿日期: 2019-07-12)