

粉防己碱对肺动脉高压大鼠中 NLRP3 炎性小体表达研究*

刘莹¹ 董文鹏² 陈长富² 杨永超³ 杨东鹏⁴ 王晓武²

[摘要] **目的:**研究肺动脉高压大鼠中 NLRP3 炎性小体的表达情况,探究粉防己碱对肺动脉高压的保护作用。**方法:**36 只雄性 SD 大鼠,随机分为 3 组:正常对照组(control)、肺动脉高压组(MCT)、粉防己碱组(Tet)。对照组单剂量给予 0.9%氯化钠腹腔注射,其余两组单剂量给予野百合碱腹腔注射后正常饲养 21d;而后 Tet 组每天给予粉防己碱药物灌胃,其余两组则每天给予 0.9%氯化钠灌胃 21d 后留取组织标本,测量肺动脉压力(右室收缩压, right ventricular systolic pressure, RVSP),计算右心室/(左心室+心室壁)[RV/(LV+S)]比值,行 HE 染色观测各组形态学变化,免疫组化及 western blot 检测各组 NLRP3、caspase-1 及白细胞介素-1 β (IL-1 β)的表达水平。**结果:**①与对照组相比,MCT 及 Tet 组 RVSP、RV/(LV+S)值均明显增高($P<0.05$);与 MCT 组相比,Tet 组又明显下降($P<0.05$)。②病理组织学检测结果显示,粉防己碱可减轻 PAH 模型大鼠肺小动脉内膜增生,减少肺组织炎性细胞浸润;③免疫组化及 western blot 结果显示,粉防己碱可抑制 NLRP3、caspase-1、IL-1 β 的表达。**结论:**粉防己碱可以抑制 NLRP3 炎性小体的活化,减轻肺动脉高压大鼠肺组织的炎性浸润,对肺动脉高压具有一定的逆转作用。

[关键词] 肺动脉高压;粉防己碱;炎性小体

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2017.11.019

[中图分类号] R54 **[文献标志码]** A

Impact of the NLRP3 inflammasome on tetrandrine in rats with pulmonary arterial hypertension

LIU Ying¹ DONG Wenpeng² CHEN Changfu² YANG Yongchao³
YANG Dongpeng⁴ WANG Xiaowu²

(¹Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, 510010, China; ²Department of Cardiovascular Surgery, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou, Guangdong, 510010, China; ³Institute of Cardiovascular Disease, Guangdong People's Hospital; ⁴Department of Cardiovascular Surgery, Guangzhou Red Cross Hospital)

Corresponding author: Wang Xiaowu, E-mail: xzwwk_wxw@hotmail.com

Abstract **Objective:** To investigate expression of the NLRP3 inflammasome in pulmonary arterial hypertension rats and explore the protective effect of tetrandrine on pulmonary arterial hypertension. **Method:** A total of 36 male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly and equally divided into 3 groups: control group, MCT group and Tet group. The control group was given intraperitoneal injection with normal saline; the others were given intraperitoneal injection with monocrotaline (MCT) to induce PAH, then given irrigation with saline and tetrandrine respectively, from day 21 to day 42. Right ventricular systolic pressure (RVSP), right ventricular hypertrophy index (RV/(LV+S)) were measured and compared among all groups. HE staining was used to observe the morphological changes of each group. Expression of NLRP3, caspase-1 and IL-1 β were detected by immunohistochemistry and western blot. **Result:** ① Compared with control group, RVSP and RV/(LV+S) were significantly increased in MCT and Tet groups ($P<0.05$); While compared with MCT group, Tet group was significantly decreased ($P<0.05$). ② Histopathological examination showed that Tet could reduce the pulmonary arterial hyperplasia of PAH rats and reduce the infiltration of inflammatory cells in lung tissue. ③ Results of immunohistochemistry and western blot showed that Tet reduced the expression of NLRP3, caspase-1 and IL-1 β . **Conclusion:** Tetrandrine could inhibit the activation of NLRP3 inflammasome, reduce the inflammatory infiltration of lung tissue in pulmonary hypertension rats, and have a certain reversal effect on pulmonary hypertension.

Key words pulmonary arterial hypertension; tetrandrine; inflammasome

* 基金项目:广东省自然科学基金(No:2015A03031362);国家自然科学基金(No:81500298);广州市珠江科技新星专项基金(No:201610010094)

¹ 广州中医药大学(广州,510010)

² 广州军区广州总医院心血管外科中心(广州,510010)

³ 广东省人民医院心血管病研究所

⁴ 广州市红十字会医院心血管外科

通信作者:王晓武, E-mail: xzwwk_wxw@hotmail.com

肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)是一种以肺小动脉重构为特征,伴右心负荷增加及右心功能不全的疾病。PAH 产生机制尚未完全清楚,目前研究认为,其发病与炎症的发生密切相关^[1]。研究发现 NLRP3 炎性小体包含 NLR、ASC 及 caspase-1 前体 3 个部分,其在先天免疫反应和肺损伤中发挥重要作用^[2-3]。粉防己碱(Tetrandrine, Tet)是防己科植物粉防己根中的生物碱,研究表明,其在大鼠肺动脉高压模型中具有抑制血管平滑肌细胞的增殖,改善心肌肥厚的作用^[4],但其是否通过抑制 NLRP3 炎性小体的活化而起保护作用,目前尚未报道。本研究旨在通过野百合碱诱导大鼠肺动脉高压模型,探究粉防己碱对肺动脉高压的保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

由南方医科大学动物中心提供 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 36 只,体质量(200±20)g,动物合格证号: NO. 44002100009921;饲养于广州军区广州总医院 SPF 级实验动物中心。使用前适应性喂养 1 周。

1.2 仪器与试剂

16 通道生理信号记录分析系统(MP100,美国);电子分析天平(AE-100,瑞士);野百合碱(美国 sigma 公司);粉防己碱(美国 sigma 公司);NLRP3 抗兔抗体(abcam 公司);caspase-1 抗兔抗体(abcam 公司);IL-1β 抗兔抗体(abcam 公司);β-actin 抗兔抗体(abcam 公司);辣根酶标记二抗羊抗兔 IgG(cell signaling technology 公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天);SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(碧云天);PV6001 免疫组化试剂盒(北京中杉金桥)。

1.3 实验设计

本实验采用野百合碱^[5](monocrotaline, MCT)60 mg/Kg 腹腔注射方式造大鼠 PAH 模型。大鼠分笼(5~6 只/笼)常规饲料喂养,室温 22~24℃,相对湿度 60%左右,早 8 点至晚 8 点自动照明,动物购置后适应性饲养 1 周。

36 只 SD 大鼠随机分为 3 组:对照组、MCT 组及 Tet 组。对照组给予 0.9%氯化钠腹腔注射,其余两组同时给予 MCT 60 mg/Kg 腹腔注射,正常饲养 21 d。21 d 后 Tet 组每天给予 Tet 60 mg/kg 灌胃治疗,其余两组每天则给予等剂量的 0.9%氯化钠治疗,饲养 21 d。

1.4 各项指标检测

1.4.1 肺动脉压力及右心室肥厚指标检测 实验周期结束后,大鼠称重,水合氯醛(300 mg/Kg)腹腔注射麻醉大鼠,右心导管法测量大鼠肺动脉压力(右心室收缩压),记录压力值;后放血处死大鼠,切取大鼠完整心脏,完整分离右心室(right ventricle, RV)、左心室和室间隔(left ventricle+sep-

tum, LV+S),电子分析天平分别称重,计算右室肥厚指数 RV/(LV+S)。

1.4.2 肺组织病理组织学观察 灭菌 0.9%氯化钠冲洗大鼠肺组织,切取左肺上叶肺门部分组织置于 4%多聚甲醛中固定,常规石蜡包埋、切片,行 HE 染色,光镜下观察各组大鼠病理组织学变化。

1.4.3 肺组织免疫组化检测 即用型二步法(聚合物链接)检测 NLRP3、caspase-1 及 IL-1β 活性表达。肺组织常规石蜡包埋、切片,二甲苯及梯度乙醇使切片脱蜡至水,高温高压抗原修复后 3% H₂O₂ 封闭。兔抗鼠 NLRP3、caspase-1、IL-1β(abcam 公司)为第一抗体,4℃孵育过夜;山羊抗兔 IgG/HRP 聚合物(PV-6001,中杉金桥)为二抗,37℃孵育 20 min 后 DAB 显色,苏木素复染后显微镜下观察着色情况并拍照。具体步骤按检测试剂盒说明书进行。

1.4.4 肺组织 Western blot 检测 取各组肺组织匀浆取上清,BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。10~12%的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,湿转法转移蛋白至 PVDF 膜上。5%脱脂奶粉溶液封闭(TBST 液稀释),一抗 4℃孵育过夜;结合 HRP 的二抗 37℃孵育 2 h,ECL 发光试剂盒显影。

1.5 统计学处理

所有数据经 SPSS19.0 统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,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 各组大鼠实验前后体质量比较

实验前称量各组大鼠体质量,各组之间无明显差异($P > 0.05$);实验结束后称量,与对照组相比,MCT 组大鼠体质量明显减轻($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠体质量比较

Table 1 Comparison of body mass among three groups

组别	g, $\bar{x} \pm s$	
	实验前	实验后
对照组	235.00±14.87	311.00±25.00
MCT 组	232.17±14.82	268.50±32.41 ¹⁾
Tet 组	234.83±10.13	308.67±17.50

与对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

2.2 各组肺动脉压力(右心室收缩压)及右室肥厚指数对比

与对照组相比,MCT 及 Tet 组右心室收缩压及右室肥厚指数明显增大($P < 0.05$);而与 MCT 组相比,Tet 组右心室收缩压及右室肥厚指数又明显下降($P < 0.05$),见表 2。

2.3 肺组织 HE 染色比较

与对照组相比,MCT 组可见肺小动脉明显狭

窄甚至闭塞,炎性细胞浸润明显,而 Tet 组虽可见肺小动脉管壁增厚,炎性细胞浸润,但各症状较 MCT 组均明显减轻,结果见图 1。

2.4 免疫组化结果比较

与对照组相比,MCT 组 NLRP3、caspase-1、IL-1 β 表达均明显增加,而 Tet 组则较 MCT 组明显下降,结果见图 1。

2.5 Western blot 结果比较

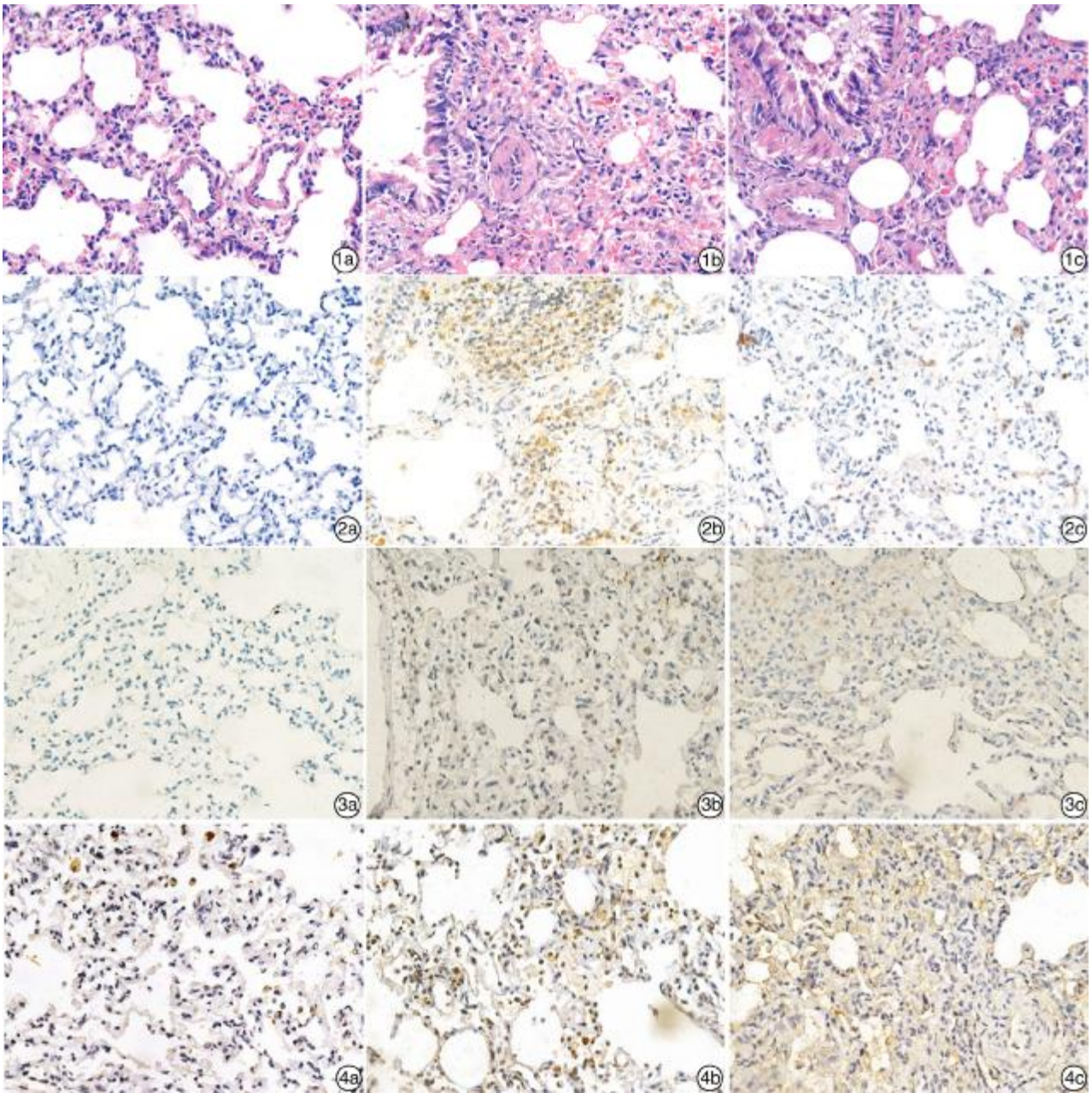
与对照组相比,MCT 组 NLRP3、caspase-1、IL-1 β 蛋白表达均明显增加,而 Tet 组则较 MCT

组明显下降,结果见图 2。

表 2 各组 RVSP、RV/(LV+S)比较
Table 2 Comparison of RVSP、RV/(LV+S) among three groups

组别	RVSP/mmHg	RV/(LV+S)/%
对照组	15.00 $\pm$ 1.79	18.4 $\pm$ 2.46
MCT 组	47.50 $\pm$ 2.43 ¹⁾	53.6 $\pm$ 4.35 ¹⁾
Tet 组	33.83 $\pm$ 8.13 ^{1) 2)}	40.2 $\pm$ 7.79 ^{1) 2)}

与对照组比较,¹⁾ $P<0.05$ 。与 MCT 组比较,²⁾ $P<0.05$ 。



a: 对照组; b: MCT 组; c: Tet 组。
1a~1c: SD 大鼠肺组织 HE 染色($\times 400$); 2a~2c: 肺组织免疫组化 NLRP3 表达情况($\times 400$); 3a~3c: 肺组织免疫组化 caspase-1 表达情况($\times 400$); 4a~4c: 肺组织免疫组化 IL-1 β 表达情况($\times 400$)。

图 1 肺组织 HE 染色及 NLRP3、caspase-1、IL-1 β 表达
Figure 1 Expression of NLRP3、caspase-1 and IL-1 β

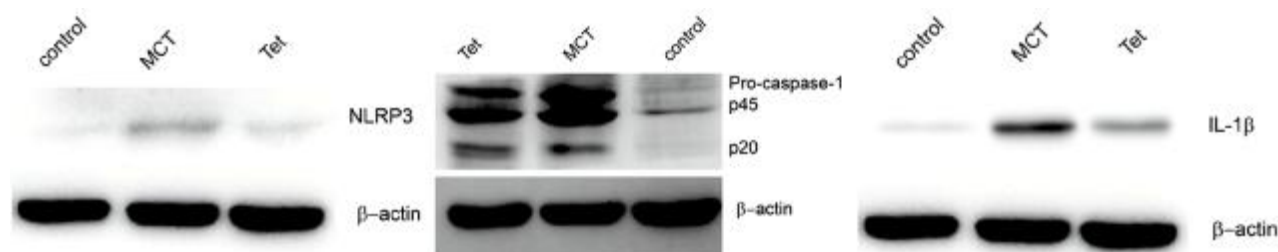


图 2 Western blot 检测肺组织中 NLRP3、caspase-1、IL-1 β 的表达
Figure 2 NLRP3, caspase-1 and IL-1 β in Western blot

3 讨论

PAH 是以肺小动脉重塑为主要特征的血流动力学异常型疾病,常伴有右心功能不全或衰竭。目前研究表明肺血管重构是其主要的病理特征,可见肺血管壁细胞增殖、细胞外基质增多、管壁增厚、管腔狭窄等病理形态学的改变^[6]。本研究通过野百合碱诱导肺动脉高压大鼠模型,可见肺小动脉明显狭窄甚或闭塞,单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等炎性细胞大量浸润,研究结果与相关文献结果一致。

肺动脉高压的研究已有 100 多年,但其发病机制尚未完全清楚。目前研究认为 PAH 发病多与血管活性物质失衡机制^[7]、离子通道机制^[8]、遗传学机制^[9]及炎症机制^[10]相关,且炎症发病机制一直成为研究的热点。NLRP3 炎性小体是由核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族成员 NLRP3、接头蛋白 ASC 和效应蛋白 Caspase-1 组成的一种分子量约为 700 kDa 的大分子多蛋白复合体^[11]。研究表明当机体受到外源性或内源性的信号刺激时,NOD 样受体 NLRP3 组装形成一个多蛋白复合体即“NLRP3 炎性小体”,激活半胱天冬酶-1,进而促进促炎细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 的剪切成熟和分泌,引起系列炎症反应^[12]。此外,NLRP3 炎性小体除了促进 IL-1 β 和 IL-18 的剪切成熟外,还可通过激活 Caspase-1,介导一种特殊的介于凋亡与坏死间的程序性细胞死亡即细胞焦亡^[13]。本研究结果显示,较正常组大鼠相比,野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠模型中 NLRP3、caspase-1 及 IL-1 β 的表达明显增加,可能是野百合碱刺激下激活了 NLRP3 炎性小体,使之发生寡聚化,进而促进炎性因子分泌及细胞焦亡的发生,但其具体的激活途径仍需进一步的研究。

目前 FDA 批准的治疗药物包括磷酸二酯酶抑制剂、前列环素、内皮素拮抗剂等,尽管如此,对 PAH 的治疗多是仅改善症状,而对血管重构的逆转效果不佳。粉防己碱是防己科植物粉防己根中的生物碱,被认为是一种钙离子拮抗剂,具有阻断心肌细胞中 T 型和 L 型钙通道的功能^[14]。大鼠糖尿病模型的研究表明,Tet 能够抑制心肌细胞肥大,改善机体炎症及氧化应激反应,进而抑制血管

平滑肌细胞的增殖和重塑^[15],而 Tet 对肺动脉高压的保护作用虽有研究,但其是否通过抑制 NLRP3 炎性小体来发挥保护作用尚未报道。本研究结果显示,与 MCT 组相比,Tet 组肺小动脉重构及炎性细胞浸润显著减轻,NLRP3、caspase-1 及 IL-1 β 的表达显著性下调。因此,Tet 可能是抑制了 NLRP3 炎性小体信号通路的激活,减少了 IL-1 β 及 IL-18 等炎性因子的表达,减轻了炎症细胞的浸润,进而对肺动脉高压的发生发展起到保护作用。

传统对于 PAH 的治疗,多从改善症状出发,但效果不理想。因此对 PAH 与炎症反应机制的研究,特别是具有抑制炎性因子分泌药物的研究,将可能为 PAH 的治疗提供新思路。

参考文献

- [1] DE JESUS PEREZ VINICIO A. Molecular pathogenesis and current pathology of pulmonary hypertension [J]. Heart Fail Rev, 2016, 21:239—257.
- [2] TSCHOPP J, SCHRODER K. NLRP3 inflammasome activation; the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? [J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10:210—215.
- [3] DOLINAY T, KIM Y S, HOWRYLAK J, et al. Inflammasome-regulated cytokines are critical mediators of acute lung injury[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2015, 185: 1225—1234.
- [4] WANG X W, YANG Y C, YANG D P, et al. Tetrandrine prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats through regulation of the protein expression of inducible nitric oxide synthase and cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase type 1 [J]. Journal of Vascular Surgery, 2015, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2015.09.016>.
- [5] 陈晓辉,翁国星,林群. 一种新型的大鼠肺动脉高压模型[J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(8): 882—885.
- [6] TUDER R M. Pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension[J]. Cell Tissue Res, 2016, 32: 112—115.
- [7] LEE M Y, TSAI K B, HSU J H, et al. Liraglutide prevents and reverses monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by suppressing ET-1 and enhancing eNOS/sGC/PKG pathways [J]. Sci Rep, 2016, 6:31788—31789.

组蛋白乙酰化修饰在 2 种不同方法建立 小鼠心肌肥厚模型中的作用*

罗孝美¹ 车建霖² 刘诗如² 龙珊²
赵培希² 许盼² 魏燕² 彭昌³

[摘要] **目的:**探讨组蛋白乙酰化修饰失衡在 2 种不同方法建立小鼠心肌肥厚模型中的作用。**方法:**选取昆明小鼠为研究对象,按照随机数字表法随机分为 5 组:正常组、0.9%氯化钠溶液组、苯肾上腺素组、手术组和假手术组。苯肾上腺素组给予苯肾上腺素皮下注射,手术组给予部分结扎腹主动脉建立小鼠心肌肥厚模型,实时荧光定量聚合酶链反应(real-time polymerase chain reaction,RT-PCR)检测心肌肥厚相关标志物心房利钠肽(atrial natriuretic peptide,ANP)及 β -肌球蛋白重链(β -myosin heavy chain, β -MHC) mRNA 表达水平,免疫印迹(western blot, WB)检测小鼠心肌组织中组蛋白 H3 赖氨酸残基 9 位乙酰化(H3K9ac)的表达,比色法检测心肌组织中组蛋白乙酰化酶(histone acetylases, HATs)、组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)活性,超声心动图观察小鼠心肌肥厚情况。**结果:**RT-PCR 结果表明苯肾上腺素组、手术组小鼠心肌组织中 ANP 和 β -MHC mRNA 表达水平分别显著高于 0.9%氯化钠溶液组、假手术组($P<0.05$);超声心动图结果显示苯肾上腺素组、手术组小鼠室间隔厚度、左室前壁厚度分别显著高于 0.9%氯化钠溶液组、假手术组($P<0.05$),而左室舒张末期直径则分别显著低于 0.9%氯化钠溶液组、假手术组($P<0.05$)。Western blot 及比色法结果显示:苯肾上腺素组、手术组小鼠心肌组织中组蛋白 H3K9ac 的乙酰化水平及 HATs 活性分别显著高于 0.9%氯化钠溶液组、假手术组($P<0.05$),而 HDACs 活性则分别显著低于 0.9%氯化钠溶液组、假手术组($P<0.05$)。**结论:**组蛋白乙酰化修饰失衡均参与了 2 种不同方式所致的小鼠心肌肥厚。

[关键词] 心肌肥厚;模型;组蛋白乙酰化;小鼠

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2017.11.020

[中图分类号] R541.7 **[文献标志码]** A

* 基金项目:国家自然科学基金项目(No:81560040);遵义医学院博士启动基金项目[院字(2015)4 号];遵义医学院医学与科技学院大学生创新训练项目[遵医科院(2015)3108]

¹遵义医学院基础医学院生理教研室(贵州遵义,563000)

²遵义医学院第一临床学院临床系

³遵义医学院附属医院儿内一科

通信作者:彭昌, E-mail: pengchang_2006@126.com

- [8] MOUDGIL R, MICHELAkis E D, ARCHER S L. The role of K⁺ channels in determining pulmonary vascular tone, oxygen sensing, cell proliferation, and apoptosis: implications in hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary arterial hypertension[J]. Microcirculation, 2006, 13:615-632.
- [9] VENGETHASAMY L, HAUTEFORT A, TIELEMANS B, et al. BMPRII influences the response of pulmonary microvascular endothelial cells to inflammatory mediators[J]. Pflugers Arch, 2016, 33: 155-156.
- [10] MARLENE R, CHRISTOPHE G, MARC H, et al. Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension[J]. Circ Res, 2014, 115:165-175.
- [11] PETRILLI V, DOSTERT C, MURUVE D A, et al. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity[J]. Curr Opin Immunol, 2007, 19: 615-622.
- [12] 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: 241-247.
- [13] BERGSBAKEN T, FINK S L, COOKSON B T. Pyroptosis: host cell death and inflammation [J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7: 99-109.
- [14] LIU Q Y, KARPINSKI E, PANG P K. Tetrandrine inhibits both T and L calcium channel currents in ventricular cells[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1992, 20: 513-519.
- [15] LIU M H, XIE W R, ZHANG Z, et al. Inhibitive effect of tetrandrine on the proliferation of diabetes mellitus rats vascular smooth muscle cells[J]. Zhong Yao Cai, 2009, 32:1867-1870.

(收稿日期:2017-06-12)