

胡椒碱对小鼠创伤性脑损伤后 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达的影响

王瑞琪 曹晶晶 郭映靓 王鑫扬 李瑜*

西安培华学院 中国陕西西安 710125

【摘要】目的：探讨胡椒碱对于创伤性脑损伤小鼠神经元焦亡关键因子 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达的影响。方法：本研究采用 C57BL/6 小鼠，选取 50 只并随机分成 5 组，即 Sham 组、TBI 组、胡椒碱低剂量组、胡椒碱中剂量组、胡椒碱高剂量组，并进行控制性皮质冲击或假手术建立模型，分组给药，连续灌胃 7 天，断头取脑。观测指标应用 qRT-PCR 以及 Western blot 进行检测 NLRP3、Caspase-1 表达水平。结果：小鼠脑组织受到创伤性损伤后，Sham 组 mNSS 评分为 1 分，TBI 组评分 ≥ 11 分，药物干预组 ≤ 8 分；且 TBI 组 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达量较 Sham 组升高；胡椒碱组与 TBI 组对比，胡椒碱组二者蛋白表达量减少，其中低剂量胡椒碱组的蛋白表达量抑制效果优于中高剂量组。结论：胡椒碱通过抑制 NLRP3 和 Caspase-1 的蛋白表达、减少神经元焦亡，有效减轻小鼠的创伤性脑损伤。

【关键词】胡椒碱；创伤性脑损伤；NLRP3；Caspase-1

【Abstract】Objective: To investigate the effect of piperine on the expression of key neuronal pyroptosis factors of NLRP3 and Caspase-1 protein in brain tissue of mice with traumatic brain injury. Methods: Choose C57BL/6 mice only 50, randomly divided into 5 groups, namely Sham group, TBI group, low-dose piperine group, medium-dose piperine group, and high-dose piperine group, subjected to controlled cortical impulse or sham-operated to establish the model, administered and gavaged for 7 days, and extraction mice brain. The observation indexes detected the expression levels of NLRP3 and Caspase-1 by RT-PCR and Western blot. Results: After traumatic brain injury, the mNSS score of the Sham group was 1, the score of the TBI group was ≥ 11 , and the score of piperine intervention group was ≤ 8 . The protein expression of NLRP3 and Caspase-1 of TBI group was elevated compared with the Sham group. Compared to TBI group, the piperine group reduced protein expression. The low-dose piperine group had a better inhibition effect than the middle and high dose groups. Conclusion: Piperine inhibited the expression of NLRP3 and Caspase-1 protein, reduce neuronal pyroptosis, and effectively improved traumatic brain injury in mice.

【Key words】Piperine, Traumatic brain injury, NLRP3, Caspase-1

引言

创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 是一种常见的中枢神经系统损伤性疾病，致残、致死率极高。引起 TBI 的主要病理机制包括谷氨酸兴奋性毒性、氧化应激、炎症反应等^[1]，最终导致神经元的死亡及其相关功能的丧失。神经元焦亡作为一种促炎性程序性细胞死亡方式，被认为是 TBI 后神经元死亡方式的一种，NLRP3、Caspase-1 均是细胞焦亡的相关表达因子，能够促进焦亡^[2]。因此，对于 TBI 后神经元焦亡的发生以及发展规律具有一定探索价值，寻求改善焦亡的有效治疗方法能够对于 TBI 后继发性损伤的减轻有一定帮助。

胡椒碱 (Piperine, PIP) 是一种胡椒中的桂皮酰胺类生物碱，被载入中国药典，具有多种药理学活性^[3]。PIP 及其衍生物在多种神经系统疾病中，如阿尔兹海默症、帕金森病、亨廷顿病、抑郁症等被证明具有改善作用^[4]，但在 TBI 中的作用仍然不明确。因此，我们通过动物实验的方式对 PIP 在 TBI 小鼠焦亡因子 NLRP3、Caspase-1 的表达影响进行研究分析。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

C57BL/6 小鼠购买于成都达硕，胡椒碱购于 MedChemExpress, FastKing RT Kit (With gDNA) 购于天根，SuperReal 荧光定量预混试剂增强版购于天根，q-PCR 仪购于罗氏，显影仪购于伯乐。

1.2 动物分组

实验分为 5 组：Sham 组、TBI 组、PIP 低剂量组 (5 mg/kg/day)、PIP 中剂量组 (25 mg/kg/day)、PIP 高剂量组 (50 mg/kg/day)，每组 10 只小鼠。

1.3 模型构建与给药

构建小鼠 TBI 模型：选用 8 周龄 25g 雄性 C57BL/6 小鼠，在 SPF 级小鼠饲养室中饲养，利用 CCI 建立在体 TBI 模型。

动物给药：按照生理盐水、高 (50 mg/kg/day)、中 (25 mg/kg/day)、低 (5 mg/kg/day) 剂量的 PIP，每天灌胃一次，共 7 天。

1.4 mNSS 评分

改良神经严重程度评分 (mNSS) 可以反应小鼠平衡、触觉、视力、异常行为、肌肉质量、感觉和运动，评价小鼠神经功能缺失程度，评分越高表示神经受损越严重。

1.5 qRT-PCR 法检测 NLRP3、Caspase-1 基因的表达

脱颈处死小鼠，取大脑皮层，采用 TRIzol 试剂盒，提取总 RNA。定量分析 NLRP3、Caspase-1 基因表达变化。

1.6 免疫印迹法检测 NLRP3、Caspase-1 蛋白的含量

提取各组总蛋白，BCA 蛋白定量，采用 Western blot 分析比较 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达变化。

1.7 统计学方法

用 Graphpad Prism 9 软件进行数据统计与分析, 统计学数据用 ($X \pm SD$) 表示, 组间比较采用 LSD-T 检验, $P \leq 0.05$ 具有统计学意义, “”表示 $p < 0.01$, VS. Sham 组; #表示 $p < 0.05$, VS. TBI 组。

2 结果

2.1 小鼠 mNSS 评分

与 Sham 组相比, TBI 组 mNSS 评分显著升高 ($p < 0.05$); 与 TBI 组相比, PIP 各组 mNSS 评分均降低, 其中高剂量组 (50 mg/kg/day) 最为显著 ($p < 0.05$)。见表 1。

表 1 mNSS 评分比较

组别 (n=10)	Sham 组	TIB 组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
mNSS 评分	1.0 ± 0.00	11.02 ± 0.98 ^{**}	6.47 ± 0.23 [#]	8.51 ± 0.54 [#]	5.98 ± 0.67 [#]

2.2qRT-PCR 法检测小鼠大脑皮层 NLRP3、Caspase-1 基因的表达

如图 1 所示, 与 Sham 组相比, TBI 组的 NLRP3、Caspase-1 基因呈显著上升趋势 ($p < 0.01$); 给予 TBI 小鼠不同剂量 PIP 后, 与 TBI 组相比, 中、低剂量均抑制 NLRP3、Caspase-1 基因的表达 ($p < 0.05$), 且低剂量组效果更好。

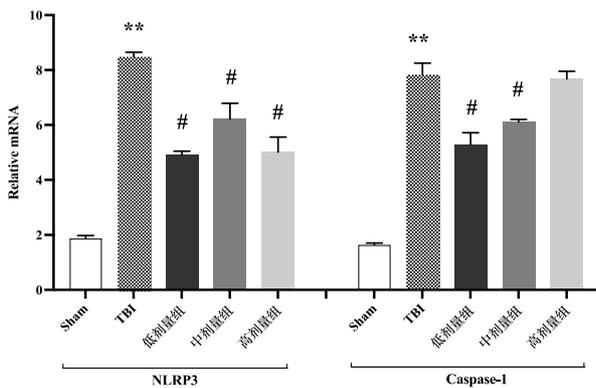


图 1 小鼠大脑皮层 NLRP3、Caspase-1 基因表达的比较

2.3 小鼠大脑皮层 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达的影响

对比图 1, 图 2、3 中, TBI 组与 Sham 组相比, 蛋白表达量相应上调 ($p < 0.01$); 而经 PIP 处理后, 二者表达均显著下降 ($p < 0.05$), 表明 PIP 通过调控 NLRP3、Caspase-1 蛋白的负表达而改善神经元焦亡引起的神经炎症。

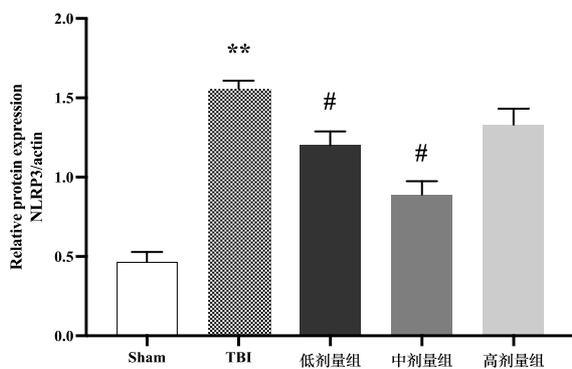


图 2 小鼠大脑皮层 NLRP3 蛋白表达的影响

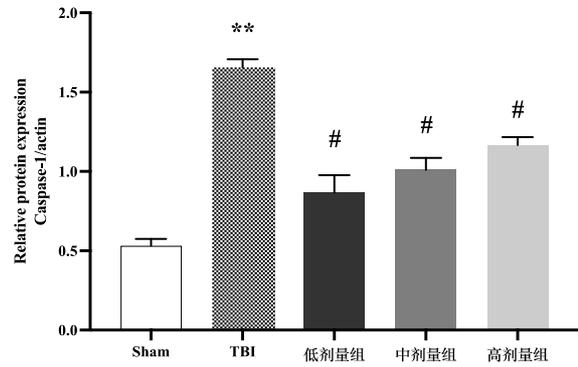


图 3 小鼠大脑皮层 Caspase-1 蛋白表达的影响

3 讨论

PIP 作为天然来源的生物碱, 是黑胡椒、长胡椒和其他胡椒科果实中含量最高的活性成分。关于胡椒碱的药理活性研究表明, 其具有抗骨质疏松、抗炎、抗肿瘤活性、认知增强、抗氧化活性和免疫调节等作用^[1]。随着对 PIP 在神经疾病方面的研究, 越来越多的药理作用被发掘。本次研究该药物对 TBI 小鼠的焦亡因子表达具有一定意义, 有研究表明胡椒碱的口服生物利用率较高, 因此, 本次研究采用的是灌胃给予胡椒碱法, 后续实验结果也证实药物治疗效果较明显、药物利用率较高。

TBI 发生发展过程复杂, 可直接导致神经元损伤, TBI 后的神经元死亡存在多种方式, 焦亡作为一种促炎性程序性细胞死亡方式。在机体持续产生的病原体或危险相关分子模式的刺激下, NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 等蛋白造成局部组织炎症性损伤或全身性炎症反应。我们前期发现, TBI 后神经元中的 Caspase-1 活化程度与损伤程度呈正相关, 证实焦亡信号参与 TBI 后神经元损伤的病理生理过程。

本次研究的结果显示, Sham 组与 TBI 组对比, 小鼠脑组织受到创伤性损伤后在 7 天后 NLRP3、Caspase-1 的蛋白表达均较 Sham 组增高, 进一步验证了这两种焦亡相关因子对于创伤性脑损伤后具有一定意义; 三组胡椒碱组与 TBI 组对比结果显示, NLRP3 和 Caspase-1 的蛋白表达量均减少, 且低剂量组的蛋白表达量减少效果要优于中高剂量组, 表明低剂量的胡椒碱对于减轻小鼠的创伤性脑损伤具有更好的效果。

综上所述, 胡椒碱对于减轻小鼠的创伤性脑损伤具有一定的效果, 主要作用是胡椒碱调控小鼠神经焦亡通路, 抑制关键因子的上升, 进而改善小鼠神经炎症反应。但胡椒碱在抗击炎症因子类型以及 TBI 其他病理机制方面仍有不足, 故继续探究 TBI 的通路机制, 寻找有效药物靶点显得尤为重要。

参考文献:

[1]金伟, 创伤性脑损伤后继发性脑损伤的分子机制及其调控研究. 江苏省, 南京鼓楼医院, 2018-12-01.
 [2]陶丙岩, 刘羽阳, 张泽瀚等. NLRP3、AIM2 炎症小体在创伤性脑损伤中作用的研究进展[J]. 解放军医学院学报, 2022, 43 (09): 993-997.
 [3]王如梦, 杨宏新. 萜萜及其有效成分胡椒碱的研究进展[J]. 中国药事, 2021, 35 (03): 350-356.

作者简介: 王瑞琪 (2003.06), 女。

基金项目: 2023 年陕西省大学生创新创业训练计划项目 (No. 202311400005)。