

MT 通过 NLRP3-Caspase-1-GSDMD 通路改善 TBI 小鼠神经损伤的作用研究

常翠翠 陈玉华 李媛媛 高荣荣 王文婷 闫玉洁

西安培华学院 中国·陕西西安 710125

【摘要】目的：创伤性脑损伤（TBI）是一种由外部机械力对大脑造成损害的神经外科急重症。本实验以 C57BL/6N 小鼠为研究对象，将 NLRP3-Caspase-1-GSDMD 信号通路作为切入点，探究褪黑素（MT）对 TBI 小鼠神经功能障碍的改善作用。方法：小鼠随机分为假手术、TBI+Vehicle、TBI+MT（1, 5 和 10 mg/kg）组，水迷宫和旷场实验评估小鼠神经功能损伤情况；Western blot 检测 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白分子的变化；qRT-PCR 检测 NLRP3、IL-1 β 基因的变化。结果：MT 可改善 TBI 小鼠运动功能损伤和空间记忆障碍；Western blot 实验结果表明：TBI 后 NLRP3、Caspase-1 和 GSDMD 蛋白表达上调，而 MT 作用后，TBI 小鼠的 NLRP3、Caspase-1 和 GSDMD 蛋白表达下调；qRT-PCR 实验结果表明：TBI 后 NLRP3 和 IL-1 β 基因表达上调，而 MT 作用后，TBI 小鼠的 NLRP3 和 IL-1 β 基因表达下调。结论：TBI 后，小鼠神经功能损伤，MT 能够通过 NLRP3-Caspase-1-GSDMD 通路减轻神经炎症进而改善 TBI 小鼠神经功能障碍。

【关键词】MT；TBI；神经元焦亡；NLRP3

【Abstract】Objective: Traumatic brain injury (TBI) is a neurosurgical emergency in which the brain is damaged by external mechanical forces. In this study, C57BL/6N mice were taken as the research object, and the NLRP3-Caspase-1-GSDMD signaling pathway was taken as the entry point to explore the improvement of melatonin (MT) on the neurological dysfunction of TBI mice. Methods: Mice were randomly divided into sham, TBI+Vehicle, TBI+MT (1, 5, and 10mg/kg) groups, water maze and open field experiments were conducted to evaluate the neurological damage of mice. The changes of NLRP3, Caspase-1 and GSDMD protein molecules were detected by Western blot. The changes of NLRP3 and IL-1 β genes were detected by qRT-PCR. Results: MT could improve motor function injury and spatial memory impairment in TBI mice. The expressions of NLRP3, Caspase-1, and GSDMD were up-regulated after TBI, while the expressions of NLRP3, Caspase-1 and GSDMD were down-regulated after MT treatment. qRT-PCR data showed that the NLRP3 and IL-1 β mRNA expressions were up-regulated after TBI, and down-regulated after MT treatment. Conclusion: After TBI, nerve function is damaged in mice, and MT can alleviate neuroinflammation through NLRP3-Caspase-1-GSDMD pathway and then improve nerve dysfunction in TBI mice.

【Key words】melatonin; Traumatic brain injury; neuroinflammation; NLRP3

引言

创伤性脑损伤（traumatic brain injury, TBI）是一种由外部机械力对大脑造成的接触性损伤，主要由原发性和继发性损伤共同作用的疾病，但目前仍缺乏有效的治疗方法^[1]。TBI 后，脑组织损伤后会引发炎症反应、线粒体功能障碍等继发性损伤^[2]，针对继发性损伤寻找有效治疗靶点具有重大意义。

炎症反应是机体通过各种免疫细胞清除损伤因子的一种保护机制^[3]。细胞焦亡又称炎症性死亡，是细胞在受到外界刺激后，促进 NLRP3 炎性小体的激活，由 Gasdermin 蛋白在细胞膜打孔，细胞膜破裂，释放炎症因子 IL-1 β 、IL-18，导致炎症反应产生的过程。NLRP3-Caspase-1-GSDMD 信号通路在焦亡中起重要作用。

褪黑素（Melatonin, MT）具有调节神经系统功能。有研究发现，MT 可以抑制内质网应激引起的细胞凋亡^[4]；靶向 NLRP3 介导的焦亡信号通路被视为改善 TBI 预后的潜在策略^[5]。但 MT 与 TBI 后焦亡的联系仍待进一步研究。因此本文拟用 C57BL/6N 小鼠为研究对象构建 TBI 为模型，NLRP3-Caspase-1-GSDMD 信号通路作为切入点，探讨 MT 对 TBI 的作用影响及机制，为临床研究与防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

C57BL/6N 小鼠购买于中国赛业（广州）生物科技有限公司，褪黑素购于 Solarbio, SuperReal 荧光定量预混试剂增强版购于天根，PCR 仪购

于罗氏，颅脑打击器购于瑞沃德，显影仪购于伯乐。

1.2 动物分组

分组：假手术组；TBI 模型组；低、中、高剂量 MT 药物干预组；每组 6 只小鼠。

1.3 模型构建与给药

造模：小鼠经麻醉后剪除小鼠头皮部位的毛发，固定于适配器，剪开头皮，于前凶开孔，调整打击器参数：Speed: 3.5 m/s, Depth: 2.0 mm, Dwell Time: 0.2 sec，采用打击器撞击小鼠头部造成脑部损伤，碘伏消毒处理后缝合好皮肤置于 37℃加热台，恢复意识和活动后置于鼠笼中；对照组不进行打击器撞击；

给药：在 TBI 模型建立后半小时内对小鼠进行灌胃 MT 低、中和高剂量，即 1, 5 和 10 mg/kg。

1.4 水迷宫实验分析小鼠的神经功能损伤情况

将小鼠放于带有平台的圆形水池中，加入二氧化钛，记录小鼠到达平台时间。

1.5 旷场实验分析小鼠运动功能损伤情况

将小鼠放于 40 cm² 的宽旷场地，记录小鼠 60 S 的运动轨迹和总距离。

1.6 免疫印迹

取大脑皮层，用 RIPA 提取总蛋白，20-40 μ g 的蛋白质在 SDS-PAGE 中分离，转膜至 PVDF 膜后封闭、孵育一抗、二抗后曝光。

1.7 qRT-PCR

取大脑皮层加入总 RNA 提取试剂, TRIZOL 法提取 RNA, 以 GAPDH 作为对照, qRT-PCR 法检测 mRNA 的相对表达。

1.8 统计学方法

用 Graphpad Prism 6 进行统计分析, 统计学用均数 ± 标准差表示, 组间比较采用 t 检验, $P \leq 0.05$ 代表差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠 TBI 后运动功能的比较

表 2-1 旷场实验结果

组别	中心 (S)	边缘 (S)	总时长 (S)
假手术	19.26 ± 5.16	40.74 ± 8.91	60
TBI+Vehicle	5.42 ± 1.34	54.58 ± 5.4*	60
MT 1	9.24 ± 2.49	50.76 ± 9.2#	60
MT 5	11.24 ± 4.59	48.76 ± 10.46 #	60
MT 10	12.36 ± 3.62	47.64 ± 8.72#	60

n=4, *, $P < 0.05$, VS. 假手术组; #, $P < 0.05$, VS. TBI 组

表 2-1 显示: MT 给药组各组均有显著性差异, 假手术组与 TBI 组相比, 假手术组的活动范围在四周与中心, TBI 组多数在四周墙角小范围内

活动。TBI 组与给药组相比较, 大多在四周墙角活动, 但给药组活动范围较 TBI 组活动范围广, 提示 MT 动物焦虑程度和自主活动性有所改善 ($P < 0.05$)。

表 2-2 水迷宫实验结果

组别	到达平台所用时长 (S)
假手术	16.36 ± 3.44
TBI+Vehicle	61.66 ± 10.24 *
MT 1	44.24 ± 5.47 #
MT 5	36.92 ± 10.74 #
MT 10	30.43 ± 6.82 #

n=4, *, $P < 0.05$, VS. 假手术组; #, $P < 0.05$, VS. TBI 组

表 2-2 显示: 给药后, TBI 组均与假手术组、MT 给药组有显著性差异, TBI 组与假手术组相比, TBI 组到达平台所用时间更长。给药组与 TBI 组相比较, 给药组到达平台所用时间比 TBI 组短。提示 TBI 小鼠会出现空间记忆障碍等表型, 同时提示 MT 对 TBI 小鼠的神经功能障碍具有改善作用 ($P < 0.05$)。

2.2 Western-blot 法检测 NLRP3、Caspase-1 和 GSDMD 蛋白的表达

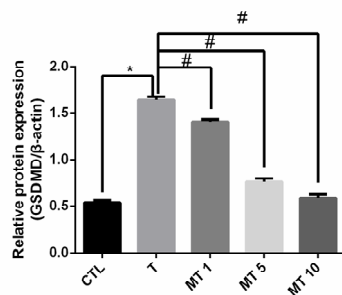


图 2-1 NLRP3 蛋白表达的影响

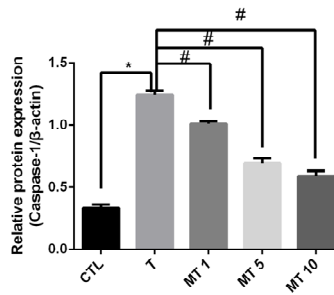


图 2-2 Caspase-1 蛋白表达的影响

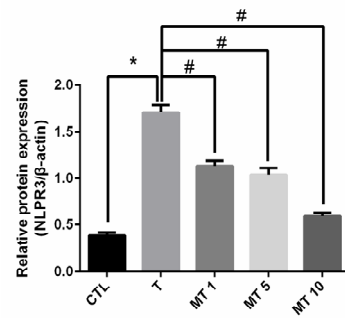


图 2-3 GSDMD 蛋白表达的影响

图 2-1、2-2、2-3 表明, 与假手术做比较, TBI 组的 NLRP3、Caspase-1 和 GSDMD 的蛋白含量均明显升高 ($P < 0.05$)。与 TBI 组比较, 给药组的 NLRP3、Caspase-1 和 GSDMD 的蛋白含量降低, ($P < 0.05$); 给药组之间: MT 10 组的 NLRP3、Caspase-1 和 GSDMD 的蛋白含量比 MT 1 组、MT 5 组低 ($P < 0.05$); 证明 MT 10 组疗效最优。

2.3 qRT-PCR 法检测实验检测 NLRP3 和 IL-1 β 的 mRNA 相对表达

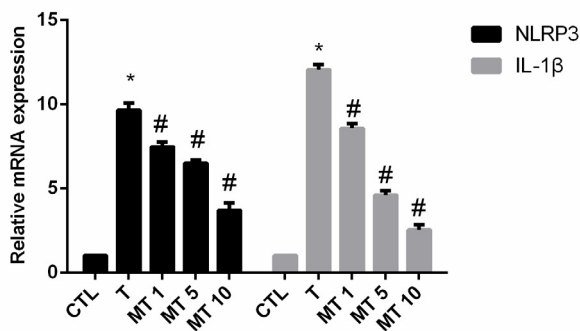


图 2-4 大脑皮层 NLRP3 和 IL-1 β 基因表达的比较

由图 2-4 得: 与假手术做比较, TBI 组的 NLRP3 和 IL-1 β 的 mRNA 相对表达量均有明显升高 ($P < 0.05$)。与 TBI 组做比较, MT 组的 NLRP3 和 IL-1 β 的 mRNA 相对表达量均降低 ($P < 0.05$)。

3 讨论

TBI 是目前人类面临的重要健康问题。本课题虽得出 MT 具有改善 TBI 后的运动功能障碍以及具有减轻炎症的作用, 但在调控炎症因子类型以及 TBI 的其它病理机制方面仍有不足, 后续仍将继续探讨相关作用机制, 为 TBI 的治疗提供理论支撑。

参考文献:

- [1]李彦腾, 程岗, 张剑宁.轻度创伤性脑损伤的诊断与治疗研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(2): 237-244.
- [2]谭雅夫, 刘畅, 王圣泳, 等.Natalizumab 减轻小鼠创伤性脑损伤炎症反应的作用研究[J].华中科技大学学报(医学版), 2023, 52(2): 218-222.
- [3]吕圣杰, 李春香, 吕园, 等.褪黑素通过抑制 NLRP3 介导的炎症反应及细胞焦亡减轻甲型流感病毒诱导肺上皮细胞损伤[J].病毒学报, 2023, 39(06): 1541-1548.
- [4]刘慧敏.褪黑素通过内质网应激介导细胞死亡抑制舌鳞癌生长[D]. 吉林大学, 2023.
- [5]Feng Z, Hua S, Li W, et al. Mesenchymal stem cells protect against TBI-induced pyroptosis in vivo and in vitro through TSG-6. Cell Commun Signal. 2022 Aug 18; 20(1): 125.

基金项目: 2022 年度西安培华学院校级科研项目, “MT 通过 NLRP3-Caspase-1-GSDMD 通路改善 TBI 小鼠神经元焦亡的作用研究”(PHKT2249)