

# 补阳还五汤对急性脊髓损伤大鼠 NOD 样受体蛋白 1/半胱氨酸蛋白水解酶-1 细胞焦亡通路的影响

李亚锋<sup>1</sup> 王延雷<sup>1</sup> 宋继鹏<sup>2</sup> 周峻<sup>1</sup> 杨峰<sup>2</sup> 唐向盛<sup>2</sup> 郝庆英<sup>2</sup> 谭明生<sup>2△</sup> 移平<sup>2△</sup>

**[摘要]** 目的:探究补阳还五汤对急性脊髓损伤(SCI)大鼠 NOD 样受体蛋白 1(NLRP1)/半胱氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1)细胞焦亡通路的影响。方法:将 32 只 SPF 级大鼠随机分成假手术组、甲强龙组、补阳还五汤(BYHWT)组和模型组,造模成功后补阳还五汤组每天给予补阳还五汤灌胃 1 次,连续 14 d,甲强龙组给予甲强龙冲击治疗;假手术组及模型组注射等补阳还五汤剂量的生理盐水;干预后的第 1,3,7 及 14 天以 BBB 评分评价大鼠神经功能恢复情况,Western Blot 法检测损伤脊髓中组织 NLRP1,Caspase-1 及 IL-18 蛋白的表达。结果:BBB 评分:假手术组大鼠评分无变化,BYHWT 组及甲强龙组治疗后 3 d,7 d 及 14 d 评分大于模型组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),治疗后 7 d 及 14 d,各组大鼠评分变化不明显。干预后第 14 天大鼠损伤脊髓组织中 NLRP1,Caspase-1 及 IL-18 蛋白的表达结果:BYHWT 组和甲强龙组蛋白表达均低于假手术组,高于模型组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论:补阳还五汤联合脊髓减压治疗急性 SCI 效果明显,作用机制可能是通过抑制 NLRP1/Caspase-1 通路以减少细胞焦亡。

**[关键词]** 脊髓损伤;补阳还五汤;焦亡;NOD 样受体蛋白 1;半胱氨酸蛋白水解酶-1

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2020)04-0006-04

## The Effect of Buyanghuanwu Decoction on the Pyroptosis Pathway of NLRP1/Caspase-1 in Rats with Acute Spinal Cord Injury

LI Yafeng<sup>1</sup> WANG Yanlei<sup>1</sup> SONG Jipeng<sup>2</sup> ZHOU Jun<sup>1</sup> YANG Feng<sup>2</sup>  
TANG Xiangsheng<sup>2</sup> HAO Qingying<sup>2</sup> TAN Mingsheng<sup>2△</sup> YI Ping<sup>2△</sup>

<sup>1</sup>Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

<sup>2</sup>China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China.

**Abstract Objective:** To investigate the effect of Buyanghuanwu decoction (BYHWT) on pyroptosis pathway of NLRP1 (NOD-like receptor protein 1)/Caspase-1 (cysteiny aspartate specific proteinase) in rats with acute spinal cord injury (SCI). **Methods:** Thirty-three SPF rats were randomly divided into four groups: sham operation group, methylprednisolone group, BYHWT group and model group. After the model was established successfully, BYHWT was prepared into a decoction once a day for 14 d. The methylprednisolone group was treated by methylprednisolone pulse therapy. The rats in the sham operation group and the model group were given normal saline at the dose of Buyanghuanwu decoction. The neurological recovery of the rats was evaluated by BBB scale at the 1, 3, 7, 14 d after intervention. The protein expression of NLRP1, Caspase-1 and IL-18 in SCI tissue was detected by Western Blot method. **Results:** BBB scale: There was no change in the scale of rats in the sham operation group. The scale of BYHWT group and methylprednisolone group were higher than that of the model group at the 3, 7 and 14 d after treatment, the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). At the 7 and 14 d after treatment, there was no significant change in the scale of rats in each group. The

protein expression of NLRP1, Caspase-1 and IL-18 in SCI tissue of rats at the 14 d after intervention: the protein expression of NLRP1, Caspase-1 and IL-18 in BYHWT group and methylprednisolone group were significantly lower than those in sham operation group and significantly higher than those in model group, the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** The therapeutic effect of Buyanghuanwu decoction combined with spinal cord decom-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81873141)

<sup>1</sup> 北京中医药大学(北京,100029)

<sup>2</sup> 中日友好医院

△通信作者 E-mail: zrtanms@sina.com(谭明生)

13811758985@139.com(移平)

王延雷与李亚锋贡献一样,为共同第一作者

pression on acute SCI is obvious, and the mechanism may be to reduce pyroptosis death by inhibiting NLRP1/Caspase-1 pathway.

**Keywords:** spinal cord injury; buyanghuanwu decoction; pyroptosis; NOD-like receptor protein 1(NLRP1); caspase-1

急性脊髓损伤(SCI)有高致残率和高死亡率的特点,是严重的中枢神经系统疾病,世界年龄标准化发病率为 $13/10^5$ <sup>[1]</sup>,中国发病率<sup>[2]</sup>为 $22.5/10^6 \sim 66.6/10^6$ ,颈脊髓损伤达 $46.02\%$ <sup>[3]</sup>。神经炎症在SCI继发性损伤中有着重要作用<sup>[4]</sup>,细胞焦亡可增强神经炎症反应<sup>[5]</sup>,NLRP1/Caspase-1是细胞焦亡通路之一<sup>[6]</sup>。补阳还五汤治疗SCI疗效确切<sup>[7]</sup>,研究显示脊髓减压联合中药疏通督脉治疗SCI疗效显著<sup>[8]</sup>。本研究探究了脊髓减压联合补阳还五汤对急性上颈髓损伤大鼠NLRP1/Caspase-1细胞焦亡通路的影响,现报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF级别健康雌性大鼠32只,体质量250~300 g,斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,实验动物许可证号SCXK(京)2019-0010。

### 1.2 实验药物及试剂

补阳还五汤出自王清任所著《医林改错》,组方剂量参考《方剂学》<sup>[9]</sup>,黄芪120 g,当归6 g,川芎3 g,赤芍5 g,地龙3 g,红花3 g,桃仁3 g。购于中国中医科学院附属望京医院,药房以中药配方颗粒自动化调配系统配制浓缩颗粒14剂,以100℃蒸馏水配制含生药2 g/mL的水煎液。戊巴比妥钠麻醉剂(美国Sigma公司,批号20160925);注射用甲泼尼龙琥珀酸钠(Pfizer Manufacturing Belgium NV,批号H20170197,规格40 mg);Caspase-1/p20/p10(兔多抗,Proteintech,22915-1-AP,1:1 000);IL-18(兔多抗,Proteintech,10663-1-AP);NLRP1(兔多抗,abcam,ab3683),GAPDH鼠单抗(CWBIO),山羊抗兔IgG(Jackson,111-035-008)。

### 1.3 实验仪器

球囊压迫系统由经改造后的SPL25012X球囊导管(Medtronic,规格2.5 mm×12.0 mm)、Cougar XT导丝(Medtronic,规格18 mm)、压力泵(美国Medtronic公司,型号Everest,规格30 atm)等组成;4℃低温高速离心机(MR 23i,美国Thermo);Multi-Skan 3酶标仪(Thermo);Mini P-4电泳槽(Cavoy);湿转电泳槽(Cavoy);稳压稳流电泳仪(Powerpac HQ,美国BIO-RAD);水平脱色摇床(其林贝尔);酸度计pH21(Han-na);电动组织匀浆(Fluka)。

### 1.4 方法

**1.4.1 造模方法** 将大鼠以2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(50 mg/kg),头部过屈位固定在大鼠手术台,

常规备皮、消毒,沿枕外隆突到C3棘突之间皮肤做纵行切口,钝性分离寰枢椎之间的肌肉及韧带,暴露出右侧寰枕间隙和寰枢椎间隙,将寰枕后膜和寰枢椎间隙之间的软组织以神经剥离子和圆刀分开,使硬膜外隙与外界相通,球囊部在铜丝及经过减少弧度的5 mm×12 mm缝合针的引导下从寰枕间隙进入,从寰枢椎间隙间穿出,球囊头部置于C2,C3椎板外,保证球囊压迫位置的精确性。放置成功后生理盐水清洗伤口,缝合肌肉及皮肤,固定导管,防止球囊压迫系统的移动,术后连续3 d肌肉注射庆大霉素6 mg/kg,预防感染。模型组、甲强龙组和BYHWT组大鼠术后24 h向球囊内注射生理盐水至压力为300 kPa,假手术组不加压,对大鼠颈脊髓形成压迫,持续压迫48 h后将球囊导管抽出。单笼饲养,定期膀胱按摩以协助排尿。

**1.4.2 分组方法** 32只成年Wistar大鼠随机分为4组( $n=8$ ):假手术组、模型组、补阳还五汤组(BYHWT组)、甲强龙组。

**1.4.3 干预方法** 1)甲强龙组:造模后24 h内尾静脉注射甲强龙,首剂量为30 mg/kg,其余以5.4 mg/(kg·h),每4 h给药1次。2)中药组:将制备的含生药2 g/mL的补阳还五汤水煎液,根据成人日服药量折算成大鼠灌胃剂量,每天给予1.75 mL/kg灌胃1次,持续2周。3)假手术组及模型组每天以1.75 mL/kg的生理盐水灌胃1次,持续2周。

**1.4.4 标本采集** 各组大鼠在干预14 d后以2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(50 mg/kg),分离大鼠脊柱,剔除肌肉软组织与骨头,分离出损伤脊髓组织,以Western Blot法检测组织中NLRP1,Caspase-1及IL-18蛋白的表达。

### 1.5 实验指标测定

**1.5.1 行为学检测** 采用Basso,Bettie和Bresnahan(BBB)评分评价大鼠脊髓损伤后的运动功能,BBB评分是评定大鼠运动功能最常用的方法之一,被分为22个等级(0分完全瘫痪到21分正常),造模前对所有大鼠进行评分,两名独立的测试者在治疗后第1,3,7及14天对实验大鼠进行5 min的观察评分,并对评分取平均值。

**1.5.2 Western Blot法检测结果** 脊髓组织在-80℃下保存至实验,使用裂解缓冲液对细胞总蛋白进行裂解和提取。用Micro总蛋白试剂盒鉴定蛋白质浓度,然后通过缓冲液中煮沸使蛋白质变性。采用10%十二烷基硫

酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳和硝酸纤维素膜电泳分离不同蛋白。用脱脂牛奶在室温下封闭膜,然后用 NLRP1, Caspase-1 和 IL-18 的特异性一抗在 4 ℃ 下孵育,而后在 37 ℃ 下,将二抗与过氧化物酶结合的膜孵育,使用增强化学发光法(ECL plus)实现可视化,得到所需蛋白的表达。用 Image J 软件对特定条带进行灰度分析,观察检测受压脊髓节段组织中的 NLRP1, Caspase-1 及 IL-18 表达。

1.6 统计学方法

所有数值均以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 SPSS 26 软件,实验各组干预后各时间点 BBB 评分采用重复测量设计资料的方差分析,其余计量资料采用单因素方差分析,

两两比较时采用方差分析 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 BBB 评分结果

观察干预后 1 d, 3 d, 7 d 及 14 d 大鼠 BBB 评分的变化,假手术组大鼠功能评分无变化。BYHWT 组及甲强龙组治疗后 3 d, 7 d 及 14 d 的 BBB 功能评分大于模型组,并且两组 BBB 评分随时间逐渐提高,表明脊髓损伤后补阳还五汤和甲强龙可以改善大鼠运动功能,但治疗后的 7 d 及 14 d, 各组大鼠运动功能变化不显著,具体结果见表 1。

表 1 各组大鼠在干预后不同时间点 BBB 功能评分比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	1 d	3 d	7 d	14 d
假手术组	8	21.000±0.000	21.000±0.000	21.000±0.000	21.000±0.000
BYHWT 组	8	9.250±0.535	14.125±0.443	18.375±0.443	19.500±0.463
甲强龙组	8	8.875±0.694	14.750±0.378	18.500±0.463	19.375±0.443
模型组	8	8.625±0.791	13.375±0.694	14.813±0.458	14.750±0.756
<i>F</i>		840.120	478.232	334.036	238.721
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:  $F_{\text{时间}} = 1\,319.787, P = 0.000 < 0.05; F_{\text{组间}} = 1\,401.397, P = 0.000 < 0.05; F_{\text{交互}} = 179.819, P = 0.000 < 0.05$ 。假手术组各时间点之间比较,  $P = 1$ ; BYHWT 组及甲强龙组各时间点之间评分比较,  $P < 0.05$ ; 模型组各时间点之间评分比较, 7 d 及 14 d,  $P = 1$ , 其余时间,  $P < 0.05$ 。各时间点假手术组与其余组之间评分比较,  $P < 0.05$ ; 1 d 其余各组之间,  $P > 0.05$ ; 3 d 其余各组之间,  $P < 0.05$ ; 7 d 及 14 d BYHWT 组与甲强龙组比较,  $P > 0.05$ , 其余各组之间,  $P < 0.05$ 。

2.2 Western Blot 法检测结果

观察大鼠脊髓中 NLRP1, Caspase-1 及 IL-18 蛋白在治疗后 14 d 的表达, BYHWT 组和甲强龙组蛋白表达低于模型组, 高于假手术组, 表明补阳还五汤和甲

强龙在大鼠脊髓损伤后可能通过下调 NLRP1, Caspase-1 及 IL-18 蛋白抑制焦亡, 从而修复大鼠脊髓损伤。NLRP1, Caspase-1 及 IL-18 蛋白表达 Western Blot 条带见图 1, 条带光密度值分析见表 2。

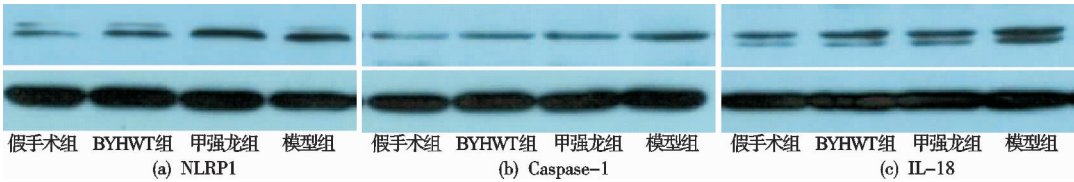


图 1 各组大鼠 NLRP1, Caspase-1 及 IL-18 表达示意图

表 2 各组大鼠 NLRP1, Caspase-1 及 IL-18 表达结果( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	NLRP1	Caspase-1	IL-18
假手术组	8	0.109±0.008	0.091±0.006	0.132±0.004
BYHWT 组	8	0.215±0.010	0.160±0.006	0.259±0.008
甲强龙组	8	0.225±0.031	0.165±0.007	0.261±0.008
模型组	8	0.351±0.005	0.406±0.011	0.480±0.009
<i>F</i>		274.044	2 503.302	2 991.974
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

注: NLRP1, BYHWT 组与甲强龙组比较,  $P = 0.625$ , 其余各组之间比较,  $P < 0.05$ ; Caspase-1, BYHWT 组与甲强龙组比较,  $P = 0.581$ , 其余各组比较,  $P < 0.05$ ; IL-18, BYHWT 组与甲强龙组比较,  $P = 0.940$ , 其余各组比较,  $P < 0.05$ 。

3 讨论

脊髓损伤的病理生理极其复杂, 包括细胞膜和轴突的剪切、血脊髓屏障的破坏、细胞死亡、免疫细胞的迁移和髓鞘的降解等<sup>[10]</sup>。由于继发性损伤在脊髓损伤后功能障碍中起主导作用, 因此目前的研究主要集中在对继发性损伤的干预上, 而减轻神经炎症反应导致

的神经元死亡及损伤区的进一步扩大被认为是抑制继发性损伤的重要措施之一<sup>[11]</sup>。研究显示炎性小体的激活是焦亡的关键触发因素<sup>[12]</sup>, 脊髓损伤开始时炎症小体未被激活, 损伤应激可直接导致细胞凋亡或坏死, 随后当损伤较小的神经元受到炎症应激时, 细胞焦亡与细胞凋亡相结合, 增强继发性损伤<sup>[13]</sup>。

NLRP1 炎性小体被研究证实可触发细胞焦亡并应用于对脊髓损伤的研究,正常大鼠脊髓神经元的 NLRP1 炎性小体是由 NLRP1、含有 CARD 的凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、Caspase-1 和 Caspase-11 组成的分子平台,并与凋亡抑制因子家族成员 X-连锁凋亡抑制因子蛋白(XIAP)形成蛋白组装。SCI 后可诱导 IL-18 的快速加工,Caspase-1 的活化及 XIAP 的裂解,促进 NALP1 炎症小体的组装<sup>[14]</sup>。

炎症小体被 SCI 激活后可裂解前半胱天冬氨酸蛋白酶-1(Pro-caspase-1),形成活性 Caspase-1,活性 Caspase-1 催化前白细胞介素分裂为包括白细胞介素 18(IL-18)在内的多种炎性因子<sup>[5]</sup>,同时 Caspase-1 还可介导质膜上的孔道开放,使促炎因子分泌到细胞外,进一步增强炎症反应<sup>[15]</sup>,这种依赖于 Caspase-1 且伴有明显炎症的细胞死亡方式称为经典途径细胞焦亡<sup>[13]</sup>。NLRP1 炎性小体是第一个被详细描述炎症小体,在细胞焦亡中发挥着重要作用,脊髓中 NLRP1 炎症小体主要在运动神经元和小胶质细胞中表达<sup>[16]</sup>。

Vaccari 等利用 T8 椎体水平的中度脊髓损伤模型,发现神经元中 NLRP1 蛋白表达水平较高<sup>[17]</sup>,同时有证据表明脊髓损伤动物体内 Caspase-1 的表达是增加的<sup>[18]</sup>。单用大剂量甲强龙治疗并不能解决继发性损伤这一难题,其他调节炎症的药物在实验中已被证明有一定效果,如外源性给药血红素氧合酶-1(HO-1)降低脊髓损伤实验模型中 NLRP1 的表达,显示 NLRP1 炎症诱导的神经元死亡减少,功能恢复改善<sup>[13]</sup>。因此,抑制 NLRP1/Caspase-1 细胞焦亡通路或是未来研究 SCI 治疗的主要方向之一。

补阳还五汤方中重用黄芪,大补元气,气行则血行,配以当归活血和血,川芎、赤芍、红花、桃仁助当归活血祛瘀,地龙行散走窜,通经活络,各药合用收补气活血通络之功,现代多用于脑梗死、脑血栓形成、血管神经性头痛、血管性痴呆、坐骨神经痛、颈椎病、腰椎间盘突出症、外伤性不全性瘫痪等症属气滞血瘀者<sup>[19-20]</sup>。本课题组将上颈髓损伤辨证为“督脉瘀阻”,并通过临床实验证明手术减压联合补阳还五汤可以治疗上颈髓损伤<sup>[21]</sup>,通过基础实验证明补阳还五汤对大鼠 SCI 有修复作用,可能机制是下调 Caspase-3、Caspase-9 及 Caspase-12 的表达和抑制血小板活化因子的释放<sup>[22-23]</sup>。廖柏松等<sup>[24-25]</sup>研究表明补阳还五汤可促进脊髓细胞体外存活和凸起生长及神经生长因子的表达,侯兆阳等<sup>[26]</sup>研究表明补阳还五汤可以明显减少细胞凋亡,进而促进神经功能恢复。以上研究结果显示补阳还五汤可通过多种机制改善 SCI 后的功能障碍,但对补阳还五汤是否抑制 NLRP1/Caspase-1 细胞焦亡通路的研究尚属空白。本实验结果表明补阳还五汤组大鼠脊髓中 NLRP1、Caspase-1 和 IL-18 表达明显低于模型组,表明补阳还五汤可以抑制大鼠 SCI 后

NLRP1/Caspase-1 细胞焦亡通路中相关蛋白的表达。

综上所述,本研究认为补阳还五汤改善大鼠上颈髓损伤的可能机制是抑制 NLRP1/Caspase-1 细胞焦亡通路,但本研究分组动物较少,对于脊髓损伤后焦亡所扮演的角色研究还不够系统深入,对于补阳还五汤作用于细胞焦亡通路的具体机制还有待进一步研究。

# 参考文献

- [1] JAMES S L,THEADOM A,ELLENBOGEN R G,et al. Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury,1990-2016;a systematic analysis for the global burden of disease study 2016[J]. The Lancet Neurology,2019,18(1):56-87.
- [2] JAZAYERI S B,BEYGI S,SHOKRANEH F,et al. Incidence of traumatic spinal cord injury worldwide;a systematic review[J]. Eur Spine J,2015,24(5):905-918.
- [3] KUMAR R,LIM J,MEKARY R A,et al. Traumatic spinal injury:global epidemiology and worldwide volume[J]. World Neurosurg,2018,113:e345-e363.
- [4] ZHANG N,YIN Y,XU S J,et al. Inflammation & apoptosis in spinal cord injury[J]. Indian Journal of Medical Research,2012,135(3):287-296.
- [5] DAI W,WANG X,TENG H,et al. Celastrol inhibits microglial pyroptosis and attenuates inflammatory reaction in acute spinal cord injury rats[J]. Int Immunopharmacol,2019,66:215-223.
- [6] TAN C C,ZHANG J G,TAN M S,et al. NLRP1 inflammasome is activated in patients with medial temporal lobe epilepsy and contributes to neuronal pyroptosis in amygdala kindling-induced rat model[J]. J Neuroinflammation,2015,12:18.
- [7] 王伟群,池伟东,吴俊哲. 中西医结合治疗脊髓损伤研究进展[J]. 山东中医杂志,2018,37(11):960-963.
- [8] 齐英娜,吴鑫杰,王延雷,等. 从督论治脊髓损伤的研究进展[J]. 时珍国医国药,2018,29(6):1425-1427.
- [9] 李冀. 方剂学[M]. 3 版. 北京:中国中医药出版社,2012:197-198.
- [10] WHALLEY K,O'NEILL P,FERRETTI P. Changes in response to spinal cord injury with development:Vascularization,hemorrhage and apoptosis[J]. Neuroscience,2006,137(3):821-832.
- [11] ZENDEDEL A,MONNINK F,HASSANZADEH G,et al. Estrogen attenuates local inflammasome expression and activation after spinal cord injury[J]. Mol Neurobiol,2018,55(2):1364-1375.
- [12] MORTEZAEI K,KHANLARKHANI N,BEYER C,et al. Inflammasome:its role in traumatic brain and spinal cord injury[J]. J Cell Physiol,2018,233(7):5160-5169.
- [13] LIN W P,XIONG G P,LIN Q,et al. Heme oxygenase-1 promotes neuron survival through down-regulation of neuronal NLRP1 expression after spinal cord injury[J]. J Neuroinflammation,2016,13(1):52.