

抑制NLRP3炎症小体中Caspase-1活化对大鼠颈动脉球囊损伤后内膜增生的保护作用

刘颖, 刘艳秋, 李翠玲, 姚凤娟, 刘东红
(中山大学附属第一医院超声科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】研究Caspase-1特异性抑制剂AC-YVAD-CMK对大鼠颈动脉球囊损伤后血管内膜增生的影响及可能机制。【方法】33只雄性成年SD大鼠,随机均分为假手术组、球囊损伤组、球囊损伤+AC-YVAD-CMK组。采用球囊损伤大鼠颈动脉的方法建立血管内膜增生动动物模型,14天后留取球囊损伤段血管,15个血管片段制作冰冻切片,苏木精-伊红(HE)染色法测量内膜与中膜(I/M)面积比值;18根血管片段采用Western blot检测NOD样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体、cleaved-Caspase-1、白介素(IL)-1 β 和IL-18的表达。【结果】HE染色发现,AC-YVAD-CMK显著抑制了内膜增生的程度(0.78 ± 0.13 vs 1.52 ± 0.14 , $P = 0.000$)。Western blot结果提示球囊损伤+AC-YVAD-CMK组中NLRP3蛋白表达较球囊损伤组显著降低($P = 0.009$);cleaved-Caspase-1蛋白在三组中的表达趋势与NLRP3蛋白表达一致($P = 0.000$)。且球囊损伤+AC-YVAD-CMK组大鼠的促炎性细胞因子IL-1 β 和IL-18水平较球囊损伤组显著降低($P = 0.000$)。【结论】AC-YVAD-CMK可以抑制大鼠颈动脉球囊损伤后内膜增生,其机制可能是其阻断Caspase-1蛋白活化,从而抑制促炎因子IL-1 β 和IL-18的释放而产生一定的保护作用。

关键词:球囊损伤;内膜增生;大鼠;NLRP3炎症小体;AC-YVAD-CMK

中图分类号:R543.3

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2017)02-0250-04

Protective Effects of Inhibiting Caspase-1 Activation in NLRP3 Inflammasome against Intimal Hyperplasia after Balloon Injury of Carotid Artery in Rats

LIU Ying, LIU Yan-qiu, LI Cui-ling, YAO Feng-juan, LIU Dong-hong

(Department of Ultrasound Imaging, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Corresponding to: LIU Dong-hong, E-mail: pylhjj@hotmail.com

Abstract:【Objective】To study the effects of Caspase-1 specific inhibitor AC-YVAD-CMK on intimal hyperplasia after carotid artery balloon injury in rats and its possible mechanism. 【Methods】A total of 33 male adult SD rats were randomly divided into sham group, balloon injury group and balloon injury+AC-YVAD-CMK group. Using the method of balloon injury to establish rat carotid artery intimal hyperplasia animal model, rats were sacrificed and blood vessels were harvested 14 days after operation. Fifteen vascular segments embedded in OCT and the intima to media (I/M) area ratio of neointima was measured by hematoxylin-eosin (HE) staining; 18 vascular segments were harvested and the expression of NLRP3 inflammasome, cleaved-Caspase-1, interleukin (IL)-1 β and IL-18 were measured by Western blot. 【Results】HE staining showed that AC-YVAD-CMK significantly inhibited the degree of intimal hyperplasia compared with the balloon injury group [(0.78 ± 0.13) vs (1.52 ± 0.14) ; $P = 0.000$]. The expression of NLRP3 inflammasome was increased in balloon injury group while the AC-YVAD-CMK attenuates the expression of NLRP3 ($P = 0.009$); The expression of cleaved-Caspase-1 was in line with the expression of NLRP3 ($P = 0.000$). The levels of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 in balloon injury + AC-YVAD-CMK group were significantly lower than those in the balloon injury group ($P = 0.000$). 【Conclusion】AC-YVAD-CMK can attenuate intimal hyperplasia after balloon injury of carotid artery in rats, which might be related to its effect on inhibiting the activation of Caspase-1, which could affect the release of pro-inflammatory cytokine of IL-1 β and IL-18.

Key words: balloon injury; intimal hyperplasia; rat; NLRP3 inflammasome; AC-YVAD-CMK

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(2): 250-253]

收稿日期:2017-01-11

基金项目:广东省省级产业技术研究与开发专项资金项目(20160904)

作者简介:刘颖,硕士研究生;刘艳秋,主治医师;排名前两位同为共同第一作者;刘东红,通信作者,主任医师,通信作者, E-mail: pylhjj@hotmail.com

经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)是冠状动脉粥样硬化的一种重要治疗手段,尽管科学技术和设备改进为血管内支架成形术带来了革命性改变,但支架内再狭窄仍然是PCI的一个重要并发症^[1-2]。虽然药物洗脱支架已大大减少了再狭窄的发生率,但支架内再狭窄仍为限制支架植入后远期疗效的一个主要因素^[3]。而炎症在支架内再狭窄的发生发展中发挥核心的作用^[1]。近年来文献报道NLRP3炎症小体对调控机体免疫和炎症反应具有重要的作用。NLRP3炎症小体是由NLP识别蛋白、ASC衔接蛋白和Caspase-1效应蛋白三种蛋白组成的复合体^[4]。而目前关于NLRP3炎症小体与内膜增生的关系尚不明确,因此我们通过建立大鼠球囊损伤后内膜增生的动物模型,探索NLRP3炎症小体的表达及Caspase-1蛋白特异性抑制剂(AC-YVAD-CMK)对内膜增生的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组

SPF级雄性SD大鼠33只,体质量350~450g,由中山大学实验动物中心提供,动物许可证号:SCXY(粤)2011-0029。随机均分为假手术组、球囊损伤组、球囊损伤+AC-YVAD-CMK组各11只。

1.2 试剂、耗材

2F球囊导管(美国Edwards),AC-YVAD-CMK、二甲基亚砜(美国Sigma),显微手术器械(上海金钟),NLRP3兔多克隆抗体(英国Abcam);cleaved-Caspase-1兔多克隆抗体(美国Santa Cruz);IL-1 β 兔单克隆抗体(英国Abcam);IL-18兔多克隆抗体(英国Abcam);兔抗 β -actin(美国CST)。

1.3 动物模型

大鼠用100g/L水化氯醛(3.5mL/kg)腹腔注射麻醉,尾静脉注射肝素100IU/kg。取颈部正中切口,钝性分离浅、深筋膜、胸锁乳突肌和二腹肌。在左侧气管旁分离暴露左颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)、颈内动脉(ICA),在CCA近心端及ICA远心端各放一个动脉夹,颈外动脉远心端备5-0丝线并结扎,近心端剪一小口,2F球囊导管从颈外动脉插入颈总动脉约2cm,向球囊灌注0.1mL肝素盐水,扩张球囊,来回抽动球囊3次,抽出球囊导管,结扎ECA开口近端,逐层缝合皮

肤^[5-6]。假手术组操作同上,但未插入球囊。球囊损伤+AC-YVAD-CMK组术后即刻腹腔注射AC-YVAD-CMK(12.5 μ mol/kg)。

1.4 取材及HE染色

术后继续饲养2周取材,生理盐水灌注后取损伤部位左侧颈总动脉约1cm,用于分子生物学实验研究;用于形态学及组织病理检测的样本,在生理盐水灌注后继续使用40g/L多聚甲醛溶液灌注固定,OCT包埋,冰冻切片机切7 μ m连续冰冻切片,行HE染色,光学显微镜拍照。采用Image-Pro Plus 6.0软件测量颈动脉内膜、中膜横断面面积,计算内膜/中膜面积比(I/M area ratio)。判断血管内膜增生程度以及AC-YVAD-CMK处理组大鼠内膜增生的改变情况。

1.5 Western blot

分别提取3组血管片段总蛋白,BCA法检测蛋白浓度。100g/L SDS-PAGE丙烯酰胺凝胶中电泳、转膜,50g/L脱脂奶粉封闭,加入一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜,加入HRP标记的二抗室温孵育1h,滴加增强型发光试剂(ECL)后,暗室曝光,观察蛋白表达情况,Image J软件分析各个条带的灰度值。

1.6 统计学方法

计量资料用均数 \pm 标准差表示,非正态分布资料采用Mann-Whitney非参数检验,正态分布资料采用单因素方差分析。应用SPSS20.0统计软件分析,以 P 小于0.05为差异有统计学意义。

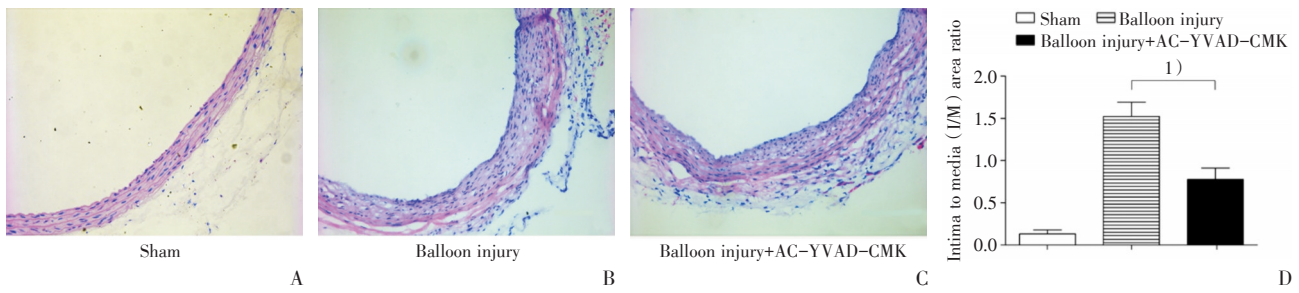
2 结 果

2.1 颈动脉内膜形态学改变

假手术组、球囊损伤组、球囊损伤+AC-YVAD-CMK组左侧5段颈动脉均行HE染色。我们发现假手术组颈动脉内膜未见异常;球囊损伤组左侧颈动脉可见显著增生。球囊损伤+AC-YVAD-CMK组内膜/中膜面积比较球囊损伤组显著降低(0.78 ± 0.13 vs 1.52 ± 0.14 , $P = 0.000$)。可见Caspase-1蛋白特异性抑制剂AC-YVAD-CMK对颈动脉球囊损伤后内膜增生具有一定的抑制作用(图1)。

2.2 AC-YVAD-CMK对大鼠血管组织NLRP3炎症小体的抑制作用

假手术组、球囊损伤组、球囊损伤+AC-YVAD-CMK组左侧6段颈动脉均行Western blot检测。我们发现球囊损伤组的血管片段中NLRP3



A: Sham group; B: Balloon injury group; C: Balloon injury+AC-YVAD-CMK group; D: Intimal hyperplasia was observed in rat carotid artery after balloon injury and suppressed by AC-YVAD-CMK. $\times 200$, Scale bars represent $100 \mu\text{m}$. ($n = 5$). 1) $P < 0.001$

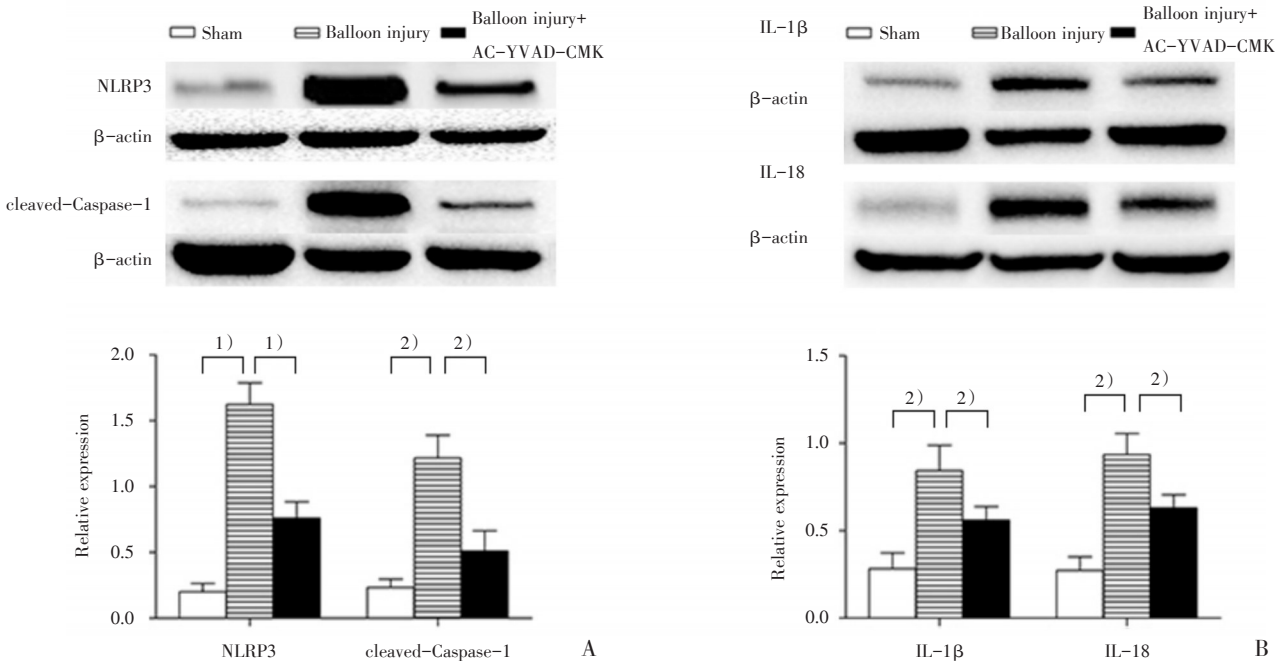
图1 大鼠颈动脉 HE 染色及统计学分析

Fig.1 HE stain of rat carotid artery and statistical analysis

蛋白显著高于假手术组 ($P = 0.000$), 而球囊损伤+AC-YVAD-CMK 组中 NLRP3 蛋白表达较球囊损伤组显著降低 ($P < 0.009$), 这说明 AC-YVAD-CMK 对 NLRP3 炎症小体产生了一定的抑制作用。Cleaved-Caspase-1 蛋白显著高于假手术组 ($P=0.000$), 而球囊损伤+AC-YVAD-CMK 组中 cleaved-Caspase-1 蛋白表达较球囊损伤组显著降低 ($P=0.000$), 进一步证实了 AC-YVAD-CMK 对 NLRP3 炎症小体中 Caspase-1 蛋白活化的抑制作用(图 2A)。

2.3 AC-YVAD-CMK 抑制 Caspase-1 活化、减少 IL-1 β 和 IL-18 的表达

Western blot 结果提示促炎性细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 在球囊损伤颈动脉中的表达较假手术组显著增加, 而球囊损伤+AC-YVAD-CMK 组大鼠的促炎性细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 水平较球囊损伤组显著降低 ($P = 0.000$)。这说明了 AC-YVAD-CMK 可以抑制 NLRP3 炎症小体中 Caspase-1 蛋白活化, 从而有效抑制大鼠球囊损伤后颈动脉促炎性细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 的产生 ($P = 0.000$; 图 2B)。



A: NLRP3 inflammasome and cleaved-caspase-1 expression are increased in carotid artery after balloon injury and suppressed by AC-YVAD-CMK. B: IL-1 β and IL-18 expression are increased in carotid artery after balloon injury and suppressed by AC-YVAD-CMK. All bands were normalized to actin. $n = 6$. 1) $P < 0.01$, 2) $P < 0.001$.

图2 Western blot 检测 NLRP3 炎症小体、cleaved-Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 在大鼠颈动脉中的表达

Fig.2 Western blot analysis of the protein expression of NLRP3 inflammasome, cleaved-caspase-1, IL-1 β and IL-18 in rat carotid artery

3 讨论

文献报道,PCI术后支架内再狭窄的主要原因是支架植入后的内膜损伤,继而引起血管平滑肌细胞的增殖、迁移以及细胞外基质的产生,最终导致内膜增生^[1,7]。因此本研究采用球囊损伤颈动脉内膜的方法,建立大鼠颈动脉内膜增生的动物模型。我们发现球囊损伤后2周,大鼠颈动脉形成了明显的新生内膜,内膜增生程度及形态学变化与文献报道一致^[6,8]。并且本研究结果还证实了AC-YVAD-CMK显著抑制了新生内膜的形成,可见AC-YVAD-CMK对球囊损伤后颈动脉内膜增生产生了一定的保护作用。

NLRP3炎症小体是目前研究较为深入的一种炎症小体,当受到某些损伤或刺激后会自身寡聚化和信号传导,进而引起效应蛋白Caspase-1活化,而后引起促炎性细胞因子IL-1 β 、IL-18的成熟和释放^[9],对炎症小体一定的干预可以有效调控促炎性细胞因子的成熟和释放^[10]。由于Caspase-1蛋白是NLRP3炎症小体中最重要的蛋白之一,并且Caspase-1蛋白是一个关键的促炎性细胞因子调节因子,在机体受到各种应激刺激后起到重要的调节作用。Krishna等^[11]采用小鼠颈动脉部分结扎建立颈动脉内膜增生模型,并且证实了微血管内皮细胞中NLRP3炎症小体的聚集、Caspase-1活化以及IL-1 β 等促炎因子的释放加重了颈动脉新生内膜增生。我们的研究结果显示,Caspase-1抑制剂AC-YVAD-CMK抑制了球囊损伤血管组织中NLRP3炎症小体中Caspase-1的活化,并且减少了促炎性细胞因子IL-1 β 和IL-18的释放,对大鼠颈动脉球囊损伤后内膜增生产生了一定的保护作用。

综上所述,本实验初步证实了NLRP3炎症小体在球囊损伤后血管组织中表达上调,而Caspase-1抑制剂AC-YVAD-CMK可以缓解新生内膜增生的程度,对球囊损伤后血管内膜产生了一定的保护作用。其作用机制可能是AC-YVAD-CMK抑制了Caspase-1蛋白活化,从而减少了促炎因子IL-1 β 和IL-18的成熟和释放,缓解了早期炎症反应。但具体通过何种通

路来对新生内膜产生抑制作用,有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Stone GW, Ellis SG, Cox DA, et al. A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease[J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(3): 221-231.
- [2] Maurel B, Chai F, Maton M, et al. In stent restenosis and thrombosis assessment after EP224283 injection in a rat model[J]. *Atherosclerosis*, 2013, 229(2): 462-468.
- [3] Hua JY, He YZ, Xu Y, et al. Emodin prevents intima thickness via Wnt4/Dvl-1/ β -catenin signaling pathway mediated by miR-126 in balloon-injured carotid artery rats[J]. *Exp Mol Med*, 2016, 47(6): e170.
- [4] Coll RC, Robertson AA, Chae JJ, et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases[J]. *Nat Med*, 2015, 21(3): 248-255.
- [5] 刘英梅,伍卫,韦育林,等.支架植入诱导平滑肌细胞凋亡在防治再狭窄中的作用[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2004, 25(3S): 30-32.
- [6] Guo X, Shi N, Cui XB, et al. Dedicator of cytokinesis 2, a novel regulator for smooth muscle phenotypic modulation and vascular remodeling[J]. *Circ Res*, 2015, 116(10): e71-80.
- [7] Kleinedler JJ, Orchard EA, Foley JD, et al. A dietary approach to increase in-stent stenosis and face validity of a rat model for arterial angioplasty and stenting[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 219(2): 484-491.
- [8] Zhang W, Halligan K. E, Zhang X, et al. Orai1-mediated I (CRAC) is essential for neointima formation after vascular injury[J]. *Circ Res*, 2011, 109(5): 534-542.
- [9] Haasken S, Sutterwala FS. Damage control: management of cellular stress by the NLRP3 inflammasome[J]. *Eur J Immunol*, 2013, 43(8): 2003-2005.
- [10] Dinarello CA, Simon A, van JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11(8): 633-652.
- [11] Xia Min, Boini KM, Abais JM, et al. Endothelial NLRP3 inflammasome activation and enhanced neointima formation in mice by adipokine visfatin [J]. *Am J Pathol*, 2014, 184(5): 1617-1628.

(编辑 王晓鹰)