

本文引文格式:张影影,杨维,李敏,等. CWI1-2 通过抑制 NLRP3 介导的焦亡对缺血性脑卒中模型的保护作用[J]. 右江民族医学院学报, 2024, 46(6): 858-862.

【论著与临床报道】

## CWI1-2 通过抑制 NLRP3 介导的焦亡 对缺血性脑卒中模型的保护作用

张影影, 杨维, 李敏, 赵宏, 寿广丽

(蚌埠医科大学第二附属医院神经内科, 安徽 蚌埠 233000)

**摘要:**目的 探索 CWI1-2 通过抑制 NLRP3 介导的焦亡对缺血性脑卒中模型起保护作用。方法 通过 GEO 数据库数据, 筛选 m6A 差异基因。构建缺血性脑卒中动物模型, 分为 NC 组(空白对照组)、缺血性脑卒中组(CIS 组)和缺血性脑卒中+[胰岛素样生长因子 2 mRNA 结合蛋白 2(IGF2BP2)抑制剂]CWI1-2 组(CIS+CWI1-2 组)。TTC 和 HE 染色法检测各组造模情况。免疫荧光检测 NeuN、TUNEL 和 NLRP3 表达强度。WB 检测各组中 NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  和 GSDMD 的表达情况。结果 生物信息学结果提示 IGF2BP2 在 CIS 患者中高表达。动物模型结果显示, 相较于 NC 组, CIS 组中脑梗死面积增多, 而较于 CIS 组, CIS+CWI1-2 组的梗死面积减小。HE 结果显示, CIS 组中细胞核碎裂较多, 而较于 CIS 组, CIS+CWI1-2 组的细胞核部分恢复。免疫荧光结果提示, 相较于 NC 组, CIS 组中 NeuN 表达下降, 而 NLRP3 表达上升, TUNEL 荧光强度增高; 而较于 CIS 组, CIS+CWI1-2 组中 NeuN 表达上升和 NLRP3 表达下降, TUNEL 荧光强度下降。WB 结果显示, 相较于 NC 组, CIS 组中 NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  和 GSDMD 上升。相较于 CIS 组, CIS+CWI1-2 组中 NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  和 GSDMD 下降。结论 CWI1-2 通过抑制 NLRP3 介导的焦亡对缺血性脑卒中模型起保护作用。

**关键词:**胰岛素样生长因子 2 mRNA 结合蛋白 2 抑制剂; NLR 家族, 热蛋白结构域包含蛋白 3; 卒中

中图分类号: R743

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2024)06-0858-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2024.06.004

### CWI1-2 protects ischemic stroke model by inhibiting NLRP3-mediated pyroptosis

ZHANG Yingying, YANG Wei, LI Min, ZHAO Hong, SHOU Guangli

(Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital of  
Bengbu Medical University, Bengbu 233000, Anhui, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the protective effect of CWI1-2 in ischemic stroke models by inhibiting NLRP3-mediated pyroptosis. **Methods** m6A differential genes were screened using data from the GEO database. Animal models of ischemic stroke were established and divided into three groups: the NC group (normal control group), the cerebral ischemic stroke (CIS group) group, and the cerebral ischemic stroke+[insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2 (IGF2BP2) inhibitor] CWI1-2 group (CIS + CWI1-2 group). TTC and HE staining were performed to assess the modeling of each group. Immunofluorescence was utilized to detect the expression intensities of NeuN, TUNEL, and NLRP3. Western blot (WB) analysis was conducted to examine the expression levels of NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$ , and GSDMD in each group. **Results** Bioinformatics results indicated that IGF2BP2 was highly expressed in patients with CIS. Animal model results showed that the infarction area in the CIS group was significantly increased compared to the NC group, whereas the infarction area in the CIS+CWI1-2 group was decreased compared to the CIS group. HE staining

基金项目:蚌埠医科大学自然科学重点项目(2023byzd099)

第一作者:张影影,主治医师,研究方向:脑血管疾病, E-mail: zyylyf618@163.com

通讯作者:寿广丽,副主任医师,研究方向:脑血管疾病, E-mail: sglsci@163.com

revealed increased nuclear fragmentation in the CIS group, with partial nuclear recovery observed in the CIS+CWI1-2 group. Immunofluorescence results indicated that compared to the NC group, the CIS group exhibited decreased NeuN expression, increased NLRP3 expression, and heightened TUNEL fluorescence intensity. However, in the CIS+CWI1-2 group, NeuN expression was increased, NLRP3 expression was decreased, and TUNEL fluorescence intensity was reduced compared to the CIS group. WB results demonstrated elevated protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$ , and GSDMD in the CIS group compared to the NC group, with decreased expression levels of these proteins observed in the CIS+CWI1-2 group compared to the CIS group. **Conclusion** CWI1-2 exerts a protective effect in the ischemic stroke model by inhibiting NLRP3-mediated pyroptosis.

**Key words:** insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2 inhibitor; NLR family, the thermal protein domain contains protein 3; stroke

目前,对于缺血性卒中(cerebral ischemic stroke, CIS)的治疗,除了经典的静脉溶栓治疗外,血管内治疗结合机械取栓和急性再通治疗也被证明是有效的<sup>[1-3]</sup>。然而,所有这些治疗方法都有局限性。静脉溶栓的有效治疗窗仅为 3 h。因此,有必要寻找新的治疗方法。近年来,RNA 修饰在基因调控中的作用受到了学术界的广泛关注。N6-甲基腺苷(M6A)修饰是真核生物中最常见的 mRNA 修饰手段<sup>[4-5]</sup>。胰岛素样生长因子 2 mRNA 结合蛋白 2(IGF2BP2)作为 m6A 修饰因子参与靶基因的转录后调控<sup>[6]</sup>。因此本研究就探索 IGF2BP2 促进 NLRP3 炎性体激活加重缺血性卒中的神经损伤的分子机制,为 CIS 诊疗做出新的探索。

## 1 方法与材料

1.1 动物模型构建 24 只 C57BL/6J 小鼠(8 周龄,雄性,25~30 g)购自斯贝福生物技术有限公司,编号:SCXK(京)2019-0010,所有动物饲养于蚌埠医科大学实验动物中心,所有小鼠自由进食饮水,12 h 明暗交替光照饲养。动物研究均经蚌埠医科大学动物研究伦理委员会批准(伦动科批字[2024]第 401 号)在实验动物中心进行。①空白对照组(NC 组):给予 PBS 灌胃,无需任何处理组;②缺血性脑卒中组(CIS 组):C57BL/6J 小鼠麻醉(戊巴比妥钠)过后,固定在手术板上,颈部皮肤备皮后,纵向剪开 3cm 切口,逐层分离组织,暴露颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉并挂线备用。利用动脉夹夹闭颈内动脉远心端后,将颈外动脉和颈内动脉分叉处做一切口,将加热后的尼龙线(直径约 0.25 mm)插入到颈内动脉后,随后结扎尼龙线于入口处颈内动脉段,随后松开颈内动脉的动脉夹,结合多普勒血流仪确定阻断血流约 80%以上,阻断约总计 60 min,随后再次暴露切口,拔除线栓,缝合切口。观察模型鼠状态,清水和标准鼠饲料饲养;③缺血脑卒中+IGF2BP2 抑制剂 CWI1-2 组(CIS+CWI1-2 组):CIS 基础之上,每日予以 CWI1-2(5 mg/kg)灌胃处理。药物配置如下:购买 CWI1-2(默克公司, HY-153274)以 10 mL 生理盐水稀释 5 mg CWI1-2 并配

置成终浓度 1 mmol/mL 的液体。所有小鼠造模 14 d。

1.2 脑组织剥离 造模 14 d 后,颈椎脱位法处死小鼠后,将小鼠头部切断,并置于冰上,分层剥离小鼠脑膜等脑部组织,直至剥离出新鲜脑组织,并迅速放于-80 °C 冰箱中。

1.3 Western Blot 实验检测 脑组织研磨成匀浆后,用含 EDTA 的 RIPA 裂解液,随后于 4 °C 低温离心机,以 12 000 r/min 转速离心 30 min,只吸取上清部分。使用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度,电泳和转膜后,取出 PDVF 膜随后 PBST 清洗 3 遍,然后用 5%脱脂牛奶包常温孵化 2 h,PVDF 膜与 GSDMD 一抗(货号:20770-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司,1:1000)、JAK2(货号:ab108596,艾博抗贸易有限公司,1:1000)、NLRP3 一抗(货号:68102-1-Ig,武汉三鹰生物技术有限公司,WB:1:1000,IF:1:200)、caspase-1(货号:81482-1-RR,武汉三鹰生物技术有限公司,1:1000)、IL-1 $\beta$ (货号:16806-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司,1:1000)、GAPDH(货号:60004-1-Ig,武汉三鹰生物技术有限公司,1:1000)4 °C 孵育过夜。然后与二抗在室温下孵育 1 h,然后用增强型化学发光试剂进行检测。并使用 Bio-Rad 成像系统进行成像。

1.4 TTC 染色法 将新鲜脑组织取出后,用 4%多聚甲醛固定 5 min 后,立刻放入-20 °C 冰箱中冰冻 30 min,随后把脑组织均匀切成 6 片,并将切片置于 2%的 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)溶液中。并用锡纸覆盖,放入 37 °C 的温箱中 15~30 min。不时翻转脑片,使其与染液均匀接触。随后用 ImageJ 软件分析梗死面积。

1.5 HE 染色 制备 4  $\mu$ m 厚石蜡包埋脑组织切片,随后蜡块脱蜡后分别用 HE 液进行染色。图像通过光学显微镜拍摄。

1.6 免疫荧光 脑组织切片用多聚甲醛固定,Triton X-100 渗透,洗涤后用 BSA 封闭。洗涤后,用抗 NLRP3 抗体(货号:68102-1-Ig,武汉三鹰生物技术有限

公司,1:200)和 NeuN 抗体(货号:ZMS377,默克集团有限公司,1:200)。在 4 °C 下染色过夜。洗涤后,与抗鼠二抗(1:200)在 37 °C 下孵育 1 h。用荧光显微镜观察和拍摄样品。

**1.7 TUNEL 染色** 采用 TUNEL 试剂盒严格按照说明书进行细胞凋亡检测。脱蜡、水合后,用酶在室温下孵育 20 min。切片用 PBS 洗涤 3 次后,在 37 °C 下与 TUNEL 反应混合液染色 1 h。PBS 洗涤 3 次后,DAPI 染色 1 h,最后室温下孵化二抗。最后将切片封存,在显微镜下拍照观察。

**1.8 生物信息学和数据统计** 通过 GEO 数据库中下载 GSE58294 数据集,并用 R(V 4.3.1 版本)软件中 Limma 包分选差异基因,热图筛选差异基因,同时

标记差异基因在染色质位置。实验数据使用软件 prism 8.0 进行统计分析。计量资料符合正态分布的,利用( $\bar{x} \pm s$ )表示。组间差异用单因素 ANOVA 分析。只有  $P < 0.05$  才具备统计学意义。

## 2 结果

**2.1 IGF2BP2 抑制剂可以恢复 CIS 的梗死面积** 热图显示,IGF2BP2 在缺血性脑卒中患者中过表达(见图 1A)。基因图标显示 IGF2BP2 在第 3 号染色体 27.2 区(见图 1B)。随后造模结果显示,CIS 组中脑梗死面积增大,而相较于 CIS 组,CIS+CWI1-2 组中梗死面积下降(见图 2A)。HE 结果显示,NC 组中的细胞较为饱满,而 CIS 组中细胞核碎裂较多。较于 CIS 组,CIS+CWI1-2 组的细胞核部分恢复(见图 2B)。

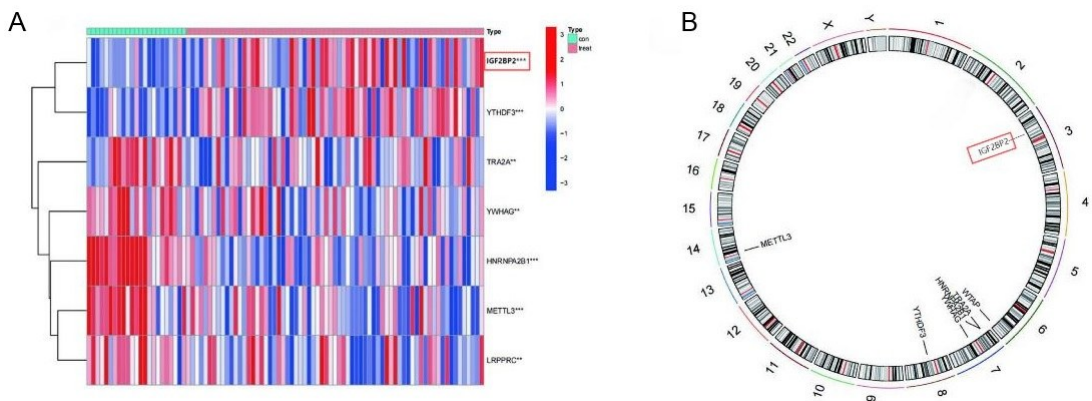
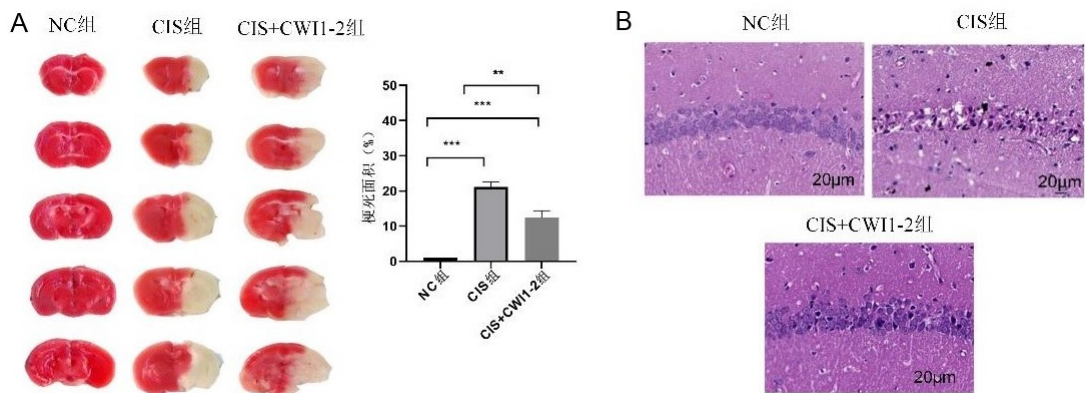


图 1 生物信息学筛选差异基因



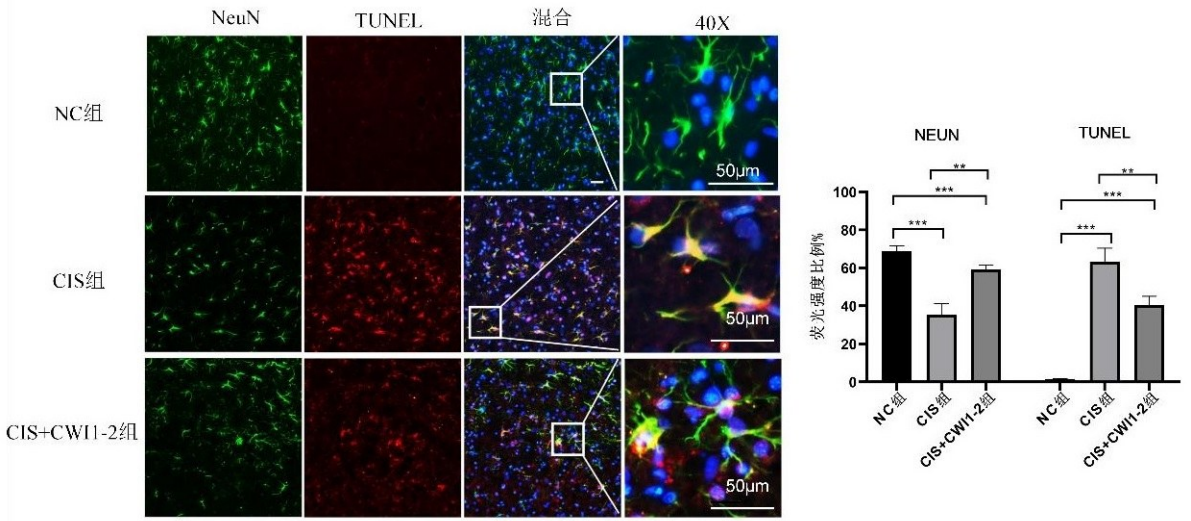
注:A. TTC 染色法;B. HE 染色法。\*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 。

图 2 TTC 和 HE 染色法检测 IGF2BP2 抑制剂对 CIS 的影响( $\times 50$ )

**2.2 IGF2BP2 抑制剂降低 CIS 模型中神经元活性标记物并减少凋亡产生** 利用免疫荧光检测各组中神经元标记物 NeuN,利用 TUNEL 法检测神经元凋亡情况。结果显示,相较于 NC 组,CIS 组中 NeuN 表达下降,而 TUNEL 染色强度提升(见图 3)。而相较于 CIS 组,CIS+CWI1-2 组中 NeuN 表达上升,而 TUNEL 染色强度下降(见图 3)。

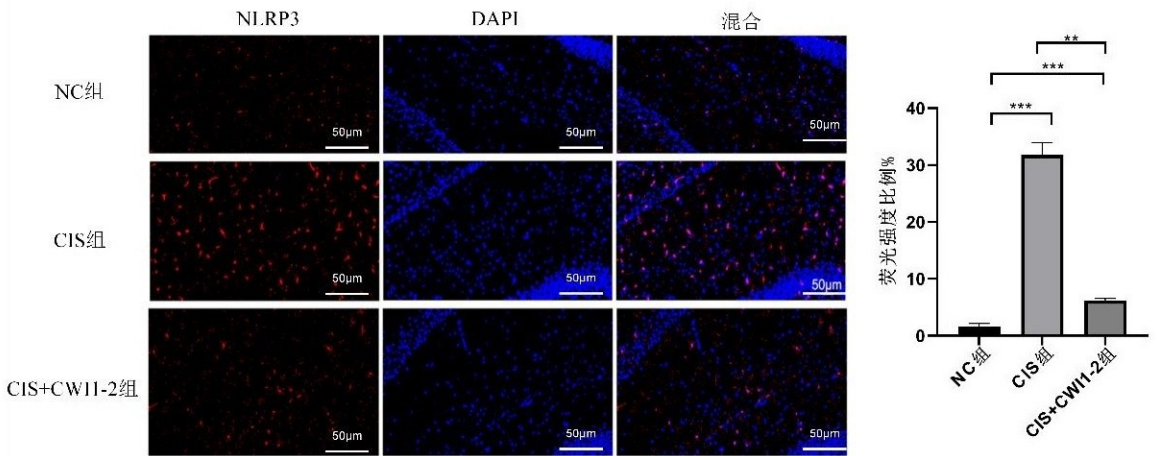
**2.3 IGF2BP2 抑制剂可以降低 NLRP3 小体形成**

为进一步探索 IGF2BP2 对 CIS 的炎性过程的影响,免疫荧光结果显示,相较于 NC 组,CIS 组中 NLRP3 表达上升明显。而相较于 CIS 组,CIS+CWI1-2 组 NLRP3 表达下降,见图 4。随后 WB 结果提示,相较于 NC 组,CIS 组中 NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  和 GSDMD 上升,而 CIS+CWI1-2 组中 NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  和 GSDMD 下降,见图 5。



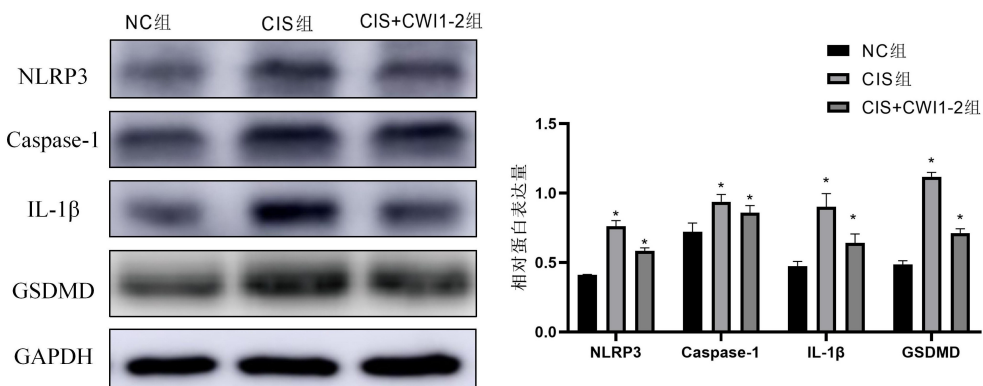
注: \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 。

图 3 免疫荧光检测各组 NeuN 强度和 TUNEL 检测各组凋亡情况( $\times 200$ )



注: \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 。

图 4 免疫荧光检测各组炎症标记物 NLRP3 的表达



注: \*  $P < 0.05$ 。

图 5 WB 实验检测 NLRP3、Caspase-1、IL-1β 和 GSDMD 的表达

### 3 讨论

CIS 的发生发展极其复杂,涉及多种分子机制和甲基化修饰<sup>[7]</sup>。已有研究表明<sup>[8]</sup>,CIS 中的 RNA 甲基化增高。M6A 修饰可以促进小胶质细胞/巨噬细胞的

激活和极化,并在中风后小胶质细胞诱导的炎症反应中发挥调节作用。因此探索 m6A 相关基因有助于了解 CIS 的发病机制。

炎症与 m6A 调控密不可分。从结构上讲,IGF2-

BP2 作为 m6A 调节蛋白影响靶基因 mRNA 稳定性。例如 METTL3 通过 IGF2BP2 依赖机制减轻 TAB3 的 m6A 修饰,从而减轻炎症进展<sup>[9]</sup>。IGF2BP2 还通过稳定 TSC1 和 PPAR $\gamma$  调节巨噬细胞表型激活和炎症疾病<sup>[10]</sup>。IGF2BP2 通过调节 IGF1R-RhoA-ROCK 信号通路促进炎症进展<sup>[11]</sup>。IGF2BP2 还通过稳定 m6A 修饰 GPX4 mRNA 减轻炎症表达<sup>[12]</sup>。这和本研究一致。本研究中添加 IGF2BP2 抑制剂后,在一定程度上缓解了 CIS 模型中的脑梗死面积,减轻了神经元细胞凋亡情况。这可能是 IGF2BP2 发挥 m6A 甲基化修饰作用影响了下游靶基因表达从而调控神经元活性。

本研究发现抑制了 IGF2BP2 后减轻了 NLRP3 的表达。而 NLRP3 作为炎症关键分子,一直是 CIS 研究的核心区域<sup>[13]</sup>。从机制上讲,NLRP3 炎性体的激活促进 Caspase-1 和 IL-1 $\beta$  释放到细胞外环境<sup>[14-16]</sup>。IL-1 $\beta$  可能不仅通过激活受损细胞的凋亡机制作为细胞凋亡的启动子,而且还可以激活小胶质细胞分泌一系列神经毒性介质,如 TNF- $\alpha$  和 iNOS,从而导致神经元损伤<sup>[17-20]</sup>。Caspase-1 激活焦亡途径,招募中性粒细胞浸润梗死灶周围区域,加重炎症<sup>[21]</sup>。而本研究显示加入 IGF2BP2 抑制剂后,NLRP3、Caspase-1 和 IL-1 $\beta$  的表达均下降,因此推测 IGF2BP2 可能通过调节 NLRP3 信号轴从而影响炎症过程。总而言之,本研究为 CIS 治疗提供了可能的方向。

#### 参考文献:

[1] 王海州,杨紫葵,陈璐,等. 颅内前循环动脉狭窄患者介入治疗后的血流动力学改变及疗效分析[J]. 卒中与神经疾病,2022,29(6):550-552,556.

[2] 吴治君,陈春花. 缺血性脑卒中治疗时间窗后辅助溶栓治疗的进展[J]. 解剖学报,2019,50(6):850-856.

[3] 李旺,石静,马磊. 阿司匹林联合氯吡格雷治疗缺血性脑卒中中对临床疗效、ADL 评分及不良反应的价值[J]. 名医,2022(7):147-149.

[4] 王亚敏,阮晓迪,吕转,等. m6A 甲基化与脑缺血再灌注相关性的研究进展[J]. 安徽医科大学学报,2024,59(7):1289-1294.

[5] 梁天,严雁,朱路路,等. 缺血性脑卒中 m6A 修饰与免疫微环境相关性分析[J]. 内科,2023,18(1):1-7,26.

[6] ZHAO Y J,JI G H,ZHOU S H, et al. IGF2BP2-Shox2 axis regulates hippocampal-neuronal senescence to alleviate microgravity-induced recognition disturbance [J]. iScience,2024,27(6):109917.

[7] ROIGNANT J Y,SOLLER M. m6A in mRNA:an ancient mechanism for fine-tuning gene expression [J]. Trends Genet,2017,33(6):380-390.

[8] CHOKKALLA A K,MEHTA S L,KIM T, et al. Transient focal ischemia significantly alters the m6A epitranscriptomic tagging of RNAs in the brain[J]. Stroke,2019,

50(10):2912-2921.

[9] WANG J N,WANG F,KE J, et al. Inhibition of METTL3 attenuates renal injury and inflammation by alleviating TAB3 m6A modifications via IGF2BP2-dependent mechanisms[J]. Sci Transl Med,2022,14(640):eabk2709.

[10] WANG X,JI Y G,FENG P P, et al. The m6A reader IGF2BP2 regulates macrophage phenotypic activation and inflammatory diseases by stabilizing TSC1 and PPAR $\gamma$ [J]. Adv Sci (Weinh),2021,8(13):2100209.

[11] LIU D,XIA A D,WU L P, et al. IGF2BP2 promotes gastric cancer progression by regulating the IGF1R-RhoA-ROCK signaling pathway [J]. Cell Signal, 2022, 94: 110313.

[12] LIU W,ZENG H. IGF2BP2 attenuates intestinal epithelial cell ferroptosis in colitis by stabilizing m6A-modified GPX4 mRNA[J]. Cytokine,2024,173:156388.

[13] KELLEY N,JELTEMA D,DUAN Y H, et al. The NLRP3 inflammasome:an overview of mechanisms of activation and regulation[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(13): 3328.

[14] HONG P,GU R N,LI F X, et al. NLRP3 inflammasome as a potential treatment in ischemic stroke concomitant with diabetes [J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1): 121.

[15] WANG L X,REN W,WU Q J, et al. NLRP3 inflammasome activation:a therapeutic target for cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Front Mol Neurosci, 2022, 15: 847440.

[16] FENG Y S,TAN Z X,WANG M M, et al. Inhibition of NLRP3 inflammasome:a prospective target for the treatment of ischemic stroke[J]. Front Cell Neurosci, 2020, 14:155.

[17] FU J N,WU H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation[J]. Annu Rev Immunol,2023,41:301-316.

[18] JAVAID H M A,KO E,JOO E J, et al. TNF $\alpha$ -induced NLRP3 inflammasome mediates adipocyte dysfunction and activates macrophages through adipocyte-derived lipocalin 2[J]. Metabolism,2023,142:155527.

[19] HUANG Y,XU W,ZHOU R B. NLRP3 inflammasome activation and cell death[J]. Cell Mol Immunol,2021,18(9):2114-2127.

[20] ZHANG J,LIU X Q,WAN C Y, et al. NLRP3 inflammasome mediates M1 macrophage polarization and IL-1 $\beta$  production in inflammatory root resorption[J]. J Clin Periodontol,2020,47(4):451-460.

[21] PULEO M G,MICELI S,DI CHIARA T, et al. Molecular mechanisms of inflammasome in ischemic stroke pathogenesis[J]. Pharmaceuticals (Basel),2022,15(10): 1168.

收稿日期:2024-06-14;修回日期:2024-07-29