DOI:10.16016/j.1000-5404.201907021

PTPN22 在大鼠脑出血后炎症损伤中的作用研究

王 露[1],张 莉[1],肖 涵[1],甘 荟[1],陈 辉[1],蒋 宁[2],翟 瑄[1],赵 敬[2],李映良[1] 400016 重庆,重庆医科大学:附属儿童医院神经外科,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,国家儿童健康与疾病临床医学研究中心,儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地,儿科学重庆市重点实验室[1],基础医学院[2]

[**摘要**] **目的** 探讨蛋白酪氨酸磷酸酶,非受体型 22(protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22, PTPN22)在大鼠脑出血后炎症反应中的作用及其机制。**方法** 采用自体血注入脑内建立大鼠脑出血(intracerebral hemorrhage,ICH)模型,36 只 SD 大鼠随机分为假手术组,ICH3、6、12、24、48 h 组($n=6$),Western blot 筛选大鼠脑出血后 PTPN22 表达的时间窗。72 只大鼠随机分为假手术组、ICH 组、ICH+NC 组、ICH+PTPN22 干扰组($n=18$)。ICH24 h 后,对各组大鼠进行神经功能评分(mNSS),脑含水量测定,Western blot 检测大鼠脑出血后血肿周围 NLRP3,成熟的白介素-1β(cleaved-IL-1β),成熟的白介素-18(cleaved-IL-18)以及激活的半胱天冬酶-1(cleaved-caspase-1)的表达,HE 和 Nissl 染色观察大鼠脑组织形态学改变,免疫荧光染色检测血肿周围髓过氧化物酶(MPO)的表达。**结果** 大鼠脑出血后 12hPTPN22 的表达开始升高,24 h 达到峰值,48 h 开始降低。差异具有统计学意义($P<0.05$);与 ICH+NC 组相比,ICH+PTPN22 干扰组神经功能评分降低,脑含水量减少,差异具有统计学意义($P<0.05$);HE 和 Nissl 染色结果可见,ICH+PTPN22 干扰组脑组织损伤程度与 ICH+NC 组相比明显减轻;ICH+PTPN22 干扰组大鼠脑出血后血肿周围 NLRP3、cleaved-IL-1β、cleaved-IL-18 以及 cleaved-caspase-1 的表达与 ICH+NC 组相比明显降低($P<0.05$);ICH+PTPN22 干扰组 MPO 细胞与 ICH+NC 组相比明显减少。**结论** 干扰 PTPN22 可通过抑制 NLRP3 炎性体的激活从而减轻大鼠脑出血后的炎症损伤。

[**关键词**] 脑出血;PTPN22;NLRP3;cleaved-IL-1β;cleaved-IL-18;cleaved-caspase-1;炎症损伤
[**中图法分类号**] R345; R364.5; R743.34 [**文献标志码**] A

Interference of protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 inhibits NLRP3 inflammasome activation to alleviate inflammation after cerebral hemorrhage in rats

WANG Lu[1], ZHANG Li[1], XIAO Han[1], GAN Hui[1], CHEN Hui[1], JIANG Ning[2], ZHAI Xuan[1], ZHAO Jing[2], LI Yingliang[1] [1]Department of Neurosurgery, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Key Laboratory of Child Development and Disorders Ministry of Education, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics; [2]College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 (PTPN22) in inflammatory response following intracerebral hemorrhage (ICH) in rats and explore the mechanism that mediates its effect. **Methods** Rat models of ICH were established by injecting autologous blood into the brain of 30 SD rats, and Western blotting was performed at 3, 6, 12, 24, and 48 h after ICH (6 rats at each time point) and in 6 sham-operated rats to determine the time window of PTPN22 expression after ICH. Another 72 rats were randomized equally into sham operation group, ICH group, ICH+negative

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81671158);重庆市科委重点课题(2015jcyjBX0144)
[**通信作者**] 李映良,E-mail:1978605122@qq.com

control (ICH + NC) group, and ICH + PTPN22 interference group, and the neurological function score (mNSS) and brain water content were assessed at 24 h after ICH or the sham operation. Western blotting was used to detect the expression of cleaved interleukin-18 (cleaved IL-18), cleaved-IL-1β and cleaved caspase-1 around the hematoma in the rats. Histomorphological changes of the brain tissues of the rats were observed using HE and Nissl staining, and the expression of myeloperoxidase (MPO) around the hematoma was detected using immunofluorescence staining. **Results** The expression of PTPN22 began to increase significantly at 12 h after ICH in the rats, peaked at 24 h and began to decrease at 48 h ($P<0.05$). Compared with those in ICH+NC group, the rats in ICH+PTPN22 interference group had significantly lowered neurological scores and reduced brain water content ($P<0.05$) with obviously alleviated brain tissue damage as shown by HE and Nissl staining. The expression of NLRP3, cleaved IL-1β, cleaved IL-18 and cleaved caspase-1 and the number of MPO-positive cells around the hematoma were all significantly lowered in PTPN22 interference group compared with ICH+NC group ($P<0.05$). **Conclusion** Small interfering RNA-mediated interference of PTPN22 attenuates inflammatory response after ICH in rats by inhibiting the activation of NLRP3.

[**Key words**] intracerebral hemorrhage; protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22; NLRP3; cleaved interleukin-1β; cleaved interleukin-18; cleaved caspase-1; inflammatory injury

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81671158) and the key project of Chonging Science and Technology Commission (2015jcyjBX0144). Corresponding author: LI Yingliang, E-mail: 1978605122@qq.com

脑出血(intracerebral hemorrhage,ICH)是脑实质的出血,是中风的一种亚型,约占所有中风的15%。脑出血病死率和发病率均较高,1年生存率仅为30%[1]。目前,脑出血的机制尚不完全清楚,临床上缺乏有效的治疗手段。PTPN22(protein tyrosine phosphatase, nonreceptor type 22)是一种蛋白酪氨酸磷酸酶,参与细胞免疫反应及炎症,与多种自身免疫性疾病有关[2-3]。研究表明在小鼠模型中,PTPN22缺乏可以导致结肠炎,增加NLRP3磷酸化,降低成熟的IL-1β水平[4]。相反,炎症性肠病(IBD)患者携带自身免疫相关PTPN22水平增加,促进NLRP3去磷酸化,增加成熟的IL-1β水平。酪氨酸磷酸化作为NLRP3的重要调节机制,可防止异常的炎性体激活[5]。但PTPN22在脑出血中的作用尚未见报道。胞内Nod样受体(NLR)在免疫应答和炎症反应过程中起关键作用[6]。NLRP3炎性体是NLR家族中最具代表性的成员,是一种多蛋白复合物,由NLRP3,凋亡相关的斑点样蛋白(ASC)和半胱天冬酶-1(caspase-1)组成[7]。激活的caspase-1(cleaved-caspase-1)可以剪切Pro-IL-1β和Pro-IL-18,形成其成熟和活跃形式,促进cleaved-IL-1β,cleaved-IL-18的释放,导致其他免疫细胞如中性粒细胞的募集和激活[8-9]。本课题组前期研究表明NLRP3炎性体的激活可以加重脑缺血再灌注损伤[10-12],与炎性体激活有关的机制是近年来研究的热点。

本实验通过采用自体血建立大鼠脑出血模型,通过抑制PTPN22的表达,研究PTPN22在大鼠脑出血后炎症反应中的作用。并探究干扰PTPN22是否可以通过抑制NLRP3炎性体激活,从而在脑出血后炎症反应中发挥作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年雄性SD大鼠108只,体质量250~300 g,在重庆医科大学实验动物中心繁殖和饲养。本实验通过重庆医科大学医学伦理委员会。36只SD大鼠随机分为6组:sham组(即假手术组),ICH3、6、12、24、48 h,每组6只,用于筛选PTPN22在脑出血模型后表达的时间窗。另外72只大鼠随机分配为以下4组($n=18$):sham组,ICH组(ICH24 h),ICH+NC组(即ICH+阴性对照组);ICH+ PTPN22siRNA组(即ICH+ PTPN22干扰组),研究PTPN22在炎症反应中的作用。

1.2 方法

1.2.1 建立ICH模型 采用自体血注入诱导脑出血模型。将大鼠随机分配到实验组,通过腹膜内注射用4%水合氯醛(1 mL/100 g)麻醉,并固定于脑定位仪上。从股动脉收集自体血(50 μL),并转移到具有显微注射泵的抗凝注射器中。将血液以前囟后0.2 mm,

旁开 3.0 mm 和深度 5.8 mm 的距离注入右侧纹状体。在深度 5.0 mm 时注入 10 μL 血液,留针 2 min;最后再进针到深度为 5.8 mm 时注入剩下的 40 μL 血液,留针 15 min 后缓慢拔出针头。Sham 组的大鼠仅插入针头[13]。

1.2.2 PTPN22 siRNA 的筛选 PTPN22 siRNA 由上海吉马公司设计并合成。四种 PTPN22-rat-siRNA 片段分别为:PTPN22-rat-1833(正义链:5′-CCUCCUCUUCUUAUAGUAATT-3′,反义链:5′-UUACUAUAAGAAGAGGAGGAGGTT-3′);PTPN22-rat-1419(正义链:5′-GCAGAUGUCACAACUCAAATT-3′,反义链:5′-UUUGAUUUGUGACAUCUGCTT-3′);PTPN22-rat-1185(正义链:5′-GCCUUAGAACUUCUAAGAUTT-3′,反义链:5′-AUCUUAGAAGUUCUAAGGCTT-3′);PTPN22-rat-494(正义链:5′-GCAUGUAUGGAGUUCGAAATT-3′,反义链:5′-UUUCGAACUCCAUACAUGCTT-3′);以及阴性对照序列。在 ICH 模型建立前 24 h 将 PTPN22siRNA 注射到右侧脑室中。免疫印迹检测转染检测出效果最好的干扰片段是 PTPN22-rat-494(正义链:5′-GCAUGUAUGGAGUUCGAAATT-3′,反义链:5′-UUUCGAACUCCAUACAUGCTT-3′)。

1.2.3 PTPN22-rat-siRNA 转染 将每管 PTPN22-rat-siRNA 于高速离心机(4 000 r/min,5 min)离心,然后将其溶溶于 10 μL DEPC 水中,振荡,离心 3 次。然后注入前囟后 2 mm,旁开 1 mm,深度 3.5 mm 的侧脑室内(每只大鼠 10 μL),留针 15 min。阴性对照的 siRNA 使用相同的方法注入。

1.2.4 神经功能评分 在改良神经功能评分(mNSS)中,通过运动实验(6 分),感官实验(2 分),平衡木实验(6 分),反射表现和不正常运动(4 分)来评价各组大鼠神经功能受损情况(总分 18 分,分数越高,表示大鼠神经功能受损越严重)[14]。

1.2.5 脑含水量测定 各组 SD 大鼠测量脑含水量,将大鼠麻醉后,在没有灌注的情况下,将大脑移除,去除小脑。立即用称重电子天平称量大脑标本获得湿重,然后在 100 ℃烤箱中烘干 24 h 并再次称重以获得干重。下面的公式用于计算脑含水量:[(湿重-干重)/湿重]×100%。

1.2.6 HE 和 Nissl 染色 进行 HE 和 Nissl 染色以评估形态学变化。各组 SD 大鼠经心脏灌注 0.9%氯化钠和 3.5%多聚甲醛,断头取脑,将脑组织于 4%的多聚甲醛中固定 2 d,然后脱水,浸蜡,包埋和切片。根据标准方案,切片用 0.1%甲酚紫(Nissl 染色)或 HE 染色。于正置显微镜下观察形态学变化。

1.2.7 免疫荧光 各组 SD 大鼠麻醉后,先用生理盐水灌注后,再用 4%的多聚甲醛灌注固定,然后将脑组织于 4%的多聚甲醛中固定 2 d,之后,用 30%蔗糖溶液将其脱水至沉底,并使用低温恒温器切片机在脑组织血肿周围做连续冠状切片(8 μm),取切片置于常温,用 PBS 洗涤 5 min/次×3 次,然后用 5%BSA 封闭 1 h,孵一抗 MPO(abcam 公司,1∶40)过夜。取切片于 37 ℃水浴箱中复温 30 min,PBS 洗涤 5 min/次×3 次,孵荧光二抗(Proteintech 公司,1∶200)2 h,PBS 洗涤 5 min/次×3 次(避光),暗室封片。荧光显微镜下观察,细胞核为蓝色,MPO 细胞呈绿色。

1.2.8 Western blot 检测 麻醉各组 SD 大鼠,0.9%生理盐水灌注后快速取脑,取血肿周围脑组织加入含有蛋白酶抑制剂 PMSF 的 RIPA 缓冲液中冰上研磨成匀浆。将混合的裂解物放入 4 ℃离心机,以 12 000×*g* 离心 15 min,并吸取上清液。用 BCA 蛋白质分析试剂盒(Beyotime)测定蛋白质浓度。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离等量的蛋白质样品(50 μg)并电转移至硝酸纤维素膜。用 5%脱脂牛奶封闭 2 h,PTPN22 一抗(Cell Signaling,#14693S,1∶500),NLRP3(Cell Signaling,#15101S,1∶1000),cleaved-IL-1β 一抗(Affinity,AF4006,1∶500),cleaved-IL-18 一抗(Proteintech,10663-1-AP,1∶500),cleaved-caspase-1 一抗(Cell Signal,#3866S,1∶1 000),beta-actin 一抗(Proteintech,1∶1 000)孵育 4 ℃过夜。然后,将用 TBST 洗膜 10 min/次×3 次,二抗(Proteintech,1∶2 000)在室温下孵育 2 h,再次用 TBST 清洗 10 min/次×3 次。通过增强的化学发光系统检测蛋白质条带的特异性信号。通过 ImageJ 计算条带强度,目的条带的灰度值与 β-actin 的比值即为蛋白表达量。每个免疫印迹实验重复至少 3 次。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism7.0 统计软件,数据表示为 $\bar{x}\pm s$,通过单向或双向方差分析(ANOVA)确定多组之间的差异,组间比较使用 t 检验。检验水准:$\alpha=0.05$.

2 结果

2.1 PTPN22 在脑出血后表达的时间窗

Western blot 检测大鼠脑出血后血肿周围 PTPN22 表达的时间窗,与 sham 组相比,ICH 后 12 h PTPN22 的表达开始升高,24 h 达到峰值,48 h 开始降低($P<0.05$,图 1)。因此,后续实验我们均选择 ICH 后 24 h 的大鼠脑组织标本。

2.2 干扰 PTPN22 减轻了大鼠脑出血后神经功能损伤

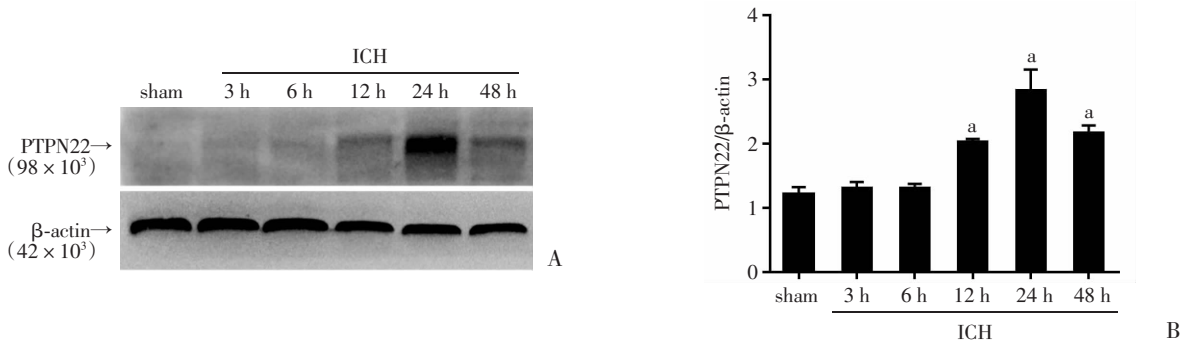
用 Western blot 检测 PTPN22 干扰效果最好的片段为 siRNA-494($P<0.05$, 图 2A、B)对各组大鼠进行神经功能评分,ICH 组神经功能评分高于 sham 组,ICH+PTPN22siRNA 组的大鼠神经功能评分明显低于 ICH+NC 组,且 ICH 组与 ICH+NC 组评分无明显差异,说明干扰 PTPN22 可以减轻大鼠脑出血后神经功能损伤($P<0.05$, 图 2C)。

2.3 干扰 PTPN22 降低了大鼠脑出血后脑含水量

ICH 组脑含水量高于 sham 组,ICH+PTPN22siRNA 组大鼠的脑含水量与 ICH+NC 组相比降低,ICH 组与 ICH+NC 组脑含水量无明显差异($P<0.05$, 图 2D)。

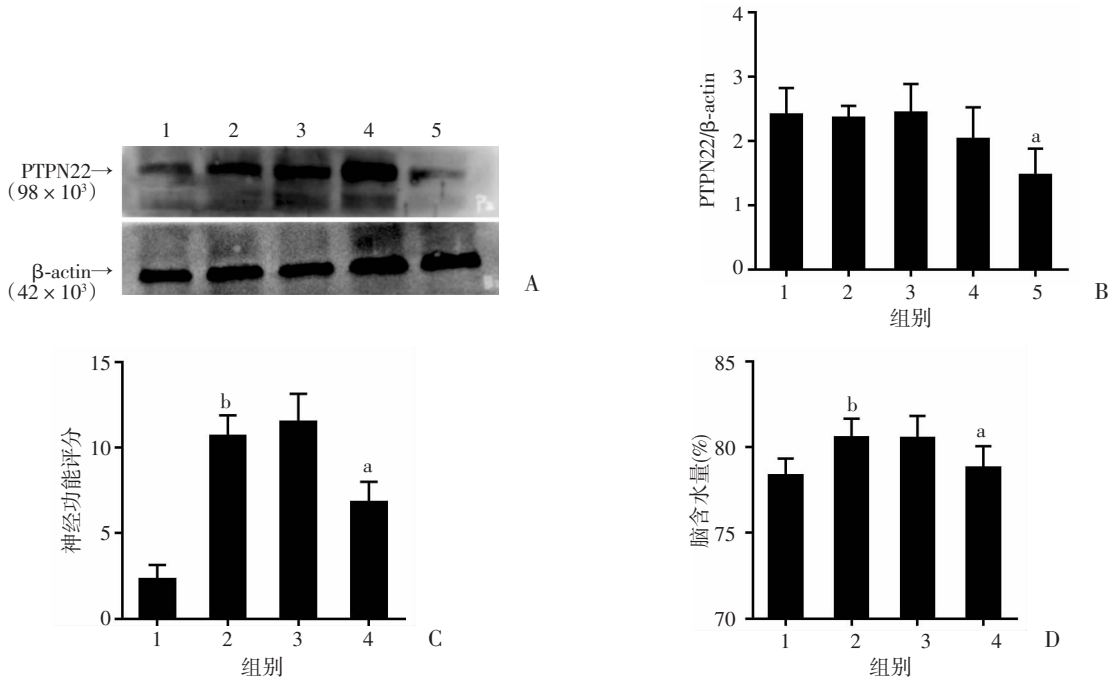
2.4 干扰 PTPN22 减轻了大鼠脑组织损伤

HE 染色结果可见 ICH 组和 ICH+NC 组脑组织大量核固缩,溶解,间质稀疏水肿和弥漫性空泡化,而 ICH+PTPN22siRNA 组呈现出核固缩的无序排列,脑组织损伤程度与 ICH+NC 组相比明显减轻,但相比 sham 加重。Nissl 染色可见 sham 组尼氏体完整,核呈深蓝色,ICH 组和 ICH+NC 组脑组织尼氏体减少、解体甚至消失,而 ICH+PTPN22siRNA 组尼氏体又重新出现、增多,与 ICH+NC 组相比脑组织损伤程度明显减轻(图 3)。



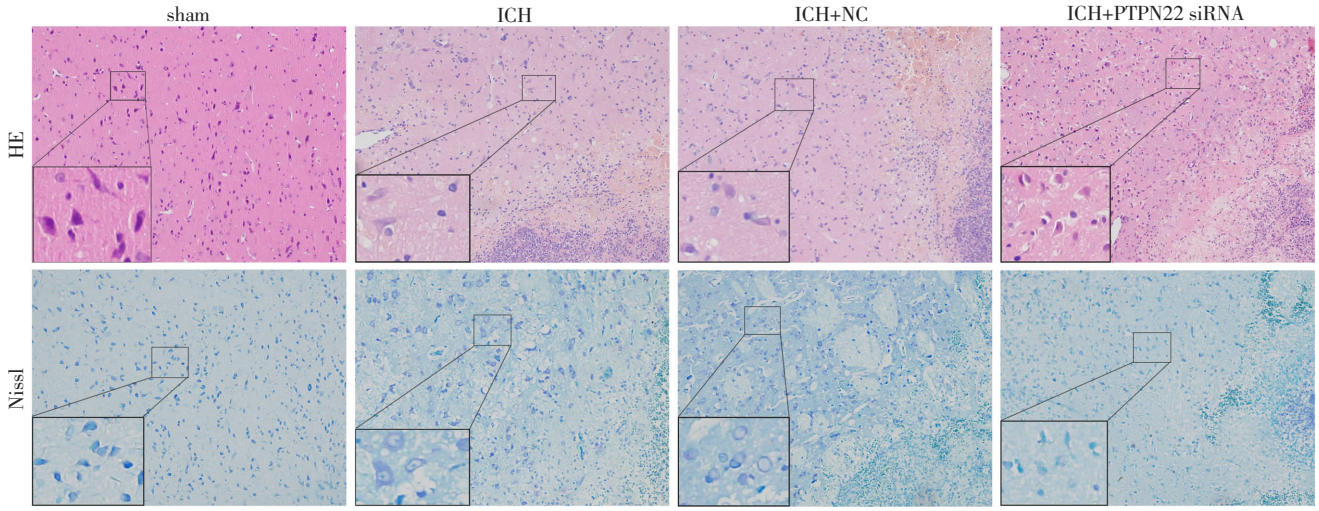
A:Western blot 检测 PTPN22 在大鼠脑出血后各时间点的表达情况; B:PTPN22 在大鼠脑出血后各时间点的半定量分析($n=3$, $\bar{x}\pm s$) a:$P<0.05$,与 sham 组相比

图 1 PTPN22 在脑出血后表达的时间窗



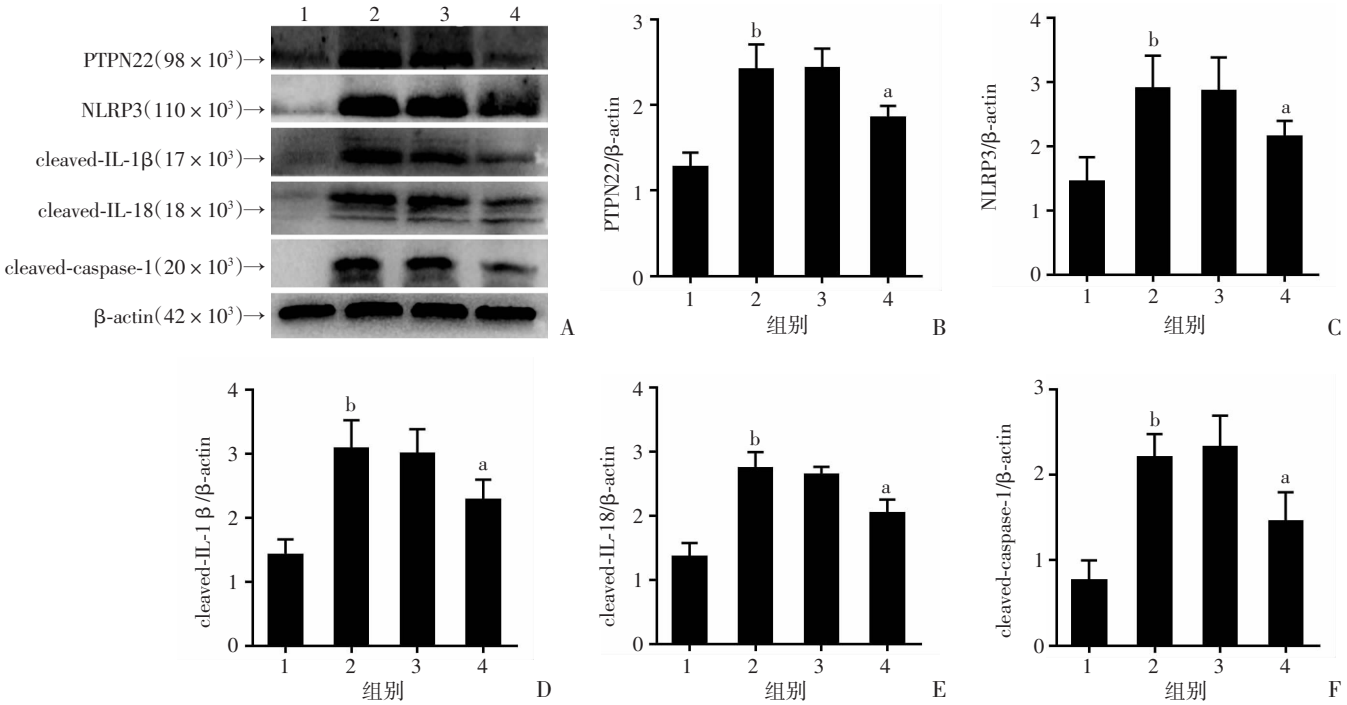
a:$P<0.05$,与 ICH+NC 组相比;b:$P<0.05$,与 sham 组相比 A:Western blot 筛选 PTPN22 的有效干扰 siRNA 1: ICH+NC; 2: siRNA-1883; 3: siRNA-1419; 4: siRNA-1185; 5: siRNA-494; B:PTPN22 的半定量分析 1: ICH+NC; 2: siRNA-1883; 3: siRNA-1419; 4: siRNA-1185; 5: siRNA-494; C:神经功能评分 1: sham; 2: ICH; 3: ICH+NC; 4: ICH+PTPN22 siRNA; D:脑含水量测定 1: sham; 2: ICH; 3: ICH+NC; 4: ICH+PTPN22 siRNA

图 2 筛选 PTPN22 有效片段以及各组大鼠脑出血后神经功能评分和脑含水量 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)



图中右下角为血肿区域,矩形方框内为组织局部区域,其放大图置于图片左下角

图 3 各组大鼠血肿周围脑组织 HE 和 Nissl 染色 (×200)



1:sham;2:ICH;3:ICH+NC;4:ICH+PTPN22siRNA;a:$P<0.05$,与 ICH+NC 组相比;b:$P<0.05$,与 sham 组相比;A:Western blot 检测血肿周围 PTPN22,NLRP3,cleaved-IL-1β,cleaved-IL-18 和 cleaved-caspase-1 的表达情况;B-F:PTPN22,NLRP3,cleaved-IL-1β,cleaved-IL-18 和 cleaved-caspase-1 的半定量分析

图 4 各组大鼠脑出血后血肿周围 NLRP3、cleaved-IL-1β、cleaved-IL-18 以及 cleaved-caspase-1 的表达 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

2.5 干扰 PTPN22 减少了大鼠脑出血后血肿周围 NLRP3、cleaved-IL-1β、cleaved-IL-18 以及 cleaved-caspase-1 的表达

用 Western blot 检测大鼠脑出血后血肿周围 NLRP3、cleaved-IL-1β、cleaved-IL-18 以及 cleaved-caspase-1 的表达,ICH 组 NLRP3、cleaved-IL-1β、cleaved-IL-18 以及 cleaved-caspase-1 的表达与 sham 组相比明显增高($P<0.05$),ICH+PTPN22siRNA 组 NLRP3、cleaved-IL-1β、cleaved-IL-18 以及 cleaved-caspase-1 的表达与 ICH+NC 组相比明显降低($P<0.05$),而 ICH 组与 ICH+NC 组相比无明显差异($P>0.05$,图 4)。

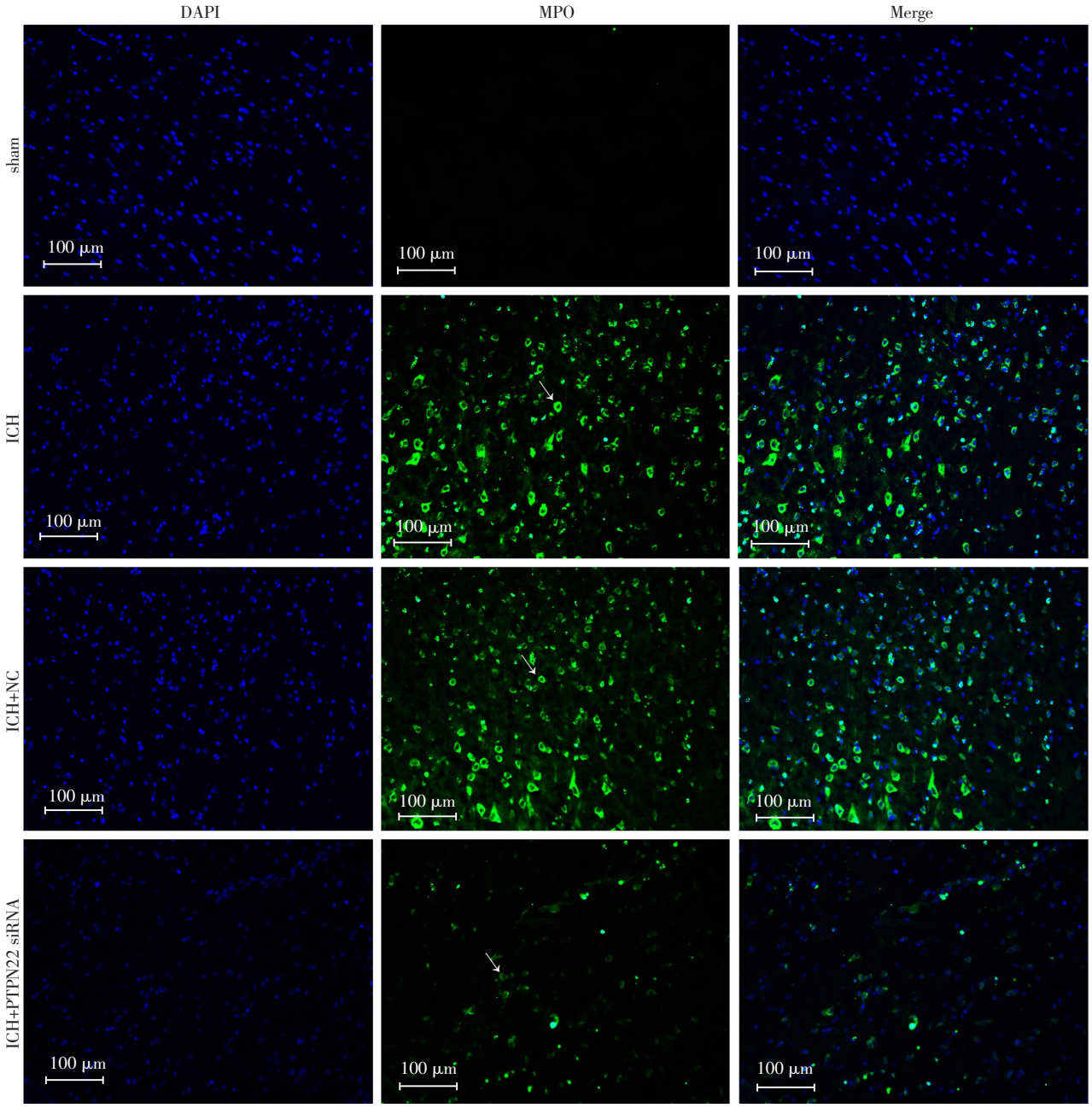
2.6 干扰 PTPN22 减少了大鼠脑出血后血肿周围的 MPO 的数量

与 sham 组相比 ICH 组血肿周围可见大量 MPO 细胞,ICH+PTPN22siRNA 组 MPO 细胞与 ICH+NC 组相比明显减少(图 5)。表明干扰 PTPN22 后减少了大鼠脑出血后血肿周围的 MPO 的数量。

3 讨论

继发性损伤是脑出血病理和治疗的关键因素之一,而炎症反应在脑出血后继发性损伤中起着重要的作用[1,15-16]。因此,脑出血后炎症反应已成为研究的热点,以及发展新型 ICH 治疗的目标[15]。

PTPN22(protein tyrosine phosphatase, nonreceptor type 22)是一种蛋白酪氨酸磷酸酶,参与细胞免疫反应及炎症,与多种自身免疫性疾病有关。PTPN22 参与自噬激活和 MDP 诱导信号传导和细胞因子分泌[17-18]。研究发现 PTPN22 的敲除可以导致对小鼠实验性关节炎以及 DSS 诱导的结肠炎的敏感性增加[19]。SPALINGER 等[4]的研究表明 PTPN22 缺乏导致结肠炎,增加 NLRP3 磷酸化,降低成熟的 IL-1β 水平。



↑:示 MPO 阳性细胞

图 5 各组大鼠脑出血后血肿周围 MPO 的表达情况

相反的,研究表明炎症性肠病(IBD)患者携带自身免疫相关 PTPN22 水平增加,促进 NLRP3 和成熟的 IL-1β 水平增加。目前对于 NLRP3 及 IL-1β 水平与结肠炎的关系尚存在争议,有文献[20]报道 NLRP3 缺乏可以减轻结肠炎,而有的文献表明 NLRP3 缺乏会导致上皮屏障功能不足而加重结肠炎[21]。但是,PTPN22 在炎性体活化和 IL-1β 分泌中的功能作用是一致的。SPALINGER 等提出一种新型的 NLRP3 炎性体激活机制,即 NLRP3 的 Tyr861 的磷酸化作用。研究发现 PTPN22 在促炎症损伤后与 NLRP3 相互作用并使其去磷酸化,从而允许 NLRP3 活化和 IL-1β 分泌。在 PTPN22 缺陷细胞和小鼠中,NLRP3 磷酸化增强,炎性体组装减少,导致 IL-1β 分泌减少[5]。然而,ICH 后脑组织中 PTPN22 的表达尚未见报道。在本实验中,我们用 si-RNA 小干扰片段减少 PTPN22 的表达,讨论了 PTPN22 在大鼠 ICH 后炎症反应中的作用,并研究其介导炎症性损伤的可能机制。我们的研究发现,与 ICH+NC 组相比,干扰 PTPN22 后可以改善大鼠神经功能评分,降低脑含水量,减轻脑组织损伤。但是干扰 PTPN22 减轻大鼠脑出血损伤的具体调控机制尚不明确。

NLRP3 炎症体是自然免疫应答中最具特征的模式识别受体(PRR),与 ICH 诱导的炎症密切相关并且产生促炎因子如 IL-1β,有研究表明 PTPN22 可以通过去磷酸化 NLRP3 的 Tyr861 激活 NLRP3[5],而 NLRP3 的激活可以募集 ASC 和 caspase-1 形成炎症体,导致一系列炎症因子的产生[8]。我们假设干扰 PTPN22 可以通过抑制 NLRP3 炎性体的激活,从而减轻大鼠脑出血后炎症反应。在本实验中,与 ICH+NC 组相比,ICH+PTPN22siRNA 组的 NLRP3 及其下游 cleaved-IL-1β,cleaved-IL-18,cleaved-caspase-1 的表达降低,免疫荧光检测血肿周围 MPO 的表达降低,说明干扰 PTPN22 后,减轻了脑出血后的炎症反应,这种作用是通过抑制 NLRP3 炎性体激活来实现的。本课题组下一步将进一步探索 PTPN22 是否通过去磷酸化 NLRP3 从而激活 NLRP3 炎性体,二者是否相互结合发挥调控作用,以及探究 PTPN22 的上游调控机制。

总之,我们的研究表明干扰 PTPN22 可以通过抑制 NLRP3 炎性体的激活,减少下游 IL-1β,IL-18 炎症因子的表达,从而减轻了大鼠脑出血后炎症反应,改善大鼠脑出血后神经功能障碍,减少脑水肿含量,减轻脑组织损伤。

参考文献:

[1] KEEP R F, HUA Y, XI G H. Intracerebral haemorrhage: mechanisms of injury and therapeutic targets[J]. Lancet Neurol, 2012, 11(8): 720-731. DOI: 10.1016/S1474-4422(12)70104-7.

[2] VILLANI A C, LEMIRE M, FORTIN G, *et al*. Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility[J]. Nat Genet, 2009, 41(1): 71-76. DOI: 10.1038/ng.285.

[3] LIU C M, SHI B Z, ZHOU J S. Effects of thrombin on the secondary cerebral injury ofperihematomal tissues of rats after intracerebral hemorrhage[J]. Genet Mol Res, 2014, 13(2): 4617-4626. DOI: 10.4238/2014.June.18.4.

[4] SPALINGER M R, LANG S, WEBER A, *et al*. Loss of protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 22 regulates interferon-γ-induced signaling in human monocytes[J]. Gastroenterology, 2013, 144(5): 978-988.e10. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.01.048.

[5] SPALINGER M R, KASPER S, GOTTIER C, *et al*. NLRP3 tyrosine phosphorylation is controlled by protein tyrosine phosphatase $PTPN_{22}$[J]. J Clin Invest, 2016, 126(11): 4388. DOI: 10.1172/JCI90897.

[6] MOHAMED I N, ISHRAT T, FAGAN S C, *et al*. Role of inflammasome activation in the pathophysiology of vascular diseases of the neurovascular unit[J]. Antioxid Redox Signal, 2015, 22(13): 1188-1206. DOI: 10.1089/ars.2014.6126.

[7] LIU H X, ZHAO L, YUE L, *et al*. Pterostilbene attenuates early brain injury following subarachnoid hemorrhage via inhibition of the NLRP3 inflammasome and Nox2-related oxidative stress[J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(8): 5928-5940. DOI: 10.1007/s12035-016-0108-8.

[8] REN H L, KONG Y, LIU Z J, *et al*. Selective NLRP3 (pyrin domain-containing protein 3) inflammasome inhibitor reduces brain injury after intracerebral hemorrhage[J]. Stroke, 2018, 49(1): 184-192. DOI: 10.1161/STROKEAHA.117.018904.

[9] ELLIOTT E I, SUTTERWALA F S. Initiation and perpetuation of NLRP3inflammasome activation and assembly[J]. Immunol Rev, 2015, 265(1): 35-52. DOI: 10.1111/imr.12286.

[10] HE Q, LI Z Y, WANG Y T, *et al*. Resveratrol alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting NLRP3 inflammasome activation through Sirt1-dependent autophagy induction[J]. Int Immunopharmacol, 2017, 50: 208-215. DOI: 10.1016/j.intimp.2017.06.029.

[11] WANG Y T, MENG CC, ZHANG J Y, *et al*. Inhibition of GSK-3β alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by suppressing NLRP3 inflammasome activation through autophagy[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 68: 234-241. DOI: 10.1016/j.intimp.2018.12.042.

[12] YU C, HE Q, ZHENG J, *et al*. Sulforaphane improves outcomes and slows cerebral ischemic/reperfusion injury via inhibition of NLRP3 inflammasome activation in rats[J]. Int Immunopharmacol, 2017, 45: 74-78. DOI: 10.1016/j.intimp.2017.01.034.

[13] LI Z Y, HE Q, ZHAI X, *et al*. Foxo1-mediated inflammatory response after cerebral hemorrhage in rats[J]. Neurosci Lett, 2016, 629: 131-136. DOI: 10.1016/j.neulet.2016.06.013.

[14] WILKINSON D A, PANDEY A S, THOMPSON B G, *et al*. Injury mechanisms in acute intracerebral hemorrhage[J]. Neuropharmacology, 2018, 134(Pt B): 240-248. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.09.033.

[15] WANG X, ARIMA H, YANG J, *et al*. Mannitol and outcome in intracerebral hemorrhage: propensity score and multivariable intensive blood pressure reduction in acute cerebral hemorrhage trial 2 results[J]. Stroke, 2015, 46(10): 2762-2767. DOI: 10.1161/STROKEAHA.115.009357.

[16] KURAMATSU J B, HUTTNER H B, SCHWAB S. Advances in the management ofintracerebral hemorrhage[J]. J Neural Transm (Vienna), 2013, 120(Suppl 1): S35-S41. DOI: 10.1007/s00702-013-1040-y.

[17] SPALINGER M R, LANG S, VAVRICKA S R, *et al*. Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 modulates NOD2-induced cytokine release and autophagy[J]. PLoS ONE, 2013, 8(8): e72384. DOI: 10.1371/journal.pone.0072384.

[18] SPALINGER M R, LANG S, GOTTIER C, *et al*. PTPN22 regulates NLRP3-mediated IL1B secretion in an autophagy-dependent manner[J]. Autophagy, 2017, 13(9): 1590-1601. DOI: 10.1080/15548627.2017.1341453.

[19] ZHANG J Y, ZAHIR N, JIANG Q H, *et al*. The autoimmune disease-associated PTPN22 variant promotes calpain-mediated Lyp/Pep degradation associated with lymphocyte and dendritic cell hyperresponsiveness[J]. Nat Genet, 2011, 43(9): 902-907. DOI: 10.1038/ng.904.

[20] BAUER C, DUEWELL P, MAYER C, *et al*. Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome[J]. Gut, 2010, 59(9): 1192-1199. DOI: 10.1136/gut.2009.197822.

[21] ZAKI M H, BOYD K L, VOGEL P, *et al*. The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis[J]. Immunity, 2010, 32(3): 379-391. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.03.003.

(收稿:2019-07-03;修回:2019-08-15)

(编辑 黄 超)