

高良姜素通过调控 NLRP3 炎性小体抑制巨噬细胞焦亡

沈灵芝¹ 李莉² 杨舟鑫³ 郭冬阳³ 陈昌勤³ 严静³

¹宁波市北仑区人民医院心内科,浙江宁波 315800; ²浙江省人民医院老年医学科,浙江杭州 310014;

³浙江医院重症医学科,浙江杭州 310013

通信作者:李莉, Email: lilihbc@163.com

【摘要】目的 探讨高良姜素对骨髓来源的巨噬细胞(BMDMs)焦亡的影响。**方法** 将体外培养的BMDMs分为空白对照组、模型组、不同浓度高良姜素组;采用脂多糖(LPS)+三磷酸腺苷(ATP)构建细胞焦亡模型。用细胞增殖与毒性检测试剂盒8(CCK-8)测定不同浓度高良姜素对BMDMs增殖的影响;采用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测BMDMs培养上清液中天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶1 p10亚基(caspase-1 p10)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)及细胞中NOD样受体蛋白3(NLRP3)的蛋白表达水平;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定BMDMs上清液中IL-1 β 含量;采用碘化丙啶(PI)染色观察细胞死亡情况;采用高通量测序比较模型组和高良姜素20 $\mu\text{mol/L}$ 组的差异基因表达。**结果** 5、10、20、40、60、80 $\mu\text{mol/L}$ 高良姜素组BMDMs的增殖水平比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),说明上述浓度高良姜素对BMDMs增殖无明显影响,故本研究选择5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 高良姜素和处理1、2、4h观察不同浓度及时间对BMDMs焦亡的影响。与空白对照组比较,模型组caspase-1 p10、成熟IL-1 β 蛋白表达和IL-1 β 含量均明显升高(均 $P<0.05$);与模型组比较,高良姜素5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 各组上清液中caspase-1 p10、成熟IL-1 β 蛋白表达和IL-1 β 含量均明显降低[IL-1 β 蛋白表达(灰度值): 0.155 ± 0.006 、 0.113 ± 0.006 、 0.111 ± 0.007 比 1.000 ± 0.000 , caspase-1 p10蛋白表达(灰度值): 0.207 ± 0.044 、 0.160 ± 0.008 、 0.082 ± 0.008 比 1.000 ± 0.000 , IL-1 β ($\mu\text{g/L}$): 99.80 ± 10.36 、 85.21 ± 8.78 、 26.53 ± 4.56 比 494.10 ± 35.47 ,均 $P<0.05$],不同浓度高良姜素组间比较差异无统计学意义(均 $P>0.05$),但随着高良姜素处理时间的延长,抑制作用增强,以高良姜素20 $\mu\text{mol/L}$ 组作用4h的抑制作用最明显[IL-1 β 蛋白表达(灰度值): 0.186 ± 0.004 比 1.000 ± 0.000 , caspase-1 p10蛋白表达(灰度值): 0.247 ± 0.009 比 1.000 ± 0.000 , IL-1 β ($\mu\text{g/L}$): 173.80 ± 10.56 比 653.80 ± 76.02 ,均 $P<0.05$];20 $\mu\text{mol/L}$ 高良姜素作用4h可减少焦亡细胞数量(个/视野): 23.00 ± 3.61 比 67.67 ± 15.63 , $P<0.05$],抑制NLRP3的蛋白表达水平(灰度值: 0.178 ± 0.025 比 0.406 ± 0.066 , $P<0.05$)。高通量测序显示,与模型组比较,高良姜素下调了Nlrp3、Nod2、IL-1 β 等基因,上调了Skp2(又称Fbx11)、Fbx120、Fbx14、Fbxo32和Fbxw7等基因水平。**结论** 高良姜素通过调控巨噬细胞中NLRP3炎性小体来抑制细胞焦亡。

【关键词】 高良姜素; 焦亡; 巨噬细胞

基金项目:浙江省中医药科技计划项目(2019ZB004)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2024.01.006

Galangin inhibits the pyroptosis of macrophages mediated by NOD-like receptor proteins 3

Shen Lingzhi¹, Li Li², Yang Zhouxin³, Guo Dongyang³, Chen Changqin³, Yan Jing³

¹Department of Cardiology, Ningbo Beilun People's Hospital, Ningbo 315800, Zhejiang, China; ²Department of Geriatrics, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, Zhejiang, China; ³Department of Critical Care Medicine, Zhejiang Hospital, Hangzhou 310013, Zhejiang, China

Corresponding author: Li Li, Email: lilihbc@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Galangin on pyroptosis of bone marrow derived macrophages (BMDMs). **Methods** BMDMs were cultured *in vitro* and divided into blank control group, model group and Galangin group with different concentrations. Lipopolysaccharide (LPS) and adenosine triphosphate (ATP) were used to construct the pyroptosis model. The effect of different concentrations of Galangin on the proliferation of BMDMs was detected by cell counting Kit-8 (CCK-8). The level of cysteinyl aspartate specific proteinase-1 p10 subunit (caspase-1 p10), interleukin-1 β (IL-1 β) in supernatant and intracellular nucleotide NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) were detected by Western blotting. IL-1 β in supernatant was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The cell death was observed by propidium iodide (PI) staining. High-throughput sequencing was used to compare the gene expression in the model group and Galangin groups at 20 $\mu\text{mol/L}$. **Results** There was no statistically significant difference between the 5, 10, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{mol/L}$ Galangin groups on the proliferation level of BMDMs (all $P > 0.05$), indicating that no significant effect of Galangin at 5, 10, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{mol/L}$ was observed on the proliferation of BMDMs. So we selected Galangin at 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ and treatment for 1, 2 and 4 hours as the effects of different concentrations and time on the pyroptosis of BMDMs. Compared with blank control group, the expression of caspase-1 p10 and mature IL-1 β protein and IL-1 β in supernatant in model group were significantly increased (all $P < 0.05$). Compared with model group, the expression of caspase-1 p10 and mature IL-1 β protein and IL-1 β in supernatant of Galangin at 5, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$

were significantly decreased [IL-1 β protein expression (gray value): 0.155 \pm 0.006, 0.113 \pm 0.006, 0.111 \pm 0.007 vs. 1.000 \pm 0.000, caspase-1 p10 protein expression (gray value): 0.207 \pm 0.044, 0.160 \pm 0.008, 0.082 \pm 0.008 vs. 1.000 \pm 0.000, IL-1 β (μ g/L): 99.80 \pm 10.36, 85.21 \pm 8.78, 26.53 \pm 4.56 vs. 494.10 \pm 35.47, all $P < 0.05$]. There was no significant difference between the different concentration groups (all $P > 0.05$), but with the extension of treatment time of Galangin, the inhibitory effect was enhanced. The inhibitory effect of Galangin at 20 μ mol/L for 4 hours was the most obvious [IL-1 β protein expression (gray value): 0.186 \pm 0.004 vs. 1.000 \pm 0.000, caspase-1 p10 protein expression (gray value): 0.247 \pm 0.009 vs. 1.000 \pm 0.000, IL-1 β (μ g/L): 173.80 \pm 10.56 vs. 653.80 \pm 76.02, all $P < 0.05$]. Treatment with 20 μ mol/L Galangin for 4 hours could reduce the number of pyroptotic cell deaths (number of view: 23.00 \pm 3.61 vs. 67.67 \pm 15.63, $P < 0.05$) and inhibited the expression of NLRP3 protein (gray value: 0.178 \pm 0.025 vs. 0.406 \pm 0.066, $P < 0.05$). High-throughput sequencing showed that, compared with the model group, Galangin down-regulated the genes of Nlrp3, Nod2, IL-1 β and up-regulated genes of Skp2 (also known as Fbx11), Fbx120, Fbx14, Fbxo32 and Fbxw7. **Conclusion** Galangin inhibited pyroptosis mediated by NLRP3 inflammasome in macrophages.

【Key words】 Galangin; Pyroptosis; Macrophage

Fund program: Zhejiang Provincial Traditional Chinese Medicine Science and Technology Planning Project (2019ZB004)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2024.01.006

焦亡是一种依赖天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspases, caspase-1、11、4、5)的程序性炎症细胞死亡方式,其特点是释放炎症细胞因子白细胞介素(interleukins, IL-1 β 、IL-18),从而在感染性疾病中发挥作用^[1-3]。多项研究表明,炎性小体的形成在焦亡的发病机制中非常重要^[4-5]。炎性小体是一种多聚体蛋白质复合物,由炎性小体启动传感器 NOD 样受体蛋白(NOD-like receptor proteins, NLRP 1、3、4 等)、炎性 caspase 及起衔接作用的凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain, ASC)组成。

根据 caspase 的不同,可将炎性小体分为 2 类,一类是经典的 caspase-1 依赖型炎性小体,另一种是非 caspase-1 依赖型炎性小体^[5-6]。经典的依赖型 caspase-1 炎性小体激活需要 2 个信号。如 NLRP3 炎性小体的激活首先需要第 1 个信号通过核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路诱导 NLRP3、ASC、IL-1 β 前体等炎性小体相关成分的表达。该信号是由模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)通过病原体相关分子模式(pathogen associated molecular pattern, PAMP)介导的。一旦这些蛋白得到充分表达,第 2 个信号如三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)就会触发 NLRP3 炎性小体的组装。NLRP3 通过 PYR 结构域与衔接蛋白 ASC 相互作用,触发 ASC 寡聚化,将 caspase-1 前体招募到 ASC 中,启动 caspase-1 前体的自我切割和活化,使其成为活性 caspase-1 p10 和 caspase-1 p20,激活的 caspase-1 切割促炎细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 前体使其成为成熟炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-18,并裂解细胞凋亡蛋白 Gasdermin D(GSDMD)使其

N-末端片段寡聚化并在宿主细胞膜上成孔,导致细胞肿胀、裂解、释放细胞质内容物,最终导致细胞凋亡。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)通常作为 PAMP 传递的第一信号,而细胞外 ATP 或尼日利亚素等损伤相关分子模式(damage associated molecular pattern, DAMP)可作为第二信号触发 NLRP3 炎性小体的激活^[7-9]。

高良姜素是一种存在于黄良姜中的黄酮醇类化合物,在炎症性疾病中有抗炎和抗氧化活性^[10-12]。高良姜素通过抑制 LPS 刺激的类风湿性关节炎成纤维细胞样滑膜细胞(rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes, RAFSC)中的 NF- κ B/NLRP3 通路用于治疗类风湿关节炎^[13]。此外,一项研究表明,从灯盏花中提取的黄酮类化合物黄芩素,可抑制 LPS+ATP 或 LPS+ 尼日利亚素诱导的巨噬细胞中 NLRP3 炎性小体的激活和焦亡^[14]。然而,高良姜素对巨噬细胞焦亡的影响及其机制尚未见报告。因此,本研究通过体外实验探讨高良姜素对 LPS+ATP 诱导巨噬细胞焦亡的影响及其可能机制,以期为临床研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂: 高良姜素、LPS(*Escherichia coli* O55:B5)和 ATP 均购自美国 Sigma 公司。DMEM 培养基、Opti-MEM 培养基和胎牛血清,购自美国 Gibco 公司。链霉素和青霉素购自吉诺生物医药技术有限公司。巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)购自美国 PeproTech 公司。细胞增殖与毒性检测试剂盒 8(cell counting Kit-8, CCK-8)购自上海七海复泰生物科技有限公司。IL-1 β 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked

immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂盒购自美国 Thermo 公司。碘化丙啶(propidium iodide, PI) 购自美国 BD 公司。细胞裂解缓冲液、苯甲磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP) 耦联的山羊抗小鼠免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 抗体和 HRP 耦联的山羊抗兔 IgG 抗体购自碧云天生物技术有限公司。caspase-1 p10 抗体和 NLRP3 抗体购自美国 AdipoGen 公司。IL-1 β 抗体和 GAPDH 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司。电化学发光法(electrochemiluminescence, ECL) 显影液购自美国 Milipore 公司。

1.2 细胞提取和模型复制: 选择 6~8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠, 体质量(18 \pm 2)g, 购自浙江省医学院实验动物中心, 动物合格证号: SCXK(浙)2019-0002, 动物实验已获浙江省医学科学院伦理委员会批准(审批号: ZJCLA-IACUC-20070011)。处死小鼠后用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS) 冲洗胫骨和股骨收集细胞, 在含 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素和 40 μ g/L M-CSF 的 DMEM 中培养 6 d, 得到骨髓来源的巨噬细胞(bone marrow derived macrophages, BMDMs)。将 BMDMs 以 8 \times 10⁵ 个/孔接种在 12 孔板上培养过夜, 次日早上将介质改为 opti-MEM。然后用 500 μ g/L LPS 刺激细胞 4 h, 洗去 LPS, 重新加入 opti-MEM, 再用 3 mmol/L ATP 刺激 45 min 构建细胞焦亡模型。

1.3 研究分组及处理: 为分析高良姜素最佳作用浓度及作用时间, 将细胞分为空白对照组、模型组、不同浓度高良姜素组, 先用 500 μ g/L LPS 刺激 BMDMs 4 h, 去上清液重新加入 Opti-MDM 培养基, 接着用不同浓度高良姜素(5、10、20 μ mol/L) 处理 1、2、4 h, 去上清液重新加入 Opti-MDM 培养基, 再加入 ATP 3 mmol/L 刺激 45 min。最终实验选取 20 μ mol/L 高良姜素处理 4 h 作为最佳作用浓度及时间。为进一步探讨高良姜素通过何种机制抑制焦亡, 且因经典焦亡途径启动需要 2 个信号, 因此实验增加了 LPS 组, 将细胞分为空白对照组、LPS 组、模型组、高良姜素组, 首先用 500 μ g/L LPS 刺激 BMDMs 4 h, 去上清液重新加 Opti-MDM 培养基, 再用 20 μ mol/L 高良姜素处理 4 h, 去上清液加入 Opti-MDM 培养基, 再加入 3 mmol/L ATP 刺激 45 min。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 细胞增殖试验: 将培养 6 d 的 BMDMs 均匀

接种于 96 孔板, 每孔加入 100 μ L 细胞悬液(含细胞 5 \times 10⁴ 个/孔), 待细胞贴壁后, 换新的 DMEM 完全培养基, 加入不同浓度(5、10、20、40、60、80 μ mol/L) 高良姜素培养 24 h, 然后更换新的 DMEM 培养基以排除药物本身颜色对吸光度(absorbance, A) 值的影响, 加 10 μ L CCK-8 培养 2 h, 在 450 nm 波长下读取 A 值为不同浓度高良姜素对 BMDMs 增殖的影响。

1.4.2 上清蛋白的超滤浓缩: 根据目的蛋白相对分子质量大小, 选择适合孔径的超滤管, 直接加入待纯化的上清蛋白, 反复离心, 直至大部分蛋白都停留在过滤管中。然后反复吹打滤膜, 将超滤浓缩后的目的蛋白吹打下来保存备用。

1.4.3 采用 ELISA 测定上清液中 IL-1 β 含量: 将细胞培养上清液在 4 $^{\circ}$ C 下离心 5 min, -80 $^{\circ}$ C 保存。然后按照说明书要求用 ELISA 试剂盒检测上清液中 IL-1 β 含量。

1.4.4 采用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting) 测定上清液中 caspase-1 p10、IL-1 β 及细胞中 NLRP3 的蛋白表达水平: 提取的蛋白质采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离, 转膜至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上, 将 PVDF 膜置于稀释好的一抗中, 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜, 然后用 HRP 标记的二抗孵育, 最后通过增强 ECL 曝光显影, 用 Image J 软件测定条带灰度值, 结果用相对灰度值表示。上清液中 caspase-1 p10、IL-1 β 蛋白表达水平以实验各组中目的蛋白灰度值与模型组目的蛋白灰度值的比值表示, 模型组目的蛋白的灰度值为 1。细胞中 NLRP3 蛋白表达水平以 NLRP3 灰度值与 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 灰度值的比值表示目的蛋白的蛋白表达水平。

1.4.5 细胞死亡数测定: 每孔加入 PI 10 μ L 在室温下染色 10 min 后, 荧光显微镜观察细胞死亡情况。

1.4.6 总 RNA 提取及测序: 采用 TRIzol 法分别提取模型组和高良姜素组 BMDMs 总 RNA 并逆转录为 cDNA。参考小鼠基因组信息或完整的转录组信息, 对基因或转录本进行注释和定量。比对至基因组后, 利用 String Tie (2016) 软件对表达进行注释和定量。最后应用网络流算法和可选的 Denovo 软件组装, 将数据集组装成转录本, 进一步计算基因和转录本的每百万外显子片段碱基映射获得的基因表达(fragments per kilobase of exon model per million

mapped fragments, FPKM) 值。

1.4.7 差异基因分析: 为研究模型组和高良姜素组样本的差异,以差异基因为研究对象,用 DESeq2 软件对两组样本进行分析,获得差异基因的显著性 *P* 值和基因间的差异倍数;差异基因的筛选条件为校正的 *P* 值 < 0.05 及差异倍数 > 2 倍和 < 0.5 倍。

1.5 统计学分析: 使用 GraphPad 5.0 统计软件分析数据,符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 及 Bonferroni 检验行两两比较,两组间比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度高良姜素对 BMDMs 细胞增殖的影响(表 1): 与空白对照组比较,不同浓度高良姜素组 BMDMs 增殖情况比较差异均无统计学意义 ($F = 2.44$, 均 $P > 0.05$),说明上述浓度高良姜素对 BMDMs 细胞增殖无影响。

组别	样本数 (孔)	BMDMs 细胞增殖 (A 值)
空白对照组	6	0.611 ± 0.107
高良姜素 5 μmol/L 组	6	0.607 ± 0.042
高良姜素 10 μmol/L 组	6	0.670 ± 0.071
高良姜素 20 μmol/L 组	6	0.649 ± 0.111
高良姜素 40 μmol/L 组	6	0.756 ± 0.088
高良姜素 60 μmol/L 组	6	0.675 ± 0.076
高良姜素 80 μmol/L 组	6	0.565 ± 0.020
<i>F</i> 值		2.44
<i>P</i> 值		> 0.05

2.2 不同浓度高良姜素对 caspase-1 p10 和 IL-1 β 水平的影响(图 1; 表 2): Western blotting 结果显示,与空白对照组比较,模型组 BMDMs 培养上清液中成熟 IL-1 β、caspase-1 p10 水平明显升高 (均 $P < 0.05$);与模型组比较,不同浓度高良姜素组 (5、10、20 μmol/L) BMDMs 培养上清液中 IL-1 β、caspase-1 p10 蛋白表达水平均明显降低 (均 $P < 0.05$),且不同浓度高良姜素组比较差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。ELISA 检测结果显示,与模型组比较,不同浓度高良姜素组 IL-1 β 水平明显降低 (均 $P < 0.05$),这与 Western blotting 检测结果一致,且不同浓度高良姜素组两两比较差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$),说明高良姜素可以抑制 LPS+ATP 诱导的巨噬细胞焦亡模型中 caspase-1 p10 和 IL-1 β 的水平,且无浓度依赖性。

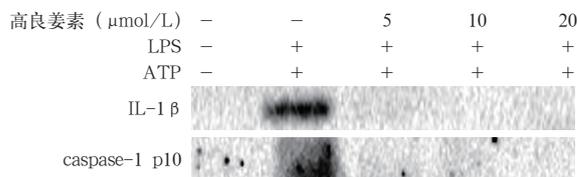


图 1 Western blotting 检测各组 BMDMs 上清液中 IL-1 β、caspase-1 p10 的蛋白表达水平

表 2 各组 BMDMs 培养上清液中 IL-1 β、caspase-1 p10 蛋白表达水平及 IL-1 β 含量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	IL-1 β 蛋白表达 (灰度值)	caspase-1 p10 蛋白表达 (灰度值)	IL-1 β 含量 (μg/L)
空白对照组	3	0.133 ± 0.011	0.077 ± 0.003	2.53 ± 0.814
模型组	3	1.000 ± 0.000 ^a	1.000 ± 0.000 ^a	494.10 ± 35.47 ^a
低浓度高良姜素组	3	0.155 ± 0.006 ^b	0.207 ± 0.044 ^b	99.80 ± 10.36 ^b
中浓度高良姜素组	3	0.113 ± 0.006 ^b	0.160 ± 0.008 ^b	85.21 ± 8.78 ^b
高浓度高良姜素组	3	0.111 ± 0.007 ^b	0.082 ± 0.008 ^b	26.53 ± 4.56 ^b
<i>F</i> 值		8 660.00	1 131.00	416.20
<i>P</i> 值		< 0.01	< 0.01	< 0.01

注:与空白对照组比较,^a*P* < 0.01;与模型组比较,^b*P* < 0.01

2.3 高良姜素作用不同时间对 caspase-1 p10 和 IL-1 β 水平的影响(图 2; 表 3): Western blotting 检测结果显示,与空白对照组比较,模型组 BMDMs 培养上清液中 IL-1 β、caspase-1 p10 的蛋白表达水平均明显升高 (均 $P < 0.05$);而与模型组比较,高良姜素作用 1、2、4 h BMDMs 培养上清液中成熟 IL-1 β、caspase-1 p10 的蛋白表达水平均明显降低 (均 $P < 0.05$),且随着高良姜素作用时间的延长抑制作用明显增强,于作用 4 h 时的抑制作用最明显。ELISA 检测成熟 IL-1 β 水平变化趋势与 Western blotting 分析结果一致,即与模型组比较,高良姜素作用 1、2、4 h 时 BMDMs 培养上清液中成熟 IL-1 β 含量均明显降低 (均 $P < 0.05$),且随着高良姜素作用时间的延长抑制作用加强,于 4 h 时抑制作用最明显,表明高良姜素可抑制 LPS+ATP 诱导的巨噬细胞焦亡模型中 caspase-1 p10 和 IL-1 β 水平,且有时间依赖性。

2.4 高良姜素对 LPS+ATP 刺激巨噬细胞焦亡模型中细胞死亡数的影响(图 3; 表 4): 与对空白对照组比较,模型组细胞死亡数明显增多 ($P < 0.05$);而与模型组比较,高良姜素 20 μmol/L 组细胞死亡数明显减少 ($P < 0.05$)。

2.5 高良姜素对巨噬细胞焦亡模型中 NLRP3 蛋白表达水平的影响(图 4; 表 5): Western blotting 检测结果显示,模型组 NLRP3 蛋白表达水平较空白对照组明显升高 ($P < 0.05$);高良姜素 20 μmol/L 组 NLRP3 蛋白表达水平而较模型组明显降低 ($P < 0.05$)。

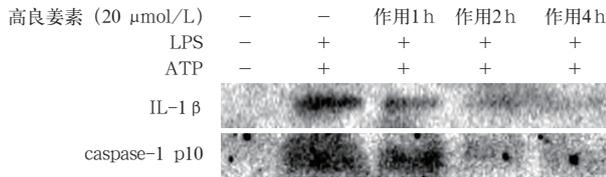
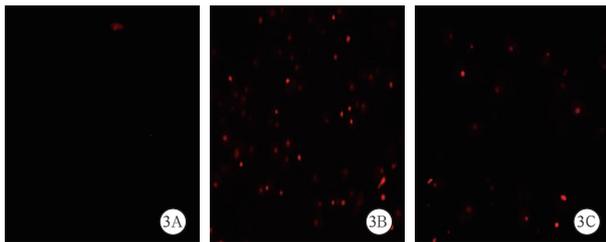


图2 Western blotting 检测高良姜素作用不同时间 BMDMs 培养上清液中 IL-1β、caspase-1 p10 的蛋白表达水平

表3 各组 BMDMs 培养上清液中 IL-1β、caspase-1 p10 蛋白表达水平和 IL-1β 含量的比较 (x̄ ± s)

组别	样本数 (孔)	IL-1β 蛋白表达 (灰度值)	caspase-1 p10 蛋白表达 (灰度值)	IL-1β (μg/L)
空白对照组	3	0.136 ± 0.006	0.197 ± 0.010	27.02 ± 1.245
模型组	3	1.000 ± 0.000 ^a	1.000 ± 0.000 ^a	653.80 ± 76.02 ^a
高良姜素 20 μmol/L 组				
作用 1 h	3	0.463 ± 0.053 ^b	0.610 ± 0.020 ^b	417.50 ± 20.93 ^b
作用 2 h	3	0.352 ± 0.010 ^b	0.369 ± 0.012 ^b	256.40 ± 1.025 ^b
作用 4 h	3	0.186 ± 0.004 ^b	0.247 ± 0.009 ^b	173.80 ± 10.56 ^b
F 值		596.90	2 226.00	91.26
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

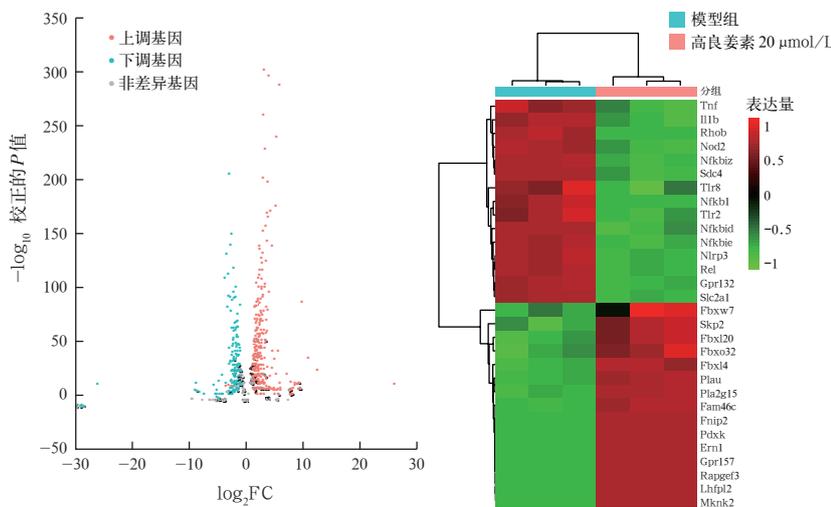
注：与空白对照组比较，^aP<0.01；与模型组比较，^bP<0.05



注：A 为空白对照组，B 为模型组，C 为高良姜素 20 μmol/L 组

图3 各组细胞死亡情况比较 PI 染色 中倍放大

2.6 RNA 测序分析(图5)：模型组和高良姜素 20 μmol/L 组基因差异较大，且相对应的转录本表达差异亦较大。红色代表差异基因表达值高，绿色代表



注：右图中红色为上调，绿色为下调

图5 RNA 聚类分析鉴定高良姜素 20 μmol/L 组和模型组的差异表达基因测序火山图(左)和 RNA 聚类分析图(右)

表4 3 组 BMDMs 中死亡细胞数量的比较 (x̄ ± s)

组别	样本数(孔)	死亡细胞数(个/视野)
空白对照组	3	3.33 ± 1.53
模型组	3	67.67 ± 15.63 ^a
高良姜素 20 μmol/L 组	3	23.00 ± 3.61 ^b
F 值		37.67
P 值		<0.01

注：与空白对照组比较，^aP<0.01；与模型组比较，^bP<0.01

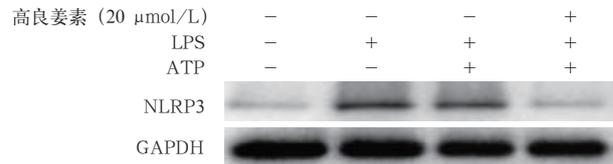


图4 Western blotting 检测 BMDMs 细胞中 NLRP3 蛋白表达水平

表5 4 组 BMDMs 中 NLRP3 蛋白表达水平的比较 (x̄ ± s)

组别	样本数(孔)	NLRP3 蛋白表达 (灰度值)
空白对照组	3	0.140 ± 0.019
LPS 组	3	0.403 ± 0.004
模型组	3	0.406 ± 0.066 ^a
高良姜素 20 μmol/L 组	3	0.178 ± 0.025 ^b
F 值		45.75
P 值		<0.01

注：与空白对照组比较，^aP<0.01；与模型组比较，^bP<0.01

表差异基因表达值低。mRNA 测序鉴定出差异表达基因中上调基因 1 277 个，下调基因 633 个。其中下调基因包括 Nlrp3、Nfkbiz、Nod2、Nfkbie、Il1β、Tnf、Nfkb1、Tlr2、Nfkbid 和 Tlr8 等，上调基因包括 Skp2 (又称 Fbxl1)、Fbxl20、Fbxl4、Fbxo32 和 Fbxw7 等。

3 讨论

高良姜素已被证明对 LPS 刺激巨噬细胞具有有效的抗炎活性^[12, 15-17]。但高良姜素对巨噬细胞焦亡的影响目前尚未明确。焦亡是一种炎症性程序性细胞死亡方式，炎性小体在其中扮演重要角色^[18-19]。炎性小体的激活为 caspase-1 的激活提供了一个平台，活化的 caspase-1 驱动 GSDMD 裂解生成 N- 端片段，并裂解促炎细胞因子前体 IL-1β 和 IL-18 生成成熟细胞因子 IL-1β 和 IL-18^[20-22]。本研究显示，高良姜素抑制了 LPS+ATP 诱导的巨噬细胞中 caspase-1 的激活和成熟 IL-1β 的分泌；PI 染色观察到死亡细胞，高良姜素可明显减少焦亡细胞数量。

NLRP3 炎性小体的活化通常需要 2 个信号。第 1 个信号是 NLRP3

的启动。这一启动过程需要 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR)、NOD 样受体的参与,通过启动 NF- κ B 信号通路,从而增加焦亡相关蛋白的表达^[23]。本研究结果表明,高良姜素可降低 NLRP3 蛋白水平, RNA 测序聚类分析结果也验证了高良姜素可下调 Nlrp3、IL-1 β 、Tlr2、Nod2 等基因。第 2 个信号是导致 NLRP3 炎性小体的激活。常见的活化剂包括 ATP 和尼日利亚素。研究表明, NLRP3 炎性小体的去泛素化是其组装和激活所必需的,而泛素化可有效抑制 NLRP3 炎性小体的激活^[24]。泛素化是诱导底物降解的过程。F-box 蛋白参与泛素化过程,其可被分为 3 个亚家族:富含亮氨酸氨基酸重复序列的 F-box (FBXL)、含 WD 40 氨基酸重复序列的 F-box (FBXW) 和仅含不典型结构域的 F-box (FBXO),它们通过 Wnt、磷脂酰肌醇 3 激酶/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase/serine-threonine protein kinase, AKT/PI3K)、p53、核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2)、磷酸腺苷依赖性蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (adenylate-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin, AMPK/mTOR)、NF- κ B、Hippo 和叉头框蛋白 O (forkhead box transcription factor O, FOXO) 等多种信号通路表现出泛素化能力^[25]。有研究显示, FBXL2 是一种内源性介质,可降解 NLRP3,它通过识别 NLRP3 并靶向 NLRP3 中的 lys-689 进行泛素化和降解,从而减少 IL-1 β 和 IL-18 的释放^[26]。本研究显示,高良姜素在 LPS+ATP 诱导的焦亡中上调了 F-box 蛋白如 Skp2 (又称 Fbxl1)、Fbxl20、Fbxl4、Fbxo32 和 Fbxw7 等基因。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- Man SM, Karki R, Kanneganti TD. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases [J]. *Immunol Rev*, 2017, 277 (1): 61-75. DOI: 10.1111/immr.12534.
- Jorgensen I, Miao EA. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens [J]. *Immunol Rev*, 2015, 265 (1): 130-142. DOI: 10.1111/immr.12287.
- 曾培歌,林志鸿.细胞焦亡及其对脓毒症影响的研究进展[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2021, 28 (4): 496-500. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2021.04.027.
- Guo HT, Callaway JB, Ting JPY. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics [J]. *Nat Med*, 2015, 21 (7): 677-687. DOI: 10.1038/nm.3893.
- 王雷,张利鹏.细胞焦亡在急性呼吸窘迫综合征中的研究进展[J]. *中华危重病急救医学*, 2021, 33 (2): 249-251. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200212-00179.
- Mathur A, Hayward JA, Man SM. Molecular mechanisms of inflammasome signaling [J]. *J Leukoc Biol*, 2018, 103 (2): 233-257. DOI: 10.1189/jlb.3MR0617-250R.
- Vanaja SK, Rathinam VAK, Fitzgerald KA. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights [J]. *Trends Cell Biol*, 2015, 25 (5): 308-315. DOI: 10.1016/j.tcb.2014.12.009.
- Sutterwala FS, Haasken S, Cassel SL. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2014, 1319 (1): 82-95. DOI: 10.1111/nyas.12458.
- Kovacs SB, Miao EA. Gasdermins: effectors of pyroptosis [J]. *Trends Cell Biol*, 2017, 27 (9): 673-684. DOI: 10.1016/j.tcb.2017.05.005.
- Tomar A, Vasisth S, Khan SI, et al. Galangin ameliorates cisplatin induced nephrotoxicity *in vivo* by modulation of oxidative stress, apoptosis and inflammation through interplay of MAPK signaling cascade [J]. *Phytomedicine*, 2017, 34: 154-161. DOI: 10.1016/j.phymed.2017.05.007.
- Huang YC, Tsai MS, Hsieh PC, et al. Galangin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by attenuating oxidative stress, inflammation and cell death in mice through inhibition of ERK and NF- κ B signaling [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2017, 329: 128-139. DOI: 10.1016/j.taap.2017.05.034.
- Lee HN, Shin SA, Choo GS, et al. Anti-inflammatory effect of quercetin and galangin in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages and DNCB-induced atopic dermatitis animal models [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41 (2): 888-898. DOI: 10.3892/ijmm.2017.3296.
- Fu Q, Gao YZ, Zhao H, et al. Galangin protects human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes via suppression of the NF- κ B/NLRP3 pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18 (4): 3619-3624. DOI: 10.3892/mmr.2018.9422.
- Liu Y, Jing YY, Zeng CY, et al. Scutellarin suppresses NLRP3 inflammasome activation in macrophages and protects mice against bacterial sepsis [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 8: 975. DOI: 10.3389/fphar.2017.00975.
- Choi MJ, Lee EJ, Park JS, et al. Anti-inflammatory mechanism of galangin in lipopolysaccharide-stimulated microglia: critical role of PPAR- γ signaling pathway [J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 144: 120-131. DOI: 10.1016/j.bcp.2017.07.021.
- Kim ME, Park PR, Na JY, et al. Anti-neuroinflammatory effects of galangin in LPS-stimulated BV-2 microglia through regulation of IL-1 β production and the NF- κ B signaling pathways [J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 451 (1-2): 145-153. DOI: 10.1007/s11010-018-3401-1.
- Blonska M, Czuba ZP, Krol W. Effect of flavone derivatives on interleukin-1beta (IL-1beta) mRNA expression and IL-1 beta protein synthesis in stimulated RAW 264.7 macrophages [J]. *Scand J Immunol*, 2003, 57 (2): 162-166. DOI: 10.1046/j.1365-3083.2003.01213.x.
- 杨茂宪,田海涛,沈鹏,等.姜黄素可通过减轻线粒体氧化应激改善 NF- κ B/NLRP3 介导的 ARDS 肾损伤 [J]. *中华危重病急救医学*, 2023, 35 (4): 393-397. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20230414-00667.
- 金灿,张伟. HSF1 通过调控 NLRP3 炎症小体活化在脓毒症大鼠急性肺损伤中的保护作用 [J]. *中华危重病急救医学*, 2022, 34 (11): 1167-1172. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210930-01417.
- Liu X, Zhang ZB, Ruan JB, et al. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores [J]. *Nature*, 2016, 535 (7610): 153-158. DOI: 10.1038/nature18629.
- 龚健,秦凡博,苗春木,等.脓毒症中细胞焦亡的分子机制及研究进展 [J]. *国际外科学杂志*, 2019, 46 (3): 203-207. DOI: 10.3760/cam.j.issn.1673-4203.2019.03.015.
- 陈丽香,李顺,周晓辉.程序性细胞坏死及细胞焦亡信号通路研究进展概述 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2020, 40 (3): 231-237. DOI: 10.3760/cma.j.cn112309-20190605-00176.
- Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, et al. Cutting edge: NF- κ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression [J]. *J Immunol*, 2009, 183 (2): 787-791. DOI: 10.4049/jimmunol.0901363.
- Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Kang S, et al. Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287 (43): 36617-36622. DOI: 10.1074/jbc.M112.407130.
- Tekeham DS, Chen D, Liu Y, et al. F-box proteins and cancer: an update from functional and regulatory mechanism to therapeutic clinical prospects [J]. *Theranostics*, 2020, 10 (9): 4150-4167. DOI: 10.7150/thno.42735.
- Han S, Lear TB, Jerome JA, et al. Lipopolysaccharide primes the NALP3 inflammasome by inhibiting its ubiquitination and degradation mediated by the SCFFBXL2 E3 ligase [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290 (29): 18124-18133. DOI: 10.1074/jbc.M115.645549.

(收稿日期: 2023-03-10)

(责任编辑: 邸美仙)