

桑黄酮抑制 NLRP3 炎症小体活化并缓解感染性休克的作用研究

刘迪迪^{1,2}, 陆莉^{1,2}, 杨燕青¹, 王凤超¹

[摘要] **目的:**探究桑枝提取物桑黄酮对 NLRP3 炎症小体活化的影响,为相关炎性疾病的治疗提供新思路。**方法:**在细胞水平上,使用 Western blotting 和 ELISA 方法,检测小鼠骨髓来源的巨噬细胞(BMDM)和人 THP-1 细胞在尼日利亚菌素、单钠尿酸盐和腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)3种刺激剂诱导下的半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)和白细胞介素(IL)-1 β 表达水平。在动物实验中,构建脂多糖(LPS)诱导的感染性休克模型,将实验小鼠分为安慰剂组、感染性休克组和桑黄酮干预组,利用 ELISA 检测小鼠腹腔灌洗液及血清中 IL-1 β 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平。**结果:**在 BMDM 和 THP-1 细胞中,桑黄酮可以抑制尼日利亚菌素、单钠尿酸盐和 ATP 这 3 种炎症小体激动剂诱导的 Caspase-1 和 IL-1 β 的加工和成熟($P < 0.01$),而对非炎症小体相关的细胞因子 TNF- α 的分泌无影响($P > 0.05$)。在动物实验中,发现桑黄酮可以缓解 LPS 诱导的小鼠感染性休克($P < 0.01$),明显抑制 LPS 诱导的小鼠血清及腹腔液中 IL-1 β 的表达($P < 0.01$),延长 LPS 造模后小鼠的存活时间($P < 0.01$)。**结论:**桑黄酮作为一种中草药活性成分提取物,可以在体外和体内抑制 NLRP3 炎症小体的活化,为 NLRP3 相关疾病的治疗提供了实验依据。

[关键词] 桑黄酮;NLRP3 炎症小体;炎症小体相关疾病

[中图分类号] R 285

[文献标志码] A

DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2023.01.014

Effect of mulberrin on inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome and relieving infectious shock

LIU Di-di^{1,2}, LU Li^{1,2}, YANG Yan-qing¹, WANG Feng-chao¹

(1. Department of Laboratory, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004; 2. Anhui Province

Key Laboratory of Immunology in Chronic Diseases, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of mulberrin, a Chinese herbal extract, on NLRP3 inflammasome activation, and provide new insight for NLRP3-related disease. **Methods:** Western blotting and ELISA were used to detect the expression level of caspase-1 and interleukin-1 β of mouse bone marrow derived macrophages (BMDM) and human THP-1 cells induced by three agonists: Nigerian bacteriocin, monosodium urate and adenosine triphosphate (ATP). Mouse septic shock model induced by lipopolysaccharide (LPS) was constructed, and experimental mice were divided into placebo group, septic shock group and mulberrin treatment group. The levels of IL-1 β and TNF- α in intraperitoneal lavage fluid and serum were detected by ELISA. **Results:** *In vitro* experiments, we found that the processing and maturation of caspase-1 and IL-1 β induced by three classic inflammasome agonists (Nigericin, MSU and ATP) were inhibited by mulberrin in BMDM and THP-1 cells ($P < 0.01$). However, there was no obviously difference observed on the secretion of non-inflammasome-related cytokines, such as TNF- α ($P > 0.05$). *In vivo* experiments, mulberrin treatment alleviated septic shock, significantly inhibited IL-1 β expression in serum and intraperitoneal lavage fluid of mice, and prolonged the survival time of LPS-induced mice ($P < 0.01$). **Conclusions:** As an active ingredient of Chinese herb extract, mulberrin can inhibit the NLRP3 inflammasome activation *in vitro* and *in vivo*. Our study provide experimental evidences for the treatment of NLRP3-related diseases.

[Key words] mulberrin; NLRP3 inflammasome; inflammasome-related diseases

NLRP3 炎症小体是一个多聚蛋白复合物,由 NLRP3、ASC 和 Pro-caspase-1 蛋白组成,可识别病原微生物和多种危险信号^[1-2]。其活化后介导炎性细

胞因子,如白细胞介素(IL)-1 β 、IL-18 的成熟与分泌,在抗感染免疫和多种人类炎性疾病,如痛风、2 型糖尿病、阿尔茨海默病等中发挥重要作用^[3-4]。目前,NLRP3 炎症小体相关炎性疾病的治疗策略主要针对 NLRP3 炎症小体活化后的产物如 IL-1 β ,但此方法无法治疗 NLRP3 炎症小体活化后 IL-18 分泌和细胞焦亡导致的疾病,且易影响细胞其他生理功能,存在较多弊端^[5]。靶向抑制 NLRP3 炎症小体活化成为治疗相关炎性疾病的新策略,多种 NLRP3 炎症小体抑制剂表现出良好效果^[6-9],但还难以应用于临床。桑黄酮是具有抗炎抗氧化中草药

[收稿日期] 2021-09-09 [修回日期] 2022-07-24

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82071775)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院第一附属医院 检验科,安徽 蚌埠 233004; 2. 蚌埠医学院 慢性病学免疫学基础与临床安徽省重点实验室,安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 刘迪迪(1997-),女,硕士研究生。

[通信作者] 王凤超,硕士研究生导师,主任技师,副教授。E-mail: 13855215344@139.com

桑枝中的主要活性成分,已被证实在神经炎症上有明显抑制作用^[10-11],但其能否抑制 NLRP3 炎症小体活化并缓解相关炎症性疾病有待证明。本文旨在探究桑黄酮对 NLRP3 炎症小体活化及其相关炎症性疾病的作用。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞系 SPF 级 C57BL/6 (B6) 雄性小鼠购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司。造模时体质量 22~24 g,鼠龄 7~10 周,在无特定病原体 (SPF) 条件下饲养。人急性单核细胞白血病 THP-1 细胞系,受赠于蚌埠医学院汪洪涛教授课题组。本研究经蚌埠医学院伦理委员会审核批准(审批号:伦动科批字[2020]第 057 号)。

1.2 药品及主要试剂 桑黄酮 (Mul, 上海陶素生化公司,货号:TQ0161)、巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) (中国 novoprotein 公司,货号:CB34)、PMA (SIGMA 公司,货号:79346)、脂多糖 (LPS) (Invivogen 公司,货号:tlrl-eklps)、尼日利亚菌素 (Nigericin, SIGMA 公司,货号:N7143)、腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP) (SIGMA 公司,货号:A2383)、红细胞裂解液 (碧云天公司,货号:C3702)、PBS (Servicebio 公司,货号:G0002)、DMEM 细胞培养基 (Gibco 公司,货号:C11965500BT)、RPMI 1640 培养基 (Gibco 公司,货号:C11875500BT)、ELISA 试剂盒[小鼠 IL-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子 (TNF- α)、人 IL-1 β ELISA kit, 购自 R&D 公司]、Western blotting 抗体[抗小鼠 Caspase-1 (p20), 购自 AdipoGen 公司; 抗人 Caspase-1 (p20), 购自 CST 公司; β -actin 抗体, 为 Abmart 公司产品; 山羊抗兔 IgG 和山羊抗小鼠 IgG, 购自 Jackson IR 公司]。

1.3 仪器 Thermo3543 CO₂ 培养箱 (美国 ThermoFisher); Western blotting 电泳转膜槽 (美国 BIO-RAD); ChemiDoc XRS + 化学发光凝胶成像仪 (美国 BIO-RAD); SCI100MiniH 恒温金属浴 (中国 SCIOGEX); CH20 BIMF200 倒置显微成像仪 (日本 OLYMPUS); MultiskanSky 多功能酶标仪 (美国 ThermoFisher); 5810R 大容量低温离心机 (德国 eppendorf); D3024R 控温离心机 (中国 SCIOGEX)。

1.4 方法

1.4.1 药物及试剂的配制 桑黄酮 25 mg, 溶于 DMSO, 配制为 50 mmol/L 贮存液, 分装冻存于 -80 °C 冰箱, 动物实验时用 PBS 稀释桑黄酮贮存液, 按照 25 mg/kg 体质量的剂量, 每只鼠腹腔注射 0.2 mL。单钠尿酸盐 (MSU) 制备: 每 1.68 g 粉末溶

于 500 mL 的 0.01 mol/L NaOH 溶液中, 加热至 70 °C 溶解, 0.22 μ m 滤器过滤后室温下使 MSU 晶体重新析出。再用无水乙醇洗晶体并高压灭菌后烘干, 无菌 PBS 重悬晶体至 50 μ g/ μ L, 并用超声仪震荡过夜, 显微镜下观察 MSU 晶体大小并确认其可以进入细胞, 分装冻存于 -20 °C 冰箱。LPS: 溶于无菌 PBS, 配置为 5 mg/mL 贮存液, 分装冻存于 -80 °C 冰箱, 动物实验时用 PBS 稀释, 按照 20 mg/kg 体质量的剂量, 每只鼠腹腔注射 0.3 mL。

1.4.2 细胞刺激前分化 麻醉下处死小鼠取小鼠后腿, 无菌分离腿骨骨髓细胞。加入 M-CSF (50 ng/mL), 37 °C 细胞培养箱分化 5~7 d。培养皿内贴壁细胞即为实验所需骨髓来源巨噬细胞 (BMDM)。人 THP-1 细胞, 加入 PMA (400 ng/mL) 培养过夜, 使得原始 THP-1 细胞分化为可实验用巨噬细胞。

1.4.3 NLRP3 炎症小体刺激 已分化的 BMDM 或 THP-1 细胞, 转入细胞培养板中, 37 °C 培养箱培养过夜。加入 LPS (100 ng/mL) 预刺激 3 h, 加入桑黄酮 30 min 后, 分别加入不同的 NLRP3 炎症小体激动剂刺激相应时间 (Nigericin、ATP 刺激约 30 min, MSU 刺激约 3 h), 收集细胞培养上清至 EP 管中待用, 向 12 孔细胞培养板内加入细胞裂解液, 裂解 5 min, 转入 EP 管中待用。

1.4.4 Western blotting 细胞上清需利用甲醇和氯仿抽提蛋白, 最后加入上样缓冲液裂解; 细胞直接用上样缓冲液裂解。裂解液金属浴 101 °C 煮 10 min, 后经过聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜, 5% BSA 封闭 1 h, 一抗 caspase-1 (p20) (1:1 000 稀释), 4 °C 摇床过夜, PBST 洗 3 次, 相应 HRP 标记二抗 (1:10 000 稀释) 室温孵育 1 h, PBST 洗 3 次, 加底物显色, 并用化学发光成像仪曝光拍照。

1.4.5 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测细胞上清液中 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 以及小鼠腹腔液及血清中 IL-1 β 及 TNF- α 表达水平 按试剂盒说明书在 96 孔 ELISA 板中进行, PBS 稀释包被抗体 (1:200 稀释) 室温过夜孵育, PBST 洗 3 次, 10% 血清封闭 1 h, PBST 洗 3 次, 加入标准品和样品室温孵育 2 h, PBST 洗 3 次, 检测抗体 (1:100 稀释) 孵育 1 h, PBST 洗 3 次, HRP (1:50 稀释) 孵育 30 min, PBST 洗 5 次, 加入底物显色, 10% 硫酸终止, 酶标仪在 450 nm 读数。根据标准曲线计算样品中细胞因子浓度。

1.4.6 模型制备与给药 SPF 级 C57BL/6 小鼠饲养至 7~10 周, 小鼠体质量约 22~24 g, 称量体质量。(1) 随机分为安慰剂组 (PBS 组) (3 只)、感染性休克组 (LPS 组) (6 只)、桑黄酮干预组 (LPS +

Mul 组)(6 只), 桑黄酮干预组提前 1 h 腹腔注射桑黄酮溶液 0.2 mL, 剂量 50 mg/kg 体质量, 再对 LPS 组和 LPS + Mul 组同时腹腔注射 LPS(20 mg/kg) 溶液 0.3 mL。LPS 注射 4 h 后, 眼球取血, 分离血清, 颈椎脱臼处死小鼠并收集灌洗液。(2) 随机分为安慰剂组(PBS 组)(5 只)、感染性休克组(LPS 组)(10 只)、桑黄酮干预组(LPS + Mul 组)(10 只), 桑黄酮干预组腹腔注射桑黄酮溶液 0.2 mL(50 mg/kg), 1 h 后, 感染性休克组和桑黄酮干预组同时腹腔注射 0.3 mL LPS(20 mg/kg)。观察并记录小鼠生存时间。

1.4.7 小鼠腹腔灌洗液收集 处死小鼠, 剪开小鼠腹部外皮, 用 1 mL 胰岛素注射针注射 1 mL 无菌 PBS 入小鼠腹腔, 用手指对小鼠腹部进行 2 min 按摩, 用 25 G 针头配合 1 mL 注射器管, 吸出腹腔液, 离心, 上清用于 ELISA 检测。

1.5 统计学方法 采用 *t* 检验和生存曲线分析(Log-Rank 检验)。

2 结果

2.1 桑黄酮抑制尼日利亚菌素诱导的 NLRP3 炎症小体的活化 Western blotting 及 ELISA 结果显示, 桑黄酮可剂量依赖地抑制尼日利亚菌素诱导的 Caspase-1(p20) 表达及 IL-1 β 的分泌($P < 0.01$) (见图 1、表 1), 但非炎症小体相关的细胞因子 TNF- α 和 IL-6 分泌差异无统计学意义($P > 0.05$) (见表 2)。

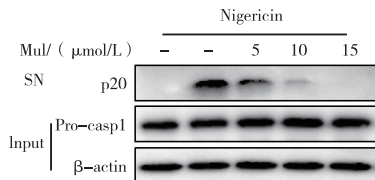


图1 桑黄酮对Nigericin刺激的BMDM细胞p20表达的影响(SN: 细胞上清, Input: 细胞裂解液)

2.2 桑黄酮抑制多种刺激剂诱导的 NLRP3 炎症小体的活化 除 Nigericin 外, 多种病原菌和危险信号均可引起 NLRP3 炎症小体活化如 MSU、ATP 等。结果显示桑黄酮明显抑制 Nigericin、ATP 及 MSU 三种经典的 NLRP3 炎症小体激动剂所诱导的 Caspase-1(p20) 表达及 IL-1 β 分泌($P < 0.01$) (见图 2、表 3)。

2.3 桑黄酮抑制人 THP-1 细胞中 NLRP3 炎症小体的活化 为了明确桑黄酮在人 THP-1 细胞中是否同样抑制 NLRP3 炎症小体的活化, 利用 Nigericin 刺激分化后的人 THP-1 细胞进行实验, 结果显示桑黄

酮可以剂量依赖性地抑制 Caspase-1(p20) 表达及 IL-1 β 分泌($P < 0.01$) (见图 3、表 4)。

表 1 桑黄酮对 Nigericin 刺激的 BMDM 细胞 IL-1 β 表达的影响($\bar{x} \pm s$; pg/mL)

分组	<i>n</i>	IL-1 β	<i>t</i> *	<i>P</i> *
mock	3	52.15 \pm 2.21	—	—
LPS	3	55.90 \pm 1.58	—	—
LPS + Nigericin	3	1 352.42 \pm 77.10	—	—
LPS + Nigericin + Mul(5 μ mol/L)	3	921.34 \pm 38.80	8.65	<0.01
LPS + Nigericin + Mul(10 μ mol/L)	3	633.80 \pm 79.56	11.23	<0.01
LPS + Nigericin + Mul(15 μ mol/L)	3	289.15 \pm 2.67	23.87	<0.01

* 示与 LPS + Nigericin 组比较假设检验的结果

表 2 桑黄酮对 Nigericin 刺激的 BMDM 细胞 TNF- α 和 IL-6 表达的影响($\bar{x} \pm s$; pg/mL)

分组	<i>n</i>	TNF- α			IL-6		
		表达水平	<i>t</i> *	<i>P</i> *	表达水平	<i>t</i> *	<i>P</i> *
mock	3	79.49 \pm 7.95	—	—	94.73 \pm 0.27	—	—
LPS	3	2 538.39 \pm 102.69	0.18	>0.05	1 065.18 \pm 90.27	0.66	>0.05
LPS + Nigericin	4	2 524.76 \pm 98.79	—	—	1 025.40 \pm 70.43	—	—
LPS + Nigericin + Mul(5 μ mol/L)	4	2 572.00 \pm 140.36	0.55	>0.05	1 016.42 \pm 50.67	0.21	>0.05
LPS + Nigericin + Mul(10 μ mol/L)	4	2 409.76 \pm 176.91	1.14	>0.05	1 080.59 \pm 14.01	1.54	>0.05
LPS + Nigericin + Mul(15 μ mol/L)	4	2 430.84 \pm 181.51	0.91	>0.05	1 072.95 \pm 99.90	0.78	>0.05

* 示与 LPS + Nigericin 组比较假设检验的结果

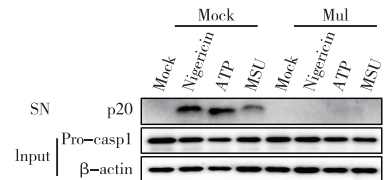


图2 桑黄酮对多种刺激剂活化的BMDM细胞p20表达的影响(SN: 细胞上清, Input: 细胞裂解液)

表 3 桑黄酮对多种刺激剂活化的 BMDM 细胞 IL-1 β 表达的影响($\bar{x} \pm s$; pg/mL)

分组	<i>n</i>	IL-1 β	<i>t</i>	<i>P</i>
mock	3	53.83 \pm 5.13	—	—
Mul(15 μ mol/L)	3	55.79 \pm 4.63	0.49	>0.05
LPS + Nigericin	3	1 265.48 \pm 81.23	—	—
LPS + Nigericin + Mul(15 μ mol/L)	3	165.96 \pm 5.92	33.38*	<0.01*
LPS + ATP	3	2 135.70 \pm 80.80	—	—
LPS + ATP + Mul(15 μ mol/L)	3	596.73 \pm 55.45	27.20 Δ	<0.01 Δ
LPS + MSU	3	1 663.46 \pm 80.84	—	—
LPS + MSU + Mul(15 μ mol/L)	3	257.73 \pm 49.10	25.74 $\#$	<0.01 $\#$

* 示与 LPS + Nigericin 组比较假设检验的结果; Δ 示与 LPS + ATP 组比较, # 示与 LPS + MSU 组比较

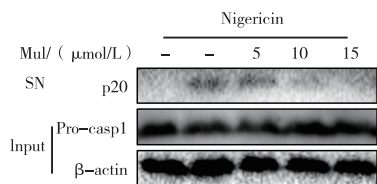


图3 桑黄酮对Nigericin刺激的THP-1细胞p20表达的影响(SN: 细胞上清, Input: 细胞裂解液)

表4 桑黄酮对Nigericin刺激的THP-1细胞IL-1 β 表达的影响($\bar{x} \pm s$; pg/mL)

分组	n	IL-1 β	t*	P*
mock	3	94.73 \pm 0.27	—	—
LPS	3	94.58 \pm 0.47	—	—
LPS + Nigericin	4	1 261.93 \pm 36.16	—	—
LPS + Nigericin + Mul(5 μ mol/L)	4	953.23 \pm 21.24	14.72	<0.01
LPS + Nigericin + Mul(10 μ mol/L)	4	586.87 \pm 25.55	30.49	<0.01
LPS + Nigericin + Mul(15 μ mol/L)	4	245.95 \pm 0.90	56.17	<0.01

* 示与 LPS + Nigericin 组比较假设检验的结果

2.4 桑黄酮缓解 LPS 诱导的小鼠感染性休克 在小鼠感染性休克模型中进一步验证桑黄酮在动物水平上的作用, ELISA 检测小鼠血清及腹腔灌洗液 IL-1 β 及 TNF- α 表达水平, 结果表明, 与 LPS 组相比, LPS + Mul 组小鼠血清及腹腔灌洗液中 IL-1 β 分泌明显降低($P < 0.01$), 而 TNF- α 的水平差异无统计学意义(见表5)。除此之外, 观察 LPS 注射后 84 h 内小鼠生存状态, 并绘制生存曲线, 结果显示 LPS 组小鼠 14 h 开始死亡, 36 h 小鼠死亡率达 80%。而 LPS + Mul 组小鼠 64 h 开始死亡, 72 h 小鼠死亡率为 40% ($P < 0.01$) (见图4)。

表5 桑黄酮对感染性休克小鼠血清及腹腔灌洗液 IL-1 β 及 TNF- α 的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	n	血清		腹腔灌洗液	
		IL-1 β /(pg/mL)	TNF- α /(pg/mL)	IL-1 β /(pg/mL)	TNF- α /(pg/mL)
PBS 组	3	26.17 \pm 3.09	41.22 \pm 1.88	23.83 \pm 1.01	44.49 \pm 3.78
LPS 组	6	275.18 \pm 69.85	190.74 \pm 14.03	527.63 \pm 65.73	85.82 \pm 13.08
LPS + Mul 组	6	132.7 \pm 44.35 **	177.47 \pm 10.61	288.70 \pm 88.18 **	85.81 \pm 10.67
F	—	23.96	191.21	52.16	16.92
P	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
MS _{组内}	—	2 854.068	129.511	5 040.231	121.104

q 检验: 与 LPS 组比较 ** $P < 0.01$

3 讨论

桑枝为桑科桑属植物桑的干燥嫩枝, 主治风湿痹痛, 水肿脚气, 另有报道桑枝还具有抗炎、抗氧化及抑菌抗病毒等功效^[12-14]。桑黄酮作为桑枝的主要活性成分, 现有研究主要集中在神经炎症、脂质代

谢等方面, 有研究^[15]发现其通过调节 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制神经炎症帕金森综合征; 另有研究^[16]发现桑黄酮可通过调节脂质代谢关键酶来降低肥胖的发生率。帕金森综合征和肥胖的发生发展与 NLRP3 炎症小体的异常活化密切相关^[17-18]。目前, 桑黄酮对 NLRP3 炎症小体作用尚不清楚, 因此, 探究其是否通过调节 NLRP3 炎症小体发挥抗炎作用对明确桑黄酮的抗炎机制具有重要意义。

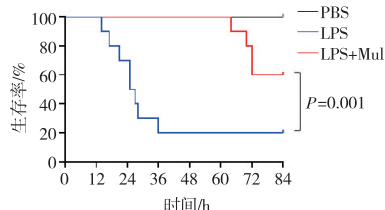


图4 桑黄酮对感染性休克小鼠生存率的影响

NLRP3 炎症小体在炎症疾病中发挥重要作用, 使其成为治疗相关疾病的关键靶点。近年来, 越来越多的小分子化合物被报道可以抑制 NLRP3 炎症小体活化, 多种中草药成分被证实对抑制 NLRP3 炎症小体活化具有良好效果^[19-21], 但还难以应用于临床。寻找可靠的 NLRP3 炎症小体抑制剂成为新的研究方向^[22]。因此, 本研究主要探究中草药抗炎成分桑黄酮的抗炎作用是否通过抑制 NLRP3 炎症小体活化来实现。我们首先在体外探究桑黄酮是否抑制 NLRP3 炎症小体活化, 结果显示, 桑黄酮在鼠 BMDM 细胞中抑制 Caspase-1 表达及 IL-1 β 分泌, 但对 priming 信号介导的 TNF- α 和 IL-6 的产生没有影响, 证实了桑黄酮以剂量依赖性方式抑制 Nigericin 诱导的 NLRP3 炎症小体活化。同时, 除 Nigericin 外, NLRP3 炎症小体还可被内源性 DAMPs 及多种病原菌激活^[23]。本研究也发现桑黄酮可以抑制其他 NLRP3 炎症小体刺激剂(如 MSU 和 ATP)诱导的炎症小体活化, 表明桑黄酮抑制 NLRP3 炎症小体具有广谱性。以上结果证实了桑黄酮可抑制鼠 BMDM 细胞中 NLRP3 炎症小体的活化。接下来笔者探讨桑黄酮在人 THP-1 细胞中是否抑制 NLRP3 炎症小体活化, 结果显示, 桑黄酮显著抑制 Caspase-1 表达及 IL-1 β 分泌, 证实了桑黄酮在人 THP-1 细胞中同样可以抑制 NLRP3 炎症小体活化。

NLRP3 炎症小体的异常活化会导致大量炎症因子释放, 诱导多种炎症性疾病发生, 如肝纤维化^[24]、炎症性肠病^[25]及感染性休克^[26]等。严重的感染性休克是内、外科重症监护病房中最常见的死亡原因, 也是临床上亟待解决的问题之一^[27]。我们构建了最常见的感染性休克模型——小鼠腹腔注射

LPS, 研究结果显示, 桑黄酮可以明显抑制感染性休克小鼠血清和腹腔灌洗液中 NLRP3 炎症小体依赖的 IL-1 β 的产生, 但对 NF- κ B 信号通路介导的 TNF- α 无影响。表明桑黄酮通过抑制 NLRP3 炎症小体活化缓解小鼠急性炎症。此外, 观察 LPS 腹腔注射 84 h 内小鼠生存状态发现, LPS 造模组小鼠 14 h 后开始死亡, 而桑黄酮治疗组小鼠 64 h 开始死亡, 桑黄酮显著延长了感染性休克小鼠的生存时间。这些结果表明桑黄酮通过抑制 NLRP3 炎症小体激活, 在体内减轻了 LPS 诱导的感染性休克。

综上所述, 桑黄酮不仅可以抑制体外鼠 BMDM 和人 THP-1 细胞 NLRP3 炎症小体活化, 还可以阻抑体内 NLRP3 炎症小体激活, 进而减轻炎症反应。明确桑黄酮对 NLRP3 炎症小体相关疾病的治疗作用, 对开发其药用价值及推进临床应用具有重要意义。

[参 考 文 献]

- [1] GONG T, LIU L, JIANG W, *et al.* DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases [J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20(2):95.
- [2] FRANCHI L, MUÑOZ-PLANILLO R, NUÑEZ G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes [J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(4):325.
- [3] GUO H, CALLAWAY JB, TING JPY. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics [J]. *Nat Med*, 2015, 21(7):677.
- [4] MARTINON F, BURNS K, TSCHOPP J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β [J]. *Mol Cell*, 2002, 10(2):417.
- [5] DINARELLO CA, VAN DER MEER JWM. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans [J]. *Semin Immunol*, 2013, 25(6):469.
- [6] CHEN Y, HE H, LIN B, *et al.* RRx-001 ameliorates inflammatory diseases by acting as a potent covalent NLRP3 inhibitor [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(6):1425.
- [7] HE H, JIANG H, CHEN Y, *et al.* Oridonin is a covalent NLRP3 inhibitor with strong anti-inflammasome activity [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):2550.
- [8] HUANG Y, JIANG H, CHEN Y, *et al.* Tranilast directly targets NLRP3 to treat inflammasome-driven diseases [J]. *EMBO Mol Med*, 2018, 10(4):e8689.
- [9] ZHENG X, HOU Y, HE H, *et al.* Synthetic vitamin K analogs inhibit inflammation by targeting the NLRP3 inflammasome [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(10):2422.
- [10] KO W, YOON CS, KIM KW, *et al.* Neuroprotective and anti-inflammatory effects of kuwanon C from *are* mediated by heme oxygenase-1 in HT22 hippocampal cells, RAW264.7 macrophage, and BV2 microglia [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(14):4839.
- [11] XIA P, GAO X, DUAN L, *et al.* Mulberrin (Mul) reduces spinal cord injury (SCI)-induced apoptosis, inflammation and oxidative stress in rats via miRNA-337 by targeting Nrf-2 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107:1480.
- [12] SEO CS, LIM HS, JEONG SJ, *et al.* HPLC-PDA analysis and anti-inflammatory effects of Mori Cortex Radicis [J]. *Nat Prod Commun*, 2013, 8(10):1443.
- [13] KIM TI, KWON EB, OH YC, *et al.* Mori ramulus and its major component morusin inhibit herpes simplex virus type 1 replication and the virus-induced reactive oxygen species [J]. *Am J Chin Med*, 2021, 49(1):163.
- [14] YU W, CHEN H, XIANG Z, *et al.* Preparation of polysaccharides from Ramulus mori, and their antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial activities [J]. *Molecules*, 2019, 24(5):856.
- [15] CAO W, DONG Y, ZHAO W, *et al.* Mulberrin attenuates 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced Parkinson's disease by promoting Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *J Chem Neuroanat*, 2019, 98:63.
- [16] HOU XD, GE GB, WENG ZM, *et al.* Natural constituents from Cortex Mori Radicis as new pancreatic lipase inhibitors [J]. *Bioorg Chem*, 2018, 80:577.
- [17] GORDON R, ALBORNOZ EA, CHRISTIE DC, *et al.* Inflammasome inhibition prevents α -synuclein pathology and dopaminergic neurodegeneration in mice [J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(465):eaah4066.
- [18] VANDANMAGSAR B, YOUM YH, RAVUSSIN A, *et al.* The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance [J]. *Nat Med*, 2011, 17(2):179.
- [19] LIN Y, LUO T, WENG A, *et al.* Gallic acid alleviates gouty arthritis by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis through enhancing Nrf2 signaling [J]. *Front Immunol*, 2020, 11:580593.
- [20] 邓敏, 侯滨芬, 陈晓东. 大黄酚通过激活 NLRP3 炎症小体诱导胃癌细胞焦亡的机制研究 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2021, 46(8):994.
- [21] 周慧, 曲颂扬, 田立东. 雷公藤甲素对 IgA 肾病大鼠的肾保护作用及对 NLRP3 炎症小体的影响 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2020, 45(12):1593.
- [22] ZHANG X, XU A, LV J, *et al.* Development of small molecule inhibitors targeting NLRP3 inflammasome pathway for inflammatory diseases [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 185:111822.
- [23] KELLEY N, JELTEMA D, DUAN Y, *et al.* The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13):3328.
- [24] WREE A, EGUCHI A, MCGEOUGH MD, *et al.* NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice [J]. *Hepatology*, 2014, 59(3):898.
- [25] 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.
- [26] MAO K, CHEN S, CHEN M, *et al.* Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock [J]. *Cell Res*, 2013, 23(2):201.
- [27] ANGUS DC, VAN DER POLL T. Severe sepsis and septic shock [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(9):840.