

苦柯胺B调控NLRP3/Caspase-1/GSDMD焦亡通路减轻脂多糖诱导的巨噬细胞炎症

宁璞,柯蕊,和平,杨拴盈

(西安交通大学第二附属医院呼吸与危重症医学科,西安 710004)

摘要 目的:探讨苦柯胺B(KB)对脂多糖(LPS)诱导的人单核细胞白血病 THP-1 细胞核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3)/半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)/消皮素 D(GSDMD)焦亡通路的调控作用。方法:THP-1 细胞经 100 ng/mL 佛波酯(PMA)诱导 24 h 成为巨噬细胞,采用 CCK-8 法检测 KB 对细胞活力的影响,确定合适的浓度用于后续实验;由 LPS 联合三磷酸腺苷(ATP)诱导建立巨噬细胞炎症损伤模型(LPS 组),采用不同浓度 KB 及 NLRP3 炎症小体抑制剂 MCC950 处理细胞,通过实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)法检测各组 *NLRP3*、*Caspase-1*、凋亡相关斑点样蛋白(*ASC*)、白细胞介素(*IL*)-1 β 、*GSDMD* 及高迁移率族蛋白 B1(*HMGB-1*) mRNA 表达,采用 western blotting 法检测炎症小体组分及焦亡相关蛋白的表达,酶联免疫吸附试验(ELISA)测定细胞上清液 IL-1 β 的含量,检测细胞上清液乳酸脱氢酶(LDH)释放量,Annexin-V-PE/7-AAD 染色检测细胞凋亡。结果:KB 浓度为 12.5~400 μ mol/L 范围内对 THP-1 细胞活力无明显影响。与对照组(未处理细胞)比较,LPS 组 *NLRP3*、*Caspase-1*、*IL-1 β* 、*GSDMD*、*HMGB-1* mRNA 表达上调,经 MCC950 或 KB 处理后,上述 mRNA 表达水平较 LPS 组下降(均 $P < 0.05$)。与对照组比较,LPS 组 *NLRP3*、*Caspase-1*、Cleaved *Caspase-1*、*GSDMD*、*GSDMD-NT*、*HMGB1* 蛋白表达量均较对照组升高,经 MCC950 或 KB 处理后上述蛋白表达下调,细胞培养上清液中 IL-1 β 分泌量和 LDH 释放量降低(均 $P < 0.05$),细胞凋亡减少。结论:KB 可通过抑制 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路介导的焦亡来改善 LPS 诱导的 THP-1 细胞炎症。

关键词 苦柯胺B;炎症小体;NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路;焦亡;巨噬细胞

中图分类号:R580 文献标志码:A 文章编号:1005-930X(2024)07-1009-08

DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.07.010

Kukoamine B regulates pyroptosis mediated by NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway to alleviate lipopolysaccharide-induced macrophage inflammation

NING Pu, KE Rui, HE Ping, YANG Shuanying. (Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China)

Abstract Objective: To investigate the regulatory effect of kukoamine B (KB) on the nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3)/Caspase-1/gasdermin D (GSDMD) pyroptosis pathway in human monocytic leukemia THP-1 cells induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods:** THP-1 cells were induced into macrophage by 100 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) for 24 h. The cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to assess the effect of KB on cell viability, and the appropriate concentrations were determined for subsequent experiments. The inflammation injury model of macrophage (LPS group) was established by LPS combined with adenosine triphosphate (ATP). The cells were treated with different concentrations of KB and NLRP3 inflammasome inhibitor MCC950. Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was employed to detect the mRNA expression of *NLRP3*, *Caspase-1*, apoptosis-related spot-like protein (*ASC*), interleukin (*IL*)-1 β , *GSDMD* and high mobility group protein B-1 (*HMGB-1*) in each group. Western blotting was used to detect the expression of the inflammasome components and pyroptosis-associated proteins. The IL-1 β level in supernatant was determined via enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the release of lactate dehydrogenase (LDH) in the cell supernatant was assessed, and the Annexin-V-PE/7-aminoactinomycin (7-AAD)

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 82100067)

[通信作者] 宁璞, E-mail: pnbjmu@163.com

[收稿日期] 2024-05-12

staining was utilized to detect apoptosis. **Results:** The concentrations of KB ranging from 12.5 $\mu\text{mol/L}$ to 400 $\mu\text{mol/L}$ had no significant effect on the viability of THP-1 cells. In comparison to the control group (untreated cells), the expression of *NLRP3*, *Caspase-1*, *IL-1 β* , *GSDMD* and *HMGB-1* mRNA was up-regulated in the LPS group. After MCC950 or KB treatment, the above changes were significantly reversed ($P < 0.05$). The protein expression of NLRP3, Caspase-1, Cleaved caspase-1, GSDMD, GSDMD-NT, and HMGB1 in the LPS group were higher than those in the control group, and the above protein expression was down-regulated after MCC950 or KB treatment. The secretion of IL-1 β and LDH release in cell culture supernatant were decreased (both $P < 0.05$), and the apoptosis was reduced. **Conclusion:** KB can alleviate LPS-induced inflammation in THP-1 cells by inhibiting pyroptosis mediated by the NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway.

Keywords kukoamine B; inflammasome; NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway; pyroptosis; macrophage

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰阴性菌细胞壁外膜的重要成分,其作为重要的外源性抗原因子,对机体炎症反应的发生起触发作用,严重时可导致脓毒症。炎症小体为一种多聚体复合物,是机体天然免疫系统中的重要传感器,与多种感染性疾病、自身免疫性疾病、肿瘤及代谢性疾病等密切相关^[1-2],在脓毒症中也扮演十分重要的角色^[3]。核苷酸结合寡聚化结构域受体-3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3)为炎症小体,由NOD样受体家族3(NOD-like receptors, NLRP3)、适应分子凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)和半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)前体(pro-Caspase-1)组成,可感受多种感染和损伤性刺激如三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)、尼日利亚菌素、低钾等,触发由Caspase-1介导的经典焦亡途径^[4]。促炎症蛋白酶Caspase-1活化后可切割白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 和IL-18前体,产生成熟的细胞因子IL-1 β 和IL-18^[5],同时可将完整的消皮素D(gasdermin D, GSDMD)剪切为GSDMD-N端(GSDMD-NT)和C端(GSDMD-CT)^[6]。GSDMD-NT可结合细胞膜脂质,形成孔样结构,破坏细胞膜引起焦亡。细胞焦亡是一种特殊的凋亡方式,对炎症反应的调节、免疫平衡的维持及组织损伤的程度发挥着关键作用^[7-8]。适度的细胞焦亡可对抗和抵御病原微生物感染,减轻脓毒症组织损伤,但过度的焦亡则可能扩大炎症反应,加重脓毒症或造成继发感染^[9]。因此,基于NLRP3炎症小体及细胞焦亡的抗炎药物开发及作用机制研究对于脓毒症等重症感染性疾病的防治具有重要意义。

苦柯胺B(又名地骨皮乙素, kukoamine B, KB)

是从传统中药地骨皮中提取出的一种天然生物碱成分,其化学结构见图1。研究显示,地骨皮具有抗菌、解热、免疫调节、降血压、降血糖和降血脂等多种药理作用^[10]。KB与LPS和CpG DNA具有较高亲和力和^[11],可抑制促炎介质产生及炎症细胞浸润,从而改善脓毒症小鼠肺脏损伤^[12]及小肠炎症反应^[13]。但KB能否通过影响NLRP3炎症小体及细胞焦亡通路发挥抗炎作用尚未有研究报道。本研究通过LPS联合ATP刺激人单核细胞白血病THP-1细胞建立急性炎症损伤模型,旨在探讨KB对NLRP3炎症小体及细胞焦亡的影响,进一步探究其潜在的药理学机制。

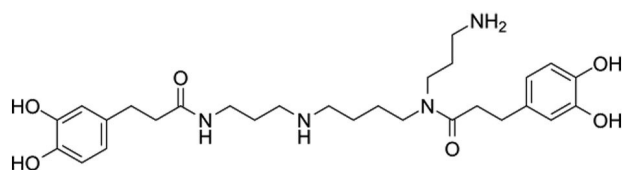


图1 KB的化学结构(分子式 $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_6$,分子量530.66)

1 材料与方法

1.1 细胞系

人单核细胞白血病细胞系THP-1购于北京协和细胞资源中心(Cell Resource center, IBMS, CAMS/PUMC)。

1.2 主要试剂与仪器

RPMI 1640培养基、胎牛血清、青霉素—链霉素混合液购于美国Gibco公司;LPS购于美国Sigma公司;KB、佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)、NLRP3炎症小体抑制剂MCC950、NLRP3抗体、HMGB-1抗体均购于美国MedChemExpress公

司;细胞计数(CCK-8)试剂盒购于日本 DojinDO 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于美国 Thermofisher 公司;Caspase-1、ASC、GSDMD 抗体购于武汉 Proteintech 公司;Cleaved Caspase-1 抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司;GSDMD-NT 抗体购于英国 Abcam 公司;GAPDH 抗体购于北京 SinoBiological 公司;二抗、人 IL-1 β 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒、Annexin-V-PE/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒均购于北京索莱宝科技有限公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒购于上海碧云天生物技术股份有限公司。细胞培养板购于美国 Coring 公司;细胞培养箱、NanoDrop One^c 超微量紫外分光光度计、ABI step one plus 荧光定量 PCR 仪、Multiskan FC 酶标仪购于美国 Thermofisher 公司;蛋白电泳转移系统购于美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 THP-1 细胞采用含 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素、0.05 mmol/L β -巯基乙醇的 RPMI 1640 培养基,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中静置培养,每 3 d 传代 1 次,取对数生长期细胞进行后续实验。

1.2.2 CCK-8 测定细胞活力 THP-1 细胞以 5 $\times$ 10⁴/孔密度接种于 96 孔板,加入终浓度为 100 ng/mL PMA 诱导贴壁 24 h,随后分别加入 12.5 μ mol/L、25 μ mol/L、50 μ mol/L、100 μ mol/L、200 μ mol/L、400 μ mol/L 的 KB 处理 24 h,每个浓度设 3 个复孔,同时设置无细胞及药物的空白对照孔。各孔更换为含 10 μ L CCK-8 的新鲜培养基继续培养 3 h,采用酶标仪测定 450 nm 和 600 nm 处的吸光度(OD)值,计算细胞存活率。细胞存活率=(OD_{实验组} - OD_{空白组})/(OD_{对照组} - OD_{空白组}) $\times$ 100%。

1.2.3 细胞分组及处理 THP-1 细胞接种于细胞培养板中,加入 100 ng/mL PMA 诱导 24 h 成为巨噬细胞,分为对照组、LPS 组、LPS+MCC950(1 μ mol/L)组、LPS+KB 低剂量(12.5 μ mol/L)组、LPS+KB 中剂量(50 μ mol/L)组、LPS+KB 高剂量(200 μ mol/L)组。对照组未处理,其余各组加入 1 μ g/mL LPS 处理 1 h,随后分别加入 MCC950 或 KB 干预 12 h,再加入 5 mmol/L ATP 继续刺激 1 h 后收集细胞沉淀或上清液。

1.2.4 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)法检测相关基因表达 收集细胞,提取总 RNA,逆转录为 cDNA,

以 cDNA 为模板配制 PCR 反应体系。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火、延伸 10 s,共 40 个循环;熔解曲线程序为:95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,95 $^{\circ}$ C 15 s。采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算目的基因相对表达量。引物由北京擎科生物科技股份有限公司提供,引物序列见表 1。

表1 PCR 引物序列

基因名称	序列(5'~3')
NLRP3	上游:GATCTTCGCTGCGATCAACAG
	下游:CGTGCATTATCTGAACCCAC
Caspase-1	上游:TCCTCAGGCTCAGAAGGGAATGTC
	下游:ACGTGTGCGGCTTGACTTGTC
ASC	上游:TGGGCCTGCAGGAGATG
	下游:ATTTGGTGGGATTGCCAG
IL-1 β	上游:AGGCTGCTCTGGGATTC
	下游:GCCACAACAACCTGACGC
GSDMD	上游:AGCCCTACTGCCTGGTGGTTAG
	下游:CCTGCGATCTTTGCCTGTCCTG
HMGB-1	上游:ATATGGCAAAAGCGGACAAG
	下游:AGGCCAGGATGTTCTCCTTT
GAPDH	上游:ACCACAGTCCATGCCATCAC
	下游:TCCACCCCTGTTGCTGTA

1.2.5 蛋白免疫印迹(western blotting)检测蛋白表达 收集细胞,加入 RIPA 和蛋白酶抑制剂裂解细胞,提取总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品煮沸变性后,取 30 μ g 样本以 7.5%~12.5%凝胶浓度进行电泳,电泳条件为:浓缩胶 80 V 20~30 min,分离胶 100 V 40~60 min;将蛋白转移至 PVDF 膜,转膜条件为 245 mA 2 h,5%脱脂牛奶室温封闭 1 h,分别加入一抗 NLRP3(1:1 000)、Caspase-1(1:2 000)、Cleaved Caspase-1(1:1 000)、GSDMD(1:1 000)、GSDMD-NT(1:1 000)、HMGB-1(1:1 000)、ASC(1:1 000)、GAPDH(1:2 000)稀释液 4 $^{\circ}$ C 下摇床孵育过夜;TBST 洗膜,加入二抗室温孵育 2 h,ECL 显色, Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

1.2.6 ELISA 法检测细胞上清中 IL-1 β 水平 收集细胞培养上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书步骤进行测定,每个样品设置 3 个复孔,采用酶标仪测定 450 nm 处各孔的 OD 值。制作标准曲线,计算各组样本所对应的浓度。

1.2.7 LDH 释放量检测 收集细胞培养上清液,按

照LDH检测试剂盒说明书步骤操作,采用酶标仪测定490 nm处各孔的OD值,计算LDH释放率。LDH释放率=(OD_{实验孔} - OD_{空白对照孔})/(OD_{最大释放孔} - OD_{空白对照孔})×100%。

1.2.8 Annexin V-PE/7AAD检测细胞凋亡 收集细胞(接种密度 8×10^5 个/mL, 2 mL/孔),按照Annexin V-PE/7-AAD凋亡检测试剂盒说明书操作,采用流式细胞仪检测细胞。

1.3 统计学方法

各实验均独立重复3次,采用GraphPad Prism 9软件对数据进行统计分析,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,组间比较采用Dunnett's *t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 THP-1巨噬细胞诱导及炎症模型建立

如图2所示,原始状态的THP-1细胞呈圆形,形态饱满、大小均一、折光性好,为悬浮生长的单个细胞(图2A);PMA刺激24 h后细胞变为贴壁生长,变为不规则形,体积较前增大,胞浆疏松,胞膜周围可见少量突起(图2B);加入LPS刺激12 h后,细胞开始聚团,胞膜突起更加明显,呈现梭形,部分细胞质内出现空泡状改变(图2C,箭头所指);加入ATP刺激1 h后,细胞贴壁性变差,细胞核固缩,部分细胞漂浮(图2D)。

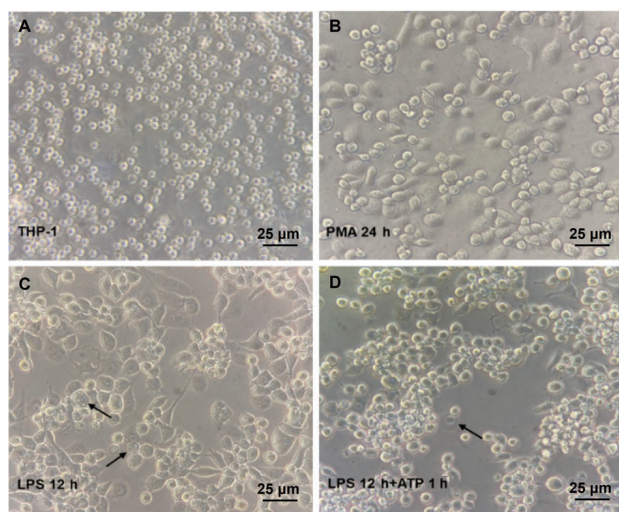


图2 THP-1细胞及LPS/ATP刺激后的细胞形态变化(×400)

2.2 KB对THP-1巨噬细胞活力的影响

如图3所示,KB浓度为12.5~400 $\mu\text{mol/L}$ 时对细胞存活率无明显影响($P > 0.05$),后续选择12.5 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$ 分别作为KB低、中、高剂量实验浓度。

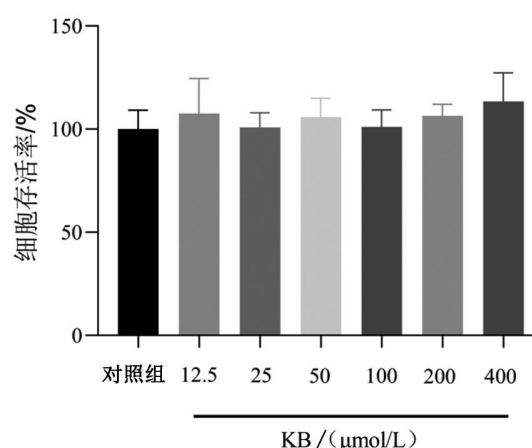


图3 KB对THP-1细胞存活率的影响

2.3 KB对LPS联合ATP刺激THP-1细胞炎症小体及焦亡相关mRNA表达的影响

与对照组比较,LPS组细胞*NLRP3*、*Caspase-1*、*IL-1 β* 、*GSDMD*、*HMGB-1* mRNA表达上调($P < 0.05$);与LPS组比较,LPS+MCC950组和LPS+KB低、中、高剂量组*NLRP3*、*Caspase-1*、*IL-1 β* 、*GSDMD*、*HMGB-1* mRNA表达下调($P < 0.05$),各组*ASC* mRNA表达差异无统计学意义($P > 0.05$),见表2。

2.4 KB对LPS联合ATP刺激THP-1细胞炎症小体及焦亡相关蛋白表达的影响

如图4、表3所示,与对照组比较,LPS组细胞*NLRP3*、*Caspase-1*、*Cleaved Caspase-1*、*GSDMD*、*GSDMD-NT*、*HMGB1*表达上调($P < 0.05$);与LPS组比较,LPS+MCC950组和LPS+KB低、中、高剂量组*NLRP3*、*Caspase-1*、*Cleaved Caspase-1*、*GSDMD*、*GSDMD-NT*、*HMGB1*表达下调($P < 0.05$);LPS组与对照组*ASC*蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表2 各组细胞NLRP3炎症小体组分及焦亡相关mRNA相对表达量比较

	$\bar{x} \pm s, n=3$					
组别	<i>NLRP3</i>	<i>Caspase-1</i>	<i>ASC</i>	<i>IL-1β</i>	<i>GSDMD</i>	<i>HMGB-1</i>
对照组	1.00 $\pm$ 0.03	1.01 $\pm$ 0.13	1.01 $\pm$ 0.12	1.00 $\pm$ 0.03	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.02
LPS组	4.15 $\pm$ 0.30 ^a	1.78 $\pm$ 0.05 ^a	1.01 $\pm$ 0.17	9.78 $\pm$ 0.40 ^a	2.27 $\pm$ 0.03 ^a	5.90 $\pm$ 0.20 ^a
LPS+MCC950组	3.05 $\pm$ 0.21 ^b	0.70 $\pm$ 0.14 ^b	1.01 $\pm$ 0.06	4.70 $\pm$ 0.59 ^b	1.38 $\pm$ 0.15 ^b	3.05 $\pm$ 0.27 ^b
LPS+KB低剂量组	2.08 $\pm$ 0.17 ^b	0.61 $\pm$ 0.10 ^b	0.91 $\pm$ 0.05	8.53 $\pm$ 0.94 ^b	0.96 $\pm$ 0.01 ^b	1.42 $\pm$ 0.08 ^b
LPS+KB中剂量组	1.91 $\pm$ 0.11 ^b	0.52 $\pm$ 0.09 ^b	0.81 $\pm$ 0.05	6.56 $\pm$ 0.15 ^b	0.75 $\pm$ 0.03 ^b	0.30 $\pm$ 0.05 ^b
LPS+KB高剂量组	1.84 $\pm$ 0.11 ^b	0.48 $\pm$ 0.03 ^b	0.79 $\pm$ 0.03	6.05 $\pm$ 2.93 ^b	0.53 $\pm$ 0.04 ^b	0.03 $\pm$ 0.01 ^b
<i>F</i>	117.647	75.724	3.615	119.474	260.990	718.906
<i>P</i>	<0.001	<0.001	0.052	<0.001	<0.001	<0.001

与对照组比较,^a*P*<0.05;与LPS组比较,^b*P*<0.05。

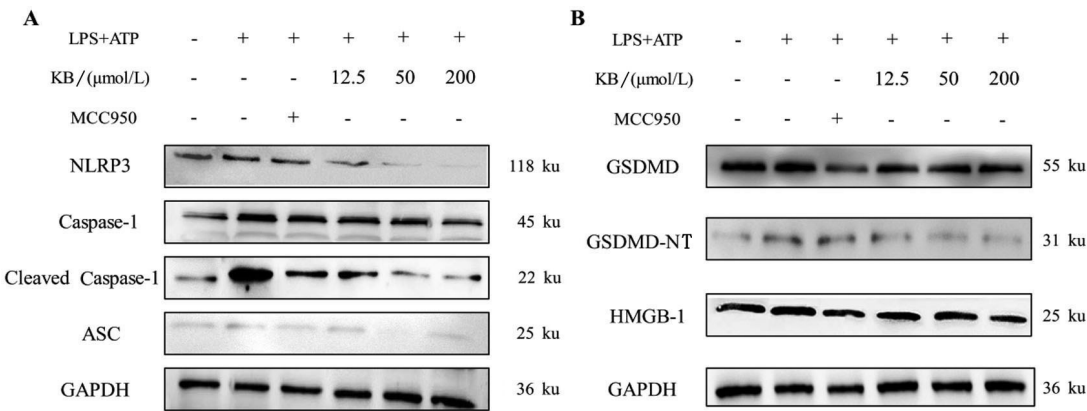


图4 Western blotting检测各组细胞炎症小体组分及焦亡相关蛋白的表达

表3 各组细胞NLRP3炎症小体组分及焦亡相关蛋白相对表达量比较

	$\bar{x} \pm s, n=3$						
组别	<i>NLRP3</i>	<i>Caspase-1</i>	Cleaved <i>Caspase-1</i>	<i>ASC</i>	<i>GSDMD</i>	<i>GSDMD-NT</i>	<i>HMGB-1</i>
对照组	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.03	1.00 $\pm$ 0.05
LPS组	1.37 $\pm$ 0.04 ^a	2.17 $\pm$ 0.06 ^a	4.73 $\pm$ 0.52 ^a	1.06 $\pm$ 0.02	1.60 $\pm$ 0.12 ^a	36.86 $\pm$ 0.89 ^a	1.50 $\pm$ 0.07 ^a
LPS+MCC950组	1.13 $\pm$ 0.15 ^b	1.72 $\pm$ 0.15 ^b	1.89 $\pm$ 0.07 ^b	1.11 $\pm$ 0.07	0.93 $\pm$ 0.08 ^b	35.01 $\pm$ 0.82 ^b	1.26 $\pm$ 0.07 ^b
LPS+KB低剂量组	0.73 $\pm$ 0.06 ^b	1.56 $\pm$ 0.08 ^b	1.51 $\pm$ 0.05 ^b	0.96 $\pm$ 0.04	1.01 $\pm$ 0.16 ^b	27.59 $\pm$ 0.21 ^b	1.26 $\pm$ 0.04 ^b
LPS+KB中剂量组	0.17 $\pm$ 0.01 ^b	1.27 $\pm$ 0.03 ^b	0.58 $\pm$ 0.03 ^b	0.65 $\pm$ 0.24 ^b	1.02 $\pm$ 0.05 ^b	15.16 $\pm$ 1.89 ^b	1.19 $\pm$ 0.07 ^b
LPS+KB高剂量组	0.14 $\pm$ 0.01 ^b	1.03 $\pm$ 0.06 ^b	0.49 $\pm$ 0.04 ^b	0.80 $\pm$ 0.03 ^b	0.98 $\pm$ 0.03 ^b	12.38 $\pm$ 1.77 ^b	0.87 $\pm$ 0.07 ^b
<i>F</i>	164.731	90.976	158.747	7.963	20.664	557.314	37.043
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	0.002	<0.001	<0.001	<0.001

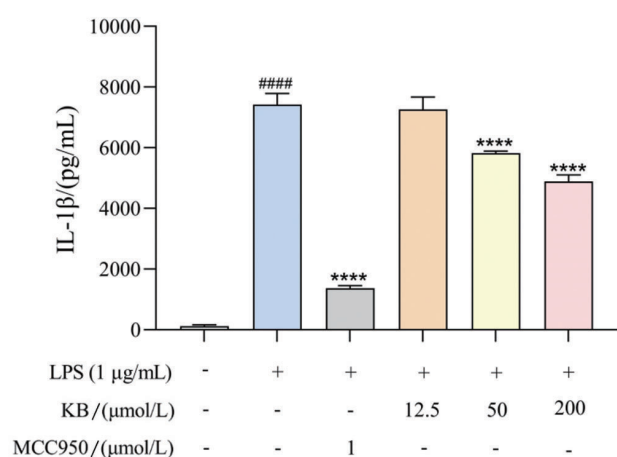
与对照组比较,^a*P*<0.05;与LPS组比较,^b*P*<0.05。

2.5 KB对LPS联合ATP刺激THP-1细胞培养上清液中IL-1 β 含量的影响

如图5所示,与对照组比较,LPS+MCC950组细胞培养上清液中IL-1 β 分泌量增加(*P*<0.000 1);与LPS组比较,LPS+MCC950组、LPS+KB中、高剂量组IL-1 β 分泌量降低(*P*<0.000 1)。

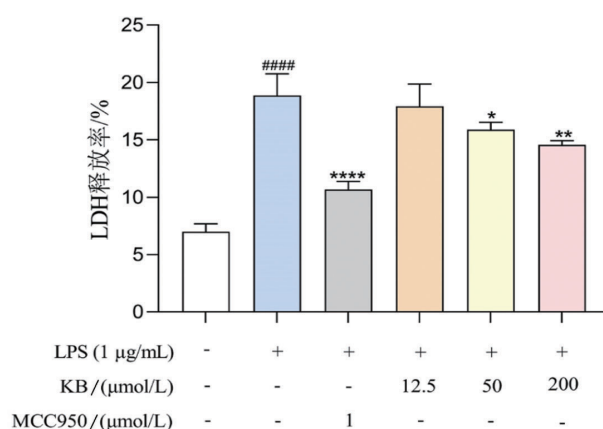
2.6 KB对LPS联合ATP刺激THP-1细胞LDH释放及细胞凋亡的影响

如图6所示,与对照组比较,LPS组细胞中LDH释放显著增加(*P*<0.000 1);与LPS组比较,LPS+MCC950组、LPS+KB中、高剂量组LDH释放减少(*P*<0.05)。如图7所示,对照组细胞状态良好,极少凋亡现象;而LPS组Annexin V+/7-AAD-及Annexin V+/7-AAD+细胞百分比升高(*P*<0.05),提示细胞凋亡增加,MCC950及不同剂量KB处理后均不同程度地抑制了细胞凋亡(*P*<0.05)。



与对照组比较, **** $P < 0.0001$; 与 LPS 组比较, **** $P < 0.0001$ 。

图5 KB对LPS联合ATP刺激THP-1细胞上清液中IL-1 β 含量的影响



与对照组比较, **** $P < 0.0001$; 与 LPS 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。

图6 KB对LPS联合ATP刺激THP-1细胞LDH释放率的影响

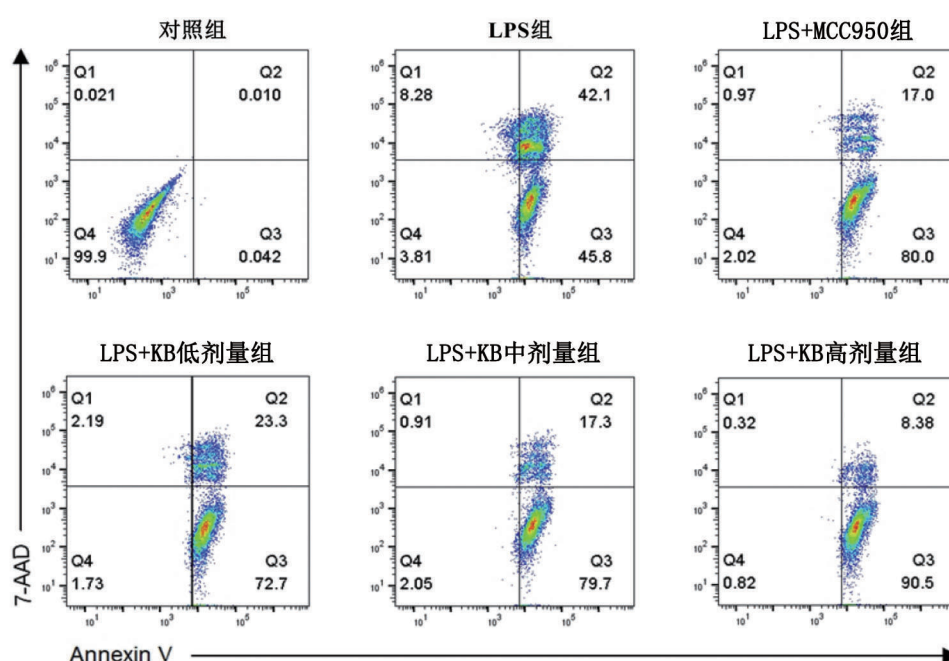


图7 KB对LPS联合ATP刺激THP-1细胞凋亡的影响

3 讨论

炎症小体是由细胞质内模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)参与组装的蛋白复合体,主要存在于攻击病原体的先天免疫细胞中,它可感知外源性病原体或内源性危险信号,并通过两种不同的信号通路—依赖Caspase-1的经典途径及依赖Caspase-4/5/11的非经典途径诱导细胞焦亡^[14]。发现能够抑制炎症小体和调控细胞焦亡的药物对于

感染性疾病尤其脓毒症等重症感染的防治具有重要意义。

KB是基于亲和生物传感器的筛选和定向分离技术从中药地骨皮中获得的一种生物碱,可调控过度激活的炎症反应,对重度和极重度脓毒症模型动物具有保护作用^[15]。本研究CCK-8细胞活性检测结果显示,不同浓度KB对细胞活力未产生明显影响,提示KB无明显细胞毒性。目前已有两项多中心、随机、双盲、安慰剂对照的前期临床试验探讨了KB

在脓毒症患者中的安全性、耐受性及药代动力学特点,结果显示KB安全性及耐受性均良好,显示了其潜在的应用前景^[16-17]。

本研究探讨了KB是否可通过影响NLRP3炎症小体及焦亡来缓解LPS诱导的巨噬细胞炎症,结果显示LPS联合ATP刺激后,巨噬细胞中炎症小体重要组分NLRP3、Caspase-1及IL-1 β 表达显著增加,在蛋白水平,酶原形式的Caspase-1及切割后的Cleaved Caspase-1表达也增加,细胞上清液中活性形式的IL-1 β 分泌量增多,这与以往研究^[18]结果一致。KB处理后上述炎症小体组分表达下降,说明KB可能抑制NLRP3炎症小体的激活。但各组细胞间ASC在mRNA及蛋白表达水平均无显著差异,可能是由于炎症小体的激活主要取决于ASC斑点是否形成及其寡聚化程度,而并非ASC本身表达量的变化,这一推测有待通过免疫荧光来分析NLRP3炎症小体的组装情况来阐明^[19]。以往有关KB药理学机制的研究很少,有研究发现,对脓毒症小鼠腹腔注射KB后,肺泡壁充血、水肿、增厚及肺组织炎性细胞浸润、渗出等病理损伤程度有所减轻,髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性下降,血浆、肺泡灌洗液及肺组织匀浆中的肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-1 β 浓度均显著降低,且核转录因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)活性及诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)蛋白表达明显下调,肺内血管内皮细胞表面细胞间黏附分子-1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)表达减少^[12]。另外,KB可通过结合LPS来改善脓毒症小鼠肝组织损伤,降低肝组织中NF- κ B的活性及TNF- α 、IL-1 β 水平^[20]。以上研究结果说明KB对于感染性疾病具有一定的抗炎作用,且可能通过影响NF- κ B通路及其下游的NLRP3炎症小体表达,从而产生抗炎作用。

Caspase-1激活的另一重要作用是引起细胞焦亡,GSDMD被证实是焦亡最终的效应蛋白^[21],其全长蛋白在被剪切前是无活性的,被Caspase-1剪切后可产生大小约31 ku有活性的N端片段,后者可与细胞膜上的磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸等结合,使细胞膜形成大小为10~14 nm的孔,导致细胞内容物流出,诱导产生焦亡^[14, 22]。本研究结果显示,LPS联合ATP刺激后细胞焦亡相关蛋白GSDMD、GSD-

MD-NT、HMGB-1表达上调,而KB能够显著抑制上述焦亡相关蛋白的表达,同时LDH等胞质内容物释放减少,Annexin V-PE及7AAD染色双阳性的细胞减少。既往有研究显示,KB干预后脓毒症小鼠肺组织中HMGB-1蛋白表达水平显著降低^[23],而HMGB1可介导LPS通过晚期糖基化终产物特异性受体(advanced glycosylation end product specific receptor, AGER)递送到胞质激活Caspase-11依赖性炎症小体,导致IL-1 β 和IL-18的成熟、细胞焦亡和损伤相关分子模式的释放。因此,KB有可能通过影响细胞焦亡而发挥抗炎作用。

MCC950是目前已知针对NLRP3炎症小体的特异性抑制剂,主要通过NLRP3 NACHT结构域中的Walker B基序结合,阻断ATP水解而抑制炎症小体的形成^[24]。MCC950还可抑制NLRP3/ASC/Caspase-1/GSDMD-N轴激活减少焦亡,从而抑制小鼠主动脉粥样硬化的形成^[25]。本研究以MCC950为参照,发现KB有类似作用,可抑制NLRP3炎症小体的激活及焦亡蛋白的过表达,阻碍细胞焦亡的发生。

综上所述,KB能够通过影响NLRP3/Caspase-1炎症小体及后续的GSDMD细胞焦亡而抑制LPS诱导的巨噬细胞炎症,但需进一步通过动物实验来证实相关机制,为脓毒症等重症感染性疾病的药理学研究及临床应用提供更多参考依据。

参考文献:

- [1] SHARMA B R, KANNEGANTI T D. NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases[J]. Nature immunology, 2021, 22(5): 550-559.
- [2] XU J, ZHOU Z, ZHENG Y, et al. Roles of inflammasomes in viral myocarditis[J]. Frontiers in cellular and infection microbiology, 2023, 13: 1149911.
- [3] WU J, CAI J, TANG Y, et al. The noncanonical inflammasome-induced pyroptosis and septic shock[J]. Seminars in immunology, 2023, 70: 101844.
- [4] SWANSON K V, DENG M, TING J P. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics[J]. Nature reviews immunology, 2019, 19(8): 477-489.
- [5] COLL R C, SCHRODER K, PELEGRIN P. NLRP3 and

- pyroptosis blockers for treating inflammatory diseases[J]. Trends in pharmacological sciences, 2022, 43(8): 653-668.
- [6] FU J, WU H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation[J]. Annual review of immunology, 2023, 41: 301-316.
- [7] VASUDEVAN S O, BEHL B, RATHINAM V A. Pyroptosis-induced inflammation and tissue damage[J]. Seminars in immunology, 2023, 69: 101781.
- [8] KURIAKOSE T, KANNEGANTI T D. Pyroptosis in anti-viral immunity[J]. Current topics in microbiology and immunology, 2023, 442: 65-83.
- [9] 孙 毅, 杨 毅, 彭 菲. Gasdermin 蛋白家族在脓毒症细胞焦亡中的作用研究进展[J]. 中华重症医学电子杂志, 2023, 9(4): 379-384.
- [10] PARK E, KIM J, KIM M C, et al. Anti-osteoporotic effects of kukoamine b isolated from lycii radices cortex extract on osteoblast and osteoclast cells and ovariectomized osteoporosis model mice[J]. International journal of molecular sciences, 2019, 20(11): 2784.
- [11] LIU X, ZHENG X, WANG N, et al. Kukoamine B, a novel dual inhibitor of LPS and CpG DNA, is a potential candidate for sepsis treatment[J]. British journal of pharmacology, 2011, 162(6): 1274-1290.
- [12] 张锦丽, 秦魏婷, 吕汪洄, 等. 苦柯胺 B 对脓毒症小鼠肺脏炎症反应的抑制作用[J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26(7): 493-497.
- [13] 吕汪洄, 秦魏婷, 张锦丽, 等. 苦柯胺 B 对脂多糖诱导的脓毒症小鼠小肠炎症反应的抑制作用及分子机制[J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27(2): 121-126.
- [14] BURDETTE B E, ESPARZA A N, ZHU H, et al. Gasdermin D in pyroptosis[J]. Acta pharmaceutica sinica B, 2021, 11(9): 2768-2782.
- [15] 杨景程, 刘 鑫, 郑新川, 等. 苦柯胺 B 拮抗细菌内毒素和 CpG DNA 的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(11): 1062-1066.
- [16] HU X Y, ZHANG W, WANG D, et al. Safety, tolerability, pharmacokinetics, and efficacy of kukoamine B in patients with sepsis: A randomized phase IIa trial[J]. Journal of critical care, 2023, 76: 154294.
- [17] LIU H, ZHAO Q, YUAN Y, et al. First-in-human safety, tolerability, and pharmacokinetics of single- dose kukoamine B mesylate in healthy subjects: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase I study[J]. Infectious diseases and therapy, 2024, 13(2): 361-371.
- [18] WANG X, WU F P, HUANG Y R, et al. Matrine suppresses NLRP3 inflammasome activation via regulating PTPN2/JNK/SREBP2 pathway in sepsis[J]. Phytomedicine, 2023, 109: 154574.
- [19] SU J, YANG F, KANG X, et al. Chalcone derivatives from abelmoschus manihot seeds restrain NLRP3 inflammasome assembly by inhibiting ASC oligomerization[J]. Frontiers in pharmacology, 2022, 13: 932198.
- [20] QIN W T, WANG X, SHEN W C, et al. A novel role of kukoamine B: Inhibition of the inflammatory response in the livers of lipopolysaccharide-induced septic mice via its unique property of combining with lipopolysaccharide[J]. Experimental and therapeutic medicine, 2015, 9(3): 725-732.
- [21] HE W T, WAN H, HU L, et al. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1beta secretion[J]. Cell research, 2015, 25(12): 1285-1298.
- [22] LIU X, ZHANG Z, RUAN J, et al. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores[J]. Nature, 2016, 535(7610): 153-158.
- [23] 曾 鸣, 张玉坤, 吴永昌, 等. 苦柯胺 B 通过抑制高迁移率族蛋白 B1/核转录因子- κ B 信号通路减轻脓毒症小鼠肺损伤[J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28(11): 994-997.
- [24] COLL R C, HILL J R, DAY C J, et al. MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition[J]. Nature chemical biology, 2019, 15(6): 556-559.
- [25] ZENG W, WU D, SUN Y, et al. The selective NLRP3 inhibitor MCC950 hinders atherosclerosis development by attenuating inflammation and pyroptosis in macrophages[J]. Scientific reports, 2021, 11(1): 19305.
- 本文引用格式:
宁 璞, 柯 蕊, 和 平, 等. 苦柯胺 B 调控 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 焦亡通路减轻脂多糖诱导的巨噬细胞炎症[J]. 广西医科大学学报, 2024, 41(7): 1009-1016. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.07.010
NING P, KE R, HE P, et al. Kukoamine B regulates pyroptosis mediated by NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway to alleviate lipopolysaccharide-induced macrophage inflammation[J]. Journal of Guangxi medical university, 2024, 41(7): 1009-1016. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.07.010