

# 草苻蓉多糖抑制 J774A.1 巨噬细胞炎症小体活化及细胞焦亡机制研究

Study on the mechanism of *Boschniakia rossica* polysaccharide inhibiting the activation of inflammasomes and pyroptosis in J774A.1 macrophages

张天<sup>1</sup> 徐慧<sup>2</sup> 全吉淑<sup>2</sup> 金爱花<sup>1</sup>

ZHANG Tian<sup>1</sup> XU Hui<sup>2</sup> QUAN Jishu<sup>2</sup> JIN Aihua<sup>1</sup>

(1. 延边大学附属医院(延边医院), 吉林 延吉 133000; 2. 延边大学医学院, 吉林 延吉 133000)

(1. Yanbian University Hospital, Yanji, Jilin 133000, China;

2. Medical College of Yanbian University, Yanji, Jilin 133000, China)

**摘要:**目的:探讨草苻蓉多糖(BRPS)对脂多糖(LPS)联合三磷酸腺苷(ATP)诱导的小鼠 J774A.1 巨噬细胞炎症小体活化及细胞焦亡的抑制作用。方法:LPS 联合 ATP 刺激 J774A.1 巨噬细胞,建立巨噬细胞核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)炎症小体模型。用细胞增殖毒性试剂盒检测 J774A.1 细胞存活率,微板法测定细胞培养液中乳酸脱氢酶(LDH)的释放,免疫荧光染色法检测细胞膜损伤情况,酶联免疫吸附法检测细胞培养液中白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )水平,免疫印迹法测定 J774A.1 细胞 NLRP3、Caspase-1、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、IL-1 $\beta$ 、消素 D(GSDMD)以及核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)蛋白的表达情况。结果:BRPS 能增高 LPS/ATP 诱导的 J774A.1 巨噬细胞存活率,降低细胞培养液中 LDH 释放,减少细胞膜损伤,下调细胞 NLRP3 蛋白表达,上调 Caspase-1 前体蛋白水平,下调 IL-1 $\beta$  以及 GSDMD N 端活性片段水平。此外,BRPS 下调 J774A.1 巨噬细胞 NF- $\kappa$ B 核转位及其磷酸化水平,以及细胞外信号调节蛋白激酶、c-Jun 氨基末端激酶、p38 MAPK 磷酸化水平。结论:BRPS 可抑制 LPS/ATP 诱导的小鼠 J774A.1 巨噬细胞炎症小体活化和焦亡,其作用可能与调控 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路有关。

**关键词:**草苻蓉;多糖;巨噬细胞;炎症小体;信号通路

**Abstract: Objective:** This study aimed to investigate the inhibitory effect of *Boschniakia rossica* polysaccharides (BRPS) on the activation of inflammasome and pyroptosis of J774A.1 macrophages induced by lipopolysaccharide (LPS) and adenosine triphosphate (ATP). **Methods:** The nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome model was established by stimulating J774A.1 macrophages with LPS and ATP. Cell viability was detected using the cell counting kit-8, the release of lactate dehydrogenase (LDH) was tested with the microplate method, the cellular level of NLRP3 and cell membrane damage were detected using the immunofluorescence staining method, and the secretion of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) was measured by the enzyme-linked immunosorbent assay. The protein expressions of NLRP3, caspase-1, apoptosis associated speck-like protein containing caspase recruitment domains (ASC), IL-1 $\beta$ , gasdermin D (GSDMD), as well as the nuclear factors- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and mitogen activated protein kinase (MAPK) was determined with the western blotting method. **Results:** BRPS could increase the cell viability, reduce the release of LDH in the culture medium, alleviate the membrane damage of macrophages, down-regulate the protein expression of NLRP3, up-regulate the level of caspase-1 precursor, and down-regulate the levels of IL-1 $\beta$  and GSDMD N-terminal active fragment in the model group. In addition, BRPS suppressed the nuclear translocation and phosphorylation of NF- $\kappa$ B, as well as the phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase, c-Jun amino terminal kinase, and p38 MAPK. **Conclusion:** BRPS inhibit LPS/ATP-induced activation of macrophage inflammasome and

**基金项目:**国家自然科学基金地区科学基金项目(编号:82060113)

**作者简介:**张天,女,延边大学在读硕士研究生。

**通信作者:**全吉淑(1968—),女,延边大学教授,博士。

E-mail: quanjs@ybu.edu.cn

金爱花(1984—),女,延边医院检验师,硕士。

E-mail: aihua1028@sina.com

**收稿日期:**2023-08-26 **改回日期:**2024-04-03

pyroptosis in mouse J774A.1 cells through regulating the NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways.

**Keywords:** *Boschnikia rossica*; polysaccharides; macrophages; inflammasome; signaling pathways

草苈蓉(*Boschnikia rossica* Fedtsch. et Flerov)属于列当科寄生植物,主要分布在中国大兴安岭和长白山一带,在俄罗斯、朝鲜和日本也有少量分布<sup>[1]</sup>。草苈蓉又称“不老草”,在民间常作为肉苈蓉的代用品,2019年卫健委将肉苈蓉纳入药食同源物质名单,对其开展按照传统药食两用物质生产经营试点工作。草苈蓉全草可入药,具有抗氧化、抗肿瘤等多种生物活性作用<sup>[2-4]</sup>。草苈蓉多糖(*Boschnikia rossica* polysaccharides, BRPS)是草苈蓉中含量最多且无毒性的水溶性有效成分之一,具有保肝、抗炎等多种药理作用<sup>[5-7]</sup>。BRPS为从草苈蓉全草中分离纯化得到的中性多糖,相对分子质量为49 000。其单糖组成为葡萄糖、半乳糖、甘露糖、木糖(摩尔比为4.0:3.1:1.0:0.6),是以Glc和Gal为主链成分、由 $\beta$ -1,4和 $\beta$ -1,6糖苷键连接的分支结构<sup>[7]</sup>,能够有效抑制脂多糖(LPS)诱导的巨噬细胞炎症反应,其抗炎作用与其抑制TLR4信号通路密切相关<sup>[8-9]</sup>。

炎症是多种疾病的早期症状,属于人体正常的免疫防御反应之一,但过度的炎症反应会导致免疫系统失调,最终引起疾病的恶化,严重威胁人类的生命健康<sup>[10]</sup>。炎症小体是多种蛋白质组成的高分子复合体,被认为是炎症反应的核心<sup>[11]</sup>。其中,核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体是近年来研究最多且最为透彻的一种炎症小体,在多种炎症性疾病发展中发挥着关键作用,包括哮喘及过敏性气道炎症、阿尔兹海默症、2型糖尿病、肝炎、动脉粥样硬化症和心肌梗死等<sup>[12-14]</sup>。NLRP3炎症小体一般需要受到第一信号如LPS、第二信号如ATP的两步刺激才能被激活,在这些双重信号刺激下,NLRP3作为胞浆内受体蛋白,与凋亡相关斑点样蛋白(ASC)和炎性Caspase-1相互聚集并组装为炎症小体,继而被激活,最终引发细胞焦亡,并进一步增强炎症反应<sup>[15-17]</sup>。

研究拟利用LPS和三磷酸腺苷(ATP)刺激小鼠J774A.1细胞建立巨噬细胞炎症小体模型,探讨BRPS对NLRP3炎症小体组装、激活以及其引发的细胞焦亡的抑制作用,并利用不同通路抑制剂探究这些通路在纠正炎症失调中的作用机制,旨在为草苈蓉在炎症性疾病防治中的应用提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 材料与试剂

J774A.1巨噬细胞:美国ATCC公司;

BRPS:延边大学医学院生物化学与分子生物学研究室全吉淑教授惠赠;

LPS、ATP、 $\beta$ -actin抗体、山羊抗兔二抗、兔抗小鼠二抗:美国Sigma-Aldrich公司;

细胞增殖毒性试剂盒(CCK-8)试剂盒:美国APEX-BIO公司;

乳酸脱氢酶(LDH)测试盒:南京建成生物科技有限公司;

Hoechst33342/PI双染试剂盒、核蛋白提取试剂盒:北京索莱宝有限公司;

NLRP3、ASC抗体:美国Abcam公司;

Caspase-1、IL-1 $\beta$ 、消皮素D(GSDMD)、核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)、Lamin B1、细胞外信号调节蛋白激酶(ERK)、c-Jun N末端激酶(JNK)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38)、p-ERK、p-JNK、p-p38抗体:美国CST公司;

IL-1 $\beta$ 酶联免疫吸附分析(ELISA)试剂盒:美国RayBiotech公司。

#### 1.1.2 主要仪器

无菌超净台:AURA Mini型,美国BIOAIR公司;

CO<sub>2</sub>培养箱:Thermo 371型,美国Thermo Fisher公司;

酶标仪:RT-2100型,美国Bio-Tek公司;

电泳仪:Mini-PROTEAN型,美国Bio Rad公司;

化学发光凝胶成像系统:Abby型,美国Protein Simple公司。

## 1.2 试验方法

1.2.1 细胞培养 将小鼠J774A.1巨噬细胞置于含有10%胎牛血清和1%双抗(青霉素、链霉素)的高糖DMEM培养液中,于37℃、5%的CO<sub>2</sub>条件下进行常规培养<sup>[9]</sup>。

1.2.2 细胞分组及处理 选取增殖活跃的对数生长期J774A.1细胞,调整密度为 $5 \times 10^4$ 个/mL,接种于96孔板中。待细胞贴壁后,随机分为正常组、模型组(LPS+ATP组)和BRPS低、中、高剂量组(又称BRPS25、BRPS50和BRPS100组, BRPS质量浓度分别为25, 50, 100 mg/L)<sup>[8-9]</sup>。模型组加入DMEM培养液培养24 h待细胞贴壁,加入含有200  $\mu$ g/L LPS的无血清DMEM培养液培养12 h,随后更换含有2 mmol/L ATP的无血清DMEM培养液处理30 min; BRPS组加入含有相应质量浓度BRPS的无血清DMEM培养液作用24 h待细胞贴壁,加入含有200  $\mu$ g/L LPS的无血清DMEM培养液培养12 h,随后更换含有2 mmol/L ATP的无血清DMEM培养液处理30 min。正常组加入DMEM培养液培养24 h待细胞贴壁,更换无血清DMEM培养液培养12 h,随后更换新鲜的无血清DMEM培养液处理30 min。

1.2.3 CCK-8 法检测 J774A.1 细胞活性 将 J774A.1 细胞接种于 96 孔板中,细胞分组及处理同 1.2.2。每组设 6 个复孔。每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 试剂,于培养箱中放置 2 h,用酶标仪测定 492 nm 处吸光值,计算细胞存活率<sup>[8-9]</sup>。

1.2.4 LDH 法检测 J774A.1 细胞毒性 将 J774A.1 细胞接种于 6 孔板中,细胞分组及处理同 1.2.2。收集各孔细胞培养液,离心收集上清,参照 LDH 试剂盒说明书检测培养液上清中 LDH 活性<sup>[18]</sup>。

1.2.5 Hoechst/PI 荧光染色法检测 J774A.1 细胞膜完整性 将 J774A.1 细胞接种于 6 孔板中,细胞分组及处理同 1.2.2。清洗细胞,进行 Hoechst33342 染色,再进行 PI 染色,封闭,置于荧光倒置显微镜下观察<sup>[18-19]</sup>。

1.2.6 免疫印迹法检测 J774A.1 细胞炎症小体以及焦亡相关蛋白表达 将 J774A.1 细胞接种于 100 mm 培养皿中,细胞分组以及处理同 1.2.2。收集细胞,冰浴裂解,离心收集细胞总蛋白,利用核蛋白提取试剂盒提取细胞核蛋白<sup>[18]</sup>。进行 SDS-PAGE 电泳,随后转膜至 PVDF 膜上,脱脂牛奶封闭 1 h,4  $^{\circ}$ C 一抗过夜,相应二抗孵育 2 h,ECL 显色,用全自动化学成像仪分析相对灰度比值<sup>[18]</sup>。

1.2.7 ELISA 法检测 J774A.1 细胞 IL-1 $\beta$  分泌 细胞分组以及处理同 1.2.2。收集细胞培养液上清,参照 ELISA 试剂盒说明书检测小鼠 J774A.1 细胞 IL-1 $\beta$  分泌情况<sup>[18]</sup>。

1.2.8 统计学分析处理 试验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 23.0 和 GraphPad Prism 9.0 软件进行 *t* 检验以及方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 BRPS 对 LPS+ATP 诱导的 J774A.1 细胞毒性的影响

巨噬细胞为一类免疫细胞,可激活机体免疫并调节炎症反应,从而发挥其功能<sup>[8-10]</sup>。当机体受到大量 LPS 的持续攻击时,所产生的促炎因子会过度激活巨噬细胞,引起炎症反应的失调,最终导致炎症相关疾病的恶化<sup>[8-10]</sup>。炎症小体为炎症反应的核心环节,是多种炎症性疾病的重要发病机制<sup>[11,18]</sup>。在小鼠 J774A.1 巨噬细胞中,LPS 和 ATP 可共同诱导 NLRP3 炎症小体的组装及其活化,引发细胞焦亡,细胞膜发生破裂,导致细胞内 LDH 大量释放<sup>[18]</sup>。由图 1 可知,与正常组比较,模型组小鼠 J774A.1 细胞存活率下降( $P < 0.05$ ),细胞培养液中 LDH 活性增高( $P < 0.05$ );而与模型组比较,BRPS 低、中、高剂量组 J774A.1 细胞存活率显著升高( $P < 0.05$ ),培养液中 LDH 活性显著降低( $P < 0.05$ )。综上,BRPS 可减轻 LPS 与 ATP 联合诱导的 J774A.1 巨噬细胞损伤及死亡。

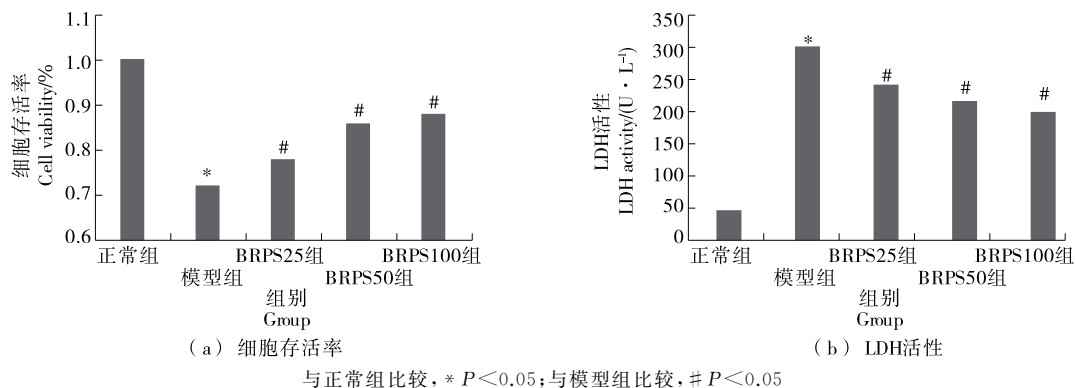


图 1 BRPS 对 J774A.1 细胞存活率和 LDH 释放的影响

Figure 1 Effects of BRPS on the cell viability and LDH release of J774A.1 macrophages

### 2.2 BRPS 对 LPS+ATP 诱导的 J774A.1 细胞膜损伤的影响

细胞焦亡是一种新型的细胞程序性坏死,以形成细胞膜微孔、细胞肿胀、胞膜破裂、最终导致炎症因子和细胞内容物的释放为主要特征<sup>[20]</sup>。Hoechst/PI 双染试剂盒中的 Hoechst 染液能够穿透细胞膜,且细胞膜破损的细胞染色显著增强,呈强蓝色荧光。PI 染液不能穿透完整细胞膜,无法染色细胞膜保持完整的细胞,但可以将细胞膜破损的细胞染为红色荧光<sup>[18,21]</sup>。由图 2 可知,正常组 J774A.1 细胞 Hoechst 染色均匀,多为弱蓝色荧光,PI 染色仅可见少量细胞呈红色荧光,提示细胞膜完整;模型

组细胞 Hoechst 染色不均,大量细胞呈强蓝色荧光,可见大量细胞呈红色荧光,提示模型组细胞发生细胞膜损伤较严重;BRPS 各剂量组细胞呈现较弱的细胞膜损伤,Hoechst 和 PI 双染细胞较模型组减少。综上,BRPS 可减轻 LPS 与 ATP 诱导的 J774A.1 巨噬细胞膜损伤。

### 2.3 BRPS 对 LPS+ATP 诱导 J774A.1 细胞炎症小体组成蛋白表达的影响

炎症小体是细胞内多种蛋白质组成的复合物,其受体的成分是由核苷酸结合寡聚化结构域样受体(NLR)形成的,为胞浆内的模式识别受体,起着传感器作用,其中,NLRP3 是研究最为广泛和深入的 NLR<sup>[22]</sup>。NLRP3 炎

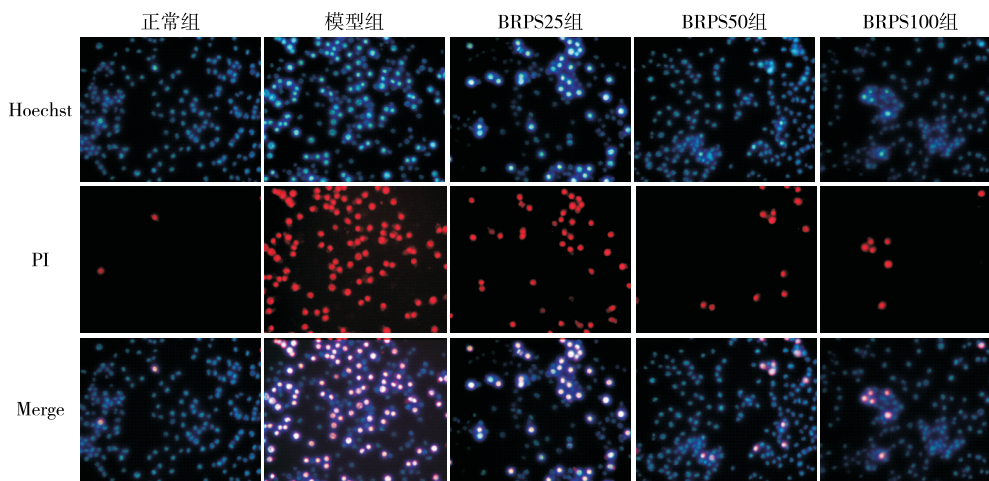
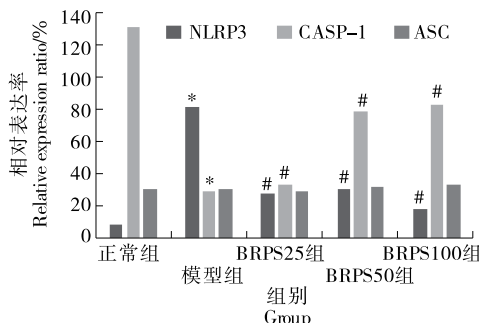


图 2 J774A.1 巨噬细胞 Hoechst/PI 荧光染色结果

Figure 2 Hoechst/PI fluorescence staining of J774A.1 macrophages (200×)

炎症小体是由传感蛋白 NLRP3、接头蛋白 ASC 以及炎性 Caspase-1 共同形成的多聚体蛋白复合物<sup>[12-14]</sup>。经典炎症小体通路中,炎症小体的激活依赖于炎性 Caspase-1,该前体蛋白经激活后可产生成熟的活化片段<sup>[23]</sup>。因其活化片段相对分子质量小,不好捕捉,故试验检测 Caspase-1 前体(CASP-1)的表达来衡量 NLRP3 炎症小体的激活水平。由图 3 可知,与正常组比较,模型组 J774A.1 细胞

NLRP3 蛋白表达水平显著升高( $P < 0.05$ ),Caspase-1 前体水平显著降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,BRPS 各剂量组 J774A.1 细胞 NLRP3 蛋白表达水平显著减低( $P < 0.05$ ),Caspase-1 前体水平显著升高( $P < 0.05$ )。BRPS 各剂量组 J774A.1 细胞 ASC 蛋白表达水平有微弱升高趋势。综上,BRPS 可下调 LPS 与 ATP 诱导的 J774A.1 巨噬细胞炎症小体的组装及其活化水平。



(a) 免疫印迹检测

(b) 灰度比值

与正常组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$

图 3 BRPS 对 J774A.1 细胞炎症小体组成蛋白表达的影响

Figure 3 Effects of BRPS on the expression of inflammasome proteins in J774A.1 cells

#### 2.4 BRPS 对 LPS + ATP 诱导的 J774A.1 细胞 IL-1 $\beta$ 和 GSDMD 剪切的影响

炎症小体激活生成的 Caspase-1 活化片段,不仅使 IL-1 $\beta$  剪切为有活性的 IL-1 $\beta$  成熟片段(M-IL-1 $\beta$ );还将 GSDMD 切割形成 N 端活性片段(GSDMD-N),使其在胞膜上形成小孔,继而引起细胞肿胀破裂,最终导致 IL-1 $\beta$  活化片段、LDH 及其他可溶性胞质内容物的大量释放,引起细胞焦亡<sup>[18,24]</sup>。由图 4 可知,与正常组比较,模型组 GSDMD-N 和 IL-1 $\beta$  活性片段水平显著升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,BRPS 各剂量组 GSDMD-N 和 IL-

1 $\beta$  活性片段水平显著降低( $P < 0.05$ ),表明 BRPS 可下调 J774A.1 巨噬细胞 IL-1 $\beta$  成熟以及 GSDMD 介导的细胞焦亡。

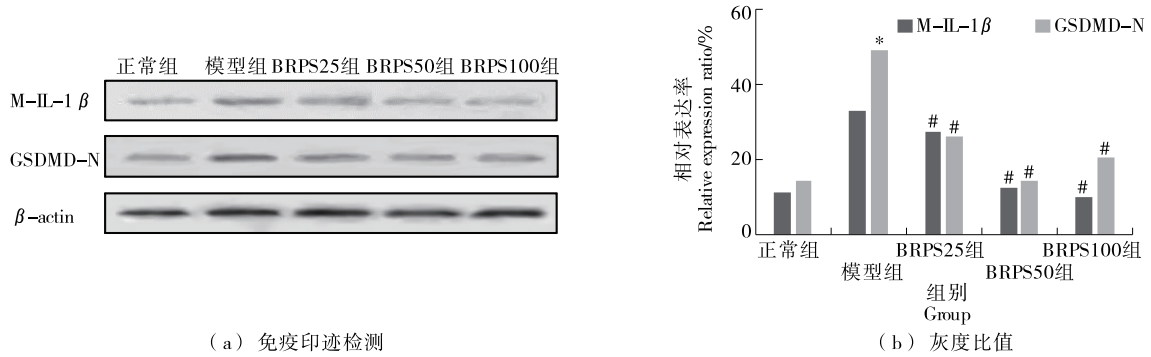
#### 2.5 BRPS 对 LPS + ATP 诱导的 J774A.1 细胞 NF- $\kappa$ B 核转位及磷酸化的影响

研究<sup>[9]</sup>表明,BRPS 可通过调控 TLR4 通路抑制 J774A.1 细胞炎症反应。因此,推测 BRPS 可能通过调控 NF- $\kappa$ B 信号通路抑制 J774A.1 细胞 NLRP3 炎症小体的组装与激活,并抑制细胞焦亡。NF- $\kappa$ B 为二聚体,主要由 p65 及 p50 构成,能够参与并调控机体的免疫反应及炎症



反应<sup>[18,25]</sup>。大多数正常细胞内 NF-κB 以非活化的状态存在于细胞质内,但巨噬细胞受到 LPS 刺激后,NF-κB 被磷酸化并进行核转移,从而促进炎症因子的合成<sup>[18,24]</sup>。由图 5 可知,与正常组比较,模型组 J774A.1 细胞核 NF-

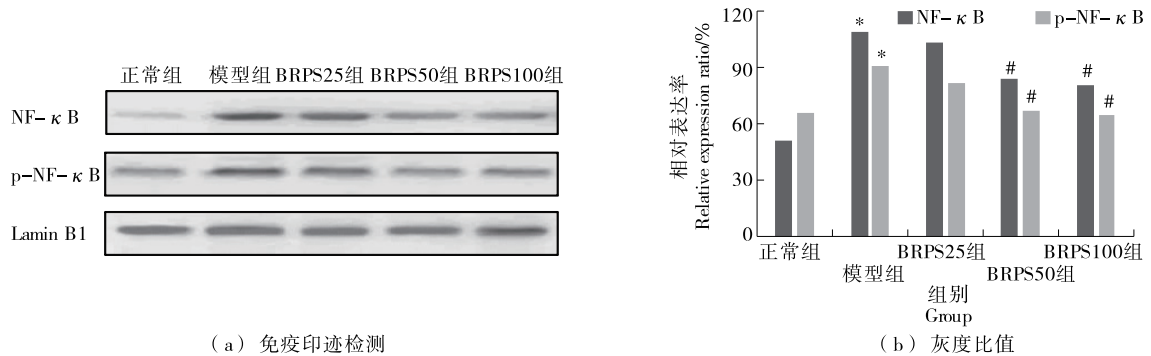
κB 和 p-NF-κB 水平显著升高( $P < 0.05$ );与模型组比较, BRPS 中、高剂量组细胞核 NF-κB 和 p-NF-κB 水平显著降低( $P < 0.05$ )。综上, BRPS 抗巨噬细胞炎症小体作用可能与其抑制 NF-κB 信号通路相关。



与正常组比较, \*  $P < 0.05$ ;与模型组比较, #  $P < 0.05$

图 4 BRPS 对 J774A.1 细胞 IL-1β 和 GSDMD 剪切的影响

Figure 4 Effects of BRPS on the cleavages of IL-1β and GSDMD in J774A.1 cells



与正常组比较, \*  $P < 0.05$ ;与模型组比较, #  $P < 0.05$

图 5 BRPS 对 J774A.1 细胞 NF-κB 核转位及磷酸化的影响

Figure 5 Effects of BRPS on the nuclear translocation and phosphorylation of NF-κB in J774A.1 cells

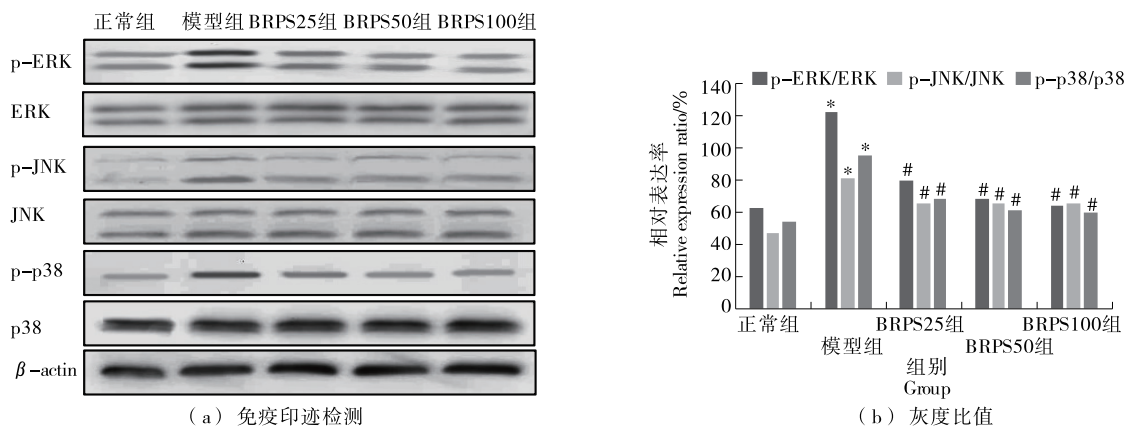
### 2.6 BRPS 对 LPS+ATP 诱导的 J774A.1 细胞 MAPK 磷酸化的影响

MAPK 家族主要包括 JNK、ERK 和 p38 3 条信号通路,主要参与细胞表面到细胞核的信号传递过程,从而介导细胞的免疫防御反应<sup>[18,26]</sup>。当 LPS 诱导细胞免疫反应时,能够激活 MAPK 信号通路,并对 JNK、ERK 和 p38 进行磷酸化修饰,随后启动 IL-1β 等炎症因子的过量表达,从而调控细胞炎症反应<sup>[18,25]</sup>。由图 6 可知,与正常组比较,模型组 J774A.1 细胞 ERK、JNK、p38 磷酸化水平显著升高( $P < 0.05$ );与模型组比较, BRPS 各剂量组细胞 ERK、JNK、p38 磷酸化水平显著降低( $P < 0.05$ )。综上, BRPS 抗巨噬细胞炎症小体作用可能与其抑制 MAPK 信号通路相关。

### 2.7 BRPS 与 BAY11-7082 对 J774A.1 细胞 NF-κB 激活以及 IL-1β 成熟和分泌的影响

选用 NF-κB 抑制剂 BAY11-7082(BAY),进一步验证

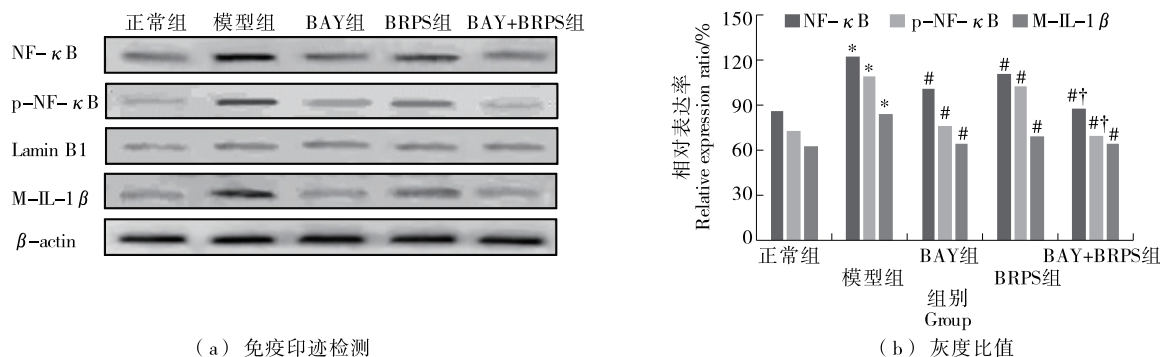
BRPS 通过调控 NF-κB 信号通路发挥抗炎症小体组装和激活的机制<sup>[27]</sup>。由图 3 和图 4 可知,各剂量 BRPS 对小鼠 J774A.1 巨噬细胞炎症小体的组装和激活均有抑制作用,但在趋势上,高剂量组比低、中剂量组有优势,因此,后续研究的 BRPS 干预剂量为 100 mg/L。由图 7 可知,与正常组比较,模型组 J774A.1 细胞核 NF-κB、p-NF-κB 及 IL-1β 蛋白水平显著增高( $P < 0.05$ );与模型组比较, BAY、BRPS、BAY+BRPS 组细胞核 NF-κB、p-NF-κB 及成熟 IL-1β 水平显著降低( $P < 0.05$ );与 BAY 组比较, BAY+BRPS 组细胞核 NF-κB、p-NF-κB 水平降低( $P < 0.05$ ),成熟 IL-1β 水平有微弱的下降趋势。由图 8 可知,与正常组比较,模型组 J774A.1 细胞培养液中 IL-1β 水平显著增高( $P < 0.05$ );与模型组比较, BAY、BRPS、BAY+BRPS 组细胞培养液中 IL-1β 水平显著降低( $P < 0.05$ )。综上, BRPS 通过下调 NF-κB 信号通路抑制 J774A.1 巨噬细胞炎症小体组装、激活以及细胞焦亡。



(a) 免疫印迹检测  
与正常组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$

图 6 BRPS 对 J774A.1 细胞 MAPK 磷酸化的影响

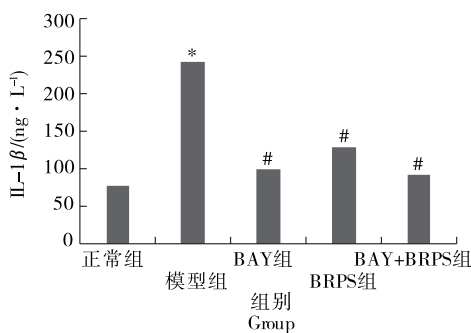
Figure 6 Effects of BRPS on the phosphorylation of MAPK proteins in J774A.1 cells



(a) 免疫印迹检测  
与正常组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$ ; 与 BAY 组比较, †  $P < 0.05$

图 7 BRPS 与 BAY 对 J774A.1 细胞 NF-κB 和 IL-1β 激活的影响

Figure 7 Effects of BRPS and BAY on the activation of NF-κB and IL-1β in J774A.1 cells



与正常组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$

图 8 BRPS 与 BAY 对 J774A.1 细胞 IL-1β 分泌的影响  
Figure 8 Effects of BRPS and BAY on the secretion of IL-1β in J774A.1 cells

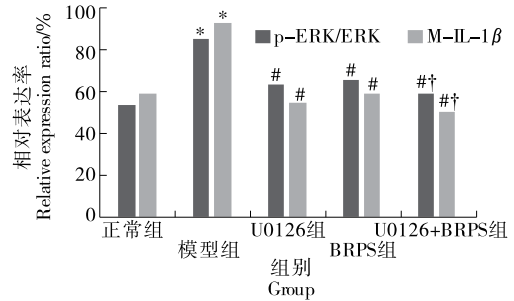
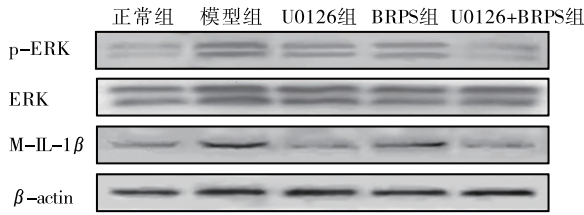
### 2.8 BRPS 与 U0126 对 J774A.1 细胞 ERK 激活以及 IL-1β 成熟和分泌的影响

选用 ERK 抑制剂 U0126 进一步验证 BRPS 通过调控 ERK 通路发挥抗炎小体组装和激活的机制<sup>[28]</sup>。由图 9 可知,与正常组比较,模型组 J774A.1 细胞 p-ERK 及

成熟 IL-1β 水平显著增高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, U0126、BRPS、U0126 + BRPS 组细胞 p-ERK 及成熟 IL-1β 水平显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与 U0126 组比较, U0126 + BRPS 组 J774A.1 细胞 p-ERK 及成熟 IL-1β 水平降低 ( $P < 0.05$ )。由图 10 可知,与正常组比较,模型组 J774A.1 细胞培养液中 IL-1β 水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, U0126、BRPS、U0126 + BRPS 组细胞培养液中 IL-1β 水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。综上, BRPS 可通过下调 ERK 信号通路抑制 J774A.1 巨噬细胞炎症小体组装、激活以及细胞焦亡。

### 2.9 BRPS 与 SP600125 对 J774A.1 细胞 JNK 激活及 IL-1β 成熟和分泌的影响

选用 JNK 抑制剂 SP600125 (SP) 进一步验证 BRPS 通过调控 JNK 通路发挥抗巨噬细胞炎症小体组装和激活的机制<sup>[29]</sup>。由图 11 可知,与正常组比较,模型组 J774A.1 细胞 p-JNK 及成熟 IL-1β 水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, SP、BRPS、SP + BRPS 组细胞 p-JNK 水平显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与 SP 组比较, SP + BRPS 组细胞 p-JNK

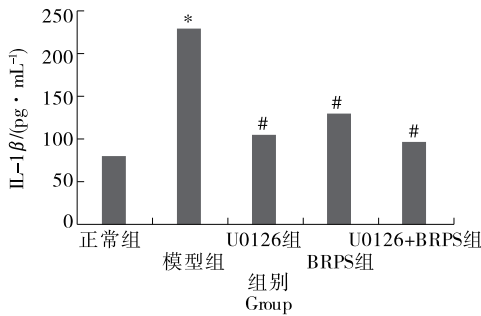


(a) 免疫印迹检测

与正常组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$ ; 与 U0126 组比较, †  $P < 0.05$

图 9 BRPS 与 U0126 对 J774A.1 细胞 ERK 和 IL-1β 激活的影响

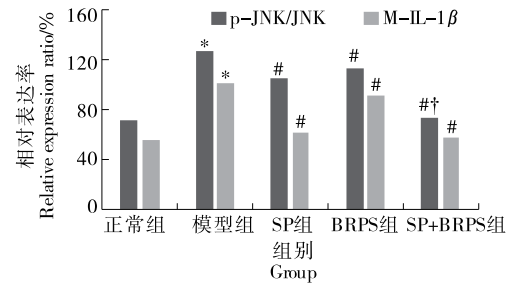
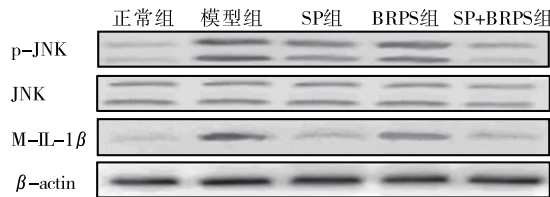
Figure 9 Effects of BRPS and U0126 on the activation of ERK and IL-1β in J774A.1 cells



与正常组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$

图 10 BRPS 与 U0126 对 J774A.1 细胞 IL-1β 分泌的影响

Figure 10 Effects of BRPS and U0126 on the secretion of IL-1β in J774A.1 cells

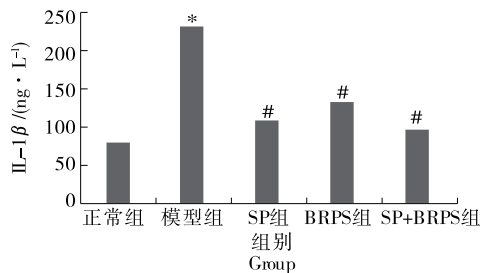


(a) 免疫印迹检测

与正常组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$ ; 与 SP 组比较, †  $P < 0.05$

图 11 BRPS 与 SP 对 J774A.1 细胞 JNK 和 IL-1β 激活的影响

Figure 11 Effects of BRPS and SP on the activation of JNK and IL-1β in J774A.1 cells



与正常组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$

图 12 BRPS 与 SP 对 J774A.1 细胞 IL-1β 分泌的影响

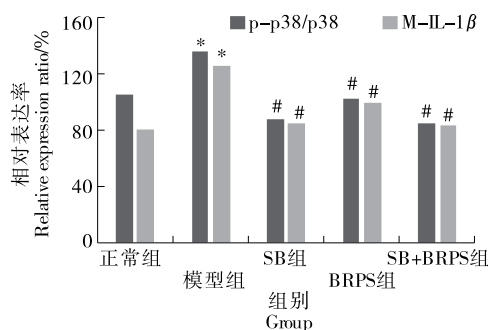
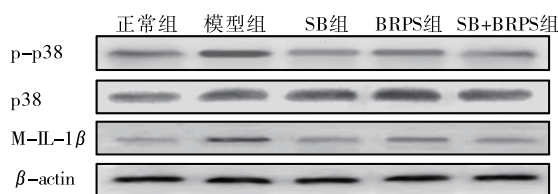
Figure 12 Effects of BRPS and SP on the secretion of IL-1β in J774A.1 cells

水平降低( $P < 0.05$ ),成熟 IL-1β 水平有微弱下降趋势。由图 12 可知,与正常组比较,经 LPS 刺激后,模型组 J774A.1 细胞培养液中 IL-1β 水平升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,SP、BRPS、SP+BRPS 组细胞培养液中 IL-1β 水平降低( $P < 0.05$ )。综上,BRPS 可通过下调 JNK 信号通路抑制 J774A.1 巨噬细胞炎症小体组装、激活以及细胞焦亡。

#### 2.10 BRPS 与 SB203580 对 J774A.1 细胞 p38 激活以及 IL-1β 成熟和分泌的影响

选用 p38 抑制剂 SB203580(SB)进一步验证 BRPS 通过调控 p38 通路发挥抗巨噬细胞炎症小体组装和激活的机制<sup>[30]</sup>。由图 13 所示,与正常组比较,模型组 J774A.1

细胞 p-p38 及成熟 IL-1β 蛋白水平显著升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,SB、BRPS、SB+BRPS 组 J774A.1 细胞 p-p38 及成熟 IL-1β 水平显著降低( $P < 0.05$ );与 SB 组比较,SB+BRPS 组 J774A.1 细胞 p-p38 及成熟 IL-1β 水平有微弱下降趋势。由图 14 可知,与正常组比较,模型组 J774A.1 细胞培养液中 IL-1β 水平显著升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,SB、BRPS、SB+BRPS 组细胞培养液中 IL-1β 水平显著降低( $P < 0.05$ )。综上,BRPS 可通过下调 p38 信号通路抑制 J774A.1 巨噬细胞炎症小体组装、激活以及细胞焦亡。



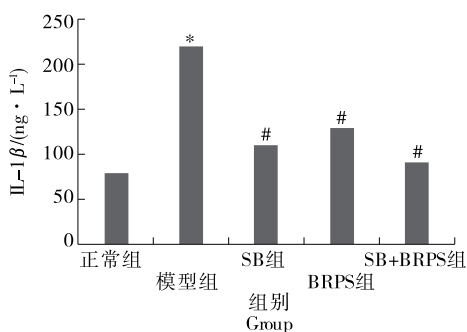
(a) 免疫印迹检测

(b) 灰度比值

与正常组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$ ; 与 SB203580 组比较, +  $P < 0.05$

图 13 BRPS 与 SB203580 对 J774A.1 细胞 p38 和 IL-1β 激活的影响

Figure 13 Effects of BRPS and SB203580 on the activation of p38 and IL-1β in J774A.1 cells



与正常组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$

图 14 BRPS 与 SB203580 对 J774A.1 细胞 IL-1β 分泌的影响

Figure 14 Effects of BRPS and SB203580 on the secretion of IL-1β in J774A.1 cells

### 3 结论

基于核转录因子-κB 和丝裂原活化蛋白激酶信号通路,探讨了草苈蓉多糖抗巨噬细胞核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 炎症小体组装、激活以及抗细胞焦亡的作用。结果表明,草苈蓉多糖可通过下调核转录因子-κB 和 ERK、JNK、p38 丝裂原活化蛋白激酶信号通路抑制巨噬细胞核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 炎症小体组装及其激活,减少 IL-1β 成熟与分泌,并抑制消皮素 D 介导的细胞焦亡。核转录因子-κB 和丝裂原活化蛋白激酶家族在炎症和免疫过程中有着复杂的交互关系,后续将对二者的交互关系以及对草苈蓉多糖抗炎症小体和抗焦亡的作用进行进一步研究。

#### 参考文献

[1] 李彩峰, 王晓琴, 刘勇, 等. 草苈蓉化学成分及药理活性研究进展[J]. 中草药, 2014, 45(7): 1 016-1 023.  
LI C F, WANG X Q, LIU Y, et al. Advances in studies on chemical constituents of *Boschniakia rossica* and their pharmacological

activities[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2014, 45(7): 1 016-1 023.  
[2] ZHANG L, ZHAO Y, WANG Z A, et al. The genus *Boschniakia* in China: An ethnopharmacological and phytochemical review [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2016, 194: 987-1 004.  
[3] 张航, 王辉, 杨树东. 草苈蓉的本草考证及药理研究[J]. 长春中医药大学学报, 2016, 32(1): 40-42.  
ZHANG H, WANG H, YANG S D. Herbalogical study and pharmacological effect of *Boschniakia rossica* [J]. Journal of Changchun University of Chinese Medicine, 2016, 32(1): 40-42.  
[4] LIN L C, LEE L C, HUANG C, et al. Effects of boschnaloside from *Boschniakia rossica* on dysglycemia and islet dysfunction in severely diabetic mice through modulating the action of glucagon-like peptide-1[J]. Phytomedicine, 2019, 62: 152946.  
[5] YAO C, CAO X, FU Z, et al. *Boschniakia rossica* polysaccharide triggers laryngeal carcinoma cell apoptosis by regulating expression of Bcl-2, caspase-3, and p53[J]. Medical Science Monitor, 2017, 23: 2 059-2 064.  
[6] 陈虹, 黄明伟, 程振东, 等. 草苈蓉多糖下调 miR-302a-3p 表达对缺氧/复氧诱导的心肌细胞损伤的影响[J]. 中国药理学通报, 2023, 39(7): 1 241-1 247.  
CHEN H, HUANG M W, CHENG Z D, et al. Effect of *Boschniakia rossica* polysaccharides on hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte damage by down-regulating miR-302a-3p expression [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2023, 39(7): 1 241-1 247.  
[7] 宋全胜. 草苈蓉根茎粗多糖的分离纯化及其部分性质的研究 [D]. 延吉: 延边大学, 2005: 17-18.  
SONG Q S. Purification and character of the crude polysaccharide from the root and stem of the *Boschniakia rossica* Fedtsch. et Flerov [D]. Yanji: University of Yanbian, 2005: 17-18.  
[8] 刘莉园, 张钊, 葛乃嘉, 等. 草苈蓉多糖对脂多糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症反应的影响[J]. 中国药学杂志, 2021, 56(18): 1 479-1 485.  
LIU L Y, ZHANG Z, GE N J, et al. Effect of *Boschniakia rossica* polysaccharides on LPS-induced inflammation of RAW264.7



- macrophages[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2021, 56(18): 1479-1485.
- [9] 张天, 王园园, 张钊, 等. 草苺蓉多糖对脂多糖诱导的小鼠 J774A.1 巨噬细胞炎症反应的抑制作用[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(12): 117-122.
- ZHANG T, WANG Y Y, ZHANG Z, et al. Inhibitory effect of *Boschniakia rossica* polysaccharides on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in mouse J774A.1 macrophages[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(12): 117-122.
- [10] QIAN L, LI J Z, SUN X, et al. Safinamide prevents lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in macrophages by suppressing TLR4/NF- $\kappa$ B signaling[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 96: 107712.
- [11] RATHINAM V A, FITZGERALD K A. Inflammasome complexes: Emerging mechanisms and effector functions[J]. Cell, 2016, 165(4): 792-800.
- [12] BRAHADEESWARAN S, DASGUPTA T, MANICKAM V, et al. NLRP3: A new therapeutic target in alcoholic liver disease[J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1215333.
- [13] ZHANG Y, DONG Z, SONG W. NLRP3 inflammasome as a novel therapeutic target for Alzheimer's disease[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2020, 5(1): 37.
- [14] PAGLIARO P, PENNA C. Inhibitors of NLRP3 inflammasome in ischemic heart disease: Focus on functional and redox aspects[J]. Antioxidants (Basel), 2023, 12(7): 1396.
- [15] HUANG Y, XU W, ZHOU R. NLRP3 inflammasome activation and cell death[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2021, 18(9): 2114-2127.
- [16] CHAN A H, SCHRODER K. Inflammasome signaling and regulation of interleukin-1 family cytokines [J]. Journal of Experimental Medicine, 2020, 217(1): e20190314.
- [17] YU P, ZHANG X, LIU N, et al. Pyroptosis: Mechanisms and diseases[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2021, 6(1): 128.
- [18] 张钊. 没食子酸对脂多糖诱导的小鼠 J774.1 巨噬细胞炎症反应的抑制作用[D]. 延吉: 延边大学, 2022: 11-13.
- ZHAN Z. Inhibitory effect of gallic acid on LPS-induced inflammatory response in mouse J774A.1 macrophages[D]. Yanji: Yanbian University, 2022: 11-13.
- [19] 杜宝双, 陈尚卫, 李玥, 等. 二氢杨梅素及其酰化衍生物对肝细胞氧化损伤的保护作用[J]. 食品与机械, 2022, 38(6): 30-33, 150.
- DU B S, CHEN S W, LI Y, et al. The protection effect of dihydromyricetin and its acylated derivatives on oxidative damage of hepatocytes[J]. Food & Machinery, 2022, 38(6): 30-33, 150.
- [20] JORGENSEN I, MIAO E A. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens[J]. Immunological Reviews, 2015, 265(1): 130-142.
- [21] 陈卓, 方兴刚, 郭兴荣, 等. 基于网络药理学及实验研究探讨紫檀芪调控凋亡及 GSDME 介导的细胞焦亡途径抗脑胶质瘤的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(13): 3589-3601.
- CHEN Z, FANG X G, GUO X R, et al. Anti-glioma mechanism of pterostilbene by regulating apoptosis and GSDME-mediated pyroptosis pathways: A study based on network pharmacology and experimental research [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2023, 48(13): 3589-3601.
- [22] ZHAO N, LI C C, DI B, et al. Recent advances in the NEK7-licensed NLRP3 inflammasome activation: Mechanisms, role in diseases and related inhibitors[J]. Journal of Autoimmunity, 2020, 113: 102515.
- [23] MIAO E A, RAJAN J V, ADEREM A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death[J]. Immunol Rev, 2011, 243(1): 206-214.
- [24] BERGSBAKEN T, FINK S L, COOKSON B T. Pyroptosis: Host cell death and inflammation [J]. Nature Reviews Microbiology, 2009, 7(2): 99-109.
- [25] HAN Y, LI X, ZHANG X, et al. Isodeoxyelephantopin, a sesquiterpene lactone from *Elephantopus scaber* linn, inhibits pro-inflammatory mediators' production through both NF- $\kappa$ B and AP-1 pathways in LPS-activated macrophages [J]. International Immunopharmacology, 2020, 84: 106528.
- [26] CUI L, ZHENG Y, WANG H, et al. Cortisol inhibits the *Escherichia coli*-induced endometrial inflammatory response through NF- $\kappa$ B and MAPK pathways in postpartum goats [J]. Animal Reproduction Science, 2020, 215: 106333.
- [27] LANG Y, CHU F, LIU L, et al. Potential role of BAY11-7082, a NF- $\kappa$ B blocker inhibiting experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6J mice via declining NLRP3 inflammasomes[J]. Clinical and Experimental Immunology, 2022, 207(3): 378-386.
- [28] WANG Y H, GAO X, TANG Y R, et al. Resolvin D1 alleviates mechanical allodynia via ALX/FPR2 receptor targeted Nod-like receptor protein 3/extracellular signal-related kinase signaling in a neuropathic pain model[J]. Neuroscience, 2022, 494: 12-24.
- [29] DUMONT A, DE ROSNY C, KIEU T L, et al. Docosahexaenoic acid inhibits both NLRP3 inflammasome assembly and JNK-mediated mature IL-1 $\beta$  secretion in 5-fluorouracil-treated MDSC: Implication in cancer treatment[J]. Cell Death & Disease, 2019, 10(7): 485.
- [30] CHEN X, LUO D, JIA G, et al. L-theanine attenuates porcine intestinal tight junction damage induced by LPS via p38 MAPK/NLRP3 signaling in IPEC-J2 cells [J]. Food and Chemical Toxicology, 2023, 178: 113870.