

## · 研究论文 ·

## 五味子甲素对 NLRP3 炎性小体活性的抑制作用及机制初步研究

崔鹤蓉<sup>1,2†</sup>, 李朋彦<sup>1†</sup>, 李雨萌<sup>3†</sup>, 王睿林<sup>4</sup>, 何娟娟<sup>1,5</sup>, 桑秀秀<sup>2</sup>, 蔡光明<sup>1</sup>,  
牛明<sup>1</sup>, 王伽伯<sup>1</sup>, 柏兆方<sup>1\*</sup>, 肖小河<sup>4\*</sup>

(1. 解放军 302 医院全军中医药研究所, 北京 100039; 2. 承德医学院, 河北 承德 067000;  
3. 秦皇岛市第一医院, 河北 秦皇岛 066000; 4. 解放军 302 医院中西医结合医学中心, 北京 100039;  
5. 株洲千金药业股份有限公司, 湖南 株洲 412000)

**摘要:** 探讨五味子甲素 (deoxyschizandrin, schisandrin A) 对小鼠骨髓来源巨噬细胞 (BMDM) 中 NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3) 炎性小体活性的抑制作用及初步机制。CCK-8 法检测细胞毒性, 根据细胞存活率确定给药浓度。通过 Western blot 方法检测细胞培养上清中 IL-1 $\beta$  和 caspase-1 的表达, 分析不同浓度的五味子甲素 (25、50、100 和 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 对尼日利亚菌素 (nigericin, Nig) 和三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 诱导的 NLRP3 炎性小体活化的影响, 检测细胞中 pro-caspase-1、pro-IL-1 $\beta$ 、ASC 和 NLRP3 等蛋白的表达变化; 免疫荧光技术分析 NF- $\kappa$ B (p65) 的入核情况。根据 CCK-8 法的结果, 确定了五味子甲素的给药浓度范围为 6.25~400  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在 25~200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度内, 五味子甲素能够抑制 Nig 和 ATP 引起的 NLRP3 炎症小体活化, 进而抑制 IL-1 $\beta$  的分泌。免疫荧光和 Western blot 实验结果显示, 五味子甲素对 NLRP3 炎症小体活性的抑制作用不依赖于 NF- $\kappa$ B 通路活性及其诱导的 NLRP3、ASC 和 pro-IL-1 $\beta$  等炎性小体蛋白的表达。综上, 本实验首次证实, 五味子甲素在一定浓度范围内通过阻断 caspase-1 活化, 抑制 caspase-1 对 pro-IL-1 $\beta$  的剪切活化, 进而抑制 NLRP3 炎性小体的活性, 减轻免疫炎症反应。本研究为五味子甲素防治 NLRP3 炎性小体相关的疾病提供了参考依据。

**关键词:** 五味子甲素; NLRP3 炎性小体; 炎症反应; caspase-1

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 01-0080-06

## Inhibitory effect and mechanism of deoxyschizandrin on NLRP3 inflammasome

CUI He-rong<sup>1,2†</sup>, LI Peng-yan<sup>1†</sup>, LI Yu-meng<sup>3†</sup>, WANG Rui-lin<sup>4</sup>, HE Juan-juan<sup>1,5</sup>, SANG Xiu-xiu<sup>2</sup>,  
CAI Guang-ming<sup>1</sup>, NIU Ming<sup>1</sup>, WANG Jia-bo<sup>1</sup>, BAI Zhao-fang<sup>1\*</sup>, XIAO Xiao-he<sup>4\*</sup>

(1. China Military Institute of Chinese Medicine, 302 Military Hospital, Beijing 100039, China; 2. Chengde Medical University, Chengde 067000, China; 3. First Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao 066000, China; 4. Integrative Medicine Center, 302 Military Hospital, Beijing 100039, China; 5. Qianjin Pharmaceutical Co., LTD, Zhuzhou 412000, China)

**Abstract:** This study was conducted to investigate the inhibitory effect and the molecular mechanism of deoxyschizandrin on the activity of NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3) inflammasome. Bone marrow-derived macrophages were used to study the effects of deoxyschizandrin on inflammasome activation using inflammasome inducers (ATP and nigericin). Cytotoxic effect was evaluated with

收稿日期: 2016-08-11; 修回日期: 2016-09-20.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81330090, 81274026); 国家自然科学基金面上项目 (03772888).

†同为第一作者.

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-66933325, E-mail: baizf2008@126.com; pharmacy302@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-0784

CCK-8. The expression of IL-1 $\beta$ , caspase-1 in the supernatant and the expression of pro-caspase-1, pro-IL-1 $\beta$ , ASC, NLRP3 in cell was detected by Western blot for the inhibitory effect of deoxyschizandrin (25, 50, 100 and 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) on the activity of NLRP3 inflammasome. Immunofluorescence was applied to investigate NF- $\kappa$ B (p65) transportation to the nucleus. The results of CCK-8 showed that the optimum concentration of deoxyschizandrin was 6.25–400  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Deoxyschizandrin (25, 50, 100, and 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) could inhibit the activation of NLRP3 inflammasome caused by nigericin and ATP, and inhibit the secretion of IL-1 $\beta$ , which was associated with inhibiting the cleavage of pro-caspase-1. The results of immunofluorescence and Western blot also suggest that the inhibitory activity of deoxyschizandrin on NLRP3 inflammasome was not dependent on NF- $\kappa$ B pathway and protein expression of NLRP3, ASC, pro-caspase-1 and pro-IL-1 $\beta$  mediated by NF- $\kappa$ B. Our results confirmed that deoxyschizandrin could suppress the cleavage of pro-caspase-1 and inhibit the activity of NLRP3 inflammasome at 25–200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  to reduce the inflammation response.

**Key words:** deoxyschizandrin; NLRP3 inflammasome; inflammatory response; caspase-1

炎性小体 (inflammasome) 是一类由胞浆分子模式识别受体 (pattern-recognition receptor, PRR) 参与组装的多蛋白复合体, 通过 PRR 识别病原微生物及内源性危险信号 (病原相关分子模式和危险相关分子模式), 在细胞内参与先天性免疫防御功能。目前发现能够形成炎性小体的 PRR 主要有 NOD 样受体 (NOD-like receptor, NLR) 及 PYHIN 蛋白家族受体<sup>[1]</sup>。其中, NLRP3 (NACHT、LRR and PYD domains-containing protein 3) 炎性小体是目前研究最多的炎性小体, 能够识别多种外源性和内源性刺激, 通过招募并激活 caspase-1, 促进促炎因子 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的剪切成熟与分泌, 引起一系列炎症反应<sup>[2]</sup>, 在 2 型糖尿病、阿尔茨海默病、痛风等多种疾病中起到一定作用<sup>[3–5]</sup>。为此, 基于 NLRP3 炎性小体的抗炎药物发现及作用机制分析对于相关疾病的防治具有重要意义。

五味子甲素 (deoxyschizandrin, schisandrin A) 是五味子 [*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill] 干燥果实中分离得到的木脂素类成分之一<sup>[6]</sup>, 在抗氧化、抑制细胞凋亡、调节免疫等方面具有广泛的药理作用<sup>[7–10]</sup>。其中, 在抗炎方面, 已有文献表明五味子甲素在体外能够有效抑制脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的炎症反应<sup>[11]</sup>。然而, 目前对于五味子甲素是否可以抑制 NLRP3 炎症小体的活化目前未有报道, 为此, 本次实验以小鼠骨髓来源巨噬细胞 (BMDM) 作为研究对象, 首次研究五味子甲素对 BMDM 中 NLRP3 炎性小体活性的抑制作用及初步机制, 以期对相关炎症疾病的治疗药物研发提供参考。

## 材料与方法

**材料和试剂** 小鼠骨髓来源巨噬细胞 (BMDM), 购自中国科学院上海细胞所; 五味子甲素对照品

(批号: 141112), 购自成都普菲德生物技术有限公司, 纯度 >98%; 三磷酸腺苷 (ATP)、尼日利亚菌素 (Nig) 均购自 Sigma, USA; ultrapure LPS 购自 Invivogen, USA; NF- $\kappa$ B (p65) 和 F(ab')<sub>2</sub> 羊抗兔 IgG 荧光抗体均购自 Cell Signaling Technology, USA; NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis associated speck-like protein containing CARD domain, ASC) 和胱天蛋白酶-1 (caspase-1) 抗体均购自 Adipogen, USA; IL-1 $\beta$  抗体购自 R&D, USA; 辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG 抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 抗体均购自 Santa Cruz, USA; PVDF 膜 (孔径 0.45  $\mu\text{m}$ ) 购自 Millipore, USA; DAPI 核染料购自 Life Technologies, USA; opti-MEM 无血清培养基及其他所有细胞培养试剂均购自 Gibco, USA。

**细胞培养** 将 BMDM 细胞用含 10% 胎牛血清、100  $\text{u}\cdot\text{mL}^{-1}$  青霉素、100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  链霉素的 DMEM 高糖培养基在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养, 3 天传代一次, 取对数期细胞进行实验。

**CCK-8 法检测细胞毒性** 取培养至对数生长期的 BMDM 细胞, 接种于 96 孔板中, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 每孔中细胞数为  $1\times 10^5$  个。BMDM 细胞分为正常组、0.1% DMSO 组、不同浓度的五味子甲素组 (6.25、12.5、25、50、100、200、400、800 和 1600  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 每组设 5 个复孔, 孵育 12 h。随后每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液, 培养 40 min 后, 测定在酶标仪上 450 nm 处的吸光度值。

**刺激方式**<sup>[12]</sup> 取培养至对数生长期的 BMDM 细胞, 接种于 12 孔板中, 每孔 1 mL, 每孔中细胞数为  $1\times 10^6$  个, 培养过夜后, 培养基替换为 opti-MEM 无血清培养基, 同时加入 100  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  LPS 预处理 3 h。随后, 将培养基替换为不同浓度的五味子甲素对照

品溶液 (25、50、100、200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , opti-MEM 无血清培养基作为溶剂) 作用 1 h。随后, 分别加入 ATP (1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 Nig (5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 刺激 45 min。

**样品处理** 将细胞上清吸去后 PBS 洗板 2 次, 置于冰上, 每孔加入 1×loading buffer 200  $\mu\text{L}$ , 10 min 后刮下细胞, 吸取细胞裂解液, 水浴煮沸, 冷却后作为细胞裂解样品。吸取细胞上清加入 1/4 体积三氯乙酸 (TCA) 冰上静置 15 min, 14 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、4  $^{\circ}\text{C}$  离心 10 min, 弃去上清, 加冰丙酮洗 3 次, 95  $^{\circ}\text{C}$  金属浴挥干丙酮, 待丙酮挥发后加 1×loading buffer 100  $\mu\text{L}$  振荡混匀, 水浴煮沸, 冷却后作为上清样品。

**Western blot 测定蛋白的表达** BCA 法测定蛋白质的浓度, 取蛋白样品 30  $\mu\text{g}$  进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将凝胶中分离的蛋白转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶室温封闭 2 h 后, 分别加入 caspase-1、IL-1 $\beta$ 、ASC、NLRP3、GAPDH 一抗溶液 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 加入辣根过氧化物酶标记的相应二抗溶液, 加入 ECL 发光液后经过化学发光成像系统 (Tanon 4200SF) 显影分析, 结果用 ImageJ2X 软件定量分析。

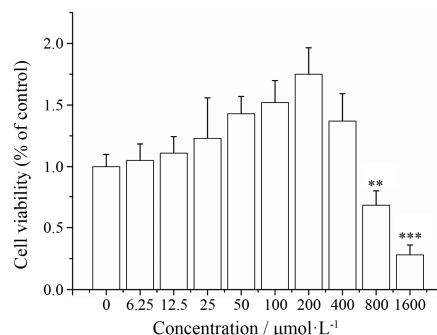
**免疫荧光分析 NF- $\kappa\text{B}$  (p65) 入核情况<sup>[13]</sup>** 将细胞按每毫升  $1.8\times 10^5$  个接种于 96 孔板, 培养过夜。加入不同浓度的五味子甲素对照品溶液 (25、50、100、200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 作用 4 h。随后加入 LPS (100  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 刺激 0.5 h。弃上清, PBS 洗 1 次 (每孔 200  $\mu\text{L}$ )。用 4% 多聚甲醛 (每孔 100  $\mu\text{L}$ ) 室温固定 20 min。弃去固定液, PBS 洗 2 次。加入含 0.1% Triton X-100 的 PBS (每孔 100  $\mu\text{L}$ ) 冰上打孔 15 min, 随后 PBS 洗 1 遍。加入封闭液 (含 5% BSA 的 PBS, 每孔 100  $\mu\text{L}$ ) 室温封闭 1 h。加 NF- $\kappa\text{B}$  (p65) 一抗 (1:300), 每孔 50  $\mu\text{L}$  4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。用含 0.1% Tween-20 的 PBS 洗 3 次 (每孔 200  $\mu\text{L}$ ), 每次 5 min。加入荧光二抗 (1:300, 离心并过膜, 每孔 50  $\mu\text{L}$ ) 室温避光孵育 1 h。用含 0.1% Tween-20 的 PBS 洗 4 次, 每次 5 min。加入 DAPI 染核 5 min (1:10 000, 避光), PBS 洗 3 次 (每孔 200  $\mu\text{L}$ )。甘油-PBS (1:1) 混合液保存 (每孔 100  $\mu\text{L}$ ), 上机检测。p65 及 DAPI 荧光信号采用 Thermo Scientific ArrayScan XTI HCA Infinity Configuration 高内涵分析仪观察并采集图像。每组随机选取 3 张切片, 每张切片选择观察 400 倍×5 个视野, NF- $\kappa\text{B}$  (p65) 标记为绿色荧光, 细胞核的 DAPI 染色为蓝色荧光, 计数绿色荧光总数及蓝色细胞核中绿色荧光数, 两者之差即为细胞浆 NF- $\kappa\text{B}$  (p65) 表达数。入核率=细胞核中绿色荧光数/绿色荧光总数 (即细胞核与细胞浆中绿色荧光数之和)。

**统计学方法** 采用 SPSS 19.0 统计软件, 实验数据以  $\bar{x}\pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-t 检验, 显著性结果以 \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  表示。

## 结果

### 1 五味子甲素对 BMDM 细胞的细胞毒性作用

通过 CCK-8 法检测五味子甲素对 BMDM 细胞的细胞毒性作用, 确定五味子甲素的给药浓度。如图 1 所示, 与正常组相比, 五味子甲素 (6.25~400  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 可提高 BMDM 细胞的生存率, 高浓度的五味子甲素 (800、1 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 会显著降低细胞的生存率 ( $P<0.01$ )。因此, 五味子甲素的给药浓度确定在 6.25~400  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  内, 根据实验选择给药浓度为 25、50、100 和 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。



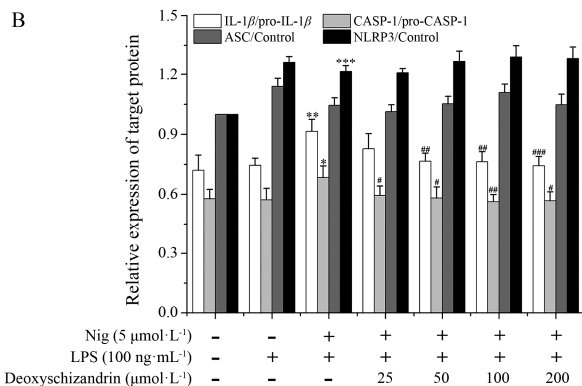
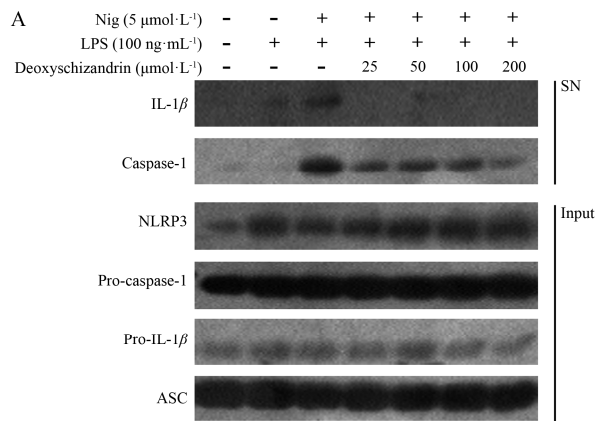
**Figure 1** Effect of deoxyschizandrin (6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) on cell viability in BMDM cells. The cells were treated with various of concentrations of deoxyschizandrin for 24 h. The cytotoxicity of deoxyschizandrin for BMDM cells was analyzed by CCK-8 assay.  $n=5$ ,  $\bar{x}\pm s$ . \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs control group

### 2 五味子甲素对 Nig 诱导的 NLRP3 炎症小体活化相关蛋白表达的影响

结果显示 (图2), 在外源性刺激 Nig 诱导的 BMDM 细胞中, 五味子甲素能够降低上清中 caspase-1 和 IL-1 $\beta$  的表达, 而胞质中 pro-caspase-1、pro-IL-1 $\beta$ 、ASC、NLRP3 等蛋白的表达水平基本没有差异。结果表明, 五味子甲素能够抑制 Nig 引起的 NLRP3 炎症小体活化, 抑制 pro-caspase-1 剪切, 进而抑制 IL-1 $\beta$  的分泌, 但不影响 NLRP3、ASC、pro-caspase-1 和 pro-IL-1 $\beta$  等炎症小体组成蛋白及前体蛋白的表达。

### 3 五味子甲素对 ATP 诱导的 NLRP3 炎症小体活化相关蛋白表达的影响

结果显示 (图3), 在内源性刺激 ATP 诱导的 BMDM 细胞中, 五味子甲素能够降低上清中 caspase-1 和

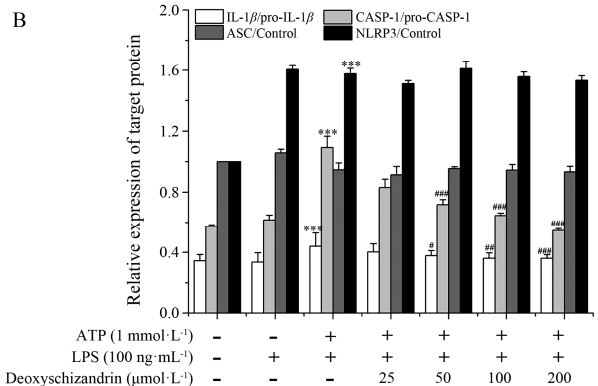
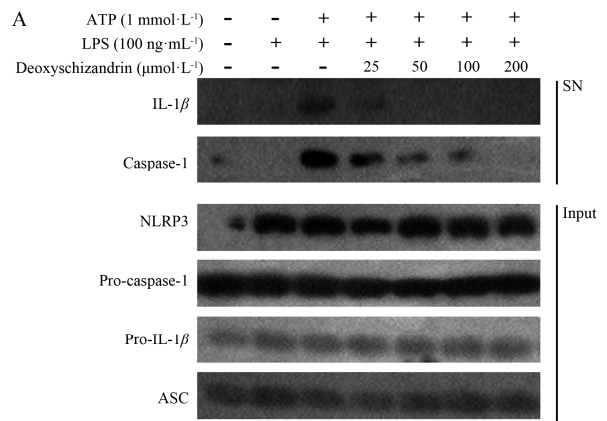


**Figure 2** Effects of deoxyschizandrin on inflammasome-induced interleukin (IL)-1 $\beta$  secretion *in vitro*. LPS-primed bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were pretreated with deoxyschizandrin for 3 h and stimulated with nigericin (Nig,  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 45 min, and supernatants (SN) were used to detect cleaved IL-1 $\beta$  (p17) and caspase-1 (p20). Cell extracts (Input) were used to detect internal controls, such as pro-IL-1 $\beta$  (p31), ASC, pro-caspase-1 (p45), and NLRP3. The protein expressions of IL-1 $\beta$ , caspase-1, NLRP3, pro-caspase-1, pro-IL-1 $\beta$ , ASC were analyzed by Western blot.  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs control group; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , ### $P<0.001$  vs LPS & stimulation group

IL-1 $\beta$  的表达, 呈剂量依赖性, 而胞质中 pro-caspase-1、pro-IL-1 $\beta$ 、ASC、NLRP3 等蛋白的表达水平基本没有差异。结果表明, 五味子甲素能够抑制 ATP 引起的 NLRP3 炎症小体活化, 抑制 pro-caspase-1 剪切, 进而抑制 IL-1 $\beta$  的分泌, 但不影响 NLRP3、ASC、pro-caspase-1 和 pro-IL-1 $\beta$  等炎症小体组成蛋白及前体蛋白的表达。

#### 4 五味子甲素对 NF- $\kappa$ B (p65) 入核的影响

高内涵数据分析如图 4、5 所示, 在静息状态下 NF- $\kappa$ B nuc/cyt 荧光强度比值 $<1$ , 表明此时 NF- $\kappa$ B 荧光信号主要分布在胞浆, 即 NF- $\kappa$ B 信号通路处于灭活状态; 在 LPS 刺激 0.5 h 后, NF- $\kappa$ B nuc/cyt 荧光强度比值增大, 表明 NF- $\kappa$ B 荧光信号在胞核分布增强, 即 LPS 诱导 NF- $\kappa$ B 发生核转位, NF- $\kappa$ B 信号通路

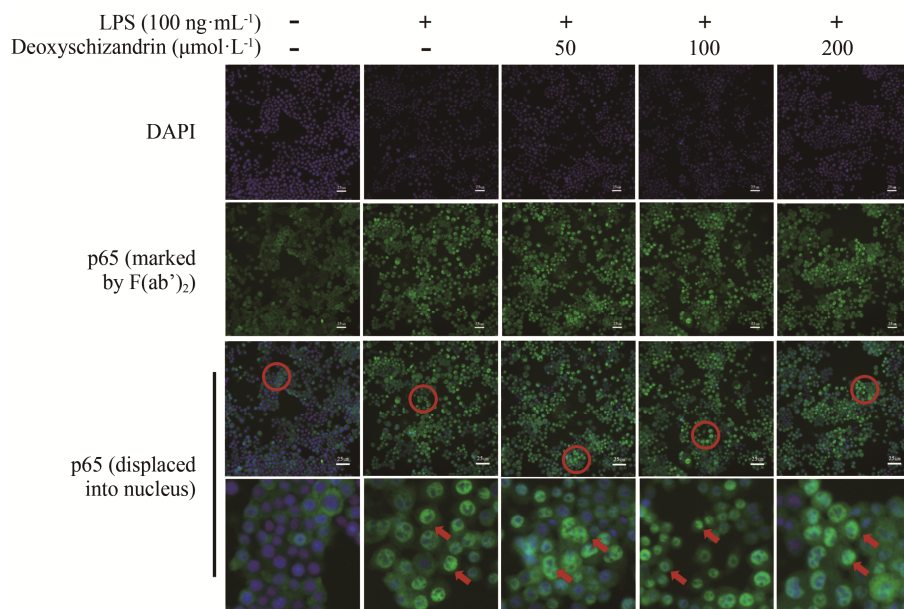


**Figure 3** Effects of deoxyschizandrin on inflammasome-induced IL-1 $\beta$  secretion *in vitro*. LPS-primed BMDMs were pretreated with deoxyschizandrin for 3 h and stimulated with adenosine triphosphate (ATP,  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 45 min, and SN were used to detect cleaved IL-1 $\beta$  (p17) and caspase-1 (p20). Input were used to detect internal controls, such as pro-IL-1 $\beta$  (p31), ASC, pro-caspase-1 (p45), and NLRP3. The protein expressions of IL-1 $\beta$ , caspase-1, NLRP3, pro-caspase-1, pro-IL-1 $\beta$ , ASC were analyzed by Western blot.  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$ . \*\*\* $P<0.001$  vs control group; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , ### $P<0.001$  vs LPS & stimulation group

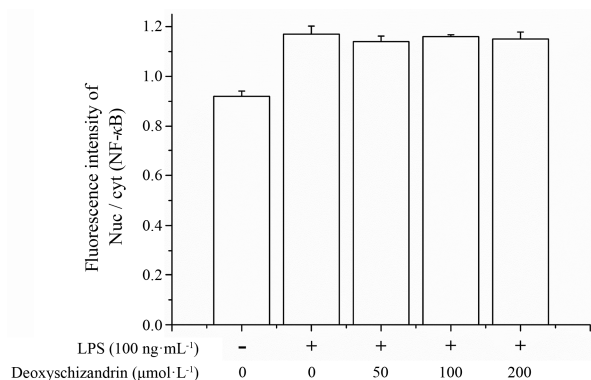
处于激活状态。随着五味子甲素浓度的增加, NF- $\kappa$ B nuc/cyt 荧光强度比值与 LPS 刺激组相比并没有明显减弱, 说明五味子甲素在  $50\sim 200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  剂量内对 LPS 刺激导致的 NF- $\kappa$ B 核转位没有明显影响。

#### 讨论

NLRP3 炎性小体是一种由 NLRP3、ASC 以及 pro-caspase-1 组成、存在于细胞质中的多蛋白复合体<sup>[14,15]</sup>, 依赖 caspase-1 的分子平台促进白细胞介素 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的剪切、成熟和释放, 引起一系列炎症反应, 在免疫细胞 (Kuffer、T 细胞等) 的激活与肝实质细胞的凋亡扮演着重要的角色<sup>[16,17]</sup>。NLRP3 炎性小体能被多种内源性、外源性刺激物激活, 包括内源性危险信号如 ATP、尿酸钠, 微生物成分如细菌、病毒及真菌的 DNA 或 RNA, 细菌成孔毒素如 Nig, 晶体物质如胆



**Figure 4** Effects of deoxyschizandrin on NF-κB (p65) transportation to the nucleus *in vitro*. The cells were pretreated with deoxyschizandrin (50, 100, 200 μmol·L<sup>-1</sup>) for 4 h and then incubated with LPS (100 ng·mL<sup>-1</sup>) for 0.5 h. NF-κB (p65) protein expression and distribution in BMDM were observed by HCA Infinity Configuration. From top to bottom: nuclear region stained by DAPI; NF-κB (p65) marked by FITC; NF-κB (p65) displaced into nucleus



**Figure 5** Effect of deoxyschizandrin on the expression of NF-κB (p65) protein in LPS (100 ng·mL<sup>-1</sup>)-induced BMDM (fluorescent number/each visual field). The cells were pretreated with deoxyschizandrin (50, 100, 200 μmol·L<sup>-1</sup>) for 4 h and then incubated with LPS (100 ng·mL<sup>-1</sup>) for 0.5 h. NF-κB (p65) protein expression in BMDM were analyzed by HCA Infinity Configuration.  $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$

固醇、二氧化硅，环境刺激物如石棉、紫外线等<sup>[18–20]</sup>。其中，在 LPS 预处理的基础上，给予 Nig、ATP 是经典的 NLRP3 激活评价模型，被广泛应用于 NLRP3 炎性小体相关机制研究及抑制剂筛选实验中<sup>[21]</sup>。本实验结果首次表明，五味子甲素能够抑制 Nig 和 ATP 引起的 NLRP3 炎性小体活化以及 pro-caspase-1 剪切，进而抑制 IL-1β 的分泌。同时，五味子甲素对胞内 NLRP3、ASC、pro-caspase-1 等蛋白的表达没有影响，表明五味子甲素并不影响 NLRP3 炎性小体的组成蛋白及前体蛋白的表达。

NLRP3 炎症小体活化受 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR)、NOD 样受体 (NOD-like receptor, NLR) 介导的双信号通路调控<sup>[20–22]</sup>。通常胞内 IL-1β 前体等炎症小体相关蛋白表达量较低，当受到 LPS 等刺激时，激活的 TLR 促进 NF-κB 通路活性，转录翻译产生 pro-IL-1β 等，形成第一条信号通路。在此基础上给予 Nig 和 ATP 刺激时，引起 caspase-1 活化，活化的 caspase-1 将 pro-IL-1β 剪切，形成成熟的 IL-1β 等，形成第二条信号通路，导致炎症小体活化<sup>[23]</sup>。其中，NF-κB 信号通路中的主要蛋白 NF-κB (p65) 的核位移是信号通路被激活的关键<sup>[24]</sup>。因此，为了探讨五味子甲素抑制 NLRP3 炎症小体活化的生物学机制，本研究基于高内涵成像系统和免疫荧光技术，采用单独 LPS 刺激实验研究五味子甲素对 NF-κB 通路活性 (p65 入核) 的影响。结果表明，五味子甲素在 50~200 μmol·L<sup>-1</sup> 浓度内对 LPS 刺激导致的 NF-κB 核转位没有明显影响，提示五味子甲素不通过下调 NF-κB 通路活性发挥抑制 NLRP3 炎性小体活化的作用，而是通过抑制 NLRP3 炎性小体活化的第二条信号通路，阻断 caspase-1 的活化，抑制 caspase-1 对 pro-IL-1β 的剪切活化。但五味子甲素抑制 caspase-1 活化的直接作用靶点还有待进一步研究，可以考虑后续实验探讨五味子甲素对 NLRP3 上、下游的影响来进一步明确药物作用的靶位。

综上，本实验首次证实五味子甲素能够在一定

浓度范围内 ( $25\sim 200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 抑制 NLRP3 炎性小体活化。免疫荧光和 Western blot 实验同时表明, 五味子甲素对 NLRP3 炎症小体活性的抑制作用不依赖于 NF- $\kappa$ B 通路活性及其诱导的 NLRP3、ASC、pro-IL-1 $\beta$  等炎性小体蛋白的表达, 而是通过阻断 caspase-1 活化, 抑制 caspase-1 对 pro-IL-1 $\beta$  的剪切活化, 进而抑制 NLRP3 炎性小体的活性, 减轻免疫炎症反应。本研究为五味子甲素防治 NLRP3 炎性小体相关的疾病提供了参考依据。

## References

- [1] Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13: 397–411.
- [2] Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, et al. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10: 241–247.
- [3] Qing Y, Zhang Q, Zhou JG. Innate immunity functional gene polymorphisms and gout susceptibility [J]. *Gene*, 2013, 524: 412–414.
- [4] Jourdan T, Godlewski G, Cinar R, et al. Activation of the Nlrp3 inflammasome in infiltrating macrophages by endocannabinoids mediates beta cell loss in type 2 diabetes [J]. *Nat Med*, 2013, 19: 1132–1140.
- [5] Tan MS, Yu JT, Jiang T, et al. The NLRP3 inflammasome in Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 48: 875–882.
- [6] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015.
- [7] Wu J, Cao Y, Zhang Y, et al. Deoxyschizandrin, a naturally occurring lignan, is a specific probe substrate of human cytochrome P450 3A [J]. *Drug Metab Dispos*, 2014, 42: 94–104.
- [8] Chang R, Li Y, Yang X, et al. Protective role of deoxyschizandrin and schisantherin A against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e61590.
- [9] Liu C, Cao YF, Fang ZZ, et al. Strong inhibition of deoxyschizandrin and schisantherin A toward UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A3 indicating UGT inhibition-based herb-drug interaction [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83: 1415–1419.
- [10] Lu Y, Wang WJ, Song YZ, et al. The protective mechanism of schisandrin A in d-galactosamine-induced acute liver injury through activation of autophagy [J]. *Pharm Biol*, 2014, 52: 1302–1307.
- [11] Yang D, Liu Z, Chen Y, et al. Effect of deoxyschizandrin on inflammatory factors in mononuclear phagocyte [J]. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志), 2013, 23: 5911–5913.
- [12] Yan Y, Jiang W, Spinetti T, et al. Omega-3 fatty acids prevent inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome activation [J]. *Cell*, 2013, 27: 1154–1163.
- [13] Mu R, Li T, Gao Y, et al. The technical system establishment of NF- $\kappa$ B signaling screen by HCS [J]. *Sci Technol Engin*, 2011, 14: 1671–1815.
- [14] Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro-IL- $\beta$  [J]. *Mol Cell*, 2002, 10: 417–426.
- [15] Bauernfeind F, Hornung V. Of inflammasomes and pathogen-sensing of microbes by the inflammasome [J]. *EMBO Mol Med*, 2013, 5: 814–826.
- [16] Franchi L. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10: 241–247.
- [17] Guarda G, Zenger M, Yazdi AS, et al. Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells [J]. *J Immunol*, 2011, 186: 2529–2534.
- [18] Franchi L, Munoz-Planillo R, Nunez G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes [J]. *Nat Immunol*, 2012, 13: 325–332.
- [19] Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7: 99–109.
- [20] Yang CS, Shin DM, Jo EK. The role of NLR-related protein 3 inflammasome in host defense and inflammatory diseases [J]. *Int Neurourol J*, 2012, 16: 2–12.
- [21] Yan Y, Jiang W, Liu L, et al. Dopamine controls systemic inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome [J]. *Cell*, 2015, 15: 62–73.
- [22] Menu P, Vince JE. The NLRP3 inflammasome in health and disease: the good, the bad and the ugly [J]. *Clin Exp Immunol*, 2011, 166: 1–15.
- [23] Tsutsui H, Imamura M, Fujimoto J, et al. The TLR4/TRIF-mediated activation of NLRP3 inflammasome underlies endotoxin-induced liver injury in mice [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2010, 2010: 641865.
- [24] Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases [J]. *Annu Rev Immunol*, 2011, 29: 707–735.