

## 蓝萼甲素通过抑制 HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路减轻肥大细胞脱颗粒引起的过敏反应

朴艺花<sup>1,2</sup>, 宋艺兰<sup>2,3</sup>, 王知广<sup>3,4</sup>, 姜京植<sup>2,3</sup>, 李莉<sup>2,3</sup>, 徐畅<sup>2,3</sup>, 朴颖<sup>2,5</sup>,  
朴红梅<sup>3,4</sup>, 延光海<sup>2,3\*</sup>

(1. 延边大学附属医院重症医学科, 吉林 延吉 133000; 2. 延边大学, 吉林省过敏性常见疾病免疫与靶向研究重点实验室, 吉林 延吉 133002; 3. 延边大学医学院解剖教研室, 吉林 延吉 133002; 4. 延边大学附属医院呼吸与危重症医学科, 吉林 延吉 133000; 5. 延边大学附属医院急诊内科学, 吉林 延吉 133000)

**摘要:** 研究蓝萼甲素 (glucocalyxin A, GLA) 对肥大细胞介导的过敏反应的影响。动物福利和实验过程均遵循延边大学动物伦理委员会的规定。动物实验采用 BALB/c 小鼠耳部皮内注射 anti-DNP-IgE (anti-dinitrophenyl-immunoglobulin E) 致敏, 尾静脉注射 DNP-HSA (human serum albumin) 和 4% 伊文思蓝混合液激发制备动物皮肤被动过敏反应 (passive cutaneous anaphylaxis, PCA) 模型, 收集双耳用于测量染料着色和组织学。细胞实验选用大鼠腹腔肥大细胞 (rat peritoneal mast cells, RPMCs), 分为对照组、IgE + antigen (Ag) 组和 IgE + Ag + GLA 组, 测定组胺释放以及钙内流水平。Western blot 法检测高亲和力 IgE 受体 (Fc $\epsilon$ RI) 介导的信号通路蛋白及 HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B (high mobility group box 1/toll like receptor 4/nuclear transcription factor kappa B) 信号蛋白。动物实验结果提示, GLA 抑制小鼠 PCA 反应, 减少伊文思蓝染料渗出, 减轻耳朵炎症反应及耳朵厚度。细胞实验结果提示, GLA 能减少组胺释放及钙离子内流, 并抑制肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白介素 (interleukin, IL)-4、IL-13 和 IL-1 $\beta$  生成; Western blot 实验结果显示 GLA 可抑制 Fc $\epsilon$ RI 介导的脾酪氨酸激酶 (spleen tyrosine kinase, Syk)、Lck/Yes 新型酪氨酸激酶 (Lck/Yes novel tyrosine kinase, Lyn)、酪氨酸激酶 Fyn (tyrosine kinase, Fyn)、生长因子受体结合蛋白 2 (growth-factor receptor-bound protein 2, Gab2) 和磷脂酶 C- $\gamma$ 1 (phospholipase C- $\gamma$ 1, PLC $\gamma$ 1) 的磷酸化水平, 同时 GLA 抑制 HMGB1/TLR4 信号通路使 NF- $\kappa$ B p65 核转移受限。结果表明, GLA 通过 HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路抑制肥大细胞脱颗粒并减轻过敏性炎症。

**关键词:** 蓝萼甲素; 高迁移率族蛋白 B1; Toll 样受体 4; 核转录因子- $\kappa$ B; 肥大细胞脱颗粒

中图分类号: R392.8 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)01-0201-07

## Glucocalyxin A attenuates allergic responses by inhibiting mast cell degranulation through HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathways

PIAO Yi-hua<sup>1,2</sup>, SONG Yi-lan<sup>2,3</sup>, WANG Zhi-guang<sup>3,4</sup>, JIANG Jing-zhi<sup>2,3</sup>, LI Li<sup>2,3</sup>, XU Chang<sup>2,3</sup>,  
PIAO Ying<sup>2,5</sup>, PIAO Hong-mei<sup>3,4</sup>, YAN Guang-hai<sup>2,3\*</sup>

(1. Department of Critical Care Medicine, Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, China; 2. Jilin Key Laboratory for Immune and Targeting Research on Common Allergic Diseases, Yanbian University, Yanji 133002, China; 3. Department of Anatomy, College of Medicine, Yanbian University, Yanji 133002, China; 4. Respiratory and Critical Care Medicine, Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, China; 5. Department of Emergency Medicine, Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, China)

**Abstract:** The study is to investigate the effect of glucocalyxin A (GLA) on mast cell-mediated anaphylaxis.

收稿日期: 2020-06-11; 修回日期: 2020-07-14.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81970018, 81860729).

\*通讯作者 Tel: 86-433-2435137, E-mail: ghyan@ybu.edu.cn

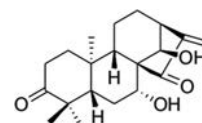
DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0960

The animal welfare and experimental process of this experiment followed the regulations of the Animal Ethics Committee of Yanbian University. BALB/c mice were used in the animal experiment and randomly divided into five groups, control group, model group, and GLA low, medium, and high dose groups (10, 20, and 40 mg·kg<sup>-1</sup>). Mice were sensitized by intradermal injection of anti-dinitrophenyl-immunoglobulin E (DNP-IgE) into the ears and challenged with a mixture of DNP-human serum albumin (HSA) and 4% evans blue into the tail veins to prepare an animal skin passive cutaneous anaphylaxis (PCA) model, which was collected from both ears for measurement of dye staining and histology. Rat peritoneal mast cells (RPMCs) were used in the cell experiment and divided into control, IgE + antigen (Ag), and IgE + Ag + GLA groups to determine histamine release as well as calcium influx levels. High-affinity IgE receptor (FcεRI)-mediated signaling pathway proteins and HMGB1/TLR4/NF-κB (high mobility group box 1/toll like receptor 4/nuclear transcription factor kappa B) signaling proteins were detected by Western blot. The results of animal experiments suggest that GLA inhibits PCA, reduces evans blue dye exudation, and reduces ear inflammation and ear thickness in mice. The results of cellular experiments suggested that GLA could reduce histamine release and calcium influx, and inhibit tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin (IL)-4, IL-13, and IL-1β production; Western blot results showed that GLA inhibited FcεRI-mediated phosphorylation levels of spleen tyrosine kinase (Syk), Lck/Yes novel tyrosine kinase (Lyn), tyrosine kinase Fyn (Fyn), growth-factor receptor-bound protein 2 (Gab2), and phospholipase C (PLC) γ1, while GLA inhibited HMGB1/TLR4 signaling pathway to limit NF-κB p65 nuclear metastasis. The results indicate that GLA inhibits mast cell degranulation and attenuates allergic inflammation through the HMGB1/TLR4/NF-κB signaling pathway.

**Key words:** glaucocalyxin A; high mobility group box 1; toll-like receptor 4; nuclear transcription factor kappa B; mast cell degranulation

肥大细胞是主要的免疫细胞,通过分泌炎症介质诱导过敏性炎症<sup>[1]</sup>。肥大细胞表面表达多种膜受体,IgE (immunoglobulin E) 与 FcεRI 结合, FcεRI 与多价抗原交联导致肥大细胞脱颗粒,并释放大量生物介质,包括预形成的分泌颗粒(含组胺和蛋白酶)以及细胞因子[如肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) 和白介素-13 (interleukin-13, IL-13)]、生长因子和趋化因子<sup>[2]</sup>。高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group protein B1, HMGB1) 属于 HMG 家族的一部分,是一种非组蛋白,主要存在于细胞核内,广泛分布于多种组织细胞中,是整个 HMG 家族蛋白中最常表达的蛋白<sup>[3]</sup>,当其被动释放或主动分泌至细胞外基质时,其作为促炎细胞因子可介导炎症和免疫反应<sup>[4]</sup>。在过敏性疾病中, HMGB1 起重要作用,通过抑制 HMGB1 与 TLR4 (toll-like receptor 4) 受体结合,可以抑制哮喘气道炎症反应<sup>[5]</sup>,但 HMGB1 在肥大细胞诱导的过敏反应中的具体作用相关报道甚少。

蓝萼甲素 (glaucocalyxin A, GLA) 是一种具有对映 15-氧-16-贝壳杉烯 (ent-15-oxo-16-kaurene) 骨架结构的二萜类化合物,其化学结构见图 1。GLA 是唇形科香茶菜属植物,广泛分布在我国东北和华东等地区,是蓝萼香茶菜中的主要活性成分,研究表明, GLA 具有抗炎、抗氧化和免疫抑制等多种药理作用,并且有很高的体内安全性,主要研究领域是肿瘤和炎症疾病<sup>[6,7]</sup>。目前 GLA 在过敏性疾病中的研究甚少。本实



**Figure 1** The chemical structure of glaucocalyxin A (GLA). The molecular formula of GLA is C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>, and its molecular weight is 332.4339

验中,作者为了评估 GLA 在过敏性炎症反应中的具体作用机制,通过体内和体外速发型超敏反应模型,探讨了蓝萼甲素通过抑制肥大细胞脱颗粒改善过敏性炎症的作用机制。

## 材料与方法

**实验动物** 雄性清洁级 BALB/c 小鼠 ( $n = 40$ ), 鼠龄 4~6 周, 体重  $18 \pm 5$  g, 雄性 Sprague-Dawley 大鼠 ( $n = 20$ ) 购自延边大学健康科学中心(中国延吉), 实验动物合格证号为 SCXK (吉) 2017-0003。动物福利和实验过程均遵循延边大学动物伦理委员会的规定。所有小鼠饲养 1 周, 温度 ( $22 \pm 2$ ) °C, 相对湿度  $55\% \pm 5\%$ , 12 h 光照-黑暗循环。

**药物与试剂** GLA (批号 B20698, 上海源叶公司); TNF-α、IL-1β、IL-4 和 IL-13 的酶联免疫吸附剂测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (武汉华美生物工程有限公司); NF-κB (nuclear transcription factor kappa B) p65 (#8242)、phospho-NF-κB p65 (#3039)、PARP (poly ADP-ribose polymerase, 46D11,

#9532)、 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  (inhibitor of  $\kappa\text{B}$  alpha, L35A5, #4814)、phospho- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  (#2859)、Syk (spleen tyrosine kinase, #13198)、phospho-Syk (#2710)、Lyn (Lck/Yes novel tyrosine kinase, #2796)、phospho-Lyn (#2731)、Gab2 (growth-factor receptor-bound protein 2, #3239)、phospho-Gab2 (#3881)、PLC (phospholipase C)  $\gamma$ 1 (#2821)、phospho-PLC $\gamma$ 1 (#8713)、HMGB1 (#3935)、TLR4 (D8L5W, #14358)、MyD88 (myeloid differentiation factor 88, #3699)、 $\beta$ -actin (#3700)、anti-rabbit IgG (H+L) (#14708) 和 anti-mouse IgG (H+L) (#14709) (美国 Cell Signaling Technology 公司); anti-DNP (dinitrophenyl)-IgE 和 DNP-HSA (human serum albumin) (美国 Sigma 公司); 伊文思蓝 (上海如吉生物科技有限公司)。

**仪器** 酶标仪 EPOCH 和细胞成像微孔板检测系统 (美国 Beckman 公司); 15K 高速冷冻台式离心机 (美国 Sigma 公司); 透射电镜 (日本 JEM-1200EX 公司); 电泳仪及电泳槽 (美国 Apparatus Corporation 公司); Western blot 转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); 分光光度计 (Spectra MAX PLUS, 美国 Molecular Devices 公司); 液体闪烁分析仪 (美国 Canberra Industries 公司)。

**实验动物分组** BALB/c 小鼠 ( $n = 40$ ) 分为 5 组, 即正常组、模型组 (IgE + Ag 组) 和 GLA 低、中、高剂量组 (10、20 和 40  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 每组 8 只。大鼠用于提取腹腔肥大细胞, 不进行分组。

**被动皮肤过敏反应 (passive cutaneous anaphylaxis, PCA)** 每只小鼠通过耳部皮内注射含有 0.5  $\mu\text{g}$  anti-DNP-IgE 的 50  $\mu\text{L}$  磷酸盐缓冲盐水致敏皮肤, 24 h 后, 灌胃给予低 (10  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、中 (20  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 和高剂量 (40  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 的 GLA, 1 h 后每只小鼠尾静脉注射 DNP-HSA (0.1 mg) 和 4% 伊文思蓝 (1:1) 混合液激发, 30 min 后, 小鼠被人道处死, 双耳被收集, 接着用 1 mL 甲酰胺在 55  $^{\circ}\text{C}$  孵育 24 h 以提取外渗的伊文思蓝染料。染料的吸光度用分光光度计在 620 nm 测量, 用百分表测量耳厚度。

**肥大细胞制备、培养及处理** 使用既往实验方法进行大鼠腹腔肥大细胞 (rat peritoneal mast cells, RPMCs) 的制备及培养<sup>[8,9]</sup>, 分离的 RPMCs 细胞培养于含 10% 胎牛血清、100  $\text{u}\cdot\text{mL}^{-1}$  青霉素钠和 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  链霉素的 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 培养液中, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下进行培养。RPMCs 分为 3 组, 即对照组、IgE + Ag (antigen) 组和 IgE + Ag + GLA 组。对照组正常培养, 未经任何药物处理; IgE + Ag 组用 50  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 anti-DNP-IgE 处理 6 h, 再用 100  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 DNP-

HSA 处理 10 min, 诱导肥大细胞脱颗粒; IgE + Ag + GLA 组用 50  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 anti-DNP-IgE 处理 6 h, 不同浓度的 GLA (纯度  $\geq 98\%$ ) 处理 30 min, 100  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 DNP-HSA 处理 10 min。透射电镜下观察各组细胞形态。

**细胞毒性实验** 将 RPMCs 细胞以  $2\times 10^4$  个/孔接种于 96 孔板中, 用不同浓度 (0.1~10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) GLA 处理 24 h, 然后于 37  $^{\circ}\text{C}$  下用 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT) 孵育细胞, 再加入二甲基亚砷溶解甲苯胺晶体, 测定 570 nm 处的吸光度。

**测定组胺释放** 向肥大细胞悬液 (每毫升  $1\times 10^6$  个) 中加入 50  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 anti-DNP-IgE 致敏, 并在 37  $^{\circ}\text{C}$  环境中孵育 6 h。然后, 加入或不加 GLA (0.1、1.0 和 5.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 孵育 30 min 后洗净, 加入 100  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  DNP-HSA, 孵育 10 min, 离心后取上清液, 采用放射酶法测定组胺含量。

**钙摄入量测定** 肥大细胞悬液 (每毫升  $1\times 10^6$  个) 与含有 1.5  $\text{mCi}\cdot\text{mL}^{-1}$  45  $\text{Ca}^{2+}$  的 HERES-Tyrode 缓冲液 (无  $\text{CaCl}_2$  和  $\text{MgCl}_2$ ) 共同孵育。然后用 50  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 anti-DNP-IgE 处理细胞 6 h, 添加不同浓度的 GLA 在 37  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 30 min, 用 100  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  DNP-HSA 激发 10 min, 用 10% Triton-100 裂解细胞后, 通过闪烁  $\beta$  计数器测量钙离子的放射性。

**ELISA 实验** 按生产商说明书用 ELISA 试剂盒测定 RPMCs 细胞培养液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-4 和 IL-13 的水平。

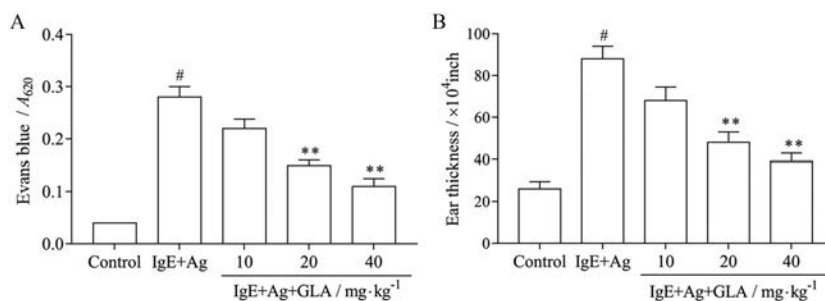
**Western blot 实验** 如前所述方法<sup>[10]</sup>, 提取细胞核和细胞质蛋白后, BCA (bicinchoninic acid) 法测定蛋白质量浓度, 取 20  $\mu\text{g}$  蛋白, 用 8%~12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (dodecyl sulfate, sodium salt-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离蛋白, 然后电转移至聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF), 在 5% 脱脂奶粉中封闭 1 h, 分别加入不同的一抗, 稀释比例为 1:1 000, 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜, 洗膜, 按照说明书于 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育不同的二抗 1 h, 常规洗膜后用高效化学发光 (efficient chemiluminescence, ECL) 试剂曝光。

**统计学分析** 采用 SPSS 23.0 软件进行数据分析, 结果表示为  $\bar{x} \pm s$ 。使用 GraphPad Prism 7.0 软件进行绘制图表,  $P < 0.05$  被视为具有统计学意义。

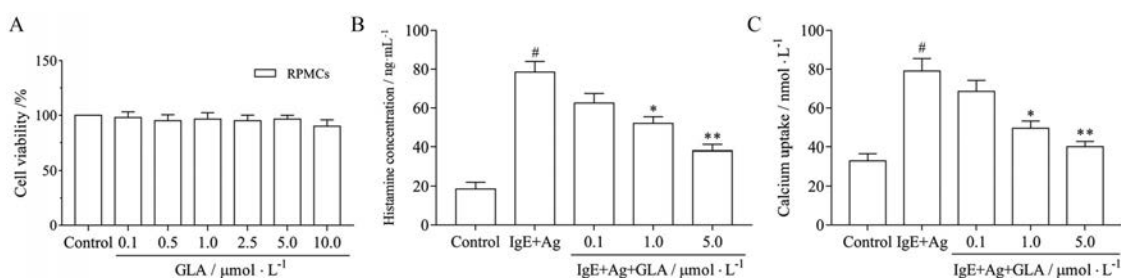
## 结果

### 1 GLA 对小鼠 PCA 反应及耳肿胀反应的影响

采用 PCA 模型评价 GLA 体内抗过敏作用。与 IgE + Ag 组比较, GLA 组均能抑制染料外渗, 其中 GLA 20 和 40  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  剂量组有显著性差异 ( $P < 0.01$ , 图



**Figure 2** Effect of GLA on anti-dinitrophenyl-immunoglobulin E (DNP-IgE)-induced passive cutaneous anaphylaxis (PCA) in mice. The mice were sensitized with 50 ng·mL<sup>-1</sup> anti-DNP-IgE for 6 h, and GLA was administered 1 h before challenging with 100 ng·mL<sup>-1</sup> DNP-human serum albumin (HSA). A: The absorbance of dye extravasation is represented; B: Ear thickness is measured with a dial gauge.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs the control group; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs the IgE + antigen (Ag) group



**Figure 3** Effects of GLA on cell viability and degranulation in rat peritoneal mast cells (RPMCs). RPMCs were stimulated with anti-DNP-IgE (50 ng·mL<sup>-1</sup>) for 6 h and preincubated at 37 °C for 30 min in the absence or presence of GLA before challenging with DNP-HSA (100 ng·mL<sup>-1</sup>) for 10 min. A: Cell viability was measured by MTT assay; B: Histamine release rate; C: Calcium uptake.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs the control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs the IgE + Ag group

2A)。用千分表测量耳厚度, IgE + Ag 组耳肿胀明显, 经 GLA 治疗后耳肿胀明显减轻, 与模型组比较有显著差异 ( $P < 0.01$ , 图 2B)。以上结果提示, 在抗原诱导的变态反应中, GLA 能够减轻肥大细胞的脱颗粒, 从而抑制 PCA 反应。

## 2 GLA 对组胺释放及钙内流的影响

为探索 GLA 对 RPMCs 细胞的活性和脱颗粒的影响, 首先用 MTT 法检测其活性, 用脱颗粒时早期释放介质组胺和细胞内钙离子浓度的测定来评估其脱颗粒作用。MTT 实验数据显示, 0.1~10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度的 GLA 对 RPMCs 细胞活性无明显影响, 其中 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度时活性有所下降, 但无统计学意义 (图 3A)。与 IgE + Ag 组比较, GLA 处理后明显抑制 RPMCs 细胞释放组胺及细胞内钙水平 (图 3B、C), 以高剂量组作用最为明显 ( $P < 0.01$ )。

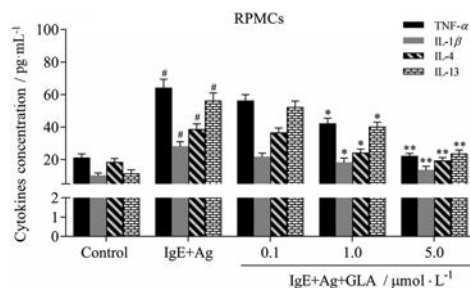
## 3 GLA 对炎性细胞因子表达的影响

活化的肥大细胞释放促炎细胞因子, 导致过敏性炎症<sup>[10]</sup>, ELISA 法检测炎性因子释放水平, 评估 GLA 对 RPMCs 分泌促炎细胞因子的影响。结果提示, 与 control 组相比, IgE + Ag 组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-4 和 IL-13 表达显著升高。与 IgE + Ag 组相比, IgE + Ag + GLA

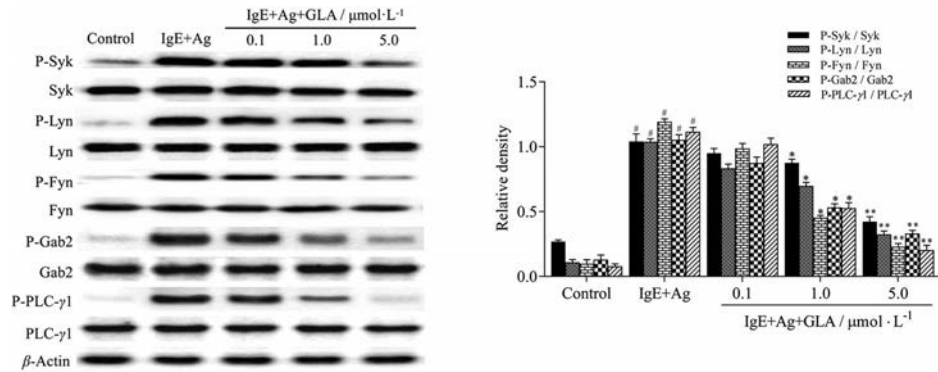
组的促炎细胞因子水平降低 (图 4), 以高剂量组最显著 ( $P < 0.01$ )。以上结果提示, GLA 可以抑制肥大细胞介导的炎性因子的释放。

## 4 GLA 对 Fc $\epsilon$ RI 介导的信号通路的影响

为了预测 GLA 发挥功能的潜在靶点, 用 Western blot 法检测 RPMCs 细胞中 Fc $\epsilon$ RI 介导的几个关键蛋白信号通路的影响。如图 5 所示, Syk、Lyn、Fyn、Gab2 及



**Figure 4** Effects of GLA on the secretion of cytokines in the supernatants of RPMCs. RPMCs were stimulated with anti-DNP-IgE (50 ng·mL<sup>-1</sup>) for 6 h and preincubated at 37 °C for 30 min in the absence or presence of GLA before challenging with DNP-HSA (100 ng·mL<sup>-1</sup>) for 10 min.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs the control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs the IgE + Ag group. TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; IL: Interleukin



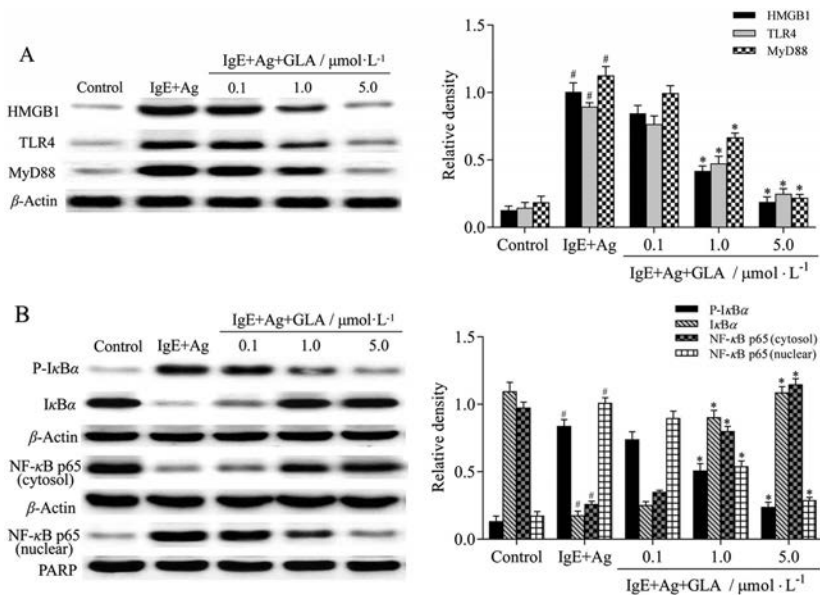
**Figure 5** Effects of GLA on Fc $\epsilon$ RI-mediated signaling pathways in RPMCs. RPMCs were stimulated with anti-DNP-IgE (50 ng·mL<sup>-1</sup>) for 6 h and preincubated at 37 °C for 30 min in the absence or presence of GLA before challenging with DNP-HSA (100 ng·mL<sup>-1</sup>) for 10 min. The related proteins and their phosphorylation levels were detected by Western blot assay.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . # $P < 0.05$  vs the control group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs the IgE + Ag group. Syk: Spleen tyrosine kinase; Lyn: Lck/Yes novel tyrosine kinase; Fyn: Tyrosine kinase Fyn; Gab2: Growth-factor receptor-bound protein 2; PLC $\gamma$ 1: Phospholipase C  $\gamma$ 1

下游因子 PLC $\gamma$ 1 信号蛋白的磷酸化水平经 anti-DNP-IgE/DNP-HSA 刺激后明显增加, 不同浓度的 GLA 处理后, 可抑制这些信号的蛋白磷酸化水平, 以 GLA 高剂量组效果最明显, 提示 GLA 可通过下调 Fc $\epsilon$ RI 依赖性信号蛋白磷酸化水平进而抑制肥大细胞脱颗粒。

### 5 GLA 通过抑制 HMGB1/TLR4 信号下调 NF- $\kappa$ B 核转位

既往研究表明, HMGB1/TLR4 信号通路在哮喘和过敏性鼻炎等小鼠模型中异常激活<sup>[11,12]</sup>。为了研究 GLA

是否通过 HMGB1/TLR4 信号通路来抑制肥大细胞活化, 通过 Western blot 法测定相关蛋白水平。结果表明, 用 anti-DNP-IgE/DNP-HSA 刺激后, HMGB1、TLR4 及 MyD88 蛋白表达及 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化水平显著升高, 且 NF- $\kappa$ B p65 核内转移明显。经过 GLA 处理后 HMGB1、TLR4 及 MyD88 蛋白水平下降, I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化及 NF- $\kappa$ B p65 核转位水平降低 (图 6)。以上结果提示, GLA 可以通过抑制 HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路抑制肥大细胞脱颗粒及 NF- $\kappa$ B p65 的核转位。



**Figure 6** GLA on high mobility group box 1 (HMGB1)-related signaling pathways in RPMCs. A: Effect of GLA on toll-like receptor 4 (TLR4) and myeloid differentiation factor 88 (MyD88) downstream of HMGB1 in RPMCs. RPMCs were stimulated with anti-DNP-IgE (50 ng·mL<sup>-1</sup>) for 6 h and preincubated at 37 °C for 30 min in the absence or presence of GLA before challenging with DNP-HSA (100 ng·mL<sup>-1</sup>) for 10 min, and protein levels were measured by Western blot; B: Effect of GLA on nuclear transcription factor kappa B (NF- $\kappa$ B), a downstream factor of MyD88. Cells were treated as above.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . # $P < 0.05$  vs the control group; \* $P < 0.05$  vs the IgE + Ag group. I $\kappa$ B $\alpha$ : Inhibitor of  $\kappa$ B alpha; P-I $\kappa$ B $\alpha$ : Phospho-I $\kappa$ B $\alpha$ ; PARP: Poly ADP-ribose polymerase

## 讨论

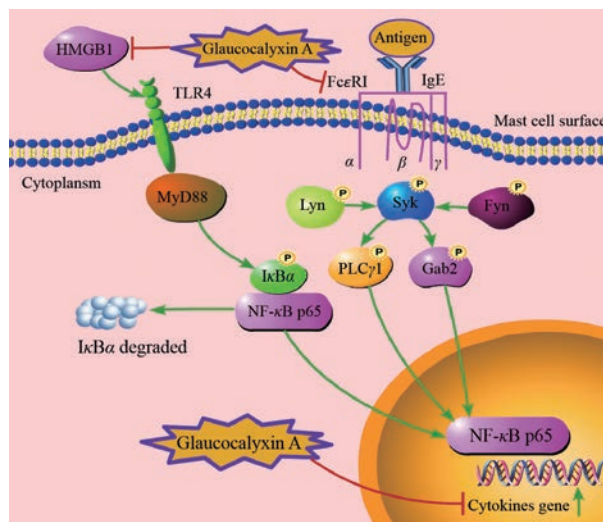
在世界范围内, 过敏性疾病的发病率迅速上升<sup>[13]</sup>。肥大细胞在过敏性疾病中起关键作用, IgE/FcεRI介导肥大细胞脱颗粒及炎症介质的分泌引起过敏反应<sup>[14,15]</sup>。PCA动物模型可在体内评价肥大细胞介导的局限性过敏反应<sup>[16,17]</sup>。在IgE/FcεRI介导小鼠PCA反应中, 肥大细胞被激活, 激活的肥大细胞释放组胺引起血管通透性增加, 引起致敏部位血管通透性增加, 血浆渗出和局部肿胀。本实验中, 可以观察GLA能显著抑制PCA小鼠中伊文思蓝的渗漏和耳部肿胀, 表明GLA能明显抑制肥大细胞介导的局限性过敏反应。

肥大细胞的活化依赖于Syk的激活, Syk的激活受FcεRI与Lyn和Fyn因子相互作用的调节<sup>[18]</sup>。Syk激活下游分子Gab2和PLCγ1通过三磷酸肌醇引起细胞内钙离子变化和PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)/AKT (protein kinase B) 途径激活NF-κB, 在肥大细胞脱颗粒中起重要作用<sup>[2]</sup>。作者数据显示, GLA抑制anti-DNP-IgE/DNP-HSA诱导的Fyn、Lyn、Syk、Gab2和PLCγ1的磷酸化水平。FcεRI介导的肥大细胞活化涉及钙内流<sup>[19]</sup>, 细胞内钙的释放导致肥大细胞脱颗粒。在脱颗粒过程中, 肥大细胞分泌多种炎症介质, 包括组胺、β-氨基己糖苷酶、细胞因子、蛋白酶、趋化因子和生长因子<sup>[20]</sup>。组胺是过敏性炎症的关键介质<sup>[21]</sup>。本研究结果发现, GLA显著抑制肥大细胞脱颗粒, 降低肥大细胞内的钙水平及组胺释放。肥大细胞活化后分泌的促炎细胞因子进一步促进过敏性炎症反应进展<sup>[22]</sup>, 关键促炎因子包括TNF-α、IL-1β、IL-4和IL-13<sup>[10]</sup>。作者结果表明, GLA在anti-DNP-IgE/DNP-HSA刺激的RPMCs细胞中抑制了TNF-α、IL-1β、IL-4和IL-13的水平。这些结果提示, GLA通过阻断IgE/FcεRI途径抑制肥大细胞脱颗粒发挥抗过敏作用。

HMGB1是一种促炎性细胞因子, 作为TLR4配体与之结合后激活MyD88, 导致NF-κB抑制蛋白IκBα磷酸化, NF-κB从复合物上解离, 最后NF-κB进入细胞核内与靶基因结合, 促进炎症因子的生成, 进一步诱导炎症反应<sup>[5,12]</sup>。研究表明, 特异性皮炎动物模型中通过抑制肥大细胞中HMGB1的表达, 阻止NF-κB核转位, 减少TNF-α和IL-6等细胞因子的释放, 改善特异性皮炎症状<sup>[23]</sup>。本实验结果提示, GLA呈浓度依赖性降低活化的肥大细胞HMGB1、TLR4及MyD88表达, 同时减少了IκBα磷酸化和核内NF-κB表达。这些结果提示, GLA可以通过抑制HMGB1/TLR4/NF-κB信号通路减轻肥大细胞介导的炎症反应。NF-κB为重要的核转录因子, 受多种信号传导的影响。在过敏性疾病中, 抗原等外部刺激因素可通过FcεRI进一步激活下游转

录因子NF-κB, 诱导炎症反应。有研究表明, FcεRI通过B细胞淋巴瘤10 (B cell CLL/lymphoma 10, Bcl10) 和黏膜相关淋巴组织1 (mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation 1, Malt1) 蛋白复合体途径, 可以诱导NF-κB活化, 进一步诱导细胞因子的生成<sup>[24]</sup>。也有报道称, 过敏性炎症最初依赖于FcεRI与Src激酶Lyn和Fyn的相互作用, 随后依赖于磷酸化的Syk, 导致下游信号PLCγ1和Gab2磷酸化, 增加细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度, 进一步激活NF-κB并促进细胞因子合成<sup>[25]</sup>。

本实验中也证实肥大细胞脱颗粒后可以激活HMGB1, 进一步激活下游因子NF-κB, 引起炎症反应。GLA即可抑制FcεRI相关下游蛋白, 也可抑制HMGB1/TLR4/NF-κB信号通路, 最终减轻过敏性炎症反应(图7)。



**Figure 7** Schematic representation of the mechanism of action of GLA on mast cell signaling pathways. GLA inhibits proinflammatory cytokine secretion by inhibiting mast cell FcεRI signaling pathway activation and HMGB1/TLR4/NF-κB signaling pathway

肥大细胞脱颗粒在变态反应性疾病发病机制的研究越来越受到重视。本研究提供的证据表明, GLA抑制anti-DNP-IgE/DNP-HSA诱导的肥大细胞表面FcεRI受体及下游蛋白表达, 并通过抑制HMGB1/TLR4过表达, 阻止NF-κB核转移减轻过敏性炎症反应。综上, 结合本实验数据, GLA可能是治疗肥大细胞介导的过敏性炎症性疾病的治疗药物。

**作者贡献:** 朴艺花、宋艺兰和李莉负责实验设计; 朴艺花、宋艺兰、王知广和徐畅参与实验并进行数据分析; 朴艺花、姜京植和朴颖负责撰写论文; 朴红梅和延光海负责稿件修改。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] González-de-Olano D, Álvarez-Twose I. Mast cells as key players in allergy and inflammation [J]. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2018, 28: 365-378.
- [2] Lin W, Su F, Gautam R, et al. Raf kinase inhibitor protein negatively regulates Fc $\epsilon$ RI-mediated mast cell activation and allergic response [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115: E9859-E9868.
- [3] Imbalzano E, Quartuccio S, Di Salvo E, et al. Association between HMGB1 and asthma: a literature review [J]. *Clin Mol Allergy*, 2017, 15: 12.
- [4] Ugrinova I, Pasheva E. HMGB1 protein: a therapeutic target inside and outside the cell [J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2017, 107: 37-76.
- [5] Jiang H, Duan J, Xu K, et al. Resveratrol protects against asthma-induced airway inflammation and remodeling by inhibiting the HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18: 459-466.
- [6] Zhu J, Sun Y, Lu Y, et al. Glucocalyxin A exerts anticancer effect on osteosarcoma by inhibiting GLI1 nuclear translocation *via* regulating PI3K/Akt pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9: 708.
- [7] Yang F, Cao Y, Zhang J, et al. Glucocalyxin A improves survival in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482: 147-153.
- [8] Ye J, Piao H, Jiang J, et al. Polydatin inhibits mast cell-mediated allergic inflammation by targeting PI3K/Akt, MAPK, NF- $\kappa$ B and Nrf2/HO-1 pathways [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 11895.
- [9] Joung EJ, Lee B, Gwon WG, et al. Sargaquinoic acid attenuates inflammatory responses by regulating NF- $\kappa$ B and Nrf2 pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 29: 693-700.
- [10] Xian Z, Jin G, Li H, et al. Imperatorin suppresses anaphylactic reaction and IgE-mediated allergic responses by inhibiting multiple steps of Fc $\epsilon$ RI signaling in mast cells: IMP alleviates allergic responses in PCA [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 7823761.
- [11] Yuan Y, Liu Q, Zhao J, et al. SIRT1 attenuates murine allergic rhinitis by downregulated HMGB1/TLR4 pathway [J]. *Scand J Immunol*, 2018, 87: e12667.
- [12] Zhu X, Cong J, Yang B, et al. Association analysis of high-mobility group box-1 protein 1 (HMGB1)/toll-like receptor (TLR) 4 with nasal interleukins in allergic rhinitis patients [J]. *Cytokine*, 2020, 126: 154880.
- [13] Tanno LK, Bierrenbach AL, Simons FER, et al. Critical view of anaphylaxis epidemiology: open questions and new perspectives [J]. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 2018, 14: 12.
- [14] Kim YY, Je IG, Kim MJ, et al. 2-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid attenuates mast cell-mediated allergic reaction in mice *via* modulation of the Fc $\epsilon$ RI signaling pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38: 90-99.
- [15] Li X, Kwon O, Kim DY, et al. NecroX-5 suppresses IgE/Ag-stimulated anaphylaxis and mast cell activation by regulating the SHP-1-Syk signaling module [J]. *Allergy*, 2016, 71: 198-209.
- [16] Che D, Hou Y, Zeng Y, et al. Dehydroandrographolide inhibits IgE-mediated anaphylactic reactions *via* calcium signaling pathway [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 366: 46-53.
- [17] Kim MJ, Kim YY, Choi YA, et al. Elaeocarpusin inhibits mast cell-mediated allergic inflammation [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 591.
- [18] Kim MJ, Je IG, Song J, et al. SG-SP1 suppresses mast cell-mediated allergic inflammation *via* inhibition of Fc $\epsilon$ RI signaling [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 50.
- [19] Dhakal H, Lee S, Kim EN, et al. Gomisin M2 inhibits mast cell-mediated allergic inflammation *via* attenuation of Fc $\epsilon$ RI-mediated Lyn and Fyn activation and intracellular calcium levels [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 869.
- [20] Espinosa E, Valitutti S. New roles and controls of mast cells [J]. *Curr Opin Immunol*, 2018, 50: 39-47.
- [21] Krystel-Whittemore M, Dileepan KN, Wood JG. Mast cell: a multi-functional master cell [J]. *Front Immunol*, 2016, 6: 620.
- [22] Wang F, Fu X, Wu X, et al. Bone marrow derived M2 macrophages protected against lipopolysaccharide-induced acute lung injury through inhibiting oxidative stress and inflammation by modulating neutrophils and T lymphocytes responses [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 61: 162-168.
- [23] Wang Y, Zhang Y, Peng G, et al. Glycyrrhizin ameliorates atopic dermatitis-like symptoms through inhibition of HMGB1 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 60: 9-17.
- [24] Klemm S, Ruland J. Inflammatory signal transduction from the Fc $\epsilon$ RI to NF- $\kappa$ B [J]. *Immunobiology*, 2006, 211: 815-820.
- [25] Kang KH, Lee KH, Yoon HM, et al. Rehmannia glutinosa pharmacopuncture solution regulates functional activation, Fc $\epsilon$ RI expression, and signaling events in mast cells [J]. *J Pharmacopuncture*, 2012, 15: 32-41.