

虎杖苷通过抑制NLRP3炎症小体活化改善小鼠痛风性关节炎

权 力¹, 徐 强², 郭文洁^{2*}, 杨家书^{2*}

(1. 南京中医药大学附属医院检验科, 江苏 南京 210023; 2. 南京大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

摘要: 虎杖苷 (polydatin, PD) 是一种从虎杖根和茎中提取的天然活性单晶化合物, 为白芦藜醇的天然前体。本研究旨在探讨虎杖苷对尿酸钠结晶 (monosodium urate, MSU) 诱导的小鼠痛风性关节炎的治疗作用及可能机制。所有动物实验程序均经过南京大学动物伦理委员会的审查与批准 (批准号: 2407002)。采用足掌注射 20 μL MSU (25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 混悬液以构建小鼠痛风性关节炎模型, 考察虎杖苷对小鼠足掌病理变化的作用效果。给药组小鼠在造模前 3 天每天通过腹腔注射给予不同剂量 (低剂量组: 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; 中剂量组 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; 高剂量组 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 虎杖苷处理。在 MSU 混悬液注射后第 3、6、9、12 和 24 h 测量小鼠足掌厚度并拍照记录。通过苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, H&E) 染色法染色观察小鼠足掌组织损伤情况。利用免疫组化及免疫荧光检测 NLRP3 及 CASP1 p20 表达情况以评估足掌组织 NLRP3 炎症小体活化情况。细胞水平采用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 联合三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP)/MSU/尼日利亚菌素 (nigericin) 构建 NLRP3 炎症小体细胞活化模型, ELISA 检测虎杖苷处理对巨噬细胞内 NLRP3 炎症小体活化后白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 分泌的影响。流式细胞术检测巨噬细胞内 CASP1 p20 活化情况。免疫荧光检测巨噬细胞内 NLRP3 炎症小体组装情况。研究结果表明, 与模型组相比, 虎杖苷给药组小鼠足掌肿胀程度显著降低; H&E 染色显示小鼠足掌组织损伤显著减轻, 表明虎杖苷对小鼠足掌损伤具有治疗作用。免疫组化及免疫荧光结果显示 CASP1 p20 及 NLRP3 表达显著降低, 表明虎杖苷显著抑制 NLRP3 炎症小体活化, 从而减弱小鼠足掌局部炎症反应。通过提取小鼠骨髓来源巨噬细胞并进行细胞水平相关实验, 发现虎杖苷处理后细胞内由 NLRP3 炎症小体活化介导的 IL-1 β 分泌及 CASP1 p20 活化显著降低, NLRP3 炎症小体组装受到抑制。综上所述, 虎杖苷可以通过抑制 NLRP3 炎症小体组装与活化, 减少 IL-1 β 炎性细胞因子的生成与释放以发挥其抗炎作用, 从而减轻小鼠痛风性关节炎的关节损伤, 为痛风的治疗提供了新策略。

关键词: 虎杖苷; 痛风性关节炎; NLRP3 炎症小体; IL-1 β 炎性细胞因子

中图分类号: R967 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)05-1443-11

Polydatin ameliorates gouty arthritis in mice by inhibiting NLRP3 inflammasome activation

QUAN Li¹, XU Qiang², GUO Wen-jie^{2*}, YANG Jia-shu^{2*}

(1. Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210023, China)

Abstract: Polydatin (PD) is a natural active crystalline compound extracted from the roots and stems of *Polygonum cuspidatum*, and is a natural precursor of resveratrol. This study aims to investigate the therapeutic effects of PD on monosodium urate (MSU)-induced gouty arthritis in mice and its potential mechanisms. The animal experiment has been approved by the Ethics Committee of Nanjing University (approval number: 2407002). A gouty arthritis model was established by injecting 20 μL of MSU (25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) suspension into the

收稿日期: 2024-11-08; 修回日期: 2025-01-20.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82473929).

*通讯作者 Tel: 15805153325, E-mail: guowj@nju.edu.cn; jsyoung1995@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-1214

mouse plantar. The effect of PD on pathological changes in the mouse plantar was evaluated. The treatment group received daily intraperitoneal injections of different doses of PD (low dose: 5 mg·kg⁻¹, medium dose: 10 mg·kg⁻¹, high dose: 20 mg·kg⁻¹) for 3 days before model induction. The thickness of the mouse plantar was measured and photographed at 3, 6, 9, 12, and 24 h after MSU suspension injection. Histopathological damage to the plantar tissue was observed using hematoxylin-eosin (H&E) staining. Immunohistochemistry and immunofluorescence were used to detect the expression of NLRP3 and CASP1 p20 to assess NLRP3 inflammasome activation in the plantar tissue. At the cellular level, lipopolysaccharide (LPS) combined with adenosine triphosphate (ATP)/MSU/nigericin was used to construct a cellular activation model of the NLRP3 inflammasome. ELISA was used to detect the effect of PD on interleukin-1 β (IL-1 β) secretion after NLRP3 inflammasome activation in macrophages. Flow cytometry was employed to measure CASP1 p20 activation in macrophages. Immunofluorescence was used to examine NLRP3 inflammasome assembly in macrophages. The results of the study indicate that, compared to the model group, the PD-treated group exhibited a significant reduction in the swelling of the mouse plantar. H&E staining showed a notable reduction in tissue damage in the mouse plantar, suggesting that PD has a therapeutic effect on plantar damage in mice. Immunohistochemistry and immunofluorescence results revealed a significant decrease in the expression of CASP1 p20 and NLRP3, indicating that PD significantly inhibits the activation of the NLRP3 inflammasome, thereby attenuating the local inflammatory response in the mouse plantar. At the cellular level, PD treatment significantly reduced the secretion of IL-1 β and activation of CASP1 p20, both of which are mediated by NLRP3 inflammasome activation. Furthermore, NLRP3 inflammasome assembly was inhibited. In summary, PD exerts its anti-inflammatory effect by suppressing the assembly and activation of the NLRP3 inflammasome, reducing the production and release of the pro-inflammatory cytokine IL-1 β , thereby alleviating joint damage in mouse gouty arthritis. This provides a novel strategy for the treatment of gout.

Key words: polydatin; gouty arthritis; NLRP3 inflammasome; IL-1 β inflammatory cytokine

痛风是一种因尿酸钠结晶 (monosodium urate, MSU) 沉积引起的临床表现明显的急性关节炎, 常累及第一跖趾关节、踝关节和膝关节^[1,2]。随着人们生活方式的变化及对食物多样化的追求, 高尿酸血症和痛风在中国的发病率不断上升, 影响到越来越多的人^[3]。作为一种慢性系统性炎症性疾病, 痛风发作时会引发关节的剧烈疼痛及肿胀, 经常伴有血脂异常、代谢紊乱、心血管疾病和肾脏疾病等并发症。目前为止, 痛风的治疗和临床试验已有多种方案, 如口服抗炎药物或降尿酸药物^[4], 但均具有一定的局限性。非甾体抗炎药 (NSAIDs) 长期服用会引起患者胃肠道不适、肾损伤或骨质疏松等不良反应, 而非布司他等降尿酸药物可能引发患者皮肤过敏、肝肾功能损害等症状, 因此疼痛管理及降尿酸药物仍是缓解痛风最有效的方法^[5,6]。随着研究的进展, 先天性免疫反应在启动对损伤和感染的炎症及免疫反应中的作用得到了越来越多的关注, 痛风性关节炎发病也与之息息相关^[7]。核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 (NACHT, LRR, and PYD domain-containing protein 3, NLRP3) 炎症小体是一种多蛋白复合物, 能够感知并响应 MSU 等“危险信号”的存在^[8]。NLRP3 炎症小体的激活是 MSU 诱导的炎症反应的核心机制之一, 导致白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-18 (interleukin-18,

IL-18) 等促炎细胞因子的成熟并释放至胞外, 从而导致关节组织损伤^[9]。因此, 抑制 NLRP3 炎症小体活化可能为治疗痛风发生与发展的有效策略。

鉴于 NLRP3 炎症小体的重要性, 针对其的药物开发成为当前研究的热点之一^[10-12]。许多研究正致力于寻找能够直接抑制 NLRP3 的药物, 以期治疗痛风等相关炎症性疾病^[13]。其中, MCC950 (也称为 CRID3 或 CP-456,773) 是一种备受关注的 NLRP3 抑制剂^[14]。它通过阻断 NLRP3 炎症小体的激活, 从而抑制炎症反应, 在小鼠模型中显示出治疗包括痛风性关节炎等多种炎症性疾病的潜力^[15,16]。然而, 在针对类风湿性关节炎的 II 期临床试验中, 由于出现明显的脱靶效应和毒性 (患者血清 ALT 和 AST 水平显著升高), 试验最终被终止^[17]。此外, 另一种 NLRP3 抑制剂 OLT1177 目前正在进行 II 期临床试验, 但已有研究表明其量效关系并不显著^[18]。因此, 对于治疗与 NLRP3 炎症小体相关的炎症性疾病迫切需要寻找更加有效的 NLRP3 小分子抑制剂。

几个世纪以来, 虎杖一直用于治疗氧化应激、炎症和脂质沉积相关的肝脏疾病^[19]。虎杖苷 (polydatin, PD) 是一种从虎杖根和茎中提取的天然活性单晶化合物, 为白藜芦醇的天然前体^[20]。已有研究表明, 白藜芦醇可显著减轻由果糖诱导的小鼠肝炎模型, 改善脂质

沉积中氧化还原的失衡状态,具有良好的抗炎抗氧化功效^[21]。不仅如此,白藜芦醇已被证明具有良好的抗肿瘤^[22]、促进神经再生^[23]和改善线粒体功能^[24]等效果。且白藜芦醇已被报道能够抑制经草酸钾处理的大鼠肾脏中NLRP3炎症小体的激活^[25]。作为白藜芦醇的苷形式,虎杖苷已被报道能够通过调控Keap1/Nrf2信号通路缓解果糖诱导的小鼠肝脏炎症,展现出显著的抗炎效果^[26]。然而,作为炎症反应的核心分子,NLRP3炎症小体的活化是否能被虎杖苷抑制仍然不明确。因此,本文探究了虎杖苷对MSU诱导的小鼠痛风模型的疗效,为痛风等NLRP3炎症小体相关疾病的治疗及药物的开发提供了新的思路。

材料与方 法

数据集的获取 数据集从基因表达综合 (Gene Expression Omnibus, GEO) 数据库 (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) 下载GSE242872数据集,为采用MSU晶体诱导的痛风小鼠模型踝关节组织的转录谱数据。其中,包括8例对照组小鼠踝关节组织和8例痛风小鼠踝关节组织。

动物 SPF级8~10周龄雄性C57BL/6小鼠30只,体重均为18~22 g,购自江苏集萃药康生物科技有限公司,动物生产许可证号:SCXK(苏)2023-0009。小鼠饲养于温度 24 ± 2 °C、湿度 $60\% \pm 5\%$ 、明暗循环为12 h的环境中,自由饮食饮水。所有动物实验程序均经过南京大学动物伦理委员会的审查与批准(批准号:2407002)。

材料与试剂 虎杖苷(货号:65914-17-2)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, 货号:L3024)、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP, 货号:A7699)、尼日利亚菌素(nigericin, 货号:72445)及MSU(货号U2875)均购自美国Sigma-Aldrich公司。MCC950(货号:HY-12815)、佛波酯(phorbol myristate acetate, PMA, 货号:HY-18739)均购自美国MedChemExpress生物科技有限公司。预包装小鼠IL-1 β 检测试剂盒(货号:1210123)、预包装人IL-1 β 检测试剂盒(货号:1110122)均购自上海达科为生物技术有限公司。NLRP3抗体(货号:D4D8T)、含CARD结构域的凋亡相关颗粒样蛋白(apoptosis associated speck-like protein containing CARD, ASC)抗体(货号:D2W8U)均购自美国Cell Signaling公司。天冬氨酸蛋白水解酶1(cysteiny l aspartate specific proteinase 1, CASP1)抗体(货号:AG-20B-0042)购自美国AdipoGen公司。秋水仙碱(colchicine, 货号:T0320)购自上海陶术生物科技有限公司。FAM-FLICA® CASP1 YVAD Assay Kit(货号:

ICT-97)购自美国ImmunoChemistry公司。

主要设备 Centrifuge 5418R型低温离心机,德国Eppendorf公司;AF103AS型制冰机,美国Scotsman斯科茨曼公司;XPR204S/AC型精密天平,瑞士METTLER TOLEDO公司;Elix Essential型纯水仪,美国Millipore®Amicon公司;M200PRO型多功能酶标仪,瑞士TECAN公司;BX51型正置光学显微镜,日本Olympus公司;TCS SP8-MP型双光子激光共聚焦显微镜,美国Leica公司;Life Attune® NxT声波聚焦流式细胞仪,美国Thermo Fisher Scientific公司。

分组、模型复制及给药 将6~8周龄正常C57BL/6雄性小鼠适应性饲养1周后,随机分为6组,分别为对照组、痛风性关节炎模型组、虎杖苷低剂量组($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、中剂量组($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、高剂量组($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和秋水仙碱性对照组($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。造模前向小鼠腹腔注射上述剂量虎杖苷或秋水仙碱,而后向小鼠足掌内注射MSU($25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)混悬液,造模24 h后脱颈法处死小鼠。取小鼠后足并小心剔除皮肤组织并放入4%多聚甲醛固定24 h,随后将足掌放至脱钙液中脱钙两周以进行后续检测。

小鼠足掌厚度测量 在向小鼠足掌注射MSU混悬液后,分别在第3、6、9、12、24 h测量并记录小鼠足掌肿胀最大部位的厚度。

小鼠足掌组织H&E染色 将固定并脱钙后的小鼠足掌石蜡包埋并切片。染色前,将组织切片置于65 °C烘箱中15 min,烤片结束后将切片浸入二甲苯中10 min,共两次;随后依次浸入95%乙醇、75%乙醇、50%乙醇;最后将组织切片于清水洗涤5 min。脱蜡后的组织切片用苏木素染色3 min,酸洗3 s,随后置于清水中5 min以返蓝,再用0.5%的伊红染色15 s。染色完毕后,将组织切片分别浸入50%乙醇、75%乙醇、无水乙醇、二甲苯进行脱水处理,中性树脂封片并在光学显微镜下观察小鼠足掌的病理学变化。

小鼠足掌组织免疫组织化学染色 将复水后的小鼠足掌组织切片浸入柠檬酸钠抗原修复液并置于98 °C水浴锅中水浴10 min,修复结束后自然冷却至室温;清水温和清洗后,滴加1% Triton X-100室温打孔20 min;滴加内源性过氧化物酶封闭液,室温孵育10 min,清洗后滴加山羊血清室温封闭1 h;按照抗体说明书配制抗体,4 °C孵育过夜,第二天室温放置30 min复温;PBST清洗后滴加二抗并于室温孵育30 min;PBST清洗后,滴加DAB显色液室温显色,待变色后迅速放入自来水中终止显色;滴加苏木素染色剂,室温放置10 min以染核,随后将片子放入1% HCl-75%乙醇溶液中分化3 s,分化结束后迅速拿出切片并

于自来水温水和冲洗 5 min; 切片脱水后自然风干, 中性树脂封片并在光学显微镜下观察。

小鼠组织免疫荧光染色 将复水后的小鼠足掌组织切片浸入柠檬酸钠抗原修复液并置于 98 °C 水浴锅中水浴 10 min, 修复结束后自然冷却至室温; 清水温和清洗后, 滴加 1% Triton X-100 室温打孔 20 min; 清洗后滴加山羊血清室温封闭 1 h; 按照抗体说明书配制抗体, 4 °C 孵育过夜, 第二天室温放置 30 min 复温; PBST 清洗后避光滴加荧光二抗并于室温避光孵育 2 h; 孵育完成后, 滴加 DAPI 染色液并室温避光孵育 10 min 进行染核操作; PBST 避光清洗后, 滴加适量抗荧光淬灭封片剂后小心盖上盖玻片, 在四周滴加透明指甲油封片以便后续荧光拍摄。

小鼠骨髓来源巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophages, BMDMs) 的提取与培养 使用 6~8 周龄的雄性小鼠提取 BMDMs。首先, 通过颈椎脱臼法将小鼠处死, 并在其全身喷洒 75% 乙醇进行消毒。随后, 将小鼠移入生物安全柜内并固定在泡沫操作板上。使用眼科剪刀在骨盆部位切下小鼠的后肢, 小心剥离大腿部位的肌肉, 剪去骨头两端。接着, 使用 1 mL 无菌 PBS 的注射器, 冲洗骨髓腔, 将骨髓冲出并收集在 15 mL 离心管中, 直至骨髓腔内没有残留骨髓。接下来, 将样品以 300 ×g 离心 5 min, 弃上清, 用 5 mL Tris-NH₄Cl 缓冲液重悬细胞沉淀, 并在室温下静置 5 min 以去除红细胞。再以 300 ×g 离心 5 min, 弃去上清后用 PBS 洗涤一次。最后, 再次离心后, 加入含有 20 ng·mL⁻¹ 巨噬细胞集落刺激生长因子 (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) 的 DMEM 培养基, 将细胞置于培养箱中培养 4~5 天, 等待 BMDMs 分化成熟后备用。

NLRP3 炎症小体活化模型的建立 对于 BMDMs 而言, BMDMs 经 100 ng·mL⁻¹ LPS 刺激 3 h 以激活 NF-κB 信号通路 (第一信号), 随后 5 mmol·L⁻¹ ATP 刺激 1 h, 500 μg·mL⁻¹ MSU 刺激 2 h, 或 10 μmol·L⁻¹ nigericin 刺激 2 h (第二信号) 以完成 NLRP3 炎症小体的组装与活化。对于 THP-1 细胞而言, THP-1 细胞经 500 nmol·L⁻¹ PMA 刺激 3 h 使细胞贴壁, 随后按照上述流程刺激 NLRP3 炎症小体活化。

ELISA 检测巨噬细胞上清中细胞因子的水平 按照实验需求处理细胞后, 收集细胞培养液, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 以去除残留在培养液中的死亡细胞, 并将离心后培养液转移至新的离心管中作为待测样品。ELISA 实验操作按照北京达科为公司的 ELISA 试剂盒操作说明进行。简而言之: 加入 100 μL 配制好的 Cytokine standard 至标准品孔, 100 μL 培养液加入到样

品孔中, 标准品及样品均设置 3 个复孔。随后, 每孔加入 50 μL 的 biotinylated antibody 工作液并混匀, 盖上封板膜, 于 37 °C 孵育 90 min。用稀释好的 washing buffer 洗板 5 次, 之后每孔加入 100 μL Streptavidin-HRP 工作液, 盖上封板膜, 于 37 °C 孵育 30 min。按照上述步骤洗板 5 次后, 迅速每孔加入 100 μL TMB 反应液, 室温反应 5~30 min, 根据孔内颜色的变化情况及时加入 100 μL 终止液。酶标仪检测每孔 450 nm 的吸光度值并根据标准曲线计算具体的细胞因子浓度。

FAM-FLICA 染色及流式细胞术检测 CASP1 活化的情况 CASP1 活化情况检测实验操作按照 FAM-FLICA® CASP1 YVAD Assay Kit 试剂盒操作说明进行。简而言之: 按照实验需求处理 BMDMs 后, 收集细胞并用 PBS 洗涤 1 次, 随后用 100 μL PBS 重悬细胞至新的 1.5 mL EP 管内。加入 4 μL 配制好的 FLICA 染色工作液至 EP 管内并于室温孵育 1 h。染色完成后, 以 3 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 并弃去上清液, 按照相同离心条件用稀释好的 1× Apoptosis Wash Buffer 洗涤细胞 3 次。洗涤完成后, 加入 500 μL PBS 重悬细胞, 并利用流式细胞仪以 488 nm 激发波长检测 CASP1 阳性细胞所占比例。

统计学分析 所有结果以 3 次独立实验的平均值 ± SEM 表示, 使用单因素方差分析进行统计分析, 然后使用 Dunnett 检验比较对照组和多剂量组。所得数据采用 GraphPad Prism 9 作图。显著性水平 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

结果

1 虎杖苷对痛风小鼠足掌肿胀及损伤情况的影响

首先, 本研究检测了虎杖苷是否对小鼠痛风性关节炎具有良好的治疗效果。在动物模型复制期间, 对照组小鼠的精力充沛, 精神状态佳, 具有较强的运动欲望及优秀的运动表现。痛风模型组小鼠活力欠佳, 精神萎靡, 无运动欲望, 且运动时足掌无法完全触地。由于小鼠足掌局部有严重的 MSU 堆积, 会造成小鼠足掌严重的炎症及损伤肿胀。如图 1A、B 所示, 对照组小鼠足掌厚度正常, 无肿胀; 痛风模型组小鼠足掌肿胀严重, 在第 6 h 肿胀最为严重, 在造模第 24 h 肿胀逐渐消退。与痛风模型组比较, 给予不同剂量虎杖苷后, 小鼠足掌肿胀程度明显下降, 并呈现良好的剂量效应。H&E 染色结果表明, 痛风模型组小鼠足掌损伤程度较大, 并伴随大量炎性细胞浸润。虎杖苷治疗后, 小鼠足掌组织损伤程度显著降低, 炎性细胞浸润显著减少 (图 1C、D)。秋水仙碱作为本实验的阳性对照, 表现出对 MSU 诱发的小鼠足掌损伤有良好的改善作用, 其效果与高剂量虎杖苷相当。以上结果表明, 虎杖苷能够

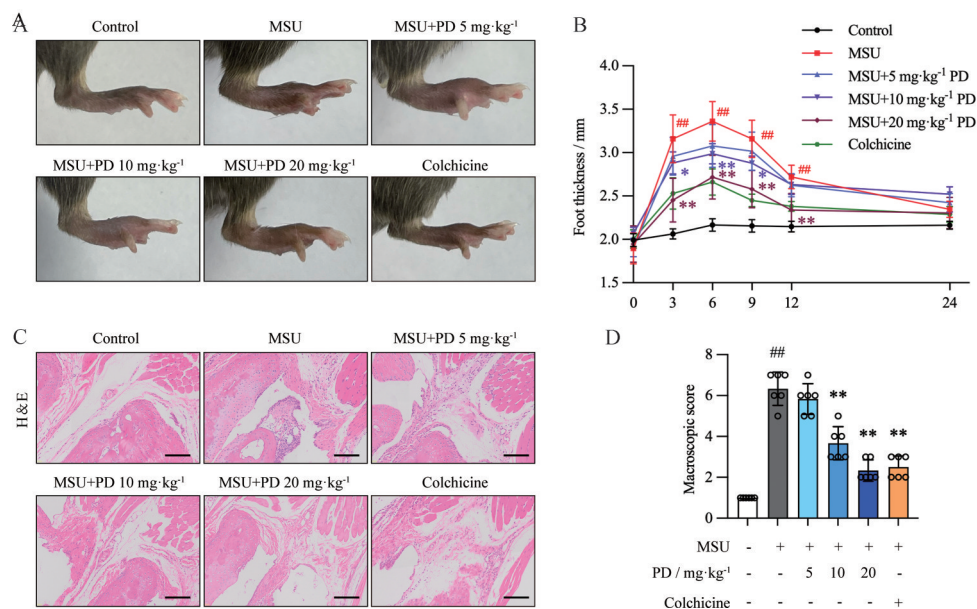


Figure 1 Effects of polydatin (PD) on paw swelling and injury in gouty mice. A: Morphological changes of foot paw from control, monosodium urate (MSU), MSU+PD (5, 10 or 20 mg·kg⁻¹) and MSU+colchicine (1 mg·kg⁻¹) groups were recorded after 6 h of MSU injection; B: Foot paw thickness changes were measured at different time after MSU injection; C, D: Hematoxylin-eosin (H&E) staining of foot paws from control, MSU, MSU+PD (5, 10 or 20 mg·kg⁻¹) and MSU+colchicine (1 mg·kg⁻¹) groups (C) and foot paws injury score (D). Scale bar: 100 μm. *n* = 6, $\bar{x} \pm \text{SEM}$. ^{##}*P* < 0.01 vs control; **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs MSU

有效缓解MSU诱导的小鼠痛风性关节炎。

2 虎杖苷对痛风小鼠足掌NLRP3及CASP1 p20表达情况的影响

本研究通过免疫组织化学检测小鼠足掌组织NLRP3的水平及NLRP3炎症小体活化情况。较对照组而言,痛风模型组小鼠足掌组织NLRP3及CASP1 p20表达显著升高,表明此时NLRP3炎症小体活化程度较高。与痛风模型组比较,在给予不同剂量虎杖苷后,虎杖苷给药组小鼠足掌组织NLRP3及CASP1 p20表达呈剂量依赖性下降,表明虎杖苷有效抑制了痛风小鼠足掌组织内NLRP3炎症小体的活化(图2A、B)。随后的免疫荧光试验进一步表明,虎杖苷有效抑制了小鼠足掌组织NLRP3炎症小体活化介导的CASP1 p20的成熟(图2C)。

3 痛风性关节炎小鼠模型踝关节的表达谱分析

通过对痛风性关节炎小鼠模型踝关节的表达谱(GSE242872)分析,本研究发现先天性免疫相关通路显著富集,表明先天性免疫在痛风性关节炎的发病中具有重要的调控作用(图3A)。相较于对照组而言,MSU诱导的小鼠痛风性关节炎模型组中细胞因子介导的信号通路相关基因显著上调(图3B)。通过分析对照组与MSU诱导的小鼠痛风性关节炎模型组之间差异表达基因,结果发现NLRP3在痛风性关节炎小鼠模型踝关节表达量显著上调,进一步证实NLRP3炎症

小体在痛风的发生与发展中起着至关重要的作用(图3C、D)。综上,NLRP3所介导的先天性免疫反应在痛风性关节炎的发病中具有重要的调控作用。

4 虎杖苷对巨噬细胞内IL-1β分泌的影响

本研究通过细胞实验进一步检测虎杖苷对NLRP3炎症小体活化介导的IL-1β分泌的影响。如图4A~C所示,BMDMs经LPS+ATP/MSU/nigericin刺激后,NLRP3炎症小体活化并伴随大量IL-1β炎症因子的生成与释放。分别使用1、3、10 μmol·L⁻¹虎杖苷处理后,与NLRP3炎症小体活化模型组相比,IL-1β的分泌显著减少,并呈现良好的剂量效应。该结果进一步在PMA预处理的THP-1细胞中得到证实(图4D~F)。MCC950作为本实验的阳性对照,对巨噬细胞内NLRP3炎症小体活化介导的IL-1β生成与分泌表现出显著的抑制作用,其效果与10 μmol·L⁻¹虎杖苷相当。上述结果表明,虎杖苷有效抑制巨噬细胞内NLRP3炎症小体活化介导的IL-1β生成与分泌。

5 虎杖苷对巨噬细胞内NLRP3炎症小体组装与活化的影响

BMDMs细胞经LPS+ATP刺激后,NLRP3炎症小体活化,从而诱导CASP1活化及CASP1 p20剪切体的产生。与NLRP3炎症小体活化模型组相比,使用不同剂量(1、3、10 μmol·L⁻¹)虎杖苷处理后,CASP1活化程度显著下降,主要体现为CASP1 p20剪切体生成显著

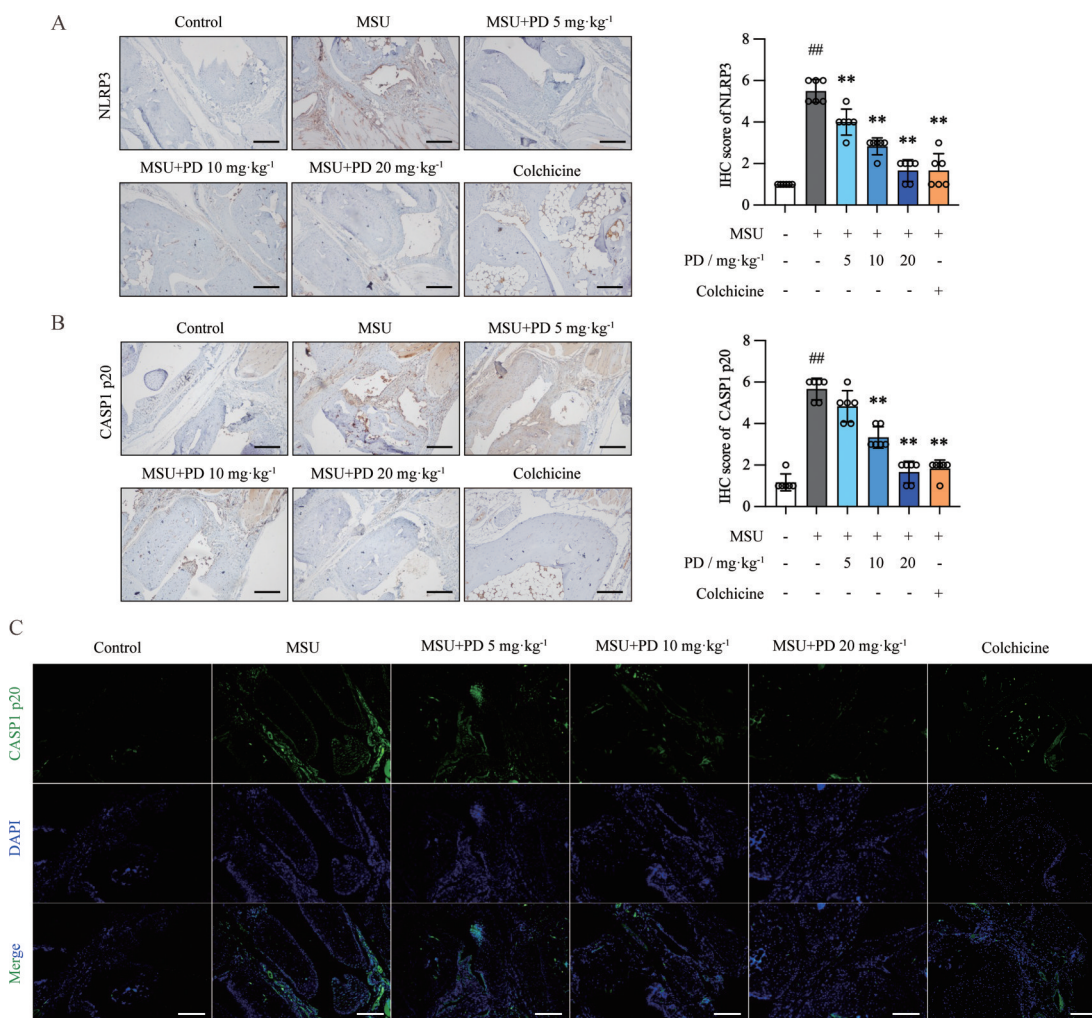


Figure 2 Effect of PD on the expression of NACHT, LRR, and PYD domain-containing protein 3 (NLRP3) and cysteinyl aspartate specific proteinase 1 (CASP1) p20 in the soles of gout mice. A: NLRP3 expression levels of mouse paws from control, MSU, MSU+PD (5, 10 or 20 mg·kg⁻¹) and MSU+colchicine (1 mg·kg⁻¹) groups were detected by immunohistochemistry; B, C: CASP1 p20 expression levels of mouse paws from control, MSU, MSU+PD (5, 10 or 20 mg·kg⁻¹) and MSU+colchicine (1 mg·kg⁻¹) groups were detected by immunohistochemistry (B) and immunofluorescence (C). Scale bar: 100 μm. *n* = 6, $\bar{x} \pm \text{SEM}$. ^{##}*P* < 0.01 vs control; ^{**}*P* < 0.01 vs MSU

减少, 并呈现良好的剂量效应 (图 5A)。同时, CASP1 与 ASC 共定位反映出 NLRP3 炎症小体组装完毕。NLRP3 炎症小体活化模型组观察到明显的 CASP1 与 ASC 共定位。与 NLRP3 炎症小体活化模型组相比, 使用 10 μmol·L⁻¹ 虎杖苷处理后细胞内 CASP1 与 ASC 共定位消失, 表明 NLRP3 炎症小体组装受到明显抑制 (图 5B)。MCC950 作为本实验的阳性对照, 对巨噬细胞内 NLRP3 炎症小体组装活化介导的 CASP1 成熟表现出显著的抑制作用, 其效果与高剂量虎杖苷相当。综上所述, 虎杖苷通过抑制 NLRP3 炎症小体组装, 进而抑制 NLRP3 炎症小体的活化。

讨论

炎症小体是由细胞质模式识别受体形成的多蛋白

复合体。这些受体在检测病原体相关分子模式 (PAMPs) 和宿主来源的损伤相关分子模式 (DAMPs) 中起关键作用^[27]。作为先天免疫系统的核心组成部分, 这些复合体调控先天免疫反应, 不仅在抵御感染中发挥作用, 还参与自身免疫和炎症性疾病的调节^[28,29]。

自从炎症小体被首次发现至今已有二十余年。在这期间, NLRP3 炎症小体因其在多种疾病发病机制中的关键作用而备受研究关注^[30]。NLRP3 由 3 个结构域组成: 羧基末端的富含亮氨酸重复序列 (LRR) 结构域、具有 ATP 酶活性的核苷酸结合结构域 (NACHT 结构域) 及氨基末端的吡啶 (PYD) 结构域^[17,31]。通常, NLRP3 炎症小体的激活需要两个信号。第一信号 (信号 1) 通常由微生物衍生的 LPS 触发, LPS 通过激活转录因子核因子 κB (NF-κB), 上调促炎性细胞因子和

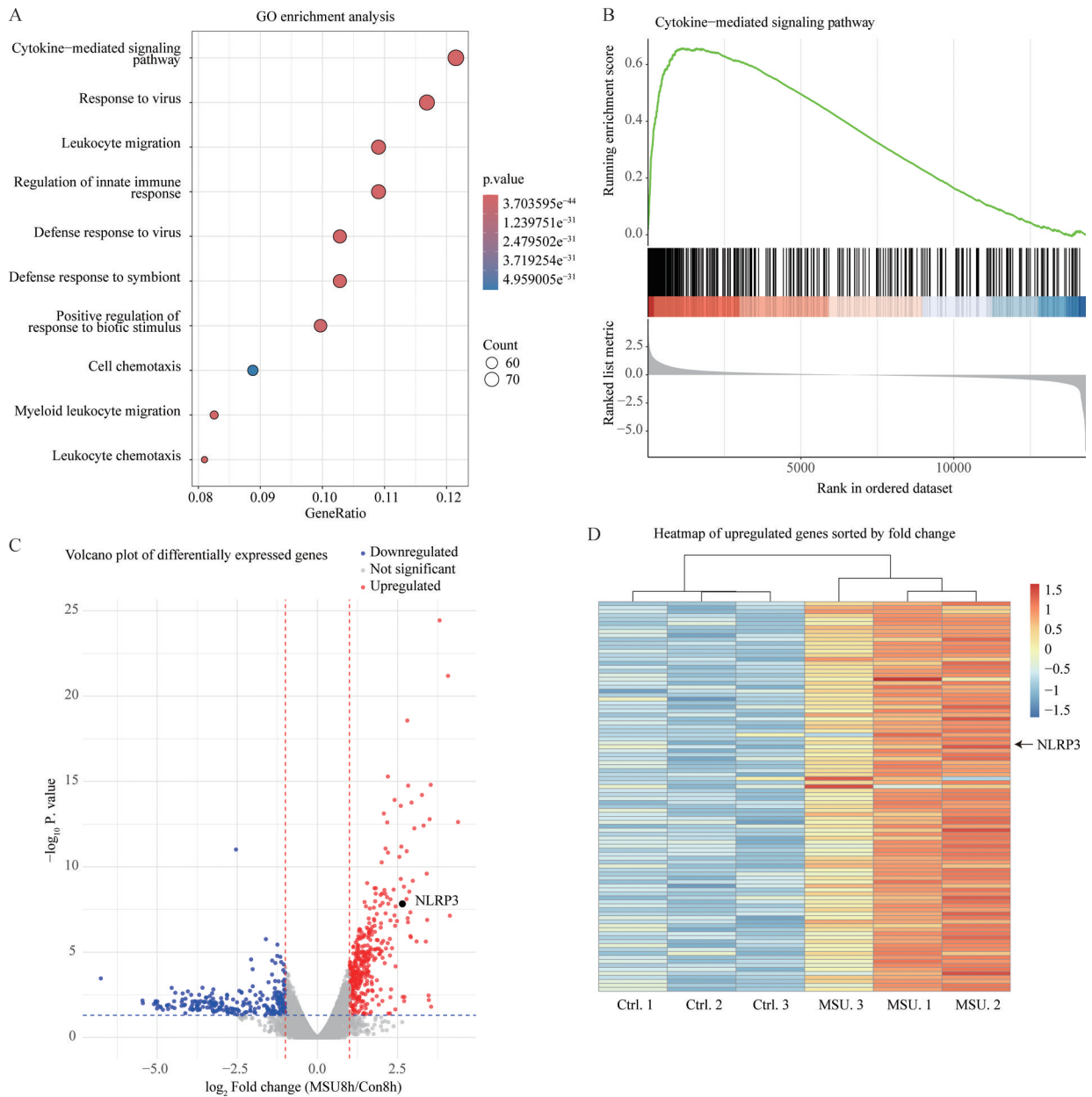


Figure 3 Expression profiling analysis of the ankle joint in a mouse model of gouty arthritis (GSE242872). A: For gouty arthritis in mice, the dot plot presents enriched immune-related GO biological process (BP) terms from GSEA analysis; B: GSEA analysis of the cytokine-mediated signaling pathway gene set; C: Volcano plot showing differentially expressed genes of the cytokine-mediated signaling pathway gene set. Gray indicates non-significant genes, red indicates upregulated genes in the pathway, and blue indicates downregulated genes in the cytokine-mediated signaling pathway gene set. Significance was determined by Benjamini-Hochberg adjusted two-sided Wilcoxon test; D: Heatmap of differentially expressed genes, showing expression levels between the gouty model and the control group, with NLRP3 showing significantly upregulated expression in the gout group

炎症小体成分的转录。第二信号 (信号 2) 则由 ATP、胆固醇、硅晶体等刺激引发, 导致 NLRP3 炎症小体组装与活化, 后者将 pro-CASP1 转化为活性 CASP1 p20 等剪切体形式, 使无活性的细胞内白细胞介素 IL-1 β 前体 pro-IL-1 β 被蛋白水解裂解为成熟的生物活性 IL-1 β ^[32,33]。活性 IL-1 β 与 IL-1 受体 1 结合并诱导多种次级炎症介质, 包括细胞因子、前列腺素和趋化因子,

从而导致中性粒细胞和单核细胞浸润, 使炎症加剧^[34,35]。此外, 线粒体功能障碍, 如线粒体通透性转变、活性氧过量生成以及线粒体 DNA 的释放等, 也可激活 NLRP3 炎症小体的组装和活化^[36,37]。从结构和功能上看, NLRP3 炎症小体的异常激活已被证明与多种疾病的发生发展密切相关, 包括胰腺炎、多发性硬化症和阿尔茨海默病等^[14]。因此, 对 NLRP3 的药理学抑制

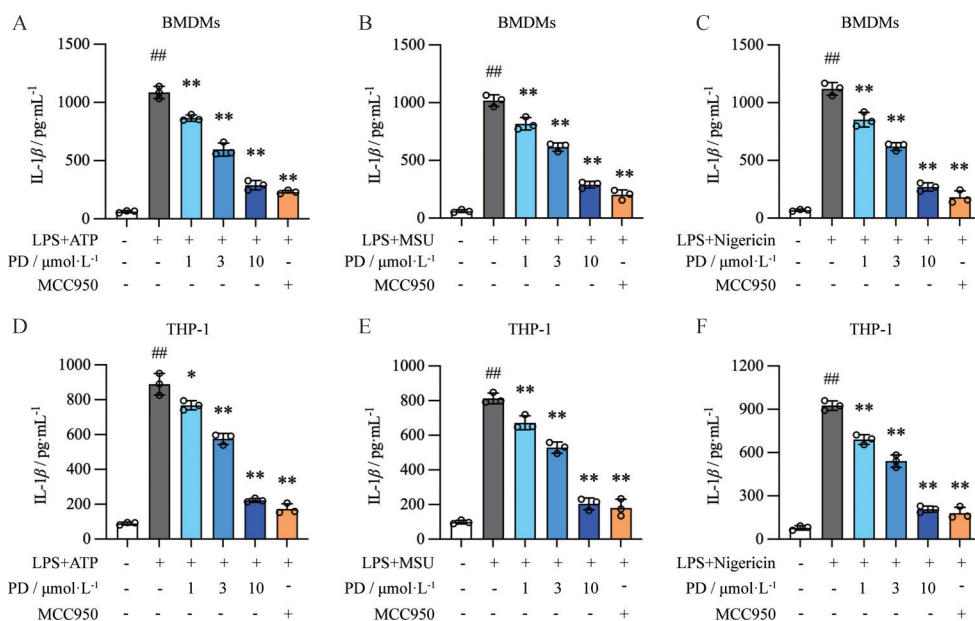


Figure 4 Effect of PD on interleukin-1 β (IL-1 β) secretion in macrophages. A–C: Bone marrow derived macrophages (BMDMs) were stimulated with 100 ng·mL⁻¹ lipopolysaccharide (LPS) for 3 h, followed by indicated concentrations of PD or 0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MCC950 treatment for 1 h and then another 1 h of 5 mmol·L⁻¹ adenosine triphosphate (ATP) (A), 2 h of 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MSU (B) or 2 h of 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ nigericin stimulation (C); D–F: Phorbol myristate acetate (PMA, 10 ng·mL⁻¹)-differentiated THP-1 cells were stimulated with 100 ng·mL⁻¹ LPS for 3 h, followed by indicated concentrations of PD or 0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MCC950 treatment for 1 h and then another 1 h of 5 mmol·L⁻¹ ATP (D), 2 h of 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MSU (E) or 2 h of 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ nigericin stimulation (F). IL-1 β in supernatant were determined by ELISA. $n = 3$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$. $^{###}P < 0.01$ vs control; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ vs LPS+ATP or LPS+MSU or LPS+nigericin

以阻碍 CASP1 活化并减少 IL-1 β 或 IL-18 等促炎性细胞因子的分泌被认为是一种潜在的有效治疗策略。

随着生活方式的改变和人们对多样化饮食的追求, 中国高尿酸血症和痛风的发病率持续上升, 影响的人群日益增多。痛风是一种慢性系统性炎症性疾病, 其急性发作常导致关节剧烈疼痛和肿胀, 并且常伴随血脂异常、代谢紊乱、心血管疾病及肾脏疾病等多种并发症, 严重影响患者的生活质量。目前, 治疗痛风发作的一线疗法包括口服具有广泛抗炎特性的药物或降尿酸药物, 如 NSAID、糖皮质激素、秋水仙碱及别嘌醇等; 但是上述药物均有着严重的毒副作用^[38]。如超过 90% 的痛风患者至少有一种非甾体抗炎药的禁忌症, 超过 40% 的痛风患者禁用秋水仙碱^[39]。除了禁忌症外, 一些痛风患者常常患有高血压、糖尿病、心血管或肾脏疾病等并发症, 这些患者对目前使用的消炎药不耐受, 若强制服用 NSAIDs、糖皮质激素或秋水仙碱可导致上述病症的加重^[6,40]。此外, 别嘌醇、非布司他等降尿酸药物可能引发患者皮肤过敏、肝肾功能损害等毒副作用, 这进一步限制了现有的口服疗法在痛风发作治疗中的应用^[41]。相较于传统的用于缓解痛风症状的广谱抗炎药物与降尿酸药物, 中药复方制剂以其独特的疗效、绿色安全, 越来越受到广泛的关注。已有研

究表明, 中药复方痛风康合剂 (主要制剂包括黄柏、苍术、苡仁、川牛膝、虎杖、秦艽、玉米须、丝瓜络、车前子、益母草、蒲公英、粉萆薢, 无任何西药成分) 对高尿酸血症和痛风具有良好的疗效, 既能改善症状, 又能降低血尿酸、红细胞沉降率和 C 反应蛋白, 与西药相比不良反应少, 便于长时间治疗, 这为痛风治疗药物的选择与进一步开发提供了方向^[42]。

已有研究表明, 痛风发作是由巨噬细胞吸收沉积的尿酸单钠晶体并随之过度激活 NLRP3 炎症小体引起的, 因此及时中断这种自身炎症过程以控制症状是治疗痛风发作的潜在手段。虽然 IL-1 β 在由单钠尿酸盐晶体引起的痛风性关节炎中起着重要作用, 但由于针对 IL-1 靶向治疗 (如 IL-1 受体阻断和 IL-1 β 中和) 的生物制剂需要注射给药且成本高昂, 尚未被广泛使用^[43-45]。鉴于 NLRP3 炎症小体活化在痛风发病过程中扮演着重要作用, 以 NLRP3 炎症小体为靶点的药物在减轻炎症方面具有巨大潜力, 且已有部分 NLRP3 炎症小体抑制剂开展临床研究。如 MCC950 是一种机制明确的高选择性 NLRP3 抑制剂, 已被证明能有效抑制炎症细胞因子的释放并减轻痛风小鼠模型中的组织损伤^[14,46]。然而, 由于 MCC950 在一项用于类风湿关节炎治疗的 II 期临床试验中出现严重的脱靶效应和毒

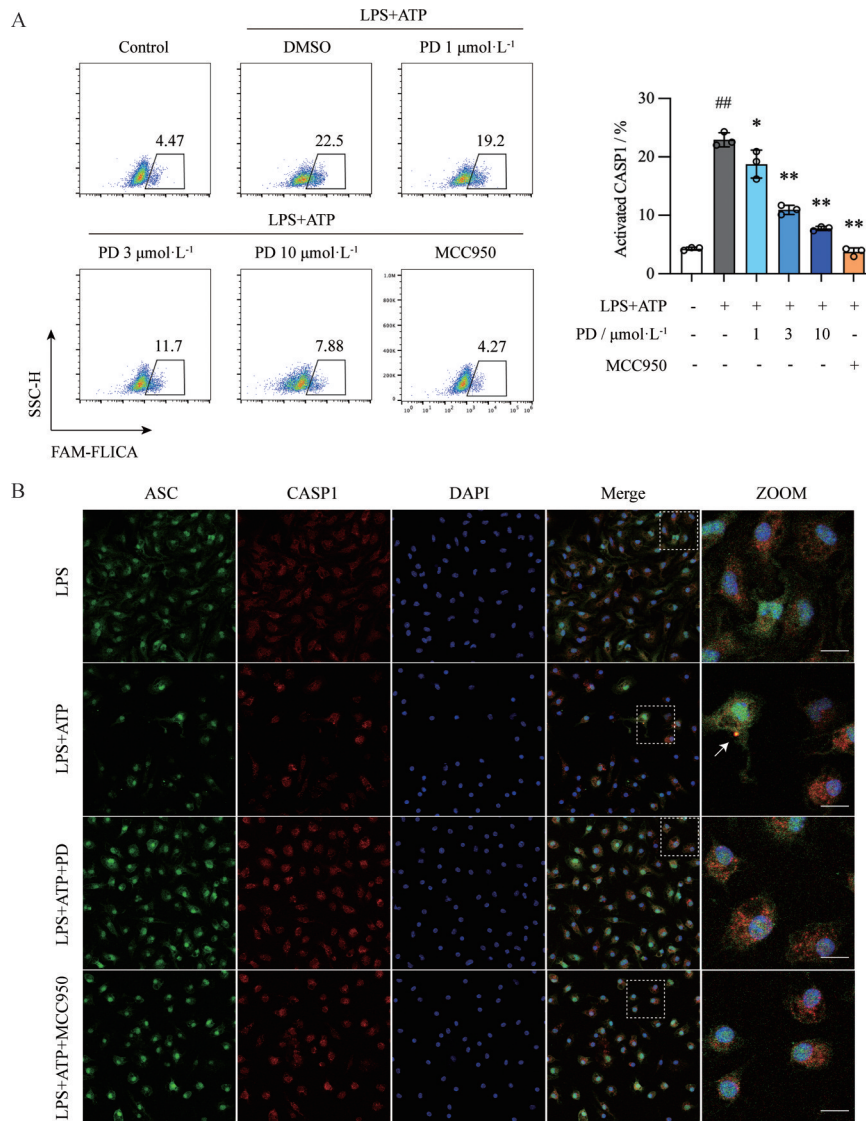


Figure 5 Effect of PD on the assembly and activation of NLRP3 inflammasome in macrophages. A: BMDMs were stimulated with $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS for 3 h, followed by indicated concentrations of PD or $0.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MCC950 treatment for 1 h and then another 1 h of $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATP. CASP1 activation was determined by FAM-FLICA staining; B: LPS primed BMDMs were treated with $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PD or $0.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MCC950 for 1 h, followed by $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATP stimulation for 30 min. Co-localization of apoptosis associated speck-like protein containing CARD (ASC) and pro-CASP1 was determined by immunofluorescence. Scale bar $10 \mu\text{m}$. $n = 3$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$. $^{###}P < 0.01$ vs control; $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ vs LPS+ATP

性, 最终宣告失败^[47]。因此, 鉴于 NLRP3 抑制剂在痛风等 NLRP3 炎症小体相关疾病方面具有广泛的治疗潜力, 持续寻找更安全、更有效的 NLRP3 抑制剂至关重要。

虎杖是一种在传统中医中广泛应用的草药, 常用于治疗炎症性疾病^[48]。从虎杖根部中提取的虎杖苷作为一种天然产物小分子, 毒副作用较小, 具有较强的安全性。此外, 已有研究表明虎杖苷具有良好的抗炎抗氧化功能^[49]。本研究在小鼠足掌内注射 MSU 晶体诱导小鼠产生典型的痛风症状, 表现为足掌组织严重肿胀及小鼠运动能力下降, 足掌组织损伤严重并伴随强

烈的局部炎症反应。与痛风模型组相比, 在给予不同剂量虎杖苷后, 小鼠足掌肿胀程度呈剂量依赖性明显下降, 足掌组织损伤显著减轻, 局部炎症反应得到有效控制与缓解。细胞实验表明, 虎杖苷有效抑制巨噬细胞内 NLRP3 炎症小体的组装, 从源头上抑制 NLRP3 炎症小体的活化。综上所述, 虎杖苷通过抑制 NLRP3 炎症小体的组装与活化以显著降低 IL-1 β 促炎细胞因子的生成与分泌, 有效减轻 MSU 诱导的痛风性关节炎, 降低足掌组织损伤程度并缓解足掌局部炎症反应, 为其作为治疗痛风性关节炎潜在药物的进一步开发提供了理论依据。

作者贡献: 杨家书、权力负责构建小鼠痛风模型、相关实验研究工作、实验结果分析与图表制作; 徐强、郭文洁提供研究思路、指导研究方法并撰写论文。

利益冲突: 本研究与任何组织和个人均不存在利益冲突。

References

- [1] Liang J, Jiang Y, Huang Y, et al. Comorbidities and factors influencing frequent gout attacks in patients with gout: a cross-sectional study [J]. *Clin Rheumatol*, 2021, 40: 2873-2880.
- [2] Busso N, So A. Mechanisms of inflammation in gout [J]. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12: 206.
- [3] Cross M, Ong KL, Culbreth GT, et al.. Global, regional, and national burden of gout, 1990-2020, and projections to 2050: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2021 [J]. *Lancet Rheumatol*, 2024, 6: e507-e517.
- [4] Becker MA, Chohan S. We can make gout management more successful now [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2008, 20: 167-172.
- [5] Dalbeth N, Choi HK, Joosten LAB, et al. Gout [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5: 69.
- [6] Bardin T, Richette P. Impact of comorbidities on gout and hyperuricaemia: an update on prevalence and treatment options [J]. *BMC Med*, 2017, 15: 123.
- [7] Sun L, Wang X, Saredy J, et al. Innate-adaptive immunity interplay and redox regulation in immune response [J]. *Redox Biol*, 2020, 37: 101759.
- [8] Xu H, Chen J, Chen P, et al. Costunolide covalently targets NACHT domain of NLRP3 to inhibit inflammasome activation and alleviate NLRP3-driven inflammatory diseases [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13: 678-693.
- [9] Liu W, Yang J, Fang S, et al. Spirodalsole analog 8A inhibits NLRP3 inflammasome activation and attenuates inflammatory disease by directly targeting adaptor protein ASC [J]. *J Biol Chem*, 2022, 298: 102696.
- [10] Yang G, Lee HE, Lee JY. A pharmacological inhibitor of NLRP3 inflammasome prevents non-alcoholic fatty liver disease in a mouse model induced by high fat diet [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24399.
- [11] He H, Jiang H, Chen Y, et al. Oridonin is a covalent NLRP3 inhibitor with strong anti-inflammasome activity [J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 2550.
- [12] Yang J, Jiao C, Liu N, et al. Polydatin-mediated inhibition of HSP90alpha disrupts NLRP3 complexes and alleviates acute pancreatitis [J]. *Research (Wash D C)*, 2024, 7: 0551.
- [13] Huang Y, Jiang H, Chen Y, et al. Tranilast directly targets NLRP3 to treat inflammasome-driven diseases [J]. *EMBO Mol Med*, 2018, 10: e8689.
- [14] Coll RC, Robertson AA, Chae JJ, et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases [J]. *Nat Med*, 2015, 21: 248-255.
- [15] Coll RC, Hill JR, Day CJ, et al. MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition [J]. *Nat Chem Biol*, 2019, 15: 556-559.
- [16] Narros-Fernández P, Chioua M, Petcu SA, et al. Synthesis and pharmacological evaluation of new N-sulfonylureas as NLRP3 inflammasome inhibitors: identification of a hit compound to treat gout [J]. *J Med Chem*, 2022, 65: 6250-6260.
- [17] Mangan MSJ, Olhava EJ, Roush WR, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17: 588-606.
- [18] Marchetti C, Swartzwelder B, Gamboni F, et al. OLT1177, a beta-sulfonyl nitrile compound, safe in humans, inhibits the NLRP3 inflammasome and reverses the metabolic cost of inflammation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115: E1530-E1539.
- [19] Lai JY, Fan XL, Zhang HB, et al. *Polygonum cuspidatum* polysaccharide: a review of its extraction and purification, structure analysis, and biological activity [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 331: 118079.
- [20] Wu M, Li X, Wang S, et al. Polydatin for treating atherosclerotic diseases: a functional and mechanistic overview [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 128: 110308.
- [21] Simões MS, Ames-Sibin AP, Lima EP, et al. Resveratrol biotransformation and actions on the liver metabolism of healthy and arthritic rats [J]. *Life Sci*, 2022, 310: 120991.
- [22] Vervandier-Fasseur D, Latruffe N. The potential use of resveratrol for cancer prevention [J]. *Molecules*, 2019, 24: 4506.
- [23] Xiang ZM, Zhang S, Yao XD, et al. Resveratrol promotes axonal regeneration after spinal cord injury through activating Wnt: β -catenin signaling pathway [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13: 23603-23619.
- [24] Jardim FR, de Rossi FT, Nascimento MX, et al. Resveratrol and brain mitochondria: a review [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55: 2085-2101.
- [25] Xue L, Wu K, Qiu H, et al. Polydatin exhibits the hepatoprotective effects through PPAR- α/β signaling pathway in streptozocin-induced diabetic mice [J]. *J Funct Foods*, 2017, 36: 341-347.
- [26] Zhao XJ, Yu HW, Yang YZ, et al. Polydatin prevents fructose-induced liver inflammation and lipid deposition through increasing miR-200a to regulate Keap1/Nrf2 pathway [J]. *Redox Biol*, 2018, 18: 124-137.
- [27] Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation [J]. *Cell*, 2010, 140: 805-820.
- [28] Gross O, Thomas CJ, Guarda G, et al. The inflammasome: an integrated view [J]. *Immunol Rev*, 2011, 243: 136-151.
- [29] Seoane PI, Lee B, Hoyle C, et al. The NLRP3-inflammasome as a sensor of organelle dysfunction [J]. *J Cell Biol*, 2020, 219: e202006194.
- [30] Schroder K, Coll RC. Caging NLRP3 tames inflammasome activity [J]. *Cell*, 2021, 184: 6224-6226.

- [31] Yu X, Matico RE, Miller R, et al. Structural basis for the oligomerization-facilitated NLRP3 activation [J]. *Nat Commun*, 2024, 15: 1164.
- [32] Rainer TH, Cheng CH, Janssens HJ, et al. Oral prednisolone in the treatment of acute gout: a pragmatic, multicenter, double-blind, randomized trial [J]. *Ann Intern Med*, 2016, 164: 464-471.
- [33] Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome [J]. *Nature*, 2006, 440: 237-241.
- [34] Dinarello CA. How interleukin-1beta induces gouty arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62: 3140-3144.
- [35] Zhan X, Li Q, Xu G, et al. The mechanism of NLRP3 inflammasome activation and its pharmacological inhibitors [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1109938.
- [36] Guo W, Liu W, Chen Z, et al. Tyrosine phosphatase SHP2 negatively regulates NLRP3 inflammasome activation *via* ANT1-dependent mitochondrial homeostasis [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 2168.
- [37] Vanaja SK, Rathinam VA, Fitzgerald KA. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights [J]. *Trends Cell Biol*, 2015, 25: 308-315.
- [38] Wechalekar MD, Vinik O, Moi JH, et al. The efficacy and safety of treatments for acute gout: results from a series of systematic literature reviews including Cochrane reviews on intraarticular glucocorticoids, colchicine, nonsteroidal antiinflammatory drugs, and interleukin-1 inhibitors [J]. *J Rheumatol Suppl*, 2014, 92: 15-25.
- [39] Richette P, Clerson P, Périsin L, et al. Revisiting comorbidities in gout: a cluster analysis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74: 142-147.
- [40] Keenan RT, O'Brien WR, Lee KH, et al. Prevalence of contraindications and prescription of pharmacologic therapies for gout [J]. *Am J Med*, 2011, 124: 155-163.
- [41] Dalbeth N, Gosling AL, Gaffo A, et al. Gout [J]. *Lancet*, 2021, 397: 1843-1855.
- [42] Chen YF, Dai FF, Ge L, et al. Observation of the Clinical Curative of Tongfengkang Mixture on Gout and Hyperuricemia (痛风康合剂治疗高尿酸血症和痛风的临床疗效观察) [D]. Nanjing: Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, 2011.
- [43] Schlesinger N, Alten RE, Bardin T, et al. Canakinumab for acute gouty arthritis in patients with limited treatment options: results from two randomised, multicentre, active-controlled, double-blind trials and their initial extensions [J]. *Ann Rheum Dis*, 2012, 71: 1839-1848.
- [44] Janssen CA, Oude Voshaar MAH, Vonkeman HE, et al. Anakinra for the treatment of acute gout flares: a randomized, double-blind, placebo-controlled, active-comparator, non-inferiority trial [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2019, 58: 1344-1352.
- [45] So A, Dumusc A, Nasi S. The role of IL-1 in gout: from bench to bedside [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2018, 57: i12-i19.
- [46] Vande Walle L, Stowe IB, Šácha P, et al. MCC950/CRID3 potentially targets the NACHT domain of wild-type NLRP3 but not disease-associated mutants for inflammasome inhibition [J]. *PLoS Biol*, 2019, 17: e3000354.
- [47] McBride C, Trzoss L, Povero D, et al. Overcoming preclinical safety obstacles to discover (S)-N-((1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-yl)carbamoyl)-6-(methylamino)-6,7-dihydro-5H-pyrazolo[5,1-b][1,3]oxazine-3-sulfonamide (GDC-2394): a potent and selective NLRP3 inhibitor [J]. *J Med Chem*, 2022, 65: 14721-14739.
- [48] Huang B, Liu J, Meng T, et al. Polydatin prevents lipopolysaccharide (LPS)-induced Parkinson's disease *via* regulation of the AKT/GSK3beta-Nrf2/NF-kappaB signaling axis [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2527.
- [49] Kim YS, Lee YM, Kim JH, et al. *Polygonum cuspidatum* inhibits pancreatic lipase activity and adipogenesis *via* attenuation of lipid accumulation [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2013, 25: 282.