

· 研究论文 ·

甘草查尔酮 A 对 NLRP3 炎症小体的调控作用及机制初探

付书彬^{1,2}, 徐 广², 高 源³, 王智磊⁴, 秦 楠¹, 刘慧敏², 柏兆方^{2*}, 肖小河^{2*}

(1. 江西中医药大学药学院 江西 南昌 330004; 2. 解放军第三〇二医院全军中医药研究所, 北京 100039;
3. 北京中医药大学药学院 北京 100029; 4. 成都中医药大学药学院 四川 成都 611137)

摘要: 利用小鼠原代骨髓巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophages, BMDMs) 构建 NOD (nucleotide binding oligomerization domain) 样受体家族 3 (NOD-like receptors, NLRP3) 炎症小体活化模型, 探讨甘草查尔酮 A (licochalcone A, LCA) 对 NLRP3 炎症小体的调控作用及初步机制。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 预处理 BMDMs 细胞后给予 LCA, 分别再给予三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 和尼日利亚菌素 (nigericin) 刺激构建 NLRP3 炎症小体活化模型, 采用 Caspase-Glo[®] 1 Inflammasome Assay 和 ELISA 检测细胞培养上清液中半胱氨酸天冬氨酸特异蛋白酶 1 (caspase-1) 的活性、白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 分泌; 通过免疫印迹法 (Western blot) 检测细胞上清中的成熟 IL-1 β 、caspase-1 的产生及细胞裂解液中 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein, ASC) 和 pro-caspase-1、pro-IL-1 β 的表达。Caspase-Glo[®] 1 Inflammasome Assay 和 ELISA 结果表明, LCA 能显著抑制 ATP 和 nigericin 诱导的 NLRP3 炎症小体组成蛋白 pro-caspase-1 和 pro-IL-1 β 剪切活化, 同时对细菌鞭毛蛋白 (Lfn-Flic) 诱导的 NOD 样受体家族半胱氨酸天冬氨酸酶激活募集结构域 4 (NOD-like receptor containing a caspase activating and recruitment domain 4, NLRC4) 炎症小体活性也具轻微抑制作用, 但是对 poly(dA:dT) 诱导的黑色素瘤缺乏因子 2 (the absent in melanoma 2, AIM2) 炎症小体活化无影响。免疫印迹法检测显示 LCA 对 NF- κ B 介导的 NLRP3 炎症小体组成蛋白 NLRP3 和 pro-IL-1 β 表达无影响。综上, 研究表明 LCA 可通过抑制 pro-caspase-1 剪切, 阻断 caspase p20 介导的 pro-IL-1 β 的剪切成熟, 最终抑制 NLRP3 炎症小体介导免疫炎症反应。本研究在中国人民解放军第 302 医院伦理委员会审批下进行, 为甘草及 LCA 防治 NLRP3 炎症小体相关疾病提供了依据。

关键词: 甘草查尔酮 A; NLRP3 炎症小体; caspase-1 p20; 成熟 IL-1 β

中图分类号: R967

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 12-2050-07

Inhibitory effect and mechanism of licochalcone A on NLRP3 inflammasome

FU Shu-bin^{1,2}, XU Guang², GAO Yuan³, WANG Zhi-lei⁴, QIN Nan¹, LIU Hui-min²,
BAI Zhao-fang^{2*}, XIAO Xiao-he^{2*}

(1. School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. China Military Institute of Chinese Medicine, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China; 3. School of Pharmacy, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 4. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

Abstract: Lipopolysaccharide (LPS)-induced bone marrow-derived macrophages (BMDMs), treated with licochalcone A (LCA) and retreated with inflammasome inducers respectively (ATP and nigericin), were used to

收稿日期: 2018-08-06; 修回日期: 2018-09-02.

基金项目: 重大新药创制项目 (2017ZX09301022); 山东省重点研发计划项目 (2016ZDJQ0108).

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

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0713

construct the inflammasome model of NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3), to investigate the inhibitory effect and the molecular mechanism of LCA on the activity of NLRP3 inflammasome. The secretion of mature interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor- α (TNF- α) and caspase-1 in the supernatants were analyzed by ELISA and the Caspase-Glo[®] 1 Inflammasome Assay. Supernatants and cell lysates were analyzed for the expression of pro-caspase-1, pro-IL-1 β , ASC, NLRP3, IL-1 β , caspase-1 by immunoblotting. The study shows that LCA inhibited the activity of caspase-1 and the secretion of IL-1 β , and suppressed the activity of NLRP3 inflammasome. There was also slight inhibition of NLRC4 inflammasome induced by Lfn-Flic, but no effect on poly(dA:dT)-induced the absent in melanoma 2 (AIM2) inflammasome. Western blot showed that LCA had no effect on the protein expression of NLRP3 and pro-IL-1 β , which was mediated by NF- κ B pathway. In summary, LCA can inhibit the cleavage of pro-caspase-1 and suppress the secretion of IL-1 β to reduce the inflammation response. The study was carried out under the approval of the Scientific Investigation Board of 302 Hospital of PLA.

Key words: licochalcone A; NLRP3 inflammasome; caspase-1; IL-1 β

炎症小体主要是由受体蛋白、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein, ASC) 和半胱氨酸天冬氨酸特异蛋白酶 1 前体 (pro-caspase-1) 组成的多蛋白复合物^[1]。其中, 受体蛋白包括多种 NOD 样受体蛋白家族如 NOD 样受体家族 3 (NLRP3)、NOD 样受体家族半胱天冬酶激活募集结构域 4 (NLRC4)、黑色素瘤缺乏因子 2 (AIM2) 蛋白和 pyrin^[2]。当细胞受到病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) 或危险相关分子模式 (danger-associated molecular pattern, DAMP) 刺激时, 会促进炎症小体的组装活化, pro-caspase-1 自我剪切产生 caspase-1, caspase-1 剪切 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18, 分泌成熟 IL-1 β 和 IL-18 等促炎因子^[3], 从而介导多种疾病的发生。其中 NLRP3 炎症小体研究最为广泛, 可被 ATP、nigericin 及病原体等多种因素诱导活化^[4]。目前研究发现溃疡性结肠炎^[5]、阿尔茨海默病^[6]、2 型糖尿病^[7]、动脉粥样硬化^[8]和痛风^[9]等都与 NLRP3 炎症小体的异常激活密切相关。

甘草查尔酮 A (licochalcone A, LCA) 是一种从胀果甘草 (*Glycyrrhiza inflata* bat.) 中提取的类黄酮物质, 是胀果甘草种属特异性成分, 也是胀果甘草的主要黄酮类成分^[10], 研究发现 LCA 具有明显的抗炎作用^[11], 在 RAW264.7 细胞中, 通过阻断 NF- κ B 信号通路抑制 LPS 诱导的炎症反应^[12]。已有研究报道, LCA 可以减弱小鼠因 LPS 引起的急性肺损伤^[13]和急性肾损伤^[14]。然而, 对于 LCA 是否能通过抑制 NLRP3 炎症小体的活性发挥抗炎作用尚未见相关报道。为此, 本研究利用小鼠原代骨髓巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophages, BMDMs) 构建体外研究模型, 探索 LCA 对 NLRP3 炎症小体活性的调控作用及初步机制, 以期对 NLRP3 过度活化诱发的相关疾病治疗

提供潜在的先导化合物。

材料与方法

材料和试剂 LCA (目录号: HY-N0372) 购自美国 Med Chem Express 公司, 纯度 99.44%; ATP 和 nigericin 均购自美国 Sigma 公司; poly(dA:dT)、ultrapure LPS 购自美国 Invivogen 公司; Lfn-Flic 为中国人民解放军军事医学科学院李涛博士赠送; NLRP3、ASC 和 caspase-1 抗体均购自美国 Adipogen 公司; IL-1 β 抗体购自美国 R&D 公司; 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 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; PVDF 膜 (孔径 0.45 μ m) 购自美国 Millipore 公司; opti-MEM 无血清培养基及其他所有细胞培养试剂均购自美国 Gibco 公司; caspase-1 荧光底物 (Ac-WEHD-AMC)、蛋白酶体抑制剂 (Ac-YVAD-CHO) 购自美国 Promega 公司。

主要仪器 SDS-PAGE 电泳系统 (美国 Bio-Rad 公司); 控温高速离心机 (美国 Sigma 公司), Promega GloMax 20/20 发光检测仪 (美国 Promega 公司)。

BMDMs 的分离培养 SPF 级雌性 C57 小鼠 (10~12 周龄) 20 只, 动物合格证号: SCXK (京) 2016-0002, 由北京斯贝福生物技术有限公司提供。本研究在中国人民解放军第 302 医院伦理委员会审批下进行。取 C57BL/6 雌鼠, 脱臼处死后在超净台分离小鼠的双侧股骨并用细针头吸取 DMEM 培养基冲出骨髓细胞, 反复吹散细胞后转移至 50 mL 离心管, 室温离心后, 去上清, 用 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 及 1% 双抗的 DMEM 培养基重悬细胞, 同时加入巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) 终质量浓度为 25 ng·mL⁻¹, 细胞培养 5 天后获得 BMDMs。

CCK-8 法检测细胞毒性 取培养至对数生长期的小鼠骨髓来源巨噬细胞系 (immortalized bone marrow-derived macrophages, iBMDMs) (购自中国科学院上海细胞所) 和 BMDMs, 接种于 96 孔板。细胞分为正常组、DMSO 组、不同浓度的 LCA 组 (1.25 、 2.5 、 5 、 10 、 20 、 40 、 80 、 $120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 孵育, 每孔加入 CCK-8 溶液 $10 \mu\text{L}$, 培养 20 min 后, 在酶标仪 450 nm 处测定吸光度值。

刺激方式^[15,16] 取上述分离培养好的 BMDMs, 胰酶与 EDTA 联合消化后接种于 24 孔板中, 用 DMEM 高糖培养基细胞培养 12 h 后, 培养基替换成浓度为 $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS 的 DMEM 培养基, 预处理 4 h 后, 撤除 LPS 刺激, 用不同浓度的 LCA 处理 1 h 后, 再在实验孔中加入 AIM2 炎症小体激活剂 Poly(dA:dT)、NLRP4 炎症小体激活剂 Lfn-Flic 刺激 6 h , 或加入 NLRP3 炎症小体激活剂 ATP 和 nigericin 刺激 45 min , 刺激时间结束后收样。

样品处理 细胞培养上清液在 $3\ 500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心后, 上清中加入 $1/4$ 体积三氯乙酸 (TCA), 冰箱 -20°C 过夜后, $13\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 4°C 离心 15 min , 弃去上清, 加冰丙酮洗 1 次, 105°C 金属浴挥干丙酮, 待丙酮挥发后加 $1\times$ loading buffer $40 \mu\text{L}$ 振荡混匀, 水浴煮沸, 冷却后作为上清样品。贴壁细胞用 PBS 洗板 2 次, 置于冰上, 每孔加入 $1\times$ loading buffer $200 \mu\text{L}$, 10 min 后刮下细胞, 吸取细胞裂解液, 水浴煮沸 20 min , 冷却后作为细胞裂解样品。

ELISA 试剂盒检测细胞培养上清液中成熟 IL-1 β 和 TNF- α 含量 细胞上清液采用 ELISA 试剂盒测定 IL-1 β 和 TNF- α 含量, 操作步骤按照试剂盒说明书进行, 最后用酶标仪上机检测, 通过 Excel 数据处理和 GraphPad Prism 6.0 图表制作。

Caspase-Glo[®] 1 Inflammasome Assay 检测细胞培养上清液中 caspase-1 活性^[17] 细胞培养上清液采

用 caspase-1 活性检测试剂盒测定 caspase-1 活性, 检测按照试剂盒说明书操作进行, 最后用 Promega GloMax 20/20 发光检测仪检测, 通过 Excel 处理数据和 GraphPad Prism 6.0 制作图表。

Western blot 测定蛋白的表达 取蛋白样品 $20 \mu\text{L}$ 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, 10% 脱脂奶室温封闭 0.5 h 后, 分别加入 pro-IL-1 β 、caspase-1、IL-1 β 、ASC、NLRP3、lamin B 的一抗溶液 4°C 孵育过夜, 加入辣根过氧化物酶标记的相应二抗溶液室温孵育 1 h 后, 用 Carestream 公司的化学发光液显色, X 光片显影。

统计学分析 实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 软件对两组间数据进行独立样本 t 检验, 显著性结果以 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、 $***P<0.001$ 表示。

结果

1 LCA 对 iBMDMs 和 BMDMs 的细胞毒性作用

通过 CCK-8 法检测 LCA (图 1A) 对 iBMDMs 和 BMDMs 细胞毒性, 确定 LCA 的给药浓度。如图 1B 和 C 所示, 与对照组相比, LCA 在 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以内不影响 iBMDMs 和 BMDMs 细胞生存, 而随着 LCA 浓度升高表现出对 iBMDMs 和 BMDMs 细胞生存的抑制效应。为此, 本研究选择 2.5 、 5 、 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为给药浓度, 开展 LCA 调控 NLRP3 炎症小体活性的研究。

2 LCA 抑制 ATP 诱导的 NLRP3 炎症小体活性

首先利用 LPS 预处理 BMDMs 诱导炎症小体前体蛋白表达后给予 LCA, 最后利用内源性刺激因子 ATP 诱导 NLRP3 炎症小体活化, 收集细胞培养上清和细胞裂解液。利用免疫印迹法对细胞培养上清中 caspase-1 p20 和成熟 IL-1 β 及细胞裂解液中的 NLRP3 炎症小体相关蛋白进行检测, LCA 呈剂量依赖性抑制上清液中 caspase-1 p20 产生和成熟 IL-1 β 分泌, 且对细胞裂解液中 NLRP3、ASC 等蛋白表达无明显影响

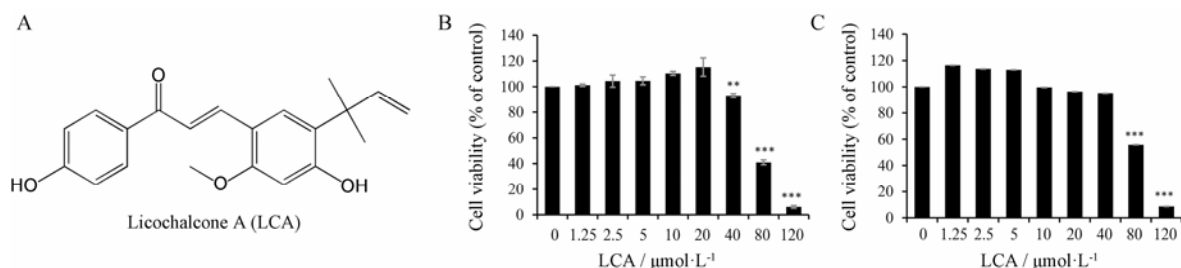


Figure 1 The cytotoxicity of licochalcone A (LCA) was analyzed by CCK-8 assay. A: LCA structure; B: Effect of LCA on cell viability in immortalized bone marrow-derived macrophages (iBMDMs). The cells were treated with various concentrations of LCA for 12 h . $n=5$, $\bar{x}\pm s$. C: Effect of LCA on cell viability in bone marrow-derived macrophages (BMDMs). The cells were treated with various concentrations of LCA for 24 h . $n=3$, $\bar{x}\pm s$. $**P<0.01$, $***P<0.001$ vs control group

(图 2A); 进一步通过 Caspase-Glo[®] 1 Inflammasome Assay 和 ELISA 分别检测细胞上清中 caspase-1 活性、成熟 IL-1 β 及 TNF- α 的含量, 结果表明, LCA 呈剂量依赖性抑制 caspase-1 活性 (图 2B) 和成熟 IL-1 β 分泌 (图 2C), 但对 TNF- α 分泌无影响 (图 2D)。因此, 结果表明, LCA 通过抑制 caspase-1 介导的 pro-IL-1 β 剪切活化, 抑制成熟 IL-1 β 分泌, 进而抑制 ATP 诱导的 NLRP3 炎症小体激活。

3 LCA 抑制 nigericin 诱导的 NLRP3 炎症小体活性

为了评价 LCA 对其他刺激因子诱导的 NLRP3 炎症小体激活的影响, 本研究在 LPS 预处理的基础上, 通过外源性刺激因子 nigericin 构建 NLRP3 炎症小体活化模型, 免疫印迹法检测细胞培养上清中 caspase-1 p20 和成熟 IL-1 β 及细胞裂解液中的 NLRP3 炎症小体相关蛋白, LCA 呈剂量依赖性抑制上清液中 caspase-1 p20 产生和成熟 IL-1 β 分泌, 且对细胞裂解液中 NLRP3、ASC 等蛋白表达无明显影响 (图 3A); 进一步采用 Caspase-Glo[®] 1 Inflammasome Assay 和 ELISA 检测细胞培养上清中 caspase-1 活性、成熟 IL-1 β 及 TNF- α 的含量, 本次实验结果表明, LCA 呈剂量依赖性抑制 caspase-1 活性 (图 3B)

和成熟 IL-1 β 分泌 (图 3C), 但对 TNF- α 分泌无影响 (图 3D)。结果表明, LCA 能抑制 nigericin 诱导的 NLRP3 炎症小体激活, 抑制成熟 IL-1 β 介导的免疫炎症通路。

4 LCA 对 NLRC4 炎症小体和 AIM2 炎症小体的活性影响

为评价 LCA 是否特异地抑制 NLRP3 炎症小体, 本研究评价了 LCA 对 NLRC4 炎症小体和 AIM2 炎症小体的作用。首先利用 LPS 联合 Lfn-Flic 构建 NLRC4 炎症小体活化模型评价 LCA 的作用。通过免疫印迹法对细胞培养上清及细胞裂解液中的炎症小体相关蛋白进行检测, 结果表明 LCA 对 NLRP3 炎症小体及 NLRC4 炎症小体中 caspase-1 p20 产生有抑制作用, 其对细胞裂解液中 NLRP3、ASC 等蛋白表达无明显影响 (图 4A); 进一步利用 Caspase-Glo[®] 1 Inflammasome Assay 和 ELISA 检测细胞培养上清液, 结果表明 LCA 对 NLRP3 炎症小体及 NLRC4 炎症小体中 caspase-1 活性和成熟 IL-1 β 分泌有抑制作用, 而在 LPS 联合 dsDNA 类似物 poly(dA:dT) 诱导的 AIM2 炎症小体活化模型中, 通过上述检测方法结果表明 LCA 对 caspase-1 活性和成熟 IL-1 β 分泌无抑制作用

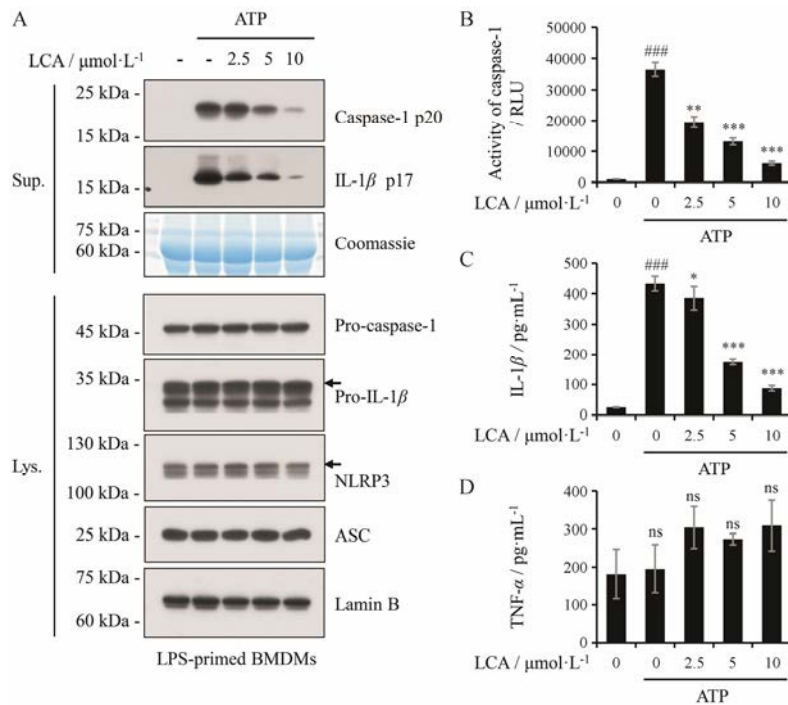


Figure 2 LCA inhibits ATP-induced activation of NLRP3 inflammasome. A: Western blot was used to assess the expression levels of indicated proteins in culture supernatants (Sup.) and cell lysates (Lys.). Lamin B was used as a loading control for cell lysates. Coomassie blue staining was provided as the loading control for the supernatants. B: The activity of caspase-1 was analyzed in the supernatant of BMDMs by the Caspase-Glo[®] 1 Inflammasome Assay. RLU, recombinant luciferase, which is proportional to caspase-1 activity. C, D: The secretion of IL-1 β and TNF- α was measured in the supernatant of BMDMs by ELISA. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs LPS+ATP group; ### $P<0.001$ vs control (DMSO) group. ns: Nonsignificant

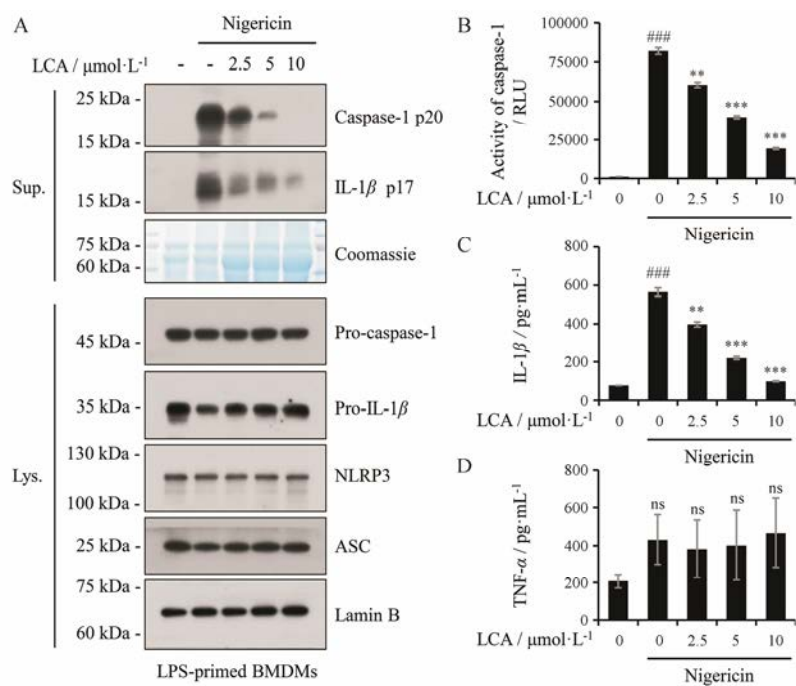


Figure 3 LCA inhibits nigericin-induced activation of NLRP3 inflammasome. A: Western blot was used to assess the expression levels of indicated proteins in culture supernatants and cell lysates. Lamin B was used as a loading control for cell lysates. Coomassie blue staining was provided as the loading control for the supernatants. B: The activity of caspase-1 was analyzed in the supernatant of BMDMs by the Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay. RLU, recombinant luciferase, which is proportional to caspase-1 activity. C, D: The secretion of IL-1 β and TNF- α was measured in the supernatant of BMDMs by ELISA. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs LPS+Nigericin group; ### $P < 0.001$ vs control (DMSO) group

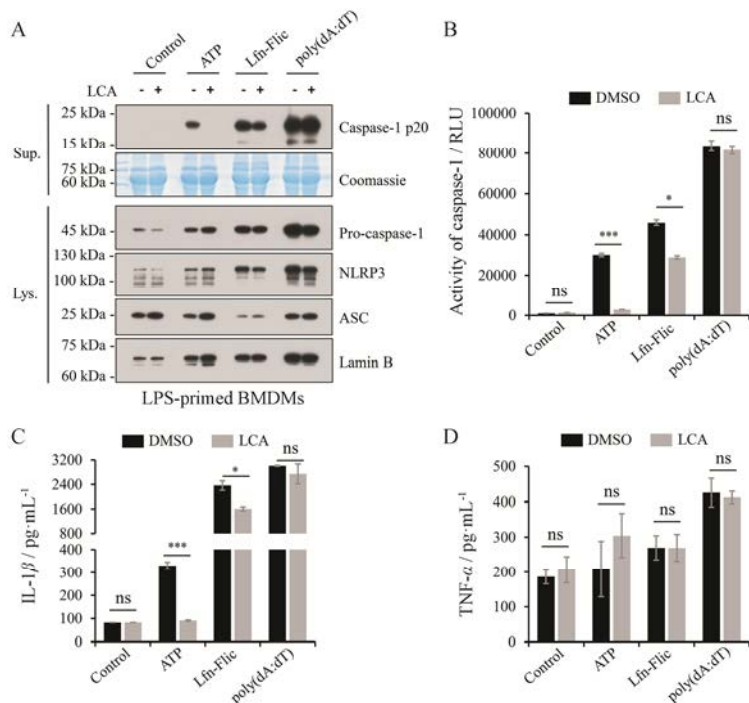


Figure 4 Effect of LCA ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the activation of NLRP3, NLRC4, and AIM2 inflammasome. A: Western blot was used to assess the expression levels of indicated proteins in culture supernatants and cell lysates. Lamin B was used as a loading control for cell lysates. Coomassie blue staining was provided as the loading control for the supernatants. B: The activity of caspase-1 was analyzed in the supernatant of BMDMs by the Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay. RLU, recombinant luciferase, which is proportional to caspase-1 activity. C, D: The secretion of IL-1 β and TNF- α was measured in the supernatant of BMDMs by ELISA. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs control (DMSO) group. NLRC4: NOD-like receptor containing a caspase activating and recruitment domain 4; AIM2: The absent in melanoma 2

(图 4B、C); 且在上述评价模型中 LCA 对 TNF- α 的分泌无影响 (图 4D)。由此可见, LCA 对 NLRP3 炎症小体活性具有较强抑制作用, 对 NLRC4 炎症小体活性有轻微抑制作用, 但对 AIM2 炎症小体活性无影响。

5 LCA 不影响 NF- κ B 介导的 NLRP3 炎症小体组成蛋白 NLRP3 和 pro-IL-1 β 表达

目前研究表明, 经典的 NLRP3 炎症小体组成蛋白 NLRP3 和 pro-IL-1 β 的表达受 NF- κ B 信号通路调控^[18], 为明确 LCA 是否通过调控 NLRP3 炎症小体组成蛋白的表达来抑制 NLRP3 炎症小体激活, 本研究采用 LCA 预处理 BMDMs 30 min 后, 联合 LPS 共同刺激 3 h^[19], 实验表明, 在 2.5~10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度内, LCA 对 NF- κ B 介导的 NLRP3 炎症小体组成蛋白 NLRP3 和 pro-IL-1 β 的表达无明显影响 (图 5)。

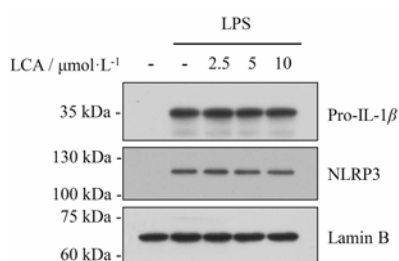


Figure 5 Effects of LCA on LPS-induced NF- κ B signaling pathway in BMDMs. LCA had no effect on LPS-induced NLRP3, pro-IL-1 β expression when BMDMs were treated with LCA for 30 min before 3 h LPS stimulation. The results showed that the inhibitory activity of LCA on NLRP3 inflammasome was not dependent on NF- κ B pathway

讨论

当宿主细胞受到外来微生物感染或自身释放的损伤信号刺激时, NLRP3、NLRC4 和 AIM2 等多种炎症小体能被激活, 如沙门菌细菌鞭毛蛋白可激活 NLRC4 炎症小体^[20]; 来自病毒的双链 DNA 可以激活 AIM2 炎症小体^[21]。其中, 内源性刺激因子 ATP 能通过与细胞膜上的嘌呤能受体 (P2X7R) 结合, 诱导细胞内 K^+ 外流, 激活 NLRP3 炎症小体^[22, 23]; 同时, 外源性刺激因子 nigericin 可能通过线粒体损伤激活 NLRP3 炎症小体^[24]。然而, NLRP3 炎症小体过度被激活, 可能导致机体组织损伤及代谢紊乱; 因此, 抑制 NLRP3 炎症小体的活化有利于防治相关疾病。现代研究表明, 甘草中的黄酮类物质是一类抗炎、抗肿瘤及抗菌活性成分, 广泛用于治疗肝炎、肾炎、溃疡性肠胃炎等^[25]。如文献报道甘草素和异甘草素能够治疗 NLRP3 炎症小体介导的肠胃组织损伤^[26], 且甘草酸对 NLRP3 炎症小体调控的 MRL/lpr 小鼠狼疮性

肾炎具有明显治疗作用^[27]。本研究发现, LCA 可以剂量依赖性抑制 ATP 和 nigericin 诱导的 BMDMs 中 NLRP3 炎症小体的激活, 最终抑制 caspase-1 的活化以及成熟 IL-1 β 等炎症因子的释放, 这表明 LCA 对 NLRP3 炎症小体的过度激活引起的免疫相关炎症具有潜在的治疗作用。

经典的 NLRP3 炎症小体活化需要两种信号通路调控^[28]。第一信号包括不同的 TLR (toll like receptor) 配体如 LPS 等危险信号, 激活 NF- κ B 通路上调 pro-IL-1 β 、NLRP3 蛋白表达^[29], 形成第一条通路, 在此基础上, 给予第二信号 (如 ATP、nigericin) 刺激时, NLRP3、ASC、pro-caspase-1 组装活化, 促使 pro-caspase-1 自我剪切成具有活性的 caspase-1, 剪切 pro-IL-1 β 并分泌其成熟形式到胞外^[30], 发挥促炎作用。其中, NF- κ B 通路在炎症小体的活化过程中发挥重要作用, 其可通过调控炎症小体组成蛋白的表达, 为炎症小体组装活化提供基础。本研究发现 LCA 对 LPS 介导的 NLRP3、pro-IL-1 β 的蛋白表达无明显影响, 提示 LCA 抑制 NLRP3 炎症小体的激活并不依赖 NF- κ B 介导的 NLRP3、pro-IL-1 β 蛋白的表达, 而是通过抑制 caspase-1 活性, 进而阻断 pro-IL-1 β 的剪切活化, 从而降低 NLRP3 炎症小体下游炎症因子 IL-1 β 分泌水平, 减轻免疫炎症反应, 为 LCA 防治 NLRP3 炎症小体相关的疾病提供了参考依据。

References

- [1] Rathinam VAK, Fitzgerald KA. Inflammasome complexes: emerging mechanisms and effector functions [J]. *Cell*, 2016, 165: 792-800.
- [2] Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling [J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16: 407-420.
- [3] Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13: 397-411.
- [4] Abderrazak A, Syrovets T, Couchie D, et al. NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases [J]. *Redox Biol*, 2015, 4: 296-307.
- [5] Bauer C, Duewell P, Mayer C, et al. Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome [J]. *Gut*, 2010, 59: 1192-1199.
- [6] Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice [J]. *Nature*, 2013, 493: 674-678.

- [7] Masters SL, Dunne A, Subramanian SL, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 β in type 2 diabetes [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11: 897–904.
- [8] Xiao H, Lu M, Lin TY, et al. Sterol regulatory element binding protein 2 activation of NLRP3 inflammasome in endothelium mediates hemodynamic-induced atherosclerosis susceptibility [J]. *Circulation*, 2013, 128: 632–642.
- [9] Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome [J]. *Nature*, 2006, 440: 237–241.
- [10] Kondo K, Shiba M, Nakamura R, et al. Constituent properties of licorices derived from *Glycyrrhiza uralensis*, *G. glabra*, or *G. inflata* identified by genetic information [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30: 1271–1277.
- [11] Furusawa J, Funakoshi-Tago M, Mashino T, et al. Glycyrrhiza inflata-derived chalcones, licochalcone A, licochalcone B and licochalcone D, inhibit phosphorylation of NF- κ B p65 in LPS signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9: 499–507.
- [12] Kwon HS, Park JH, Kim DH, et al. Licochalcone A isolated from licorice suppresses lipopolysaccharide-stimulated inflammatory reactions in RAW264.7 cells and endotoxin shock in mice [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2008, 86: 1287–1295.
- [13] Chu X, Ci X, Wei M, et al. Licochalcone A inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60: 3947–3954.
- [14] Hu J, Liu J. Licochalcone A attenuates lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by inhibiting NF- κ B activation [J]. *Inflammation*, 2016, 39: 569–574.
- [15] 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, 2: 1154–1163.
- [16] Song N, Liu ZS, Xue W, et al. NLRP3 phosphorylation is an essential priming event for inflammasome activation [J]. *Mol Cell*, 2017, 68: 185–197.
- [17] O'Brien M, Moehring D, Muñoz-Planillo R, et al. A bioluminescent caspase-1 activity assay rapidly monitors inflammasome activation in cells [J]. *J Immunol Methods*, 2017, 447: 1–13.
- [18] Si MM, Kanneganti TD. Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 16: 7–22.
- [19] Huang Y, Jiang H, Chen Y, et al. Tranilast directly targets NLRP3 to treat inflammasome-driven diseases [J]. *EMBO Mol Med*, 2018, 10: 1–15.
- [20] Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, et al. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages [J]. *Nat Immunol*, 2006, 7: 576–582.
- [21] Roberts TL, Idris A, Dunn JA, et al. HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA [J]. *Science*, 2009, 323: 1057–1060.
- [22] Franceschini A, Capece M, Chiozzi P, et al. The P2X7 receptor directly interacts with the NLRP3 inflammasome scaffold protein [J]. *FASEB J*, 2015, 29: 2450–2461.
- [23] Liu X, Zhang Z, Ruan J, et al. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores [J]. *Nature*, 2016, 535: 153–158.
- [24] Shimada K, Crother TR, Karlin J, et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis [J]. *Immunity*, 2012, 36: 401–414.
- [25] Huang YT, Chi ZL, Wang SM, et al. Research progress on licorice flavonoids and their antitumor activities [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2017, 26: 1532–1537.
- [26] Tanigericinawa T, Nadatani Y, Shimada S, et al. Isoliquiritigenin, a flavonoid component of licorice, accelerate healing of gastric ulcer through inhibition of NLRP3 inflammasome activation [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152: S886.
- [27] Wang YY, Li HT, Lu Y, et al. Protective effects of glycyrrhizic acid against lupus nephritis in MRL/lpr mice [J]. *J South Med Univ (南方医科大学学报)*, 2017, 37: 957–961.
- [28] Sutterwala FS, Haasken S, Cassel SL. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2014, 1319: 82–95.
- [29] Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, et al. Cutting edge: NF- κ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression [J]. *J Immunol*, 2009, 183: 787–791.
- [30] 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: 641865–641876.