

田蓯苣苷下调TLR4/Myd88/NF- κ B信号通路抑制 NLRP3炎症小体和炎症反应

张兴宇¹, 徐磊², 卡德尔业·卡德尔², 王守宝³, 邢建国^{2*}, 郑瑞芳^{2,4*}

(1. 新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆药物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830002; 3. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050; 4. 中国药科大学基础医学与临床药学院, 江苏 南京 211198)

摘要: 本研究通过脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导 RAW264.7 细胞建立炎症反应模型, 探讨田蓯苣苷 (tilianin) 对炎症反应的影响及其作用机制。通过 CCK-8 (cell counting kit-8) 实验检测细胞活力, 酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA) 检测肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素 6 (interleukin 6, IL-6) 含量; Griess 试剂法检测一氧化氮 (nitric oxide, NO) 含量; 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 荧光探针检测细胞内活性氧 (reactive oxygen radical, ROS) 水平; Western blot 检测 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)、髓样分化因子 88 (myeloid differentiation primary response gene 88, Myd88)、核转录因子- κ B p65 (nuclear factor- κ B p65, NF- κ B p65)、磷酸化核转录因子- κ B (phospho-nuclear factor- κ B, p-NF- κ B)、NF- κ B 抑制蛋白 α (inhibitor of NF- κ B α , I κ B α) 和磷酸化 NF- κ B 抑制蛋白 α (phospho-inhibitor of NF- κ B α , p-I κ B α) 的蛋白表达水平; qRT-PCR 法和 Western blot 检测 Nod 样受体蛋白 3 (Nod-like receptor protein 3, NLRP3)、IL-1 β 前体 (pro-IL-1 β)、IL-18 前体 (pro-IL-18) 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 前体 (pro-caspase-1) 的 mRNA 和蛋白水平。免疫荧光染色检测 NF- κ B p65 核转位; 使用 TLR4 抑制剂 resatorvid (TAK242) 进一步验证田蓯苣苷对 TLR4/Myd88/NF- κ B 信号通路的影响。结果显示, 田蓯苣苷显著降低了 RAW264.7 细胞上清中 TNF- α 、IL-6 和 NO 水平以及细胞内 ROS 含量。田蓯苣苷降低了 TLR4、Myd88、p-NF- κ B p65 和 p-I κ B α 蛋白表达水平, 抑制了 NF- κ B p65 的核转位, 同时显著降低了 NLRP3、pro-IL-1 β 、pro-IL-18 和 pro-caspase-1 的蛋白表达水平以及 NLRP3 和 pro-IL-1 β 的 mRNA 水平。上述研究结果表明, 田蓯苣苷能明显减轻 LPS 诱导 RAW264.7 细胞产生的炎症反应, 其机制可能与下调 TLR4/Myd88/NF- κ B 信号通路从而抑制 NLRP3 炎症小体有关。

关键词: 田蓯苣苷; 脂多糖; RAW264.7 细胞; TLR4/Myd88/NF- κ B 通路; NLRP3 炎症小体

中图分类号: R966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-4870(2024)07-2012-08

Tilianin downregulated TLR4/Myd88/NF- κ B signaling pathway to inhibit NLRP3 inflammasome and inflammatory response

ZHANG Xing-yu¹, XU Lei², KADER Kaderyea², WANG Shou-bao³, XING Jian-guo^{2*}, ZHENG Rui-fang^{2,4*}

(1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Xinjiang Institute of Pharmacy, Urumqi 830002, China; 3. Institute of Materia Medica, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China; 4. School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

Abstract: In this study, we investigated the anti-inflammatory effect and mechanism of tilianin in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 cells. The cell viability was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) assay. The

收稿日期: 2024-03-13; 修回日期: 2024-04-26.

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金 (2022D01D50, 2023D01B46, 2023D01E10); 国家自然科学基金资助项目 (82204767); 中央引导地方科技发展专项 (ZYYD2022A02); 第二批天山英才培养计划青年托举人才项目 (2023TSYCQNTJ0010); 新疆维吾尔自治区科研业务费 (ky2023091).

*通讯作者 Tel: 13999178585, E-mail: xjguodd@163.com; 872780352@qq.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0228

content of tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits. The content of nitric oxide (NO) was assayed by Griess reagent method. The level of intracellular reactive oxygen species (ROS) was detected by 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescent probe. The protein levels of Toll like receptor 4 (TLR4), myeloid differentiation primary response gene 88 (Myd88), nuclear factors κ B p65 (NF- κ B p65), phosphorylated nuclear factor κ B p65 (p-NF- κ B p65), nuclear factor κ B inhibitory protein α (I κ B α) and phosphorylation nuclear factor κ B inhibitory protein α (p-I κ B α) were detected by Western blot. The mRNA and protein levels of NLRP3, pro-IL-1 β , pro-IL-18 and pro-caspase-1 were detected by qRT-PCR and Western blot. Immunofluorescence staining was used to detect the nuclear translocation of NF- κ B p65. The effect of tilianin on the TLR4/Myd88/NF- κ B signaling pathway was further validated by using the TLR4 signaling inhibitor restatorvid (TAK242). The results showed that tilianin significantly reduced the levels of TNF- α , IL-6 and NO in the supernatant of RAW264.7 cells and decreased the content of intracellular ROS. Tilianin reduced the levels of TLR4, Myd88, p-NF- κ B p65 and p-I κ B α protein and nuclear translocation of NF- κ B p65. Tilianin could reduce the protein levels of NLRP3, pro-IL-1 β , pro-IL-18 and pro-caspase-1. Tilianin significantly inhibited the mRNA levels of NLRP3 and pro-IL-1 β . The above research results indicated that tilianin could significantly alleviate the LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 cells and its mechanism might be related to downregulate the TLR4/Myd88/NF- κ B signaling pathway to inhibit NLRP3 inflammasome.

Key words: tilianin; lipopolysaccharide; RAW264.7 cell; TLR4/Myd88/NF- κ B pathway; NLRP3 inflammasome

田蓟苷 (tilianin) 是新疆民族药香青兰中的主要活性成分, 属于黄酮类化合物, 本课题组在前期研究中发现^[1-3], 田蓟苷在心、脑缺血再灌注损伤以及动脉粥样硬化等疾病中均表现出一定的保护作用。在心肌缺血再灌注损伤中, 田蓟苷的保护作用主要与改善线粒体能量代谢、减轻氧化应激^[4]、抑制线粒体凋亡和减轻炎症反应有关^[5]。

炎症是对多种胞外病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 和损伤相关分子模式 (damage/danger-associated molecular patterns, DAMPs) 诱导宿主免疫系统释放多种细胞因子和趋化因子的保护性反应^[6], 炎症的发生与 Nod 样受体蛋白 3 (Nod-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体的调控密切相关。NLRP3 炎症小体是病原体感染或损伤的炎症反应中重要的组成部分^[7], 作为一种免疫传感器, 可检测到多种微生物和宿主来源的信号, 其活化需要启动和激活两个过程^[8,9]。在启动阶段, 微生物分子或内源性细胞因子通过激活核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 触发 NLRP3、IL-1 β 前体 (pro-IL-1 β)、IL-18 前体 (pro-IL-18) 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 前体 (pro-caspase-1) 的转录。在激活阶段, 多种刺激促进 NLRP3 的寡聚化以及 NLRP3 炎症小体的组装, 随后启动一系列下游炎症反应。课题组发现田蓟苷能够抑制炎症反应, 但对 NLRP3 炎症小体的研究尚未进行, 因此本研究针对田蓟苷与 NLRP3 炎症小体的关系展开实验。

巨噬细胞是一种先天免疫细胞, 在炎症反应中发挥重要的作用, 而 NLRP3 炎症小体可以介导宿主对微生物感染和细胞损伤的免疫反应^[10], 选用巨噬细胞可

以更好地研究 NLRP3 炎症小体导致的炎症反应。RAW264.7 细胞具有巨噬细胞的特征, 包括吞噬功能和免疫调节能力, 常用于研究炎症和免疫反应^[11], 因此本研究选取 RAW264.7 细胞作为研究对象。

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰阴性菌细胞壁的主要组成成分, 是导致机体炎症损伤的重要致病因子, 能够激活巨噬细胞产生多种促炎介质^[11]。根据报道可知, LPS 能够识别 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4), 随后通过信号转导至髓样分化因子 88 (myeloid differentiation primary response gene 88, Myd88) 导致 NF- κ B 的活化, 调节炎症基因的表达, 进而引发炎症, 分泌大量促炎介质。TLR4 信号通路的启动导致了复杂的生物反应, 触发一系列炎症过程^[12,13]。

本研究旨在从 NLRP3 炎症小体的视角深入研究田蓟苷在抗炎过程中的作用机制。通过利用 LPS 刺激 RAW264.7 细胞以诱发炎症反应, 观察田蓟苷在炎症过程中的表现, 并探讨其发挥抗炎作用的具体机制。这一发现为了解田蓟苷在抗炎作用中的机制提供了新的视角, 并可能为开发新的抗炎药物提供思路。

材料与方法

药品与试剂 田蓟苷 (HPLC 纯度 98%) 由新疆维吾尔自治区药物研究所自制 (批号: 20170805); LPS (L2880, 纯度: $\geq 99\%$; 美国 Sigma 公司); 活性氧 (reactive oxygen radical, ROS) 检测试剂盒、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); cell counting kit-8 (CCK-8) 试剂、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6

(interleukin-6, IL-6) ELISA 检测试剂盒、免疫荧光染色试剂盒-抗兔 Elab Fluor®594 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司); 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、DMEM 高糖培养基、Bicinchoninic acid (BCA) 蛋白定量试剂盒 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Radio Immunoprecipitation Assay (RIPA) (强) 裂解液、苯甲基磺酰氟 (PMSF)、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); 磷酸酶蛋白抑制剂 (兰杰柯科技有限公司); resatorvid (TAK-242) (美国 MedChemExpress 公司); p-NF- κ B p65、inhibitor of NF- κ B α (I κ B α)、phospho-I κ B α (p-I κ B α)、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记山羊抗兔 IgG、HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 抗体 (江苏亲科生物研究中心有限公司); RNA 提取试剂盒、EasyScript® One-Step gDNA Remover and cDNA Synthesis SuperMix、PerfectStart® Green qPCR SuperMix、Passive Reference Dye II (50 \times) (北京全式金生物技术有限公司); TLR4、Myd88、IL-1 β 、IL-18、NLRP3 抗体 (英国 Abcam 公司); NF- κ B p65 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司); β -Tubulin 抗体 (北京中杉金桥生物技术有限公司); ECL 发光液、PVDF 膜 (孔径 0.45 μ m) (美国 Millipore 公司)。

仪器 多功能微孔板检测仪 (瑞士 TECAN SPARK 公司); 多功能成像系统 (法国 VILBER 公司); 电泳仪和电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司); 台式高速冷冻离心机 TGL-16k (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); 光学显微镜 (日本 OLYMPUS 公司); 制冰机 (杭州中冷电气有限公司); 超微量分光光度计 (德国 Implen 公司); 漩涡振荡器 (江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司); 荧光定量 PCR 仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 微量移液器 (德国艾本德股份公司)。

细胞株及细胞培养 RAW264.7 细胞来源于中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下, 用含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基传代培养, 实验用细胞均处于对数生长期。

模型建立及分组 将细胞分为 control 组、LPS 组 (1 μ g \cdot mL⁻¹)、田蓟苷组 (5、10、20 μ g \cdot mL⁻¹) 和 TAK242 组 (10 μ mol \cdot L⁻¹)。Control 组不做处理, LPS 组用 1 μ g \cdot mL⁻¹ LPS 处理, 田蓟苷组和 TAK242 组分别用 5、10、20 μ g \cdot mL⁻¹ 田蓟苷和 10 μ mol \cdot L⁻¹ TAK242 预处理 RAW264.7 细胞 12 h 后, 用浓度为 1 μ g \cdot mL⁻¹ LPS 刺激 6 h。

细胞活力检测 将 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板中, 用田蓟苷 (0、0.625、1.25、2.5、5、10、20 μ g \cdot mL⁻¹) 干预 24 h 后, 将含有 10% CCK-8 试剂的 DMEM 高糖培养基加入每个孔中, 避光孵育 60 min。用酶标仪在 450 nm 处测定每个孔的吸光度 (*A*) 值, 计算细胞活力

(cell viability)。

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{A_{\text{药物处理孔}} - A_{\text{空白孔}}}{A_{\text{对照孔}} - A_{\text{空白孔}}} \times 100$$

酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测 IL-6、TNF- α 的含量 将 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板中, 细胞给药后, 收集细胞上清, 1 000 \times g、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min 后取上清, 选用相应 ELISA 检测试剂盒分别检测上清中 TNF- α 和 IL-6 含量。

GRIESS 法测定 NO 的含量 取出 Griess Reagent I 和 II, 使恢复室温。样品为细胞培养液上清, 用完全培养基稀释标准品。标准品的浓度取 0、1、2、5、10、20、40、60、100 μ mol \cdot L⁻¹。在 96 孔板中, 每孔按 50 μ L 加入标准品及样品, 接着在各孔中加入 50 μ L Griess Reagent I 和 Griess Reagent II, 随后立即在 540 nm 处测定 *A* 值。

ROS 水平检测 去除 6 孔板中不同处理组的细胞培养基, 用无血清高糖培养基将 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 稀释成终浓度为 10 μ mol \cdot L⁻¹ 溶液, 将 1 mL 稀释后的溶液加入到孔中。在 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱内孵育 20 min, 用无血清高糖培养基洗涤细胞 3 次, 荧光显微镜下观察并拍照, 使用酶标仪在激发波长 488 nm 和发射波长 525 nm 条件下检测细胞平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI)。

细胞免疫荧光 药物处理细胞后, 加入 1 mL 4% 多聚甲醛固定 15 min, 去除固定液, 用 TBST 工作液洗 3 次, 每次 5 min, 使用 0.5% TritonX-100 室温通透细胞 15 min, 使用 TBST 浸洗玻片 3 次, 每次 3 min, 用山羊血清封闭液封闭 30 min, 去除封闭液, 滴加一抗 100 μ L NF- κ B (1:400) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。去除一抗, 用 TBST 工作液洗涤 3 次, 每次 5 min; 在盖玻片上加入 100 μ L 含有 Elab Fluor® 594 标记的山羊抗兔 IgG(H+L) 抗体 (1:50) 湿盒内 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60 min, 用 TBST 工作液洗涤 5 次, 每次 5 min, 期间适当注意避光操作。后滴加 DAPI 染色液避光孵育 5 min 用于染细胞核, 用 TBST 工作液洗涤玻片 5 min, 洗涤 4 次, 滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上, 盖上盖玻片, 在荧光显微镜下拍照。

qRT-PCR 检测 按照 RNA 抽提试剂盒说明书进行提取, 进行 RNA 浓度测定后, 根据说明书进行逆转录反应。使用 QuantStudio 3 Flex 型实时荧光定量 PCR 仪进行扩增及检测设置, 引物见表 1。以 β -actin 为内参基因, 由 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算基因的相对表达量。

Western blot 检测 药物干预后, 加入 RIPA 细胞裂解液, 冰上裂解 30 min 后, 离心收集上清, 提取细胞蛋白, BCA 法测定总蛋白浓度。各孔取 30 μ g 蛋白上

Table 1 Sequences of the primers

Gene	Sequence (5' to 3')
NLRP3	F: CTTGCAGAAGCTGGGGTTG R: GAGTCCTGTGTCTCCAAGGG
pro-IL-1 β	F: CGCAGCAGCACATCAACAAGAGC R: TGTCTCATCTGGAAGGTCCACG
pro-IL-18	F: CAGCATCAGGACAAAGAAAG R: CAGTGTGCCGAATAAAGAG
pro-caspase-1	F: TCAACATCTTCTCCGAGG R: GCAAGGCTTGTGAACATCTC
β -Actin	F: CACCATGTACCCAGGCATTG R: CCTGCTTGCTGATCCACATC

样,于12%聚丙烯酰胺凝胶电泳进行蛋白分离(浓缩胶电压70 V,30 min;分离胶电压120 V,50 min)。将分离后的蛋白电转移(120 V,90 min)至PVDF膜。加入5%脱脂牛奶于摇床上室温封闭2 h;TBST洗膜3次,每次5 min;分别加入相应一抗(均1:1 000),4 $^{\circ}$ C孵育过夜;次日先以TBST洗膜3次,每次10 min;后加入HRP标记的二抗(1:2 000),室温孵育2 h;再用TBST洗膜3次,每次10 min。随后按ECL试剂盒说明进行曝光显影,并用Image J软件分析条带灰度。

统计学分析 采用GraphPad Prism 8.0软件进行数据处理和作图,结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差ANOVA进行多组数据间比较分析,认为 $P < 0.05$ 差异具有统计学意义。

结果

1 田蓟苷减轻LPS诱导的RAW264.7细胞NO和炎症因子释放

如图1A所示,0、0.625、1.25、2.5、5、10、20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度的田蓟苷作用于RAW264.7细胞24 h,用CCK-8法测定细胞活力,根据图1A所示,各浓度条件下对RAW264.7细胞均未显示出明显的损伤效应。结合前期实验室的相关研究,本研究选定田蓟苷的质量浓度为5、10、20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,用于后续的深入实验研究。

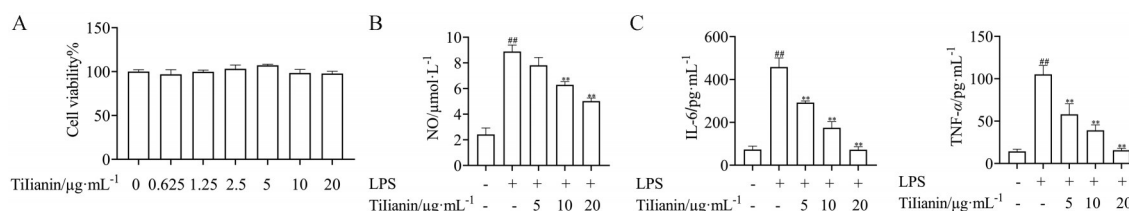


Figure 1 Tilianin reduced LPS-induced release of NO and inflammatory factors in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells pretreated with tilianin (5, 10 and 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) for 12 h were induced by LPS (1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) for 6 h. A: RAW264.7 cells were treated with tilianin (0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 and 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) for 24 h, respectively. Cell viability was determined by CCK-8 assay; B: The effect of tilianin on LPS-induced NO production in RAW264.7; C: The effect of tilianin on LPS-induced IL-6 and TNF- α production in RAW264.7. $n = 3, \bar{x} \pm s$. $^{##}P < 0.01$ vs the control group; $^{**}P < 0.01$ vs the LPS group. LPS: Lipopolysaccharide; CCK-8: Cell counting kit-8; NO: Nitric oxide; IL-6: Interleukin-6; TNF- α : Tumor necrosis factor- α

LPS刺激后产生NO是炎症过程的重要反映,许多炎症性疾病都会导致巨噬细胞产生过量的NO^[14]。用LPS刺激6 h后,检测细胞培养上清液中NO的含量变化,图1B所示,田蓟苷处理组NO释放量显著降低。细胞因子是调节宿主对炎症反应的重要介质。为了进一步研究田蓟苷的抗炎作用,采用ELISA试剂盒检测了IL-6和TNF- α 的含量变化。图1C中结果显示,在田蓟苷的作用下,IL-6和TNF- α 的释放量都明显下降。

2 田蓟苷显著降低LPS诱导RAW264.7细胞的ROS水平

炎性细胞在受到刺激时,会产生损伤细胞和组织的ROS,过量的ROS还可以激活参与炎症过程的信号通路。消除ROS可能对治疗炎症相关疾病有益^[15]。为了研究田蓟苷对ROS的影响,采用DCFH-DA荧光探针检测细胞内ROS的含量,DCF荧光强度MFI与细胞内ROS水平成正比。结果显示,与control组比较,LPS组细胞内ROS水平升高($P < 0.01$);与LPS组比较,田蓟苷处理组细胞内ROS水平降低(图2)。

3 田蓟苷在LPS诱导的RAW264.7细胞中抑制NF- κ B活化与核转位

NF- κ B是调节大多数促炎细胞因子表达的重要转录因子,是引起炎症反应的关键因素^[16]。为了探讨NF- κ B的激活状态,通过Western blot检测了NF- κ B的磷酸化水平变化,根据图3A、B结果显示,在LPS组中,p-NF- κ B p65的蛋白表达升高($P < 0.05$),经过田蓟苷处理后,NF- κ B p65的磷酸化受到抑制。同时,通过免疫荧光结果分析(图3C),观察到LPS组中的NF- κ B p65入核现象明显,而在田蓟苷处理组中,核转位现象得到了有效抑制。这些结果表明,田蓟苷能够抑制NF- κ B的活化,因此可以减轻NF- κ B通路介导的炎症反应。

4 田蓟苷在LPS诱导的RAW264.7细胞中抑制NLRP3炎症小体启动

NF- κ B的激活能够上调NLRP3炎症小体中NLRP3和pro-IL-1 β 等蛋白的表达^[17]。本研究采用Western blot

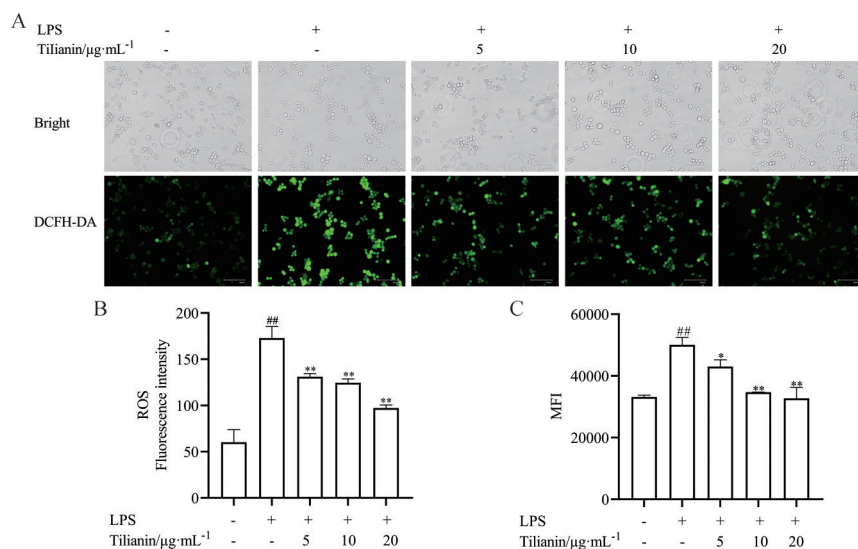


Figure 2 Tilianin reduced LPS-induced ROS release in RAW264.7 cells. A: ROS level in cells was stained with DCFH-DA. The images were captured by fluorescence microscopy (scale bar: 100 μm); B: Statistical analysis of the ROS per group; C: ROS level in RAW264.7 cells was detected by DCFH-DA fluorescence probe. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ^{##} $P < 0.01$ vs the control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs the LPS group. ROS: Reactive oxygen radical; DCFH-DA: 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate

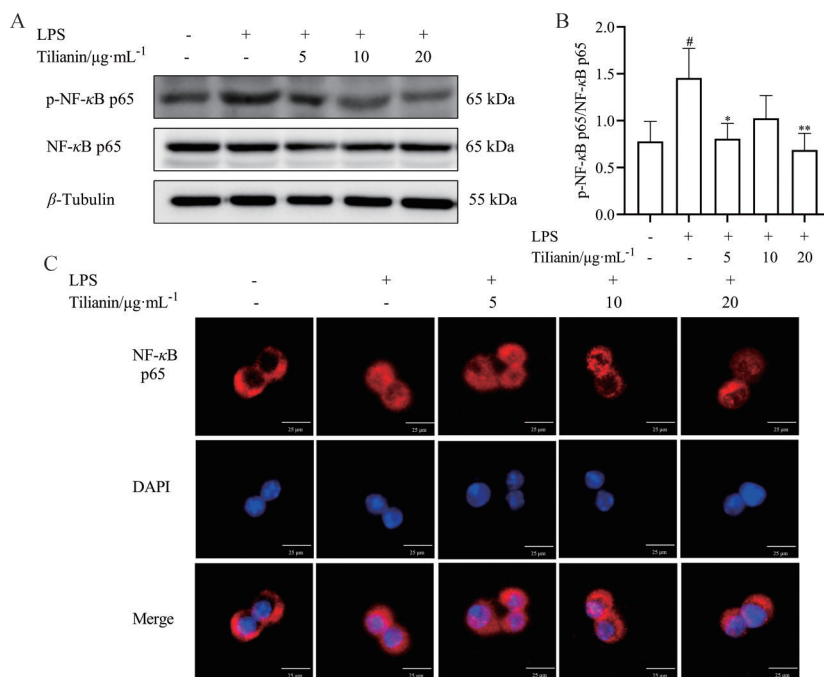


Figure 3 Tilianin inhibits NF- κB activation and nuclear translocation in LPS-induced RAW264.7 cells. A: The level of NF- κB p65 and p-NF- κB p65 protein; B: Western blot analysis of p-NF- κB p65; C: The nuclear translocation of NF- κB p65 in LPS-induced RAW 264.7 cells by immunofluorescence staining (scale bar: 25 μm). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. [#] $P < 0.05$ vs the control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs the LPS group. NF- κB : Nuclear factor- κB

和 qRT-PCR 检测 NLRP3 炎症小体启动阶段的蛋白和 mRNA 水平。如图 4A、B 所示, 田蓟昔处理组中 NLRP3、pro-IL-1 β 、pro-IL-18 和 pro-caspase-1 等蛋白的表达明显降低; 根据图 4C, 田蓟昔处理组中 NLRP3 和 pro-IL-1 β 的 mRNA 水平也有显著下降, 说明田蓟昔能够抑制 NLRP3 炎症小体的启动。

5 田蓟昔下调 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 TLR4/Myd88/NF- κB 信号通路

为了研究田蓟昔抑制炎症反应的作用机制, 采用 Western blot 和免疫荧光技术检测在 LPS 诱导 RAW264.7 细胞的炎症反应模型中 TLR4 和 Myd88 的表达、I $\kappa\text{B}\alpha$ 的磷酸化以及 NF- κB 的核转位。结果显

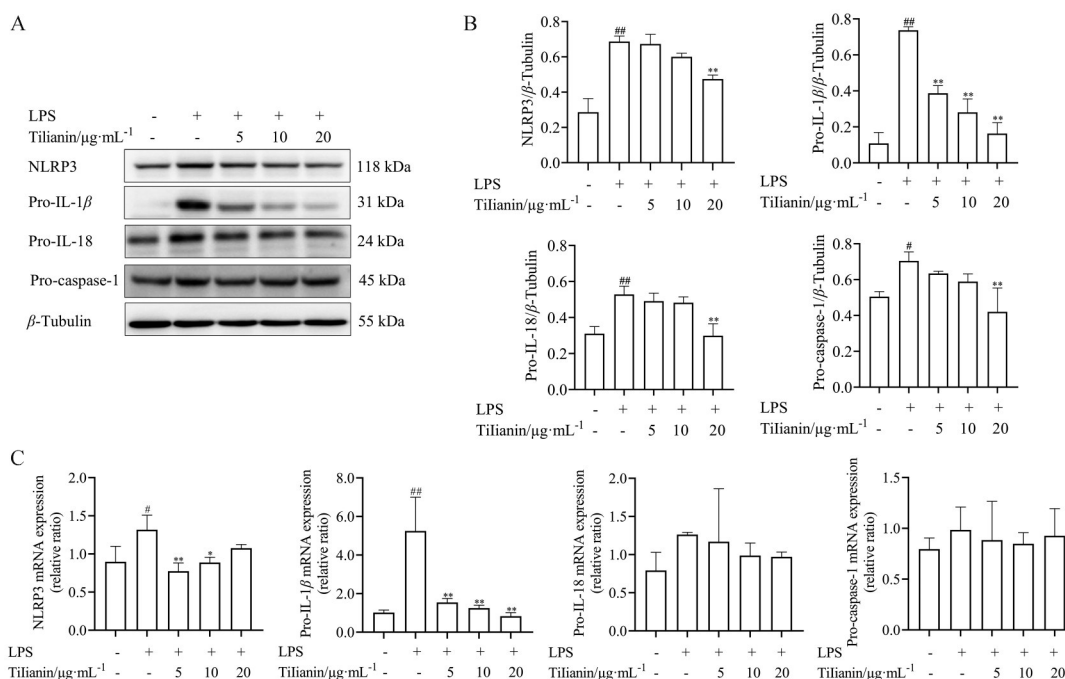


Figure 4 Tiliacin inhibited NLRP3 inflammasome priming in LPS-induced RAW264.7 cells. A: The levels of NLRP3, pro-IL-1 β , pro-IL-18 and pro-caspase-1 protein detected by Western blot; B: Western blot analysis; C: The relative mRNA levels detected by qRT-PCR; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs the control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the LPS group. NLRP3: Nod-like receptor protein 3

示, LPS 处理激活了 TLR4/Myd88 通路, 该通路被田蓯昔显著抑制。如图 5 所示, 与 control 组比较, LPS 组中 TLR4 和 Myd88 的蛋白表达升高, I κ B α 的磷酸化水平升高, NF- κ B 的入核现象明显增加, 田蓯昔处理组抑制了 TLR4、Myd88、p-I κ B α 的蛋白表达和 NF- κ B 的入核现象。TAK242 作为 TLR4 抑制剂, 能有效抑制 TLR4 下游蛋白的表达, 从图 5 可知, 在降低 TLR4、Myd88、p-I κ B α 的蛋白表达和抑制 NF- κ B p65 核转位等方面, 田蓯昔均表现出与 TAK242 一致的作用。

讨论

炎症是对外来刺激的一种防御性免疫反应, 是一些疾病的共有基础病理机制^[18], 会导致肺损伤、心脑血管疾病、神经退行性疾病, 甚至死亡的发生^[19]。LPS 是革兰阴性菌细胞壁的主要成分, 可诱导哺乳动物细胞产生免疫反应, 释放促炎性细胞因子。在本研究中使用小鼠巨噬细胞 RAW264.7 来研究田蓯昔的抗炎作用。本研究结果发现, 田蓯昔显著降低了 LPS 诱导 RAW264.7 细胞产生 NO、IL-6 和 TNF- α 的含量, 表明田蓯昔可以减轻 LPS 诱导的炎症反应, 具有良好的抗炎活性。细胞内 ROS 水平的降低表明田蓯昔可能抑制细胞中的氧化应激反应。

NLRP3 炎症小体的启动是由于 LPS 激活 NF- κ B 上调 NLRP3、pro-IL-1 β 、pro-IL-18 和 pro-caspase-1 蛋白

表达^[20]。本研究通过 LPS 刺激 RAW264.7 细胞后检测到 NLRP3 炎症小体启动过程相关蛋白表达的升高, 表明 NLRP3 炎症小体被成功启动, 随后加入田蓯昔保护, 田蓯昔处理组能够明显降低 NLRP3、pro-IL-1 β 、pro-IL-18 和 pro-caspase-1 的蛋白表达水平以及 NLRP3 和 pro-IL-1 β 的 mRNA 水平, 因此田蓯昔抑制了炎症反应中 NLRP3 炎症小体的启动过程。

在 NLRP3 炎症小体的启动阶段中, TLR4/Myd88/NF- κ B 信号通路是主要的调控通路^[21]。根据研究显示^[17,22,23], TLR4 在免疫细胞表面具有广泛的表达, 通过识别特定的结构分子来介导免疫和炎症反应。在 LPS 的刺激下, TLR4 及其下游通路被激活, 进而募集 Myd88 到 TLR4 上, 随后 Myd88 通过与下游衔接分子的相互作用来激活 I κ B 激酶, 并导致 I κ B α 的磷酸化和降解。这一系列反应应答最终诱导 NF- κ B 二聚体进入细胞核, 使 NF- κ B 活化, 随后 NLRP3 炎症小体被启动。有研究表明, 根据一些天然产物结构作为模板设计合成的 NZ^[19] 就是通过 TLR4/NF- κ B 信号通路抑制了 NLRP3 炎症小体, 改善了炎症反应。

在本研究中, 田蓯昔处理组降低了 TLR4 和 Myd88 的蛋白表达, 并且抑制了 I κ B α 和 NF- κ B p65 的磷酸化水平, NF- κ B 的核转位减弱, 抑制了 NF- κ B 的入核现象。为了进一步探讨田蓯昔在 TLR4/Myd88/NF- κ B 信号通路中的作用, 使用 TLR4 抑制剂 resatorvid (TAK-242) 阻

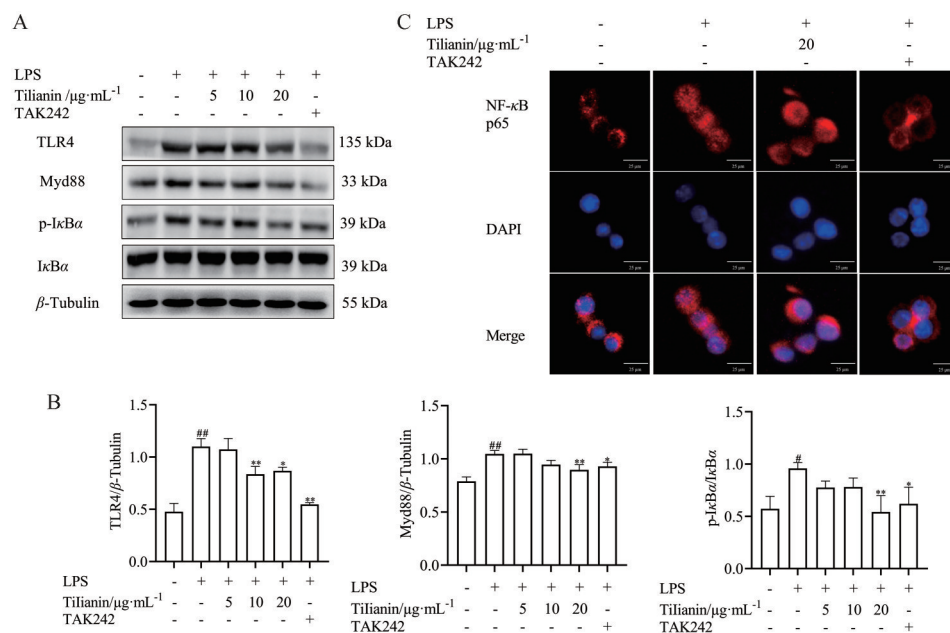


Figure 5 Tiliainin downregulated TLR4/Myd88/NF- κ B pathway in LPS-induced RAW264.7 cells. A: The levels of TLR4, Myd88, I κ B α and p-I κ B α protein; B: Western blot analysis of TLR4, Myd88 and p-I κ B α ; C: Nuclear translocation of NF- κ B p65 in LPS-induced RAW 264.7 cells by immunofluorescence staining (scale bar: 25 μm). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ vs the control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs the LPS group. TLR4: Toll-like receptor 4; Myd88: Myeloid differentiation primary response gene 88; I κ B α : Inhibitor of NF- κ B α

断了TLR4下游信号分子的表达,而田蓯昔也发挥了类似的作用。

综上所述,田蓯昔可以在炎症反应中起到抗炎作用,其机制可能是通过下调TLR4/Myd88/NF- κ B信号通路抑制NLRP3炎症小体有关。未来,本课题组将进一步研究田蓯昔对NLRP3炎症小体的影响,挖掘其在炎症性疾病中的应用潜力。

作者贡献: 张兴宇进行实验操作、数据分析和统计,并撰写论文;王守宝进行实验设计;卡德尔业·卡德尔、徐磊监督和协助实验进行以及实验数据分析和统计;郑瑞芳和邢建国指导和监督实验过程并协助论文的撰写。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] Li HN, Zheng RF, Dou YW, et al. Study on the effect and mechanism of tiliainin in preventing programmed necrosis of cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Chin Tradit Herb Drug (中草药), 2021, 52: 1974-1980.
- [2] Guo XH, Cao WJ, Fan XM, et al. Mechanism and protective effects of tiliainin on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2013, 19: 168-172.
- [3] Xi M, Xing JG, Wang L, et al. The hypolipidemic and anti-atherosclerotic effects of acacetin and its mechanism of action in mice [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 846-853.
- [4] Tian L, Cao W, Yue R, et al. Pretreatment with tiliainin improves mitochondrial energy metabolism and oxidative stress in rats with myocardial ischemia/reperfusion injury via AMPK/SIRT1/PGC-1 α signaling pathway [J]. J Pharmacol Sci, 2019, 139: 352-360.
- [5] Jiang H, Xing J, Fang J, et al. Tiliainin protects against ischemia/reperfusion-induced myocardial injury through the inhibition of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent apoptotic and inflammatory signaling pathways [J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 5939715.
- [6] Meyers AK, Zhu X. The NLRP3 inflammasome: metabolic regulation and contribution to inflammaging [J]. Cells, 2020, 9: 1808.
- [7] Seoane PI, Lee B, Hoyle C, et al. The NLRP3-inflammasome as a sensor of organelle dysfunction [J]. J Cell Biol, 2020, 219: e202006194.
- [8] Zhao C, Zhao W. NLRP3 inflammasome--a key player in antiviral responses [J]. Front Immunol, 2020, 11: 211.
- [9] Ge Q, Chen X, Zhao Y, et al. Modulatory mechanisms of NLRP3: potential roles in inflammasome activation [J]. Life Sci, 2021, 267: 118918.
- [10] He Y, Hara H, Nunez G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation [J]. Trends Biochem Sci, 2016, 41: 1012-1021.
- [11] Liu LY, Zhang Z, Ge NJ, et al. Effect of *Boschniakia rossica* polysaccharides on LPS-induced inflammation of RAW264.7 macrophages [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2021, 56: 1479-

- 1485.
- [12] Zhang C, Wang X, Wang C, et al. Qingwenzhike prescription alleviates acute lung injury induced by LPS *via* inhibiting TLR4/NF- κ B pathway and NLRP3 inflammasome activation [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 790072.
- [13] Hwangbo H, Ji SY, Kim MY, et al. Anti-inflammatory effect of auranofin on palmitic acid and LPS-induced inflammatory response by modulating TLR4 and NOX4-mediated NF- κ B signaling pathway in RAW264.7 macrophages [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 5920.
- [14] Emam SH, Sonousi A, Osman EO, et al. Design and synthesis of methoxyphenyl- and coumarin-based chalcone derivatives as anti-inflammatory agents by inhibition of NO production and down-regulation of NF- κ B in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells [J]. *Bioorg Chem*, 2021, 107: 104630.
- [15] Chen J, Li DL, Xie LN, et al. Synergistic anti-inflammatory effects of silibinin and thymol combination on LPS-induced RAW264.7 cells by inhibition of NF- κ B and MAPK activation [J]. *Phytomedicine*, 2020, 78: 153309.
- [16] Dong J, Li J, Cui L, et al. Cortisol modulates inflammatory responses in LPS-stimulated RAW264.7 cells *via* the NF- κ B and MAPK pathways [J]. *BMC Vet Res*, 2018, 14: 30.
- [17] Afonina IS, Zhong Z, Karin M, et al. Limiting inflammation-the negative regulation of NF- κ B and the NLRP3 inflammasome [J]. *Nat Immunol*, 2017, 18: 861-869.
- [18] Ren J, Su D, Li L, et al. Anti-inflammatory effects of aureusidin in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages *via* suppressing NF- κ B and activating ROS- and MAPKs-dependent Nrf2/HO-1 signaling pathways [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, 387: 114846.
- [19] Xiang P, Chen T, Mou Y, et al. NZ suppresses TLR4/NF- κ B signalings and NLRP3 inflammasome activation in LPS-induced RAW264.7 macrophages [J]. *Inflamm Res*, 2015, 64: 799-808.
- [20] Paik S, Kim JK, Silwal P, et al. An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18: 1141-1160.
- [21] Gros Lambert M, Py BF. Spotlight on the NLRP3 inflammasome pathway [J]. *J Inflamm Res*, 2018, 11: 359-374.
- [22] Yi G, Li H, Liu M, et al. Soybean protein - derived peptides inhibit inflammation in LPS - induced RAW264.7 macrophages *via* the suppression of TLR4-mediated MAPK-JNK and NF- κ B activation [J]. *J Food Biochem*, 2020, 44: e13289.
- [23] Fu Y, Xu B, Huang S, et al. Baicalin prevents LPS-induced activation of TLR4/NF- κ B p65 pathway and inflammation in mice *via* inhibiting the expression of CD14 [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42: 88-96.