

[文章编号] 1671-587X(2024)06-1499-13

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240603

草苈蓉多糖对 THP-1 巨噬细胞炎症反应的抑制作用及其机制

马新月^{1,2}, 徐慧², 刁佳雯², 金爱花¹, 全吉淑²

(1. 延边大学附属医院检验科, 吉林 延吉 133000; 2. 延边大学医学院生物化学与分子生物学教研室, 吉林 延吉 133000)

[摘要] **目的:** 探讨草苈蓉多糖 (BRPS) 对脂多糖 (LPS) 诱导的 THP-1 巨噬细胞炎症反应的影响, 并阐明其作用机制。**方法:** 将 THP-1 单核细胞分化为巨噬细胞, 采用 LPS 诱导 THP-1 巨噬细胞, 建立炎症模型。CCK-8 法检测不同浓度 (0、100、200、500、1 000 和 2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) LPS 及不同浓度 (0、12.5、25.0、50.0、100.0 和 200.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) BRPS 处理后 THP-1 巨噬细胞存活率, 选取后续实验药物浓度。将 THP-1 巨噬细胞分为空白组、模型组、低剂量 BRPS 组 (25.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BRPS)、中剂量 BRPS 组 (50.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BRPS) 和高剂量 BRPS 组 (100.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BRPS)。采用 P38 抑制剂 SB203580、ERK 抑制剂 U0126、c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 抑制剂 SP600125 和核因子 κB (NF- κB) 抑制剂 BAY11-7082 对 THP-1 细胞进行验证。另取 THP-1 细胞, 分为对照组、LPS 组、抑制剂组、100.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BRPS 组和抑制剂+100.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BRPS 组。酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测各组 THP-1 巨噬细胞培养液中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 (IL)-6 和 IL-1 β 水平, 2, 7-二氯荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 荧光探针法检测各组 THP-1 巨噬细胞中活性氧 (ROS) 水平, Hoechst33342/PI 荧光染色法观察各组 THP-1 巨噬细胞膜损伤情况, JC-1 荧光染色法观察各组 THP-1 巨噬细胞线粒体膜电位, 蛋白印迹法检测各组 THP-1 巨噬细胞中环氧化酶 2 (COX-2)、高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1)、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶 (Caspase)-1、消皮素 D (GSDMD)-N、IL-1 β 、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 和 NF- κB 相关蛋白表达水平。**结果:** CCK-8 法检测, LPS 浓度为 100~2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, THP-1 巨噬细胞存活率均 $>90\%$; 与 0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS 组比较, 100、200、500、1 000 和 2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS 组 THP-1 巨噬细胞培养液中 IL-6 水平均明显升高 ($P<0.05$), 提示巨噬细胞炎症反应明显增强, 因此选用 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS 构建炎症模型; 12.5、25.0、50.0、100.0 和 200.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BRPS 处理 THP-1 巨噬细胞, THP-1 巨噬细胞存活率分别为 91.2%、93.8%、91.4%、90.6% 和 91.8%, 选取 25.0、50.0 和 100.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BRPS 作为后续实验中低、中和高剂量 BRPS 组药物浓度。ELISA 法检测, 与空白组比较, 模型组 THP-1 巨噬细胞培养液中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平均明显升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 低、中和高剂量 BRPS 组 THP-1 巨噬细胞培养液中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平均明显降低 ($P<0.05$)。DCFH-DA 荧光探针法检测, 与空白组比较, 模型组 THP-1 巨噬细胞中 ROS 水平明显升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 低、中和高剂量 BRPS 组 THP-1 巨噬细胞中 ROS 水平均明显降低 ($P<0.05$)。Hoechst33342/PI 荧光染色法观察, 与空白组比较, 模型组 THP-1 巨噬细胞膜损伤程度明显增加; 与模型组比较, 低、中和高剂量 BRPS 组 THP-1 巨噬细胞膜损伤程度明显减少。JC-1 荧光染色法观察, 空白组 THP-1 巨噬细胞线粒体膜电位较高; 与空白组比较, 模型组 THP-1 巨噬细胞线粒体跨膜电位明显降低; 与模型组比较, 低、中和高剂量 BRPS 组 THP-1 巨噬细胞线粒体跨膜电位逐渐升高。蛋白印迹法检测, 与空白组比较, 模型组 THP-1 巨噬细胞中 COX-2、HMGB1、NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N 和 IL-1 β 蛋白表达水平及 p-P38/P38、p-ERK/ERK、p-JNK/JNK 和 p-NF- κB /NF- κB 比值均明显升高

[收稿日期] 2024-01-20

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82060113)

[作者简介] 马新月 (1998—), 女, 吉林省长春市人, 在读硕士研究生, 主要从事天然成分活性方面的研究。

[通信作者] 金爱花, 检验师 (E-mail: aihua1028@sina.com);

全吉淑, 教授, 博士研究生导师 (E-mail: quanjs@ybu.edu.cn)

($P < 0.05$); 与模型组比较, 中和高剂量 BRPS 组 THP-1 巨噬细胞中 HMGB1、NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N 和 IL-1 β 蛋白表达水平及 p-P38/P38、p-ERK/ERK、p-JNK/JNK 和 p-NF- κ B/NF- κ B 比值均明显降低 ($P < 0.05$), 低剂量 BRPS 组 THP-1 巨噬细胞中 NLRP3、Caspase-1 和 IL-1 β 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$), 高剂量 BRPS 组 THP-1 巨噬细胞中 COX-2 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 与对照组比较, LPS 组 THP-1 巨噬细胞 p-P38/P38、p-ERK/ERK、p-JNK/JNK 和 p-NF- κ B/NF- κ B 比值及 IL-1 β 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$); 与 LPS 组比较, 抑制剂组、100 mg·L⁻¹ BRPS 组和抑制剂 + 100 mg·L⁻¹ BRPS 组 THP-1 巨噬细胞中 p-P38/P38、p-ERK/ERK、p-JNK/JNK 和 p-NF- κ B/NF- κ B 比值及 IL-1 β 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$); 与抑制剂组比较, 抑制剂 + 100 mg·L⁻¹ BRPS 组 THP-1 巨噬细胞 p-P38/P38、p-ERK/ERK、p-JNK/JNK 和 p-NF- κ B/NF- κ B 比值均明显降低 ($P < 0.05$)。结论: BRPS 抑制 THP-1 细胞巨噬细胞的炎症反应, 其机制可能与 BRPS 调控 MAPK 和 NF- κ B 信号通路有关。

[关键词] 草苈蓉多糖; NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3; 丝裂原活化蛋白激酶; 核因子 κ B; 焦亡

[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A

Inhibitory effect of *Boschnikia rossica* polysaccharides on THP-1 macrophage inflammation and its mechanism

MA Xinyue^{1,2}, XU Hui², DIAO Jiawen², JIN Aihua¹, QUAN Jishu²

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital, Yanbian University, Yanji 133000, China;

2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medical Sciences, Yanbian University, Yanji 133000, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of *Boschnikia rossica* polysaccharides rapa polysaccharides (BRPS) on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses in the THP-1 macrophages, and to clarify its mechanism. **Methods:** The THP-1 monocytes were differentiated into the macrophages, and the inflammation model was established using LPS to induce the THP-1 macrophages. CCK-8 method was used to detect the survival rates of the THP-1 macrophages after treated with different concentrations (0, 100, 200, 500, 1 000, and 2 000 μ g·L⁻¹) of LPS and different concentrations (0, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0, and 200.0 mg·L⁻¹) of BRPS to select the concentrations for the subsequent experiments. The THP-1 macrophages were divided into blank group, model group, low dose of BRPS group (25.0 mg·L⁻¹ BRPS), medium dose of BRPS group (50.0 mg·L⁻¹ BRPS), and high dose of BRPS group (100.0 mg·L⁻¹ BRPS). P38 inhibitor SB203580, ERK inhibitor U0126, c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor SP600125, and nuclear factor of kappa B (NF- κ B) inhibitor BAY11-7082 were used to verify the effects on THP-1 cells. The THP-1 cells were divided into control group, LPS group, inhibitor group, 100.0 mg·L⁻¹ BRPS group, and inhibitor + 100.0 mg·L⁻¹ BRPS group. ELISA method was used to detect the levels of tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin (IL) -6, and IL-1 β in culture fluid of the THP-1 macrophages in various groups; DCFH-DA fluorescence probe method was used to detect the reactive oxygen species (ROS) levels in the THP-1 macrophages in various groups; Hoechst33342/PI fluorescence staining method was used to detect the membrane damage in the THP-1 macrophages in various groups; JC-1 fluorescence staining was used to observe mitochondrial membrane potential in the THP-1 macrophages in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of cyclooxygenase-2 (COX-2), high mobility group protein B1 (HMGB1), NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3), cysteinyl aspartate specific protease (Caspase)-1, gasdermin D

(GSDMD)-N, IL-1 β , mitogen-activated protein kinase (MAPK), and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) related proteins in the THP-1 macrophages in various groups. **Results:** The CCK-8 method results showed that when the LPS concentration was 100–2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, the survival rates of the THP-1 macrophages were over 90%. Compared with 0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS group, the IL-6 levels in culture fluid of the THP-1 macrophages in 100, 200, 500, 1 000, and 2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS group were increased ($P<0.05$), indicating a significant enhancement of the inflammatory response in the macrophages, so 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS was used to construct the inflammation model. After treated with 12.5, 25.0, 50.0, 100.0, and 200.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BRPS, the survival rates of the THP-1 macrophage were 91.2%, 93.8%, 91.4%, 90.6%, and 91.8%, respectively, so 25.0, 50.0, and 100.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BRPS were selected as the drug concentrations for low, medium, and high doses of BRPS groups in the subsequent experiments. The ELISA results showed that compared with blank group, the levels of IL-6, TNF- α , and IL-1 β in culture fluid of the THP-1 macrophages in model group were increased ($P<0.05$); compared with model group, the levels of IL-6, TNF- α , and IL-1 β in low, medium, and high doses of BRPS groups were decreased ($P<0.05$). The DCFH-DA fluorescence probe method results showed that compared with blank group, the ROS level in the THP-1 macrophages in model group was increased ($P<0.05$); compared with model group, the ROS levels in low, medium, and high doses of BRPS groups were decreased ($P<0.05$). The Hoechst33342/PI fluorescence staining results showed that compared with blank group, the degree of membrane damage in the THP-1 macrophages in model group was increased; compared with model group, the degrees of membrane damage in low, medium, and high doses of BRPS groups were decreased. The JC-1 fluorescence staining results showed that compared with blank group, the mitochondrial membrane potential in the THP-1 macrophages in model group was decreased significantly; compared with model group, the mitochondrial membrane potential in low, medium, and high doses of BRPS groups were increased gradually. The Western blotting results showed that compared with blank group, the expression levels of COX-2, HMGB1, NLRP3, Caspase 1, GSDMD-N, and IL-1 β proteins and the ratios of p-P38/P38, p-ERK/ERK, p-JNK/JNK, and p-NF- κ B/NF- κ B in the THP-1 macrophages in model group were increased ($P<0.05$); compared with model group, the expression levels of HMGB1, NLRP3, Caspase-1, GSDMD-N, and IL-1 β proteins and the ratios of p-P38/P38, p-ERK/ERK, p-JNK/JNK, and p-NF- κ B/NF- κ B in the THP-1 macrophages in medium and high doses of BRPS groups were decreased ($P<0.05$), the expression levels of NLRP3, Caspase-1, and IL-1 β proteins in the cells in low dose of BRPS group were decreased ($P<0.05$), the expression level of COX-2 protein in the cells in high dose of BRPS group was decreased ($P<0.05$). Compared with control group, the ratios of p-P38/P38, p-ERK/ERK, p-JNK/JNK, and p-NF- κ B/NF- κ B, and the expression level of IL-1 β protein in the THP-1 macrophages in LPS group were increased ($P<0.05$); compared with LPS group, the ratios of p-P38/P38, p-ERK/ERK, p-JNK/JNK, and p-NF- κ B/NF- κ B, and the expression level of IL-1 β protein in the THP-1 macrophages in inhibitor group, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BRPS group, and inhibitor+100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BRPS group were decreased ($P<0.05$); compared with inhibitor group, the ratios of p-P38/P38, p-ERK/ERK, p-JNK/JNK, and p-NF- κ B/NF- κ B in the THP-1 macrophages in inhibitor+100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BRPS group were decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** BRPS inhibits the inflammatory response of the THP-1 macrophages, which may be related to the MAPK and NF- κ B signaling pathways regulated by BRPS.

KEYWORDS *Boschnikia rossica* polysaccharides; NOD-like receptor family pyrin domain-containing protein 3; Mitogen-activated protein kinase; Nuclear factor- κ B; Pyroptosis

草苈蓉, 又称“不老草”, 属列当科草苈蓉属植物, 分布于中国长白山、日本富士山和朝鲜北部山区^[1]。草苈蓉含有草苈蓉多糖 (*Boschnikia*

rossica polysaccharides, BRPS)、草苈蓉苷、草苈蓉苯丙素苷和草苈蓉环烯醚萜苷等多种药理成分^[2]。草苈蓉可全草入药, 味甘, 具有补肾、壮阳及

保肝等功效^[3]。中医药研究^[4]发现滋肾清热类中草药同时具有抗炎作用。研究^[5-7]显示BRPS具有抗炎、抗肿瘤和抗氧化应激等药理作用。BRPS可溶于水,不良反应少,具有非常广泛的药用价值,因此对BRPS的研究具有重要意义^[8]。

当机体受到刺激后会产生防御反应,此时炎症反应会被激活,进行组织修复,但是过度的炎症反应会对机体组织产生损害^[9]。NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)炎症小体是由NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)和含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶(cysteine aspartic specific protease, Caspase)-1前体(Pro-Caspase-1)组成的高分子蛋白复合物,其激活后导致细胞释放炎症因子,引起细胞焦亡^[10]。经典炎症通路丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路和核因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)通路可以激活下游NLRP3炎症小体^[11]。NLRP3炎症小体激活后可将Pro-Caspase-1剪切为具有活性的Caspase-1,此外活化的Caspase-1切割打孔蛋白消皮素D(gasdermin D, GSDMD),随后GSDMD的N端活性片段(GSDMD-N)转移至细胞膜磷脂层上并形成孔洞,细胞内外渗透压改变,最后细胞肿胀破裂,细胞失去调控物质进出的能力,释放出细胞内炎症因子,引发机体的炎症反应^[12-13]。

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是细菌细胞壁中的主要成分,可以与机体免疫系统中的受体结合,进而引发炎症反应^[14]。巨噬细胞在炎症反应中起关键作用,其可通过分泌细胞炎症因子参与机体免疫应答。研究^[15]发现:佛波酯(phorbol myristate acetate, PMA)可诱导人单核白血病细胞THP-1极化为巨噬细胞。但BRPS通过MAPK和NF- κ B通路对THP-1巨噬细胞发挥抗炎作用的具体机制尚未完全阐明。因此,本研究探讨BRPS的抗炎作用及其对MAPK和NF- κ B信号通路的影响,为BRPS的临床应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 药物、细胞、主要试剂和仪器 BRPS(含量为86.5%),常规醇沉法提取,由延边大学医学院尹宗柱教授惠赠。THP-1细胞购自美国ATCC公司。LPS和PMA购自美国Sigma公司, RPMI-1640培

养基和胎牛血清购自以色列BI公司, β -actin抗体购自美国ABclonal公司, NLRP3和Caspase-1抗体购自美国Thermo公司, 环氧合酶2(cyclooxygenase-2, COX-2)、高迁移率族蛋白B1(high mobility group box 1 protein, HMGB1)、GSDMD-N、白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、P38、磷酸化P38(phosphorylated P38, p-P38)、细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)、磷酸化ERK(phosphorylated ERK, p-ERK)、c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)、磷酸化JNK(phosphorylated JNK, p-JNK)、NF- κ B、磷酸化NF- κ B(phosphorylated NF- κ B, p-NF- κ B)和Lamin B1抗体购自美国Cell Signaling Technology公司, 人IL-1 β 、IL-6和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自美国RayBiotech公司, 活性氧(reactive oxidative species, ROS)检测试剂盒、Hoechst33342/PI荧光染色试剂盒和线粒体膜电位检测试剂盒购自上海碧云天生物有限公司, 核蛋白提取试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。CO₂培养箱和酶标仪购自美国Bio-Tek公司, 垂直板电泳仪购自北京六一生物科技有限公司, 化学发光成像系统购自美国Azure Biosystems公司, 荧光倒置显微镜购自重庆奥特光学仪器有限公司。

1.2 THP-1细胞培养和PMA诱导巨噬细胞 将THP-1单核细胞培养于含10%胎牛血清和1%抗生素的RPMI-1640培养基中, 于37℃、5%CO₂条件下培养。细胞生长2~3d后进行传代。取对数生长期细胞, 采用100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PMA刺激THP-1单核细胞48h, 诱导分化为巨噬细胞。光学显微镜下观察细胞形态表现, 此时细胞为贴壁状态^[16-17]。

1.3 CCK-8法检测不同浓度LPS和BRPS处理后THP-1巨噬细胞存活率 将THP-1巨噬细胞接种于96孔细胞培养板中, 分别加入含0、100、200、500、1000和2000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS的培养基培养24h, 每组设6个复孔, 加入CCK-8试剂后, 避光2h, 于波长450nm处测定吸光度(A)值, 计算THP-1巨噬细胞存活率。细胞存活率=测定孔A值/空白孔A值 \times 100%

另取THP-1巨噬细胞, 接种于96孔细胞培养板中, 每组设6个复孔, 分别加入含0、12.5、

25.0、50.0、100.0 和 200.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BRPS 的培养基培养 24 h, 加入 CCK-8 试剂, 避光 2 h 后, 于波长 450 nm 处测定 A 值, 计算 THP-1 巨噬细胞存活率, 以选取后续实验药物浓度。细胞存活率 = 测定孔 A 值/空白孔 A 值 $\times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.4 ELISA 法检测不同浓度 LPS 处理后 THP-1 巨噬细胞培养液中 IL-6 水平 将 THP-1 巨噬细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 按上述各组 LPS 浓度进行处理, 24 h 后吸取各组细胞培养液, 按照 ELISA 试剂盒说明书步骤进行操作, 绘制标准曲线, 计算不同浓度 LPS 处理后巨噬细胞培养液中 IL-6 水平。实验重复 3 次。

1.5 细胞分组和处理 将 THP-1 细胞分为空白组、模型组、低剂量 BRPS 组、中剂量 BRPS 组和高剂量 BRPS 组。空白组 THP-1 细胞采用 $100\text{ pg}\cdot\text{L}^{-1}$ PMA 刺激 48 h 分化为巨噬细胞, 加入无血清培养基培养 24 h, 更换新培养基培养 1 h。模型组 THP-1 细胞采用 $100\text{ pg}\cdot\text{L}^{-1}$ PMA 刺激 48 h, 加入无血清培养基培养 24 h 后, $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS 处理 1 h, 建立细胞炎症模型。低、中和高剂量 BRPS 组 THP-1 细胞采用 $100\text{ pg}\cdot\text{L}^{-1}$ PMA 刺激 48 h, 分别加入含 25.0、50.0 和 $100.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BRPS 培养基培养 24 h 后, 应用 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS 处理 1 h^[18]。采用 P38 抑制剂 SB203580、ERK 抑制剂 U0126、JNK 抑制剂 SP600125 和 NF- κ B 抑制剂 BAY11-7082 对 THP-1 细胞进行验证。另取 THP-1 细胞, 分为对照组、LPS 组、抑制剂组、 $100.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BRPS 组和抑制剂 + $100.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BRPS 组。各组 THP-1 细胞采用 $100\text{ pg}\cdot\text{L}^{-1}$ PMA 刺激 48 h 分化为巨噬细胞。对照组 THP-1 细胞不作任何处理; LPS 组 THP-1 细胞加入 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS 作用 1 h; 抑制剂组 THP-1 细胞分别采用相应浓度不同抑制剂处理后加入 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS 作用 1 h, 其中 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SB203580 作用 90 min, $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ U0126 作用 90 min, $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SP600125 作用 30 min, $30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BAY11-7082 作用 60 min; $100.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BRPS 组 THP-1 细胞加入含 $100.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BRPS 培养基培养 24 h 后, 加入 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS 作用 1 h; 抑制剂 + $100.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BRPS 组 THP-1 细胞加入含 $100.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BRPS 培养基培养 24 h 后, 更换相应浓度不同抑制剂处理, 再加入 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS 作用 1 h。

1.6 ELISA 法检测各组 THP-1 巨噬细胞培养液中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平 将 THP-1 巨噬细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 收集各组细胞培养液, 按照试剂盒说明书操作, 检测 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平, 绘制标准曲线, 计算各组 THP-1 巨噬细胞培养液中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平。实验重复 3 次。

1.7 2, 7-二氯荧光素二乙酸酯 (2, 7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 荧光探针法检测各组 THP-1 巨噬细胞中 ROS 水平 将 THP-1 巨噬细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 按照 ROS 检测试剂盒说明书操作, 各孔加入适当稀释好的 DCFH-DA 试剂避光染色 30 min。倒置荧光显微镜下观察并拍照, 采用 Image J 软件分析绿色荧光强度, 以绿色荧光强度代表 ROS 水平。实验重复 3 次。

1.8 Hoechst33342/PI 荧光染色法观察各组 THP-1 巨噬细胞膜损伤情况 将 THP-1 巨噬细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 按 Hoechst33342/PI 荧光染色试剂盒说明书操作, 各孔加入染色混合液 (Hoechst33342 染液 : PI 染液 = 1 : 1), 避光染色 30 min。倒置荧光显微镜下观察并拍照。Hoechst33342 染液可穿透细胞膜呈蓝色, PI 染液不能穿透细胞膜, 当细胞膜破损时, Hoechst33342 染液增强呈强蓝色荧光, PI 染液可以将细胞膜破损的细胞染为强红色荧光^[19]。以 Hoechst33342 染液和 PI 染液染色强度代表各组 THP-1 巨噬细胞膜损伤程度。

1.9 JC-1 荧光染色法观察各组 THP-1 巨噬细胞线粒体膜电位 将 THP-1 巨噬细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 按线粒体膜电位检测试剂盒说明书操作, 加入染色液避光染色 30 min。倒置荧光显微镜下观察并拍照, 细胞中红色荧光为 JC-1 聚合物荧光染色, 绿色荧光为 JC-1 单体荧光染色。以红色荧光强度代表 THP-1 巨噬细胞线粒体膜电位。

1.10 蛋白印迹法检测各组 THP-1 巨噬细胞中炎症相关信号通路蛋白表达水平 收集 THP-1 巨噬细胞并裂解细胞, 提取总蛋白及核蛋白, 煮沸变性后进行 SDS-PAGE 电泳, 采用 PVDF 膜进行转膜, 封闭后, 加入一抗, β -actin (1 : 10 000)、COX-2 (1 : 1000)、HMGB1 (1 : 1000)、NLRP3 (1 : 1000)、Caspase-1 (1 : 1 000)、GSDMD-N (1 : 1 000)、IL-1 β (1 : 1000)、p-P38 (1 : 2000)、P38 (1 : 1000)、p-ERK (1 : 2 000)、ERK (1 : 1 000)、p-JNK

(1:1000)、JNK (1:1000)、p-NF- κ B (1:1000)、NF- κ B (1:1000) 和 Lamin B1 (1:1000) 孵育过夜。相应二抗稀释 (1:1000), 室温孵育 1 h 后显色, 采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 以 β -actin 内参, 并计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。实验重复 3 次。

1.11 统计学分析 采用 GraphPad Prism 8.0 统计软件进行统计学分析。各组 THP-1 巨噬细胞存活率、THP-1 巨噬细胞培养液中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平及 THP-1 巨噬细胞中炎症相关信号通路蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 LPS 和 BRPS 处理后 THP-1 巨噬细胞存活率及细胞培养液中 IL-6 水平 LPS 浓度为 100~2 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, LPS 对 THP-1 巨噬细胞不显示细胞毒性, THP-1 巨噬细胞存活率均 $> 90\%$ 。与 0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 组比较, 100、200、500、1 000 和 2 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 组 THP-1 巨噬细胞培养液中 IL-6 水平均明显升高 ($P < 0.05$), 提示巨噬细胞炎症反应明显增强。本研究选用 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 处理 THP-1 巨噬细胞 1 h 作为炎症模型的建立条件。见表 1。

表 2 各组 THP-1 巨噬细胞培养液中炎症因子水平

Tab. 2 Levels of inflammatory factors in culture fluid in THP-1 macrophages in various groups [$n=3, \bar{x} \pm s, \rho_{\text{B}}/(\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$]

Group	IL-6	TNF- α	IL-1 β
Blank	59.29 \pm 0.24	441.67 \pm 0.28	1.49 \pm 0.35
Model	215.13 \pm 0.62*	1 200.33 \pm 1.23*	29.93 \pm 0.83*
Low dose of BRPS	171.38 \pm 0.39 Δ	1 050.03 \pm 0.76 Δ	26.61 \pm 0.44 Δ
Medium dose of BRPS	127.58 \pm 0.43 Δ	874.83 \pm 0.35 Δ	23.88 \pm 0.46 Δ
High dose of BRPS	78.88 \pm 0.80 Δ	815.20 \pm 1.07 Δ	12.21 \pm 0.46 Δ

* $P < 0.05$ compared with blank group; $\Delta P < 0.05$ compared with model group.

2.3 各组 THP-1 巨噬细胞中 ROS 水平 与空白组 (52.68 \pm 2.55) 比较, 模型组 THP-1 巨噬细胞中 ROS 水平 (175.02 \pm 11.56) 明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 低、中和高剂量 BRPS 组 THP-1 巨噬细胞中 ROS 水平 (166.87 \pm 12.32、136.92 \pm 4.30 和 85.91 \pm 10.35) 均明显降低 ($P <$

表 1 不同浓度 LPS 处理后 THP-1 巨噬细胞存活率和细胞培养液中 IL-6 水平

Tab. 1 Survival rates of THP-1 macrophages and IL-6 level in cell culture fluid after treated with different concentrations of LPS ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	Survival rate($\eta/\%$)	IL-6 [$\rho_{\text{B}}/(\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$]
0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS	99.81 \pm 1.32	21.49 \pm 3.37
100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS	94.80 \pm 1.16	40.41 \pm 6.87*
200 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS	90.27 \pm 2.90	62.27 \pm 5.29*
500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS	93.43 \pm 2.24	88.59 \pm 7.33*
1 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS	94.63 \pm 3.52	215.61 \pm 6.18*
2 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS	92.43 \pm 4.31	242.27 \pm 8.06*

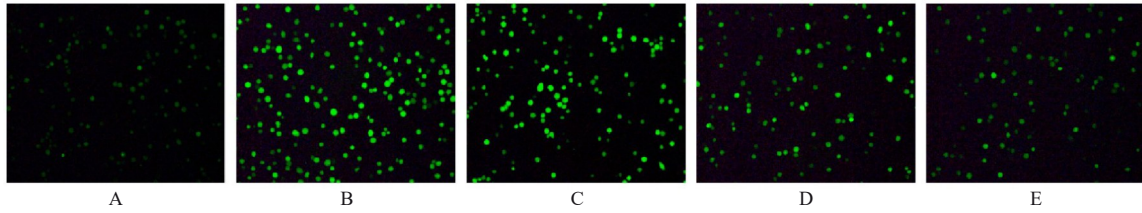
* $P < 0.05$ compared with 0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS group.

12.5、25.0、50.0、100.0 和 200.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BRPS 处理 THP-1 巨噬细胞, THP-1 巨噬细胞存活率分别为 91.2%、93.8%、91.4%、90.6% 和 91.8%, 提示 BRPS 对 THP-1 巨噬细胞不显示细胞毒性。因此, 选取 25.0、50.0 和 100.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BRPS 作为后续实验中低、中及高剂量 BRPS 组的药物浓度。

2.2 各组 THP-1 巨噬细胞培养液中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平 与空白组比较, 模型组 THP-1 巨噬细胞培养液中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平均明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 低、中和高剂量 BRPS 组 THP-1 巨噬细胞培养液中 IL-6、TNF- α 及 IL-1 β 水平均明显降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

0.05)。见图 1。

2.4 各组 THP-1 巨噬细胞膜损伤情况 与空白组比较, 模型组 THP-1 巨噬细胞中 Hoechst33342 染液和 PI 染液染色增强, THP-1 巨噬细胞膜损伤程度明显加重。与模型组比较, 低、中和高剂量 BRPS 组 THP-1 巨噬细胞中 Hoechst33342 染液和 PI 染液染



A: Blank group; B: Model group; C: Low dose of BRPS group; D: Medium dose of BRPS group; E: High dose of BRPS group.

图1 DCFH-DA 荧光探针法检测各组 THP-1 巨噬细胞中荧光强度($\times 200$)

Fig. 1 Fluorescence intensities in THP-1 macrophages in various groups detected by DCFH-DA fluorescence probe method($\times 200$)

色减弱, THP-1 巨噬细胞膜损伤程度明显减轻。见图 2。

2.5 各组 THP-1 巨噬细胞线粒体膜电位 空白组 JC-1 聚合物红色荧光较强, JC-1 单体绿色荧光较弱, 提示 THP-1 巨噬细胞线粒体膜电位较高。与

空白组比较, 模型组 THP-1 巨噬细胞线粒体跨膜电位明显降低。与模型组比较, 低、中和高剂量 BRPS 组 THP-1 巨噬细胞线粒体跨膜电位逐渐升高。见图 3。

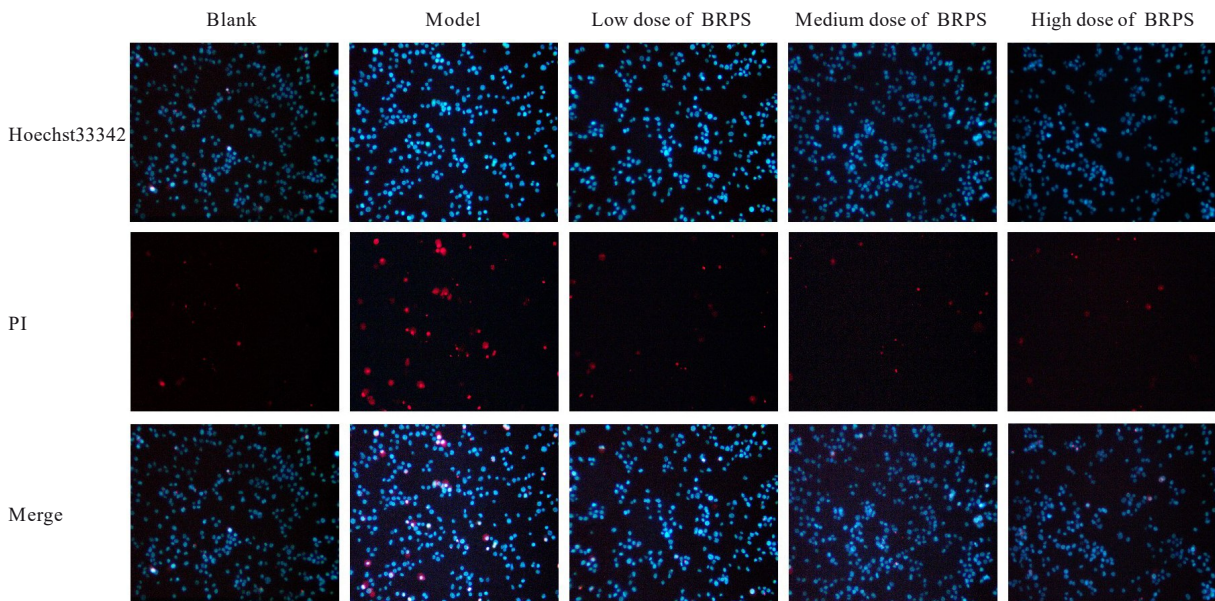


图2 Hoechst33342/PI 荧光染色法观察各组 THP-1 巨噬细胞膜损伤情况($\times 200$)

Fig. 2 Membrane damage in THP-1 macrophages in various groups observed by Hoechst33342/PI fluorescence staining assay($\times 200$)

2.6 各组 THP-1 巨噬细胞中 COX-2 和 HMGB1 蛋白表达水平 与空白组比较, 模型组 THP-1 巨噬细胞中 COX-2 和 HMGB1 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 中剂量 BRPS 组 THP-1 巨噬细胞中 HMGB1 蛋白表达水平和高剂量 BRPS 组 THP-1 巨噬细胞中 COX-2 和 HMGB1 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$), 低剂量 BRPS 组 THP-1 巨噬细胞中 COX-2 和 HMGB1 蛋白表达水平和中剂量 BRPS 组 THP-1 巨噬细胞中 COX-2 蛋白表达水平差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

见图 4。

2.7 各组 THP-1 巨噬细胞中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N 和 IL-1 β 蛋白表达水平 与空白组比较, 模型组 THP-1 巨噬细胞中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N 和 IL-1 β 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 低、中和高剂量 BRPS 组 THP-1 巨噬细胞中 NLRP3、Caspase-1 和 IL-1 β 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$), 中和高剂量 BRPS 组 THP-1 巨噬细胞中 GSDMD-N 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$), 低剂量 BRPS 组 THP-1

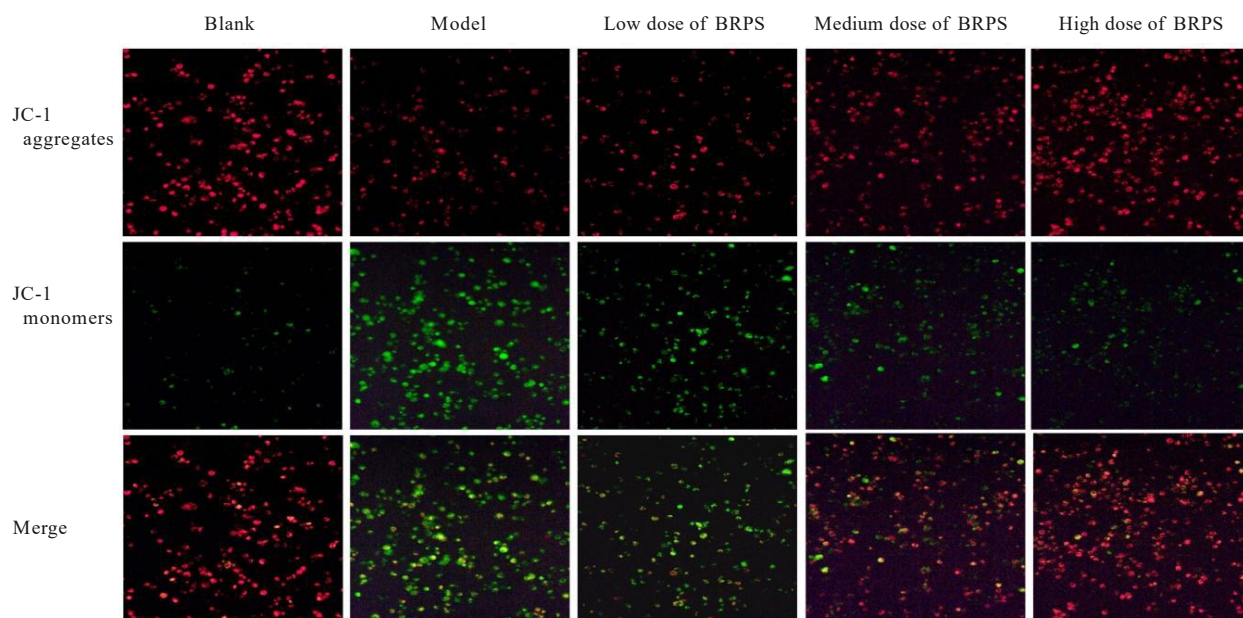
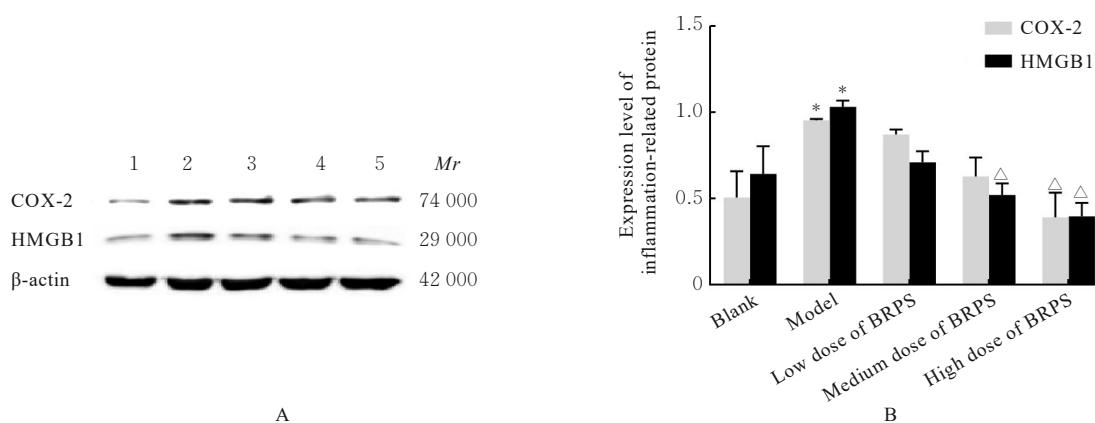


图3 JC-1荧光染色法观察各组 THP-1巨噬细胞线粒体膜电位情况($\times 200$)

Fig. 3 Mitochondrial membrane potential in THP-1 macrophages in various groups observed by JC-1 fluorescence staining assay($\times 200$)



Lane 1: Blank group; Lane 2: Model group; Lane 3: Low dose of BRPS group; Lane 4: Medium dose of BRPS group; Lane 5: High dose of BRPS group. * $P < 0.05$ compared with blank group; $\Delta P < 0.05$ compared with model group.

图4 各组 THP-1巨噬细胞炎症相关蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

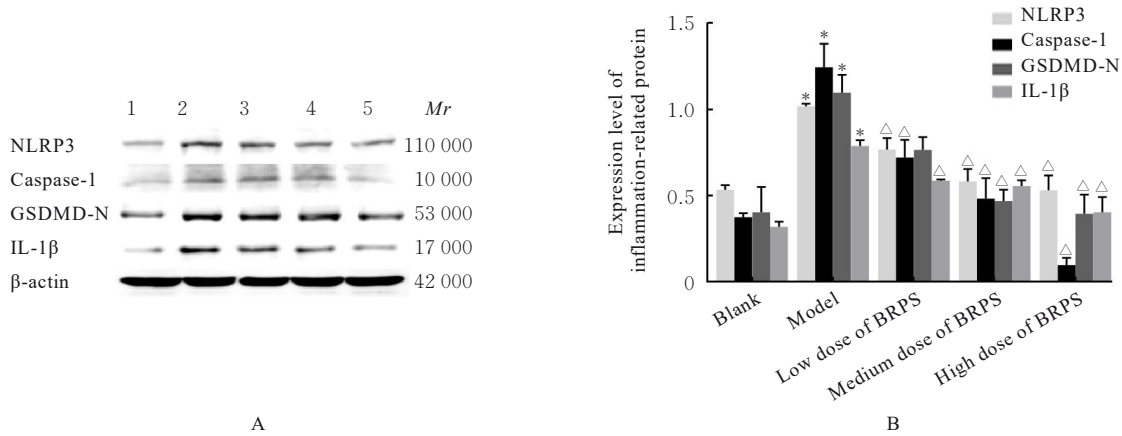
Fig. 4 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of inflammation-related proteins in THP-1 macrophages in various groups

巨噬细胞中 GSDMD-N 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 5。

2.8 各组 THP-1 巨噬细胞中 p-P38/P38、p-ERK/ERK、p-JNK/JNK 和 p-NF- κ B/NF- κ B 比值及 IL-1 β 蛋白表达水平 与空白组比较,模型组 THP-1 巨噬细胞中 p-P38/P38、p-ERK/ERK、p-JNK/JNK 和 p-NF- κ B/NF- κ B 比值均明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较,中和高剂量 BRPS 组 THP-1 巨噬细胞中 p-P38/P38、p-ERK/ERK、p-JNK/JNK 和

p-NF- κ B/NF- κ B 比值均明显降低 ($P < 0.05$),低剂量 BRPS 组 THP-1 巨噬细胞中 p-P38/P38、p-ERK/ERK、p-JNK/JNK 和 p-NF- κ B/NF- κ B 比值差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 6 和 7 及表 3。

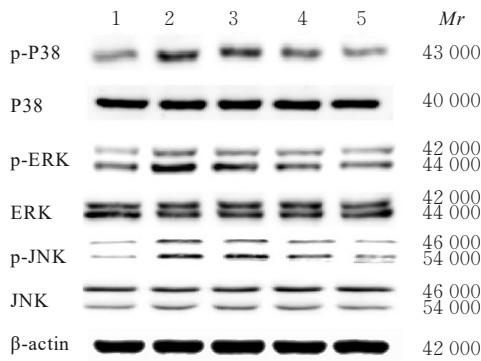
与对照组比较,LPS 组 THP-1 巨噬细胞 p-P38/P38、p-ERK/ERK、p-JNK/JNK 和 p-NF- κ B/NF- κ B 比值及 IL-1 β 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$)。与 LPS 组比较,抑制剂组、100 mg \cdot L $^{-1}$ BRPS 组和



Lane 1: Blank group; Lane 2: Model group; Lane 3: Low dose of BRPS group; Lane 4: Medium dose of BRPS group; Lane 5: High dose of BRPS group. * $P < 0.05$ compared with blank group; $\Delta P < 0.05$ compared with model group.

图5 各组 THP-1 巨噬细胞炎症小体相关蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

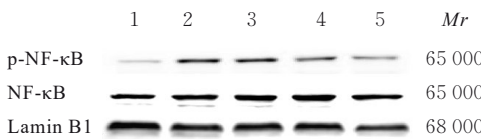
Fig. 5 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of inflammasome-related proteins in THP-1 macrophages in various groups



Lane 1: Blank group; Lane 2: Model group; Lane 3: Low dose of BRPS group; Lane 4: Medium dose of BRPS group; Lane 5: High dose of BRPS group.

图6 各组 THP-1 巨噬细胞中 p-P38、P38、p-ERK、ERK、p-JNK 和 JNK 蛋白表达电泳图

Fig. 6 Electrophoregram of expressions of p-P38, P38, p-ERK, ERK, p-JNK, and JNK proteins in THP-1 macrophages in various groups



Lane 1: Blank group; Lane 2: Model group; Lane 3: Low dose of BRPS group; Lane 4: Medium dose of BRPS group; Lane 5: High dose of BRPS group.

图7 各组 THP-1 巨噬细胞中 p-NF-κB 和 NF-κB 蛋白表达电泳图

Fig. 7 Electrophoregram of expressions of p-NF-κB and NF-κB proteins in THP-1 macrophages in various groups

抑制剂 + $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BRPS 组 THP-1 巨噬细胞中 p-P38/P38、p-ERK/ERK、p-JNK/JNK 和 p-NF-κB/NF-κB 比值及 IL-1β 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$)。与抑制剂组比较, 抑制剂 + $100.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BRPS 组 THP-1 巨噬细胞 p-P38/P38、p-ERK/ERK、p-JNK/JNK 和 p-NF-κB/NF-κB 比值均明显降低 ($P < 0.05$)。见图 8~11。

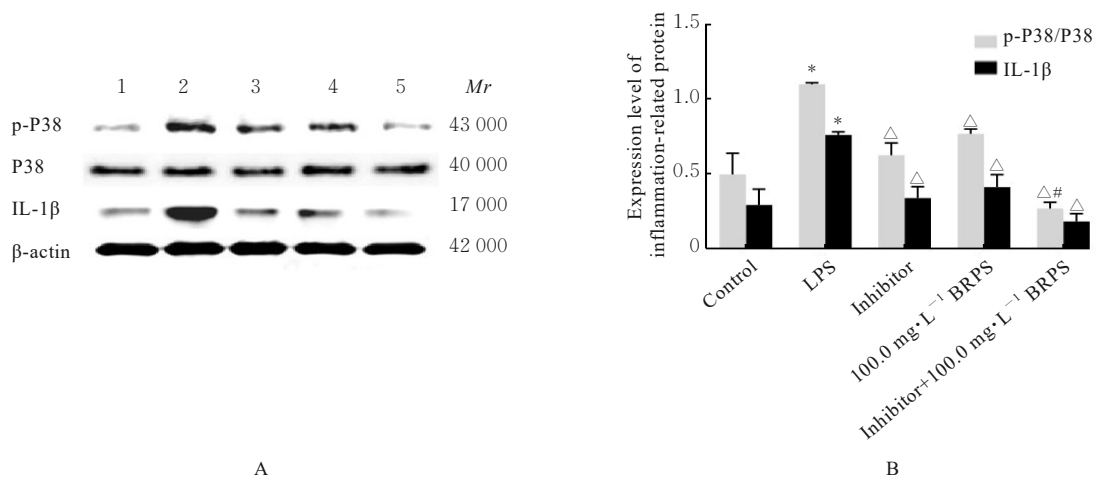
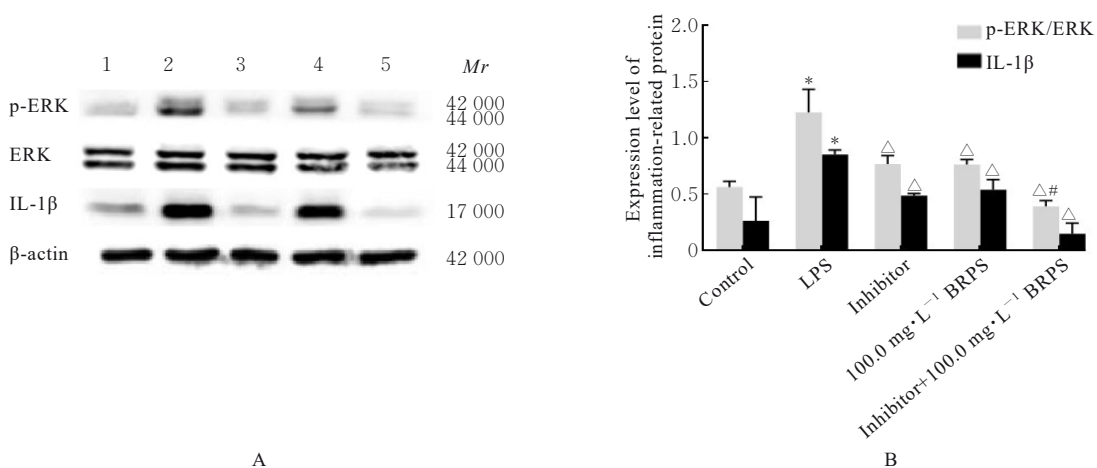
3 讨论

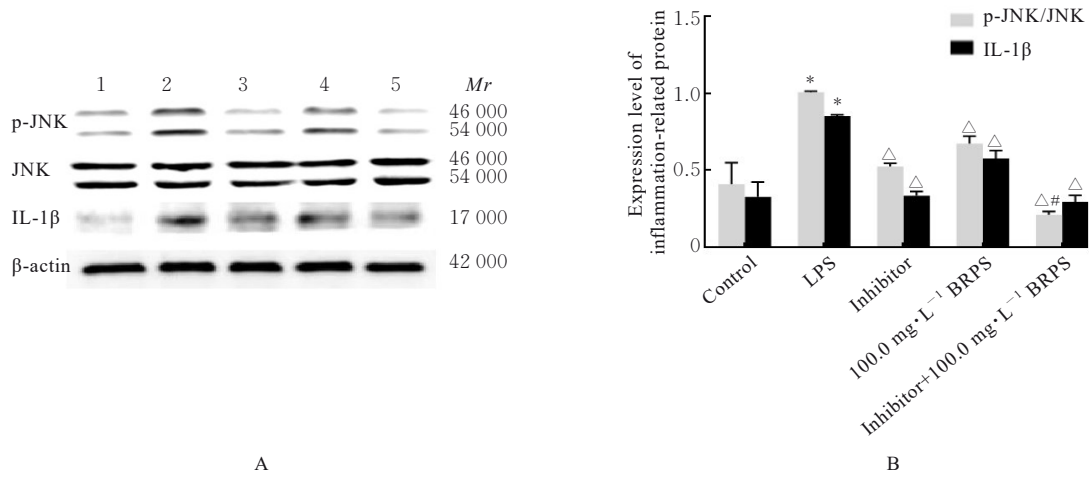
炎症反应是免疫系统对于病原体、受损细胞和有毒化合物等有害刺激作出的防御反应, 通过多种炎症信号通路进行调节, 以清除有害刺激维持机体平衡^[20]。巨噬细胞在受到刺激后参与机体炎症反应, 诱导炎症因子产生并释放^[9]。IL-1β 是 IL-1 基因家族中典型的促炎因子, 可由 LPS 直接刺激产生也可由 TNF-α 诱导产生, 同时也可诱导 IL-6、TNF-α 及其自身的分泌, 在炎症反应中相互协调作用^[21]。炎症因子的大量释放可引起 COX-2 高表达^[22]。同时, 产生的炎症因子可促进 HMGB1 与相应受体相互作用, 激活下游炎症通路^[23]。本研究结果显示: BRPS 预处理后, THP-1 巨噬细胞中炎症因子水平和 COX-2 及 HMGB1 蛋白表达水平降低, 提示 BRPS 可减少炎症因子的释放, 从而降低炎症反应。

ROS 主要来源于线粒体, 其产生不仅会诱导氧化应激, 还可引发炎症反应。线粒体功能发生障碍时, 可产生大量 ROS, ROS 的释放也可促进 NLRP3 炎症小体的激活^[24-25]。NLRP3 炎症小体组

表3 各组 THP-1 巨噬细胞中 p-P38/P38、p-ERK/ERK、p-JNK/JNK 和 p-NF- κ B/NF- κ B 比值Tab. 3 Ratios of p-P38/P38, p-ERK/ERK, p-JNK/JNK, and p-NF- κ B/NF- κ B in THP-1 macrophages in various groups $(n=3, \bar{x}\pm s)$

Group	p-P38/P38	p-ERK/ERK	p-JNK/JNK	p-NF- κ B/NF- κ B
Blank	0.59 \pm 0.05	0.70 \pm 0.10	0.52 \pm 0.05	0.67 \pm 0.18
Model	1.01 \pm 0.01*	1.17 \pm 0.12*	1.05 \pm 0.09*	1.38 \pm 0.07*
Low dose of BRPS	1.04 \pm 0.04	0.98 \pm 0.04	0.96 \pm 0.05	1.11 \pm 0.05
Medium dose of BRPS	0.79 \pm 0.08 Δ	0.90 \pm 0.06 Δ	0.83 \pm 0.02 Δ	1.05 \pm 0.05 Δ
High dose of BRPS	0.45 \pm 0.04 Δ	0.81 \pm 0.06 Δ	0.64 \pm 0.08 Δ	0.82 \pm 0.12 Δ

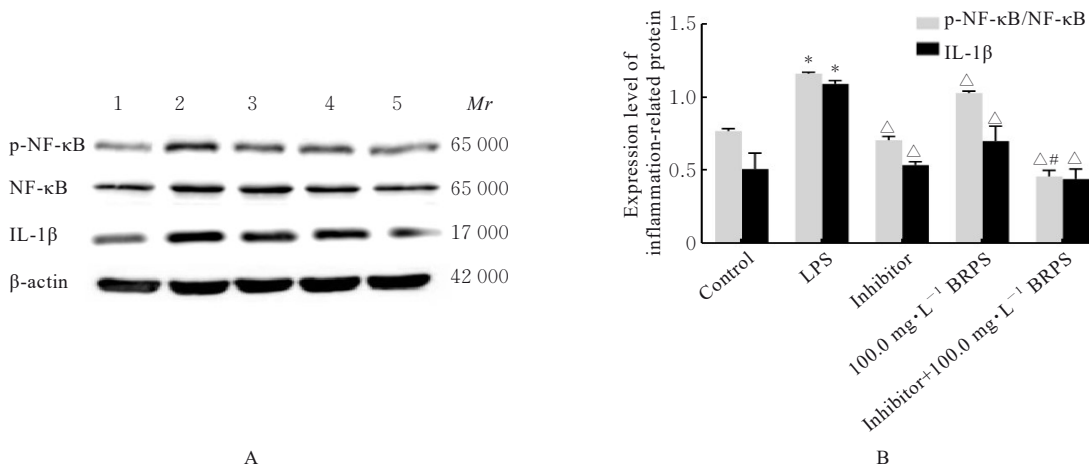
* $P<0.05$ compared with blank group; $\Delta P<0.05$ compared with model group.Lane 1: Control group; Lane 2: LPS group; Lane 3: Inhibitor group; Lane 4: 100.0 mg·L⁻¹ BRPS group; Lane 5: Inhibitor+100.0 mg·L⁻¹ BRPS group. * $P<0.05$ compared with blank group; $\Delta P<0.05$ compared with model group; # $P<0.05$ compared with inhibitor group.图8 各组 THP-1 巨噬细胞中 p-P38、P38 和 IL-1 β 蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)Fig. 8 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of p-P38, P38, and IL-1 β proteins in THP-1 macrophages in various groupsLane 1: Control group; Lane 2: LPS group; Lane 3: Inhibitor group; Lane 4: 100.0 mg·L⁻¹ BRPS group; Lane 5: Inhibitor+100.0 mg·L⁻¹ BRPS group. * $P<0.05$ compared with blank group; $\Delta P<0.05$ compared with model group; # $P<0.05$ compared with inhibitor group.图9 各组 THP-1 巨噬细胞中 p-ERK、ERK 和 IL-1 β 蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)Fig. 9 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of p-ERK, ERK, and IL-1 β proteins in THP-1 macrophages in various groups



Lane 1: Control group; Lane 2: LPS group; Lane 3: Inhibitor group; Lane 4: 100.0 mg·L⁻¹ BRPS group; Lane 5: Inhibitor+100.0 mg·L⁻¹ BRPS group. **P*<0.05 compared with blank group; [△]*P*<0.05 compared with model group; #*P*<0.05 compared with inhibitor group.

图 10 各组 THP-1 巨噬细胞中 p-JNK、JNK 和 IL-1β 蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 10 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of p-JNK, JNK and IL-1β proteins in THP-1 macrophages in various groups



Lane 1: Control group; Lane 2: LPS group; Lane 3: Inhibitor group; Lane 4: 100.0 mg·L⁻¹ BRPS group; Lane 5: Inhibitor+100.0 mg·L⁻¹ BRPS group. **P*<0.05 compared with blank group; [△]*P*<0.05 compared with model group; #*P*<0.05 compared with inhibitor group.

图 11 各组 THP-1 巨噬细胞中 p-NF-κB、NF-κB 和 IL-1β 蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 11 Electrophoregram (A) and histogram(B) of expressions p-NF-κB, NF-κB and IL-1β proteins in THP-1 macrophages in various groups

装后, 导致细胞焦亡的发生, 同时 IL-1β 可经受损的细胞膜释放, 加重机体的炎症反应^[26]。本研究结果显示: BRPS 预处理后可降低 THP-1 巨噬细胞中 ROS 水平、升高线粒体跨膜电位并减轻细胞膜损伤情况, 降低 THP-1 巨噬细胞中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N 和 IL-1β 蛋白表达水平。提示 BRPS 可减轻细胞氧化应激及炎症反应, 有效减轻细胞膜损伤情况, 并抑制细胞炎症小体活化及焦亡。

MAPK 和 NF-κB 信号通路是经典的促炎信号

通路, 均可通过上调炎症因子的合成, 进而促进炎症反应^[27]。MAPK 主要包括 P38、ERK 和 JNK 共 3 个亚家族, 可通过磷酸化调节炎症因子的表达^[28]。NF-κB 经典通路通常由 LPS 等与细胞上的相关受体结合而介导活化, NF-κB 活化后进入细胞核内以调节下游靶基因的表达。研究^[18]显示: BRPS 可通过 MAPK 和 NF-κB 信号通路减轻 RAW264.7 巨噬细胞炎症反应。本研究结果显示: BRPS 降低 THP-1 巨噬细胞中 P38、ERK、JNK 和

NF- κ B磷酸化水平,并通过MAPK和NF- κ B通路抑制剂验证具有相同结果,提示BRPS抗炎作用可能与MAPK和NF- κ B通路有关。

综上所述, BRPS可通过MAPK和NF- κ B信号通路减轻LPS诱导的THP-1巨噬细胞炎症反应,本研究结果为BRPS的临床应用提供了参考。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

马新月、刁佳雯和徐慧参与实验数据获取及分析,金爱花参与实验设计和论文撰写,全吉淑参与实验设计和论文修改及审校。

[参考文献]

- [1] 陈庆红,张睿,冯秀春,等.长白山区草苈蓉研究现状与濒危机理[J].现代农业科技,2015(14):80-81.
- [2] QUAN J S, JIN M H, XU H X, et al. BRP, a polysaccharide fraction isolated from *Boschniakia rossica*, protects against galactosamine and lipopolysaccharide induced hepatic failure in mice[J]. J Clin Biochem Nutr, 2014, 54(3): 181-189.
- [3] 许长青,许顺贵,刘春光,等.草苈蓉的药理作用研究进展[J].武警医学,2023,34(1):75-78.
- [4] 王丽华,杨弋,周德生,等.川芎清脑颗粒治疗慢性脑缺血伴头痛的治疗研究[J].中国实用内科杂志,2023,43(1):74-77.
- [5] 吴文龙,王权成,孟强,等.小檗碱对肝癌细胞活性与增殖能力的影响及其机制[J].解放军医学杂志,2023,48(6):653-662.
- [6] 华龙,王晨宇,姚坤厚,等.草苈蓉多糖对人肝癌细胞侵袭迁移的影响及机制[J].解放军医学杂志,2021,46(8):763-770.
- [7] 尹学哲,王玉娇,尹基峰,等.草苈蓉提取物对HepG2细胞氧化应激损伤的保护作用[J].食品科学,2015,36(15):173-178.
- [8] 宋全胜.草苈蓉根茎粗多糖的分离纯化及其部分性质的研究[D].延吉:延边大学,2005.
- [9] MONTELEONE G, MOSCARDELLI A, COLELLA A, et al. Immune-mediated inflammatory diseases: common and different pathogenic and clinical features [J]. Autoimmun Rev, 2023, 22(10): 103410.
- [10] YU P, ZHANG X, LIU N, et al. Pyroptosis: mechanisms and diseases [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 128.
- [11] ZHANG E L, HUANG J B, WANG K, et al. Pterostilbene protects against lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver failure by upregulating the Nrf2 pathway and inhibiting NF- κ B, MAPK, and NLRP3 inflammasome activation[J]. J Med Food, 2020, 23(9): 952-960.
- [12] HUANG Y, XU W, ZHOU R B. NLRP3 inflammasome activation and cell death [J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(9): 2114-2127.
- [13] 丁杨,胡容. NLRP3炎症小体激活及调节机制的研究进展[J].药学进展,2018,42(4):294-302.
- [14] CECCARELLI S, PANERA N, MINA M, et al. LPS-induced TNF- α factor mediates pro-inflammatory and pro-fibrogenic pattern in non-alcoholic fatty liver disease[J]. Oncotarget, 2015, 6(39): 41434-41452.
- [15] YU C P, ZHAO W, DUAN C J, et al. Poly-l-lysine-caused cell adhesion induces pyroptosis in THP-1 monocytes[J]. Open Life Sci, 2022, 17(1): 279-283.
- [16] DAIGNEAULT M, PRESTON J A, MARRIOTT H M, et al. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages[J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8668.
- [17] GIAMBELLUCA S, OCHS M, LOPEZ-RODRIGUEZ E. Resting time after phorbol 12-myristate 13-acetate in THP-1 derived macrophages provides a non-biased model for the study of NLRP3 inflammasome[J]. Front Immunol, 2022, 13: 958098.
- [18] 刘莉园,张钊,葛乃嘉,等.草苈蓉多糖对脂多糖诱导的RAW264.7巨噬细胞炎症反应的影响[J].中国药理学杂志,2021,56(18):1479-1485.
- [19] NI Y J, ZHANG J, ZHU W J, et al. Echinacoside inhibited cardiomyocyte pyroptosis and improved heart function of HF rats induced by isoproterenol via suppressing NADPH/ROS/ER stress [J]. J Cell Mol Med, 2022, 26(21): 5414-5425.
- [20] CHEN L L, DENG H D, CUI H M, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs[J]. Oncotarget, 2017, 9(6): 7204-7218.
- [21] HUANG Y, CHEN S P, YAO Y, et al. Ovotransferrin inhibits TNF- α induced inflammatory response in gastric epithelial cells via MAPK and NF- κ B pathway[J]. J Agric Food Chem, 2023, 71(33): 12474-12486.
- [22] CUI J H, JIA J P. Natural COX-2 inhibitors as promising anti-inflammatory agents: an update[J]. Curr Med Chem, 2021, 28(18): 3622-3646.
- [23] 华湘黔,张漾. HMGB1及PD-L1在浸润性乳腺癌非特殊型中的表达及临床意义[J].现代肿瘤医学,2024,32(3):477-481.

- [24] AN Y N, ZHANG H F, WANG C, et al. Activation of ROS/MAPKs/NF- κ B/NLRP3 and inhibition of efferocytosis in osteoclast-mediated diabetic osteoporosis[J]. *FASEB J*, 2019, 33(11): 12515-12527.
- [25] LIN Q S, LI S, JIANG N, et al. PINK1-parkin pathway of mitophagy protects against contrast-induced acute kidney injury via decreasing mitochondrial ROS and NLRP3 inflammasome activation [J]. *Redox Biol*, 2019, 26: 101254.
- [26] AKTHER M, HAQUE M E, PARK J, et al. NLRP3 ubiquitination-a new approach to target NLRP3 inflammasome activation[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8780.
- [27] HEPWORTH E M W, HINTON S D. Pseudophosphatases as regulators of MAPK signaling[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(22): 12595.
- [28] ZHANG M, CHEN Y, YANG M J, et al. Celastrol attenuates renal injury in diabetic rats via MAPK/NF- κ B pathway[J]. *Phytother Res*, 2019, 33(4): 1191-1198.