

【 实验研究 】

金合欢素抑制 NLRP3 炎症小体与细胞焦亡改善急性肺损伤的研究

初英杰¹, 刘霞¹, 李琪琪¹, 李俊良¹, 原鑫馨², 韦斯娴², 王遥^{1,3*}

1. 北京中医药大学 生命科学学院, 北京 102488

2. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102488

3. 北京中医药大学 北京中医药研究院, 北京 100029

摘要: 目的 基于 NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体与细胞焦亡, 探究金合欢素对急性肺损伤 (ALI) 的治疗作用。方法 将雄性 C57BL/6J 小鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为对照组、模型组、金合欢素 (40 mg·kg⁻¹) 组, 除对照组外, ip 致死剂量的脂多糖 (LPS, 20 mg·kg⁻¹) 构建 ALI 小鼠模型, 进行小鼠生存率实验; ip 致死剂量的 LPS (10 mg·kg⁻¹) 构建 ALI 小鼠模型, 苏木素-伊红 (HE) 染色法检测肺组织病理变化; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测小鼠肺组织炎症相关基因肿瘤坏死因子 (*Tnf*)、白细胞介素 (*Il*) 6、*Il1b* 的表达; Western blotting 检测小鼠肺组织中 NLRP3 通路相关蛋白 NLRP3、消皮素 D (GSDMD) 的表达; ELISA 法检测小鼠腹腔灌洗液 IL-1 β 水平。体外培养原代腹腔巨噬细胞, 通过将 LPS 分别与腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP)、尼日利亚菌素 (Nig) 以及短杆菌肽 (Gram) 联合使用, 刺激 NLRP3 炎症小体激活, 给予金合欢素 (5、10、20 μ mol·L⁻¹) 联合培养, Western blotting 法检测半胱氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1)、NLRP3、GSDMD 蛋白表达水平, 碘化丙啶 (PI) /Hoechst 染色观察细胞焦亡。结果 LPS 20 mg·kg⁻¹ 造模后 45 h, 模型组小鼠全部死亡; 金合欢素组小鼠最终生存率为 60%。与 LPS 10 mg·kg⁻¹ 模型组相比, 金合欢素组的小鼠肺组织结构损伤得到显著缓解, 炎症细胞浸润明显减少, 肺泡壁增厚情况减轻, 且肺组织损伤评分显著降低 ($P < 0.001$); 肺组织 *Tnf*、*Il6*、*Il1b* mRNA 表达显著下降 ($P < 0.001$), 腹腔灌洗液 IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.001$); 肺组织 NLRP3、GSDMD-NT 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。体外实验结果表明, 与模型组比较, 金合欢素组 NLRP3、GSDMD-NT、Caspase-1 (p20) 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001); 细胞焦亡率显著降低 ($P < 0.001$)。结论 金合欢素可以通过抑制 NLRP3 炎症小体与细胞焦亡, 改善 ALI 小鼠的肺部损伤以及炎症反应。

关键词: 金合欢素; 急性肺损伤; 原代腹腔巨噬细胞; NLRP3 炎症小体; 细胞焦亡**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)04-0800-09**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.04.002

Research on inhibition of NLRP3 inflammasome and pyroptosis by acacetin in improvement of acute lung injury

CHU Yingjie¹, LIU Xia¹, LI Qiqi¹, LI Junliang¹, YUAN Xinxin², WEI Sixian², WANG Yao^{1,3}

1. School of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

3. Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effects of acacetin on acute lung injury (ALI) base on the NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome and pyroptosis. **Methods** Male C57BL/6J mice were adaptively fed for one week and then randomly divided into control group, model group, and acacetin (40 mg·kg⁻¹) group. Except for control group, the mice in the other groups were ip with a lethal dose of lipopolysaccharide (LPS, 20 mg·kg⁻¹) to establish ALI mouse model, and the survival rate of the mice was examined. The mice in the other groups were ip with an inflammatory dose of LPS (10 mg·kg⁻¹) to establish the ALI mouse

收稿日期: 2024-11-20**基金项目:** 国家自然科学基金面上项目 (82474153); 北京中医药大学-优莎纳联合研究中心 (BURC) 基金重点项目 (BUCM-2022-JS-KF-003); 北京市科技新星计划课题 (20230484342); 北京市自然科学基金资助项目 (7242239); 中华中医药学会青年人才托举工程项目 (CACM-2023-QNRC2-A02)**作者简介:** 初英杰, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药抗炎免疫药理。E-mail: 20220931207@bucm.edu.cn***通信作者:** 王遥, 教授, 研究方向为中药免疫药理。E-mail: yaowang@bucm.edu.cn

model. The pathological changes of lung tissue were detected by hematoxylin-eosin (HE) staining. The expression of inflammation-related genes tumor necrosis factor (*Tnf*), interleukin (*Il*) 6, and *Il1b* in lung tissue was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). The expression of NLRP3 pathway-related proteins NLRP3 and gasdermin D (GSDMD) in lung tissue was detected by Western blotting. The level of IL-1 β in the peritoneal lavage fluid was detected by ELISA. Primary peritoneal macrophages were cultured *in vitro*. LPS was combined with adenosine triphosphate (ATP), nigericin (Nig), and gramicidin (Gram) to stimulate the activation of NLRP3 inflammasome. Acacetin (5, 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was added for co-culture. The expression levels of caspase-1, NLRP3, and GSDMD proteins were detected by Western blotting, and pyroptosis was observed by propidium iodide (PI)/Hoechst staining. **Results** 45 h after LPS 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ modeling, all mice in the model group died; The final survival rate of the acacetin group was 60%. Compared with LPS 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ model group, the structural damage of lung tissue in the acacetin group was significantly alleviated, the infiltration of inflammatory cells was significantly reduced, the thickening of alveolar walls was alleviated, and the lung tissue injury score was significantly decreased ($P < 0.001$); The mRNA expression of *Tnf*, *Il6*, and *Il1b* in lung tissue was significantly decreased ($P < 0.001$), and the level of IL-1 β in peritoneal lavage fluid was significantly decreased ($P < 0.001$); The expression levels of NLRP3 and GSDMD-NT proteins in lung tissue were significantly decreased ($P < 0.01, 0.001$). The *in vitro* experimental results showed that compared with the model group, the expression levels of NLRP3, GSDMD-NT, and Caspase-1 (p20) proteins in the acacetin group were significantly decreased ($P < 0.01, 0.001$), and the pyroptosis rate was significantly decreased ($P < 0.001$). **Conclusion** Acacetin has the potential to ameliorate lung injury and modulate the inflammatory response in ALI mice by suppressing the NLRP3 inflammasome and pyroptosis.

Key words: acacetin; acute lung injury; primary peritoneal macrophages; NLRP3 inflammasome; pyroptosis

急性肺损伤 (ALI) 是一种严重的临床疾病, 具有高发病率和死亡率^[1-2], 通常由多种内源或外源性因素引起, 其中内源性因素包括吸入性损伤、肺部感染等, 可直接引起肺泡病变, 而外源性因素则包括败血症、脓毒症等, 首先引起全身性炎症反应, 继而引起肺部炎症细胞浸润和肺泡病变。其特征包括肺泡上皮细胞及毛细血管内皮细胞损伤、中性粒细胞募集和强烈的肺部炎症反应, 并伴有广泛的肺实质损伤^[3]。当机体受到相应刺激时, NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 会募集前体形式的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (pro-Caspase-1) 和凋亡相关斑点样蛋白 (ASC), 形成 NLRP3 炎症小体, 活化后的炎症小体会将 Pro-Caspase-1 加工为成熟的 Caspase-1, 从而将消皮素 D (GSDMD) 切割成其活化形式 GSDMD-NT, 活化的 GSDMD-NT 会与细胞膜上的磷脂蛋白结合形成细胞孔洞, 释放大量的炎症因子, 产生细胞焦亡^[4], 从而触发严重的炎症反应, 诱发 ALI 的发生与进展^[5]。临床研究表明, NLRP3 炎症小体和白细胞介素 (IL) -1 β 、IL-18 等炎症因子在脓毒症 ALI 患者体内的表达水平显著增加^[6], 提示了 NLRP3 炎症小体在 ALI 发病机制中的重要作用。因此, NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路是 ALI 的潜在的重要靶点。

中医认为“热、毒”是贯穿 ALI 发生、进展的主要病机, 临床注重使用“清热解毒”的方剂进行治疗^[7]。在西医治疗 ALI 中则侧重原发性治疗, 总体

缺乏特效药物及方法。因此, 通过对“清热解毒”中药药效成分开展研究, 找寻高效低毒的潜在药物具有重要临床意义。金合欢素是一类天然的黄酮类化合物, 具有抗氧化和抗炎等特性^[8-9]。其广泛存在于多种传统药用植物中, 如菊花、天山雪莲、山薄荷等^[10-11], 这些中药皆具“清热解毒”功效。研究表明, 金合欢素通过抑制 Toll 样受体 4/核因子 κB (TLR4/NF- κB) 信号通路过度激活, 缓解溃疡性结肠炎小鼠的症状^[12]; 在脑缺血再灌注损伤模型中, 金合欢素的治疗可以有效减少小鼠脑组织中炎症因子的释放和炎症相关通路蛋白表达, 改善神经缺损^[13]。然而, 其抗炎分子机制, 特别是对 NLRP3 炎症小体激活的影响仍不明确。

本研究探讨金合欢素通过抑制 NLRP3 炎症小体与细胞焦亡改善 ALI 小鼠的肺部损伤以及炎症反应的新机制, 为其发展成为 ALI 治疗的候选药物提供参考。

1 材料

1.1 细胞

小鼠原代腹腔巨噬细胞 (PMs) 从小鼠腹腔灌洗液中分离 (具体方法见“2.2.1”项)。

1.2 动物

SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠, 体质量 18~20 g, 6~8 周龄, 购自斯贝福 (北京) 实验动物科技有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2019-0010。小鼠饲养于温度 18~22 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 50%~60%、

12 h 光暗交替的环境中, 自由进食饮水。所有动物实验和研究经北京中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号 BUCM-2024092403-3231), 并严格按照动物实验相关章程执行。

1.3 药品与主要试剂

金合欢素(质量分数 $\geq 98\%$, 批号 PS2012-0020)购自成都普思生物科技股份有限公司, 溶于二甲基亚砜(DMSO)配制成 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的药液, 储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用; DMSO(货号 D4540)购于 Sigma 公司; Evo M-MLV RT Kit(货号 AG11711)、SYBR®Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit(货号 AG11701)购于湖南艾科瑞生物工程有限公司; Trizol Reagent(货号 15596018), 购于 Invitrogen 公司; DMEM 高糖培养基(货号 C11995500CP)、青霉素-链霉素($10\,000\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, 货号 15140-122)、胎牛血清(FBS, 货号 2358184P)购于 Gibco 公司; CCK-8 细胞增殖-毒性检测试剂盒(货号 CK04)购于东仁化学科技(上海)有限公司; 0.25%胰蛋白酶/EDTA 细胞消化液(货号 T1300)购于北京索莱宝科技有限公司; 羊抗兔 IgG-HRP(货号 M21002)购于艾比玛特医药科技(上海)有限公司; 羊抗鼠 IgG-HRP(货号 GB23301)购于武汉赛维尔生物科技有限公司; 异氟烷(货号 R50-22-10)购于深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司; 超敏 ELC 发光液(货号 WBKLS0500)购于美国 Millipore 公司; NLRP3 抗体(货号 AG-20B-0014-C100)、Caspase-1 抗体(货号 AG-20B-0042)购于 Adipogen 公司; GSDMD 抗体(货号 ab210070)购于 Abcam 公司; β -肌动蛋白(β -actin)抗体(货号 60008-1-Ig)购于 Proteintech 公司; 脂多糖(LPS, 货号 L4391)、腺嘌呤核苷三磷酸(ATP, 货号 A6419)购于购自美国 Sigma 公司; 尼日利亚菌素(Nig, 货号 tlrl-nig)购于 InvivoGen 公司; 短杆菌肽(Gram, 货号 HY-P0163)购于 MCE 公司。鼠源 IL-1 β ELISA 检测试剂盒(货号 KE10003)购于 Proteintech 公司。

1.4 主要仪器

CFX96 荧光定量 PCR 仪、T100 型 PCR 仪、Power Pac 型基础电泳仪购于美国 BIO-RAD 公司; NanoDrop ONEC 型分光光度计、Sorvall™ Legend™ Micro 21R 微量离心机、1300 Series A2 型生物安全柜、Heracell 150i 型 CO₂ 培养箱购于美国 Thermo 公司; Spectra Max i3x 多功能酶标仪购于美谷分子仪器(上海)有限公司; Mill-Q 超纯水仪购于美国

Millipore 公司; Tanon 5200 系列全自动化学发光图像分析系统购于上海天能生命科学有限公司; SK-L180-Pro 数控线性摇床购于大龙兴创实验仪器股份公司; ZHCH-C1115B 型超净工作台购于上海智城分析仪器制造有限公司; CKX53 型倒置显微镜购于日本 Olympus 公司。

2 方法

2.1 体内实验

2.1.1 动物分组与造模^[14] 将雄性 C57BL/6J 小鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为对照组、模型组、金合欢素($40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 剂量依据参考文献报道^[15-17]及预试验确定)组, 每组 5 只。金合欢素组在 ip LPS 前连续 3 d ip 金合欢素, 对照组及模型组 ip 磷酸盐缓冲液(PBS), 造模后持续观察小鼠状态。其中小鼠生存率实验 LPS 的使用剂量为 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (致死剂量), 小鼠肺组织损伤评估实验 LPS 的使用剂量为 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (致炎剂量)。

2.1.2 肺组织病理学观察及评分 每组统一取小鼠的左肺组织于 4%多聚甲醛中固定, 脱水、透明、石蜡包埋, 制备组织切片, 切片厚度 $3\sim 5\text{ }\mu\text{m}$, 进行苏木素-伊红(HE)染色、封片后, 于显微镜下观察肺组织病理学变化, 并进行病理分析评分, 病理损伤评级如下: 小鼠肺组织损伤严重程度从 0~4 分进行评级, 评估内容包括肺实质组织紊乱、出血、肺泡腔的中性粒细胞浸润等。0 分代表未出现损伤, 1 分表示损伤 $<25\%$, 2 分表示 $25\%\leq$ 损伤 $\leq 50\%$, 3 分表示 $50\%<$ 损伤 $\leq 75\%$, 4 分表示损伤 $>75\%$ 。

2.1.3 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测金合欢素对小鼠肺组织炎症相关基因表达的影响 将小鼠肺组织置于 $500\text{ }\mu\text{L}$ 的 Trizol Reagent 中, 用匀浆机打成匀浆后提取肺组织 RNA, 然后反转录成 cDNA 进行 qRT-PCR 实验, 检测炎症基因的表达水平。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'→3')
肿瘤坏死因子 (Tnf)	F: CAGGCGGTGCCTATGTCTC R: CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG
Il6	F: CTGCAAGAGACTTCCATCCAG R: AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG
Il1b	F: CTGTGACTCATGGGATGATGATG R: CGGAGCCTGTAGTGCAGTTG
Actb (内参)	F: GTGACGTTGACATCCGTAAAGA R: GCCGGACTCATCGTACTCC

2.1.4 Western blotting 检测金合欢素对小鼠肺组织中 NLRP3 通路相关蛋白 NLRP3、GSDMD 表达的影响 将小鼠肺组织于 RIPA 裂解液中匀浆,冰上充分裂解 30 min, 4 °C 离心取上清, BCA 法测定蛋白浓度, 加入 5×Loading Buffer 100 °C 金属浴 10 min 使蛋白变性后进行 SDS-PAGE 电泳, 湿法转膜后 5%奶粉封闭 1 h, 于 4 °C 过夜孵育一抗, 室温孵育二抗 1 h 后显影。

2.1.5 ELISA 法检测小鼠腹腔中 IL-1 β 水平 于小鼠腹腔处剖一小口, 分批注入共 4 mL 洗液[含 0.01 g 牛血清蛋白 (BSA)、0.01 mL 0.5 mol·L⁻¹ 乙二胺四乙酸 (EDTA)、10 mL PBS], 吸出腹腔灌洗液 300×g 离心 5 min, 取上清按照试剂盒说明测定灌洗液中 IL-1 β 的水平。

2.2 体外实验

2.2.1 小鼠 PMs 的分离 小鼠 ip 2 mL 的 3%淀粉肉汤溶液, 2 d 后处死小鼠, 打开腹腔膜, 用 10 mL 洗液反复轻轻吹打并吸出灌洗液。4 °C、300×g 离心 10 min, 弃上清, 2 mL PBS 重悬后再加入 5 mL PBS, 4 °C、500×g 离心 5 min, 再次弃上清后, 使用 2 mL DMEM 完全培养基重悬, 细胞计数, 铺板。2~3 h 后, 换液去除未贴壁细胞, 剩余即为小鼠 PMs。

2.2.2 细胞活力测定 PMs 细胞以每孔 1.5×10^5 的密度接种于 96 孔板, 培养过夜使细胞完全贴壁; 用 DMEM 完全培养基配制 0 (对照)、1.25、2.50、5.00、10.00、20.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的金合欢素加入细胞中, 于 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱中培养; 24 h 后, 向每孔细胞加入 10 μL CCK-8 试剂孵育 30 min, 无细胞孔为空白孔, 使用酶标仪测定 450 nm 处吸光度 (A) 值, 计算细胞相对存活率。

$$\text{细胞相对存活率} = (A_{\text{药物}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2.3 Western blotting 检测金合欢素对 LPS 联合多种刺激^[18]诱导 PMs 细胞中 Caspase-1、GSDMD、NLRP3 蛋白表达的影响 12 孔板中以每孔 2×10^6 个密度接种 PMs 细胞, 培养过夜, 设置对照组、模型组和金合欢素低、中、高浓度 (5、10、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组, 各组按照 3 个阶段进行处理: 首先金合欢素组加入相应浓度药物预处理 4 h; 之后除对照组外, 其余各组加入 LPS (0.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 处理 4 h, 金合欢素组加入药物与 LPS 共孵育 4 h; 最后各组全换液, 除对照组外, 其余各组加入刺激剂处理 1 h (3 个实验分别加入 ATP 4 mmol·L⁻¹、Nig

10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、Gram 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。收集细胞, 加 IP 裂解液冰上充分裂解细胞 30 min, 后续步骤同“2.1.4”项。

2.2.4 碘化丙啶 (PI) /Hoechst 染色检测金合欢素对细胞焦亡的影响 12 孔板中以每孔 1×10^6 个密度接种 PMs 细胞, 培养过夜, 设置对照组、模型组、金合欢素 (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组, 按照“2.2.3”项中的刺激条件给予 LPS+ATP 刺激, 全换液后, 每孔中加入 2 μL PI 染色液 (2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和 2 μL Hoechst 染色液 (5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 避光染色 10 min, 在倒置荧光显微镜下观察并记录图像。使用 Image J 软件统计 PI 阳性细胞数。

2.3 数据处理

数据用 GraphPad Prism 9.0 进行可视化处理, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组样本间通过双尾非配对 t 检验进行比较, 多组样本间通过单因素方差分析进行比较。

3 结果

3.1 金合欢素对 ALI 小鼠生存率的影响

ip 致死剂量的 LPS 后, 模型组小鼠精神萎靡, 进食进水量减少, 呼吸急促, 眼周分泌白色脓状物, 毛发无光泽。如图 1-A 所示, 造模后 40 h, 模型组小鼠出现死亡情况, 造模后 45 h, 模型组小鼠全部死亡; 金合欢素组小鼠最终生存率为 60%, 表明金合欢素可以有效延长 ALI 小鼠的存活时间, 提高小鼠的生存率。

3.2 金合欢素对 ALI 小鼠肺组织病理形态的影响

如图 1-B 所示, 对照组小鼠肺组织结构完整, 肺泡壁薄, 间隙清晰, 未见明显炎症细胞浸润; 模型组小鼠肺泡壁厚度增加, 炎症细胞浸润与肺泡塌陷明显, 肺组织损伤评分较对照组显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 金合欢素组小鼠肺组织结构损伤得到显著缓解, 炎症细胞浸润明显减少, 肺泡壁增厚情况减轻, 且肺组织损伤评分显著降低 ($P < 0.001$)。

3.3 金合欢素对 ALI 小鼠肺组织炎症相关基因表达的影响

如图 2-A 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠肺组织 *Tnf*、*Il6*、*Il1b* 等炎症基因的表达明显上调 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 金合欢素组小鼠肺组织 *Tnf*、*Il6*、*Il1b* mRNA 表达显著下降 ($P < 0.001$)。表明金合欢素可以有效抑制 ALI 小鼠肺组织的炎症反应, 减轻 LPS 对小鼠肺部造成的损伤。

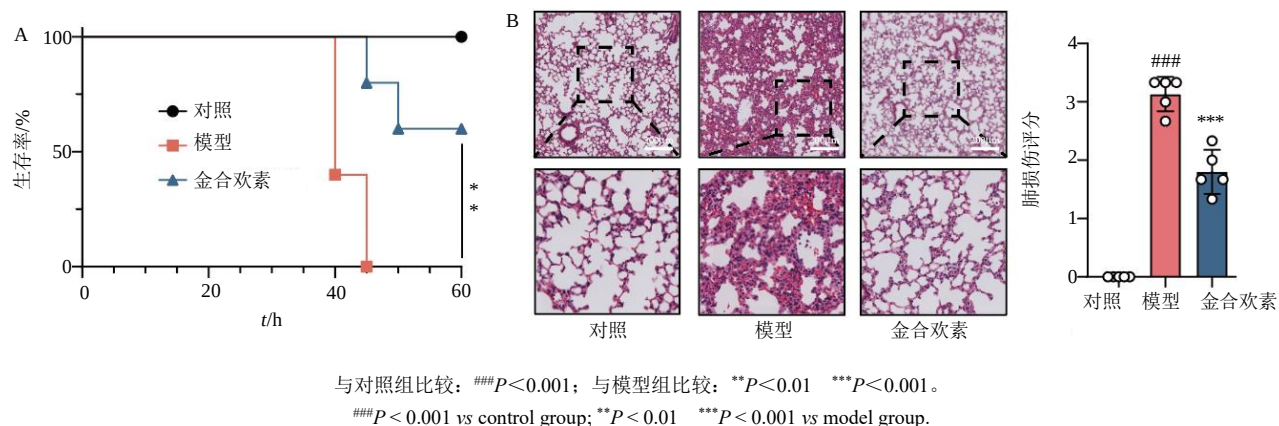


图 1 金合欢素对 ALI 小鼠生存率(A)和肺组织病理损伤(B)的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 1 Effect of acacetin on survival rate (A) and pathological damage of lung tissue (B) in ALI mice ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

3.4 金合欢素对 ALI 小鼠腹腔灌洗液中 IL-1 β 水平的影响

如图 2-B 所示,与对照组相比,模型组小鼠腹腔灌洗液中 IL-1 β 水平明显提高 ($P < 0.001$);与模型组相比,金合欢素组的小鼠腹腔中 IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.001$)。

著降低 ($P < 0.001$)。

3.5 金合欢素对 ALI 小鼠肺组织中 NLRP3 通路相关蛋白表达的影响

如图 2-C 所示,与对照组相比,模型组小鼠肺组织 NLRP3、GSDMD-NT 蛋白的表达水平显著升

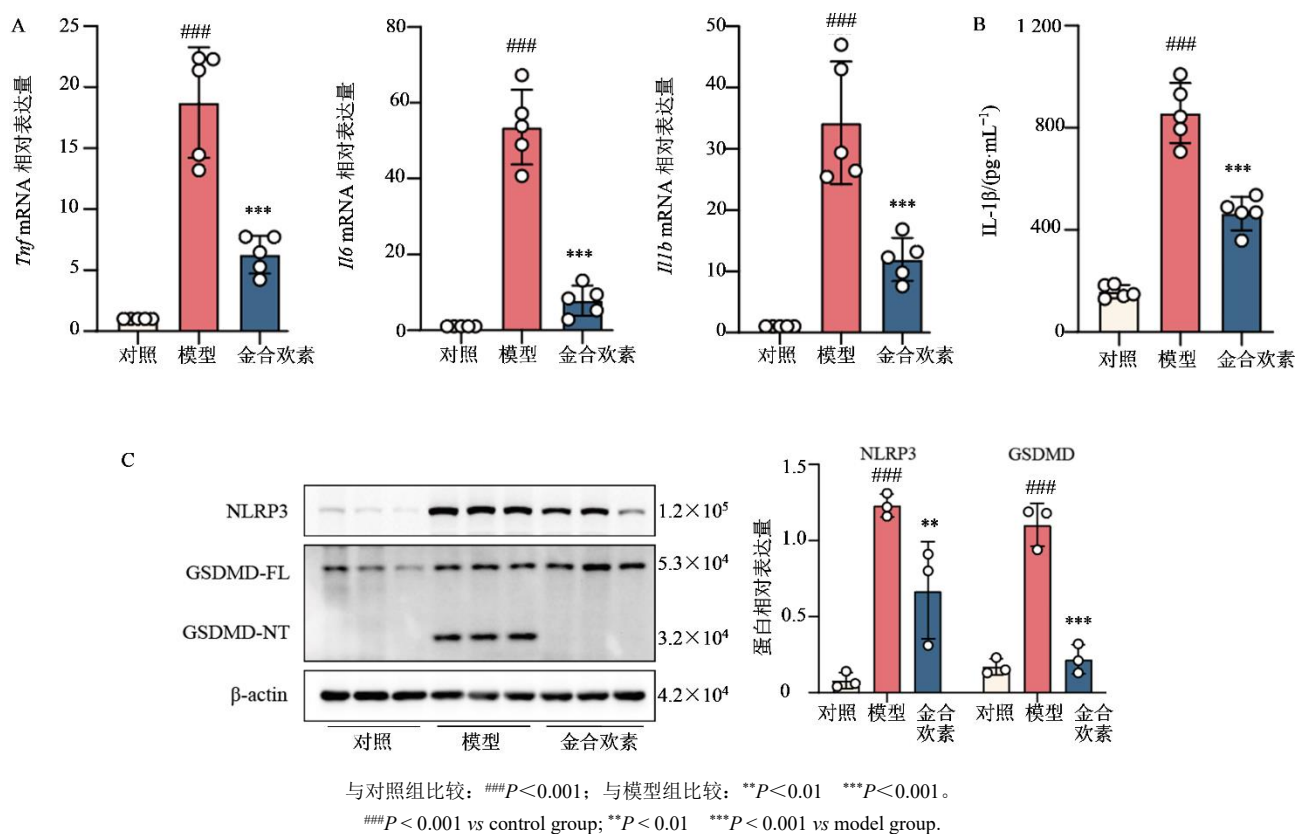


图 2 金合欢素对 ALI 小鼠肺组织炎症因子 mRNA 和 NLRP3、GSDMD 蛋白水平以及腹腔灌洗液中 IL-1 β 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 2 Effects of acacetin on mRNA of inflammatory factors, NLRP3 and GSDMD protein levels in lung tissue and IL-1 β levels in peritoneal lavage fluid of ALI mice ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 金合欢素组小鼠肺组织 NLRP3、GSDMD-NT 蛋白的表达水平明显降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

3.6 金合欢素对 PMs 细胞活力的影响

如图 3 所示, $0 \sim 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的金合欢素无明显的细胞毒性, 因此在后续实验中, 金合欢素的使用浓度选取在 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下。

3.7 金合欢素对 LPS 联合多种刺激诱导 PMs 细胞中 NLRP3 通路相关蛋白表达的影响

如图 4-A 所示, 与对照组相比, LPS 联合 ATP 刺激 PMs 细胞后, NLRP3、Caspase-1 (p20) 和 GSDMD-NT 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$),

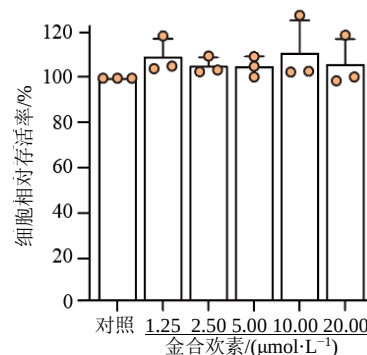
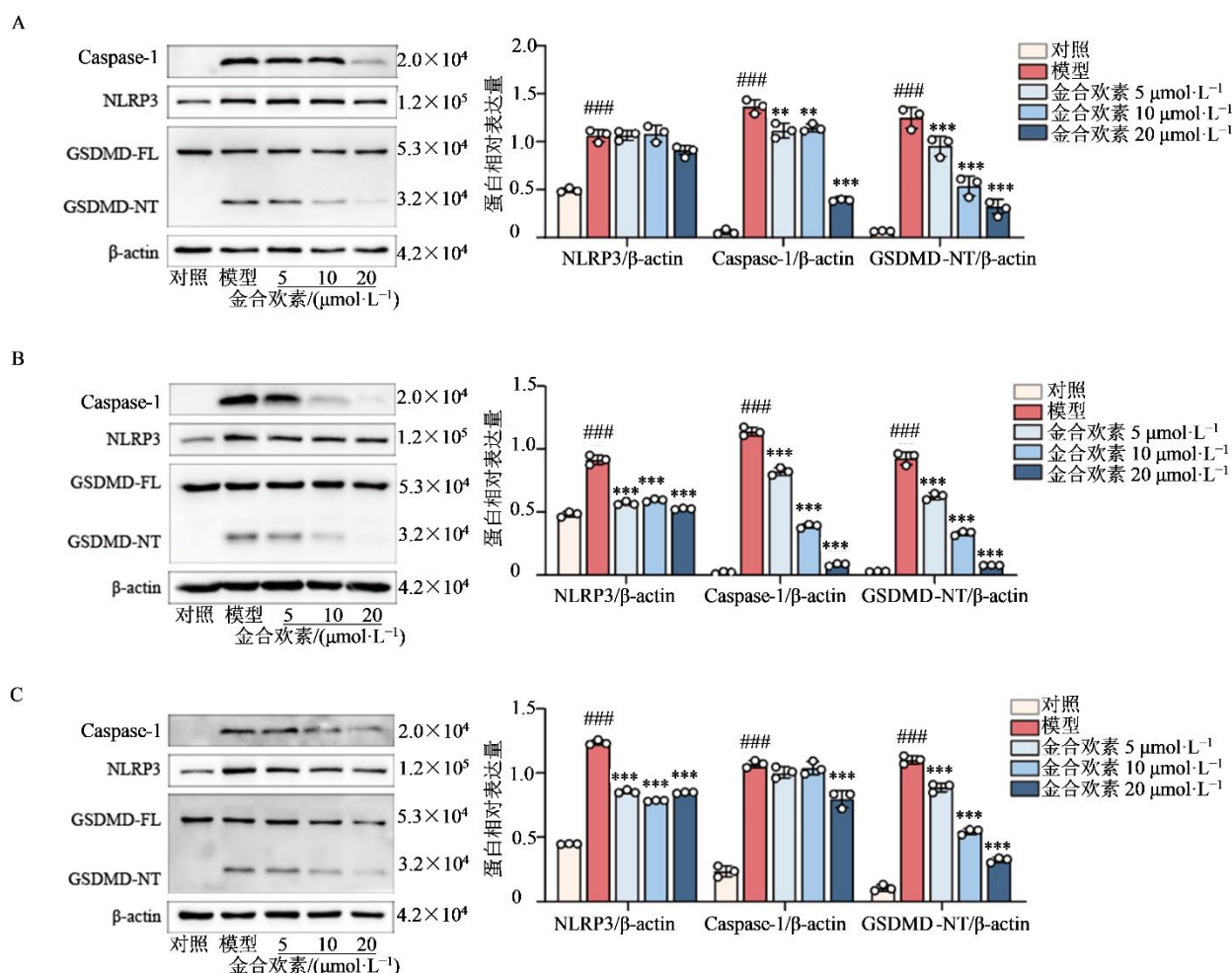


图 3 金合欢素对 PMs 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Effect of acacetin on survival rate of PMs cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



与对照组比较: $###P < 0.001$; 与模型组比较: $**P < 0.01$ $***P < 0.001$ 。

$###P < 0.001$ vs control group; $**P < 0.01$ $***P < 0.001$ vs model group.

图 4 金合欢素对 LPS 联合 ATP (A)、Nig (B)、Gram (C) 诱导 PMs 细胞 NLRP3 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 4 Effect of acacetin on expression of NLRP3 pathway-related proteins in PMs cells induced by LPS combined with ATP(A), Nig (B), and Gram(C) ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

与模型组相比,金合欢素组 Caspase-1 (p20) 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001), GSDMD-NT 蛋白的表达显著降低 ($P<0.001$)。

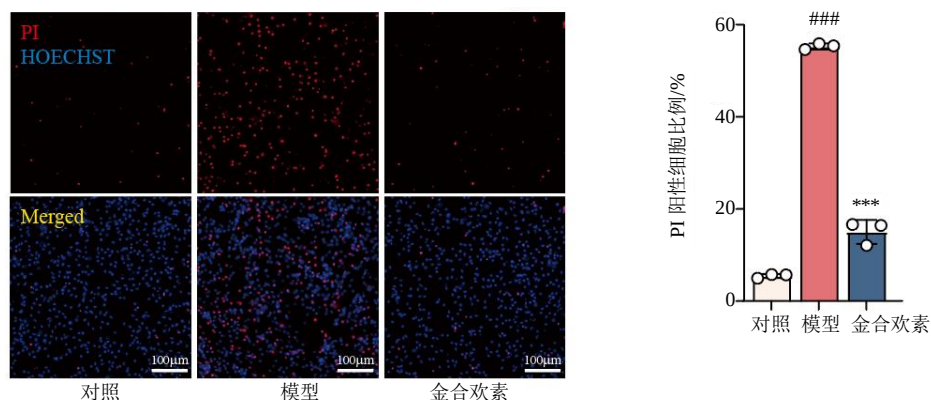
如图 4-B 所示,与对照组相比, LPS 联合 Nig 刺激后 PMs 细胞后, NLRP3、Caspase-1 (p20) 和 GSDMD-NT 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.001$), 与模型组相比,金合欢素低、中、高浓度组 NLRP3 和 Caspase-1 (p20) 蛋白表达均显著降低 ($P<0.001$)。

如图 4-C 所示,与对照组相比, LPS 联合 Gram 刺激 PMs 细胞后, NLRP3、Caspase-1 (p20) 和 GSDMD-NT 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.001$),

与模型组相比,金合欢素低、中、高浓度组 NLRP3 和 GSDMD-NT 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.001$), 金合欢素高浓度组 Caspase-1 (p20) 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.001$)。

3.8 金合欢素对 PMs 细胞焦亡的影响

NLRP3 炎症小体的过度激活会引起细胞焦亡,因此,通过 PI/Hoechst 双染色来评估细胞的死亡情况。如图 5 所示,与对照组相比, LPS 联合 ATP 刺激后, PMs 细胞中 PI 阳性的细胞比例显著增多 ($P<0.001$); 与模型组相比,金合欢素组 PI 阳性细胞的比例明显减少 ($P<0.001$), 结果表明金合欢素能显著抑制 NLRP3 介导的细胞焦亡。



与对照组比较: ### $P<0.001$; 与模型组比较: *** $P<0.001$ 。

$P<0.001$ vs control group; *** $P<0.001$ vs model group.

图 5 金合欢素抑制细胞焦亡 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Acacetin inhibits cell pyroptosis ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

4 讨论

ALI 是多种因素引起的一系列肺部病变,可发展为急性呼吸窘迫综合征 (ARDS),从而导致高死亡率^[19]。ALI 的具体发病机制还在不断完善,其中,炎症反应、凝血因素、氧化应激等都参与其发生与疾病进展^[20-21]。目前认为过度放大的炎症反应风暴是 ALI/ARDS 发生的重要机制^[22-23]。具体来说,肺组织中的炎症反应失调,会导致机体免疫反应过度激活,招募免疫细胞异常表达的促炎细胞因子,造成肺脏毛细血管内皮细胞及肺泡上皮细胞弥漫性损害,最终形成难治性低氧血症和呼吸衰竭^[24]。NLRP3 炎症小体是一种胞质多蛋白复合物,它作为机体固有免疫的一部分,可响应微生物感染、内源性危险信号和环境刺激,促进炎症因子的释放,这有助于先天免疫防御和稳态维持^[25]。然而, NLRP3 炎症小体的异常激活却与 ALI 的发病过程息息相关。研究表明,敲除 NLRP3 基因或者抑制 NLRP3

炎症小体活化可以缓解由不同诱导因素引起的 ALI,减轻炎症反应和组织损伤^[26-27]。

目前,多种天然来源的小分子药物已被证实可以通过抑制 NLRP3 炎症小体和细胞焦亡,发挥减轻 ALI 小鼠肺部损伤的作用^[28-30]。金合欢素作为菊花、山薄荷等清热解毒中药的活性成分,已被证明具有抗炎^[31]、抗氧化^[32]、心肌保护^[33]等作用。本研究发现金合欢素在动物水平可以改善 LPS 诱导的 ALI 小鼠的肺组织损伤,减轻肺部炎症反应,显著降低小鼠肺组织中 *Tnf*、*Il6* 等炎症基因的表达以及 NLRP3 炎症小体信号通路相关蛋白的表达,减少小鼠腹腔中促炎因子 IL-1 β 的释放,提高 ALI 小鼠的生存率;同时在细胞水平,金合欢素可以显著降低多种刺激诱导的 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路相关蛋白的表达,抑制 PMs 细胞焦亡。

金合欢素可以通过抑制 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 焦亡通路的激活,缓解炎症反应,保护

肺组织, 改善 ALI。本研究为金合欢素作为 ALI 的临床候选治疗药物提供参考, 为在治疗炎症性疾病中的药物研发提供科学数据支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hu Q, Zhang S, Yang Y, et al. Extracellular vesicles in the pathogenesis and treatment of acute lung injury [J]. *Mil Med Res*, 2022, 9(1): 61.
- [2] Mart M F, Ware L B. The long-lasting effects of the acute respiratory distress syndrome [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2020, 14(6): 577-586.
- [3] Bakowitz M, Bruns B, McCunn M. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in the injured patient [J]. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*, 2012, 20: 54.
- [4] Fu J N, Wu H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation [J]. *Annu Rev Immunol*, 2023, 41: 301-316.
- [5] Sun L C, Zhang H B, Gu C D, et al. Protective effect of acacetin on sepsis-induced acute lung injury via its anti-inflammatory and antioxidative activity [J]. *Arch Pharm Res*, 2018, 41(12): 1199-210.
- [6] Wu D D, Wang Y N, Zhang H, et al. Acacetin attenuates mice endotoxin-induced acute lung injury via augmentation of heme oxygenase-1 activity [J]. *Inflammopharmacology*, 2018, 26(2): 635-643.
- [7] 刘曼, 邵翔, 李玉婷, 等. 金合欢素对糖尿病肾病大鼠肾损伤及 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响 [J]. *药物评价研究*, 2023, 46(9): 1943-1948.
Liu M, Shao X, Li Y T, et al. Effect of acacetin on renal injury and TLR4/NF- κ B signaling pathway in diabetes nephropathy rats [J]. *Drug Eval Res*, 2023, 46(9): 1943-1948.
- [8] Liu Y H, Shang L R, Zhou J B, et al. Emodin attenuates LPS-induced acute lung injury by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis signaling pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. *Inflammation*, 2022, 45(2): 753-767.
- [9] 李应辉, 刘盛兰, 范铮, 等. 钙敏感受体介导的 NLRP3 炎症小体信号通路在脓毒症急性肺损伤患者中的作用机制 [J]. *南开大学学报(自然科学版)*, 2023, 56(5): 37-42.
Li Y H, Liu S L, Fan Z, et al. Mechanism of calcium-sensing receptor-mediated NLRP3 inflammasome signaling pathway in patients with sepsis and acute lung injury [J]. *Acta Sci Nat Univ Nankaiensis*, 2023, 56(5): 37-42.
- [10] 卢悦, 张平平, 王东强, 等. 急性肺损伤中医病因病机的探讨 [J]. *中国中医急症*, 2020, 29(2): 280-282.
- Lu Y, Zhang P P, Wang D Q, et al. Discussion on pathogenesis and pathogenesis of acute lung injury [J]. *J Emerg Tradit Chin Med*, 2020, 29(2): 280-282.
- [11] Pan M H, Lai C S, Wang Y J, et al. Acacetin suppressed LPS-induced up-expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages and TPA-induced tumor promotion in mice [J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 72(10): 1293-1303.
- [12] Wu W Y, Li Y D, Cui Y K, et al. The natural flavone acacetin confers cardiomyocyte protection against hypoxia/reoxygenation injury via AMPK-mediated activation of Nrf2 signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 497.
- [13] Chen S, Liu J, Dong G Q, et al. Flavonoids and caffeoylquinic acids in *Chrysanthemum morifolium* Ramat flowers: A potentially rich source of bioactive compounds [J]. *Food Chem*, 2021, 344: 128733.
- [14] Ji W T, Zhang X T, Sang C, et al. Punicalin attenuates LPS-induced acute lung injury by inhibiting inflammatory cytokine production and MAPK/NF- κ B signaling in mice [J]. *Heliyon*, 2023, 9(4): e15434.
- [15] Gong G, Huang J, Yang Y, et al. *Saussureae involucratae* herba (snow Lotus): Review of chemical compositions and pharmacological properties [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1549.
- [16] Ren J, Yue B, Wang H, et al. Acacetin ameliorates experimental colitis in mice via inhibiting macrophage inflammatory response and regulating the composition of gut microbiota [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 577237.
- [17] Bu J, Shi S, Wang H Q, et al. Acacetin protects against cerebral ischemia-reperfusion injury via the NLRP3 signaling pathway [J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(4): 605-612.
- [18] Song H, Liu B Y, Huai W W, et al. The E3 ubiquitin ligase TRIM31 attenuates NLRP3 inflammasome activation by promoting proteasomal degradation of NLRP3 [J]. *Nat Commun*, 2016, DOI: 10.1038/ncomms13727.
- [19] Liang L, Peng W J, Qin A P, et al. Intracellularly synthesized artificial exosome treats acute lung injury [J]. *ACS Nano*, 2024, 18(32): 21009-21023.
- [20] Sweeney R M, McAuley D F. Acute respiratory distress syndrome [J]. *Lancet*, 2016, 388(10058): 2416-2430.
- [21] 张茂福, 张志明, 宋忠阳, 等. 中药调控氧化应激防治急性肺损伤的研究进展 [J]. *中草药*, 2024, 55(9): 3190-3201.
Zhang M f, Zhang Z m, Song Z y, et al. Research progress on the regulation of oxidative stress by traditional Chinese

- medicine in the prevention and treatment of acute lung injury [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2024, 55(9): 3190-3201.
- [22] Li X L, Huang R M, Liu K F, et al. Fucoxanthin attenuates LPS-induced acute lung injury via inhibition of the TLR4/MyD88 signaling axis [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 13(2): 2655-2667.
- [23] Scozzi D, Liao F Y, Krupnick A S, et al. The role of neutrophil extracellular traps in acute lung injury [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 953195.
- [24] Burkard P, Schonhart C, Vögtle T, et al. A key role for platelet GPVI in neutrophil recruitment, migration, and NETosis in the early stages of acute lung injury [J]. *Blood*, 2023, 142(17): 1463-1477.
- [25] Huang Y, Xu W, Zhou R B. NLRP3 inflammasome activation and cell death [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(9): 2114-2127.
- [26] He D K, Xu N, Shao Y R, et al. NLRP3 gene silencing ameliorates phosgene-induced acute lung injury in rats by inhibiting NLRP3 inflammasome and proinflammatory factors, but not anti-inflammatory factors [J]. *J Toxicol Sci*, 2020, 45(10): 625-637.
- [27] Ren M, Chen J H, Xu H W, et al. Ergolide covalently binds NLRP3 and inhibits NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 120: 110292.
- [28] Shao J J, Li W F, Sun J F, et al. Britannin as a novel NLRP3 inhibitor, suppresses inflammasome activation in macrophages and alleviates NLRP3-related diseases in mice [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2024, 45(4): 803-814.
- [29] 兰悦嘉, 孟宪丽, 吴嘉思. 黄芩素调控 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路介导的焦亡减轻小鼠急性肺损伤作用 [J]. *中草药*, 2023, 54(20): 6694-6703.
- Lan Y J, Meng X L, Wu J S. Baicalein alleviates acute lung injury in mice by regulating NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway mediated pyroptosis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(20): 6694-6703.
- [30] 崔淦, 李琦, 舒方方, 等. 三七总皂苷通过抑制 NF- κ B 转录活性改善 LPS 诱导小鼠急性肺损伤的研究 [J]. *药学报*, 2022, 57(12): 3587-95.
- [31] Singh S, Gupta P, Meena A, et al. Acacetin, a flavone with diverse therapeutic potential in cancer, inflammation, infections and other metabolic disorders [J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 145: 111708.
- [32] Song F, Mao Y J, Hu Y, et al. Acacetin attenuates diabetes-induced cardiomyopathy by inhibiting oxidative stress and energy metabolism via PPAR- α /AMPK pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 922: 174916.
- [33] Liu H, Yang L, Wu H J, et al. Water-soluble acacetin prodrug confers significant cardio protection against ischemia/reperfusion injury [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 36435.

[责任编辑 兰新新]