

NLRP3/GSDMD 介导的细胞焦亡在痛风性关节炎中的调控机制

梁淼雨, 徐晓敏, 王 宇, 耿 欣, 于纯淼, 卢 芳, 刘树民, 于栋华*

黑龙江中医药大学 中医药研究院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘 要: **目的** 探究 NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体介导的细胞焦亡在痛风性关节炎 (GA) 中的调控机制。**方法** 通过 GeneCards 数据库筛选 GA 相关靶点, GSEA 数据库检索细胞焦亡相关靶点, 借助 STRING 平台构建交集基因的蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 预测 GA 中细胞焦亡相关作用机制; 将 96 只 SPF 级雄性大鼠适应性喂养 1 周后, 分 2 批 (每批 48 只), 每批随机分为对照组、模型组、MCC950 (NLRP3 抑制剂, 2、4、8、10 mg·kg⁻¹) 组或 LDC7559 (消皮素 D (GSDMD) 抑制剂, 2、4、8、10 mg·kg⁻¹) 组, 每组 8 只。除对照组外, 其余各组大鼠均通过右后肢踝关节注射尿酸钠 (MSU) 构建 GA 大鼠模型, 以大鼠血清中白细胞介素-1 β (IL-1 β) 含量及关节组织中 IL-1 β mRNA 及蛋白表达水平为指标, 筛选 2 种抑制剂的最佳作用剂量; 另取 32 只 SPF 级雄性大鼠随机分为对照组、模型组、MCC950 (8 mg·kg⁻¹) 组、LDC7559 (4 mg·kg⁻¹) 组, 除对照组外, 其余各组均采用上述相同方法构建 GA 模型。计算各组大鼠关节肿胀度; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色法观察关节组织病理变化; 全自动生化分析仪测定大鼠血清尿酸 (SUA)、肌酐 (SCr)、尿素氮 (BUN) 含量; 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测大鼠血清 IL-1 β 、IL-8、TNF- α 水平; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测大鼠关节组织中凋亡相关斑点样蛋白 (ASC)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-1 (Caspase-1)、NLRP3、GSDMD、IL-1 β 的 mRNA 表达; Western blotting 检测大鼠关节组织中 NLRP3、GSDMD、消皮素 D-N 端 (GSDMD-N)、IL-1 β 、白细胞介素 1 β 前体 (pro-IL-1 β)、Caspase-1、半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1 前体 (pro-Caspase-1)、ASC 蛋白表达水平; 免疫共沉淀 (COIP) 法验证 NLRP3 与 GSDMD 的结合情况。明确最佳抑制剂剂量干预下 NLRP3/GSDMD 介导的细胞焦亡在 GA 中的调控机制。**结果** 网络药理学分析显示, 共筛选得到 352 个 GA 作用靶点、60 个细胞焦亡作用靶点及 14 个交集基因, 核心靶点与 NOD 样受体通路密切相关; MCC950、LDC7559 的最佳剂量分别为 8、4 mg·kg⁻¹。与对照组相比, MSU 诱导的 GA 模型大鼠右后肢踝关节及足底均发生不同程度的红肿、发热, 关节滑膜重度增厚, 结缔组织增生, 伴新生血管形成及淋巴细胞、中性粒细胞浸润, 关节腔内可见坏死细胞碎片; 血清 SUA、SCr、BUN 及 IL-1 β 、IL-8、TNF- α 水平均显著升高 ($P < 0.01$), 关节组织中 NLRP3、GSDMD、ASC、Caspase-1、IL-1 β 等焦亡关键基因及蛋白表达均显著上调 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 提示 GA 急性发作时 NOD 样受体通路激活并诱发焦亡; 经 MCC950 或 LDC7559 干预后, NLRP3 炎症小体的活化被抑制, GSDMD、ASC、Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达降低; 且抑制 GSDMD 激活后 NLRP3 蛋白表达也显著下调; COIP 结果证实, NLRP3 与 GSDMD 具有紧密的互作关系。**结论** NLRP3/GSDMD 通路可通过调控细胞焦亡参与 GA 疾病进程, 为 GA 的治疗提供潜在靶点。

关键词: NLRP3/GSDMD 信号轴; 焦亡; 网络药理学; 痛风性关节炎; 消皮素 D; NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体
中图分类号: R684.3; R329.25 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)12-3538-13

DOI:10.7501/j.issn.1674-6376.2025.12.012

Regulatory mechanism of NLRP3/GSDMD-mediated pyroptosis in gouty arthritis

LIANG Miaoyu, XU Xiaomin, WANG Yu, GENG Xin, YU Chunmiao, LU Fang, LIU Shumin, YU Donghua

Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: **Objective** To explore the regulatory mechanism of NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome-mediated pyroptosis in gouty arthritis (GA). **Methods** GA-related targets were screened through the GeneCards database, and pyroptosis-related targets were retrieved from the GSEA database. The protein-protein interaction (PPI) network of the intersection genes was constructed with the STRING platform to predict the mechanism of pyroptosis in GA. Ninety-six SPF male rats were adaptively fed for one week and then divided into two batches (48 rats each). Each batch was randomly divided into a control group, a model group,

收稿日期: 2025-07-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82074149); 黑龙江省自然科学基金资助项目 (PL2024H242)

作者简介: 梁淼雨 (2001—), 硕士研究生, 研究方向为中药药性理论及药效物质基础。E-mail: 15776343006@163.com

*通信作者: 于栋华, 博士, 副教授, 研究方向为中药药性理论及药效物质基础。E-mail: yudonghua1015@163.com

MCC950 (NLRP3 inhibitor, 2, 4, 8, 10 mg·kg⁻¹) groups or LDC7559 [(Gasdermin D (GSDMD) inhibitor, 2, 4, 8, 10 mg·kg⁻¹) groups, with 8 rats in each group. Except for the control group, the other groups were injected with sodium monosulfate (MSU) into the right hind ankle joint to establish the GA rat model. The content of interleukin-1 β (IL-1 β) in rat serum and the expression levels of IL-1 β mRNA and protein in joint tissues were used as indicators to screen the optimal doses of the two inhibitors. Another 32 SPF male rats were randomly divided into a control group, a model group, an MCC950 (8 mg·kg⁻¹) group, and an LDC7559 (4 mg·kg⁻¹) group. Except for the control group, the other groups were also established with the same method as above. The degree of joint swelling in each group was calculated. The pathological changes of joint tissues were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The contents of serum uric acid (SUA), creatinine (SCr), and blood urea nitrogen (BUN) in rats were determined by an automatic biochemical analyzer. The levels of IL-1 β , IL-8, and TNF- α in rat serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA expressions of apoptosis-associated speck-like protein (ASC), *Caspase-1*, *NLRP3*, *GSDMD*, and *IL-1 β* in rat joint tissues were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). The protein expressions of NLRP3, GSDMD, Gasdermin D-N-terminal (GSDMD-N), IL-1 β , pro-IL-1 β , *Caspase-1*, pro-*Caspase-1*, and ASC in rat joint tissues were detected by Western blotting. The binding of NLRP3 and GSDMD was verified by co-immunoprecipitation (COIP). The regulatory mechanism of NLRP3/GSDMD-mediated pyroptosis in GA under the optimal inhibitor dose was clarified. **Results** Network pharmacological analysis showed that a total of 352 GA-related targets, 60 pyroptosis-related targets, and 14 intersection genes were screened, and the core targets were closely related to the NOD-like receptor pathway. The optimal doses of MCC950 and LDC7559 were 8 and 4 mg·kg⁻¹, respectively. Compared with the control group, the right hind ankle joint and plantar of the MSU-induced GA model rats showed varying degrees of redness, swelling, and fever, with severe thickening of the synovium, connective tissue hyperplasia, accompanied by neovascularization and infiltration of lymphocytes and neutrophils, and necrotic cell debris were visible in the joint cavity. The levels of serum SUA, SCr, BUN, IL-1 β , IL-8 and TNF- α were all significantly increased ($P < 0.01$), and the expressions of key pyroptosis-related genes and proteins such as NLRP3, GSDMD, ASC, *Caspase-1* and IL-1 β in joint tissues were significantly upregulated ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), suggesting that the NOD-like receptor pathway was activated and pyroptosis was induced during the acute attack of GA. After intervention with MCC950 or LDC7559, the activation of NLRP3 inflammasome was inhibited, and the expressions of GSDMD, ASC, *Caspase-1* and IL-1 β proteins were decreased. Moreover, the expression of NLRP3 protein was also significantly downregulated after inhibiting GSDMD activation. COIP results confirmed that NLRP3 and GSDMD have a close interaction. **Conclusion** The NLRP3/GSDMD pathway can participate in the disease process of GA by regulating GA cell pyroptosis, providing a potential target for the treatment of GA.

Key words: NLRP3/GSDMD signaling axis; pyroptosis; network pharmacology; gouty arthritis; GSDMD; NLRP3

痛风性关节炎 (GA) 是由尿酸钠 (MSU) 晶体在关节内沉积介导的炎症性关节疾病^[1]。当患者血液中尿酸浓度超过溶解度阈值、达到过饱和状态时, MSU 晶体会在软骨、滑膜及关节周围组织中沉积, 持续刺激关节滑膜并触发一系列病理级联反应, 最终引发关节局部的炎症反应^[2]。目前, GA 的患病率在全球范围内呈显著上升趋势, 疾病发作时关节及周围组织会出现典型的红、肿、热、痛症状, 严重干扰患者的日常生活与工作^[3], 已成为受到全球医疗系统广泛关注的公共卫生问题。同时, 相关研究证实^[4], 细胞焦亡与 GA 的发病机制密切相关, 其可通过激活 NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体、促进炎症因子释放等途径, 在 GA 的病理进程中发挥关键作用。已有研究表明, MCC950 是一种有效的 NLRP3 炎症小体抑制剂^[5]。LDC7559 作为消皮素 D (GSDMD) 抑制剂, 可抑制 GSDMD 活

化^[6]。基于此, 本研究以细胞焦亡为理论核心, 深入探究 GA 的发病机制, 旨在为疾病的防治提供理论支撑。

细胞焦亡是一种具有炎症效应的程序性细胞死亡方式, 主要分为经典的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (*Caspase-1*) 依赖型与非经典的 *Caspase-4/5/11* 依赖型 2 类^[7-11]。其中, 经典途径与 NLRP3 炎症小体的激活密切相关: 当病原体相关分子模式 (PAMPs) 或损伤相关分子模式 (DAMPs) 与炎症小体感受器结合并激活后, 会诱导 *Caspase-1* 募集形成大分子复合物; 复合物形成后 *Caspase-1* 被激活, 进而催化白细胞介素-1 β 前体 (pro-IL-1 β) 和白细胞介素-18 前体 (pro-IL-18) 裂解, 促使成熟的白细胞介素-1 β (IL-1 β) 与白细胞介素-18 (IL-18) 释放, 最终启动细胞焦亡^[12]。此外, GSDMD 作为 *Caspase-1*、4、5、11 的共有底物, 是触发细胞焦亡的关键执

行分子^[13]：在焦亡过程中^[14-15]，GSDMD 可被活化的 Caspase-1 或 Caspase-4/5/11 剪切，产生具有成孔活性的氨基末端片段（GSDMD-N）；该片段会定位于细胞质膜及线粒体膜，与磷脂酰肌醇磷酸盐（PIPs）、磷脂酰丝氨酸（PS）、心磷脂（CL）等酸性脂质结合并寡聚形成环状结构，插入磷脂双分子层后形成跨膜大孔道；此孔道可导致 IL-1 β 、IL-18 等炎症细胞因子及细胞内容物释放，最终引发细胞膜破裂与细胞焦亡^[16]。

在 GA 的病理发展过程中，关节内沉积的 MSU 晶体可直接诱导 NLRP3 炎症小体过度激活，进而促使 Caspase-1 活化；活化的 Caspase-1 不仅能促进 pro-IL-1 β 成熟，还可剪切 GSDMD 的氨基末端（GSDMD-N）与羧基末端（GSDMD-C）之间的连接区域，破坏其结构完整性，最终导致细胞膜孔道形成与细胞焦亡发生^[17-19]。基于上述机制，本研究以 NLRP3 炎症小体及焦亡执行蛋白 GSDMD 为核心切入点，探究 2 者在 GA 相关细胞焦亡中的调控作用。

网络药理学作为整合生物信息学、化学信息学与系统生物学的研究技术，通过大数据分析通过网络可视化手段开展药物研发相关研究^[20]；其以“疾病-基因-药物-靶点”相互作用网络为基础，从整体视角解析靶蛋白与疾病的关联，系统揭示靶蛋白对疾病网络的调控效应。因此，本研究通过网络药理学预测 GA 焦亡发生的关键途径，以 MSU 诱导的 GA 模型大鼠为研究对象，并给予通路抑制剂—NLRP3 抑制剂/GSDMD 抑制剂进一步阐明 GA 细胞焦亡的机制。

1 材料

1.1 仪器

TDZ5-WS 型台式离心机，湖南湘仪实验室仪器开发有限公司；FA2004 型电子天平，中国天马股份有限公司；EclipseCi-L 型全自动生物显微镜，日本丹吉尔公司；Gamma1-16 型冻干机，德国 marin christ 公司；ZMN-7803 型全自动组织包埋机，常州市华利电子有限责任公司；Chemray360 型全自动生化分析仪，雷度米特医疗设备上海有限公司；ZMN-6802 病理组织漂烘仪，常州市华利电子有限责任公司；R139 型轮转切片机、EM AC20 型全自动染色机、CV5030 型全自动封片机、DM2000 LED 型显微镜，ASP 6025 S 型全自动脱水机，徕卡显微系统上海贸易有限公司；FRESCO 17 型台式高速冷冻离心机、A28132 型实时荧光定量 PCR 检测系统，赛

默飞世尔科技公司；ClinxChemiScope 6000 型化学发光仪，上海勤翔科学仪器有限公司；ELx800 型酶标仪，美国伯腾仪器有限公司；DYY-7C 型电泳仪电源、DYCZ-24DN 型双垂直电泳仪，北京六一生物科技有限公司；eBlotTmL1 型快速转膜仪，金斯瑞生物科技有限公司；TS-8 型水平脱色摇床，海门其林贝尔仪器制造有限公司。

1.2 试剂

MSU（批号 J2122579），上海阿拉丁生化科技股份有限公司；聚山梨酯 80（批号 20200205），天津市富宇精细化工有限公司；戊巴比妥钠（批号 20190112），天津市大茂化学试剂厂；二甲基亚砜（DMSO，批号 RNBG8041），西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司；3%双氧水，长沙华康消毒剂厂；4%多聚甲醛组织固定液（批号 P0099）、RIPA 强裂解液（批号 P0013B）、BCA 蛋白浓度测定试剂盒（批号 P0012）、超敏 ECL 化学发光试剂盒（批号 P0018S）、Cy3 标记山羊抗兔 IgG（H+L）（批号 A0516）、Cy3 标记山羊抗小鼠 IgG（H+L）（批号 A0521）均购于上海碧云天生物技术有限公司；苏木精-伊红（HE）染色液（批号 BA4025），珠海贝索生物技术有限公司；冰醋酸（批号 A35-500），上海国药集团化学试剂有限公司；大鼠血清尿酸（SUA）检测试剂盒（批号 C012-2-1）、大鼠血清肌酐（SCr）检测试剂盒（批号 C011-2-1）、大鼠血清尿素氮（BUN）检测试剂盒（批号 C013-1-1）、大鼠血清 IL-1 β 检测试剂盒（批号 20201208）、大鼠血清 IL-8 检测试剂盒（批号 20201113）、大鼠血清肿瘤坏死因子（TNF）- α 检测试剂盒（批号 20211025）均购于南京建成生物工程研究所；PVDF 膜（批号 IPVH00010），密理博中国有限公司；RIPA 裂解液（批号 AJG1896A）、反转录试剂盒（批号 ALG2222A），实时荧光定量聚合酶链式反应（qRT-PCR）试剂盒（批号 CJAN611），日本 TaKaRa 公司；抗体：GSDMD-N（批号 ab219800）、pro-Caspase-1（批号 ab179515），艾博抗（上海）贸易有限公司；IL-1 β （批号 bs-0812R），北京博奥森生物技术有限公司； β -actin（批号 66009-1-Ig），武汉三鹰生物技术有限公司；Anti-Rabbit IgG（H+L）Antibody、Peroxidase-Labeled（批号 074-1506）、Anti-Mouse IgA+IgG+IgM（H+L）Antibody，Human Serum Adsorbed and Peroxidase-Labeled（批号 074-1807），上海拜礼生物公司。LDC7559（GSDMD 抑制剂，

批号 HYC000032330)、MCC950 (NLRP3 抑制剂, 批号 HYBG00058535), 上海皓元生物医药科技有限公司; 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4)、柠檬酸缓冲液 (pH 6.0), 广州安恺立生物科技有限公司; FITC 标记山羊抗兔 IgG (批号 GB22303)、FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG (批号 GB22301), 武汉赛维尔生物科技有限公司; NLRP3 抗体 (批号 DF7438)、GSDMD 抗体 (批号 DF13758), 江苏亲科生物研究中心有限公司。

1.3 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠, 体质量 (200 ± 20) g, 动物由黑龙江中医药大学实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (黑) 2015-004, 大鼠饲养于温度 $20 \sim 25$ °C, 湿度为 40%~60% 的环境中。实验动物给予标准饲料和自由饮水, 并获得黑龙江中医药大学伦理委员会批准, 批准编号 DXLL2019081601。

1.4 细胞

THP-1 细胞由普拉特泽生物公司提供。

1.5 实验所用数据库及软件

通用蛋白质数据库 UniProt (<https://www.uniprot.org/>); 在线人类孟德尔遗传数据库 OMIM (<https://omim.org/>); 蛋白质互作平台 STRING V 11.0 (<https://string-db.org/>); 生物学信息注释数据库 DAVID V 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>); 网络拓扑属性分析软件 Cytoscape 3.7.2 (<http://cytoscape.org/>); GSEA 数据库 (<https://www.gsea-msigdb.org>)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 GA 焦亡发生的靶点 运用 GeneCards、OMIM 数据库, 以 “gouty arthritis” 为检索词检索疾病相关的靶点; 采用 GSEA 数据库, 以 “pyroptosis” 为关键词检索焦亡关键靶点, 将疾病靶点与焦亡靶点取交集得到共同靶点即为 GA 焦亡发生过程中的相关靶点, 并利用 venny 2.1 在线平台绘制韦恩图。

2.1.2 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络的构建 将上述 “2.1.1” 得到的关键靶点信息导入 STRING 数据库, 获得潜在靶点之间的相互联系。利用 Cytoscape 3.7.2 软件进行可视化分析, 构建 PPI 互作网络。

2.1.3 基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全

书 (KEGG) 通路富集分析 采用 R 语言中 clusterProfiler 程序包对共有的靶标进行 GO 分类富集分析和 KEGG 通路富集分析, 对应的核心靶蛋白直接映射到通路上, 核心靶点富集的通路即为 GA 焦亡发生的关键通路, 并绘制气泡图。

2.2 炎症小体抑制剂最佳给药剂量的筛选

2.2.1 MCC950 给药剂量的筛选

(1) MSU 溶液的制备: 精密称取 MSU 1.25 g, 置于 45 mL 0.9% 氯化钠溶液中, 加入 5 mL 聚山梨酯 80, 加热搅拌, 配制质量浓度为 $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。

(2) MCC950 溶液的制备: 精密称取 MCC950 10 mg, 溶解于 100 mL 的 0.9% 氯化钠溶液^[21], 配制质量浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。

(3) 造模、分组与给药: 48 只 SD 大鼠分成 6 组, 每组 8 只。分别为对照组、模型组、MCC950 (2、4、8、10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组。除对照组外, 其余各组大鼠右后肢踝关节后侧沿跟腱内侧以 $30^\circ \sim 40^\circ$ 方向, 关节腔内注入 0.2 mL MSU 溶液, 以关节囊对侧鼓起为注入标准^[22], 对照组于同一部位注射 0.9% 氯化钠溶液, 各组均连续造模 7 d, 造模第 5 天开始给药, 各给药组均按对应剂量每日 1 次尾 iv 给药, 模型组 iv 等量 0.9% 氯化钠溶液, 连续 3 d。

2.2.2 LDC7559 给药剂量的筛选

(1) LDC7559 溶液的制备: 精密称取 LDC7559 10 mg, 溶解于 100 mL 的 0.9% 氯化钠溶液, 配制质量浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。

(2) 造模、分组与给药: 48 只 SD 大鼠分成 6 组, 每组 8 只。分别为对照组、模型组、LDC7559 (2、4、8、10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组。造模及给药方法同 “2.2.1 (3)” 项下方法。

2.2.3 样品的收集与处理 给药结束后, 采用 3% 戊巴比妥钠麻醉大鼠, 腹主动脉采血, 室温下自然凝血 1 h, $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、4 °C、离心 15 min 分离血清; 采血完毕后, 取大鼠踝关节组织, 10% 多聚甲醛固定后备用, 其余冻存。

2.2.4 ELISA 法检测大鼠血清 IL-1 β 含量 取血清 50 μL , 按试剂盒操作说明书操作。

2.2.5 qRT-PCR 检测各组大鼠踝关节组织中 IL-1 β mRNA 表达水平 取踝关节滑膜组织, 采用 Trizol 法提取总 RNA, 反转录进行 cDNA 合成, 以 GAPDH 为内参, 检测大鼠关节组织中 IL-1 β mRNA 表达水平。引物由大连宝生物公司合成 (表 1), 反应条件

表 1 PCR 引物序列
Table 1 PCR primer sequences

引物	引物序列 (5'→3')
<i>GAPDH</i>	F: CACCCACTCCTCCACCTTTG R: CCACCACCCTGTTGCTGTAG
<i>GSDMD</i>	F: GCCAGAAGAAGACGGTCACCATC R: TTCGCTCGTGGAACGCTTGTTG
<i>ASC</i>	F: TGGAGTCGTATGGCTTGAG R: TGTCTTCAGTCAGCACACT
<i>NLRP3</i>	F: AGTAGGCTCTCCATCCATT R: TCTGTCTGTCTGTCTGTCT
<i>Caspase-1</i>	F: TGCTACGCTCCGAATCTA R: GTTCCACATCTGACTTAGGT
<i>IL-1β</i>	F: TCTTTGAAGTTGACGGACCC R: TGAGTGATACTGCCTGCCTG

为: 95 °C 预热 30 s, 95 °C 变性 5 s、60 °C 退火 31 s, 40 个循环, 95 °C 扩增 15 s。结果通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行相对定量。

2.2.6 Western blotting 法检测各组大鼠踝关节 IL-1β 蛋白水平的表达 参照 BCA 试剂盒说明书进行蛋白浓度的测定。样品制备, 取 20 μg 的样本加入到 loading buffer 中进行混匀, 在 95 °C 进行加热变性 5 min。计算含 20 μg 蛋白的溶液体积, 即为上样量。用 1×loading buffer 补至每个加样孔的总体积一致, 在浓缩胶电压为 80 V, 40 min, 分离胶电压 120 V, 30~50 min 条件下电泳。电泳结束后, 将胶取下, 根据预染 Marker 相对分子质量范围, 剪切目的表达区域, PVDF 膜预先浸泡甲醇 5 min, 再进行转膜, 条件为 350 mA, 转膜时间为 1 h。将 PVDF 膜放入封闭液中, 室温条件下封闭 1 h。把封闭后的 PVDF 膜置于一抗中, 4 °C 条件下孵育过夜。一抗孵育结束后, PBST 洗膜 5 次, 每次间隔 5 min。加入 HRP 标记的二抗, 常温孵育 1 h 振荡孵育。孵育结束后用 PBST 洗膜 5 次, 每次间隔 5 min。曝光结束后保存并导出图片。

2.3 NLRP3/GSDMD 介导 GA 诱导细胞焦亡的机制验证

2.3.1 造模、分组及给药 32 只大鼠随机分为对照组、模型组、MCC950 (8 mg·kg⁻¹) 组、LDC7559 (4 mg·kg⁻¹) 组, 造模及给药同“2.2.1 (3)”项下方法。

2.3.2 样品的收集与处理 同“2.2.3”项下方法。

2.3.3 大鼠关节肿胀度的测量 采用缚线法在造模前及造模后 6、12、24、72、120、168 h 测量大鼠右侧踝关节周长 (单次测量 3 次取平均值), 计算

关节肿胀度。

关节肿胀度 = 测试时间点的大鼠踝关节周长 - 大鼠踝关节原始周长

2.3.4 大鼠踝关节滑膜组织病理学检测 取各组大鼠踝关节滑膜组织, 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 4 μm, HE 染色、封片后, 于显微镜下观察组织病理学变化。

2.3.5 大鼠血清 SUA、SCr、BUN 水平的检测 取“2.3.2”项下分离的血清 50 μL, 采用全自动生化分析仪测定血清 SUA、SCr、BUN 含量; 剩余血清于 -80 °C 超低温冰箱冻存, 用于后续指标的检测。

2.3.6 大鼠血清 IL-1β、IL-8、TNF-α 水平的检测 取“2.3.2”项下分离的血清 50 μL, 按试剂盒操作说明书操作。

2.3.7 qRT-PCR 法检测各组大鼠踝关节组织中 ASC、Caspase-1、NLRP3、GSDMD、IL-1β 的 mRNA 表达水平 取“2.3.2”项下大鼠踝关节滑膜组织, 采用 Trizol 法提取总 RNA, 反转录进行 cDNA 合成, 以 GAPDH 为内参, 检测大鼠踝关节组织中 ASC、Caspase-1、NLRP3、GSDMD、IL-1β 的 mRNA 表达水平。引物由大连宝生物公司合成 (表 1), 反应条件为: 95 °C 预热 30 s, 95 °C 变性 5 s、60 °C 退火 31 s, 40 个循环, 95 °C 扩增 15 s。结果通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行相对定量。

2.3.8 Western blotting 法检测各组大鼠踝关节中 NLRP3、GSDMD、GSDMD-N、IL-1β、pro-IL-1β、Caspase-1、pro-Caspase-1、ASC 蛋白水平的表达 同“2.2.6”项下方法。

2.4 免疫共沉淀

将 THP-1 细胞经超声 (80 W、20 kHz) 5 min 破碎后离心取上清, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测上清中蛋白浓度; 取洁净 EP 管, 每管加入 5 μL 经 1×PBST 缓冲液 (3 000 r·min⁻¹, 重复清洗 6 次以除杂) 清洗后的蛋白 A+蛋白 G 磁珠, 再按 1 μg·mg⁻¹ 蛋白的比例加入对应目标蛋白的特异性抗体, 每组同时设对照管, 加入与特异性抗体同物种的免疫球蛋白 G 抗体以排除非特异性结合干扰。另取洁净 EP 管, 加入 2×十二烷基硫酸钠上样缓冲液, 取少量上述离心后的细胞上清液直接加入制样 (作为输入样品, 用于验证蛋白是否成功提取), 剩余上清全部加入前述免疫沉淀用管; 将免疫沉淀用管置于旋转混合仪, 4 °C 旋转孵育过夜, 孵育后用 1×PBST 缓冲液清洗磁珠, 弃上清并加入 1×十二烷基

基硫酸钠上样缓冲液制样, 最终将免疫沉淀样品与输入样品一同进行蛋白质印迹法检测并分析结果。

2.5 统计学处理

数据均采用 SPSS26.0 软件进行分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA); 依据方差齐性结果采用不同的检验方法, 若方差齐则采用 LSD 法检验, 若不齐则采用 Dunnett's T3 法检验; 计数资料则采用 χ^2 方检验或非参数检验, 以 $P < 0.05$ 为统计学有显著差异。

3 结果

3.1 网络药理学分析结果

3.1.1 GA 与细胞焦亡发生的关键靶点 利用网络药理学方法筛选得到 352 个 GA 作用靶点和 60 个细胞焦亡作用靶点, 运用 UniProt 数据库对预测到的靶点信息格式进行标准化, 将上述二者所得靶点用 Venny 2.1 获得 14 个交集基因 (图 1), 导入 STRING 数据库, 获得潜在靶点之间的相互联系。利用 Cytoscape 3.7.2 软件对 STRING 数据库的蛋白质相互作用分析结果进行可视化分析, 构建 PPI 网络图, 得到 13 个节点 (图 2), 并按度值大小提取核心靶标, 筛选出 GA 焦亡发生过程中排名前 6 位的核心靶点为: Caspase-1、IL-1 β 、TNF- α 、NLRP3、IL-6、IL-18。

3.1.2 GO、KEGG 通路富集分析 将 6 个核心靶点导入 DAVID 6.8 在线数据库, 以 $P < 0.05$ 为条件, 共筛选得到 144 个条目, 其中生物过程 (BP) 条目 122 个, 细胞组分 (CC) 条目 11 个, 分子功能 (MF) 条目 11 个, 根据 P 值大小, 选取排名前 10 的条目绘制气泡图 (图 3)。利用 KEGG 将关键靶蛋白映射至通路, 以 $P < 0.05$ 为筛选条件, 通路富集分析得到 47 条通路; 以 fold enrichment 和 P 值为指标, 选择 count 排名前 20 的通路绘制气泡图 (图 4)。相关研究表明, NOD 样受体属于模式识别受体, 参与机体固有免疫^[23], 且与 GA 焦亡的发生密切相关。

3.2 炎症小体抑制剂最佳给药剂量筛选结果

3.2.1 各组大鼠血清 IL-1 β 含量测定结果 IL-1 β 是 GA 炎症发作的核心效应因子, 也是 NLRP3 炎症小体激活后的关键下游功能分子, 本研究通过检测其血清水平筛选抑制剂的最佳作用浓度, 结果见图 5。与对照组相比, 模型组大鼠血清 IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.01$); 相较于模型组, MCC950 组及 LDC7559 不同剂量 (2、4、8 mg·kg⁻¹) 组的血清 IL-1 β 水平平均显著回调 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。其中, MCC950 以 8 mg·kg⁻¹ 剂量的作用效果最佳,

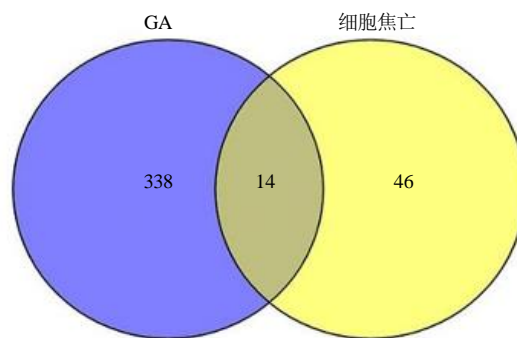


图 1 韦恩图

Fig. 1 Venn diagram

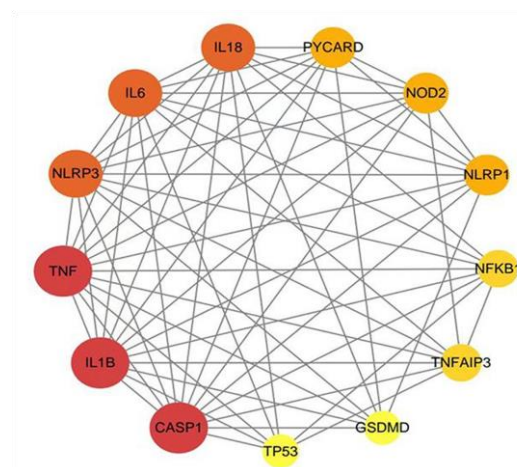


图 2 PPI 网络图

Fig. 2 PPI network diagram

LDC7559 则以 4 mg·kg⁻¹ 剂量的效果最优。

3.2.2 炎症小体抑制剂对 GA 模型大鼠关节组织 IL-1 β 基因和蛋白表达的影响 结果见图 6, 与对照组相比, 模型组大鼠关节组织中 IL-1 β mRNA 及蛋白水平均显著升高 ($P < 0.01$ 、0.001); 相较于模型组, MCC950 组、LDC7559 (2、4、8 mg·kg⁻¹) 组大鼠关节组织中 IL-1 β mRNA 显著回调 ($P < 0.01$ 、0.001), MCC950 (4、8、10 mg·kg⁻¹) 组、LDC7559 (2、4 mg·kg⁻¹) 组大鼠关节组织中 IL-1 β 蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.05$ 、0.001)。其中 MCC950 组以 8 mg·kg⁻¹ 剂量组效果最优, LDC7559 组以 4 mg·kg⁻¹ 剂量组效果最优, 因此在后续实验中, MCC950、LDC7559 的剂量分别选取为 8、4 mg·kg⁻¹。

3.3 NLRP3/GSDMD 介导 GA 诱导细胞焦亡的机制验证结果

3.3.1 大鼠踝关节肿胀度的测量 如图 7 所示, 造模结束后, 各组大鼠右后肢踝关节及足底均发生不同程度的红肿、发热现象, 其中以模型组大鼠肿胀现

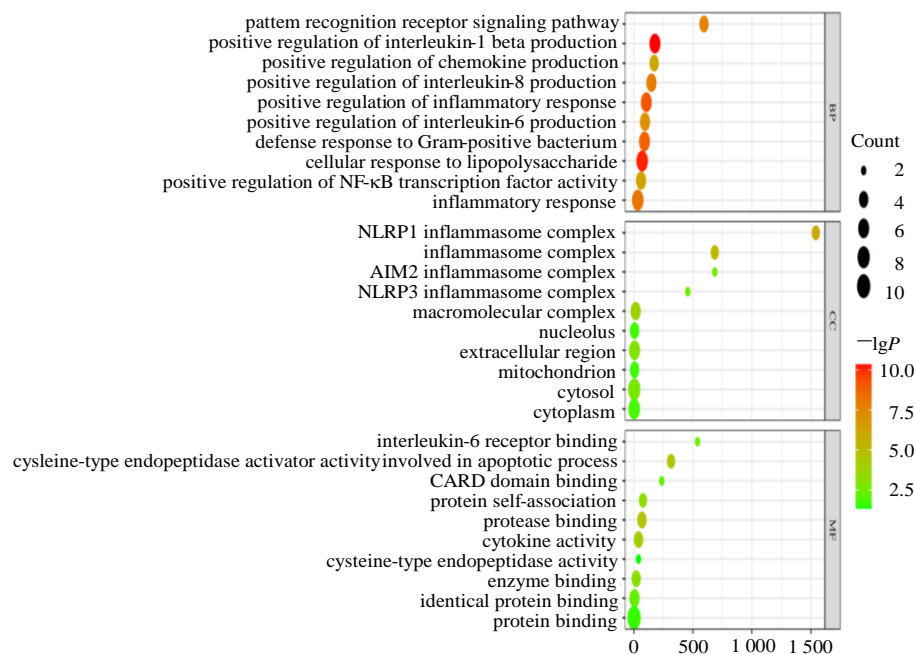


图 3 GO 富集分析结果

Fig. 3 GO enrichment analysis results

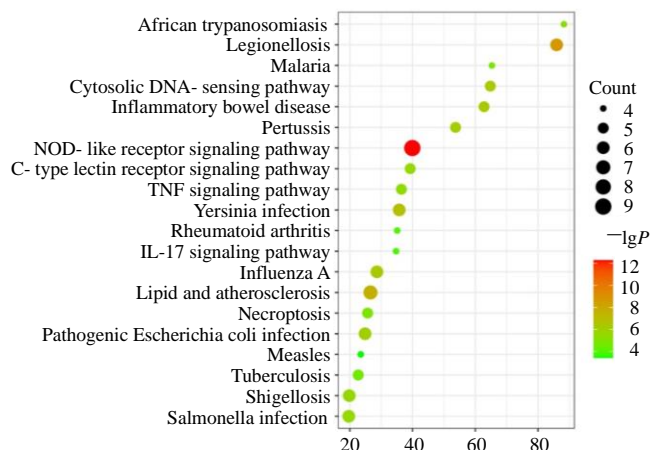
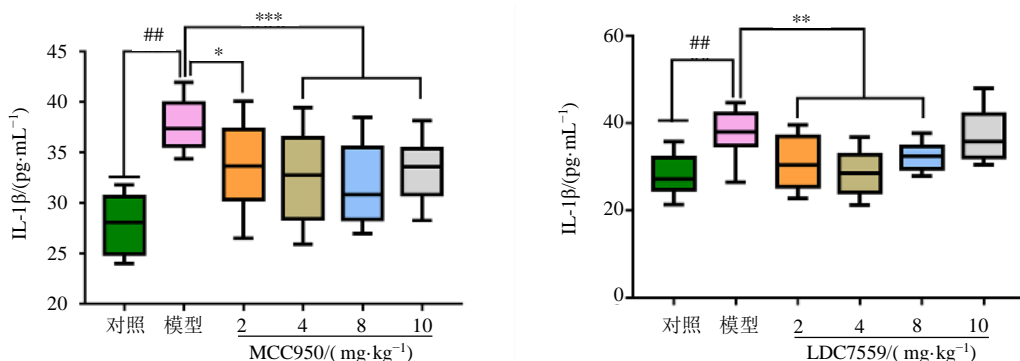


图 4 KEGG 通路富集分析结果

Fig. 4 KEGG enrichment analysis results



与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图 5 炎症小体抑制剂对模型大鼠血清 IL-1 β 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 5 Effects of inflammasome inhibitors on serum IL-1 β in model rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

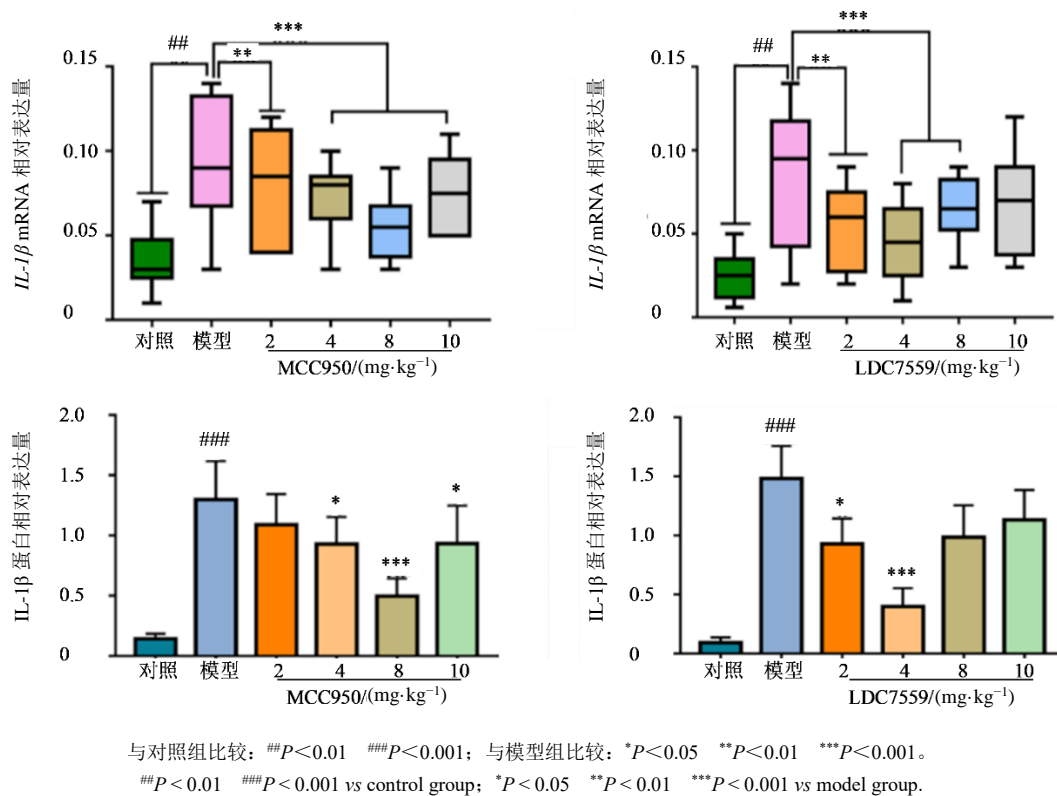


图 6 炎症小体抑制剂对模型大鼠关节组织 IL-1 β 基因和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 6 Effect of inflammasome inhibitors on expression of IL-1 β gene and protein in joint tissues of model rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

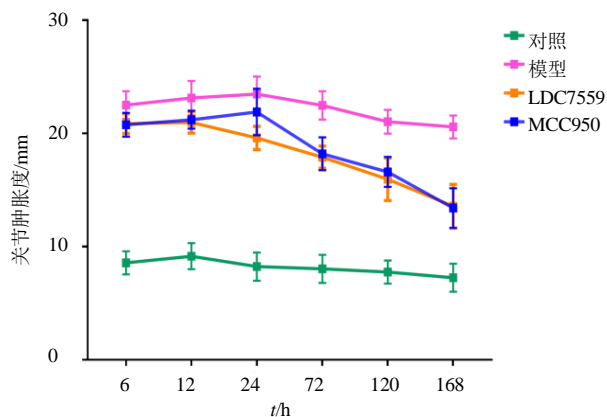


图 7 大鼠关节肿胀度变化趋势 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 7 Trend of Changes in joint swelling degree of rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

象最为显著,造模 1 d 内肿胀程度呈加重趋势,在第 1 d 结束前后右后肢肿胀达到峰值。造模 1~7 d,模型组肿胀程度略呈下降趋势,与模型组相比,各抑制剂组大鼠关节肿胀度呈下降趋势。

3.3.2 HE 染色观察大鼠踝关节滑膜组织病理学变化 各组大鼠踝关节组织病理学观察结果如图 8 所示,对照组关节结构完整,软骨表面光滑平整,软骨细胞形态正常。与对照组比较,模型组关节一侧滑膜重度增厚,大面积结缔组织增生,伴有大量新生血管,大量淋巴细胞与中性粒细胞浸润,关节腔可见较大的坏死细胞碎片;与模型组比较, MCC950 组关节一侧滑膜局部可见少量点状的淋巴细胞浸润; LDC7559 组关节一侧滑膜局部可见轻度

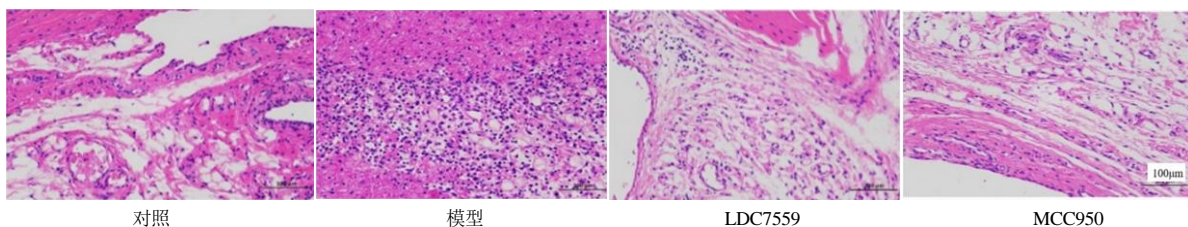


图 8 大鼠踝关节组织病理学观察 ($\times 400$)

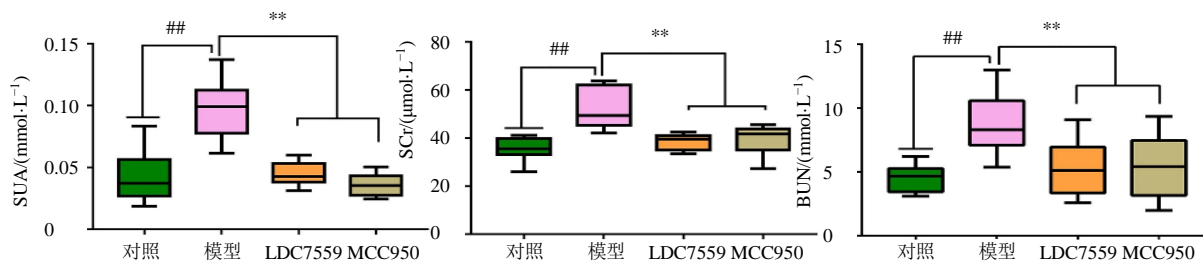
Fig. 8 Rats ankle histopathological observation ($\times 400$)

的结缔组织增生,并伴有少量的淋巴细胞浸润。

3.3.3 GA 模型大鼠血清 SUA、SCr、BUN 的含量测定 如图 9 所示,与对照组相比,模型组的血清 SUA、SCr、BUN 含量显著增高 ($P<0.01$),表明造模成功;相较于模型组,各抑制剂组血清 SUA、SCr、BUN 水平均不同程度的显著降低 ($P<$

0.01)。

3.3.4 GA 模型大鼠血清炎症因子的含量测定 如图 10 所示,与对照组相比,模型组的血清 IL-1 β 、IL-8 和 TNF- α 水平显著增加 ($P<0.01$),提示造模成功;相较于模型组,各炎症小体抑制剂组血清 IL-1 β 、IL-18 和 TNF- α 水平均显著降低 ($P<0.01$)。

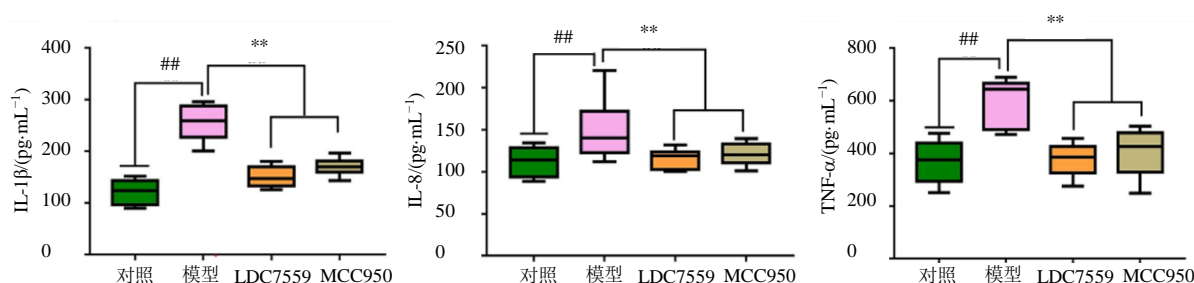


与对照组比较: ## $P<0.01$; 与模型组比较: ** $P<0.01$ 。

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

图 9 炎症小体制剂对 GA 模型大鼠血清生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 9 Effects of inflammatory microsphere preparations on serum biochemical indicators in GA model rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)



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

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

图 10 炎症小体制剂对 GA 模型大鼠血清炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 10 Effect of inflammatory microsphere preparations on levels of serum inflammatory factors in GA model rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

3.3.5 qRT-PCR 法检测各组大鼠踝关节中 NLRP3、GSDMD、IL-1 β 、Caspase-1、ASC mRNA 水平 如图 11 所示,与对照组相比,模型组大鼠关节组织中 NLRP3、GSDMD、IL-1 β 、Caspase-1、ASC mRNA 水平显著升高 ($P<0.01$ 、0.001);相较于模型组,各抑制剂组均能显著降低 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β mRNA 表达水平 ($P<0.05$ 、0.01、0.001)。结果表明 2 个抑制剂均对焦亡蛋白具有显著抑制作用。

3.3.6 Western blotting 法检测各组大鼠踝关节中 NLRP3、GSDMD、GSDMD-N、IL-1 β 、pro-IL-1 β 、Caspase-1、pro-Caspase-1、ASC 蛋白水平的表达

如图 12 所示,相较于对照组,模型组 NLRP3、ASC、Caspase-1、pro-Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N、IL-1 β 、pro-IL-1 β 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$ 、0.001),提示模型组存在焦亡发生;与模型组相比,各抑制剂组上述蛋白的表达水平均显著降低 ($P<0.01$ 、0.001),表明抑制剂可通过抑制 NLRP3 炎症小体的组装,进而减少 pro-Caspase-1 的剪切活化,抑制炎症因子的释放,最终发挥抑制焦亡发生的作用。

3.4 免疫共沉淀

如图 13 所示, NLRP3 与 GSDMD 存在紧密的互作关系,提示 2 者可能通过直接相互作用参与调控。

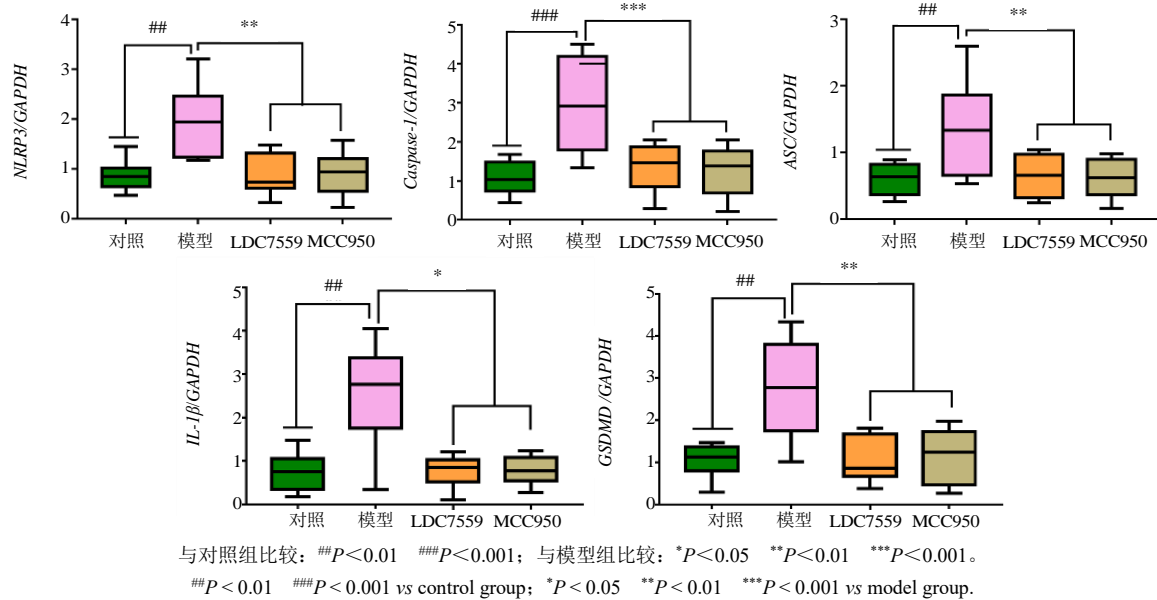
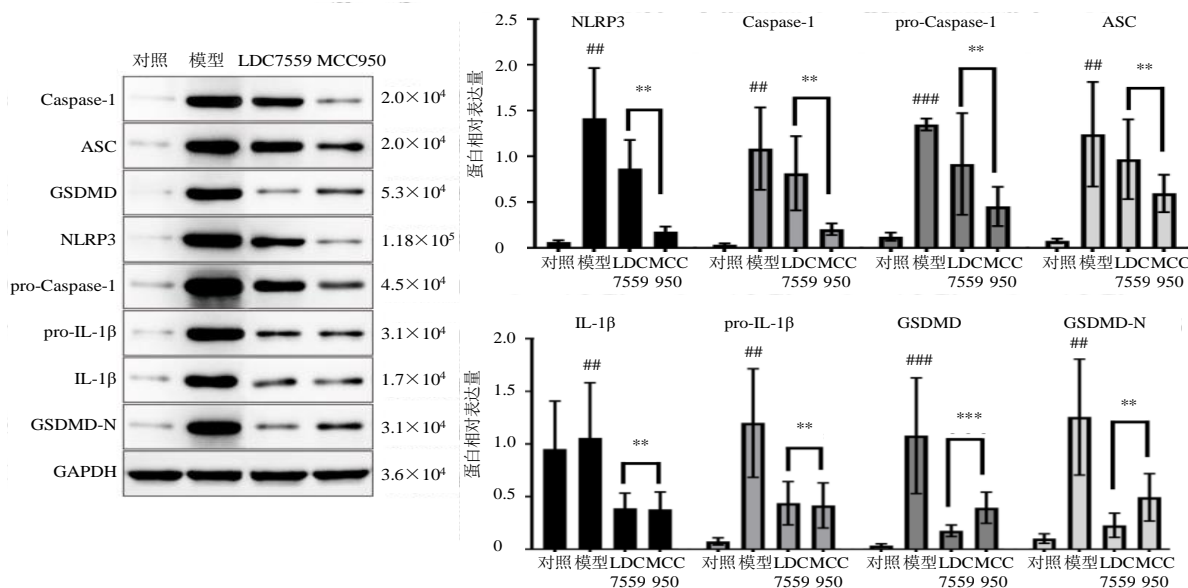
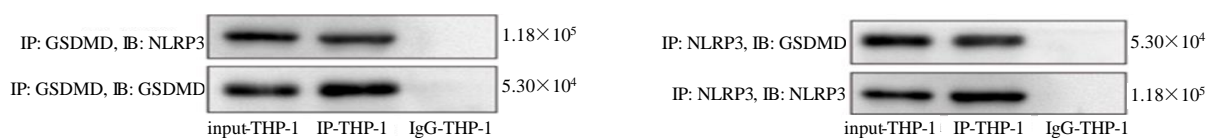
图 11 炎症小体制剂对 GA 模型大鼠关节组织炎症因子 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Fig. 11 Effect of inflammatory cell preparation on mRNA of inflammatory factors in joint tissues of GA model rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)图 12 炎症小体制剂对 GA 模型大鼠关节组织 NLRP3、ASC、Caspase-1、pro-Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N、IL-1β、pro-IL-1β 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Fig. 12 Effects of inflammatory microenvironment formulation on protein expression levels of NLRP3, ASC, Caspase-1, pro-Caspase-1, GSDMD, GSDMD-N, IL-1β, and pro-IL-1β in joint tissues of GA model rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

图 13 NLRP3/GSDMD 免疫共沉淀

Fig. 13 NLRP3/GSDMD co-immunoprecipitation

4 讨论

网络药理学预测结果显示, GA 焦亡发生时 NOD 样受体通路被激活, NOD 样受体是一个近年在炎症反应中发现的胞浆蛋白家族, 是固有免疫系统对病原体的一类重要感受器, 它们广泛参与识别 PAMPs 和 DAMPs, 产生相应的炎症应答反应, NOD 样受体通路炎症小体密切相关, 而炎症小体的形成是细胞焦亡的生化特征物质^[24]。NLRP3 炎症小体是由 NOD 样受体家族成员 NLRP3、ASC、Caspase-1 组装形成的蛋白复合物, 来自环境或宿主的各种因素均可激活 NLRP3 炎症小体, 导致焦亡并释放促炎因子的分泌。本实验拟通过 MSU 诱导的 GA 大鼠模型探究 NLRP3/GSDMD 信号轴在焦亡中的调控机制, 为 GA 的防治提供新思路。

MSU 作为内源性危险信号分子, 可被机体固有免疫系统通过模式识别受体 (PRR) 识别为危险信号。NLRP3 蛋白 C 端的亮氨酸重复序列 (LRR) 在识别 MSU 等危险信号后发生构象变化并活化, 暴露出核苷酸结合寡聚化结构域 (NACHT), 通过 ATP 依赖的聚合作用形成有序的 NLRP3 寡聚体; 随后, NLRP3 通过其热蛋白结构域 (PYD) 募集 ASC 和 Caspase-1, 组装形成炎症小体^[25-27]。其中, ASC 作为 NLRP3 炎症小体的双重衔接蛋白, 可通过桥梁作用连接 NLRP3 与 Caspase-1 前体, 最终形成具有酶活性的 Caspase-1 异二聚体。作为炎症小体的效应蛋白, Caspase-1 能将无活性的 pro-IL-1 β 和 IL-18 前体剪切为成熟的 IL-1 β 和 IL-18^[28]。

基于上述机制, 本实验采用 NLRP3 炎症小体抑制剂 MCC950 及焦亡执行蛋白 GSDMD 抑制剂 LDC7559, 进一步探究其作用机制。结果显示: 在 MSU 晶体诱导的 GA 大鼠模型中, 大鼠关节肿胀度显著增加, 滑膜存在严重炎症并伴有明显中性粒细胞浸润; 血清中 SUA、SCr、BUN 及 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 水平显著升高; 踝关节组织中 ASC、Caspase-1、NLRP3、GSDMD、IL-1 β 、pro-IL-1 β 、pro-Caspase-1 的蛋白表达水平亦显著上调。上述结果提示, MSU 刺激可促使 NLRP3 通过 PYD 结构域招募 ASC 和 Caspase-1 前体, 激活 NLRP3 炎症小体; 活化的 Caspase-1 一方面将 pro-IL-1 β 剪切为成熟 IL-1 β , 另一方面剪切 GSDMD 使其 N 端暴露, 进而引发细胞膜打孔及炎症因子释放, 最终诱导焦亡发生并导致关节炎症反应。

抑制剂干预后, 各抑制剂组均能显著降低模型

大鼠踝关节肿胀度、缓解病理损伤、降低炎症因子水平; 其作用机制可能为通过抑制 ASC 与 pro-Caspase-1 的组装, 阻断 NLRP3 炎症小体活化, 从而抑制 Caspase-1 对 IL-1 β 及 GSDMD 的剪切, 最终抑制焦亡发生, 这与 Hao 等^[29]的研究结果一致。本研究还发现, GSDMD 抑制组除下游的 GSDMD、GSDMD-N、IL-1 β 、pro-IL-1 β 表达降低外, NLRP3 的表达亦受影响; 这与 Wang 等^[30]提出的“GSDMD 的氧化可激活 NLRP3”的结论相符。为进一步验证二者的互作关系, 本实验通过免疫共沉淀检测发现, NLRP3 与 GSDMD 存在密切互作; 且抑制 NLRP3 表达可显著降低 GSDMD 及 GSDMD-N 的表达, 而抑制 GSDMD 也会影响 NLRP3 的表达, 这与动物实验结果一致。

综上, 本研究通过体内实验证实, NLRP3 炎症小体的活化与 GSDMD 蛋白表达水平的变化趋势一致, 提示 GA 的发生机制与 NLRP3/GSDMD 途径介导的焦亡密切相关。鉴于 GSDMD 的激活可影响 NLRP3 表达, 且已有研究^[31-34]表明 GSDMD 的氧化可能促进线粒体 ROS 生成, 进而激活炎症小体并诱发焦亡, 未来研究将围绕 GSDMD/ROS/NLRP3 信号轴, 探究 GA 焦亡过程中的氧化应激水平及其具体作用机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Martillo M A, Nazzari L, Crittenden D B. The crystallization of monosodium urate [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2014, 16(2): 400.
- [2] Wu X H, Wang C Z, Wang S Q, et al. Anti-hyperuricemia effects of allopurinol are improved by Smilax riparia, a traditional Chinese herbal medicine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 162: 362-368.
- [3] Pu M J, Yao C J, Liu L M, et al. Traditional Chinese medicine for gouty arthritis: A protocol for meta-analysis [J]. *Medicine*, 2021, 100(3): e23699.
- [4] 王国镇, 刘紫佳, 盛超, 等. 焦亡相关炎症因子与痛风性关节炎疾病活动度的相关性研究 [J]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2024, 16(4): 61-67.
Wang G Z, Liu Z J, Sheng C, et al. The correlation between levels of serum pyroptosis-related inflammatory factors and pain in gouty arthritis patients [J]. *Chin J Front Med Sci Electron Version*, 2024, 16(4): 61-67.
- [5] 王国镇, 刘紫佳, 唐铎, 等. NLRP3 炎症小体抑制剂

- MCC950 对急性痛风性关节炎大鼠的保护作用 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2022, 28(11): 810-816.
- Wang G Z, Liu Z J, Tang D, et al. The protective effect of NLRP3 inflammasome inhibitor MCC950 on acute gouty arthritis rats [J]. Chin J Pain Med, 2022, 28(11): 810-816.
- [6] Cai W, Wu Z, Lai J, Yao J, Zeng Y, Fang Z, Lin W, Chen J, Xu C, Chen X. LDC7559 inhibits microglial activation and GSDMD-dependent pyroptosis after subarachnoid hemorrhage [J]. Front Immunol, 2023, 14:1117310.
- [7] Guo H T, Callaway J B, Ting J P. Inflammasomes: Mechanism of action, role in disease, and therapeutics [J]. Nat Med, 2015, 21(7): 677-687.
- [8] Wang L F, Ding Y J, Zhao Q, et al. Investigation on the association between NLRP3 gene polymorphisms and susceptibility to primary gout [J]. Genet Mol Res, 2015, 14(4): 16410-16414.
- [9] Sun L B, Ma W, Gao W L, et al. Propofol directly induces caspase-1-dependent macrophage pyroptosis through the NLRP3-ASC inflammasome [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(8): 542.
- [10] Kovacs S B, Miao E A. Gasdermins: Effectors of pyroptosis [J]. Trends Cell Biol, 2017, 27(9): 673-684.
- [11] 武君珂, 张芳芳, 黄丽平, 等. 基于 NLRP3 介导细胞焦亡在类风湿性关节炎中的机制及中医药研究进展 [J]. 中草药, 2024, 55(24): 8632-8643.
- Wu J K, Zhang F F, Huang L P, et al. Mechanism of NLRP3 mediated pyroptosis in rheumatoid arthritis and research progress in traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(24): 8632-8643.
- [12] Zeng Z L, Li G H, Wu S Y, et al. Role of pyroptosis in cardiovascular disease [J]. Cell Prolif, 2019, 52(2): e12563.
- [13] Karmakar M, Minns M, Greenberg E N, et al. N-GSDMD trafficking to neutrophil organelles facilitates IL-1 β release independently of plasma membrane pores and pyroptosis [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 2212.
- [14] Xu S, Wang J, Zhong J J, et al. CD73 alleviates GSDMD-mediated microglia pyroptosis in spinal cord injury through PI3K/AKT/Foxo1 signaling [J]. Clin Transl Med, 2021, 11(1): e269.
- [15] 单少鹏, 李方, 郝恩魁. GSDMD 介导的细胞焦亡在心血管疾病中的研究进展 [J]. 中国临床医学, 2022, 29(2): 267-272.
- Shan S P, Li F, Hao E K. Research progress of GSDMD mediated pyroptosis in cardiovascular diseases [J]. Chin J Clin Med, 2022, 29(2): 267-272.
- [16] Hsu S K, Li C Y, Lin I L, et al. Inflammation-related pyroptosis, a novel programmed cell death pathway, and its crosstalk with immune therapy in cancer treatment [J]. Theranostics, 2021, 11(18): 8813-8835.
- [17] Shi H R, Gao Y, Dong Z, et al. GSDMD-mediated cardiomyocyte pyroptosis promotes myocardial I/R injury [J]. Circ Res, 2021, 129(3): 383-396.
- [18] Xia S Y, Hollingsworth L R 4th, Wu H. Mechanism and regulation of gasdermin-mediated cell death [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2020, 12(3): a036400.
- [19] Aglietti R A, Dueber E C. Recent insights into the molecular mechanisms underlying pyroptosis and gasdermin family functions [J]. Trends Immunol, 2017, 38(4): 261-271.
- [20] Zhao W B, Wang B Y, Li S. Network pharmacology for traditional Chinese medicine in era of artificial intelligence [J]. Chin Herb Med, 2024, 16(4): 558-560.
- [21] 叶玉妹, 陈隆望, 张万里, 等. NLRP3 炎症小体抑制剂 MCC950 通过抑制 Th1/Th17 和促进 Tregs 改善脓毒症小鼠器官损伤 [J]. 温州医科大学学报, 2024, 54(03): 190-198.
- Ye Y M, Chen L W, Zhang W L, et al. The NLRP3 inflammasome inhibitor MCC950 improves organ damage in septic mice by inhibiting Th1/Th17 and promoting Tregs [J]. J Wenzhou Med Univ, 2024, 54(03): 190-198.
- [22] 宋娟, 李清漪, 张奇, 等. 改良法制备大鼠痛风性关节炎模型 [J]. 中国当代医药, 2018, 25(31): 4-6.
- Song J, Li Q Y, Zhang Q et al. Improved method for preparing rat gouty arthritis model [J]. China Mod Med, 2018, 25(31): 4-6.
- [23] Coll R C, Robertson A A B, Chae J J, et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases [J]. Nat Med, 2015, 21(3): 248-255.
- [24] Li X, Xu D Q, Sun D Y, et al. Curcumin ameliorates monosodium urate-induced gouty arthritis through Nod-like receptor 3 inflammasome mediation via inhibiting nuclear factor-kappa B signaling [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(4): 6718-6728.
- [25] Li S S, Sun Y M, Song M M, et al. NLRP3/caspase-1/GSDMD-mediated pyroptosis exerts a crucial role in astrocyte pathological injury in mouse model of depression [J]. JCI Insight, 2021, 6(23): e146852.
- [26] Zhu Y, Deng J, Nan M L, et al. The interplay between pattern recognition receptors and autophagy in inflammation [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1209: 79-108.
- [27] Huang Y, Xu W, Zhou R B. NLRP3 inflammasome activation and cell death [J]. Cell Mol Immunol, 2021,

- 18(9): 2114-2127.
- [28] Lin Y Q, Luo T Y, Weng A L, et al. Gallic acid alleviates gouty arthritis by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis through enhancing Nrf2 signaling [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 580593.
- [29] Hao K, Jiang W J, Zhou M Z, et al. Targeting BRD4 prevents acute gouty arthritis by regulating pyroptosis [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(16): 3163-3173.
- [30] Wang Y F, Shi P L, Chen Q, et al. Mitochondrial ROS promote macrophage pyroptosis by inducing GSDMD oxidation [J]. *J Mol Cell Biol*, 2019, 11(12): 1069-1082.
- [31] 郭玉星, 熊辉, 陆小龙, 等. 改良痛风性关节炎大鼠模型的复制 [J]. *云南中医学院学报*, 2017, 40(2): 18-23.
- Guo Y X, Xiong H, Lu X L, et al. Replication of rat model of gouty arthritis [J]. *J Yunnan Univ Tradit Chin Med*, 2017, 40(2): 18-23.
- [32] 吕军, 吕芳, 方和金, 等. 高尿酸血症并急性痛风性关节炎大鼠模型的建立 [J]. *中国现代医学杂志*, 2013, 23(27): 11-16.
- Lü J, Lü F, Fang H J, et al. Study of acute gouty arthritis and hyperuricemia rat model [J]. *China J Mod Med*, 2013, 23(27): 11-16.
- [33] Xing Y Q, He Y C, Zhang Y, et al. Emodin alleviates high-glucose-induced pancreatic β -cell pyroptosis by inhibiting NLRP3/GSDMD signaling [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 5276832.
- [34] Zhazykbayeva S, Pabel S, Mügge A, et al. The molecular mechanisms associated with the physiological responses to inflammation and oxidative stress in cardiovascular diseases [J]. *Biophys Rev*, 2020, 12(4): 947-968.

[责任编辑 孙英杰]