

• 药理与临床 •

基于 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路探讨木犀草素对 LPS/ATP 诱导的细胞焦亡的保护机制

刘双慧^{1,2}, 张衍坤^{1,2}, 赵毅^{1,2}, 贺常亮^{2,3*}

1. 四川农业大学动物医学院 基础兽医系, 四川 成都 611134

2. 四川农业大学动物医学院 天然药物研究中心, 四川 成都 611134

3. 四川农业大学动物医学院 临床兽医系, 四川 成都 611134

摘要: 目的 基于 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)/半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cystein-aspartate protease-1, Caspase-1)/消皮素 D (gasdermin D, GSDMD) 通路研究木犀草素对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 联合三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 诱导的小鼠单核巨噬细胞 J774A.1 焦亡的作用及其机制。方法 利用分子对接技术预测木犀草素与焦亡相关蛋白结合的可能性。将对数生长期的小鼠单核巨噬细胞 J774A.1 细胞分为对照组、LPS+ATP 组、木犀草素 (8 $\mu\text{mol/L}$) 组和木犀草素低、中、高 (2、4、8 $\mu\text{mol/L}$) + LPS+ATP 组。采用 LPS+ATP 诱导 J774A.1 细胞焦亡, 采用木犀草素预防治疗 12 h。通过碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 释放和细胞计数 (cell counting kit-8, CCK-8) 法检测细胞活力和细胞膜损伤, 利用 ELISA 法测定白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和 IL-18 的水平。采用 Western blotting 检测细胞中 NLRP3、凋亡相关颗粒样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)、Caspase-1、GSDMD 的蛋白表达。同时, 将 ICR 雄性小鼠随机分为对照组、LPS (50 mg/kg) 组、木犀草素 (80 mg/kg) 组和木犀草素低、中、高剂量 (40、60、80 mg/kg) + LPS (50 mg/kg) 组, 进行木犀草素干预 LPS 诱导小鼠脾脏细胞焦亡的体内实验, 检测血清中 IL-1 β 、IL-18 的水平和脾脏中 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD 的表达。结果 分子对接结果表明, 木犀草素与细胞焦亡相关蛋白 Caspase-1、NLRP3、ASC、GSDMD 的结合良好, 结合能均小于 -5 kcal/mol。体外实验表明, 经过木犀草素预处理 (2~8 $\mu\text{mol/L}$) 12 h 能显著提高 LPS+ATP 诱导的 J774A.1 细胞活力 ($P<0.05$), 显著减少 PI 染色阳性率和 LDH 释放 ($P<0.05$), 显著降低 IL-1 β 和 IL-18 水平 ($P<0.01$), 并显著下调 NLRP3、Caspase-1 p10 及 GSDMD p30 的蛋白表达 ($P<0.01$)。体内实验表明, 木犀草素可以显著降低小鼠血清中 IL-1 β 和 IL-18 水平 ($P<0.01$), 并显著下调 NLRP3、Caspase-1 p20 及 GSDMD p30 的蛋白表达 ($P<0.01$)。结论 木犀草素能够显著改善 LPS+ATP 诱导的 J774A.1 细胞焦亡模型的形态学损伤, 抑制促炎性细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 的释放, 并通过 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路抑制细胞焦亡的发生。

关键词: 细胞焦亡; 木犀草素; NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1; 消皮素 D

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)06-1989-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.06.012

Exploring protective mechanism of luteolin against LPS/ATP-induced pyroptosis based on NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway

LIU Shuanghui^{1,2}, ZHANG Yankun^{1,2}, ZHAO Yi^{1,2}, HE Changliang^{2,3}

1. Department of Basic Veterinary, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611134, China

2. Natural Medicine Research Center, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611134, China

3. Department of Clinical Veterinary, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611134, China

收稿日期: 2024-11-14

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32273047)

作者简介: 刘双慧, 硕士研究生, 研究方向为民族药物的研发与临床应用。E-mail: liushuanghui0917@163.com

*通信作者: 贺常亮, 教授, 博士生导师, 研究方向为民族药物的研发与临床应用。E-mail: Lorri190@126.com

Abstract: Objective Based on NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3)/cysteinyl aspartate specific proteinase-1 (Caspase-1)/Gasdermin D (GSDMD) pathway to study the intervention effect of luteolin on lipopolysaccharide (LPS) combined with adenosine triphosphate (ATP)-induced pyroptosis in J774A.1 cells and its mechanism. **Methods** Molecular docking technology was used to predict the possibility of luteolin binding to pyroptosis-related proteins. Mouse mononuclear macrophage J774A.1 cells in logarithmic growth phase were divided into control group, LPS+ATP group, luteolin (8 $\mu\text{mol/L}$) group, and luteolin low, medium, and high (2, 4, and 8 $\mu\text{mol/L}$) + LPS + ATP groups. LPS + ATP was used to induce pyroptosis in J774A.1 cells, and luteolin was used for preventive treatment for 12 h. Cell viability and cell membrane damage were detected by propidium iodide (PI) staining, lactate dehydrogenase (LDH) release, and cell counting kit-8 (CCK-8) method. The levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-18 were determined by ELISA. Western blotting was used to detect the protein expressions of NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), Caspase-1, and GSDMD in cells. At the same time, ICR male mice were randomly divided into a control group, an LPS (50 mg/kg) group, a luteolin alone (80 mg/kg) group, and a luteolin low-, medium-, and high-dose (40, 60, and 80 mg/kg) + LPS (50 mg/kg) group. An *in vivo* experiment was performed to investigate the intervention of luteolin in LPS-induced pyroptosis of mouse spleen cells. The levels of IL-1 β and IL-18 in serum and the expressions of NLRP3, ASC, Caspase-1, and GSDMD in spleen were detected. **Results** The results of molecular docking showed that luteolin had good binding activity with pyroptosis-related proteins Caspase-1, NLRP3, ASC and GSDMD, and the binding energy was less than -5 kcal/mol. *In vitro* experiments showed that 12 hours of luteolin pretreatment (2—8 $\mu\text{mol/L}$) significantly increased the cell viability induced by LPS + ATP ($P < 0.05$), significantly reduced the positive rate of PI staining and LDH release ($P < 0.05$), significantly reduced the release of IL-1 β and IL-18 ($P < 0.01$), and significantly down-regulated the expression of NLRP3, Caspase-1 p10 and GSDMD p30 ($P < 0.01$). *In vivo* experiments showed that luteolin could significantly reduce the release of IL-1 β and IL-18 in serum ($P < 0.01$) and significantly down-regulate the expression of NLRP3, Caspase-1 p20 and GSDMD p30 ($P < 0.01$). **Conclusion** Luteolin can significantly improve the morphological damage of LPS + ATP-induced J774A.1 cell pyroptosis, inhibit the release of the pro-inflammatory cytokine IL-1 β and IL-18, and inhibit the occurrence of pyroptosis through the NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling pathway.

Key words: pyroptosis; luteolin; NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3; cystein-aspartate protease-1; gasdermin D

细胞焦亡是一种以炎症为特征的程序性细胞死亡方式,通常由炎症小体介导,涉及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cystein-aspartate protease-1, Caspase-1) 等多种半胱氨酸酶的激活。激活的 Caspase-1 可以引发消皮素家族成员消皮素 D (gasdermin D, GSDMD) 的剪切和多聚化,导致细胞膜穿孔,细胞内容物和促炎因子的释放,进而引发细胞死亡^[1]。研究表明,细胞焦亡在感染、免疫性疾病、代谢性疾病、癌症和神经退行性疾病的发生和发展中发挥着复杂的作用^[2]。细胞焦亡在一定程度上通过增强免疫反应对抗病原,但当其过度激活或失调时,也可能引发组织损伤,促进疾病的进展。因此,细胞焦亡的调控机制已成为疾病治疗研究中的重要方向。

细胞焦亡机制是 Caspase-1 介导的经典细胞焦亡途径和 Caspase-4/5/11 介导的非经典途径^[3]。经典的细胞焦亡通路是由炎症小体激活,通过特殊接头蛋白结合在 pro-Caspase-1 后活化成 Caspase-1^[4]。非经典的细胞焦亡通路是由活化的 Caspase-4/5/11 切割 GSDMD,一方面诱导细胞膜穿孔,引起细胞焦亡^[5-6]。Caspase 具有剪切白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-18 和 GSDMD 的能力,其中 GSDMD 是启动细胞焦亡的重要介质。GSDMD-N 端能插入

细胞膜诱导形成细胞膜孔道,细胞逐渐膨胀至破裂,大量细胞内容物释放出来,引起炎症反应^[7-8]。

木犀草素作为一种天然的四羟基黄酮类化合物,具有广泛的药理作用,包括抗菌、抗炎、抗氧化和抗凋亡等。近年来,木犀草素在多种炎症相关疾病的研究中展现了其潜在的治疗价值^[9]。关于脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 处理的小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 RAW264.7 和患有盐酸/乙醇引发的胃炎小鼠的几项研究报告称,天然药物靶向核因子- κB (nuclear factor kappa-B, NF- κB) 通路中的类固醇受体辅激活因子 (steroid receptor coactivator, Src) 和脾酪氨酸激酶 (spleen tyrosine kinase, Syk),并通过阻断 NF- κB 信号传导具有抗炎作用^[10-11]。研究发现,木犀草素被认为通过下调 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) 保护心肌细胞免受 LPS 诱导的细胞凋亡和炎症损伤^[12]。以上研究结果表明,木犀草素在调节细胞焦亡、缓解由炎症和氧化应激引发的组织损伤方面具有显著作用,提示其作为潜在治疗药物的可能性。

尽管木犀草素在抑制细胞焦亡方面已有初步的实验研究,但其具体机制尚未完全明确,尤其是

在 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路中的作用尚待进一步探讨。而 J774A.1 细胞是一种广泛使用的小鼠巨噬细胞系,已被广泛用于免疫学和炎症研究^[13]。该细胞系具有典型的巨噬细胞功能,能够响应 LPS 等刺激物激活炎症小体,诱导细胞焦亡,并且在多种实验条件下表现出良好的稳定性和可操作性^[14]。据此,本研究采用 LPS 联合三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)诱导 J774A.1 细胞焦亡模型,并基于 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路,系统评估木犀草素对 LPS+ATP 诱导的 J774A.1 细胞焦亡的干预作用,进一步揭示其潜在的分子机制。通过深入分析木犀草素对细胞焦亡的抑制作用,为其在相关疾病中的应用提供理论依据,并为临床治疗炎症性疾病提供新的思路。

1 材料

1.1 细胞株与动物

小鼠单核巨噬细胞 J774A.1 (批号 KCB 2010167)由中国科学院昆明细胞库提供。

SPF 级 ICR 雄性小鼠 48 只,6 周龄,体质量(20±2)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SYXK(川)2023-0040。动物饲养于四川农业大学动物医学院鼠房,温度 22~26℃、相对湿度 40%~60%,饲养期间自由饮食饮水,适应性饲养 7 d 后开始实验。所有动物实验方案均经四川农业大学实验动物伦理委员会批准(批准号 20230045)。

1.2 药品及试剂

木犀草素(批号 M007161222,质量分数>98%)购自成都瑞芬思科技有限公司;LPS(批号 MFCD00164401)、ATP(批号 A6419)购自美国 Sigma 公司;NLRP3 抗体(批号 15101S)、凋亡相关颗粒样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)抗体(批号 67824T)、10×RIPA 裂解液(批号 9806S)购自美国 CST 公司;Pro Caspase-1+p10+p12 抗体(批号 EPR16883)、GSDMD 抗体(批号 EPR20859)购自美国 Abcam 公司;Caspase-1/p20/p10 抗体(批号 22915)购自武汉三鹰生物技术有限公司;β-肌动蛋白(β-actin)抗体(批号 P60709)购自成都正能生物技术有限公司;IL-1β ELISA 试剂盒(批号 EK201B20221124)、IL-18 ELISA 试剂盒(批号 EK21820221124)购自杭州联科生物技术股份有限公司;细胞计数(cell counting kit-8, CCK-8)试剂盒(批号 Byt-10319)、LDH 细胞毒性检测试剂盒(批号 081823240308);HRP 标记的山羊抗兔二抗(批

号 A0208)、HRP 标记的山羊抗小鼠二抗(批号 A0216)购自上海碧云天公司;Hoechst 33342 和 PI 双染试剂盒(批号 SK34213105)购自北京酷来搏科技有限公司;DMEM 培养基(批号 10013060)、青霉素-链霉素溶液(批号 30004029)购自美国 Corning 公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 批号 GA220622)购自美国 Gibco 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 77670755)购自北京博迈德生物技术有限公司;苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF, 批号 20220630)、脱脂奶粉(批号批号 CR2206098)购自北京 Solarbio 公司;PVDF 膜(批号 R7DA3424C, 0.22 μm)购自美国 Millipore 公司。

1.3 仪器

CF1524R 型台式高速微量冷冻离心机(美国 SCILOGEX 公司);Finnpipette™ F1 多通道移液器、Varioskan Flash 全波长扫描式多功能读数仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Mini-PROTEAN® Tetra 垂直电泳槽及转膜槽、ChemiDoc MP 型蛋白印迹成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司);IX73 型倒置荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司);DYY-8C 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司);LX-900 型迷你离心机(林贝尔仪器制造有限公司);SW-CJ-1D 型超净工作台(苏州净化设备有限公司)。

2 方法

2.1 分子对接

运用 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载木犀草素的二维结构,并在分子模拟软件 MOE 中通过能量最小化转化为低能三维结构,进行分子对接。通过 RCSB Protein Data Bank 数据库(<https://www.rcsb.org/>)查找 Caspase-1/GSDMD/NRP3 蛋白的晶体结构,筛选条件物种设置为人类,蛋白-配体复合物分辨率低于 0.3 nm,将选中的蛋白-配体晶体机构下载保存。利用 PyMOL 软件对蛋白质进行去水、去磷酸根等操作,保存为 PDB 文件。采用 Molecular Operating Environment 2019 软件对化合物进行能量最小化,对靶点蛋白进行预处理并寻找活性口袋,进行半柔性分子对接,根据结合能大小评估二者的结合活性,并将结果通过 PyMOL、Discovery studio 软件进行可视化处理。

2.2 木犀草素干预 LPS/ATP 诱导 J774A.1 细胞焦亡体外实验

2.2.1 细胞培养 使用含 10% FBS、100 U/mL 青

霉素和 0.1 mg/mL 链霉素的 DMEM 培养液, 在 37 ℃、5% CO₂ 的条件下培养 J774A.1 细胞。

2.2.2 细胞造模、分组与给药 将细胞分为对照组、LPS+ATP 组、木犀草素 (8 μmol/L) 组和木犀草素低、中、高 (2、4、8 μmol/L) + LPS+ATP 组。木犀草素低、中、高 (2、4、8 μmol/L) + LPS+ATP 组用各剂量木犀草素孵育细胞 12 h, 除对照组和木犀草素 (8 μmol/L) 组外, 其余各组采用 100 ng/mL LPS 孵育 4 h 联合 5 mmol/L ATP 孵育 30 min 构建细胞焦亡模型^[15]。

2.2.3 细胞活力检测 将 J774A.1 细胞按 5×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 待其生长形态饱满密度约 80% 开始实验, 细胞按“2.2.2”项下方法分组与处理。造模结束后, 加入 10 μL CCK-8 试剂, 继续孵育 2 h, 酶标仪 450 nm 波长下检测吸光度 (*A*) 值, 计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.2.4 LDH 释放检测 将 J774A.1 细胞按 5×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 待其生长形态饱满密度约 80% 开始实验, 细胞按“2.2.2”项分组, 且设置空白 (无细胞) 组及 LDH 最大释放 (LDH 释放试剂) 组。根据试剂盒说明书, 检测各组细胞 LDH 水平, 酶标仪在 450、630 nm 双波长下检测 *A* 值, 采用 ($A_{450 \text{ nm}} - A_{630 \text{ nm}}$) 进行矫正, 计算 LDH 释放率。

$$\text{LDH 释放率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{LDH 最大释放}} - A_{\text{空白}})$$

2.2.5 Hoechst 33342/PI 双染 将 J774A.1 细胞按 5×10^5 个/孔接种于 12 孔板, 待其生长形态饱满密度约 80% 开始实验, 细胞按“2.2.2”项下方法分组与处理。造模结束后, 用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 每孔加入 800 μL 染色缓冲液, 再分别加入 4 μL Hoechst 33342 和 PI 染料, 4 ℃避光孵育 20 min, 孵育结束后用预冷 PBS 洗涤 2 次除去非特异性染色, 于荧光显微镜下观察并拍照。

2.2.6 细胞因子检测 收集各组细胞培养液, 根据试剂盒说明书, 检测各组细胞上清中 IL-1β 和 IL-18 水平。

2.2.7 Western blotting 检测 提取各组 J774A.1 细胞总蛋白和细胞上清液中分泌蛋白, 使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 分别加入 Caspase-1、Caspase-1 p20、NLRP3、ASC、GSDMD、β-actin 一抗 (1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:2 000、1:800), 4 ℃孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 二抗

(1:1 0000) 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 采用 ECL 发光液成像, Image-J 软件进行灰度值的测定。

2.3 木犀草素干预 LPS 诱导小鼠脾脏细胞焦亡体内实验

2.3.1 动物分组、造模与给药 将小鼠随机分为对照组、LPS (50 mg/kg) 组、木犀草素单独给药 (80 mg/kg) 组和木犀草素低、中、高剂量 (40、60、80 mg/kg) + LPS (50 mg/kg) 组, 每组 8 只。木犀草素低、中、高剂量 (40、60、80 mg/kg) + LPS (50 mg/kg) 组小鼠, ig 相应药物, 1 次/d, 连续 3 d。第 4 天除对照组、木犀草素单独给药 (80 mg/kg) 组外, 其余各组小鼠 ip LPS 溶液 (50 mg/kg), 6 h 后摘眼球取血, 立即脱颈处死小鼠, 采集脾脏组织样本。

2.3.2 小鼠血清 IL-1β、IL-18 水平的检测 取全血于 4 ℃、3 500 r/min 离心 15 min, 取上清, 按 ELISA 试剂盒的说明书检测各组小鼠血清中 IL-1β、IL-18 水平。

2.3.3 Western blotting 检测小鼠脾脏组织中细胞焦亡相关蛋白的表达 取脾脏组织 1 g, 加入 1 mL 裂解液, 低温环境下快速匀浆, 4 ℃静置 2 h, 12 000 r/min 低温离心 15 min, 收集上清液。使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度, 其余步骤同“2.2.7”项下方法。

2.4 统计学分析

采用 GraphPad Prism 6.02 软件作图, 采用 SPSS 22.0 软件分析处理数据, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 ANOVA 分析。

3 结果

3.1 分子对接结果分析

如图 1 所示, 木犀草素与细胞焦亡相关蛋白 Caspase-1、NLRP3、GSDMD 的结合活性良好, 结合能小于 -5 kcal/mol。此外, 结合模式分析表明, 木犀草素可以与细胞焦亡相关靶点蛋白中的多对残基相互作用, 表明具有良好的结合活性, 结果表明木犀草素有效靶向细胞焦亡相关蛋白的可能性。

3.2 木犀草素干预 LPS/ATP 诱导 J774A.1 细胞焦亡体外实验结果

3.2.1 对细胞活力的影响 如图 2 所示, 木犀草素 (8 μmol/L) 组与对照组细胞均表现为形态饱满, LPS+ATP 组细胞大部分细胞塌陷, 呈现扁平化, 与 LPS+ATP 组比较, 木犀草素低、中、高 (2、

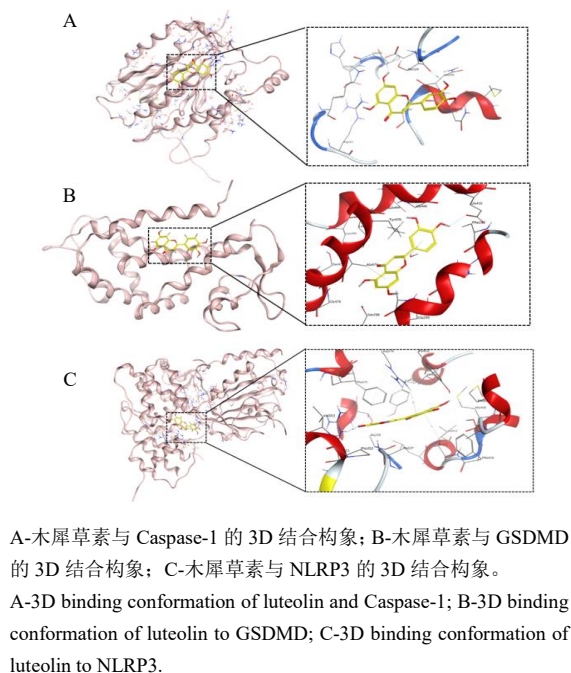


图 1 分子对接结果

Fig. 1 Molecular docking results

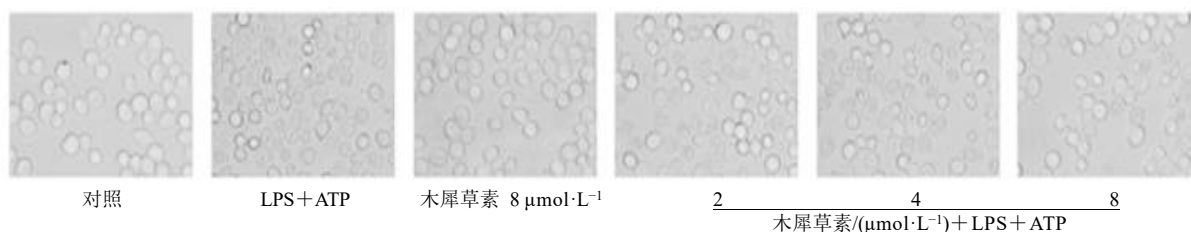
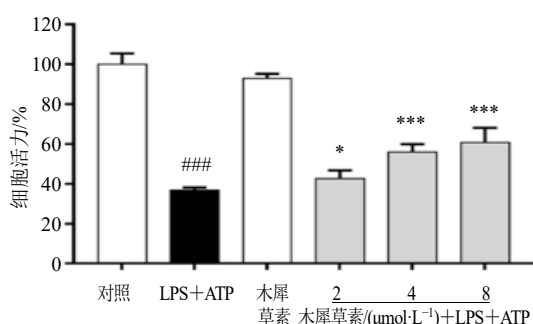


图 2 木犀草素对 LPS+ATP 诱导的细胞形态的影响 ($\times 400$)

Fig. 2 Effect of luteolin on cellular morphology induced by LPS + ATP ($\times 400$)



与对照组比较: #### $P < 0.001$; 与 LPS + ATP 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同。

$P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs LPS + ATP group, same as below figures.

图 3 木犀草素对 LPS+ATP 诱导的细胞活力的影响
($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 3 Effect of luteolin on cell viability induced by LPS + ATP ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

4、8 $\mu\text{mol/L}$ 剂量 + LPS + ATP 组比例降低, 表明 8 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草素作用 12 h 对 J774A.1 细胞在生长形态上无影响, 而木犀草素低、中、高 (2、4、8 $\mu\text{mol/L}$) 剂量预处理 12 h 后, 对 LPS + ATP 诱导的 J774A.1 细胞损伤有一定的抑制作用。

如图 3 所示, 与对照组比较, LPS + ATP 组细胞活力显著降低 ($P < 0.001$), 木犀草素组细胞活力无显著差异; 与 LPS + ATP 组比较, 低、中、高剂量木犀草素预处理组细胞活力显著升高 ($P < 0.05$ 、0.001), 表明木犀草素对 LPS + ATP 诱导的 J774A.1 细胞焦亡具有保护作用。

3.2.2 对细胞膜损伤的影响 如图 4 所示, 木犀草素 (8 $\mu\text{mol/L}$) 组与对照组 PI 染色阳性率为 0, 与对照组比较, LPS + ATP 组细胞 PI 染色阳性细胞数量明显增加; 与 LPS + ATP 组比较, 木犀草素低、中、高 (2、4、8 $\mu\text{mol/L}$) 剂量预处理 12 h 后 PI 染色阳性细胞数量减少, 并呈剂量相关性。结果表明, 木犀草素对 LPS + ATP 诱导的细胞膜损伤有保

护作用。

如图 5 所示, 与对照组比较, 木犀草素 (8 $\mu\text{mol/L}$) 组 LDH 释放率无显著变化, LPS + ATP 组 LDH 释放率显著升高 ($P < 0.001$); 与 LPS + ATP 组比较, 木犀草素低、中、高 (2、4、8 $\mu\text{mol/L}$) 剂量预处理 12 h 后 LDH 释放率显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。结果与 PI 染色试验一致, 表明木犀草素能够显著抑制 LPS + ATP 诱导的 J774A.1 细胞膜损伤。

3.2.3 对 IL-1 β 、IL-18 水平的影响 如图 6 所示, 与对照组比较, 木犀草素 (8 $\mu\text{mol/L}$) 组细胞 IL-1 β 无显著差异, LPS + ATP 组 IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.001$); 与 LPS + ATP 组比较, 木犀草素低、中、高 (2、4、8 $\mu\text{mol/L}$) 剂量预处理 12 h 后 IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.001$), 且呈剂量相关性。结果表明, 木犀草素抑制 LPS + ATP 诱导的 J774A.1

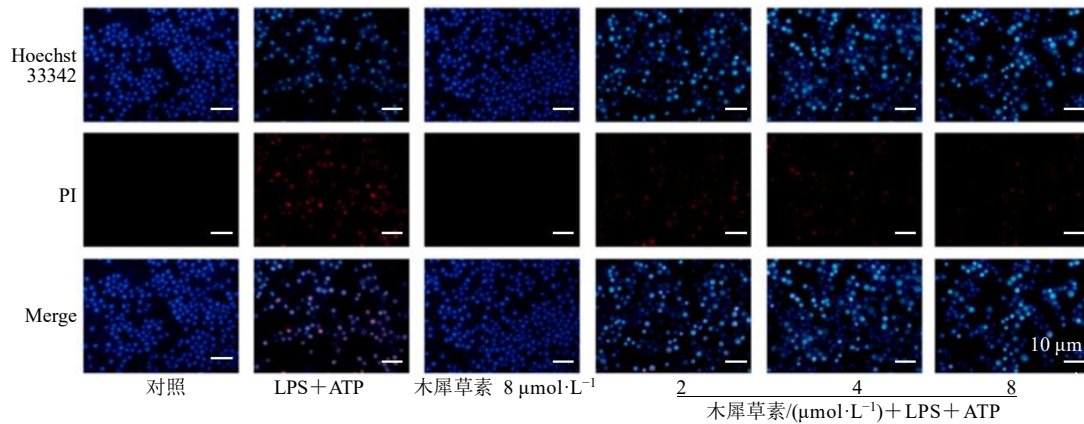
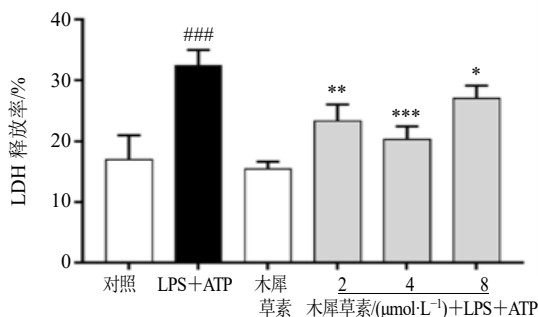


图 4 木犀草素对 LPS+ATP 诱导的 Hoechst 33342/PI 染色的影响 (×200)

Fig. 4 Effect of luteolin on LPS + ATP-induced Hoechst 33342/PI staining (× 200)

图 5 木犀草素对 LPS+ATP 诱导的 LDH 释放的影响
($\bar{x} \pm s, n = 4$)Fig. 5 Effect of luteolin on release of LDH induced by
LPS + ATP ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

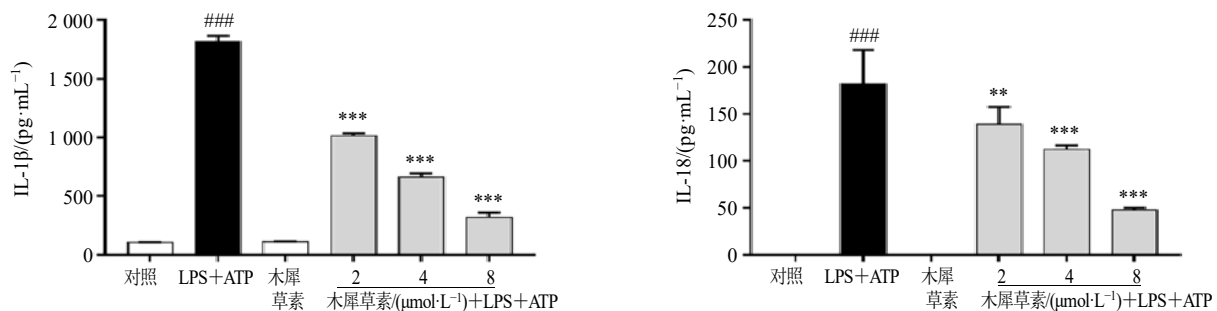
细胞 IL-1 β 水平效果显著。木犀草素 (8 $\mu\text{mol/L}$) 组与对照组均未检测到 IL-18 释放, 与对照组比较, LPS+ATP 组 IL-18 水平显著升高 ($P < 0.001$); 与 LPS+ATP 组比较, 木犀草素低、中、高 (2、4、8 $\mu\text{mol/L}$) 剂量预处理 12 h 后 IL-18 水平显著

降低 ($P < 0.01$ 、0.001), 且呈剂量相关性。结果表明, 木犀草素抑制 LPS+ATP 诱导的 J774A.1 细胞 IL-18 释放效果显著。

3.3 对 LPS+ATP 诱导的 J774A.1 细胞焦亡通路蛋白的影响

为了进一步探究木犀草素抑制 LPS+ATP 诱导的 J774A.1 细胞焦亡蛋白水平的影响, 通过 Western blotting 的方法检测了细胞总蛋白中 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD 以及细胞上清液中 Caspase-1 的蛋白表达。

3.3.1 对 Caspase-1 活化的影响 由图 7 所示, 在细胞总蛋白中, 木犀草素 (8 $\mu\text{mol/L}$) 组与对照组均未检测到 Caspase-1 p10 的蛋白表达, 与对照组比较, LPS+ATP 组 Caspase-1 p10 蛋白相对表达量显著升高 ($P < 0.001$); 与 LPS+ATP 组比较, 木犀草素低、中、高 (2、4、8 $\mu\text{mol/L}$) 剂量预处理 12 h 后 Caspase-1 p10 的蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.01$ 、0.001)。结果表明, 木犀草素能够显著抑

图 6 木犀草素对 LPS+ATP 诱导的 IL-1 β 、IL-18 释放的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 6 Effect of luteolin on release of IL-1 β and IL-18 induced by LPS + ATP ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

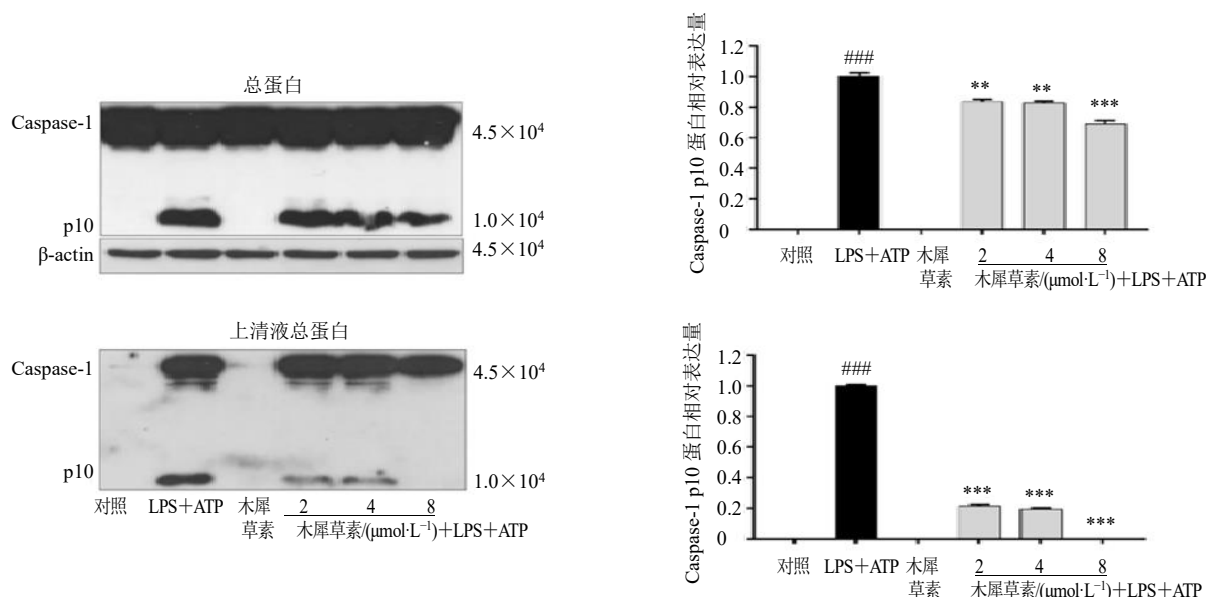


图 7 木犀草素对 LPS+ATP 诱导的 Caspase-1 p10 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effects of luteolin on expression of Caspase-1 p10 induced by LPS + ATP ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

制 LPS+ATP 诱导的 J774A.1 细胞 Caspase-1 的活化。在细胞上清富集的蛋白中，木犀草素单独使用组与对照组同样均未检测到 Caspase-1 p10 的蛋白表达，与对照组比较，LPS+ATP 组 Caspase-1 p10 蛋白相对表达量显著升高 ($P < 0.001$)；与 LPS+ATP 组比较，木犀草素低、中、高 (2、4、8 $\mu\text{mol/L}$) 剂量预处理 12 h 后 Caspase-1 p10 的蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.001$)，其中 8 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草素预处理 12 h 组已经几乎检测不到 Caspase-1 p10 的表达。结果进一步确定木犀草素能够显著抑制 LPS+ATP 诱导的 J774A.1 细胞 Caspase-1 的活化。

3.3.2 对 NLRP3 和 ASC 蛋白表达的影响 如图 8 所示，与对照组比较，木犀草素 (8 $\mu\text{mol/L}$) 组 NLRP3 蛋白相对表达量无显著变化，LPS+ATP 组 NLRP3 的蛋白相对表达量显著升高 ($P < 0.001$)；与 LPS+ATP 组比较，木犀草素低、中、高 (2、4、8 $\mu\text{mol/L}$)

剂量预处理 12 h 后 NLRP3 蛋白相对表达量均显著降低 ($P < 0.001$)。由于 ASC 在参与组装炎性小体时通过寡聚化以二聚体的形式发挥作用，ASC 主要发生的是构象变化和聚集，而非表达水平的增加，因此各组接头蛋白 ASC 蛋白相对表达量均无显著差异。

3.3.3 对 GSDMD 活化的影响 如图 9 所示，与对照组比较，木犀草素 (8 $\mu\text{mol/L}$) 组 GSDMD 蛋白相对表达量无显著变化，LPS+ATP 组 GSDMD p30 蛋白相对表达量显著升高 ($P < 0.001$)；与 LPS+ATP 组比较，木犀草素低、中、高 (2、4、8 $\mu\text{mol/L}$) 剂量预处理 12 h 后 GSDMD 蛋白相对表达量均显著降低 ($P < 0.01$ 、0.001)。结果表明，木犀草素能够显著抑制 LPS+ATP 诱导的 J774A.1 细胞 GSDMD 的活化。

3.4 木犀草素干预 LPS 诱导的小鼠脾脏细胞焦亡体内研究

3.4.1 对小鼠血清中 IL-1 β 、IL-18 水平的影响 如图 10

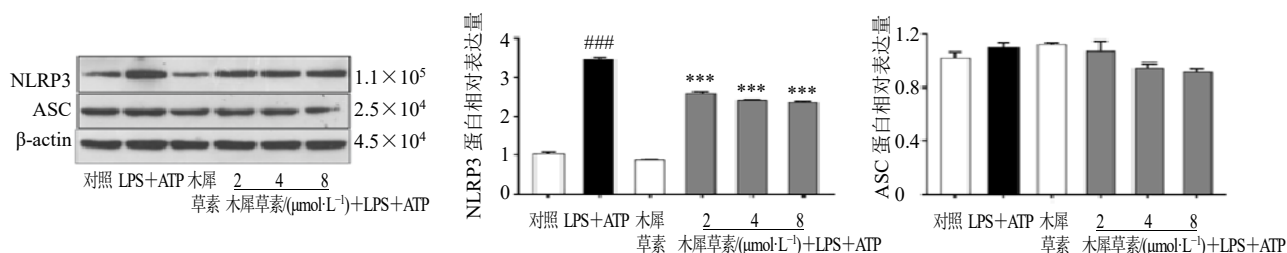


图 8 木犀草素对 LPS+ATP 诱导的 NLRP3、ASC 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effects of luteolin on expression of NLRP3 and ASC induced by LPS + ATP ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

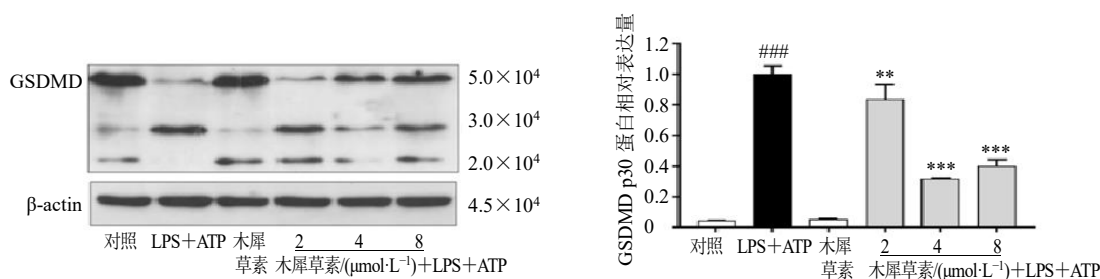
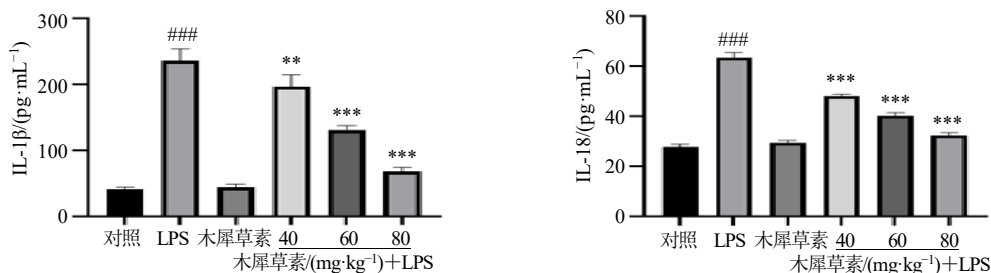


图 9 木犀草素对 LPS+ATP 诱导的 GSDMD p30 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effects of luteolin on expression of GSDMD p30 induced by LPS + ATP ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

所示,与对照组比较,木犀草素单独使用组小鼠血清中 IL-1 β 水平无显著差异,LPS 组 IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.001$);与 LPS 组比较,木犀草素各剂量给药干预后 IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.01, 0.001$)。与对照组比较,木犀草素单独使用组小鼠血清中 IL-18 水平无显著差异,

LPS 组 IL-18 水平显著升高 ($P < 0.001$);与 LPS 组比较,木犀草素各剂量给药干预后 IL-18 水平均显著降低 ($P < 0.001$),并呈现剂量相关性。结果表明,木犀草素抑制 LPS 诱导的小鼠血清 IL-1 β 、IL-18 释放效果显著,与体外实验结果一致。



与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与 LPS 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下同。

$P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs LPS group, same as below figures.

图 10 木犀草素对 LPS 诱导小鼠血清中 IL-1 β 、IL-18 释放的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 10 Effect of luteolin on release of IL-1 β and IL-18 in serum of mice induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.4.2 对小鼠脾脏中 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达的影响 如图 11 所示,与对照组比较,LPS 组小鼠脾脏中焦亡相关蛋白 Caspase-1、GSDMD、NLRP3 相对表达量均显著上调 ($P < 0.001$);与 LPS 组比较,经各剂量木犀草素干预后,Caspase-1、GSDMD、NLRP3 蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.001$),表明木犀草素在小鼠体内通过 Caspase-1/GSDMD/NLRP3 通路抑制细胞焦亡的发生。

4 讨论

近年来,木犀草素在抗炎、抗氧化、抗肿瘤等方面得到了广泛研究,它对细胞焦亡的影响也逐渐引起了人们的关注。细胞焦亡不仅在细胞内引发直接的死亡效应,还通过释放大量的促炎因子,调节免疫反应,进而影响疾病的发生、发展及预后^[16]。研究表明,木犀草素能够通过抑制 NF- κ B、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)

等炎症信号通路,减少促炎因子的释放,调节免疫反应^[17-18]。而 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路不仅在细胞焦亡中发挥核心作用,还与多种疾病的发生发展密切相关。例如,在感染、慢性炎症等疾病中,这一通路的过度激活可导致组织损伤和免疫失调^[19]。J774A.1 细胞系是一种常用的小鼠巨噬细胞系,具有良好的免疫反应特性,能够响应 LPS 等病原相关分子模式 (PAMPs) 的刺激。LPS 通过 Toll 样受体 4 (Toll-like receptors 4, TLR4) 激活巨噬细胞,促使 NLRP3 炎性小体的激活,而 ATP 作为一个经典的焦亡诱导因子,能过嘌呤能 2X7 受体 (purinergic 2X7 receptor, P2X7R) 参与 NLRP3 的激活^[20]。因此,本研究基于 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路探讨木犀草素对 LPS/ATP 诱导 J774A.1 细胞焦亡的保护机制,不仅能够模拟机体免疫应答,还能帮助深入分析木犀草素在抗炎、抗焦亡中的机制,有助于

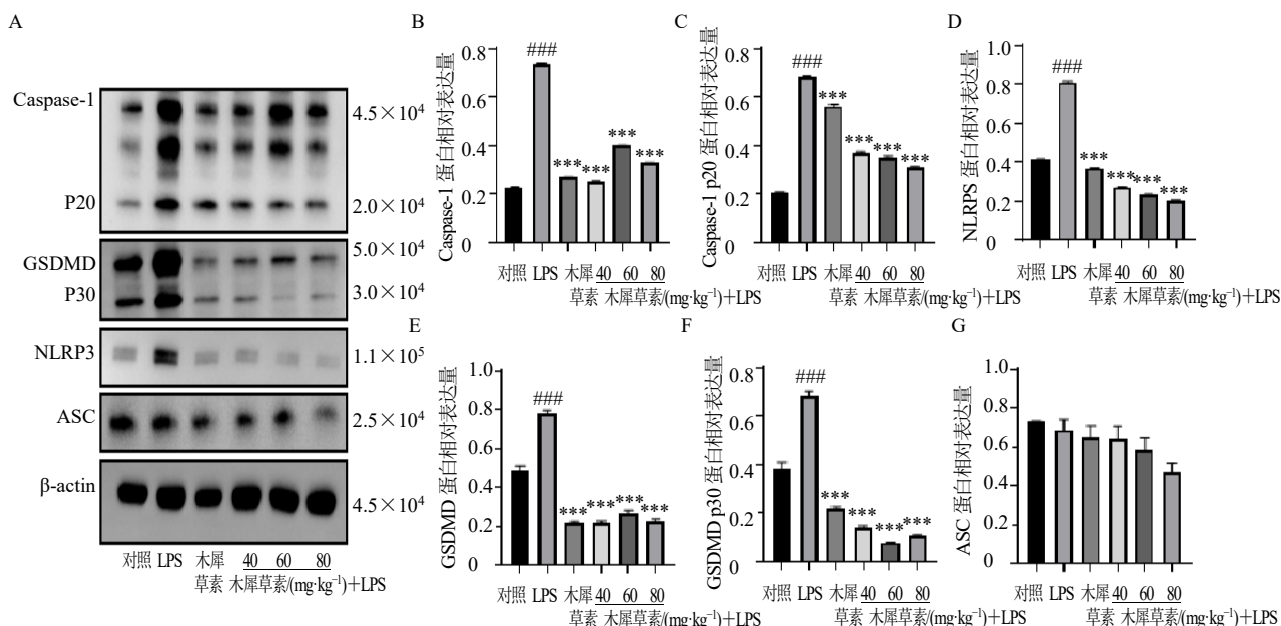


图 11 木犀草素对 LPS 诱导的小鼠脾脏 Caspase-1、Caspase-1 p20、GSDMD、GSDMD p30、NLRP3、ASC 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Effects of luteolin on expression of Caspase-1, Caspase-1 p20, GSDMD, GSDMD p30, NLRP3 and ASC proteins in spleen of mice induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

进一步验证木犀草素作为抗炎药物的潜力，对于疾病的防治具有重要意义。

在 LPS+ATP 诱导的巨噬细胞的细胞焦亡中，在 LPS+ATP 共同作用下，NLRP3 炎性小体被激活，进而促进 Caspase-1 的活化。Caspase-1 不仅剪切前体形式的 IL-1 β 和 IL-18，使之变为活性形式，还能剪切 GSDMD。被剪切后的 GSDMD 形成孔道，在细胞膜上造成破坏，导致细胞内容物的外泄和细胞死亡，典型的细胞焦亡特征随之表现出来^[21]。本试验结果显示，本研究结果表明木犀草素能够抑制 LPS+ATP 诱导的 J774A.1 细胞膜损伤，进一步论证了其抑制细胞焦亡的可能性。且木犀草素可能通过阻断 NF- κ B 信号通路或者通过阻断 Caspase-1 活化 IL-1 β 和 IL-18。活化的 Caspase-1 在细胞焦亡中具有两大重要的效应，Caspase-1 促炎性细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 的成熟，IL-1 β 和 IL-18 刺激更多相关的免疫细胞产生如 IL-6、IL-10、TNF- α 、IFN- γ 、MCP-1 等大量炎性细胞因子或趋化因子，扩大免疫炎症反应^[22-24]。

Caspase-1 更重要的角色是在 GSDMD 蛋白序列 272FLTD275 (人源) 或 273LLSD276 (小鼠) 后切割点将自抑制状态的 GSDMD 切割为 GSDMD-N 和 GSDMD-C，GSDMD-N 寡聚到细胞膜上形成 10~14 nm 的微孔，IL-1 β 和 IL-18 从微孔释放到胞内发挥更好的促炎作用^[7, 25-27]。在细胞焦亡的研究

中，木犀草素被发现具有抑制作用，它能够通过抑制 NLRP3 炎性小体的激活、减少炎症因子的释放，减轻由细胞焦亡引起的炎症反应^[28]。木犀草素对细胞焦亡的调控作用为其在炎症性疾病和自体免疫疾病中的应用提供了新的视角。Caspase-1 活化后会裂解产生 p20 和 p10 片段，将 GSDMD 切割为 C-GSDMD p20 和 GSDMD p30。在细胞和组织中，这些蛋白表达和降解速率存在差异，但均能代表 Caspase-1 和 GSDMD 的剪切情况。在小鼠体内 Caspase-1 p20 和 GSDMD p30 较为稳定，而细胞中 Caspase-1 p10、GSDMD p20 和 GSDMD p30 片段较易被检测。因此，本研究对细胞进行相同的处理检测其 NLRP3、Caspase-1 p10、GSDMD p30 和 ASC 的蛋白表达，同时进行犀草素干预小鼠体内细胞焦亡的实验验证，结果显示木犀草素干预后，有效降低了 IL-1 β 和 IL-18 的释放，并显著抑制 NLRP3、Caspase-1 p20、GSDMD p30 蛋白的表达。

综上，可以推断木犀草素通过抑制 NLRP3 炎性小体下调 Caspase-1 的活化，进而减少了 IL-1 β 和 IL-18 的生成和 GSDMD 裂解的 GSDMD-N 寡聚到细胞膜上形成微孔导致的细胞焦亡。木犀草素通过调节细胞焦亡过程，抑制 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 的激活，改善 LPS/ATP 诱导的 J774A.1 细胞焦亡，在多种疾病的预防和治疗中展现了潜力。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Newton K, Strasser A, Kayagaki N, *et al.* Cell death [J]. *Cell*, 2024, 187(2): 235-256.
- [2] Al Mamun A, Shao C X, Geng P W, *et al.* The mechanism of pyroptosis and its application prospect in diabetic wound healing [J]. *J Inflamm Res*, 2024, 17: 1481-1501.
- [3] Shi J J, Gao W Q, Shao F. Pyroptosis: Gasdermin-mediated programmed necrotic cell death [J]. *Trends Biochem Sci*, 2017, 42(4): 245-254.
- [4] Huang Y, Xu W, Zhou R. NLRP3 inflammasome activation and cell death [J]. *Cell Mol Immunol*. 2021, 18(9): 2114-2127.
- [5] Liu P, Zhang Z D, Cai Y C, *et al.* Inhibition of the pyroptosis-associated inflammasome pathway: The important potential mechanism of ginsenosides in ameliorating diabetes and its complications [J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 253: 115336.
- [6] Ye J Z, Zeng B, Zhong M Y, *et al.* Scutellarin inhibits caspase-11 activation and pyroptosis in macrophages via regulating PKA signaling [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(1): 112-126.
- [7] Shi J J, Zhao Y, Wang K, *et al.* Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death [J]. *Nature*, 2015, 526(7575): 660-665.
- [8] Wang K, Sun Q, Zhong X, *et al.* Structural mechanism for GSDMD targeting by autoprocessed caspases in pyroptosis [J]. *Cell*, 2020, 180(5): 941-955.
- [9] Prasher P, Sharma M, Singh S K, *et al.* Luteolin: A flavonoid with a multifaceted anticancer potential [J]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22(1): 386.
- [10] Kim J H, Park J G, Hong Y H, *et al.* *Sauropus brevipes* ethanol extract negatively regulates inflammatory responses *in vivo* and *in vitro* by targeting Src, Syk and IRAK1 [J]. *Pharm Biol*, 2021, 59(1): 74-86.
- [11] Hong Y H, Kim J H, Cho J Y. *Ranunculus bulmei* methanol extract exerts anti-inflammatory activity by targeting src/syk in NF- κ B signaling [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(4): 546.
- [12] Liu Z F, Gao S H, Bu Y, *et al.* Luteolin protects cardiomyocytes cells against lipopolysaccharide-induced apoptosis and inflammatory damage by modulating NLRP3 [J]. *Yonsei Med J*, 2022, 63(3): 220-228.
- [13] Todorova M, Pasheva M, Tasinov O, *et al.* LPS-induced response in J774A.1 macrophage cell culture—indicative markers for stimulated antioxidant defense, inflammation and phagocytosis [J]. 2020, 6(2):31-36.
- [14] Huang H Q, Fletcher A, Niu Y G, *et al.* Characterization of lipopolysaccharide-stimulated cytokine expression in macrophages and monocytes [J]. *Inflamm Res*, 2012, 61(12): 1329-1338.
- [15] He C, Zhao Y, Jiang X, *et al.* Protective effect of ketone musk on LPS/ATP-induced pyroptosis in J774A.1 cells through suppressing NLRP3/GSDMD pathway [J]. *Int Immunopharmacol*. 2019, 71:328-335.
- [16] Minton K. Pyroptosis heats tumour immunity [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(5): 309.
- [17] Qiao X R, Feng T, Zhang D, *et al.* Luteolin alleviated neutrophilic asthma by inhibiting IL-36 γ secretion-mediated MAPK pathways [J]. *Pharm Biol*, 2023, 61(1): 165-176.
- [18] Liu B, Su H L. Luteolin improves vasoconstriction function and survival of septic mice via AMPK/NF- κ B pathway [J]. *Heliyon*, 2023, 9(2): e13330.
- [19] Liu J B, Jia S S, Yang Y, *et al.* Exercise induced meteorin-like protects chondrocytes against inflammation and pyroptosis in osteoarthritis by inhibiting PI3K/Akt/NF- κ B and NLRP3/caspase-1/GSDMD signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 158: 114118.
- [20] Wang Y Q, Wang C, He Q L, *et al.* Inhibition of sphingosine-1-phosphate receptor 3 suppresses ATP-induced NLRP3 inflammasome activation in macrophages via TWIK2-mediated potassium efflux [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1090202.
- [21] Fu X, Hong W, Li S Y, *et al.* Wood smoke particulate matter (WSPM_{2.5}) induces pyroptosis through both Caspase-1/IL-1 β /IL-18 and ATP/P2Y-dependent mechanisms in human bronchial epithelial cells [J]. *Chemosphere*, 2022, 307(Pt 2): 135726.
- [22] Błażejowski A J, Thiemann S, Schenk A, *et al.* Microbiota normalization reveals that canonical caspase-1 activation exacerbates chemically induced intestinal inflammation [J]. *Cell Rep*, 2017, 19(11): 2319-2330.
- [23] Shields C A, Tardo G A, Wang X, *et al.* Inhibition of caspase 1 reduces blood pressure, cytotoxic NK cells, and inflammatory T-helper 17 cells in placental ischemic rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(2): 863.
- [24] Reinke S, Linge M, Diebner H H, *et al.* Non-canonical caspase-1 signaling drives RIP2-dependent and TNF- α -mediated inflammation *in vivo* [J]. *Cell Rep*, 2020, 30(8): 2501-2511.
- [25] Qin X C, Zhou Y Y, Jia C L, *et al.* Caspase-1-mediated extracellular vesicles derived from pyroptotic alveolar macrophages promote inflammation in acute lung injury [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(4): 1521-1538.
- [26] Liu Z H, Wang C P, Yang J, *et al.* Caspase-1 engages full-length gasdermin D through two distinct interfaces that mediate caspase recruitment and substrate cleavage [J]. *Immunity*, 2020, 53(1): 106-114.
- [27] Gao W, Zhang K Z. RBP4 induces pyroptosis in cardiomyocytes via activating NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway in acute myocardial infarction [J]. *Eur Heart J*, 2020, 41(Suppl 2): ehaa946.3641.
- [28] Chen D C, Shen F Y, Liu J H, *et al.* Luteolin enhanced antioxidant capability and induced pyroptosis through NF- κ B/NLRP3/Caspase-1 in splenic lymphocytes exposure to ammonia [J]. *Sci Total Environ*, 2024, 919: 170699.

[责任编辑 罗 曦]