

• 药理与临床 •

蝙蝠葛碱抑制溶酶体损伤激活的 NLRP3 炎症小体研究

禹艳丽¹, 成翠芹², 何昱廷¹, 刘哲¹, 高艳松¹, 原鑫馨¹, 杨洁¹, 贾鑫^{1*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029

2. 北京中医药大学生命科学院, 北京 100029

摘要: 目的 在小鼠骨髓源性巨噬细胞 (bone marrow derived macrophage, BMDM) 中构建溶酶体损伤激活的 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) 炎症小体模型, 探究蝙蝠葛碱对 NLRP3 炎症小体激活模型的抑制作用。方法 使用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 和亮氨酸-亮氨酸甲酯盐 (Leu-Leu-*O*-methyl ester, LLOME) 联合刺激 BMDM 细胞, 设置对照组、LPS 组、模型 (LPS+LLOME) 组和蝙蝠葛碱低、中、高剂量组。采用细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 检测细胞活力; Western blotting 检测剪切的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cleaved cysteinyl aspartate specific protease-1, cleaved Caspase-1)、剪切的白细胞介素-1 β (cleaved interleukin-1 β , cleaved IL-1 β)、Gasdermin D 的 N 端片段 (Gasdermin D *N*-terminal, GSDMD-N) 蛋白表达; ELISA 检测细胞上清液中 IL-1 β 水平; 荧光显微镜结合碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色检测焦亡细胞比例变化; 采用 RNA-seq 测序结合生物信息学分析蝙蝠葛碱干预 BMDM 细胞的转录特征; 利用 galectin-3 抗体结合免疫荧光分析蝙蝠葛碱对溶酶体膜损伤的影响; 采用流式细胞术检测蝙蝠葛碱对溶酶体生成的影响。结果 蝙蝠葛碱显著抑制 NLRP3 炎症小体激活后的 cleaved Caspase-1、cleaved IL-1 β 及 GSDMD-N 蛋白表达 ($P<0.05$ 、 0.001), 并显著抑制 IL-1 β 的分泌 ($P<0.001$)。蝙蝠葛碱明显改善细胞损伤, 抑制细胞焦亡及焦亡小泡的形成, 降低 PI 阳性细胞比例 ($P<0.001$)。蝙蝠葛碱能够上调溶酶体生成相关基因表达, 促进溶酶体生成, 抑制溶酶体膜损伤后形成的 galectin-3 ($P<0.05$ 、 0.001)。结论 蝙蝠葛碱通过促进溶酶体生物发生, 减少溶酶体膜损伤, 从而抑制溶酶体损伤激活的 NLRP3 炎症小体。

关键词: 蝙蝠葛碱; NLRP3 炎症小体; 溶酶体; galectin-3; 焦亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)07-2356-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.07.012

Dauricine inhibits NLRP3 inflammasome activation induced by lysosomal damage

YU Yanli¹, CHENG Cuiqin², HE Yuting¹, LIU Zhe¹, GAO Yansong¹, YUAN Xinxin¹, YANG Jie¹, JIA Xin¹

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. School of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effects of dauricine on NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3) inflammasome model activated by lysosome damage in bone marrow-derived macrophages (BMDM) of mice. **Methods** Lipopolysaccharide (LPS) and Leu-Leu-*O*-methyl ester (LLOME) were used in combination to stimulate BMDM cells, control group, LPS group, model (LPS + LLOME) group, and dauricine low-, medium-, and high-dose groups were set up. Cell viability was detected using cell counting kit-8 (CCK-8); Western blotting was used to detect the protein expression of cleaved cysteine aspartate specific protease-1 (cleaved Caspase-1), cleaved interleukin-1 β (cleaved IL-1 β) and Gasdermin D *N*-terminal (GSDMD-N); ELISA was used to detect IL-1 β level in cell supernatant; Fluorescence microscopy combined with propidium iodide (PI) staining were used to detect changes in the proportion of pyroptosis cells; RNA sequencing combined with bioinformatics analysis were used to

收稿日期: 2024-10-22

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82474153); 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项目 (CACM-2023-QNRC2-A02); 北京市科技新星计划课题 (20230484342)

作者简介: 禹艳丽, 硕士研究生, 研究方向为中药抗炎免疫药理。E-mail: yuyanli0222@163.com

*通信作者: 贾鑫, 副教授, 研究方向为中药抗病毒及抗炎免疫药理。E-mail: jiaxin@bucm.edu.cn

investigate the transcriptional characteristics of dauricine intervention in BMDM cells; Galectin-3 antibody combined with immunofluorescence analysis were used to investigate the effect of dauricine on lysosomal membrane damage; Flow cytometry was used to detect the effect of dauricine on lysosome production. **Results** Dauricine significantly inhibited the expressions of cleaved Caspase-1, cleaved IL-1 β and GSDMD-N proteins after NLRP3 inflammasome activation ($P < 0.05, 0.001$), and significantly inhibited the secretion of IL-1 β ($P < 0.001$). Dauricine significantly improved cell damage, inhibited cell pyroptosis and the formation of pyroptosis vesicles, and reduced the proportion of PI positive cells ($P < 0.001$). Dauricine could upregulate the expressions of genes related to lysosome formation, promote lysosome formation, and inhibit the formation of galectin-3 after lysosome membrane damage ($P < 0.05, 0.001$). **Conclusion** Dauricine promotes lysosomal biogenesis, reduces lysosomal membrane damage, and thus inhibits NLRP3 inflammasome activated by lysosomal damage.

Key words: dauricine; NLRP3 inflammasome; lysosome; galectin-3; pyroptosis

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 speck-like protein containing a caspase recruitment domain, ASC) 和含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶前体 (precursor cysteinyl aspartate specific protease-1, pro Caspase-1) 组成的多蛋白复合体^[1]。机体感受到外界病原微生物入侵或自身“危险信号”时, NLRP3 炎症小体组装, 诱导白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 等炎症因子的释放及细胞焦亡的产生, 最终导致细胞死亡^[2]。目前, NLRP3 炎症小体激活剂多种多样, 病原体如细菌、病毒, 机体内代谢产物如尿素结晶、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP), 以及细胞死亡释放的细胞内容物等都可以诱导 NLRP3 炎症小体活化。亮氨酸-亮氨酸甲酯盐 (Leu-Leu-O-methyl ester, LLOME) 是一种常见的溶酶体膜损伤刺激剂, 目前普遍认为, 其可通过诱导溶酶体损伤从而激活 NLRP3 炎症小体^[3-4]。由于 NLRP3 炎症小体激活方式的多样性, 且各种激活剂没有共性规律, 目前将其激活机制总结为钾离子外流假说、线粒体活性氧假说和溶酶体损伤假说^[5]。其中, 溶酶体损伤激活 NLRP3 炎症小体的假说机制正被更广泛接受。

蝙蝠葛碱是从防己科植物蝙蝠葛 *Menispermum dauricum* DC. 的干燥根茎中提取的双苄基四氢异喹啉类生物碱, 是《中国药典》2020 年版规定的北豆根含量测定的主要成分和指标^[6]。蝙蝠葛碱具有抗心律失常、抗菌消炎的作用^[7-8]。研究报道, 蝙蝠葛碱能通过抑制核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路缓解内皮炎症, 可作为治疗内皮炎症相关疾病的有效候选药物^[9]。动物实验表明, 蝙蝠葛碱可通过阻断 NF- κ B 改善脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 或盲肠结扎与穿孔

(cecaligation and puncture, CLP) 诱导的急性肺损伤^[10]。此外, 有研究发现蝙蝠葛碱通过降低活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 减轻神经炎症发挥神经保护作用^[11]。虽然蝙蝠葛碱的抗炎活性明确, 但其抑制炎症的详细分子机制, 特别从 NLRP3 炎症小体激活角度开展其抗炎功能仍未见报道。

本研究利用 LPS 和 LLOME 联合刺激小鼠骨髓源性巨噬细胞 (bone marrow derived macrophage, BMDM) 构建溶酶体损伤激活的 NLRP3 炎症小体原代细胞模型, 探究蝙蝠葛碱在抑制 NLRP3 炎症小体模型的作用与分子机制, 旨在为阐明蝙蝠葛碱抗炎作用机制提供科学数据支撑, 为相关抗炎药物研发提供新的研究方向。

1 材料

1.1 动物与细胞株

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 6~8 周龄, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2019-0010。动物实验经北京中医药大学伦理委员会审查通过 (伦理号 BUCM-2024092401-3229)。

从雄性 C57BL/6 小鼠骨髓中分离出 BMDM。

1.2 药品与试剂

蝙蝠葛碱 (批号 Z18N6S6094, 质量分数 $\geq 98\%$) 购自上海源叶生物科技有限公司; CA-074 甲酯 (CA-074 methyl ester, CA-074 Me, 批号 631585, 质量分数 99.62%) 购自美国 MedChemExpress 公司; 巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage-colony stimulating factor, M-CSF) 重组蛋白 (批号 1013245, 质量分数 $\geq 98\%$) 购自美国 PeproTech 公司; 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 BCCM3828, 质量分数 $\geq 99.5\%$); LPS (批号 0000428249, 质量分数 $\geq 97\%$); 碘化丙啶 (propidium iodide, PI, 批号 WXBFB4936V, 质量分数 $\geq 94\%$) 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; LLOME (批号 J2307114, 质量分数 $\geq$

97%)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; Trizol 试剂(批号 10177071)购自 Invitrogen 公司; DMEM 高糖培养基(批号 3093243)、青霉素-链霉素(10 000 U/mL, 批号 203043)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 批号 16000)购自美国 Gibco 公司; 细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8, 批号 BS350A)购自兰杰柯科技有限公司; IL-1 β ELISA 试剂盒(批号 KE10003)、 β -actin 抗体(批号 60008-1-Ig)、galectin-3 抗体(批号 14979-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司; IL-1 β 抗体(批号 12242S)购自美国 CST 公司; Caspase-1 抗体(批号 AG-20B-0042)购自 AdipoGen Life Sciences 公司; GSDMD-N 抗体(批号 ab209845)购自英国 Abcam 公司; HRP 标记的羊抗兔二抗(批号 GB23303)、HRP 标记的羊抗鼠二抗(批号 GB23301)购自武汉塞维尔公司; Lyso-Tracker Red 溶酶体红色荧光探针(批号 C1046)购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 仪器

Power Pac 型基础电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); DK-8D 型电热恒温水槽(上海一恒科技有限公司); Spectra Max i3x 多功能酶标仪(美谷分子仪器有限公司); Tanon 5200 系列全自动化学发光图像分析系统(上海天能生命科学有限公司); SK-L180-Pro 数控线性摇床(大龙兴创实验仪器股份公司); 1300 Series A2 型生物安全柜、Heracell 150i 型 CO₂ 培养箱、Sorvall™ Legend™ Micro 21R 型微量离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ZHCH-C1115B 型超净工作台(上海智城分析仪器制造有限公司); CKX53 型倒置显微镜、激光扫描共聚焦荧光显微镜(日本 Olympus 公司); Cyto FLEX 型流式细胞仪(美国 Beckman 公司)。

2 方法

2.1 CCK-8 实验检测细胞活力

BMDM 细胞用含 20% FBS、1%青霉素/链霉素的 DMEM 培养基培养, 用 M-CSF (100 ng/mL) 刺激 7 d 分化, 培养 7 d 后可进行铺板。

BMDM 细胞以 9×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 培养过夜使细胞完全贴壁。分别加入 1、5、10、20、30、40、50、60 μ mol/L 蝙蝠葛碱, 设置空白组(不含细胞)、对照组(DMEM 完全培养基), 于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中培养。培养 24 h 后, 加入 10 μ L CCK-8 试剂, 孵育 30 min, 使用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(A)值, 计算细胞相对存活率。

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

2.2 细胞分组及处理

设置对照组、LPS (100 ng/mL) 组、模型 (LPS 100 ng/mL + LLOME 1 mmol/L) 组和蝙蝠葛碱低、中、高剂量 (5、10、20 μ mol/L) 组。LPS 组加入 LPS 处理 4 h; 模型组在 LPS 处理 4 h 后, LLOME 处理 1 h; 各给药组分别给予不同浓度的蝙蝠葛碱处理 4 h 后, 加入 LPS (100 ng/mL) 继续孵育 4 h, 最后加入 LLOME (1 mmol/L) 孵育 1 h。

2.3 NLRP3 炎症小体相关蛋白 cleaved Caspase-1、cleaved IL-1 β 表达的检测

BMDM 细胞以 1.2×10^6 个/孔接种于 12 孔板, 按“2.2”项下方法进行分组和处理。取 300 μ L 细胞上清, 加入等体积甲醇, 加入 1/4 体积氯仿, 离心, 随后用 2 $\times$ Loading buffer 溶解沉淀, 金属浴使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 湿法转至 PVDF 膜, 封闭, 分别加入 cleaved Caspase-1 (1:1 000)、cleaved IL-1 β (1:1 000) 抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 加入羊抗鼠二抗 (1:5 000), 室温孵育 1 h, 使用全自动化学发光图像分析系统进行显影。

2.4 炎症因子 IL-1 β 水平的测定

BMDM 细胞按“2.2”项下方法进行分组和处理, 收集细胞, 4 $^{\circ}$ C、500 $\times g$ 离心 5 min, 取上清, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-1 β 水平。

2.5 荧光显微镜观察 NLRP3 炎症小体激活后 BMDM 细胞死亡情况

BMDM 细胞以 7×10^5 个/孔接种于 24 孔板, 按“2.2”项下方法进行分组和处理。用 PBS 洗涤细胞, 于荧光倒置显微镜下观察并拍照。分别加入 Hoechst 33342 (1:500) 和 PI 染色液 (2 μ g/mL), 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min, 于荧光倒置显微镜下观察并拍照, 采用 Image-Pro Plus 6.0 统计阳性细胞比例。

2.6 NLRP3 炎症小体激活下游蛋白 GSDMD-N 表达的检测

BMDM 细胞以 1.2×10^6 个/孔接种于 12 孔板, 按“2.2”项下方法进行分组和处理。收集细胞, 加入 IP 裂解液充分裂解细胞, 4 $^{\circ}$ C、10 000 $\times g$ 离心 10 min, 取上清, 加入 5 $\times$ Loading Buffer, 金属浴使蛋白变性, BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 湿法转至 PVDF 膜, 封闭, 加入 GSDMD (1:1 000) 抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 加入羊抗兔二抗 (1:5 000), 室温

孵育 1 h, 使用全自动化学发光图像分析系统显影。

2.7 RNA 测序及转录组学分析

BMDM 细胞以 1.2×10^6 个/孔接种于 12 孔板, 培养过夜后, 分别加入 DMSO (对照组)、20 $\mu\text{mol/L}$ 蝙蝠葛碱预处理 8 h, 收集细胞, 加入 Trizol 试剂提取 RNA, 由华大基因股份有限公司进行测序分析。

2.8 免疫荧光检测 galectin-3 表达

BMDM 以 1.0×10^6 个/孔接种于共聚焦培养皿中, 贴壁培养, 设置对照组、LPS (100 ng/mL) 组、模型 (LPS 100 ng/mL+LLOME 1 mmol/L) 组、蝙蝠葛碱 (20 $\mu\text{mol/L}$) 组和 CA-074 Me (20 $\mu\text{mol/L}$) 组。LPS 组加入 LPS 处理 4 h; 模型组在 LPS 处理 4 h 后, 给予 LLOME 处理 1 h; 蝙蝠葛碱组给予蝙蝠葛碱处理 4 h 后, 加入 LPS (100 ng/mL) 继续孵育 4 h, 最后加入 LLOME (1 mmol/L) 孵育 1 h。CA-074 Me 组给予 CA-074 Me 处理 4 h 后, 加入 LPS (100 ng/mL) 继续孵育 4 h, 最后加入 LLOME (1 mmol/L) 孵育 1 h。处理结束, 加入 4% 多聚甲醛室温固定 20 min; Saponin 破膜 10 min, 加入 5% 牛血清白蛋白于室温封闭 1 h; 滴加 galectin-3 一抗 (1:1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 滴加羊抗兔荧光二抗 (1:500), 室温孵育 1 h。加入 Hoechst 33342 染液 (1:500), 室温避光染色 20 min, 使用共聚焦显微镜成像。

2.9 流式细胞术检测溶酶体的生成

BMDM 细胞以 1×10^6 个/孔接种于 12 孔板, 按“2.2”项下方法进行分组和处理, 收集细胞, PBS 清洗, LysoTracker 染色 30 min, 用 PBS 洗涤细胞 3 次。采用流式细胞仪上机检测, 统计 LysoTracker 阳性细胞的数量, 并计算 LysoTracker 阳性率。

2.10 统计学分析

使用 GraphPad Prism 9.0.0 软件进行统计学分析, 使用单因素方差分析进行组间比较, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

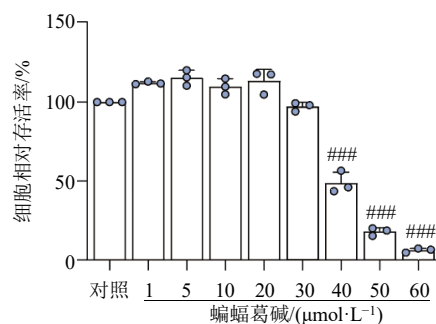
3 结果

3.1 蝙蝠葛碱对 BMDM 细胞活力的影响

如图 1 所示, 40、50、60 $\mu\text{mol/L}$ 蝙蝠葛碱处理 BMDM 细胞 24 h 后, 细胞存活率显著降低 ($P < 0.001$)。因此, 选取无明显细胞毒性的低、中、高剂量 (5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 进行后续实验。

3.2 蝙蝠葛碱对 LPS+LLOME 诱导的 NLRP3 炎症小体激活的影响

如图 2-A~C 所示, 与对照组比较, 模型组 cleaved Caspase-1、cleaved IL-1 β 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 蝙蝠葛碱各剂量组 cleaved Caspase-1、cleaved-IL-1 β 蛋白表达水



与对照组比较: ### $P < 0.001$ 。

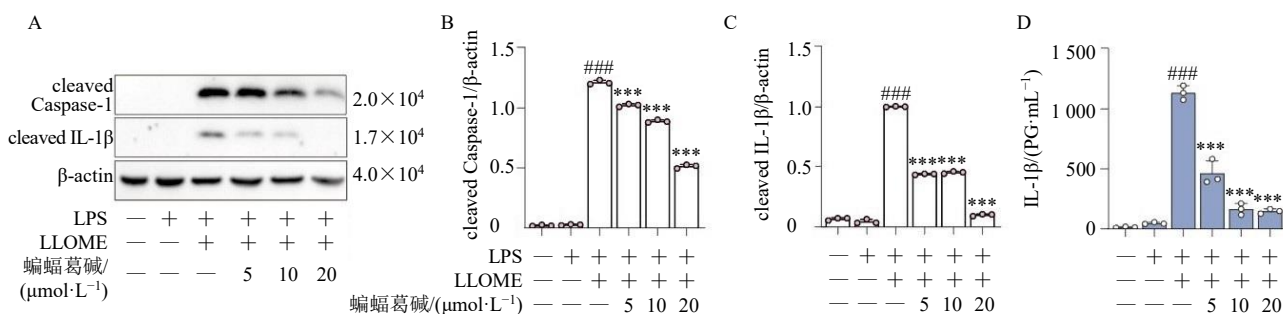
$P < 0.001$ vs control group.

图 1 蝙蝠葛碱对 BMDM 细胞活力的影响

($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of dauricine on viability of BMDM cells

($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A~C-蝙蝠葛碱对 cleaved Caspase-1 和 cleaved IL-1 β 蛋白表达的影响; D-蝙蝠葛碱对细胞上清液中 IL-1 β 水平的影响; 与对照组比较: ### $P < 0.001$, 与模型组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$, 下同。

A—C-effect of dauricine on cleaved Caspase-1 and cleaved IL-1 β protein expressions; D-effect of dauricine on IL-1 β level in cell supernatant; ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 2 蝙蝠葛碱对 LPS+LLOME 诱导的 NLRP3 炎症小体过度激活的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of dauricine on LPS + LLOME-induced hyperactivation of NLRP3 inflammasome ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

平均显著降低 ($P < 0.001$), 且呈剂量相关性。如图 2-D 所示, 与对照组比较, 模型组细胞上清液中 IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 蝙蝠葛碱各剂量组细胞上清液中 IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.001$), 且呈剂量相关性。表明蝙蝠葛碱可抑制 LPS+LLOME 诱导的 NLRP3 炎症小体激活。

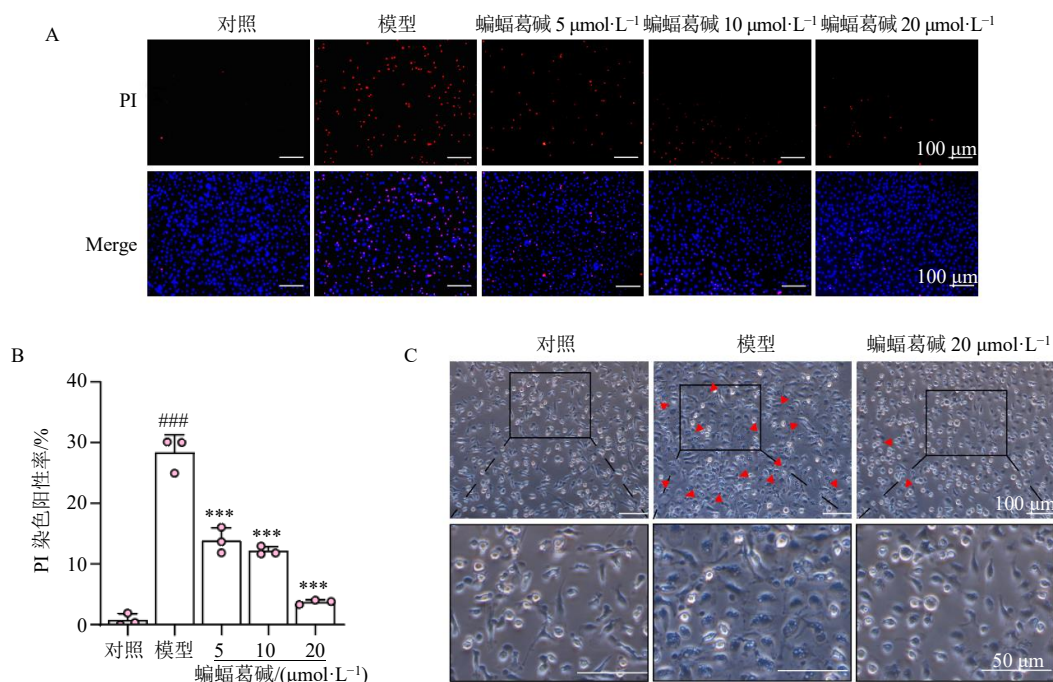
3.3 蝙蝠葛碱对 NLRP3 炎症小体激活后 BMDM 细胞死亡的影响

如图 3-A、B 所示, 与对照组比较, 模型组 PI 染色阳性率显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 蝙蝠葛碱各剂量组 PI 染色阳性率显著降低 ($P < 0.001$), 呈剂量相关性。NLRP3 炎症小体激活后细

胞焦亡随之产生, 焦亡小泡是细胞焦亡过程中的一个重要形态学特征^[12]。如图 3-C 所示, 给予 LPS+LLOME 刺激后, BMDM 细胞出现焦亡小泡, 细胞肿胀、破裂; 给予蝙蝠葛碱干预后, 细胞焦亡小泡减少, 细胞肿胀、破裂程度降低。表明蝙蝠葛碱能够减轻 LPS+LLOME 诱导的细胞死亡。

3.4 蝙蝠葛碱对 NLRP3 炎症小体激活后 GSDMD-N 蛋白表达的影响

基于蝙蝠葛碱对 NLRP3 炎症小体激活后 BMDM 细胞死亡的抑制作用, 检测了蝙蝠葛碱对 NLRP3 炎症小体激活后 GSDMD-N 蛋白表达的影响。如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组 GSDMD-N



A、B-PI 染色观察蝙蝠葛碱对细胞焦亡的影响; C-荧光显微镜观察蝙蝠葛碱对细胞焦亡的影响。

A, B-effect of dauricine on cellular pyroptosis observed by PI staining; C-effect of dauricine on cellular pyroptosis observed by fluorescence microscopy.

图 3 蝙蝠葛碱对 LPS+LLOME 诱导的 BMDM 细胞死亡的影响 ($\times 100$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 3 Effect of dauricine on LPS + LLOME-induced cell death in BMDM cells ($\times 100$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

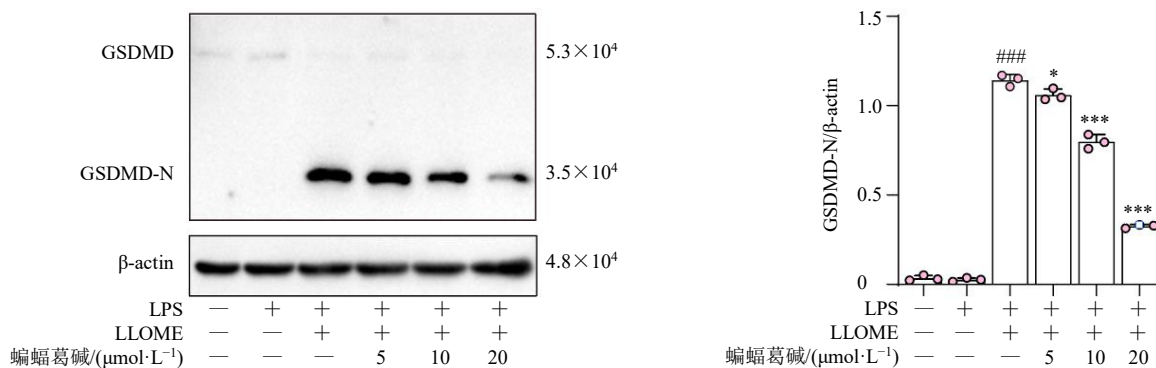


图 4 蝙蝠葛碱对 LPS+LLOME 诱导的 BMDM 细胞 GSDMD-N 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 4 Effect of dauricine on GSDMD-N protein expression in LPS + LLOME-induced BMDM cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

蛋白表达水平显著升高($P<0.001$);与模型组比较,蝙蝠葛碱各剂量组 GSDMD-N 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$ 、 0.001),且呈剂量相关性。

3.5 蝙蝠葛碱上调溶酶体相关基因表达

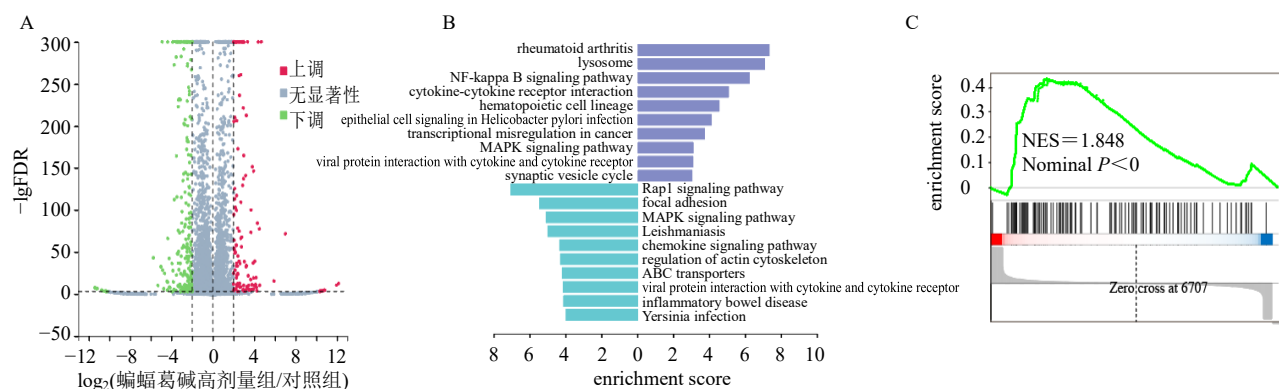
如图 5-A 所示,蝙蝠葛碱干预后诱导 1 317 个差异表达基因,其中与溶酶体相关的基因被显著上调。对上调和下调的差异基因进行 KEGG 通路富集分析,发现蝙蝠葛碱上调溶酶体相关基因表达,而下调的基因主要集中在炎症相关通路(图 5-B)。此外, GSEA 分析发现蝙蝠葛碱给药组显著富集到溶酶体相关通路(图 5-C)。提示蝙蝠葛碱可能通过溶酶体途径发挥抑制 NLRP3 炎症小体激活的功能。

3.6 蝙蝠葛碱对溶酶体膜损伤的影响

如图 6 所示,与对照组比较,模型组细胞 galectin-3 形成显著增加($P<0.01$);蝙蝠葛碱干预后明显抑制 galectin-3 形成($P<0.05$),与 CA-074 Me 作用一致。表明蝙蝠葛碱可改善 NLRP3 炎症小体激活后的溶酶体膜损伤。

3.7 流式细胞术检测蝙蝠葛碱对溶酶体生成的影响

如图 7 所示, LPS+LLOME 刺激对 BMDM 细胞溶酶体生成无显著影响,给予蝙蝠葛碱干预后 LysoTracker 阳性率呈剂量相关性地升高($P<0.05$ 、 0.001),表明蝙蝠葛碱可促进溶酶体生成。



A-转录组测序分析; B-KEGG 通路分析; C-GSEA 分析。

A-RNA-seq analysis; B-KEGG pathway analysis; C-GSEA analysis.

图 5 蝙蝠葛碱干预 BMDM 细胞的转录组测序分析

Fig. 5 RNA-seq analysis of BMDM cells treated with dauricine

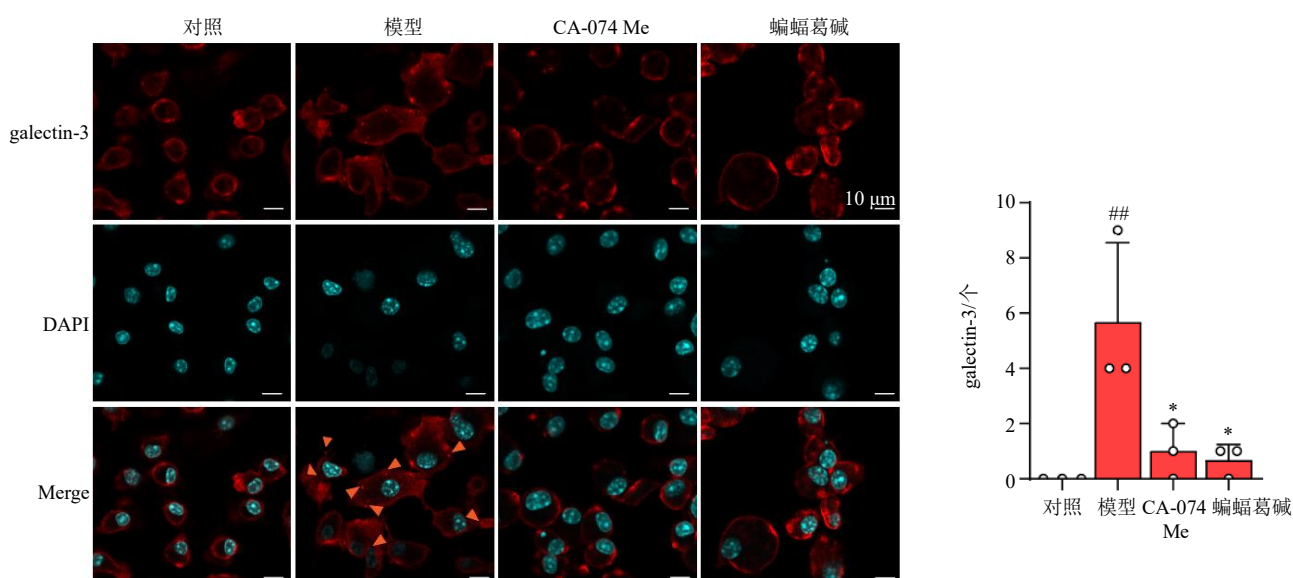


图 6 蝙蝠葛碱对 LPS+LLOME 诱导的 BMDM 细胞 galectin-3 形成的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Effect of dauricine on galectin-3 formation in LPS + LLOME-induced BMDM cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

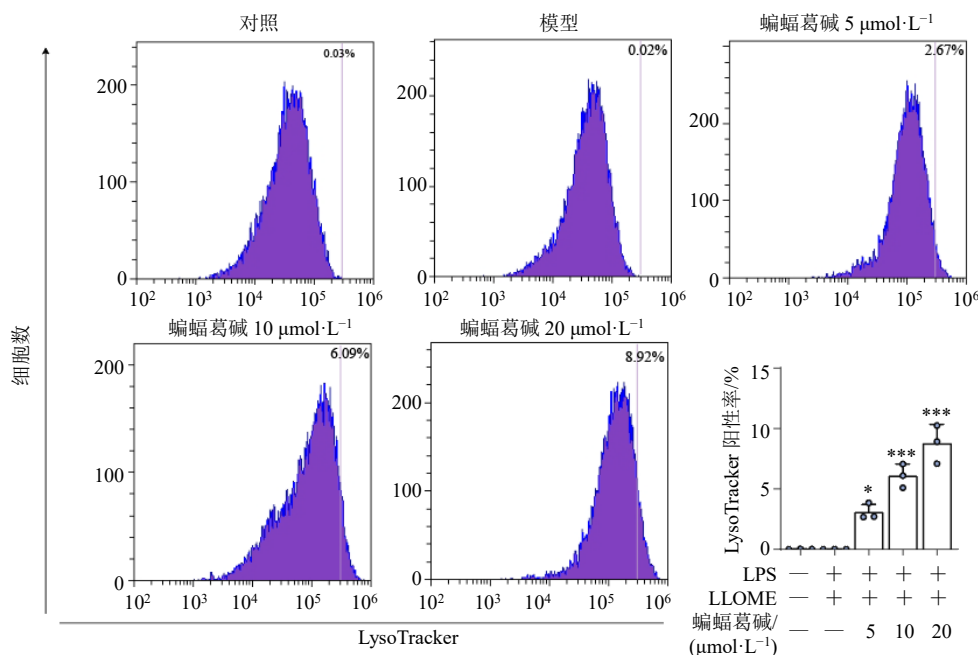


图 7 蝙蝠葛碱对 LPS+LLOME 诱导的 BMDM 细胞溶酶体生成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of dauricine on lysosomal production in LPS + LLOME-induced BMDM cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

NLRP3 炎症小体的启动和激活参与多种疾病的发生与进展。在神经炎症和神经退行性疾病（阿尔茨海默症和帕金森病）中，致病性错误折叠蛋白（如阿尔茨海默症中的淀粉样蛋白 β 和帕金森病中的 α -突触核蛋白）诱导溶酶体稳态失衡，进而触发 NLRP3 炎症小体激活，促进疾病的发生发展^[13-15]；在动脉粥样硬化、肥胖以及 2 型糖尿病等代谢性疾病中，细胞的代谢产物可作为危险信号激活 NLRP3 炎症小体，过度激活的炎症小体产生炎症的级联放大，促进上述疾病的进展^[16]；此外，感染引发的炎症性肠病、脓毒血症的发生发展过程中也伴随着 NLRP3 炎症小体不可控活化^[17-19]。因此，探究蝙蝠葛碱抑制 NLRP3 炎症小体的作用具有重要的科学价值。

溶酶体作为分解蛋白质、核酸、多糖等生物大分子的主要细胞器，其稳态失衡会促进肿瘤、阿尔茨海默病和动脉粥样硬化等疾病的发展，调控其稳态被视为治疗上述疾病的新方向^[20]。溶酶体是细胞中主要发挥降解功能的细胞器，参与调控细胞多种重要的生理功能，其功能是膜依赖性的，一旦溶酶体膜出现损伤，将导致溶酶体腔内的氢离子、钙离子以及水解酶外漏^[21]。Galectin-3 的形成可以作为溶酶体膜损伤的标志^[22]。LLOME 是特征最明显的溶酶体试剂，在溶酶体内聚合，诱导快速但可逆的

溶酶体膜损伤^[23]。研究表明，LLOME 通过改变溶酶体膜的通透性，提高细胞内钾离子外流诱导炎症小体激活^[24]。

本研究通过使用 LPS 联合 LLOME 刺激，构建溶酶体损伤诱导激活的 NLRP3 炎症小体原代巨噬细胞模型，NLRP3 炎症小体激活后产生 cleaved Caspase-1，促进炎症因子释放，并具有剪切 GSDMD 的功能，使 GSDMD 的 N 末端结构域释放。GSDMD-N 蛋白通过与细胞膜上的磷脂酰丝氨酸和磷酸肌醇结合，在细胞膜上打孔，导致细胞内外失衡而破裂，引起细胞死亡；此外，细胞内容物释放到细胞外，会引起炎症反应^[25]。本研究结果表明，蝙蝠葛碱抑制 NLRP3 炎症小体的激活。蝙蝠葛碱能够抑制 NLRP3 炎症小体激活后的 cleaved Caspase-1、cleaved IL-1 β 及 GSDMD-N 蛋白表达，并抑制 IL-1 β 的分泌，改善 NLRP3 炎症小体过度激活引起的细胞死亡。为了探究蝙蝠葛碱对溶酶体生成的影响，本研究采用流式细胞术检测蝙蝠葛碱在 NLRP3 炎症小体激活后对 LysoTracker 染色的影响，结果显示，蝙蝠葛碱能够促进溶酶体生成。CA-074 Me 可通过减轻炎症激活后的溶酶体膜损伤，从而抑制 NLRP3 炎症小体的激活^[26]。本研究发现蝙蝠葛碱与 CA-074 Me 作用一致，同样能够减轻 NLRP3 激活后的溶酶体损伤，提示蝙蝠葛碱可能在 NLRP3 炎症小体驱动的炎症性疾病中具有重要的治疗潜力。

综上,本研究使用溶酶体损伤激活的NLRP3炎症小体细胞模型,确证溶酶体损伤对诱导NLRP3炎症小体激活的重要作用,并证明蝙蝠葛碱通过促进溶酶体生成,改善溶酶体损伤,从而显著抑制NLRP3炎症小体激活。本研究为蝙蝠葛碱在治疗相关炎症性疾病中的药物研发提供了数据支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Barnett K C, Li S R, Liang K X, *et al.* A 360° view of the inflammasome: Mechanisms of activation, cell death, and diseases [J]. *Cell*, 2023, 186(11): 2288-2312.
- [2] 张坦, 王茹, 丁树哲. 糖脂代谢参与 NLRP3 炎症小体活化的研究进展 [J]. *生命科学*, 2022, 34(4): 385-391.
- [3] Sharma A, Dhavale D D, Kotzbauer P T, *et al.* VCP inhibition augments NLRP3 inflammasome activation [J]. *Inflammation*, 2024, 47(5): 1868-1883.
- [4] Orlowski G M, Colbert J D, Sharma S, *et al.* Multiple cathepsins promote pro-IL-1 β synthesis and NLRP3-mediated IL-1 β activation [J]. *J Immunol*, 2015, 195(4): 1685-1697.
- [5] Swanson K V, Deng M, Ting J P. The NLRP3 inflammasome: Molecular activation and regulation to therapeutics [J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19(8): 477-489.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 103.
- [7] 朱接全, 曾繁典, 胡崇家. 蝙蝠葛碱对猫冠脉结扎和复灌性心律失常的影响及电生理作用 [J]. *中国药理学通报*, 1991, 7(1): 23-26.
- [8] Yang X Y, Jiang S Q, Zhang L, *et al.* Inhibitory effect of dauricine on inflammatory process following focal cerebral ischemia/reperfusion in rats [J]. *Am J Chin Med*, 2007, 35(3): 477-486.
- [9] Hu J, Chen R, An J, *et al.* Dauricine attenuates vascular endothelial inflammation through inhibiting NF- κ B pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 758962.
- [10] Qiao B R, Wang H, Wang C, *et al.* Dauricine negatively regulates lipopolysaccharide- or cecal ligation and puncture-induced inflammatory response via NF- κ B inactivation [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 666: 99-106.
- [11] Wang L F, Pu Z J, Li M X, *et al.* Antioxidative and antiapoptosis: Neuroprotective effects of dauricine in Alzheimer's disease models [J]. *Life Sci*, 2020, 243: 117237.
- [12] Chen X, He W T, Hu L C, *et al.* Pyroptosis is driven by non-selective gasdermin-D pore and its morphology is different from MLKL channel-mediated necroptosis [J]. *Cell Res*, 2016, 26(9): 1007-1020.
- [13] Singh J, Habean M L, Panicker N. Inflammasome assembly in neurodegenerative diseases [J]. *Trends Neurosci*, 2023, 46(10): 814-831.
- [14] Hou Y T, He H B, Ma M, *et al.* Apilimod activates the NLRP3 inflammasome through lysosome-mediated mitochondrial damage [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1128700.
- [15] Zhou Y, Lu M, Du R H, *et al.* microRNA-7 targets Nod-like receptor protein 3 inflammasome to modulate neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease [J]. *Mol Neurodegener*, 2016, 11: 28.
- [16] Sharma B R, Kanneganti T D. NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases [J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(5): 550-559.
- [17] Zaki M H, Lamkanfi M, Kanneganti T D. The Nlrp3 inflammasome: Contributions to intestinal homeostasis [J]. *Trends Immunol*, 2011, 32(4): 171-179.
- [18] Zhang H W, Liao J, Jin L T, *et al.* NLRP3 inflammasome involves in the pathophysiology of sepsis-induced myocardial dysfunction by multiple mechanisms [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 167: 115497.
- [19] de Carvalho Ribeiro M, Szabo G. Role of the inflammasome in liver disease [J]. *Annu Rev Pathol*, 2022, 17: 345-365.
- [20] Zhu S Y, Yao R Q, Li Y X, *et al.* Lysosomal quality control of cell fate: A novel therapeutic target for human diseases [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(9): 817.
- [21] Saftig P, Klumperman J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: Trafficking meets function [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(9): 623-635.
- [22] Aits S, Krickler J, Liu B, *et al.* Sensitive detection of lysosomal membrane permeabilization by lysosomal galectin puncta assay [J]. *Autophagy*, 2015, 11(8): 1408-1424.
- [23] Maejima I, Takahashi A, Omori H, *et al.* Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury [J]. *EMBO J*, 2013, 32(17): 2336-2347.
- [24] Katsnelson M A, Lozada-Soto K M, Russo H M, *et al.* NLRP3 inflammasome signaling is activated by low-level lysosome disruption but inhibited by extensive lysosome disruption: Roles for K $^{+}$ efflux and Ca $^{2+}$ influx [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2016, 311(1): C83-C100.
- [25] Coll R C, Schroder K, Pelegrin P. NLRP3 and pyroptosis blockers for treating inflammatory diseases [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2022, 43(8): 653-668.
- [26] Ye T, Wang C Y, Yan J F, *et al.* Lysosomal destabilization: A missing link between pathological calcification and osteoarthritis [J]. *Bioact Mater*, 2023, 34: 37-50.

[责任编辑 李亚楠]