

# 基于 miR-210/NF- $\kappa$ B/NLRP3 炎症小体信号通路探讨木瓜总三萜减轻 *N*-甲基-*N'*-硝基-*N*-亚硝基胍和尼日利亚菌素诱导 GES-1 细胞损伤的作用机制

张继红<sup>1,2</sup>, 周疆鹏<sup>2</sup>, 马俊辉<sup>1</sup>, 甘庭月<sup>1</sup>, 贺海波<sup>1</sup>, 周如凤<sup>1</sup>, 余惠凡<sup>3</sup>, 李浩然<sup>2\*</sup>, 吴勉<sup>1</sup>, 许杰<sup>2</sup>, 潘朝旺<sup>4\*</sup>

1. 三峡大学 天然产物研究与利用湖北省重点实验室&药食同源大健康产品开发利用宜昌市重点实验室, 湖北 宜昌 443002
2. 三峡大学中医医院&湖北省功能性消化系统疾病中医临床医学研究中心, 湖北 宜昌 443002
3. 湖北医药学院 武当特色中药研究湖北省重点实验室, 湖北 十堰 442000
4. 鄂州职业大学医学院, 湖北 鄂州 436000

**摘要** 目的 基于微小 RNA-210 (microRNA-210, miR-210)/核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)/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) 炎症小体信号通路研究木瓜总三萜 (total triterpenes from fruits of *Chaenomeles speciosa*, CST) 减轻 *N*-甲基-*N'*-硝基-*N*-亚硝基胍 (*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, MNNG) 和尼日利亚菌素 (nigericin, NIG) 诱导人胃黏膜上皮细胞损伤的作用机制。方法 构建 MNNG 和 NIG 损伤 GES-1 细胞模型, 使用 CST 和 (或) miR-210 mimic、miR-210 inhibitor、NF- $\kappa$ B siRNA、NLRP3 siRNA 处理 GES-1 细胞。采用 MTT 法检测细胞活力; 免疫荧光检测细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平; 流式细胞术检测细胞焦亡; 比色法和 ELISA 法检测细胞上清液中白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4)、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10、IL-18、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 水平; 比色法检测细胞中过氧化氢酶 (catalase, CAT)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC) 水平; 双荧光素酶报告实验验证 miR-210 与 NF- $\kappa$ B 的靶向关系; 采用免疫荧光检测 NF- $\kappa$ B p65 核移位及 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis related spot like protein, ASC) 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 前体 (pro-cystein-aspartate protease-1, pro-Caspase-1) 共定位; qRT-PCR 测定 miR-210、NF- $\kappa$ B、NLRP3 mRNA 表达; Western blotting 检测胞质 NF- $\kappa$ B p65、胞核 NF- $\kappa$ B p65、细胞有丝分裂相关酶 7 (NIMA-related kinase 7, NEK7)、硫氧还蛋白互作蛋白 (thioredoxin interacting protein, TXNIP)、NLRP3、ASC、Caspase-1、pro-Caspase-1、消皮素 D (gasdermin D, GSDMD)、GSDMD 的 N 端结构域 (N-terminal domain of GSDMD, GSDMD-N)、pro-IL-18、pro-IL-1 $\beta$  蛋白表达。结果 miR-210 是促炎/促焦亡因子, 可与 NF- $\kappa$ B mRNA 3'-UTR 结合。与模型组比较, CST 可显著抑制 MNNG 和 NIG 所致的 GES-1 细胞焦亡和 LDH 释放 ( $P < 0.01$ ), 降低细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18、TNF- $\alpha$  和细胞中 ROS、MPO、MDA 水平 ( $P < 0.01$ ), 升高细胞上清液中 IL-4、IL-10 水平和细胞中 CAT、GSH、SOD、T-AOC 活性 ( $P < 0.01$ ); 抑制 NF- $\kappa$ B p65 核移位及 NLRP3、ASC 和 pro-Caspase-1 共定位 ( $P < 0.01$ ); 显著下调细胞中 miR-210、NF- $\kappa$ B、NLRP3 mRNA 和胞核 NF- $\kappa$ B p65、TXNIP、NEK7、NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N、pro-IL-18、pro-IL-1 $\beta$  蛋白表达 ( $P < 0.01$ ), 上调胞质 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达 ( $P < 0.01$ )。CST 与 miR-210 inhibitor、NF- $\kappa$ B siRNA、NLRP3 siRNA 转染联用可进一步改善上述指标 ( $P < 0.01$ )。结论 CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 GES-1 细胞损伤具有较好的防治作用, 其机制与抑制 miR-210 异常升高和 NF- $\kappa$ B/NLRP3 炎症小体信号通路激活、减轻氧化应激, 进而抑制细胞焦亡密切相关。

**关键词:** 木瓜总三萜; 炎症反应; 氧化应激; 细胞焦亡; miR-210/NF- $\kappa$ B/NLRP3 炎症小体信号通路; 慢性萎缩性胃炎

**中图分类号:** R285.5      **文献标志码:** A      **文章编号:** 0253-2670(2026)12-4662-22

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.12.013

**收稿日期:** 2026-01-16

**基金项目:** 湖北省科技厅重点研发项目 (2025BCB067); 湖北省科技厅省级科技计划项目 (2025CSA045); 湖北省科技厅重点研发大健康计划项目 (2022BCE017); 湖北省科技厅自然科学基金面上项目 (2025AFB805, 2025AFB839, 2025AFD301, 2025AFD294, 2023AFB600, 2022CFB357, 2022CFB427); 湖北省卫生健康委员会中医药重点项目 (ZY2023Z015); 武当特色中药研究湖北省重点实验室开放基金资助项目 (WDCM2025010)

**作者简介:** 张继红, 女, 硕士, 主任医师, 教授, 主要从事中药防治消化系统疾病基础与临床研究。E-mail: 13872605766@163.com

**\*通信作者:** 李浩然, 男, 硕士, 副教授, 副主任医师, 主要从事消化系统疾病基础与临床研究。E-mail: 250514123@qq.com

潘朝旺, 男, 硕士, 副教授, 主要从事中药药理研究。E-mail: 258644498@qq.com

## Mechanism of total triterpenoids from fruits of *Chaenomeles speciosa* in alleviating *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine and nigericin induced GES-1 cell damage based on miR-210/NF- $\kappa$ B/NLRP3 inflammasome signaling pathway

ZHANG Jihong<sup>1,2</sup>, ZHOU Jiangpeng<sup>2</sup>, MA Junhui<sup>1</sup>, GAN Tingyue<sup>1</sup>, HE Haibo<sup>1</sup>, ZHOU Rufeng<sup>1</sup>, YU Huifan<sup>3</sup>, LI Haoran<sup>2</sup>, WU Mian<sup>1</sup>, XU Jie<sup>2</sup>, PAN Chaowang<sup>4</sup>

1. Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development, Yichang Laboratory of Development and Utilization of Health Products with Drug and Food Homology, China Three Gorges University, Yichang 443002, China
2. Traditional Chinese Medicine Hospital & Hubei Clinical Research Center for Functional Digestive Diseases of Traditional Chinese Medicine, China Three Gorges University, Yichang 443002, China
3. Hubei Key Laboratory of Wudang Local Chinese Medicine Research, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China
4. Medical College, Ezhou Vocational University, Ezhou 436000, China

**Abstract: Objective** To investigate the mechanism of total triterpenes from fruits of *Chaenomeles speciosa* (CST) in alleviating *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) and (NIG)-induced human gastric mucosal epithelial cells damage based on microRNA-210 (miR-210)/nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)/NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3) inflammasome signaling pathway. **Methods** MNNG and NIG induced GES-1 cells model were constructed, and then GES-1 cells were treated with CST and/or miR-210 mimic, miR-210 inhibitor, NF- $\kappa$ B siRNA, NLRP3 siRNA. MTT assay was used to detect cell viability, immunofluorescence was utilized to measure reactive oxygen species (ROS) level, flow cytometry was used to test pyroptosis, colorimetric and ELISA methods were utilized to measure the levels of interleukin-4 (IL-4), IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-18, lactate dehydrogenase (LDH), and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in cell supernatant. The colorimetric method was used to determine the levels of catalase (CAT), glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO), superoxide dismutase (SOD) and total antioxidant capacity (T-AOC) in cells. The dual luciferase reporter assay was employed to verify the targeted intervention between miR-210 and NF- $\kappa$ B. Immunofluorescence was utilized to detect the NF- $\kappa$ B p65 nuclear translocation, the co-localization of NLRP3, apoptosis related spot like protein (ASC) and pro-cysteine-aspartate protease-1 (pro-Caspase-1). qRT-PCR was used to detect the mRNA expression levels of *miR-210*, *NF- $\kappa$ B*, *NLRP3*. Western blotting was utilized to determine the protein expression levels of cytoplasmic NF- $\kappa$ B, nuclear NF- $\kappa$ B, NIMA-related kinase 7 (NEK7), thioredoxin-interacting protein (TXNIP), NLRP3, ASC, Caspase-1, pro-Caspase-1, gasdermin D (GSDMD), N-terminal domain of GSDMD (GSDMD-N), pro-IL-18 and pro-IL-1 $\beta$ . **Results** miR-210 was a pro-inflammatory/pyroptosis factor, the dual luciferase reporter assay confirmed that it could bind to 3'-UTR in mRNA of *NF- $\kappa$ B*. Compared with model group, CST significantly inhibited pyroptosis and LDH release in MNNG and NIG induced GES-1 cells ( $P < 0.01$ ), reduced levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, TNF- $\alpha$  in supernatant and ROS, MPO, MDA in cells ( $P < 0.01$ ), elevated levels of IL-4, IL-10 in supernatant and activities of CAT, GSH, SOD, T-AOC in cells ( $P < 0.01$ ), suppressed the NF- $\kappa$ B p65 nuclear translocation and the co-localization of NLRP3, ASC and pro-Caspase-1 ( $P < 0.01$ ), downregulated the mRNA expressions of *miR-210*, *NF- $\kappa$ B*, *NLRP3* and the protein expressions of nuclear NF- $\kappa$ B p65, TXNIP, NEK7, NLRP3, ASC, pro-Caspase-1, Caspase-1, GSDMD, GSDMD-N, pro-IL-1 $\beta$ , pro-IL-18 ( $P < 0.01$ ), upregulated the cytoplasmic NF- $\kappa$ B p65 protein expression ( $P < 0.01$ ). The combination of CST with miR-210 inhibitor, NF- $\kappa$ B siRNA and NLRP3 siRNA transfection could further improve the above indicators ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** CST has a good preventive and therapeutic effect on MNNG and NIG-induced GES-1 cell injury, and its mechanism is closely related to inhibiting the abnormal elevation of miR-210 and activation of NF- $\kappa$ B/NLRP3 inflammasome signaling pathway, alleviating oxidative stress and subsequent suppressing pyroptosis.

**Key words:** total triterpenes from fruits of *Chaenomeles speciosa*; inflammatory response; oxidative stress; pyroptosis; miR-210/NF- $\kappa$ B/NLRP3 inflammasome signaling pathway; chronic atrophic gastritis

慢性萎缩性胃炎 (chronic atrophic gastritis, CAG) 是一种常见的慢性炎症性疾病, 主要症状为胃痛、腹部不适、打嗝、腹胀、反流、食欲下降、恶心和呕吐<sup>[1-3]</sup>, 其特征不仅在于黏膜萎缩、胃腺缺失和肠化生, 还导致氧化应激增加和胃癌的发生<sup>[4-5]</sup>。

因此, 加强对癌前异常如 CAG 的认识, 并及时识别和治疗 CAG 以阻止胃癌的发展具有重要的临床意义<sup>[6]</sup>。

研究发现胃黏膜反复损伤 [如幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 感染, 生活压力、不规律

的饮食、过量饮酒、高盐饮食以及接触亚硝酸盐等物理化学因素]所引发的慢性炎症是CAG的主要发病机制<sup>[7-8]</sup>。目前, *N*-甲基-*N'*-硝基-*N*-亚硝基胍 (*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, MNNG) 和尼日利亚菌素 (nigericin, NIG) 通常被用作实验室实验的化学致癌物和诱变剂<sup>[9-10]</sup>。MNNG 可以模拟过量摄入硝酸盐 (通常来自烟熏或腌制食品) 导致 CAG 甚至胃癌等癌前病变。因此, MNNG 通常用于复制正常的胃黏膜病变, 模拟胃硝酸盐摄入并将其转化为硝酸或其他致癌物。在胃中, 这些富含硝酸盐的食物在 NIG 作用下可以转化为亚硝胺, 导致氧化应激、DNA 损伤、胃肠黏膜脱落、炎症、萎缩、溃疡、肠上皮化生, 甚至胃癌的发生和发展<sup>[10-12]</sup>。因此, MNNG 与 NIG 联合使用可用于诱导 GES-1 细胞损伤的体外 CAG 模型<sup>[2]</sup>。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一组高度保守的小非蛋白编码 RNA, 与多种疾病密切相关。miRNA-210 (miR-210) 是一种抗凋亡基因, 同时也是促炎/促焦亡因子, 广泛参与细胞增殖、血管生成、分化和凋亡<sup>[13]</sup>。研究表明, miR-210 的异常表达与 CAG、胃癌、前列腺癌、宫颈癌、脑缺血、心肌缺血和炎症等疾病有关<sup>[14]</sup>。Zhang 等<sup>[15]</sup>研究发现 CAG 大鼠胃组织中核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 亚基 p65 和 miR-210 的表达上调, 用针刺治疗后胃组织中 NF- $\kappa$ B p65 和 miR-210 的表达下调。由此可见 CAG 的发生发展与 miR-210 和 NF- $\kappa$ B 信号通路密切相关。慢性炎症在 CAG 的发生发展中扮演着重要角色<sup>[2]</sup>。Hp 感染、不合理饮食、情绪波动、免疫力下降等可启动炎性细胞因子网络, 诱导多种炎症介质的产生, 引起 CAG, 在这过程中炎症相关信号通路激活是 CAG 的关键节点<sup>[16]</sup>。研究发现 CAG 组织中 NF- $\kappa$ B 信号通路激活, 其下游 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) 炎症小体活化<sup>[2,17]</sup>。研究发现在 CAG 的细胞和动物模型中, 细胞和胃黏膜微环境中生成肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、IL-6 等促炎性细胞因子, 激活 NF- $\kappa$ B 信号通路, 进一步促进 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 释放, 引起炎症的级联放大; 此外, 激活的 NF- $\kappa$ B 通路还可促进 NLRP3 募集凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis related spot like protein, ASC)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cystein-aspartate protease-

1, Caspase-1) 前体 (pro-Caspase-1) 共定位, 促进 NLRP3 炎症小体形成, 促进 IL-1 $\beta$  和 IL-18 等促炎性细胞因子释放, 进一步引起炎症的级联放大, 促进胃黏膜上皮细胞焦亡, 推动 CAG 发生发展<sup>[2,17-18]</sup>。由此可见, NF- $\kappa$ B/NLRP3 炎症小体信号通路在 CAG 发生发展进程中扮演着重要角色, 靶向 NF- $\kappa$ B/NLRP3 炎症小体信号通路是极具潜力的 CAG 治疗策略之一。

木瓜总三萜 (total triterpenes from fruits of *Chaenomeles speciosa*, CST) 是木瓜 *Chaenomeles Fructus* 中的重要活性成分。课题组前期研究发现, CST 对胃溃疡患者和动物均具有较好的治疗作用, 可抑制上皮细胞凋亡、促进其迁移和增殖、加速受损胃黏膜愈合, 证实其机制与增强内源性抗氧化系统功能、抑制氧化应激、炎性反应及 NLRP3 炎症小体通路激活密切相关<sup>[19-23]</sup>; CST 对脂多糖和三磷酸腺苷诱导的人类风湿性成纤维样滑膜 MH7A 细胞和佐剂性关节炎大鼠具有较好的抗类风湿性关节炎作用, 证实其机制与抑制 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) /NF- $\kappa$ B/NLRP3 通路激活、减少炎症反应密切相关<sup>[24]</sup>; CST 中的重要成分委陵菜酸和 CST 对 Hp 诱导的人胃黏膜上皮 GES-1 细胞损伤和 CAG 小鼠的保护作用与增强内源性抗氧化系统功能、抑制氧化应激、减少炎性反应、纠正溶酶体功能障碍、抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B/NLRP3 炎症小体信号通路激活及减少线粒体介导的细胞凋亡密切相关<sup>[22,25]</sup>。上述研究表明 CST 可通过抑制免疫炎症损伤来发挥对 CAG 的治疗作用, 但其靶向 miR-210 及调控 NF- $\kappa$ B/NLRP3 炎症小体信号通路的机制尚未阐明。基于此, 本研究拟通过 MNNG 合用 NIG 诱导的 GES-1 细胞损伤模型, 围绕 miR-210/NF- $\kappa$ B/NLRP3 炎症小体信号通路探讨 CST 抑制细胞焦亡、缓解 CAG 的作用机制, 为 CST 防治 CAG 的机制研究提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 细胞

GES-1 细胞 (批号 HG-165) 购自美国模式生物保藏中心。

### 1.2 药物与试剂

CST (质量分数为 90.02%) 为本课题组制备<sup>[20]</sup>, 主要包含齐墩果烷型、羽扇豆烷型和乌苏烷型五环三萜化合物, 其中马斯里酸、齐墩果酸、白桦脂醇、白桦脂酸、熊果酸、3-*O*-乙酰熊果酸的质量分数分

别为 2.49%、21.94%、10.57%、5.63%、6.36%、3.89%；MNNG (批号 E015702)、NIG (批号 S6653) 购自美国 Selleck 公司；RPMI 1640 培养基 (批号 621035)、胎牛血清 (批号 10569-157B)、胰酶 (批号 217496)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒 (DCFH-DA, 批号 S0019) 购自美国 Gibco 公司；二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 6120541)、MTT (批号 6312745)、Lipofectamine™ 3000 (批号 6514209) 购自美国 Sigma 公司；Annexin V-FITC/PI Apoptosis Kit (批号 CA1020) 购自上海康朗生物科技有限公司；双荧光素酶检测试剂盒 (批号 E1910) 购自美国 Promega 公司；乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和 RNA 转染试剂盒 (批号分别为 20251005、20251013、20251014、20251019、20251018、20251013、20251021、E607402-1000) 购自南京建成生物工程研究所；IL-1 $\beta$ 、IL-4、IL-6、IL-10、IL-18、TNF- $\alpha$  试剂盒 (批号分别为 20251108、20251109、20251104、20251105、20251103、20251106) 购自深圳达科为生物技术公司；miR-210 mimic、mimic NC、miR-210 inhibitor、inhibitor NC、pcDNA-NF- $\kappa$ B、NF- $\kappa$ B siRNA、pcDNA-NLRP3 和 NLRP3 siRNA (批号分别为 20251009、20251011、20251010、20251008、20251023、25251019、20251017、20251015) 购自上海吉玛制药技术有限公司；miR-210 引物、NF- $\kappa$ B 引物、NLRP3 引物、U6 引物、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 引物、DEPC 水、TRIzol (批号分别为 A0250915、A0250912、A0250914、A0250912、A02500910、20250816、12236879) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司；Prime Script™ RT reagent kit (批号 603516)、Taq DNA 聚合酶 (批号 602629) 购自日本 TaKaRa 公司；胞质 NF- $\kappa$ B p65、核 NF- $\kappa$ B p65、NLRP3、ASC、Caspase-1、pro-Caspase-1、细胞有丝分裂相关酶 7 (mitotic associated enzyme, NEK7)、硫氧还蛋白互作蛋白 (thioredoxin interacting protein, TXNIP)、消皮素 D (gasdermin D, GSDMD)、GSDMD 的 N 端结构域 (N-terminal

fragment of GSDMD, GSDMD-N)、pro-IL-18、pro-IL-1 $\beta$ 、 $\beta$ -actin、GAPDH 抗体 (批号分别为 sc-15463、sc15748、sc-24175、sc-16461、sc-3459S、sc-0636S、sc-3069S、sc-4368S、sc-20362、sc-2541S、sc-3619S、sc3674S、sc-21547、sc-2156S) 购自美国 CST 公司；DyLight™ 405、DyLight™ 488、DyLight™ 550 荧光二抗 (批号分别为 2405318S、2405693S、240156S) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司；抗荧光淬灭剂 (批号 20240519) 购自北京索莱宝科技有限公司；HRP 标记的 IgG 抗体 (批号 ab35458) 购自英国 Abcam 公司；蛋白提取试剂盒 (批号 P0252)、ECL 发光试剂盒 (批号 P0385) 购自南京碧云天生物技术有限公司。

### 1.3 仪器

MA54 型电子天平 [梅特勒托利多科技 (中国) 有限公司]；5427R 型高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司)；VORTEX-6 型涡旋仪 (美国 Aoran 公司)；Infinite 200PRO 型酶标仪 (瑞士 Tecan 公司)；HVA-110 型高压灭菌锅 (日本 Hirayama 公司)；MCO-18AIC 型 CO<sub>2</sub> 培养箱 (日本 Sanyo 公司)；SW-CJ-2FD 型超净工作台 (苏州净化设备有限公司)；MA200 型倒置显微镜 (日本 Nikon 公司)；OLS3100 型激光共聚焦显微镜 (日本 Olympus 公司)；Nano Drop One 型核酸测定仪、PIKO-REAL96 型实时定量 PCR 仪 (美国 Thermo 公司)；DYCZ-24A/B、DYCZ-20G 和 DYCZ-40S 型电泳槽 (北京六一生物科技有限公司)；Tanon MINI Space2000 型凝胶成像分析系统 (上海天能生命科学有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养和转染

GES-1 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养液，于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。隔天更换 1 次培养液，待细胞生长至对数生长期时，用胰酶消化细胞，制成细胞悬液后，接种于培养板中备用。

miR-210 mimic、mimic NC、miR-210 inhibitor、inhibitor NC、pcDNA-NF- $\kappa$ B、NF- $\kappa$ B siRNA、pcDNA-NLRP3 和 NLRP3 siRNA 由上海吉玛制药技术有限公司构建，其序列为 miR-210 mimic：上游引物 5'-CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA-3'，下游引物 5'-AGCCGCUGUCACACGCACAGUU-3'；mimic NC：上游引物 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'，下

游引物 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'; miR-210 inhibitor: 5'-UCAGCCGCUGUCACACG-CACAG-3'; inhibitor NC: 5'-CAGUACUUUUGU-GUAGUACAA-3'; pcDNA-NLRP3: 上游引物 5'-GGGAAGCTTATGGGGTGGCCGAGCCGCC-3', 下游引物 5'-GGGCTCGAGCTACTGGCCCCG-TGCTG-3'; siRNA NF- $\kappa$ B: 上游引物 5'-CCAUUGCGGACAUGGACUUTT-3', 下游引物 5'-AAGUCCAUGUCCGCAAUGGTT-3'; siRNA NLRP3: 上游引物 5'-CCGCAUGAGCUUCGUCA-AATT-3', 下游引物 5'-UUUGACGAAGCUAUGC-GGTT-3'。根据说明书方法进行转染, 待 GES-1 细胞生长至密度达 70%~80%时, 在无血清条件下, 使用 Lipofectamine™ 3000 试剂将 pcDNA-NF- $\kappa$ B、pcDNA-NLRP3、miR-210 mimic、miR-210 inhibitor 或相应的阴性对照 (mimic NC、inhibitor NC) 转染到细胞中, 转染 24 h 后换成完全培养基。转染细胞在常规培养基中培养, 转染 48 h 后用于后续实验。

## 2.2 MTT 法检测 CST 和 MNNG 对 GES-1 细胞活力的影响

GES-1 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后, 用 CST (0~100  $\mu$ g/mL) 分别处理 24、48、72 h, 或用 MNNG (0~120  $\mu$ mol/L) 处理 24 h, 每孔加入 20  $\mu$ L MTT 溶液, 继续培养 4 h 后用 200  $\mu$ L 移液枪吸尽培养液, 每孔加入 150  $\mu$ L DMSO, 于微孔振荡板上以 500 r/min 振荡 5 min, 采用酶标仪在 490 nm 波长处测定吸光度 ( $A$ ) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

## 2.3 MTT 法检测 CST 对 MNNG 诱导的 GES-1 细胞损伤的保护作用

GES-1 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后, 加入 20  $\mu$ mol/L MNNG 避光处理 2 h, 然后加入 CST (0~80  $\mu$ g/mL) 共同孵育 48 h。每孔加入 20  $\mu$ L MTT 溶液, 按“2.2”项下方法检测细胞存活率。

## 2.4 流式细胞术检测细胞焦亡

根据细胞活力测定的结果, 选择不同质量浓度 (2.5、5.0、10.0  $\mu$ g/mL) 的 CST 进行进一步研究。细胞分组如下: 未经处理的细胞作为对照组; 模型组细胞用 20  $\mu$ mol/L MNNG 预处理 2 h, 然后用含 10%胎牛血清的新鲜培养基孵育 48 h, 最后加入 10  $\mu$ mol/L NIG 刺激 1 h<sup>[2]</sup>; CST (2.5、5.0、10.0  $\mu$ g/mL)

组细胞用 20  $\mu$ mol/L MNNG 预处理 2 h, 然后分别用不同浓度的 CST 处理细胞 48 h, 最后加入 10  $\mu$ mol/L NIG 刺激 1 h; CST (10  $\mu$ g/mL) 单独给药组细胞仅用 CST 处理 48 h, 无 MNNG 和 NIG 刺激。收集细胞, 加入 200  $\mu$ L 结合缓冲液重悬细胞, 加入 cleaved Caspase-1 抗体, 室温避光孵育 20 min; 加入 20  $\mu$ L PI 和 Annexin V-FITC/PI 染色工作液, 30 min 内用流式细胞仪检测细胞焦亡率, 即 cleaved Caspase-1 (+) /PI (+) 占总细胞的百分比<sup>[26-28]</sup>。

细胞按“2.1”项下方法转染, 用 CST (10  $\mu$ g/mL) 或与 miR-210 mimic、miR-210 inhibitor、NF- $\kappa$ B siRNA、NLRP3 siRNA 联合处理后, 采用流式细胞术检测细胞焦亡率。

## 2.5 比色法和 ELISA 检测细胞上清液中 LDH 和细胞因子水平

GES-1 细胞以  $2 \times 10^4$  个/孔接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后, 按照“2.4”项下方法进行分组和处理, 收集上清液, 按照试剂盒说明书检测细胞上清液中 LDH 和 IL-1 $\beta$ 、IL-4、IL-6、IL-10、IL-18、TNF- $\alpha$  水平。

细胞按“2.1”项下方法转染, 用 CST (10  $\mu$ g/mL) 或与 miR-210 mimic、miR-210 inhibitor、NF- $\kappa$ B siRNA、NLRP3 siRNA 联合处理后, 检测细胞上清液中 LDH 和 IL-1 $\beta$ 、IL-4、IL-6、IL-10、IL-18、TNF- $\alpha$  水平。

## 2.6 荧光探针法检测细胞中 ROS 水平

GES-1 细胞以  $5 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后, 按照“2.4”项下方法用 CST (10  $\mu$ g/mL) 或与 miR-210 mimic、miR-210 inhibitor、NF- $\kappa$ B siRNA、NLRP3 siRNA 联合处理后, 收集细胞, 按照 DCFH-DA 检测试剂盒说明书检测各组细胞中 ROS 水平<sup>[22]</sup>。

## 2.7 比色法检测细胞中氧化应激指标水平

按照“2.4”项下方法进行分组和处理, 收集细胞, 经超声破碎仪破碎后, 离心收集上清液, 按照试剂盒说明书测定 CAT、GSH、MPO、SOD、T-AOC 活性和 MDA 水平。

## 2.8 NF- $\kappa$ B p65 亚细胞定位测定

将细胞接种于 24 孔板中, 按照“2.4”项下方法进行分组和处理, 用 PBS 浸洗后, 加入 4%多聚甲醛固定, 随后用 0.5% Triton X-100 室温通透 3 min, 洗涤后加入 5%牛血清白蛋白, 室温封闭 2 h; 加入用牛血清白蛋白配制的 NF- $\kappa$ B p65 一抗 (1:

100), 4 °C 孵育过夜; PBS 洗涤后加入荧光二抗(1 : 100), 室温孵育 2 h, DAPI 染核后, 置于激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

### 2.9 NLRP3 炎症小体共定位分析

按照“2.4”项下方法进行分组和处理, 经 PBS 洗涤、4%多聚甲醛固定、0.3% Triton X-100 处理后, 加入用 PBST 配制的一抗(1 : 60), 4 °C 孵育过夜; TBST 洗涤, 加入荧光二抗(1 : 5 000), 室温孵育 1 h; PBS 洗涤后加入 NucSpot® Live 650 Nuclear Stain 染色液浸染细胞核 10 min, 弃去染液, 用滤纸吸干水分后立即滴加抗荧光淬灭剂封片, 置于激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

### 2.10 双荧光素酶报告基因实验

将转染后的 GES-1 细胞接种在 48 孔板中, 并在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。当细胞融合为 1 层时进行双荧光素酶报告基因检测, 将 NF-κB 野生型(NF-κB-WT)、NF-κB 突变型(NF-κB-MUT) 分别与 miR-NC、miR-210 mimic 共转染细胞, 培养 48 h, 收

集细胞至 1.5 mL 离心管内, 按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书操作, 在每个离心管内加入 150~200 μL 细胞裂解液, 充分吹打混匀后于室温放置 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 吸取 100 μL 上清液至新的 1.5 mL 离心管中, 加入 100 μL 提前配制的海肾荧光素酶检测工作液, 吹打混匀后立即在单管型多功能检测仪上检测荧光值; 取出样品管, 向其中加入 100 μL 萤火虫荧光素酶检测工作液, 吹打混匀后立即检测荧光值, 统计海肾荧光素酶/萤火虫荧光素酶活性值并进行归一化处理。

### 2.11 qRT-PCR 法检测细胞中 miR-210、NF-κB、NLRP3 mRNA 表达

按照“2.4”项下方法进行分组和处理, 收集细胞, 按照 TRIzol 试剂盒说明书提取总 RNA, 用 PrimeScript RT 将其反转录为 cDNA 后, 用 SYBR 荧光染料、高效 PCR 酶在实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增, 以 U6 或 GAPDH 作为内参, 采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算目的基因的表达量, 引物序列见表 1<sup>[14,23]</sup>。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	上游引物序列 (5'-3')	下游引物序列 (5'-3')
miR-210	GAGTGTCAGTGGTTTTACCCCT	GCAGGGTCCGAGGTATTC
NF-κB	ACTGTGAGGATGGGATCTGC	TCTGTCATTCGTGCTTCCAG
NLRP3	GCACTGTGTTTGGAGTGGGTTTCA	CCCCACAGTGGATATAGAACAGA
U6	TGCGGGTGCTCGCTTCGGCAGC	CCAGTGCAGGGTCCGAGGT
GAPDH	GACAACCTTGGCATCGTGGA	ATGCAGGGATGATGTTCTGG

### 2.12 Western blotting 检测细胞中 TLR4/NF-κB/NLRP3 炎症小体信号通路相关蛋白表达

细胞以 3×10<sup>5</sup> 个/孔接种于 12 孔板中, 培养 24 h 后, 按照“2.4”项下方法进行分组和处理, 弃去培养基, 用预冷的 PBS 轻柔漂洗 2 次, 按照胞质/胞核蛋白提取试剂盒说明书, 分别提取细胞中胞质/胞核蛋白, 采用 BCA 法检测蛋白浓度。取 5×SDS 上样缓冲液和 40 μg 蛋白上清(体积比 1 : 4) 混匀并高温变性后, 蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂牛奶在室温下封闭 1.5 h, 分别加入 ASC(1 : 800)、GSDMD-N(1 : 800)、GSDMD(1 : 800)、胞质 NF-κB p65(1 : 1 000)、核 NF-κB p65(1 : 1 000)、NLRP3(1 : 1 000)、Caspase-1(1 : 1 000)、pro-Caspase-1(1 : 1 000)、NEK7(1 : 1 000)、TXNIP(1 : 1 000)、pro-IL-18(1 : 1 000)、pro-IL-1β(1 : 1 000)、β-actin(1 : 1 000)、GAPDH(1 : 1 000)

一抗, 4 °C 孵育过夜; 室温复温 30 min 后, 加入 HRP 标记的二抗(1 : 5 000), 室温孵育 1 h。TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 按 1 : 1 比例混合 ECL 化学发光试剂 A 液与 B 液, 均匀滴加至膜上, 使用化学发光成像系统采集图像<sup>[23,29]</sup>。采用 Image J 软件对目标条带的灰度值进行分析, 以 β-actin 或 GAPDH 作为内参计算目标蛋白的相对表达量。

### 2.13 统计学分析

采用 SPSS 27.0 软件进行统计分析, 实验结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多样本均数比较采用 One-way ANOVA 分析, 通过 Graphpad Prism 9 软件绘图。

## 3 结果

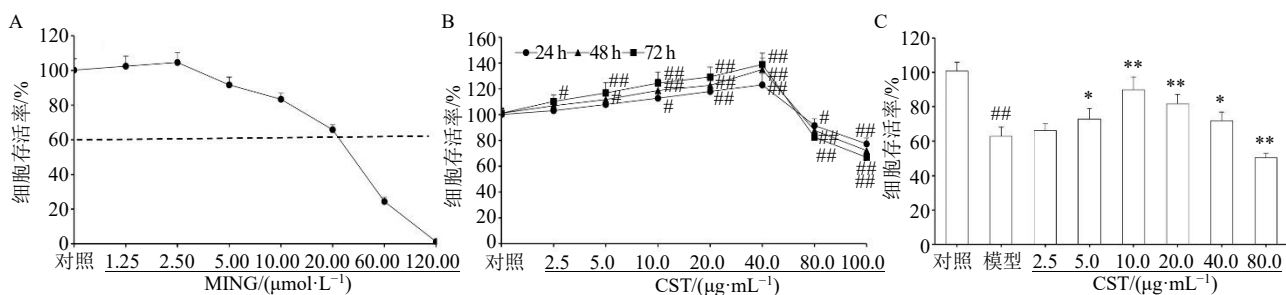
### 3.1 MNNG 和 CST 对 GES-1 细胞活力的影响

如图 1-A 所示, 1.25~120.00 μmol/L MNNG 处理 GES-1 细胞 24 h, 细胞存活率呈剂量相关性地降低, 其中 20 μmol/L MNNG 显著抑制细胞活力且细胞存活率高于 60%, 因此采用 20 μmol/L MNNG 诱

导 GES-1 细胞损伤。与文献报道<sup>[2,30]</sup>一致。如图 1-B 所示, 2.5~40.0 μmol/L CST 处理 GES-1 细胞 24、48、72 h, 细胞存活率呈剂量相关性地升高; 而 80.0、100.0 μg/mL 的 CST 可显著降低 GES-1 细胞存活率 ( $P < 0.05$ 、0.01), 结合课题组前期研究结果<sup>[19-20]</sup>, 选择 CST 作用 GES-1 细胞 48 h 进行后续研究。采用 20 μmol/L MNNG 刺激 GES-1 细胞 2 h 后, 给予 2.5~80.0 μg/mL CST 处理 48 h 检测细胞活力, 结果如图 1-C 所示, 与模型组比较, 5.0~40.0 μg/mL CST 显著提高细胞存活率 ( $P < 0.05$ 、0.01), 其中 10.0 μg/mL CST 作用最佳。因此, 采用 2.5、5.0、10.0 μg/mL CST 进行后续研究。

### 3.2 CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 GES-1 细胞焦亡、LDH 和细胞因子释放的影响

如图 2-A 所示, 与对照组比较, 模型组细胞焦亡率显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, CST (2.5、5.0、10.0 μg/mL) 组细胞焦亡率显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01)。如图 2-B 所示, 与对照组比较, 模型组细胞 LDH 释放率显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, CST (2.5、5.0、10.0 μg/mL) 组细胞 LDH 释放率显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01)。如图 2-C 所示, 与对照组比较, 模型组细胞上清液中 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-18 水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), IL-4、IL-10 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, CST (2.5、



A-不同浓度 MNNG 处理 24 h 对 GES-1 细胞活力的影响; B-不同质量浓度 CST 处理 24、48、72 h 对 GES-1 细胞活力的影响; C-不同质量浓度的 CST 处理 48 h 对 MNNG 诱导的 GES-1 细胞活力的影响; 与对照组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ , 下图同。A-effect of different concentrations of MNNG treated for 24 h on viability of GES-1 cells; B-effect of different concentrations of CST treated for 24, 48, 72 h on viability of GES-1 cells; C-effect of different concentrations of CST treated for 48 h on viability of MNNG-induced GES-1 cells; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs model group, same as below figures.

图 1 MNNG 和 CST 对 GES-1 细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 1 Effects of MNNG and CST on viability of GES-1 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

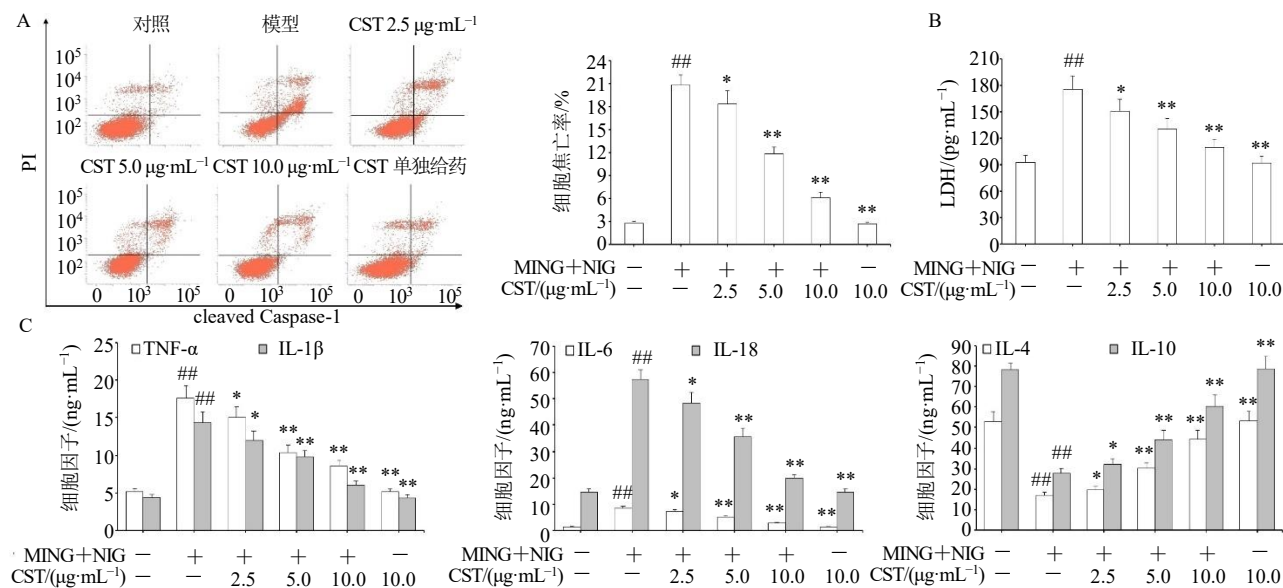


图 2 CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 GES-1 细胞焦亡 (A)、LDH (B) 和细胞因子 (C) 释放的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 2 Effect of CST on pyroptosis (A), release of LDH (B) and cytokines in GES-1 cells induced by MNNG and NIG

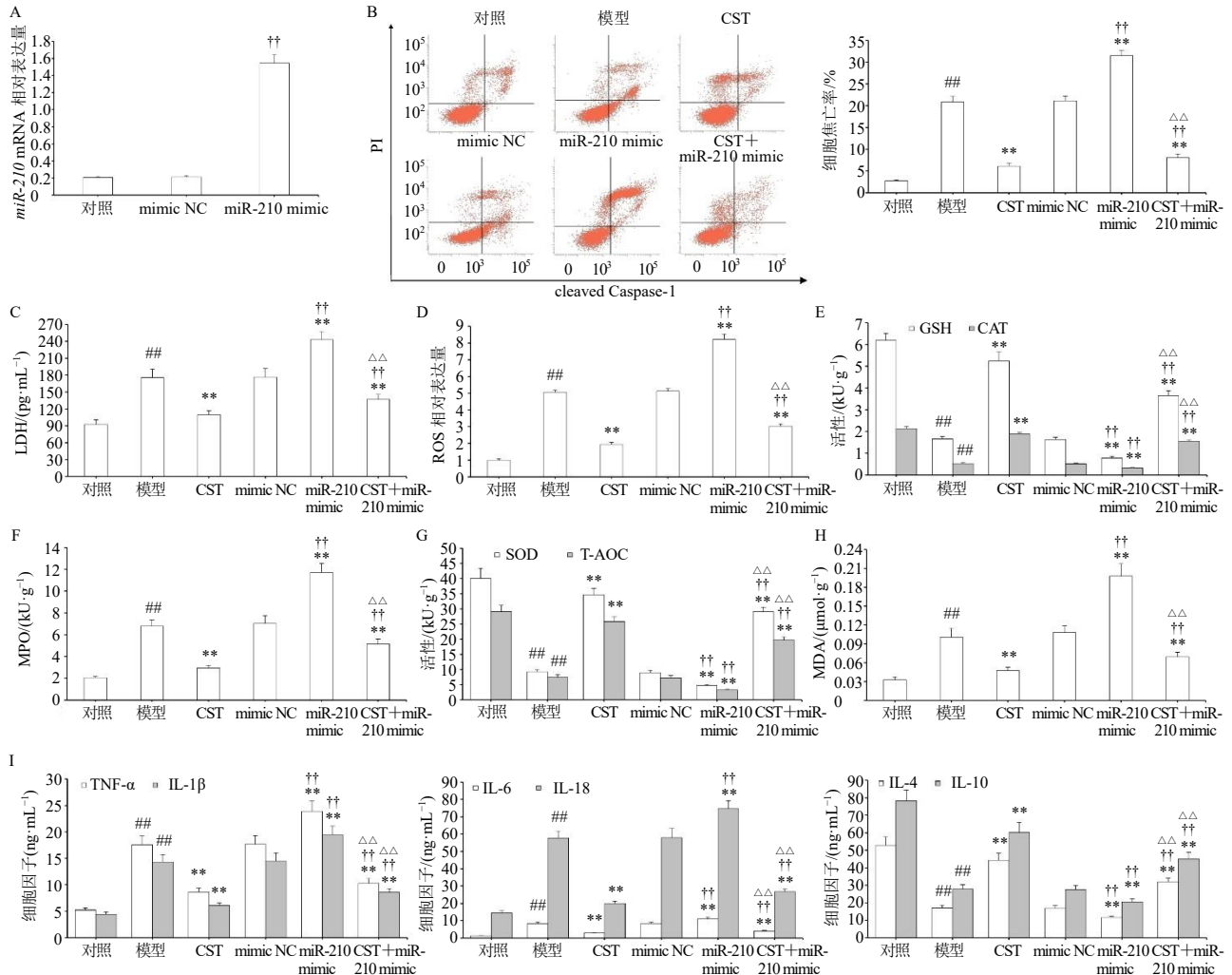
( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

5.0、10.0 μg/mL) 组细胞上清液中 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-18 水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01), 上清液中 IL-4、IL-10 水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、0.01)。

### 3.3 CST 通过下调 miR-210 和调节 NF-κB/NLRP3 炎症小体信号通路来抑制 MNNG 和 NIG 诱导的 GES-1 细胞焦亡

通过 qRT-PCR 检测 GES-1 细胞及转染 miR-

210 mimic 后细胞中 *miR-210* mRNA 表达量, 发现转染 *miR-210* mimic 后细胞中 *miR-210* mRNA 表达显著高于 mimic NC 组 ( $P < 0.01$ , 图 3-A), 表明 *miR-210* mimic 转染成功升高了 *miR-210* mRNA 表达。为了研究 CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 GES-1 细胞损伤的保护作用和潜在机制, 分别通过流式细胞术和 ELISA 检测 CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的



A-miR-210 mimic 转染 GES-1 细胞中 *miR-210* mRNA 的表达; B-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 *miR-210* mimic 转染 GES-1 细胞焦亡的影响; C-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 *miR-210* mimic 转染 GES-1 细胞 LDH 释放的影响; D-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 *miR-210* mimic 转染 GES-1 细胞中 ROS 水平的影响; E~H-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 *miR-210* mimic 转染 GES-1 细胞中氧化应激水平的影响; I-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 *miR-210* mimic 转染 GES-1 细胞上清液中细胞因子水平的影响; 与 mimic NC 或 inhibitor NC 或 siRNA NC 组比较: \* $P < 0.05$ ; † $P < 0.01$ ; †† $P < 0.01$ ; 与 CST 组比较: Δ $P < 0.01$ , 下同。

A-*miR-210* mRNA expression in *miR-210* mimic transfected GES-1 cells; B-effect of CST on pyroptosis of *miR-210* mimic transfected GES-1 cells induced by MNNG and NIG; C-effect of CST on LDH release in *miR-210* mimic transfected GES-1 cells induced by MNNG and NIG; D-effect of CST on ROS level in *miR-210* mimic transfected GES-1 cells induced by MNNG and NIG; E~H-effect of CST on oxidative stress level in *miR-210* mimic transfected GES-1 cells induced by MNNG and NIG; I-effect of CST on cytokine levels in supernatant of *miR-210* mimic transfected GES-1 cells induced by MNNG and NIG; † $P < 0.01$  vs mimic NC or inhibitor NC or siRNA NC group; †† $P < 0.01$  vs mimic NC or inhibitor NC or siRNA NC group; Δ $P < 0.01$  vs CST group, same as below figures.

图 3 CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 *miR-210* mimic 转染 GES-1 细胞焦亡、LDH 释放、氧化应激和上清液中细胞因子水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 3 Effect of CST on pyroptosis, LDH release, oxidative stress and cytokine levels in supernatant of *miR-210* mimic transfected GES-1 cells induced by MNNG and NIG ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

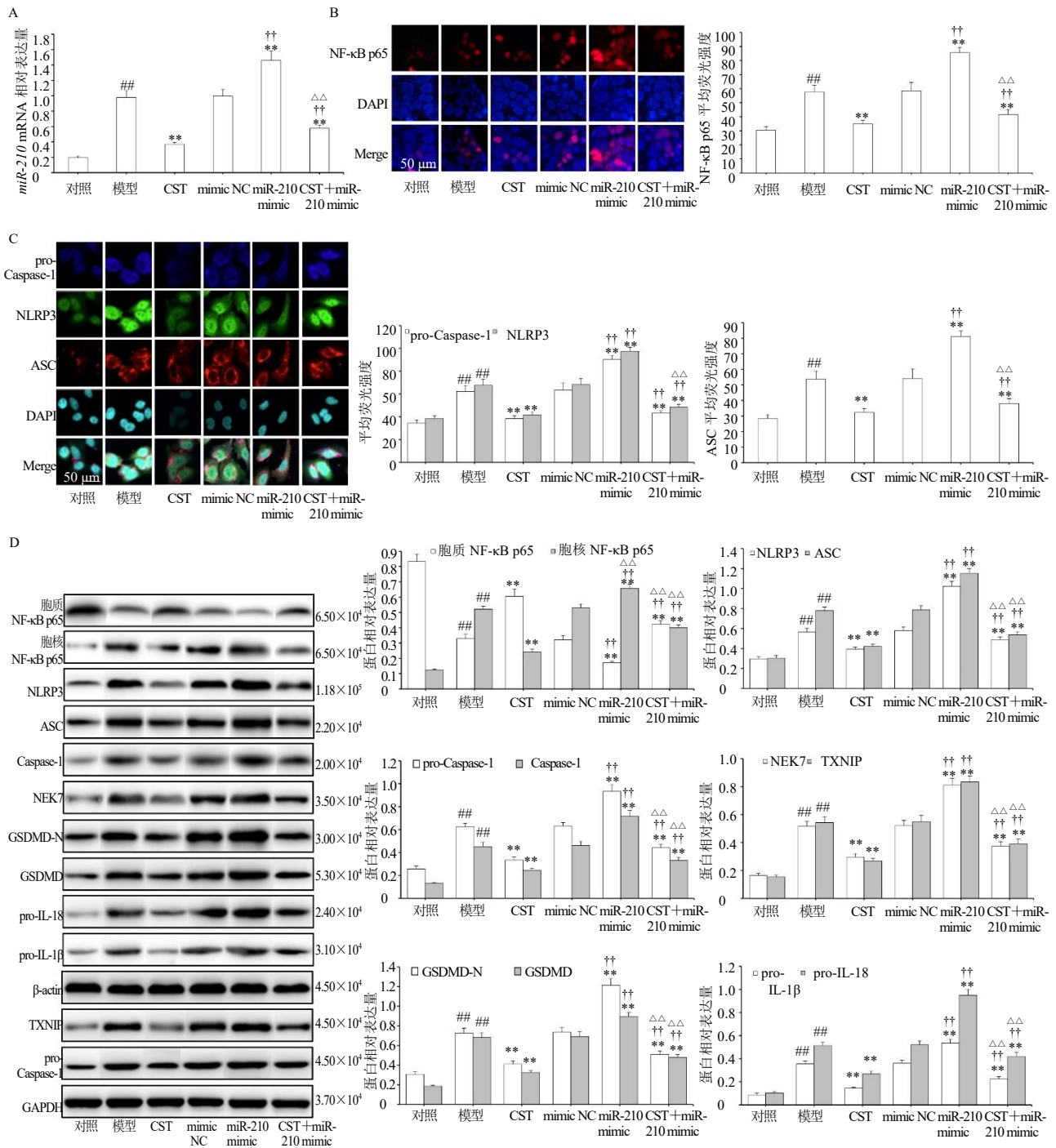
miR-210 mimic 转染 GES-1 细胞焦亡和 LDH 释放的影响。如图 3-B、C 所示,与对照组比较,模型组细胞焦亡率和 LDH 释放显著升高 ( $P<0.01$ );与模型组比较,CST 组和 CST+miR-210 mimic 组细胞焦亡率和 LDH 释放显著降低 ( $P<0.01$ ),miR-210 mimic 组细胞焦亡率和 LDH 释放进一步增加 ( $P<0.01$ );与 mimic NC 组比较,miR-210 mimic 组细胞焦亡率和 LDH 释放显著增加 ( $P<0.01$ ),CST+miR-210 mimic 组细胞焦亡率和 LDH 释放显著降低 ( $P<0.01$ )。氧化应激指标和细胞因子含量的检测结果如图 3-D~I 所示,与对照组比较,模型组细胞中 ROS、MPO、MDA 和细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18、TNF- $\alpha$  水平显著升高 ( $P<0.01$ ),细胞中 CAT、GSH、SOD、T-AOC 和细胞上清液中 IL-4、IL-10 水平显著降低 ( $P<0.01$ );与模型组比较,CST 组和 CST+miR-210 mimic 组细胞中 ROS、MPO、MDA 和细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18、TNF- $\alpha$  水平显著降低 ( $P<0.01$ ),细胞中 CAT、GSH、SOD、T-AOC 和细胞上清液中 IL-4、IL-10 水平显著升高 ( $P<0.01$ );miR-210 mimic 组细胞中 ROS、MPO、MDA 和细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18、TNF- $\alpha$  水平进一步升高 ( $P<0.01$ ),细胞中 CAT、GSH、SOD、T-AOC 和细胞上清液中 IL-4、IL-10 水平进一步降低 ( $P<0.01$ )。与 mimic NC 组比较,miR-210 mimic 组细胞中 ROS、MPO、MDA 和细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18、TNF- $\alpha$  水平显著升高 ( $P<0.01$ ),CST+miR-210 mimic 组细胞中 ROS、MPO、MDA 和细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18、TNF- $\alpha$  水平显著降低 ( $P<0.01$ )。

为了探究 miR-210 是否参与了 CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 GES-1 细胞损伤的保护作用,进一步分析各组 miR-210 mRNA 表达情况。如图 4-A 所示,与对照组比较,模型组细胞中 miR-210 mRNA 表达水平显著升高 ( $P<0.01$ );与模型组比较,CST 组 miR-210 mRNA 表达显著降低 ( $P<0.01$ );与 mimic NC 组相比,miR-210 mimic 组 miR-210 mRNA 表达进一步增加 ( $P<0.01$ );与 mimic NC 组比较,CST+miR-210 mimic 组 miR-210 mRNA 表达显著降低 ( $P<0.01$ );与 CST 组比较,CST+miR-210 mimic 组 miR-210 mRNA 表达显著升高 ( $P<0.01$ ),表明 CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 GES-1 细胞损伤的保护作用与抑制 miR-210 表达有关。

NF- $\kappa$ B/NLRP3 炎症小体信号通路是细胞焦亡

调控的中心,该通路被激活会导致炎症介质、炎症因子大量分泌和细胞焦亡<sup>[2,23]</sup>。免疫荧光结果(图 4-B)显示,模型组 NF- $\kappa$ B p65 核移位增加 ( $P<0.01$ ),miR-210 mimic 转染可进一步促进 NF- $\kappa$ B p65 核移位 ( $P<0.01$ );相反,CST 组和 CST+miR-210 mimic 组 NF- $\kappa$ B p65 核移位被显著抑制 ( $P<0.01$ );此结果与 Western blotting 结果一致(图 4-D),模型组细胞核 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达升高、胞质 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达降低,miR-210 mimic 转染可进一步升高胞核 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达、降低胞质 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达;CST 组和 CST+miR-210 mimic 组胞核 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达显著降低、胞质 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达显著升高,表明 miR-210 可以发挥调控 NF- $\kappa$ B 的作用。

激活的 NF- $\kappa$ B 可促进下游的 NLRP3、ASC、pro-Caspase-1 共定位和 NLRP3 炎症小体形成,引起 IL-1 $\beta$  和 IL-18 等促炎细胞因子释放增加、进一步引起炎症的级联放大,导致胃黏膜上皮细胞焦亡,进而推动 CAG 发生发展<sup>[2,17-18]</sup>。如图 4-C 所示,与对照组比较,模型组 NLRP3、ASC、Caspase-1 荧光强度显著增加 ( $P<0.01$ ),3 种荧光叠加部分呈粉白色,出现了高度重合;miR-210 mimic 组 NLRP3 炎症小体共定位进一步增加 ( $P<0.01$ ),表明 MNNG+NIG 诱导和 miR-210 mimic 转染促进了 GES-1 细胞 NLRP3 炎症小体共定位。相反,CST 组和 CST+miR-210 mimic 组 NLRP3 炎症小体共定位被显著抑制 ( $P<0.01$ )。Western blotting 结果(图 4-D)显示,与对照组比较,模型组细胞中 TXNIP、NEK7、NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N、pro-IL-1 $\beta$ 、pro-IL-18 蛋白表达水平显著升高 ( $P<0.01$ );与 mimic NC 组比较,miR-210 mimic 组 TXNIP、NEK7、NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N、pro-IL-1 $\beta$ 、pro-IL-18 蛋白表达进一步增加 ( $P<0.01$ );与模型组和 mimic NC 组比较,CST 组和 CST+miR-210 mimic 组 TXNIP、NEK7、NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N、pro-IL-1 $\beta$ 、pro-IL-18 蛋白表达水平显著降低 ( $P<0.01$ ),此结果与细胞上清液中细胞因子水平检测一致。以上结果表明,CST 可通过降低 miR-210/NF- $\kappa$ B/NLRP3 炎症小体信号通路相关基因和蛋白表达,进而抑制 MNNG 和 NIG 诱导的 GES-1 细胞炎症因子分泌和细胞焦亡。



A-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 miR-210 mimic 转染 GES-1 细胞中 miR-210 mRNA 表达的影响；B-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 miR-210 mimic 转染 GES-1 细胞 NF-κB p65 核移位的影响 (×200)；C-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 miR-210 mimic 转染 GES-1 细胞 NLRP3 炎症小体共定位的影响 (×200)；D-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 miR-210 mimic 转染 GES-1 细胞中 NF-κB/NLRP3 炎症小体信号通路相关蛋白表达的影响。

A-effect of CST on miR-210 mRNA expression in miR-210 mimic transfected GES-1 cells induced by MNNG and NIG; B-effect of CST on NF-κB p65 nuclear translocation in miR-210 mimic transfected GES-1 cells induced by MNNG and NIG (× 200); C-effect of CST on NLRP3 inflammasome colocalization in miR-210 mimic transfected GES-1 cells induced by MNNG and NIG (× 200); D-effect of CST on expressions of NF-κB/NLRP3 inflammasome signaling pathway related proteins in miR-210 mimic transfected GES-1 cells induced by MNNG and NIG.

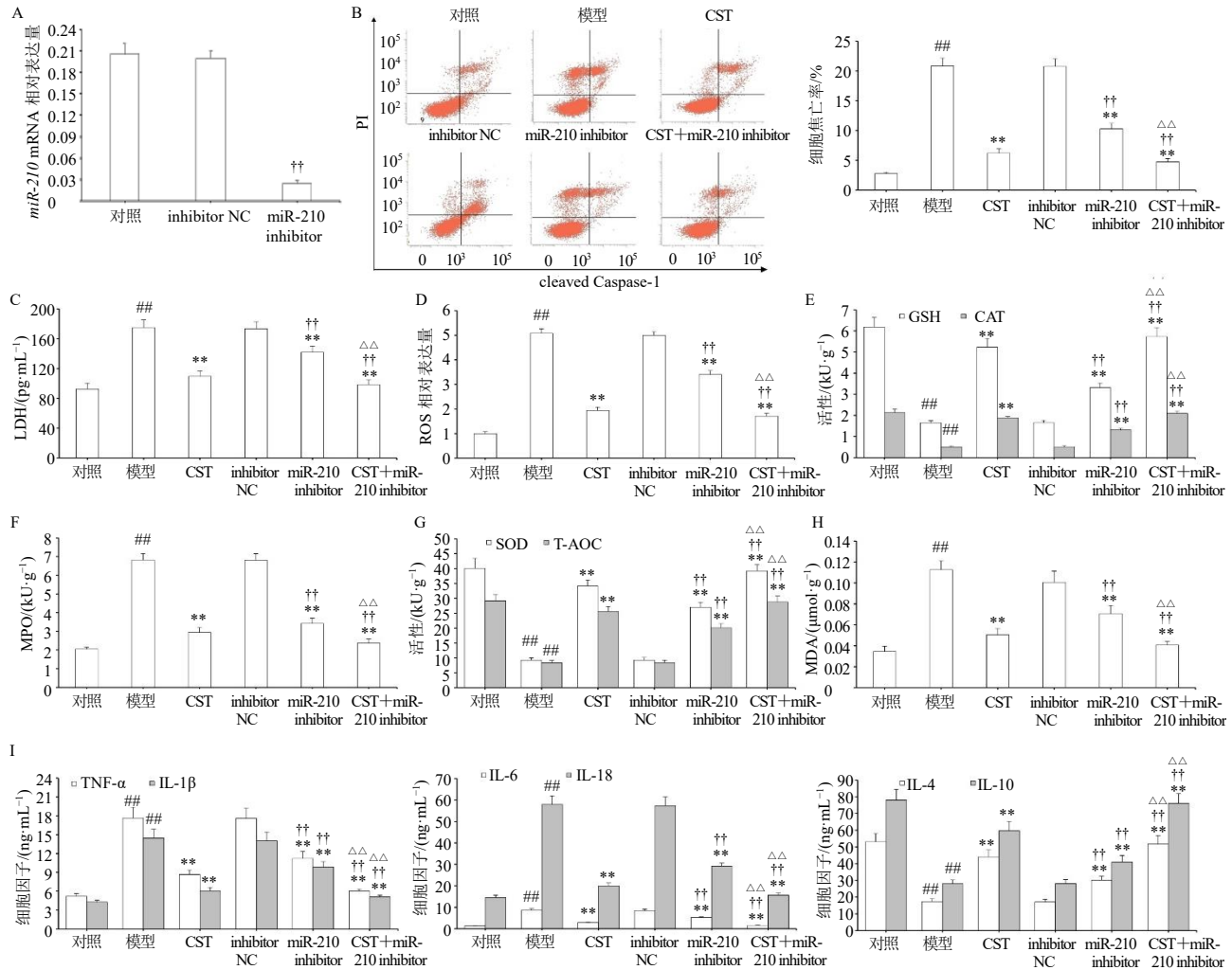
图 4 CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 miR-210 mimic 转染 GES-1 细胞中 miR-210/NF-κB/NLRP3 炎症小体信号通路相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 4 Effect of CST on expressions of miR-210/NF-κB/NLRP3 inflammasome signaling pathway related proteins in miR-210 mimic transfected GES-1 cells induced by MNNG and NIG ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

### 3.4 CST 通过下调 miR-210 并靶向 NF-κB 基因来抑制 NF-κB/NLRP3 炎症小体信号通路

通过 qRT-PCR 检测 GES-1 细胞及转染 miR-210 inhibitor 后细胞中 *miR-210* mRNA 表达量,发现转染 miR-210 inhibitor 后细胞中 *miR-210* mRNA 表达显著低于 inhibitor NC 组 ( $P < 0.01$ , 图 5-A),表明 miR-210 inhibitor 转染成功降低了 *miR-210* mRNA 表达。为了进一步证实 miR-210 是否延伸到 MNNG 和 NIG

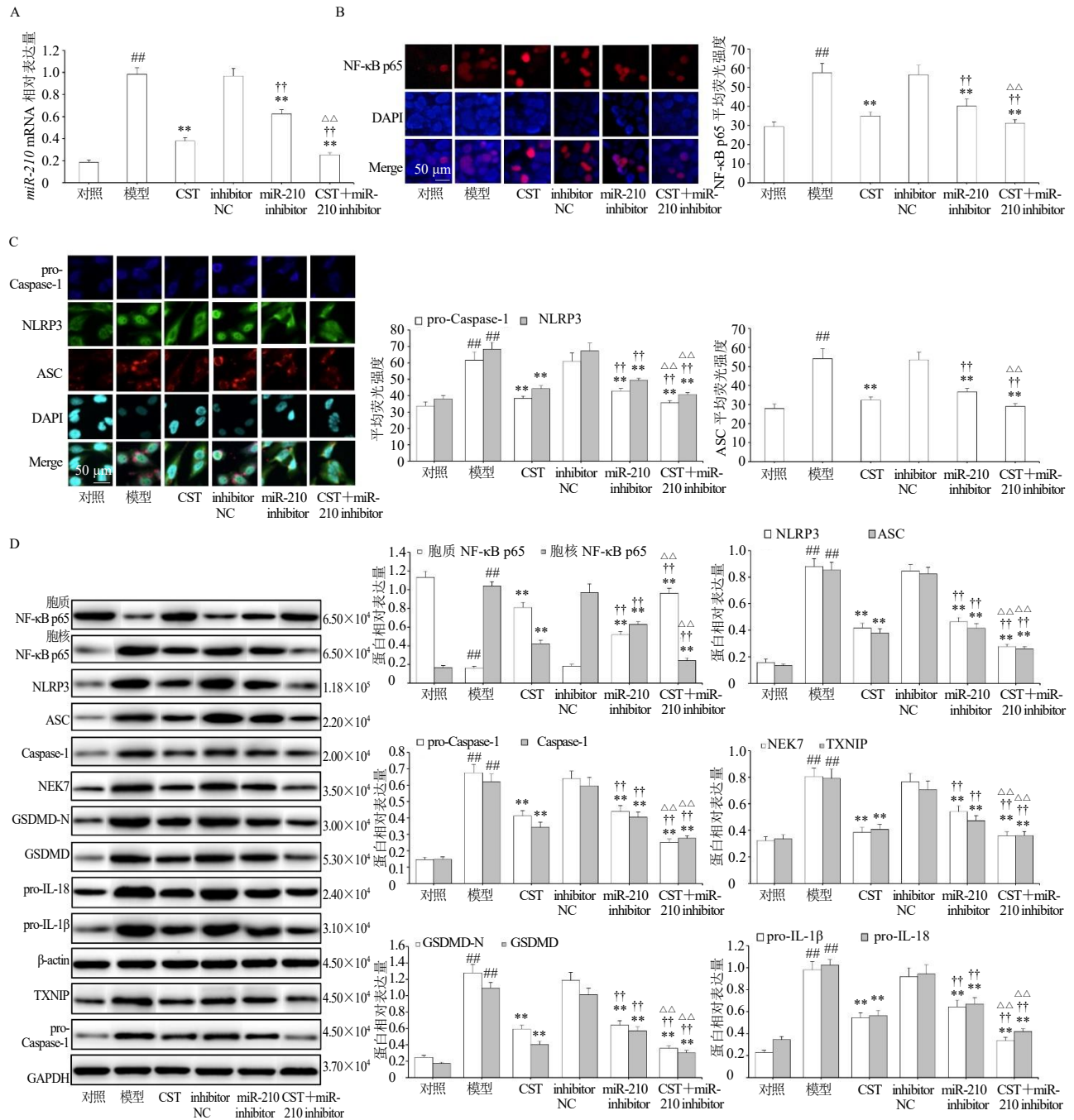
诱导的 GES-1 细胞焦亡,在 GES-1 细胞转染 miR-210 inhibitor 敲低 *miR-210* 基因后,检测细胞焦亡、LDH 释放、氧化应激、细胞因子水平和 NF-κB/NLRP3 炎症小体通路相关蛋白表达。如图 5-B~I 和图 6-A 所示,在 miR-210 inhibitor 转染的 MNNG + NIG 损伤 GES-1 细胞中,miR-210 敲低不仅显著抑制 MNNG 和 NIG 诱导的 GES-1 细胞焦亡和 LDH 释放 ( $P < 0.01$ ),显著升高细胞中 CAT、GSH、SOD、



A-miR-210 inhibitor 转染 GES-1 细胞中 *miR-210* mRNA 的表达; B-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 miR-210 inhibitor 转染 GES-1 细胞焦亡的影响; C-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 miR-210 inhibitor 转染 GES-1 细胞 LDH 释放的影响; D-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 miR-210 inhibitor 转染 GES-1 细胞中 ROS 水平的影响; E~H-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 miR-210 inhibitor 转染 GES-1 细胞中氧化应激水平的影响; I-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 miR-210 inhibitor 转染 GES-1 细胞上清液中细胞因子水平的影响。  
 A-miR-210 mRNA expression in miR-210 mimic transfected GES-1 cells; B-effect of CST on pyroptosis of miR-210 inhibitor transfected GES-1 cells induced by MNNG and NIG; C-effect of CST on LDH release in miR-210 inhibitor transfected GES-1 cells induced by MNNG and NIG; D-effect of CST on ROS level in miR-210 inhibitor transfected GES-1 cells induced by MNNG and NIG; E~H-effect of CST on oxidative stress level in miR-210 inhibitor transfected GES-1 cells induced by MNNG and NIG; I-effect of CST on cytokine levels in supernatant of miR-210 inhibitor transfected GES-1 cells induced by MNNG and NIG.

图 5 CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 miR-210 inhibitor 转染 GES-1 细胞焦亡、LDH 释放、氧化应激和上清液中细胞因子水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 5 Effect of CST on pyroptosis, LDH release, oxidative stress and cytokine levels in supernatant of miR-210 inhibitor transfected GES-1 cells induced by MNNG and NIG ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )



A-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 miR-210 inhibitor 转染 GES-1 细胞中 miR-210 mRNA 表达的影响；B-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 miR-210 inhibitor 转染 GES-1 细胞 NF-κB p65 核移位的影响 (×200)；C-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 miR-210 inhibitor 转染 GES-1 细胞 NLRP3 炎症小体共定位的影响 (×200)；D-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 miR-210 inhibitor 转染 GES-1 细胞中 NF-κB/NLRP3 炎症小体信号通路相关蛋白表达的影响。

A-effect of CST on miR-210 mRNA expression in miR-210 inhibitor transfected GES-1 cells induced by MNNG and NIG; B-effect of CST on NF-κB p65 nuclear translocation in miR-210 inhibitor transfected GES-1 cells induced by MNNG and NIG (×200); C-effect of CST on NLRP3 inflammasome co-localization in miR-210 inhibitor transfected GES-1 cells induced by MNNG and NIG (×200); D-effect of CST on expressions of NF-κB/NLRP3 inflammasome signaling pathway related proteins in miR-210 inhibitor transfected GES-1 cells induced by MNNG and NIG.

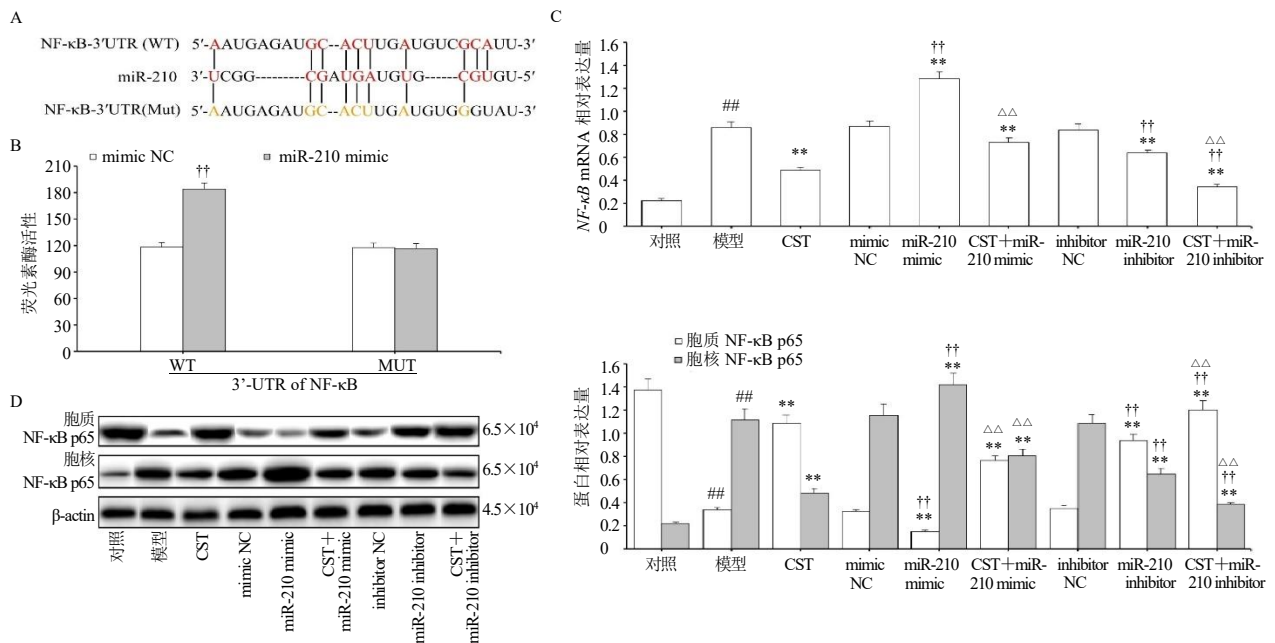
图 6 CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 miR-210 inhibitor 转染 GES-1 细胞中 miR-210/NF-κB/NLRP3 炎症小体信号通路相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 6 Effect of CST on expressions of miR-210/NF-κB/NLRP3 inflammasome signaling pathway related proteins in miR-210 inhibitor transfected GES-1 cells induced by MNNG and NIG ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

T-AOC 和上清液中 IL-4、IL-10 水平 ( $P<0.01$ ); 而且降低细胞中 ROS、MPO、MDA 和细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18、TNF- $\alpha$  水平 ( $P<0.01$ ), 下调 *miR-210* mRNA 表达 ( $P<0.01$ )。CST 与 *miR-210* inhibitor 联用后, 可进一步抑制细胞焦亡和 LDH 释放 ( $P<0.01$ ), 升高细胞中 CAT、GSH、SOD、T-AOC 和细胞上清液中 IL-4、IL-10 水平 ( $P<0.01$ ); 而且进一步降低细胞中 ROS、MPO、MDA 和上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18、TNF- $\alpha$  水平 ( $P<0.01$ ), 下调 *miR-210* mRNA 表达 ( $P<0.01$ )。免疫荧光和 Western blotting 结果(图 6-B~D)显示, 与模型组或 inhibitor NC 组比较, 用 *miR-210* inhibitor 敲低 MNNG+NIG 损伤 GES-1 细胞后, NF- $\kappa$ B p65 核移位、NLRP3 炎症小体共定位和胞核 NF- $\kappa$ B p65、TXNIP、NEK7、NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N、pro-IL-1 $\beta$ 、pro-IL-18 蛋白表达水平显著降低 ( $P<0.01$ ), 胞质 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平显著升高 ( $P<0.01$ ); 给予 CST 干预后可进一步抑制 NF- $\kappa$ B p65 核移位、NLRP3 炎症小体共定位 ( $P<0.01$ ), 降低胞核 NF- $\kappa$ B p65、TXNIP、NEK7、NLRP3、ASC、

pro-Caspase-1、Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N、pro-IL-1 $\beta$ 、pro-IL-18 蛋白表达 ( $P<0.01$ ), 升高胞质 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达 ( $P<0.01$ )。

通过上述分析发现 *miR-210* 在 MNNG+NIG 损伤的 GES-1 细胞中对 NF- $\kappa$ B 进行正调控。然而, NF- $\kappa$ B 是否是 *miR-210* 的潜在靶基因尚不清楚, 进一步使用在线数据库上的生物信息学分析进行预测。如图 7-A 所示, NF- $\kappa$ B 被预测为 *miR-210* 的靶基因。GES-1 细胞用 NF- $\kappa$ B 的 WT 或 MUT 3'-UTR 序列与 mimic NC 或 *miR-210* mimic 联合转染后, 进行荧光素酶报告基因测定, 结果见图 7-B, 当与 NF- $\kappa$ B 的 WT 3'-UTR 共转染时, *miR-210* mimic 转染显著升高了荧光素酶的活性 ( $P<0.01$ ), 但并未导致 NF- $\kappa$ B 的 MUT 3'-UTR 中荧光素酶活性的变化。如图 7-C、D 所示, 与模型组和 mimic NC 组比较, MNNG+NIG 损伤的 GES-1 细胞转染 *miR-210* mimic 后, 细胞中 NF- $\kappa$ B mRNA 和胞核中 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达显著升高 ( $P<0.01$ ), 胞质 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达显著降低 ( $P<0.01$ ); CST 干预后显著逆转以上蛋白表达 ( $P<0.01$ )。相反, 与模型组和 inhibitor



A-通过在线数据库上的生物信息学分析预测 NF- $\kappa$ B 3'-UTR 中的 *miR-210* 结合位点; B-荧光素酶活性; C-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 *miR-210* mimic 或 *miR-210* inhibitor 转染 GES-1 细胞中 NF- $\kappa$ B mRNA 表达的影响; D-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 *miR-210* mimic 或 *miR-210* inhibitor 转染 GES-1 细胞中 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达的影响。

A-predicting *miR-210* binding sites in NF- $\kappa$ B 3'-UTR through bioinformatics analysis on online databases; B-fluorescein enzyme activity; C-effect of CST on NF- $\kappa$ B mRNA expression in *miR-210* mimic or *miR-210* inhibitor transfected GES-1 cells induced by MNNG and NIG; D-effect of CST on NF- $\kappa$ B p65 protein expression in *miR-210* mimic or *miR-210* inhibitor transfected GES-1 cells induced by MNNG and NIG.

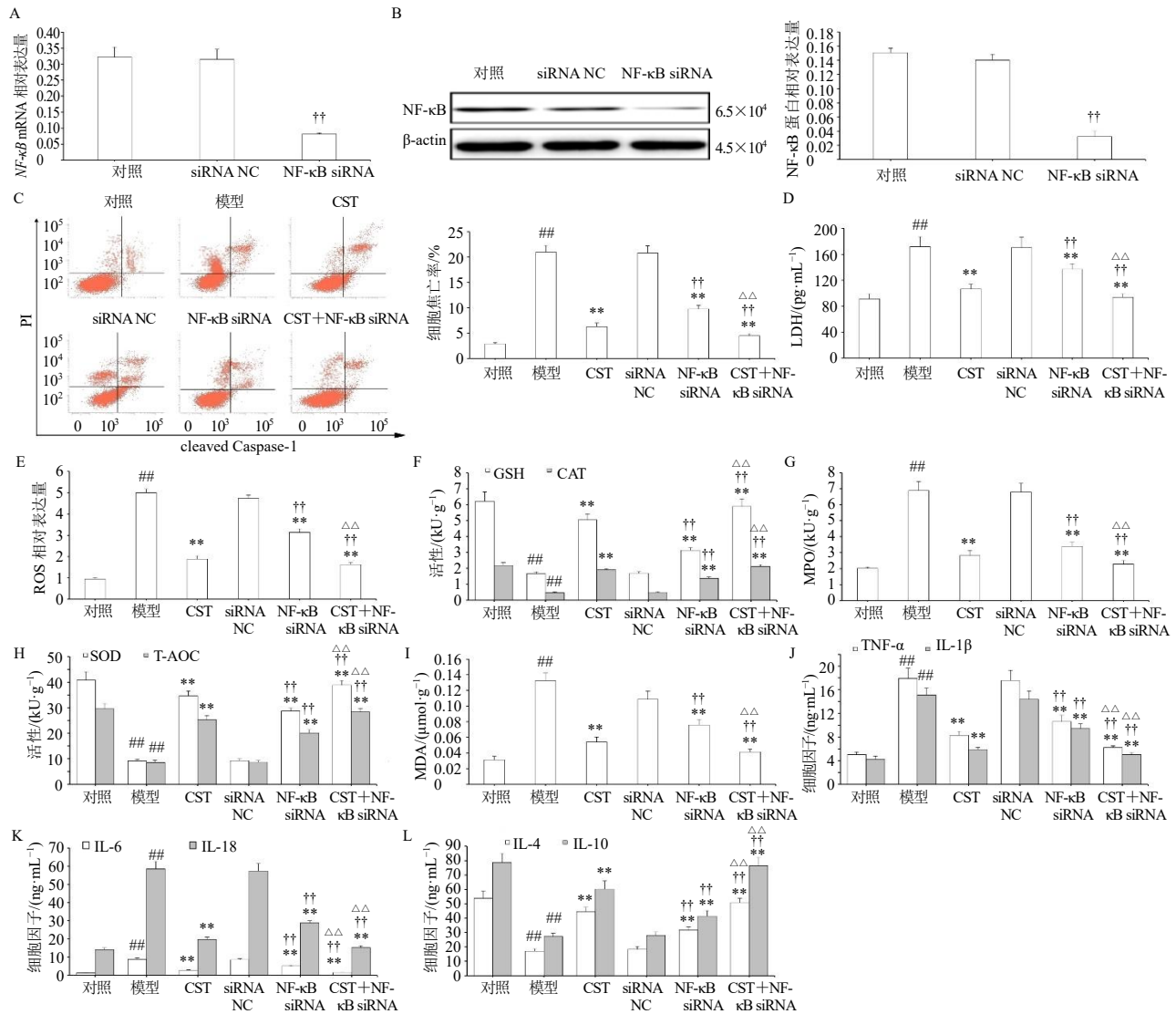
图 7 NF- $\kappa$ B 是 *miR-210* 的直接靶点 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )  
Fig. 7 NF- $\kappa$ B was direct target of *miR-210* ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

NC 组比较, MNNG+NIG 损伤的 GES-1 细胞转染 miR-210 inhibitor 后, 细胞中 *NF-κB* mRNA 和胞核中 *NF-κB* p65 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.01$ ), 胞质 *NF-κB* p65 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.01$ ); CST 干预后细胞中 *NF-κB* mRNA 和胞核中 *NF-κB* p65 蛋白表达进一步降低 ( $P < 0.01$ ), 胞质 *NF-κB* p65 蛋白表达进

步升高 ( $P < 0.01$ )。由此可见, *NF-κB* 是 miR-210 的直接靶基因, CST 可通过下调 miR-210、靶向 *NF-κB* 基因来抑制 *NF-κB*/NLRP3 炎症小体信号通路。

### 3.5 *NF-κB* 敲低增强了 CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 GES-1 细胞损伤的保护作用

如图 8-A、B 所示, 通过 qRT-PCR 和 Western



A-*NF-κB* 敲低 GES-1 细胞中 *NF-κB* mRNA 的表达; B-*NF-κB* 敲低 GES-1 细胞中 *NF-κB* 蛋白的表达; C-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 *NF-κB* 敲低 GES-1 细胞焦亡的影响; D-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 *NF-κB* 敲低 GES-1 细胞 LDH 释放的影响; E-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 *NF-κB* 敲低 GES-1 细胞中 ROS 水平的影响; F~I-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 *NF-κB* 敲低 GES-1 细胞中氧化应激水平的影响; J~L-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 *NF-κB* 敲低 GES-1 细胞上清液中细胞因子水平的影响。

A-*NF-κB* mRNA expression in *NF-κB* knockdown GES-1 cells; B-*NF-κB* protein expression in *NF-κB* knockdown GES-1 cells; C-effect of CST on pyroptosis of *NF-κB* knockdown GES-1 cells induced by MNNG and NIG; D-effect of CST on LDH release in *NF-κB* knockdown GES-1 cells induced by MNNG and NIG; E-effect of CST on ROS level in *NF-κB* knockdown GES-1 cells induced by MNNG and NIG; F~I-effect of CST on oxidative stress level in *NF-κB* knockdown GES-1 cells induced by MNNG and NIG; J~L-effect of CST on cytokine levels in supernatant of *NF-κB* knockdown GES-1 cells induced by MNNG and NIG.

图 8 CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 *NF-κB* 敲低 GES-1 细胞焦亡、LDH 释放、氧化应激和上清液中细胞因子水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 8 Effect of CST on pyroptosis, LDH release, oxidative stress and cytokine levels in supernatant of *NF-κB* knockdown GES-1 cells induced by MNNG and NIG ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

blotting 检测 GES-1 细胞及转染 NF- $\kappa$ B siRNA 后细胞中 NF- $\kappa$ B mRNA 和蛋白表达量,发现转染 NF- $\kappa$ B siRNA 后细胞中 NF- $\kappa$ B mRNA 和蛋白表达水平显著低于 siRNA NC 组 ( $P < 0.01$ ),表明 NF- $\kappa$ B siRNA 转染成功降低了 NF- $\kappa$ B mRNA 和蛋白表达。为了进一步证实 NF- $\kappa$ B 是否延伸到 MNNG 和 NIG 诱导的 GES-1 细胞焦亡,在 GES-1 细胞转染 NF- $\kappa$ B siRNA 敲低 *NF- $\kappa$ B* 基因后,检测细胞焦亡、LDH 释放、氧化应激、细胞因子水平和 NF- $\kappa$ B/NLRP3 炎症小体通路相关蛋白表达。如图 8-C~L 和图 9-A 所示,与模型组比较,转染 NF- $\kappa$ B siRNA 显著抑制 MNNG+NIG 损伤的 GES-1 细胞 LDH 释放和细胞焦亡 ( $P < 0.01$ ),升高细胞中 CAT、GSH、SOD、T-AOC 和细胞上清液中 IL-4、IL-10 水平 ( $P < 0.01$ ),降低细胞中 ROS、MPO、MDA 和细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18、TNF- $\alpha$  水平 ( $P < 0.01$ ),下调 *NF- $\kappa$ B* mRNA 表达 ( $P < 0.01$ ); CST 单用或与 NF- $\kappa$ B siRNA 联用后,可进一步抑制 LDH 释放和细胞焦亡 ( $P < 0.01$ ),升高细胞中 CAT、GSH、SOD、T-AOC 和细胞上清液中 IL-4、IL-10 水平 ( $P < 0.01$ ); 而且进一步降低细胞中 ROS、MPO、MDA 和细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18、TNF- $\alpha$  水平 ( $P < 0.01$ ),下调 *NF- $\kappa$ B* mRNA 表达 ( $P < 0.01$ )。免疫荧光和 Western blotting 结果 (图 9-B~D) 显示,与模型组比较,用 NF- $\kappa$ B 敲低 MNNG+NIG 损伤 GES-1 细胞后,NF- $\kappa$ B p65 核移位和 NLRP3 炎症小体共定位被抑制,胞核中 NF- $\kappa$ B p65 和细胞中 TXNIP、NEK7、NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N、pro-IL-1 $\beta$ 、pro-IL-18 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ ),胞质中 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); CST 干预 MNNG+NIG 损伤 GES-1 细胞可抑制 NF- $\kappa$ B p65 核移位和 NLRP3 炎症小体共定位,降低胞核中 NF- $\kappa$ B p65 和细胞中 TXNIP、NEK7、NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N、pro-IL-1 $\beta$ 、pro-IL-18 蛋白表达水平 ( $P < 0.01$ ),升高胞质中 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平 ( $P < 0.01$ ); CST+NF- $\kappa$ B siRNA 可进一步改善上述指标 ( $P < 0.01$ )。由此可见,NF- $\kappa$ B siRNA 和 CST 处理可对 MNNG 和 NIG 诱导的 GES-1 细胞损伤产生协同保护作用。

### 3.6 NLRP3 敲低增强了 CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 GES-1 细胞损伤的保护作用

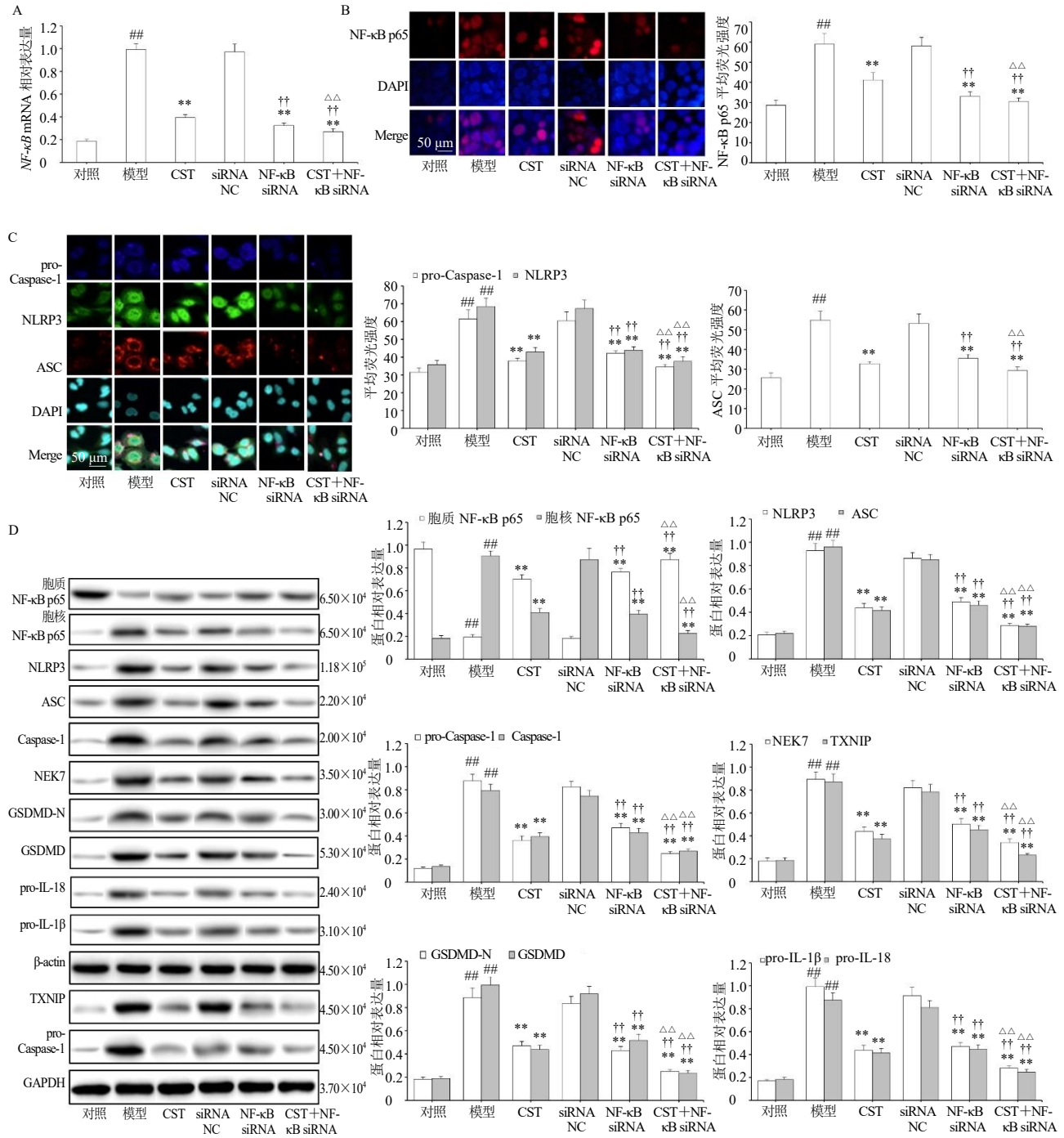
通过 qRT-PCR 和 Western blotting 检测 GES-1

细胞及转染 NLRP3 siRNA 后细胞中 NLRP3 mRNA 和蛋白表达量,发现转染 NLRP3 siRNA 后细胞中 NLRP3 mRNA 和蛋白表达水平显著低于 siRNA NC 组 ( $P < 0.01$ , 图 10-A、B),表明 NLRP3 siRNA 转染成功降低了 NLRP3 mRNA 和蛋白表达。

为了进一步证实 NLRP3 是否延伸到 MNNG 和 NIG 诱导的 GES-1 细胞焦亡,在 GES-1 细胞转染 NLRP3 siRNA 敲低 *NLRP3* 基因后,检测细胞焦亡、LDH 释放、氧化应激、细胞因子水平和 NF- $\kappa$ B/NLRP3 炎症小体通路相关蛋白表达。如图 10-C~L 和图 11-A 所示,转染 NLRP3 siRNA 显著抑制 MNNG+NIG 损伤的 GES-1 细胞 LDH 释放和细胞焦亡 ( $P < 0.01$ ),升高细胞中 CAT、GSH、SOD、T-AOC 和细胞上清液中 IL-4、IL-10 水平 ( $P < 0.01$ ),降低细胞中 ROS、MPO、MDA 和细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18、TNF- $\alpha$  水平 ( $P < 0.01$ ),下调 *NLRP3* mRNA 表达 ( $P < 0.01$ ); CST 单用或与 NLRP3 siRNA 联用后,可进一步抑制 LDH 释放和细胞焦亡 ( $P < 0.01$ ),升高细胞中 CAT、GSH、SOD、T-AOC 和细胞上清液中 IL-4、IL-10 水平 ( $P < 0.01$ ),而且进一步降低细胞中 ROS、MPO、MDA 和细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18、TNF- $\alpha$  水平 ( $P < 0.01$ ),下调 *NLRP3* mRNA 表达 ( $P < 0.01$ )。免疫荧光和 Western blotting 结果 (图 11-B~J) 显示,与模型组比较,用 NLRP3 敲低 MNNG+NIG 损伤 GES-1 细胞后,NLRP3 炎症小体共定位和细胞中 NLRP3 mRNA 表达被抑制,胞质 NF- $\kappa$ B p65、TXNIP、NEK7、NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N、pro-IL-1 $\beta$ 、pro-IL-18 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ ),胞质 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); CST 干预 MNNG+NIG 损伤 GES-1 细胞可抑制 NLRP3 炎症小体共定位,降低细胞中 *NLRP3* mRNA 表达及胞核 NF- $\kappa$ B p65、TXNIP、NEK7、NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N、pro-IL-1 $\beta$ 、pro-IL-18 蛋白表达水平 ( $P < 0.01$ ),升高胞质 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平 ( $P < 0.01$ ); CST+NLRP3 siRNA 可进一步改善上述指标 ( $P < 0.01$ )。由此可见,NLRP3 siRNA 和 CST 处理可对 MNNG 和 NIG 诱导的 GES-1 细胞损伤产生协同保护作用。

## 4 讨论

课题组前期研究发现 CST 及其活性成分委陵菜酸对 Hp 诱导的 GES-1 细胞和 CAG 小鼠均具有

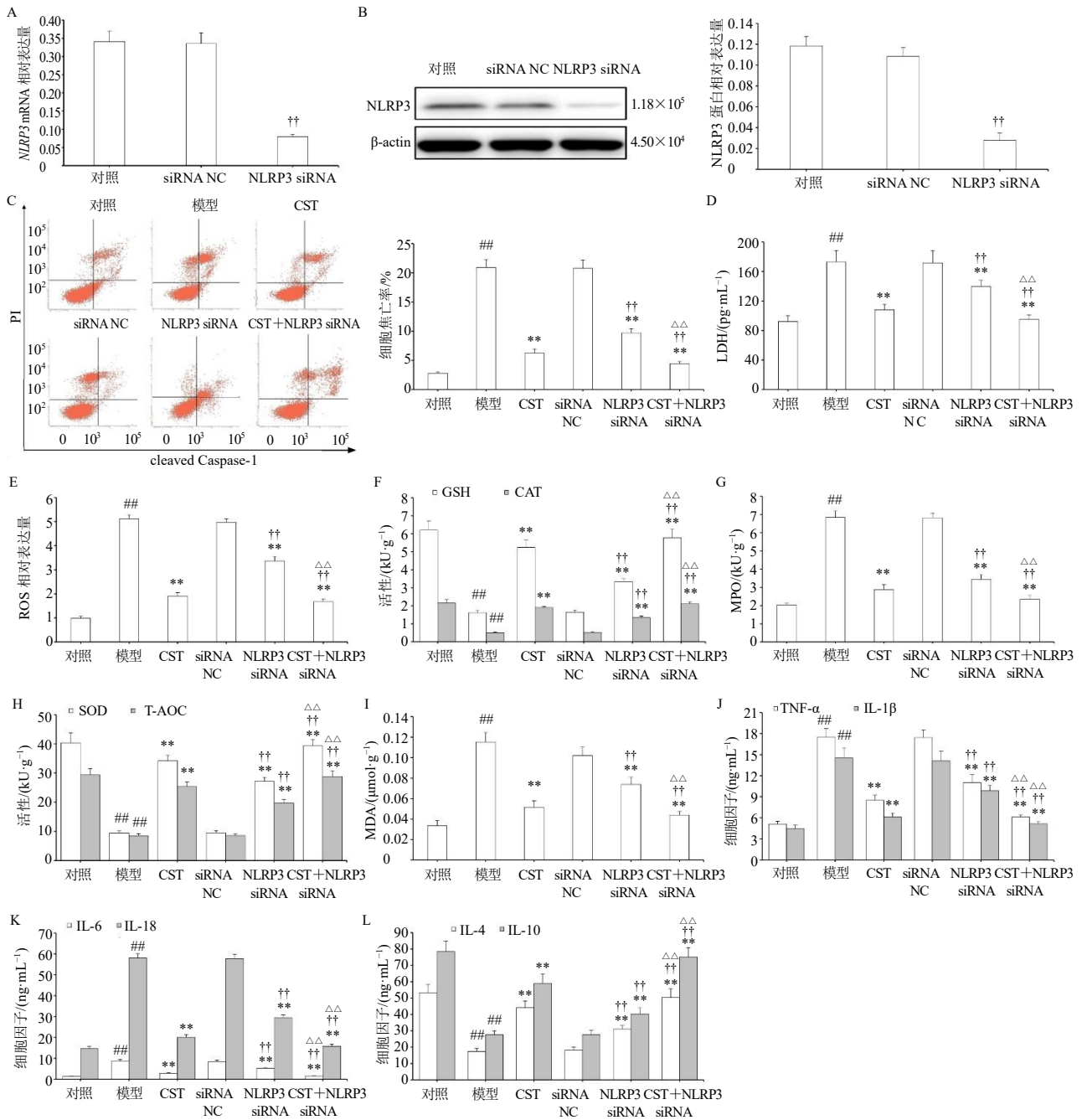


A-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 GES-1 细胞中 NF-κB mRNA 表达的影响; B-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 NF-κB 敲低 GES-1 细胞 NF-κB p65 核移位的影响 (×200); C-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 NF-κB 敲低 GES-1 细胞 NLRP3 炎症小体共定位的影响 (×200); D-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 NF-κB 敲低 GES-1 细胞中 NLRP3 炎症小体信号通路相关蛋白表达的影响。

A-effect of CST on NF-κB mRNA expression in NF-κB knockdown GES-1 cells induced by MNNG and NIG; B-effect of CST on NF-κB p65 nuclear translocation in NF-κB knockdown GES-1 cells induced by MNNG and NIG (×200); C-effect of CST on NLRP3 inflammasome co-localization in NF-κB knockdown GES-1 cells induced by MNNG and NIG (×200); D-effect of CST on expressions of NLRP3 inflammasome signaling pathway related proteins in NLRP3 knockdown GES-1 cells induced by MNNG and NIG.

图 9 CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 NF-κB 敲低 GES-1 细胞中 NLRP3 炎症小体信号通路相关基因和蛋白表达的影响 (x̄ ± s, n = 5)

Fig. 9 Effect of CST on expressions of NLRP3 inflammasome signaling pathway related genes and proteins in NF-κB knockdown GES-1 cells induced by MNNG and NIG (x̄ ± s, n = 5)

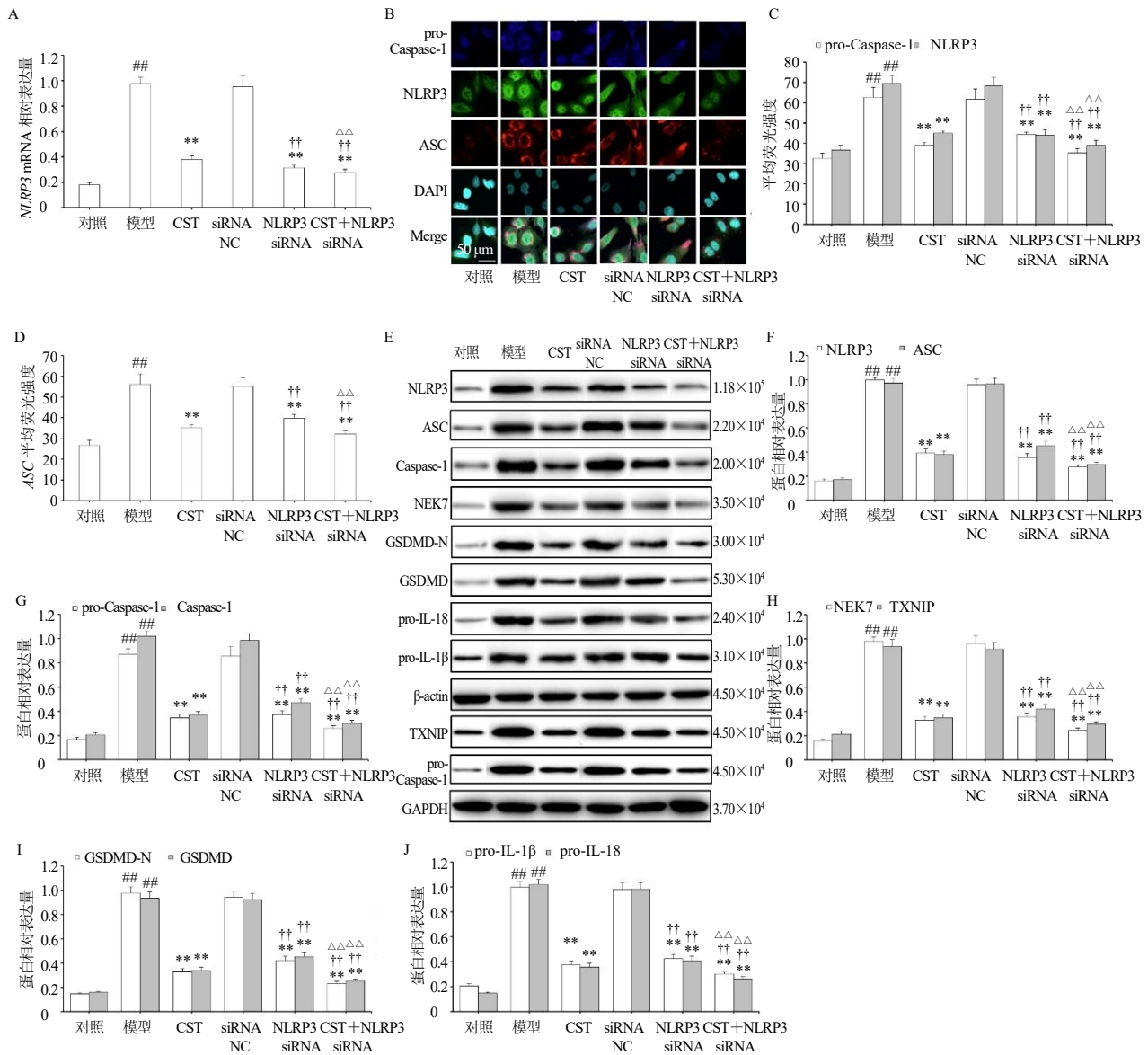


A-NLRP3 敲低 GES-1 细胞中 *NLRP3* mRNA 的表达; B-NLRP3 敲低 GES-1 细胞中 NLRP3 蛋白的表达; C-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 NLRP3 敲低 GES-1 细胞焦亡的影响; D-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 NLRP3 敲低 GES-1 细胞 LDH 释放的影响; E-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 NLRP3 敲低 GES-1 细胞中 ROS 水平的影响; F~I-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 NLRP3 敲低 GES-1 细胞中氧化应激水平的影响; J~L-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 NLRP3 敲低 GES-1 细胞上清液中细胞因子水平的影响。

A-*NLRP3* mRNA expression in NLRP3 knockdown GES-1 cells; B-NLRP3 protein expression in NLRP3 knockdown GES-1 cells; C-effect of CST on pyroptosis of NLRP3 knockdown GES-1 cells induced by MNNG and NIG; D-effect of CST on LDH release rate in NLRP3 knockdown GES-1 cells induced by MNNG and NIG; E-effect of CST on ROS level in NLRP3 knockdown GES-1 cells induced by MNNG and NIG; F~I-effect of CST on oxidative stress level in NLRP3 knockdown GES-1 cells induced by MNNG and NIG; J~L-effect of CST on cytokine levels in supernatant of NLRP3 knockdown GES-1 cells induced by MNNG and NIG.

图 10 CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 NLRP3 敲低 GES-1 细胞焦亡、LDH 释放、氧化应激和上清液中细胞因子水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 10 Effect of CST on pyroptosis, LDH release, oxidative stress and cytokine levels in supernatant of NLRP3 knockdown GES-1 cells induced by MNNG and NIG ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )



A-CST 对 MNNG 和 NIG 损伤 GES-1 中 *NLRP3* mRNA 表达的影响; B~D-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 NLRP3 敲低 GES-1 细胞 NLRP3 炎症小体共定位的影响 ( $\times 200$ ); E~J-CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 NLRP3 敲低 GES-1 细胞中 NLRP3 炎症小体信号通路相关蛋白表达的影响。  
A-effect of CST on *NLRP3* mRNA expression in NLRP3 knockdown GES-1 cells induced by MNNG and NIG; B—D-effect of CST on NLRP3 inflammasome co-localization in NLRP3 knockdown GES-1 cells induced by MNNG and NIG ( $\times 200$ ); E—J-effect of CST on expressions of NLRP3 inflammasome signaling pathway related proteins in NLRP3 knockdown GES-1 cells induced by MNNG and NIG.

图 11 CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 NLRP3 敲低 GES-1 细胞中 NLRP3 炎症小体信号通路相关基因和蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 11 Effect of CST on expressions of NLRP3 inflammasome signaling pathway related genes and proteins in NLRP3 knockdown GES-1 cells induced by MNNG and NIG ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

保护作用,可增强内源性抗氧化系统功能、抑制氧化应激、炎症反应、纠正溶酶体功能障碍及 TLR4/NF- $\kappa$ B/NLRP3 炎症小体信号通路激活,减少线粒体介导的细胞凋亡<sup>[25]</sup>。临床试验也证实 CST 对脾胃湿热型 Hp 阳性 CAG 患者具有较好的治疗作用,且无明显不良反应,证实其作用机制与增强 CAG 患者胃

免疫功能、调节胃肠激素分泌、促进胃蛋白酶原合成、抑制炎症反应及 TLR4/NF- $\kappa$ B/NLRP3 通路激活有关<sup>[31]</sup>。以上研究表明 CST 具备了作为 CAG 治疗药物的潜质,值得进一步深入研究。本研究通过 MNNG 和 NIG 诱导的 GES-1 细胞损伤模型,进一步研究 CST 防治 CAG 的作用机制。本研究发现 miR-

210 是促炎/促焦亡因子, 双荧光素酶报告实验证实 miR-210 可与 *NF-κB* mRNA 3'-UTR 结合; CST 可显著抑制 MNNG 和 NIG 所致的 GES-1 细胞焦亡和 LDH 释放, 降低细胞上清液中 IL-1β、IL-6、IL-18、TNF-α 和细胞中 ROS、MPO、MDA 水平, 升高细胞上清液中 IL-4、IL-10 水平和细胞中 CAT、GSH、SOD、T-AOC 活性, 抑制 *NF-κB* p65 核移位及 NLRP3、ASC 和 pro-Caspase-1 共定位, 下调细胞中 *miR-210*、*NF-κB*、*NLRP3* mRNA 及胞核 *NF-κB* p65、

细胞中 TXNIP、NEK7、NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N、pro-IL-1β、pro-IL-18 蛋白表达, 上调胞质中 *NF-κB* p65 蛋白表达; CST 与 *miR-210* inhibitor、*NF-κB* siRNA、NLRP3 siRNA 转染联用可进一步改善上述指标。表明 CST 对 MNNG 和 NIG 诱导的 GES-1 细胞损伤具有较好的防治作用, 其机制与抑制 *miR-210* 异常升高和 *NF-κB*/NLRP3 炎症小体信号通路激活、减轻氧化应激, 进而抑制细胞焦亡密切相关 (图 12)。

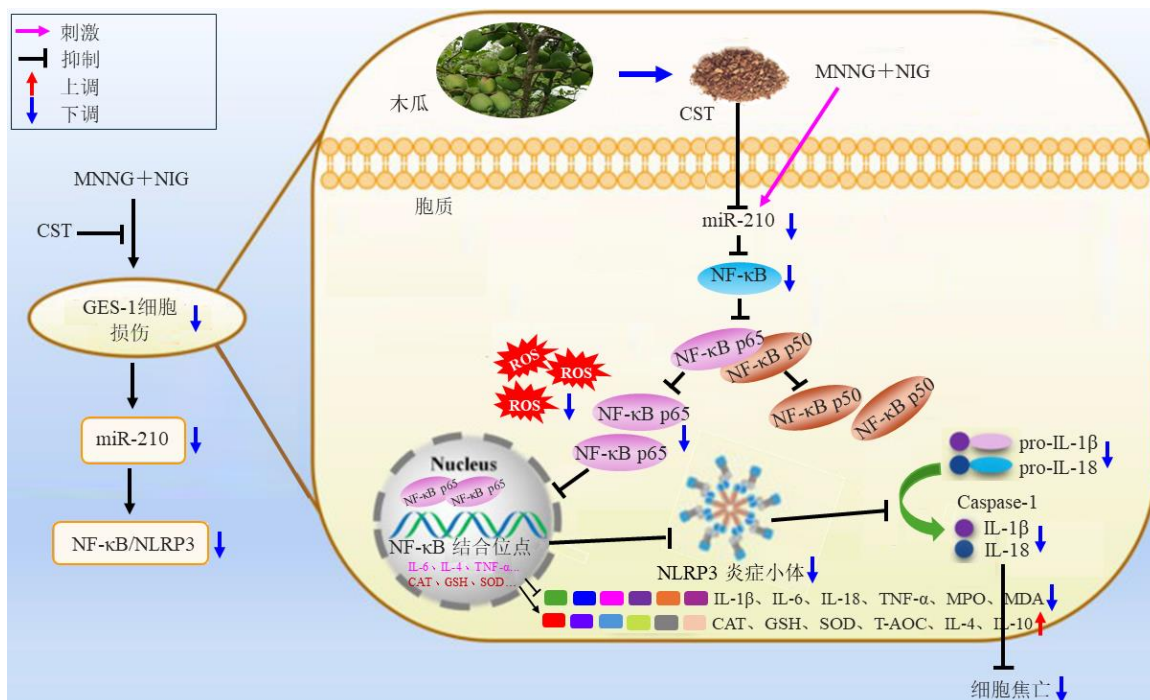


图 12 CST 防治 MNNG 和 NIG 诱导的 GES-1 细胞损伤的作用机制

Fig. 12 Mechanism of CST in preventing and treating MNNG and NIG-induced GES-1 cells damage

近年来, *miR-210* 在许多人类疾病中得到了广泛研究, 如 CAG、胃癌、前列腺癌、宫颈癌、心脑血管缺血和炎症等<sup>[13]</sup>。*miR-210* 通过靶向 *NF-κB*、死亡受体 6、缺氧诱导因子-1 抑制因子等来参与上述病理过程<sup>[13,32-34]</sup>。魏明乔等<sup>[35]</sup>研究发现 *miR-210* 参与了增殖、侵袭和迁移过程, 且对 *NF-κB* 表达产生了正向调节, 与 Zhang 等<sup>[15]</sup>报道的 CAG 大鼠胃组织中 *NF-κB* 和 *miR-210* 的表达上调相一致。本研究发现, 与对照组比较, 在 MNNG+NIG 损伤的 GES-1 细胞中, *miR-210* mRNA 表达显著升高, *NF-κB* p65 核移位和胞核中 *NF-κB* p65 蛋白表达显著升高, 胞质中 *NF-κB* p65 蛋白表达显著降低; 同时还证实 *miR-210* mimic 转染产生的 *miR-210* 过表达加重了 MNNG 和 NIG 诱导的 GES-1 细胞焦亡, 这

与 MNNG+NIG 损伤的 GES-1 细胞 LDH 释放增加、细胞中内源性抗氧化系统功能降低、炎症因子大量分泌有关; 相反, CST 与 *miR-210* mimic 或 *miR-210* inhibitor 转染联用可抵消或增强 CST 效果, 表现为抑制 MNNG+NIG 损伤的 GES-1 细胞焦亡、LDH 释放和 *NF-κB* p65 核移位, 降低 MNNG+NIG 损伤 GES-1 细胞炎症因子分泌, 增强内源性抗氧化系统功能, 降低细胞中 *miR-210* mRNA 和胞核中 *NF-κB* p65 蛋白表达、升高胞质上 *NF-κB* p65 蛋白表达。提示 CST 可通过抑制 *miR-210* 的异常升高来发挥对 MNNG+NIG 损伤的 GES-1 细胞的保护作用。

*miRNA* 通过调节其靶基因发挥作用, 生物信息学预测分析和荧光素酶报告基因测定结果显示 *miR-210* 能够直接结合 *NF-κB* mRNA 的 3'-UTR 区,

NF- $\kappa$ B 可被鉴定为 miR-210 的靶基因。Hp、胃酸反流、不良饮食习惯、长期服用非甾体抗炎药、精神压力和心理应激状态等因素促进毒素相关基因 A (cytotoxin-associated gene A, CagA)、空泡毒素 A (Vacuolating cytotoxin A, VacA) 和 ROS 等毒性因子释放,一方面刺激胃黏膜上皮细胞中还原型辅酶II (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化酶产生内源性应激因子攻击胃黏膜上皮细胞膜,引发细胞膜脂质过氧化,破坏其完整性,导致 LDH 从细胞内漏出,脂过氧化产物 MDA 增加<sup>[25]</sup>;另一方面还可影响胃黏膜上皮细胞骨架重排,激活 NF- $\kappa$ B 信号通路,诱导 NF- $\kappa$ B 上游激酶 I $\kappa$ B 激酶 (I $\kappa$ B kinase, IKK) 磷酸化,并增加酶活性,IKK 磷酸化 NF- $\kappa$ B 抑制因子,导致其泛素化和降解,并释放 NF- $\kappa$ B p50/p65 二聚体,NF- $\kappa$ B p65 核移位,结合靶基因的 DNA 结合位点,促进 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 转录,导致胃黏膜上皮细胞损伤和细胞焦亡<sup>[36-37]</sup>。在本研究中,MNNG+NIG 损伤的 GES-1 细胞 NF- $\kappa$ B p65 核移位增加,细胞中 NF- $\kappa$ B mRNA 表达和胞核 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达增加,胞质 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达降低;NF- $\kappa$ B 与 miR-210 正调控关系进一步在 MNNG+NIG 损伤 GES-1 细胞的 miR-210 mimic 和 miR-210 inhibitor 实验中得到了证实。此结果与 MNNG+NIG 损伤 GES-1 细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18、TNF- $\alpha$  和细胞中 ROS、MPO、MDA 水平升高,细胞上清液中 IL-4、IL-10 水平和细胞中 CAT、GSH、SOD、T-AOC 活性降低相一致;相反,CST 与 miR-210 mimic 或 miR-210 inhibitor 转染联用可抵消或增强 CST 效果,能够降低 MNNG+NIG 损伤 GES-1 细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18、TNF- $\alpha$  和细胞中 ROS、MPO、MDA 水平,升高细胞上清液中 IL-4、IL-10 水平和细胞中 CAT、GSH、SOD、T-AOC 活性,抑制 NF- $\kappa$ B p65 核移位,降低细胞中 NF- $\kappa$ B mRNA 表达和胞核中 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达,升高胞质中 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达。同时研究还发现 MNNG+NIG 损伤的 GES-1 细胞转染 NF- $\kappa$ B siRNA 后,其作用效果与 miR-210 inhibitor 转染相类似,CST 与 NF- $\kappa$ B siRNA 转染联用可增强 CST 效果。上述结果表明,CST 对 MNNG+NIG 损伤的 GES-1 细胞的保护作用与抑制 miR-210、NF- $\kappa$ B mRNA 表达和 NF- $\kappa$ B p65 核移位、降低胞核 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达,升高 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达密切相关。提示 NF- $\kappa$ B 是 miR-210 的靶基因,CST 可通过抑制 miR-210

异常升高,进而抑制 NF- $\kappa$ B 表达来实施对 MNNG+NIG 损伤的 GES-1 细胞的保护作用。

NLRP3 介导的焦亡是 NF- $\kappa$ B 的下游途径之一,NF- $\kappa$ B 通路在这一过程中起着关键作用<sup>[38-39]</sup>。在 CAG 患者和大、小鼠的胃黏膜组织中,激活的 NF- $\kappa$ B 通路可促进 NLRP3 募集 ASC 和 pro-Caspase-1,进行共定位,完成 NLRP3 炎症小体组装和 IL-18、IL-1 $\beta$  的转录;在激活阶段,组装的 NLRP3 炎症小体被激活,诱导 pro-Caspase-1 自我剪切活化,活化的 Caspase-1 使 pro-IL-1 $\beta$ 、pro-IL-18 剪切为活化的 IL-1 $\beta$ 、IL-18,活化的 IL-1 $\beta$ 、IL-18 刺激胃黏膜上皮细胞,通过自分泌/旁分泌系统分泌多种更多炎症介质、炎症因子,形成“瀑布样”级联放大反应,导致 NF- $\kappa$ B 表达和 NLRP3 炎症小体被激活,形成 NF- $\kappa$ B/NLRP3 反馈环,从而促进上皮细胞焦亡和 CAG 的发生发展<sup>[2,16,18,40-41]</sup>。由此可见,NLRP3 炎症小体通路激活在炎症信号转导及 CAG 发病机制中发挥着重要作用。本研究发现 MNNG+NIG 损伤 GES-1 细胞和 miR-210 mimic 转染 MNNG+NIG 损伤 GES-1 细胞中 NLRP3 炎症小体共定位增加,细胞中 NLRP3 mRNA 和 TXNIP、NEK7、NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N、pro-IL-1 $\beta$ 、pro-IL-18 蛋白表达显著降低;CST 与 miR-210 mimic 转染联用可抵消 CST 效果,CST 抑制 MNNG+NIG 损伤 GES-1 细胞中 NLRP3 炎症小体共定位及降低细胞中 NLRP3 mRNA 和 TXNIP、NEK7、NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N、pro-IL-1 $\beta$ 、pro-IL-18 蛋白表达的作用效果被遏制;相反,CST 与 miR-210 inhibitor 转染联用可增强 CST 效果,表现出进一步抑制 MNNG+NIG 损伤 GES-1 细胞中 NLRP3 炎症小体共定位,降低细胞中 NLRP3 mRNA 和 TXNIP、NEK7、NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N、pro-IL-1 $\beta$ 、pro-IL-18 蛋白表达的效果。同时研究还发现 MNNG+NIG 损伤的 GES-1 细胞转染 NLRP3 siRNA 后,其作用效果与 miR-210 inhibitor 和 NF- $\kappa$ B siRNA 转染相类似,CST 与 NLRP3 siRNA 转染联用可增强 CST 效果。表明 CST 对 MNNG+NIG 损伤的 GES-1 细胞具有良好的抗炎和抑制细胞焦亡活性,其作用机制可能与其抑制 NLRP3 炎症小体信号通路激活有关。

综上,CST 对 MNNG+NIG 损伤 GES-1 细胞具有较好的保护作用,其作用与抑制 miR-210/NF-

$\kappa$ B/NLRP3 炎症小体信号通激活、减少炎症反应，进而抑制细胞焦亡密切相关。当前从细胞水平进行了 CST 防治 CAG 效果和作用机制的初步探索，尚缺乏 miR-210 敲除动物模型验证。由于细胞模型无法完全模拟 CAG 慢性环境、免疫细胞参与其病理过程，这使得 CST 治疗 CAG 作用机制尚需要进一步的探讨；当前正在开展的动物和临床实验研究可以弥补这一不足。后续研究可为阐明 CST 防治 CAG 机制研究提供更深入的认识，也有望使其成为治疗 CAG 的新型候选药物。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Wang R X, Zhao Y D, Zhou L, *et al.* Costunolide ameliorates MNNG-induced chronic atrophic gastritis through inhibiting oxidative stress and DNA damage via activation of Nrf2 [J]. *Phytomedicine*, 2024, 130: 155581.
- [2] Zhou Z H, Hu C, Cui B, *et al.* Ginsenoside Rg<sub>1</sub> suppresses pyroptosis via the NF- $\kappa$ B/NLRP3/GSDMD pathway to alleviate chronic atrophic gastritis *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Agric Food Chem*, 2024, 72(24): 13668-13683.
- [3] 李光跃, 王莉, 李光辉, 等. 养胃舒胶囊联合吉法酯治疗慢性萎缩性胃炎的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2025, 40(6): 1483-1487.
- [4] Tan P, Yeoh K G. Genetics and molecular pathogenesis of gastric adenocarcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(5): 1153-1162.
- [5] Smyth E C, Nilsson M, Grabsch H I, *et al.* Gastric cancer [J]. *Lancet*, 2020, 396(10251): 635-648.
- [6] Koulis A, Buckle A, Boussioutas A. Premalignant lesions and gastric cancer: Current understanding [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2019, 11(9): 665-678.
- [7] Song J H, Kim S G, Jin E H, *et al.* Risk factors for gastric tumorigenesis in underlying gastric mucosal atrophy [J]. *Gut Liver*, 2017, 11(5): 612-619.
- [8] Tong Y L, Wang R L, Liu X, *et al.* Zuojin Pill ameliorates chronic atrophic gastritis induced by MNNG through TGF- $\beta$ 1/PI3K/Akt axis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 271: 113893.
- [9] Lee S H, Lee S J, Kim J H, *et al.* Chemical carcinogen, *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, is specific activator of oncogenic ras [J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(10): 1257-1264.
- [10] Pachathundikandi S K, Backert S. *Helicobacter pylori* controls NLRP3 expression by regulating hsa-miR-223-3p and IL-10 in cultured and primary human immune cells [J]. *Innate Immun*, 2018, 24(1): 11-23.
- [11] Liu Y T, Cai C C, Qin X M. Regulation of gut microbiota of *Astragali Radix* in treating for chronic atrophic gastritis rats based on metabolomics coupled with 16S rRNA gene sequencing [J]. *Chem Biol Interact*, 2022, 365: 110063.
- [12] Yin J, Yi J Y, Yang C, *et al.* Chronic atrophic gastritis and intestinal metaplasia induced by high-salt and *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine intake in rats [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(4): 315.
- [13] Afsar S, Syed R U, Bin Break M K, *et al.* The dual role of miR-210 in the aetiology of cancer: A focus on hypoxia-inducible factor signalling [J]. *Pathol Res Pract*, 2024, 253: 155018.
- [14] Khalilian S, Bijanvand A, Abedinlou H, *et al.* A review on the role of miR-210 in human disorders [J]. *Pathol Res Pract*, 2023, 241: 154244.
- [15] Zhang J L, Huang K B, Zhong G X, *et al.* Acupuncture decreases NF- $\kappa$ B p65, miR-155, and miR-21 and increases miR-146a expression in chronic atrophic gastritis rats [J]. *Evid Based Complement Altern Med*, 2016, 2016: 9404629.
- [16] Xie F, Yao S Q. Jatrorrhizine attenuates inflammatory response in *Helicobacter pylori*-induced gastritis by suppressing NLRP3 inflammasomes and NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Arch Microbiol*, 2025, 207(8): 177.
- [17] Zhou P, Zheng Z H, Wan T, *et al.* Yiqi Jiedu Huayu Decoction inhibits precancerous lesions of chronic atrophic gastritis by inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2024, 16(7): 3158-3168.
- [18] Zeng X, Yang M H, Ye T B, *et al.* Mitochondrial GRIM-19 loss in parietal cells promotes spasmodic polypeptide-expressing metaplasia through NLR family pyrin domain-containing 3 (NLRP3)-mediated IL-33 activation via a reactive oxygen species (ROS)-Nrf2-heme oxygenase-1 (HO-1)-NF- $\kappa$ B axis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 202: 46-61.
- [19] He H B, Feng M L, Xu H Y, *et al.* Total triterpenoids from the fruits of *Chaenomeles speciosa* exerted gastroprotective activities on indomethacin-induced gastric damage via modulating microRNA-423-5p-mediated TFF/NAG-1 and apoptotic pathways [J]. *Food Funct*, 2020, 11(1): 662-679.
- [20] Zhang Y Y, Xu H Y, He H B, *et al.* Total triterpenes from the fruits of *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai protects against indomethacin-induced gastric mucosal injury: Involvement of TFF1-mediated EGF/EGFR and apoptotic pathways [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2020, 72(3): 409-423.
- [21] 贺海波, 李小琴, 李小妹, 等. 木瓜总三萜和奥美拉唑联用对吡啶美辛诱导大鼠胃溃疡的治疗作用研究 [J].

- 中国中药杂志, 2019, 44(11): 2338-2347.
- [22] 贺海波, 朱丽金, 贺君宇, 等. 委陵菜酸对幽门螺杆菌诱导 GES-1 细胞损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2021, 52(16): 4892-4903.
- [23] 刘杰, 张颖, 冯豫之, 等. 木瓜总三萜通过抑制炎症、氧化应激和 NLRP3 炎症小体介导的细胞焦亡减轻吡啶美辛引起的胃黏膜损伤 [J]. 中国中药杂志, 2025, 51(12): 1-23.
- [24] 孟子元, 贺君宇, 马俊辉, 等. 基于 TLR4/NF- $\kappa$ B/NLRP3 信号通路探讨木瓜总三萜抗类风湿性关节炎的作用 [J]. 中国中药杂志, 2025, 50(23): 6654-6665.
- [25] 石孟琼, 贺君宇, 王晓, 等. 木瓜总三萜对幽门螺杆菌诱导小鼠胃炎的保护作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(18): 4782-4792.
- [26] 王丹, 杨强, 付正媛. 利多卡因通过 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路介导的细胞焦亡抑制乳腺癌细胞增殖 [J]. 解剖学研究, 2023, 45(5): 425-431.
- [27] 张留静, 张静, 宛瑞杰, 等. 胡椒碱通过分泌型卷曲相关蛋白 1 调控类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞焦亡 [J]. 中国临床药理学杂志, 2025, 41(14): 1994-1999.
- [28] 冯琦, 徐超, 布合力其·麦麦提. METTL3 调控 miR-126-5p 对人肾小球系膜细胞焦亡的影响及机制研究 [J]. 广西医科大学学报, 2024, 41(4): 564-571.
- [29] Meng X L, Zhang X Y, Su X J, *et al.* Daphnes Cortex and its licorice-processed products suppress inflammation via the TLR4/NF- $\kappa$ B/NLRP3 signaling pathway and regulation of the metabolic profile in the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 283: 114657.
- [30] Xu Q H, Cui F, Li X D, *et al.* Dangshen Huangjiu prevents gastric mucosal injury and inhibits Akt/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Food Funct*, 2023, 14(17): 7897-7911.
- [31] 罗悦, 石孟琼, 覃慧林, 等. 木瓜三萜片联合四联疗法治疗脾胃湿热型 Hp 阳性慢性萎缩性胃炎临床疗效观察 [J]. 中药药理与临床, 2026, 42(6): 1-15.
- [32] Zhang Y M, Liu Q H, Wu H, *et al.* miR-210/NF- $\kappa$ B axis: A new direction for regulating cadmium-induced pig artery inflammatory injury [J]. *J Cell Physiol*, 2023, 238(7): 1605-1621.
- [33] Zhang D W, Cao X R, Li J, *et al.* miR-210 inhibits NF- $\kappa$ B signaling pathway by targeting DR6 in osteoarthritis [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 12775.
- [34] Jiang Z X, Chen J, Chen J J, *et al.* Anti-inflammatory effects of paeoniflorin caused by regulation of the HIF-1 $\alpha$ /miR-210/Caspase-1/GSDMD signaling pathway in astrocytes: A novel strategy for hypoxia-induced brain injury in rats [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2021, 43(4): 410-418.
- [35] 魏明乔, 赵丽楠, 吴一辰, 等. miR-210 通过 NF- $\kappa$ B 信号通路对胃癌细胞的增殖、凋亡、侵袭及转移的影响 [J]. 贵州医科大学学报, 2024, 49(2): 242-247.
- [36] Yue R Z, Li Y J, Su B H, *et al.* Atorvastatin reduces contrast media-induced pyroptosis of renal tubular epithelial cells by inhibiting the TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *BMC Nephrol*, 2023, 24(1): 25.
- [37] Arab H H, Saad M A, El-Sahar A E, *et al.* Mechanistic perspective of morin protection against ketoprofen-induced gastric mucosal injury: Targeting HMGB1/RAGE/NF- $\kappa$ B, DJ-1/Nrf2/HO-1 and PI3K/mTOR pathways [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2020, 693: 108552.
- [38] Afonina I S, Zhong Z Y, Karin M, *et al.* Limiting inflammation: The negative regulation of NF- $\kappa$ B and the NLRP3 inflammasome [J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(8): 861-869.
- [39] Luo M, Yan D S, Sun Q S, *et al.* Ginsenoside Rg<sub>1</sub> attenuates cardiomyocyte apoptosis and inflammation via the TLR4/NF- $\kappa$ B/NLRP3 pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(4): 2994-3004.
- [40] Choi H R, Lim H, Lee J H, *et al.* Interruption of *Helicobacter pylori*-induced NLRP3 inflammasome activation by chalcone derivatives [J]. *Biomol Ther*, 2021, 29(4): 410-418.
- [41] An Y, Tu Z W, Wang A, *et al.* Qingyi Decoction and its active ingredients ameliorate acute pancreatitis by regulating acinar cells and macrophages via NF- $\kappa$ B/NLRP3/Caspase-1 pathways [J]. *Phytomedicine*, 2025, 139: 156424.

[责任编辑 李亚楠]