

基于目标成分敲出/敲入的丹参抑制 NLRP3 炎症小体活化的关键活性成分研究

王贤铃^{1,2}, 许颖杰^{1,3}, 李欣雨¹, 郭龙鑫¹, 文金财¹, 郑维军^{1,2}, 赵旭¹, 柏兆方¹, 肖小河^{1*}, 湛小燕^{1*}

1. 中国人民解放军总医院 肝病医学部, 北京 100039

2. 贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳 550005

3. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

摘要: **目的** 探讨隐丹参酮在丹参抑制 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) 炎症小体活化中的作用。**方法** 采用骨髓源性巨噬细胞 (bone marrow derived macrophage, BMDMs) 建立 NLRP3 炎症小体活化模型, 评价丹参提取物对 NLRP3 炎症小体活化的影响。利用目标成分敲出/敲入评价隐丹参酮在丹参抑制 NLRP3 炎症小体活化中的作用, 采用薄层色谱法“敲出”隐丹参酮得到目标成分样品 (隐丹参酮样品) 及阴性样品 (丹参提取物中敲出隐丹参酮的样品), 并利用 NLRP3 炎症小体活化模型, 比较其对 NLRP3 炎症小体活化的抑制作用, 通过 ELISA 和 Western blotting 检测相关炎症因子的释放和蛋白的表达; 利用“敲入”方法, 在阴性样品中加入目标成分样品, 并将之与丹参提取物进行比较, 评价二者对 NLRP3 炎症小体活化的调控作用; 同时利用质谱对目标成分样品、阴性样品进行检测。**结果** 丹参提取物对 NLRP3 炎症小体的活化有抑制作用; “敲出”隐丹参酮后丹参提取物对 NLRP3 炎症小体活化的抑制作用减弱, “敲入”后抑制作用回升。**结论** 隐丹参酮是丹参抑制 NLRP3 炎症小体活化的关键成分。

关键词: 丹参; 隐丹参酮; NLRP3 炎症小体; 成分敲出/敲入; 炎症因子

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)21-7783-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.21.012

Key active components of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* in inhibiting NLRP3 inflammasome activation based on target component knock-out/knock-in

WANG Xianling^{1,2}, XU Yingjie^{1,3}, LI Xinyu¹, GUO Longxin¹, WEN Jincai¹, ZHENG Weijun^{1,2}, ZHAO Xu¹, BAI Zhaofang¹, XIAO Xiaohe¹, ZHAN Xiaoyan¹

1. Senior Department of Hepatology of PLA General Hospital, Beijing 100039, China

2. School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550005, China

3. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To explore the effect of cryptotanshinone in inhibiting the activation of NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3) inflammasome in Danshen (*Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*). **Methods** Bone marrow derived macrophages (BMDMs) was used to establish an NLRP3 inflammasome activation model and the effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* extract on NLRP3 inflammasome activation was evaluated. Target component knock-out/knock-in was used to evaluate the effect of cryptotanshinone in inhibiting NLRP3 inflammasome activation in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*. Thin layer chromatography was used to knock-out cryptotanshinone to obtain target component samples (cryptotanshinone samples) and negative samples (samples of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* extract with cryptotanshinone knock-out), and the NLRP3 inflammasome activation model was used to compare its inhibitory effect on NLRP3 inflammasome activation. ELISA and

收稿日期: 2025-06-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82003984, 82230118); 北京市自然科学基金资助项目 (7232321, 7214296); 国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目 (ZYXCXTD-C-202005); 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目 (zyzdxk-2023309)

作者简介: 王贤铃, 硕士研究生, 从事中药药理学研究。E-mail: 327936844@qq.com

***通信作者:** 湛小燕, 副研究员, 主要从事中药药理和毒理学研究。E-mail: xyzhan123@163.com

肖小河, 研究员, 主要从事临床中药学研究。E-mail: pharmacy_302@126.com

Western blotting were used to detect the release of relevant inflammatory factors and protein expressions; The knock-in method which added the target component sample to the negative sample was used and was compared with *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* extract to evaluate their regulatory effects on NLRP3 inflammasome activation; Mass spectrometry was simultaneously used to detect target component samples and negative samples. **Results** *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* extract had an inhibitory effect on the activation of NLRP3 inflammasome; The inhibitory effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* extract on NLRP3 inflammasome activation was weakened after knocking-out cryptotanshinone, but the inhibitory effect was restored after knocking-in. **Conclusion** Cryptotanshinone is the key component in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*'s inhibition of NLRP3 inflammasome activation.

Key words: *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; cryptotanshinone; NLRP3 inflammasome; component knock-out/knock-in; inflammatory factors

丹参 *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* 为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎, 具有活血祛瘀、凉血清心、养血安神的功效^[1]。现代药理学研究表明, 丹参具有显著的抗炎作用^[2], 丹参及相关制剂可以通过抑制机体炎症因子的释放, 从而减轻炎症反应^[3]。丹参中丹参酮类成分可通过下调小鼠巨噬细胞 RAW264.7 和 J774A.1 中的 NIMA 相关激酶 7 (NIMA-related kinases 7, Nek7)、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)、剪切的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cleaved cysteinyl aspartate specific protease-1, cleaved Caspase-1) 及成熟的白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 蛋白表达, 并通过与 Nek7 直接结合调控 NLRP3 炎症小体的活化^[4]; 在脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 诱导的 J774A 巨噬细胞中, 丹参总酮通过调控磷脂酶 C γ 2 (phospholipase C γ 2, PLC γ 2)-磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP2) 通路, 抑制 NLRP3 炎症小体的活化^[5]。

NLRP3 炎症小体是最新发现的炎症通路之一, NLRP3 炎症小体的组装由 2 个不同的步骤启动, 即启动和激活。启动步骤主要是 LPS 等信号激活 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs), 导致核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路活化, 增加 NLRP3、pro-IL-1 β 等表达; 激活步骤为细胞受到第二信号如尼日利亚霉素 (nigericin)、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 等刺激, NLRP3 与凋亡相关颗粒样蛋白 (apoptosis associated speck, ASC)、pro-Caspase-1 组装成炎症小体, 介导 pro-Caspase-1 自剪切形成成熟的 Caspase-1^[6-7], 活化的 Caspase-1 剪切 pro-IL-1 β 、pro-IL-18 形成成熟形式的 IL-1 β 、IL-18^[8-10], 释放到胞外, 从而促进多种炎症疾病的发生发展^[11-12]。

课题组前期提出了基于成分敲出/敲入的中药药效物质辨识模式, 通过成分敲出的策略分析和辨识中药关键药效组分, 为药效物质识别与质量标准控制提供有效研究方法^[13]。目前, 已形成的较为成熟的敲出方法有薄层色谱法、凝胶色谱法、液相色谱法及超临界萃取法等^[14-18]。丹参中成分多样, 其活性成分对 NLRP3 炎症小体的抑制作用多有报道, 本课题组前期也发现隐丹参酮可以特异性地抑制 NLRP3 炎症小体的活化, 其他团队^[19-20]也对隐丹参酮抑制 NLRP3 炎症小体活化进行探索, 但其是否是丹参抑制 NLRP3 炎症小体活化中的关键活性成分尚不明确, 因此本研究基于成分敲出/敲入评价隐丹参酮在丹参抑制炎症小体活化中的作用。本研究构建 NLRP3 炎症小体活化模型证实丹参提取物对 NLRP3 炎症小体的活化有显著抑制作用, “敲出” 隐丹参酮后丹参总体物对 NLRP3 炎症小体活化的抑制作用减弱, “敲入” 后抑制作用回升, 提示隐丹参酮是丹参抑制 NLRP3 炎症小体活化的关键成分。

1 材料

1.1 动物

8 周龄 C57BL/6 雄性小鼠, 购自斯贝福生物技术有限公司, 动物合格证号 SCXK (京) 2024-0001。动物饲养于中国人民解放军总医院第五医学中心实验动物中心, 12 h 明暗循环, 自由进食饮水。动物实验经中国人民解放军总医院第五医学中心伦理委员会批准 (批准号 IACUC-2023-0013)。

1.2 药材

丹参饮片 (货号 C2572110001) 购自河北荷花池药业有限公司, 经中国人民解放军总医院第五医学中心湛小燕副研究员鉴定为唇形科植物丹参 *S. miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎。

1.3 药品与试剂

青霉素-链霉素 (货号 CC004)、Opti-MEM 培

养基(货号 CT007)购自北京中科迈晨科技有限公司; LPS(货号 t1rl-pb5lps)、二氧化硅(SiO_2 , 货号 t1tl-sio)、Poly(I: C)(货号 t1rl-picw)购自法国 InvivoGen 公司; DMEM 高糖培养基(货号 PYG0073)购自武汉博士德生物工程有限公司; ATP(货号 A2383)、胆固醇结晶(cholesterol crystals, CC, 货号 C8667)购自美国 Sigma 公司; 尼日利亚霉素、巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF, 货号 HY-P7085)、隐丹参酮对照品(货号 HY-N0174, 质量分数为 98.80%)购自美国 MedChemExpress 公司; Caspase-1 抗体(货号 AG-20B-0042-C100)、NLRP3 抗体(货号 AG-20B-0014-C100)购自北京安诺伦生物科技有限公司; IL-1 β 抗体(货号 AF-401-NA)购自美国 R&D 公司; ASC 抗体(货号 67834T)购自美国 CST 公司; Lamin B 抗体(货号 66095-1-Ig)购自美国 Proteintech 公司; Caspase-1 活性检测试剂盒(货号 G9951)、CellTiter-Glo[®] 发光法细胞活力检测试剂盒(货号 G7572)购自美国 Promega 公司; IL-1 β ELISA 检测试剂盒(货号 1210122)购自达科为生物技术股份有限公司; 石油醚(货号 20230608)购自东方世博(北京)科技有限公司; 醋酸乙酯(货号 E116123)、正己烷(货号 H109654)购自阿拉丁试剂(上海)有限公司; 丙酮(货号 20181006)购自天津市大茂化学试剂厂; 甲醇(货号 20231015)购自天津市富宇精细化工有限公司; HRP 标记的二抗(货号 705-035-003、115-035-003)购自美国 Jackson 公司。

1.4 仪器

TGL-18M 型低温高速离心机、HERACELL 150i 型 CO_2 培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); BCD-452WEGR5S 型超低温冰箱(安徽康佳同创电器有限公司); BBS-SDC 型医用洁净工作台(济南鑫贝西生物技术有限公司); SQP-QUINTIX125D-1CN 型十万分之一分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司); TC10TM 型细胞计数仪(美国 Bio-Rad 公司); INFINITE M PLEX 型全自动生化分析仪(瑞士 Tecan 公司); GF254 型薄层板(上海吉至生化科技有限公司); Xevo-TQD 型三重四极杆液质联用仪(美国 Waters 公司)。

2 方法

2.1 丹参提取物的制备

称取丹参药材粉末 1 g 于圆底烧瓶中, 加入 100

mL 75%乙醇, 浸润粉末 0.5 h, 待粉末完全浸湿后, 打开带热套, 开始加热, 回流提取 1 h 后, 用纱布滤过; 药渣加入 100 mL 75%乙醇, 再次提取 1 h, 合并 2 次滤液, 浓缩得到浸膏。

2.2 细胞培养

从 C57BL/6 雄性小鼠股骨中制备骨髓源性巨噬细胞(bone marrow derived macrophage, BMDMs), 用 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素和 50 ng/mL M-CSF 的 DMEM 培养基, 在细胞培养箱中培养 5 d。

2.3 细胞活力检测

BMDMs 以 1.2×10^5 个/孔接种至 96 孔板中, 培养过夜待细胞贴壁。分别加入含不同质量浓度(0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00、16.00 mg/mL)丹参提取物的培养基, 对照组加入不含药物的培养基, 处理 12 h 后, 采用试剂盒检测细胞活力。

2.4 炎症小体活化 BMDMs

BMDMs 以 1.2×10^6 个/mL 接种至 12 孔板中, 培养过夜待细胞贴壁。第 2 天更换培养基, 用 50 ng/mL LPS 预处理 4 h 后, 分别加入含不同质量浓度(0.5、1.0、2.0 mg/mL)丹参提取物或不同浓度(10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)隐丹参酮的 Opti-MEM 培养基处理 1 h 后, 再加入指定的激动剂处理一段时间[尼日利亚霉素 0.5 h, ATP 1 h, SiO_2 6 h, Poly(I: C) 6 h, CC 6 h], 收集细胞及上清液。

2.5 成分的敲出/敲入

用毛细管少量多次将丹参提取物点在薄层板上, 将薄层板放于展开缸中饱和 15 min 后开始展开, 流动相为石油醚-丙酮(8:2)。展开后, 用镊子将隐丹参酮位置抠出, 记为 A+, 剩余部分记为 A-, 并将完整展开且不扣除部分记为 A。将三者放于锥形瓶中, 超声 30 min 将成分与硅胶分离, 滤过后浓缩得到药液。

采用液相-质谱联用对敲出/敲入成分进行鉴定和含量分析。色谱条件: Waters Acquity UPLC[®] HSS T3 C_{18} 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B); 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量 0.3 mL/min。质谱条件: 隐丹参酮相对分子质量 297.1; 母离子 m/z 297.05; 锥孔电压为 24 V; 碰撞能分别为 42、36、34 eV; 子离子 m/z 251.03、282.06、268.00; 正离子电喷雾模式。

2.6 敲出/敲入成分抑制 NLRP3 炎症小体活化

BMDMs 以 1.2×10^6 个/mL 接种至 12 孔板中,

培养过夜待细胞贴壁。第 2 天更换培养基, 用 50 ng/mL LPS 预处理 4 h 后, 分别加入含 A、A+、A-、A+/A- 的 Opti-MEM 培养基处理 1 h, 用指定激动剂处理一段时间 (尼日利亚霉素 0.5 h, ATP 1 h, CC 6 h), 收集细胞及上清液。

2.7 Western blotting 检测细胞上清液中 Caspase-1、IL-1 β 和裂解液中 pro-Caspase-1、pro-IL-1 β 、NLRP3、ASC 蛋白表达

细胞加入 200 μ L 裂解液, 提取细胞总蛋白, 105 $^{\circ}$ C 下煮沸 15 min 使蛋白变性。按照文献方法提取细胞上清液中的蛋白^[18]。蛋白样品经 12% 或 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% 脱脂牛奶, 于室温封闭 1 h, 加入相应一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 洗膜 3 次后, 加入二抗 (1: 5 000), 室温孵育 1 h, 使用增强型化学发光试剂检测目的蛋白条带。

2.8 上清液中 IL-1 β 水平的测定

收集细胞上清液, 按照试剂盒说明书测定 IL-1 β 水平。

2.9 上清液中 Caspase-1 活性的测定

收集细胞上清液, 按照试剂盒说明书测定 Caspase-1 活性。

2.10 统计学分析

数据用 GraphPad Prism 9 软件处理, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用 One-way ANOVA 分析, 使用 unpaired student's *t* 检验来确定 2 组之间是否存在显著差异。

3 结果

3.1 丹参提取物抑制 NLRP3 炎症小体活化

采用 0.25~16.00 mg/mL 丹参提取物干预 BMDMs 12 h 后, 检测细胞活力。如图 1 所示, 0.25~16.00 mg/mL 丹参提取物对 BMDMs 细胞活力无明显影响。

如图 2-A、B、D~F 所示, 用尼日利亚霉素活化 LPS 诱导的 BMDMs 后, 细胞上清液中 Caspase-1、IL-1 β 的蛋白表达水平和分泌量均明显升高 ($P < 0.001$); 给予 1.0、2.0 mg/mL 丹参提取物干预后, 细胞上清液中 Caspase-1 和 IL-1 β 的蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$ 、0.001), 细胞上清液中 IL-1 β 的分泌量明显降低 ($P < 0.001$); 给予 0.5、1.0、2.0 mg/mL 丹参提取物干预后, 细胞上清液中 Caspase-1 活性均明显降低 ($P < 0.001$)。如图 2-A、C 所示, 各组细胞裂解液中 pro-Caspase-1、pro-IL-

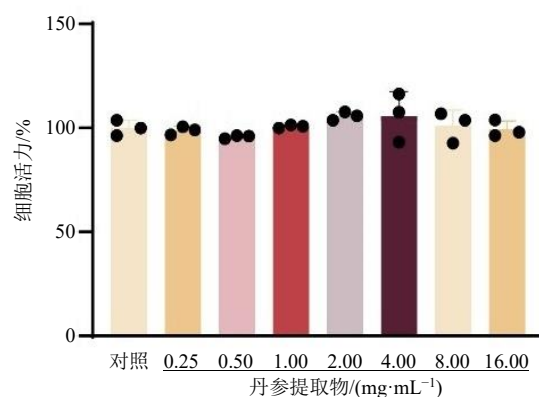


图 1 不同质量浓度的丹参提取物对 BMDMs 活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 1 Effect of different concentrations of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* extract on viability of BMDMs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

1 β 、NLRP3、ASC 蛋白表达无明显变化。表明丹参提取物对尼日利亚霉素刺激活化的 NLRP3 炎症小体有抑制作用。

如图 3-A~C、E、F 所示, 用 ATP 活化 LPS 诱导的 BMDMs 后, 细胞上清液中 Caspase-1 和 IL-1 β 的蛋白表达水平和分泌量明显升高 ($P < 0.01$ 、0.001); 给予 1.0、2.0 mg/mL 丹参提取物干预后, 细胞上清液中 IL-1 β 蛋白表达及 Caspase-1、IL-1 β 的分泌量明显降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001); 给予 0.5、1.0、2.0 mg/mL 丹参提取物干预后, 细胞上清液中 Caspase-1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$ 、0.001)。如图 3-A、C 所示, 各组细胞裂解液中 pro-Caspase-1、pro-IL-1 β 、NLRP3、ASC 蛋白表达无明显变化。表明丹参提取物对 ATP 诱导的 NLRP3 炎症小体活化也有抑制作用。

如图 4-A~C、H、I 所示, 除了 ATP 和尼日利亚霉素外, NLRP3 炎症小体还可被 SiO₂、Poly (I: C)、CC 激活。给予 1.0 mg/mL 丹参提取物干预后, 细胞上清液中 Caspase-1 和 IL-1 β 的蛋白表达水平和分泌量呈不同程度的降低, 其中尼日利亚霉素组和 SiO₂ 组细胞上清液中 Caspase-1 和 IL-1 β 的蛋白表达水平和分泌量均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.001), ATP 组和 Poly (I: C) 组细胞上清液中 Caspase-1 蛋白表达水平和 Caspase-1、IL-1 β 的分泌量均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), CC 组细胞上清液中 Caspase-1 活性显著降低 ($P < 0.01$)。如图 4-A、D~G 所示, 各组细胞裂解液中 pro-Caspase-1、pro-IL-

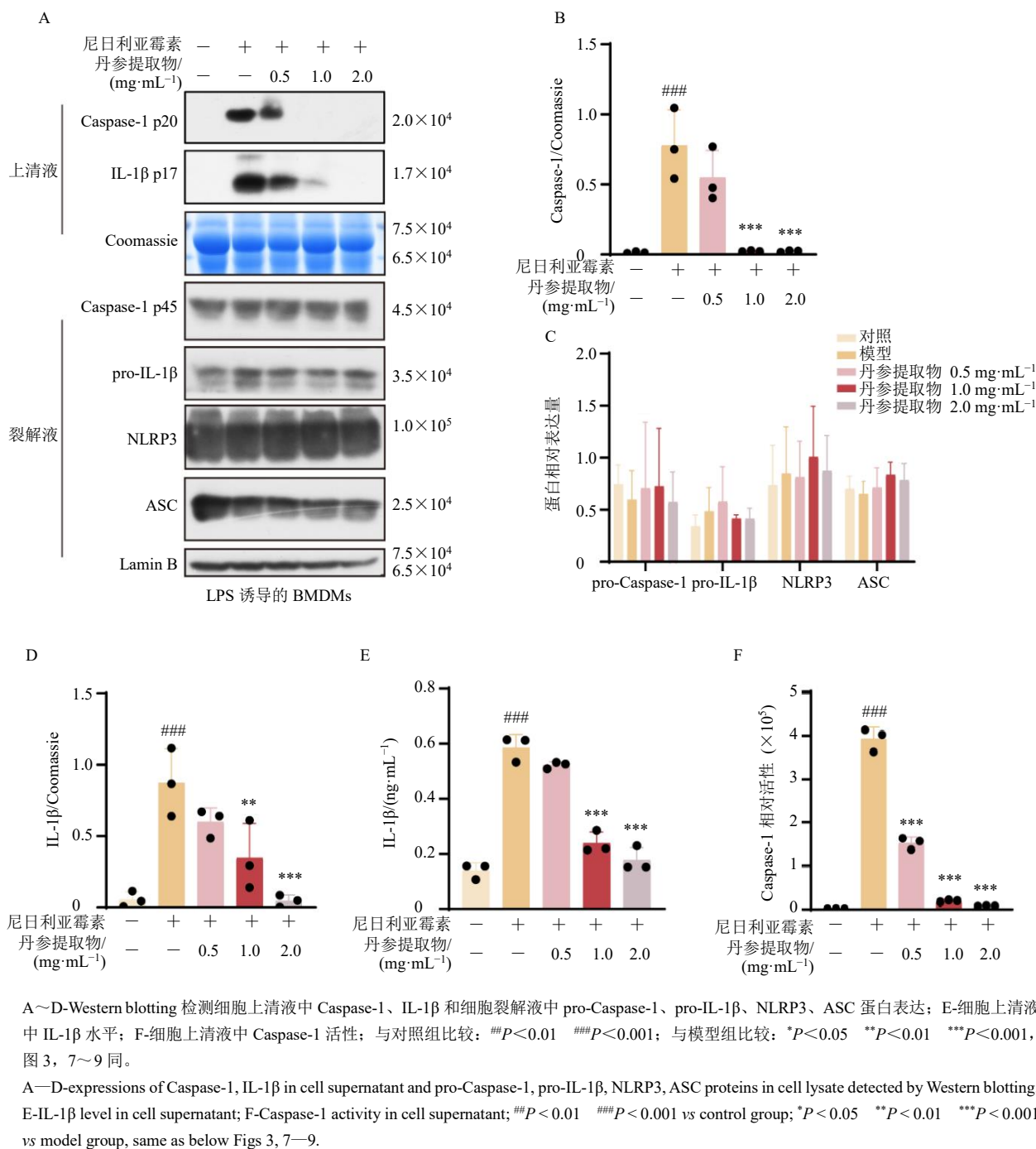


图 2 丹参提取物抑制尼日利亚霉素诱导的 NLRP3 炎症小体活化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

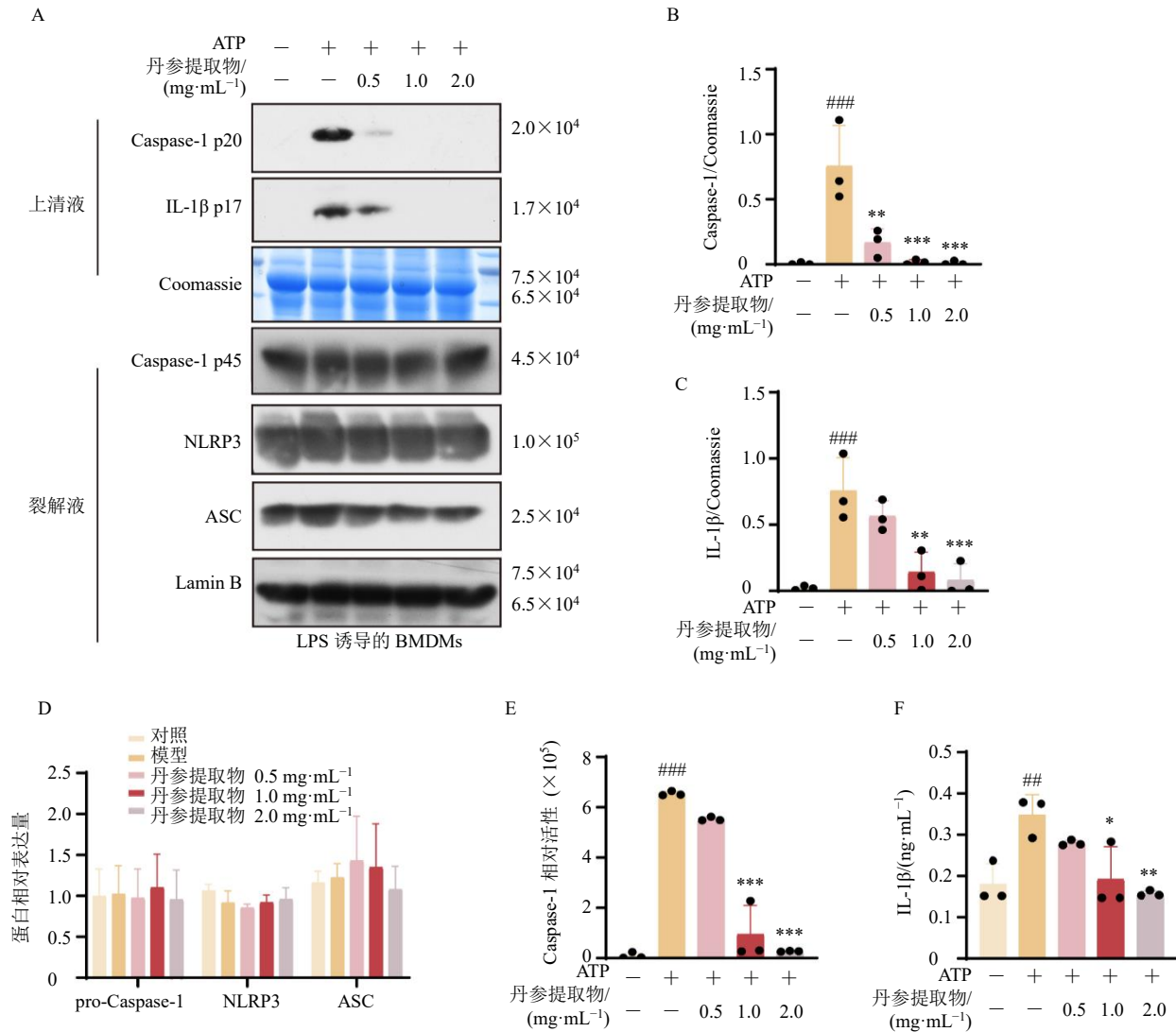
Fig. 2 *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* extract inhibits activation of NLRP3 inflammasome induced by nigericin ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

1β、NLRP3、ASC 蛋白表达无明显变化。表明丹参提取物对 NLRP3 炎症小体活化有广泛的抑制作用。

3.2 采用薄层色谱法“敲出”隐丹参酮制备目标成分样品及阴性样品

基于成分敲出/敲入方法对丹参中成分隐丹参酮进行“敲出”，在薄层板上对丹参提取物 (A) 进

行展开分离 (图 5)，制备目标成分 (A+) 以及阴性样品 (A-)，并通过质谱对目标成分及阴性样品进行检测。由图 6 可知，“敲出”隐丹参酮后，阴性样品 (A-) 中隐丹参酮含量明显降低，几乎不含该目标成分，说明成功从丹参总体物中“敲出”隐丹参酮，得到目标成分及阴性样品。



A~D—Western blotting 检测细胞上清液中 Caspase-1、IL-1β 和细胞裂解液中 pro-Caspase-1、pro-IL-1β、NLRP3、ASC 蛋白表达；E—细胞上清液中 Caspase-1 活性；F—细胞上清液中 IL-1β 水平。

A~D—expressions of Caspase-1, IL-1β in cell supernatant and pro-Caspase-1, pro-IL-1β, NLRP3, ASC proteins in cell lysate detected by Western blotting; E—Caspase-1 activity in cell supernatant; F—IL-1β level in cell supernatant.

图 3 丹参提取物抑制 ATP 诱导的 NLRP3 炎症小体活化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

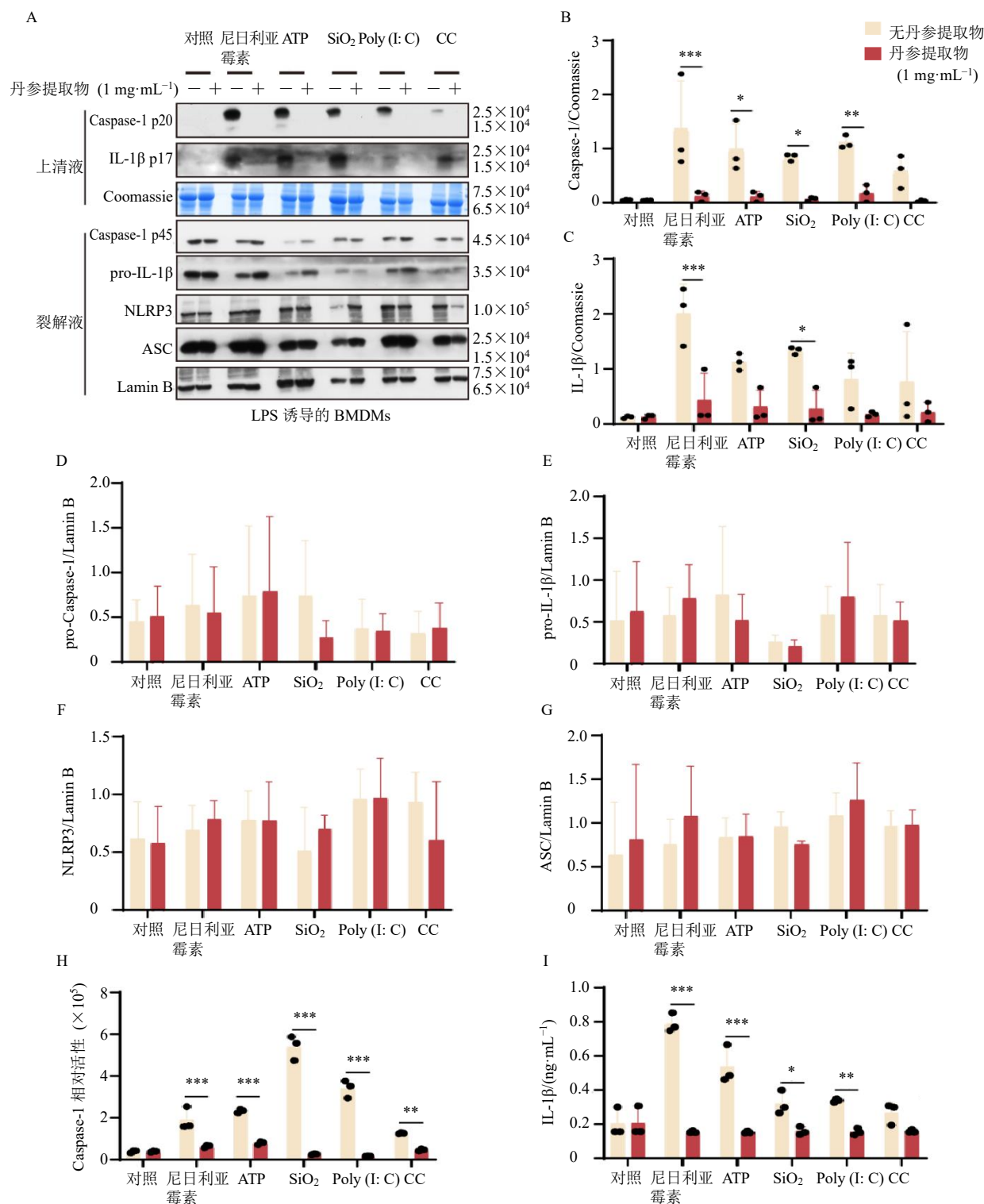
Fig. 3 *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* extract inhibits activation of NLRP3 inflammasome induced by ATP ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 隐丹参酮是丹参抑制 NLRP3 炎症小体活化的关键成分

如图 7-A~C 所示，用尼日利亚霉素活化 LPS 诱导的 BMDMs 后，细胞上清液中 Caspase-1 和 IL-1β 的蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.001$)；给予 20、40 μmol/L 隐丹参酮干预后，细胞上清液中 Caspase-1 和 IL-1β 的蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。如图 7-A、D 所示，各组细胞裂解液中 pro-Caspase-1、pro-IL-1β、NLRP3、ASC 蛋白表达无明显变化。

表明隐丹参酮对尼日利亚霉素诱导的 NLRP3 炎症小体活化有抑制作用。

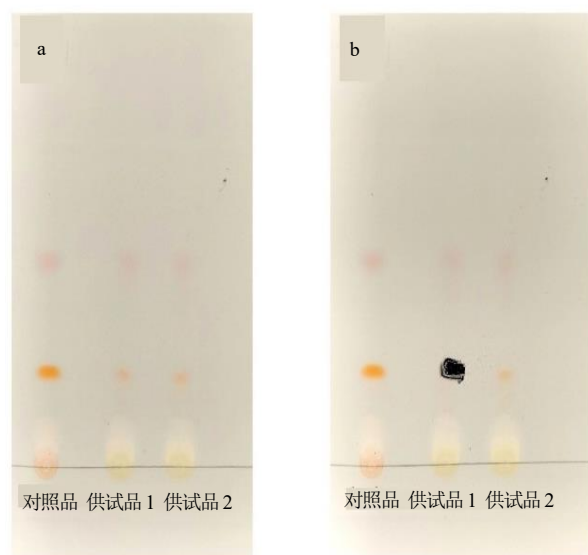
进一步评价隐丹参酮在丹参抑制 NLRP3 炎症小体活化中的作用。在 BMDMs 中，将丹参提取物 (A)、目标成分 (A+)、阴性样品 (A-)、阴性样品中回补目标成分 (A-/A+) 分别预处理细胞 1 h，然后分别加入尼日利亚霉素、CC 刺激 0.5、6 h，收集细胞上清液及细胞裂解液，采用 Western blotting 和 ELISA 检测 NLRP3 炎症小体相关蛋白表达和分泌



A~G-Western blotting 检测细胞上清液中 Caspase-1、IL-1β 和细胞裂解液中 pro-Caspase-1、pro-IL-1β、NLRP3、ASC 蛋白表达；H-细胞上清液中 Caspase-1 活性；I-细胞上清液中 IL-1β 水平；* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A~G-expressions of Caspase-1, IL-1β in cell supernatant and pro-Caspase-1, pro-IL-1β, NLRP3, ASC proteins in cell lysate detected by Western blotting; H-Caspase-1 activity in cell supernatant; I-IL-1β level in cell supernatant; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

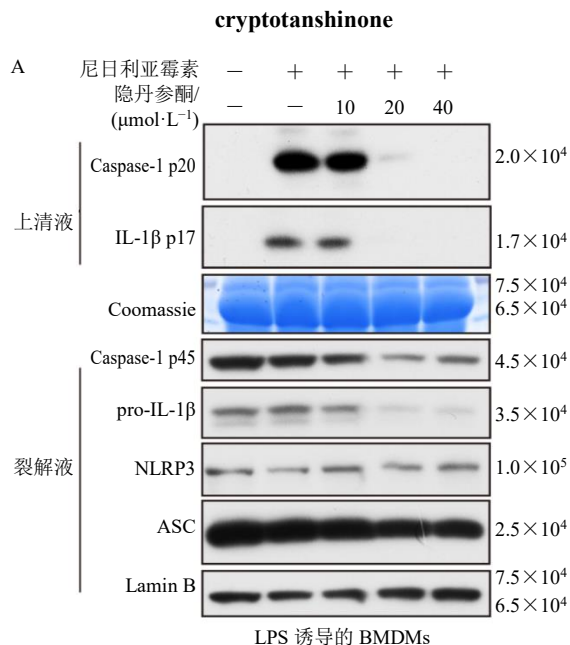
图 4 丹参提取物抑制尼日利亚霉素、ATP、SiO₂、Poly (I: C)、CC 诱导的 NLRP3 炎症小体活化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 4 *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* extract inhibits activation of NLRP3 inflammasome induced by nigericin, ATP, SiO₂, Poly (I: C) and CC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



a-点样及展开图; b-“敲出”隐丹参酮 (A+)、(A-)、(A) 样本制备示意图。

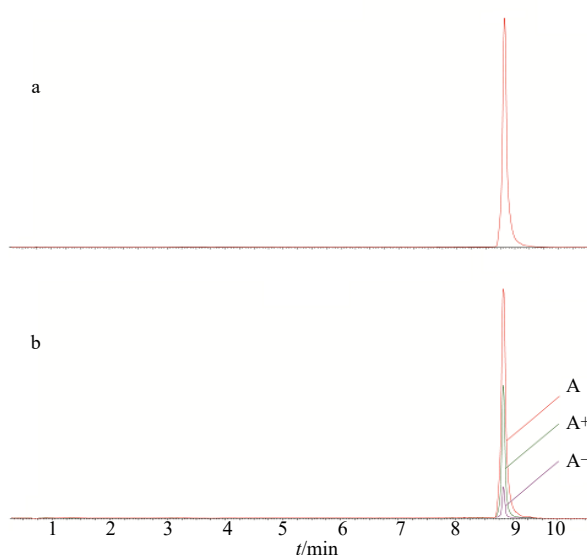
a-spotting and development diagram; b-schematic diagram of sample preparation for “knocking-out” cryptotanshinone (A+), (A-), (A).

图 5 丹参提取物样品、“敲出”隐丹参酮示意图
Fig. 5 Schematic diagram of sample of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* extract and “knock-out”



A~D-Western blotting 检测细胞上清液中 IL-1β、Caspase-1 和细胞裂解液中 pro-Caspase-1、pro-IL-1β、NLRP3、ASC 蛋白表达。
A—D-expressions of IL-1β, Caspase-1 in cell supernatant and pro-Caspase-1, pro-IL-1β, NLRP3, ASC proteins in cell lysate detected by Western blotting.

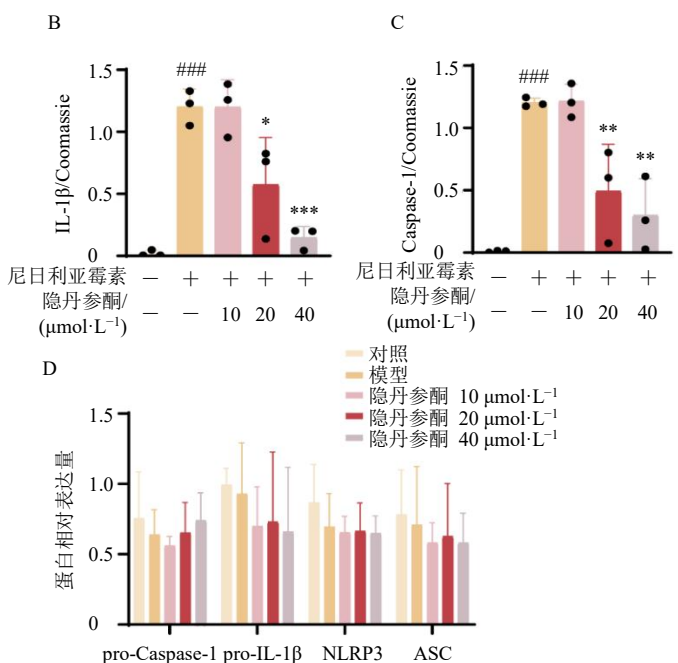
图 7 隐丹参酮抑制尼日利亚霉素诱导的 NLRP3 炎症小体活化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 7 Cryptotanshinone inhibits activation of NLRP3 inflammasome induced by nigericin ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



a-隐丹参酮对照品; b-丹参提取物“敲出”隐丹参酮样品, A 为丹参提取物, A+为目标成分, A-为阴性样品。

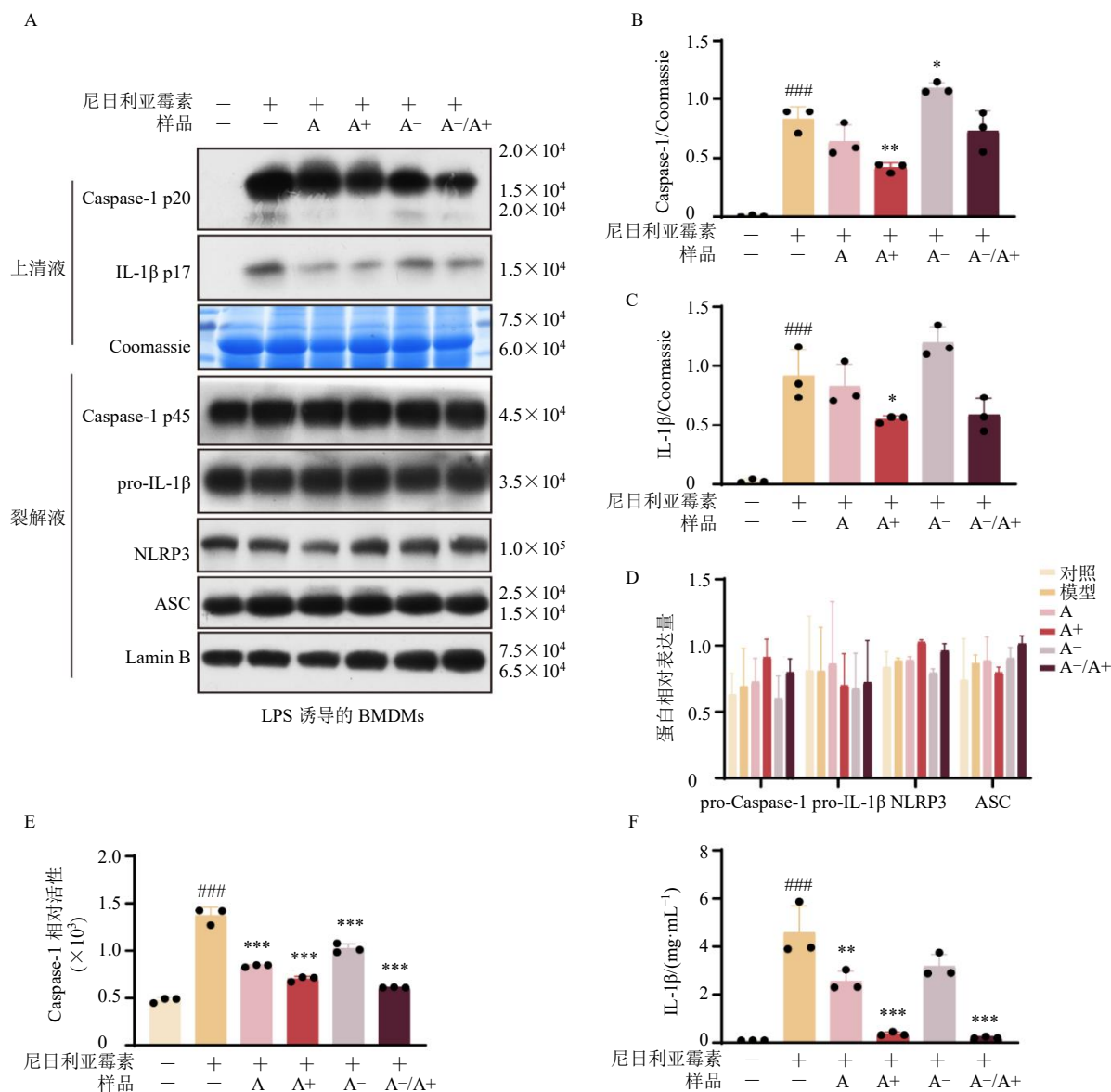
a-standard of cryptotanshinone; b-sample of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* extract “knocked-out” cryptotanshinone, A is *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* extract, A+ is target component, A- is negative sample.

图 6 质谱检测丹参提取物、目标成分及阴性样品
Fig. 6 Mass spectrometry analysis of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* extract, target components and negative samples



量。如图 8-A~C、E、F 所示，在尼日利亚霉素的刺激下，与模型组比较，A 组细胞上清液中 Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达水平呈降低趋势，上清液中 Caspase-1 活性及 IL-1 β 水平显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001)；A+组细胞上清液中 Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达和 Caspase-1、IL-1 β 分泌量均显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)；A-组细胞上清液中 Caspase-1 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$)，IL-1 β 蛋白表达

水平呈升高趋势，Caspase-1 活性显著降低 ($P<0.001$)，IL-1 β 分泌量呈降低趋势，表明 A-对 NLRP3 炎症小体的活化抑制作用减弱；A+/A-组细胞上清液中 Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达水平呈降低趋势，Caspase-1 活性及 IL-1 β 分泌量显著降低 ($P<0.001$)。如图 8-A、D 所示，各组细胞裂解液中 pro-Caspase-1、pro-IL-1 β 、NLRP3、ASC 蛋白表达无明显变化。



A~D-Western blotting 检测细胞上清液中 Caspase-1、IL-1 β 和细胞裂解液中 pro-Caspase-1、pro-IL-1 β 、NLRP3、ASC 蛋白表达；E-细胞上清液中 Caspase-1 活性；F-细胞上清液中 IL-1 β 水平。

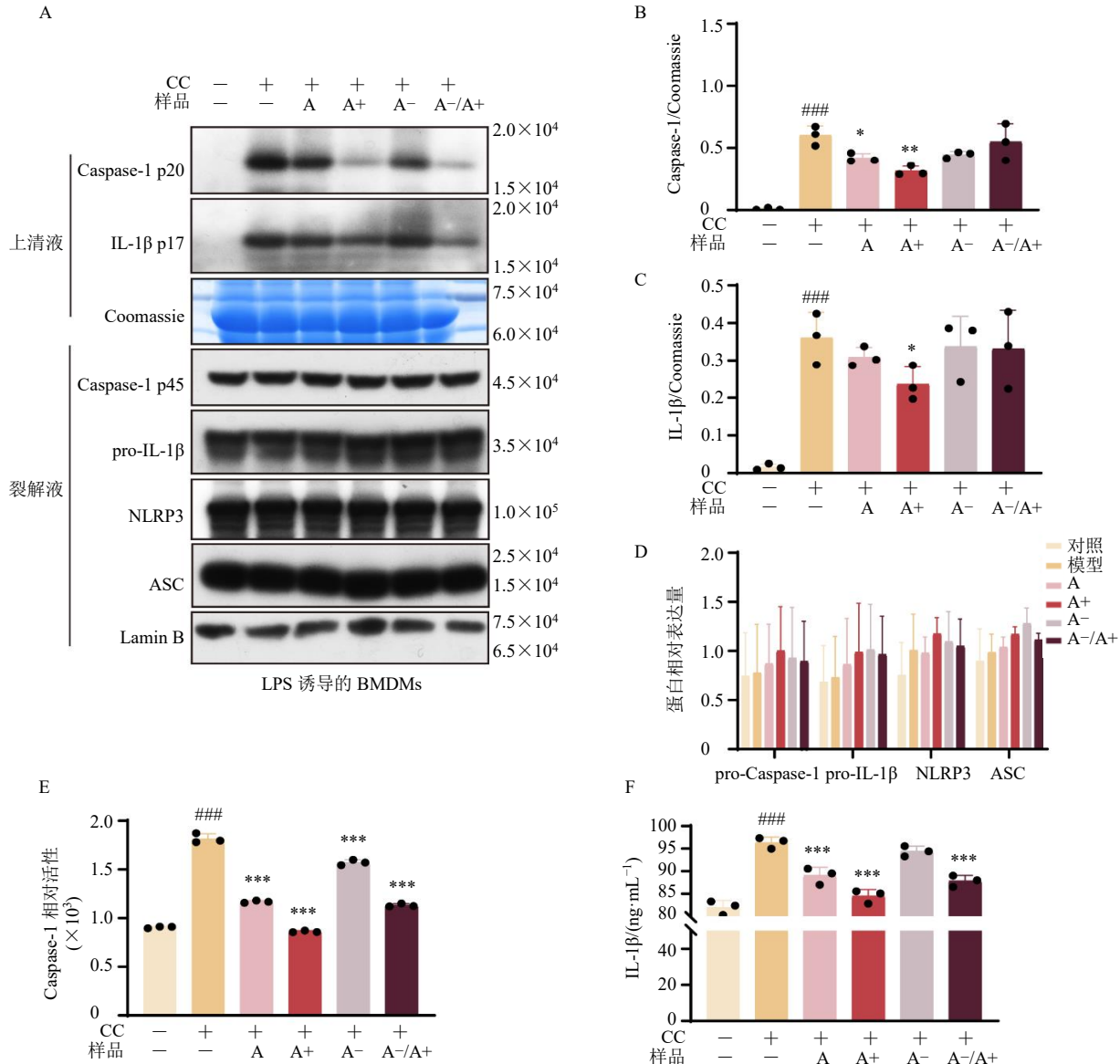
A~D-expressions of Caspase-1, IL-1 β in cell supernatant and pro-Caspase-1, pro-IL-1 β , NLRP3, ASC proteins in cell lysate detected by Western blotting; E-Caspase-1 activity in cell supernatant; F-IL-1 β level in cell supernatant.

图 8 丹参敲出/敲入各组对尼日利亚霉素刺激的 NLRP3 炎症小体活化抑制情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Inhibition of NLRP3 inflammasome activation stimulated by nigerimycin in *Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma* knock-out/knock-in groups ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

CC 导致 NLRP3 炎症小体活化, 进而释放炎症因子, 是动脉粥样硬化的主要病因^[21]。如图 9-A~C、E、F 所示, 在 CC 的刺激下, 与模型组比较, A 组细胞上清液中 Caspase-1 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$), IL-1 β 蛋白表达水平呈降低趋势, 上清液中 Caspase-1 活性及 IL-1 β 水平显著降低 ($P<0.001$); A+组细胞上清液中 Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达和 Caspase-1、IL-1 β 分泌量均显著降低 ($P<$

0.05、0.01、0.001); A-组细胞上清液中 Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达及 IL-1 β 分泌量呈降低趋势, Caspase-1 活性显著降低 ($P<0.001$); A+/A-组细胞上清液中 Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达水平呈降低趋势, Caspase-1 活性及 IL-1 β 分泌量显著降低 ($P<0.001$)。如图 9-A、D 所示, 各组细胞裂解液中 pro-Caspase-1、pro-IL-1 β 、NLRP3、ASC 蛋白表达无明显变化。以上结果表明, A+抑制炎症小体活化的能



A~D-Western blotting 检测细胞上清液中 Caspase-1、IL-1 β 和细胞裂解液中 pro-Caspase-1、pro-IL-1 β 、NLRP3、ASC 蛋白表达; E-细胞上清液中 Caspase-1 活性; F-细胞上清液中 IL-1 β 水平。

A~D-expressions of Caspase-1, IL-1 β in cell supernatant and pro-Caspase-1, pro-IL-1 β , NLRP3, ASC proteins in cell lysate detected by Western blotting; E-Caspase-1 activity in cell supernatant; F-IL-1 β level in cell supernatant.

图 9 丹参敲出/敲入各组对 CC 刺激的 NLRP3 炎症小体活化抑制情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Inhibition of NLRP3 inflammasome activation stimulated by CC in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* knock-out/knock-in groups ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

力最强,“敲出”隐丹参酮后,丹参对炎症小体活化的抑制作用下降,“敲入”隐丹参酮后,能够恢复丹参对炎症小体活化的抑制作用。

4 讨论

本研究发现丹参提取物对 NLRP3 炎症小体的活化有抑制作用,且呈剂量相关性。同时利用中药成分敲出/敲入手段,将丹参中成分隐丹参酮“敲出”,发现丹参提取物对 NLRP3 炎症小体活化抑制作用下降,将隐丹参酮“敲入”,丹参提取物抑制 NLRP3 炎症小体活化作用回升。由此可见,隐丹参酮是丹参抑制 NLRP3 炎症小体的主要活性物质。

有研究表明,丹参酮能够通过抑制 NF- κ B 相关炎症通路活化,减少炎症因子的释放,从而缓解炎症诱发的疾病^[20]。Guo 等^[21]通过降低人肾小球内皮细胞(HRGECS)中活性氧的表达,抑制 NLRP3 炎症小体的活化,检测发现 cleaved IL-1 β 、cleaved Caspase-1、NLRP3 表达均降低。同时,有研究发现在 LPS 诱导的大鼠抑郁症模型中,与模型组比较,丹参酸 B 组 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达量明显下降,表明丹参酸 B 对 NLRP3 炎症小体的活化有抑制作用。本研究仅对丹参中的隐丹参酮抑制 NLRP3 炎症小体活化进行验证,但对于其他丹参成分是否抑制 NLRP3 炎症小体活化还需要进一步研究,丹参中其他活性成分是否协同或拮抗隐丹参酮抑制 NLRP3 炎症小体活化还尚未可知。

现有研究及临床试验均表明丹参对动脉粥样硬化具有治疗作用。CC 存在于动脉粥样硬化的所有阶段^[22-23]。Duewell 等^[24]发现 CC 诱导 NLRP3 炎症小体活化,释放 IL-1 β ,并形成斑块。动脉粥样硬化病变的特征是脂质的积累、CC 和免疫细胞的浸润。本研究结果显示,丹参提取物对 CC 诱导活化的 NLRP3 炎症小体活化有抑制作用,并减少 IL-1 β 的释放。敲出隐丹参酮后,丹参对 CC 刺激活化的 NLRP3 炎症小体抑制作用减弱,提示隐丹参酮可能是丹参抑制 NLRP3 炎症小体防治动脉粥样硬化的重要成分。隐丹参酮作为丹参中主要活性成分之一,有望成为临床中治疗动脉粥样硬化的新药物。

丹参在抑制疾病炎症方面表现出很好的作用,NLRP3 炎症小体是关键炎症通路,本研究发现隐丹参酮是丹参抑制 NLRP3 炎症小体的关键活性成分,为进一步理解丹参的药理作用提供依据,同时为基于丹参的新药开发和质量控制提供了参考和依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 翟俊杰,左亚锋,王孟虎,等.丹参品种、产地及栽培历史本草考证[J].辽宁中医药大学学报,2024,26(5):130-137.
- [2] Guo Y B, Li Y, Xue L M, et al. *Salvia miltiorrhiza*: An ancient Chinese herbal medicine as a source for anti-osteoporotic drugs [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(3): 1401-1416.
- [3] 王静,董振华,芦波,等.丹参活性成分及制剂在心血管病中的研究进展[J].时珍国医国药,2019,30(6):1453-1456.
- [4] 李新星.丹参酮类成分抗炎作用及机制研究[D].南宁:广西中医药大学,2021.
- [5] Li X X, Qiu H X, Gan J Y, et al. Total tanshinones protect against acute lung injury through the PLC γ 2/NLRP3 inflammasome signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 314: 116478.
- [6] Chou W C, Jha S, Linhoff M W, et al. The NLR gene family: From discovery to present day [J]. *Nat Rev Immunol*, 2023, 23(10): 635-654.
- [7] 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.
- [8] Li Q, Feng H, Wang H B, et al. Licochalcone B specifically inhibits the NLRP3 inflammasome by disrupting NEK7-NLRP3 interaction [J]. *EMBO Rep*, 2022, 23(2): e53499.
- [9] 刘燕,徐磊,史玉柱,等.基于 NLRP3 炎症通路探讨滨蒿提取物对急性肺损伤小鼠的保护作用机制[J].中草药,2025,56(16):5837-5846.
- [10] 禹艳丽,成翠芹,何昱廷,等.蝙蝠葛碱抑制溶酶体损伤激活的 NLRP3 炎症小体研究[J].中草药,2025,56(7):2356-2363.
- [11] Kong P, Cui Z Y, Huang X F, et al. Inflammation and atherosclerosis: Signaling pathways and therapeutic intervention [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 131.
- [12] Bäck M, Yurdagul A Jr, Tabas I, et al. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: Mediators and therapeutic opportunities [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16(7): 389-406.
- [13] 肖小河,鄢丹,袁海龙,等.基于成分敲除/敲入的中药药效组分辨识与质量控制模式的商建[J].中草药,2009,40(9):1345-1348.
- [14] 孔维军.基于成分敲出/敲入的中药(牛黄)药效物质辨识和质量控制模式的初步研究[D].成都:成都中医药大学,2011.
- [15] 李兴丰.基于目标成分“敲出/敲入”的姜黄药效物质辨识与质量控制方法的初步研究[D].长沙:湖南中医药大学,2011.

- [16] Xu J S, Tanaka H, Shoyama Y. One-step immunochromatographic separation and ELISA quantification of glycyrrhizin from traditional Chinese medicines [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 850(1/2): 53-58.
- [17] Uto T, Morinaga O, Tanaka H, *et al.* Analysis of the synergistic effect of glycyrrhizin and other constituents in licorice extract on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production using knock-out extract [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 417(1): 473-478.
- [18] 何静. 基于目标成分“敲出/敲入”质量控制模式的中药姜黄抗氧化药效物质辨识 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2011.
- [19] Wang J J, Ye W L, Zou J M, *et al.* Targeting the smooth muscle cell Keap1-Nrf2-GSDMD-pyroptosis axis by cryptotanshinone prevents abdominal aortic aneurysm formation [J]. *Theranostics*, 2024, 14(17): 6516-6542.
- [20] Liao X Z, Xie R X, Zheng S Y, *et al.* Bioinformatics and molecular docking reveal cryptotanshinone as the active anti-inflammation component of Qu-Shi-Xie-Zhuo Decoction by inhibiting S100A8/A9-NLRP3-IL-1 β signaling [J]. *Phytomedicine*, 2025, 136: 156257.
- [21] Guo C S, Chi Z X, Jiang D L, *et al.* Cholesterol homeostatic regulator SCAP-SREBP2 integrates NLRP3 inflammasome activation and cholesterol biosynthetic signaling in macrophages [J]. *Immunity*, 2018, 49(5): 842-856.
- [22] 郭宁宁, 苏力德, 斯日古冷, 等. 丹参酮对细胞信号通路调控作用的研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2025, 42(4): 665-678.
- [23] Niyonzima N, Bakke S S, Gregersen I, *et al.* Cholesterol crystals use complement to increase NLRP3 signaling pathways in coronary and carotid atherosclerosis [J]. *EBioMedicine*, 2020, 60: 102985.
- [24] Duewell P, Kono H, Rayner K J, *et al.* NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals [J]. *Nature*, 2010, 464(7293): 1357-1361.

[责任编辑 李亚楠]