

左归降糖舒心方含药血浆调控 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路抑制 ox-LDL 诱导 J774A.1 巨噬细胞焦亡的机制

杨金伟, 喻嵘, 吴勇军, 肖凡, 刘秀, 邓奕辉 (湖南中医药大学, 湖南长沙 410208)

摘要: 目的 基于 NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)/半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1)/Gasdermin D (GSDMD)通路探讨左归降糖舒心方含药血浆对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导 J774A.1 巨噬细胞焦亡的调控机制。方法 将分化完全的 J774A.1 巨噬细胞分为空白血浆组、模型组、左归降糖舒心方含药血浆组、MCC950(NLRP3 特异性抑制剂)组, 每组 6 个复孔。除空白血浆组外, 其余各组以 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ox-LDL 诱导细胞, 构建细胞焦亡模型。空白血浆组、模型组、MCC950($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组以含 10%空白血浆进行培养, 左归降糖舒心方含药血浆组用 10%含药血浆培养细胞 24 h。采用 CCK-8 法测定各组细胞增殖情况, 计算细胞增殖抑制率; 采用 LDH 释放实验检测细胞膜完整性及细胞焦亡水平; 采用 ELISA 法及免疫荧光法检测细胞白细胞介素(IL)1 β 、IL-18 含量及蛋白表达情况; 采用 Western Blot 法检测 NLRP3、Caspase-1 及 GSDMD 蛋白表达。结果 与空白血浆组比较, 模型组细胞的 IL-18、IL-1 β 含量及 LDH 释放率明显增高($P < 0.01$), IL-1 β 、IL-18 及 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达明显上调($P < 0.01$)。与模型组比较, 左归降糖舒心方含药血浆组细胞的 IL-18、IL-1 β 含量及 LDH 释放率明显下降($P < 0.01$), IL-1 β 、IL-18 及 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达明显下调($P < 0.01$)。结论 左归降糖舒心方含药血浆能够抑制 ox-LDL 诱导的 J774A.1 巨噬细胞焦亡状态及炎症反应, 其作用机制可能与调控 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路, 下调细胞炎症因子 IL-18、IL-1 β 表达有关。

关键词: 左归降糖舒心方含药血浆; J774A.1 细胞; 细胞焦亡; 炎症反应; NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路; IL-18; IL-1 β

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2022)02-0165-08

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2022.02.004

Inhibition Effect of Zuogui Jiangtang Shuxin Medicated Plasma on Pyroptosis of J774A.1 Cells Induced by ox-LDL through NLRP3/Caspase-1/GSDMD Signaling Pathway

YANG Jinwei, YU Rong, WU Yongjun, XIAO Fan, LIU Xiu, DENG Yihui (Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208 Hunan, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of *Zuogui Jiangtang Shuxin* medicated plasma on ox-LDL-induced pyroptosis J774A.1 cells by NOD like receptor thermoprotein domain 3(NLRP3)/cysteine-proteinase-1(Caspase-1)/GSDMD pathway. **Methods** Differentiated J774A.1 cells were pretreatment with ox-LDL ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) to establish experimental model for pyroptosis, which were randomly divided into 4 groups: the blank plasma group, the model group, the *Zuogui Jiangtang Shuxin* medicated plasma group, and the MCC950(NLRP3 specific inhibitor) group, 6 replicates in each group. Except the blank plasma group, cells in the other groups were treated with $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

收稿日期: 2021-03-17

作者简介: 杨金伟, 男, 博士, 主治医师, 研究方向: 中西医结合防治内分泌疾病。Email: ykingjay@126.com。通信作者: 喻嵘, 女, 博士, 教授, 研究方向: 中医药防治内分泌疾病。Email: 1208466238@qq.com。邓奕辉, 女, 博士, 教授, 研究方向: 中西医结合防治内分泌疾病。Email: 644138330@qq.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81573956, 82074400); 湖南省重点研发计划项目(2020SK2101); 湖南省教育厅科研项目(18A220, 20K094, 21B0390); 湖南省“国内一流建设学科”中医学开放基金项目(2021ZYX17); 湖南省中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地开放基金项目(21PTKF1016)。

ox-LDL. The passages were divided into two parts, the blank plasma and model groups were cultured by 10% blank plasma, *Zuogui Jiangtang Shuxin* medicated plasma group and MCC950 group were cultured by 10% drug containing plasma or MCC950($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 h. The proliferation of J774A.1 cells were tested by CCK-8 assay after 24 h culture and the inhibition rates were calculated. LDH releasing test was used to check the integrity of cell membrane. ELISA and immunofluorescence were used to detect expression of inflammatory cytokines such as IL-18 and IL-1 β . The expression of NLRP3, Caspase-1 and GSDMD were detected by Western Blot. **Results** Compared with the blank plasma group, $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ox-LDL suppressed the growth of J774A.1 cells. It was also shown by LDH releasing test and ELISA that the LDH activity, IL-18 and IL-1 β levels significantly increased in model group cells($P<0.01$); ox-LDL could up-regulated the expression of NLRP3, Caspase-1, GSDMD, IL-18 and IL-1 β ($P<0.01$). Compared with model group, *Zuogui Jiangtang Shuxin* medicated plasma can effectively reduce the LDH release and the levels of IL-18 and IL-1 β ($P<0.01$), and can significantly restrain the expression of NLRP3, Caspase-1, GSDMD, also obviously decreased expression of inflammatory cytokine associated proteins IL-18 and IL-1 β ($P<0.01$). **Conclusion** *Zuogui Jiangtang Shuxin* medicated plasma can suppress the pyroptosis and inflammatory state of J774A.1 macrophages induced by ox-LDL, and its mechanism may be related to the inhibition of NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling pathway and IL-18, IL-1 β expression.

Keywords: *Zuogui Jiangtang Shuxin* medicated plasma; J774A.1 cells; pyroptosis; inflammation response; NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling pathway; IL-18; IL-1 β

糖尿病是由于胰岛素分泌不足或功能缺陷引起的以高血糖为特征的代谢性疾病^[1]。长期高血糖可引起机体代谢紊乱, 诱发严重并发症。动脉粥样硬化性疾病是糖尿病的主要血管并发症。巨噬细胞是糖尿病动脉粥样硬化发生发展过程中的关键靶细胞之一^[2]。巨噬细胞功能状态影响着糖尿病动脉粥样硬化的整个过程^[3]。在病变早期, 单核细胞在趋化因子的作用下聚集在病变部位, 与内皮细胞黏附, 随后内迁于内皮下转换为巨噬细胞, 由于巨噬细胞清除凋亡细胞能力正常, 不仅能减少斑块细胞数量, 而且能减少细胞外胶原降解, 从而抑制动脉粥样硬化的进展。随着病程进展, 巨噬细胞摄入氧化低密度脂蛋白(ox-LDL), 胆固醇逆转障碍, 形成泡沫细胞, 并出现大量细胞死亡, 有效吞噬功能丧失, 继发性形成动脉粥样硬化斑块的坏死核心, 产生炎症效应而影响纤维帽, 增加斑块不稳定性^[4-5]。随着对糖尿病动脉粥样硬化病理机制研究的深入, 慢性炎症的持续作用在粥样斑块形成和进展中的重要作用逐步被证实, 而巨噬细胞焦亡及其过程中的炎症释放特性是参与病程发生发展的关键环节^[6]。细胞焦亡依赖于半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1)完成细胞程序性死亡代谢过程, 其可激活炎症细胞因子白细胞介素(IL)18、IL-1 β 的合成和释放, 产生

级联放大的炎症反应^[7]。

本课题组前期研究^[8-9]表明, 以滋阴益气、活血解毒立法组方的左归降糖舒心方对糖尿病心血管疾病疗效确切, 具有改善糖脂代谢和减少炎症因子对细胞损伤的作用, 能减缓糖尿病并发血管病变的风险。故本研究拟从巨噬细胞焦亡调控角度出发, 探讨左归降糖舒心方含药血浆对 NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)/Caspase-1/Gasdermin D(GSDMD)通路及炎症因子 IL-1 β 、IL-18 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞株 8 周龄 SD 雄性大鼠 20 只, 体重(200 \pm 20)g, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 动物生产许可证号: SCXK(湘)2016-0002, 动物质量合格证号: 43004700029165; 饲养于湖南中医药大学含浦校区实验动物中心, 温度: (22 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$, 湿度: 50%~65%, 自由摄食、饮水, 12 h/12 h 光暗周期(光照时间为 6:00~18:00)。小鼠 J774A.1 巨噬细胞(批号: 17369), 购自湖南丰晖生物科技有限公司。

1.2 药物及试剂 左归降糖舒心方由黄芪 18 g、生地 15 g、黄连 6 g、丹参 9 g、山茱萸 12 g、山楂 9 g、葛根 12 g 组成, 所用饮片均购自于湖南中医药大学

第一附属医院门诊部中药房,经湖南中医药大学药学院李雅副教授鉴定合格。将上述组方饮片以 5 倍量水浸泡 1 h,煮沸后以小火煎煮 30 min,过滤,药渣再加 3 倍量水煎煮 20 min,过滤;合并 2 次滤液,混合浓缩制备成含生药质量浓度为 $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液,经灭菌后置于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,备用。

MCC950(NLRP3 特异性抑制剂),购自美国 Sigma 公司,批号: PZ0280;胎牛血清(批号: 42F0266K)、胰蛋白酶-EDTA 消化液(批号: 2120539),均购自美国 Gibco 公司;高糖 DMEM 培养基(批号: AF29422282)、PBS 缓冲液(批号: AD17792273),均购自美国 Hyclone 公司;CCK-8 检测试剂盒,北京博奥森生物技术有限公司,批号: AI07246697;无血清细胞冻存液,苏州新赛美生物科技有限公司,批号: 18061073;IL- 1β (批号: ml063132)、IL-18(批号: ml063131)ELISA 检测试剂盒,均购自上海酶联生物科技有限公司;LDH 释放检测试剂盒(批号: ab102526)、兔抗 NLRP3 多克隆抗体(批号: ab260017)、兔抗 Caspase-1 多克隆抗体(批号: ab138483)、兔抗 GSDMD 多克隆抗体(批号: ab219800)、兔抗 IL-18 多克隆抗体(批号: ab207323)及兔抗 IL- 1β 多克隆抗体(批号: ab234437),均购自英国 Abcam 公司。

1.3 主要仪器 SW-CJ-2G 超净工作台、PikoReal96 型荧光定量 PCR 仪、SPL0960 型荧光 PCR 板,美国 Thermo Scientific 公司;CCL-170T-8 型 CO_2 培养箱,新加坡 ESCO 公司;BA210T 型荧光显微镜,北京普瑞赛司仪器有限公司;TGL-18R 型台式冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;ELx800 型酶标仪,美国 BioTek 公司;DYCZ-40A 型转膜仪、DYCZ-24EN 型电泳槽,北京六一生物科技有限公司;XB-K-25 型细胞计数板,上海求精生化试剂仪器有限公司。

1.4 含药血浆的制备 将 20 只 SD 大鼠随机分成 2 组:空白血浆组、左归降糖舒心方组,每组 10 只。左归降糖舒心方组按照 $25.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃($12.9 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)给予左归降糖舒心方药液($2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$);空白血浆组采用等容量的灭菌超纯水灌胃,每日 1 次,连续 5 d。末次灌胃 1 h 后,采用 10%水合氯醛 $3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 麻醉大鼠,腹主动脉取血,用含肝素抗凝管收集血液,静置 3 h;然后,以 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ (离心半径 15 cm)离心 15 min,移液枪取上层血浆, $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, $56 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅灭活 30 min;将灭活的血浆分

装至无菌 EP 管中并标记,置于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.5 细胞培养及处理 将分化完全的 J774A.1 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基进行培养。置于 5% CO_2 、 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 饱和湿度的恒温培养箱, 2~3 d 换液 1 次,细胞融合至 80%~90%时按照 1:2 比例传代,取对数生长期细胞进行实验。J774A.1 细胞用 10% FBS DMEM 培养液调整细胞密度为 $5 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的悬液,予以 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ox-LDL 诱导 24 h 后收集细胞。随机分成空白血浆组(10%空白血浆)、模型组($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ox-LDL + 10%空白血浆)、左归降糖舒心方含药血浆组($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ox-LDL + 10%左归降糖舒心方含药血浆)、MCC950 组($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ox-LDL + $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MCC950 + 10%空白含药血浆)。

1.6 CCK-8 法检测 J774A.1 细胞增殖抑制率 J774A.1 细胞生长融合至 80%~90%时,以 1~1.5 mL EDTA-胰酶消化后,加入 10% FBS DMEM 完全培养液重悬细胞;以 $5 \times 10^3 \cdot \text{mL}^{-1}$ 细胞密度接种至 96 孔培养板中,置于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中;用预冷的培养液将细胞同步化处理,分别加入稀释后的胎牛血清(正常对照组)、空白血浆及含药血浆,每组设置 5%、10%、15%、20%、25% 的浓度梯度;另外加入浓度为 25、50、100、150、200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ox-LDL 诱导 J774A.1 细胞,每组均设 6 个复孔。待分别干预处理 24 h 后,吸弃上清,每孔加入 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 溶液及 $90 \mu\text{L}$ 完全培养基。1.5 h 后采用酶标仪在 450 nm 波长下检测各组细胞的光密度(OD)值,计算:细胞增殖抑制率(%)=[(对照孔 OD 值-实验孔 OD 值)/对照孔 OD 值]×100%。

1.7 LDH 释放实验 将生长状态良好的 J774A.1 细胞以每孔 8×10^3 个的细胞密度接种到 96 孔培养板中,待细胞汇合至 80%~90%时,更换为无血清培养液,于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中过夜。按照“1.5”项下分组进行药物干预或按“1.6”项下分组进行 ox-LDL 诱导,同时设置样品对照组(正常培养)、实验组(药物处理)、最大酶活性组(未经处理,加入 LDH 释放试剂),另设无细胞仅有培养基的校正孔。检测时各孔取 $120 \mu\text{L}$ 上清液,移至新的 96 孔板中,加入 $60 \mu\text{L}$ 配制好的 LDH 检测工作液,摇床室温下避光孵育 30 min;采用酶标仪于 490 nm 处测定各孔光密度(OD)值。计算:LDH 释放率(%)=[(实验孔 OD 值-对照孔 OD 值)/(最大酶活性孔 OD 值-对照孔 OD 值)]×100%。

1.8 ELISA 法检测细胞 IL-1 β 、IL-18 含量 取对数生长期的 J774A.1 细胞按照每孔 1×10^5 个的细胞密度接种于 6 孔板。按照“1.5”项下分组干预后，以预冷 PBS 清洗，EDTA-胰蛋白酶消化；以 $1\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ (离心半径 15 cm) 离心 5 min，收集细胞，计数后 PBS 重悬，进行反复冻融；以 $3\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ (离心半径 15 cm) 离心 20 min，取上清检测。设置标准品孔、样本孔及空白孔，样品孔加入稀释液 $40\ \mu\text{L}$ ，加待测样品 $10\ \mu\text{L}$ ，每孔再加入酶标试剂 $100\ \mu\text{L}$ ；以封板膜封闭反应孔， $37\ ^\circ\text{C}$ 下温育 60 min；弃液，以洗涤液洗涤 5 次后，加入显色剂 $100\ \mu\text{L}$ ， $37\ ^\circ\text{C}$ 下避光显色 15 min；每孔加入终止液 $50\ \mu\text{L}$ ，于 $450\ \text{nm}$ 波长处测量各孔吸光度值，计算 IL-1 β 、IL-18 含量变化。

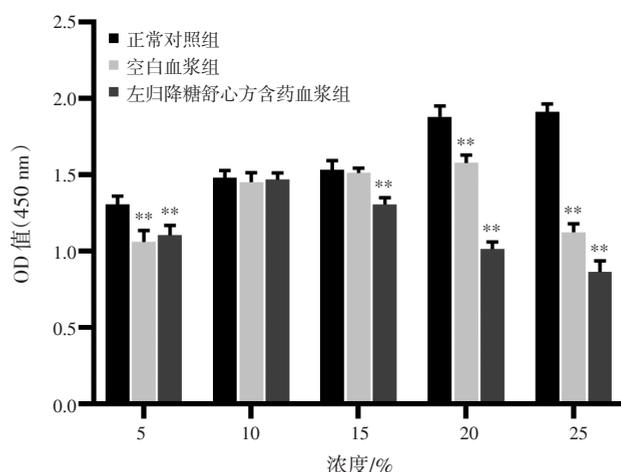
1.9 免疫荧光法检测 IL-1 β 、IL-18 蛋白表达 将 J774A.1 细胞按照每孔 2×10^5 个的细胞密度接种于含细胞爬片的 6 孔板。按照“1.5”项下分组及加入相应药物干预，培养 24 h 后，弃培养液，PBS 浸洗 3 次。用 4% 预冷的多聚甲醛溶液对细胞进行固定 30 min ($4\ ^\circ\text{C}$ 静置)，PBS 溶液洗 3 遍，每次 5 min；加入 5% 封闭血清孵育 20 min 后，于湿盒中加入稀释的 IL-18、IL-1 β 一抗孵育过夜；摇床晃动洗涤 3 次 (每次 5 min) 后，滴加稀释的 IgG/FITC 二抗孵育 60 min；洗涤后复染核，然后进行封片，在荧光显微镜下观察。

1.10 Western Blot 法检测 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达 将 J774A.1 细胞以 $5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞密度接种于 6 孔板中，细胞培养 24 h 后，按照“1.5”项下分组及加入相应药物干预；培养 24 h 后，弃培养上清液，用 PBS 洗涤 2 次，加入适量 RIPA 裂解液重悬；低温下匀浆后将样品转移至 1.5 mL 离心管中，以 $12\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ (离心半径 10 cm) 离心 5 min，取上清液分装。采用 BCA 法测定蛋白浓度后，进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。取 $120\ \mu\text{g}$ 蛋白，经 SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜上；用含 1% 牛血清白蛋白及 5% 脱脂牛奶的封闭液室温下封闭后，加入兔抗人 NLRP3 (1:100)、Caspase-1 (1:500)、GSDMD (1:500) 抗体， $4\ ^\circ\text{C}$ 下孵育过夜；TBST 洗膜 3 次，加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 抗体 (1:6 000)，室温下孵育 1 h；在 ECL 显色液中 1 min 显影，冲洗胶片、扫描。采用 Images-Pro Plus 6.0 软件读取条带灰度值，以 β -actin 为内参，对目的蛋白进行半定量分析。

1.11 统计学处理方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析；计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示；多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)，两两比较采用 SNK- q 检验；以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 左归降糖舒心方含药血浆对 J774A.1 细胞增殖的影响 结果见图 1。与正常对照组比较，浓度为 10% 的左归降糖舒心方含药血浆组及空白血浆组的 OD 值无明显变化，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；而左归降糖舒心方含药血浆浓度为 5%、15%、20%、25% 时，OD 值明显降低，细胞增殖受到抑制，差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果表明，10% 左归降糖舒心方含药血浆对 J774A.1 细胞无明显抑制作用，故作为后续实验含药血浆的干预浓度。

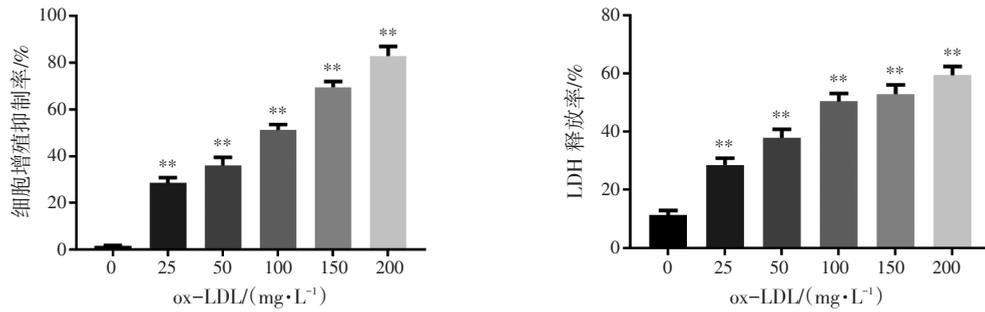


注：与正常对照组比较，** $P < 0.01$

图 1 左归降糖舒心方含药血浆对 J774A.1 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Figure 1 Effects of Zuogui Jiangtang Shuxin medicated plasma on the proliferation of J774A.1 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

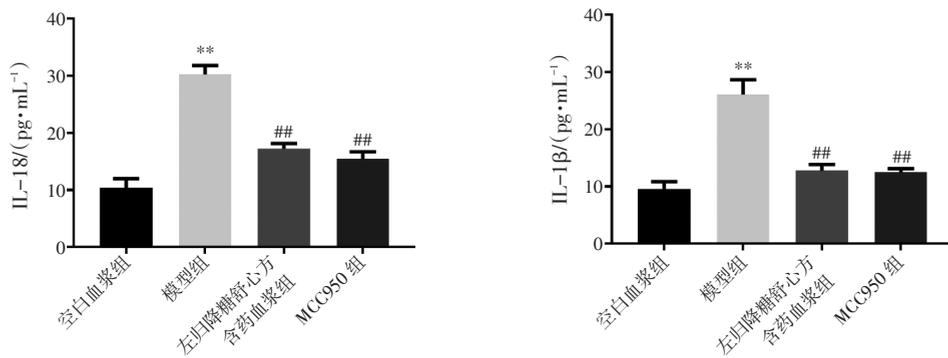
2.2 ox-LDL 对 J774A.1 细胞增殖抑制率及 LDH 释放率的影响 结果见图 2。与 $0\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ox-LDL 组比较，J774A.1 细胞在 25、50、100、150、200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ox-LDL 诱导下，细胞增殖抑制率及 LDH 释放率均明显提高 ($P < 0.01$)，且呈浓度依赖性。其中 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ox-LDL 干预 24 h 后，J774A.1 细胞的增殖抑制率为 $(51.22 \pm 0.27)\%$ ；LDH 释放率显示，其与 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ox-LDL 组比较无明显的细胞毒性作用。因此，考虑以 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ox-LDL 干预 24 h 作为诱导 J774A.1 细胞焦亡的最佳造模方法。



注：与 0 mg·L⁻¹ ox-LDL 组比较，**P < 0.01

图 2 ox-LDL 对 J774A.1 细胞增殖抑制率及 LDH 释放率的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Figure 2 Effect of ox-LDL on J774A.1 cells proliferation inhibition rate and LDH release rate($\bar{x} \pm s, n=6$)



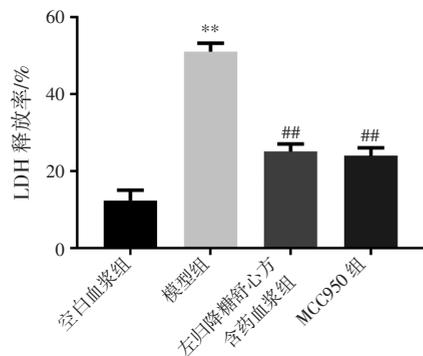
注：与空白血浆组比较，**P < 0.01；与模型组比较，##P < 0.01

图 3 左归降糖舒心方含药血浆对 J774A.1 细胞中 IL-18、IL-1β 水平的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Figure 3 Effect of Zuogui Jiangtang Shuxin medicated plasma on level of IL-18 and IL-1β in the J774A.1 cells($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.3 左归降糖舒心方含药血浆对 J774A.1 细胞中 IL-18、IL-1β 水平的影响 结果见图 3。与空白血浆组比较，模型组 J774A.1 细胞中的 IL-18、IL-1β 含量均显著升高，差异有统计学意义(P < 0.01)。与模型组比较，左归降糖舒心方含药血浆组及 MCC950 组细胞中的 IL-18、IL-1β 含量显著降低，差异有统计学意义(P < 0.01)。结果表明，左归降糖舒心方含药血浆可以降低 ox-LDL 诱导的 J774A.1 细胞炎症因子 IL-18、IL-1β 的释放，抑制 ox-LDL 诱导焦亡过程中的炎症反应。

2.4 左归降糖舒心方含药血浆对 J774A.1 细胞 LDH 释放率的影响 结果见图 4。与空白血浆组比较，模型组 J774A.1 巨噬细胞在 ox-LDL 诱导 24 h 后，LDH 释放率显著上升，差异有统计学意义(P < 0.01)。与模型组比较，左归降糖舒心方含药血浆组及 MCC950 组细胞的 LDH 释放率显著降低，差异有统计学意义(P < 0.01)。结果表明，左归降糖舒心方含药血浆能够抑制 ox-LDL 诱导的 J774A.1 细胞的 LDH 释放，具有保护细胞膜完整性的作用效应。



注：与空白血浆组比较，**P < 0.01；与模型组比较，##P < 0.01

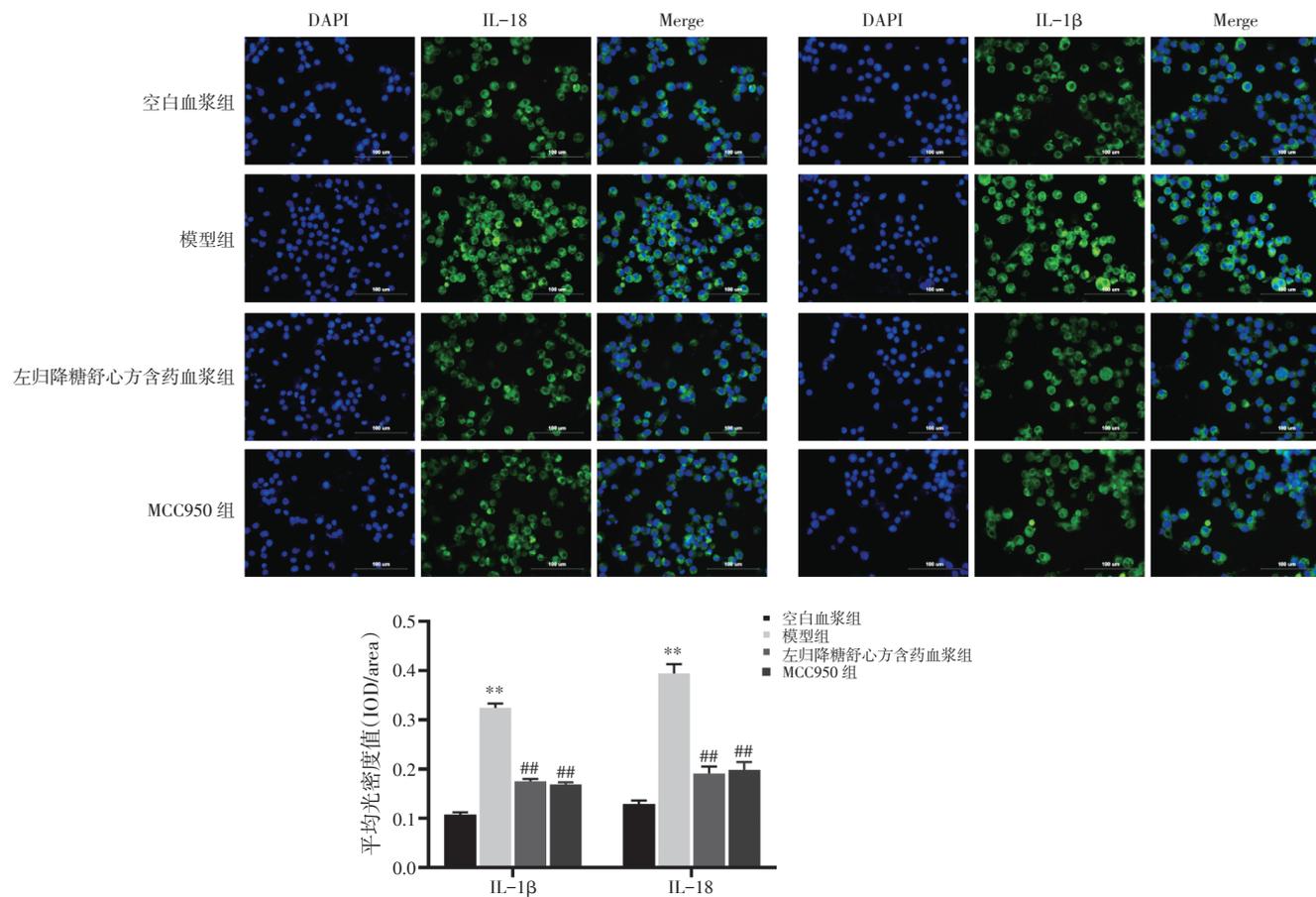
图 4 左归降糖舒心方含药血浆对 J774A.1 细胞 LDH 释放率的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Figure 4 Effect of Zuogui Jiangtang Shuxin medicated plasma on LDH release rate of the J774A.1 cells($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.5 左归降糖舒心方含药血浆对 J774A.1 细胞 IL-1β、IL-18 蛋白表达的影响 结果见图 5。与空白血浆组比较，模型组 J774A.1 细胞的 IL-1β、IL-18 蛋白表达明显上调，差异有统计学意义(P < 0.01)。与模型组比较，左归降糖舒心方含药血浆组及 MCC950 组细胞的 IL-1β、IL-18 蛋白表达明显下调，差异有统

计学意义($P < 0.01$)。结果表明,左归降糖舒心方含药血浆可下调 ox-LDL 诱导的 J774A.1 细胞 IL-1 β 、IL-18 蛋白表达,进一步表明其对 ox-LDL 诱导焦亡过程中的炎性反应具有抑制作用。

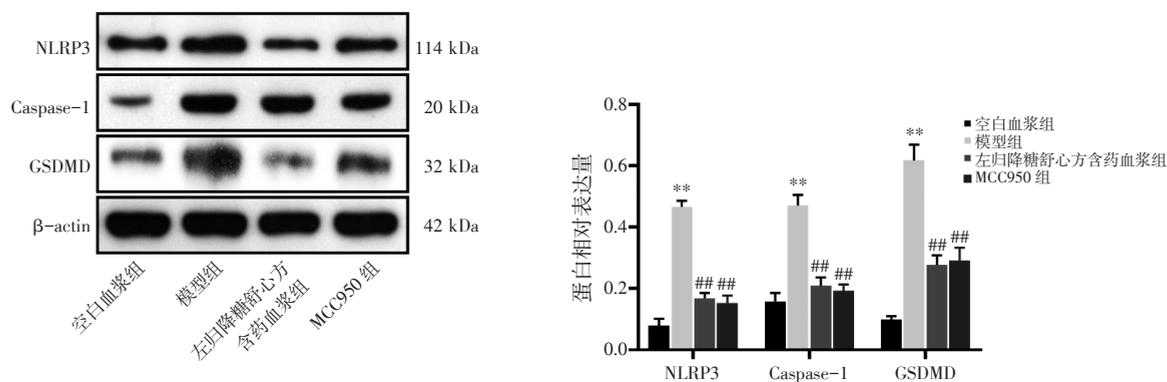
2.6 左归降糖舒心方含药血浆对 J774A.1 细胞 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达的影响 结果见图 6。与空白血浆组比较,模型组 J774A.1 细胞的 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达均显著上



注:与空白血浆组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$

图 5 左归降糖舒心方含药血浆对 J774A.1 细胞 IL-1 β 、IL-18 蛋白表达的影响(免疫荧光, $\times 400$; $\bar{x} \pm s, n=6$)

Figure 5 Effects of Zuogui Jiangtang Shuxin medicated plasma on IL-1 β and IL-18 expression (IOD/area) of the J774A.1 cells (IF, $\times 400$; $\bar{x} \pm s, n=6$)



注:与空白血浆组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$

图 6 左归降糖舒心方含药血浆对 J774A.1 细胞 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Figure 6 Effects of Zuogui Jiangtang Shuxin medicated plasma on the expression of NLRP3, Caspase-1 and GSDMD in the J774A.1 cells($\bar{x} \pm s, n=6$)

调, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较, 左归降糖舒心方含药血浆组及 MCC950 组细胞的 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达均显著下调, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。结果表明, 左归降糖舒心方含药血浆可能通过抑制 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路的激活, 降低 ox-LDL 诱导的 J774A.1 细胞焦亡水平。

3 讨论

糖尿病动脉粥样硬化是多因素、多阶段、多基因共同参与作用的结果。学术界对其病理机制的探讨主要有糖脂紊乱机制、细胞外基质失衡机制、免疫炎症机制、氧化应激机制、血管新生机制等^[10]。而炎症反应的持续损伤是其病变过程中的核心因素。巨噬细胞功能状态失衡、泡沫化转变及内膜下浸润是粥样斑块形成的关键步骤。作为固有免疫系统中的重要效应细胞, 巨噬细胞主要通过分泌促炎介质、黏附分子触发血管壁炎症反应^[11]。氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)是粥样硬化斑块形成的独立危险因素, 在过氧化修饰后形成的特殊结构域可改变激活巨噬细胞表达多种清道夫受体, 对其识别、吞噬。随着巨噬细胞持续内吞 ox-LDL 至溶酶体, 胞内胆固醇外流减少, 促进泡沫细胞形成^[12]。同时, ox-LDL 的细胞毒性作用可介导巨噬细胞凋亡^[13]。此外, 在 ox-LDL 的诱导作用下, 巨噬细胞也会出现非凋亡形态学特征的病理变化, 如细胞肿胀、胞膜破裂、内容物(LDH 等)和炎性因子(IL-1 β 、IL-18 等)释放到细胞外, 提示存在非凋亡途径的参与, 即细胞焦亡^[14]。经典细胞焦亡途径是由 NLRP3 亮氨酸富集结构域识别配体结合后, 在 Nod 结构域诱导自身寡聚反应形成二聚体, 同时热结构域招募 ASC 分子结合, 而在 ASC 中 Caspase 募集结构域可特异性连接 Caspase-1, 最终形成 NLRP3 炎性小体^[15]。炎性小体的激活可剪切修饰细胞焦亡效应蛋白 Gasdermin D 的 N 端结构域, 靶向细胞膜, 使孔洞形成, 破坏细胞膜的完整性。随着焦亡过程的进行, pro-Caspase-1 剪切活化成为 Caspase-1, 在水解酶活性作用下水解催化 pro-IL-1 β 、pro-IL-18 成熟为致炎因子 IL-1 β 和 IL-18 等, 炎性因子大量释放形成级联放大的炎症反应, 实现程序性细胞死亡过程^[16]。

在巨噬细胞焦亡及粥样斑块形成的过程中, ox-LDL 发挥了重要作用。本研究以 ox-LDL 作为巨

噬细胞焦亡的诱导剂, 通过采用 CCK-8 法检测细胞增殖抑制率筛选含药血浆浓度, 结果在 10%左归降糖舒心方含药血浆的干预浓度下, 对细胞增殖状态无明显影响, 故选作实验含药血浆干预浓度。同时, 结合不同浓度 ox-LDL 诱导下 LDH 释放率的变化来确定细胞焦亡造模的 ox-LDL 剂量, 结果 100 mg·L⁻¹ ox-LDL 诱导 24 h 后, J774A.1 细胞的 LDH 释放率为(50.34 \pm 2.76)%, 细胞增殖抑制率为(51.22 \pm 0.27)%, 无明显细胞毒性作用, 故选择以 100 mg·L⁻¹ ox-LDL 干预 24 h 为诱导细胞焦亡条件。本研究结果显示, 左归降糖舒心方含药血浆可有效抑制 J774A.1 细胞中 IL-18、IL-1 β 的含量及 LDH 释放率, 其降低炎性因子的释放、保护细胞膜完整性的作用效应与焦亡抑制剂 MCC950 相当。J774A.1 细胞在识别与吞噬 ox-LDL 后, 可激活细胞焦亡相关通路, 参与细胞炎症反应及焦亡过程。本研究中, 与空白血浆组比较, ox-LDL 诱导的模型组 J774A.1 细胞 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 及 IL-18、IL-1 β 蛋白表达明显上调, 细胞焦亡及继发的炎症反应明显。而左归降糖舒心方含药血浆可抑制 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路蛋白表达, 其中 Caspase-1 的活化可促进成熟的 IL-1 β 、IL-18 蛋白表达变化, 并促进其分泌至胞外引起炎症反应。左归降糖舒心方含药血浆组 IL-1 β 、IL-18 蛋白表达差异与 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 的结果具有一致性。为了证实左归降糖舒心方含药血浆的保护机制与调控细胞焦亡过程的相关性, 本研究采用细胞焦亡抑制剂 MCC950 作为横向对比。结果表明, 左归降糖舒心方含药血浆在抑制细胞焦亡信号通路 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 的激活与下调炎性因子 IL-18、IL-1 β 表达的作用效应上与 MCC950 相当。

综上所述, 左归降糖舒心方含药血浆可能通过调控 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路, 抑制炎性因子 IL-18、IL-1 β 释放与表达, 阻断慢性炎症反应的持续过程, 保护细胞膜的完整性, 维持巨噬细胞正常功能状态。左归降糖舒心方通过抑制细胞焦亡途径调控 ox-LDL 对巨噬细胞的损伤效应, 可作为干预糖尿病动脉粥样硬化进展的新途径。

参考文献:

- [1] WANG J, ZHENG J, SHI W, et al. Dysbiosis of maternal and neonatal microbiota associated with gestational diabetes mellitus[J].

- Gut, 2018, 67(9): 1614–1625.
- [2] KUMAR A, GUPTA P, RANA M, et al. Role of pyruvate kinase M2 in oxidized LDL- induced macrophage foam cell formation and inflammation[J]. Journal of Lipid Research, 2020, 61(3): 351–364.
- [3] GROH L, KEATING S T, JOOSTEN L A B, et al. Monocyte and macrophage immunometabolism in atherosclerosis[J]. Seminars in Immunopathology, 2018, 40(2): 203–214.
- [4] SANDA G M, DELEANU M, TOMA L, et al. Oxidized LDL- exposed human macrophages display increased MMP- 9 expression and secretion mediated by endoplasmic reticulum stress[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2017, 118(4): 661–669.
- [5] 梁万洪, 黎智文, 黄瑞莉, 等. 心灵丸对ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块及斑块内血管新生的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(9): 1088–1092.
- [6] HERRINGTON W, LACEY B, SHERLIKER P, et al. Epidemiology of atherosclerosis and the potential to reduce the global burden of atherothrombotic disease[J]. Circ Res, 2016, 118(4): 535–546.
- [7] KESAVARDHANA S, KANNEGANTI T D. Mechanisms governing inflammasome activation, assembly and pyroptosis induction[J]. Int Immunol, 2017, 29(5): 201–210.
- [8] 成细华, 喻嵘, 吴勇军, 等. 左归降糖舒心方对转基因2型糖尿病MKR鼠心肌损伤的保护作用[J]. 中草药, 2011, 42(2): 343–345.
- [9] 成细华, 喻嵘, 黄政德, 等. 左归降糖舒心方对高脂饮食MKR小鼠糖脂代谢及炎症反应的影响[J]. 中草药, 2011, 42(3): 546–549.
- [10] WANG Z Q, ZHANG L L, SUN Z, et al. Mechanisms of matrix vesicles mediating calcification transition in diabetic plaque[J]. Heart, Lung and Circulation, 2020, 29(1): 112–117.
- [11] BORNFELDT K E, KRAMER F, BATORSKY A, et al. A novel type 2 diabetes mouse model of combined diabetic kidney disease and atherosclerosis[J]. American Journal of Pathology, 2017, 188(2): 343–352.
- [12] ALIZADEH S, MIRSHAFIEY A, DJALALI M, et al. Vitamin D3 induces gene expression of ox-LDL scavenger receptors in streptozotocin- induced diabetic rat aortas: new insight into the role of vitamin D in diabetic atherosclerosis[J]. Reports of Biochemistry & Molecular Biology, 2018, 6(2): 170–177.
- [13] LI D, TAN Y. TIPE2 suppresses atherosclerosis by exerting a protective effect on macrophages via the inhibition of the Akt signaling pathway[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2019, 17(4): 2937–2944.
- [14] 郑亚萍, 刘春杰. 白芍总苷对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞焦亡及NLRP3炎症小体表达的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(8): 910–914.
- [15] HAN Y, QIU H, PEI X, et al. Low-dose sinapic acid abates the pyroptosis of macrophages via downregulation of lncRNA-MALAT1 in rats with diabetic atherosclerosis[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2018, 71(2): 104–112.
- [16] SHI J J, ZHAO Y, WANG K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death[J]. Nature, 2015, 526(75): 660–665.

(编辑: 邹元平)