

参附注射液对 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 介导的 J774A.1 细胞焦亡的影响*

陈腾飞 张玲梅 王施玮 周 晓 任圆圆 陈 波 施小伟 叶成坚 郑文贺[△]
(福建中医药大学附属第二人民医院,福建 福州 350003)

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:1004-745X(2023)12-2103-04

doi:10.3969/j.issn.1004-745X.2023.12.009

【摘要】 目的 观察参附注射液对 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 介导的 J774A.1 细胞焦亡的影响并探讨其机制。**方法** 采用 MTT 法确定低、中及高剂量参附注射液组药物浓度分别为 2.5、5、10 $\mu\text{L/mL}$ 。将 J774A.1 细胞分为 5 组,每组 6 孔。空白组在细胞接种后,常规培养细胞;模型组细胞在 100 ng/mL LPS 提前处理 4 h 之后加入 10 $\mu\text{mol/L}$ Nigericin 处理 2 h;低、中和高参附注射液组细胞在模型组的基础上加入上述相应浓度的参附注射液进行共刺激。倒置显微镜观察各组细胞形态改变;LDH 释放法检测各组细胞活性;Western blotting 检测细胞及上清液中 Pro-Caspase-1、Caspase-1、GSDMD 及 GSDMD-N 蛋白水平;ELISA 检测细胞培养上清中白细胞介素-1 β (IL-1 β)水平。**结果** 在模型组细胞中观察到膨胀球形改变及胞膜破裂,向胞外释放的 LDH 明显增多($P<0.05$),经参附注射液干预后形态改变有减轻,LDH 释放显著减少($P<0.05$);Western blotting 结果显示,模型组 Caspase-1 及 GSDMD-N 蛋白水平显著升高($P<0.05$),经参附注射液干预后,上述蛋白水平明显下降($P<0.05$);ELISA 测得的细胞培养上清 IL-1 β 水平,在模型组中亦明显升高($P<0.05$),而在各参附注射液组中均有显著下降($P<0.05$)。**结论** 参附注射液能抑制 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 介导的 J774A.1 细胞焦亡改变,机制可能与其抑制 Pro-Caspase-1 与 GSDMD 的活化过程相关。

【关键词】 脓毒症 参附注射液 细胞焦亡 GSDMD

Effect of Shenfu Injection on NLRP3/Caspase-1/GSDMD-Mediated Pyroptosis of J774A.1 Cells

Chen Tengfei, Zhang Lingmei, Wang Shiwei, Zhou Xiao, Ren Yuanyuan, Chen Bo, Shi Xiaowei, Ye Chengjian, Zheng Wenhe. The Second People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fujian, Fuzhou 350003, China.

【Abstract】 Objective: To observe the effect of Shenfu Injection (SFI) on NLRP3/Caspase-1/GSDMD-mediated J774A.1 cell pyroptosis and to explore the mechanism. **Methods:** MTT method was used to determine the drug concentration of 2.5, 5 and 10 $\mu\text{L/mL}$ in the low, medium and high dose SFI groups, respectively. J774A.1 cells were divided into 5 groups with 6 wells in each group. In the normal group, the cells were routinely cultured after cell inoculation. In the model group, cells were treated with 10 $\mu\text{L/mL}$ Nigericin for 2 h, following a 4 h treatment with 100 ng/mL LPS. The cells in the low, medium and high SFI groups were co-stimulated by adding the corresponding concentration of SFI mentioned above to that in the model group. Inverted microscope was used to observe the morphological changes of the cells in each group. LDH release assay was used to detect the activity of the cells in each group. Western blotting was used to detect the levels of Pro-Caspase-1, Caspase-1, GSDMD and GSDMD-N proteins in the cells and the supernatant. ELISA was used to detect the levels of IL-1 β in the supernatant of the cell culture. **Results:** In the cells of the model group, swelling, spherical shape change, and cell membrane rupture were observed, and the release of LDH into the extracellular space was significantly increased ($P<0.05$), and the morphological change was alleviated and the release of LDH was significantly reduced after the intervention of SFI ($P<0.05$). Western blotting results showed that the levels of Caspase-1 and GSDMD-N proteins were significantly increased in the model group ($P<0.05$), and the levels of the above proteins were significantly decreased after SFI intervention ($P<0.05$). IL-1 β levels in cell culture supernatants measured by ELISA were also significantly increased in the model group ($P<0.05$), and significantly decreased in all SFI groups ($P<0.05$).

* 基金项目:福建省自然科学基金项目(2023J01816);福建省卫生健康青年科研课题(2020QNA063)

[△]通信作者(电子邮箱:wenh0350@sina.com)

Conclusion: *SFI* inhibits NLRP3/Caspase-1/GSDMD-mediated pyroptosis of J774A.1 by a mechanism that may be related to its inhibition of the activation process of Pro-Caspase-1 and GSDMD.

[Key words] Sepsis; *Shenfu Injection*; Pyroptosis; GSDMD

脓毒症是极其复杂、极具威胁又难于治疗的临床病症,每年在全世界范围内有数百万的患者受其威胁,虽然Surviving Sepsis Campaign指南有效地指导了临床诊疗^[1],但其死亡率仍可高达30%以上^[2]。参附注射液是“回阳法”的代表方剂,已发现其具有一定抗炎作用^[3-4],被推荐用于严重脓毒症的免疫调理治疗^[5],而具体疗效机制亟待进一步探索。NOD样受体家族中含有pyrin结构域的蛋白3(NLRP3)的激活、半胱天冬氨酸酶-1前体(Pro-Caspase-1)自剪切及gasdermin D(GSDMD)N端结构域(GSDMD-N)释放和成孔效应所造成的细胞焦亡是脓毒症早期过度炎症反应的重要机制^[6-8]。本研究将基于上述信号通路,探讨参附注射液治疗脓毒症的可能机制。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 细胞及药物 J774A.1细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司(货号:CL-0370)。参附注射液为华润三九(雅安)药业有限公司产品。

1.2 主要试剂 重组 Anti-GSDMD 抗体(货号:ab209845)、重组 Anti-pro Caspase-1+p10+p12 抗体(货号:ab179515)购自艾博抗(上海)贸易有限公司。Mouse IL-1 beta ELISA Kit 购自武汉三鹰生物技术有限公司(货号:KE10003)。L-乳酸脱氢酶(L-LDH)活性检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司(货号:BC0685)。尼日利亚菌素(Nigericin)为InvivoGen公司产品(货号:tlrl-nig)。脂多糖(LPS)来源于大肠杆菌0111:B4,购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司(货号:L4391)。

1.3 造模与分组 取对数生长期细胞用于试验。将上述细胞分为5组:空白组在细胞接种后,常规培养细胞;模型组细胞在LPS 100 ng/mL提前处理目的细胞4 h之后加入10 μmol/L Nigericin处理2 h;通过MTT试验确定参附注射液对该细胞的适宜干预浓度,并在此基础上设置低、中和高3个浓度梯度,参附注射液组细胞在模型组的基础上加入上述相应浓度的参附注射液进行共刺激。白光视野下的焦亡细胞观察通过倒置显微镜在室温下进行。

1.4 细胞毒性试验 采用LDH释放法进行,结果以可催化产生的丙酮酸水平来表示。

1.5 蛋白质免疫印迹试验(WB) WB法检测细胞及上清液中Pro-Caspase-1、Caspase-1、GSDMD及GSDMD-N蛋白水平,内参为3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)。采用Image J进行图像分析,以目的蛋白与GAPDH的灰度比值表示蛋白表达水平。

1.6 酶联免疫吸附试验(ELISA) ELISA法检测细胞培养上清中白细胞介素-1β(IL-1β)水平。

1.7 统计学处理 应用SPSS统计软件。计量资料符合正态分布以($\bar{x} \pm s$)表示。多组计量资料间的比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 参附注射液不同浓度下J774A.1细胞的存活情况 见表1。10 μL/mL及更低浓度的参附注射液对J774A.1细胞的存活未造成影响,故设置低、中及高剂量参附注射液组药物浓度分别为2.5、5、10 μL/mL。

表1 参附注射液不同浓度下J774A.1细胞的存活率($\bar{x} \pm s$)

浓度(μL/mL)	n	细胞存活率(%)
40.0	6	0.51±0.10*
20.0	6	0.75±0.03*
10.0	6	0.98±0.03
5.0	6	1.05±0.01
2.5	6	0.94±0.04
0	6	0.97±0.04

注:与0 μL/mL参附注射液比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 各组倒置显微镜下的细胞形态比较 见图1。可观察到模型组J774A.1细胞先后经LPS及Nigericin刺激后,细胞呈膨胀球形改变,且较多细胞出现胞膜破裂。经不同浓度参附注射液干预后,上述改变有缓解,以高剂量参附注射液组缓解程度最为明显。

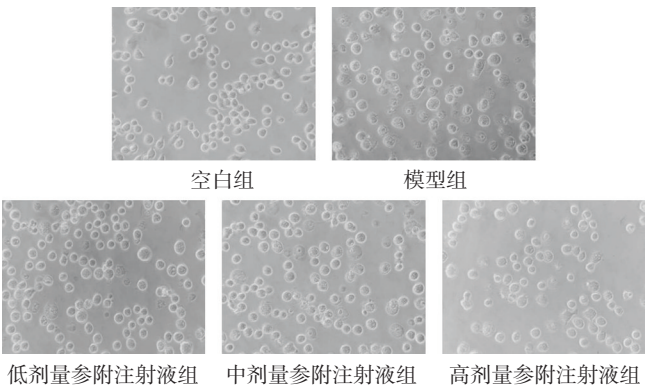


图1 各组细胞在倒置显微镜下的形态观察(400倍)

2.3 各组细胞的存活情况比较 见表2。模型组细胞上清液出检出的丙酮酸水平明显高于空白组($P < 0.05$),而经低、中和高剂量参附注射液干预后则出现不同程度的下降($P < 0.05$)。

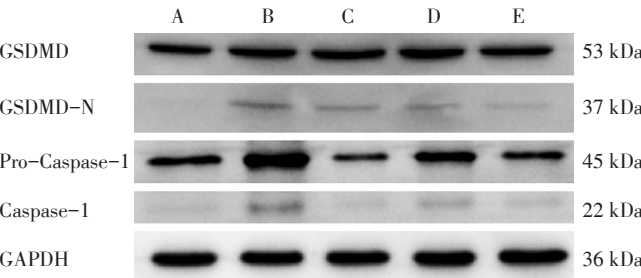
2.4 各组Pro-Caspase-1、Caspase-1、GSDMD及GSD-

表2 各组细胞存活情况比较($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	丙酮酸水平
空白组	6	1.17±0.05
模型组	6	1.30±0.07*
低剂量参附注射液组	6	1.23±0.08 [△]
中剂量参附注射液组	6	1.17±0.04 [△]
高剂量参附注射液组	6	1.09±0.05 [△]

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[△] $P<0.05$ 。下同。

MD-N蛋白表达比较 见图2、表3。模型组GSDMD-N及Caspase-1水平均较空白组明显升高($P<0.05$),而经参附注射液干预后,两者均出现不同水平的表达量下降($P<0.05$)。



A为空白组;B为模型组;C为低剂量参附注射液组;D为中剂量参附注射液组;E为高剂量参附注射液组。

图2 各组细胞Pro-Caspase-1、Caspase-1、GSDMD及GSDMD-N蛋白表达

表3 各组细胞Caspase-1及GSDMD-N蛋白水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Caspase-1	GSDMD-N
空白组	6	0.09±0.03	0.03±0.01
模型组	6	0.17±0.04*	0.19±0.04*
低剂量参附注射液组	6	0.02±0.01 [△]	0.14±0.05 [△]
中剂量参附注射液组	6	0.13±0.07	0.10±0.05 [△]
高剂量参附注射液组	6	0.04±0.02 [△]	0.06±0.02 [△]

2.5 各组细胞培养上清中IL-1 β 水平比较 见表4。模型组细胞上清液中IL-1 β 水平较空白组显著增高($P<0.05$),经参附注射液干预后则出现明显下降($P<0.05$)。

表4 各组细胞上清液中IL-1 β 水平比较(pg/mL , $\bar{x}\pm s$)

组别	n	IL-1 β
空白组	6	7.40±2.58
模型组	6	16.36±1.82*
低剂量参附注射液组	6	6.63±0.70 [△]
中剂量参附注射液组	6	4.70±2.03 [△]
高剂量参附注射液组	6	2.98±1.05 [△]

3 讨论

NLR家族中含有pyrin结构域3的NLRP3是一类研究最为广泛深入的炎症小体,各类PAMPs如病毒RNA、微生物毒素和细菌表面成分以及DAMPs如尿酸晶体、ATP、铝佐剂和 β -淀粉样肽等均能造成其激活。激活的NLRP3募集Pro-Caspase-1,并引起其自剪切。激活的Caspase-1可促使IL-1 β 和IL-18的成熟,并剪切GSDMD,释放其N端结构域GSDMD-N。该结构域转移到细胞膜并形成孔,介导包括上述炎症细胞因子在内的细胞内容物释放,最终造成细胞焦亡^[6-8],进而帮助宿主有效抵抗病原菌、病毒等的侵扰。然而由于失调而过度激活的炎症小体又会导致脓毒症的发生。

脓毒症可归属于中医学“外感热病”“温病”“温毒”及外科“疔疮走黄”“疽毒内陷”等范畴,脓毒性休克和多器官功能衰竭则可归属于中医学“脱证”“厥证”范畴。目前随着中医对脓毒症证候特征的认识逐步深入展开,对病因病机的论述主要集中在正气不足、腑气不通、瘀热毒邪内蕴、浊毒等方面。患者多久病体虚,正气亏虚,阴阳失和,外来之邪则乘虚而入,致机体脏腑功能失调,气血津液输布失常,最终形成了脓毒症,因此正气不足是本病的基本病机,是脓毒症的病理基础。正如《素问·刺法论》所云“正气存内,邪不可干”“邪之所凑,其气必虚”,而“少火生气、壮火食气”,重症脓毒症的高热阶段往往出现阳气耗散,阳损及阴,阴阳俱损,最终元气颓败,发展为厥、脱之证。施治应以“益气温阳,扶正固本”为要。

参附注射液是“回阳法”的代表方剂。方中附子首载于《神农本草经》,有“回阳救逆第一品药”之称。人参亦首见于《神农本草经》,素有“虚劳内伤第一要药”之称。附子与人参配伍可达到上助心阳,下补肾阳,中健脾气,气阳同救,温而兼润,补而能固的功效。《医宗金鉴》有言“补后天之气无如人参,补先天之气无如附子”。二药相须,人参得附子瞬息化气于乌有之乡;附子得人参,顷刻生阳于命门之内。临床研究证实其可减少脓毒性休克患者对血管加压药的需求以及重症病房的住院时间^[9],并可通过降低白细胞介素-6(IL-6)、C反应蛋白(CPR)、HMGB-1和vWF水平,延长烧伤脓毒症患者的平均存活时间^[10],已被《脓毒症中西医结合诊治专家共识》^[5]推荐用于严重脓毒症的免疫调理治疗。根据现有的药理学研究,认为附子的主要有效成分是以乌头碱、次乌头碱和新乌头碱为代表的C19型二萜生物碱。目前研究已发现其存在一定的抗炎活性,可能通过调节了趋化因子介导的白细胞趋化而发挥作用^[11];其亦可与其他药物配伍下协同抑制IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 等促炎因子的过表达^[12]。人参皂苷是人参主要的活性化合物,根据其羟基及配基双键的位置

主要分为原人参二醇和原人参三醇。原人参二醇包括人参皂苷Rb1、Rb2、Rb3、Rc、Rd、Rg3、Rh2和Rs1,原人参三醇包括Re、Rf、Rg1、Rg2和Rh1。已有研究发现这些组分在抑制炎症方面的作用,如Rh2可干预p38 MAPK、c-Jun及核转录因子- κ B(NF- κ B)通路,抑制巨噬细胞释放肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-6和IL-1 β ^[13],其亦可通过干预TGF- β 1/Smad通路抑制促炎因子的释放^[14]。另外,人参还富含人参多糖,其亦可通过干预NF- κ B通路,明显抑制TNF- α 和IL-6过度表达^[15]。本研究证实参附注射液能减轻细胞焦亡所导致的细胞肿胀及胞膜破裂改变,相应向胞外释放的LDH水平也有明显降低。进一步对GSDMD-N及Caspase-1蛋白表达水平分析发现,参附注射液可抑制Pro-Caspase-1自剪切及后续对GSDMD的剪切过程,初步确定了其抑制细胞焦亡的靶点。

综上,参附注射液能抑制NLR3P/Caspase1/GSDMD介导的J774A.1细胞焦亡改变,减轻其细胞肿胀及胞膜破裂,相应减少其向胞外释放的LDH水平。其机制可能与其抑制了Pro-Caspase-1自剪切,继而导致具有细胞成孔效应的GSDMD-N释放减少有关。

参 考 文 献

- [1] EVANS L, RHODES A, ALHAZZANI W, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021 [J]. *Intensive Care Med*, 2021, 47 (11): 1181-1247.
- [2] FLEISCHMANN-STRUZEK C, MELLHAMMAR L, ROSE N, et al. Incidence and mortality of hospital-and ICU-treated sepsis: results from an updated and expanded systematic review and meta-analysis [J]. *Intensive Care Med*, 2020, 46 (8): 1552-1562.
- [3] ZHENG Y L, ZHENG M, SHAO J, et al. Upregulation of claudin-4 by Chinese traditional medicine Shenfu attenuates lung tissue damage by acute lung injury aggravated by acute gastrointestinal injury [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 1981-1993.
- [4] ZHANG M Q, ZHANG Q, YUAN W, et al. Protective effect of shenfu injection on vascular endothelial damage in a porcine model of hemorrhagic shock [J]. *Chin J Integr Med*, 2022, 28 (9): 794-801.
- [5] 中国中西医结合学会急救医学专业委员会, 编辑委员会中国中西医结合急救杂志. 脓毒症中西医结合诊治专家共识[J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25(4): 194-197.
- [6] LEI Q, YI T, CHEN C. NF- κ B-Gasdermin D (GSDMD) axis couples oxidative stress and NACHT, LRR and PYD Domains-Containing protein 3 (NLRP3) Inflammasome-Mediated cardiomyocyte pyroptosis following myocardial infarction [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24(6): 6044-6052.
- [7] DING J J, WANG K, LIU W, et al. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family [J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 111-116.
- [8] SHI A A, ZHAO Y, WANG K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death [J]. *Nature*, 2015, 526(7575): 660-665.
- [9] WANG S, LIU G, CHEN L, et al. Effects of shenfu injection on sublingual microcirculation in septic shock patients: A randomized controlled trial [J]. *Shock*, 2022, 58 (3): 196-203.
- [10] XU C Z, XIA Y F, JIA Z T, et al. The curative effect of Shenfu-injection in the treatment of burn sepsis and its effect on the patient's immune function, HMGB, and vWF [J]. *Am J Transl Res*, 2022, 14(4): 2428-2435.
- [11] 郑世超, 严小英, 陈菊, 等. 基于蛋白互作网络分析祛风湿药川乌的抗炎机制[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(9): 1747-1751.
- [12] 谢运飞. 附子与白芍组分配伍治疗风寒湿痹证的作用机制研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2019.
- [13] 黄容容, 钱颖, 向明. 人参皂苷Rh2免疫调节作用研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(23): 2936-2941.
- [14] VINOTH KUMAR R, OH T W, PARK Y K. Anti-Inflammatory effects of Ginsenoside-Rh2 inhibits LPS-Induced activation of microglia and overproduction of inflammatory mediators via modulation of TGF- β 1/Smad pathway [J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(5): 951-957.
- [15] 刘鹏飞, 朱伟, 万进, 等. 人参多糖对LPS诱导小鼠巨噬细胞炎症因子生成的抑制作用及其机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(14): 102-107.

(收稿日期 2023-08-16)

(上接第2089页)

- [20] 覃颖, 郭孟玮, 蓝莹, 等. 电针不同穴位对肠易激综合征大鼠肠道动力和敏感性的影响[J]. *针刺研究*, 2020, 45(4): 293-298.
- [21] 陈健海, 仲婕, 王凡, 等. 胃肠道Cajal间质细胞起搏功能的研究进展[J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(1): 184-188.
- [22] 王阳, 鲍晓蕾, 郎铁簋, 等. 实验性腹泻型肠易激综合征模型大鼠Cajal间质细胞改变对胃肠动力及VIP和CGRP水平的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(6): 1293-1296.
- [23] RADENKOVIC G, SAVIC V, MITIC D, et al. Development of c-kit immunopositive interstitial cells of Cajal in the human stomach [J]. *J Cel Mol Med*, 2010, 14: 1125-1134.
- [24] 张玉翠, 于隼, 孟庆玲, 等. 电针不同神经节段穴位对大鼠胃运动异常模型胃内压的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2011, 31(11): 65-68.

(收稿日期 2023-07-07)