

· 经典名方 ·

黄连温胆汤对 IGT 大鼠骨骼肌细胞焦亡经典通路的影响

田旭升, 李云凤, 李寒, 王宁, 陆阁玲, 陈冰冰, 辛相如, 马伯艳*
(黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

[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)/消皮素D(GSDMD)/白细胞介素-1 β (IL-1 β)/白细胞介素-18(IL-18)经典通路,探讨黄连温胆汤对糖耐量低减(IGT)大鼠骨骼肌细胞焦亡的影响,并阐释其可能作用机制。方法:健康雄性SD大鼠予45%脂肪热能的高脂饲料长期喂养20周诱导IGT大鼠模型。造模成功后将实验分为4组,分别为正常组、模型组、阳性药组(盐酸二甲双胍,0.05 g·kg⁻¹·d⁻¹)和黄连温胆汤组(7.8 g·kg⁻¹·d⁻¹),正常组和模型组则给予相应体积蒸馏水,各组给药体积均为10 mL·kg⁻¹·d⁻¹,连续灌胃给药4周。实验结束后取血分离血清并取大鼠骨骼肌进行液氮保存。采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清IL-1 β 和IL-18含量;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测骨骼肌组织NLRP3, Caspase-1, GSDMD mRNA及蛋白表达水平;免疫荧光法观测骨骼肌组织GSDMD, IL-1 β 和IL-18蛋白表达;苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠骨骼肌组织病理学变化。结果:与正常组比较,模型组大鼠血清中IL-1 β , IL-18含量和骨骼肌组织中NLRP3, Caspase-1, GSDMD mRNA及蛋白表达水平均显著升高($P<0.01$);免疫荧光检测显示IGT大鼠骨骼肌组织GSDMD, IL-18和IL-1 β 蛋白含量显著上升($P<0.01$);HE染色可见骨骼肌组织具有明显病理形态变化。与模型组比较,黄连温胆汤和盐酸二甲双胍组均可有效降低IGT大鼠血清IL-18和IL-1 β 含量和骨骼肌组织NLRP3, Caspase-1, GSDMD mRNA和蛋白表达($P<0.01$);免疫荧光技术结果表明黄连温胆汤能有效降低IGT大鼠骨骼肌组织GSDMD, IL-1 β 和IL-18蛋白含量($P<0.01$);HE染色结果表明黄连温胆汤能改善大鼠骨骼肌组织形态变化。结论:黄连温胆汤对IGT大鼠骨骼肌细胞焦亡具有抑制作用,其作用机制与调节细胞焦亡经典途径中NLRP3/Caspase-1/GSDMD/IL-1 β /IL-18通路具有重要关系。

[关键词] 黄连温胆汤; 骨骼肌细胞焦亡; 糖耐量低减(IGT); 炎症反应

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)18-0001-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211704

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210719.1703.006.html>

[网络出版日期] 2021-07-20 8:58

Effect of Huanglian Wendantang on Classical Pathway of Skeletal Muscle Pyroptosis in IGT Rats

TIAN Xu-sheng, LI Yun-feng, LI Han, WANG Ning, LU Ge-ling, CHEN Bing-bing,
XIN Xiang-ru, MA Bo-yan*
(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of Huanglian Wendantang (HLWDT) on pyroptosis of skeletal muscle in rats with impaired glucose tolerance (IGT) and to explain the mechanism based on NOD-like receptor protein 3 (NLRP3)/cysteine aspartate-specific protease-1 (Caspase-1)/gasdermin D (GSDMD)/interleukin-1 β (IL-1 β)/IL-18 signaling pathway. **Method:** The SD male rats were fed with 45% high-fat diet for 20 weeks to induce the IGT model. After modeling, the rats were randomly divided into a blank group, a model

[收稿日期] 20210429(015)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81873231);黑龙江省自然科学基金面上项目(H2018057)

[第一作者] 田旭升, 博士, 副研究员, 从事中医药防治精神、心理疾病的研究, E-mail: xstian@sina.com

[通信作者] * 马伯艳, 博士, 教授, 从事温病学理法方药对代谢类疾病的防治研究, E-mail: zymaboyan@163.com

group, a positive control group (metformin hydrochloride, $0.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), and an HLWDT ($7.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) group based on the body weight of rats. The blank group and the model group were fed with the same volume of distilled water. The dose for each group was set as $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. After four weeks of continuous gavage, blood was collected and serum was separated. The skeletal muscles of rats were stored in liquid nitrogen. Subsequently, serum IL-1 β and IL-18 were detected by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA and protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, and GSDMD were detected by real-time quantitative PCR (Real-time PCR) and Western blot, respectively. The expression of GSDMD, IL-1 β , and IL-18 proteins in skeletal muscle tissues was detected by immunofluorescence. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of skeletal muscles. **Result:** Compared with the blank group, the model group showed increased IL-1 β and IL-18 in serum, and NLRP3, Caspase-1, and GSDMD gene and protein expression in skeletal muscle tissues ($P < 0.01$). Immunofluorescence assay showed that GSDMD, IL-18, and IL-1 β protein expression in skeletal muscle tissues of the model group was significantly elevated ($P < 0.01$). HE staining showed obvious pathological changes in skeletal muscles. Compared with the model group, the HLWDT group and the positive control group could decrease IL-1 β and IL-18 in serum and NLRP3, Caspase-1, and GSDMD gene and protein expression in skeletal muscle tissues ($P < 0.01$). In addition, immunofluorescence assay revealed that HLWDT could reduce protein expression levels of GSDMD, IL-1 β , and IL-18 in skeletal muscles of IGT rats ($P < 0.01$). The results of HE staining showed that HLWDT could improve the pathological changes of skeletal muscles in IGT rats. **Conclusion:** HLWDT can inhibit skeletal muscle pyroptosis of IGT rats, and the mechanism may be closely related to NLRP3/Caspase-1/GSDMD/IL-18/IL-1 β signaling pathway.

[Keywords] Huanglian Wendantang; skeletal muscle pyroptosis; impaired glucose tolerance (IGT); inflammatory response

糖耐量低减(IGT)作为正常葡萄糖稳态和糖尿病高血糖之间的中间代谢状态,是逆转其向2型糖尿病(T2DM)发展的关键时期。目前,全球有3.74亿糖耐量受损人群以每年6%~10%的概率进展为T2DM^[1]。因此,IGT的高度可逆性对T2DM防治有着重要意义。而T2DM的“炎症学说”指出,慢性、低度、系统性炎症反应是IGT和T2DM的始发因素,且炎症因子浓度与胰岛素抵抗(IR)程度成正相关,并促进IGT向T2DM的发展^[2]。

细胞焦亡是一种依赖多种炎性半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1,4,5,11(Caspase-1,4,5,11),同时释放炎症因子的程序性细胞死亡^[3]。过度的细胞焦亡会扩大炎症反应,加重机体组织器官病理损伤并导致自身炎症性疾病的发生。研究发现,细胞焦亡在T2DM的发生发展中具关键性影响,其作用机制可能是导致胰岛 β 细胞数量减少,结构受损及功能障碍而使胰岛素分泌能力减弱造成不同程度胰岛素缺乏^[4-5];或者直接影响胰岛素作用的靶器官脂肪^[6]、肝脏^[7]及骨骼肌^[8],降低其对胰岛素的敏感性而引发IR,使胰岛素对血糖的调节能力减弱。骨骼肌作为餐后葡萄糖转移的主要储藏部位,是外周葡萄糖代谢的主要场所,对糖的摄取和利用减少在IR

发病中至关重要。

黄连温胆汤出自清代陆廷珍《六因条辨》^[9],由温胆汤加黄连而成。现代医学研究表明,黄连温胆汤及温胆汤类方在糖尿病,肥胖,高血压,代谢综合征等多种代谢类疾病的防治取得显著效果^[10-13]。由此,基于细胞焦亡及骨骼肌在IR过程中发挥的重要影响,本研究在前期研究^[14-16]基础上选择观察黄连温胆汤对IGT大鼠骨骼肌细胞焦亡经典途径中NOD样受体蛋白3(NLRP3)/Caspase-1/消皮素D(GSDMD)/白细胞介素-1 β (IL-1 β)/白细胞介素-18(IL-18)通路的影响,以期在炎症相关的细胞焦亡经典途径探究其作用机制。

1 材料

1.1 动物 60只SPF级7~8周龄SD雄性大鼠,体重(200 \pm 20)g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,动物合格证号SCXK(辽)2015-0001。本实验经黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会批准,编号2018121012。

1.2 药物及试剂 黄连温胆汤由法半夏10g,陈皮15g,枳实10g,竹茹10g,茯苓7.5g,生姜5g,炙甘草5g,大枣5g,黄连10g组成。黄连温胆汤药量为前期工作^[17]筛选出的黄连温胆汤防治T2DM最佳

配伍比例。所有药材均来自北京同仁堂,经黑龙江中医药大学药学院王振月教授鉴定,符合2020年版《中华人民共和国药典》相关规定。

精密称取黄连温胆汤中各药材,混匀,加12倍量水,浸泡60 min后,煎煮至沸腾,保持微沸40 min,过滤药液;药渣再加8倍量水,如上煎煮方法,回流提取,滤出药液,合并2次滤液后,低温减压浓缩至质量浓度为 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。盐酸二甲双胍片(中美上海施贵宝制药有限公司,国药准字H20023370,规格0.5 g),按成人一般剂量每次0.5 g,每日2次,将二甲双胍片溶于蒸馏水制备悬浊液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。根据《人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值表》及参考课题组前期研究,计算出大鼠给药剂量为黄连温胆汤 $7.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 和盐酸二甲双胍 $0.05\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。45%脂肪热能的高脂饲料购自南京君科生物工程有限公司。乌拉坦,4,6-联脒-2-苯基吡啶(DAPI),二甲苯(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号分别为U299635, D106471-5mg, 1330-20-7);IL-1 β 和IL-18酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测试剂盒(武汉优尔生命科学装备有限公司,批号均为SEA133Ra);总RNA提取试剂盒,Super M-MLV反转录酶,RNase inhibitor,2 \times Power Taq聚合酶链式反应(PCR) MasterMix(美国BioTek公司,批号分别为RP1001, PR6502, RP5602, PR1702);RIPA裂解液(强),苯甲基磺酰氟(PMSF),BCA蛋白浓度测定试剂盒,30% Acr-Bis(29:1),十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液,Cy3标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G和Cy3标记山羊抗小鼠IgG(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为P0013B, ST506, P0009, ST003, P0015, A0516, A052);ECL发光液(上海七海复泰生物科技有限公司,批号E003);预染蛋白分子量标准(加拿大Fermentas公司,批号26616);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号LC2005);牛血清白蛋白(BSA, Biosharp公司,批号BS043);Caspase-1(p20)(Wnleibio公司,批号WL03450);GSDMD荧光抗体,内参抗体 β -肌动蛋白(β -actin),羊抗小鼠IgG,羊抗兔IgG(美国Proteintech公司,批号分别为66387-1-Ig, SA00001, 60008-1-Ig, SA00001-2);IL-1 β , IL-18和NLRP3荧光抗体(Abcclonal公司,批号分别为A1112, A16737, A12694);山羊血清,抗荧光淬灭剂,苏木素,荧光染料(美国Solarbio公司,批号分别为SL038, S2100,

H8070, SY1020);曙红Y(醇溶)[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号A600190]。

1.3 仪器 ELX-800型酶标仪(美国BioTek公司);NW10LVF型超纯水系统(力康生物医疗科技控股有限公司);NANO 2000型紫外分光光度计(美国Thermo公司);Exicycler 96型实时荧光定量(Real-time)PCR仪(韩国Bioneer公司);H-2050R型超速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);DYY-7C型电泳仪,WD-9405B型水平摇床(北京六一生物科技有限公司);DP73型显微镜拍照系统(日本Olympus公司);RM2235型石蜡切片机(德国Leica公司)。

2 方法

2.1 模型建立与评价标准 根据前期的大鼠IGT模型研究^[13],将大鼠适应喂养1周,选取空腹血糖(FPG)在 $5.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\leq\text{FPG}<5.6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的60只大鼠进入实验,根据体质量区域性将大鼠随机分为高脂饲料组40只(高脂组)和普通饲料组20只(正常组)。高脂组大鼠每10 g给予45%脂肪热能的高脂饲料(含蛋白质24 g和20 kcal;碳水化合物41 g和35 kcal;脂肪24 g和45 kcal),正常组大鼠每5 g给予10%脂肪热能的普通饲料(含蛋白质19.2 g和20 kcal;碳水化合物67.3 g和70 kcal;脂肪4.3 g和10 kcal),每日固定时间投食、给水,连续喂养20周。复制模型期间实验室设置为12 h/12 h明暗交替环境,室内温度控制在 $25\sim 27\text{ }^{\circ}\text{C}$,相对湿度保持为50%~70%。

高脂组大鼠 $\text{FPG}<5.6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,餐后2 h血糖(2 h PG)在 $7.8\sim 11.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,即IGT造模成功;正常组大鼠 $\text{FPG}<5.6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,及2 h PG $<7.8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,则符合正常血糖标准^[18]。

2.2 动物分组与给药 选取30只符合IGT模型评价标准的高脂组大鼠,根据体质量区间随机分为模型组、阳性药组(盐酸二甲双胍组)和黄连温胆汤组,每组10只。另选取正常组大鼠10只进入后续实验。每日固定时间内正常组和模型组给予 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 蒸馏水,阳性药组给予盐酸二甲双胍水溶液 $0.05\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,黄连温胆汤组给予黄连温胆汤水煎剂 $7.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,给药体积均同为 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,连续灌胃给药4周。给药期间模型组、盐酸二甲双胍组、黄连温胆汤组大鼠每10 g给予45%脂肪热能的高脂饲料,正常组大鼠每5 g给予10%脂肪热能的普通饲料。每日固定时间投食、给水。

2.3 样本采集与保存

2.3.1 血液采集与保存 末次给药后,大鼠禁食

不禁水 12 h, 用 10% 乌拉坦溶液 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射。麻醉成功后颈部锁骨下静脉取血 5~8 mL, 血液静置 1~2 h 后, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min (离心半径 8.3 cm), 分离血清, 分装于 1.5 mL 冻存管, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用, 检测相关指标。

2.3.2 骨骼肌组织采集与保存 大鼠取血后, 迅速取出大鼠左侧下肢同一位置的骨骼肌组织。用预冷的 0.9% 氯化钠溶液冲洗干净, 滤纸拭干, 立即存入液氮中, 待样本全部取完移至 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱保存, 待检测相关指标。

2.4 指标检测

2.4.1 ELISA 检测血清 IL-1 β 和 IL-18 含量 取待测血清, 严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 应用酶标仪测定 450 nm 的吸光度 A , 以 A 为横坐标, 标准品浓度为纵坐标, 根据标准曲线计算出血清中 IL-1 β 和 IL-18 含量。

2.4.2 苏木素-伊红(HE)染色观察骨骼肌组织形态变化 将固定的骨骼肌组织从低浓度乙醇逐渐递升高浓度乙醇及二甲苯进行脱水, 石蜡包埋后切成 $5 \mu\text{m}$ 的薄片移到载玻片上, 脱腊后苏木素染液染色, 封片后于显微镜下观察染色并拍照。

2.4.3 免疫荧光技术检测骨骼肌组织 GSDMD 蛋白表达水平 将固定的骨骼肌组织从低浓度乙醇逐渐递升高浓度乙醇及二甲苯进行脱水, 石蜡包埋后切成 $5 \mu\text{m}$ 的薄片移到载玻片上, 脱腊后置于抗原修复液中, 高温低火修复。每张切片用吸水纸擦干, 免疫组化笔在组织周围画圈, 防止滴加液体时外溢。滴加山羊血清至完全覆盖组织, 一抗用 PBS 按 1:100 稀释, 荧光二抗用 PBS 1:200 稀释(以下操作注意避光), 滴加至完全覆盖组织, PBS 中浸泡 $5 \text{ min} \times 3$ 次, DAPI 至完全覆盖组织以复染核。取出切片, 擦干周围液体, 滴加抗荧光淬灭剂, 盖玻片封片。荧光显微镜下观察染色效果并拍照。

2.4.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测骨骼肌组织 NLRP3, Caspase-1, GSDMD 蛋白表达 取待测骨骼肌组织样本液氮研磨后放入离心管, 加入含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液进行裂解, 得蛋白质抽提物。用 BCA 工作液测出各样本的蛋白浓度。根据目的蛋白分子量大小选用对应浓度的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 转印至 PVDF 膜上, 然后 TBST 稀释的 5% 脱脂奶粉溶液封闭 1 h。将 5% 脱脂奶粉稀释的一抗工作液放入封闭好的 PVDF 膜(稀释浓度分别为 NLRP3 1:2 000, Caspase-1 1:500, GSDMD 1:2 000, β -actin 1:2 000), $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜进行一抗孵育, 取

出 PVDF 膜, 浸入 TBST 缓冲液中冲洗。用 5% BSA 稀释抗体制成二抗工作液(1:1 万), 将二抗工作液倒入漂洗好的 PVDF 膜杂交袋中, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行二抗孵育 40 min。用 Gel-Pro-Analyze 软件分析各组条带的光密度值, 取各蛋白的灰度值与内参蛋白 β -actin 灰度值的比值, 进行半定量分析。

2.4.5 Real-time PCR 检测骨骼肌组织 NLRP3, Caspase-1, GSDMD mRNA 表达 取适量骨骼肌组织液氮研磨, 裂解, 提取样本总 RNA。将 RNA 样本进行反转录以得到对应的 cDNA。取总 RNA 样本 $2 \mu\text{L}$, 加入 oligo(dT) $1 \mu\text{L}$ 和 random $1 \mu\text{L}$, 加双蒸水至总反应体系为 $12.5 \mu\text{L}$ 。简短离心收集反应液加入: dNTP ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $2 \mu\text{L}$, $5 \times$ Buffer $4 \mu\text{L}$, RNase inhibitor $0.5 \mu\text{L}$ 。 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 温浴 10 min, $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 温浴 50 min, $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min 终止反应, 得到 $20 \mu\text{L}$ cDNA 样本。PCR 扩增体系为 cDNA $1 \mu\text{L}$, PCR 上游引物 $0.5 \mu\text{L}$, PCR 下游引物 $0.5 \mu\text{L}$, SYBR GREEN MastaMix $10 \mu\text{L}$, 双蒸水 $8 \mu\text{L}$ 。 $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 使 DNA 双链完全打开, $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 变性至延伸过程依次循环 40 次, $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保温 2.5 min 使产物扩增充分, $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 1.5 min, $60 \sim 94 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 1~2 min。测定结果用基因 β -actin 表达量作为内参对照进行半定量校正, 计算得出目的基因相对表达量。引物由金斯瑞生物科技有限公司合成, PCR 引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列	长度 /bp
NLRP3	上游 5'-GCCTTGAAGAGGAGTGGATAG-3'	175
	下游 5'-TGGGTGTAGCGTCTGTTGAG-3'	
Caspase-1	上游 5'-CCTTCCTTGATTCATGTCTCA-3'	152
	下游 5'-GATAACCTGGGCTTGCTCT-3'	
GSDMD	上游 5'-TGCGGGAGTGGTCAAGAA-3'	113
	下游 5'-TGCTCAGGAGGCAGTAGGG-3'	
β -actin	上游 5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTAGC-3'	155
	下游 5'-GGCCGGACTCATCGTACTCCTGCTT-3'	

2.5 统计学方法 采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析, 用 One-way ANOVA 进行统计处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 IGT 大鼠血清 IL-18, IL-1 β 含量的影响 与正常组比较, 模型组血清 IL-18 和 IL-1 β 的含量均显

著升高($P<0.01$),与模型组比较,黄连温胆汤组和盐酸二甲双胍组血清IL-18和IL-1 β 的含量均显著降低($P<0.01$)。见表2。

表2 黄连温胆汤对IGT大鼠血清IL-1 β ,IL-18含量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 2 Effect of Huanglian Wendantang on IL-1 β and IL-18 in serum of IGT rats ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-1 β	IL-18
正常		30.44±6.56	50.63±10.77
模型		125.04±25.41 ¹⁾	182.13±38.24 ¹⁾
盐酸二甲双胍	0.05	61.37±12.90 ²⁾	95.46±22.44 ²⁾
黄连温胆汤	7.8	78.94±17.87 ²⁾	110.8±22.83 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$ (表3~5同)。

3.2 对IGT大鼠骨骼肌组织病理学变化的影响

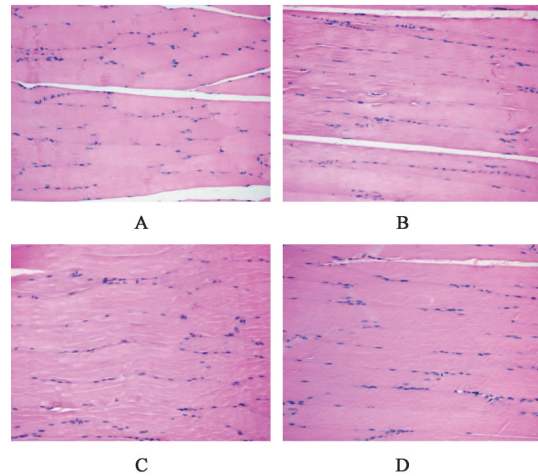
正常组大鼠骨骼肌组织结构均匀正常,形态完整,排列有序,细胞质与细胞核染色均匀。与正常组相比,模型组大鼠骨骼肌组织均存在细胞质染色不均匀,细胞核偏移固缩,组织结构排列紊乱不规整,骨骼肌纤维疏松断裂,部分细胞嗜酸性增强。与模型组比较,黄连温胆汤组骨骼肌组织排列较为规整,骨骼肌结构紧密,肌纤维断裂减少,细胞核固缩减少,细胞嗜酸性增强较少出现。见图1。

表3 黄连温胆汤对IGT大鼠骨骼肌组织GSDMD,IL-1 β ,IL-18蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 3 Effect of Huanglian Wendantang on GSDMD,IL-1 β and IL-18 protein in skeletal muscle tissue of IGT rats ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	GSDMD	IL-1 β	IL-18
正常		15 675.74±507.04	18 808.36±377.98	13 689.72±431.43
模型		69 406.96±723.73 ¹⁾	70 846.67±557.48 ¹⁾	58 197.98±567.22 ¹⁾
盐酸二甲双胍	0.05	29 541.90±878.14 ²⁾	30 865.49±713.4 ²⁾	39 160.81±732.30 ²⁾
黄连温胆汤	7.8	46 608.41±665.45 ²⁾	44 278.50±816.62 ²⁾	48 659.95±644.62 ²⁾

3.4 对IGT大鼠骨骼肌组织NLRP3,Caspase-1,GSDMD蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠骨骼肌组织NLRP3,Caspase-1,GSDMD蛋白表达水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,黄连温胆汤组和盐酸二甲双胍组大鼠骨骼肌组织NLRP3,



A. 正常组;B. 模型组;C. 盐酸二甲双胍组;D. 黄连温胆汤组(图2~5同)

图1 黄连温胆汤对IGT大鼠骨骼肌组织病理形态的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of Huanglian Wendantang on pathomorphology of skeletal muscle tissues in IGT rats (HE,×200)

3.3 对IGT大鼠骨骼肌组织GSDMD,IL-1 β ,IL-18蛋白表达的影响 免疫荧光结果显示,与正常组比较,模型组骨骼肌组织中GSDMD,IL-1 β ,IL-18蛋白表达显著增多($P<0.01$);与模型组比较,黄连温胆汤组和盐酸二甲双胍组骨骼肌组织中GSDMD,IL-1 β ,IL-18蛋白表达显著减少($P<0.01$)。见表3,图2~4。

Caspase-1,GSDMD蛋白表达水平显著降低($P<0.01$)。见表4,图5。

3.5 对大鼠骨骼肌组织NLRP3,Caspase-1,GSDMD mRNA表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠骨骼肌组织NLRP3,Caspase-1,GSDMD

表4 黄连温胆汤对IGT大鼠骨骼肌组织NLRP3,Caspase-1,GSDMD蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 4 Effect of Huanglian Wendantang on NLRP3,Caspase-1 and GSDMD protein in skeletal muscle tissue of IGT rats ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NLRP3/ β -actin	Caspase-1/ β -actin	GSDMD/ β -actin
正常		1.00±0.04	1.02±0.03	1.00±0.17
模型		4.46±0.05 ¹⁾	3.93±0.07 ¹⁾	3.29±0.22 ¹⁾
盐酸二甲双胍	0.05	2.04±0.05 ²⁾	1.59±0.03 ²⁾	1.54±0.17 ²⁾
黄连温胆汤	7.8	3.05±0.03 ²⁾	1.95±0.04 ²⁾	2.47±0.20 ²⁾

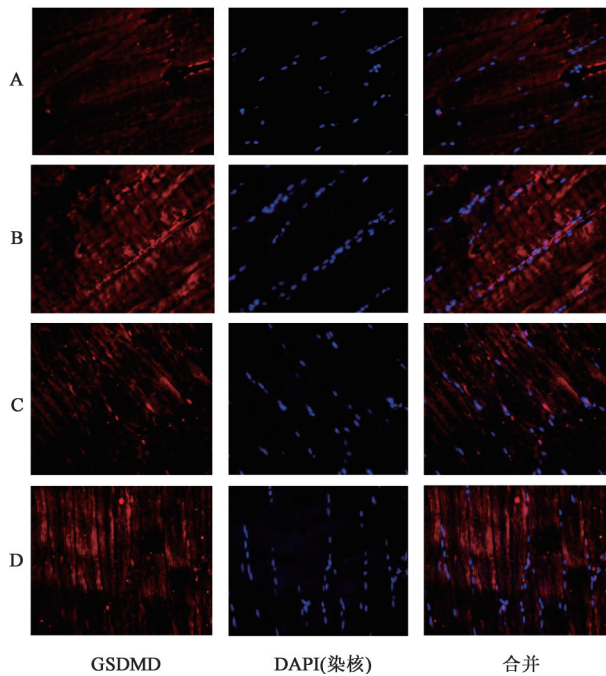


图2 黄连温胆汤对IGT大鼠骨骼肌组织中GSDMD蛋白表达的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 2 Effect of Huanglian Wendantang on GSDMD protein in skeletal muscle tissue of IGT rats(IF,×400)

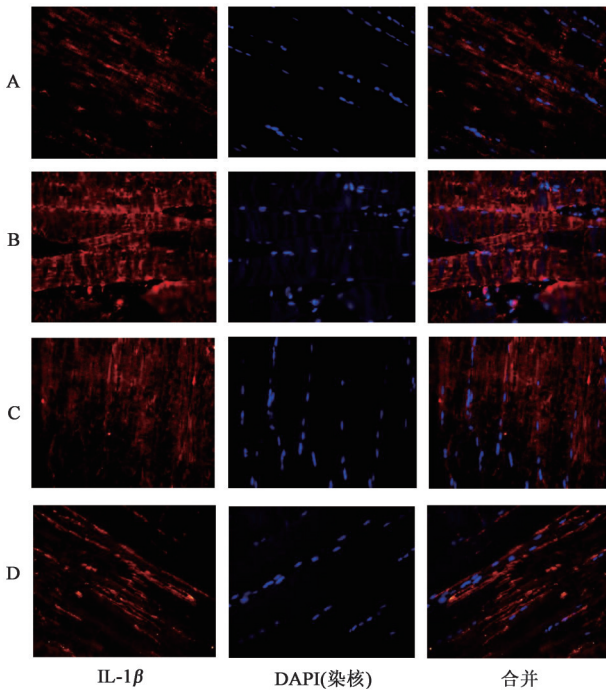


图3 黄连温胆汤对IGT大鼠骨骼肌组织中IL-1β蛋白表达的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 3 Effect of Huanglian Wendantang on IL-1β protein in skeletal muscle tissue of IGT rats(IF,×400)

mRNA 表达量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,黄连温胆汤组和盐酸二甲双胍组大鼠骨骼肌组织 NLRP3, Caspase-1, GSDMD mRNA 表达量显著降低($P<0.01$)。见表5。

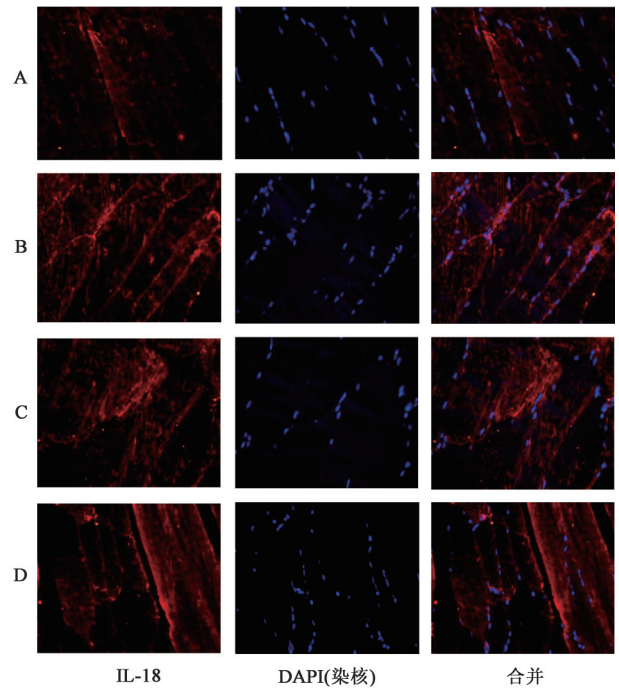


图4 黄连温胆汤对IGT大鼠骨骼肌组织中IL-18蛋白表达的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 4 Effect of Huanglian Wendantang on IL-18 protein in skeletal muscle tissue of IGT rats(IF,×400)

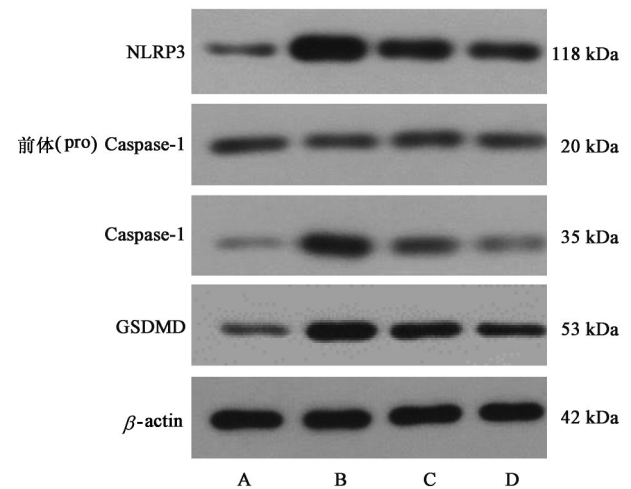


图5 各组大鼠骨骼肌组织中NLRP3, Caspase-1, GSDMD蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of NLRP3, Caspase-1 and GSDMD protein in skeletal muscle tissue of each group rats

4 讨论

IGT的发病机制主要包括胰岛β细胞功能受损和IR。而IR作为核心病机,其形成机制复杂,近年来慢性低度炎症导致IR学说备受关注。研究表明炎症标志物浓度与IR程度呈正相关^[19-20]。炎症因子能作用于胰岛素信号通路位点上,干扰多个信号通路在内的胰岛素信号转导^[21]。细胞焦亡作为机体众多炎症反应途径中的一种,当机体的内源性危

表 5 黄连温胆汤对 IGT 大鼠骨骼肌组织 NLRP3, Caspase-1, GSDMD mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Effect of Huanglian Wendantang on NLRP3, Caspase-1 and GSDMD mRNA in skeletal muscle tissue of IGT rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NLRP3	Caspase-1	GSDMD
正常		1.00±0.04	1.00±0.04	1.00±0.02
模型		3.18±0.06 ¹⁾	3.09±0.09 ¹⁾	3.09±0.23 ¹⁾
盐酸二甲双胍	0.05	1.75±0.08 ²⁾	1.53±0.11 ²⁾	1.59±0.10 ²⁾
黄连温胆汤	7.8	1.96±0.03 ²⁾	2.10±0.04 ²⁾	1.77±0.03 ²⁾

险因素引起 NLRP3 炎症小体活化后,进一步激活 Caspase-1,促进 IL-1 β 和 IL-18 炎症因子的表达和分泌,从而反映出机体的慢性低度炎症状态。本实验研究发现,长期高脂饮食诱导的 IGT 大鼠血清及骨骼肌组织中 IL-1 β 和 IL-18 水平明显升高,且 HE 染色显示 IGT 大鼠骨骼肌组织病理学改变明显,提示模型大鼠存在炎症反应。而存在炎症反应的 IGT 大鼠是否存在细胞焦亡呢,现代研究发现,依赖于 Caspase-1 的经典细胞焦亡途径主要包含 4 个步骤^[22],首先,核转录因子- κ B(NF- κ B)核移位能促使 NLRP3, IL-1 β 及 IL-18 等前体物的表达;其次, NLRP3/凋亡相关斑点样蛋白(ASC)/pro Caspase-1 蛋白复合物(即 NLRP3 炎症小体)在病原体相关分子模式或损伤相关分子模式(PAMP/DAMP)的刺激下进行组装激活, pro Caspase-1 裂解成为活性 Caspase-1, pro IL-1 β 及 pro IL-18 则被活化的 Caspase-1 切割成为具活性的炎症细胞因子 IL-1 β 及 IL-18;同时,活性 Caspase-1 裂解其关键底物蛋白 GSDMD,使其寡聚化在细胞膜表面形成膜孔;最后, IL-1 β 及 IL-18 通过膜孔被分泌到细胞之外,导致细胞肿胀破裂,最终引发伴炎症反应的细胞死亡^[23]。可以说,细胞焦亡的关键因素是炎症小体活化,炎性 Caspase-1 是细胞焦亡的核心执行者^[24], GSDMD 蛋白则是细胞焦亡的直接和最终执行者^[25]。研究表明, GSDMD 基因敲除细胞焦亡则不会发生,而是 Caspase-1 将细胞引向凋亡的过程^[26]。本实验应用 Real-time PCR, Western blot 及免疫荧光技术检测发现, IGT 大鼠骨骼肌组织中的 NLRP3, Caspase-1, GSDMD, IL-1 β 及 IL-18 mRNA 与蛋白表达均显著上升,提示模型大鼠骨骼肌组织中存在细胞焦亡。

本实验研究结果显示,黄连温胆汤能够有效抑制 IGT 大鼠骨骼肌组织中 NLRP3 炎症小体, Caspase-1 及 GSDMD mRNA 与蛋白的活化,降低血清和骨骼肌组织中 IL-1 β /IL-18 炎症因子水平,在形态学上改善骨骼肌组织结构和形态,从而改善 IGT

大鼠炎症反应程度,减轻骨骼肌组织细胞焦亡。

综上,本研究从细胞焦亡经典途径中 NLRP3/Caspase-1/GSDMD/IL-1 β , IL-18 通路揭示了黄连温胆汤改善 IGT 的作用机制,这些研究结果对黄连温胆汤的进一步开发利用具有重要参考价值。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF diabetes atlas [M]. 9th ed. Belgium: International Diabetes Federation, 2019.
- [2] 魏伊秋,李满,余佳. 慢性炎症与胰岛素抵抗机制关系的研究进展[J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(3): 640-645.
- [3] MAN S M, KARKI R, KANNEGANTI T D. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory Caspases and inflammasomes in infectious diseases [J]. Immunol Res, 2017, 277(1): 61-75.
- [4] SHARMA I, BEHL T, SEHGAL A, et al. Exploring the focal role of pyroptosis in diabetes mellitus [J]. Biointerface Res Appl Chem, 2021, 11(5): 13557-13572.
- [5] MAMUN A A, WU Y, NASRIN F, et al. Role of pyroptosis in diabetes and its therapeutic implications [J]. J Inflammation Res, 2021, 24(14): 2187-2206.
- [6] XIAO L W, YUN G, JUAN S, et al. The TIR/BB-loop mimetic AS-1 prevents non-alcoholic steatohepatitis and hepatic insulin resistance by inhibiting NLRP3-ASC inflammasome activation [J]. Br J Pharmacol, 2017, 174(12): 1841-1856.
- [7] XU C, LU Z, LUO Y, et al. Targeting of NLRP3 inflammasome with gene editing for the amelioration of inflammatory diseases [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 4092-4106.
- [8] CHEN Y N, QIAN Q, YU J. Carbenoxolone ameliorates insulin sensitivity in obese mice induced by high fat diet via regulating the I κ B- α /NF- κ B pathway and NLRP3 inflammasome [J]. Biomed

- Pharm, 2019, 115(4): 1-11.
- [9] 陆子贤. 六因条辨[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1982.
- [10] 王婧, 董丽萍, 时歆未, 等. 温胆汤历史沿革研究进展[J]. 世界中医药, 2020, 15(14): 2193-2198.
- [11] 喻松仁, 舒晴, 白洋, 等. 温胆汤对肥胖痰湿证大鼠相关炎症因子及 JAK2/STAT3 通路关键分子 STAT3 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(6): 39-44.
- [12] 李兰心, 陈新宇, 蔡虎志. 温胆汤合血压平方加减治疗中青年高血压痰湿壅盛证的临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(9): 106-111.
- [13] 刘莉, 李卫忠, 邹国良, 等. 黄连温胆汤治疗代谢综合征研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(17): 190-196.
- [14] 马伯艳, 宋颖星, 郑慧娟, 等. 温胆汤对高脂饮食诱导的糖耐量受损大鼠脂代谢的影响[J]. 中医杂志, 2015, 56(10): 874-876.
- [15] 武晓宇, 王燕, 马伯艳, 等. 温胆汤对实验性大鼠血脂代谢紊乱的调节及机理研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(7): 44-46.
- [16] 王燕, 武晓宇, 马伯艳, 等. 温胆汤对高脂血症大鼠血脂的影响[J]. 河北中医, 2006, 27(11): 867-869.
- [17] 李雨庭. 黄连温胆汤中黄连最佳剂量对 T2DM 大鼠肝脏脂代谢 PPAR α -LXR α -ABCA1 信号通路的影响[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2018.
- [18] 马伯艳, 宋颖星, 张洋, 等. 高脂诱导大鼠 IGT 模型“痰湿瘀热”证候研究[J]. 中医药学报, 2014, 42(5): 14-17.
- [19] WU H, BALLANTYNE C M. Metabolic inflammation and insulin resistance in obesity [J]. Circ Res, 2020, 126(11): 1549-1564.
- [20] MATULEWICZ N, KARCZEWSKA-KUPCZEWSKA M. Insulin resistance and chronic inflammation [J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2016, 70(1): 1245-1258.
- [21] 魏伊秋, 李满, 余佳. 慢性炎症与胰岛素抵抗机制关系的研究进展[J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(3): 640-645.
- [22] ARPEETA S, MITCHEL T, GEETHA M, et al. Oxidative stress and NLRP3-inflammasome activity as significant drivers of diabetic cardiovascular complications: therapeutic implications [J]. Front Physiol, 2018, 9(114): 2-15.
- [23] SCHNEIDER K S, GROB C J, DREIER R F, et al. The Inflammasome drives GSDMD-independent secondary pyroptosis and IL-1 release in the absence of Caspase-1 protease activity [J]. Cell Rep, 2017, 21(13): 3846-3859.
- [24] KESAVARDHANA S, MALIREDDI R K, KANNEGANTI T D. Caspases in cell death, inflammation, and pyroptosis [J]. Annu Rev Immunol, 2020, 38(9): 567-595.
- [25] ZHAO W, YANG H, LYU L, et al. GSDMD, an executor of pyroptosis, is involved in IL-1 β secretion in *Aspergillus fumigatus* keratitis [J]. Exp Eye Res, 2020, 202(12): 1-8.
- [26] ROGERS C, ERKES D A, NARDONE A, et al. Gasdermin pores permeabilize mitochondria to augment Caspase-3 activation during apoptosis and inflammasome activation [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 1-17.

[责任编辑 周冰冰]