

抵挡汤对高糖环境下泡沫细胞焦亡炎症级联反应的作用机制

任秋月¹, 姚蓉飞², 杨荣禄^{1,3}, 张宁^{1*}, 常柏^{4*}

(1. 中国中医科学院望京医院, 北京 100102; 2. 中央民族大学, 北京 100091;
3. 北京中医药大学, 北京 100029; 4. 天津医科大学朱宪彝纪念医院, 天津市内分泌研究所,
国家卫健委激素与发育重点实验室, 天津市代谢性疾病重点实验室, 天津 300314)

[摘要] 目的: 基于泡沫细胞焦亡探讨抵挡汤对其高糖环境下炎症级联反应的影响。方法: 采用氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL, 100 mg·L⁻¹)诱导泡沫细胞焦亡模型, 设置正常组(5.5 mmol·L⁻¹葡萄糖)、泡沫细胞组(100 mg·L⁻¹ ox-LDL)、高糖组(33.3 mmol·L⁻¹葡萄糖)、抵挡汤组(10%含药血清)、核苷酸寡聚化结构域样受体蛋白3(NLRP3)抑制剂(MCC950, 10 nmol·L⁻¹)组。分别采用乳酸脱氢酶(LDH)释放实验观察细胞膜损伤情况, 免疫荧光法检测胱天蛋白酶-1(Caspase-1)的表达, 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测焦亡通路关键蛋白NLRP3、Caspase-1、消化道皮肤素D(GSDMD)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-18(IL-18)的表达, 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测细胞上清液中炎症因子IL-1 β 、IL-18、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、白细胞介素-1 α (IL-1 α)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)释放情况。结果: 与正常组比较, 泡沫细胞组NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18表达显著上调($P < 0.01$), 炎症因子IL-1 β 、IL-18、MCP-1、IL-1 α 、TNF- α 释放显著增加($P < 0.01$); 与泡沫细胞组相比, 高糖组NLRP3、Caspase-1、GSDMD表达显著上调($P < 0.01$), IL-1 β 、IL-18、MCP-1、IL-1 α 、TNF- α 释放显著增加($P < 0.01$), 抵挡汤及NLRP3抑制剂MCC950均可抑制高糖导致的NLRP3、Caspase-1、GSDMD表达的增加, 显著降低IL-1 β 、IL-18、MCP-1、IL-1 α 、TNF- α 的释放($P < 0.01$)。结论: 抵挡汤可通过抑制高糖环境下NLRP3/Caspase-1通路诱导的泡沫细胞焦亡, 减轻炎症级联反应。

[关键词] 抵挡汤; 高糖; 细胞焦亡; 炎症反应

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R284; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)11-0008-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220604

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220114.1115.004.html>

[网络出版日期] 2022-01-14 16:36

Mechanism of Didangtang Against Inflammatory Cascade Triggered by Foam Cell Pyroptosis in High-glucose Environment

REN Qiu-yue¹, YAO Rong-fei², YANG Rong-lu^{1,3}, ZHANG Ning^{1*}, CHANG Bai^{4*}

(1. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China;
2. Minzu University of China, Beijing 100081, China; 3. Beijing University of Chinese Medicine,
Beijing 100029, China; 4. Tianjin Medical University Chu Hsien-I Memorial Hospital,
Tianjin Institute of Endocrinology, NHC Key Laboratory of Hormones and Development,
Tianjin Institute of Endocrinology, Tianjin 300314, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of Didangtang (DDT) against the inflammatory cascade triggered by foam cell pyroptosis in high-glucose environment. **Method:** Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL, 100 mg·L⁻¹) was used to induce pyroptosis of foam cells. The control group

[收稿日期] 2021-10-09

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81973614)

[第一作者] 任秋月, 博士, 从事中医药治疗内分泌疾病、肾病研究, E-mail: renyue7889@163.com

[通信作者] * 张宁, 博士, 主任医师, 从事中医药治疗内分泌疾病、肾病研究, E-mail: znice3927@126.com;

* 常柏, 博士, 主任医师, 从事中西医结合治疗糖尿病及其并发症研究, E-mail: changbai1972@126.com

(5.5 mmol·L⁻¹ glucose), foam cell group (100 mg·L⁻¹ ox-LDL), high-glucose group (33.3 mmol·L⁻¹ glucose), DDT group (10% DDT-containing serum), and NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inhibitor group (MCC950, 10 nmmol·L⁻¹) were designed. The cell membrane damage was observed by lactate dehydrogenase (LDH) release assay. The expression of cysteinyl aspartate-specific proteinase-1 (Caspase-1) was detected by immunofluorescence method, and expression of key proteins NLRP3, Caspase-1, gastermin D (GSDMD), interleukin-1 β (IL-1 β), and interleukin-18 (IL-18) in the pyroptosis pathway was determined by Western blot. The release of IL-18 and IL-1 β , monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and tumor necrosis factor α (TNF- α) in cell supernatant was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** The expression of NLRP3, Caspase-1, and GSDMD was up-regulated ($P<0.01$) and the release of IL-1 β , IL-18, MCP-1, IL-1 α , and TNF- α was increased ($P<0.01$) in foam cell group compared with those in the control group. The expression of NLRP3, Caspase-1, and GSDMD was higher ($P<0.01$) and the release of inflammatory factors was more ($P<0.01$) in the high-glucose group than in the foam cell group. DDT and MCC950 can inhibit expression of NLRP3, Caspase-1, GSDMD and reduce the release of IL-1 β , IL-18, MCP-1, IL-1 α , and TNF- α . **Conclusion:** DDT can suppress the pyroptosis of foam cells induced by NLRP3/Caspase-1 pathway in high-glucose environment and thereby alleviate the inflammatory cascade.

[Keywords] Didangtang; high glucose; pyroptosis; inflammation

糖尿病是影响人类生命健康的重大疑难疾病。糖尿病患者中,大血管病变的患病风险是非糖尿病患者的2~4倍^[1]。糖尿病大血管病变主要以动脉粥样硬化(AS)为病理基础,而炎症反应贯穿于整个发生发展过程^[2]。与非糖尿病人群相比,2型糖尿病(T2DM)患者合并的大血管病变程度更严重^[3-4]。前期研究证实,炎症反应对于T2DM大血管病变的发生发展至关重要^[5-6]。近年来研究发现细胞焦亡发生伴随瀑布式炎症级联反应。细胞焦亡是一种依赖于胱天蛋白酶-1/4/5/11(Caspase-1/4/5/11)的新型细胞死亡形式,其特征在于细胞肿胀破裂、炎症因子外释并引起炎症级联反应,因此也被称为细胞炎性坏死^[7-8]。由核苷酸寡聚化结构域样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体介导的Caspase-1的活化,进而释放成熟的白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-18是细胞焦亡发生的经典途径。一项针对22 096例欧洲人的流行病学调查显示,NLRP3炎症小体与AS等心血管疾病的发生风险及严重程度呈正相关^[9]。T2DM大血管病变患者NLRP3炎症小体成分表达明显上调^[10]。敲除炎症小体成分可降低动脉粥样硬化模型小鼠主动脉斑块面积^[11]。

T2DM大血管病变属于中医“消渴”变证,其病机为糖尿病日久,气阴两虚,阴损及阳,渐致痰浊瘀毒等病理产物积聚,络瘀脉损。抵挡汤方出于《伤寒论》,原方由大黄、水蛭、桃仁、虻虫组成,为破血化瘀之峻剂。前期体内实验证实,抵挡汤可通过抑制糖尿病大血管病变大鼠主动脉NLRP3炎症小体

的激活,延缓病变进展^[12]。而泡沫细胞是细胞焦亡的靶细胞^[13],在AS病变的早期产生,是其特征性的病理改变,那么抵挡汤是否会通过抑制高糖环境下泡沫细胞焦亡减轻炎症级联反应,进而改善病变程度。因此,本实验以氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导高糖环境下泡沫细胞焦亡模型,探讨抵挡汤延缓病变的可能机制,为破血逐瘀法治疗糖尿病大血管病变提供更多理论依据。

1 材料

1.1 细胞 人单核白血病细胞株(THP-1)由天津医科大学内分泌研究所、天津中医药大学馈赠(批号TCHu57)。

1.2 动物 SPF级SD大鼠20只[合格证号SCXK(京)2016-0006],雌雄各半,6~7周龄,体质量(258 \pm 27)g,饲养环境温度20~26℃,相对湿度50%~60%,自由饮水。本研究已通过天津医科大学实验动物伦理委员会批准。

1.3 试剂与药物 特级胎牛血清(FBS,美国Gibco公司,批号10099);RPMI1640培养基、佛波酯(PMA)、总胆固醇(TC)含量试剂盒、游离胆固醇(FC)含量测定试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司,批号分别为10491、P6741、BC1985、BC1895);ox-LDL(广州奔源生物科技有限公司,批号YB-002-1);乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号C0017);兔Caspase-1单克隆抗体、兔 β -肌动蛋白(β -actin)抗体、羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G-H+L(中国Proteintech公司,批号分别

为22915-1-AP、23660-1-AP、SA00001-2);兔NLRP3单克隆抗体、兔IL-1 β 单克隆抗体、兔IL-18单克隆抗体、兔消化道皮肤素D(GSDMD)单克隆抗体(美国CST公司,批号分别为13158、12703S、54943S、36425S);人IL-1 β 、IL-18、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、IL-1 α 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为H002、H015、H115、H001、H052-1);NLRP3抑制剂MCC950(美国MCE公司,批号HY-12815);抵挡汤颗粒剂:虻虫1.5g、桃仁5g、大黄10g、水蛭3g(广州一方制药有限公司,批号分别为9230426、0032063、9126163、9110823)。

1.4 仪器 3111型恒温CO₂培养箱(美国Thermo公司);AE2000型倒置相差显微镜(中国麦克奥迪公司);CKX53型倒置荧光显微镜(日本奥林巴斯公司);DKB-600b型电热恒温水浴槽(上海森信实验仪器有限公司);Powerpac Universal型垂直电泳系统、170-8280型ChemiDoc MP化学发光成像系统(美国Bio-Rad公司);SC-3612型低速水平离心机(中国中科中佳科学仪器有限公司);51119000型Multiskan FC酶标仪(美国BioTek公司)。

2 方法

2.1 泡沫细胞焦亡模型建立与分组 THP-1细胞培养在含10% FBS 10 mL、1%青/链霉素、0.05 mmol·L⁻¹ β -巯基乙醇的RPMI 1640培养基中,放置于37℃、5% CO₂培养箱培养。取对数生长期THP-1细胞,调整细胞密度,100 μ g·L⁻¹佛波酯刺激24 h,更换新鲜完全培养基,倒置显微镜下观察细胞贴壁、变形、出现伪足,表示转化为巨噬细胞,更换新鲜无血清培养基过夜,泡沫细胞组次日更换为含100 mg·L⁻¹ ox-LDL^[13]的RPMI 1640培养基,高糖组次日更换为含100 mg·L⁻¹ ox-LDL、33.3 mmol·L⁻¹葡萄糖的RPMI 1640培养基,高渗组次日更换为100 mg·L⁻¹ ox-LDL、5.5 mmol·L⁻¹葡萄糖、27.8 mmol·L⁻¹甘露醇的RPMI 1640培养基,抵挡汤组、MCC950组次日更换为含100 mg·L⁻¹ ox-LDL、33.3 mmol·L⁻¹葡萄糖的RPMI 1640培养基的同时,分别加入10%抵挡汤含药血清和10 nmol·L⁻¹的MCC950,正常组不做任何处理。继续置于37℃、5% CO₂培养箱培养24 h。油红O染色、酶法、Caspase-1免疫荧光染色和乳酸脱氢酶(LDH)释放实验评价细胞焦亡模型。

2.2 抵挡汤含药血清制备 20只大鼠,雌雄各半,适应性喂养1周后,随机分为2组,正常组、抵挡汤

组。抵挡汤颗粒剂人鼠等效剂量1.5 g·kg⁻¹灌胃^[12],每日2次,连续7 d,正常组给以1.5 g·kg⁻¹的生理盐水灌胃。末次灌胃前禁食12 h。末次灌胃后1 h,腹主动脉采血,静置2 h,3 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径10 cm),分离血清,经56℃、30 min灭活处理后,用0.22 μ m微孔滤膜过滤除菌,置-20℃保存备用。

2.3 Caspase-1免疫荧光染色 细胞爬片4%多聚甲醛固定,磷酸盐缓冲液(PBS)洗3次,0.3% Triton通透5~10 min。滴加封闭血清,在湿盒中37℃,60 min。用滤纸擦去封闭液,滴加一抗(Caspase-1 1:100)湿盒中4℃孵育过夜,PBS洗去一抗,滴加荧光二抗(1:250),置湿盒中37℃避光孵育1 h,PBS洗去二抗。滴加DAPI避光孵育10 min显核,PBS洗3次。甘油封片,荧光显微镜下立即观察。

2.4 细胞内TC、FC酶法测定 将对数生长期THP-1细胞接种于6孔细胞培养板中,诱导泡沫细胞焦亡模型,PBS洗2~3次,加入细胞裂解液,静置10 min,1万 r·min⁻¹,4℃,离心5 min(离心半径5 cm)。取上清液置于冰上待测,BCA法进行蛋白含量测定,空白孔中加入无水乙醇20 μ L,标准孔中加入标准品,样品孔中分别加入待测样品20 μ L,各孔再加入工作液180 μ L,37℃静置15 min,酶标仪于550 nm波长下测定各组吸光度A,绘制标准曲线,计算样品的TC、FC含量。胆固醇酯(CE)=TC-FC。

2.5 LDH释放检测 在96孔细胞培养板中接种THP-1细胞悬液,诱导泡沫细胞焦亡模型。弃去培养液,更换为无血清培养液,将各培养孔分为无细胞的培养液孔、未经药物处理的对照细胞孔,未经药物处理的用于后续裂解的细胞孔,药物干预组采用正常组血清、抵挡汤含药血清处理,每组设置5个复孔,继续放入培养箱。到预定的检测时间前1 h,取出细胞培养板,在未经药物处理的用于后续裂解的细胞孔中加入试剂盒提供的LDH释放试剂,加入量为原有培养液体积的10%,加入LDH释放试剂后,反复轻轻吹打数次混匀,然后继续在细胞培养箱中孵育。到预定的检测时间前1 h,加入LDH释放试剂后,反复轻轻吹打数次混匀,然后继续在细胞培养箱中孵育。多孔板离心机400 \times g离心5 min(离心半径16.5 cm)。分别取各孔的上清液120 μ L,加入到新的96孔细胞培养板相应孔中,随机进行样品测定。各孔加入LDH检测工作液60 μ L,混匀,室温避光孵育30 min,然后再490 nm处测定A。使用600 nm或 \geq 600 nm的任一波长作为

参考波进行双波长测定。LDH释放率(%)=(处理样品浓度A-样品孔A)/(细胞最大酶活性的A-样品孔A)×100。

2.6 ELISA检测细胞上清液中IL-1 β 、IL-18、MCP-1、IL-1 α 、TNF- α 含量 按照ELISA试剂盒说明书步骤检测细胞上清液中IL-1 β 、IL-18、MCP-1、IL-1 α 、TNF- α 含量。

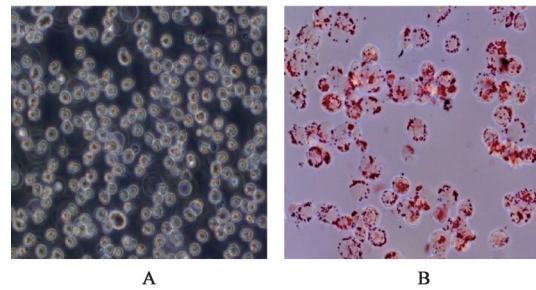
2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)测定NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18蛋白表达 弃培养皿中培养液,加入RIPA裂解液以及蛋白酶抑制剂,冰上裂解30 min。4℃,12 000 r·min⁻¹离心10 min(离心半径5 cm),收集上清。BCA蛋白定量法测定蛋白浓度,根据蛋白浓度结果,加入相应蛋白体积和PBS,混匀后,金属浴100℃,变性10 min,-80℃保存,避免反复冻融。配置10%的分离胶和5%浓缩胶,微量进样器缓慢加入样品,电泳仪设置成稳压状态,接通电源,使样品通过浓缩胶与分离胶,凝胶电泳结束后,将凝胶上分离到的蛋白条带通过转移电泳方式转印至PVDF膜。室温封闭2 h,一抗(NLRP3 1:1 000,Caspase-1 1:1 000,IL-1 β 1:1 000,IL-18 1:1 000, β -actin 1:3 000)孵育4℃反应过夜,TBST洗涤后二抗(1:2 500)室温孵育1 h,TBST洗膜,化学发光成像系统成像。

2.8 统计学分析 采用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 泡沫细胞焦亡模型评价 油红O染色镜下观察,细胞内存在大量红色脂质颗粒,符合泡沫细胞形态特征,见图1。泡沫细胞组TC、FC、CE含量均显著增加($P<0.01$),且CE含量超过50%,表明细胞内有大量胆固醇聚集,见表1。另外,泡沫细胞组Caspase-1免疫荧光染色阳性率明显增加,见图2,LDH释放明显增多,见表2,提示泡沫细胞焦亡模型制备成功。

3.2 抵挡汤对细胞上清液IL-1 β 表达的影响 与泡沫细胞组、高渗组(5.5 mmol·L⁻¹葡萄糖+27.8 mmol·L⁻¹甘露醇)比较,高糖组IL-1 β 释放显著增高。根据细胞增殖与活性检测(CCK-8)细胞活力实验,选择10%抵挡汤含药血清作为干预浓度。再次采用ELISA法检测细胞上清液IL-1 β 浓度水平,结果显示,与正常组比较,泡沫细胞组IL-1 β 含量显著升高($P<0.01$);与泡沫细胞组比较,抵挡汤可显著



注:A. THP-1细胞(×100);B. 泡沫细胞(油红O染色,×100)

图1 细胞形态变化

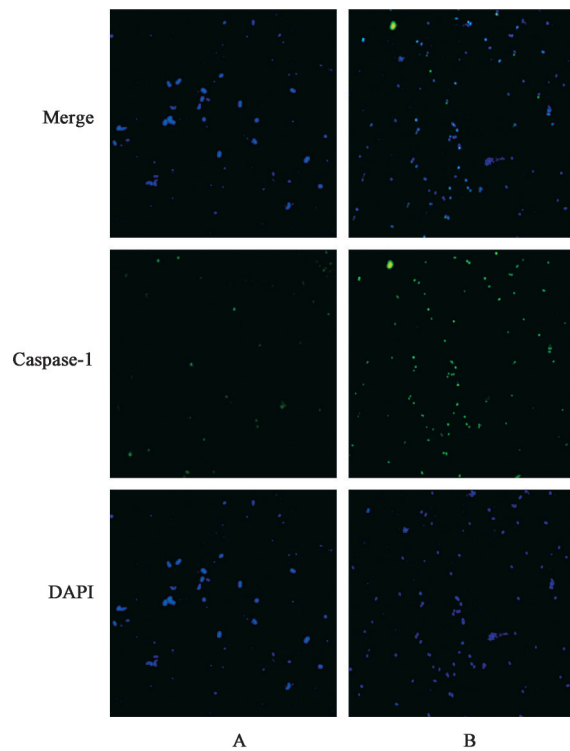
Fig. 1 Cellular morphologic change

表1 ox-LDL诱导的泡沫细胞内胆固醇含量($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1 Cholesterol content in foam cells induced by ox-LDL ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	TC	FC	CE
正常组	356.67±1.52	233.67±1.12	123.00±2.64
泡沫细胞组	474.33±2.08 ¹⁾	205.00±2.31 ¹⁾	269.33±1.54 ¹⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$ (表2同)



注:A. 正常组;B. 泡沫细胞组

图2 Caspase-1阳性表达(免疫荧光,×100)

Fig. 2 Caspase-1 positive expression (IF, ×100)

表2 ox-LDL诱导的泡沫细胞LDH释放率($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 LDH release rate in foam cells induced by ox-LDL ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	LDH/%
正常组	16.33±1.21
泡沫细胞组	63.35±3.24 ¹⁾

降低高糖环境下 IL-1 β 的含量 ($P < 0.01$), NLRP3 抑制剂 MCC950 也可显著减少 IL-1 β 含量 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 抵挡汤对细胞上清液 IL-1 β 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 3 Effect of Didangtang (DDT) on IL-1 β in cell supernatant ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量	IL-1 β /ng·L ⁻¹
正常组		0.37 \pm 0.05
泡沫细胞组	100 mg·L ⁻¹	0.57 \pm 0.02 ¹⁾
高糖组	33.3 mmol·L ⁻¹	0.69 \pm 0.01 ^{1,2)}
高渗组		0.55 \pm 0.01 ^{1,3)}
抵挡汤组	10% 含药血清	0.51 \pm 0.01 ^{1,2,3)}
MCC950组	10 nmol·L ⁻¹	0.38 \pm 0.01 ^{1,2,3)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与泡沫细胞组比较²⁾ $P < 0.01$;与高糖组比较³⁾ $P < 0.01$ (表 4-表 7同)

3.3 抵挡汤对高糖环境下泡沫细胞 LDH 释放的影响 与正常组比较,泡沫细胞组 LDH 释放率显著增多 ($P < 0.01$);与泡沫细胞组比较,高糖组 LDH 释放率显著升高 ($P < 0.01$);与高糖组比较,抵挡汤及 MCC950 对高糖环境下 LDH 释放均有显著抑制作用,差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 4。

3.4 抵挡汤对高糖环境下泡沫细胞焦亡 IL-1 β 、IL-18 表达的影响 与泡沫细胞组比较,高糖组细胞上清液 IL-1 β 、IL-18 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$), MCC950 组 IL-1 β 、IL-18 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$)。与高糖组比较,抵挡汤和 MCC950 可显著抑制高糖环境下 IL-1 β 、IL-18 释放 ($P < 0.01$)。见表 5。

表 6 抵挡汤对高糖环境下泡沫细胞焦亡 MCP-1、IL-1 α 、TNF- α 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量	MCP-1	IL-1 α	TNF- α
正常组		0.33 \pm 0.05	0.35 \pm 0.01	0.28 \pm 0.02
泡沫细胞组	100 mg·L ⁻¹	0.47 \pm 0.01 ¹⁾	0.43 \pm 0.04 ¹⁾	0.48 \pm 0.05 ¹⁾
高糖组	33.3 mmol·L ⁻¹	0.52 \pm 0.02 ^{1,2)}	0.50 \pm 0.03 ^{1,2)}	0.58 \pm 0.01 ^{1,2)}
抵挡汤组	10% 含药血清	0.41 \pm 0.03 ^{1,2,3)}	0.38 \pm 0.02 ^{1,2,3)}	0.37 \pm 0.02 ^{1,2,3)}
MCC950组	10 nmol·L ⁻¹	0.27 \pm 0.04 ^{1,2,3)}	0.32 \pm 0.03 ^{1,2,3)}	0.24 \pm 0.03 ^{1,2,3)}

3.6 抵挡汤对高糖环境下泡沫细胞焦亡的影响 与泡沫细胞组比较,高糖组 Caspase-1 阳性率增加, NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18、GSDMD 表达显著上调;与高糖组比较,抵挡汤及 MCC950 组可减少高糖环境下 Caspase-1 阳性率并显著下调上述蛋白的表达 ($P < 0.01$)。见图 3、表 7 和图 4。

4 讨论

细胞焦亡是近几年发现的一种新的细胞程序

表 4 抵挡汤对高糖环境下泡沫细胞 LDH 释放的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 4 Effect of DDT on release of LDH in foam cells of high sugar environment ($\bar{x} \pm s, n=3$)

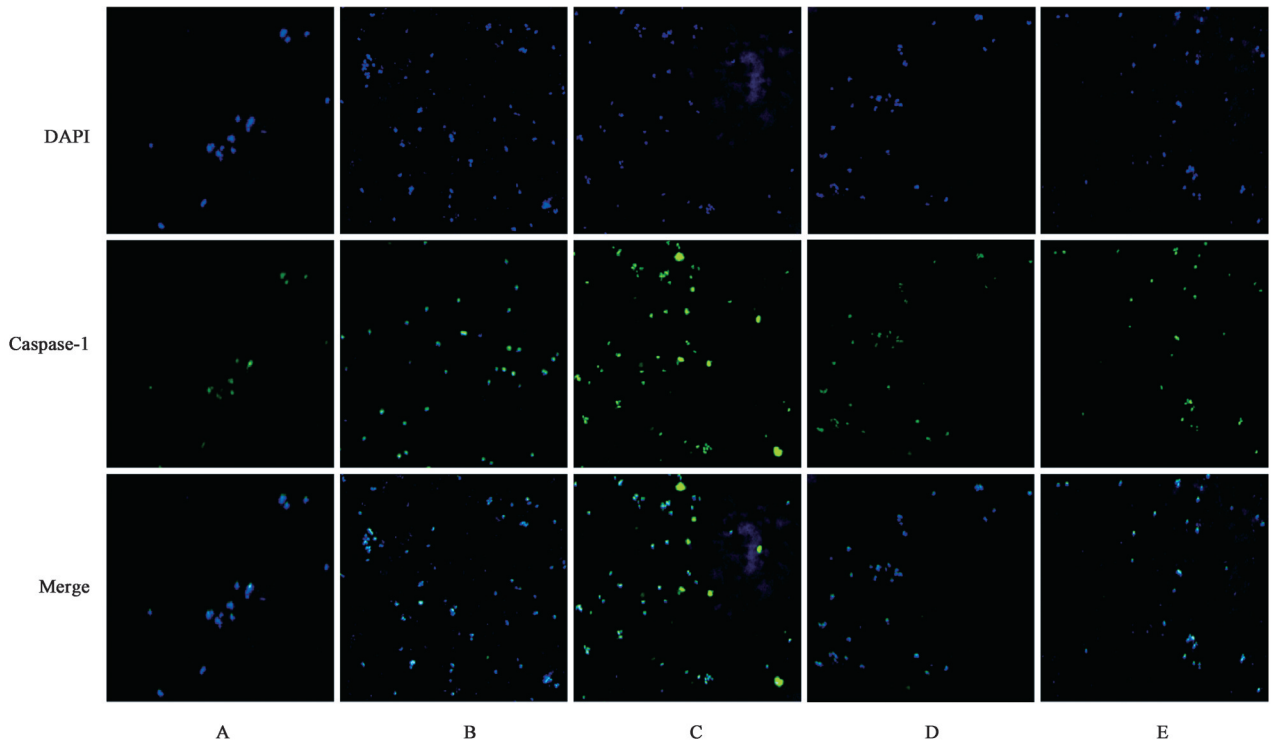
组别	剂量	LDH/%
正常组		15.45 \pm 3.22
泡沫细胞组	100 mg·L ⁻¹	65.61 \pm 2.88 ¹⁾
高糖组	33.3 mmol·L ⁻¹	76.27 \pm 2.25 ^{1,2)}
抵挡汤组	10% 含药血清	68.61 \pm 1.99 ^{1,3)}
MCC950组	10 nmol·L ⁻¹	68.11 \pm 3.03 ^{1,3)}

表 5 抵挡汤对高糖环境下泡沫细胞焦亡 IL-1 β 、IL-18 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量	IL-1 β	IL-18
正常组		0.36 \pm 0.03	0.38 \pm 0.01
泡沫细胞组	100 mg·L ⁻¹	0.58 \pm 0.01 ¹⁾	0.57 \pm 0.03 ¹⁾
高糖组	33.3 mmol·L ⁻¹	0.68 \pm 0.02 ^{1,2)}	0.72 \pm 0.02 ^{1,2)}
抵挡汤组	10% 含药血清	0.57 \pm 0.02 ^{1,3)}	0.50 \pm 0.01 ^{1,2,3)}
MCC950组	10 nmol·L ⁻¹	0.32 \pm 0.01 ^{1,2,3)}	0.31 \pm 0.02 ^{1,2,3)}

3.5 抵挡汤对高糖环境下泡沫细胞焦亡 MCP-1、IL-1 α 、TNF- α 含量的影响 与正常组比较,泡沫细胞组 MCP-1、IL-1 α 、TNF- α 含量显著升高 ($P < 0.01$);与泡沫细胞组比较,高糖组 MCP-1、IL-1 α 、TNF- α 蛋白表达较泡沫细胞组均显著增加 ($P < 0.01$);与高糖组比较,抵挡汤、MCC950 可显著抑制高糖环境下 MCP-1、IL-1 α 、TNF- α 的表达,差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 6。

性死亡方式,在形态学上具有独特特征即细胞膜表面形成蜂窝状的直径 10~14 nm 的环形亲水性孔道,离子及水分子等小分子进入细胞内导致细胞肿胀破裂^[14-16],进而炎症因子和溶酶体等内容物释放,引发炎症级联反应^[17]。本研究结果显示,高糖环境下泡沫细胞焦亡引发的炎症级联反应程度更重,抵挡汤可通过抑制高糖环境下 NLRP3 炎症小体介导的泡沫细胞焦亡,减轻炎症级联反应。



注:A. 正常组;B. 泡沫细胞组;C. 高糖组;D. 抵挡汤组;E. MCC950组(图4同)

图3 抵挡汤对泡沫细胞焦亡Caspase-1表达的影响(免疫荧光,×100)

Fig. 3 Effect of DDT on expression of Caspase-1 by fluorescence microscope (IF, ×100)

表7 抵挡汤对高糖环境下泡沫细胞焦亡关键蛋白NLRP3、Caspase-1 p20、IL-1β、IL-18、GSDMD表达的影响(̄x±s, n=3)

Table 7 Effect of DDT on NLRP3, Caspase-1 p20, IL-1β, IL-18 and GSDMD expression of foam cell pyroptosis with high glucose (̄x±s, n=3)

组别	剂量	NLRP3/β-actin	Caspase-1 p20/β-actin	IL-1β/β-actin	IL-18/β-actin	GSDMD/β-actin
正常组		0.11±0.01	0.45±0.01	0.29±0.02	0.44±0.03	0.16±0.01
泡沫细胞组	100 mg·L ⁻¹	0.23±0.02 ¹⁾	0.73±0.02 ¹⁾	0.43±0.07 ¹⁾	0.62±0.01 ¹⁾	0.44±0.01 ¹⁾
高糖组	33.3 mmol·L ⁻¹	0.27±0.02 ^{1,2)}	0.93±0.02 ^{1,2)}	0.55±0.01 ^{1,2)}	0.73±0.02 ^{1,2)}	0.64±0.03 ^{1,2)}
抵挡汤组	10% 含药血清	0.17±0.01 ^{1,2,3)}	0.57±0.02 ^{1,2,3)}	0.44±0.02 ^{1,3)}	0.55±0.01 ^{1,2,3)}	0.36±0.01 ^{1,2,3)}
MCC950组	10 nmol·L ⁻¹	0.08±0.01 ^{1,2,3)}	0.56±0.02 ^{1,2,3)}	0.31±0.01 ^{2,3)}	0.25±0.03 ^{1,2,3)}	0.13±0.02 ^{1,2,3)}

炎症小体复合物的组装是细胞焦亡起始的关键环节^[18]。正常生理情况下,Caspase-1以无活性的酶原形式Caspase-1前体(pro-Caspase-1)存在,由核苷酸结合寡聚化结构域样受体(NLRs)蛋白自我寡聚与接头蛋白(ASC)相互作用,招募胞内的pro-Caspase-1,组装成炎症小体复合物,剪切pro-Caspase-1,释放成熟活化的Caspase-1。其后,成熟活化的Caspase-1将剪切pro-IL-1β、pro-IL-18为具有促炎功能的成熟的IL-1β和IL-18,并释放至胞外,引起炎症级联反应。细胞焦亡在AS^[19]、糖尿病^[20-21]等的发生发展过程中发挥重要作用。高浓度葡萄糖可激活NLRP3炎症小体,促进IL-1β的释放,进一步诱发胰岛素抵抗和T2DM进展^[22],而Caspase-1和NLRP3缺失后的小鼠可显著改善由高脂饮食诱导

的胰岛素抵抗和葡萄糖不耐受^[23-24],提示Caspase-1和NLRP3炎症小体均参与T2DM的病变进程。

在大血管病变过程中,泡沫细胞是早期的特征性病理改变。早期的泡沫细胞主要来源于血液中的单核细胞,进入血管受损部位后分化为巨噬细胞,后者通过其表面受体无限制的摄取大量ox-LDL,形成泡沫细胞。本研究显示,ox-LDL可增加LDH的释放,Caspase-1表达,活化Caspase-1,激活NLRP3炎症小体,促进IL-1β、IL-18的释放,诱导泡沫细胞焦亡,与既往研究结果一致^[13]。另外,采用ox-LDL诱导泡沫细胞焦亡模型也符合大血管病变的病理过程。与正常糖环境比较,高糖环境下LDH释放,NLRP3、IL-1β、IL-18表达,Caspase-1活化均显著增加,提示高糖环境下泡沫细胞焦亡更

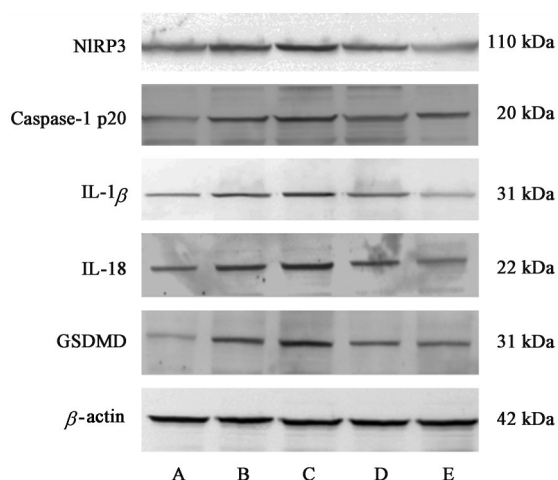


图4 泡沫细胞 NLRP3、Caspase-1 p20、IL-1 β 、IL-18、GSDMD 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of NLRP3, Caspase-1 p20, IL-1 β , IL-18 and GSDMD of foam cell

重。GSDMD 蛋白是细胞焦亡的发生和 IL-1 β 释放的必要步骤^[25], 本研究显示 GSDMD 蛋白在高糖环境下同样显著上调。

伴随着细胞焦亡, IL-1 β 、IL-18 释放到细胞外, IL-1 β 是强大的前炎症因子, 能够有效诱导 MCP-1、血管细胞黏附因子-1 (VCAM-1) 的表达, 二者在血管病变早期单核细胞向受损血管部位的趋化、黏附起关键作用。Caspase-1 的活化能够促进 IL-1 α 的表达, 后者可直接对炎症部位的持续性细胞浸润和组织破坏产生作用。MIGGIN 等^[26] 利用脂多糖刺激 Caspase-1 缺陷的巨噬细胞后, TNF- α 表达显著降低。TNF- α 作为一种重要的炎症介质, 广泛表达于血管内皮, 可调节细胞黏附因子, 平滑肌细胞迁移、增殖。这些炎症因子与 T2DM 大血管病变整个病理过程密切相关。本研究显示, 与正常糖环境相比, 高糖环境下细胞上清液中 IL-1 β 、IL-18、MCP-1、IL-1 α 、TNF- α 表达也明显增加, 表明在高糖环境下, 泡沫细胞的焦亡引发的炎症级联反应也更重。

中医学认为脉络瘀阻是 T2DM 大血管病变的主要病机, 并以破血化瘀法论治。中医学的瘀血与炎症有着密切的联系, 炎症反应必然导致瘀血内停。而炎症过程中, 血管中和血管外多种有形成分的聚集、免疫功能调节失常均是中医瘀血的具体表现。本研究结果显示, 抵挡汤可通过降低 LDH 释放, 下调 NLRP3、IL-1 β 、IL-18 的表达及 Caspase-1 活化, 抑制高糖环境下泡沫细胞焦亡, 下调细胞上清液中 IL-1 β 、IL-18、MCP-1、IL-1 α 、TNF- α 的表达, 减轻炎症级联反应。MCC950 是一种有效的、选择性

的 NLRP3 抑制剂, 是很有潜力的药物候选分子^[27-28]。本研究结果显示, MCC950 同样可通过抑制 NLRP3 炎症小体的活化, 抑制高糖环境下泡沫细胞焦亡, 进而减轻炎症级联反应, 提示抵挡汤抑制高糖环境下泡沫细胞焦亡的作用靶点可能为 NLRP3, 为破血化瘀法治疗糖尿病大血管病变提供更多的理论依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] SARWAR N, GAO P, SESHASAI S R, et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: A collaborative meta-analysis of 102 prospective studies[J]. *Lancet*, 2010, 375(9733): 2215-2222.
- [2] WEBER C, NOELS H. Atherosclerosis: Current pathogenesis and therapeutic options [J]. *Nat Med*, 2011, 17(11):1410-1422.
- [3] XU Y, WANG L, HE J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults [J]. *JAMA*, 2013, 310(9): 948-959.
- [4] BI Y, LU J, WANG W, et al. Cohort profile: Risk evaluation of cancers in Chinese diabetic individuals: A longitudinal (REACTION) study [J]. *J Diabetes*, 2014, 6(2):147-157.
- [5] 常柏, 李巧芬, 常宝成, 等. 抵挡汤早期干预对2型糖尿病大鼠大血管巨噬细胞调控作用的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(16): 195-199.
- [6] 常柏, 李巧芬, 常宝成, 等. 抵挡汤早期干预对2型糖尿病大鼠肿瘤坏死因子- α 与血管细胞黏附分子-1 表达的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2012, 19(10): 38-40.
- [7] BERGSBAKEN T, FINK S L, COOKSON B T. Pyroptosis: Host cell death and inflammation [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(2): 99-109.
- [8] CHEN X, HE W T, HU L, et al. Pyroptosis is driven by non-selective gasdermin-D pore and its morphology is different from MLKL channel-mediated necroptosis [J]. *Cell Res*, 2016, 26(9): 1007-1020.
- [9] DEGHAN A, YANG Q, PETERS A, et al. Association of novel genetic Loci with circulating fibrinogen levels: A genome-wide association study in 6 population-based cohorts [J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2009, 2(2): 125-133.
- [10] LEE J, WAN J, LEE L, et al. Study of the NLRP3 inflammasome component genes and downstream cytokines in patients with type 2 diabetes mellitus with

- carotid atherosclerosis[J]. *Lipids Health Dis*, 2017, 16(1):217.
- [11] 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.
- [12] 傅红敏,任秋月,常柏. 抵挡汤对糖尿病大血管病变小鼠主动脉NLRP3炎症小体活化炎症级联反应的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(11):1-8.
- [13] LIN J, SHOU X, MAO X, et al. Oxidized low density lipoprotein induced Caspase-1 mediated pyroptotic cell death in macrophages: Implication in lesion instability?[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4):e62148.
- [14] COLL R C, ROBERTSON A A, CHAE J J, et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases [J]. *Nat Med*, 2015, 21(3):248-255.
- [15] SHI J, ZHAO Y, WANG K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death[J]. *Nature*, 2015, 526(7575):660-665.
- [16] DING J, WANG K, LIU W, et al. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family[J]. *Nature*, 2016, 535(7610):111-116.
- [17] TOMA C, HIGA N, KOIZUMI Y, et al. Pathogenic *Vibrio* activate NLRP3 inflammasome via cytotoxins and TLR/nucleotide-binding oligomerization domain-mediated NF-kappa B signaling[J]. *J Immunol*, 2010, 184(9):5287-5297.
- [18] FENG H, GU J, GOU F, et al. High glucose and lipopolysaccharide prime NLRP3 inflammasome via ROS/TXNIP pathway in mesangial cells[J]. *J Diabetes Res*, 2016, 2016:6973175.
- [19] MARTINON F, PÉTRILLI V, MAYOR A, et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome[J]. *Nature*, 2006, 440(7081):237-241.
- [20] RHEINHEIMER J, DE SOUZA B M, CARDOSO N S, et al. Current role of the NLRP3 inflammasome on obesity and insulin resistance: A systematic review[J]. *Metabolism*, 2017, 74:1-9.
- [21] 王美子,岳丽军,万毅刚,等. 葛根芩连汤加味方改善糖尿病肾病模型鼠足细胞焦亡和胰岛素抵抗的作用和机制[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(17):4471-4479.
- [22] MASTERS S L, DUNNE A, SUBRAMANIAN S L, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 β in type 2 diabetes[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(10):897-904.
- [23] ZHOU R, TARDIVEL A, THORENS B, et al. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(2):136-140.
- [24] STIENSTRA R, JOOSTEN L A, KOENEN T, et al. The inflammasome-mediated Caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity [J]. *Cell Metab*, 2010, 12(6):593-605.
- [25] HE W T, WAN H, HU L, et al. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion[J]. *Cell Res*, 2015, 25(12):1285-1298.
- [26] MIGGIN S M, PÅLSSON-MCDERMOTT E, DUNNE A, et al. NF-kappaB activation by the Toll-IL-1 receptor domain protein MyD88 adapter-like is regulated by Caspase-1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(9):3372-3377.
- [27] O'BRIEN W T, PHAM L, SYMONS G F, et al. The NLRP3 inflammasome in traumatic brain injury: Potential as a biomarker and therapeutic target [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1):104.
- [28] COLL R C, HILL J R, DAY C J, et al. MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition[J]. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(6):556-559.

[责任编辑 周冰冰]