

补骨脂定-刺甘草查尔酮配伍减毒机制

刘婷婷^{1,2,3}, 梁龙鑫², 徐广², 肖小河², 赵艳玲^{2*}, 柏兆方^{2*}

(1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 中国人民解放军总医院第五医学中心, 北京 100039;
3. 遵义医科大学第三附属医院(遵义市第一人民医院), 贵州 563000)

[摘要] 目的:基于小鼠原代骨髓巨噬细胞(BMDM),建立补骨脂定诱导的炎症小体活化模型,探索补骨脂定联合刺甘草查尔酮免疫调控的作用效应。方法:联用脂多糖与补骨脂定激活炎症小体,使用脂多糖(LPS)刺激BMDM 4 h后,给予刺甘草查尔酮($40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)进行预保护,1 h后用补骨脂定($10, 20, 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)刺激4 h,采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测同时检测细胞上清中剪切成熟的胱天蛋白酶-1 p20(Caspase-1 p20)和细胞裂解液中Caspase-1前体(pro-Caspase-1)、白细胞介素-1 β 前体(pro-IL-1 β)的蛋白表达;酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒测定BMDM细胞上清液中IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量。结果:Western blot分析显示,与空白组比较,刺甘草查尔酮可明显抑制补骨脂定诱导的pro-Caspase-1剪切成熟($P<0.05, P<0.01$);ELISA试剂盒检测结果表明,与空白组比较,不同浓度得补骨脂定组均可以明显增加IL-1 β 、TNF- α 释放($P<0.05, P<0.01$);与补骨脂定组比较,补骨脂定-刺甘草查尔酮组均可显著减少IL-1 β 、TNF- α 释放($P<0.01$)。结论:刺甘草查尔酮可显著抑制补骨脂定介导的过激的免疫炎症反应,从而达到配伍减毒的效应,该研究探索了补骨脂定-刺甘草查尔酮配伍减毒的效应,在一定程度上为临床安全用药提供依据。

[关键词] 补骨脂定; 刺甘草查尔酮; 配伍减毒; 免疫调控; 炎症小体

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)01-0045-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221502

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220719.1721.006.html>

[网络出版日期] 2022-07-20 13:22

Mechanism of Toxicity Reduction of Psoralidin Combined with Echinatin

LIU Tingting^{1,2,3}, LIANG Longxin², XU Guang², XIAO Xiaohe², ZHAO Yanling^{2*}, BAI Zhaofang^{2*}

(1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;
2. The Fifth Medical Center of Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100039, China;
3. No. 3 Affiliated Hospital to Zunyi Medical University (The First People's Hospital of Zunyi),
Guizhou 563000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a model of inflammasome activation induced by psoralidin based on bone marrow-derived macrophages (BMDM) in mice, and to explore the immunomodulatory effects of psoralidin combined with echinatin. **Method:** Lipopolysaccharide (LPS) and psoralidin were used to activate inflammasomes, and after 4 h LPS stimulation, echinatin ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was administered for pre-protection for 1 h, followed by stimulation with psoralidin ($10, 20, 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 4 h. The protein expression of Caspase-1 p20 in cell supernatant and precursor (pro)-Caspase-1 and pro-interleukin (IL)-1 β in cell lysate were simultaneously detected by Western blot. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was adopted to

[收稿日期] 2022-03-21

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81874368);首都卫生发展科研专项项目(首发2022-4-5062);中国博士后科学基金项目(2020M673676)

[第一作者] 刘婷婷,博士,从事中药药理学研究, Tel:010-933252, E-mail:mikotyann@hotmail.com

[通信作者] * 柏兆方,博士,副研究员,从事临床中药学研究, Tel:010-933252, E-mail:Baizf2008@hotmail.com;

* 赵艳玲,博士,主任药师,从事中药药理学研究及中药新药研究, Tel:010-933362, E-mail:zhaoyl2855@126.com

determine the content of IL- β and TNF- α in the supernatant of BMDM. **Result:** Western blot revealed that compared with the conditions in the control group, the maturation of psoralidin-induced pro-Caspase-1 and the secretion of IL-1 β was inhibited by echinatin ($P<0.05$, $P<0.01$). ELISA showed that the production of IL-1 β and TNF- α was enhanced by psoralidin of different concentrations ($P<0.05$, $P<0.01$) compared with the condition in the control group. In addition, compared with the psoralidin group, the psoralidin combined with echinatin group reduced the secretion of IL-1 β and TNF- α ($P<0.01$). **Conclusion:** Echinatin could significantly inhibited the excessive immune-inflammatory response mediated by psoralidin, and thus achieve the effect of toxicity reduction. The present study explored the toxicity-reducing effect of psoralidin combined with echinatin, providing a basis for safe clinical application.

[Keywords] psoralidin; echinatin; toxicity reduction by combination; immunomodulation; inflammasome

炎症小体可识别体外入侵的各种微生物以及体内的危险刺激信号^[1],诱导凋亡相关斑点蛋白(ASC)寡聚及胱天蛋白酶-1(Caspase-1)自我剪切成熟,从而分泌大量的炎性因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-18,抵御外来刺激带来的损害^[2-4]。天然免疫模式识别受体(PRRs)的种类很多,目前研究较多的有Toll样受体、NOD样受体及黑素瘤2(AIM2)样受体,均可调控免疫反应抵御多种感染性疾病^[5-7]。然而,近年来多项研究表明,炎症小体的过度激活与许多疾病的发展、发生密切相关,特别是一些慢性疾病,例如肝纤维化^[8-9]、阿尔兹海默症^[10-11]等。

补骨脂收录于2020年版《中华人民共和国药典》,补肾壮阳,固精缩尿,温脾止泻,为补肾扶火、壮阳要药,临床应用广泛^[12]。然而,近年来,包括仙灵骨葆胶囊在内的多种补骨脂相关制剂诱导肝损伤的不良反应已被国家不良反应中心多次报道,补骨脂及其相关制剂的安全性引起了广泛的关注^[13]。课题组前期研究发现补骨脂及其相关成分可导致小鼠肝脏损伤^[14-15],其中补骨脂定是补骨脂中一种香豆素类成分,可诱导炎症小体过度激活导致肝脏炎症浸润、肝细胞肥大等,可能是补骨脂诱导肝损伤的主要原因^[16]。由此推测,抑制炎症小体的过度激活或许是减少补骨脂诱导的肝损伤的重要环节。甘草,具有“解百毒”之功,可缓和诸药之偏性,常用于中药配伍,调和诸药^[17-18]。刺甘草查尔酮具有抗病毒、抗炎、抗癌等多种药理作用,是甘草中主要的药效成分之一。同时,课题组前期研究表明,刺甘草查尔酮抑制NOD样受体蛋白3(NLRP3)、NOD样受体家族蛋白4(NLRC4)炎症小体激活,改善小鼠败血症休克和结肠炎,明显抑制小鼠非酒精性脂肪肝^[19]。补骨脂与甘草的配伍常见于临床应用。本研究旨在探索补骨脂配伍甘草的可能减毒机制,为

补骨脂临床配伍解毒用药提供基础和方向。

1 材料

1.1 动物 C57BL/6 WT 雌性小鼠6~8周,体质量18~22 g,购自斯贝福生物技术有限公司,动物合格证号SCXK(京)2021-0010,小鼠被安置在21~24 °C的环境中(每笼4~6只),采用光-暗循环,本实验所有的动物实验都得到了中国人民解放军总医院第五医学中心的批准,符合《实验动物管理调节》要求。

1.2 药材及试剂 补骨脂定(批号HY-NO232)、刺甘草查尔酮(批号HY-NO269),均购于美国MedChemExpress公司,纯度>98%;DMEM培养基、胎牛血清、Opti-MEM培养基(美国Gibco公司,批号分别为11965092、C0232、2427634);二甲基亚砜(北京百奥莱博科技有限公司,批号QN0746);ASC抗体、IL-1 β 抗体、Lamin B抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为67824、12242、17416);Caspase-1 p20/p45抗体[安诺伦(北京)生物科技有限公司,批号AG-20B-004];细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(上海同仁药业股份有限公司,批号ck04-500T);IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测试剂盒(达科为生物技术有限公司,批号分别为1210602、1217202)。

1.3 仪器 HERAcell VIOS 160i型二氧化碳培养箱、TGL-18M型低温高速离心机(美国Thermo Scientific公司);SpectraMax iD5型酶标仪(美国Promega公司);PowerPac HC型电泳仪、Trans-Bolt型转印槽(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 小鼠骨髓来源巨噬细胞(BMDM)的制备及培养 雌性SPF级C57小鼠,体质量20~25 g,乙醚麻醉下脱颈处死,75%乙醇浸泡消毒30 min,无菌操作

台中分离出小鼠胫骨,用37℃预热的培养基(含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素)冲洗骨髓腔,至胫骨发白,收集混合液,加入巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF, 25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),吹打混匀,放入培养基,置于条件稳定(5% CO_2 、37℃)培养箱中培养,5~7 d后,细胞用小鼠巨噬细胞标志物F4/80抗体标记,通过流式细胞仪检测,鉴定所得细胞为巨噬细胞(BMDM)^[20-22]。

2.2 CCK-8细胞增殖与活性实验 BMDM(1×10^6 个/L),吹打混匀后接种于96孔板中(100 μL),每组设置3个复孔,分为正常组(0.1% DMSO组)、补骨脂定组(10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),以及不补骨脂定(10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)与刺甘草查尔酮(40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)混合液组,恒温培养5、10 h,避光加入CCK-8溶液(66 μL),恒温培养30、450 nm处测定吸光度A,计算增殖率。

2.3 细胞刺激方式 BMDM细胞中评价炎症小体活性 BMDM(1×10^6 个/L),吹打混匀后接种于24孔板中(500 μL),置于细胞培养箱待细胞贴壁后,LPS(50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)预处理4 h,弃上清,加入含刺甘草查尔酮化合物的培养基孵育1 h,而后,加入不同浓度的补骨脂定溶液刺激3 h,观察细胞状态并收集混悬液,置于离心机中5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min(离心半径16 cm),分别收集上清与细胞裂解液,备用^[23]。

2.4 ASC寡聚化 用50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS诱导细胞4 h。用刺甘草查尔酮预处理1 h,并用补骨脂定(10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)进行刺激4 h,将细胞上清液去除细胞上清液,用Triton Buffer(0.5% Triton X-100, 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-100)裂解细胞,100、50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl和150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl,其中含有不含EDTA的蛋白酶抑制剂。裂解液在4℃以6 000 \times g离心15 min,颗粒被用冰水冷却的磷酸盐缓冲液(PBS)洗2次,然后重新悬浮在200 μL 的PBS中。对于ASC低聚物交联,2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸二琥珀酰亚胺(DSS)被添加到重新悬浮的样品中,并在混合物在37℃下进一步孵化30 min,交联后,将交联的样品离心,然后重新悬浮在样品缓冲液中,加热,并通过免疫印迹进行分析。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达 用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离细胞裂解液和上清中等量的蛋白质样品,电泳结束后,将蛋白转移到聚偏氟乙烯膜上,结束后,将PVDF膜在室温下用10%的脱脂牛奶将膜封闭15 min,封闭结束后,用相应的一抗Caspase-1、ASC

抗体(1:1 000),Lamin B抗体(1:3 000)在4℃孵育过夜,然后在室温下用对应的二抗(1:1 000)孵育1 h,对上清和裂解中的蛋白表达进行分析^[18]。

2.6 ELISA试剂盒测定BMDM细胞上清液中IL- β 、TNF- α 含量 收集给药后的细胞培养上清液,按照试剂盒说明书操作步骤按进行测定。

2.7 统计学方法 采用SPSS 21.0进行统计学分析,所有实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组均数比较采用单因素方差分析(One way ANOVA),进行最小显著性差异法(LSD)检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 补骨脂定配伍刺甘草查尔酮对细胞活性的影响 与空白组比较,随着补骨脂定的给药浓度增加,BMDM细胞存活率呈梯度显著降低($P<0.01$);与单独补骨脂定组比较,配伍刺甘草查尔酮后,细胞存活率显著升高($P<0.01$)。见表1。

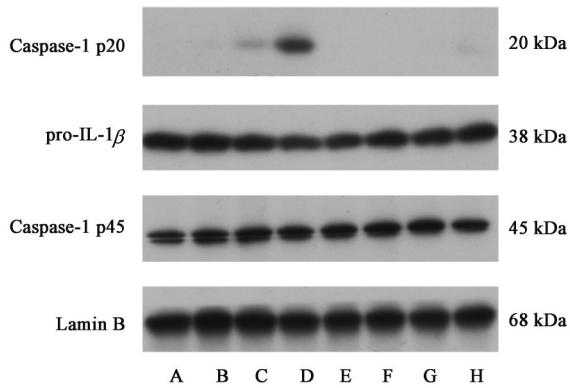
表1 补骨脂定配伍刺甘草查尔酮对细胞增殖率的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 1 Effect of psoralidin-echinatin on cellular activity ($\bar{x}\pm s, n=3$) %

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	5 h	10 h
空白组		100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00
补骨脂定组	10	92.27 \pm 0.28 ³⁾	80.73 \pm 0.56 ³⁾
	20	82.49 \pm 0.29 ³⁾	71.95 \pm 0.32 ³⁾
	40	72.59 \pm 0.40 ³⁾	61.56 \pm 0.55 ³⁾
刺甘草查尔酮组	40	98.68 \pm 0.45	91.07 \pm 0.82
补骨脂定-刺甘草查尔酮组	10+40	93.46 \pm 0.16 ¹⁾	82.82 \pm 0.89 ¹⁾
	20+40	90.82 \pm 0.71 ¹⁾	80.60 \pm 0.34 ¹⁾
	40+40	83.49 \pm 0.18 ¹⁾	77.84 \pm 0.73 ¹⁾

注:与补骨脂定40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较¹⁾ $P<0.01$;与空白组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ (表2-表5同)

3.2 不同浓度的补骨脂定配伍刺甘草查尔酮后上清pro-IL-1 β 、Caspase-1蛋白表达及IL-1 β 、TNF- α 释放的影响 与空白组比较,单独给予补骨脂定组可增加上清中Caspase-1 p20的成熟,显著增加IL-1 β 与TNF- α 的释放($P<0.01$);与单独给予补骨脂定组(40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)比较,配伍刺甘草查尔酮后可抑制补骨脂定诱导的Caspase-1 p20的剪切成熟,显著减少上清中IL-1 β 与TNF- α 的释放($P<0.01$)。各组间pro-IL-1 β 、Caspase-1 p45蛋白表达差异无统计学意义。见图1、表2。

3.3 补骨脂定配伍不同浓度的刺甘草查尔酮对上清pro-IL-1 β 、Caspase-1蛋白表达及IL-1 β 、TNF- α 释放的影响 与空白组比较,单独给予补骨脂定组可



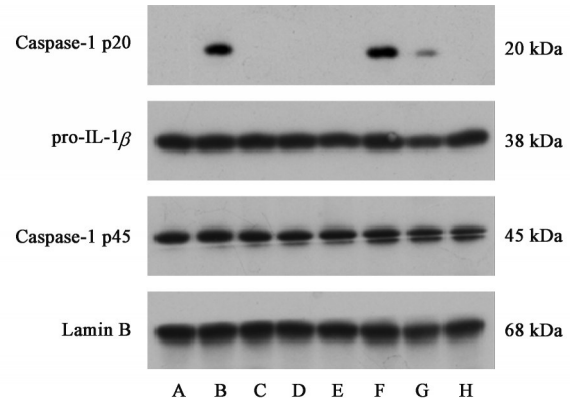
注: A. 空白组; B. 补骨脂定 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; C. 补骨脂定 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; D. 补骨脂定 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; E. 刺甘草查尔酮组; F. 补骨脂定 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ -刺甘草查尔酮组; G. 补骨脂定 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ -刺甘草查尔酮组; H. 补骨脂定 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ -刺甘草查尔酮组(图4同)

图1 各组BMDM上清Caspase-1 p20的蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of Caspase-1 p20 protein expression in each group of BMDM supernatant

增加上清中Caspase-1 p20的成熟,明显增加IL-1β与TNF-α的释放($P<0.05$);与单独给予补骨脂定 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较,刺甘草查尔酮 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 显著抑制补骨脂定诱导的Caspase-1 p20的剪切成熟,刺甘草查尔酮 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 可以完全抑制,显著减少上

清中IL-1β与TNF-α的释放($P<0.01$)。刺甘草查尔酮 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对Caspase-1的活化及IL-1β、TNF-α差异无统计学意义。各组间pro-IL-1β、Caspase-1 p45蛋白表达差异无统计学意义。见图2、表3。



注: A. 空白组; B. 补骨脂定组; C. 刺甘草查尔酮 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; D. 刺甘草查尔酮 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; E. 刺甘草查尔酮 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; F. 补骨脂定-刺甘草查尔酮 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; G. 补骨脂定-刺甘草查尔酮 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; H. 补骨脂定-刺甘草查尔酮 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

图2 各组BMDM上清Caspase-1 p20的蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Caspase-1 p20 protein expression in each group of BMDM supernatant

表2 不同浓度的补骨脂定配伍刺甘草查尔酮对IL-1β、TNF-α释放及pro-IL-1β、Caspase-1蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of different concentrations of psoralidin combine with echinatin on release of IL-1β, TNF-α and pro-IL-1β, Caspase-1 protein expression ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	IL-1β/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	TNF-α/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	Caspase-1 p20/ LaminB	pro-IL-1β/ LaminB	Caspase-1 p45/ LaminB
空白组		8.91±1.75	69.16±10.09	0.007±0.001	0.63±0.02	0.72±0.05
补骨脂定组	10	35.25±2.21 ³⁾	121.80±10.86 ⁴⁾	0.066±0.013 ⁴⁾	0.55±0.05	0.84±0.01
	20	97.23±2.84 ³⁾	298.04±11.20 ³⁾	0.280±0.016 ³⁾	0.57±0.02	0.95±0.01
	40	186.60±5.38 ³⁾	684.48±14.72 ³⁾	1.150±0.034 ³⁾	0.64±0.01	0.90±0.03
刺甘草查尔酮组	40	8.78±1.29	61.19±11.06	0.021±0.003 ¹⁾	0.59±0.05	0.98±0.03
补骨脂定-刺甘草查尔酮组	10+40	22.66±1.66 ¹⁾	109.02±6.84 ¹⁾	0.024±0.001 ¹⁾	0.64±0.02	1.02±0.06
	20+40	29.85±2.99 ¹⁾	131.31±6.39 ¹⁾	0.067±0.004 ¹⁾	0.67±0.02	1.11±0.26
	40+40	39.80±4.23 ¹⁾	178.93±10.12 ¹⁾	0.076±0.002 ¹⁾	0.70±0.02	0.90±0.03

3.4 不同浓度补骨脂定配伍刺甘草查尔酮、MCC950对上清pro-IL-1β、Caspase-1蛋白表达及IL-1β、TNF-α释放的影响 与空白组比较,单独给予补骨脂定组增加上清Caspase-1 p20蛋白,显著增加IL-1β与TNF-α的释放($P<0.01$);与单独给予补骨脂定 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较,MCC950 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 与刺甘草查尔酮均可完全抑制补骨脂定 $10、20、40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 诱导的Caspase-1活化,抑制补骨脂定 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 诱导的Caspase-1活化,显著抑制IL-1β、TNF-α释放($P<0.01$)。各组间pro-IL-1β、Caspase-1

p45蛋白差异无统计学意义。见表4、图3。

3.5 补骨脂定配伍刺甘草查尔酮对ASC寡聚的影响 与空白组比较,单独给予补骨脂定 $20、40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组可显著诱导ASC寡聚($P<0.01$);与单独给予补骨脂定 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较,配伍刺甘草查尔酮可显著抑制补骨脂定诱导的ASC寡聚化($P<0.01$)。见图4、表5。

4 讨论

近年来,中药导致的不良反应被频繁报道,尤其是肝损伤,中药安全性问题已引起了社会广泛的

表3 补骨脂定配伍不同浓度的刺甘草查尔酮对IL-1 β 、TNF- α 释放及pro-IL-1 β 、Caspase-1蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of psoralidin combine with different concentrations of echinatin on release of IL-1 β , TNF- α and pro-IL-1 β , Caspase-1 protein expression ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	IL-1 β / $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	TNF- α / $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	Caspase-1 p20 /LaminB	pro-IL-1 β /LaminB	Caspase-1 p45 /LaminB
空白组		6.58 \pm 1.11	24.29 \pm 2.24	0.025 \pm 0.003	1.25 \pm 0.14	0.96 \pm 0.14
补骨脂定组	40	203.24 \pm 2.08 ³⁾	290.45 \pm 9.71 ³⁾	0.790 \pm 0.031 ³⁾	1.28 \pm 0.06	1.00 \pm 0.05
刺甘草查尔酮组	10	7.39 \pm 1.79 ¹⁾	24.28 \pm 1.68	0.035 \pm 0.005 ¹⁾	1.38 \pm 0.10	1.01 \pm 0.06
	40	10.70 \pm 1.55 ¹⁾	24.73 \pm 1.36	0.029 \pm 0.003 ¹⁾	1.29 \pm 0.05	1.01 \pm 0.04
	80	14.04 \pm 1.60 ¹⁾	27.72 \pm 3.15	0.033 \pm 0.004 ¹⁾	1.24 \pm 0.12	1.11 \pm 0.07
补骨脂定-刺甘草查尔酮组	40+10	200.64 \pm 2.80 ¹⁾	270.31 \pm 12.12	0.720 \pm 0.042	1.14 \pm 0.01	1.04 \pm 0.06
	40+40	70.27 \pm 1.56 ¹⁾	112.20 \pm 8.99 ¹⁾	0.210 \pm 0.046 ¹⁾	1.26 \pm 0.28	1.06 \pm 0.19
	40+80	22.37 \pm 0.97 ¹⁾	36.06 \pm 2.53 ¹⁾	0.027 \pm 0.003 ¹⁾	1.26 \pm 0.16	0.93 \pm 0.11

表4 补骨脂定配伍刺甘草查尔酮/MCC950对IL-1 β 、TNF- α 释放及pro-IL-1 β 、Caspase-1蛋白的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

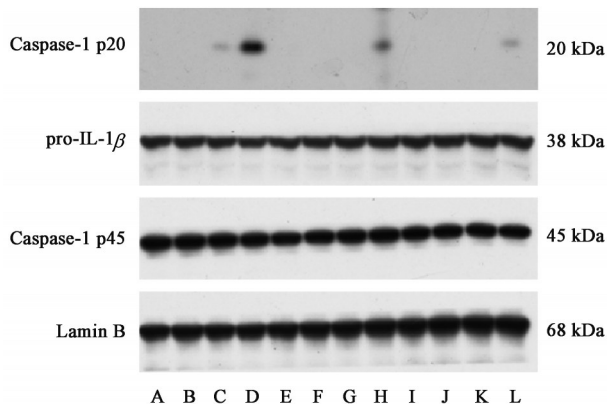
Table 4 Effect of psoralidin combine with different concentrations of echinatin or MCC950 on release of IL-1 β , TNF- α and pro-IL-1 β , Caspase-1 protein expression ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	IL-1 β / $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	TNF- α / $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	Caspase-1 p20 /LaminB	pro-IL-1 β /LaminB	Caspase-1 p45 /LaminB
空白组		10.14 \pm 1.91	24.29 \pm 2.24	0.074 \pm 0.00082	0.98 \pm 0.076	1.02 \pm 0.023
补骨脂定组	10	32.48 \pm 1.80 ⁴⁾	59.53 \pm 6.75 ⁴⁾	0.016 \pm 0.0076	0.99 \pm 0.093	1.09 \pm 0.040
	20	119.56 \pm 3.34 ³⁾	317.91 \pm 8.32 ³⁾	0.097 \pm 0.015 ⁴⁾	1.05 \pm 0.11	1.16 \pm 0.12
	40	225.43 \pm 8.39 ³⁾	651.75 \pm 22.61 ³⁾	1.05 \pm 0.095 ³⁾	1.04 \pm 0.087	1.12 \pm 0.11
MCC950组	5	19.06 \pm 0.80 ¹⁾	24.73 \pm 1.36 ¹⁾	0.031 \pm 0.0032 ¹⁾	1.12 \pm 0.094	1.11 \pm 0.064
补骨脂定-MCC950组	10+5	26.71 \pm 1.51 ¹⁾	59.99 \pm 3.03 ¹⁾	0.029 \pm 0.0089 ¹⁾	1.17 \pm 0.049	1.06 \pm 0.056
	20+5	70.63 \pm 1.69 ¹⁾	170.35 \pm 17.02 ¹⁾	0.035 \pm 0.050 ¹⁾	1.14 \pm 0.072	1.06 \pm 0.031
	40+5	132.45 \pm 4.28 ¹⁾	314.08 \pm 14.35 ¹⁾	0.49 \pm 0.027 ²⁾	1.18 \pm 0.093	1.07 \pm 0.073
刺甘草查尔酮组	40	13.92 \pm 1.73 ¹⁾	23.10 \pm 2.53 ¹⁾	0.020 \pm 0.0064 ¹⁾	1.18 \pm 0.15	1.03 \pm 0.078
补骨脂定-刺甘草查尔酮组	10+40	16.48 \pm 3.67 ¹⁾	24.74 \pm 2.69 ¹⁾	0.021 \pm 0.0062 ¹⁾	1.23 \pm 0.18	1.01 \pm 0.13
	20+40	22.97 \pm 1.52 ¹⁾	90.01 \pm 6.47 ¹⁾	0.031 \pm 0.0090 ¹⁾	1.24 \pm 0.15	1.04 \pm 0.18
	40+40	78.07 \pm 6.15 ¹⁾	125.37 \pm 8.75 ¹⁾	0.14 \pm 0.0121 ¹⁾	1.31 \pm 0.25	1.01 \pm 0.18

关注。课题组前期对淫羊藿^[21,23]、补骨脂^[15]、白鲜皮^[25]等多种中药的安全性进行了研究,构建了LPS诱导的细胞模型及动物模型,发现了几种中药导致肝损伤的机制可能是通过诱导炎症小体的过度激活,调动机体免疫反应,释放大量促炎因子,招募中性粒细胞聚集,放大炎症反应而造成肝脏细胞、组织损伤。同时,课题组还开展了甘草、丹参等多种抗炎中药的研究^[22,26],其中甘草有“国老”之称,广泛应用于临床以达到配伍解毒、调和诸药的作用。课题组前期发现甘草中的许多成分,如刺甘草查尔酮、甘草查尔酮B等^[18-19],可抑制多种DAMPs(ATP、尼日利亚菌素等)诱导的炎症小体激活,并在炎症小体介导的疾病小鼠模型(败血症模型、非酒精性脂肪肝)中起到保护作用^[27]。补骨脂与甘草的配伍使用常见于临床,同时课题组前期研究发现补骨脂

定过度激活炎症小体可能是补骨脂诱导肝损伤的主要原因,而刺甘草查尔酮是甘草中的主要活性成分可显著抑制炎症小体激活,因此,刺甘草查尔酮或许可以通过抑制炎症小体激活缓解补骨脂所致的肝损伤。

炎症小体是一类多聚蛋白复合物,可调控机体免疫,清除病原体和损伤细胞^[28]。炎症小体的活化一般包含两步,首先需要LPS,诱导促进炎症小体组成蛋白NLRP3与ASC表达、识别DAMPs和PAMPs,诱导ASC寡聚成为多聚体,活化pro-Caspase-1,产生成熟的Caspase-1、分泌IL-1 β 和IL-18分泌,诱导免疫炎症反应。本研究结果表明,刺甘草查尔酮可显著抑制补骨脂定诱导的Caspase-1成熟,IL-1 β 、TNF- α 释放^[29]。此外,ASC寡聚化在炎症小体的激活过程中发挥重要作用,ASC寡聚后可



注: A. 空白组; B. 补骨脂定 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; C. 补骨脂定 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; D. 补骨脂定 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; E. MCC950 组; F. 补骨脂定 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ -MCC950 组; G. 补骨脂定 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ -MCC950 组; H. 补骨脂定 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ -MCC950 组; I. 刺甘草查尔酮组; J. 补骨脂定 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ -刺甘草查尔酮组; K. 补骨脂定 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ -刺甘草查尔酮组; L. 补骨脂定 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ -刺甘草查尔酮组

图3 各组BMDM上清Caspase-1 p20的蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of Caspase-1 p20 protein expression in each group of BMDM supernatant

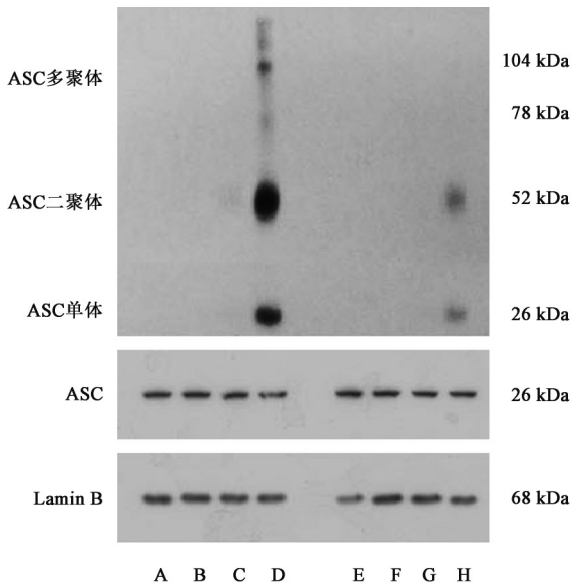


图4 各组ASC寡聚蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of ASC oligomeric protein expression in each group

与未成熟的 Caspase-1 结合, 将没有活性的 Caspase-1 剪切成熟为活化的 Caspase-1 从而促进炎症因子的释放, 激活炎症反应^[30-31]。本实验结果表明, 刺甘草查尔酮可显著抑制补骨脂定诱导 ASC 寡聚化从而抑制炎症小体激活。

中药配伍是中医遣方用药的特色优势, 本论文从中药配伍调控的角度出发, 以抑制炎症过度激活为目标, 将补骨脂定与甘草中的主要药效成分刺甘草查尔酮配伍联用, 于小鼠原代骨髓巨噬细胞中,

表5 补骨脂定配伍刺甘草查尔酮对ASC寡聚灰度值的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 5 Effect of psoralidin with echinatin on gray value of ASC oligomerization ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	ASC寡聚/Lamin B
空白组		0.013 \pm 0.006
补骨脂定组	10	0.018 \pm 0.007
	20	0.035 \pm 0.011
	40	1.090 \pm 0.130
刺甘草查尔酮	40	0.031 \pm 0.020 ¹⁾
补骨脂定-刺甘草查尔酮组	10+40	0.028 \pm 0.008 ¹⁾
	20+40	0.036 \pm 0.009 ¹⁾
	40+40	0.250 \pm 0.049 ¹⁾

确定了刺甘草查尔酮对补骨脂定诱导的炎症小体激活的抑制作用, 且比 MCC950 更有效的抑制效果, 为临床合理用药提供了实验基础。然而, 本研究尚未在炎症小体相关动物模型评价补骨脂定与刺甘草查尔酮配伍减毒的作用, 同时尚未从生物利用度、转化度、代谢等方面对两者配伍在机体的调控效果, 仍有待进一步的探讨。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] LAMKANFI M, DIXIT V M. Mechanisms and functions of inflammasomes[J]. Cell, 2014, 157(5): 1013-1022.

[2] LISTON A, MASTERS S L. Homeostasis-altering molecular processes as mechanisms of inflammasome activation[J]. Nat Rev Immunol, 2017, 17(3): 208-214.

[3] RATHINAM V A, FITZGERALD K A. Inflammasome complexes: Emerging mechanisms and effector functions[J]. Cell, 2016, 165(4): 792-800.

[4] MAN S M, KANNEGANTI T D. Regulation of inflammasome activation[J]. Immunol Rev, 2015, 265(1): 6-21.

[5] SHEN C, LI R, NEGRO R, et al. Phase separation drives RNA virus-induced activation of the NLRP6 inflammasome[J]. Cell, 2021, 184(23): 5759-5774.

[6] SCHNAPPAUF O, CHAE J J, KASTNER D L, et al. The pyrin inflammasome in health and disease[J]. Front Immunol, 2019, 10: 1745.

[7] TAKAHASHI M. NLRP3 inflammasome as a key driver of vascular disease[J]. Cardiovasc Res, 2022, 118(2): 372-385.

[8] 郭新华, 郑洋, 王佳慧, 等. 基于 miRNA 介导的

- NLRP3 炎症小体活化探讨中医药在肝纤维化发生中作用的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(9): 2409-2418.
- [9] DE CARVALHO RIBEIRO M, SZABO G. Role of the inflammasome in liver disease [J]. *Annu Rev Pathol*, 2022, 17: 345-365.
- [10] CHOUBEY D. Type I interferon (IFN) -inducible Absent in Melanoma 2 proteins in neuroinflammation; Implications for Alzheimer's disease [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 236.
- [11] BAI H, ZHANG Q. Activation of NLRP3 inflammasome and onset of Alzheimer's disease [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 701282.
- [12] 张亚中, 刘军玲, 程世云, 等. 补骨脂药材的质量变化规律和标准探讨[J]. 中国现代中药, 2022, 24(2): 294-297.
- [13] GE F L, NIU M, HAN Z X, et al. Landscape of hepatobiliary adverse drug reactions related to preparations containing psoraleae fructus and its application in pharmacovigilance [J]. *Chin J Integr Med*, 2021, 27(11): 832-837.
- [14] GAO Y, WANG Z, TANG J, et al. New incompatible pair of TCM: Epimedii Folium combined with Psoraleae Fructus induces idiosyncratic hepatotoxicity under immunological stress conditions [J]. *Front Med*, 2020, 14(1): 68-80.
- [15] QIN N, XU G, WANG Y, et al. Bavachin enhances NLRP3 inflammasome activation induced by ATP or nigericin and causes idiosyncratic hepatotoxicity [J]. *Front Med*, 2021, 15(4): 594-607.
- [16] WANG Y, XU G, WANG Z, et al. Psoralidin, a major component of Psoraleae Fructus, induces inflammasome activation and idiosyncratic liver injury [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 92: 107352.
- [17] 王波, 王丽, 刘晓峰, 等. 中药甘草成分和药理作用及其现代临床应用的研究进展[J]. 中国医药, 2022, 17(2): 316-320.
- [18] LI Q, FENG H, WANG H, et al. Licochalcone B specifically inhibits the NLRP3 inflammasome by disrupting NEK7-NLRP3 interaction [J]. *EMBO Rep*, 2022, 23(2): e53499.
- [19] XU G, FU S, ZHAN X, et al. Echinatin effectively protects against NLRP3 inflammasome-driven diseases by targeting HSP90 [J]. *JCI Insight*, 2021, 6(2): 162.
- [20] HOU X, XU G, WANG Z, et al. Glaucocalyxin A alleviates LPS-mediated septic shock and inflammation via inhibiting NLRP3 inflammasome activation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 81: 106271.
- [21] GAO Y, XU G, MA L, et al. Icariside I specifically facilitates ATP or nigericin-induced NLRP3 inflammasome activation and causes idiosyncratic hepatotoxicity [J]. *Cell Commun Signal*, 2021, 19(1): 13.
- [22] SHI W, XU G, ZHAN X, et al. Carnosol inhibits inflammasome activation by directly targeting HSP90 to treat inflammasome-mediated diseases [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(4): 252.
- [23] WANG Z, XU G, WANG H, et al. Icariside II, a main compound in Epimedii Folium, induces idiosyncratic hepatotoxicity by enhancing NLRP3 inflammasome activation [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(9): 1619-1633.
- [24] WU D, CHEN Y, SUN Y, et al. Target of MCC950 in inhibition of NLRP3 inflammasome activation: A literature review [J]. *Inflammation*, 2020, 43(1): 17-23.
- [25] 石伟, 高源, 郭玉明, 等. 基于免疫刺激的白鲜皮致特异质肝损伤评价研究[J]. 药学学报, 2019, 54(4): 678-686.
- [26] LIU H, ZHAN X, XU G, et al. Cryptotanshinone specifically suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against inflammasome-mediated diseases [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 164: 105384.
- [27] ZAHID A, LI B, KOMBE A, et al. Pharmacological inhibitors of the NLRP3 inflammasome [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2538.
- [28] ZHAO Y, YANG J, SHI J, et al. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus [J]. *Nature*, 2011, 477(7366): 596-600.
- [29] MALIK A, KANNEGANTI T D. Inflammasome activation and assembly at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2017, 130(23): 3955-3963.
- [30] MATYSZEWSKI M, ZHENG W, LUECK J, et al. Distinct axial and lateral interactions within homologous filaments dictate the signaling specificity and order of the AIM2-ASC inflammasome [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2735.
- [31] MATYSZEWSKI M, ZHENG W, LUECK J, et al. Distinct axial and lateral interactions within homologous filaments dictate the signaling specificity and order of the AIM2-ASC inflammasome [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2735.
- [32] HUANG Y, XU W, ZHOU R. NLRP3 inflammasome activation and cell death [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(9): 2114-2127.

[责任编辑 周冰冰]