

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240361

· 论 著 ·

柯里拉京通过干扰糖酵解 /ROS/NLRP3 信号抑制尼日利亚菌素诱导的软骨细胞焦亡

张莹^{1,2}, 何乐冉^{1,2}, 何英芃^{1,2}, 易华², 潘浩^{1,2*}

1. 广州中医药大学基础医学院人体解剖学系, 广州 510006

2. 广州中医药大学基础医学院中西医结合基础研究中心, 广州 510006

[摘要] **目的** 探讨柯里拉京 (COR) 对脂多糖 (LPS) 联合尼日利亚菌素 (NIG) 诱导的 Nod 样受体家族含 pyrin 结构域蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体激活和软骨细胞焦亡的调控作用。**方法** 采用 C57BL/6J 小鼠的软骨细胞作为实验对象, 将原代软骨细胞培养至第 3 代用于实验, 实验分为对照组、LPS 组、LPS+NIG 组及 LPS+NIG+COR (低、中、高剂量) 组。首先用 LPS 预致敏软骨细胞 4 h, 然后分别用不同浓度 (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 的 COR 处理细胞 30 min, 最后加入 NIG (10 $\mu\text{mol/L}$) 刺激 1 h; 对照组细胞采用含 1% FBS 的 DMEM/F-12 培养基培养。采用 CCK-8 法检测不同浓度 (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 的 COR 对软骨细胞活性的影响, 采用 PI 和 Hoechst 33342 双染色和乳酸脱氢酶 (LDH) 细胞毒性检测试剂盒分析 COR 对 LPS 和 NIG 诱导的软骨细胞死亡的影响, 采用蛋白质印迹法分析细胞上清中 NLRP3 炎症小体激活标志物 caspase 1 p20 的表达水平及细胞裂解液中 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (ASC)、caspase 1、IL-1 β 前体和细胞焦亡执行蛋白消皮素 D (GSDMD) 的表达, 采用 ELISA 法检测细胞培养上清中 IL-1 β 的水平, 采用荧光探针 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (H₂DCFDA) 染色观察 COR 对活性氧 (ROS) 产生的影响, 采用蛋白质印迹法分析软骨细胞内糖酵解相关蛋白己糖激酶 2 (HK2)、葡萄糖转运蛋白 1 (GLUT1)、LDHA 的表达。**结果** 浓度 $\leq 40 \mu\text{mol/L}$ 的 COR 对软骨细胞的活性影响较小。10~40 $\mu\text{mol/L}$ COR 能够降低 LPS 和 NIG 刺激的 PI 阳性细胞比例 (均 $P < 0.05$) 和 LDH 的释放 (均 $P < 0.01$), 抑制软骨细胞内 GSDMD 蛋白氨基末端的表达, 减少软骨细胞 caspase 1 p20 和 IL-1 β 的释放 (均 $P < 0.01$)。40 $\mu\text{mol/L}$ COR 能够减少软骨细胞内 ROS 的产生 (与对照组比较 $P < 0.01$), 并抑制糖酵解相关蛋白 HK2、GLUT1、LDHA 的表达 (均 $P < 0.05$)。**结论** COR 通过抑制 NIG 诱导的糖酵解 /ROS/NLRP3 信号减少了 NLRP3 炎症小体激活和软骨细胞焦亡。

[关键词] 柯里拉京; 糖酵解; NLRP3 炎症小体; 软骨细胞; 焦亡

[引用本文] 张莹, 何乐冉, 何英芃, 等. 柯里拉京通过干扰糖酵解 /ROS/NLRP3 信号抑制尼日利亚菌素诱导的软骨细胞焦亡 [J]. 海军军医大学学报, 2025, 46 (7): 847-855. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240361.

Corilagin inhibits nigericin-induced chondrocyte pyroptosis by interfering glycolysis/ROS/NLRP3 signaling

ZHANG Ying^{1,2}, HE Leran^{1,2}, HE Yingpeng^{1,2}, YI Hua², PAN Hao^{1,2*}

1. Department of Human Anatomy, School of Basic Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong, China

2. Basic Research Center of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, School of Basic Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong, China

[Abstract] **Objective** To explore the regulatory effect of corilagin (COR) on Nod-like receptor family pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) inflammasome activation and chondrocyte pyroptosis induced by lipopolysaccharide (LPS) combined with nigericin (NIG). **Methods** Primary chondrocytes isolated from C57BL/6J mice were cultured to passage 3 for experiments. Cells were divided into control group, LPS group, LPS+NIG group, and LPS+NIG+COR (low-, medium-, and high-dose) groups. The chondrocytes were pre-sensitized with LPS for 4 h. Then the cells

[收稿日期] 2024-05-24 **[接受日期]** 2024-10-30

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金 (82004026), 广东省中医药局科研项目 (20221124). Supported by Youth Project of National Natural Science Foundation of China (82004026) and Scientific Research Program of Administration of Traditional Chinese Medicine of Guangdong Province (20221124).

[作者简介] 张莹, 硕士生. E-mail: 1442534088@qq.com

* 通信作者 (Corresponding author). E-mail: hao.pan25@foxmail.com

were treated with COR at different concentrations (10, 20, and 40 $\mu\text{mol/L}$) for 30 min, and finally NIG (10 $\mu\text{mol/L}$) was supplemented for 1 h. Control cells were cultured in DMEM/F-12 medium supplemented with 1% FBS. Cell counting kit 8 (CCK-8) was used to detect the effect of COR at different concentrations (10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$) on chondrocyte viability. Propidium iodide (PI) and Hoechst 33342 staining and lactate dehydrogenase (LDH) release assay were used to analyze the effect of COR on chondrocyte death induced by LPS and NIG. Western blotting was used to detect the expression of the NLRP3 inflammasome activation marker cysteine aspartic acid specific protease 1 (caspase 1) p20 in the cell supernatant and NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein (ASC), caspase 1, interleukin-1 β precursor (pro-IL-1 β), and pyroptosis execution protein gasdermin D (GSDMD) in the cell lysate. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the level of IL-1 β in cell culture supernatant. Reactive oxygen species (ROS) fluorescent probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA) staining was used to observe the effect of COR on ROS production, and Western blotting was used to detect the expression of intracellular glycolysis-related proteins hexokinase 2 (HK2), glucose transporter 1 (GLUT1), and lactate dehydrogenase A (LDHA). **Results** COR exhibited slight effect on chondrocyte viability at the concentration $\leq 40 \mu\text{mol/L}$. COR (10-40 $\mu\text{mol/L}$) reduced the proportion of PI-positive cells (all $P < 0.05$) and the release of LDH (all $P < 0.01$) stimulated by LPS and NIG, inhibited the expression of GSDMD N-terminus domain in chondrocytes, and reduced the release of caspase 1 p20 and IL-1 β from chondrocytes (all $P < 0.01$). Furthermore, COR (40 $\mu\text{mol/L}$) reduced the production of ROS (compared with the control group, $P < 0.01$) and inhibited the expression of glycolysis-related proteins HK2, GLUT1, and LDHA (all $P < 0.05$). **Conclusion** COR can inhibit NIG-induced glycolysis/ROS/NLRP3 signaling, thereby preventing NLRP3 inflammasome activation and chondrocyte pyroptosis.

[**Key words**] corilagin; glycolysis; NLRP3 inflammasome; chondrocytes; pyroptosis

[**Citation**] ZHANG Y, HE L, HE Y, et al. Corilagin inhibits nigericin-induced chondrocyte pyroptosis by interfering glycolysis/ROS/NLRP3 signaling[J]. Acad J Naval Med Univ, 2025, 46(7): 847-855. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R. 20240361.

关节炎影响着全球数亿人的生活质量, 关节感染和软骨损伤是关节炎的常见特征, 与 Nod 样受体家族含 pyrin 结构域蛋白 3 (Nod-like receptor family pyrin domain-containing protein 3, NLRP3) 炎症小体的激活密切相关^[1]。NLRP3 炎症小体的异常激活会导致软骨细胞焦亡 (一种程序性细胞死亡形式), 严重影响软骨的结构和功能^[1-2]。因此, 探寻能够调节这一过程的药物对治疗细菌性关节炎至关重要。NLRP3 是先天免疫的重要组成部分^[3], NLRP3 炎症小体是一种由受体蛋白 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein, ASC) 和 caspase 1 前体组成的胞质内多蛋白复合物。NLRP3 炎症小体的经典激活途径包括启动和激活 2 个步骤: 第 1 步为模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 识别病原相关分子模式或损伤相关分子模式, 也可通过炎症细胞因子等诱导 NF- κB 或其他转录因子的活化, 促进 NLRP3 和 IL-1 β 前体的表达; 第 2 步为传感器蛋白 NLRP3 发生寡聚化, 并招募 ASC 形成一个大分子焦点 (称为 ASC 斑点), 组装的 ASC 进一步募集 caspase 1 前体, 最终形成 NLRP3-ASC-caspase 1 复合物, 即 NLRP3 炎症小体。激活的 NLRP3 炎症小体能够引发 caspase 1 切割, 产生

有活性的 caspase 1 p10 和 p20 2 种亚基, 后者可以切割消皮素 D (gasdermin D, GSDMD) 获得其氨基末端结构域 (gasdermin D-N-terminal domain, GSDMD-NT)。GSDMD-NT 与细胞膜结合形成孔隙, 介导 IL-1 β 等炎症因子的释放, 并诱导炎症细胞焦亡^[4]。NLRP3 炎症小体的激活不仅发生于巨噬细胞, 在软骨细胞内也能检测到^[5]。已有研究证实 NLRP3 炎症小体的异常激活会导致过度的炎症反应, 进而加剧痛风、骨关节炎和关节细菌感染等疾病的发生、发展^[6]。

糖酵解是一种细胞内的糖代谢过程, 在调控细胞免疫应答和炎症过程中发挥重要作用。细胞外葡萄糖通过葡萄糖转运蛋白 1 (glucose transporter 1, GLUT1) 被转运到细胞内^[7-8]。己糖激酶 (hexokinase, HK)、磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶是参与调控糖酵解过程的 3 个限速酶。乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) A 促进丙酮酸转化为乳酸。此外, 糖酵解的代谢酶 HK 能够调控 NLRP3 炎症小体的激活^[9]。GLUT1 可促进 NLRP3 炎症小体的激活, 而敲除 *GLUT1* 则能抑制糖酵解, 进而阻止单钠尿酸盐 (monosodium urate, MSU) 晶体诱导的 ASC 寡聚化和 IL-1 β 分泌^[10], 说明干预糖酵解过程可作为关节感染疾病的治疗策略。

柯里拉京 (corilagin, COR) 是一种天然多酚单宁酸类化合物, 分子式为 $C_{27}H_{22}O_{18}$, 分子量为 634.46, 易溶于乙醇、甲醇、丙酮、DMSO 等有机溶剂。COR 属于逆没食子酸鞣质, 是老鹳草和叶下珠等植物的主要活性成分, 具有抗炎、抗氧化和抗菌等生物活性^[11]。Li 等^[12]发现, 在脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) / 尼日利亚菌素 (nigericin, NIG) 刺激的小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 和小鼠肺上皮细胞 MLE-12 及 NIG 刺激的大鼠小肠隐窝上皮细胞 IEC6 中, COR 通过抑制 NLRP3 炎症小体激活和细胞焦亡减轻小鼠肠道缺血再灌注诱导的肠肺损伤。本课题组前期研究发现, COR 能抑制 MSU 晶体诱导的 NLRP3 炎症小体激活和巨噬细胞焦亡, 减少炎症因子 IL-1 β 的分泌, 从而缓解 MSU 晶体诱导的关节炎^[13]。COR 对软骨细胞内 NLRP3 炎症小体激活及软骨细胞焦亡的调控作用尚未见详细报道。

本实验采用 LPS 联合 NIG 刺激软骨细胞诱导 NLRP3 炎症小体激活和细胞焦亡, 并通过 COR 干预, 分析 COR 对 NLRP3 炎症小体、糖酵解相关蛋白及活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平的影响, 考察其是否通过糖酵解 / ROS / NLRP3 信号发挥保护作用, 为应用 COR 治疗 NLRP3 相关的炎症疾病提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 试剂及抗体 COR (货号: B20672) 购自上海源叶生物科技有限公司; II 型胶原酶 (货号: BS164) 购自北京兰杰柯科技有限公司; PI (货号: P4170)、Hoechst 33342 (货号: B2261) 和 FBS (货号: S8318) 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; DMEM/F-12 培养基 (货号: C11330500BT)、链霉素-青霉素双抗 (货号: 15140122) 均购自美国 ThermoFisher 公司; CCK-8 试剂 (货号: C005) 购自上海陶素生化科技有限公司; LDH 细胞毒性检测试剂盒 (货号: C0017)、RIPA 裂解液 (强) (货号: P0013B) 均购自上海碧云天生物技术有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (货号: FD2001)、一步法凝胶制备试剂盒 (货号: FD341) 均购自杭州弗德生物技术有限公司; 超敏化学发光试剂 (货号: P0100) 购自苏州新赛美生物科技有限公司; 小鼠 IL-1 β ELISA 检测试剂盒 (货号: EMCOO1b) 购自深圳欣博盛生物科技有限公司; Alexa-Fluor 555 山羊抗鼠 IgG 抗体 (货号: 4409)、NLRP3 抗体 (货号: 15101)、ASC 抗体 (货号: 67824) 和 GAPDH

抗体 (货号: 2118S) 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; caspase 1 p20 抗体 (货号: AG-20B 0042) 购自瑞士 AdipoGen 公司; caspase 1 抗体 (货号: NB100-56565) 购自美国 Novus Biologicals 公司; HK2 抗体 (货号: 66974-1-1g)、LDHA 抗体 (货号: 66287-1-1g) 均购自武汉三鹰生物技术有限公司; GLUT1 抗体 (货号: HA601071) 购自杭州华安生物技术有限公司; GSDMD 抗体 (货号: ab209845)、 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (货号: ab8227) 购自英国 Abcam 公司。

1.2 软骨组织的取材及处理 将 8~10 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 [购自广州中医药大学实验动物中心, 生产许可证号: SCXK (粤) 2018-0085] 颈椎脱臼处死, 用 75% 乙醇浸泡 5 min, 在无菌超净台内用手术刀将四肢皮肤切开, 用剪刀剪下双侧的股骨和胫骨, 剔除周围的肌肉、韧带和关节囊等软组织, 剥离出股骨的两端 (股骨头和股骨髁) 及胫骨面的软骨组织。用 PBS 清洗软骨组织 2 次, 洗去附着在软骨表面的血液及滑膜组织, 然后用眼科手术剪将其剪切成约 1 mm³ 的组织块。

1.3 软骨细胞的培养与鉴定 将大小适宜的软骨组织块转移至 6 cm 培养皿中, 加入 4 mL 含 0.1% II 型胶原酶的 DMEM/F-12 培养基, 然后置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内消化 4 h, 其间每隔 1 h 取出用十字法摇晃混匀, 使 II 型胶原酶与软骨组织充分接触。消化结束后用 70 μ m 细胞过滤器去除杂质, 收集细胞悬液, 200 $\times$ g 离心 5 min。将原代软骨细胞重悬于含 10% FBS 和 1% 链霉素-青霉素双抗的 DMEM/F-12 完全培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 每 48 h 更换 1 次培养基。培养 7 d, 待细胞融合率达 90% 时, 按照 1 : 3 比例进行传代。显微镜下观察软骨细胞的生长情况, 取第 3 代细胞用于实验。取第 1 代细胞进行阿利新蓝染色及 II 型胶原免疫荧光染色鉴定。

1.4 分组及给药 实验分为 6 组: 对照组、LPS 组、LPS+NIG 组及 LPS+NIG+COR (低、中、高剂量) 组。用 LPS 预致敏软骨细胞 4 h, 然后分别用不同浓度 (10、20、40 μ mol/L) 的 COR 处理细胞 30 min, 最后加入 NIG (10 μ mol/L) 刺激 1 h, 对照组细胞仅使用含 1% FBS 的 DMEM/F-12 培养基于 CO₂ 培养箱中培养。

1.5 CCK-8 法检测细胞活性 将原代软骨细胞悬液浓度调整为 1×10^5 /mL, 每孔接种 100 μ L 于 96 板, 置于培养箱贴壁过夜。使用不同浓度 (0、10、20、40、80、160 μ mol/L) 的 COR 处理软骨

细胞 24 h, 之后每孔加入 10 μ L CCK-8 工作液, 充分混匀, 操作过程中注意避免产生气泡, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h, 使用酶标仪在 450 nm 波长处测光密度 (D) 值。细胞存活率 (%) = $[(\text{实验组 } D \text{ 值} - \text{空白组 } D \text{ 值}) / (\text{对照组 } D \text{ 值} - \text{空白组 } D \text{ 值})] \times 100\%$ 。

1.6 PI 和 Hoechst 33342 双染色检测细胞死亡情况 各组细胞中加入 PI (2 μ g/mL) 和 Hoechst 33342 (5 μ g/mL), 在室温下避光染色 10 min, 然后立即用 Bio-Rad ZOETM 荧光细胞成像系统随机拍摄多个视野照片, 计算 PI 阳性细胞百分比。

1.7 LDH 细胞毒性检测试剂盒检测细胞毒性 收集上述细胞的培养上清, 400 $\times$ g 离心 5 min, 取 120 μ L 上清和 60 μ L 配制好的 LDH 工作液加入 96 孔板, 置于水平摇床上避光孵育 30 min, 使用酶标仪测量 490 nm 波长处的 D 值, 按照说明书计算 LDH 释放量。

1.8 蛋白质印迹法检测蛋白表达 取 2 mL 软骨细胞悬液以每孔 2×10^5 /mL 密度接种于 6 孔板, 在培养箱中贴壁过夜, 刺激和加药方法同 1.4 节。刺激完成后收集细胞上清, 取 800 μ L 细胞培养上清, 加入与上清等体积的甲醇和 1/4 氯仿振荡混匀, 用高速冰冻离心机 4 $^{\circ}$ C、16 000 $\times$ g 离心 11 min, 结束后弃上清, 加入等体积甲醇进行二次离心, 弃上清, 将沉淀置于 55 $^{\circ}$ C 金属浴中加热 6 min 使蛋白完全干燥, 在每个样品中加入 35 μ L 配制好的 2 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液, 剧烈振荡使其充分溶解。此外, 每孔加入 120 μ L 细胞裂解液在冰上裂解 30 min 后, 用刮刀轻轻刮下蛋白, 收集细胞裂解液。用高速冰冻离心机 16 000 $\times$ g 离心 15 min, 吸取上清。使用 BCA 蛋白试剂盒测定总蛋白浓度, 计算上样体积。将上清浓缩蛋白或细胞裂解液分别与上样缓冲液混匀后在沸水中煮 6 min 使蛋白变性。随后对蛋白样品进行 SDS-PAGE, 然后将细胞蛋白样品转至 PVDF 膜 (90 min), 用 5% 牛奶封闭膜 60 min, 按照说明书比例配制 NLRP3、全长 GSDMD、GSDMD-NT、caspase 1、ASC、IL-1 β 前体、caspase 1 p20、GLUT1、LDHA、HK2、 β -actin 和 GAPDH 抗体等一抗稀释液, 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜。次日回收一抗, 用 TBST 洗 PVDF 膜 3 次, 每次 5 min。室温水平摇床孵育二抗 1 h, TBST 洗膜 4 次, 每次 8 min, 最后用上海天能全自动化学发光图像分析仪 (型号: Tanon 5200) 拍照并保存显影结果。

1.9 ELISA 法检测 IL-1 β 水平 收集上述细胞的培养上清, 400 $\times$ g 离心 5 min, 取 100 μ L 上清或标准品加入到试剂盒的预包被酶标板条内, 37 $^{\circ}$ C 孵育

90 min, 洗板 5 次后, 离心 30 s。加入 100 μ L 提前配制好的 1 $\times$ 生物素化抗体工作液, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60 min, 洗板 5 次后, 离心 30 s; 加入 100 μ L 提前配制好的 1 $\times$ 酶结合物工作液, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 洗板 5 次后, 离心 30 s; 每孔加入 100 μ L 显色底物, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min; 最后向每孔加入 100 μ L 反应终止液, 混匀后用酶标仪在 450 nm 波长处测 D 值; 绘制标准曲线后计算 IL-1 β 水平。

1.10 免疫荧光分析 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, H₂DCFDA) 标记的 ROS 在细胞培养板内放置玻璃爬片, 取 0.5 mL 软骨细胞以每孔 2×10^5 /mL 密度接种于 24 孔板, 按照 1.4 节的分组处理细胞。每孔加入 10 μ mol/L H₂DCFDA 染色 30 min, 之后加入 4% 多聚甲醛溶液室温固定 15 min, 用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 然后用 Hoechst 33342 室温避光孵育细胞 10 min, PBS 洗 3 次, 最后滴加抗荧光衰减封片剂, 盖上盖玻片并用指甲油封片, 使用德国 Zeiss 公司的激光共聚焦显微镜 (型号: LSM 800 with Airyscan) 观察并拍照。

1.11 统计学处理 应用 GraphPad Prism 9.4 软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 小鼠关节原代软骨细胞的形态学特征及鉴定 在显微镜下观察到小鼠的关节软骨细胞呈圆形, 悬浮于培养基中, 大小均一, 具有强折光性。软骨细胞在 12 h 内逐渐贴壁, 48 h 内大部分细胞贴壁且呈三角形、多角形散在贴附在皿底; 48 h 后换液, 细胞增殖速度明显加快, 且细胞彼此间伸出伪足样突起相互连接; 第 5 天出现复层生长的趋势; 第 7 天细胞达到 90% 融合率, 胞体丰满, 胞质均匀, 核大而圆, 细胞紧密排列, 呈“铺路石”状外观, 此时的软骨细胞为第 1 代。见图 1A。随着传代次数的增加, 3 代以后细胞逐渐分化为成纤维细胞, 两端伸出数量不等的伪足, 细胞形态不规则, 生长速度下降。故本实验选用第 3 代细胞用于相关机制研究。

阿利新蓝染色结果显示, 碱性染料能与大部分软骨细胞中的酸性黏多糖结合呈蓝绿色 (图 1B)。细胞免疫荧光染色结果显示, 软骨标志物 II 型胶原蛋白表达阳性 (图 1C)。以上结果表明分离培养的细胞为软骨细胞。

2.2 COR 能够减少 NIG 刺激的软骨细胞死亡 CCK-8

法检测结果显示, 浓度 $\leq 40 \mu\text{mol/L}$ 的COR对细胞的活性影响较小(图2A), 因此选择10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的COR用于体外实验。用PI和Hoechst 33342双染色检测COR对细胞死亡的影响, 结果(图2B、图2C)显示NIG能够刺激软骨细胞死亡,

10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ COR均能降低PI阳性细胞百分比(均 $P<0.05$)。此外10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ COR能减少软骨细胞培养上清中LDH的释放量(均 $P<0.01$ 、图2D)。以上结果表明COR能够减少NIG刺激的软骨细胞死亡。

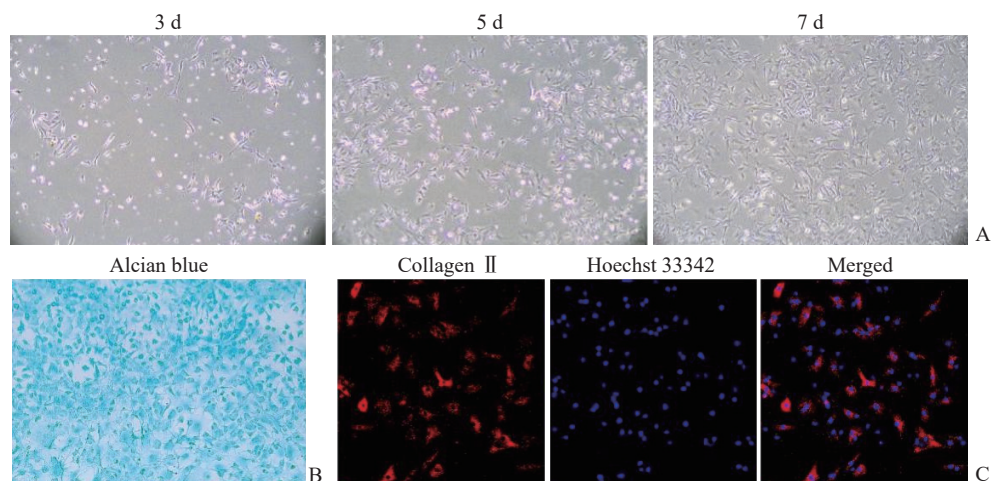


图1 小鼠关节软骨细胞的形态观察及软骨标志物鉴定 (100 $\times$)

Fig 1 Morphological observation of mouse articular chondrocytes and identification of cartilage marker (100 $\times$)

A: Cell morphology maps of chondrocytes on day 3, 5 and 7 *in vitro* culture; B: Alcian blue stained chondrocyte matrix; C: Immunofluorescence staining of collagen II.

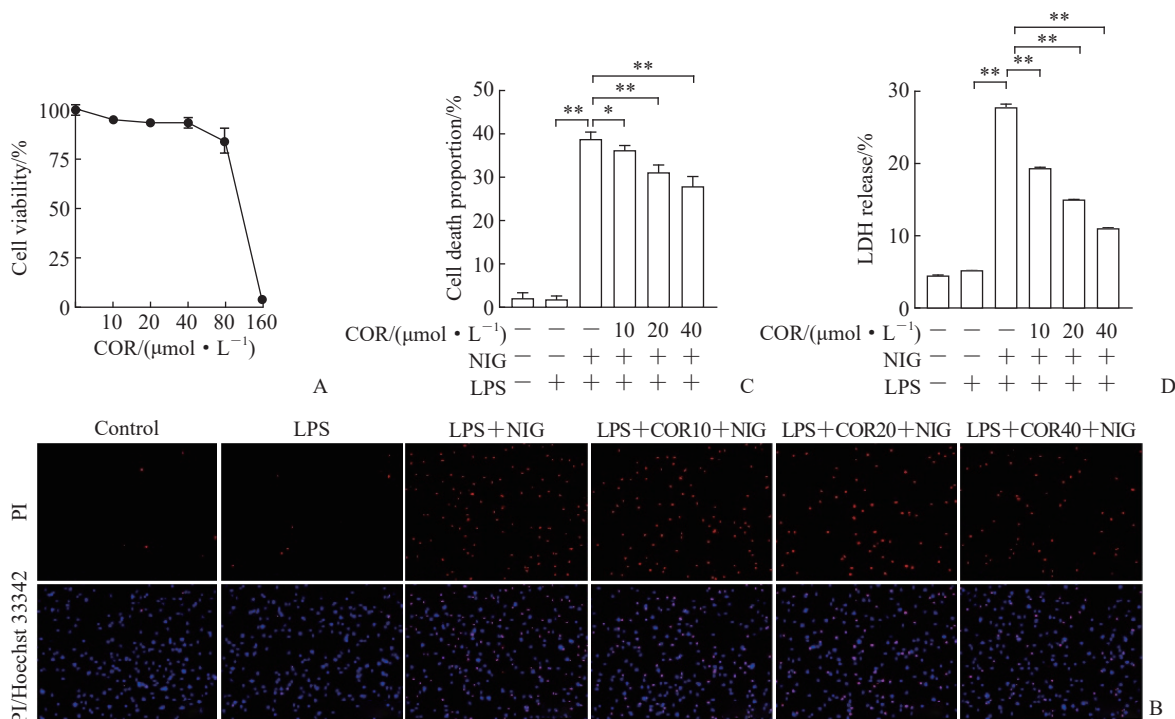


图2 COR减少NIG刺激的软骨细胞死亡

Fig 2 COR reduces NIG-stimulated chondrocyte death

A: Cell viability was detected by CCK-8 ($n=3, \bar{x} \pm s$); B: Cell nuclei stained with PI and Hoechst 33342 (100 $\times$); C: The percentage of PI-positive cells (death cells) relative to total cells ($*P<0.05, **P<0.01, n=5, \bar{x} \pm s$); D: Cell culture supernatant was taken to detect the release rate of LDH ($**P<0.01, n=3, \bar{x} \pm s$). COR: Corilagin; NIG: Nigericin; LPS: Lipopolysaccharide; COR10: 10 $\mu\text{mol/L}$ COR; COR20: 20 $\mu\text{mol/L}$ COR; COR40: 40 $\mu\text{mol/L}$ COR; LDH: Lactate dehydrogenase; CCK-8: Cell counting kit 8; PI: Propidium iodide.

2.3 COR能够抑制NIG刺激的NLRP3炎症小体激活和软骨细胞焦亡 采用ELISA试剂盒检测细胞培养上清,结果显示与LPS+NIG组比较,10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ COR能降低细胞上清中IL-1 β 的水平(均 $P<0.01$,图3A)。

此外,用蛋白质印迹法检测细胞培养上清浓缩液中NLRP3炎症小体激活标志物caspase 1 p20

以及细胞裂解液中NLRP3炎症小体组分蛋白和细胞焦亡执行蛋白GSDMD的表达,结果显示10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ COR能抑制LPS+NIG处理的软骨细胞上清中caspase 1 p20的表达及细胞裂解液中GSDMD-NT、NLRP3的表达(图3B、3C)。以上结果表明COR能抑制NIG刺激的NLRP3炎症小体激活和软骨细胞焦亡。

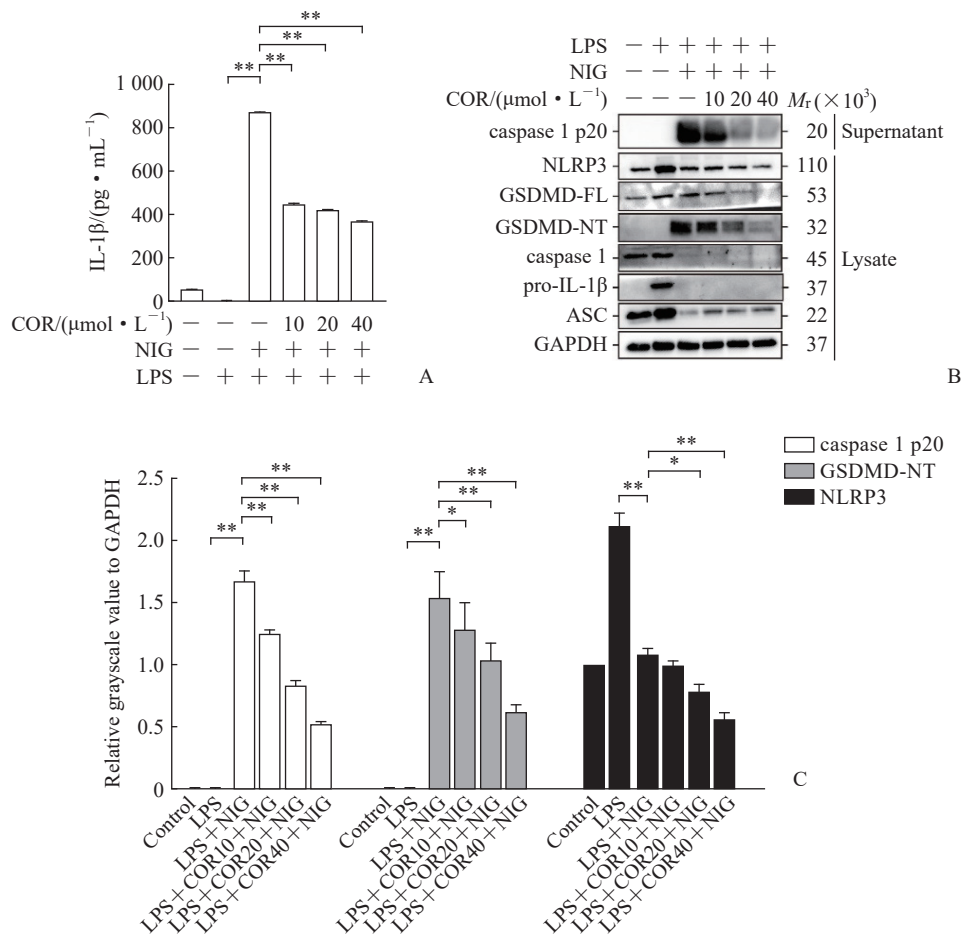


图3 COR抑制NIG刺激的NLRP3炎症小体激活和软骨细胞焦亡

Fig 3 COR inhibits NIG-stimulated NLRP3 inflammasome activation and chondrocyte pyroptosis

A: The level of IL-1 β in the supernatant of cell culture was detected by ELISA (** $P<0.01$, $n=3$, $\bar{x}\pm s$); B: Western blotting of the expression of related proteins in cell supernatant and cell lysate; C: Histogram of grayscale analysis of blot bands (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, $n=3$, $\bar{x}\pm s$). COR: Corilagin; NIG: Nigericin; NLRP3: Nod-like receptor family pyrin domain-containing protein 3; IL-1 β : Interleukin 1 β ; LPS: Lipopolysaccharide; caspase 1: Cysteine aspartic acid specific protease 1; GSDMD-FL: Gasdermin D-full-length protein; GSDMD-NT: Gasdermin D-N-terminal domain; pro-IL-1 β : IL-1 β precursor; ASC: Apoptosis-associated speck-like protein; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; COR10: 10 $\mu\text{mol/L}$ COR; COR20: 20 $\mu\text{mol/L}$ COR; COR40: 40 $\mu\text{mol/L}$ COR; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay.

2.4 COR能够减少NIG刺激的软骨细胞ROS产生 采用荧光探针H₂DCFDA染色观察COR对ROS生成的影响,结果显示NIG可刺激LPS预致敏的软骨细胞产生ROS,而COR能减少NIG刺激

的软骨细胞内ROS生成(均 $P<0.01$,图4)。结果表明COR对NIG刺激的软骨细胞氧化应激有抑制作用。

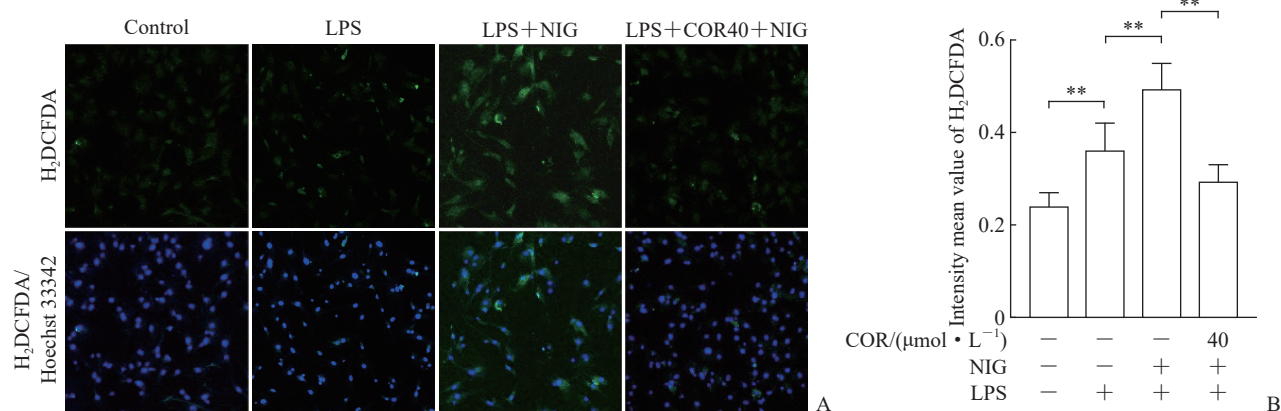


图 4 COR 减少 NIG 刺激的软骨细胞 ROS 产生

Fig 4 COR reduces NIG-stimulated ROS production in chondrocytes

A: H_2DCFDA -labeled intracellular ROS (20 $\times$); B: Quantitative analysis of fluorescence intensity ($^{**}P<0.01$, $n=5$, $\bar{x}\pm s$). COR: Corilagin; NIG: Nigericin; ROS: Reactive oxygen species; H_2DCFDA : 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; LPS: Lipopolysaccharide; COR40: 40 $\mu\text{mol/L}$ COR.

2.5 COR 能够抑制 NIG 刺激的软骨细胞内糖酵解过程 采用蛋白质印迹法检测糖酵解途径的关键酶 HK2、GLUT1 和 LDHA 的表达, 结果显示, COR

可减少软骨细胞内 HK2、GLUT1 和 LDHA 的表达水平 (均 $P<0.05$, 图 5)。结果表明 COR 能抑制 NIG 对软骨细胞内糖酵解的刺激作用。

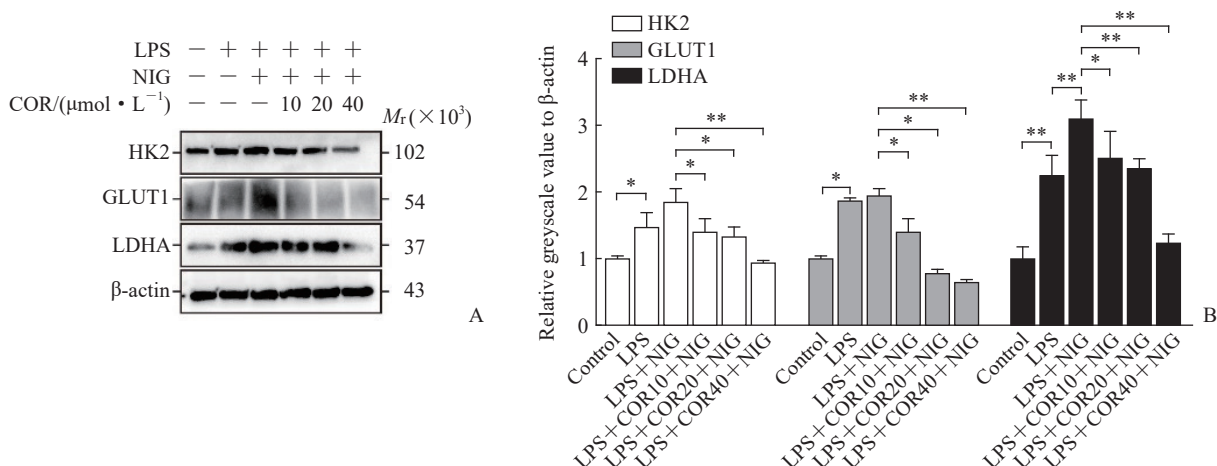


图 5 COR 抑制 NIG 刺激的软骨细胞中糖酵解相关信号

Fig 5 COR inhibits NIG-stimulated glycolytic signal in chondrocytes

A: Expression of HK2, GLUT1 and LDHA proteins in cell lysate detected by Western blotting; B: Quantitative analysis of the grayscale value of the blot bands ($^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $n=3$, $\bar{x}\pm s$). COR: Corilagin; NIG: Nigericin; LPS: Lipopolysaccharide; HK2: Hexokinase 2; GLUT1: Glucose transporter 1; LDHA: Lactate dehydrogenase A; COR10: 10 $\mu\text{mol/L}$ COR; COR20: 20 $\mu\text{mol/L}$ COR; COR40: 40 $\mu\text{mol/L}$ COR.

3 讨论

COR 作为一种鞣质、多酚类化合物, 具有良好的抗炎和抗氧化等生物活性^[11]。本研究以 LPS 联合 NIG 刺激的软骨细胞为体外模型, 研究 COR 对软骨细胞内 NLRP3 炎症小体激活和细胞焦亡的影响, 结果发现 COR 能通过抑制糖酵解过程、减

少 ROS 的生成阻止 NLRP3 炎症小体激活和软骨细胞焦亡, 减少炎症因子 IL-1 β 的分泌, 提示在关节感染模型中 COR 有抗炎潜能。

NLRP3 炎症小体的激活受多种途径的调控, 常见机制包括离子通量改变、线粒体功能障碍、ROS 生成及溶酶体损伤等^[14]。应用抗氧化剂 (如 N-乙酰半胱氨酸) 的实验表明, ROS 是 NLRP3 炎症

小体激活的关键介质, NLRP3 炎症小体通过 ROS 依赖的转录因子 NF- κ B 和 LPS 介导的 NLRP3 去泛素化; 此外, NLRP3 炎症小体激活可诱导炎症反应, 并促进免疫细胞(如中性粒细胞和巨噬细胞)聚集, 而这些免疫细胞本身也会产生 ROS, 进一步加剧炎症反应^[15]。Ding 等^[16]研究发现, 二氢槲皮素可抑制高糖肾细胞的细胞增殖和 ROS 的过度生成, 减轻高糖肾细胞 NLRP3 炎症小体的激活和肾纤维化相关蛋白的表达。本研究也发现 COR 可以抑制 ROS 的生成及 NLRP3 炎症小体的激活和软骨细胞焦亡。

糖代谢对维持体内环境稳态具有重要作用。近年来, 越来越多的研究表明, 肥胖、酒精肝、痛风等代谢性疾病常伴有炎症水平的升高, 且炎症反应是推动这些代谢性疾病发展的关键因素^[17]。然而, 炎症反应与代谢性疾病之间的关系并不明确。随着对先天免疫研究的不断深入, 人们发现 NLRP3 炎症小体与人类自身炎症性疾病和免疫性疾病有关^[18]。有研究显示, 糖代谢与 NLRP3 炎症小体的激活关系密切^[19]。Zhao 等^[20]发现用天冬氨酸转氨酶抑制剂氨基氧乙酸处理巨噬细胞可抑制糖酵解途径, 同时降低 NLRP3 炎症小体的激活水平。而使用糖酵解抑制剂 2-脱氧葡萄糖能明显减轻 LPS 诱导的小鼠肺组织病理损伤、中性粒细胞积累、氧化应激反应和促炎因子的表达, 以及减弱 NLRP3 炎症小体的激活^[21]。Rong 等^[22]发现通过抑制黄嘌呤氧化酶下调低氧诱导因子 1 α 介导的 LDHA 和 NLRP3 信号通路, 可以缓解胰腺坏死并防止严重急性胰腺炎的进展。Baik 等^[23]的研究表明, 线粒体 HK 的分离会促进电压依赖性阴离子通道发生寡聚化, 从而推动 NLRP3 炎症小体的组装与激活。本研究也发现 COR 能抑制软骨细胞内的糖酵解过程, 减少 ROS 生成, 从而阻止 NLRP3 炎症小体的激活。

本研究结果显示, COR 具备成为一种有效抗炎药物的潜力, 可用于控制 NLRP3 炎症小体相关炎症性疾病。其作用机制在于, COR 能够通过抑制糖酵解过程及相关氧化应激反应, 减缓或逆转关节炎的病情进展。本研究揭示了调控细胞焦亡的一种新途径, 这一发现对于理解软骨细胞应对炎症压力的机制具有重要意义。然而, 本研究也存在一定局限性。尽管在体外模型中观察到 COR 的积极效果,

但其在体内环境的实际效果仍有待进一步验证。此外, COR 的生物利用度和稳定性问题一直是制约其临床应用的关键因素, 因此开发出高效且稳定的药物制剂将成为未来研究的重要方向。

[参 考 文 献]

- [1] SPINELLI J B, HAIGIS M C. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism[J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(7): 745-754. DOI: 10.1038/s41556-018-0124-1.
- [2] ZHENG X, QIU J, GAO N, et al. Paroxetine attenuates chondrocyte pyroptosis and inhibits osteoclast formation by inhibiting NF- κ B pathway activation to delay osteoarthritis progression[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2023, 17: 2383-2399. DOI: 10.2147/DDDT.S417598.
- [3] FU J, WU H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation[J]. *Annu Rev Immunol*, 2023, 41: 301-316. DOI: 10.1146/annurev-immunol-081022-021207.
- [4] HUANG Y, XU W, ZHOU R. NLRP3 inflammasome activation and cell death[J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(9): 2114-2127. DOI: 10.1038/s41423-021-00740-6.
- [5] CHEN Y, LIU Y, JIANG K, et al. Linear ubiquitination of LKB1 activates AMPK pathway to inhibit NLRP3 inflammasome response and reduce chondrocyte pyroptosis in osteoarthritis[J]. *J Orthop Translat*, 2022, 39: 1-11. DOI: 10.1016/j.jot.2022.11.002.
- [6] WANG L, HAUENSTEIN A V. The NLRP3 inflammasome: mechanism of action, role in disease and therapies[J]. *Mol Aspects Med*, 2020, 76: 100889. DOI: 10.1016/j.mam.2020.100889.
- [7] FREEMERMAN A J, JOHNSON A R, SACKS G N, et al. Metabolic reprogramming of macrophages: glucose transporter 1 (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(11): 7884-7896. DOI: 10.1074/jbc.M113.522037.
- [8] JIANG B. Aerobic glycolysis and high level of lactate in cancer metabolism and microenvironment[J]. *Genes Dis*, 2017, 4(1): 25-27. DOI: 10.1016/j.gendis.2017.02.003.
- [9] YU Q, GUO M, ZENG W, et al. Interactions between NLRP3 inflammasome and glycolysis in macrophages: new insights into chronic inflammation pathogenesis[J]. *Immun Inflamm Dis*, 2022, 10(3): e581. DOI: 10.1002/iid3.581.
- [10] RENAUDIN F, ORLIAGUET L, CASTELLI F, et al. Gout and pseudo-gout-related crystals promote GLUT1-mediated glycolysis that governs NLRP3 and interleukin-1 β activation on macrophages[J]. *Ann*

- Rheum Dis, 2020, 79(11): 1506-1514. DOI: 10.1136/annrheumdis-2020-217342.
- [11] JANTAN I, HAQUE M A, ILANGKOVAN M, et al. An insight into the modulatory effects and mechanisms of action of *Phyllanthus* species and their bioactive metabolites on the immune system[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 878. DOI: 10.3389/fphar.2019.00878.
- [12] LI W, YANG K, LI B, et al. Corilagin alleviates intestinal ischemia/reperfusion-induced intestinal and lung injury in mice via inhibiting NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 1060104. DOI: 10.3389/fphar.2022.1060104.
- [13] LUO T, ZHOU X, QIN M, et al. Corilagin restrains NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis through the ROS/TXNIP/NLRP3 pathway to prevent inflammation[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 1652244. DOI: 10.1155/2022/1652244.
- [14] KELLEY N, JELTEMA D, DUAN Y, et al. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(13): 3328. DOI: 10.3390/ijms20133328.
- [15] DOMINIC A, LE N T, TAKAHASHI M. Loop between NLRP3 inflammasome and reactive oxygen species[J]. Antioxid Redox Signal, 2022, 36(10/11/12): 784-796. DOI: 10.1089/ars.2020.8257.
- [16] DING T, WANG S, ZHANG X, et al. Kidney protection effects of dihydroquercetin on diabetic nephropathy through suppressing ROS and NLRP3 inflammasome[J]. Phytomedicine, 2018, 41: 45-53. DOI: 10.1016/j.phymed.2018.01.026.
- [17] HOTAMISLIGIL G S. Inflammation and metabolic disorders[J]. Nature, 2006, 444(7121): 860-867. DOI: 10.1038/nature05485.
- [18] JO E K, KIM J K, SHIN D M, et al. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation[J]. Cell Mol Immunol, 2016, 13(2): 148-159. DOI: 10.1038/cmi.2015.95.
- [19] 张坦,王茹,丁树哲. 糖脂代谢参与NLRP3炎症小体活化的研究进展[J]. 生命科学, 2022, 34(4): 385-391. DOI: 10.13376/j.cbbs/2022045.
- [20] ZHAO P, ZHOU W, ZHANG Y, et al. Aminooxyacetic acid attenuates post-infarct cardiac dysfunction by balancing macrophage polarization through modulating macrophage metabolism in mice[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(4): 2593-2609. DOI: 10.1111/jcmm.14972.
- [21] ZHONG W J, YANG H H, GUAN X X, et al. Inhibition of glycolysis alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in a mouse model[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(4): 4641-4654. DOI: 10.1002/jcp.27261.
- [22] RONG J, HAN C, HUANG Y, et al. Inhibition of xanthine oxidase alleviated pancreatic necrosis via HIF-1 α -regulated LDHA and NLRP3 signaling pathway in acute pancreatitis[J]. Acta Pharm Sin B, 2024, 14(8): 3591-3604. DOI: 10.1016/j.apsb.2024.04.019.
- [23] BAIK S H, RAMANUJAN V K, BECKER C, et al. Hexokinase dissociation from mitochondria promotes oligomerization of VDAC that facilitates NLRP3 inflammasome assembly and activation[J]. Sci Immunol, 2023, 8(84): eade7652. DOI: 10.1126/sciimmunol.ade7652.

[本文编辑] 尹 茶