

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.003376

基于 NLRP3/Caspase-1 通路探讨薏苡仁多糖对溃疡性结肠炎体外炎症模型的干预作用及机制

陈莉娟¹, 李彦龙², 杨维建², 李宝瑜³, 苟玉琴³, 张早育³, 李莹³, 吴航³

(1. 甘肃省疾病预防控制中心社区卫生与慢性非传染性疾病防制科, 兰州 730010; 2. 甘肃省中医院脾胃病诊疗中心, 兰州 730050; 3. 甘肃中医药大学中西医结合学院, 兰州 730000)

【摘要】目的:从炎症理论角度出发,探讨薏苡仁多糖(Coixan)对溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)体外炎症模型的干预作用及其机制。**方法:**体外培养 NCM460 细胞,采用不同剂量(0、2.5、5、10、20 和 40 $\mu\text{g/mL}$)脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导 NCM460 细胞,筛选出最佳诱导剂量(20 $\mu\text{g/mL}$);用不同浓度(0、5、10、20、40 和 80 $\mu\text{g/mL}$)的 Coixan 诱导 NCM460,筛选出最佳促增殖浓度(10、20、40 $\mu\text{g/mL}$)。实验随机设为空白组、模型组(LPS 诱导)、LPS+Coixan 低、中、高剂量(10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)组, LPS+柳氮磺吡啶(sulfasalazine, SASP)(200 $\mu\text{g/mL}$)组,除空白组外用 LPS(20 $\mu\text{g/mL}$)刺激 48 h 建立 UC 体外细胞炎症模型后,分别以薏苡仁多糖及 SASP 进行 48 h 干预治疗后,ELISA 法检测细胞上清液中炎症因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平;免疫荧光检测焦亡相关蛋白 Caspase-1 荧光的表达量;采用 qRT-PCR 技术检测各组 NCM460 中 NLRP3/Caspase-1 通路中焦亡相关 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 基因表达水平的影响;Western blot 技术检测各组焦亡相关 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达水平的影响。**结果:**与 0 $\mu\text{g/mL}$ 比较(20 $\mu\text{g/mL}$)LPS 诱导 48 h 对 NCM460 细胞生长抑制较为适中($P<0.01$),同时,干预 48 h 时,炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 含量明显升高($P<0.01$),因此,选择(20 $\mu\text{g/mL}$)LPS 诱导 48 h 作为造模方式。与 0 $\mu\text{mol/L}$ 的 Coixan 相比,当 Coixan 浓度为 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率增高,特别是 Coixan 浓度为 10、20 $\mu\text{mol/L}$ ($P<0.05$)。与正常对照组比较,模型组中炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 的含量, NLRP3、Caspase-1 β 、IL-1 β 蛋白和 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 基因表达均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,药物干预组中,中、高剂量组和柳氮磺吡啶组中细胞 IL-1 β 、TNF- α 分泌量减少,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,药物干预组中,高剂量组和柳氮磺吡啶组中焦亡相关蛋白 Caspase-1 表达水平明显下调($P<0.01$);与模型组比较,药物干预组中,低、中、高剂量组和柳氮磺吡啶组中 NLRP3、Caspase-1 蛋白和基因表达明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),药物干预组中,高剂量组、柳氮磺吡啶组中 GSDMD-N、IL-1 β 基因表达均显著降低($P<0.01$);与模型组比较,药物干预组中,中、高剂量组和柳氮磺吡啶组中焦亡相关蛋白(NLRP3、Caspase-1、IL-1 β)表达水平明显下调($P<0.01$)。**结论:**薏苡仁多糖可能通过下调焦亡相关因子 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 的表达水平,从而抑制人结肠上皮细胞的细胞焦亡,发挥人结肠上皮细胞保护作用。

【关键词】薏苡仁多糖;溃疡性结肠炎;细胞炎症模型;NLRP3/Caspase-1;细胞焦亡**【中图分类号】**R575.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2023-09-09Intervention effect of coix seed polysaccharides on an *in vitro* inflammation model of ulcerative colitis and its mechanism: a study based on the NLRP3/caspase-1 pathwayChen Lijuan¹, Li Yanlong², Yang Weijian², Li Baoyu³, Gou Yubin³, Zhang Zaoyu³, Li Ying³, Wu Hang³

(1. Department of Community Health and Chronic Non-communicable Disease Prevention and Control, Gansu Provincial Center for Disease Control and Prevention; 2. Spleen and Stomach Disease Diagnosis and Treatment Center, Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine; 3. School of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Gansu University of Chinese Medicine)

作者介绍:陈莉娟, Email: 2212243993@163.com,

研究方向: 中西医结合防治慢病方向。

通信作者:李彦龙, Email: 308923963@163.com。**基金项目:**甘肃省自然科学基金资助项目(编号: 21JR11RA205); 甘肃省自然科学基金资助项目(编号: 20JR10RA419); 甘肃省青年科技基金计划资助项目(编号: 18JR3RA072); 陇原青年创新创业人才资助项目(编号: 甘组通字[2022]77号)。**优先出版:** <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.r.20231127.1508.002>
(2023-11-29)

【Abstract】Objective: To investigate the intervention effect of coix seed polysaccharides (Coixan) on an *in vitro* inflammation model of ulcerative colitis (UC) and its mechanism from the perspective of inflammation theory. **Methods:** NCM460 cells were cultured *in vitro* and were induced by different doses (0, 2.5, 5, 10, 20, and 40 $\mu\text{g/mL}$) of lipopolysaccharide (LPS) to obtain the optimal induction dose of 20 $\mu\text{g/mL}$, and NCM460 cells were induced by different concentrations (0, 5, 10, 20, 40, and 80 $\mu\text{mol/L}$) of Coixan to obtain the optimal concentrations for promoting proliferation (10, 20, and 40 $\mu\text{mol/L}$). The cells were randomly divided into blank group, model group

(LPS induction), LPS+low-, middle-, and high-dose Coixan (10, 20, and 40 $\mu\text{mol/L}$) groups, and LPS+salicylazosulfapyridine (SASP) (200 $\mu\text{g/mL}$) group, and after all cells except those in the blank group were stimulated with LPS (20 $\mu\text{g/mL}$) for 48 hours to establish an *in vitro* cell inflammation model of UC, Coixan and SASP were used for 48 hours of intervention. ELISA was used to measure the levels of the inflammatory factors interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in supernatant; immunofluorescence assay was used to measure the expression level of the pyroptosis-related protein caspase-1; qRT-PCR was used to measure the gene expression levels of NLRP3, caspase-1, GSDMD-N, and IL-1 β associated with pyroptosis in the NLRP3/caspase-1 pathway; Western blot was used to measure the protein expression levels of NLRP3, caspase-1, and IL-1 β associated with pyroptosis in each group. **Results:** Compared with 0 $\mu\text{g/mL}$ LPS, 20 $\mu\text{g/mL}$ LPS for 48 hours of induction moderately inhibited the growth of NCM460 cells ($P < 0.01$), and meanwhile, there was a significant increase in the content of the inflammatory factors IL-1 β and TNF- α at 48 hours of intervention ($P < 0.01$); therefore, 20 $\mu\text{g/mL}$ LPS induction for 48 hours was selected for modeling. Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$ Coixan, there was an increase in cell viability after intervention with Coixan at concentrations of 10, 20, and 40 $\mu\text{mol/L}$, especially Coixan at concentrations of 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$). Compared with the normal control group, the model group had significant increases in the levels of the inflammatory factors IL-1 β and TNF- α , the protein expression levels of NLRP3, caspase-1, and IL-1 β , and the gene expression levels of NLRP3, caspase-1, GSDMD-N, and IL-1 β ($P < 0.01$); compared with the model group, the middle- and high-dose groups and the SASP group had significant reductions in the secretion of IL-1 β and TNF- α ($P < 0.01$). Compared with the model group, the middle- and high-dose groups and the SASP group had a significant reduction in the expression level of the pyroptosis-related protein caspase-1 ($P < 0.01$); compared with the model group, the low-, middle-, and high-dose groups and the SASP group had significant reductions in the protein and gene expression levels of NLRP3 and caspase-1 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the middle and high-dose groups and the SASP group had significant reductions in the gene expression levels of GSDMD-N and IL-1 β ($P < 0.01$); compared with the model group, the middle- and high-dose groups and the SASP group had significant reductions in the expression levels of the pyroptosis-related proteins NLRP3, caspase-1, and IL-1 β ($P < 0.01$). **Conclusions:** Coixan may exert a protective effect on human intestinal epithelial cells by downregulating the expression levels of the pyroptosis-related factors NLRP3, caspase-1, GSDMD-N, and IL-1 β and inhibiting the pyroptosis of intestinal epithelial cells.

[Key words] coix seed polysaccharides; ulcerative colitis; cell inflammation model; NLRP3/caspase-1; pyroptosis

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种慢性、持续性、非特异性免疫性肠病, 长期不受控制的 UC 可能会导致结直肠癌。世界卫生组织目前将 UC 列为最难治的消化系统疾病之一^[1-2]。据报道, UC 在我国的发病率约为 2.5/10 万人^[3]。目前柳氮磺吡啶 (sulfasalazine, SASP) 是治疗 UC 的临床一线用药, 但是治疗效果仍不尽如人意。例如个体患者由于其严重的毒副作用不耐受, 一部分患者对现代治疗方法不敏感。因此, 从多角度探索 UC 的病理机制, 发现新的药物作用靶点和寻找更有效的抗焦虑方法无疑是值得探索的方向。

近年来, 细胞焦亡介导的炎症反应在 UC 病理过程中的作用受到专家学者的广泛关注, 细胞焦亡是一种由 Caspase 介导与炎症相关的程序性细胞死亡^[4]。近年来发现, 以 NLRP3 炎症小体形成、Caspase-1 激活和消皮素 D (gasdermin D, GSDMD) 切割为特征的细胞焦亡在 UC 患者结肠组织中高表达^[5], 证实细胞焦亡与 UC 的发病机制密切相关。研究表明, 抑制细胞焦亡可以减轻实验性结肠炎的损害^[6-7]。薏苡仁多糖是中药薏苡仁的重要活性成分之一, 薏苡仁具有健脾益胃、利水化湿、清热排脓等功效, 在临床上治疗 UC 疗效明确, 现代药理学证

明: 薏苡仁多糖具有调节免疫、抗炎、抗肠道肿瘤等作用^[8-10]。但目前还没有研究报道薏苡仁多糖 (Coixan) 能通过抑制细胞焦亡发挥治疗 UC 的作用。因此, 本研究探讨薏苡仁多糖对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导 UC 体外细胞 (NCM460) 炎症模型的保护作用与对 NLRP3/Caspase-1 通路介导的细胞焦亡机制的影响, 初步探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

Coixan 购自: 上海源叶生物公司, 批号: S27205; SASP, 购自上海信谊天平药业有限公司, 规格: 0.25 g/片, 批号: H31020557。人结肠上皮细胞 (NCM460), 购自谱诺赛细胞库 (货号: 40652)。LPS (索来宝公司, 批号: L8880); 人白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 酶联免疫检测仪试剂盒 (联科生物公司, 批号: EK101B-96)。人肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 酶联免疫检测仪试剂盒 (联科生物公司, 批号: EK182HS-96); ROS 荧光探针 (碧云天公司, 批号: S0033S); CCK-8 试剂盒 (MCE 公司批号: G1203); 苏木素伊红 (HE) 染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 批号: G1120); Caspase-1 抗体 (Gene Tex 公司, 批号: GTX101322); NLRP3 抗体 (Gene Tex 公司, GTX101322); IL-1 β 抗体 (Gene Tex 公司, 批号: GTX130021); GAPDH (immunoway 公司, 批

号:YM3215);抗荧光衰减封片剂(含 DAPI)(北京索莱宝科技有限公司批号:S2110)HRP 标记的山羊抗兔(IgG Immuno Way 公司,批号:RS0002);HRP 标记的山羊抗鼠 IgG(Immuno Way 公司,批号 RS0001)。凝胶成像系统(美国 UVP 公司,批号:ChemiDoc-610);电子分析天平(日本 Shimadzu 公司,批号:UW120D);光学显微镜(Olympus 公司,批号:BX53);电泳仪(美国 BIO-RAD 公司,批号:EPS300);PCR 扩增仪(美国 BIO-RAD 公司;CFX96)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞培养在含 5% 胎牛血清、1% 青-链霉素的 DEME 培养基,置于 37 °C、饱和湿度、5%CO₂ 的细胞培养箱中培养,细胞生长融合至 80%~90% 进行传代。

1.2.2 溃疡性结肠炎体外细胞炎症模型的构建 采用脂多糖诱导人结肠上皮细胞(NCM460),建立溃疡性结肠炎体外炎症模型^[11-12],具体实验步骤:取对数生长期的 NCM460,以每孔 5×10⁴ 个细胞的密度接种于 96 孔细胞培养板,每组设 3 个复孔,培养 24 h 后给予(0、2.5、5、10、20 和 40 μg/mL)的 LPS 诱导,于培养箱内分别培养 24、48 和 72 h 后向每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,37 °C 孵育 2 h。筛选出最佳作用浓度和时间后,收集其作用后的 NCM460 细胞,3 000 r/min 离心 5 min,取上清。按照 Elisa 酶联免疫试剂盒步骤检测各组 NCM460 细胞上清 IL-1β、TNF-α 含量。

1.2.3 CCK-8 法筛选浓度薏苡仁多糖干预浓度 取对数生长期 NCM460,以每孔 2.5×10⁴ 个细胞的密度接种于 96 孔细胞培养板,分别加入 0、5、10、20、40 和 80 μmol/L Coixan 每个浓度组设置 3 个复孔,置于细胞培养箱中分别培养 48 h。采用酶标仪于 450 nm 波长处测定 A 值,计算细胞存活率,确定本实验的 Coixan 最佳干预剂量。

1.2.4 溃疡性结肠炎体外细胞炎症模型的干预措施 依据参考文献[11-12],将培养至对数生长期的 NCM460 细胞,用胰蛋白酶消化液,接种于 96 孔板中,每孔 100 μL,于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中贴壁 24 h 弃培养液后,除正常组外其余各组加入终浓度为 20 μg/mL LPS,于培养箱中培养 48 h。弃培养液后,正常组、模型组加入等量培养液,药物干预组分别加入终浓度 10、20、40 μmol/L(薏苡仁多糖),SASP(200 μg/mL)^[13-14] 的等量悬液置于 5%CO₂、37 °C 条件的二氧化碳细胞培养箱继续培养 48 h 后,检测各项指标。

1.2.5 Elisa 法检测 NCM460 细胞上清 IL-1β、TNF-α 的含量和活性氧检测试剂盒检测细胞 ROS 水平 收集 NCM460 细胞,3 000 r/min 离心 5 min,取上清。按照 Elisa 酶联免疫试剂盒步骤检测各组 NCM460 细胞上清 IL-1β、TNF-α 含量,按照 ROS 试剂盒使用步骤说明书,采用 DCFH-DA 荧光探针检测各组 NCM460 细胞上清中 ROS 水平的影响。

1.2.6 免疫荧光检测 Caspase-1 蛋白的表达水平 将细胞培养于提前用多聚-L-赖氨酸包被的 45 mm 直径的共聚焦玻璃培养皿中。14 h 后对其加药处理。到达实验设计时间后,弃除培养基,用 PBS 清洗 3 次。随后用 4% 多聚甲醛细胞固定液固定 30 min,再用 3% 牛血清白蛋白和 0.1% Triton X-100 细胞封闭液封闭 30 min。用 PBS 清洗细胞 5 遍,再用相

应的抗体进行孵育染色,随后使用共聚焦显微镜进行成像。

1.2.7 RT-qPCR 法检测 NCM460 细胞中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1β mRNA 表达 收集细胞,提取总 RNA,然后根 TAKARA 公司的 PCR 逆转录试剂盒为 cDNA,通过 Real-time PCR 仪进行扩增,以 GAPDH 为内参,采用 2^{-ΔΔCT} 法计算 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1β mRNA 相对表达量。基因引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司进行引物序列设计和合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因名	引物序列(5'~3')	长度(bp)
NLRP3	上游 TGGCATCGTGAAGTGGTTGT	157
	下游 GCCAAATGCTTACCAGAAAGT	
Caspase-1	上游 CCGITCCATGGGTGAAGGTA	276
	下游 GAGGATGTGGGCATAGCTG	
GSDMD-N	上游 TAAACTGGGCGGAGGGATGAA	300
	下游 GAAGGGGATTCTGCTGGTGT	
IL-1β	上游 GAAGGGGATTCTGCTGGTGT	211
	下游 GTCCATGGCCACAACAACCTG	
GAPDH	上游 CAGGAGGCATTGCTGATGAT	138
	下游 GAAGGCTGGGGCTCATTT	

1.2.8 Western blot 法检 NCM460 细胞中 NLRP3、Caspase-1、IL-1β 蛋白表达 收集细胞,提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,经电泳、转膜、脱脂奶粉封闭后,加入一抗 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1β,4 °C 孵育过夜,次日 TBST 洗膜后加入二抗,显影后使用 Image Pro Plus 图像处理软件分析蛋白相对表达量。

1.3 统计学方法

所有实验数据经过 SPSS 25.0 软件分析,计量资料用均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析(One-Way-Anova);若方差齐时采用 LSD 法进行检验;若方差不齐采用塔姆黑尼 T2(Tamhane's T2)法进行检验;若不符合正态分布采用非参数检验。检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 溃疡性结肠炎体外细胞(NCM460)炎症细胞模型的诱导

如下表 2、表 3 所示,20、40 μg/mL LPS 干预 NCM460 后 48 和 72 h,对其产生明显的生长抑制作用($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。其中,20 μg/mL LPS 诱导后 48 h,NCM460 的存活率显著下降($P<0.01$)。LPS 诱导后 48 h 和 72 h 两时间点细胞抑制率相比较,在 48 h 时(20 μg/mL)LPS 诱导对 NCM460 细胞生长抑制较为适中。同时,20 μg/mL LPS 作用 NCM460 细胞 48 h 后,模型组促炎细胞因子 TNF-α、IL-1β 的表达显著降低($P<0.01$)。这说明 20 μg/mL LPS 可以对此造成一定的炎性损伤,说明溃疡性结肠炎体外细胞炎症损伤模型造模成功,因此本实验用 20 μg/mL LPS 诱导 NCM460 后 48 h 时作为造模条件。

表2 CCK-8 法检测 LPS 干预不同时间后对 NCM460 的活力影响 ($\bar{x} \pm s$; %; $n=3$)

组别	24 h		48 h		72 h	
	A 值	抑制率	A 值	抑制率	A 值	抑制率
0 $\mu\text{g/mL}$	0.60 ± 0.20	0.00	0.76 ± 0.02	0.00	1.08 ± 0.06	0.00
2.5 $\mu\text{g/mL}$	0.57 ± 0.01	4.58	0.81 ± 0.01^a	-6.55	1.15 ± 0.05	-5.81
5 $\mu\text{g/mL}$	0.59 ± 0.02	1.95	0.80 ± 0.02	-4.67	1.15 ± 0.10	-5.69
10 $\mu\text{g/mL}$	0.60 ± 0.02	-0.000 6	0.75 ± 0.01	2.36	1.07 ± 0.09	0.83
20 $\mu\text{g/mL}$	0.57 ± 0.01	4.69	0.68 ± 0.03^b	11.22	0.92 ± 0.04^a	15.07
40 $\mu\text{g/mL}$	0.54 ± 0.01	8.82	0.58 ± 0.02^b	24.24	0.78 ± 0.06^b	28.21

注:a, 与 0 $\mu\text{g/mL}$ 组比较, $P<0.05$; b: 与 0 $\mu\text{g/mL}$ 组比较, $P<0.01$

表3 ELISA 检测各组 NCM460 的 TNF- α , IL-1 β 含量 ($\bar{x} \pm s$; $n=3$)

组别	LPS 剂量/干预 时间	IL-1 β 浓度 (pg/L)	TNF- α 浓度 (ng/L)
正常组	0 $\mu\text{g/mL}$	11.57 ± 1.19	63.55 ± 8.34
模型组 (LPS 组)	20 $\mu\text{g/mL}$ (48 h)	49.22 ± 0.63^a	419.16 ± 36.71^a

注:a, 与正常组比较, $P<0.01$

2.2 薏苡仁多糖促进细胞增殖最佳干预剂量

如下表 4 所示, 分别用不同浓度薏苡仁多糖(终浓度为 0、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$) 干预 NCM460 细胞 48 h 后检测细胞存活率。与 0 $\mu\text{mol/L}$ 薏苡仁多糖 (Coixan) 相比较, 当薏苡仁多糖浓度为 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞存活率增高, 特别是, Coixan 浓度为 10、20 $\mu\text{mol/L}$ ($P<0.05$)。因此, 本研究选择 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 薏苡仁多糖诱导 NCM460 进行后续实验, 并在 LPS 诱导后继续干预处理 48 h。

表4 薏苡仁多糖干预 48 h 后各组 NCM460 的存活率 ($\bar{x} \pm s$; %; $n=3$)

组别	A 值	生存率
0 $\mu\text{mol/L}$	0.54 ± 0.01	100.00 ± 0.00
2.5 $\mu\text{mol/L}$	0.53 ± 0.01	97.90 ± 2.49
5 $\mu\text{mol/L}$	0.57 ± 0.02^a	106.43 ± 2.81^a
10 $\mu\text{mol/L}$	0.58 ± 0.01^a	107.17 ± 1.62^a
20 $\mu\text{mol/L}$	0.57 ± 0.01	105.25 ± 1.67
40 $\mu\text{mol/L}$	0.52 ± 0.02	96.17 ± 2.90

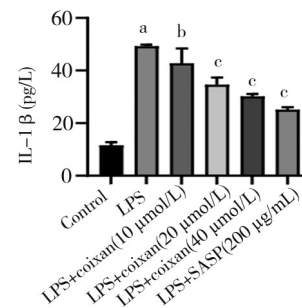
注:a, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比较, $P<0.05$

2.3 薏苡仁多糖 NCM460 细胞上清 IL-1 β 、TNF- α 、ROS 的含量影响

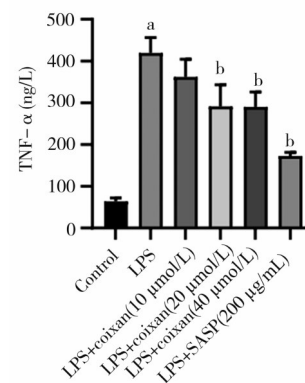
由图 1~4 可见, 与 NCM460 正常对照组比较, 模型组 NCM460 上清液中 IL-1 β 、TNF- α 、ROS 表达均显著升高 ($P<0.01$); 与模型组相比, Coixan 低、中、高剂量组, (柳氮磺吡啶) 中 IL-1 β 、ROS 含量显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。Coixan 中、高剂量和阳性药 (柳氮磺吡啶) 组中 TNF- α 表达显著降低 ($P<0.01$)。

2.4 Coixan 对 LPS 诱导的 NCM460 细胞 Caspase-1 荧光强度的影响

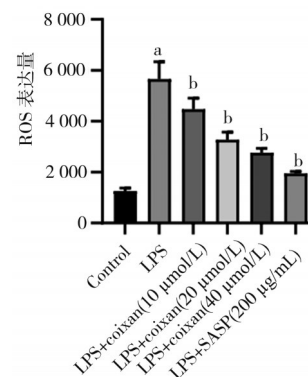
免疫荧光双染色法检测各组细胞中 Caspase-1 蛋白表达, 结果图 5、6 所示, 如左图所示: 与正常组相比, LPS 造模损伤后, 模型组 Caspase-1 蛋白表达显著增加 ($P<0.01$); 与模型组相比, 高薏苡仁多糖组, 柳氮磺吡啶组中 Caspase-1 蛋白表达明显下调 ($P<0.01$)。



注:a, 与正常组比较, $P<0.01$; b: 与模型组比较, $P<0.05$; c: 与模型组比较, $P<0.01$

图1 ELISA 法检测各组 NCM460 的 IL-1 β (pg/L) 含量 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

注:a, 与正常组比较, $P<0.01$; b: 与模型组比较, $P<0.01$

图2 ELISA 检测各组 NCM460 的 TNF- α (ng/L) 含量 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

注:a, 与正常组比较, $P<0.01$; b: 与模型组比较, $P<0.01$

图3 活性氧荧光探针法检测各组 NCM460 的 ROS 含量 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

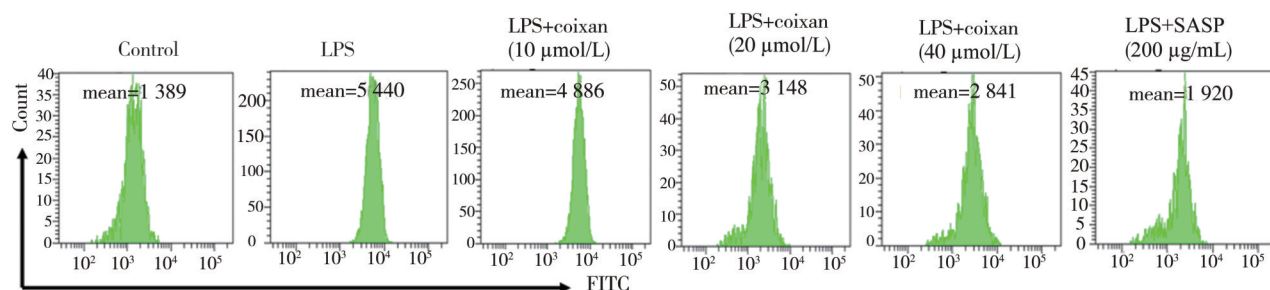
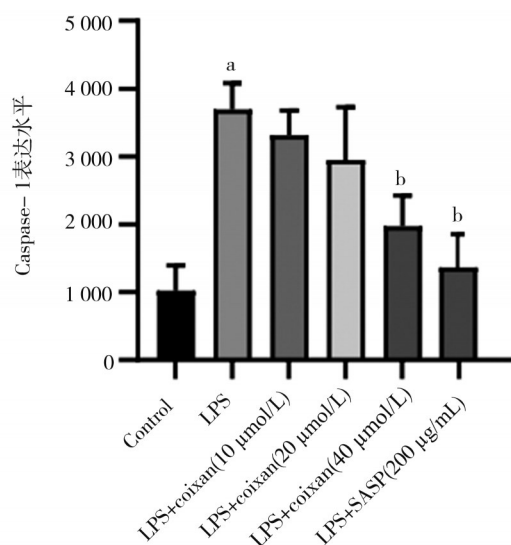


图4 薏苡仁多糖对各组NCM460细胞ROS含量的影响

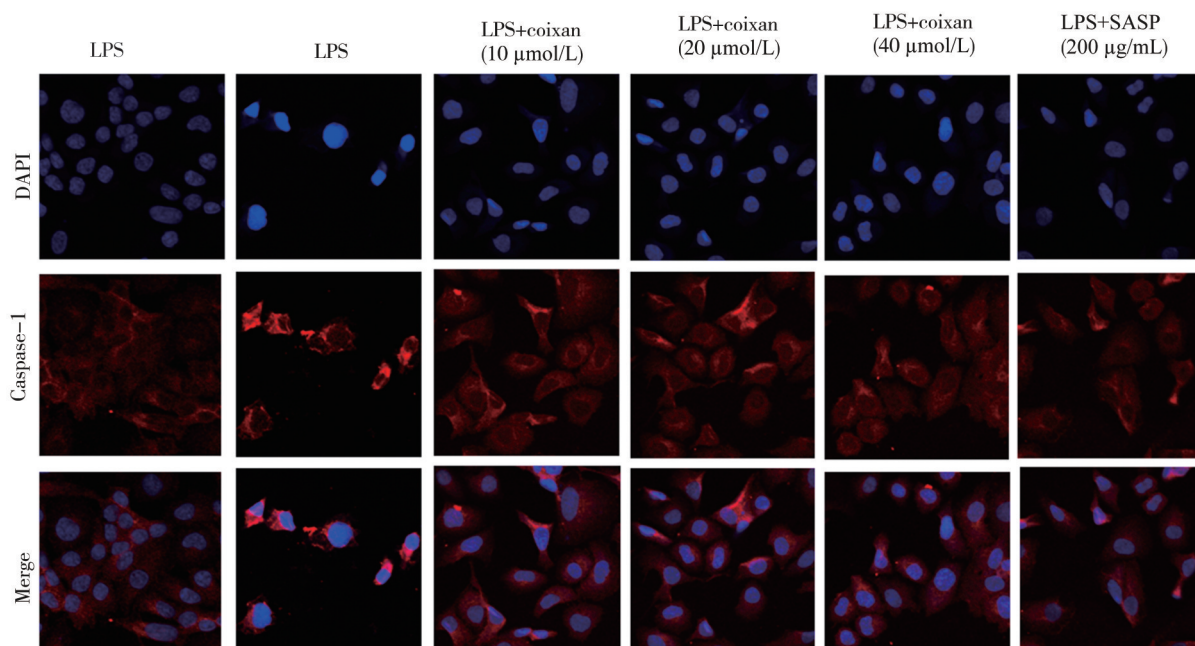
注:a,与正常组比较, $P<0.01$;b:与模型组比较, $P<0.01$ 图5 Coixan对LPS诱导的NCM460细胞中Caspase-1蛋白的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

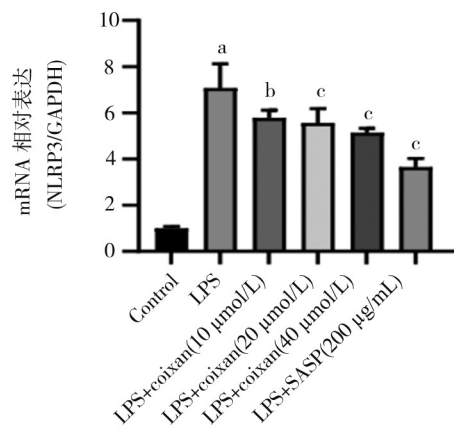
2.5 Coixan 对 各 组 NCM460 中 NLRP3 mRNA、Caspase-1 mRNA、GSDMD-N mRNA、IL-1 β mRNA 表达水平的影响

PCR 法检测 NLRP3/Caspase-1 信号通路焦亡相关因子 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 的表达情况,结果见图 7,与正常组相比,模型组 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 基因表达均显著升高($P<0.01$);与模型组相比,Coixan 低、中、高剂量组,柳氮磺吡啶组中 NLRP3、Caspase-1 表达均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);Coixan 中,高剂量组,柳氮磺吡啶组中 GSDMD-N、IL-1 β 基因表达均显著降低($P<0.01$)。

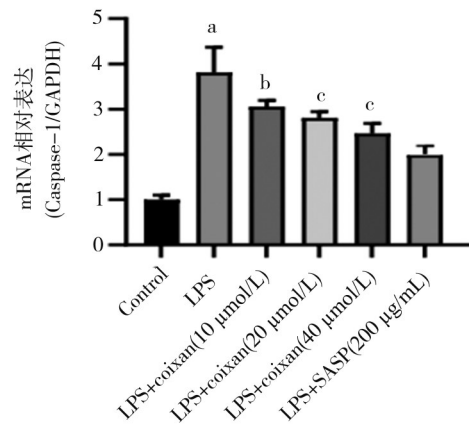
2.6 Coixan 对 各 组 NCM460 中 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达水平的影响

结果如图 8、9 所示,与正常组相比,模型组中 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达水平明显下调($P<0.01$);与模型组相比,Coixan 低、中、高剂量组,柳氮磺吡啶组中 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达水平明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$);Coixan 中,高剂量组,柳氮磺吡啶组中 IL-1 β 蛋白表达水平明显下调($P<0.01$)。

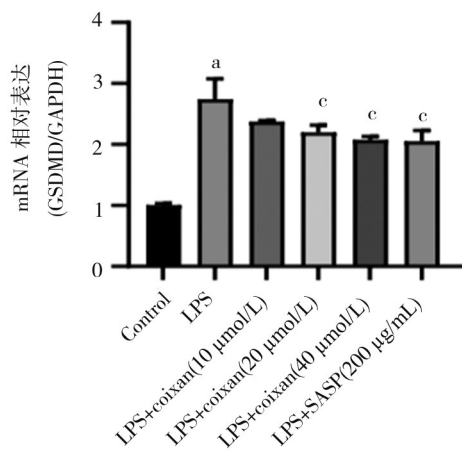
图6 免疫荧光染色检测对LPS诱导NCM460细胞焦亡相关Caspase-1蛋白的影响($30\times$) ($\bar{x} \pm s, n=3$)



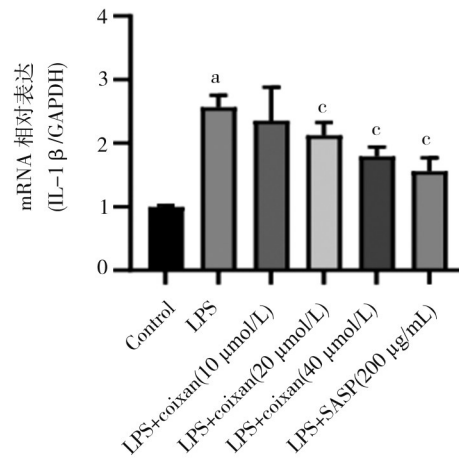
A. 细胞上清液中NLRP3 mRNA基因表达水平



B. 细胞上清液中Caspase-1 mRNA基因表达水平

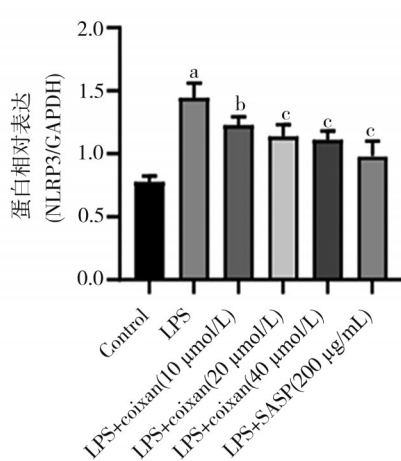


C. 细胞上清液中GSDMD-N mRNA基因表达水平

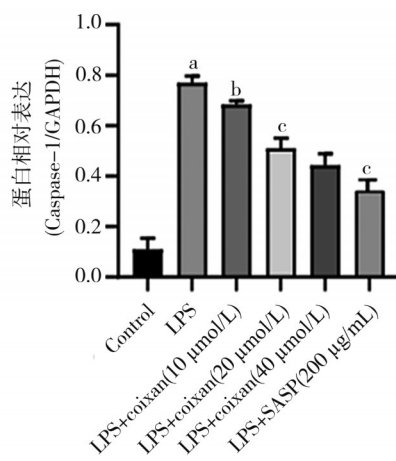


D. 细胞上清液中IL-1β mRNA基因表达水平

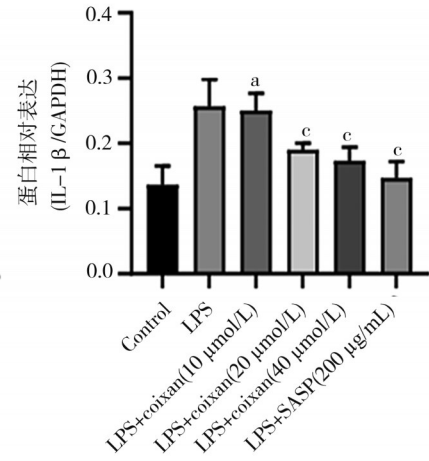
注:a,与正常组比较, $P<0.01$;b,与模型组比较, $P<0.05$;c,与模型组比较, $P<0.01$

图7 各组NCM460中NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1β mRNA表达水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

A. 细胞上清液中NLRP3蛋白表达水平



B. 细胞上清液中Caspase-1蛋白表达水平



C. 细胞上清液中IL-1β蛋白表达水平

注:a,与正常组比较, $P<0.01$;b,与模型组比较, $P<0.05$;c,与模型组比较, $P<0.01$

图8 各组NCM460中NLRP3、Caspase-1、IL-1β蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

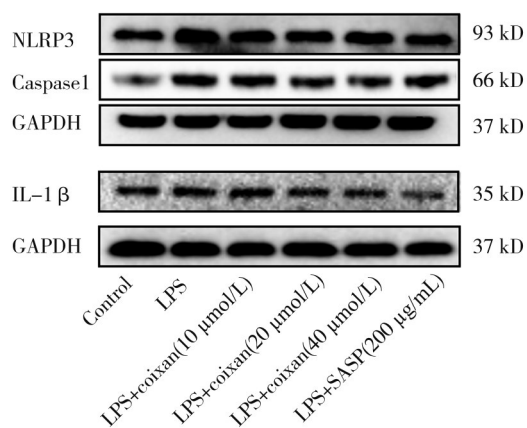


图9 各组 NCM460 中焦亡相关蛋白表达

3 讨论

UC 是 IBD 的一种亚型,为慢性终身疾病,临床特征主要包括复发缓解过程、特发性肠道炎症、血性腹泻和体重减轻,病变主要影响远端结肠和直肠,其死亡率和癌变率高于其他类型结肠炎^[15]。目前 UC 的体外实验研究,广大临床和科研工作者在基础实验中,NCM460 细胞源于人类结肠组织细胞,NCM460 细胞与人体内结肠组织具有十分类似的生物学活性,可为研究生物体 UC 疾病的发生发展提供强有力的手段^[16-17]。通过查阅相关文献资料可知,LPS 是目前被基础实验研究者所熟知存在的体外复制 UC 模型使用最为广泛有效的致炎剂之一,并且能够十分接近模拟 UC 病理炎症损伤,他能诱导细胞促使多种促炎因子(如 TNF- α 、IL-1、IL-6 等)的合成及释放,大量炎症因子的释放和相互作用下甚至会诱发全身炎症“级联反应”,从而加重 UC 的病理进程^[18-20]。现在,对 UC 体外细胞模型成功建立与否的评价标准,大多数是以确认促炎细胞因子的高表达作为着力点,正是在 UC 疾病发病理论指导下,基于尽可能复制体内环境进行的,其中促炎因子 IL-1 β 、TNF- α 等常被基础研究者作为 UC 体外炎症模型建立成功的评价标准^[21-24]。综上所述,本实验采用 NCM460 作为 UC 基础研究的实验模型。本研究结果显示:在 48 h 时,(20 μ g/mL) LPS 诱导对 NCM460 细胞生长抑制较为适中,(20 μ g/mL) LPS 作用 NCM460 细胞 48 h 后,与正常组比较,模型组细胞上清液中促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 ROS 的分泌量明显增加,说明 LPS 此浓度和诱导时间对 NCM460 细胞已经造成炎症损伤,表明用 LPS 诱导 NCM460 导溃疡性结肠炎体外炎症损伤模型建立成功。因此本实验选择 20 μ g/mL 48 h 作为诱导溃疡性结肠炎体外炎症损伤模型的造模剂量诱

导和时间。

研究发现,其中过度的炎症反应是目前 UC 发病机制及防治机制研究的重点领域^[25-26],有效预防控制 UC 的发展是目前研究的重点及难点,并贯穿疾病全程。细胞焦亡是一种由消皮素 D(GSDMD)介导与炎症密切相关的程序性细胞死亡^[27],在机体内外各种因素刺激下,激活的 NOD 样受体热蛋白结构域 3(NLRP3)炎症小体,激活的 Caspase-1 处理白细胞介素 1 β 前体(pro-IL-1 β)和白细胞介素 18 前体(pro-IL-18)导致成熟细胞炎症因子的大量急剧释放,此外,切割 GSDMD,形成焦亡小体从而使细胞膜破裂穿孔,从而释放大促炎细胞因子,导致激烈的炎症损伤,加重了 UC 的病理进程。比如,Tian ZQ 等^[28]发现黄芪多糖能抑制 DSS 诱导的 UC 小鼠结肠组织中 NLRP3 炎症小体的激活,从而 GSDMD、IL-18 和 IL-1 β 的表达,抑制结肠组织细胞焦亡机制的发生,从而减轻 UC 的病理进程。另外,Liang J 等^[29]通过实验发现石斛多糖可以明显抑制 UC 小鼠细胞焦亡发生,其降低 DSS 诱导的急性 UC 死亡率,减轻结肠病理损伤,使促炎因子(IL-1 β 和 IL-18)和抗炎因子 IL-4、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)的失衡有效缓解。本实验研究也得到与上述研究文献类似的结果,本研究用薏苡仁多糖干预,从体外细胞炎症模型证实中、高剂量的 Coixan 可显著降低 IL-1 β 、TNF- α 的表达,虽然其降低疗效不如 SASP,但同样表明薏苡仁多糖具有降低细胞炎症反应的作用。为了更深入探薏苡仁多糖发挥抗炎作用的可能机制,结合以往的研究,通过 Western blot 法检测 NLRP3/Caspase-1 信号通路中细胞焦亡相关蛋白的表达,本研究用中、高剂量的薏苡仁多糖干预后,NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达明显下降,免疫荧光检测 Caspase-1 蛋白显示,高剂量的薏苡仁多糖干预后,Caspase-1 蛋白表达较模型组也显著降低。QPCR 法检测 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β mRNA 表达较模型组也显著降低。这表明薏苡仁多糖发挥抗炎作用可通过下调焦亡相关因子 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 的表达。

从整个实验结果不难看出,薏苡仁多糖和 SASP 对 NLRP3/Caspase-1 细胞信号通路中的关键焦亡分子 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 均有显著的下调作用,从而使其下游的促炎细胞因子减少来发挥抗炎作用。虽然整体上来看,薏苡仁多糖对相关因子的影响作用不如 SASP,可能受其他的影响因素,比如药物作用时间的影响,因为中药的起效效果相对漫长,需长时间用药作用效果才会更好,而本研究时间较短尚需进一步验证。

综上所述,薏苡仁多糖可能通过下调焦亡相关因子 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 的表达水平,从而抑制人结肠上皮细胞的细胞焦亡,发挥人结肠上皮细胞保护作用。初步探究了薏苡仁多糖发挥抗炎作用的可能机制,为薏苡仁多糖能够有效治疗 UC 提供了实验理论依据。

参 考 文 献

- [1] Park J, Cheon JH. Incidence and prevalence of inflammatory bowel disease across Asia[J]. Yonsei Med J, 2021, 62(2): 99-108.
- [2] Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, et al. Ulcerative colitis[J]. Lancet, 2017, 389(10080): 1756-1770.
- [3] Ng SC, Shi HY, Hamidi N, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies[J]. Lancet, 2017, 390(10114): 2769-2778.
- [4] 卢灿省,张鑫龙,石健,等.白头翁汤保留灌肠治疗湿热壅滞型溃疡性结肠炎临床观察[J]. 中医药临床杂志, 2017, 29(7): 1106-1108.
- [5] Lu CX, Zhang XL, Shi J, et al. Clinical observation of *Enema* in the treatment of stagnation of damp heat ulcerative colitis retention Baitouweng Decoction[J]. Clin J Tradit Chin Med, 2017, 29(7): 1106-1108.
- [6] 张培培,杨欣,梁国强,等.加味白头翁汤通过 p38 MAPK-MLCK 信号通路影响溃疡性结肠炎模型大鼠肠黏膜紧密连接蛋白[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(21): 5719-5726.
- [7] Zhang PP, Yang X, Liang GQ, et al. Jiawei Baitouweng Decoction affects intestinal mucosal tight junction proteins in rats with ulcerative colitis through p38 MAPK-MLCK signaling pathway[J]. China J Chin Mater Med, 2021, 46(21): 5719-5726.
- [8] Du L, Ha C. Epidemiology and pathogenesis of ulcerative colitis[J]. Gastroenterol Clin North Am, 2020, 49(4): 643-654.
- [9] Wei SC, Sollano J, Hui YT, et al. Epidemiology, burden of disease, and unmet needs in the treatment of ulcerative colitis in Asia[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 15(3): 275-289.
- [10] Zhang X, Zang J, Ma SZ, et al. Hollow microcapsules with ulcerative colitis therapeutic effects made of multifunctional Turkish galls extraction[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2019, 11(28): 25054-25065.
- [11] 张声生,沈洪,郑凯,等.溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识意见(2017)[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(8): 3585-3589.
- [12] Zhang SS, Shen H, Zheng K, et al. Consensus opinion of TCM diagnosis and treatment experts on ulcerative colitis (2017) [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2017, 32(8): 3585-3589.
- [13] Porter RJ, Kalla R, Ho GT. Ulcerative colitis: recent advances in the understanding of disease pathogenesis[J]. F1000Res, 2020, 9: 1333-1345.
- [14] 刘丽娟,王允亮,李军祥.靛蓝对溃疡性结肠炎体外炎症模型的作用[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(5): 1666-1669.
- [15] Liu LJ, Wang YL, Li JX. Study of indigo on ulcerative colitis inflammatory cell model *in vitro* [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2014, 29(5): 1666-1669.
- [16] 姜莎莎,臧思源,柳越冬,等.青黛对溃疡性结肠炎体外炎症模型的抗炎作用及机制[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(2): 1101-1104.
- [17] Jiang SS, Zang SY, Liu YD, et al. Anti-inflammatory effects and mechanism of Qingdai on experimental ulcerative colitis *in vitro* [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(2): 1101-1104.
- [18] 顾思臻,薛艳,高阳,等.青黛对溃疡性结肠炎肠上皮细胞炎症模型的抗炎机制研究[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(6): 67-71.
- [19] Gu SZ, Xue Y, Gao Y, et al. Anti-inflammatory mechanism of Qingdai (青黛) in model of intestinal epithelial cell inflammation after ulcerative colitis[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2021, 37(6): 67-71.
- [20] Chen XQ, Xu TT, Lv XY, et al. Ginsenoside Rh2 alleviates ulcerative colitis by regulating the STAT3/miR-214 signaling pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 274: 113997.
- [21] Gu PQ, Zhu L, Liu YJ, et al. Protective effects of paeoniflorin on TNBS-induced ulcerative colitis through inhibiting NF- κ B pathway and apoptosis in mice[J]. Int Immunopharmacol, 2017, 50: 152-160.
- [22] 杨一新,李桂源. LPS 所介导的信号转导通路研究进展[J]. 中南大学学报(医学版), 2006, 31(1): 141-145.
- [23] Yang YX, Li GY. Progression of lipopolysaccharide signal pathway[J]. J Cent South Univ Med Sci, 2006, 31(1): 141-145.
- [24] Herzum I, Renz H. Inflammatory markers in SIRS, sepsis and septic shock[J]. Curr Med Chem, 2008, 15(6): 581-587.
- [25] 尹岸民. 溃疡性结肠炎患者血浆炎症反应细胞因子水平的变化[J]. 吉林医学, 2011, 32(27): 5682.
- [26] Yin AM. Changes of plasma inflammatory cytokines in patients with ulcerative colitis[J]. Jilin Med J, 2011, 32(27): 5682.
- [27] 甘华田,欧阳钦,贾道全,等. 溃疡性结肠炎患者核因子- κ B 活化与细胞因子基因表达[J]. 中华内科杂志, 2002, 41(4): 252-255.
- [28] Gan HT, Ouyang Q, Jia DQ, et al. Activation of nuclear factor- κ B and its relationship with cytokine gene expression in colonic mucosa of ulcerative colitis patients[J]. Chin J Intern Med, 2002, 41(4): 252-255.
- [29] 马杰,陈韵之,田蕾. 黄芩多糖通过调节 JAK2/STAT3 通路和 IL-23/IL-17 炎症轴改善 DSS 诱导的 UC 模型小鼠的炎症[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2023, 44(3): 423-429.
- [30] Ma J, Chen YZ, Tian L. Scutellaria baicalensis polysaccharides alleviates the inflammation of DSS-induced UC model mice by regulating JAK2/STAT3 pathway and IL-23/IL-17 inflammatory axis[J]. J Sun Yat Sen Univ Med Sci, 2023, 44(3): 423-429.
- [31] Hanauer SB. Update on the etiology, pathogenesis and diagnosis of ulcerative colitis[J]. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2004, 1(1): 26-31.
- [32] Mukocytes stimulated *in vitro*: modulation by the anti-tumor necrosis factor- α antibody infliximab and comparison with the mucosal cytokine expression in patients with ulcerative colitis[J]. DNA Cell Biol, 2021, 40(2): 147-156.
- [33] et al. Quantitative gene expression of cytokines in peripheral blood lensl Res. 2007;150(4):223-232.
- [34] Porter RJ, Kalla R, Ho GT. Ulcerative colitis: recent advances in the understanding of disease pathogenesis[J]. F1000Res, 2020, 321(3): 1520-1531.
- [35] Wang SS, Shen L, Luo HS. Identification and validation of key miRNAs and a microRNA-mRNA regulatory network associated with ulcerative colitis[J]. DNA Cell Biol, 2021, 40(2): 147-156.
- [36] Lu FF, Lan ZX, Xin ZQ, et al. Emerging insights into molecular mechanisms underlying pyroptosis and functions of inflammasomes in diseases[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(4): 3207-3221.
- [37] Kantono M, Guo BC. Inflammasomes and cancer: the dynamic role of the inflammasome in tumor development[J]. Front Immunol, 2017, 8: 1132.
- [38] Lu FF, Lan ZX, Xin ZQ, et al. Emerging insights into molecular mechanisms underlying pyroptosis and functions of inflammasomes in diseases[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(4): 3207-3221.
- [39] Tian ZQ, Liu Y, Yang B, et al. Astagalus polysaccharide attenuates murine colitis through inhibition of the NLRP3 inflammasome[J]. Planta Med, 2017, 83(1/2): 70-77.
- [40] Liang J, Chen SX, Chen JH, et al. Therapeutic roles of polysaccharides from *Dendrobium Officinale* on colitis and its underlying mechanisms[J]. Carbohydr Polym, 2018, 185: 159-168.

(责任编辑:周一青)