

大豆苷元通过调控 NLRP3/GSDMD 信号通路对小鼠单核巨噬 RAW264.7 细胞焦亡的影响

齐璐瑶, 马宇慧, 孟佳磊, 叶慧, 雷鸣*
(上海中医药大学附属第七人民医院, 上海 200137)

摘要: 目的 探讨大豆苷元对小鼠单核巨噬 RAW264.7 细胞焦亡的影响。方法 采用脂多糖 (LPS) 联合三磷酸腺苷 (ATP) 诱导 RAW264.7 巨噬细胞构建焦亡模型, 设置对照组、LPS+ATP 组、地塞米松组 (5 $\mu\text{mol/L}$) 和大豆苷元 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 组。CCK8 法检测 RAW264.7 细胞增殖能力; 乳酸脱氢酶 (LDH) 释放法检测细胞损伤程度; Hoechst-PI 染色法观察细胞死亡率; ELISA 法检测细胞上清液肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL) -6 和 IL-1 β 水平; 荧光探针法检测细胞活性氧 (ROS) 水平; Western blot 法检测细胞 NLRP3 炎症小体相关蛋白 (NLRP3、Caspase-1 p20、Caspase-1 p45、GSDMD-N、GSDMD-FL) 表达。结果 与对照组比较, 大豆苷元各剂量组 RAW264.7 细胞增殖能力无明显变化 ($P>0.05$)。与 LPS+ATP 组比较, 细胞死亡率降低 ($P<0.05$), 细胞上清液 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平降低 ($P<0.05$), 细胞 ROS 水平降低, NLRP3 炎症小体相关蛋白表达降低 ($P<0.05$)。结论 大豆苷元可抑制由 LPS+ATP 诱导的 NLRP3 炎症小体激活, 缓解巨噬细胞焦亡, 减少炎症因子的释放。

关键词: 大豆苷元; RAW264.7 巨噬细胞; 细胞焦亡; NLRP3 炎症小体; NLRP3/GSDMD 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)06-1982-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.06.032

先天免疫系统是人体防御病原体的第一道防线。当病原体侵入人体时, 巨噬细胞表面的模式识别受体 (PRRs) 能够识别诸多病原体的特定分子结构^[1-3], 促使免疫细胞释放大量的炎症介质, 爆发炎症反应^[4]。作为细胞中的一种重要 PRRs, 核苷酸结合寡聚化结构域样受体 (NLRs) 参与调节炎症反应和免疫应答^[5-6]; NLRP3 是 NLRs 中的重要组成部分, 通过形成 NLRP3 炎症小体来介导 IL-1 β 的释放^[7]。NLRP3 炎症小体是一种多聚体蛋白复合物, 包括 NLRP3、含 CARD 结构域的凋亡相关斑点样蛋白 (ASC)、Caspase-1 等成分, 其激活受到细胞内环境的调控, 如细胞内离子平衡、活性氧 (ROS) 水平等^[8-9]。NLRP3 炎症小体的形成促使 pro-Caspase-1 转变为活化的 Caspase-1, 进而促使成熟的 IL-1 β 、IL-18 及细胞焦亡执行蛋白 GSDMD-N 的产生, 诱发细胞焦亡^[10]。

大豆苷元是一种天然的异黄酮类化合物, 被广泛应用于抗炎、抗氧化、心血管保护等领域^[11]。研究表明, 大豆苷元可通过抑制 MAPK 和 NF- κ B 通路减轻 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症反应^[12]; 通过抑制 NLRP3/Caspase-1 信号轴减轻高糖诱导的肾小管上皮细胞焦亡^[13]。课题组前期研究发现, 大豆苷元具有优良的抗炎活性, 但未进一步探讨其可能机制^[14]。本研究通过构建 RAW264.7 细胞焦亡

模型, 探究大豆苷元的抗炎效果是否与 NLRP3 炎症小体的激活和焦亡相关。

1 材料

1.1 试剂与药物 TNF- α 、IL-6 ELISA 试剂盒 (批号 1217202、1210602, 深圳市达科为医疗科技有限公司); IL-1 β ELISA 试剂盒 (规格 EK-201B/3-96, 杭州联科生物技术股份有限公司); LDH 试剂盒 (货号 A020-2-2, 南京建成生物工程研究所有限公司); 活性氧检测试剂盒、RIPA 裂解液、BCA 定量试剂盒、Hoechst-PI 试剂盒 (货号 S0033S、P0013、P0009、C1056, 上海碧云天生物技术股份有限公司); 磷酸酶抑制剂、预制胶试剂盒、蛋白上样缓冲液、12.5% PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (货号 GRF102、PG113、LT103、PG113, 上海雅酶生物科技有限公司); 蛋白酶抑制剂、胎牛血清 [货号 20124ES03、40130ES76, 翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司]; 增强型化学发光检测试剂盒、DMEM 基础培养基、CCK8 试剂盒 (货号 MA0186、MA0212、MA0218, 大连美仑生物技术有限公司); NLRP3、Caspase-1、cleaved Caspase-1、GSDMD、cleaved GSDMD、GAPDH 一抗 (货号 15101、83383、89332、69469、10137、92310, 美国 CST 公司)。大豆苷元 (货号 BP0445, 纯度 $\geq 98\%$, 成都普瑞法科技开发有限公

收稿日期: 2024-07-29

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82174189); 上海市浦东新区联合公关项目 (PW2021D-05); 上海市浦东新区中医高端人才引进工程 (PDZY-2022-0701)

作者简介: 齐璐瑶 (1996—), 女, 博士生, 从事中西医结合治疗急危重症的研究。Tel: 17862969121, E-mail: 1102624674@qq.com

* **通信作者:** 雷鸣 (1968—), 男, 硕士, 博士生导师, 主任医师, 从事中西医结合治疗急危重症的研究。Tel: 13764950647, E-mail: leiming6891@163.com

司); LPS、ATP、地塞米松(货号L2630、A2383、D1756, 美国Sigma公司)。

1.2 细胞 小鼠单核巨噬RAW264.7细胞(货号CL-0190, 武汉普诺赛生命科技有限公司)。

1.3 仪器 多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司); 冷冻高速离心机(德国Eppendorf公司); WB电泳仪、转膜仪、显影仪(美国Bio-Rad公司); 正倒置荧光显微镜(德国徕卡公司)。

2 方法

2.1 细胞培养、分组及造模 RAW264.7细胞置于含10%胎牛血清的DMEM培养基中, 在37℃含5% CO₂的细胞培养箱中培养, 于光学显微镜下观察细胞的生长状态, 每1~2 d进行细胞换液及传代。通过LPS(100 ng/mL终质量浓度刺激4 h)和ATP(4 mmol/L终浓度刺激30 min)联合刺激建立细胞焦亡模型。细胞分为对照组, LPS+ATP组, 大豆苷元10、20、40 μmol/L组, 地塞米松组(5 μmol/L)。

2.2 CCK8法检测细胞增殖能力 将RAW264.7细胞接种于96孔板中, 每孔2×10⁴个细胞, 培养12 h后, 各孔加入含不同浓度(0、5、10、20、40、80、160 μmol/L)大豆苷元的培养基培养1 d后, 改用含10% CCK8溶液的DMEM培养基培养, 1 h后在450 nm波长处测定光密度(OD)值。

2.3 乳酸脱氢酶(LDH)释放法检测细胞损伤程度 将RAW264.7细胞种于96孔板中, 每孔2×10⁴个细胞, 培养12 h后加入含不同浓度大豆苷元(10、20、40 μmol/L)、地塞米松(5 μmol/L)的培养基, 预给药1 h后, 按“2.1”项下方法造模。收集各组细胞上清液, 离心, 按LDH试剂盒说明书检测LDH水平。

2.4 Hoechst-PI染色法观察细胞死亡率 将RAW264.7细胞种于6孔板中, 每孔1×10⁶个细胞, 培养12 h后, 加入含不同浓度大豆苷元(10、20、40 μmol/L)、地塞米松(5 μmol/L)的培养基, 预给药1 h后, 按“2.1”项下方法造模。弃去培养基, 预冷PBS清洗细胞2次, 加入Hoechst-PI染色工作液, 每孔1 mL。将孔板置于4℃冰箱中孵育0.5 h。弃去工作液, PBS清洗细胞2次, 于荧光显微镜下观察并拍照, 利用Image J软件分析图像中PI阳性细胞数量。

2.5 ELISA法检测细胞上清液TNF-α、IL-6、IL-1β水平 细胞按“2.1”项下方法处理, 取细胞上清液, 按ELISA试剂盒说明书操作, 检测TNF-α、IL-6和IL-1β水平。

2.6 2, 7-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)荧光探针法检测ROS水平 细胞按“2.1”项下方法处理, 预冷PBS清洗2次, 加入DCFH-DA(1:2 000)荧光探针稀释液, 每孔1 mL, 37℃恒温培养20 min, 除去染色工作液, PBS清洗2次, 于荧光显微镜下观察并采集图像, 采用Image J软件对ROS平均荧光强度进行量化测定。

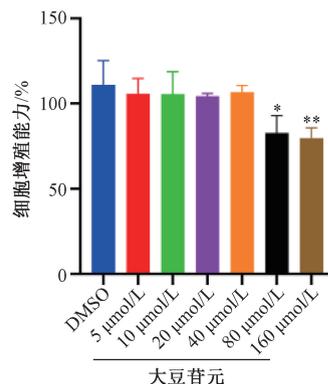
2.7 Western blot法检测NLRP3炎症小体相关蛋白表达 细胞按“2.1”项下方法处理, 弃去培养基, 预冷PBS清洗

细胞2次, 每孔中加入等量细胞裂解液, 低温充分裂解后12 000 r/min离心20 min, 收取上清液, BCA法定测定蛋白浓度。取适量蛋白, 用缓冲液配制成样品, 95℃加热10 min至蛋白变性, 蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳后, 移至PVDF膜上, 以脱脂奶粉溶液进行封闭, 加一抗(1:1 000)4℃孵育过夜, 加二抗室温孵育1 h, 显影液曝光后以Image J软件分析目的蛋白条带灰度值。

2.8 统计学分析 通过GraphPad Prism 8.0软件进行处理, 数据以($\bar{x}\pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

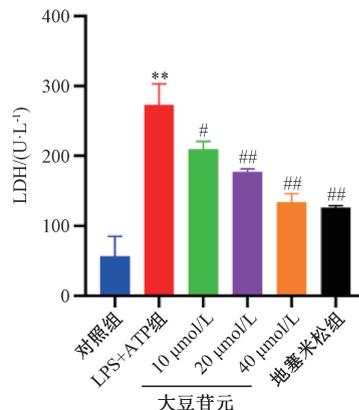
3.1 大豆苷元对RAW264.7细胞焦亡模型增殖能力的影响 由图1可知, 大豆苷元在5~40 μmol/L浓度范围内对RAW264.7细胞的增殖无明显影响($P>0.05$)。故选用10、20、40 μmol/L给药浓度进行后续实验。



注: 与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图1 不同浓度大豆苷元对RAW264.7细胞焦亡模型增殖能力的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.2 大豆苷元对RAW264.7细胞焦亡模型上清液LDH水平的影响 当焦亡发生时, 细胞肿胀破裂, 大量LDH会被释放到细胞外。如图2所示, 与对照组比较, LPS+ATP组细胞上清液LDH水平升高($P<0.01$); 与LPS+ATP组比较, 大豆苷元各剂量组细胞上清液LDH水平降低($P<0.05$, $P<0.01$)。

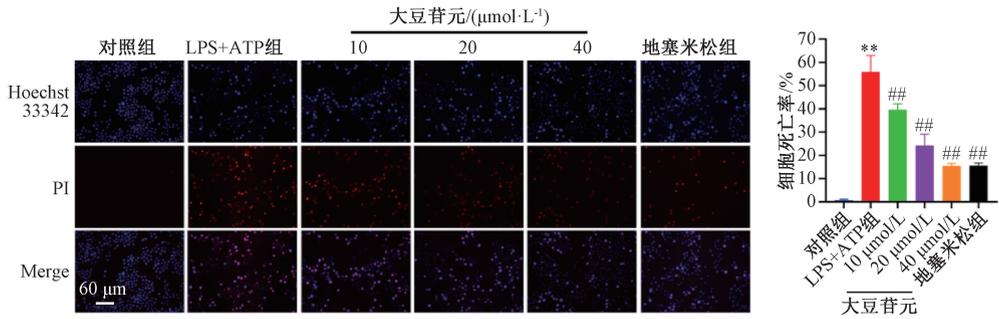


注: 与对照组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, # $P<0.05$, ### $P<0.01$ 。

图2 大豆苷元对RAW264.7细胞焦亡模型上清液LDH水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.3 大豆苷元对 RAW264.7 细胞焦亡模型死亡率的影响 PI 染料可以染色死细胞并发出红色荧光，正常活细胞不会被染色。如图 3 所示，与对照组比较，LPS+ATP 组细胞死亡

率升高 ($P < 0.01$)，说明细胞损伤情况严重；与 LPS+ATP 组比较，大豆苷元各剂量组细胞死亡率降低 ($P < 0.01$)，且呈剂量依赖性。

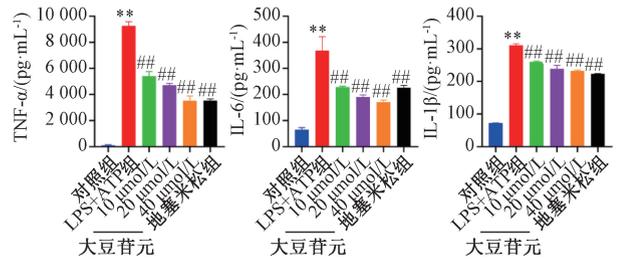


注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，## $P < 0.01$ 。

图 3 大豆苷元对 RAW264.7 细胞焦亡模型死亡率的影响 ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.4 大豆苷元对 RAW264.7 细胞焦亡模型上清液 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平的影响 如图 4 所示，与对照组比较，LPS+ATP 组细胞上清液促炎细胞因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平升高 ($P < 0.01$)；与 LPS+ATP 组比较，大豆苷元各剂量组上清液 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平降低 ($P < 0.01$)，且呈剂量依赖性。

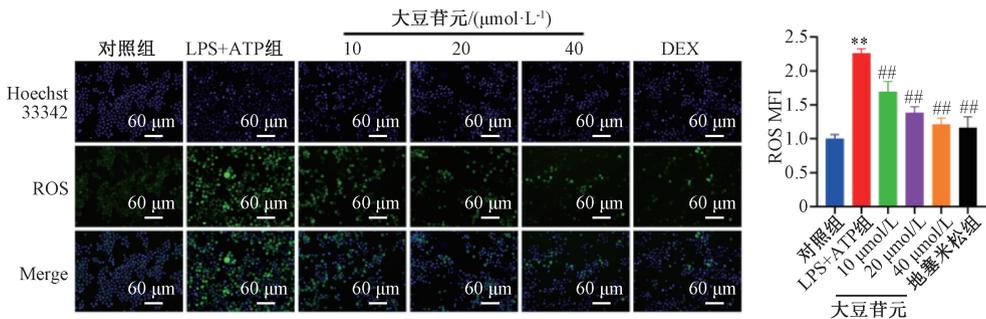
ROS 水平降低 ($P < 0.01$)，且呈剂量依赖性。



注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，## $P < 0.01$ 。

图 4 大豆苷元对 RAW264.7 细胞焦亡模型上清液 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.5 大豆苷元对 RAW264.7 细胞焦亡模型 ROS 水平的影响 ROS 的大量释放可导致巨噬细胞中 NLRP3 炎症小体的激活，诱发细胞焦亡。如图 5 所示，与对照组比较，LPS+ATP 组细胞绿色荧光明显，ROS 水平升高 ($P < 0.01$)；与 LPS+ATP 组比较，大豆苷元各剂量组细胞绿色荧光减弱，



注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，## $P < 0.01$ 。

图 5 大豆苷元对 RAW264.7 细胞焦亡模型 ROS 水平的影响 ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

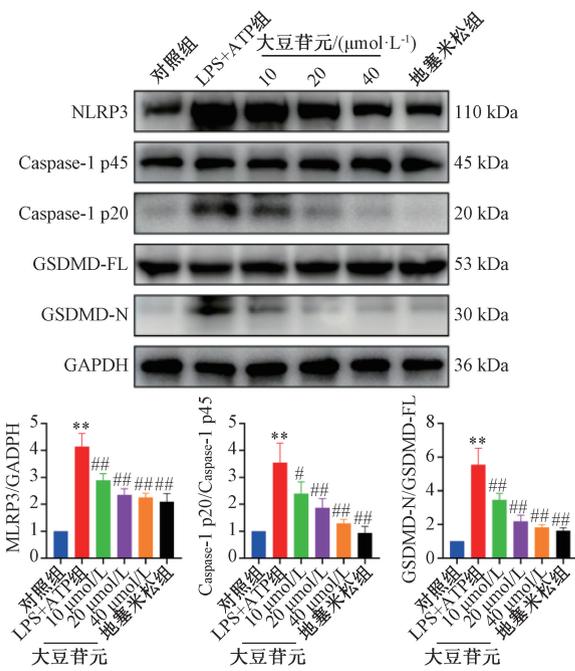
3.6 大豆苷元对 RAW264.7 细胞焦亡模型 NLRP3 炎症小体相关蛋白表达的影响 如图 6 所示，与对照组比较，LPS+ATP 组 NLRP3、cleaved Caspase-1、cleaved GSDMD 蛋白表达升高 ($P < 0.01$)；与 LPS+ATP 组比较，大豆苷元各剂量组 NLRP3、cleaved Caspase-1、cleaved GSDMD 蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，且呈剂量依赖性。结果表明，大豆苷元能抑制 RAW264.7 细胞焦亡模型中 NLRP3 炎症小体的激活，缓解炎症反应，改善细胞焦亡。

找新的高效抗炎药物至关重要。本研究发现大豆苷元可抑制 LPS 联合 ATP 诱导的 NLRP3 炎症小体激活，降低焦亡执行蛋白 GSDMD-N 表达，抑制促炎细胞因子 (TNF- α 、IL-6、IL-1 β) 和 ROS 生成，进而抑制巨噬细胞焦亡。

NLRP3 炎症小体介导的细胞焦亡和炎症反应是机体对抗刺激的重要自我保护机制。NLRP3 炎症小体的异常激活与多种炎症性疾病密切相关，如脓毒症、神经退行性疾病、炎症性肠病、动脉粥样硬化等^[17-19]。ATP 可与细胞膜 P2X7 受体结合，引起细胞钾离子外流和钙离子内流，促使 NLRP3 炎症小体激活^[20]。本研究发现，在 LPS 联合 ATP 双重刺激下，NLRP3 蛋白表达升高，IL-1 β 、LDH 水平及细胞死亡率升高；大豆苷元可抑制 RAW264.7 细胞焦亡模型

4 讨论

机体对损伤或感染的防御可能会导致过度炎症反应。过度炎症和氧化应激会造成组织受损和器官功能障碍，同时也促进了慢性炎症性疾病的发生和发展^[15-16]。因此，寻



注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

图6 大豆苷元对RAW264.7细胞焦亡模型NLRP3炎症小体相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

释放LDH,降低细胞死亡率,改善巨噬细胞膜损伤,降低细胞上清液TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平,抑制巨噬细胞炎症反应。细胞应激及线粒体功能障碍使得ROS水平升高,限制ROS水平可抑制NLRP3炎症小体激活^[5,21]。大豆苷元可抑制RAW264.7细胞焦亡模型释放ROS,提示大豆苷元可能通过影响ROS的生成来抑制NLRP3炎症小体的激活。GSDMD是触发焦亡的关键执行者,NLRP3炎症小体可剪切形成活化的Caspase-1,Caspase-1的激活可以切割生成GSDMD-N、IL-1 β 等细胞因子并释放到细胞外,诱导细胞焦亡和炎症级联反应^[22-23]。大豆苷元可显著降低NLRP3、Caspase-1 p20、GSDMD-N蛋白表达,抑制细胞焦亡。

综上所述,大豆苷元通过抑制巨噬细胞中NLRP3炎症小体激活,改善细胞焦亡,发挥抗炎作用,还可能通过影响ROS的生成抑制NLRP3炎症小体的激活。本研究为大豆苷元及其来源中药治疗NLRP3相关炎症性疾病提供了理论支撑。

参考文献:

[1] 张东玥,郑国光.巨噬细胞的固有免疫记忆研究进展[J].中国细胞生物学学报,2022,44(1):120-128.
[2] 宋丹,熊晓蕃,杨雨,等.巨噬细胞极性重塑在疾病和组织稳态中的作用[J].中国细胞生物学学报,2022,44(5):904-923.
[3] Moretti J, Blander J M. Increasing complexity of NLRP3 inflammasome regulation[J]. *J Leukoc Biol*, 2021, 109(3): 561-571.
[4] He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation[J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(12): 1012-1021.

[5] Wang L X, Ren W, Wu Q J, et al. NLRP3 inflammasome activation; a therapeutic target for cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15: 847440.
[6] Hoseini Z, Sepahvand F, Rashidi B, et al. NLRP3 inflammasome: its regulation and involvement in atherosclerosis[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(3): 2116-2132.
[7] Shen H H, Yang Y X, Meng X, et al. NLRP3: a promising therapeutic target for autoimmune diseases[J]. *Autoimmun Rev*, 2018, 17(7): 694-702.
[8] Danielski L G, Giustina A D, Bonfante S, et al. The NLRP3 inflammasome and its role in sepsis development[J]. *Inflammation*, 2020, 43(1): 24-31.
[9] Meyers A K, Zhu X. The NLRP3 inflammasome: metabolic regulation and contribution to inflamming[J]. *Cells*, 2020, 9(8): 1808.
[10] Swanson K V, Deng M, Ting J P Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics[J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19(8): 477-489.
[11] Laddha A P, Kulkarni Y A. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, toxicity, and formulations of daidzein: an important isoflavone[J]. *Phytother Res*, 2023, 37(6): 2578-2604.
[12] Tan Y, Zhang X T, Cheang W S. Isoflavones daidzin and daidzein inhibit lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264.7 macrophages[J]. *Chin Med*, 2022, 17(1): 95.
[13] 陈才伟,吴月平,王转锁,等.大豆苷元减轻高糖诱导的肾小管上皮细胞焦亡[J].中国细胞生物学学报,2023,43(12):1801-1807.
[14] Ma Y H, Xu H, Chen G, et al. Uncovering the active constituents and mechanisms of Rujin Jiedu Powder for ameliorating LPS-induced acute lung injury using network pharmacology and experimental investigations[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1186699.
[15] Gentek R, Molawi K, Sieweke M H. Tissue macrophage identity and self-renewal[J]. *Immunol Rev*, 2014, 262(1): 56-73.
[16] Hmama Z, Peña-Díaz S, Joseph S, et al. Immuno-evasion and immunosuppression of the macrophage by *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Immunol Rev*, 2015, 264(1): 220-232.
[17] Li Z, Guo J L, Bi L Q. Role of the NLRP3 inflammasome in autoimmune diseases[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130: 110542.
[18] Mangan M S J, Olhava E J, Roush W R, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(8): 588-606.
[19] Shi X Y, Tan S C, Tan S P. NLRP3 inflammasome in sepsis (Review) [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(1): 514.
[20] Xu J, Núñez G. The NLRP3 inflammasome: activation and regulation[J]. *Trends Biochem Sci*, 2023, 48(4): 331-344.
[21] Ding S J, Xu S, Ma Y, et al. Modulatory mechanisms of the NLRP3 inflammasomes in diabetes[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(12): 850.
[22] Ding J J, Wang K, Liu W, et al. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family[J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 111-116.
[23] Kovacs S B, Miao E A. Gasdermins: effectors of pyroptosis[J]. *Trends Cell Biol*, 2017, 27(9): 673-684.