

刁佳雯,徐慧,马新月,等. 没食子酸对脂多糖诱导的人 THP1 巨噬细胞炎症反应的抑制作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(4): 41-53.

Diao JW, Xu H, Ma XY, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammatory response by gallic acid in human THP1 macrophages [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(4): 41-53.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.04.006

没食子酸对脂多糖诱导的人 THP1 巨噬细胞炎症反应的抑制作用

刁佳雯,徐 慧,马新月,全吉淑*

(延边大学医学院,吉林 延吉 133002)

【摘要】 目的 探讨没食子酸(gallic acid,GA)对脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)诱导的人 THP1 巨噬细胞炎症反应的抑制作用。**方法** 将人 THP1 单核细胞用佛波酯(phorbol myristate acetate,PMA)分化为巨噬细胞,用 LPS 诱导建立巨噬细胞炎症模型,给予不同浓度 GA 进行保护。CCK-8 法筛选 LPS 和 GA 对 THP1 细胞的安全浓度;设正常组、模型组(100 μ g/L LPS)和 GA 组(100 μ g/L LPS+不同浓度 GA)。ELISA 法检测各组细胞培养液白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)水平,微板法检测各组细胞培养液乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)活性和一氧化氮(nitric oxide,NO)含量,荧光染色检测各组细胞活性氧(ROS)水平、细胞损伤情况和线粒体跨膜电位的变化,Western blot 法检测各组细胞环氧合酶-2(COX-2)、高迁移率蛋白 B1(HMGB1)、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)、细胞外调节蛋白激酶(ERK)、P38 丝裂原活化蛋白激酶(P38)、核转录因子- κ B(NF- κ B)、NOD 样受体 3(NOD-like receptor protein 3,NLRP3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)、IL-1 β 和消皮素 D(Gasdermin D,GSDMD)蛋白表达的影响。**结果** 与正常组比较,模型组细胞培养液 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 和 NO 的分泌增多($P<0.05$),COX-2、HMGB1、p-ERK、p-JNK、p-P38、p-NF- κ B、NLRP3、Caspase-1 和 IL-1 β 蛋白表达升高($P<0.05$),GSDMD 蛋白表达水平降低($P<0.05$),ROS 生成和细胞损伤明显增多,线粒体跨膜电位较正常组显著降低,LDH 活性显著升高($P<0.05$);与模型组比较,GA 组细胞培养液 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 和 NO 的分泌减少($P<0.05$),COX-2、HMGB1、p-ERK、p-JNK、p-P38、p-NF- κ B、NLRP3、Caspase-1 和 IL-1 β 蛋白表达降低($P<0.05$),GSDMD 蛋白表达水平升高($P<0.05$),ROS 生成和细胞损伤减少,线粒体跨膜电位逐渐升高,LDH 活性降低($P<0.05$)。**结论** GA 对 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞炎症反应具有抑制作用,其抗炎机制可能涉及 MAPK 和 NF- κ B 信号通路。

【关键词】 THP1 细胞;炎症;没食子酸;脂多糖

【中图分类号】 R-33

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-7856 (2024) 04-0041-13

Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammatory response by gallic acid in human THP1 macrophages

DIAO Jiawen, XU Hui, MA Xinyue, QUAN Jishu*

(Medical College of Yanbian University, Yanji 133002, China)

【Abstract】 Objective To investigate the inhibitory effect of gallic acid (GA) on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses in human THP1 macrophages. **Methods** THP1 monocytes were differentiated into

【基金项目】 国家自然科学基金地区科学基金项目(82060113)。

【作者简介】 刁佳雯(1998—),女,硕士研究生,研究方向:天然成分的活性研究。E-mail:946904980@qq.com

【通信作者】 全吉淑(1968—),女,博士,教授,研究方向:天然成分的活性研究。E-mail:quanjs@ybu.edu.cn

macrophages with phorbol myristate acetate. A macrophage inflammation model was established with LPS induction, and GA was added at different concentrations. The safe concentrations of LPS and GA for THP1 cells were screened using the CCK-8 method, and a normal group, model group (100 μg/L LPS), and GA group (100 μg/L LPS + different concentrations of GA) were set up. ELISA was used to detect the levels of interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor-α (TNF-α), and IL-1β in the cell culture media of each group. The microplate method was used to detect lactate dehydrogenase (LDH) activity and NO content in the cell cultures, and fluorescence staining was used to detect the reactive oxygen species (ROS) levels, cell damage, and changes in mitochondrial transmembrane potential in each group. Western blot was performed to detect the levels of cyclooxygenase-2 (COX-2), HMGB1, c-Jun amino-terminal kinase (JNK), extracellular-regulated protein kinase (ERK), P38 mitogen-activated protein kinase (P38), nuclear transcription factor-κB (NF-κB), NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), Caspase-1, IL-1β, and gasdermin D (GSDMD). **Results** Compared with the normal group, the model cell group's secretion of IL-6, TNF-α, IL-1β, and NO was increased ($P < 0.05$); the secretion of COX-2, HMGB1, p-ERK, p-JNK, and p-P38 and expression of p-NF-κB, NLRP3, Caspase-1, IL-1β were elevated ($P < 0.05$); expression of GSDMD protein activation fragment was reduced ($P < 0.05$); ROS generation and cellular damage were significantly increased; mitochondrial transmembrane potential was significantly lower; and LDH activity was elevated ($P < 0.05$). In comparison with the model group, the GA group cells' secretion of IL-6, TNF-α, IL-1β, and NO was decreased ($P < 0.05$); expression of COX-2, HMGB1, p-ERK, p-JNK, p-P38, p-NF-κB, NLRP3, Caspase-1, and IL-1β was decreased ($P < 0.05$); GSDMD protein activation fragment expression level was increased ($P < 0.05$); ROS generation and cellular damage were decreased; mitochondrial transmembrane potential gradually increased; and LDH activity was decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** GA had an inhibitory effect on the LPS-induced inflammatory response in THP1 macrophages, and its anti-inflammatory mechanism may involve the MAPK and NF-κB signaling pathways.

【Keywords】 THP1 cells; inflammation; gallic acid; lipopolysaccharide
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

没食子酸(gallic acid, GA)是我国传统中草药植物的主要成分之一,常见于五倍子、掌叶大黄、山茱萸、没食子等^[1]。据报道,GA 具有多种药理作用,包括抗炎、心血管保护、抗菌等,可用于治疗糖尿病、肝纤维化等常见疾病^[2]。没食子也常用于各种抗炎的中药配方中,如由黄连、没食子、地锦草组成的肠炎宁胶囊用于治疗急、慢性胃肠炎;以没食子为主要成分的西帕依固龈液,对牙龈可起到一定的消炎作用^[3-4]。据文献报道,GA 可抑制 RAW264.7 小鼠巨噬细胞的炎症反应^[5]。GA 不仅副作用少,价格可负担,而且显著增强机体的免疫功能^[6]。这些均提示 GA 具备发展为抗炎新药的潜力。然而,GA 抗炎作用研究多停留在抗炎、抗氧化等生物活性水平上,并未见相关的分子机制研究^[5]。炎症的发生与炎症小体密切相关,炎症小体活化被称为炎症反应的核心,参与多种自身免疫性疾病的发生。近年来,慢性炎症疾病中炎症小体的活化和调控机制已成为研究热点。炎症小体是哺乳动物免疫细胞中的一种多聚蛋白复合物,研究最多的是由 NOD 样受体 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3)、凋亡相关斑点样蛋白 (ASC) 及前体 (Pro)-caspase-1 组成的 NLRP3 炎症小体。NLRP3

或 Caspase-1 的失活可阻止炎症的激活^[7]。细胞焦亡(Pyroptosis)又称细胞炎性坏死,由炎性小体引发,是一种由 Caspase 蛋白酶参与、Gasdermin D 介导的程序性细胞死亡,使细胞膜丧失完整性并形成孔洞,释放出包括乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)在内的细胞内容物,引发炎症反应^[8-9]。炎症小体被认为是体内炎症的“开关”,一旦被启动,会促使机体分泌大量炎症介质,引发或加重炎症反应。过度的细胞焦亡可能会引发持续性炎症反应,导致炎症性疾病的发生。因此,抑制 NLRP3 炎症小体的组装、活化和减少巨噬细胞的焦亡,是抑制或减缓炎症反应的关键。在前人研究基础上,本实验从炎症小体、细胞焦亡方面深入探讨 GA 的抗炎作用机制。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是一种强效的致炎因子,通常用来构建细胞炎症模型^[10]。脓毒症研究中,体外炎症模型经常选用 LPS 诱导完成,该模型具有很好的模拟性,因此,本实验选用 LPS 来诱导细胞炎症模型^[11]。机体可通过 LPS 刺激,激活包括 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)、P38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen activated protein kinase, P38)、细胞外调节蛋白激酶(extracellular

regulated protein kinase, ERK) 在内的丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路以及核转录因子- κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 通路, 进而释放大量白介素-6 (interleukin 6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β) 等炎症因子, 从而引起炎症反应^[12]。THP1 细胞, 来源于急性单核细胞性白血病患者, 具有球形单细胞悬浮特征, 在一定条件下, 可被刺激分化为巨噬细胞^[13]。巨噬细胞被认为是人类先天免疫的最重要功能细胞, 在维持机体稳态中发挥重要作用, 可通过启动或缓解炎症, 以对抗入侵的抗原和抗原呈递。当机体受到外界刺激时, 巨噬细胞会从小体积、静息状态被激活, 启动多条与炎症相关的信号通路并释放炎症因子^[14]。本实验以佛波酯 (phorbol myristate acetate, PMA) 诱导的 THP1 巨噬细胞为研究对象, 探讨 GA 对 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞炎症反应的抑制作用, 并阐明其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 细胞

人 THP1 单核细胞购自美国 ATCC 公司。

1.2 主要试剂与仪器

GA 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司 (货号 G104231); LPS 购自美国 Sigma 公司 (货号 I2880); NF- κ B p65 (货号 #8242)、p-NF- κ B p65 (货号 #3036)、环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) (货号 #12282)、ERK (货号 #4695)、p-ERK (货号 #4370)、JNK (货号 #9252)、p-JNK (货号 #4668)、P38 (货号 #8690)、p-P38 (货号 #9216)、Gasdermin D (货号 #93709)、IL-1 β (货号 #12703) 均购自美国 CST 公司; NLRP3 (货号 3840AA01)、Caspase-1 (货号 3840AA30) 抗体购自 Thermo Fisher Scientific 公司; β -actin (货号 AC026) 抗体购自 ABclonal 集团公司; 羊抗兔二抗 (货号 SA00001-2)、羊抗鼠二抗 (货号 SA00001-1) 购自美国 Proteintech Group 公司; IL-6 (生产批号 0317230140)、TNF- α (生产批号 0428230193) 和 IL-1 β (生产批号 0317230134) 酶联免疫吸附分析 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒均购自美国 RayBiotech 公司; CCK-8 试剂盒 (货号 K1018) 购自美国 ApexBIO 公司; RPMI-1640 培养基 (货号 C11875500BT)、胎牛血清 (货号 12484028) 购自美国 GIBCO 公司; 细胞凋亡

荧光 Hoechst33342/PI 双染试剂盒 (货号 CA1120) 购自 Solarbio 公司; SB203580 (产品编号 S1863-1 mg)、SP600125 (产品编号 S1876-5 mg)、U0126 (产品编号 S1901-1 mg)、BAY11-7082 (产品编号 SF0011-10 mM)、活性氧检测试剂盒 (货号 S0033 S)、线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1, 货号 C2006) 购自碧云天生物有限公司; LDH 乳酸脱氢酶试剂盒 (货号 A020-2-2) 购自南京建成生物工程研究所。RT-2100 型酶标仪购自美国 Bio-Tek 公司; UVP 全自动凝胶成像仪购自美国 UVP 公司; DYCZ-24DN 电泳仪购自中国北京六一生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养、传代及分化

在 37 °C 和 5% CO₂ 的条件下, 将 THP1 细胞培养于 RPMI-1640 培养液中。根据细胞生长情况, 每 3~4 d 传代 1 次。随即利用 100 μ g/L 的 PMA 诱导, 将其分化为巨噬细胞, 并进行后续实验。

1.3.2 LPS 对人 THP1 巨噬细胞活力的影响

将 PMA 诱导后的 THP1 巨噬细胞以 5×10^4 /mL 接种于 96 孔板中, 在 37 °C 和 5% CO₂ 环境下培养。待 THP1 重新贴壁后, 更换含不同浓度 LPS (0、100、200、400、800 和 1000 μ g/L) 的无血清细胞培养液, 继续培养 24 h。设置 5 个复孔。随后, 使用 CCK-8 试剂盒检测 THP1 巨噬细胞的存活率。细胞存活率/% = 测定孔 OD 值/空白孔 OD 值 $\times 100\%$

1.3.3 LPS 对人 THP1 巨噬细胞 COX-2 蛋白表达的影响

按照方法 1.3.2 处理细胞, 收集各组细胞, 并在冰上裂解 30 min, 在 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min 提取蛋白, 进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 与相应 COX-2、 β -actin 抗体在 4 °C 下孵育过夜, 与相应 HRP 标记的二抗在室温中孵育 1 h, ECL 显色, 进行条带灰度分析, 并计算蛋白相对表达率。

1.3.4 GA 对人 THP1 巨噬细胞活力的影响

将 PMA 诱导后的 THP1 巨噬细胞以 5×10^4 /mL 接种于 96 孔板中, 在 37 °C 和 5% CO₂ 环境下培养。待 THP1 重新贴壁后, 更换含不同浓度 GA (0、10、20、40、80 和 160 μ mol/L) 的无血清细胞培养液, 继续培养 24 h。设置 5 个复孔。随后, 使用 CCK-8 试剂盒检测 THP1 巨噬细胞的存活率。

1.3.5 GA 对 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、NO、LDH 分泌的影响

将诱导后的 THP1 巨噬细胞分成正常组、模型

组(LPS 刺激浓度为 100 $\mu\text{g/L}$)和 GA 低、中、高剂量组(GA 浓度分别为 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$),培养 24 h 后,收集细胞培养液,并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3000 r/min 条件下离心 5 min 后取上清。根据试剂盒说明书,检测细胞培养液中 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、NO、LDH 分泌水平。

1.3.6 GA 对 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞损伤的影响

根据方法 1.3.5 处理细胞,收集各组细胞于 6 孔板中,加入配好的 Hoechst/PI 染液,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。染色后,利用荧光倒置显微镜观察并拍照。

1.3.7 GA 对 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞 ROS 水平的影响

根据方法 1.3.5 进行细胞分组及处理,收集各组细胞于 6 孔板中,加入稀释好的 DCFH-DA,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。染色后,利用荧光倒置显微镜进行 ROS 荧光强度检测。

1.3.8 GA 对 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞线粒体膜电位的影响

根据方法 1.3.5 处理细胞,收集各组细胞于 6 孔板中,加入配好的 JC-1 工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。染色后,利用荧光倒置显微镜观察并拍照。

1.3.9 GA 对 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞 COX-2、HMGB1、MAPK、NF- κB 、NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、GSDMD 蛋白表达的影响

根据方法 1.3.5 处理细胞,收集各组细胞,进行 SDS-PAGE 电泳。分别与 COX-2、HMGB1、 β -actin、p-JNK、p-P38、p-ERK、JNK、P38、ERK、p-NF- κB 、NF- κB 、NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、GSDMD 抗体在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下

孵育过夜,与相应二抗孵育,ECL 显色,进行条带灰度分析,并计算各蛋白相对表达率。

1.3.10 GA 与 MAPK、NF- κB 抑制剂联合作用对 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞 MAPK、NF- κB 蛋白表达的影响

选用 JNK、ERK、P38、NF- κB 通路抑制剂 SP600125、U0126、SB203580、BAY11-7082,分别验证 GA 对相关通路的抑制作用。将 THP1 巨噬细胞分成正常组、模型组、抑制剂(SP600125(10 $\mu\text{mol/L}$, JNK 抑制剂)、SB203580(10 $\mu\text{mol/L}$, P38 抑制剂)、U0126(10 $\mu\text{mol/L}$, ERK 抑制剂)和 BAY11-7082(30 $\mu\text{mol/L}$, NF- κB 抑制剂))组、GA 组(80 $\mu\text{mol/L}$)和抑制剂联合 GA(GA+SP600125、GA+SB203580、GA+U0126 和 GA+BAY11-7082)组。分别与相应抗体在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜,与相应二抗孵育,ECL 显色,进行条带灰度分析,并计算各蛋白相对表达率。

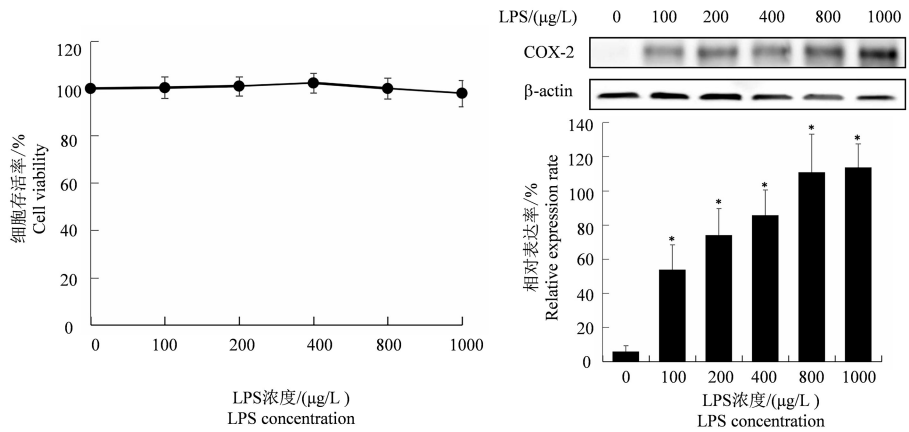
1.4 统计学方法

实验数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,应用 Prism 软件进行 t 检验以及方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS 诱导的巨噬细胞炎症模型的构建

如图 1 所示,0~1000 $\mu\text{g/L}$ LPS 处理后,THP1 巨噬细胞的存活率均在(100 $\pm$ 5)%范围内,表明 LPS 对细胞存活率没有明显影响($P>0.05$)。但不同浓度的 LPS 处理后,THP1 巨噬细胞 COX-2 蛋白表达水平显著增高($P<0.05$)。当 LPS 浓度为 100



注:与正常组比较,* $P<0.05$ 。

图 1 LPS 诱导的巨噬细胞炎症模型的构建

Note. Compared with normal group, * $P<0.05$.

Figure 1 Construction of a model of LPS-induced macrophage inflammation

μg/L 时,COX-2 蛋白表达已显著增加,提示炎症反应显著增强。根据以上结果,在后续实验中,选择 100 μg/L LPS 来刺激 THP1 巨噬细胞,以构建炎症模型。

2.2 GA 对人 THP1 巨噬细胞活力的影响

CCK-8 结果显示:在 GA 浓度为 0~160 μmol/L 时,THP1 巨噬细胞的存活率均在 (100±5)% 范围内,表明 GA 对细胞存活率没有明显影响 ($P>0.05$)。因此,选择 20、40 和 80 μmol/L GA 作为后续实验中各药物组的药物浓度。见图 2。

2.3 GA 对 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞 IL-6、TNF-α、IL-1β、NO 分泌的影响

THP1 巨噬细胞在 LPS 刺激下,可升高细胞培养液中炎症因子 IL-6、TNF-α、IL-1β、NO 的释放水平 ($P<0.05$)。而加入 GA 后,抑制炎症因子 IL-6、TNF-α、IL-1β、NO 的释放量 ($P<0.05$),抑制炎症反应进一步恶化。见表 1。

2.4 GA 对 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞 COX-2、HMGB1 蛋白表达的影响

THP1 巨噬细胞在 LPS 刺激下,模型组细胞内

炎症因子 COX-2、HMGB1 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$)。加入 GA 后,COX-2、HMGB1 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$),且随着 GA 浓度升高,COX-2、HMGB1 蛋白表达量呈降低趋势。在 GA 浓度为 80 μmol/L 时,蛋白表达量最低。见图 3。

2.5 GA 对 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞 NLRP3、Caspase-1、IL-1β 蛋白表达的影响

THP1 巨噬细胞在 LPS 刺激下可升高细胞内 NLRP3、Caspase-1、IL-1β 蛋白表达水平 ($P<0.05$)。加入 GA 后,降低 NLRP3、Caspase-1、IL-1β 蛋白表达水平 ($P<0.05$),提示,GA 可抑制 NLRP3 炎症小体的组装生成,降低下游 IL-1β、Caspase-1 的活化与释放。见图 4。

2.6 GA 对 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞 GSDMD 蛋白表达的影响

THP1 巨噬细胞在 LPS 刺激下显著降低 GSDMD 蛋白表达水平 ($P<0.05$)。加入 GA 后,可显著升高 GSDMD 蛋白表达水平 ($P<0.05$),提示 GA 可抑制 GSDMD 切割为具有生物活性的 N 端片段。见图 5。

表 1 各组细胞培养液中炎症因子水平($n=3,\bar{x}\pm s$)					
Table 1 Levels of inflammatory factors in culture medium of cells in various groups					
组别 Groups	剂量/(μmol/L) Dosages	IL-6/(ng/L)	TNF-α/(ng/L)	IL-1β/(ng/L)	NO/(μmol/L)
正常组 Normal group	/	4.7±2.6	240.0±8.0	1.99±0.29	16.4±5.8
模型组 Model group	/	121.8±4.7 [*]	1071.1±6.3 [*]	7.26±0.04 [*]	140.7±17.6 [*]
GA 低剂量组 GA low dose group	20	94.6±9.9 [#]	984.0±8.7 [#]	6.47±0.38 [#]	93.2±18.2 [#]
GA 中剂量组 GA medium dose group	40	54.9±6.0 [#]	752.0±10.6 [#]	5.05±1.27 [#]	81.0±20.2 [#]
GA 高剂量组 GA high dose group	80	44.6±7.3 [#]	400.9±8.0 [#]	3.37±2.22 [#]	63.0±20.8 [#]

注:与正常组比较, $^*P<0.05$;与模型组比较, $^{\#}P<0.05$ 。
Note. Compared with the normal group, $^*P<0.05$. Compared with the model group, $^{\#}P<0.05$.

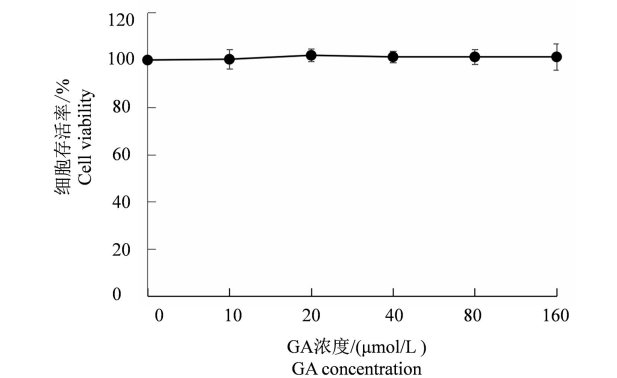


图 2 GA 对 THP1 巨噬细胞活力的影响
Figure 2 Effect of GA on the viability of THP1 macrophages

2.7 GA 对 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞损伤的影响

如图 6,Hoechst/PI 染色检测结果显示,正常组细胞中蓝色荧光强度微弱,可见少量细胞呈红色荧光,提示细胞膜较为完整。与正常组比较,模型组中细胞呈强蓝色荧光,可见大量细胞呈红色荧光,提示细胞膜损伤较重。与模型组比较,GA 各剂量组细胞亮蓝色荧光强度减弱,红色荧光细胞数量减少,提示 GA 可降低细胞损伤程度。

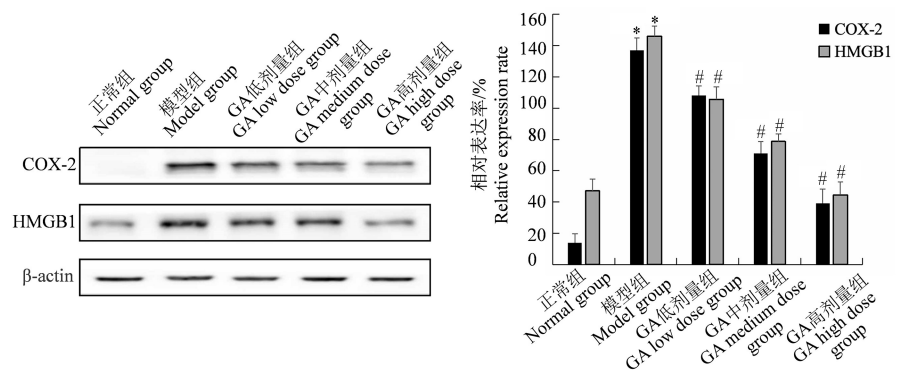
2.8 GA 对 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞 LDH 活性的影响

如图 7,微板检测结果显示,与正常组比较,模

型组中 LDH 活性明显升高 ($P<0.05$); 而与模型组比较, GA 组中 LDH 活性明显降低 ($P<0.05$), 提示 GA 能够通过降低 LPS 诱导的 THP1 巨噬细胞损伤程度, 从而减少 LDH 的释放。

2.9 GA 对 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞线粒体膜电位的影响

JC-1 聚合物荧光染色结果显示, 正常组细胞呈强红色荧光, 与正常组比较, 模型组红色荧光强度

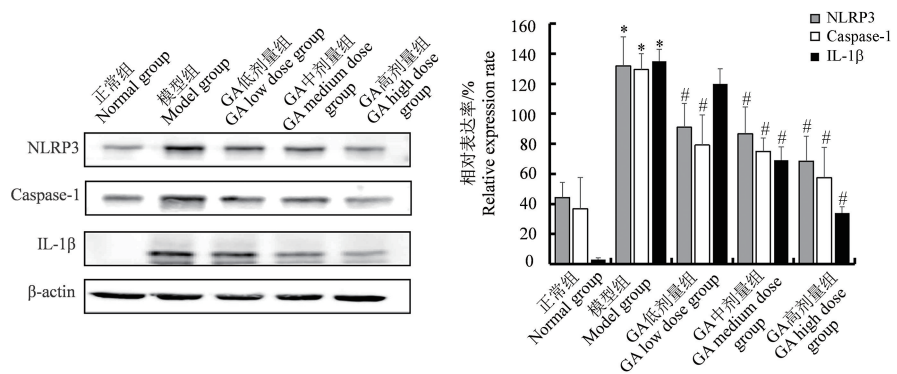


注: 与正常组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, # $P<0.05$ 。

图 3 GA 对 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞 COX-2、HMGB1 蛋白表达的影响

Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$.

Figure 3 Effect of GA on COX-2 and HMGB1 protein expression in LPS-induced THP1 macrophages

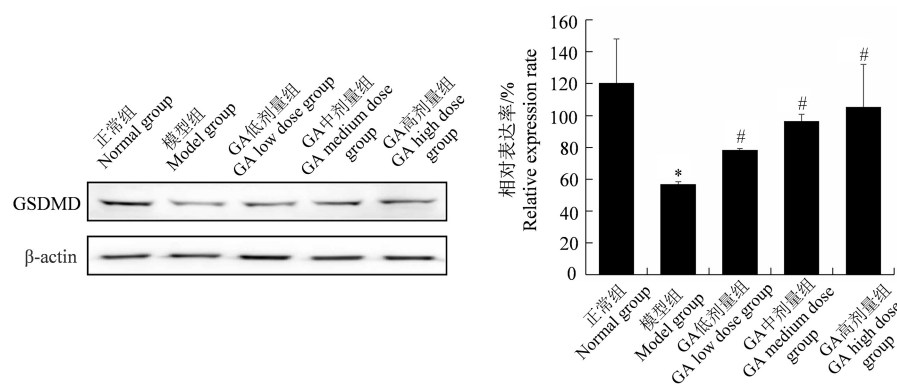


注: 与正常组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, # $P<0.05$ 。

图 4 GA 对 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞 NLRP3、Caspase-1 和 IL-1β 蛋白表达的影响

Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$.

Figure 4 Effect of GA on NLRP3, Caspase-1 and IL-1β protein expression in LPS-induced THP1 macrophages



注: 与正常组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, # $P<0.05$ 。

图 5 GA 对 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞 GSDMD 蛋白表达的影响

Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$.

Figure 5 Effect of GA on GSDMD protein expression in LPS-induced THP1 macrophages

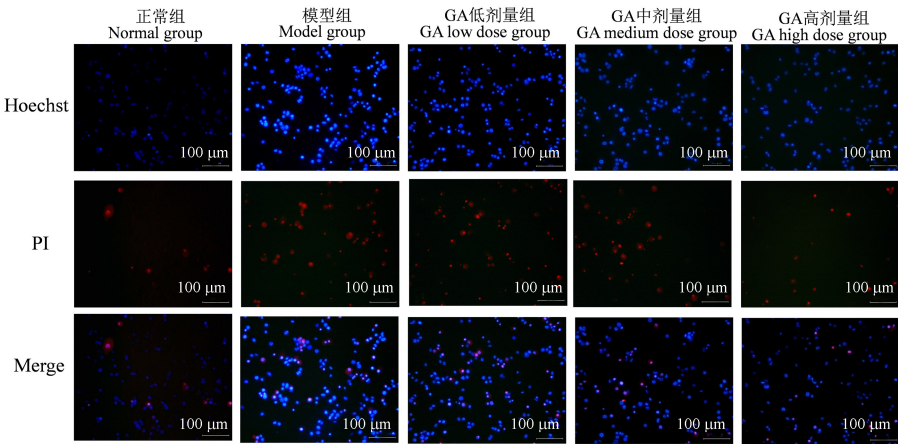
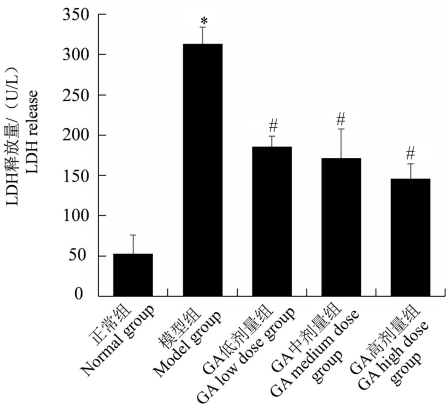


图 6 Hoechst/PI 双染试剂盒染色观察各组 THP1 巨噬细胞损伤情况

Figure 6 Cellular damage in THP1 macrophages in various groups by Hoechst/PI staining method



注:与正常组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, # $P<0.05$ 。
图 7 GA 对 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞 LDH 活性的影响
Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$.

Figure 7 Effect of GA on LPS-induced LDH activity in THP1 macrophages

减弱。与模型组比较,GA 各剂量组红色荧光强度逐渐增强。JC-1 单体荧光染色结果显示,正常组细胞绿色荧光强度微弱,与正常组比较,模型组绿色荧光强度增强,与模型组比较,GA 各剂量组绿色荧光强度显著降低。提示模型组线粒体跨膜电位较正常组显著降低,GA 各剂量组随着药物浓度的升高,线粒体跨膜电位逐渐升高。见图 8。

2.10 GA 对 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞 ROS 水平的影响

DCFH-DA 检测结果显示,正常组细胞中绿色荧光强度微弱,提示细胞生成的 ROS 较少。与正常组比较,模型组中 ROS 水平升高。与模型组比较,GA 各剂量组中 ROS 水平呈降低趋势。见图 9。

2.11 GA 对 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞 JNK、ERK、P38 蛋白表达的影响

THP1 巨噬细胞在 LPS 刺激下可显著升高 JNK、ERK、P38 磷酸化水平 ($P<0.05$)。加入 GA 后,可抑制 THP1 巨噬细胞内 JNK、ERK、P38 磷酸化水平 ($P<0.05$)。提示 GA 抗 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞的炎症反应可能与 MAPK 信号通路有关。见图 10。

2.12 GA 与 JNK 抑制剂联合作用对人 THP1 巨噬细胞 JNK 蛋白表达的影响

本实验选用 JNK 抑制剂 SP600125,探讨 GA 通过调控 JNK 信号通路发挥抗炎作用机制。验证结果显示,与 GA 单独作用相比,SP600125+GA 组中 JNK 磷酸化水平显著降低 ($P<0.05$)。提示,GA 抗 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞的炎症反应与 JNK 信号通路有关。见图 11。

2.13 GA 与 ERK 抑制剂联合作用对人 THP1 巨噬细胞 ERK 蛋白表达的影响

本实验选用 ERK 抑制剂 U0126,探讨 GA 通过调控 ERK 信号通路发挥抗炎作用机制。验证结果显示,与 GA 单独作用相比,U0126+GA 组中 ERK 磷酸化水平显著降低 ($P<0.05$)。提示 GA 抗 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞的炎症反应与 ERK 信号通路有关。见图 12。

2.14 GA 与 P38 抑制剂联合作用对人 THP1 巨噬细胞 P38 蛋白表达的影响

本实验选用 P38 抑制剂 SB203580,探讨 GA 通过调控 P38 信号通路发挥抗炎作用机制。验证结果显示,与 GA 单独作用相比,SB203580+GA 组中 P38 磷酸化水平显著降低 ($P<0.05$)。提示 GA 抗

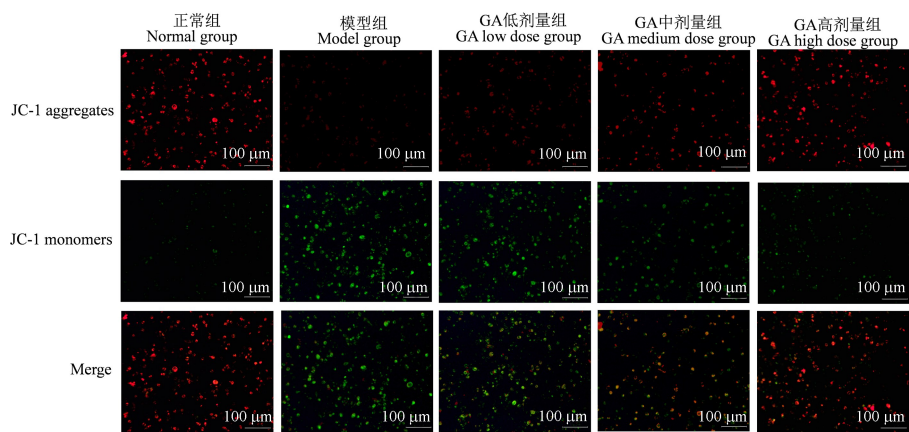


图 8 JC-1 荧光染色观察各组 THP1 巨噬细胞线粒体膜电位

Figure 8 Mitochondrial membrane potential of THP1 macrophages in each group observed by JC-1 fluorescence staining

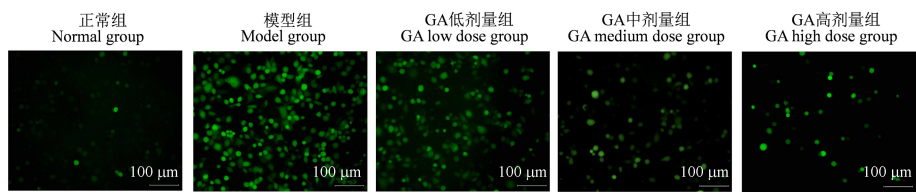
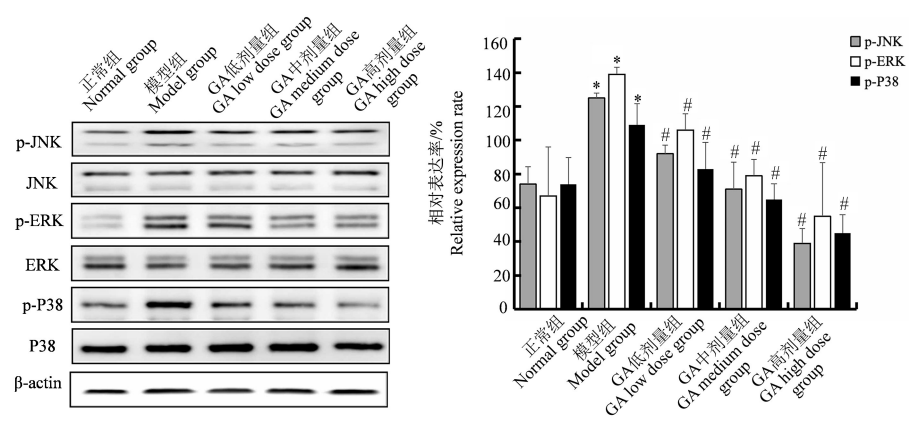


图 9 DCFH-DA 法检测各组 THP1 巨噬细胞 ROS 水平

Figure 9 Levels of ROS in THP1 macrophages in various groups by DCFH-DA method



注:与正常组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, # $P<0.05$ 。

图 10 GA 对 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞 JNK、ERK 和 P38 蛋白表达的影响

Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$.

Figure 10 Effect of GA on JNK, ERK and P38 protein expression in LPS-induced THP1 macrophages

LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞的炎症反应与 P38 信号通路有关。见图 13。

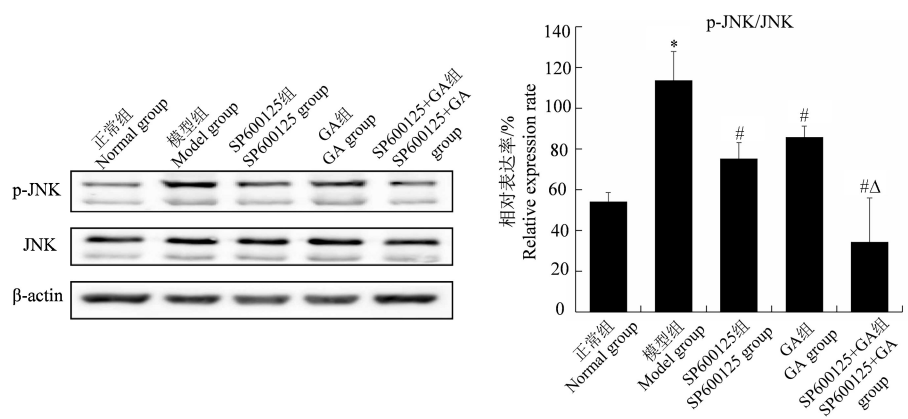
2.15 GA 对 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞 NF- κ B 蛋白表达的影响

如图 14 结果显示可知, THP1 巨噬细胞在 LPS 刺激下可显著升高 NF- κ B 磷酸化水平 ($P<0.05$)。加入 GA 后, 可抑制 THP1 巨噬细胞内 NF- κ B 磷酸化水平 ($P<0.05$)。提示 GA 抗 LPS 诱导的人

THP1 巨噬细胞的炎症反应可能与 NF- κ B 信号通路有关。

2.16 GA 与 NF- κ B 抑制剂联合作用对人 THP1 巨噬细胞 NF- κ B 蛋白表达的影响

如图 15 所示, 本实验选用 NF- κ B 抑制剂 BAY11-7082, 探讨 GA 通过调控 NF- κ B 信号通路发挥抗炎作用机制。验证结果显示, 与 GA 单独作用相比, BAY11-7082+GA 组中 NF- κ B 磷酸化水平显

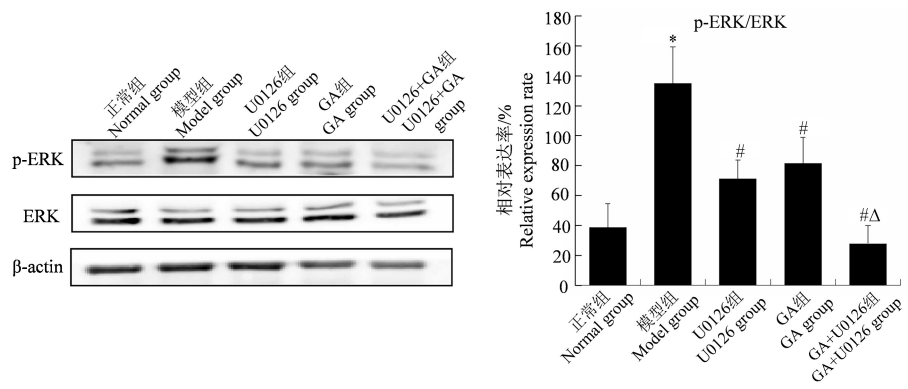


注:与正常组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, # $P<0.05$;与 GA 组比较, Δ $P<0.05$ 。

图 11 GA 与 SP600125 联合作用对 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞 JNK 蛋白表达的影响

Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$. Compared with the GA group, Δ $P<0.05$.

Figure 11 Effect of GA and SP600125 on JNK protein expression in LPS-induced THP1 macrophages

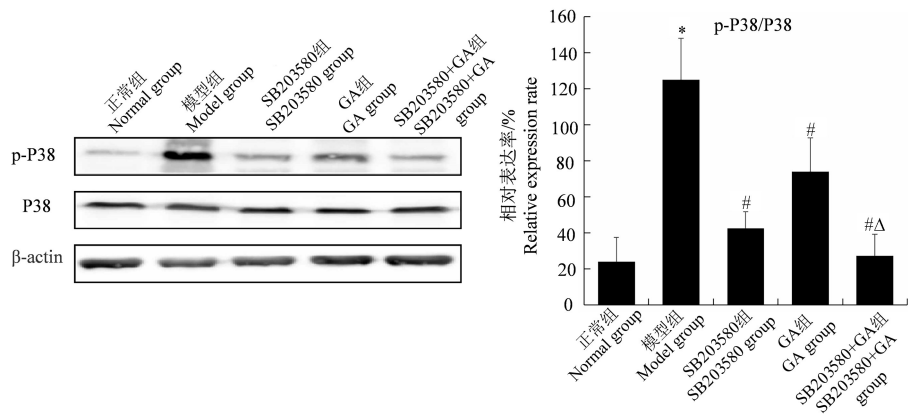


注:与正常组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, # $P<0.05$;与 GA 组比较, Δ $P<0.05$ 。

图 12 GA 与 U0126 联合作用对 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞 ERK 蛋白表达的影响

Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$. Compared with the GA group, Δ $P<0.05$.

Figure 12 Effect of GA and U0126 on ERK protein expression in LPS-induced THP1 macrophages

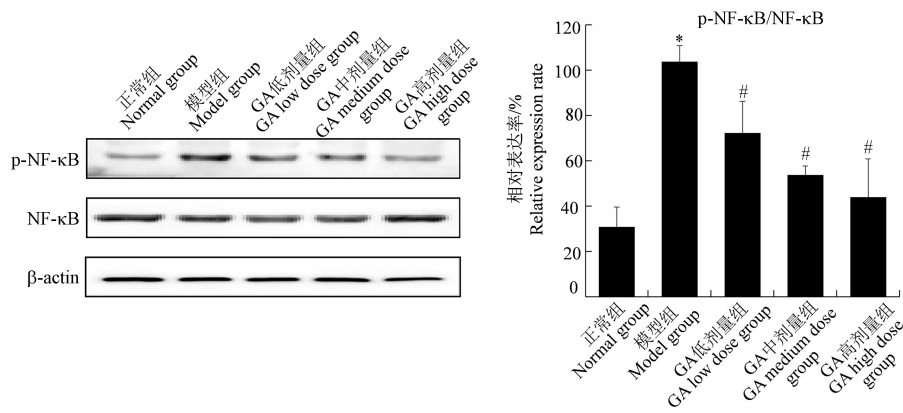


注:与正常组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, # $P<0.05$;与 GA 组比较, Δ $P<0.05$ 。

图 13 GA 与 SB203580 联合作用对 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞 P38 蛋白表达的影响

Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$. Compared with the GA group, Δ $P<0.05$.

Figure 13 Effect of GA and SB203580 on P38 protein expression in LPS-induced THP1 macrophages

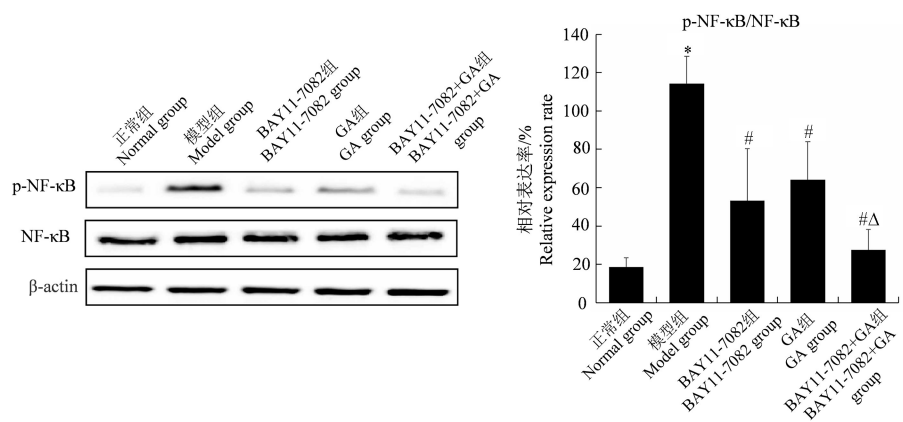


注:与正常组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, # $P<0.05$ 。

图 14 GA 对 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞 NF- κ B 蛋白表达的影响

Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$.

Figure 14 Effect of GA on NF- κ B protein expression in LPS-induced THP1 macrophages



注:与正常组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, # $P<0.05$;与 GA 组比较, Δ $P<0.05$ 。

图 15 GA 与 BAY11-7082 联合作用对 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞 NF- κ B 蛋白表达的影响

Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$. Compared with the GA group, Δ $P<0.05$.

Figure 15 Effect of GA and BAY11-7082 on NF- κ B protein expression in LPS-induced THP1 macrophages

著降低($P<0.05$)。提示 GA 抗 LPS 诱导的人 THP1 巨噬细胞的炎症反应与 NF- κ B 信号通路有关。

3 讨论

炎症反应是一种常见的机体保护自身安全的生物学反应。当病原微生物或其它有毒刺激物入侵机体时,炎症可以减轻组织损伤,在机体中发挥着重要的保护作用^[15]。一般认为,一旦触发炎症的因素被消除,炎症会随着促炎因子消散和免疫细胞的死亡或分散而消失^[16]。因此,可通过降低炎症介质的表达来改善慢性炎症。在受到 LPS 刺激时,机体可释放大量的 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子,同时激活与炎症相关的信号通路,如经典的 MAPK、NF- κ B 信号通路,引起炎症反应^[17]。IL-6、TNF- α 和 IL-

1 β 是促炎细胞因子中的重要代表,他们的分泌水平能够表达炎症反应的严重程度^[18]。COX-2 是前列腺素生物合成的关键酶,通常被认为是炎症的生物标志物^[19-21]。NO 是机体中极为关键的一种促炎介质,被视为检测炎症反应严重程度的敏感指标^[22]。HMGB1 在正常情况下,多位于细胞核中,而在炎症状态下可被转移至细胞质或细胞外,是介导感染、组织损伤和炎症的重要因子^[23]。本实验结果显示,在 LPS 的刺激下,IL-6、TNF- α 、IL-1 β 和 NO 的分泌增多,COX-2 及 HMGB1 蛋白表达水平升高,而 GA 可降低 LPS 诱导的炎症因子的表达量,对 LPS 诱导的 THP1 巨噬细胞炎症反应具有抑制作用。

机体在 LPS 与 ATP 的共同作用下,产生大量

NLRP3 炎症小体,将 Pro-caspase-1 切割为具有生物活性的 Caspase-1,而活化后的 Caspase-1 将 Pro-IL-1 β 裂解为成熟的、具有生物活性的 IL-1 β ,将无活性的 GSDMD 切割成活性 N 端片段,使其转移至细胞膜,引起细胞肿胀、破裂,引起细胞外培养液中的 LDH 活性升高^[24-25]。本研究结果显示,GA 可抑制 NLRP3 炎症小体的组装生成,降低下游 IL-1 β 、Caspase-1 的活化与释放,并抑制 GSDMD 被剪切活化为 N 端片段,降低细胞外 LDH 活性,防止 THP1 巨噬细胞炎症反应的进一步加重。

ROS 是细胞内氧化还原反应的正常代谢产物,主要是由线粒体氧化产生,但过量的 ROS 可能会引发细胞凋亡、炎症等一系列有害反应^[26-27]。ROS 通过激活 NF- κ B 通路,引发炎症,促进炎症因子 IL-1 β 等的分泌^[28-29]。通过荧光染色发现,正常组细胞 ROS 生成较少,可见少量细胞损伤,线粒体膜电位正常,而模型组细胞 ROS 生成和细胞损伤明显增多,线粒体跨膜电位较正常组显著降低,GA 各剂量组 ROS 生成及细胞损伤呈下降趋势,线粒体跨膜电位逐渐升高。

MAPK 信号通路由多种蛋白组成,构成一个复杂的级联反应,ERK、JNK 和 P38 是 MAPK 的 3 个主要亚家族,均可调控细胞分化、增殖等生理过程^[30-32]。在 LPS 刺激下,ERK、JNK、P38 磷酸化后,诱导炎症反应,并释放大量炎性因子^[24]。NF- κ B 信号通路是多数免疫细胞共有的核心信号通路,被人们广泛认为是经典的促炎信号通路^[33]。NF- κ B 以 p50 和 p65 组成的异二聚体存在于细胞中,与其抑制蛋白 I κ B 结合在一起,阻止入核,因此在体内是处于非活性的状态,当受到 LPS 等外界刺激时,NF- κ B 可被激活进入到细胞核内,引起机体炎症反应,导致下游多种炎症因子表达^[34-36]。磷酸化的 MAPK 与 NF- κ B 一同作用,刺激机体释放 IL-6、TNF- α 等炎症因子,从而进一步促进炎症相关疾病的恶化^[37]。本研究结果显示,模型组中 p-ERK、p-JNK、p-P38 和 p-NF- κ B 蛋白表达水平均升高,而 GA 可降低其磷酸化水平,提示 GA 可通过调节 MAPK、NF- κ B 信号通路而发挥抗炎作用。

综上所述,GA 能够抑制 LPS 诱导的 THP1 巨噬细胞炎症反应,其作用与抑制 NF- κ B、MAPK 通路,抑制炎症小体活化及细胞焦亡相关。GA 有较强的抗炎功能,其资源丰富、毒性小、制取容易。此外,GA 可抑制炎症小体活化以及细胞焦亡,而活化 IL-

1 β 以及焦亡引起的细胞内容物释放是炎症反应加重的重要原因,因此,GA 对肝损伤、脓毒症等炎症相关疾病的防治有着重要的意义,具有很高的药用价值和广泛的应用前景。

参考文献:

- [1] 曾茂林. 石榴皮鞣质主要单体成分抗膀胱癌 T24 细胞活性的筛选及作用机理研究 [D]. 武汉: 武汉大学, 2019.
ZENG M L. Screening of anti bladder cancer T24 cells activity of pomegranate peel tannins main monomers and researching on the mechanism [D]. Wuhan: Wuhan University, 2019.
- [2] 史海燕. 没食子酸生物活性研究进展 [J]. 吉林医药学院学报, 2020, 41(2): 146-149.
SHI H Y. Research progress in bioactivity of Gallic acid [J]. J Jilin Med Univ, 2020, 41(2): 146-149.
- [3] 刘莉, 李婷婷, 孔卫东, 等. HPLC 法测定肠炎宁胶囊中没食子酸的含量 [J]. 内江科技, 2017, 38(3): 23, 29.
LIU L, LI T T, KONG W D, et al. Determination of Gallic acid in Changyanning capsules by HPLC [J]. Nei Jiang Sci Technol, 2017, 38(3): 23, 29.
- [4] 阿依努尔·阿木提, 司马义江·阿布都热西提. HPLC 法测定西帕依固龈液不同制备方法中没食子酸的含量 [J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(19): 12-14.
AYINUER A, SIMAYIJIAN A. Determination of the content of xipayi mouth rinse different preparation method of Gallic acid in HPLC [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharmacy, 2017, 26(19): 12-14.
- [5] 黄丽华, 侯林, 薛海南, 等. 没食子酸通过拮抗脂多糖诱导的 TLR4/NF- κ B 活化抑制 RAW_{264.7} 巨噬细胞炎症反应 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(12): 1610-1614.
HUANG L H, HOU L, XUE H N, et al. Gallic acid inhibits inflammatory response of RAW_{264.7} macrophages by blocking the activation of TLR4/NF- κ B induced by LPS [J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2016, 32(12): 1610-1614.
- [6] BAI J, ZHANG Y, TANG C, et al. Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 133: 110985.
- [7] 何鸿宾. 冬凌草甲素抑制 NLRP3 炎症小体并缓解相关疾病的作用及机制探究 [D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2018.
HE H B. The effect and mechanism of oridonin in inhibition of NLRP3 inflammasome activation and alleviation of NLRP3-driven diseases [D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2018.
- [8] 郑淑娟, 邱鹏程, 王媛媛, 等. 重楼皂苷抗胶质瘤作用机制的研究进展 [J]. 环球中医药, 2022, 15(11): 2234-2242.
ZHENG S X, QIU P C, WANG Y Y, et al. Research progress on the mechanism of anti-glioma action of Paris saponin [J]. Glob Tradit Chin Med, 2022, 15(11): 2234-2242.
- [9] 李思佳, 贾连群, 战丽彬, 等. 高血压阴虚证大鼠主动脉细胞焦亡相关基因表达研究 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40

- (2): 47-51.
- LI S J, JIA L Q, ZHAN L B, et al. Study on expressions of cell pyroptosis related genes in aorta of hypertension rats with Yin deficiency syndrome [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2022, 40 (2): 47-51.
- [10] 郑雅君, 李美秀, 姜泽东, 等. 琼胶寡糖对脂多糖诱导的巨噬细胞 RAW_{264.7} 炎症反应的抑制作用 [J]. 中国食品学报, 2022, 22(6): 72-82.
- ZHENG Y J, LI M X, JIANG Z D, et al. Inhibition of Agar-oligosaccharides on the Lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction in macrophages RAW_{264.7} [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2022, 22(6): 72-82.
- [11] 杨泽, 王可洲, 于杨. 脂多糖结合蛋白和杀菌/通透性增加蛋白: 脓毒症的潜在治疗靶点 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 86-94.
- YANG Z, WANG K Z, YU Y. Lipopolysaccharide-binding protein and bactericidal/permeability-increasing protein: potential therapeutic targets in sepsis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 86-94.
- [12] 王圆圆, 白雅, 马晨超, 等. 瑞舒伐他汀改善缺氧/复氧引起的脑微血管内皮细胞损伤的作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(10): 1796-1804.
- WANG Y Y, BAI Y, MA C C, et al. Effect of rosuvastatin on cerebral microvascular endothelial cell injury induced by oxygen-glucose deprivation/reoxygenation [J]. Chin J Pathophysiol, 2018, 34(10): 1796-1804.
- [13] 干军. 肺癌细胞 HLA-G 分子表达抑制异种荷瘤小鼠肿瘤免疫排斥的作用及机制研究 [D]. 温州: 温州医科大学, 2019.
- GAN J. Effect and mechanism of HLA-G molecular expression in lung cancer cells on tumor immune rejection in xenogeneic tumor-bearing mice [D]. Wenzhou: Wenzhou Medical University, 2019.
- [14] 陈玉文, 李诗琪, 黄小鹏, 等. 基于 IL-6/STAT3、PI3K/Akt 通路探讨汉黄芩素对 LPS 诱导的 THP1 巨噬细胞炎症模型的影响 [J]. 中药材, 2022, 45(7): 1721-1725.
- CHEN Y W, LI S Q, HUANG X P, et al. Based on IL-6/STAT3 and PI3K/Akt pathways, the effects of wogonin on LPS-induced THP1 macrophage inflammation model were discussed [J]. J Chin Med Mater, 2022, 45(7): 1721-1725.
- [15] 李莺歌, 程雅佳, 张龙飞, 等. PGC-1 α 与炎症反应的研究进展 [J]. 生理科学进展, 2018, 49(2): 153-156.
- LI Y G, CHENG Y J, ZHANG L F, et al. Advances in the studies of PGC-1 α and inflammation [J]. Prog Physiol Sci, 2018, 49(2): 153-156.
- [16] LESLIE M. Inflammation's stop signals [J]. Science, 2015, 347(6217): 18-21.
- [17] 孙佳楠, 马若婷, 赵生俊, 等. 三种阿魏不同极性部位的抗炎活性谱效关系研究 [J]. 化学与生物工程, 2022, 39(3): 24-34.
- SUN J N, MA R T, ZHAO S J, et al. Spectrum-effect relationship of anti-inflammatory activity of different polar extracts of three kinds of *Ferula* [J]. Chem Bioeng, 2022, 39(3): 24-34.
- [18] 刘莉园, 张钊, 葛乃嘉, 等. 草苈蓉多糖对脂多糖诱导的 RAW_{264.7} 巨噬细胞炎症反应的影响 [J]. 中国药学杂志, 2021, 56(18): 1479-1485.
- LIU L Y, ZHANG Z, GE N J, et al. Effect of *Boschniakia rossica* polysaccharides on LPS-induced inflammation of RAW_{264.7} macrophages [J]. Chin Pharm J, 2021, 56(18): 1479-1485.
- [19] 李曦雯. 青蒿琥酯对人唾液腺腺样囊性癌 SACC-83 细胞系增殖及侵袭迁移能力影响的体外研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2018.
- LI X W. Effects of artesunate on the proliferation, invasion and metastasis of human adenoid cystic carcinoma SACC-83 cell line [D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2018.
- [20] 任晓璠, 孙宪昌, 王宇鑫, 等. Rg1 和 GR 阻断剂对脂多糖诱导的 BV2 小胶质细胞 iNOS 及 COX2 蛋白表达影响 [J]. 青岛大学医学院学报, 2016, 52(2): 148-149, 152.
- REN X F, SUN X C, WANG Y X, et al. The effect of Rg1 on the expressions of iNOS and COX2 in lipopolysaccharide-induced BV2 microglia [J]. Acta Acad Med Qingdao Univ, 2016, 52(2): 148-149, 152.
- [21] 任晓璠, 张庆鹏, 荣世阔, 等. 阿曼托双黄酮抑制脂多糖诱导的小鼠 BV-2 小胶质细胞炎症反应 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2020, 36(1): 14-19.
- REN X F, ZHANG Q P, RONG S K, et al. Amentoflavone inhibits inflammation of mouse BV-2 microglia cells induced by lipopolysaccharide [J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2020, 36(1): 14-19.
- [22] GUZIK T J, KORBUT R, ADAMEK-GUZIK T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation [J]. J Physiol Pharmacol, 2003, 54(4): 469-487.
- [23] 苏艳新, 张明香, 刘莎, 等. 地塞米松对哮喘小鼠中性粒细胞性气道炎症和 HMGB1 表达的影响 [J]. 解放军医学杂志, 2020, 45(2): 171-175.
- SU Y X, ZHANG M X, LIU S, et al. Effects of dexamethasone on neutrophil airway inflammation and HMGB1 expression in asthmatic mice [J]. Med J Chin People's Liberation Army, 2020, 45(2): 171-175.
- [24] 张天. 草苈蓉多糖对脂多糖诱导的小鼠 J774A.1 巨噬细胞炎症反应的抑制作用 [D]. 延吉: 延边大学, 2021.
- ZHANG T. Inhibitory effect of *Boschniakia rossica* polysaccharide on lipopolysaccharide-induced inflammatory response of mouse J774A.1 macrophage [D]. Yanji: Yanbian University, 2021.
- [25] 焦静雅. 鼠尾草酸基于 NLRP3 炎症小体调控酒精性脂肪肝中脂肪蓄积与炎症机制研究 [D]. 延吉: 延边大学, 2022.
- JIAO J Y. Mechanism of carnosic acid regulating fat accumulation and inflammation in alcoholic fatty liver based on NLRP3 inflammatory corpuscles [D]. Yanji: Yanbian University, 2022.
- [26] 李晓娜, 宋一菲, 史佩佩, 等. 机械牵拉对角膜成纤维细胞氧化应激、炎症因子和 MMP-9 表达的影响 [J]. 太原理工大

学学报, 2019, 50(4): 529-535.

LI X N, SONG Y F, SHI P P, et al. Effects of mechanical stretch on the oxidative stress, expression of inflammatory cytokines and MMP-9 in corneal fibroblasts *in vitro* [J]. J Taiyuan Univ Technol, 2019, 50(4): 529-535.

[27] 杨玲, 许速. 氧化应激与疾病发生的相关性 [J]. 西南国防医药, 2012, 22(11): 1268-1270.

YANG L, XU S. Correlation between oxidative stress and disease occurrence [J]. Med J Natl Defending Forces Southwest China, 2012, 22(11): 1268-1270.

[28] 李成华. TLR4 激活对于 PDLSCs 和 BMMSCs 成骨能力的影响及其机制探讨 [D]. 西安: 第四军医大学, 2014.

LI C H. The effects and possible mechanism of TLR4 ligation to the osteogenesis potential of PDLSCs and BMMSCs [D]. Xi'an: The Fourth Military Medical University, 2014.

[29] 钟兴明, 苗竹林, 崔蓉, 等. PCOS 不孕患者性激素与外周血 NK 细胞活性的相关性研究 [J]. 免疫学杂志, 2016, 32(9): 800-803.

ZHONG X M, MIAO Z L, CUI R, et al. Association analysis between sex hormones and peripheral blood NK cell activity in PCOS dysgenesis patients [J]. Immunol J, 2016, 32(9): 800-803.

[30] LIANG Y J, YANG W X. Kinesins in MAPK cascade: How kinesin motors are involved in the MAPK pathway? [J]. Gene, 2019, 684: 1-9.

[31] 梅佳辉, 杨曦亮, 方伟, 等. 鹿衔草内生真菌 *Penicillium solitum* 次生代谢产物的分离鉴定与神经保护活性筛选 [J]. 微生物学通报, 2022, 49(9): 3784-3797.

MEI J H, YANG X L, FANG W, et al. Isolation, identification, and neuroprotective activity screening of secondary metabolites of endophytic *Penicillium solitum* from *Pyrola incarnata* Fisch [J]. Microbiol China, 2022, 49(9): 3784-3797.

[32] INTAYOUNG P, LIMTRAKUL P, YODKEEREE S. Antiinflammatory activities of crebanine by inhibition of NF-κB and AP-1 activation through suppressing MAPKs and Akt signaling in LPS-induced RAW_{264.7} macrophages [J]. Biol Pharm Bull, 2016, 39(1): 54-61.

[33] 闫文, 顾玉彪, 谢兴文, 等. MicroRNA-223 调控 NF-κB 信号通路干预骨关节炎的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2022, 28(11): 1706-1710.

YAN W, GU Y B, XIE X W, et al. Research progress of microRNA-223 regulating NF-κB signaling pathway in osteoarthritis [J]. Chin J Osteoporos, 2022, 28(11): 1706-1710.

[34] 郭威. 谷氨酰胺对酒精诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用及分子机制 [D]. 洛阳: 河南科技大学, 2020.

GUO W. Protective effect of glutamine on alcohol-induced acute liver injury in mice and its molecular mechanism [D]. Luoyang: Henan University of Science and Technology, 2020.

[35] 伍振辉, 孟炯, 胡佳伟, 等. TLR4-MyD88-NF-κB 信号通路 with 肝炎-肝纤维化-肝癌轴相关性研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2017, 44(5): 396-401.

WU Z H, MENG X, HU J W, et al. Research progress on the correlation between TLR4-MyD88-NF-κB signalling pathways and the hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis [J]. J Int Pharm Res, 2017, 44(5): 396-401.

[36] PANG M, YUAN Y, WANG D, et al. Recombinant CC16 protein inhibits the production of pro-inflammatory cytokines via NF-κB and p38 MAPK pathways in LPS-activated RAW264.7 macrophages [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2017, 49(5): 435-443.

[37] TABARSA M, DABAGHIAN E H, YOU S, et al. Inducing inflammatory response in RAW_{264.7} and NK-92 cells by an Arabinogalactan isolated from *Ferula gummosa* via NF-κB and MAPK signaling pathways [J]. Carbohydr Polym, 2020, 241: 116358.

[收稿日期] 2024-01-18