

# 原人参三醇通过抑制NLRP3炎症小体激活改善巨噬细胞炎症

刘亚男<sup>1,2</sup>, 牛志强<sup>3</sup>, 李甫<sup>4</sup>, 胡卫成<sup>3\*</sup>, 张迹<sup>1,2\*</sup>

(1. 新疆农业大学食品科学与药学院, 新疆乌鲁木齐 830052)

(2. 淮阴师范学院生命科学学院, 江苏淮安 223300) (3. 扬州大学医学院, 江苏扬州 225109)

(4. 中国科学院成都生物研究所天然产物研究中心, 四川成都 610041)

**摘要:** 探究原人参三醇 (20S-Protopanaxatriol, PPT) 对脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 和三磷酸腺苷 (Adenosine Triphosphate, ATP) 双诱导激活 Nod 样受体蛋白 3 (NOD-Like Receptor Thermal Protein Domain Associated Protein 3, NLRP3) 炎症小体的影响, 从而发挥改善巨噬细胞炎症的作用。将 RAW264.7 细胞分为空白对照组、LPS 组、LPS+ATP 组和 PPT 给药组 (20、40、80  $\mu\text{mol/L}$ )。经 LPS+ATP 诱导后, 一氧化氮合酶 (Inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS)、环氧合酶 2 (Cyclooxygenase-2, COX-2)、白细胞介素  $1\beta$  (Interleukin- $1\beta$ , IL- $1\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和 NLRP3 的 mRNA 水平显著提高。经 PPT 处理可显著下调 iNOS、IL- $1\beta$  和 NLRP3 的 mRNA 水平, 而不影响 COX-2 和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 水平。同时, PPT 可下调胞质中 NLRP3、IL- $1\beta$  和半胱天冬酶 1 (Cysteinyl Aspartate Specific Proteinase-1, Cleaved-caspase-1) 蛋白的表达量, 而不影响核内转录因子  $\kappa\text{B}$  (Nuclear Factor Kappa-B, NF- $\kappa\text{B}$ ) 蛋白的水平。酶联免疫吸附 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 测定给药组可显著下调 IL- $1\beta$  的表达量, 而对 TNF- $\alpha$  表达量无显著变化。此外, 细胞形态学观察结果显示 PPT 可显著改善 RAW264.7 炎症细胞形态, 如伪足减少, 细胞褶皱平缓, 恢复圆形形态。该研究证明 PPT 可能通过抑制 NLRP3 炎症小体激活, 进一步抑制炎症因子 IL- $1\beta$  的表达水平, 从而发挥抗炎作用。为后期探究 PPT 如何靶向 NLRP3 炎症小体以及相关药物研发提供理论依据。

**关键词:** 原人参三醇; 抗炎作用; NLRP3 炎症小体; RAW264.7

文章编号: 1673-9078(2025)02-31-39

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.2.0176

## Macrophage Inflammation Alleviation by 20(S)-Protopanaxatriol by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation

LIU Ya'nan<sup>1,2</sup>, NIU Zhiqiang<sup>3</sup>, LI Fu<sup>4</sup>, HU Weicheng<sup>3\*</sup>, ZHANG Ji<sup>1,2\*</sup>

(1.College of Food Science and Pharmacology, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China) (2.School

引文格式:

刘亚男,牛志强,李甫,等.原人参三醇通过抑制NLRP3炎症小体激活改善巨噬细胞炎症[J].现代食品科技,2025, 41(2):31-39.

LIU Ya'nan, NIU Zhiqiang, LI Fu, et al. Macrophage inflammation alleviation by 20(S)-protopanaxatriol by inhibiting NLRP3 inflammasome activation [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(2): 31-39.

收稿日期: 2024-02-05

基金项目: 江苏省高等学校基础科学(自然科学)研究重大项目(23KJA550001)

作者简介: 刘亚男(1992-),女,硕士研究生,研究方向:食品营养, E-mail: liuyan0805@163.com

通讯作者: 胡卫成(1984-),男,博士,教授,研究方向:天然产物化学及药理学, E-mail: hu\_weicheng@163.com; 共同通讯作者: 张迹

(1982-),男,博士,副教授,研究方向:食品营养学, E-mail: zhangji@hytc.edu.cn

of Life Sciences, Huaiyin Normal University, Huaian 223300, China)(3.College of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225109, China)(4.Natural Products Research Center, Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** The effects of 20(S)-protopanaxatriol (PPT) on NOD-like receptor thermal protein domain-associated protein 3 (NLRP3) inflammasome activation induced by lipopolysaccharide (LPS) and adenosine triphosphate (ATP) were investigated to examine the role of PPT in alleviating macrophage inflammation. RAW264.7 cells were divided into a control group, an LPS group, an LPS+ATP group, and three PPT treatment groups (20, 40, and 80  $\mu\text{mol/L}$ ). The mRNA expression levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and NLRP3 were significantly increased after LPS+ATP treatment. PPT treatment markedly downregulated the mRNA levels of iNOS, IL-1 $\beta$ , and NLRP3; however, there were no significant changes in those of COX-2 and TNF- $\alpha$ . Additionally, the expression levels of NLRP3, IL-1 $\beta$ , and cysteinyl aspartate-specific proteinase-1 in the cell lysate of the PPT treatment group were lower than those in the LPS+ATP group; however, PPT had no effect on the translocation of nuclear factor kappa-B. Enzyme-linked immunosorbent assay revealed that PPT significantly reduced IL-1 $\beta$  expression levels without affecting TNF- $\alpha$  levels. Scanning electron microscopy observation showed that PPT notably improved the inflammatory state of RAW264.7 cells. Specifically, there was a decrease in pseudopodia formation, whereas cell folds were smoothed resulting in rounded cells. This study demonstrated that PPT exhibits immunomodulatory and anti-inflammatory effects. PPT can regulate inflammation in macrophages by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and subsequently reducing the expression level of IL-1 $\beta$ . This study provides a theoretical basis for exploring the mechanism by which PPT targets the NLRP3 inflammasome and its potential impact on related drug development.

**Key words:** 20(S)-protopanaxatriol; anti-inflammatory effect; NLRP3 inflammasome; RAW264.7

模式识别受体发起的先天免疫反应是抵御病原体入侵的第一道防线,并维持体内平衡<sup>[1]</sup>。NOD样受体(NLRs)家族3是细胞质中重要的模式识别受体,在包括病原体相关分子模式(Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs),如病毒RNA(Viral RNAs)、微生物毒素(Microbial Toxins)和细菌表面成分(Bacterial Surface Components)和危险相关分子模式(Danger/Damage-Associated Molecular Patterns, DAMPs),如尿酸晶体(Uric Acid Crystals, MSU)、三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)、铝佐剂(Aluminum Adjuvant)和 $\beta$ -淀粉样肽( $\beta$ -Amyloid Peptide)等多种刺激下,NLRP3炎症小体被激活,从而导致Caspase-1的活化以及促炎细胞因子IL-1 $\beta$ 和IL-18的成熟。活化的Caspase-1切割打孔蛋白(Gasdermin D, GSDMD)并释放其N端结构域,该结构域被转移到细胞膜上并形成孔隙,介导包括炎性细胞因子IL-1 $\beta$ 和IL-18等细胞内容物的释放,并诱导细胞焦亡<sup>[2-4]</sup>。因此,NLRP3炎症小体的激活对于宿主防御病原体入侵和维持体内平衡至关重要。然而,NLRP3炎症小体的过度激活也会导致各种炎症性疾病的发生和发展,如冷热蛋白相关周期性综合征、关节炎、动脉粥样硬化、2型糖尿病、阿尔茨海默病和癌症等<sup>[5-7]</sup>。所

以,寻找靶向NLRP3炎症小体的抑制剂,并深入研究其作用机制是相关疾病治疗和药物开发的重要方向。

人参皂苷是传统名贵中药人参属(包括人参、三七等)的主要活性成分,可分为达玛烷型和齐墩果烷型(OA型)皂苷。达玛烷型人参皂苷又可分为原人参二醇型(PPD型)皂苷和原人参三醇型(PPT型)皂苷<sup>[8]</sup>。本文所使用原人参三醇从三七中分离获得,原人参三醇的结构式如(图1)。大量研究表明人参皂苷具有抗炎<sup>[9-11]</sup>、抗癌<sup>[12-14]</sup>、抗糖尿病<sup>[15,16]</sup>、心血管保护<sup>[17,18]</sup>,以及对其他疾病改善<sup>[19-23]</sup>方面的作用。原人参三醇型皂苷在肠道微生物,如拟杆菌属(*Bacteroides*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、真杆菌属(*Eubacterium*)和梭杆菌属(*Fusobacterium*)<sup>[24,25]</sup>的代谢下,逐步去糖基化形成的其最终代谢产物PPT,可在血液中检测到<sup>[26]</sup>。PPT同样具有较好的抗炎活性,可通过不同的信号通路影响炎症效应物的释放而起到抗炎作用<sup>[26-28]</sup>。研究表明,PPT通过影响Akt/mTOR信号通路,诱导非保护性自噬和凋亡,抑制乳腺癌细胞增殖<sup>[29]</sup>。Kim等<sup>[30]</sup>发现PPT通过抑制包括钙离子内流、PKC和PLA2在内的多种细胞信号通路来减少炎症介质的释放。在Oh等<sup>[27]</sup>的研究中,PPT通过

抑制 NF- $\kappa$ B 活性和 I- $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化降解来阻断 LPS 诱导的 iNOS 和 COX-2 表达。Jiang 等<sup>[31]</sup>证明 PPT 在体内通过抑制 MSU 诱导激活的 NLRP3 炎症小体起到抗炎作用。然而, 目前关于 PPT 影响 NLRP3 炎症小体激活的相关机制研究甚少, 因此, 本文基于 LPS+ATP 双诱导建立 NLRP3 炎症小体模型, 初步探究 PPT 对 NLRP3 炎症小体的抑制作用机制, 可为深入研究 PPT 对 NLRP3 炎症小体抑制作用提供研究思路, 为 PPT 在 NLRP3 炎症小体相关疾病治疗中的应用研究和药物开发提供理论基础。

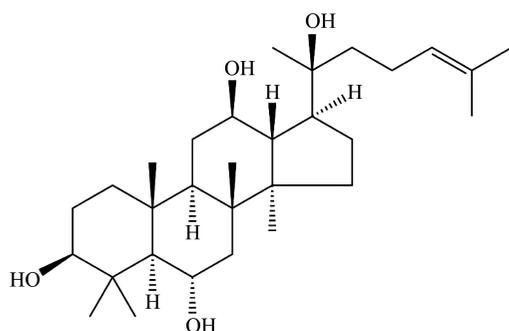


图 1 原人参三醇的化学结构

Fig.1 Chemical structure of 20(S)-propanaxatriol

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

小鼠单核巨噬细胞 (RAW264.7) 来自美国典型培养物保藏中心 (ATCC); RPMI 1640 培养基、青-链霉素, 购自美国 Cytiva 公司; 二甲亚砜 (Dimethyl Sulfoxide, DMSO)、甲氮甲唑蓝、Trizol Reagent, 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS), 购自美国 Sigma 公司; 细胞全蛋白及核蛋白提取试剂盒、ECL 化学发光检测试剂盒, 康为世纪生物科技股份有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司; 抗 Caspase-1、抗 NLRP3 等抗体, 购自 Adipogen; SYBR®Realtime PCR 试剂盒购于 Takara 公司; Mouse IL-1 $\beta$  ELISA Kit 和 Mouse TNF- $\alpha$  ELISA Kit 购自美国 R&D Systems。

### 1.2 主要仪器设备

CLM-170/240/L 二氧化碳培养箱 Esco, 上海益世科公司; HFsafe-1200LC-A2 生物安全柜, 上海力申科学仪器有限公司; Eclipse Ts2 倒置显微镜, Nikon 德国; 5414R 低温高速离心机, 艾本德 (上海) 国际贸易有限公司; PT-3502B 微孔板分光光度计,

北京普天新桥技术有限公司; PCR 仪, TIANGEN 公司; Quantagene q225 实时荧光定量 PCR 仪, 北京酷搏科技有限公司; Power PacTMHC 电泳槽, 伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司; Tannon 5200 凝胶成像系统, 上海天能有限公司; 超净工作台, 苏州安泰有限公司; Quanta FEG450 扫描电子显微镜, 英国 FEI 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 原人参三醇的分离与纯化

三七 (10.0 kg) 粉碎后, 以 30 L 的 95% (体积分数) 乙醇在 70 °C 提取 3 次, 提取液合并后减压浓缩至干, 提取物悬浮于纯水 (Reverses Osmosis, RO) 中, 依次以石油醚和正丁醇萃取 3 次, 正丁醇萃取液合并浓缩至干, 得三七总皂苷 1.16 kg。取三七总皂苷 100 g 溶于 1.5 L 正丁醇中, 加热搅拌条件下加入乙醇钠 130 g, 通氧气, 在 100 °C 反应 60 h。反应液冷却至室温, 以水充分淋洗, 正丁醇层减压浓缩至干后悬浮于水中, 以乙酸乙酯萃取 3 次, 乙酸乙酯萃取液合并后减压浓缩至干得乙酸乙酯萃取物, 该萃取物进行硅胶柱层析, 以二氯甲烷-甲醇 (95:5, V/V) 混合溶剂洗脱, 得原人参三醇 8.63 g。鉴定结果如下:

白色无定形粉末, C<sub>30</sub>H<sub>52</sub>O<sub>41</sub>。H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 5.14 (1H, t, J=7.4 Hz, H-24), 2.04 (3H, s, H-28), 1.65 (3H, s, H-26), 1.61 (3H, s, H-27), 1.49 (3H, s, H-29), 1.39 (3H, s, H-21), 1.09 (3H, s, H-18), 1.08 (3H, s, H-19), 0.94 (3H, s, H-30)。<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 40.1 (C-1), 27.8 (C-2), 79.5 (C-3), 40.5 (C-4), 62.1 (C-5), 68.9 (C-6), 47.3 (C-7), 42.0 (C-8), 50.8 (C-9), 40.2 (C-10), 32.0 (C-11), 72.0 (C-12), 48.5 (C-13), 52.4 (C-14), 31.4 (C-15), 27.3 (C-16), 55.1 (C-17), 17.6 (C-18), 17.7 (C-19), 74.4 (C-20), 26.5 (C-21), 36.3 (C-22), 23.3 (C-23), 126.2 (C-24), 132.0 (C-25), 25.9 (C-26), 17.7 (C-27), 31.9 (C-28), 16.1 (C-29), 17.1 (C-30)。根据波谱数据比照文献报<sup>[32]</sup>, 故可推断化合物为 20(S)-原人参三醇。

#### 1.3.2 细胞培养及模型构建

RAW264.7 细胞采用 RPMI 1640 加 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素培养基 (体积分数), 于细胞培养箱中 37 °C 恒温培养。显微镜观察细胞生长情况, 并按比例进行传代。待细胞传代稳定后, 进行后续实验。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

基因名称	正向引物	反向引物
<i>iNOS</i>	CATTGATCTCCGTGACAGCC	CATGCTACTGGAGGTGGGTG
<i>COX2</i>	GGGAGTCTGGAACATTGTGAA	GCACATTGTAAGTAGGTGGACTGT
<i>NLRP3</i>	AGAAGAGACCACGGCAGAAG	CCTTGGACCAGGTTTCAGTGT
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	TGCCTATGTCTCAGCCTCTTC	GAGGCCATTTGGGAACCTTCT
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	CAGGATGAGGACATGAGCACC	CTCTGCAGACTAAACTCCAC
<i>GAPDH</i>	CACTCACGGCAAATTCAACGGCACA	GACTCCACGACATACTCAGCAC

按每孔  $1.5 \times 10^6$  个的接种量将细胞接种于 6 孔板中过夜培养。次日, 用  $1 \mu\text{g/mL}$  的 LPS 诱导处理细胞 3 h, 再用不同浓度的 PPT 处理 30 min, 最后加入终浓度为  $2.5 \text{ mmol/L}$  的 ATP 刺激细胞, 诱导活化 NLRP3 炎症小体。细胞处理结束后, 弃去培养基, 磷酸缓冲盐溶液 (Phosphate Buffer Saline, PBS) 漂洗细胞后转移至  $1.5 \text{ mL}$  离心管, 加入  $150 \mu\text{L}$  细胞裂解液提取细胞全蛋白, 按 BCA 蛋白定量试剂盒说明书步骤定量后用于后续分析。

### 1.3.3 细胞存活率和一氧化氮释放量测定

将 RAW264.7 细胞接种到 96 孔板中, 按照每孔  $1 \times 10^5$  个的接种量, 同时设置空白对照组和 LPS 组, 每组三个平行, 置于恒温细胞培养箱中过夜培养。次日, 以不同浓度的原人参三醇 ( $25$ 、 $50$ 、 $100$ 、 $150$ 、 $200$ 、 $300 \mu\text{mol/L}$ ) 处理细胞 24 h, 移去上清培养液, 每孔加入  $100 \mu\text{L}$  现配的 ( $0.5 \text{ mg/mL}$ ) 噻唑蓝 (Methyl Thiazolyl Tetrazolium, MTT) 溶液, 4 h 后, 加入终止液并置于培养箱继续孵育过夜,  $550 \text{ nm}$  处测定吸光度, 计算分析不同摩尔浓度 PPT 对 RAW264.7 细胞活力的影响。

按上述方法接种 RAW264.7 细胞至 96 孔板中, 过夜培养后先给药预处理 30 min, 再加入 LPS 刺激 24 h 后, 采用 Griess 法<sup>[33]</sup>测定培养液上清中 NO 的含量。

### 1.3.4 Western blot

定量后的蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳分离后, 将蛋白转移至 PVDF 膜上, 用质量分数为 5% 牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA) 室温封闭 2 h, 一抗  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育过夜, 二抗室温孵育 2 h 后, 加 eECL 显色液, 室温避光反应后, 置于显影仪中进行条带的曝光显色及拍照分析。

### 1.3.5 实时荧光定量 PCR

RAW264.7 细胞按照  $2 \times 10^6$  个 / 孔的接种量, 接

种于 6 孔板, 过夜培养。按 1.3.1 方法构建炎症模型及药物处理后, 提取各样本细胞总 RNA, 再利用反转录试剂盒合成第一链 cDNA。以 GAPDH 为内参基因, 进行实时荧光定量 PCR 扩增, 按  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  法计算分析相关 mRNA 的相对表达量。本研究所用引物均由生工生物工程 (上海) 有限公司合成, 相关引物序列如表 1。

### 1.3.6 酶连免疫吸附试验 (ELISA)

本研究采用 ELISA 试剂盒均购自 R&D Systems, 并严格按照说明书进行实验操作。

### 1.3.7 细胞形态学分析 (SEM)

本研究采用扫描电子显微镜 (SEM) 观察细胞的形态学变化。在预先加有灭菌盖玻片的六孔板中按照每孔  $2 \times 10^6$  个的接种量接种细胞, 培养过夜。实验处理方式如 1.3.1, 细胞给药处理结束后, 弃去上清, 用 PBS 漂洗三遍, 加入 2.5% 的戊二醛溶液,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  固定 1 h。固定后使用乙醇溶液进行梯度脱水, 乙醇体积分数依次为 20%、50%、75%、90%、100%, 每个体积分数脱水时间约 3 min, 脱水后的样品置于干燥器内暂存<sup>[34]</sup>。取出各组样品盖玻片, 粘在样品托上进行喷金处理及扫描电镜观察和拍照分析。

### 1.3.8 数据处理与统计分析

多组间数据比较采用 IBM SPSS Statistics 26 进行单因素方差分析,  $P < 0.05$ 、 $P < 0.001$  为差异具有统计学意义。使用 GraphPad Prism 9.5.0 软件对数据信息进行绘图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 原人参三醇对 RAW264.7 细胞活力和一氧化氮释放量的影响

本文采用 MTT 法测定了原人参三醇对 RAW264.7

细胞的安全用药浓度范围和对细胞 NO 释放量的影响。结果显示, 与对照组相比, 原人参三醇浓度在 100  $\mu\text{mol/L}$  以内时对细胞活力无显著影响, 在 150  $\mu\text{mol/L}$  时细胞存活率为 86.7% 左右, 在 200  $\mu\text{mol/L}$  以外时, 细胞活力具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 在最高浓度 (300  $\mu\text{mol/L}$ ) 时细胞存活率低于 10% (图 2a), 大部分细胞已死亡。因此, 原人参三醇的安全用药浓度范围在 150  $\mu\text{mol/L}$  以内。LPS 作为细菌细胞壁的主要成分, 刺激细胞产生炎症, 从而产生大量的一氧化氮, NO 作为典型的炎症效应物, 对细胞造成了免疫损伤作用, 加重了细胞炎症。对 NO 释放量进行检测, 结果显示, 与 LPS 组相比, 随着原人参三醇浓度增加, NO 释放量显著下降, 且呈剂量依赖性, PPT 浓度在 25  $\mu\text{mol/L}$  时已有下调趋势, 当浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$  时, NO 释放量仅为 50% 左右。(图 2b,  $P < 0.05$ )。

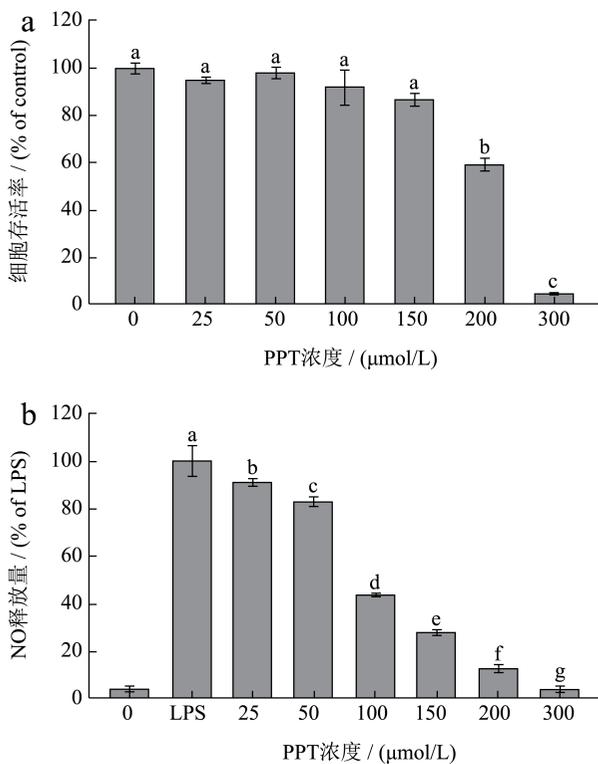


图 2 原人参三醇对 RAW264.7 细胞活力和一氧化氮释放量的影响

Fig.2 Effect of 20(S)-propanaxatriol on cell viability and NO production of RAW 264.7

注: a~g 代表与 LPS 处理组有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

不同浓度的原人参三醇使 RAW264.7 细胞活力呈剂量依赖性下降, 可抑制细胞过度增殖活化, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。根据实验结果确定后

续实验原人参三醇浓度为 40、80  $\mu\text{mol/L}$ 。原人参三醇通过抑制 LPS 刺激细胞发挥抗炎作用, 这与 Oh 等<sup>[27]</sup>所表述的结论相似。

## 2.2 原人参三醇对 RAW264.7 细胞形态的保护作用

LPS+ATP 双诱导刺激细胞产生炎症, 使 NLRP3 炎症小体活化, 引起巨噬细胞特异性形态变化。本文采用 SEM, 比较分析了原人参三醇对 RAW264.7 细胞形态的影响。结果如图 3 所示, 与对照组相比, LPS 刺激后, 细胞表面形态变化较大, 产生间隙, 体积变大, 伪足增多, 有促炎趋势, 为典型的 M1 型。原人参三醇处理组则体积变小, 伪足减少, 间隙逐渐减少, 细胞形态大部分恢复正常。同时, 分泌抗炎细胞因子, 缓解细胞损伤。导致巨噬细胞产生 M1 型转化的因素很多, 最重要的是 NLRP3 炎症小体的蓄积<sup>[35,36]</sup>。通过 SEM 观察 LPS 刺激后细胞的形态变化, 原人参三醇可能具有抑制细胞极化为 M1 型的作用, 从而抑制 NLRP3 炎症小体, 但具体作用机制还需继续深入探究。因此, 从细胞形态可推断, 原人参三醇有可能对 NLRP3 炎症小体有抑制作用。

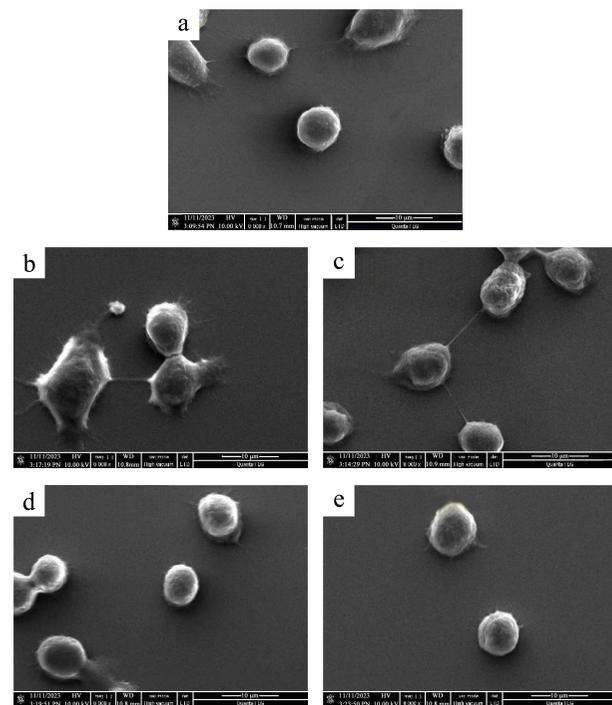


图 3 原人参三醇对 RAW264.7 细胞形态的影响

Fig.3 Effect of 20(S)-propanaxatriol on cellular morphology of RAW264.7 cells

注: a 为 C, b 为 LPS, c 为 LPS+ATP, d 为 PPT-40  $\mu\text{mol/L}$ , e 为 PPT-80  $\mu\text{mol/L}$ 。放大倍数为 8 000 倍。

### 2.3 原人参三醇对RAW264.7细胞iNOS和COX2表达的影响

诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 和环氧化物酶 2 (COX-2) 表达量增加负调控参与抗炎机制。然而, 细胞受 LPS 刺激使 iNOS 释放大量 NO<sup>[34,37]</sup>。采用 RT-qPCR 和 WB 分别在 mRNA 和蛋白水平进行了分析。结果显示, 在 LPS 刺激下, 原人参三醇对 iNOS 蛋白表达量影响较弱 (图 4a), 而在 LPS+ATP 双诱导刺激下, 原人参三醇可显著下调 mRNA 水平 (图 4b,  $P < 0.05$ ), 此实验结果与 NO 实验检测结果一致 (图 4c), 推断原人参三醇通过 iNOS 信号通路影响 NLRP3 炎症小体。原人参三醇对 COX2 的 mRNA 和蛋白表达均无显著影响 (图 4a、4c)。

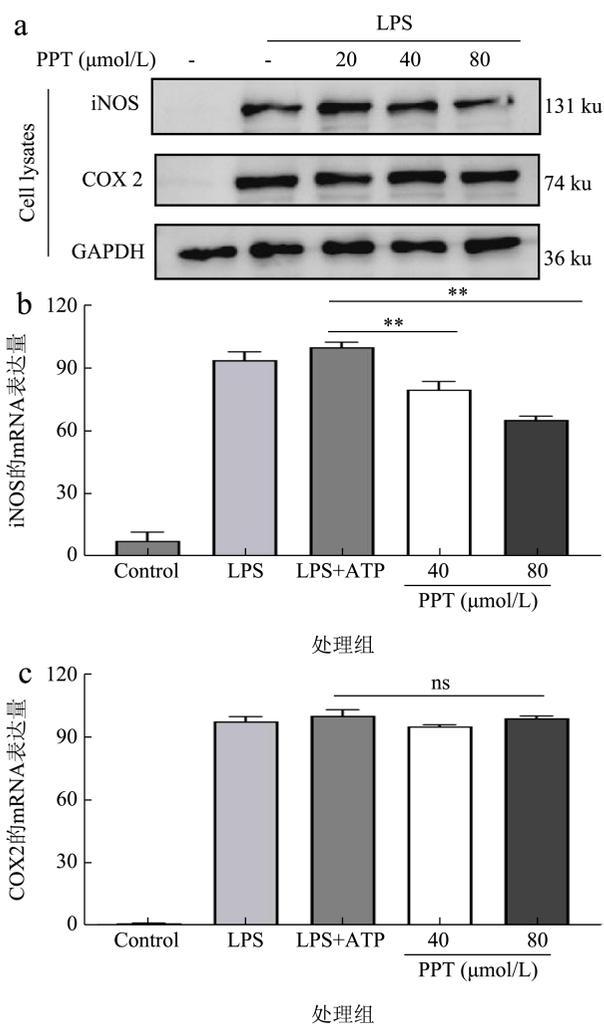


图 4 原人参三醇对 RAW264.7 细胞 iNOS 和 COX2 基因和蛋白表达量影响

Fig.4 Effect of 20(S)-propanaxatriol on iNOS and COX2 genes and proteins expression of RAW264.7 cells

注: ns 代表与 LPS+ATP 处理组没有显著性差异, \*\* 代表与 LPS+ATP 处理组有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

### 2.4 原人参三醇抑制 RAW264.7 细胞中 NLRP3 炎症小体激活

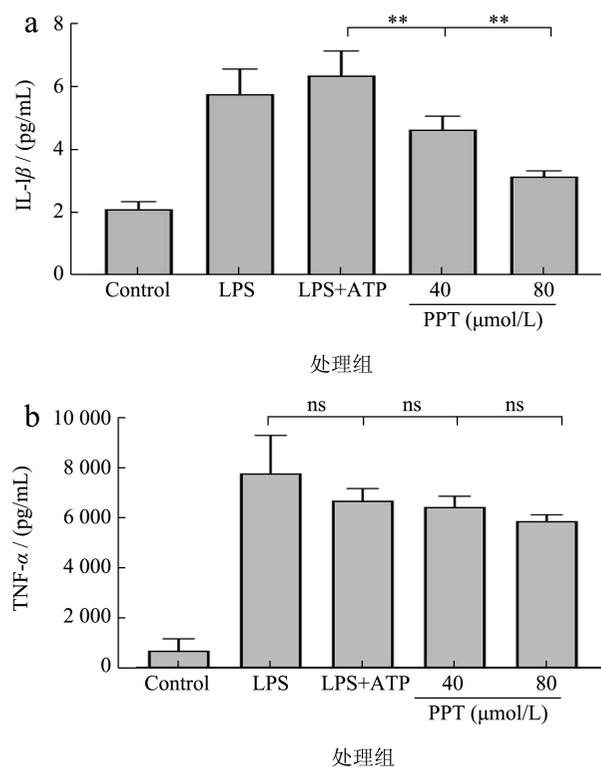
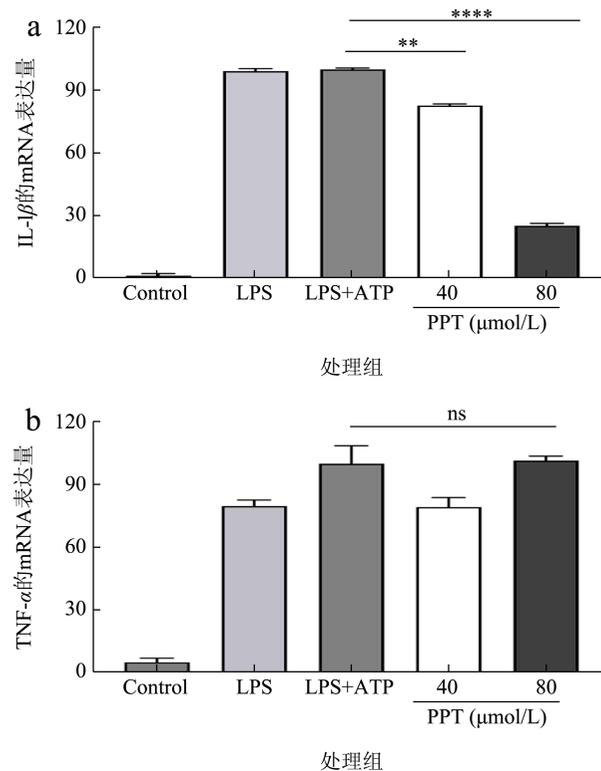


图 5 ELISA 检测炎症细胞因子 IL-1β 和 TNF-α 表达水平  
Fig.5 Detection of IL-1β and TNF-α formation by ELISA

注: ns 代表与 LPS 处理组没有显著性差异, \*\* 代表与 LPS 处理组有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。



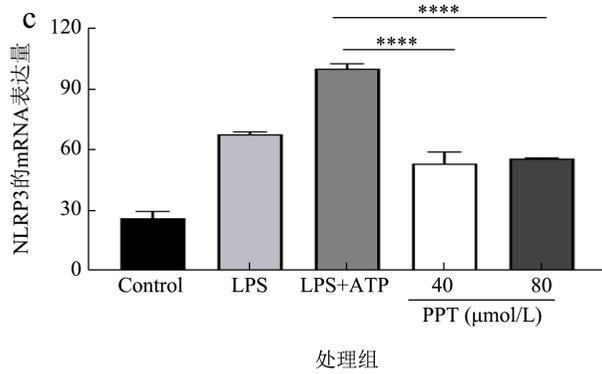


图6 原人参三醇对 RAW264.7 细胞 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 NLRP3 基因表达量的影响

Fig.6 Effect of 20(S)-propanaxatriol on IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  and NLRP3 genes of RAW264.7 cells

注: \*\* 代表与 LPS+ATP 处理组有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), \*\*\*\* 代表与 LPS+ATP 处理组有显著性差异 ( $P < 0.001$ ); ns 代表与 LPS+ATP 处理组无显著差异。

LPS 刺激引起典型的 NF- $\kappa$ B 信号通路, 引发下游 NLRP3 炎症小体相关蛋白表达, 以及 TNF- $\alpha$  的释放<sup>[25]</sup>。经 ATP 诱导 NLRP3 炎症小体组装活化, 通过 NLRP3/Caspase-1/IL-1 $\beta$  信号通路<sup>[3]</sup>, 最终导致巨噬细胞炎症。

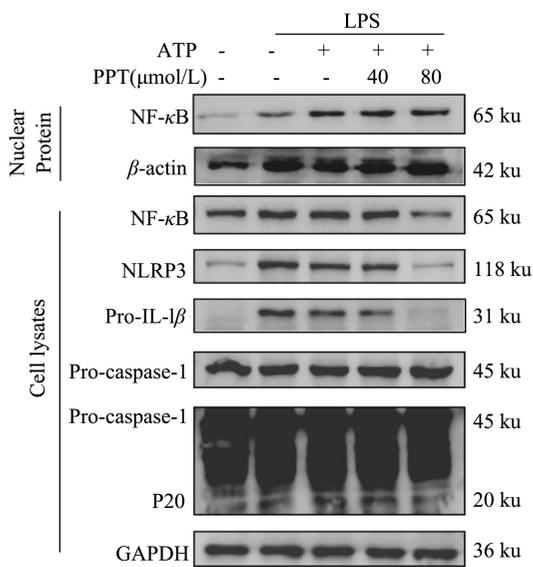


图7 原人参三醇抑制 RAW264.7 细胞中 NLRP3 炎症小体激活

Fig.7 20(S)-propanaxatriol blocks activation of NLRP3 inflammasome in RAW264.7 cells

本文为进一步研究原人参三醇如何影响 NLRP3 炎症小体。首先, ELISA 检测细胞上清炎症因子 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的表达量。结果表明, 与 LPS+ATP 组相比, 原人参三醇显著抑制 IL-1 $\beta$  的释放, IL-1 $\beta$

在各组差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。原人参三醇对 TNF- $\alpha$  无影响, 各组差异无统计学意义 (图 5)。采用 RT-qPCR 分析, 在 LPS+ATP 双诱导刺激下, 原人参三醇显著下调 IL-1 $\beta$  和 NLRP3 的 mRNA 表达量 ( $P < 0.001$ ), 并不影响 TNF- $\alpha$  的 mRNA 表达量 (图 6)。WB 结果分析, 与 LPS+ATP 组相比, 原人参三醇并不影响 NF- $\kappa$ B 的核易位, 轻微下调胞质内 NF- $\kappa$ B 的表达。对 NLRP3 各组蛋白表达分析, 原人参三醇显著下调 NLRP3、Por-caspase-1、Por-IL-1 $\beta$  的表达 (图 7)。

综上所述, 原人参三醇并不通过 NF- $\kappa$ B 信号通路, 影响下游 NLRP3 活化, 而是直接参与 NLRP3/Caspase-1/IL-1 $\beta$  信号通路。并且, 原人参三醇在转录翻译水平上均抑制 NLRP3 炎症小体活化。

### 3 结论

本文研究发现原人参三醇可以抑制 NLRP3 炎症小体组装, 并抑制 IL-1 $\beta$  的释放, 是一种 NLRP3 炎症小体抑制剂, 与 RAW264.7 细胞抗炎免疫紧密联系。此外, 原人参三醇可抑制 iNOS 的表达, 防止过量 NO 产生。原人参三醇是一种人参属皂苷, 有较好的抗炎活性, 也是人参皂苷关键成分之一, 通过影响细胞内信号通路的炎症效应物发挥抗炎作用。结果显示, 原人参三醇可作为 NLRP3 的潜在抑制剂, 为治疗 NLRP3 相关疾病提供新见解。

NLRP3 炎症小体活化需要通过两个阶段, 第一阶段 (启动阶段) 通过 NF- $\kappa$ B 入核诱导 NLRP3 各组分蛋白表达, 第二阶段 (激活阶段) NLRP3 炎症小体组装, 引起后续 Caspase-1 激活剪切 Pro-IL-1 $\beta$ , 释放成熟的 IL-1 $\beta$ 。已有文献报道, 原人参三醇可以通过抑制 MSU 晶体诱导的 NLRP3 炎症小体激活, 是从第二阶段激活 NLRP3 炎症小体。因此, 本文重点研究了原人参三醇是否抑制 NLRP3 炎症小体活化。结果表明, 原人参三醇并不抑制启动阶段, 而是抑制炎症小体激活阶段。IL-1 $\beta$  的释放是 NLRP3 炎症激活过程中必不可少的标志物, 原人参三醇显著下调 IL-1 $\beta$  的表达, 说明原人参三醇可通过降低 IL-1 $\beta$  的释放量从而影响 NLRP3 炎症小体的组装和激活。

综上所述, 证实了原人参三醇抑制 RAW264.7 细胞中 NLRP3 炎症小体组装, 并且发挥免疫调节和抗炎作用。

## 参考文献

- [1] MUKHOPADHYAY S, PLUDEMANN A, GORDON S. Macrophage pattern recognition receptors in immunity, homeostasis and self tolerance [J]. Target Pattern Recognition in Innate Immunity, 2009, 653: 1-14.
- [2] LEI Q, Yi T, CHEN C. NF- $\kappa$ B-Gasdermin D (GSDMD) axis couples oxidative stress and NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 (NLRP3) inflammasome-mediated cardiomyocyte pyroptosis following myocardial infarction [J]. Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research, 2018, 24: 6044.
- [3] SHI J, ZHAO Y, WANG K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death [J]. Nature, 2015, 526(7575): 660-665.
- [4] HE W, WAN H, HU L, et al. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 $\beta$  secretion [J]. Cell Research, 2015, 25(12): 1285-1298.
- [5] WANG Z, ZHANG S, XIAO Y, et al. NLRP3 inflammasome and inflammatory diseases [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2020, 17: 4063562.
- [6] TOURKOCHRISTOU E, AGGELETOPOULOU I, KONSTANTAKIS C, et al. Role of NLRP3 inflammasome in inflammatory bowel diseases [J]. World Journal of Gastroenterology, 2019, 25(33): 4796.
- [7] ABDERRAZAK A, SYROVETS T, COUCHIE D, et al. NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases [J]. Redox Biology, 2015, 4: 296-307.
- [8] YANG W, HU Y, WU W, et al. Saponins in the genus *Panax* L. (Araliaceae): a systematic review of their chemical diversity [J]. Phytochemistry, 2014, 106: 7-24.
- [9] LI J, WANG R F, ZHOU Y, et al. Dammarane-type triterpene oligoglycosides from the leaves and stems of *Panax notoginseng* and their antiinflammatory activities [J]. Journal of Ginseng Research, 2019, 43(3): 377-384.
- [10] IM D S. Pro-resolving effect of ginsenosides as an anti-inflammatory mechanism of *Panax ginseng* [J]. Biomolecules, 2020, 10(3): 444.
- [11] GAO Y, LI J, WANG J, et al. Ginsenoside Rg1 prevent and treat inflammatory diseases: A review [J]. International Immunopharmacology, 2020, 87: 106805.
- [12] WONG A S T, CHE C M, LEUNG K W. Recent advances in ginseng as cancer therapeutics: a functional and mechanistic overview [J]. Natural Product Reports, 2015, 32(2): 256-272.
- [13] SUN M, YE Y, XIAO L, et al. Anticancer effects of ginsenoside Rg3 [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2017, 39(3): 507-518.
- [14] LI X, CHU S, LIN M, et al. Anticancer property of ginsenoside Rh2 from *ginseng* [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2020, 203: 112627.
- [15] ZHOU P, XIE W, HE S, et al. Ginsenoside Rb1 as an anti-diabetic agent and its underlying mechanism analysis [J]. Cells, 2019, 8(3): 204.
- [16] BAI L, GAO J, WEI F, et al. Therapeutic potential of ginsenosides as an adjuvant treatment for diabetes [J]. Frontiers in Pharmacology, 2018, 9: 423.
- [17] NABAVI S F, SUREDA A, HABTEMARIAN S, et al. Ginsenoside Rd and ischemic stroke; a short review of literatures [J]. Journal of Ginseng Research, 2015, 39(4): 299-303.
- [18] PENG L, SUN S, XIE L H, et al. Ginsenoside Re: pharmacological effects on cardiovascular system [J]. Cardiovascular Therapeutics, 2012, 30(4): e183-e188.
- [19] GAO Y, CHU S, ZHANG Z, et al. Hepatoprotective effects of ginsenoside Rg1-A review [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2017, 206: 178-183.
- [20] SHIN J H, KWON H W, CHO H J, et al. Vasodilator-stimulated phosphoprotein-phosphorylation by ginsenoside Ro inhibits fibrinogen binding to  $\alpha$ IIB/ $\beta$ 3 in thrombin-induced human platelets [J]. Journal of Ginseng Research, 2016, 40(4): 359-365.
- [21] LIU Y, LIU T, ZHAO J, et al. Phospholipase C $\gamma$ 2 signalling contributes to the haemostatic effect of notoginsenoside Ft1 [J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2019, 71(5): 878-886.
- [22] LE TRAN Q, ADNYANA I K, TEZUKA Y, et al. Hepatoprotective effect of majonoside R2, the major saponin from Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis*) [J]. Planta Medica, 2002, 68(5): 402-406.
- [23] AHMED T, RAZA S H, MARYAM A, et al. Ginsenoside Rb1 as a neuroprotective agent: a review [J]. Brain Research Bulletin, 2016, 125: 30-43
- [24] BAE E A, PAEK S Y, KIM D H. Constitutive  $\beta$ -glucosidases hydrolyzing ginsenoside Rb1 and Rb2 from human intestinal bacteria [J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2000, 23(12): 1481-1485.
- [25] BAE E A, SHIN J, KIM D H. Metabolism of ginsenoside Re by human intestinal microflora and its estrogenic effect [J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2005, 28(10): 1903-1908.
- [26] 陈小玲,史大臻,司函瑞,等.原人参三醇生物活性及其作用机制研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2021,23(2): 209-214.
- [27] OH G S, PAE H O, CHOI B M, et al. 20 (S)-Protopanaxatriol, one of ginsenoside metabolites, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2

- expressions through inactivation of nuclear factor- $\kappa$ B in RAW 264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide [J]. *Cancer Letters*, 2004, 205(1): 23-29.
- [28] OH H A, KIM D E, CHOI H J, et al. Anti-stress effects of 20 (S)-protopanaxadiol and 20 (S)-protopanaxatriol in immobilized mice [J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2015, 38(2): 331-335.
- [29] LI Y, WANG P, ZOU Z, et al. Ginsenoside (20S)-protopanaxatriol induces non-protective autophagy and apoptosis by inhibiting Akt/mTOR signaling pathway in triple-negative breast cancer cells [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, 583: 184-191.
- [30] KIM D Y, RO J Y, LEE C H. 20 (S)-Protopanaxatriol inhibits release of inflammatory mediators in immunoglobulin E-mediated mast cell activation [J]. *Journal of Ginseng Research*, 2015, 39(3): 189-198.
- [31] JIANG J, SUN X, AKTHER M, et al. Ginsenoside metabolite 20 (S)-protopanaxatriol from *Panax ginseng* attenuates inflammation-mediated NLRP3 inflammasome activation [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 251: 112564.
- [32] 杨崇康,罗启鹏,张莲,等.三七总皂苷酸水解产物化学成分研究[J].*中草药*,2020,51(5):1175-1182.
- [33] MAIVICINI R, SANTA-CRUZ D, De LAZZARI G, et al. Macrophage bioassay standardization to assess the anti-inflammatory activity of mesenchymal stromal cell-derived small extracellular vesicles [J]. *Cytotherapy*, 2022, 24(10): 999-1012.
- [34] 牛志强,李琦,刘亚男,等.人参皂苷F2对LPS诱导RAW264.7细胞炎症反应的改善作用[J].*现代食品科技*,2024, 10(1):27-33.
- [35] WANG T, ZHAO N, PENG L, et al. DJ-1 regulates microglial polarization through P62-mediated TRAF6/IRF5 signaling in cerebral ischemia-reperfusion [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020, 8: 593890.
- [36] 罗连响,黄芳芳,吴锐剑,等.杨梅素通过诱导巨噬细胞自噬抑制NLRP3炎症小体激活[J].*中国免疫学杂志*,2021, 37(15): 1809-1813,1819.
- [37] LEE S Y, JEONG J J, EUN S H, et al. Anti-inflammatory effects of ginsenoside Rg1 and its metabolites ginsenoside Rh1 and 20 (S)-protopanaxatriol in mice with TNBS-induced colitis [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2015, 762: 333-343.