



畜牧兽医学报

Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica

ISSN 0366-6964, CN 11-1985/S

《畜牧兽医学报》网络首发论文

题目: 竹叶黄酮对H₂O₂诱导奶牛乳腺上皮细胞焦亡的保护作用
作者: 王靖, 关淑文, 赵小博, 王琳玮, 郭刚, 蒋林树
收稿日期: 2024-03-14
网络首发日期: 2024-09-23
引用格式: 王靖, 关淑文, 赵小博, 王琳玮, 郭刚, 蒋林树. 竹叶黄酮对H₂O₂诱导奶牛乳腺上皮细胞焦亡的保护作用[J/OL]. 畜牧兽医学报.
<https://link.cnki.net/urlid/11.1985.S.20240920.1800.002>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。



竹叶黄酮对 H₂O₂ 诱导奶牛乳腺上皮细胞焦亡的保护作用

王 靖¹, 关淑文¹, 赵小博¹, 王琳玮¹, 郭 刚^{2*}, 蒋林树^{1*}

(1. 北京农学院, 奶牛营养学北京重点实验室, 北京 102206; 2. 北京首农畜牧发展有限公司, 100076)

摘 要: 旨在以竹叶黄酮 (BLF) 为添加物, 探究 BLF 对过氧化氢 (H₂O₂) 诱导奶牛乳腺上皮细胞 (BMECs) 焦亡的保护作用。本研究以 BMECs 为研究对象, 分为对照组, 80 μg mL⁻¹ BLF 处理组, 800 μmol L⁻¹ H₂O₂ 处理组和 80 μg mL⁻¹ BLF+800 μmol L⁻¹ H₂O₂ 处理组。利用 RT-qPCR、Western blot、免疫荧光、流式细胞术等技术, 检测细胞焦亡相关基因和蛋白表达以及凋亡相关微粒样蛋白 (ASC) 荧光强度。结果表明, 与对照组相比, 800 μmol L⁻¹ H₂O₂ 处理 BMECs 8 h 显著增加了奶牛乳腺上皮细胞的焦亡 ($P < 0.05$); H₂O₂ 处理后, *NLRP3*、*Nek7*、*ASC*、*GSDMD*、*IL-18*、*IL-1β* 等焦亡相关基因的相对表达量均显著升高 ($P < 0.05$), 尤其是 *NLRP3* 的表达, 说明 H₂O₂ 显著增加 BMECs 焦亡。与 H₂O₂ 处理组相比, BLF 可以降低正常细胞焦亡水平, 显著降低 *NLRP3*、*Nek7*、*ASC*、*GSDMD*、*IL-18*、*IL-1β* 基因 mRNA 上调的趋势, 显著缓解了 H₂O₂ 导致的 *NLRP3*、*ASC*、*Nek7*、*pro-caspase1*、*caspase1 p20*、*GSDMD-N*、*IL-18* 和 *IL-1β* 胞内焦亡相关蛋白表达的升高 ($P < 0.05$), *ASC* 的荧光强度显著降低 ($P < 0.05$)。综上所述, H₂O₂ 显著上调 *NLRP3*、*ASC*、*Caspase-1*、*GSDMD*、*IL-1β*、*IL-18* 焦亡基因和蛋白表达水平, 诱导奶牛乳腺上皮细胞焦亡。BLF 通过降低 *NLRP3* 炎症小体通路蛋白和基因表达, 降低了炎症因子水平, 从而缓解奶牛乳腺上皮细胞焦亡。

关键词: 竹叶黄酮; 奶牛乳腺上皮细胞; 细胞焦亡

中图分类号: S823.91

文献标志码: A

The Protective Effect of Bamboo Leaf Flavonoids on H₂O₂-induced Pyroptosis in Bovine Mammary Epithelial Cells

WANG Jing¹, GUAN Shuwen¹, ZHAO Xiaobo¹, WANG Linwei¹, GUO Gang^{2*}, JIANG Linshu^{1*}

(1. Beijing Key Laboratory of Dairy Cow Nutrition, Beijing University of Agriculture, Beijing, 102206, China;

2. Beijing Shouong Animal Husbandry Development Co., Ltd., Beijing 100076, China)

Abstract: In this study, bamboo leaf flavonoids (BLF) was used as an additive to explore the protective effect of BLF on hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced pyroptosis of bovine mammary epithelial cells (BMECs). (Method) In this experiment, the concentration of BLF was 80 μg / mL and the concentration of H₂O₂ was 800 μmol · L⁻¹. The BMECs without BLF treatment were set as the control group, and the treatment groups were BLF treatment group, H₂O₂ treatment group, BLF and H₂O₂ co-treatment group. The expression of pyroptosis-related genes and related proteins and the fluorescence intensity of apoptosis-related microparticle-like protein (ASC) were detected by RT-qPCR, Western blot, immunofluorescence and flow cytometry. The results showed that compared with the control group, 800 μmol · L⁻¹ H₂O₂ treatment of BMECs for 8 h significantly increased the pyroptosis of bovine mammary epithelial cells ($P < 0.05$). After H₂O₂ treatment, the relative expression levels of *NLRP3*, *Nek7*, *ASC*,

收稿日期: 2024-03-14

基金项目: 家禽产业技术体系北京市创新团队(BAIC05); 乳业全产业链“绿色数智”技术集成创新与产业化应用[SNSPKJ(2022)]

作者简介: 王 靖 (2001-), 女, 北京人, 硕士生, 主要从事反刍动物营养与饲料活性物质开发与应用研究, E-mail: 13718216147@163.com

*通信作者: 蒋林树, 主要从事奶牛营养与免疫研究, E-mail: jls@bua.edu.cn; 郭 刚, 博士, 正高级畜牧师, 北京首农畜牧发展有限公司, 主要从事奶牛营养方向, E-mail: guogang2180@126.com

GSDMD, *IL-18*, *IL-1β* and other related pyroptosis genes were significantly increased ($P < 0.05$), especially the expression of *NLRP3*, indicating that H_2O_2 significantly increased the pyroptosis of BMECs. Compared with the H_2O_2 treatment group, BLF could reduce the pyroptosis level of normal cells, significantly reduce the mRNA up-regulation trend of *NLRP3*, *Nek7*, *ASC*, *GSDMD*, *IL-18*, *IL-1β* and other genes, and significantly alleviate the increase of intracellular pyroptosis protein expression of *NLRP3*, *ASC*, *Nek7*, pro-caspase1, caspase1 p20, *GSDMD-N*, *IL-18* and *IL-1β* induced by H_2O_2 ($P < 0.05$), and the fluorescence intensity of *ASC* was significantly reduced ($P < 0.05$). In summary, H_2O_2 significantly up-regulated the expression levels of pyroptosis-related genes and proteins such as *NLRP3*, *ASC*, *Caspase-1*, *GSDMD*, *IL-1β*, and *IL-18*, and induced pyroptosis in bovine mammary epithelial cells. (Conclusion)BLF reduced the level of inflammatory factors by reducing the expression of *NLRP3* inflammasome pathway proteins and genes, thereby alleviating the pyroptosis of dairy cow mammary epithelial cells.

Keywords: bamboo leaf flavonoids; dairy cow mammary epithelial cells; pyroptosis of cells

细胞焦亡，也称细胞炎症性坏死，是一种程序性细胞死亡^[1]。在规模化奶牛生产中，由于环境、温度、管理等因素的影响，奶牛机体内会产生大量的活性氧（reactive oxygen species, ROS），当其超过机体抗氧化系统的清除能力时，过量的 ROS 会损伤机体内的蛋白质、脂质和 DNA，破坏细胞结构^[2]，刺激核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 活化（NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, *NLRP3*）与凋亡相关微粒样蛋白（apoptosis-associated speck-like protein, *ASC*）形成 *NLRP3* 炎症小体^[3]，激活细胞焦亡通路^[4]，从而加剧奶牛机体的炎症级联扩增^[5-7]，严重影响奶牛健康状况及泌乳性能。这与卢德勋先生提出的氧化应激-炎症反应-免疫应激三方联动效应失衡的理念相一致^[8]。大量研究发现，天然植物活性成分可调控细胞焦亡，减轻炎症症状^[9]。竹叶黄酮（bamboo leaves flavone, BLF）作为竹叶中的主要活性成分，具有抗炎、抗氧化、缓解氧化应激的生物功能^[10-11]，可降低血清中 IgG 和 IL-10 及血液中 IL-1β 和 TNF-α 含量^[12-13]。侯昆等^[14]研究发现，对患有隐性乳房炎的奶牛饲喂 BLF 能够降低奶牛血清中 TNF-α 含量和乳中体细胞数，在一定程度上提高奶牛的产奶性能，增强机体免疫；在体外细胞试验中，添加 BLF 可抑制奶牛乳腺上皮细胞 ROS 的生成，提高 Nrf2 及抗氧化酶的活性，缓解奶牛乳腺上皮的线粒体损伤，降低凋亡相关基因的表达^[15-16]。本实验室前期研究也证明了 $800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 能够建立稳定的氧化应激模型， $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 BLF 能缓解奶牛乳腺上皮细胞（bovine mammary epithelial cells, BMECs）的氧化应激，并阐述了其相关作用机制^[15-17]，但 BLF 对 BMECs 焦亡是否具有保护效果尚未明晰。因此，本研究通过构建 H_2O_2 诱导的 BMECs 焦亡模型，深入探讨 BLF 对细胞焦亡的影响，为 BLF 作为缓解 BMECs 焦亡的天然植物饲料添加剂提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试剂与耗材

原代奶牛乳腺上皮细胞由中国农科院畜牧兽医研究所智慧畜牧业创新团队惠赠；98%竹叶黄酮由浙江大学生物系统工程与食品科学学院赠予。

表 1 试剂与耗材

Table 1 Reagents and consumables

试剂	来源
Reagent	Source
H_2O_2 Hydrogen peroxide	天津光复，中国

DMEM/F12、FBS、双抗 DMEM/F12、FBS、Penicillin-Streptomycin	Gibco, 美国
0.25%胰蛋白酶-EDTA 0.25% trypsin-EDTA	Gibco, 美国
PBS	Wissen, 中国
细胞培养皿、细胞培养板、离心管、枪头	Corning, 美国
Cell culture dish、Cell culture plate、Centrifuge tube、Gun tip	
BCA 试剂盒 BCA kit	Beyotime, 中国
二甲基亚砜 (DMSO) Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Solarbio, 中国
蛋白酶抑制剂 Protease inhibitor	Beyotime, 中国
RIPA、PMSF	Beyotime, 中国
TBST	Solarbio, 中国
聚丙烯酰胺电泳凝胶试剂盒 Polyacrylamide electrophoresis gel kit	Beyotime, 中国
Hoechst 33342/PI 双染试剂盒 Hoechst 33342/PI double dye kit	Solarbio, 中国
SDS-PAGE 缓冲液 SDS-PAGE buffer	Beyotime, 中国
预染蛋白 Marker Prestain protein Marker	LABLEAD, 中国
PVDF 膜 PVDF membrane	Beyotime, 中国
脱脂奶粉 Skim milk powder	Beyotime, 中国
Tris	Solarbio, 中国
SDS	Solarbio, 中国
甘氨酸 Glycine	Solarbio, 中国
甲醇 Carbinol	Solarbio, 中国
cDNA 反转录试剂盒 cDNA reverse transcription kit	Erik, 中国
SYB [®] TM Premix ExTaq II	Erik, 中国
TRIzol	Beyotime, 中国
氯仿、异丙醇、无水乙醇 Chloroform、Isopropyl alcohol、Anhydrous ethanol	北京化工厂, 中国
ECL 化学发光试剂盒 ECL chemiluminescence kit	Beyotime, 中国
羊抗兔 IgG, 羊抗鼠 IgG Sheep Anti-Rabbit IgG, Sheep Anti-Mouse IgG	LABLEAD, 中国
SIRT1, p65, NLRP3, ASC, IL-1 β , Nek7, Lamin B1 抗体	Santa, 中国
SIRT1, p65, NLRP3, ASC, IL-1 β , Nek7, Lamin B1 antibody	
Caspase-1, GSDMD-N 抗体 Caspase-1, GSDMD-N antibody	Abcam, 美国
IL-18 抗体 IL-18 antibody	Bioss, 中国
β -actin 抗体 β -actin antibody	CST, 美国
抗荧光淬灭封片液 (含 DAPI)	Beyotime, 中国
Anti-fluorescence quenched sealing solution (DAPI included)	

1.2 主要仪器设备

表 2 仪器设备

Table 2 Instrument and equipment

试验仪器	来源
Test instrument	Source
荧光倒置显微镜 Inverted fluorescence microscope	Motic, 中国
CO ₂ 细胞培养箱 CO ₂ cell incubator	Thermo, 美国
多功能气浴恒温振荡器 Dual-function gas bath thermostatic oscillator	常州峥嵘, 中国
恒温恒湿箱 Constant temperature and humidity box	上海一恒, 中国
荧光定量 PCR 仪 Fluorescent quantitative PCR instrument	Roche, 瑞士

垂直电泳转印系统 Vertical electrophoretic transfer system	BIO-RAD, 美国
天能化学发光成像仪 Celestial chemiluminescence imager	上海天能, 中国
Gene Max 基因扩增仪 Gene Max Gene amplification instrument	杭州博日, 中国
Cyto FLEX 流式细胞仪 Cyto FLEX flow cytometry	BECKMAN COULTER, 中国

1.3 试剂配制

1.3.1 细胞培养液 DMEM/F-12 +10% FBS+1%双抗, 配制为细胞完全培养液; DMEM/F-12 +2% FBS, 为细胞维持培养液; BLF 处理液取纯度 98%的 BLF 5 mg 加 5 mL 维持培养基, 得到 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液, 根据所需培养基体积进行稀释, 使 BLF 浓度最终为 $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; H_2O_2 处理液: 取 $100 \mu\text{L}$ 30%的 H_2O_2 与 $870 \mu\text{L}$ 的细胞维持培养基配制成 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 储备液; 将一定体积的 H_2O_2 贮备液加入到一定体积的细胞维持培养基中进一步稀释处理细胞, 使 H_2O_2 的浓度为 $800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 以上试剂现配现用。

1.3.2 Western blot 用试剂

1.3.2.1 2 L SDS-PAGE 电泳液: 6 g Tris+28.8 g 甘氨酸+2 g SDS+800 mL 去离子水, 混匀后定容至 2 L, 备用。

1.3.2.2 2 L 转膜液: 6 g Tris+28.8 g 甘氨酸+200 mL 甲醇+800 mL 去离子水, 4°C 冰箱储存。当蛋白分子量大于 80 ku 时, 转膜液中另需添加 2 g 的 SDS。

1.4 试验方法

1.4.1 试验分组 试验分为对照组、BLF 组、 H_2O_2 组和 BLF+ H_2O_2 共处理组。按上述方法将 BMECs 培养在 60 mm 平皿中, 融合度达 85%, 添加处理液: 对照组不添加 H_2O_2 和 BLF; BLF 组浓度为 $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; H_2O_2 组用 $800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 处理细胞 24 h; BLF 与 H_2O_2 共处理组先用 $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BLF 预处理 24 h 后, 再用 $800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 处理细胞 8 h。

1.4.2 细胞培养

1.4.2.1 细胞复苏: 转移液氮中装有奶牛乳腺上皮细胞的冻存管至 37°C 水浴锅快速融化, 移入装有预热完全培养液的 15 mL 离心管中, 吹打混匀, $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃去上清, 重悬后移至 60 mm 培养皿孵育;

1.4.2.2 细胞换液: 培养两天后看培养基颜色和细胞状态, 培养基变为淡黄色则吸出培养液, PBS 洗 2 遍后加入新培养液继续孵育;

1.4.2.3 细胞传代: 细胞融合度达 85%, PBS 冲洗 2 次, 吸取 1 mL 0.25%胰酶于平皿作用 1 min, 吸取 1 mL 培养液迅速停止消化。收集细胞悬液, 上述条件离心后弃上清, 重悬至新培养皿孵育。

1.4.3 RT-qPCR 检测焦亡相关基因

1.4.3.1 细胞总 RNA 的提取: 将细胞培养皿置于冰盒上或盛满冰块的铁盘中, 吸取培养基, PBS 冲洗 2 次。各孔加入 $500 \mu\text{L}$ TRIzol, 作用均匀后刮净细胞转移至 1.5 mL 无 RNA 酶管; 加入 $100 \mu\text{L}$ 氯仿, 震荡混匀后放置 2 min; 离心 15 min (4°C , $12000 \times g$)。取上层 $300 \mu\text{L}$ 移至新无 RNA 酶管, 另取等量异丙醇摇匀静放 10 min, 离心 10 min (4°C , $12000 \times g$); 留沉淀加 75%乙醇离心 5 min (4°C , $7500 \times g$) 冲洗 2 次; 弃上清离心 3 min (4°C , $12000 \times g$), 开盖静置 3~5 min 后加 $50 \mu\text{L}$ DEPC。NanoDrop 微量分光光度计测量总 RNA 浓度。 -80°C 储存。

1.4.3.2 cDNA 合成反应液: 参考 Erik 的 cDNA 反转录试剂盒, 反应条件与本实验室牛慧^[18]的前期研究一致。

1.4.3.3 实时荧光定量 PCR: 使用 *ACTB* 和 *GAPDH* 作为内参, 将反转录成功的 *NLRP3*、*Nek7*、*ASC*、*p65*、*GSDMD*、*IL-18* 和 *IL-1 β* 样品的 cDNA 加入 PCR 反应系统, 体系配制和扩增条件参考本实验室前期研究^[16]。 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法被用于计算 mRNA 相对表达量。引物序列如下。

表 3 Real-time PCR 引物设计

Table 3 Primers of Real-time PCR

基因	引物序列
Genes	Primer sequences (5'—3')
含有一个吡啶结构域 3 的 Nod 样受体	F: AGATCATGTTGGACTGGGCA
NLRP3	R: CATCAAAGCCGTCCATGAGG
凋亡相关斑点样蛋白	F: AGCCAGGCCTGCACTTTATA
ASC	R: CATCTTGCTTGGGTTGGTGG
半肌氨酸天冬氨酸蛋白酶 1	F: ATGGGATCTGCGGACTATG
Caspase 1	R: CCAGGTTCTCGGATGACTGT
哺乳动物相关激酶 7	F: TTCAGCTCCAAAACCACAGC
Nek7	R: ACACAGCGAGTACAGGTTCA
白细胞介素-1 β	F:AAACTCCAGGACAGAGAGCAAAA
<i>IL-1β</i>	R: CTCTCCTTGCACAAAGCTCATG
白细胞介素-	F: TGGCTGCAGAACAAGTAGAAG
<i>IL-18</i>	R: TGGTCTGGGGTGCATTATCT
消皮素 D	F: TTTGTAGTGACCGAGGTGCT
GSDMD	R: ATGTCCCAGTCAGAGCCAAT
β -肌动蛋白	F: CAAGTACCCATTGAGCACG
ACTB	R: GTCATCTTCTCACGGTTGGC
甘油醛-3-磷酸脱氢酶	F: TGGAAAGGCCATCACCATCT
GAPDH	R: CCCACTTGATGTTGGCAG

1.4.4 Western blot 检测焦亡相关蛋白的表达

1.4.4.1 制备细胞蛋白样品：分组培养的细胞经 PBS 冲洗 2 次，每次 3 min，取 1 mL 以 100:1:2 混合的 RIPA+PMSF+磷酸酶抑制剂于培养皿，刮蹭细胞移至 1.5 mL 离心管中；离心 10 min (4°C, 12 000 r \cdot min⁻¹) 取上液。BCA 试剂盒测定浓度后加入 SDS Loading Buffer 保持浓度一致。沸水浴 10 min，保存至 -80°C 备用。

1.4.4.2 电泳：根据蛋白分子量大小参考试剂盒说明选取对应的浓度配置分离胶 (8%、10%、12%) 和浓缩胶 (5%)；倒入电泳液没过内侧玻璃板，加入 10 μ L 样品至拔出梳子后的孔，最左孔添加 5 μ L 彩色预染蛋白 (Marker) 进行参考。加入电泳液电泳；浓缩胶 (80 V, 30 min)，分离胶 (120 V, 1 h)。

1.4.4.3 转膜：根据彩色预染蛋白切出所需凝胶，转移至厚滤纸上，将剪切好并且经甲醇浸泡的 PVDF 膜铺满凝胶，上盖一张厚滤纸，闭合转膜所需夹子。全程注意气泡。转膜与分子量大小同等的时间。(20 kDa 以下小蛋白直流 300 mA；其余蛋白直流 350 mA) 如需半小时以上的转膜，则置于装满冰水的盆中进行。

1.4.4.4 封闭：TBST 洗膜 5 min，快速封闭液在 37°C 封闭 15 min。

1.4.4.5 一、二抗孵育：膜在 TBST 中洗 3 次，每次 5 min，后经一抗 4°C 孵育过夜；次日在 TBST 中冲洗 3 次，每次进行 15 min，处理后经二抗室温孵育 60 min。

1.4.4.6 显色：TBST 中冲洗 3 次，每次为 15 min，置于天能化学发光成像仪，膜上滴满 ECL 显色液曝光。用 Image J 检测分析图像。

1.4.5 免疫荧光技术检测 ASC 荧光强度

1.4.5.1 分组：同“1.4.1”，将细胞接种至 6 孔板培养。

1.4.5.2 固定：吸取各培养孔上清，用 PBS 冲洗 3 次，每次操作 5 min，每孔 1 mL 4%多聚甲醛固定 30 min，晾干。

1.4.5.3 通透及封闭：PBS 冲洗 3 次，每次 3 min，再加入 0.3%Triton X-100 进行 25 min 通透；再用 PBS 冲洗 3 次，每次 3 min，最后 3% BSA 等待 60 min，封闭抗原。

1.4.5.4 一、二抗孵育：弃封闭液+ASC 一抗（1：100），湿盒 37 °C 孵育 2 h；PBS 冲洗 5 次，每次 3 min 再用 FITC（1：100）处理 1 h。

1.4.5.5 封片：用 PBS 冲洗 5 次，每次 3min，再抗荧光猝灭封片液（含 DAPI）处理 5 min。荧光显微镜观察。

1.4.6 流式细胞术检测 BLF 和 H₂O₂ 对奶牛乳腺上皮细胞焦亡的影响

根据说明书操作，每组 $1 \times 10^5 \sim 10^6$ 细胞收集于 1.5 mL 离心管，离心取沉淀 1 mL 细胞染色缓冲液重悬；加入 5 μ L Hoechst 33341 和 5 μ L PI 染色，4°C 摇床孵育 30 min，流式细胞仪检测红蓝荧光。

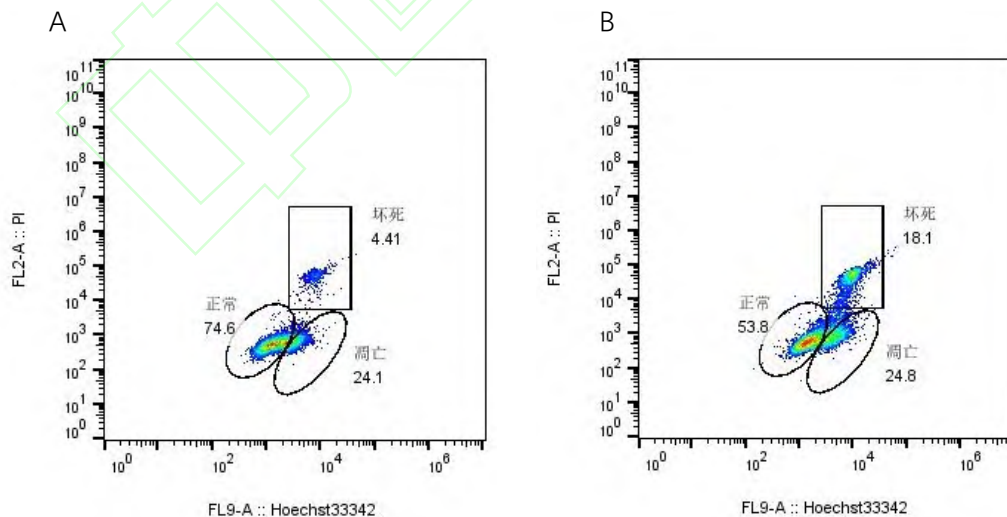
1.5 数据分析

试验结果在 Office16 的 Excel 中进行处理，得出的数据经过 SPSS 26.0 进行 ANOVA 的单因素方差分析，使用 Duncan's 法进行组间多重比较， $P \leq 0.05$ 为差异显著， $P > 0.05$ 为差异不显著。最终结果由 origin 2021 捕捉数据进行绘图呈现。

2 结果

2.1 H₂O₂ 对奶牛乳腺上皮细胞焦亡的影响

本实验室前期研究显示， $800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂ 处理 BMECs 8 h 对奶牛乳腺上皮细胞有显著损伤^[9]。使用 Hoechst 33342/PI 双染细胞，通过流式细胞术进行细胞检测，确认该浓度下 H₂O₂ 对奶牛乳腺上皮细胞焦亡的影响，如图 1 所示，右上角即为焦亡细胞，结果显示，使用 $800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂ 处理 BMECs 8 h 显著增加了奶牛乳腺上皮细胞的焦亡（ $P < 0.05$ ）。



A. 对照组； B. H₂O₂ 诱导组

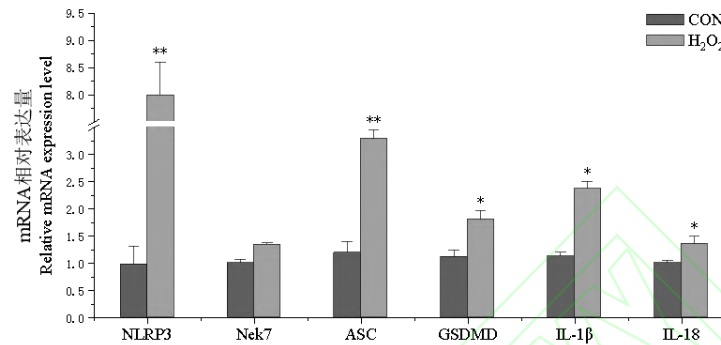
A. Control group; B. H₂O₂ induction group

图 1 H₂O₂ 诱导奶牛乳腺上皮细胞焦亡

Fig.1 H₂O₂ induced pyroptosis of bovine mammary epithelial cells

2.2 H₂O₂ 对奶牛乳腺上皮细胞焦亡相关基因的影响

在提取总 RNA 后，使用 RT-qPCR 对焦亡相关 mRNA 表达进行分析，确定 800 μmol · L⁻¹ 的 H₂O₂ 处理 8 h 是否是诱导奶牛乳腺上皮细胞焦亡的直接诱因。NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、IL-18、IL-1β 被重点监测。结果如图 2 所示，与对照组相比，在 H₂O₂ 的诱导下 NLRP3、ASC、GSDMD、IL-18、IL-1β 的相对表达量均显著升高 ($P < 0.05$)，尤其是 NLRP3 炎症小体相关的表达。说明 H₂O₂ 处理 8 h 显著提高了细胞焦亡相关基因的表达和炎症小体的表达活性，表明细胞受到氧化损伤后出现了细胞焦亡。



**表示组间差异极显著 ($P < 0.01$)；*表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。下同

** indicates that the difference between groups is extremely significant ($P < 0.01$)；* means significant difference between groups ($P < 0.05$). The same as below

图 2 H₂O₂ 对奶牛乳腺上皮细胞焦亡相关基因表达的影响

Fig.2 Effect of H₂O₂ on the expression of pyrolytic related genes in bovine mammary epithelial cells

2.3 H₂O₂ 对奶牛乳腺上皮细胞焦亡相关蛋白的影响

如图 3，Western blot 结果进一步验证了 800 μmol · L⁻¹ H₂O₂ 处理 BMECs 8 h 显著提高胞内焦亡通路相关蛋白 NLRP3、ASC、Nek7、pro-caspase1、caspase1 p20、GSDMD-N、IL-18 和 IL-1β 的表达水平 ($P < 0.05$)。说明 800 μmol · L⁻¹ H₂O₂ 处理 8 h 后通过升高 NLRP3 和 ASC 等焦亡相关蛋白，致使奶牛乳腺上皮细胞发生细胞焦亡。同时也说明 H₂O₂ 处理 8 h 后能建立稳定有效的 BMECs 焦亡模型。

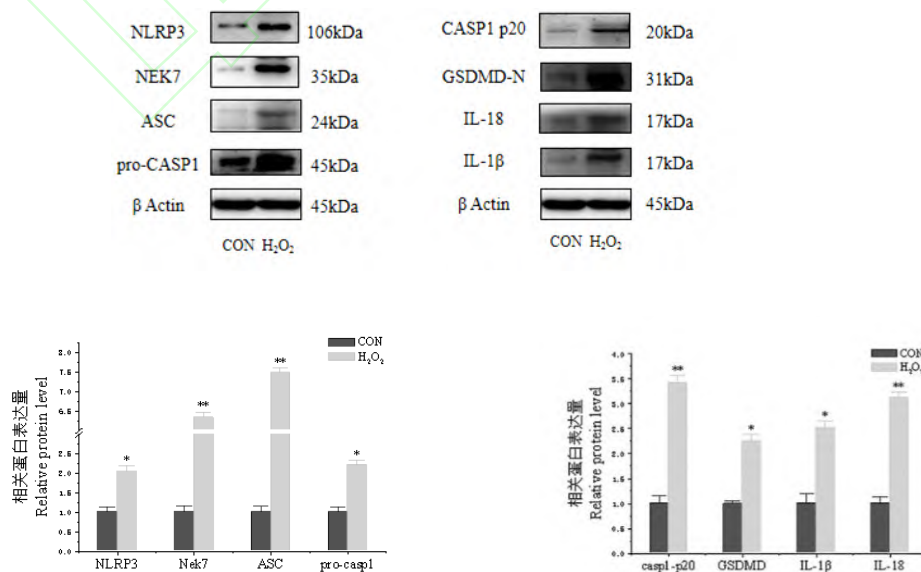
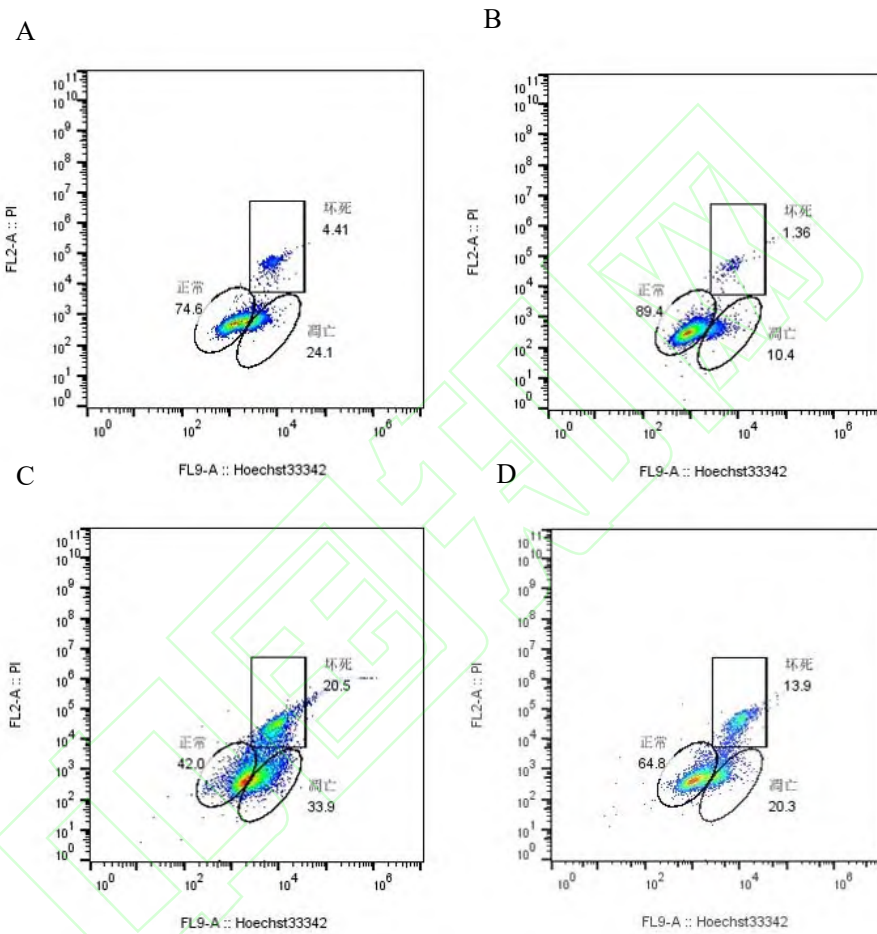


图 3 H₂O₂ 对奶牛乳腺上皮细胞焦亡相关蛋白的影响

Fig.3 Effect of H₂O₂ on pyrolytic related proteins of bovine mammary epithelial cells

2.4 BLF 对奶牛乳腺上皮细胞焦亡的影响

为探究 BLF 对奶牛乳腺上皮细胞以及对 H₂O₂ 诱导的奶牛乳腺上皮细胞焦亡的影响,加入 BLF 处理组和 BLF+ H₂O₂ 共处理组,以明确 BLF 的保护作用。BLF 的处理时间 24 h 与浓度 80 μg · mL⁻¹ 来自本实验室詹经纬^[17]的前期研究。如图 4 可以看到, BLF 的加入可以降低正常细胞的焦亡水平,并且 BLF+ H₂O₂ 共处理组的焦亡水平显著低于仅用 H₂O₂ 处理的结果。



A. 对照组; B. BLF 组; C. H₂O₂ 组; D. BLF+H₂O₂ 组

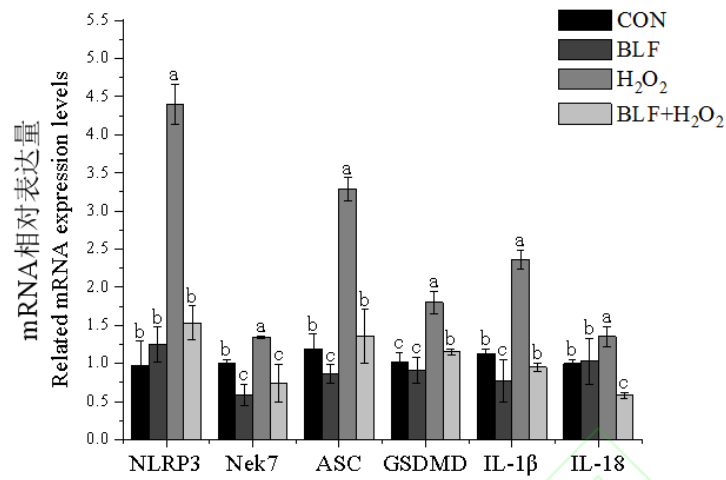
A. Control group; B. BLF group; C. H₂O₂ induction group; D. BLF+H₂O₂ group

图 4 BLF 对细胞焦亡的影响

Fig. 4 Effect of bamboo leaf flavonoids on cell charring

2.5 BLF 对焦亡相关基因的影响

本研究还通过对 H₂O₂ 诱导组与 BLF 组、BLF+H₂O₂ 共处理组的焦亡相关 mRNA 表达进行对比(图 5),可以看出 BLF 单独处理可以使 *ASC*、*Nek7* 和 *IL-1β* 的 mRNA 水平低于对照组 ($P < 0.05$); 同时,尽管 H₂O₂ 引起了 *NLRP3*、*Nek7*、*ASC*、*GSDMD*、*IL-18*、*IL-1β* 的 mRNA 上调,但 BLF 显著降低了这种趋势,使其恢复到正常水平甚至更低 ($P < 0.05$)。



柱上相同字母表示组间差异不显著 ($P>0.05$), 不同字母表示组间差异显著 ($P<0.05$)。下同
 Bars with the same letter indicates no significant difference between the groups ($P>0.05$), different letters indicate significant differences ($P<0.05$). The same as below

图 5 BLF 对焦亡相关基因的影响

Fig. 5 Effect of bamboo leaf flavonoids on scorch related mRNA

2.6 BLF 对焦亡相关蛋白的影响

Western blot 结果见图 6, 与 H₂O₂ 单独处理组相比, BLF 显著缓解了 H₂O₂ 导致的 NLRP3、ASC、Nek7、pro-caspase1、caspase1 p20、GSDMD-N、IL-18 和 IL-1β 等胞内焦亡蛋白表达的升高 ($P<0.05$), 尤其是 caspase1 p20 和 Nek7 的蛋白表达量 ($P<0.05$), 但并没有使其恢复到与对照组统一的水平。

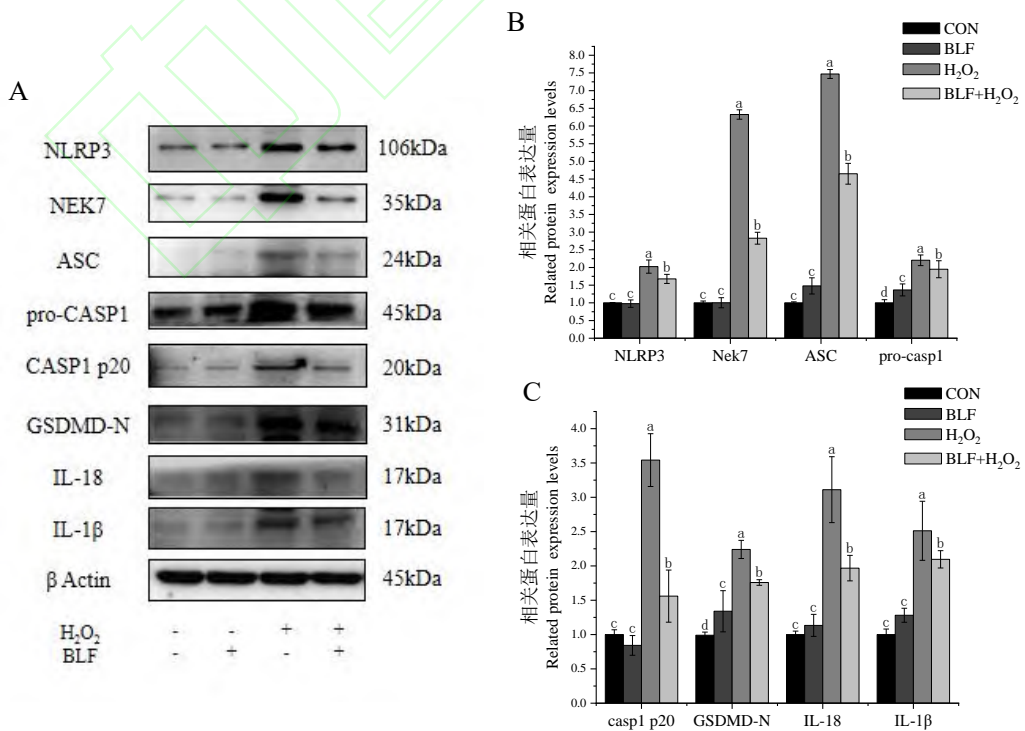


图 6 BLF 对焦亡相关蛋白的影响

Fig. 6 Effect of bamboo leaf flavonoids on scorch related proteins

2.7 BLF 对 ASC 斑点的影响

应用荧光显微镜观察不同处理组 ASC 斑点的形成，ASC 斑点荧光强度表明细胞焦亡的程度。（图 7）使用带有 FITC 荧光的二抗与 ASC 一抗结合，检测焦亡中的重要蛋白 ASC，可以看到 BLF 单独处理的 ASC 斑点没有被激活；在 H_2O_2 诱导下 ASC 斑点形成，其荧光强度显著高于对照组（ $P < 0.05$ ）；而使用 BLF 预处理后再用 H_2O_2 诱导奶牛乳腺上皮细胞，可以看到 ASC 的荧光强度显著降低（ $P < 0.05$ ），说明 BLF 可降低细胞焦亡相关蛋白的表达，在一定程度上对细胞具有保护作用。

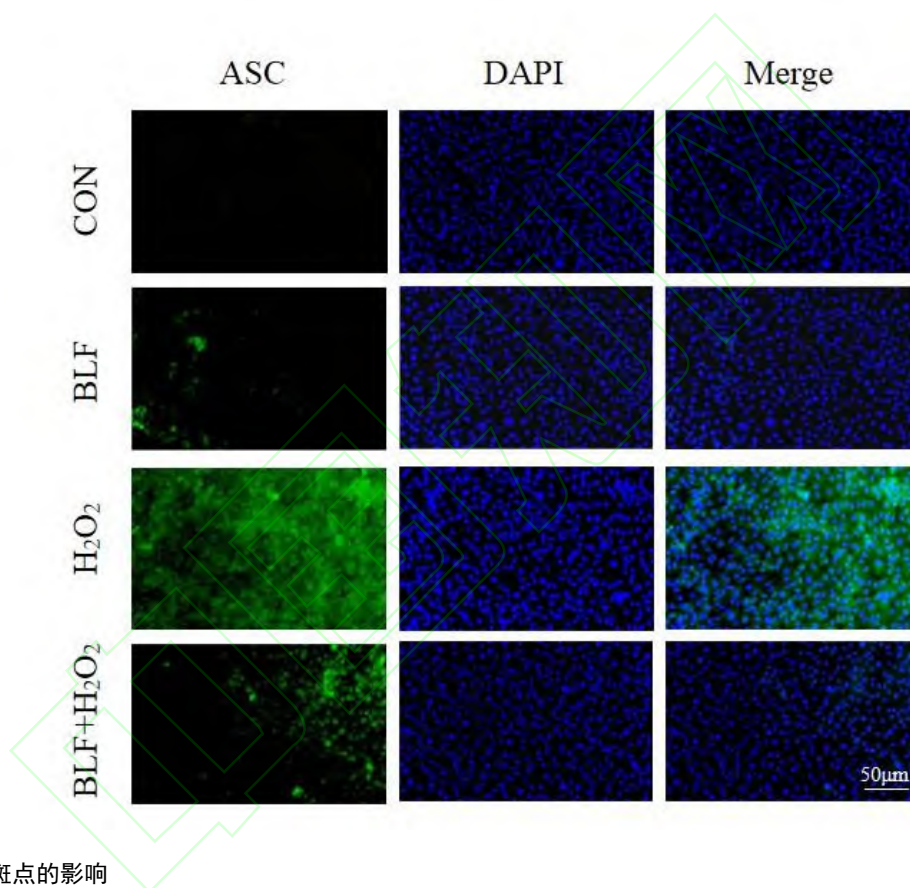


图 7 BLF 对 ASC 斑点的影响

Fig. 7 Effect of bamboo leaf flavonoids on ASC spots

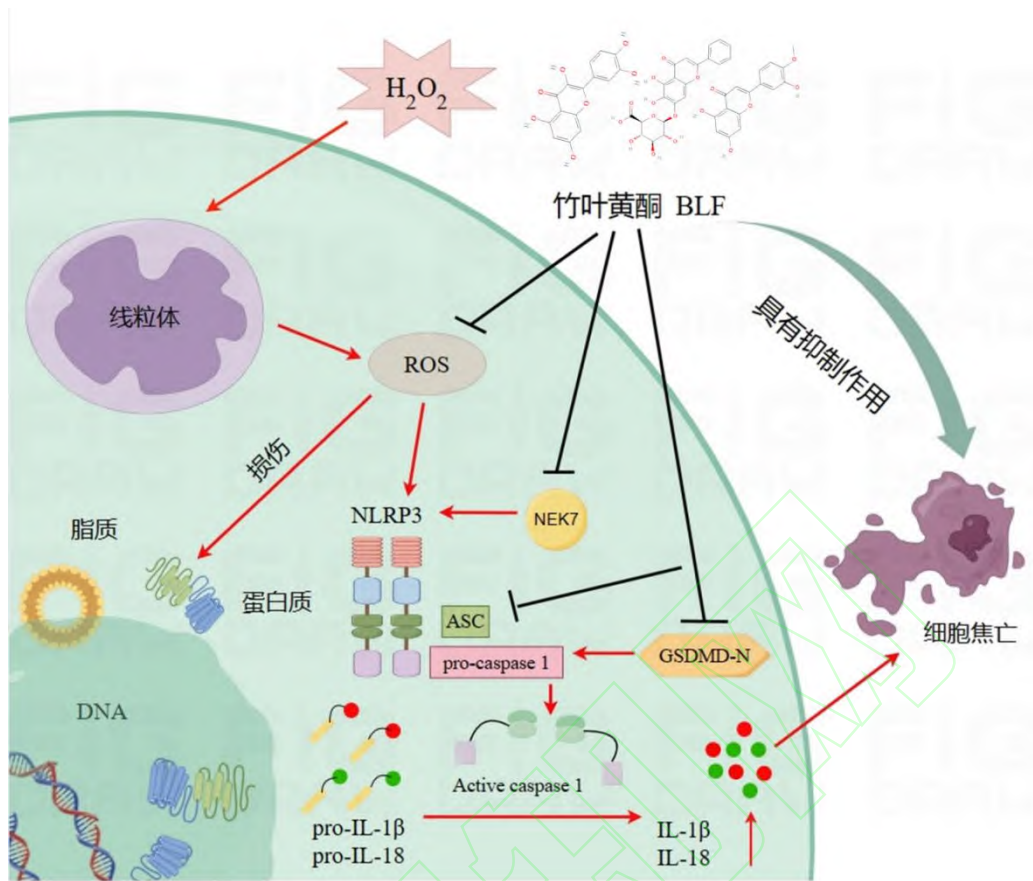
3 讨论

奶牛在围产后期和泌乳期代谢旺盛，易导致机体能量负平衡，引发氧化应激并产生过量 ROS^[19]。过量的 ROS 将导致细胞内大分子发生氧化损伤，最终可能引起细胞焦亡、细胞衰老、死亡和基因突变等严重后果^[20]。细胞焦亡作为一种 Caspase-1/Caspase-11 依赖性的程序性细胞死亡过程，起源于炎性小体的形成，最终激活包括 IL-1 β 和 IL-18 在内的多种炎症因子并通过新开的膜孔通道释放^[21]。焦亡的经典通路主要由 Gasdermin D (GSDMD) 执行，其过程中细胞不断扩张直至破裂，释放细胞内容物，触发强烈的炎症反应^[22-23]。GSDMD 蛋白在一定刺激下激活 Caspase-1，激活后切割 GSDMD 蛋白释放氨基端，氨基端 GSDMD 蛋白高度聚集后结合膜脂质，破坏细胞膜完整性，形成穿孔性膜孔，导致细胞逐渐肿胀并最终破裂死亡^[24-25]。机体代谢过程中产生的 ROS 充当信号分子参与了先天和适应性免疫细胞的激活。研究表明，ROS 作为

NLRP3 炎性小体的触发和调节因子,参与 NLRP3 炎性小体的激活,从而诱导 Caspase-1 依赖的细胞焦亡^[26]。葛子硕等^[27]研究表明,心肌缺血缺氧引起大量 Ca^{2+} 内流和 ROS 累积,通过激活 NLR 识别信号,导致 NLRP3 炎性小体的组装。苏日娜^[28]的研究发现, H_2O_2 处理巨噬细胞可导致 IL-1 β 分泌水平显著增加和 Caspase-1 介导的细胞焦亡率升高,提示 H_2O_2 具有诱导巨噬细胞发生细胞焦亡的能力。本研究结果表明, H_2O_2 处理后的 BMECs 出现明显的细胞损伤,其 *NLRP3*、*Nek7*、*ASC*、*GSDMD*、*IL-18*、*IL-1 β* 的 mRNA 相对表达量均呈显著上升趋势,尤其是 NLRP3 炎症小体的 mRNA 表达量。另外,流式细胞术检测细胞坏死比例增加,证实了 H_2O_2 显著提高了 BMECs 焦亡水平,与前人的研究结果一致^[29]。因此,本试验采用 H_2O_2 处理 BMECs 构建焦亡模型。

BLF 是一种从竹叶中提取的新型天然抗氧化剂,其黄酮类成分主要以槲皮素、异鼠李素为主^[30]。已有研究证实 BLF 具有抑菌作用,可有效降低血液中甘油三酯、胆固醇等含量,促进低密度脂蛋白在肝脏中的降解,具有强烈的自由基清除能力,同时抑制亚硝酸盐的形成^[31-32]。研究表明, BLF 的特异性结构,尤其是 2-苯基色原酮,是其发挥抗炎、抗氧化、增强免疫等功能的基础,对保护奶牛乳腺上皮细胞至关重要^[14-16-33-34]。詹经纬^[17]的研究证实了 BLF 对 H_2O_2 诱导的 BMECs 凋亡和 ROS 生成的抑制作用,通过缓解线粒体损伤、恢复抗氧化能力保护 BMECs 免受氧化损伤。袁书立^[35]的研究表明, BLF 中的荜苈萜有助于促进运动骨骼肌受损大鼠中 Nrf2 的转录和核转位,从而减轻骨骼肌的炎症和氧化应激。尽管以上研究已经充分证明了 BLF 在抗炎、抗痛、抗氧化等方面的广泛作用,然而关于其对细胞焦亡的影响仍鲜有研究。在本试验中,研究对 H_2O_2 刺激的 BMECs 进行 $800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BLF 预处理以模拟 H_2O_2 对 BLF 预处理细胞的影响,探究 BLF 预处理是否对 H_2O_2 诱导的细胞焦亡具有保护作用。结果表明, BLF 显著降低了由 H_2O_2 诱导的细胞焦亡的相关基因 (*NLRP3*、*Nek7*、*ASC*、*GSDMD*、*IL-18*、*IL-1 β*) 的 mRNA 及相关蛋白 (NLRP3、ASC、Nek7、pro-caspase1、caspase1 p20、GSDMD-N、IL-18 和 IL-1 β) 表达量上调,恢复了 ASC 斑点荧光水平, BLF 通过经典途径缓解了 NLRP3、ASC、caspase-1 介导的细胞焦亡 (图 8)。但是 BLF 对相关基因及蛋白的影响程度并不是完全一致的,对比对照组、BLF 组发现: BLF 添加可显著降低 *Nek7*、*ASC*、*IL-18* mRNA 表达量至对照水平以下, *GSDMD* mRNA 表达量与对照组相比具有下降趋势,并且细胞焦亡程度也有所下降,可能是 BLF 调控了 BMECs 自身由线粒体产生的 ROS,影响了焦亡相关 mRNA 表达量,但焦亡相关蛋白可能处于稳态, BLF 尚未对其产生影响效果。该推测与詹经纬的试验结果具有一致性, BLF 能够缓解线粒体 ROS 的产生^[17]。结合对照组、 H_2O_2 组、BLF 组、共处理组的相关基因及蛋白的研究结果发现: 共处理组的 *Nek7*、*IL-18* mRNA 表达量显著低于对照组, *NLRP3* 等其他 mRNA 水平仅下降至对照组水平; 且共处理组的 *Nek7*、*ASC*、caspase1 p20、IL-18 蛋白表达量显著下降,但焦亡相关蛋白表达量均无法下降至对照组水平。与纪凌云等^[36]研究结果一致,加入黄芩-黄连对后显著降低了主动脉组织中 *NLRP3*、*ASC*、*caspase-1*、*IL-18* 等 mRNA 表达水平; 降低主动脉组织中 *ASC*、*IL-18* 等焦亡蛋白的表达。由此, BLF 可能是通过调控焦亡相关 mRNA 降低了焦亡相关蛋白从而实现缓解细胞焦亡的过程而非直接影响焦亡相关蛋白,特别是 *Nek7*、*IL-18* mRNA 可能是 BLF 影响强度较大的基因,蛋白表达水平与 mRNA 降低趋势一致。

综上所述, BLF 能够干预 H_2O_2 诱导的 BMECs 中 NLRP3 炎症小体的调控,保护细胞免受过量 ROS 引起的细胞焦亡。



红色箭头表示 H₂O₂ 破坏细胞导致焦亡的过程；黑色线条表示 BLF 产生的抑制作用

The red arrow indicates the process of pyroptosis caused by H₂O₂ destroying cells ; black lines indicate the inhibitory effect of BLF

图 8 竹叶黄酮对奶牛乳腺上皮细胞焦亡相关通路的抑制作用 (Figdraw)

Fig. 8 Inhibitory effect of bamboo leaf flavonoids on pyroptosis-related pathways in dairy cow mammary epithelial cells (Figdraw)

4 结论

4.1 H₂O₂ 显著上调 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、IL-1β 和 IL-18 等焦亡相关基因和蛋白水平，诱导奶牛乳腺上皮细胞焦亡。

4.2 BLF 通过降低 NLRP3 炎症小体通路蛋白和基因的表达，降低炎症因子水平，缓解奶牛乳腺上皮细胞焦亡。

参考文献(References):

- [1] 周杨淑,喻礼怀,董 丽.细胞焦亡的分子机制及其营养调控[J].动物营养学报,2023,35(12):7648-7657.
ZHOU Y S,YU L H,DONG L.Molecular mechanisms of Cell Pyroptosis and its nutritional regulation[J].*Chinese Journal of Animal Nutrition*,2023,35(12):7648-7657.(in Chinese)
- [2] ZAHRA K F,LEFTER R,ALI A,et al.The involvement of the oxidative stress status in cancer pathology:a double view on the role of the antioxidants[J].*Oxid Med Cell Longev*,2021,2021(1):9965916.
- [3] 刘永芳,周 莉,刘晖扬,等.NLRP3 炎症小体在 IgA 肾病中的作用及中药干预进展[J].中国实验方剂学杂志,2024,30(6):269-279.
- LIU Y F,ZHOU L,LIU H Y,et al.Role of NLRP3 Inflammasome in IgA Nephropathy and Chinese medicine intervention:a review[J].*Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*,2024,30(6):269-279.(in Chinese)

- [4] 龚梦元,张博,朱泽恩,等.槐耳清膏通过抑制 ROS 介导的腺泡细胞焦亡减轻小鼠急性胰腺炎的严重程度[J].西安交通大学学报(医学版),2024,45(2):183-191.
- GONG M Y,ZHANG B,ZHU E Z,et al.Huaier alleviates acute pancreatitis in mice by reducing ROS-induced pyroptosis in acinar cells[J].*Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Sciences)*,2024,45(2):183-191.(in Chinese)
- [5] 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.
- [6] 赵承启,邹伟.中医药调控细胞焦亡干预缺血性脑卒中的研究进展[J].湖南中医药大学学报,2023,43(9):1742-1748.
- ZHAO C Q,ZOU W.Research progress on Chinese medicine in regulating pyroptosis for ischemic stroke[J].*Journal of Hunan University of Chinese Medicine*,2023,43(9):1742-1748.(in Chinese)
- [7] 齐庆,孙蓬远,许诺,等.基于 NLRP3 介导的细胞焦亡探讨痹通方含药血清对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞损伤的保护作用及机制研究[J/OL].中华中医药学刊,2023[2024-03-14].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.r.20231027.1653.008.html>.
- QI Q,SUN P Y,XU N,et al.To investigate the protective effect and mechanism of Bitong decoction containing serum on fibroblast-like synovial cell injury in rheumatoid arthritis based on NLRP3 mediated pyroptosis[J].*Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*,2023[2024-03-14].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.r.20231027.1653.008.html>.(in Chinese)
- [8] 卢德勋.动物营养学科发展在战略方向上的重大突破:构建动物健康营养理论和技术体系及其实际应用[J].动物营养学报,2021,33(1):1-12.
- LU D X.A Major breakthrough in development of animal nutrition in strategic direction:building an animal health and nutrition theory and technology system and its application[J].*Chinese Journal of Animal Nutrition*,2021,33(1):1-12.(in Chinese)
- [9] 宋景平,姜宇轩,刘光芒,等.天然植物成分调控 gasdermin 家族在细胞焦亡中的作用[J].动物营养学报,2022,34(7):4213-4226.
- SONG J P,JIANG Y X,LIU G M,et al.Roles of natural plant components regulating gasdermin family in pyroptosis[J].*Chinese Journal of Animal Nutrition*,2022,34(7):4213-4226.(in Chinese)
- [10] GU Y P,XUE F,XIAO H R,et al.Bamboo leaf flavonoids suppress oxidative stress-induced senescence of HaCaT cells and UVB-induced photoaging of mice through p38 MAPK and autophagy signaling[J].*Nutrients*,2022,14(4):793.
- [11] 甘甜,周晓燕,范高霞,等.竹叶黄酮对 2 型糖尿病大鼠抑郁的影响及机制[J].中华医学杂志,2019,99(16):1251-1255.
- GAN T,ZHOU X Y,FAN G X,et al.Effect and mechanism of bamboo leaf flavonoids on depression in type 2 diabetic rats[J].*National Medical Journal of China*,2019,99(16):1251-1255.(in Chinese)
- [12] 李成贤,曹洪志,易宗容,等.竹叶提取物对肉牛生长性能、营养物质表观消化率、血清抗氧化和免疫指标的影响[J].饲料研究,2021,44(12):10-14.
- LI C X,CAO H Z,YI Z R,et al.Effect of bamboo leaf extract on growth performance,nutrients apparent digestibility,serum antioxidant and immune indexes of beef cattle[J].*Feed Research*,2021,44(12):10-14.(in Chinese)
- [13] YU Y,LI Z M,CAO G T,et al.Bamboo leaf flavonoids extracts alleviate oxidative stress in HepG2 cells via naturally modulating reactive oxygen species production and Nrf2-mediated antioxidant defense responses[J].*J Food Sci*,2019,84(6):1609-1620.
- [14] 侯昆,童津津,楚康康,等.竹叶黄酮与青蒿提取物对患隐性乳房炎奶牛产奶性能、乳中体细胞数及血清免疫和抗氧化相关指标的影响[J].动物营养学报,2019,31(9):4286-4295.
- HOU K,TONG J J,CHU K K,et al.Effects of bamboo leaf flavonoids and *Artemisia annua* extract on milk performance,milk somatic cell count and serum immune and antioxidant related indexes of dairy cows with subclinical mastitis[J].*Chinese Journal of Animal Nutrition*,2019,31(9):4286-4295.(in Chinese)
- [15] 李建凤,赵佳桢,沈义媛,等.竹叶黄酮对热应激诱导奶牛乳腺上皮细胞氧化损伤的保护作用[J].动物营养学报,2022,34(1):626-639.
- LI J F,ZHAO J Z,SHEN Y Y,et al.Protective effects of Bamboo Leaf flavonoids on oxidative damage of bovine mammary epithelial cells induced by heat stress[J].*Chinese Journal of Animal Nutrition*,2022,34(1):626-639.(in Chinese)
- [16] 王宇彤,沈义媛,霍相羽,等.体外法研究竹叶黄酮对奶牛乳腺上皮细胞抗氧化及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路中关键基因表达的影响[J].动物营养学报,2022,34(1):612-625.
- WANG Y T,SHEN Y Y,HUO X Y,et al.*In vitro* study on effects of Bamboo Leaf flavonoids on Antioxidation and expression of key

- genes in mammalian target of rapamycin signaling pathway in bovine mammary epithelial cells[J].*Chinese Journal of Animal Nutrition*,2022,34(1):612-625.(in Chinese)
- [17] 詹经纬,李欣,关淑文,等.竹叶黄酮对过氧化氢诱导的奶牛乳腺上皮细胞氧化损伤的保护作用[J].*动物营养学报*,2023,35(4):2616-2628.
- ZHAN J W,LI X,GUAN S W,et al.Protective effect of Bamboo Leaf flavonoids on oxidative damage of bovine mammary epithelial cells induced by hydrogen peroxide[J].*Chinese Journal of Animal Nutrition*,2023,35(4):2616-2628.(in Chinese)
- [18] 牛慧.苦参碱对无乳链球菌诱导的奶牛乳腺上皮细胞炎症反应的保护机制研究[D].北京:北京农学院,2022:1-60.
- NIU H.Study on the protective mechanism of matrine against bovinemammary epithelial cells inflammation induced by *Streptococcus agalactiae*[D].Beijing:Beijing University of Agriculture,2022:1-60.(in Chinese)
- [19] 李澜,杨佳琦,刘耀权,等.氧化应激与奶牛常见疾病关系研究进展[J].*动物医学进展*,2022,43(8):98-101.
- LI L,YANG J Q,LIU Y Q,et al.Progress on relationship between oxidative stress and common diseases in dairy cows[J].*Progress in Veterinary Medicine*,2022,43(8):98-101.(in Chinese)
- [20] BEG A A,RUBEN S M,SCHEINMAN R I,et al.I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B:a mechanism for cytoplasmic retention[J].*Genes Dev*,1992,6(10):1899-1913.
- [21] AGLIETTI R A,ESTEVEZ A,GUPTA A,et al.GsdmD p30 elicited by caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes[J].*Proc Natl Acad Sci U S A*,2016,113(28):7858-7863.
- [22] XIA X J,WANG X,CHENG Z,et al.The role of pyroptosis in cancer:pro-cancer or pro-“host”?[J].*Cell Death Dis*,2019,10(9):650.
- [23] GE X T,LI W Z,HUANG S,et al.The pathological role of NLRs and AIM2 inflammasome-mediated pyroptosis in damaged blood-brain barrier after traumatic brain injury[J].*Brain Res*,2018,1697:10-20.
- [24] 关海梅,曾阳玲,王恬雯,等.GSDMD介导的肝细胞焦亡在急性肝衰竭中的致病机制[J].*海南医学院学报*,2024,30(9):700-706.
- GUAN H M,ZENG Y L,WANG T W,et al.Pathogenesis of GSDMD-mediated pyroptosis of hepatocytes in acute liver failure[J].*Journal of Hainan Medical University*,2024,30(9):700-706.(in Chinese)
- [25] SHI J J,ZHAO Y,WANG K,et al.Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death[J].*Nature*,2015,526(7575):660-665.
- [26] BAI R R,LANG Y,SHAO J,et al.The role of NLRP3 Inflammasome in cerebrovascular diseases pathology and possible therapeutic targets[J].*ASN Neuro*,2021,13:17590914211018100.
- [27] 葛子硕,徐志猛,李萍.NLRP3炎症小体介导的心肌细胞焦亡及中药干预研究进展[J].*中国中药杂志*,2021,46(20):5210-5217.
- GE Z S,XU Z M,LI P.Advances in research on cardiomyocyte pyroptosis mediated by NLRP3inflammasome and traditional Chinese medicine intervention[J].*China Journal of Chinese Materia Medica*,2021,46(20):5210-5217.(in Chinese)
- [28] 苏日娜,刘天怡,马璐瑶,等.小檗碱通过 mtROS-NLRP3 通路抑制 H₂O₂ 诱导的巨噬细胞焦亡[J].*中国免疫学杂志*,2022,38(9):1064-1068.
- SU R N,LIU T Y,MA L Y,et al.Berberine inhibits H₂O₂-induced pyroptosis of macrophages through mtROS-NLRP3 pathway[J].*Chinese Journal of Immunology*,2022,38(9):1064-1068.(in Chinese)
- [29] 易娜,李贺,游三丽,等.丹参酮IIA通过 AK003290 减轻 H₂O₂ 诱导的原代小鼠心肌细胞焦亡[J].*中国病理生理杂志*,2021,37(6):1035-1041.
- YI N,LI H,YOU S L,et al.Tanshinone IIA attenuates H₂O₂-induced primary mouse cardiomyocyte pyroptosis via AK003290[J].*Chinese Journal of Pathophysiology*,2021,37(6):1035-1041.(in Chinese)
- [30] 周易,杨丽,党逸云,等.淡竹叶黄酮类成分的研究[J].*中成药*,2023,45(1):112-118.
- ZHOU Y,YANG L,DANG Y Y,et al.Flavonoids from *Lophatherum gracile*[J].*Chinese Traditional Patent Medicine*,2023,45(1):112-118.(in Chinese)
- [31] 姚佳.竹叶提取物的生物学功能及其在动物生产中的应用研究进展[J].*饲料研究*,2023,46(5):155-159.
- YAO J.Research progress on biological function of bamboo leaf extract and application in animal production[J].*Feed*

Research,2023,46(5):155-159.(in Chinese)

[32] 陈露,朱莉苹,张超,等.竹叶黄酮提取优化及其在四川泡菜中的应用研究[J].中国调味品,2023,48(7):196-201, 212.

CHEN L,ZHU L P,ZHANG C,et al.Study on optimization of extraction of flavonoids from Bamboo Leaves and their application in Sichuan pickles[J].*China Condiment*,2023,48(7):196-201, 212.(in Chinese)

[33] 栗明月,焦梦荷,蒋林树,等.竹叶黄酮的生理功能及其应用前景[J].中国农学通报,2018,34(32):144-149.

LI M Y,JIAO M H,JIANG L S,et al.Physiological functions and application prospect of Bamboo Leaf flavonoids[J].*Chinese Agricultural Science Bulletin*,2018,34(32):144-149.(in Chinese)

[34] WANG T Y,LI Q,BI K S.Bioactive flavonoids in medicinal plants:structure,activity and biological fate[J].*Asian J Pharm Sci*,2018,13(1):12-23.

[35] 袁书立.竹叶黄酮活性物质对运动性骨骼肌损伤大鼠的干预作用及机制[J].分子植物育种,2023,21(6):2045-2050.

YUAN S L.Intervention effect and mechanism of Bamboo Leaf flavonoids on exercise-induced skeletal muscle injury in rats[J].*Molecular Plant Breeding*,2023,21(6):2045-2050.(in Chinese)

[36] 纪凌云,吴俏兰,陈泽涛,等.基于 NLRP3 炎症小体介导的巨噬细胞焦亡探究黄芩-黄连对动脉粥样硬化的干预机制[J].中国实验方剂学杂志,2024,30(7):121-130.

JI L Y,WU Q L,CHEN Z T,et al.Scutellariae Radix-Coptidis Rhizoma treats atherosclerosis via NLRP3 Inflammasome-mediated Pyroptosis of macrophages[J].*Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*,2024,30(7):121-130.(in Chinese)

(编辑 范子娟)