

睡莲总多酚对脂多糖诱导的 RAW 264.7 细胞炎症的保护机制

李晨阳^{1,2}, 姚雨含², 艾迪达尔·托力肯², 陈燕², 赵军^{1,2*}¹新疆医科大学公共卫生学院, 乌鲁木齐 830011; ²新疆维吾尔自治区药物研究院维吾尔药重点实验室, 乌鲁木齐 830004

摘要:采用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的 RAW 264.7 细胞炎症模型探究睡莲总多酚(total polyphenols from *Nymphaea candida*, NCTP)的抗炎机制。通过 LPS 诱导构建 RAW 264.7 细胞炎症模型, 采用 CCK-8 法检测细胞活力; 利用 Griess 试剂法检测细胞上清液中一氧化氮(NO)含量; ELISA 法检测细胞上清液中环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)、前列腺素 E2(prostaglandin E2, PGE2)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)含量; 采用免疫荧光和流式细胞仪检测细胞线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)和活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平; 流式细胞术检测细胞 M1 极化; Western blot 测定细胞中 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)、髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)、转化生长因子激酶 1(transforming growth factor β -activated kinase 1, TAK1)、 κ B 抑制因子激酶(inhibitor of κ B kinase, IKK)、核转录因子 κ B 抑制蛋白(inhibitor of NF- κ B, I κ B)、核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)、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 MAPK)、NOD 样受体蛋白 3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)、凋亡相关颗粒样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)、半胱氨酸天冬氨酸特异蛋白酶-1(cysteiny aspartate specific proteinase-1, Caspase-1)、血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)、Kelch 样 ECH 相关蛋白 1(Kelch-like ECH-associated protein 1, KEAP1)和核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2)的蛋白表达。结果显示, NCTP 抑制了 PGE2、COX-2、NO、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的水平($P < 0.01$), 并防止 LPS 诱导的 RAW 264.7 巨噬细胞 M1 极化($P < 0.01$); NCTP 可抑制 TLR4、MyD88、TAK1、IKK、p-I κ B/I κ B、p-NF- κ B/NF- κ B、p-JNK/JNK、p-P38 MAPK/P38 MAPK、NLRP3、ASC、Caspase-1、KEAP1 水平, 上调 NRF2 和 HO-1 蛋白的表达($P < 0.05$, $P < 0.01$); 同时保护 MMP、减少 ROS 的产生($P < 0.05$, $P < 0.01$)。以上结果表明, NCTP 对 LPS 诱导的 RAW 264.7 巨噬细胞炎症损伤具有较好的防治作用, 其机制与抗氧化, 改善线粒体功能, 调节 TLR4/MAPK/NF- κ B、NLRP3、KEAP1-NRF2/HO-1 途径密切相关。

关键词:睡莲花; 睡莲总多酚; 炎症; TLR4/MAPK/NF- κ B; NLRP3; RAW 264.7 细胞

中图分类号: 285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-6880(2026)8-1629-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2026.8.001

CSTR: 32307.14.1001-6880.2026.8.001

Preventive effect of the total polyphenols from *Nymphaea candida* in lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 cellsLI Chen-yang^{1,2}, YAO Yu-han², TOLIKEN Aididar², CHEN Yan², ZHAO Jun^{1,2*}¹School of Public Health, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;²Xinjiang Key Laboratory for Uighur Medicines, Institute of Materia Medica of Xinjiang, Urumqi 830004, China

Abstract: This study aims to investigate the anti-inflammatory mechanism of total polyphenols from *Nymphaea candida* (NCTP) by using lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 cell inflammation model. *In vitro*, CCK-8 assay was used to test cell viability; the Griess reagent method was used to detect the content of nitric oxide (NO) in cell supernatant; ELISA methods were used to measure the levels of cyclooxygenase-2 (COX-2), prostaglandin E2 (PGE2), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the cell supernatant; immunofluorescence and flow cytometry were used to measure mitochondrial membrane potential (MMP) and reactive oxygen species (ROS) levels; flow cytometry was used to

收稿日期: 2026-01-26

接受日期: 2026-05-28

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金重点项目(2021D01D14); 新疆维吾尔自治区公益性科研院所基本科研业务费项目(KY2025083)

* 通信作者 E-mail: zhaojun21.cn@163.com

test M1 polarization; Western blot was utilized to determine the protein expression levels of Toll-like receptor 4 (TLR4), myeloid differentiation factor 88 (MyD88), transforming growth factor β -activated kinase 1 (TAK1), inhibitor of κ B kinase (IKK), inhibitor of NF- κ B (I κ B), nuclear factor- κ B (NF- κ B), extracellular regulated protein kinases (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), P38 mitogen-activated protein kinase (P38 MAPK), NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), cysteinyl aspartate specific proteinase-1 (Caspase-1), heme oxygenase-1 (HO-1), Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2). The results showed that NCTP could inhibit the levels of NO, PGE2, COX-2, IL-1 β , IL-6 and TNF- α ($P < 0.01$); and prevented LPS-induced RAW 264.7 macrophages M1 polarization ($P < 0.01$). NCTP also downregulated the expression of TLR4, MyD88, TAK1, IKK, p-I κ B/I κ B, p-NF- κ B/NF- κ B, p-JNK/JNK, p-P38 MAPK/P38 MAPK, NLRP3, ASC, Caspase-1, KEAP1 proteins, and upregulated the expression of NRF2 and HO-1 in RAW 264.7 cell ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Meanwhile, NCTP elevated MMP and reduced ROS production ($P < 0.05$, $P < 0.01$). These results demonstrated that anti-inflammatory mechanism of NCTP might be closely related to antioxidation, ameliorating mitochondrial function, and regulating TLR4/MAPK/NF- κ B, NLRP3, KEAP1/NRF2/HO-1 pathways.

Key words: *Nymphaea candida* Presl; total polyphenols from *Nymphaea candida*; inflammation; TLR4/MAPK/NF- κ B; NLRP3; RAW 264.7 cells

睡莲花为睡莲属植物雪白睡莲 *Nymphaea candida* Presl 的干燥花蕾,主产于我国新疆博斯腾湖、伊犁及阿勒泰地区,具有润肺止咳、清热强心、湿脑安神之功效,临床用于热性感冒、肺燥干咳等疾病的治疗,是祖卡木颗粒、理血奇朗糖浆等清热解毒类单方或复方制剂的主要药味^[1,2]。该药材具有抗炎、抗氧化、降血压、降血糖、保肝及神经保护等多种生物活性,多酚类成分是其所含的主要特征性成分^[3-5]。在构建睡莲花总多酚(total polyphenols from *Nymphaea candida*, NCTP; 多酚含量可达 90.0%)制备工艺^[6]的基础上,进一步研究发现 NCTP 具有较好的消炎、镇痛、解热和止咳的活性,对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的小鼠急性肺损伤也有较为显著的防治作用^[7,8]。

线粒体既是细胞能量代谢中心,也是介导氧化应激与炎症信号传导的关键节点,其功能状态直接决定炎症反应走向^[9]。在 LPS 诱导的炎症反应中, LPS 可通过与巨噬细胞表面 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 受体结合,激活 TLR4/丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)/核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路,释放白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)等炎症因子。这些炎症因子可损伤线粒体,导致线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)降低,引发活性氧(reactive oxygen species, ROS)大量产生;ROS 又可通过磷酸化激活促进 NF- κ B 介导的促炎因子转录,或激活 NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体,进一步加剧炎

症级联反应^[10]。核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2) 通路可感知 ROS 浓度的变化,上调血红素氧合酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 的表达清除过量 ROS、减轻线粒体损伤,反向抑制炎症通路的激活^[11]。因此,本文通过线粒体膜功能的改善、TLR4/MAPK/NF- κ B 和 ROS/Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, KEAP1)/NRF2 通路的调控探讨 NCTP 对 LPS 诱导小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 炎症反应的抑制机制,以期对睡莲花抗炎功效机制的阐明及其有效部位 NCTP 的深入开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

NCTP 按前期报道方法^[7]制备,总多酚含量 90.15% $\pm$ 0.17%,睡莲酚、鞣花酸和烟花苷的含量分别为 28.05% $\pm$ 0.02%、2.15% $\pm$ 0.03% 和 3.50% $\pm$ 0.01%。

RAW 264.7 细胞(批号:L880320040205,武汉博世德生命科技有限公司提供);LPS(批号:L2880-100 mg,美国 Sigma 公司);CCK-8 试剂盒(批号:AK20861,武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司);特超敏 ECL 化学发光底物(批号:BL520A,北京兰杰柯科技有限公司);PBS 缓冲液(批号:2246306,美国 Thermo Fisher Scientific 公司);IL-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2)、环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) ELISA 试剂盒(批号分别是:JL18442、JL20268、JL10484、JL12815、JL27126,上海

江莱生物有限公司);一氧化氮(NO)试剂盒(批号:Z938241028,上海碧云天生物技术有限公司);地塞米松(dexamethasone, DEX)(美国 Selleck 公司);BCA 蛋白定量试剂盒(批号:PC0020,北京索莱宝科技有限公司);NLRP3 抗体(批号:1011211-26)、凋亡相关颗粒样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)抗体(批号:1054835-29)、半胱氨酸天冬氨酸特异蛋白酶-1(cysteinyI aspartate specific proteinase-1, Caspase-1)抗体(批号:1031411-9)、髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)抗体(批号:GR 3215844-9)、转化生长因子激酶 1(transforming growth factor β -activated kinase 1, TAK1)抗体(批号:1084069-11)、 κ B 抑制因子激酶(inhibitor of κ B kinase, IKK)抗体(批号:1000562-13)、核转录因子 κ B 抑制蛋白(inhibitor of NF- κ B, I κ B)抗体(批号:1050440-39)、p-I κ B 抗体(批号:1050440-5)、NF- κ B p65 抗体(批号:1078126-18)、p-NF- κ B p65 抗体(批号:1078126-41)、KEAP1 抗体(批号:1053068-6)、HO-1 抗体(批号:1011567-19)、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)抗体(批号:1002225-29)、细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinase, ERK)抗体(批号:1024274-17)、P38 MAPK 抗体(批号:1000220-40)、p-P38 MAPK 抗体(批号:1121708-3)、p-JNK 抗体(批号:1056200-11)、p-ERK 抗体(批号:1001375-5)和山羊抗兔 IgG H&L(批号:GR3215675-8)(美国 Abcam 公司);TLR4 抗体(批号:14358S)、NRF2 抗体(批号:12721T)(美国 Cell Signaling Technology 公司)。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-2FD 超净工作台(苏州净化设备公司);Multiskan GO 全波长酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Evos XL 倒置生物显微镜(深圳 Evos 公司);HF240 CO₂ 恒温细胞培养箱(日本东京理化器械株式会社);AL204 电子天平(精度 0.001 g,梅特勒-托利多上海有限公司);MIKRO200R 高速冷冻离心机(德国 Hettich 公司);ChemiDoc MP 全自动全能型显影仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养及活力测定

RAW 264.7 细胞在含 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基中,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。称取 NCTP 适量,以 DMSO 溶解后稀释

配制成浓度为 500 μ g/mL 母液,0.22 μ m 微孔滤膜过滤,-80 °C 保存备用。选择生长状态良好的 RAW 264.7 巨噬细胞,当细胞密度长到 70% ~ 80% 左右时,将细胞接种在 96 孔板中,每孔 100 μ L(共 60 000 个细胞/孔),孵育 24 h。NCTP 组给予不同浓度(200、100、50、25、12.5、6.25 μ g/mL)的 NCTP 孵育 24 h;LPS + NCTP 组经上述同浓度 NCTP 预处理 24 h 后,加入 500 ng/mL LPS 共孵育 16 h,同时设空白组(含 0.02% DMSO 的培养基)。干预结束后,每孔加入 10 μ L CCK8 试剂,再补加 90 μ L 无血清 DMEM 培养基,继续孵育 1 h。采用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔吸光度值,计算细胞活力^[12,13]。

1.3.2 实验分组及处理

参考“1.3.1”的实验结果,选取 NCTP 浓度为 6.25、12.5 和 25 μ g/mL。将 RAW 264.7 巨噬细胞分为空白组、模型组、DEX 阳性对照组、NCTP 低、中、高剂量组。当 RAW 264.7 巨噬细胞密度达 90% 时,轻轻吹打细胞,离心,并收集细胞沉淀,接种于 6 孔板(5×10^5 个/mL),培养 24 h 后,进行细胞处理:NCTP 低、中、高剂量组分别加入 6.25、12.5、25 μ g/mL 的 NCTP,阳性对照组加入 10 μ mol/L DEX,空白组和模型组加入等体积培养基。干预 24 h 后,除空白组外,其余各组均加入 500 ng/mL LPS 继续干预 16 h,完成实验处理。

1.3.3 Griess 法测定 NO 浓度

细胞接种和给药方法参照细胞活力测定部分。细胞干预完成后,分别取各组细胞培养上清液 50 μ L 于 96 孔板中,分别加入 Griess A 和 Griess B 试剂各 50 μ L,室温避光孵育 10 min。在 540 nm 波长下测定吸光度值,根据亚硝酸钠标准曲线计算上清液中的 NO 浓度。

1.3.4 ELISA 法测定炎症介质 PGE₂、COX-2 和促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量

按照“1.3.2”进行分组处理,干预结束收集细胞上清液并离心,通过 ELISA 试剂盒测定上清液中 PGE₂、COX-2 和 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 分泌情况。使用酶标仪在 450 nm 下测定吸光度值。

1.3.5 流式细胞术检测 M1 型巨噬细胞表面标志性因子、细胞内 ROS

按照“1.3.2”进行分组处理,收集各组细胞,用 4 °C 含 0.1% BSA 的 PBS 洗涤 3 次,加 1 mL PBS 重悬制备单细胞悬液;台盼蓝染色计数后,调整细胞浓度至 5×10^5 个/mL,12 000 r/min 离心 5 min,弃上

清。向细胞沉淀中加 100 μL PBS 重悬,每管分别加入 5 μL CD86 抗体和 5 μL CD45 抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min;孵育后加 500 μL PBS 洗涤细胞 2 次,重复洗涤 1 次,最后加 300 μL PBS 重悬细胞,上机检测,结果采用 FlowJo 10.8.1 软件分析。

按照“1.3.2”进行分组处理,收集各组细胞,待融合度达到 80% 时,加入含 10 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 的无血清培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。随后,用 PBS 洗涤细胞 2 次,采用流式细胞仪(激发波长 488 nm,发射波长 525 nm)检测荧光强度。

1.3.6 免疫荧光实验

细胞按“1.3.2”分组处理后,分别进行 ROS、MMP 检测。ROS 检测:弃去培养液,加入 1 mL CM-H₂DCFDA,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min,以 PBS 洗涤细胞 3 次,充分去除未进入细胞的探针后,采用荧光显微镜观察。MMP 检测:弃去培养液,PBS 洗涤 1 次,依次加入 1 mL 细胞培养液与 1 mL 新鲜配制的 JC1 染色缓冲液,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育,弃上清后以 JC1 染色缓冲液洗涤细胞 2 次,加入 2 mL 细胞培养液,采用荧光显微镜观察。

1.3.7 Western blot 检测相关蛋白的表达

按照“1.3.2”进行分组处理,细胞经 RIPA 裂解液提取后,BCA 法定量并调整浓度。各组蛋白加入相应体积的 5 $\times$ loading buffer 及不同体积的 PBS 后,涡旋混匀,100 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。按照 10 μg 上样,本实验选择 10% 的分离胶,进行 SDS-PAGE 电泳(浓缩胶:80 V,30 min;分离胶:120 V,60 min),电转(300 mA,90 min),将蛋白转移至 PVDF 膜上。将 PVDF 膜用 1 $\times$ TBST 漂洗 3 次,每次 5 min;漂洗后放入快速封闭液中封闭 15 min,裁至适宜,置于稀释好的一抗,TLR4(1:1 000),MyD88(1:1 000),TAK1(1:1 000),IKK(1:5 000),I κ B(1:5 000),p-I κ B(1:10 000),NF- κ B p65(1:5 000),p-NF- κ B p65(1:1 000),NLRP3(1:1 000),ASC(1:1 000),Caspase-1(1:1 000),JNK(1:1 000),p-JNK(1:5 000),ERK(1:10 000),p-ERK(1:1 000),P38 MAPK(1:1 000),p-P38 MAPK(1:1 000),NRF2(1:1 000),KEAP1(1:1 000),HO-1(1:1 000),GAPDH(1:10 000),冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 16 h 后,将 PVDF 膜从抗体中拿出,用 1 $\times$ TBST 漂洗 3~5 次,每次 15 min,洗膜后孵育山羊抗兔 IgG 二抗(1:10 000,室温 1 h),ECL 显影后用 Image J 分析条带密度。

1.4 统计学分析

实验结果以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 25 软件进行统计学分析,多组间显著性比较采用单因素方差分析,两组之间显著性比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。结果采用 GraphPad Prism 9.4 软件作图。

2 结果

2.1 NCTP 对 RAW 264.7 细胞活力的影响

检测不同浓度的 NCTP(200、100、50、25、12.5、6.25 $\mu\text{g/mL}$)及不同浓度的 NCTP 与 500 ng/mL 的 LPS 共同孵育 RAW 264.7 细胞时的细胞活力,结果如图 1 所示,其中在 50 $\mu\text{g/mL}$ 以下的浓度与空白组相比差异无统计学意义。因此,NCTP 在后续实验的剂量选择为 6.25、12.5、25 $\mu\text{g/mL}$ 。

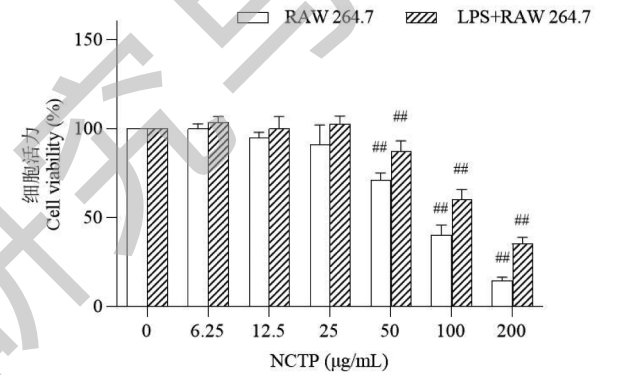


图 1 NCTP 对 RAW 264.7 细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effect of NCTP on RAW 264.7 cell activity($\bar{x} \pm s, n = 6$)

注:与 0 $\mu\text{g/mL}$ 组比较,## $P < 0.01$ 。Note: Compared with 0 $\mu\text{g/mL}$ group, ## $P < 0.01$ 。

2.2 NCTP 对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 PGE2、COX-2、NO、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 表达水平的影响

如图 2 所示,与空白组相比,模型组炎症介质 PGE2、COX-2、NO 和炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平明显升高($P < 0.01$),提示细胞炎症激活,造模成功;与模型组相比,NCTP 在 6.25、12.5 和 25 $\mu\text{g/mL}$ 浓度时以剂量依赖的方式有效抑制 LPS 诱导的 PGE2、COX-2、NO、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的过量产生($P < 0.05, P < 0.01$)。

2.3 NCTP 对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 M1 极化标志物 CD45 和 CD86 表达的影响

为了进一步确定 NCTP 对巨噬细胞 M1 型极化的影响,采用流式细胞术检测表面的相关因子 CD45 和 CD86 的表达,通过荧光强度的强弱反映原型巨

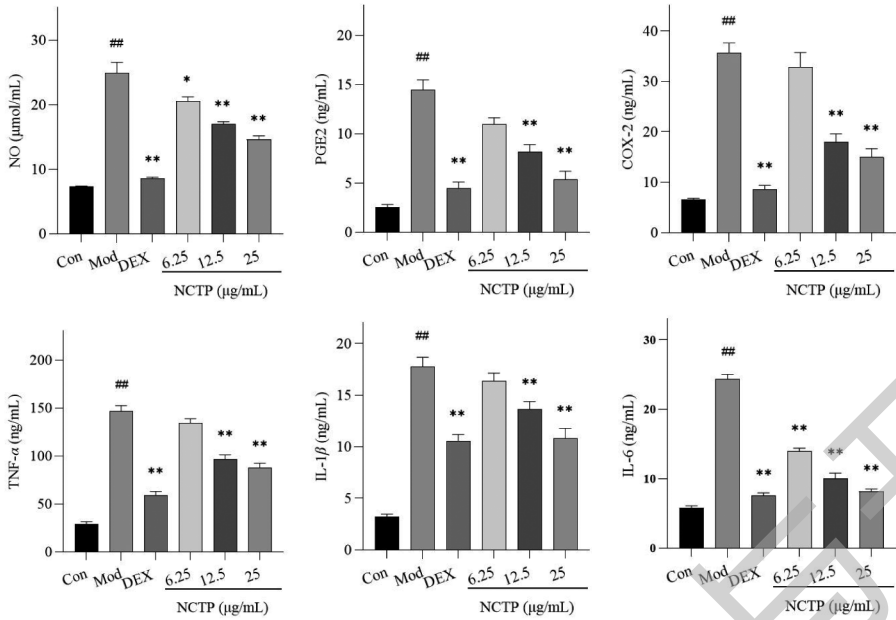


图2 NCTP 对 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞上清液中 PGE2、COX-2、NO、TNF-α、IL-1β 和 IL-6 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effects of NCTP on the levels of PGE2, COX-2, NO, TNF-α, IL-1β and IL-6 in the supernatant of LPS-induced RAW 264.7 cells($\bar{x} \pm s, n = 6$)

注: Con. 空白组, Mod. 模型组. 与 Con 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 Mod 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 下同. Note: Con. control group, Mod. model group. Compared with Con group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; Compared with Mod group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, the same below.

噬细胞向 M1 型极化的程度. 结果如图 3 所示, 降低 CD45 和 CD86 的荧光强度($P < 0.01$), 抑制 NCTP 在 6.25、12.5 和 25 $\mu\text{g/mL}$ 浓度时可以显著 RAW 264.7 向 M1 型极化。

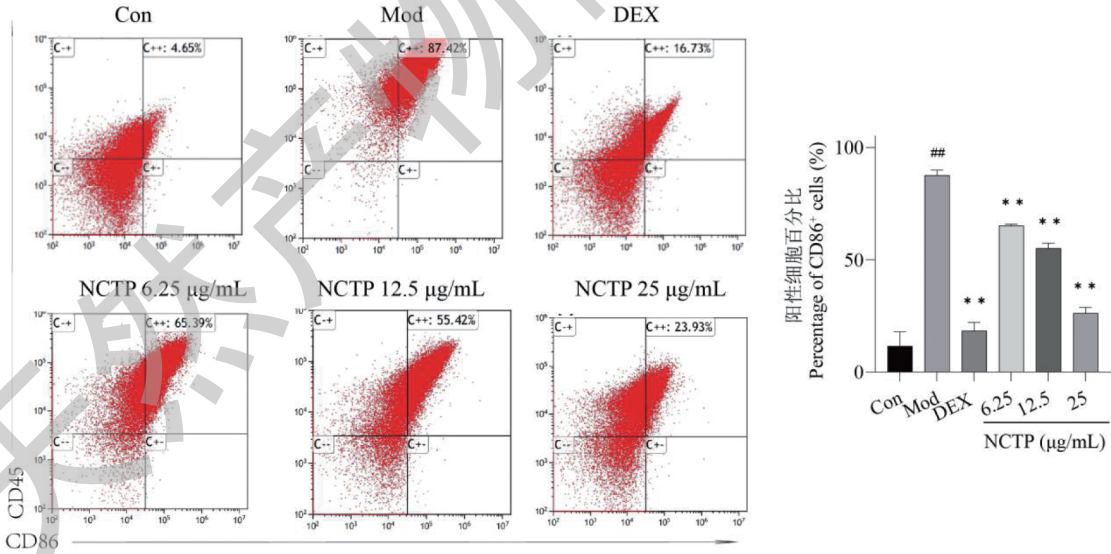


图3 NCTP 对 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞表面的 CD86 的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of NCTP on the percentage of CD86 cell in LPS-induced RAW 264.7 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.4 NCTP 对 LPS 刺激的 RAW 264.7 细胞中线粒体膜电位的影响

在炎症的发展过程中, 线粒体膜电位去极化起

着关键作用. 如图 4 所示, 与模型组相比, NCTP 预处理完全逆转了 JC-1 的绿色荧光, 产生了红色荧光, 这表明 NCTP 对线粒体膜电位损失具有保护作用。

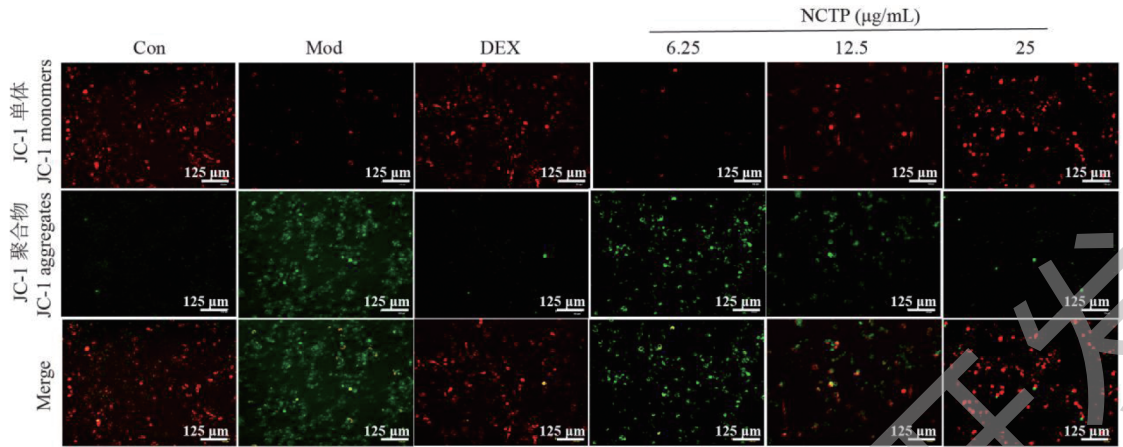


图4 NCTP对LPS刺激的RAW 264.7细胞中线粒体膜电位的影响($\times 100; \bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effect of NCTP on mitochondrial membrane potential in LPS-stimulated RAW 264.7 cells($\times 100; \bar{x} \pm s, n=3$)

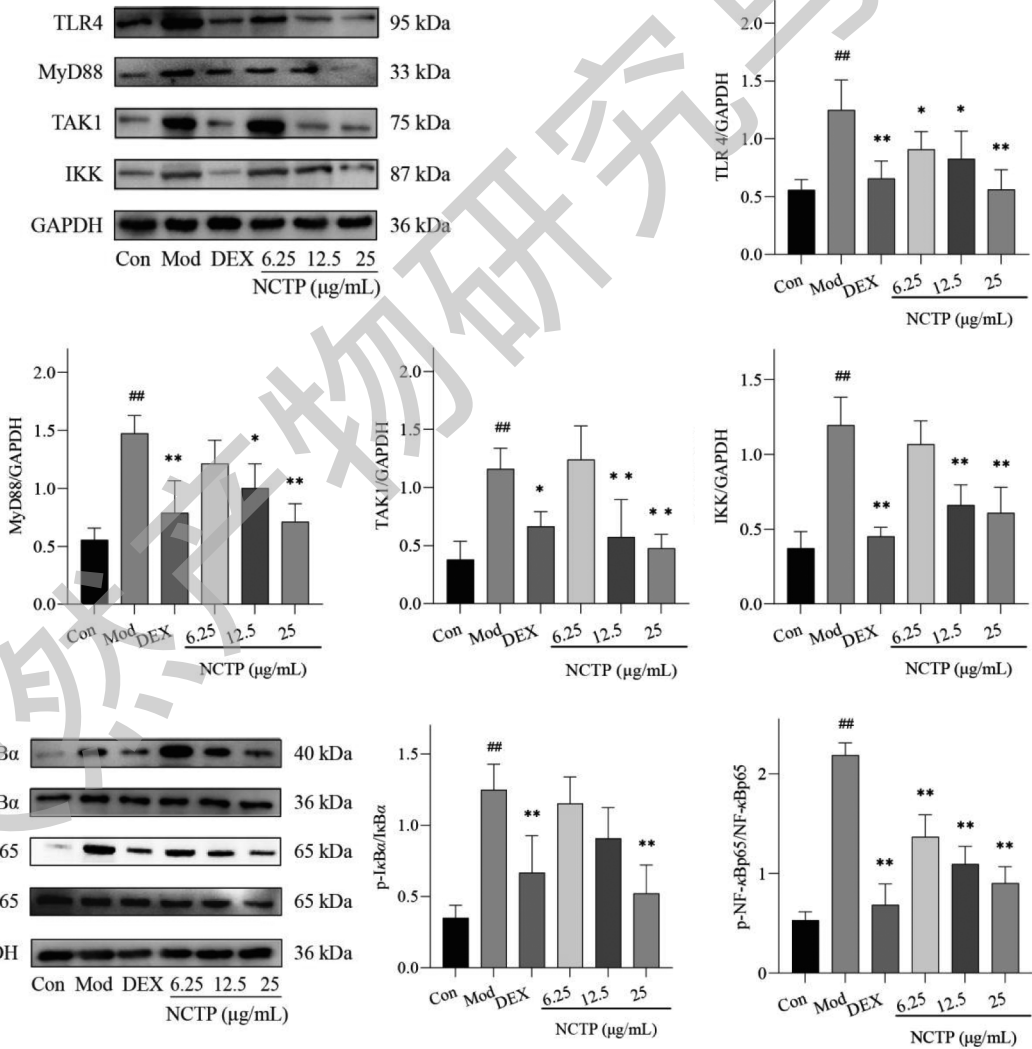


图5 NCTP对LPS诱导的RAW 264.7细胞中TLR-4/NF-κB蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effects of NCTP on TLR-4/NF-κB protein expression in LPS-induced RAW 264.7 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.5 NCTP 对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 TLR4/NF- κ B 通路的影响

本研究在体外实验中,针对 NCTP 的抗炎作用机制展开了深入探究。LPS 可通过其受体 TLR4 激活 NF- κ B 信号通路诱发炎症反应。LPS 与 TLR4 结合后,可招募 MyD88 并激活 TAK1 与 IKK,进而促使 I κ B α 磷酸化降解^[14,15],使 NF- κ B 释放并入核,上调 TNF- α 、IL-6 等促炎因子的表达。如图 5 所示,与空白组相比,LPS 刺激后显著诱导胞质中 NF- κ B p65 向细胞核内转位,而 NCTP 处理则能有效抑制该转位过程。Western blot 结果显示,模型组 TLR4、MyD88、TAK1、IKK 蛋白表达及 I κ B α 、NF- κ B 磷酸化水平均显著升高($P < 0.01$);与模型组相比,NCTP 可剂量依赖性地下调 TLR4 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)、MyD88 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)、TAK1 ($P < 0.01$)、IKK

($P < 0.01$)蛋白表达及 I κ B α 、NF- κ B 磷酸化水平($P < 0.01$)。

2.6 NCTP 对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 P38 MAPK/JNK 通路的影响

为了探究 NCTP 是否可抑制 LPS 诱导的 MAPK 信号通路,本研究检测了 P38 MAPK、JNK 和 ERK 及其磷酸化蛋白的表达。如图 6 所示,LPS 处理 RAW 264.7 细胞后,模型组 P38 MAPK ($P < 0.01$)、JNK ($P < 0.05$)、ERK ($P < 0.01$)的磷酸化水平明显升高,而 P38 MAPK、JNK 的磷酸化明显被 NCTP 抑制($P < 0.05$),而 NCTP 对 ERK 的磷酸化水平无明显影响。NCTP 通过抑制 P38 MAPK/JNK 通路的激活,进一步抑制 NF- κ B 信号通路,从而抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞炎症反应。

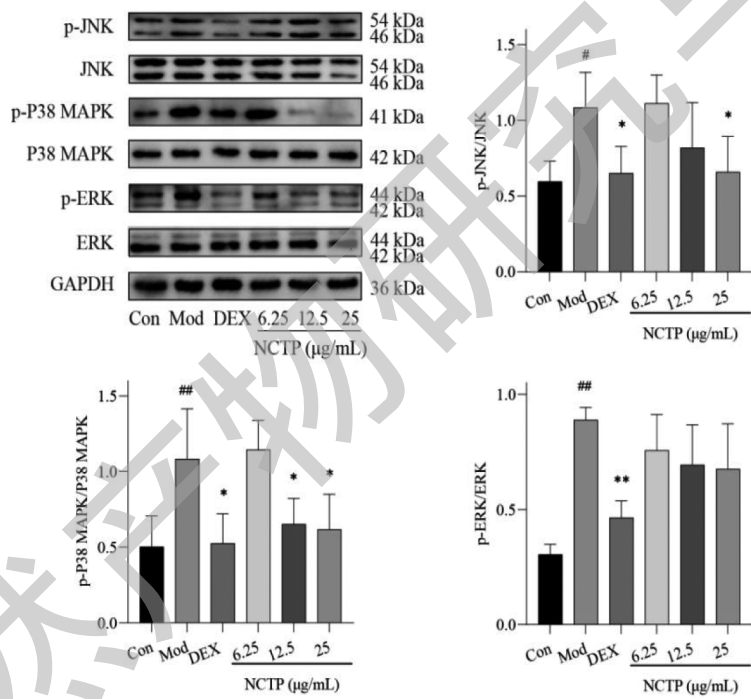


图 6 NCTP 对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞中 MAPK 信号通路蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 Effects of NCTP on MAPK signaling pathway protein expression in LPS-induced RAW 264.7 cells($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

2.7 NCTP 对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 NLRP3 通路相关蛋白的影响

在炎症反应的发生发展过程中,NLRP3 炎症小体的活化也十分重要。如图 7 所示,与空白组相比,模型组的 NLRP3 ($P < 0.01$)、ASC ($P < 0.05$)和 Caspase-1 ($P < 0.01$)水平显著升高,NCTP (25 μ g/mL)显著抑制了 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 的水平($P < 0.05$)。

2.8 NCTP 通过激活 NRF2 通路抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞的氧化应激

LPS 可诱导巨噬细胞产生过量的 ROS,ROS 在炎症发生发展中起关键作用,并可进一步促进巨噬细胞促炎因子的表达^[11]。通过免疫荧光和 DCFH-DA 法检测 ROS 的产生,以探讨 NCTP 对 LPS 诱导的 ROS 产生的抑制作用。结果如图 8A、8B 所示,在 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞中,NCTP 处理后,细胞

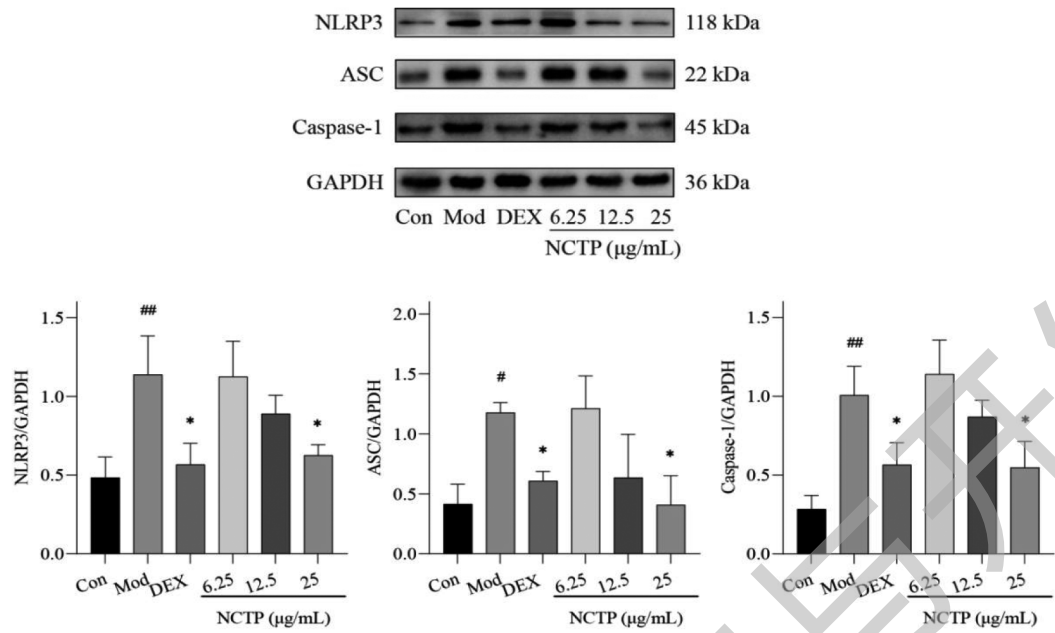


图 7 NCTP 对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞中 NLRP3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effects of NCTP on NLRP3 protein expression in LPS-induced RAW 264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

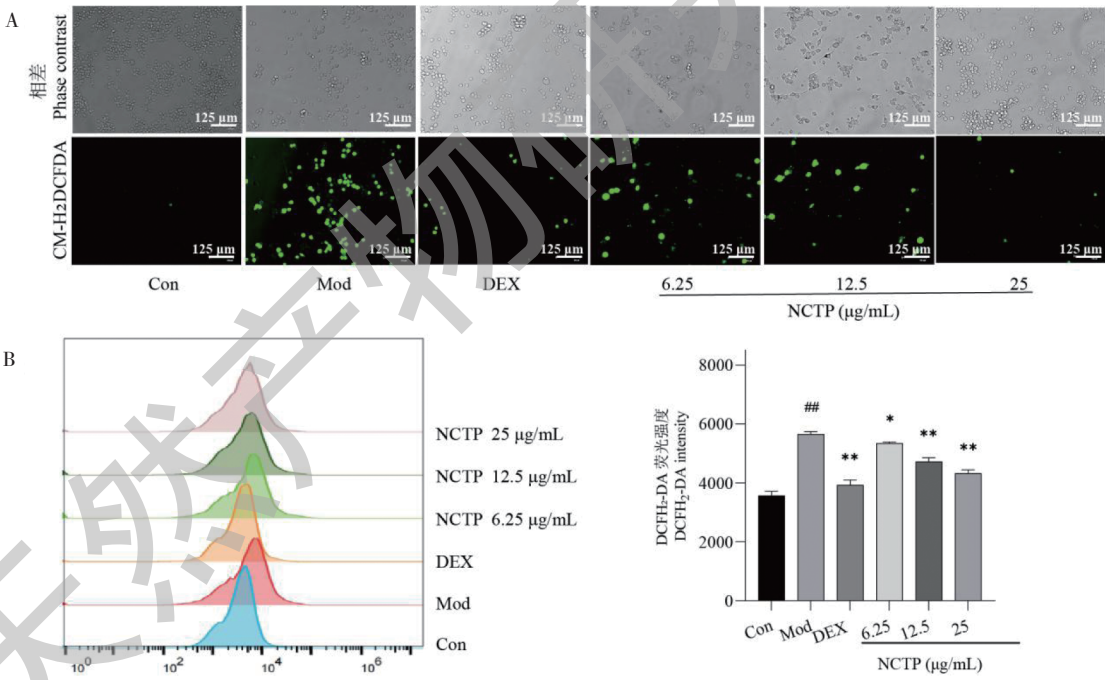


图 8 NCTP 对 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞氧化应激的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Inhibition effect of NCTP on LPS-induced oxidative stress in RAW 264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:A:免疫荧光法观察细胞内 ROS 生成情况;B:流式细胞术检测细胞内 ROS 水平。Note:A:Intracellular ROS production observed by immunofluorescence;B:Intracellular ROS levels measured by flow cytometry.

ROS 水平明显降低。NRF2 在 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞中可以保护细胞免受过量 ROS 的损伤 ($P < 0.05, P < 0.01$)。此外,在氧化应激下,NRF2 与 KEAP1 解离 ($P < 0.01$),转位到细胞核,并调节 HO-1 的表达 ($P < 0.01$)。如图 9 所示,NCTP 降低了 KEAP1 的表达并激活了 NRF2/HO-1 通路 ($P < 0.01$)。

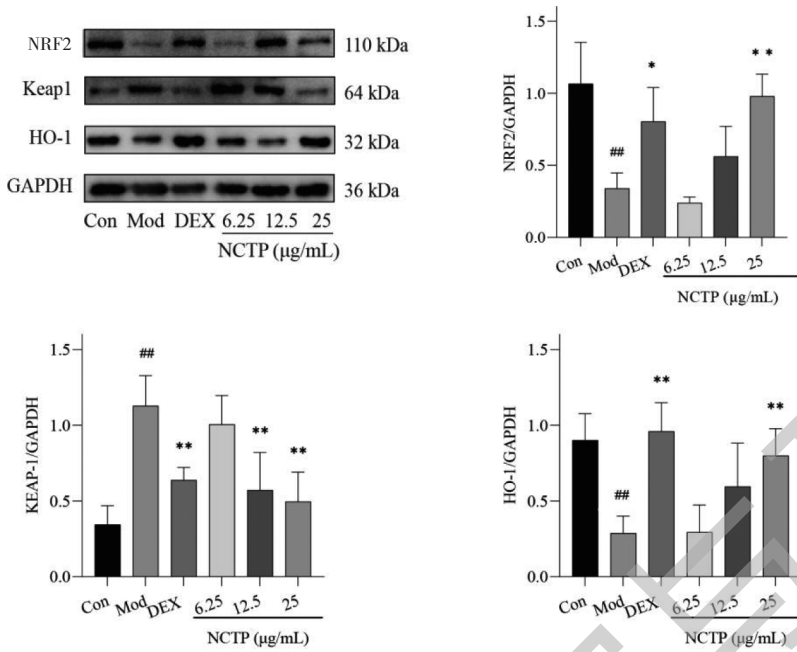


图9 NCTP对LPS诱导的RAW 264.7细胞中KEAP1、NRF2和HO-1蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 9 Effects of NCTP on KEAP1, NRF2 and HO-1 protein expression in LPS-induced RAW 264.7 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论与结论

炎症是机体应对感染或损伤的核心防御反应,但其过度激活会导致多种疾病。TLR4及其下游的MAPK和NF- κ B信号通路是调控炎症反应的关键枢纽。TLR4是LPS的关键受体,LPS与TLR4结合后可诱导TLR4活化,活化的TLR4进一步招募MyD88,继而激活TAK1激酶;活化的TAK1能够激活IKK激酶复合物^[16,17]。IKK随后催化I κ B α 蛋白的磷酸化,导致其被泛素化标记并通过蛋白酶体降解。I κ B α 的降解使得原本被抑制的NF- κ B得以释放,并进入细胞核内,进而促进多种炎症相关基因的表达,包括TNF- α 、IL-6等细胞因子^[18]。这一通路的激活对机体抵抗感染至关重要,但如果调控失常,可能导致过度炎症反应,与败血症、自身免疫疾病等病理过程相关。在之前的动物实验中,我们通过腹腔注射LPS构建的急性肺损伤小鼠,NCTP干预后显著减弱TLR4、IKK、MyD88、p-I κ B、p-NF- κ B p65、p-JNK、p-P38、NLRP3、ASC和Caspase-1的表达。结果表明,NCTP抑制了LPS诱导的急性肺损伤中肺组织的TLR4/MAPK/NF- κ B和NLRP3通路的激活,从而缓解LPS诱导的急性肺损伤^[8]。

本实验中,采用LPS处理RAW 264.7细胞建立炎症模型研究NCTP的抗炎作用机制。结果表明NCTP能显著下调TLR4和MyD88的蛋白水平,说

明NCTP在信号通路的最上游进行了干预,可能通过直接或间接的方式阻碍了LPS与TLR4复合物的结合,从而从源头上遏制了炎症信号的启动。在MyD88下游,信号通路分化为NF- κ B和MAPK两条核心路径^[19,20]。NCTP不仅能抑制TAK1的活性,还能显著降低其下游的IKK以及p-I κ B水平。p-I κ B水平的下降,直接导致p-NF- κ B p65的减少,从而阻断了TNF- α 、IL-6等核心促炎细胞因子基因的转录。MyD88和TAK1还同时启动下游MAPK信号级联,MAPK信号通路可分为3个主要家族,分别为:ERK、JNK和P38 MAPK,其中ERK主要对生长因子和有丝分裂产生反应,JNK调节蛋白在细胞凋亡、炎症、细胞因子产生起重要作用,P38 MAPK激活会促进炎症、凋亡、细胞分化等;p-JNK和p-P38 MAPK是调控炎症细胞活化及凋亡的关键信号。本实验中NCTP直接抑制了JNK和P38 MAPK蛋白的磷酸化,从而产生多层次的抗炎效应,与文献报道一致^[21]。NCTP能直接阻碍炎性细胞的趋化浸润,并抑制巨噬细胞向促炎的M1表型极化,与NF- κ B通路形成强大协同,从而在细胞水平上有效限制炎症反应的扩大与持续。在炎症反应的发生发展过程中,NLRP3炎症小体的活化也十分重要,NCTP可能通过干扰NLRP3的寡聚化,从而阻止了由ASC介导的Caspase-1前体的募集与活化,从而对NLRP3、

ASC 和 Caspase-1 蛋白水平的直接下调,提示 NCTP 可能直接干预炎症小体的组装过程。既往研究表明,MAPK 家族蛋白参与 NF- κ B 激活,且 NF- κ B 磷酸化可能发生在 MAPK 的下游^[22,23],NF- κ B 又可激活 NLRP3 炎症小体通路,参与调节许多细胞活动,包括应激、损伤,尤其是炎症反应,可诱导包括 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 等多种炎症介质,而这些促炎细胞因子可增强炎症反应和氧化应激。

LPS 刺激的巨噬细胞还释放了 ROS 的产生和细胞的早期凋亡,为了进一步讨论 NCTP 的活性,本实验采用流式细胞仪观察了 NCTP 对 ROS 的产生和 MMP 的影响^[24]。在 LPS 处理 16 h 后,RAW 264.7 细胞中 ROS 的产生显著增加,而 NCTP 有效抑制了 ROS 的水平,从而表明 NCTP 可能通过调控抗氧化酶系统或抑制自由基生成途径,而具有一定的抗炎和抗氧化特性。与流式细胞仪分析结果相一致,RAW 264.7 细胞中 ROS 显微成像系统的数据表明 NCTP 抑制了 ROS 的产生。在炎症性疾病的发展过程中,MMP 去极化起着关键作用,MMP 的改变可能反映其对线粒体能量代谢的调节作用,可能涉及电子传递链活性或线粒体通透性的改变^[25]。在本实验中,NCTP 预处理完全逆转了 JC-1 的绿色荧光,产生了红色荧光,这表明 NCTP 可改善炎症反应状态下的 MMP 损伤。ROS 是 NF- κ B、NLRP3 等通路的激活剂,NCTP 可能通过减少 ROS 间接抑制这些通路,降低促炎因子的释放^[26]。炎症反应中,过度激活的免疫细胞若持续存活会导致炎症迁延,MMP 下降是细胞凋亡的早期标志之一,可触发线粒体释放细胞色素从而启动凋亡通路,清除过度激活的炎症细胞,避免炎症失控^[27]。从本实验可知,NCTP 通过减少 ROS 降低线粒体损伤风险,同时通过调节膜电位促进炎症细胞的凋亡,从而发挥抗炎保护作用。

综上所述,睡莲花中的 NCTP 通过激活 NRF2/HO-1 通路,不仅直接增强了细胞清除 ROS 的能力,其产生的抗炎效应也能与对 TLR4/MAPK/NF- κ B 和 NLRP3 通路的抑制形成强大的协同作用。NCTP 具有良好的抗炎活性,是一种潜在的治疗炎症相关疾病的天然药物。

数据可用性声明: 本篇论文的关联数据可在 ScienceDB 数据库 (<https://doi.org/10.57760/sciencedb.nprd.00093>) 中访问获取。

参考文献

- 1 Liu YM, Pharmacography of Uighur Part One(维吾尔药志:第一部)[M]. Urumuqi: Xinjiang Science & Technology & Hygiene Publishing, 1999.
- 2 Yu CQ, Li YN, Li YX, et al. A novel mechanism for regulating lung immune homeostasis: Zukamu granules alleviated acute lung injury in mice by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and regulating Th17/Treg cytokine balance[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 324: e117831.
- 3 Dong HJ, Guo YX, Wang X, et al. Preventive effect of total flavonoids from *Nymphaea candida* on CCl₄ induced hepatic fibrosis in mice[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2020, 32: 1754-1760.
- 4 Guo ZY, Li CY, Zuo DJ, et al. Preventive effects of total flavonoids from *Nymphaea candida* on alcoholic liver injury in mice[J]. China Food Additives(中国食品添加剂), 2023, 34: 205-211.
- 5 Zuo DJ, Li CY, Yang J, et al. Quality analysis of *Nymphaea Flos* based on HPLC fingerprint and QAMS[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2023, 35: 1112-1123.
- 6 Yang DH, Li CY, Xu F, et al. Hypoglycaemic and hypolipidemic activities of total flavonoids from *Nymphaea candida* flowers on diabetic mice[J]. Nat Prod Res, 2023, 38: 2135-2139.
- 7 Sun Y, Qi ZY, Xu YH, et al. Anti-inflammatory, analgesic, antitussive and antipyretic activities of polyphenol-enriched fraction from *Nymphaea candida* [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 324: 117789.
- 8 Li CY, Qi XX, Xu L, et al. Preventive effect of the total polyphenols from *Nymphaea candida* on sepsis-induced acute lung injury in mice via gut microbiota and NLRP3, TLR-4/NF- κ B pathway[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25: 4276-4295.
- 9 Xu XY, Pang Y, Fan XQ. Mitochondria in oxidative stress, inflammation and aging: from mechanisms to therapeutic advances [J]. Signal Transduct Target Ther, 2025, 10: 190-219.
- 10 Chu TJ, Wang YM, Wang SH, et al. Kaempferol regulating macrophage foaming and atherosclerosis through Piezo1-mediated MAPK/NF- κ B and Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. J Adv Res, 2025, 75: 635-650.
- 11 Choi HJ, Choi JW, Park SJ, et al. Anti-inflammatory mechanisms of *Pleurotus citrinopileatus*: inhibition of MAPK and NF- κ B signaling pathways, and activation of ROS/PI3K/Nrf2/HO-1 signaling pathway in LPS-stimulated RAW 264.7 cells[J]. J Microbiol Biotechnol, 2025, 35: e2501012.
- 12 Wulipan T, Ding WT, Sun Y, et al. Exploring anti-inflamma-

- tiory mechanism of urolithin A based on miRNA155-5p-mediated MAPK/NF- κ B pathway[J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2024, 40:1066-1074.
- 13 Wulipan T, Ding WT, Sun Y, et al. Inhibition of ellagic acid on lipopolysaccharids-induced inflammatory responses in RAW 264.7 macrophage through TLR4-SRC/MAPK/NF- κ B pathway[J]. Cent South Pharm(中南药学), 2024, 44:943-949.
- 14 Hsieh LC, Hsieh SL, Ping TN, et al. *Apium graveolens* L. alleviates acute lung injury in human A-549 cells by reducing NF- κ B and NLRP3 inflammasome signaling[J]. Pharm Biol, 2024, 63:1-13.
- 15 Lo J, Liu CC, Li YS, et al. Punicalagin attenuates LPS-induced inflammation and ROS production in microglia by inhibiting the MAPK/NF- κ B signaling pathway and NLRP3 inflammasome activation[J]. J Inflamm Res, 2022, 15:5347-5359.
- 16 Luo W, Ruan ZL, Yuan CF, et al. Study on the mechanism of Qilongtian capsule in reducing M1 macrophage polarization and inhibiting inflammatory response in acute lung injury based on TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2024, 47:2345-2349.
- 17 Wang YP, Zhang JM, Zhou M, et al. Mechanism of *Panax notoginseng* saponins on macrophage M1 polarization via Notch pathway[J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med(现代中西医结合杂志), 2024, 33:2921-2930.
- 18 Pei CX, Wang ZX, Wang XM, et al. Platycodin D attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via NF- κ B signaling pathway in rats[J]. Chin J Pathophysiol(中国病理生理杂志), 2022, 38:672-679.
- 19 Wan HY, Zhang L, Wan HT, et al. The anti-asthma effect of Mahuang decoction based on p38MAPK/NF- κ B signaling pathway and its mechanism[J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2021, 37:423-429.
- 20 Liu YS, Wang JJ, Meng Y, et al. Exploration of the study on the mechanism of Herba Ephedrae-Semen Armeniacae Amarum drug pair for the treatment of bronchial asthma in rats based on p38MAPK/NF- κ B signaling pathway[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2022, 33:1025-1031.
- 21 Wang X, Liu Y, Shi YZ. The anti-inflammation effects of aesculetin from *Viola tianshanica* Maxim via NF- κ B and MAPK signaling pathways in RAW 264.7 cells stimulated by LPS and its mechanism[J]. Chin J Pathophysiol(中国药理学通报), 2022, 38:223-232.
- 22 Kou YL, Wang WB, Yan SG, et al. Mechanism of lung and intestine combination therapy in treatment of acute lung injury by inhibiting inflammatory response based on NF- κ B/NLRP3 signaling pathway and alveolar macrophage activation[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2022, 47:151-158.
- 23 Bai J, Tang Y, Li M, et al. Effect of ganoderic acid A on delaying *D*-galactose-induced brain aging by modulating MAPK/SIRT1/NF- κ B signaling pathway[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2026, 51:1701-1712.
- 24 Salamaiti A, Ayijia M, Gulifeire Y, et al. Alleviative effect and mechanism of *Prunus cerasifera* Ehrhart extract on oxidative stress injury in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells[J]. Food Sci(食品科学), 2025, 46:223-232.
- 25 Chen TY, Yan J, Zhu BH, et al. Yan Tiao formula attenuates intestinal ischemia-reperfusion-induced lung injury by suppressing excessive autophagy in alveolar type II epithelial cells via regulating the NF- κ B/LncRNA-Miat signaling pathway[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2025, 36:1849-1860.
- 26 Qin QY, Li L, Wang YH, et al. Arjunic acid alleviates inflammation via modulating ROS/Keap1/Nrf2, MAPK and mTOR pathways in LPS-stimulated macrophages[J]. Acta Pharm Sin B(药学报), 2025, 60:595-605.
- 27 Liu J, Zhang Y, Feng YZ, et al. Effect of total triterpenes from *Chaenomelis Fructus* on mitigating indomethacin induced gastric mucosal injury by inhibiting inflammation, oxidative stress, and NLRP3-mediated pyroptosis[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2026, 51:1667-1687.