

基于沉默信息调节因子 1/p65 通路探讨竹叶黄酮对过氧化氢诱导的奶牛乳腺上皮细胞焦亡的保护作用机制

王琳玮¹ 关淑文¹ 赵小博¹ 王靖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,北京 100176)

摘要: 本试验旨在通过过氧化氢(H_2O_2)诱导的奶牛乳腺上皮细胞(bMECs)焦亡模型探讨竹叶黄酮(BLF)预处理缓解bMECs焦亡的作用机制。试验以bMECs为研究对象,设对照组、BLF组、 H_2O_2 组、BLF+ H_2O_2 组、BAY 11-7082+ H_2O_2 组、BLF+BAY 11-7082+ H_2O_2 组、EX 527+ H_2O_2 组和BLF+EX 527+ H_2O_2 组,BLF作用浓度为80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, H_2O_2 作用浓度为800 $\mu\text{mol}/\text{L}$,使用BAY 11-7082和EX 527干预p65和沉默信息调节因子1(SIRT1)的表达。利用PCR和Western Blot技术检测细胞内焦亡相关基因和蛋白的表达水平,利用流式细胞术检测焦亡细胞数量,并利用免疫荧光技术检测细胞内凋亡相关斑点样蛋白(ASC)斑点的荧光强度,以观测SIRT1/p65通路在BLF缓解 H_2O_2 诱导的bMECs焦亡中发挥的作用。结果显示:1) H_2O_2 诱导的bMECs焦亡中p65的mRNA和蛋白表达水平显著升高($P<0.05$),BLF处理后p65的mRNA和蛋白表达水平则显著降低($P<0.05$);BLF与BAY 11-7082对p65表达及核转位的抑制效果显著($P<0.05$),可有效缓解bMECs焦亡,同时二者也显著降低了bMECs焦亡相关基因和蛋白的表达水平($P<0.05$),并增强了ASC斑点的荧光强度。2) H_2O_2 诱导的bMECs焦亡中SIRT1的mRNA和蛋白表达水平显著降低($P<0.05$),BLF处理后SIRT1的mRNA和蛋白表达水平则显著升高($P<0.05$);EX 527对抑制SIRT1、促进p65的表达及核转位的效果显著($P<0.05$);EX 527也显著升高了bMECs焦亡相关基因和蛋白的表达水平($P<0.05$),并增强了ASC斑点的荧光强度。综上所述,80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的BLF通过抑制p65的表达和核转位,缓解 H_2O_2 诱导的bMECs焦亡和NLRP3炎症小体激活;SIRT1的表达在 H_2O_2 诱导的bMECs焦亡中被下调,BLF缓解 H_2O_2 诱导的bMECs焦亡是通过上调SIRT1的表达来抑制p65的表达来实现的。

关键词: 竹叶黄酮;NLRP3炎症小体;奶牛乳腺上皮细胞;焦亡

中图分类号:S823

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2024)09-5949-21

竹叶黄酮(bamboo leaf flavonoids, BLF)作为竹叶中的主要活性成分,具有抗炎、抗氧化、抗菌、调节脂代谢、调节免疫等多种生物学功能^[1-3],是一种天然酚类抗氧化剂^[4],具有良好的应用前景。研究表明,BLF可显著提高动物体内抗氧化酶活

性,增强免疫能力^[5-6],下调过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)诱导的氧化损伤细胞模型和高脂饮食诱导的小鼠模型中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , $TNF-\alpha$)和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , $IL-1\beta$)等炎症因子的表达^[7]。周晓燕

收稿日期:2024-02-22

基金项目:家禽产业技术体系北京市创新团队(BAICO5);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:王琳玮(1999—),男,吉林长春人,硕士研究生,研究方向为反刍动物营养与饲料活性物质开发与应用。E-mail: wlw07101@126.com

*通信作者:郭刚,正高级畜牧师,E-mail: guogang2180@126.com;蒋林树,教授,博士生导师,E-mail: jls@bua.edu.com

等^[8]研究发现, BLF 能够有效抑制糖尿病大鼠脑组织海马区炎症因子白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 和 TNF- α 的表达, 从而抑制大鼠海马区的炎症反应。在李建凤等^[9]的研究中, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 BLF 可以通过调控核因子红细胞相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 信号通路中的关键基因, 缓解热应激对奶牛乳腺上皮细胞 (bovine mammary epithelial cells, bMECs) 的影响。本实验室前期研究已证实了在奶牛生产中 BLF 对奶牛乳腺的保护作用。侯昆等^[10]研究发现, 在奶牛饲料中添加 BLF 可以有效降低奶牛血清中 IL-1 β 与 TNF- α 的含量, 增加白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2) 的含量, 从而有效改善奶牛乳房炎; 詹经纬等^[11]通过建立 bMECs MAC-T 的氧化应激模型, 发现 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BLF 预处理 24 h 可以缓解 800 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H_2O_2 处理 8 h 所导致的 MAC-T 氧化损伤。另外, 多种黄酮类化合物均可通过影响核苷酸结合寡聚化结构域样受体样蛋白 3 (NOD-like receptor containing a pyrin domain 3, NLRP3) 炎症小体的表达缓解全身性炎症及细胞焦亡, 改善免疫功能及机体健康^[12-15]。

细胞焦亡是由各种病原微生物感染或其他危险信号引起的、伴随着炎症反应的程序性细胞死亡^[16]。细胞焦亡的发生需要多种细胞因子的参与, 其中 NLRP3 是细胞焦亡途径中研究最为广泛的炎症小体之一^[17]。在规模化奶牛生产中, 受饲料、管理、环境等因素的限制, 奶牛易造成机体自由基稳态失衡产生氧化应激, 从而引起奶牛乳腺细胞焦亡^[18-20], 对奶牛健康状况及泌乳性能产生负面影响^[21]。研究表明, NLRP3 炎症小体的激活可能需要核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 的 p65 亚基来调节^[22-24], 其中沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1) 可促进 NF- κ B 活化^[25], 并通过 p65 去乙酰化调控细胞炎症^[26]。此外, 天然植物功能组分可通过抑制 NLRP3 信号通路缓解细胞焦亡, 对相关细胞和器官起到保护作用^[27-30]。本实验室前期研究已证实 BLF 可缓解 H_2O_2 诱导的 bMECs 焦亡, 但作用机理尚未明晰。因此, 本试验将进一步探究 BLF 对 H_2O_2 诱导的 bMECs 焦亡的保护作用机制, 解释 p65 在 BLF 缓解 bMECs 焦亡中的作用, 并验证 p65 表达是否受到 SIRT1 的调控, 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 材料与方法

1.1 主要材料

原代 bMECs 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% BLF 由浙江大学生物系统工程与食品科学学院惠赠。

试验所用其他试剂与耗材如下: H_2O_2 (天津光复, 中国), DMEM/F12 培养基、胎牛血清 (FBS)、青霉素/链霉素溶液、0.25% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸 (Gibco, 美国), 磷酸盐缓冲液 (PBS) (Wissen, 中国), 细胞培养皿、细胞培养板、离心管、枪头 (Corning, 美国), BCA 试剂盒、蛋白酶抑制剂、RIPA、苯甲基磺酰氟 (PMSF)、Trizol、ECL 化学发光试剂盒、聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 试剂盒、十二烷基硫酸钠 (SDS)-PAGE 缓冲液、聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜、脱脂奶粉、抗荧光淬灭封片液 [含 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI)]、BAY 11-7082、胞浆蛋白与核蛋白抽提试剂盒、EX 527 (Be-yotime, 中国), 二甲基亚砜 (DMSO)、TBST、甘氨酸、甲醇、Hoechst 33342/PI 双染试剂盒、Tris、SDS (Solarbio, 中国), cDNA 反转录试剂盒、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Erik, 中国), 氯仿、异丙醇、无水乙醇 (北京化工厂, 中国), 羊抗兔免疫球蛋白 G (IgG)、羊抗鼠 IgG、预染蛋白 Marker (LABELAD, 中国), SIRT1、p65、NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein, ASC)、IL-1 β 、哺乳动物相关激酶 7 (mammalian-related kinase 7, NEK7)、核纤层蛋白 B1 (lamin B1, LMNB1) 抗体、p65 一抗 (Santa, 中国), 半胱天冬酶 (cysteiny l aspartate specific proteinase, Caspase)-1、消皮素 D N 末端片段 (gasdermin D N-terminal, GSDMD-N) 抗体 (Abcam, 美国), 白细胞介素-18 (interleukin-18, IL-18) 抗体 (Bioss, 中国), β -肌动蛋白 (β -actin, ACTB) 抗体 (CST, 美国)。

1.2 主要仪器设备

试验所用主要仪器设备如下: 荧光倒置显微镜 (Motic, 中国)、二氧化碳 (CO_2) 细胞培养箱 (Thermo, 美国)、双功能气浴恒温振荡器 (常州崢嵘, 中国)、恒温恒湿箱 (上海一恒, 中国)、荧光定量 PCR 仪 (Roche, 瑞士)、垂直电泳转印系统 (Bio-Rad, 美国)、天能化学发光成像仪 (上海天能, 中

国)、Gene Max 基因扩增仪(杭州博日,中国)、Cyto FLEX 流式细胞仪(Beckman Coulter,中国)。

1.3 试剂配制

1.3.1 细胞培养液

细胞完全培养液:DMEM/F-12 培养基中加入 10% FBS 和 1% 青霉素/链霉素溶液,混匀,4 °C 保存备用;细胞维持培养液:DMEM/F-12 培养基中加入 2% FBS,混匀,4 °C 保存备用。BLF 处理液:取 5 mg 的 98% BLF 加入 5 mL 细胞维持培养液,得到 1 mg/mL 的储备液,稀释至 80 μg/mL;H₂O₂ 处理液:取 100 μL 30% H₂O₂ 与 870 μL 的细胞维持培养液配制成 1 mmol/L 的 H₂O₂ 储备液,稀释至 800 μmol/L。本试验所设定的 BAY 11-7082 与 EX 527 的浓度参考李方^[31]的研究。在 10 mg 的 BAY 11-7082 中加入 1 mL 的 DMSO,配制成 50 mmol/L 的溶液保存。使用时取 1 μL 浓度为 50 mmol/L 的 BAY 11-7082 加入 10 mL 配制好的维持培养液处理细胞,最终浓度稀释至 5 μmol/L。在 5 mg 的 EX 527 中加入 1.005 mL 的 DMSO,配制成 20 mmol/L 的溶液保存。使用时取 20 μL 浓度为 20 mmol/L 的 EX 527 加入 20 mL 配制好的维持培养液处理细胞,使最终浓度为 10 μmol/L。

1.3.2 Western Blot 用试剂

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;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。当蛋白质分子质量大于 80 ku 时,转膜液中另需添加 2 g 的 SDS。

1.4 试验方法

1.4.1 细胞培养

将液氮中装有 bMECs 的冻存管转移至 37 °C 水浴锅快速融化,移入装有预热的细胞完全培养液的 15 mL 离心管中,吹打混匀,离心 5 min (4 °C, 7 500×g),弃去上清,重悬后移至 60 mm 培养皿孵育。培养 2 d 后观察培养液颜色和细胞状态,培养液变为淡黄色则吸出培养液,PBS 漂洗 2 次后加入新培养液继续孵育。待细胞融合度达 85%,PBS 漂洗 2 次,吸取 1 mL 0.25% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸于培养皿作用 1 min,吸取 1 mL 培养液迅速停止消化。收集细胞悬液,按上述条件离心后弃上清,重悬至新培养皿孵育。

1.4.2 试验分组

试验共设 8 个组,分别为对照(CON)组、BLF 组、H₂O₂ 组、BLF+H₂O₂ 组、BAY 11-7082+H₂O₂ 组、BLF+BAY 11-7082+H₂O₂ 组、EX 527+H₂O₂ 组和 BLF+EX 527+H₂O₂ 组。bMECs 培养在 60 mm 培养皿中,于 37 °C、5%CO₂ 的细胞培养箱中孵育,融合度达 85% 开始处理。对照组细胞接种于不添加任何物质的维持培养液中培养 24 h;BLF 组细胞接种于含 80 μg/mL BLF 的维持培养液中培养 24 h;H₂O₂ 组细胞接种于含 800 μmol/L H₂O₂ 的维持培养液中培养 8 h;BLF+H₂O₂ 组细胞先接种于含 80 μg/mL BLF 的维持培养液中培养 24 h 后,再用含 800 μmol/L H₂O₂ 的维持培养液培养 8 h;BAY 11-7082+H₂O₂ 组与 EX 527+H₂O₂ 组细胞先分别接种于含 5 μmol/L BAY 11-7082 和 10 μmol/L EX 527 的维持培养基中培养 1 h,再用含 800 μmol/L H₂O₂ 的维持培养基培养 8 h;BLF+BAY 11-7082+H₂O₂ 组和 BLF+EX 527+H₂O₂ 组细胞先用含 5 μmol/L BAY 11-7082 或 10 μmol/L EX 527 的维持培养液培养 1 h,再用含 80 μg/mL BLF 的维持培养液培养 24 h,最后用含 800 μmol/L H₂O₂ 的维持培养液培养 8 h。

1.4.3 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术检测焦亡相关基因的表达

将细胞培养皿置于冰盒上,吸取培养液,PBS 漂洗 2 次。各孔加入 500 μL Trizol,作用均匀后刮净细胞转移至 1.5 mL 无 RNA 酶管;加入 100 μL 氯仿,振荡混匀后放置 2 min;离心 15 min (4 °C, 12 000×g)。取上清 300 μL 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, 12 000×g);留沉淀加 75% 乙醇离心 10 min (4 °C, 7 500×g);弃上清离心 3 min (4 °C, 12 000×g),开盖静置 3~5 min 后加 50 μL DEPC。NanoDrop 微量分光光度计测量总 RNA 浓度后-80 °C 储存。反应液配制参考 Erik 的 cDNA 反转录试剂盒,反应条件参考本实验室前期研究^[32],具体如下:37 °C, 15 min;85 °C, 5 s。使用 ACTB 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 作为内参,将反转录成功的 NLRP3、NEK7、ASC、p65、消皮素 D (gasdermin D, GSDMD)、IL-18 和 IL-1β 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^[32]。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的 mRNA 表达水平。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene names	GenBank 登录号 GenBank accession number	引物序列 Primer sequences (5'—3')	产物长度 Product length/bp	退火温度 Annealing temperature/°C
核苷酸结合寡聚化结构域样受体样蛋白 3 <i>NLRP3</i>	NM_001102219.1	F: AGATCATGTTGGACTGGGCA R: CATCAAAGCCGTCCATGAGG	204	60
凋亡相关斑点样蛋白 <i>ASC</i>	NM_174730.2	F: CAGCGGACGAGCTCAAAAAG R: ACCGTACGCCTCCAGATAGT	149	60
哺乳动物相关激酶 7 <i>NEK7</i>	XM_003587112.6	F: TTCAGCTCCAAAACCACAGC R: ACACAGCGAGTACAGGTTCA	186	60
白细胞介素-1 β <i>IL-1β</i>	NM_174093.1	F: AAAGTCCAGGACAGAGAGCAAAA R: CTCTCCTTGACAAAAGCTCATG	126	60
白细胞介素-18 <i>IL-18</i>	NM_174091.2	F: TGGCTGCAGAACAAGTAGAAG R: TGGTCTGGGGTGCATTATCT	243	60
消皮素 D <i>GSDMD</i>	XM_059893205.1	F: TTTGTAGTGACCGAGGTGCT R: ATGTCCCAGTCAGAGCCAAT	215	60
β -肌动蛋白 <i>ACTB</i>	NM_173979.3	F: CAAGTACCCCATTGAGCACG R: GTCATCTTCTCACGGTTGGC	159	60
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 <i>GAPDH</i>	NM_001034034.2	F: TGGAAAGGCCATCACCATCT R: CCCACTTGATGTTGGCAG	53	60
<i>p65</i>	NM_001080242.2	F: GACCAACAACAACCCCTTCC R: ATTCACCCGGCAGATCTTGA	196	60
沉默信息调节因子 1 <i>SIRT1</i>	XM_024986766.2	F: TACCCCATGAAGTGCCTCAG R: ATATTGAGGGGTGTGGGTGG	238	60

1.4.4 Western Blot 技术检测焦亡相关蛋白的表达

细胞经 PBS 漂洗 2 次,每次 5 min,取 1 mL 以 100:1:2 混合的 RIPA+PMSF+磷酸酶抑制剂于培养皿,移至 1.5 mL 离心管中;离心 10 min (4°C, 12 000×g)取上液。BCA 试剂盒测定蛋白浓度后加入 SDS Loading Buffer 保持浓度一致,沸水浴 10 min,保存至-80 °C 备用。根据目的蛋白分子质量大小参考试剂盒说明选取对应的浓度配制分离胶(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 样品至加样孔,最左侧孔添加 5 μ L 彩色预染蛋白(Marker)进行参考。加入电泳液进行电泳。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 1 张厚滤纸,闭合转膜所需夹子,转膜(20 ku 以下小蛋白直流

300 mA,其余蛋白直流 350 mA)。TBST 洗膜 5 min,快速封闭液在 37 °C 封闭 15 min。膜用 TBST 漂洗 3 次,每次 5 min,后经一抗 4 °C 孵育过夜;次日用 TBST 漂洗 3 次,每次 15 min,后经二抗室温孵育 60 min。TBST 漂洗 3 次,每次 15 min,置于化学发光成像仪,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

吸取各培养孔上清,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,每孔 1 mL 4%多聚甲醛固定 30 min,晾干。PBS 漂洗 3 次,每次 3 min,加入 0.3% Triton X-100 进行 25 min 通透,PBS 漂洗 3 次,每次 3 min,之后再加入 3% BSA 孵育 60 min,封闭抗原。弃封闭液+ASC 一抗(1:100),湿盒 37 °C 孵育 2 h;PBS 漂洗 5 次,每次 3 min,然后用 FITC(1:100)处理 1 h;PBS 漂洗 5 次,每次 3 min,加入抗荧光猝灭封片

液(含 DAPI)处理 5 min。用荧光显微镜进行观察。

1.4.6 流式细胞术检测 BAY11-7082 对 bMECs 焦亡的影响

收集 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个细胞于 1.5 mL 离心管,离心取沉淀,用 1 mL 细胞染色缓冲液重悬;加入 5 μ L Hoechst 33342 和 5 μ L PI 染色,4 $^{\circ}$ C 摇床孵育 30 min,流式细胞仪检测红、蓝荧光。

1.4.7 提取胞核和胞浆蛋白

收集 $0.5 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ 个细胞,根据胞浆和胞核蛋白抽提试剂盒说明书进行操作,提取胞核和胞浆蛋白。

1.5 数据统计分析

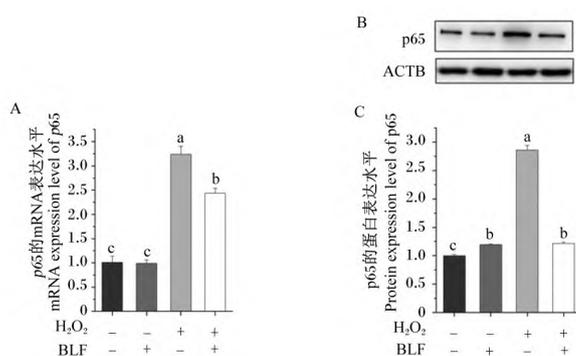
试验结果用平均值 \pm 标准差表示,采用 Excel 2016 对试验数据进行初步处理,应用 SPSS 26.0 进行单因素方差分析(one-way ANOVA),使用 Duncan 氏法进行组间多重比较, $P < 0.05$ 为差异显著, $P > 0.05$ 为差异不显著。最终结果由 Origin 2021 绘图呈现。

2 结果与分析

2.1 BLF 通过调控 p65 缓解 H_2O_2 诱导的 bMECs 焦亡

2.1.1 BLF 缓解 H_2O_2 诱导的 bMECs 焦亡中 p65 的表达水平

为了探究 p65 是否参与 BLF 对 H_2O_2 诱导的 bMECs 焦亡的缓解,检测了对照组、BLF 组、 H_2O_2 组和 BLF+ H_2O_2 组中 p65 的 mRNA 和蛋白表达情况。通过细胞培养提取以上各组的 mRNA 和蛋白,利用 RT-qPCR 和 Western Blot 技术检测细胞内 p65 的 mRNA 和蛋白表达水平,结果如图 1 所示。与对照组相比,在 80 μ g/mL 的 BLF 处理 24 h 的情况下,p65 的 mRNA 表达水平无显著变化($P > 0.05$);而在 800 μ mol/L 的 H_2O_2 处理 8 h 的情况下,p65 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$)。经过 80 μ g/mL 的 BLF 预处理 24 h 后的 BLF+ H_2O_2 组的 bMECs,其 p65 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著低于 H_2O_2 组($P < 0.05$),且 p65 的蛋白表达水平恢复至 BLF 组水平,说明 p65 参与了 BLF 对 H_2O_2 诱导的 bMECs 焦亡的作用过程。



A: p65 的 mRNA 表达水平 mRNA expression level of p65; B: 蛋白表达条带 protein expression bands; C: p65 的蛋白表达水平 protein expression level of p65。

H_2O_2 : 过氧化氢; BLF: 竹叶黄酮; ACTB: β -肌动蛋白。数据柱标注不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 相同小写字母表示差异不显著($P > 0.05$)。下图同。 H_2O_2 : hydrogen peroxide; BLF: bamboo leaf flavonoids; ACTB: β -actin. Data columns marked with different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$), while with the same lowercase letters indicate no significant difference ($P > 0.05$). The same as below.

图 1 BLF 缓解 H_2O_2 诱导的 bMECs 焦亡中 p65 的表达水平

Fig.1 Expression level of p65 in H_2O_2 induced pyroptosis of bMECs alleviated by BLF

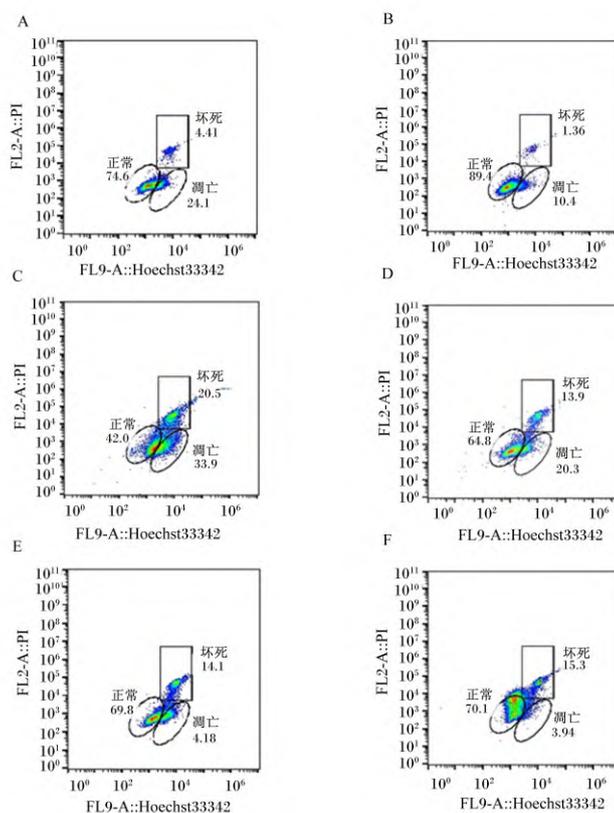
2.1.2 BAY 11-7082 对 H_2O_2 诱导的 bMECs 焦亡的影响

为了进一步明确 p65 在 H_2O_2 诱导的 bMECs

焦亡中的调控作用,使用 p65 抑制剂 BAY 11-7082 来模拟 p65 低表达。将对照组、BLF 组、 H_2O_2 组、BLF+ H_2O_2 组、BAY 11-7082+ H_2O_2 组和 BLF+

BAY 11-7082 + H₂O₂ 组的 bMECs 进行 Hoechst 33342/PI 染色,使用流式细胞术检测焦亡细胞的数量,结果如图 2 所示。BAY 11-7082+H₂O₂ 组的 bMECs 焦亡水平与 H₂O₂ 组相比显著降低 ($P < 0.05$),说明 BAY 11-7082 可能是通过抑制 p65 表达从而有效缓解 bMECs 焦亡;与 BLF+H₂O₂ 组相

比则无显著差异 ($P > 0.05$),说明 BLF 可能与 BAY 11-7082 具有相似的缓解 bMECs 焦亡的功能;而 BLF+BAY 11-7082 + H₂O₂ 组与 BAY 11-7082 + H₂O₂ 组相比无显著差异 ($P > 0.05$),表明在 BAY 11-7082 处理的基础上对 bMECs 进行 BLF 预处理未能进一步缓解 bMECs 焦亡。



A: 对照组 CON group; B: BLF 组 BLF group; C: H₂O₂ 组 H₂O₂ group; D: BLF+H₂O₂ 组 BLF+H₂O₂ group; E: BAY 11-7082+H₂O₂ 组 BAY 11-7082+H₂O₂ group; F: BLF+BAY 11-7082+H₂O₂ 组 BLF+BAY 11-7082+H₂O₂ group。

FL9-A::Hoechst33342: Hoechst33342 染料在 FL9 通道检测到的荧光强度 fluorescence intensity detected in FL9 channel for Hoechst33342 dye; FL2-A::PI: PI 染料在 FL2 通道检测到的荧光强度 fluorescence intensity detected in FL2 channel for PI dye。图 9 同 the same as Fig.9。

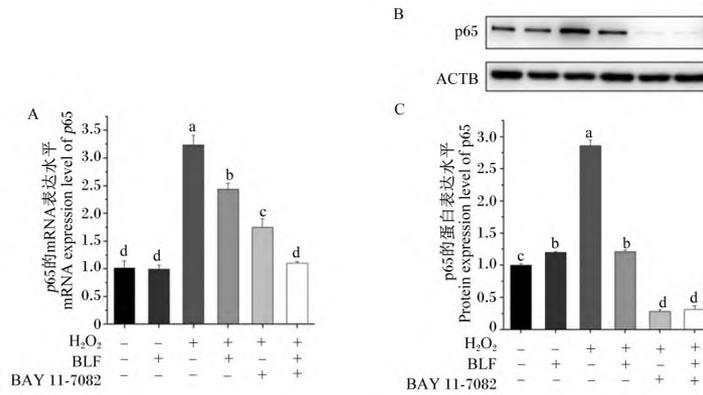
图 2 流式细胞术检测 BAY 11-7082 对 bMECs 焦亡的影响

Fig.2 Detection of effects of BAY 11-7082 on pyroptosis of bMECs by flow cytometry

2.1.3 BLF 和 BAY 11-7082 对 p65 表达的影响

为了进一步明确 p65 在 H₂O₂ 诱导的 bMECs 焦亡中是否有调控作用,利用 RT-qPCR 和 Western Blot 技术检测 bMECs 内 p65 的 mRNA 和蛋白表达水平,验证 BLF 和 BAY 11-7082 对 p65 的抑制效果,结果如图 3 所示。在经过 BAY 11-7082 处理后,BAY 11-7082+H₂O₂ 组的 p65 的 mRNA 表

达水平显著低于 H₂O₂ 组 ($P < 0.05$),蛋白表达水平显著低于 H₂O₂ 组 ($P < 0.05$),说明 BAY 11-7082 对 p65 的抑制效果显著;BLF+BAY 11-7082+H₂O₂ 组的 p65 的 mRNA 和蛋白表达水平则均显著低于 H₂O₂ 组与 BLF+H₂O₂ 组 ($P < 0.05$),说明经过 BLF 预处理后,BAY 11-7082 对 p65 的抑制效果进一步增强,BLF 可能与 BAY 11-7082 在抑制 p65 的表达上具有协同作用。



A:p65 的 mRNA 表达水平 mRNA expression level of p65;B:蛋白表达条带 protein expression bands;C:p65 的蛋白表达水平 protein expression level of p65。

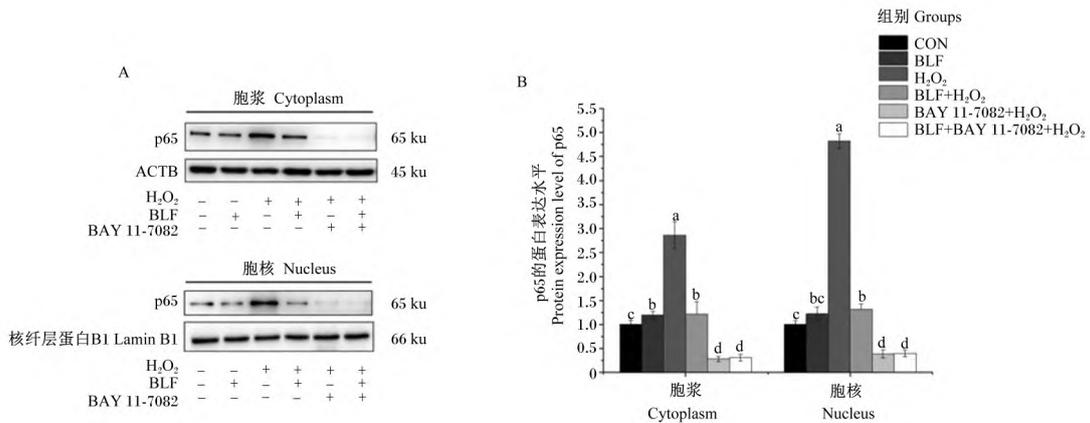
图 3 BLF 和 BAY 11-7082 对 bMECs 焦亡中 p65 表达的影响

Fig.3 Effects of BLF and BAY 11-7082 on expression of p65 in pyroptosis of bMECs

2.1.4 BLF 和 BAY 11-7082 对 p65 核转位的影响

为了进一步探究 BLF 和 BAY 11-7082 对 bMECs 焦亡时 p65 表达的影响,利用 Western Blot 技术检测胞浆和胞核中 p65 的蛋白表达水平并分析其核转位情况,结果如图 4 所示。与对照组相比,H₂O₂ 诱导 bMECs 焦亡时胞核和胞浆内 p65 的蛋白表达水平均显著升高 (P<0.05),且由胞浆向胞核的转移明显增加,表明在 H₂O₂ 诱导的 bMECs

焦亡中,H₂O₂ 促进了 p65 的表达及核转位;BLF+H₂O₂ 组的 p65 在胞浆和胞核的蛋白表达水平均显著低于 H₂O₂ 组 (P<0.05),说明 BLF 抑制了 H₂O₂ 诱导的 bMECs 焦亡时 p65 的表达及核转位;BAY 11-7082+H₂O₂ 组和 BLF+BAY 11-7082+H₂O₂ 组的 p65 在胞浆和胞核的蛋白表达水平均显著低于 H₂O₂ 组 (P<0.05),说明 BAY 11-7082 对 p65 的表达及核转位的抑制效果明显。



A:蛋白表达条带 protein expression bands;B:p65 在胞浆和胞核中的蛋白表达水平 protein expression levels of p65 in cytoplasm and nucleus。

图 4 Western Blot 检测 BLF 和 BAY 11-7082 对 bMECs 焦亡中 p65 核转位的影响

Fig.4 Detection of effects of BLF and BAY 11-7082 on p65 nuclear translocation in pyroptosis of bMECs by Western Blot

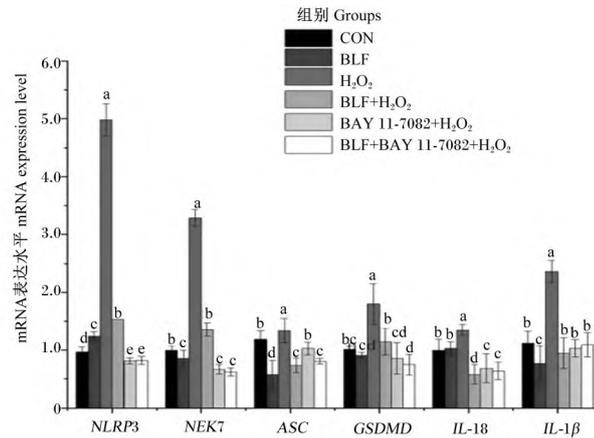
2.1.5 BLF 和 BAY 11-7082 对 bMECs 焦亡相关基因表达的影响

本试验利用 RT-qPCR 技术进一步探究了 BLF

和 BAY 11-7082 对 bMECs 焦亡相关基因 mRNA 表达水平的影响,结果如图 5 所示。与 H₂O₂ 组相比,BLF+H₂O₂ 组、BAY 11-7082+H₂O₂ 组和 BLF+

BAY 11-7082+H₂O₂ 组的 *NLRP3*、*NEK7*、*ASC*、*GSDMD*、*IL-18*、*IL-1β* 的 mRNA 表达水平均显著降低

($P < 0.05$), 说明 BLF 与 BAY 11-7082 可有效抑制 bMECs 焦亡相关基因的表达。



NLRP3:核苷酸结合寡聚化结构域样受体样蛋白 3 NOD-like receptor containing a pyrin domain 3; *NEK7*:哺乳动物相关激酶 7 mammalian-related kinase 7; *ASC*:凋亡相关斑点样蛋白 apoptosis-associated speck-like protein; *GSDMD*:消皮素 D gasdermin D; *IL-18*:白细胞介素-18 interleukin-18; *IL-1β*:白细胞介素-1β interleukin-1β。图 12 同 the same as Fig.12。

图 5 BLF 和 BAY 11-7082 对 bMECs 焦亡相关基因表达的影响

Fig.5 Effects of BLF and BAY 11-7082 on expression of related genes in pyroptosis of bMECs

2.1.6 BLF 和 BAY 11-7082 对 bMECs 焦亡相关蛋白表达的影响

本试验利用 Western Blot 技术进一步探究了 BLF 和 BAY 11-7082 对 bMECs 焦亡相关蛋白表达水平的影响,结果如图 6 所示。与 H₂O₂ 组相比, BLF+H₂O₂ 组、BAY 11-7082+H₂O₂ 组和 BLF+BAY 11-7082+H₂O₂ 组的 bMECs 焦亡相关蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$), 说明 BLF 与 BAY 11-7082 可有效抑制 bMECs 焦亡相关蛋白的表达。

2.1.7 BLF 和 BAY 11-7082 对 bMECs 内 ASC 斑点的影响

本试验利用免疫荧光技术检测了各组 bMECs 内 ASC 斑点的荧光强度,结果如图 7 所示。与 H₂O₂ 组相比, BLF+H₂O₂ 组、BAY 11-7082+H₂O₂ 组和 BLF+BAY 11-7082+H₂O₂ 组的 ASC 斑点的荧光强度均明显降低,进一步证实了 BLF 可能是通过抑制 p65 的表达来缓解 H₂O₂ 诱导的 bMECs 焦亡。

2.2 BLF 通过 SIRT1 调节 p65 缓解 H₂O₂ 诱导的 bMECs 焦亡

2.2.1 SIRT1 在 BLF 调节 H₂O₂ 诱导的 bMECs 焦亡中的表达

为了探究 SIRT1 是否参与 BLF 对 H₂O₂ 诱导

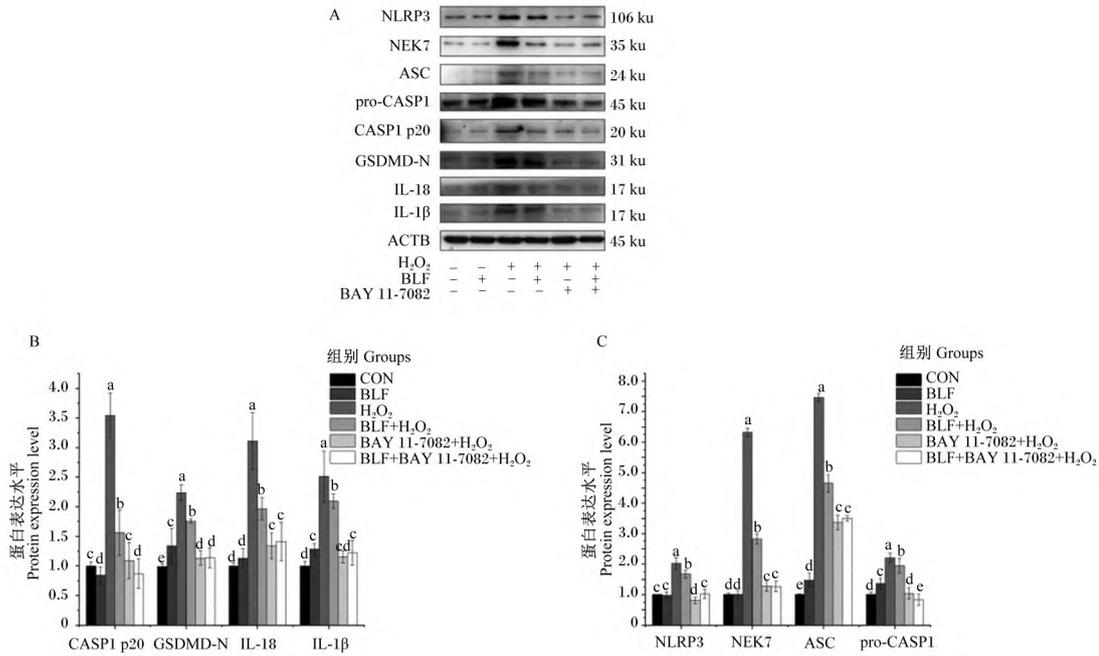
的 bMECs 焦亡的缓解,通过细胞培养提取以上各组的 mRNA 和蛋白,利用 RT-qPCR 和 Western Blot 技术检测了细胞内 *SIRT1* 的 mRNA 和蛋白表达水平,结果如图 8 所示。与对照组相比,在 80 μg/mL 的 BLF 处理 24 h 的情况下, *SIRT1* 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$); 而在 800 μmol/L 的 H₂O₂ 处理 8 h 的情况下, *SIRT1* 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$); 而经过 BLF 预处理的 BLF+H₂O₂ 组的 bMECs,其 *SIRT1* 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著高于 H₂O₂ 组 ($P < 0.05$), 且蛋白表达水平恢复至 BLF 组水平,说明 *SIRT1* 参与了 BLF 对 H₂O₂ 诱导的 bMECs 焦亡的缓解作用过程。

2.2.2 EX 527 对 H₂O₂ 诱导的 bMECs 焦亡的影响

为了进一步明确 BLF 对 H₂O₂ 诱导的 bMECs 焦亡的保护作用是否通过 *SIRT1* 调控,使用了 *SIRT1* 抑制剂 EX 527 来模拟 *SIRT1* 低表达。将对照组、BLF 组、H₂O₂ 组、BLF+H₂O₂ 组、EX 527+H₂O₂ 组和 BLF+EX 527+H₂O₂ 组的 bMECs 进行 Hoechst33342/PI 染色,使用流式细胞术检测焦亡细胞的数量,结果如图 9 所示。EX 527+H₂O₂ 组的 bMECs 焦亡水平与 H₂O₂ 组相比显著升高 ($P < 0.05$), 说明 EX 527 可能是通过抑制 *SIRT1* 表达

从而促进 bMECs 焦亡;BLF+EX 527+H₂O₂ 组的 bMECs 焦亡水平与 EX 527+H₂O₂ 组相比无显著

差异 ($P>0.05$),说明在 BLF 预处理下也未能有效缓解 bMECs 焦亡。



A: 蛋白表达条带 protein expression bands; B, C: 焦亡相关蛋白表达水平 expression levels of related proteins in pyroptosis.

CASP1 p20:半胱天冬酶 1 p20 cysteinyl aspartate specific proteinase 1 p20;GSDMD-N:消皮素 D N 末端片段 gasdermin D N-terminal domain;IL-18:白细胞介素-18 interleukin-18;IL-1β:白细胞介素-1β interleukin-1β;NLRP3:核苷酸结合寡聚化结构域样受体样蛋白 3 NOD-like receptor containing a pyrin domain 3;NEK7:哺乳动物相关激酶 7 mammalian-related kinase 7;ASC:凋亡相关斑点样蛋白 apoptosis-associated speck-like protein;pro-CASP1:半胱天冬酶 1 前体 pro-cysteinyl aspartate specific proteinase 1。图 13 同 the same as Fig.13。

图 6 BLF 和 BAY 11-7082 对 bMECs 焦亡相关蛋白表达的影响

Fig.6 Effects of BLF ans BAY 11-7082 on expression of related proteins in pyroptosis of bMECs

2.2.3 BAY 11-7082 和 EX 527 对 SIRT1 表达的影响

为验证 EX 527 对 SIRT1 的抑制效果,利用 RT-qPCR 和 Western Blot 技术检测 bMECs 内 SIRT1 的 mRNA 以及蛋白表达水平,结果如图 10 所示。在经过 EX 527 的处理后,EX 527+H₂O₂ 组的 SIRT1 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著低于 H₂O₂ 组 ($P<0.05$),说明 EX 527 对 SIRT1 的抑制效果显著;BLF+EX 527+H₂O₂ 组的 SIRT1 的 mRNA 和蛋白表达水平则均显著高于 EX 527+H₂O₂ 组 ($P<0.05$),说明经过 BLF 预处理后,EX 527 对 SIRT1 的抑制效果减弱;然而,BAY 11-7082 对 SIRT1 的 mRNA 表达没有显著影响 ($P>0.05$)。

2.2.4 EX 527 对 p65 表达及核转位的影响

为进一步探究 BLF 是否通过调节 SIRT1 来影响 p65 的表达以缓解 H₂O₂ 诱导的 bMECs 焦亡,利用 RT-qPCR 技术检测 EX 527 对 p65 的 mRNA 表达水平,并利用 Western Blot 技术检测胞浆和胞核中 p65 的蛋白表达水平,分析其核转位情况。如图 11-A 所示,EX 527+H₂O₂ 组 bMECs 的 p65 的 mRNA 表达水平显著高于 BAY 11-7082+H₂O₂ 组 ($P<0.05$),且恢复到 H₂O₂ 组水平,说明 EX 527 作为 SIRT1 的抑制剂可促进 p65 的 mRNA 表达;在经过 BLF 的预处理后,BLF+EX 527+H₂O₂ 组 bMECs 的 p65 的 mRNA 表达水平则显著降低 ($P<0.05$),说明 BLF 可能通过减弱 EX 527 对 SIRT1 的抑制效果从而减少 p65 的 mRNA 表达。如图

11-C 所示, EX 527+H₂O₂ 组 bMECs 的 p65 的蛋白表达水平显著高于 BAY 11-7082+H₂O₂ 组 ($P < 0.05$), 且由胞浆向胞核的转移明显增加, 表明 EX 527 促进了 p65 的表达及核转位; 在经过 BLF 预处理后, BLF+EX 527+H₂O₂ 组 bMECs 的 p65

的蛋白表达水平则显著降低 ($P < 0.05$), 且 p65 向胞核的转移减少, 表明 BLF 也可能通过减弱 EX 527 对 SIRT1 的抑制效果从而减少 p65 的蛋白表达及核转位。

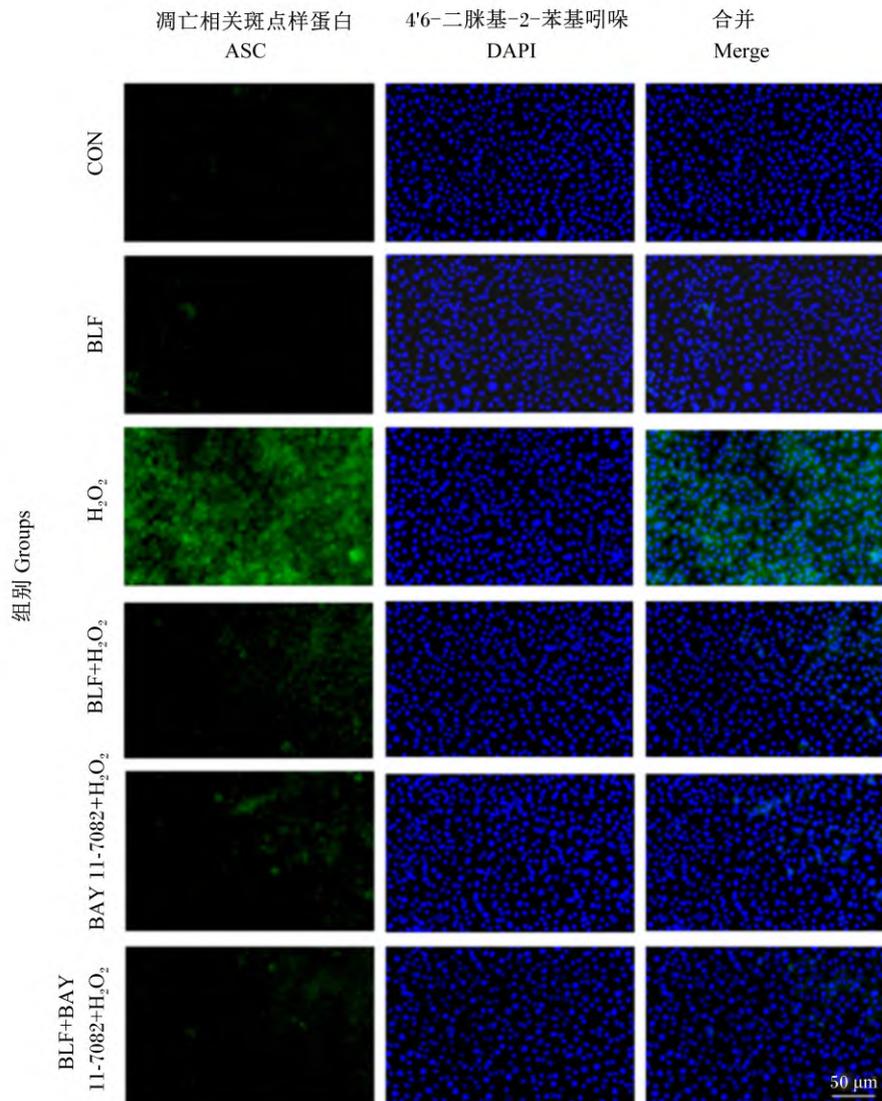


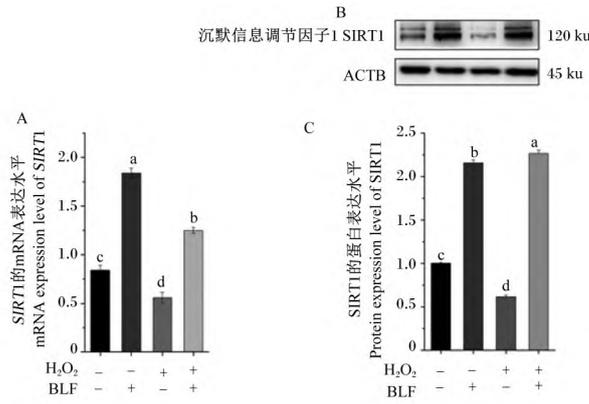
图7 免疫荧光检测 BAY 11-7082 对 bMECs 焦亡中 ASC 斑点的影响

Fig.7 Detection of effects of BAY 11-7082 on ASC spots in pyroptosis of bMECs by immunofluorescence

2.2.5 EX 527 对 bMECs 焦亡相关基因表达的影响

利用 RT-qPCR 技术探究了 EX 527 对 bMECs 焦亡相关基因表达水平的影响, 焦亡相关基因的 mRNA 表达水平如图 12 所示。EX 527+H₂O₂ 组

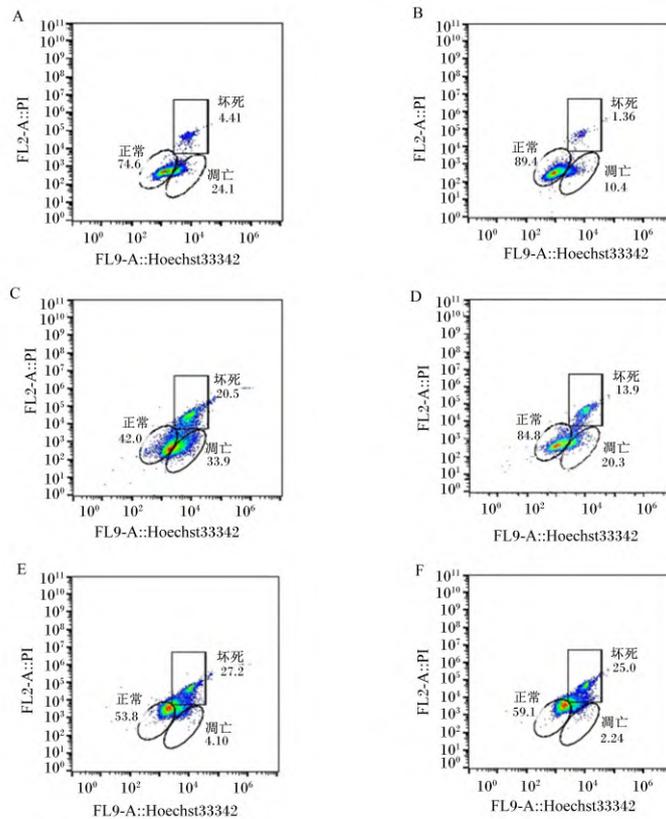
bMECs 焦亡相关基因 mRNA 表达水平均显著高于 BLF+H₂O₂ 组和 BAY 11-7082+H₂O₂ 组 ($P < 0.05$), 进一步证实了 EX 527 可能通过抑制 SIRT1 的表达, 从而使 p65 表达增强, 导致 bMECs 焦亡相关基因表达水平增强。



A: *SIRT1* 的 mRNA 表达水平 mRNA expression level of *SIRT1*; B: 蛋白表达条带 protein expression bands; C: *SIRT1* 的蛋白表达水平 protein expression level of *SIRT1*。

图 8 BLF 缓解 H₂O₂ 诱导的 bMECs 焦亡中 SIRT1 的表达

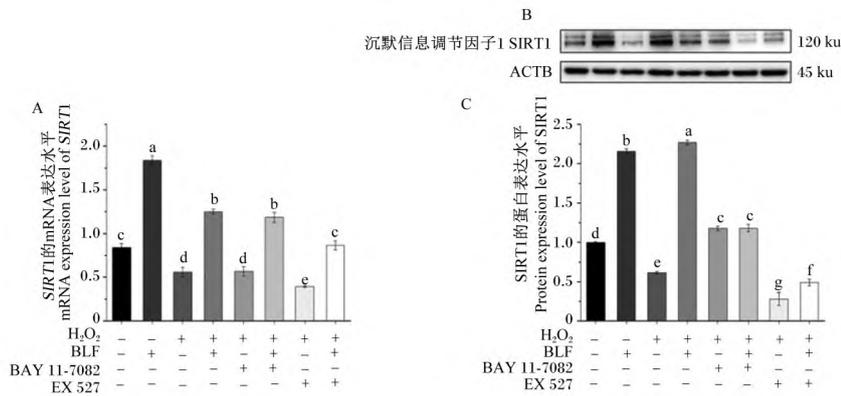
Fig.8 BLF alleviates SIRT1 expression in H₂O₂ induced pyroptosis of bMECs



A: 对照组 CON group; B: BLF 组 BLF group; C: H₂O₂ 组 H₂O₂ group; D: BLF+H₂O₂ 组 BLF+H₂O₂ group; E: EX 527+H₂O₂ 组 EX 527+H₂O₂ group; F: BLF+EX 527+H₂O₂ 组 BLF+EX 527+H₂O₂ group。

图 9 流式细胞术检测 EX 527 对 bMECs 焦亡的影响

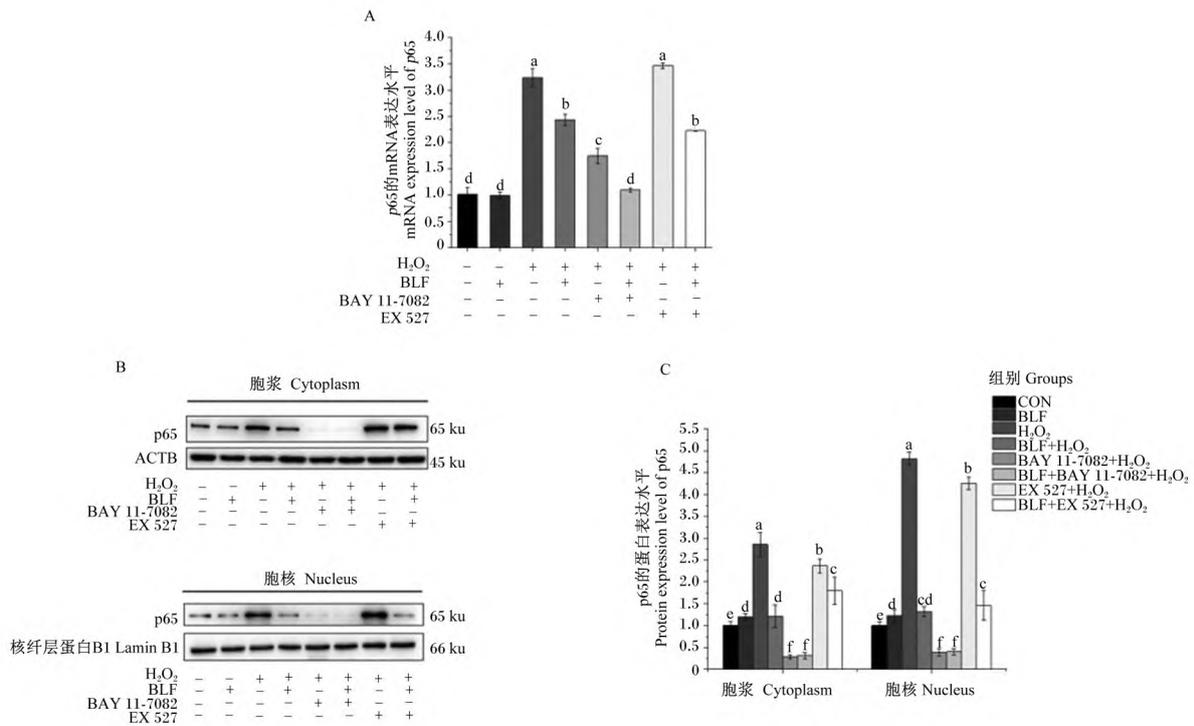
Fig.9 Detection of effects of EX 527 on pyroptosis of bMECs by flow cytometry



A: *SIRT1* 的 mRNA 表达水平 mRNA expression level of *SIRT1*; B: 蛋白表达条带 protein expression bands; C: *SIRT1* 的蛋白表达水平 protein expression level of *SIRT1*。

图 10 BAY 11-7082 和 EX 527 对 bMECs 焦亡中 *SIRT1* 表达的影响

Fig.10 Effects of BAY 11-7082 and EX 527 on expression of *SIRT1* in pyroptosis of bMECs



A: p65 的 mRNA 表达水平 mRNA expression level of p65; B: 蛋白表达条带 protein expression bands; C: p65 在胞浆和胞核中的蛋白表达水平 protein expression level of p65 in cytoplasm and nucleus。

图 11 EX 527 对 bMECs 焦亡中 p65 表达及核转位的影响

Fig.11 Effects of EX 527 on expression and nuclear transposition of p65 in pyroptosis of bMECs

2.2.6 EX 527 对 bMECs 焦亡相关蛋白表达的影响

利用 Western Blot 技术分析了 EX 527 对 bMECs 焦亡相关蛋白表达的影响,以进一步探究

SIRT1 调控 bMECs 焦亡的机制,结果如图 13 所示。与 BLF+H₂O₂ 组和 BAY 11-7082+H₂O₂ 组相比,EX 527 + H₂O₂ 组中 NLRP3、NEK7、ASC、Caspase-1 p20 以及 IL-18 的蛋白表达水平显著增

强($P < 0.05$),但 GSDMD-N 和 IL-1 β 的蛋白表达水平无显著变化($P > 0.05$)。

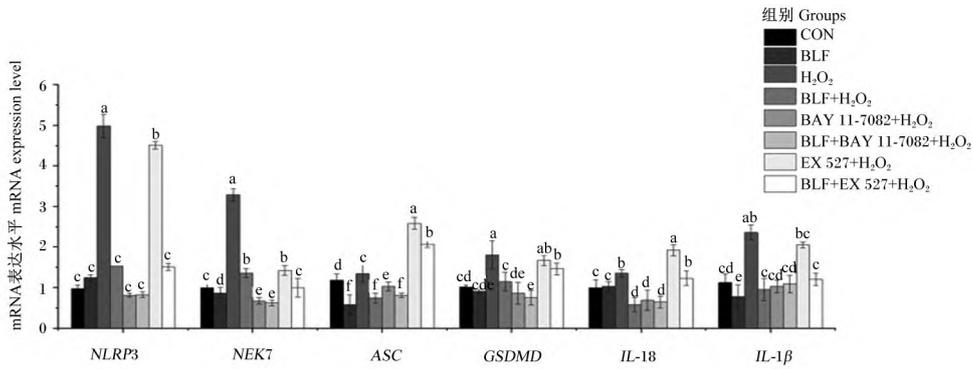
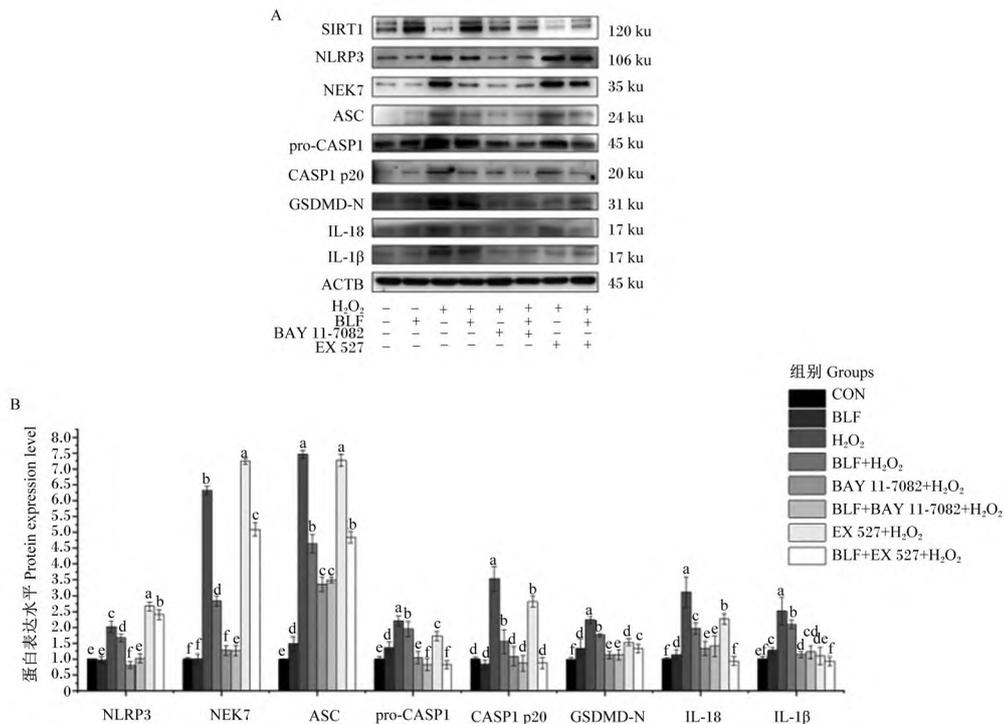


图 12 EX 527 对 bMECs 焦亡相关基因表达的影响

Fig.12 Effects of EX 527 on expression of related genes in pyroptosis of bMECs



A: 蛋白表达条带 protein expression bands; B: 焦亡相关蛋白表达水平 expression levels of related proteins in pyroptosis。

图 13 EX 527 对 bMECs 焦亡相关蛋白表达的影响

Fig.13 Effects of EX 527 on expression of related proteins in pyroptosis of bMECs

2.2.7 EX 527 对 bMECs 内 ASC 斑点的影响

利用免疫荧光技术检测细胞内 ASC 斑点的荧光强度,以进一步明确 SIRT1 在 BLF 缓解 H₂O₂ 诱导的 bMECs 焦亡中的作用,结果如图 14 所示。EX 527+H₂O₂ 组中 bMECs 的 ASC 斑点的荧光强度最高,BLF+EX 527+H₂O₂ 组的 ASC 斑点的荧光强度被逆转,但仍然未恢复到 BLF+H₂O₂ 组水平。

3 讨论

细胞焦亡的通路分为 Caspase-1 介导的经典焦亡通路^[33]和 Caspase-4/5/11 介导的非经典焦亡通路^[34]。其中,NLRP3/Caspase-1/GSDMD 介导的细胞焦亡为焦亡最经典通路^[35]。炎症小体的形成、Caspase 的激活以及大量促炎因子的主动释放

是细胞焦亡的重要标志^[36]。NLRP3 炎症小体的激活刺激包括感染期间出现的广泛介质^[37]、组织损伤^[38]或代谢应激^[39]。丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 NEK7 是 NLRP3 的一个关键相互作用伙伴,导致 NLRP3 的寡聚以及 ASC 斑点的形成和 IL-1 β 和 IL-18 的成熟,以响应活性氧(reactive oxygen species, ROS)等 NLRP3 炎症小体激活信号^[40]。ROS

还通过 ROS 依赖的转录因子 NF- κ B 和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)介导的 NLRP3 去泛素化参与 NLRP3 炎症小体的启动信号^[41]。大量研究表明了 NLRP3 在包括寄生虫、脂肪代谢和炎症中的重要作用^[42-44]。但关于 NLRP3 在奶牛乳腺细胞焦亡中是否具有关键作用尚未见报道。

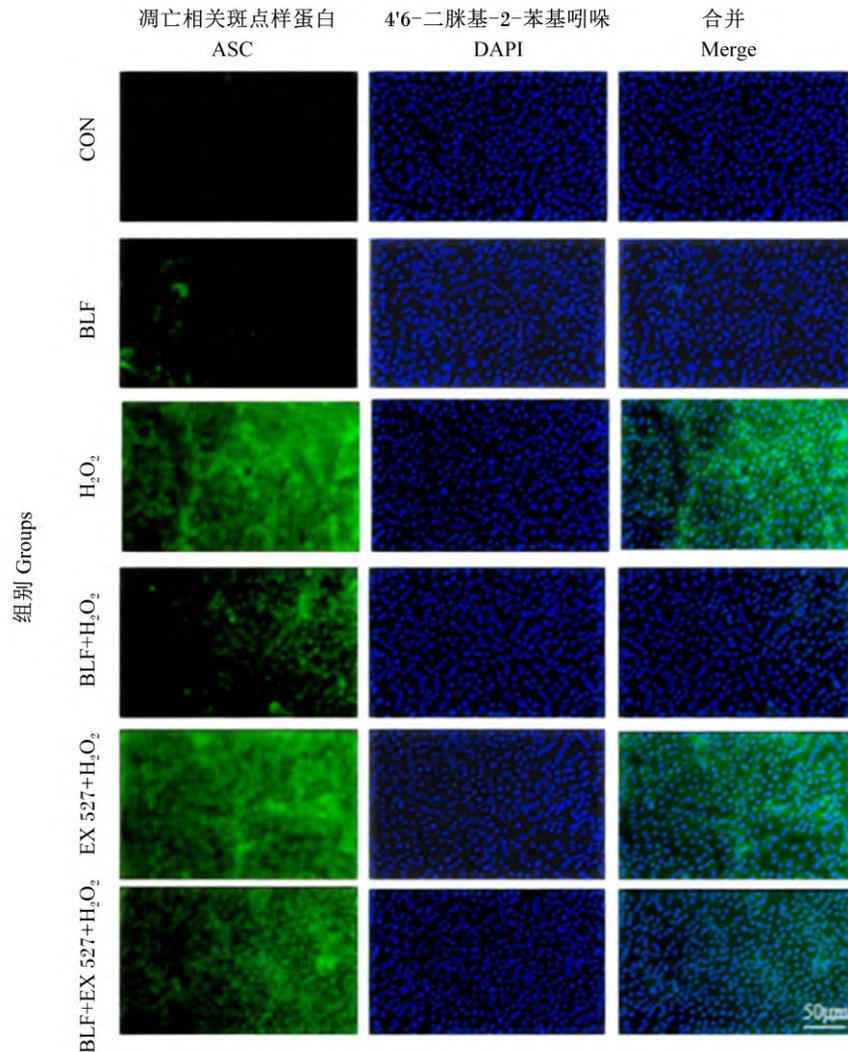


图 14 免疫荧光检测 EX 527 对 bMECs 焦亡中 ASC 斑点的影响

Fig. 14 Detection of effects of EX 527 on ASC spots in pyroptosis of bMECs by immunofluorescence

H₂O₂ 作为一种 ROS,可诱导细胞毒性,造成细胞内大分子氧化损伤,导致细胞死亡^[45]。刘佳^[46]的研究证明了 H₂O₂ 可通过 p65 诱导人主动脉内皮细胞(human aortic endothelial cells, HAECs)焦亡,且 HAECs 内的 SIRT1 通过去乙酰化抑制 NF- κ B 的表达,因此本研究也采用 H₂O₂ 成功构建了原代 bMECs 焦亡模型。

NF- κ B 转录因子在协调免疫和炎症反应中发挥核心作用^[47],其中 p65 作为 NF- κ B 转录因子的成员之一得到了广泛研究^[48]。在畜牧领域已有研究表明 p65 介入了无乳链球菌^[32]、金葡萄球菌^[49]和大肠杆菌^[50]所诱导的炎症。在奶牛氧化应激时也检测到 p65 表达的上调,通过抑制奶牛单核细胞中 NF- κ B p65 的表达可以缓解 LPS 引起的氧化

应激,提高抗氧化酶活性^[51],因此本研究通过 H₂O₂ 诱导 bMECs 焦亡,探究 p65 在缓解 bMECs 焦亡中的作用。已有研究表明黄酮类化合物对 bMECs 中 NF-κB 的调控作用。例如,任婷婷等^[52]研究发现,葛根黄酮通过抑制 LPS 诱导的原代 bMECs 中 NF-κB 的活化和降低下游 TNF-α 的表达来提供抗炎效果;陈喜宏等^[53]建立的 LPS 诱导的 MAC-T 炎症模型中,芹菜素通过在转录和翻译水平降低其 p65 和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPK)的表达,从而降低下游炎症因子起到抗炎效果。但尚不明确 p65 在 BLF 缓解 H₂O₂ 诱导的 bMECs 焦亡中参与 NLRP3 炎症小体调控的生理过程。本研究检测了 BLF 缓解 H₂O₂ 诱导 bMECs 焦亡模型中 p65 的表达情况,结果表明, H₂O₂ 诱导下 bMECs 中 p65 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著提高,说明 p65 参与了 H₂O₂ 诱导的 bMECs 焦亡;在 BLF+H₂O₂ 组中, BLF 的预处理下调了 H₂O₂ 导致的 p65 表达水平的升高,缓解了 bMECs 的焦亡。这与 Teng 等^[54]的研究结果一致,其试验使用重楼皂苷 VI (polyphyllin VI, PP VI) 诱导 A549 和 H1299 细胞内 ROS 水平升高,从而激活 NF-κB p65,导致 A549 和 H1299 细胞 Caspase-1 依赖的细胞焦亡,而使用延龄草处理 A549 和 H1299 细胞则逆转了这一过程。为进一步探究 p65 参与 bMECs 焦亡的调控机制,本试验引入了 p65 抑制剂 BAY 11-7082 来模拟 p65 低表达模型。在 BAY 11-7082 处理下, p65 的表达降低,同时 NLRP3 炎症小体相关通路的 mRNA 和蛋白表达被抑制, ASC 斑点的荧光强度降低, NEK7 的表达被下调,下游炎症因子的表达水平也被降低,这说明 p65 作为 NLRP3 炎症小体通路的上游发挥调控细胞焦亡的作用,其作用与 NLRP3 炎症小体是正相关的, BAY 11-7082 则拮抗了这一效果。这一结果也与刘佳^[46]使用 si-p65 转染 HAECs 得到的结果一致,低表达 p65 降低了 HAECs 中 NLRP3 炎症小体的通路蛋白表达,缓解了焦亡。在 H₂O₂ 诱导下我们应用 BLF 处理得到了与 BAY 11-7082 作用相类似的结果,但 BLF 与 BAY 11-7082 共同处理并没有使这种抑制效果增强,其原因还需要后续进一步的研究。

SIRT1 是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺) 依赖的去乙酰化酶^[55],具有调节内分泌、代谢、免疫应答、氧化

应激、炎症和抗衰老等多种生理功能^[56-58],也是多种天然植物功能组分发挥疾病保护作用的重要分子靶点^[59]。在体内和体外, SIRT1 作为急性炎症反应和相关疾病的一部分被下调^[60-61],一些药物和上游分子通过上调 SIRT1 的表达表现出很强的抗炎活性^[62-63]。因此,开发和利用具有调节 SIRT1 作用的生物活性物质对抑制细胞焦亡具有重要意义。在畜牧领域有研究表明 SIRT1 通过腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)、Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)等信号通路参与了奶牛乳脂、乳蛋白的合成过程^[64]。此外,多种植物黄酮等已经被证明可以通过上调 SIRT1 的表达来改善大鼠氧化应激、脑损伤和保护海马神经元细胞^[65-67],但尚无在 bMECs 中的研究,其是否参与 H₂O₂ 诱导的 bMECs 焦亡仍不清楚。因此,本研究探究了 H₂O₂ 和 BLF 对 SIRT1 表达的影响,结果表明在 H₂O₂ 刺激下 SIRT1 的表达被显著抑制, BLF 预处理则可以显著提高 SIRT1 的表达,并且 BLF 可以逆转 H₂O₂ 刺激所导致的 SIRT1 表达下调。这一结果可能说明了 SIRT1 参与了 H₂O₂ 诱导的 bMECs 焦亡,且 SIRT1 可以调控 NF-κB 信号通路,但并不明确是否可以调控 bMECs 中 NLRP3 炎症小体的表达。为了进一步探究 SIRT1 在 BLF 缓解 bMECs 焦亡中的作用,本试验引入了 SIRT1 抑制剂 EX 527 来模拟 SIRT1 低表达,同样使用 BLF 进行预处理,探究 SIRT1 与 p65 在调控细胞焦亡时的互作关系。结果表明,在使用 H₂O₂ 刺激条件下抑制 SIRT1 后, p65 的表达显著升高,并促进了 p65 向胞核的移位;同时 NLRP3 炎症小体通路以及 NEK7 都被显著上调, ASC 斑点的荧光强度也呈现较高水平。在应用 BLF+EX 527+H₂O₂ 处理的情况下, SIRT1 的表达水平被 BLF 上调, p65 的核移位情况被下调, NLRP3 炎症小体通路的 mRNA 和蛋白表达水平被显著抑制,但 GSDMD-N 和 IL-1β 的蛋白表达水平与 EX 527+H₂O₂ 组相比降低并不显著。以上结果与郭文帆等^[68]的研究结果一致,其发现茶黄素可以通过提高 AMPK/SIRT1 表达,来抑制 NF-κB 信号通路引起的大鼠膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)。时延龙等^[69]的研究则表明, 槲子苷可能激活 AMPK/SIRT1/NF-κB 通路诱导人乳腺癌细

胞 MCF-7 线粒体功能障碍,从而抑制 MCF-7 细胞增殖和侵袭,促进其焦亡。这些研究与本试验结果都说明了 SIRT1 与炎症和细胞焦亡的密切关系,而黄酮类物质可以通过影响 SIRT1 的表达调控炎症和焦亡等生理过程,这有望成为缓解奶牛乳腺炎的新靶点。

4 结 论

BLF 可通过抑制 p65 的表达和核转位,缓解 H₂O₂ 诱导的 bMECs 焦亡和 NLRP3 炎症小体激活;在 H₂O₂ 诱导的 bMECs 焦亡中 SIRT1 被显著抑制,BLF 可通过上调 SIRT1 的表达来减少 p65 的表达和核转位以缓解 H₂O₂ 诱导的 bMECs 焦亡。

参考文献:

- [1] 张硕.竹叶黄酮与丁酸钠对仙居鸡生产性能、蛋品质和脂质代谢的影响[D].硕士学位论文.杭州:浙江农林大学,2021.
ZHANG S.Effects of bamboo leaf flavonoids and sodium butyrate on the performance,egg quality and lipid metabolism of *Xianju* chicken[D].Master's Thesis.Hangzhou: Zhejiang A & F University, 2021. (in Chinese)
- [2] 方菊.竹叶黄酮的提取分离有抑菌效果研究[D].硕士学位论文.合肥:合肥工业大学,2012.
FANG J.Extraction, separation and antimicrobial activities of bamboo leaves flavonoids [D]. Master's Thesis.Hefei: Hefei University of Technology, 2012. (in Chinese)
- [3] 唐浩国,魏晓霞,李叶,等.竹叶黄酮对小鼠脾细胞免疫的分子机制研究[J].食品科学,2007,28(9):523-526.
TANG H G, WEI X X, LI Y, et al.Study on molecule mechanism of immunoregulation to spleen cells of rat with flavonoids from bamboo leaves [J]. Food Science, 2007, 28(9): 523-526. (in Chinese)
- [4] 曹晶,代重山.竹叶黄酮的生物学功能及其在动物生产的应用[J].中国饲料,2023(23):14-18.
CAO J, DAI C S.Biological functions of bamboo leaf flavonoids and its application in animal production [J]. China Feed, 2023(23): 14-18. (in Chinese)
- [5] 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)
- [6] 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]. Journal of Food Science, 2019, 84(6): 1609-1620.
- [7] LI S, LIANG T, ZHANG Y, et al. Vitexin alleviates high-fat diet induced brain oxidative stress and inflammation via anti-oxidant, anti-inflammatory and gut microbiota modulating properties[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2021, 171: 332-344.
- [8] 周晓燕,应长江,王珊珊,等.竹叶黄酮抑制大鼠海马马的炎症反应减轻糖尿病大鼠认知功能障碍[J].中国医学创新,2016,13(35):21-23.
ZHOU X Y, YING C J, WANG S S, et al. Bamboo leaf flavone alleviates cognitive deficit through inhibiting inflammation in hippocampus in diabetic rats[J]. Medical Innovation of China, 2016, 13(35): 21-23. (in Chinese)
- [9] 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)
- [10] 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)
- [11] 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 bo-

- vine mammary epithelial cells induced by hydrogen peroxide [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2023, 35(4) : 2616–2628. (in Chinese)
- [12] LI L L, QI J J, TAO H, et al. Protective effect of the total flavonoids from *Clinopodium chinense* against LPS-induced mice endometritis by inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 312 : 116489.
- [13] 郭娜, 孙云朝, 孙春霞, 等. 山楂黄酮通过抑制 ROS/NLRP3 信号通路对辐射损伤小鼠睾丸的保护作用 [J]. 中成药, 2023, 45(1) : 258–263.
- GUO N, SUN Y C, SUN C X, et al. Hawthorn flavonoids protect the testis of radiation-injured mice by inhibiting ROS/NLRP3 signaling pathway [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2023, 45(1) : 258–263. (in Chinese)
- [14] 吕鑫, 顾志荣, 祁梅, 等. 锁阳黄酮对阿尔茨海默病大鼠海马组织 ROS 含量及 NADPH 氧化酶、NLRP3 表达的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2023, 30(4) : 82–87.
- LV X, GU Z R, QI M, et al. Effects of cynomorium songaricum flavonoids on ROS content and expressions of NADPH oxidase and NLRP3 in hippocampus of alzheimer disease rats [J]. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 2023, 30(4) : 82–87. (in Chinese)
- [15] ZHANG G X, TANG L M, LIU H B, et al. Psidium guajava flavonoids prevent NLRP3 inflammasome activation and alleviate [J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2021, 49(8) : 2001–2015.
- [16] 肖金龙, 王浩, 万全, 等. 撒坝猪源 *E. coli* 高致病性毒力岛通过 NLRP3/ASC/Caspase-1 途径诱导 IPEC-J2 细胞焦亡 [J]. 畜牧兽医学报, 2023, 54(12) : 5218–5227.
- XIAO J L, WANG H, WAN Q, et al. Induction of IPEC-J2 pyroptosis by *E. coli* HPI from *Saba* pig via NLRP3/ASC/Caspase-1 pathway [J]. Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica, 2023, 54(12) : 5218–5227. (in Chinese)
- [17] 张慧欣, 辜银萍, 胡宇声, 等. NLRP3 炎性小体和细胞焦亡在消化系统疾病中的作用机制 [J]. 中国兽医杂志, 2023, 59(1) : 96–101.
- ZHANG H X, GU Y P, HU Y S, et al. The mechanism of NLRP3 inflammasome and pyroptosis in digestive system diseases [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2023, 59(1) : 96–101. (in Chinese)
- [18] BARBATO O, HOLMES B, FILIPESCU I E, et al. Dietary supplementation of yerba mate (*Ilex paraguayensis*) during the dry period improves redox balance in lactating dairy cows [J]. Antioxidants, 2019, 8(2) : 38.
- [19] SUN X D, JIA H D, XU Q S, et al. Lycopene alleviates H₂O₂-induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in bovine mammary epithelial cells via the NFE2L2 signaling pathway [J]. Food & Function, 2019, 10(10) : 6276–6285.
- [20] WEI Z J, NIE G H, YANG F, et al. Inhibition of ROS/NLRP3/Caspase-1 mediated pyroptosis attenuates cadmium-induced apoptosis in duck renal tubular epithelial cells [J]. Environmental Pollution, 2021, 273 : 115919.
- [21] CAPUCO A V, CHOUDHARY R K. Symposium review: determinants of milk production: understanding population dynamics in the bovine mammary epithelium [J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(3) : 2928–2940.
- [22] 魏祎, 刘超, 齐鸣, 等. 岩白菜素通过调控 NF-κB/NLRP3 通路和代谢对特发性肺间质纤维化小鼠的影响 [J]. 中成药, 2023, 45(1) : 62–69.
- WEI Y, LIU C, QI M, et al. Effects of bergenin on mice with idiopathic pulmonary fibrosis by regulating NF-κB/NLRP3 pathway and metabolism [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2023, 45(1) : 62–69. (in Chinese)
- [23] 张富慧, 郝静峰, 张自艳, 等. 菊苣酸调控 p38MAPK/NF-κB/NLRP3 信号通路对缺血性脑卒中大鼠神经元凋亡及炎症反应的影响 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2022, 39(8) : 694–698.
- ZHANG F H, HAO J F, ZHANG Z Y, et al. Impacts of cichoric acid on neuronal apoptosis and inflammatory response in ischemic stroke rats by regulating p38 MAPK/NF-κB/NLRP3 signaling pathway [J]. Journal of Apoplexy and Nervous Diseases, 2022, 39(8) : 694–698. (in Chinese)
- [24] 吴本升. 黄蜀葵花总黄酮抑制 NF-κB/NLRP3 信号通路改善溃疡性结肠炎的作用机制研究 [D]. 博士学位论文. 南京: 南京中医药大学, 2022.
- WU B S. Alleviative effects of total flavone abelmoschus manihot against ulcerative colitis via inhibiting NF-κB/NLRP3 signaling pathway [D]. Ph.D. Thesis. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2022. (in Chinese)
- [25] ZHANG Y M, TAO X F, YIN L H, et al. Protective effects of dioscin against cisplatin-induced nephrotox-

- icity via the microRNA-34a/sirtuin 1 signalling pathway [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2017, 174 (15): 2512–2527.
- [26] DENG H J, ZHOU C H, HUANG L T, et al. Activation of silent information regulator 1 exerts a neuroprotective effect after intracerebral hemorrhage by deacetylating NF- κ B/p65 [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2021, 157(3): 574–585.
- [27] LUO X, BAO X Y, WENG X Z, et al. The protective effect of quercetin on macrophage pyroptosis via TLR2/Myd88/NF- κ B and ROS/AMPK pathway [J]. *Life Sciences*, 2022, 291: 120064.
- [28] TANG K, SU W H, HUANG C H, et al. Notoginsenoside R1 suppresses inflammatory response and the pyroptosis of nucleus pulposus cells via inactivating NF- κ B/NLRP3 pathways [J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 101(Part B): 107866.
- [29] ZOU Y P, LUO X, FENG Y, et al. Luteolin prevents THP-1 macrophage pyroptosis by suppressing ROS production via Nrf2 activation [J]. *Chemico-biological Interactions*, 2021, 345: 109573.
- [30] SHI H L, ZHANG Y L, XING J, et al. Baicalin attenuates hepatic injury in non-alcoholic steatohepatitis cell model by suppressing inflammasome-dependent GSDMD-mediated cell pyroptosis [J]. *International Immunopharmacology*, 2020, 81: 106195.
- [31] 李方. 白藜芦醇调节 SIRT1/NF- κ B/NLRP3 炎症小体通路影响力竭运动大鼠肾脏炎症反应的机制 [D]. 博士学位论文. 北京: 北京体育大学, 2020.
- LI F. Effect and mechanism of resveratrol on kidney inflammation of exhausted exercise rats via modulating SIRT1/NF- κ B/NLRP3 inflammsome pathway [D]. Ph.D. Thesis. Beijing: Beijing Sport University, 2020. (in Chinese)
- [32] 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]. 硕士学位论文. 北京: 北京农学院, 2022.
- NIU H. Study on the protective mechanism of matrine against bovine mammary epithelial cells inflammation induced by *Streptococcus agalactiae* [D]. Master's Thesis. Beijing: Beijing University of Agriculture, 2022. (in Chinese)
- [33] LIU X, ZHANG Z B, RUAN J B, et al. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores [J]. *Nature*, 2016, 535 (7610): 153–158.
- [34] AGLIETTI R A, ESTEVEZ A, GUPTA A, et al. GSDMD p30 elicited by Caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(28): 7858–7863.
- [35] HADIAN K, STOCKWELL B R. The therapeutic potential of targeting regulated non-apoptotic cell death [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2023, 22(9): 723–742.
- [36] 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)
- [37] KANNEGANTI T D, OZÖREN N, BODY-MALAPPEL M, et al. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate Caspase-1 through cryopyrin/Nalp3 [J]. *Nature*, 2006, 440(7081): 233–236.
- [38] LEEMANS J C, CASSEL S L, SUTTERWALA F S. Sensing damage by the NLRP3 inflammasome [J]. *Immunological Reviews*, 2011, 243(1): 152–162.
- [39] SCHRODER K, ZHOU R B, TSCHOPP J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? [J]. *Science*, 2010, 327(5963): 296–300.
- [40] ZHAO N, LI C C, DI B, et al. Recent advances in the NEK7-licensed NLRP3 inflammasome activation: mechanisms, role in diseases and related inhibitors [J]. *Journal of Autoimmunity*, 2020, 113: 102515.
- [41] JULIANA C, FERNANDES-ALNEMRI T, KANG S, et al. Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(43): 36617–36622.
- [42] 董记红. Mitofusin 2 对脂肪肝奶牛肝脏脂代谢紊乱和炎症的调节机制 [D]. 博士学位论文. 长春: 吉林大学, 2021.
- DONG J H. The regulatory mechanism of mitofusin 2 in hepatic altered lipid metabolism and inflammation of dairy cows with fatty liver [D]. Ph. D. Thesis. Changchun: Jilin University, 2021. (in Chinese)
- [43] 马梦汝. LncRNA-XIST 通过 NF- κ B/NLRP3 炎症小体通路调节奶牛乳腺上皮细胞的炎性应答 [D]. 硕士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- MA M R. LncRNA-XIST mediates bovine mammary epithelial cell inflammatory response via NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway [D]. Master's Thesis.

- Yangling; Northwest A & F University, 2018. (in Chinese)
- [44] 刘明超. 奶牛子宫内膜炎早期诊断及益生菌抗大肠杆菌诱导的子宫内膜上皮细胞炎性损伤作用机理 [D]. 博士学位论文. 北京: 中国农业大学, 2017.
LIU M C. Early diagnosis of endometritis of dairy cows and the mechanism of probiotics against inflammatory injury of bovine endometrial epithelial cells induced by *Escherichia coli* [D]. Ph. D. Thesis. Beijing: China Agricultural University, 2017. (in Chinese)
- [45] 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 & Development*, 1992, 6(10): 1899–1913.
- [46] 刘佳. SIRT1 通过去乙酰化 NF-κB (p65) 调控 H₂O₂ 诱导的人主动脉内皮细胞焦亡的机制研究 [D]. 博士学位论文. 长春: 吉林大学, 2022.
LIU J. The mechanism of SIRT1 regulating H₂O₂-induced pyroptosis of human aortic endothelial cells by deacetylating of NF-κB (p65) [D]. Ph. D. Thesis. Changchun: Jilin University, 2022. (in Chinese)
- [47] HAYDEN M S, GHOSH S. Shared principles in NF-kappaB signaling [J]. *Cell*, 2008, 132(3): 344–362.
- [48] HOESEL B, SCHMID J A. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer [J]. *Molecular Cancer*, 2013, 12: 86.
- [49] 王建强, 李俊, 马晓敏, 等. 金黄色葡萄球菌感染对奶牛乳腺上皮细胞 Nrf2 和 NF-κB 信号通路转导的影响 [J]. *中国兽医学报*, 2020, 40(12): 2413–2418, 2424.
WANG J Q, LI J, MA X M, et al. Effects of *Staphylococcus aureus* infection on Nrf2 and NF-κB signaling pathway in bovine mammary epithelial cells [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2020, 40(12): 2413–2418, 2424. (in Chinese)
- [50] 王一, 吴建美, 毕艳楠, 等. 大肠杆菌对体外培养的奶牛乳腺成纤维细胞 TGF-β1 和 NF-κB 及 TLR4 表达的影响 [J]. *中国兽医科学*, 2015, 45(7): 764–770.
WANG Y, WU J M, BI Y N, et al. Effect of *Escherichia coli* on TGF-β1, TLR4 and NF-κB mRNA expression and protein secretion in bovine mammary fibroblast cultured *in vitro* [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2015, 45(7): 764–770. (in Chinese)
- [51] 郑亚光. 壳聚糖通过 NF-κB 信号通路调节奶牛抗氧化功能与抗炎反应的机理研究 [D]. 博士学位论文. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020.
ZHENG Y G. Mechanism of chitosan regulating antioxidant function and anti-inflammatory response of dairy cows by NF-κB signaling pathway [D]. Ph. D. Thesis. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2020. (in Chinese)
- [52] 任婷婷, 张东君, 朱丽萍, 等. 葛根素对奶牛乳腺上皮细胞炎症模型中 NF-κB 信号通路的影响 [J]. *农业生物技术学报*, 2016, 24(1): 44–51.
REN T T, ZHANG D J, ZHU L P, et al. Effect of puerarin on NF-κB signaling pathway in inflammation model of bovine (*Bos taurus*) mammary epithelial cells [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(1): 44–51. (in Chinese)
- [53] 陈喜宏, 余世田, 马骁, 等. 芹菜素通过 NF-κB 和 MAPK 通路抑制 MAC-T 细胞和小鼠乳腺的炎症反应 [J]. *中国兽医学报*, 2022, 42(10): 2042–2050.
CHEN X H, YU S T, MA X, et al. Inflammatory inhibition of apigenin through NF-κB and MAPK pathways in MAC-T cells [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2022, 42(10): 2042–2050. (in Chinese)
- [54] TENG J F, MEI Q B, ZHOU X G, et al. Polyphyllin VI induces Caspase-1-mediated pyroptosis via the induction of ROS/NF-κB/NLRP3/GSDMD signal axis in non-small cell lung cancer [J]. *Cancers*, 2020, 12(1): 193.
- [55] CANTÓ C, AUWERX J. Targeting sirtuin 1 to improve metabolism: all you need is NAD⁺? [J]. *Pharmacological Reviews*, 2012, 64(1): 166–187.
- [56] DAENTHANASANMAK A, IAMSAWAT S, CHAKRABORTY P, et al. Targeting Sirt-1 controls GVHD by inhibiting T-cell allo-response and promoting treg stability in mice [J]. *Blood*, 2019, 133(3): 266–279.
- [57] NOGUEIRAS R, HABEGGER K M, CHAUDHARY N, et al. Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism [J]. *Physiological Reviews*, 2012, 92(3): 1479–1514.
- [58] GUARENTE L, PICARD F. Calorie restriction—the SIR2 connection [J]. *Cell*, 2005, 120(4): 473–482.
- [59] ISIDE C, SCAFURO M, NEBBIOSO A, et al. SIRT1 activation by natural phytochemicals: an overview [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 1225.
- [60] BAI X Z, HE T, LIU Y, et al. Acetylation-dependent regulation of notch signaling in macrophages by SIRT1 affects sepsis development [J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 762.
- [61] ZHANG Z Y, LOWRY S F, GUARENTE L, et al.

- Roles of SIRT1 in the acute and restorative phases following induction of inflammation[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(53): 41391-41401.
- [62] LI Y, LIU T T, LI Y T, et al. Baicalin ameliorates cognitive impairment and protects microglia from LPS-induced neuroinflammation via the SIRT1/HMGB1 pathway[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 2020: 4751349.
- [63] HU T Y, FAN X Q, MA L, et al. TIM4-TIM1 interaction modulates Th2 pattern inflammation through enhancing SIRT1 expression[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2017, 40(5): 1504-1510.
- [64] 曹佩佩, 冀思同, 窦文丽, 等. 沉默信息调节因子 2 相关酶 1 对乳脂、乳蛋白合成和乳腺炎的调节及其可能机制[J]. *动物营养学报*, 2023, 35(3): 1426-1432.
- CAO P P, JI S T, DOU W L, et al. Regulation of silent information regulator 2-related enzyme 1 on milk fat, milk protein synthesis and mastitis and its possible mechanism[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2023, 35(3): 1426-1432. (in Chinese)
- [65] 吴颖, 王敏纯, 廖卫国, 等. 毛蕊异黄酮苷通过 SIRT1 通路对缺血性脑损伤大鼠的保护作用及机制[J]. *中药新药与临床药理*, 2022, 33(9): 1163-1169.
- WU Y, WANG M C, LIAO W G, et al. Protective effect and mechanism of calycosin-7-O- β -D-glucoside through SIRT1 pathway on ischemic brain injury in rats[J]. *Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology*, 2022, 33(9): 1163-1169. (in Chinese)
- [66] 李闯, 马晓莉, 文志萍, 等. 香青兰总黄酮对心肌缺血再灌注损伤大鼠氧化应激和线粒体的保护作用[J]. *中成药*, 2022, 44(2): 390-395.
- LI C, MA X L, WEN Z P, et al. Protective effects of *Dracocephalum moldavica* total flavonoids on oxidative stress and mitochondria in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2022, 44(2): 390-395. (in Chinese)
- [67] 杨娴, 阮金兰. 鸡血莲黄酮通过调节 AMPK/Sirt1/NF- κ B 信号通路改善小鼠非酒精性脂肪肝的实验研究[J]. *中医药导报*, 2021, 27(4): 10-14.
- YANG X, RUAN J L. Experimental study on the improvement of non-alcoholic fatty liver in mice with flavone of *Jixuelian* (*Pronephrium penangianum*) by regulating the AMPK/Sirt1/NF- κ B signaling pathway[J]. *Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacology*, 2021, 27(4): 10-14. (in Chinese)
- [68] 郭文帆, 杨学钰, 郑雪君, 等. 茶黄素调节 AMPK/SIRT1/NF- κ B 信号通路对膝骨关节炎大鼠的治疗作用[J]. *河北医学*, 2023, 29(1): 42-49.
- GUO W F, YANG X Y, ZHENG X J, et al. Therapeutic effect of theaflavins modulation of AMPK/SIRT1/NF- κ B signaling pathway in rats with knee osteoarthritis[J]. *Hebei Medicine*, 2023, 29(1): 42-49. (in Chinese)
- [69] 时延龙, 周鹏, 王雪凯, 等. 栀子苷通过 AMPK/SIRT1/NF- κ B 通路调节乳腺癌细胞增殖、焦亡和侵袭[J]. *广西医科大学学报*, 2022, 39(11): 1700-1705.
- SHI Y L, ZHOU P, WANG X K, et al. Regulation of geniposide on the proliferation, pyroptosis and invasion of breast cancer cells through AMPK/SIRT1/NF- κ B pathway[J]. *Journal of Guangxi Medical University*, 2022, 39(11): 1700-1705. (in Chinese)

Protective Mechanism of Bamboo Leaf Flavonoids on Hydrogen Peroxide-Induced Pyroptosis of Bovine Mammary Epithelial Cells Was Discussed Based on Silent Information Regulator 1/p65 Pathway

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

(1. Beijing Key Laboratory of Dairy Cow Nutrition, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; 2. Beijing Sunlon Livestock Development Co., Ltd., Beijing 100176, China)

Abstract: This study aimed to explore the mechanism by which bamboo leaf flavonoids (BLF) pretreatment alleviates pyroptosis in bovine mammary epithelial cells (bMECs) induced by hydrogen peroxide (H_2O_2). bMECs were used as the research subjects, and control group, BLF group, H_2O_2 group, BLF+ H_2O_2 group, BAY 11-7082+ H_2O_2 group, BLF+BAY 11-7082+ H_2O_2 co-treatment group, EX 527+ H_2O_2 group and BLF+EX 527+ H_2O_2 co-treatment group were set up in this experiment. BLF was administered at a concentration of 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and H_2O_2 was used at 800 $\mu\text{mol}/\text{L}$. BAY 11-7082 and EX 527 were used to inhibit the expression of p65 and silent information regulator 1 (SIRT1), respectively. Gene and protein expression levels in the cells were detected using PCR and Western Blot. The number of pyroptotic cells was determined by flow cytometry. The fluorescence intensity of apoptosis-associated speck-like protein (ASC) spots was detected by immunofluorescence to observe the role of the SIRT1/p65 pathway in BLF-mediated alleviation of H_2O_2 -induced bMECs pyroptosis. The results showed as follows: 1) p65 mRNA and protein expression levels were significantly increased in H_2O_2 -induced bMECs pyroptosis ($P < 0.05$), and significantly decreased following BLF treatment ($P < 0.05$). BLF and BAY 11-7082 significantly inhibited p65 expression and nuclear translocation ($P < 0.05$), effectively alleviating bMECs pyroptosis. The expression levels of pyroptosis-related genes and proteins in bMECs were significantly reduced by BLF and BAY 11-7082 ($P < 0.05$), as well as the fluorescence intensity of ASC spots was reduced. 2) SIRT1 mRNA and protein expression levels were significantly decreased in H_2O_2 -induced bMEC pyroptosis ($P < 0.05$), and significantly increased following BLF treatment ($P < 0.05$). EX 527 significantly inhibited SIRT1 expression, while promoted p65 expression and nuclear translocation ($P < 0.05$). EX 527 also significantly increased the expression levels of pyroptosis-related genes and proteins in bMECs ($P < 0.05$), and enhanced ASC spots fluorescence intensity. In summary, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BLF alleviates H_2O_2 -induced bMECs pyroptosis and NLRP3 inflammasome activation by inhibiting p65 expression and nuclear translocation. SIRT1 expression is downregulated in H_2O_2 -induced bMEC pyroptosis, and BLF alleviates bMECs pyroptosis by upregulating SIRT1 expression, thereby inhibiting p65 expression and exerting a protective effect on the cells. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2024, 36(9):5949-5969]

Key words: bamboo leaf flavonoids; NLRP3 inflammasome; bovine mammary epithelial cells; pyroptosis

* Corresponding authors: GUO Gang, senior livestock specialist, E-mail: guogang2180@126.com; JIANG Linshu, professor, E-mail: jls@bua.edu.com (责任编辑 管景颖)