

胡椒碱缓解LPS/Nigericin诱导巨噬细胞炎症的机制

杨贵贵^{1,2}, 郭锐², 谢静^{1,2}, 蒋胜男², 吴桂苹³, 谷风林³, 吕生辉^{4*}, 张迹^{1,2*}

(1. 新疆农业大学食品科学与药学院, 新疆乌鲁木齐 830052) (2. 淮阴师范学院生命科学院, 江苏淮安 223300)
(3. 中国热带农业科学院香料饮料研究所, 海南海口 571151) (4. 广东省中医院海南医院, 海南海口 570311)

摘要: 胡椒碱 (Piperine) 具有抗炎等多种生物活性, 但其抗炎作用机制尚未完全阐明。该研究基于小鼠永生生化骨髓源巨噬细胞 (iBMDM) 炎症模型和转录组测序分析, 从转录组水平上对胡椒碱抗炎的作用机制进行了阐释。研究结果表明, 胡椒碱在供试浓度范围内对 iBMDM 无毒性作用, 10 $\mu\text{mol/L}$ 的胡椒碱能显著抑制细胞炎症因子 IL-1 β 的释放 ($P<0.05$)。转录组测序结果显示, 胡椒碱处理分别显著上调了 35 个和下调了 11 个基因的表达水平。GO 富集分析显示, 响应胡椒碱处理的差异表达基因主要富集于生物调节和代谢等生物过程以及细胞结合、催化、转录调节等分子功能。KEGG 富集分析表明, 差异表达基因显著富集于 NOD 样受体信号通路和钙信号通路等炎症相关通路。Reactome 富集分析表明, 差异表达基因显著富集于 P2X7 介导的跨膜通道、NLRP3 炎症小体、P2X7 介导的胞内钾离子 (K^+) 流失等炎症相关通路。该研究结果从转录组水平上阐述了胡椒碱通过多靶点、多通路发挥抗炎作用的机制, 为进一步更全面地理解胡椒碱抗炎作用的分子机制提供了依据。

关键词: 胡椒碱; 抗炎; 永生生化骨髓源巨噬细胞; 转录组

文章编号: 1673-9078(2025)11-10-18

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.11.1168

The Mechanisms Underlying the Alleviating Effect of Piperine against LPS/Nigericin-induced Inflammation in iBMDM

YANG Guigui^{1,2}, GUO Rui², XIE Jing^{1,2}, JIANG Shengnan², WU Guiping³, GU Fenglin³, LYU Shenghui^{4*}, ZHANG Ji^{1,2*}

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

(2.School of Life Sciences, Huaiyin Normal University, Huaian 223300, China)

(3.Spice and Beverage Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571151, China)

(4.Hainan Hospital of Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Haikou 570311, China)

Abstract: Piperine exhibits various biological activities, including anti-inflammatory properties, but its anti-inflammatory mechanisms has not yet been completely elucidated. In this study, the anti-inflammatory mechanisms of piperine were elucidated at the transcriptome level based on the inflammation model of immortalized bone marrow-derived macrophages (iBMDM) of mice and transcriptome sequencing analysis. The research results revealed that piperine had no toxic effect on iBMDM within the tested concentrations, and piperine (10 $\mu\text{mol/L}$) significantly inhibited the release of inflammatory factor IL-1 β ($P<0.05$). Transcriptome sequencing results indicate that piperine significantly up-regulated the expression levels of 35 genes and down-regulated the expression levels of 11 genes. Gene Ontology (GO) function enrichment analysis indicated that the differentially expressed genes

引文格式:

杨贵贵,郭锐,谢静,等.胡椒碱缓解LPS/Nigericin诱导巨噬细胞炎症的机制[J].现代食品科技,2025,41(11):10-18.

YANG Guigui, GUO Rui, XIE Jing, et al. The mechanisms underlying the alleviating effect of piperine against LPS/Nigericin-induced inflammation in iBMDM [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(11): 10-18.

收稿日期: 2024-08-08; 修回日期: 2024-11-12; 接受日期: 2024-11-15

基金项目: 海南省重点研发计划项目 (ZDYF2024XDNY177)

作者简介: 杨贵贵 (1997-), 女, 硕士, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 1720913654@qq.com

通讯作者: 吕生辉 (1979-), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 中西医结合治疗肛肠疾病, E-mail: hyfzy1325@hainmc.edu.cn; 共同通讯

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

(DEGs) in response to the piperine treatment were predominantly enriched in biological processes such as bioregulation and metabolism, along with molecular functions including cell binding, catalysis, transcriptional regulation. The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signaling pathway enrichment analysis showed that DEGs were significantly enriched in inflammation-related pathways, such as the NOD-like receptor signaling pathways and calcium signaling pathways. Reactome enrichment analysis showed the significant enrichment of DEGs in inflammatory response-related pathways, including P2X7-mediated transmembrane channels, NLRP3 inflammasomes, and P2X7-mediated intracellular potassium efflux. The results of this study elaborate the mechanisms underlying piperine's multi-target multi-pathway anti-inflammatory effect at the transcriptome level, providing a basis for further more comprehensive understanding of the molecular mechanisms underlying piperine's anti-inflammatory effect.

Key words: piperine; anti-inflammatory; iBMDM; RNA-seq

胡椒 (*Piper nigrum*) 为胡椒科 (Piperaceae) 胡椒属 (Piper) 多年生木质藤本植物, 是我国卫生部门第一批公布的具有药食同源作用的植物^[1]。目前, 我国胡椒的种植区主要集中在海南省, 产量可达全国的90%以上^[2]。胡椒碱 (Piperine) 是从胡椒中提取出来的一种对人体健康有益的生物碱, 其不同品种胡椒中的品质^[3]和风味也不尽相同^[4]。在白胡椒中, 胡椒碱的含量约为3.2%^[5]。研究表明, 胡椒碱具有抗炎^[6]、抗氧化^[7]、抗肿瘤^[8]、抗血管生成^[9]、抗糖尿病^[10]、抗肥胖^[11]和免疫调节^[12]以及神经保护^[13]等广泛的生理活性。

胡椒碱具有良好的抗炎效果, Chen等^[14]研究表明, 胡椒碱可以降低小胶质细胞BV2中肿瘤坏死因子 (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α)、白细胞介素1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素6 (Interleukin-6, IL-6) 等炎症因子的表达水平。另一项研究显示胡椒碱降低了LPS和三磷酸腺苷 (Adenosine Triphosphate, ATP) 诱导 iBMDM 的焦亡和 IL-1 β 的释放^[15]。Ying等^[16]研究表明胡椒碱可以通过 NF- κ B 通路缓解 LPS 刺激的 RAW264.7 炎症细胞。胡椒碱可通过调节 PI3K/AKT 和 STAT3 信号通路, 促进 AMPK 蛋白激酶的激活并抑制 NLRP3 炎症小体的激活, 改善运动性骨骼肌损伤^[17], 抑制胃癌细胞增殖^[18], 改善狼疮性肾炎^[19]。最近研究表明, 胡椒碱还可通过调节 TLR4/IRAK1/NF- κ B 信号通路, 保护肝脏免受缺血性损伤^[20]。这些研究均显示了胡椒碱具有显著的抗炎作用, 但未能较全面地揭示胡椒碱抗炎的作用机制。

转录组测序是基于新一代高通量测序技术全面解析样本中各基因的转录水平的研究策略。基于转录组测序数据, 通过比较组间基因的转录水平筛选响应实验处理的差异表达基因, 再借助一定的生物信息学分析, 可全面深入地解析相关因子的作用靶点及代谢通路等作用机制, 在保健食品功能评价和药理学研究中被广泛应用^[21]。目前, 关于胡椒碱抗炎转录组学分析的研究鲜有报道。本文采用 LPS 和尼日利亚菌素联合诱导 iBMDM 建立炎症模型, 借助 RNA-seq 分析, 从转录组水平上深入研究炎症细胞响应胡椒碱处理的差

异表达基因, 进而阐明胡椒碱抗炎作用的靶点及信号通路, 更加全面和深入地阐述胡椒碱抗炎的药理机制。本文研究结果有助于全面理解胡椒碱的抗炎活性, 为胡椒相关产品的应用开发提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

胡椒碱, 纯度 $\geq 98\%$ (HPLC), 购自上海源叶生物科技有限公司; RPMI1640 培养基、青-链霉素 (AB)、胎牛血清 (FBS) 等购自 Invitrogen Gibco; 二甲基亚砜 (DMSO)、台盼蓝、Trizol Reagent 等购自 Sigma-Aldrich; 噻唑蓝 (3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide, MTT) 购于德国 BioFRoxx 公司; IL-1 β 酶联免疫吸附测定试剂盒购于 Elabscience; 其他常规试剂均为普通分析纯试剂。

1.2 主要仪器与设备

细胞 CO₂ 培养箱 (HERACELL 150i), Thermo Fisher Scientific; 倒置生物显微镜 (IX71), Olympus; 低温高速离心机 (5414R), Eppendorf; RT-qPCR 仪 (CPX connect), Bio-Rad; Nanodrop (NanoDrop One), Thermo Fisher Scientific; 凝胶成像系统 (5200 multi), 上海天能科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞传代培养

从液氮取出冻存的 iBMDM, 快速融化, 酒精消毒后转移至预先加有含 10 wt.% FBS 和 1 wt.% AB 的 DMEM 培养基的细胞培养瓶内, 置于细胞培养箱中, 在 37 °C、 $\varphi=5\%$ CO₂ 的条件下静置培养, 细胞贴壁后换液。当细胞贴壁生长至培养瓶面积的 80% 左右时, 弃去培养基, 再用新鲜培养基将细胞吹打重悬后按 1:3~1:5 的比例进行传代培养, 约 2~3 d 传代一次。连续传代三次, 待细胞状态稳定后方可进行后续实验。

表 1 本文所用RT-qPCR引物
Table 1 Primers used for the RT-qPCR analysis in this study

基因 ID	正向引物	反向引物
<i>GAPDH</i>	CCATCTTCCAGGAGCGAGAC	GGTCATGAGCCCTTCCACAA
<i>Gfi1b</i>	AGCGGGAGATGTTGCTGAAC	TGGAGAACACCTTGTTGCACT
<i>Cxcr2</i>	ATGCCACTCAGAGAACCTGG	CAGGGTTGAGCCAAAAGTCC
<i>Tnxb</i>	AATCCTCGCACTCTGCAACA	CGGCACCCATTTGACTTTGG
<i>Panx1</i>	GTATTGCCGTGGGTCTACCT	GCAGGTACAGGAGTATGGCA

1.3.2 细胞存活率测定

将 iBMDM 以每孔 8×10^4 个细胞的密度接种于 96 孔细胞培养板中，过夜培养。采用系列浓度胡椒碱（0、25、50、100、200、400 $\mu\text{mol/L}$ ）处理细胞 24 h。MTT 法检测细胞的存活率：弃去培养基，每孔加入 0.5 g/L 的 MTT 溶液 100 μL ，置于 CO_2 培养箱中孵育 4 h，每孔加入 100 μL 的终止液后置于培养箱中继续温育约 16 h。酶标仪于 550 nm 处检测各孔的吸光值。每个处理设置 3 个复孔，各减去空白孔吸光值后，取平均值，以对照组为基准计算各组细胞相对存活率。

1.3.3 细胞炎症因子IL-1 β 释放量测定

细胞以每孔 3.5×10^5 个接种于 24 孔板，过夜培养。终质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 诱导预处理 3 h，再分别加入 5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 的胡椒碱预处理细胞 30 min 后，再用 10 $\mu\text{mol/L}$ 尼日利亚菌素处理 30 min，诱导 NLRP3 炎症小体组装活化。实验设置未经胡椒碱预处理的模型组以及既不用胡椒碱预处理也未加诱导剂的普通对照组，每组设三个重复。细胞处理结束后取上清培养液，采用 ELISA 试剂盒，按照说明书步骤检测细胞炎症因子 IL-1 β 的释放量。

1.3.4 细胞转录组测序

取对数生长期的细胞，新鲜培养基重悬后，按每孔 2.5×10^6 个细胞的接种量将细胞接种入皿中，过夜培养。实验设置模型组（M）和胡椒碱处理组（H），每组 3 个重复。所有实验组细胞经 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 诱导处理 6 h 后，胡椒碱处理组细胞用新鲜培养基配制的 10 $\mu\text{mol/L}$ 胡椒碱处理 30 min，模型组则加入相应体积的新鲜培养基。再用 10 $\mu\text{mol/L}$ 尼日利亚菌素诱导 NLRP3 炎症小体组装活化，处理 30 min 后弃去培养液，用预冷的 PBS 漂洗 2 次。采用 TRizol 法，按说明书步骤提取各细胞样品总 RNA。RNA 样品经琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 检测合格后，反转录合成 cDNA。按 Illumina 测序平台要求构建 cDNA 测序文库，并使

用 Qubit 和 Agilent 2100 分别检测文库浓度与文库片段长度，控制 cDNA 测序文库的质量浓度范围在 0.1~50 ng/ μL ，片段长度大小范围在 25~1 000 bp 之间。即为库检合格后，利用 Illumina HiSeq2500 平台，以 2 $\times$ 150 bp 双端测序模式进行高通量测序。该转录组测序分析由广州基迪奥生物科技有限公司完成。

1.3.5 生物信息学分析

采用 Fastp 法对原始测序数据进行过滤，去除原始数据（Raw Reads）中带接头的 reads，以及全部都是 A 的、碱基的含 N 比例大于 10% 的质量和值 $Q\leq 20$ 的碱基数占整条 read 50% 以上的低质量 reads，获得高质量的 Clean Data，以保证后续信息分析的质量。使用 HISAT2 软件将质控后的 Clean Data 与参考基因组^[22]进行比对，再利用 Stringtie 对已知基因和转录本进行注释和定量。比较模型组和胡椒碱处理组两个基因之间的转录水平，分析两组间的差异表达基因（Differential Expressed Genes, DEGs），DEGs 的筛选条件为 $|\log_2(\text{fold change})|>1.5$ ， $P<0.01$ 。分别对筛选出的 DEGs 进行 GO（Gene Ontology）、KEGG（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes）信号通路和 Reactome 生物分子通路富集分析。

1.3.6 mRNA表达量分析（RT-qPCR）

将处于对数生长期的细胞接种于 6 孔板中，过夜培养。用 10 $\mu\text{mol/L}$ 的胡椒碱预处理 30 min，加入 LPS 处理 6 h。细胞处理结束后采用 Trizol 法提取细胞总 RNA。按试剂盒说明书步骤将 RNA 反转录成 cDNA 后，以 GAPDH 为内参基因，对目标基因 mRNA 的相对表达量进行实时荧光定量分析。RT-qPCR 所用引物（表 1）由生工生物工程（上海）有限公司合成。

1.4 数据处理与统计分析

部分图片采用 GraphPad Prism 9.5 软件进行绘制与统计分析，结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。采用 ANOVA 方差分析， $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 胡椒碱对iBMDM活力的影响

本研究采用 MTT 法评价了胡椒碱对 iBMDM 活力的影响。结果如图 1 所示,在本实验所有测试浓度下,细胞存活率均在 100% 以上,其中,胡椒碱浓度在 200 $\mu\text{mol/L}$ 时的细胞相对存活率为 114.10%,表明胡椒碱浓度在 400 $\mu\text{mol/L}$ 以内对细胞活力均无抑制作用,且在一定程度上提高了细胞的活力水平。该结果表明,胡椒碱浓度在 400 $\mu\text{mol/L}$ 以内时对 iBMDM 没有毒性,可以在该浓度范围内开展后续实验。

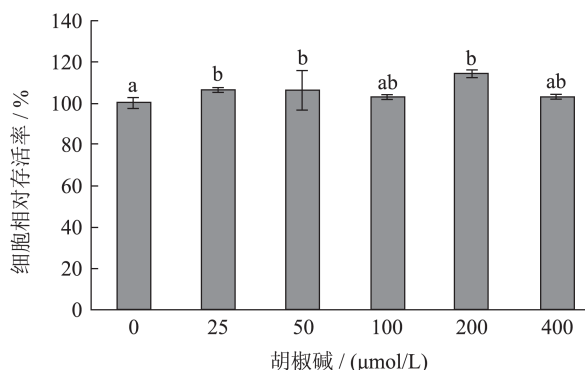


图 1 胡椒碱对 iBMDM 存活率的影响

Fig.1 Effects of piperine on cells viability of iBMDM

注: b 代表与对照组有显著性差异 ($P < 0.05$), ab 代表与对照组无显著性差异。

2.2 胡椒碱对iBMDM炎症因子IL-1 β 释放量的影响

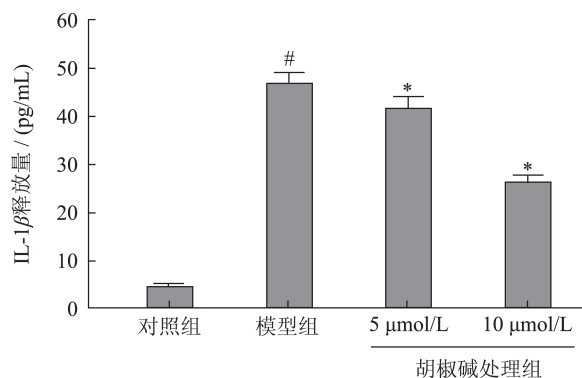


图 2 胡椒碱对细胞炎症因子 IL-1 β 释放量的影响

Fig.2 Effects of piperine on the release of cell inflammation cytokine IL-1 β

注: # 代表与对照组有显著性差异 ($P < 0.05$), * 代表与模型组有显著性差异 ($P < 0.05$)。

iBMDM 经 LPS 和尼日利亚菌素联合诱导后会激

活 NLRP3 炎症小体,释放 IL-1 β 等炎症因子,进而产生显著的炎症反应。IL-1 β 的释放量能够反映细胞的炎症水平,因此,为了验证胡椒碱的抗炎活性,本研究采用 ELISA 法检测了细胞 IL-1 β 的释放量。如图 2 所示,对照组 IL-1 β 的释放量约为 3.57 pg/mL ,相较于对照组,模型组细胞经 LPS 和尼日利亚菌素诱导后,IL-1 β 的释放量急剧增加,达到 47.09 pg/mL ,表明细胞炎症模型构建成功。相较于模型组,细胞经 5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 胡椒碱处理后的 IL-1 β 的释放量分别为 41.84 pg/mL 和 26.50 pg/mL ,呈剂量依赖性下降,且差异显著。该结果表明胡椒碱处理能够显著逆转 LPS 和尼日利亚菌素联合诱导的细胞炎症水平。

2.3 iBMDM转录组测序分析

2.3.1 细胞总RNA提取及建库测序

以 LPS 诱导的 iBMDM 炎症模型经 10 $\mu\text{mol/L}$ 胡椒碱预处理后,用 TRizol 试剂提取了各组细胞的总 RNA。如图 3 所示,琼脂糖凝胶电泳检测显示各组细胞总 RNA 样品条带清晰,表明各样本 RNA 提取完整。进一步对各 RNA 样品质量浓度和纯度的检测显示 RNA 完整性 $\text{RIN} \geq 6.5$, RNA 质量浓度 $\geq 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 均介于 1.8~2.2 之间,符合建库测序的质量要求,遂进行后序的反转录和建库测序。

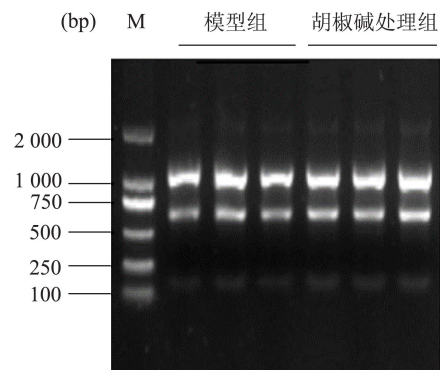


图 3 细胞总 RNA 样品琼脂糖凝胶电泳检测图谱

Fig.3 Agarose gel electrophoresis assay of total RNA samples from cells

2.3.2 测序数据处理及统计

原始测序数据经过滤后,进一步分析了碱基的组成及质量分布。6 个样本质控序列 (Clean data) 中 Q30 碱基百分比 $\geq 94.13\%$, GC 碱基所占比例 $\geq 48.82\%$ 。将 Clean data 与参考基因组进行序列比对,单个映射在 90.79%~91.26%,总映射在 95.91%~96.23%。具体数据见表 2。

表 2 测序数据质量分析
Table 2 Sequence data quality analysis

组别	序列总数	没有映射/%	单个映射/%	多个映射/%	总映射/%
M1	40 803 672	1 538 791 (3.77%)	37 232 050 (91.25%)	2 032 831 (4.98%)	39 264 881 (96.23%)
M2	41 662 666	1 679 785 (4.03%)	37 883 100 (90.93%)	2 099 781 (5.04%)	39 982 881 (95.97%)
M3	47 438 686	1 939 504 (4.09%)	43 071 513 (90.79%)	2 427 669 (5.12%)	45 499 182 (95.91%)
H-10 ⁻¹	41 004 190	1 661 919 (4.05%)	37 274 279 (90.90%)	2 067 992 (5.04%)	39 342 271 (95.95%)
H-10 ⁻²	46 824 878	1 785 203 (3.81%)	42 732 326 (91.26%)	2 307 349 (4.93%)	45 039 675 (96.19%)
H-10 ⁻³	49 225 670	1 992 820 (4.05%)	44 704 457 (90.82%)	2 528 393 (5.14%)	47 232 850 (95.95%)

2.3.3 差异基因筛选及数量统计

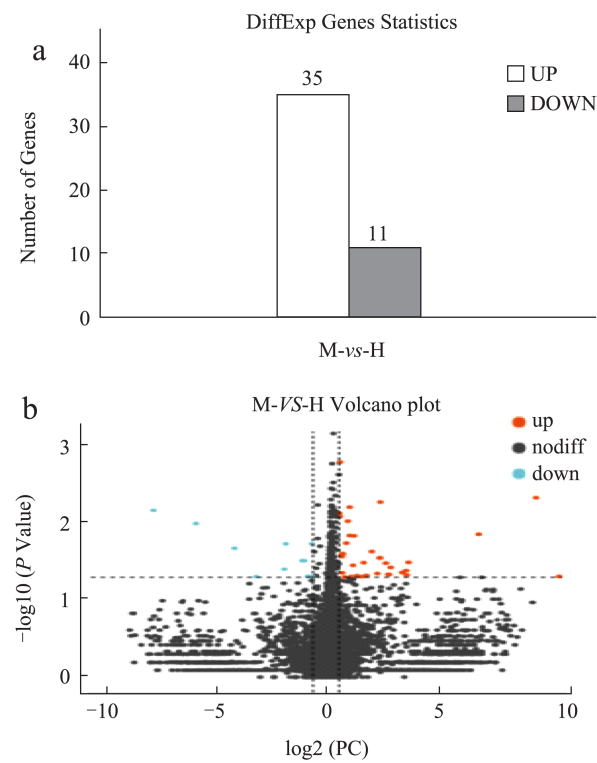


图 4 响应胡椒碱处理的差异表达基因统计分析
Fig.4 Statistical analysis of differentially expressed genes
response to piperine treatment

注：图 a：差异表达基因数量统计图；图 b：差异表达基因统计火山图。

基于上述转录组测序结果，对比胡椒碱处理组和模型组间各基因的表达量，使用 Deseq2 软件，以 $P < 0.05$ ， $\log_2FC$ (Fold change) $> \log_2(1.5)$ 为条件筛选差异表达基因。结果如图 4 所示，共计筛选出 46 个响应胡椒碱处理的差异表达基因。与模型组相比，胡椒碱处理组有 35 个基因表达水平上调，11 个基因表达水平下调。

2.3.4 差异表达基因聚类分析

对 46 个差异表达基因进行聚类分析显示（图 5），响应胡椒碱处理的差异表达基因在模型组和胡椒碱处理组各重复样本间基本聚类成簇，表明胡椒碱对 LPS 诱导的 iBMDM 中相关基因表达水平的影响具有较好的重复性，差异表达基因可以用于后续进一步的生物信息学分析。

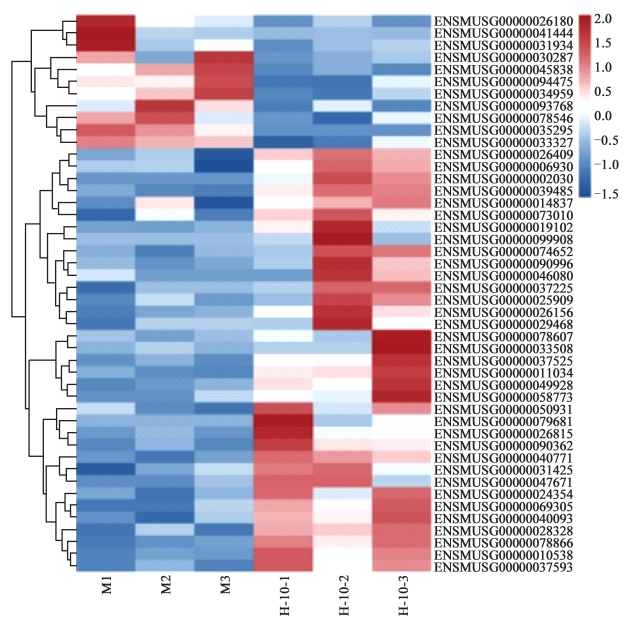


图 5 差异表达基因聚类分析热图
Fig.5 Heat map of cluster analysis of differentially expressed genes

2.3.5 差异表达基因GO富集分析

GO 是一个国际化的基因功能分类体系，提供了一套动态更新的标准词汇表（Controlled Vocabulary）来全面描述生物体中基因和基因产物的属性。GO 包含生物过程（Biological Process, BP）、细胞组分（Cellular Component, CC）和分子功能（Molecular Function, MF）三个亚群。本研究对响应

胡椒碱处理的差异表达基因进行的 GO 功能富集结果显示（图 6），胡椒碱调控的基因主要富集在细胞过程、生物调节、生物调控、生物结合、生物信号、生物过程积极调节、代谢过程等生物过程。而在分子功能方面，差异基因主要富集于结合以及催化、转录调节、分子转导、结构分子和分子功能调节等活性条目。在细胞组分上，差异表达基因仅富集于细胞解剖实体物和蛋白质复合物两个条目。GO 富集结果表明胡椒碱能够通过靶向调控差异基因表达水平，调控上述富集的一系列分子功能和生物过程参与细胞的炎症反应调节，进而发挥其抗炎作用。

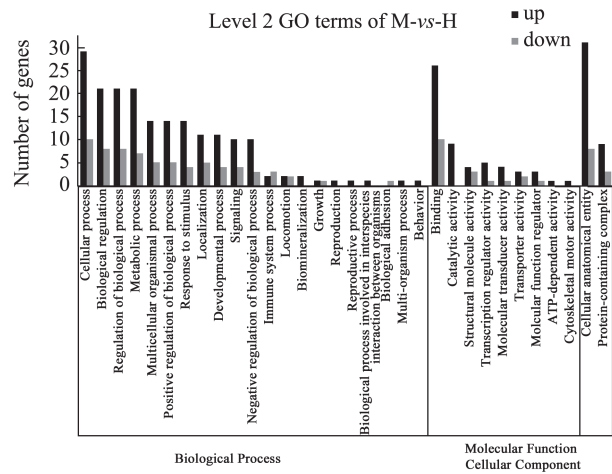


图 6 差异表达基因 GO 富集分析柱形图

Fig.6 GO enrichment analysis of differentially expressed genes

2.3.6 差异表达基因KEGG通路富集分析

为了进一步深入分析胡椒碱抗炎过程中所调节的信号通路，本文对响应胡椒碱处理的差异表达基因进行了 KEGG 通路富集分析。KEGG 富集数目统计图（图 7a）显示差异表达基因主要富集于代谢、环境信息过程、有机体系统和人类疾病等四个层面的相关信号通路，其中显著富集的前 20 条通路及其所包含的差异表达基因比例列于图（7b）。如图 7b 所示，响应胡椒碱处理的差异表达基因显著富集于 NOD 样受体信号通路、钙信号通路、系统性红斑狼疮、苯丙氨酸代谢、甘露糖型 O 型聚糖生物合成、人类巨细胞病毒感染等信号通路。

NLRP3（NLR 家族，Pyrin 域蛋白 3）炎性小体是一个多蛋白复合物^[23]。NLRP3 炎症小体是人体免疫系统的一个重要组分，在维持人体免疫功能方面起着不可忽视的作用，在细胞损伤时，介导 Caspase-1 激活和促炎细胞因子 IL-1 β /IL-18 的成熟和分泌^[24]。研究表明，NLRP3 炎症小体的过度活化与多种炎症性疾病相关，如关节炎^[25]、结肠炎^[26]、阿尔兹海默症^[27]、直肠癌^[28]和神经退行性疾病^[29]等。iBMDM 是目前常用

的炎症细胞之一，可由 LPS 或 ATP 刺激产生炎症反应^[30]。LPS 会与 Toll 样受体结合激活下游 NF- κ B 信号通路，加剧炎症反应，激活 NLRP3 炎症小体，引起多种促炎性细胞因子（IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等）的释放。响应胡椒碱处理的差异表达基因显著富集于 NOD-like 受体信号通路表明胡椒碱能够通过抑制 NLRP3 炎症小体的过度激活，抑制细胞的炎症反应发挥抗炎作用。已有研究也表明胡椒碱可以抑制 LPS 引起的炎症反应，降低促炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-18、IL-6 和 TNF- α 的表达水平^[31]。

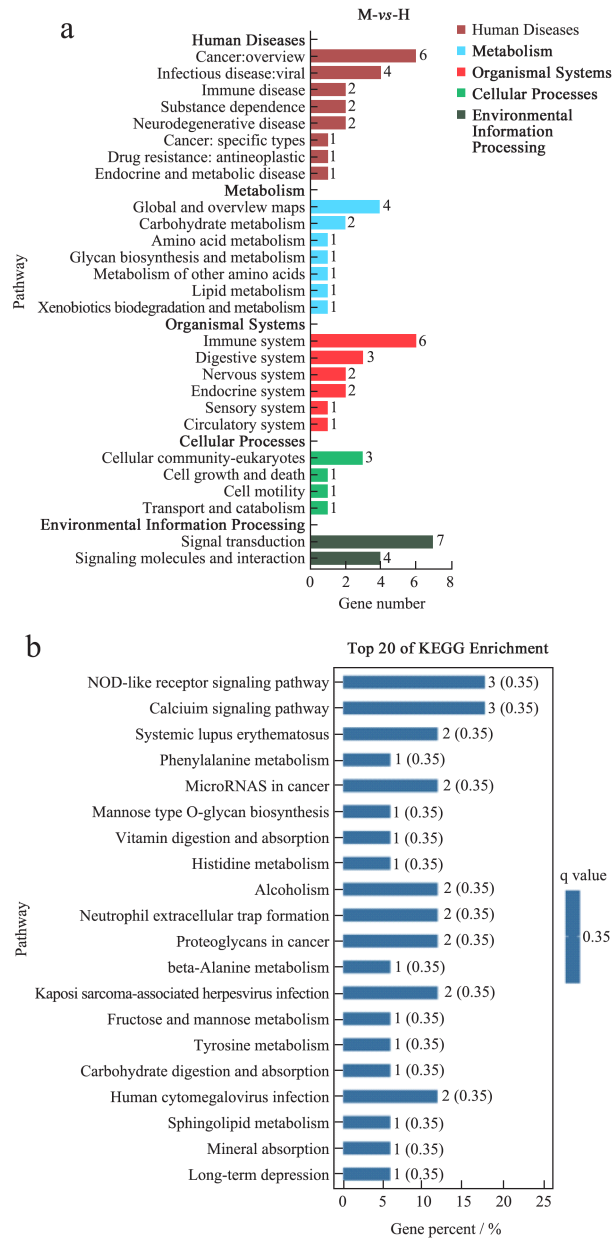


图 7 差异表达基因 KEGG 通路富集分析

Fig.7 KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed genes

注：图 a：KEGG 通路富集数目统计图；图 b：KEGG 显著富集 Top20 通路条形图。

从 KEGG 的 Top 信号通路（图 7b）可见差异表达基因还显著富集于钙信号通路。 Ca^{2+} 是一种重要的矿物质元素，其作为第二信使参与细胞的生长、分化和代谢等诸多重要的生物功能，对肌体健康起着至关重要的作用^[32]。细胞外 Ca^{2+} 浓度增加会通过 G 蛋白偶联受体激活 NLRP3 炎症小体，从而诱导产生更多的促炎性细胞因子 IL-1 β ^[33]。 Ca^{2+} 内流也可参与 NLRP3 炎症小体的组装和活化，激活促炎性细胞因子，进而促进炎症的发生和发展。研究表明^[34]， Ca^{2+} 是 NLRP3 炎症小体的关键调节因子，对 NLRP3 炎症小体的组装起到关键作用。细胞质 Ca^{2+} 增加和线粒体 Ca^{2+} 摄取过量也是导致细胞 NLRP3 炎症小体过度激活的主要原因^[33]。显然，钙信号通路与 NLRP3 有关的炎症反应密切相关，也参与了胡椒碱抗炎作用的细胞信号通路调节^[35]。

2.3.7 差异表达基因Reactome通路富集分析

在 KEGG 信号通路富集的基础上，该文对响应胡椒碱处理的差异表达基因进行了进一步的 Reactome 通路富集分析。从显著富集的 Top20 通路图上看（图 8），在 Reactome 通路富集分析中，响应胡椒碱处理的差异表达基因显著富集于 P2X7 调节包括泛连接蛋白 1 在内的膜孔、NLRP3 炎症小体、细胞质 Ca^{2+} 水平升高、炎症因子、细胞衰老、P2X7 介导细胞内损失钾离子（ K^{+} ）、核苷酸结合域、富含亮氨酸的重复序列包含受体信号通路。其中 NLRP3 炎症小体以及炎症小体通路和 Ca^{2+} 相关通路的显著富集与 KEGG 信号通路的富集分析结果一致，再次表明这些通路与胡椒碱抗炎作用密切相关。

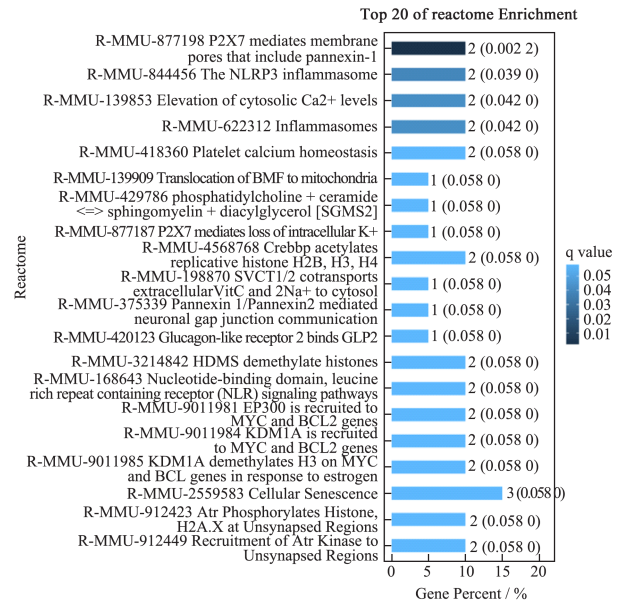


图 8 差异表达基因 Reactome 富集分析条形图

Fig.8 Reactome enrichment analysis bar chart of differentially expressed genes

P2X7 调节包括泛连接蛋白在内的膜孔通路在 Reactome 富集分析中被显著富集，表明 P2X7 及其调节跨膜通道这一通路可能参与胡椒碱抗炎作用。嘌呤能 P2X7 受体（P2X7R）泛连接蛋白-1（Pannexin-1）是跨膜通道蛋白，对 ATP 具有较好的通透性，是细胞外的 ATP 传感器，ATP 从坏死细胞中释放，可诱导促炎细胞因子的产生和巨噬细胞死亡^[36]。最近的研究表明，P2X7R 在共培养中参与 IL-1 β 的分泌，尤其是在纳米颗粒暴露的情况下，炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 的分泌比单培养的要高^[37]。上述研究显示 P2X7 与 Ca^{2+} 浓度调控以及炎症因子的释放密切相关。此外，P2X7 调节胞内 K^{+} 外流通路也被显著富集，表明胡椒碱对炎症细胞中 P2X7 调节的跨膜通道对 K^{+} 外流也有显著影响。细胞内 K^{+} 的流失能够激活 NLRP3 炎症小体，进而诱发一系列的炎症反应^[38]。该信号通路的显著富集表明其在胡椒碱抗炎作用中也发挥了重要的调控作用。

2.3.8 差异基因RT-qPCR验证

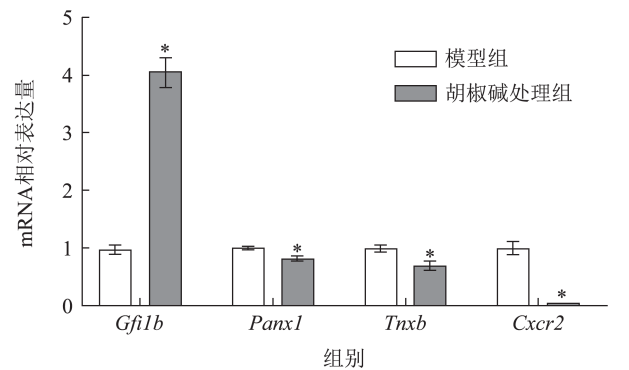


图 9 代表性差异表达基因 mRNA 表达水平定量分析

Fig.9 Quantitative analysis of representative DEGs mRNA expression levels by RT-qPCR

注：* 代表与模型组有显著性差异（ $P < 0.05$ ）。

为了验证转录组测序结果的准确性，在差异表达基因中选取了 4 个具有代表性的基因进行 RT-qPCR 检测分析，分别编码独立生长因子 1B（Growth Factor-independent 1B, Gfi1b）、泛连接蛋白 1（Pannexin 1, Panx1）、肌腱糖蛋白 XB（Tenascin XB, Tnxb）和趋化因子受体 2（CXC Chemokine Receptor 2, Cxcr2）。Gfi1b 为核转录抑制因子，在红细胞生成和分化过程中发挥重要作用，与多种血液系统疾病密切相关^[39]。Panx1 属泛连接蛋白家族成员，是一种非选择性的跨膜通道蛋白，激活后可在细胞膜上形成通道，可释放 ATP、UTP、 K^{+} 、 Ca^{2+} 等胞内物质至胞外，在细胞间的信号传导中发挥重要作用。其释放的胞内物质还可作为炎症介质，诱导炎症反应的发生^[40]。Tnxb 是一

种细胞外基质糖蛋白, 仅在成纤维细胞中表达, 在胶原存在的情况下可以介导纤维化, 起到调节免疫系统的功能, 还可以通过上调转化生长因子- $\beta 1$ (Tgf- $\beta 1$) 和下调过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 改善心肌纤维化^[41]。Cxc2 为 CXC 趋化因子受体 2, 可与 CXC 趋化因子 1 (CXCL1) 结合, 激活 NLRP3 炎症小体, 促进巨噬细胞中的 IL-1 β 产生, 进而促进炎症的发生和发展^[42]。本研究以 GAPDH 为内参, 对以上 4 个基因的 mRNA 转录水平进行了 RT-qPCR 荧光定量分析, 结果如图 9 所示, 与模型组相比, 胡椒碱处理组中 *Gfi1b* 的 mRNA 相对表达水平显著增加 ($P < 0.05$), 而 *Panx1*、*Tnxb* 和 *Cxc2* 的 mRNA 相对表达量则显著降低 ($P < 0.05$)。这些基因 mRNA 表达水平的变化趋势与转录组测序结果基本一致, 表明本研究中的转录组测序结果及相关的研究结论准确可靠。

3 结论

本文基于 LPS 和尼日利亚菌素联合诱导的 iBMDM 炎症模型, 研究了胡椒碱的抗炎作用及机制。结果表明, 胡椒碱在测试浓度范围内对细胞无毒性作用, 并能够显著抑制炎症因子 IL-1 β 炎症因子释放, 表现出了显著的抗炎活性。转录组测序分析结果表明胡椒碱调控了炎症细胞中包括 35 个上调基因和 11 个下调基因在内的 46 个基因的表达水平。对差异表达基因进行进一步的生物信息学分析表明, 胡椒碱能够通过靶向这些差异表达基因调控 NOD 样受体信号通路、钙信号通路、NLRP3 炎症小体以及 P2X7 介导的细胞膜孔和 Ca^{2+} 、 K^{+} 浓度调控等相关信号通路发挥其抗炎作用, 展现了胡椒碱调控“多靶点、多通路”的抗炎作用机制。本文从转录组水平上揭示了胡椒碱的抗炎作用机制, 为全面认识胡椒碱的抗炎活性提供了一定的理论和数据支撑。本研究的不足之处在于生物信息学分析相关结果尚缺乏实验支撑, 有待于进一步深入的实验研究。

参考文献

- [1] IMRAN M, SAMAL M, QADIR A, et al. A critical review on the extraction and pharmacotherapeutic activity of piperine [J]. *Polymers in Medicine*, 2022, 52(1): 31-36.
- [2] 林日甫.海南胡椒产业可持续发展对策探讨[J].*中国热带农业*,2007,3:13-15.
- [3] 李鑫,丁云爽,张超华,等.机械脱皮白胡椒的品质评价及风味分析[J].*现代食品科技*,2023,39(7):268-278.
- [4] 李鑫,谷凤林,胡卫成,等.胡椒低温粉碎粒径与风味品质的变化[J].*现代食品科技*,2023,39(4):240-248.
- [5] 冯真英,李嘉敏,吴春玲,等.HPLC法测定海南产白胡椒中胡椒碱的含量[J].*北方药学*,2022,19(3):12-14.
- [6] BANG J S, OH D H, CHOI H M, et al. Anti-inflammatory and antiarthritic effects of piperine in human interleukin 1 β -stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models [J]. *Arthritis Research and Therapy*, 2009, 11(2): 49.
- [7] QIN B, YANG K, CAO R. Synthesis and antioxidative activity of piperine derivatives containing phenolic hydroxyl [J]. *Journal of Chemistry*, 2020, 2: 1-9.
- [8] SI L, YANG R, LIN R, et al. Piperine functions as a tumor suppressor for human ovarian tumor growth via activation of JNK/p38 MAPK-mediated intrinsic apoptotic pathway [J]. *Bioscience Reports*, 2018, 38: 1-10.
- [9] SUNILA E S, KUTTAN G. *Piper longum* inhibits VEGF and proinflammatory cytokines and tumor-induced angiogenesis in C57BL/6 mice [J]. *International Immunopharmacology*, 2006, 6(5): 733-741.
- [10] ATAL S, AGRAWAL R P, VYAS S, et al. Evaluation of the effect of piperine perse on blood glucose level in alloxan-induced diabetic mice [J]. *Polish Pharmaceutical Society*, 2012, 69(5): 965-969.
- [11] DU Y, CHEN Y, FU X, et al. Effects of piperine on lipid metabolism in high-fat diet induced obese mice [J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 71: 104011.
- [12] PATHAK N, KHANDELWAL S. Cytoprotective and immunomodulating properties of piperine on murine splenocytes: an *in vitro* study [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2007, 576: 160-170.
- [13] HUA S Y, LIU J Y, ZHANG Y W, et al. Piperine as a neuroprotective functional component in rats with cerebral ischemic injury [J]. *Food Science and Nutrition*, 2019, 7: 3443-3451.
- [14] CHEN W S, JIE A, LI J J, et al. Piperine attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses in BV2 microglia [J]. *International Immunopharmacology*, 2017, 42: 44-48.
- [15] LIANG Y D, BAI W J, LI C G, et al. Piperine suppresses pyroptosis and interleukin-1 β release upon ATP triggering and bacterial infection [J]. *Front Pharmacology*, 2016, 7: 390.
- [16] YING X, YU K, CHEN X, et al. Piperine inhibits LPS induced expression of inflammatory mediators in RAW 264.7 cells [J]. *Cell Immunology*, 2013, 285(1-2): 49-54.
- [17] 刘东彪.胡椒活性物质胡椒碱通过PI3K/AKT改善运动性骨骼肌损伤[J].*分子植物育种*,2024,22(5):1654-1662.
- [18] 陈镛,陈美玲,刘瀚予,等.胡椒碱调控STAT3信号通路抑制胃癌的研究机制[J].*陕西科技大学学报*,2022,40(3):74-76.
- [19] PENG X, YANG T, LIU G, et al. Piperine ameliorated lupus nephritis by targeting AMPK mediated activation of NLRP3 inflammasome [J]. *International Immunopharmacology*, 2018, 65: 448-457.
- [20] ZHANG L, KUANG G, GONG X, et al. Piperine attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury via suppressing the TLR4 signaling cascade in mice [J]. *Transplant Immunology*, 2024, 84: 102033.
- [21] 孙洪计,魏慧君.RNA-seq技术在转录组研究中的应用[J].*中外医学研究*,2018,16(20):184-187.

- [22] CHEN S, ZHOU Y, CHEN Y, et al. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor [J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): 884-890.
- [23] DRINKALL S, LAWRENCE C B, OSSOLA B, et al. The two pore potassium channel THIK-1 regulates NLRP3 inflammasome activation [J]. *Glia*, 2022, 70(7): 1301-1316.
- [24] KELLEY N, JELTEMA D, DUAN Y, et al. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation [J]. *International Journal of Molecular Science*, 2019, 20(13): 3328.
- [25] GUO C, FU R, WANG S, et al. NLRP3 inflammasome activation contributes to the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2018, 194(2): 231-243.
- [26] HAUSMANN M, KRAEMER T, Rogler G. Titanium dioxide nanoparticles exacerbate DSS-induced colitis: role of the NLRP3 inflammasome [J]. *Gut*, 2017, 66(7): 1216-1224.
- [27] FENG Y S, TAN Z X, WU L Y, et al. The involvement of NLRP3 inflammasome in the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Ageing Research Reviews*, 2020, 64: 101192.
- [28] VAF AEI S, TAHERI H, HAJIMOMENI Y, et al. The role of NLRP3 inflammasome in colorectal cancer: potential therapeutic target [J]. *Clinical and Translational Oncology*, 2022, 24(10): 1881-1889.
- [29] HOLBROOK J A, JAROSZ-GRIFFITHS H H, CASELEY E, et al. Neurodegenerative disease and the NLRP3 inflammasome [J]. *Front in Pharmacology*, 2021, 12: 643254.
- [30] MEDZHITOV R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame [J]. *Cell*, 2010, 140(6): 771-776.
- [31] 喻婷,吕冬梅,邓浩,等.淫羊藿苷预处理增强人牙周膜干细胞对M1型巨噬细胞的影响[J].*中国组织工程研究*,2024,29:1-8.
- [32] 张雪,陈森,汪小莉,等.LncRNA XR_378418对肝星状细胞生物学行为及转录组学影响[J].*安徽医科大学学报*,2023,59(1):127-131.
- [33] ROSSOL M, PIERER M, RAULIEN N, et al. Extracellular Ca^{2+} is a danger signal activating the NLRP3 inflammasome through G protein-coupled calcium sensing receptors [J]. *Nature Communication*, 2012, 3: 1329.
- [34] SHIN J N, RAO L, SHA Y, et al. P38 MAPK activity is required to prevent hyperactivation of NLRP3 inflammasome [J]. *Journal of Immunology*, 2021, 207(2): 661-670.
- [35] MICHAEL A, KATSNELSON L, GRAHAM R, et al. K^{+} efflux agonists induce NLRP3 inflammasome activation independently of Ca^{2+} signaling [J]. *The Journal of Immunology*, 2015, 194(8): 3937-3952.
- [36] AMARAL E P, RIBEIRO S C, LANES V R, et al. Pulmonary infection with hypervirulent mycobacteria reveals a crucial role for the P2X7 receptor in aggressive forms of tuberculosis [J]. *Plos Pathogens*, 2014, 10(7): 1004188.
- [37] DEKALI S, DIVETAIN A, KOURTULEWSKI T, et al. Cell cooperation and role of the P2X7 receptor in pulmonary inflammation induced by nanoparticles [J]. *Nanotoxicology*, 2013, 7(8): 1302-1314.
- [38] FRANCESCHINI A, CAPECE M, CHIOZZI P, et al. The P2X7 receptor directly interacts with the NLRP3 inflammasome scaffold protein [J]. *The FASEB Journal Research Communication*, 2015, 29(6): 2450-2461.
- [39] THIVAKARAN A, BOTEZATU L, VASSEN L, et al. Gfi1b: a key player in the genesis and maintenance of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome [J]. *Haematologica*, 2018, 103: 614-625.
- [40] ACOSTA M L, GUO C X, MUGISHO O O, et al. Connexin therapeutics: blocking connexin hemichannel pores is distinct from blocking pannexin channels or gap junctions [J]. *Neural Regeneration Research*, 2021, 16(3): 482-488.
- [41] JING L, ZHOU L J, ZHANG F M, et al. Tenascin-x facilitates myocardial fibrosis and cardiac remodeling through transforming growth factor- β 1 and peroxisome proliferator-activated receptor γ in alcoholic cardiomyopathy [J]. *China Medical Journal*, 2011, 124(3): 390-395.
- [42] JIANG S, LI W, SONG M, et al. CXCL1-CXCR2 axis mediates inflammatory response after sciatic nerve injury by regulating macrophage infiltration [J]. *Molecular Immunology*, 2024, 169: 50-65.