

本文引用:李玲,谭洋,汪涛,张熙,肖锦仁,李志忠,裴刚.熊果酸和坡膜酸通过上调乌头酸脱羧酶1表达促进巨噬细胞内毒素耐受作用的研究[J].湖南中医药大学学报,2022,42(11):1837-1842.

熊果酸和坡膜酸通过上调乌头酸脱羧酶1表达促进巨噬细胞内毒素耐受作用的研究

李玲^{1,2},谭洋¹,汪涛¹,张熙³,肖锦仁¹,李志忠^{4*},裴刚^{1,2*}

(1.湖南中医药大学药学院,湖南长沙410208;2.湖南省普通高等学校中药现代化重点实验室,湖南长沙410208;
3.湖南省第二人民医院,湖南长沙410021;4.古汉中药有限公司,湖南衡阳421000)

[摘要] 目的 研究熊果酸(ursolic acid, UA)和坡膜酸(pomolic acid, PA)上调乌头酸脱羧酶1(aconitate decarboxylase 1, IRG1)表达从而促进巨噬细胞内毒素耐受的活性机制。方法 用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激RAW264.7细胞两次构建巨噬细胞内毒素耐受模型;将细胞分为空白对照组、LPS组以及LPS+IRG1过表达组,检测IRG1高表达状态下巨噬细胞在两次LPS刺激下IL-6、TNF- α 的分泌情况;将细胞分为LPS组和不同浓度的UA和PA干预组,检测两次LPS刺激下各组巨噬细胞IL-6、TNF- α 的分泌和IRG1表达情况。结果 过表达IRG1后,与空白对照组相比,LPS组的巨噬细胞在第二次LPS刺激下,IL-6和TNF- α 的分泌均受到抑制($P<0.01$);与LPS组相比,实验所设的LPS+UA和LPS+PA各浓度组均能有效减少巨噬细胞在受到LPS第二次刺激时IL-6和TNF- α 的分泌,并能上调细胞中IRG1蛋白的表达水平($P<0.01$)。结论 UA和PA的干预能够促进巨噬细胞内毒素耐受,且与二者上调细胞中IRG1蛋白表达有关。

[关键词] 巨噬细胞;内毒素耐受;乌头酸脱羧酶1;熊果酸;坡膜酸

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.11.011

Promoting effects of ursolic acid and pomolic acid in endotoxin tolerance of macrophages by up-regulating the expression of aconitate decarboxylase 1

LI Ling^{1,2}, TAN Yang¹, WANG Tao¹, ZHANG Xi³, XIAO Jinren¹, LI Zhizhong^{4*}, PEI Gang^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Key Laboratory of Modern Research of Chinese Material Medica in Hunan Provincial High School, Changsha, Hunan 410208, China;
3. Hunan Second People's Hospital, Changsha, Hunan 410021, China; 4. Guhan Chinese Medicine Limited Company, Hengyang, Hunan 421000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the promoting effects of ursolic acid (UA) and pomolic acid (PA) in endotoxin tolerance of macrophages by up-regulating the expression of aconitate decarboxylase (IRG1). **Methods** Lipopolysaccharide (LPS) was used to stimulate RAW264.7 cells twice to construct macrophage endotoxin tolerance model. Cells were divided into the blank control group, LPS group and LPS+IRG1 overexpression group, and the secretion of IL-6 and TNF- α in macrophages with overexpression of IRG1 under two times of LPS stimulation were detected. Then, the cells were divided into LPS group and UA and PA intervention groups with different concentrations. The secretion of IL-6 and TNF- α and the expression of IRG1 with two times of LPS stimulation were checked. **Results** After the overexpression of IRG1, compared with the control group, the secretion of IL-6 and TNF- α from macrophages in LPS group was inhibited by the second LPS stimulation ($P<0.01$). Compared with LPS group, the

[收稿日期]2022-05-22

[基金项目]国家自然科学基金面上项目(81874424,82174271);湖南中医药大学中药学一流学科;湖南中医药大学2020年博士科研启动基金(202003)。

[第一作者]李玲,女,副教授,硕士研究生导师,研究方向:中药有效成分及作用机制。

[通信作者]*裴刚,男,教授,博士研究生导师,E-mail:hntcmpg@163.com;李志忠,男,主管药师,E-mail:476597964@qq.com。

concentration groups of LPS+UA and LPS+PA set showed significant decrease in the secretion of IL-6 and TNF- α , and increase in the expression level of IRG1 protein in macrophages after the second stimulation of LPS ($P<0.01$). **Conclusion** The intervention of UA and PA could promote endotoxin tolerance of macrophages, and it is related to the up-regulation of IRG1 protein expression in macrophages.

[**Keywords**] macrophages; endotoxin tolerance; aconitate decarboxylase 1; ursolic acid; pomolic acid

巨噬细胞是机体重要的免疫细胞,广泛分布在身体的各个组织中。在不同的病理条件下,巨噬细胞可极化为促炎的 M1 型巨噬细胞(经典活化的巨噬细胞)和抗炎的 M2 型巨噬细胞(替代活化的巨噬细胞)^[1]。抑制巨噬细胞炎症因子表达、促进抗炎细胞因子的分泌,能很好地抑制机体炎症反应,对炎症相关的多种疾病起到良好的治疗作用。

内毒素耐受是指先天免疫细胞(如单核细胞和巨噬细胞)在内毒素[如脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)]长期刺激后,再次接受同类刺激时,细胞炎症反应受到抑制的现象^[2]。内毒素耐受现象存在于多种炎症相关疾病中^[3],被认为是机体受到长期炎症损伤的保护机制。促进内毒素耐受,能够抑制炎症细胞引发的炎症损伤,对脓毒症等多种炎症疾病起到一定的治疗作用。

乌头酸脱羧酶 1(aconitate decarboxylase 1, IRG1)是炎症和感染中免疫代谢的调节因子,在炎症反应、抗菌过程、肿瘤、神经退行性改变等病理状态下,均发现 IRG1 的表达上调^[4-6]。巨噬细胞在病原体相关分子模式(如 LPS)、细胞因子(如 TNF- α 和 IFN- γ)等的刺激下高表达 IRG1^[7]。研究表明,IRG1 可以通过催化衣康酸在巨噬细胞中的积累,抑制 LPS 刺激所导致的氧化应激促进细胞的抗炎表型^[8]。此外,IRG1 催化产生的衣康酸,可抑制琥珀酸脱氢酶的活性,增加琥珀酸的积累,这在巨噬细胞代谢重塑中发挥着重要作用^[9]。但是,尚未有关 IRG1 对内毒素耐受作用的相关研究报道。

熊果酸(ursolic acid, UA)和坡膜酸(pomolic acid, PA)均属于乌苏烷型五环三萜,有多篇文献报道了这两个化合物在抑制巨噬细胞炎症反应方面的活性^[10-11]。本研究旨在通过体外实验研究 IRG1 对巨噬细胞内毒素耐受的调控,及 UA 和 PA 的干预作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

实验所用小鼠 RAW264.7 单核-巨噬细胞系(191220)购自中国科学院细胞库。RAW264.7 单核-巨噬细胞,接种至含有 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 高糖培养基中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养,实验所用细胞均为处于对数生长期的传代在 2~

10 代范围内的细胞。

1.2 药物及试剂

DMEM 高糖培养基(批号:C11995500BT)、胎牛血清(FBS,批号:10270106),购自美国 Gibco 公司;小鼠 TNF- α (批号:EK282P)、IL-6(批号:EK282P) ELISA 检测试剂盒,购自杭州联科生物技术有限公司;LPS(批号:L2880),购自美国 Sigma 公司;IRG1 检测抗体 Anti-IRG1 antibody(批号:ab222411),购自美国 Abcam 公司; β -actin 检测抗体 Anti-beta actin antibody(批号:AF018),购自美国 Affinity Biosciences 公司;IRG1 过表达质粒(批号:214157),购自北京 simo biological 公司;UA 和 PA 均为本实验室从福建野鸦椿果中制备^[12]。

1.3 巨噬细胞内毒素耐受模型建立

参照文献^[13]中的方法,并加以改进建立巨噬细胞内毒素耐受模型,具体操作如下:将 RAW264.7 细胞以 1×10^6 孔的密度接种至 6 孔板中,以 200 ng/mL 浓度的 LPS 干预细胞 24 h,更换新鲜培养基,3 h 后,再次以相同浓度的 LPS 刺激细胞 6 h,建立巨噬细胞内毒素耐受模型。

1.4 细胞上清液炎症因子的检测

于第 1 次 LPS 刺激 6、24 h,第 2 次 LPS 刺激 3、6 h,收集上清液,3000 r/min 离心 10 min,通过 ELISA 试剂盒检测其中 IL-6 和 TNF- α 的含量。

1.5 IRG1 蛋白表达检测

在第 2 次 LPS 刺激 6 h 后,用细胞刮刀刮下细胞,置于 1.5 mL 离心管中,冰上裂解 30 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 、1300 g 离心 15 min,取上清蛋白溶液,以 BCA 定量后 105 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴变性 10 min,通过 Western blot 检测样本中 IRG1 蛋白的含量。

1.6 IRG1 过表达巨噬细胞体系的构建

构建 IRG1 过表达质粒,取其中 100 μg 溶于 100 μL 无菌蒸馏水中,配制成浓度为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的质粒储备液。移取质粒 4 μL (4 μg)加入 71 μL Opti-mem 培养基,混匀,静置 5 min。移取 Lipofectamine 2000 转染试剂 4 μL ,加入 71 μL Opti-mem 培养基,混匀,静置 5 min。混合质粒及转染试剂,混匀,室温孵育 25 min。取出细胞密度为 50%~60% 的 6 孔板,弃去培养基,加入适量无菌 PBS 润洗 2 遍。吸尽 PBS 后,于转染孔中加入上述质粒与转染试剂的混合液,再

加入 600 μL Opti-mem 培养基,轻轻混匀。其余各孔中加入 750 μL Opti-mem 培养基作为对照。转染 6 h 后更换新鲜 DMEM 高糖培养基培养 10 h。通过 Western blot 检测细胞中 IRG1 蛋白的含量明确 IRG1 过表达的效率。

1.7 IRG1 过表达对巨噬细胞内毒素耐受的影响

将巨噬细胞分为空白对照组、LPS 组、IRG1 过表达+LPS 实验组。参照“1.3”项条件进行巨噬细胞内毒素耐受的诱导,并于第一次 LPS 刺激 24 h 以及第二次 LPS 刺激 3、6 h 收集细胞上清液,通过 ELISA 法检测细胞上清液中炎症因子的含量,在 LPS 第二次干预 6 h 检测细胞中 IRG1 蛋白的表达情况。

1.8 UA 和 PA 对巨噬细胞内毒素耐受和 IRG1 表达的影响

将巨噬细胞分为空白对照组、LPS 组、LPS+UA 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 组、LPS+PA 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 组。LPS 组参照“1.3 项”条件构建巨噬细胞内毒素耐受模型。其余给药组按照分组在造模开始时加入不同浓度的 UA 和 PA (5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 进行干预,在 LPS 和(或)药物第一次干预 24 h 以及第二次 LPS 刺激 3、6 h 收集细胞上清液,通过 ELISA 法检测细胞上清液中 IL-6 和 TNF- α 的含量,在 LPS 和(或)药物第二次干预 6 h 收集细胞,检测其中 IRG1 蛋白的表达情况。

1.9 统计学分析

计量数据均用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,实验各分组间数据均采用单因素方差分析, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 IRG1 过表达促进巨噬细胞内毒素耐受

与空白对照组相比,RAW264.7 巨噬细胞在

LPS 第一次刺激时,炎症因子 IL-6 和 TNF- α 分泌增加($P<0.01$)。与第一次 LPS 刺激 6 h 相比,第二次 LPS 刺激 6 h 时,IL-6 和 TNF- α 的含量明显低于第一次刺激($P<0.01$),表明巨噬细胞在第二次 LPS 轮刺激时出现了内毒素耐受现象。详见图 1。

由图 2 可知,与空白组对照相比,在 LPS 第二次刺激下(内毒素耐受阶段)巨噬细胞 IRG1 蛋白表达显著上调,表明 IRG1 过表达巨噬细胞构建成功。在 LPS 第一次刺激 6 h 和 24 h 时,与相应时间点下的 LPS 组相比,IRG1 过表达+LPS 组中 IL-6 的分泌都明显低于 LPS 组($P<0.01$);但 IRG1 过表达+LPS 组中 TNF- α 的分泌与 LPS 组相比,差异不明显($P>0.05$)。在 LPS 第二次刺激 3 h 和 6 h 时,与对应时间点下的 LPS 组相比,IRG1 过表达+LPS 组中 IL-6 和 TNF- α 的分泌都明显低于 LPS 组($P<0.01$)。

2.2 UA 和 PA 促进巨噬细胞的内毒素耐受并上调 IRG1 的表达水平

在 LPS 第一次刺激巨噬细胞时(24 h),LPS+UA 处理的各组间巨噬细胞 TNF- α 的释放均无统计学差异($P>0.05$);在 LPS 第一次刺激巨噬细胞时(3、6 h),与 LPS 组相比,LPS+UA 浓度在 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 时 IL-6 的分泌降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),LPS+PA 在 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 时 TNF- α 的分泌降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),LPS+PA 在 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞上清液中 IL-6 的浓度均降低($P<0.01$)。LPS 第二次刺激的 3 h 和 6 h 两个时间点,LPS+UA 和 LPS+PA 在 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内,巨噬细胞 TNF- α 和 IL-6 的释放均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。详见图 3。

与空白对照组比较,LPS 组 RAW264.7 细胞 IRG1 蛋白表达量增加($P<0.01$);与 LPS 组相比,LPS+UA 和 LPS+PA 在 10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内 RAW264.7 细胞 IRG1 蛋白的表达水平均上调($P<0.01$)。详见图 4。

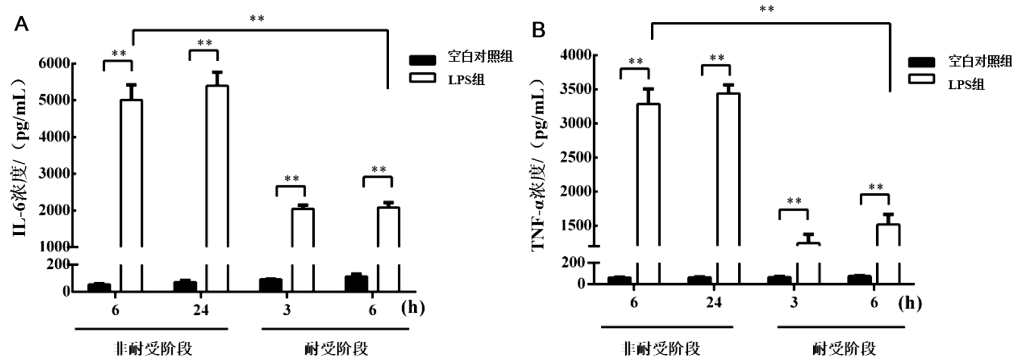


图 1 两次 LPS 刺激下巨噬细胞上清液 IL-6(A)和 TNF- α (B)的浓度

注:** $P<0.01$ 。

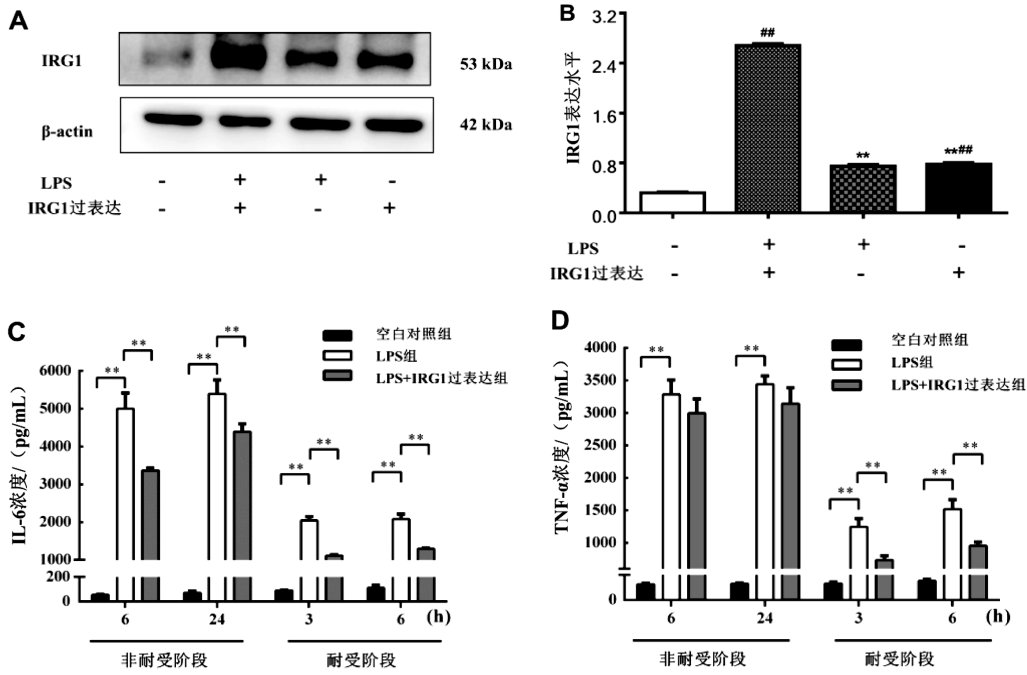


图2 IRG1 过表达对巨噬细胞炎症因子释放的影响

注:A. IRG1 过表达和 LPS 刺激条件下巨噬细胞中 IRG1 蛋白的表达情况;B. IRG1 蛋白的相对表达水平;C. IRG1 过表达对巨噬细胞在 LPS 刺激下炎症因子 IL-6 分泌的影响;D. IRG1 过表达对巨噬细胞在 LPS 刺激下炎症因子 TNF- α 分泌的影响。与空白对照组比较, ** $P < 0.01$, 与 LPS+IRG1 过表达组比较, # $P < 0.01$; 各组间比较, ** $P < 0.01$ 。

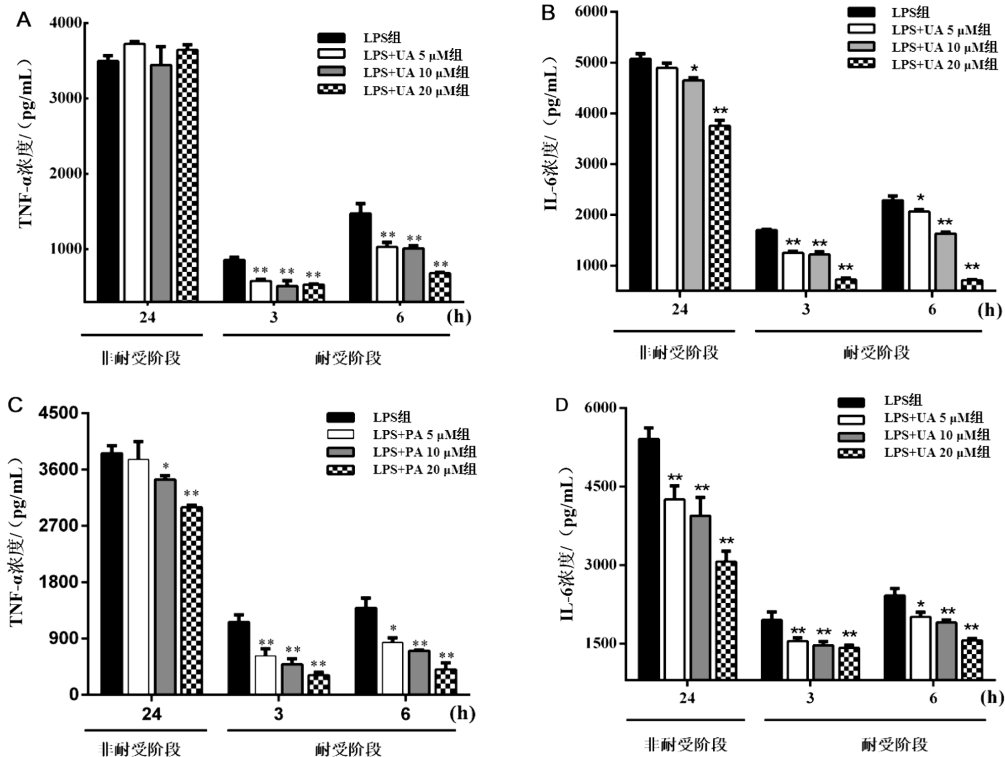


图3 UA 和 PA 对巨噬细胞内毒素非耐受和耐受过程中炎症因子释放的影响

注:A. UA 对巨噬细胞 TNF- α 释放的影响;B. UA 对巨噬细胞 IL-6 释放的影响;C. PA 对巨噬细胞 TNF- α 释放的影响;D. PA 对巨噬细胞 IL-6 释放的影响。不同时间点下的各给药组与相应时间点下 LPS 处理组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

LPS 是革兰氏阴性菌细胞膜上的重要组成成分,是造成革兰氏阴性菌感染和炎症反应的重要原

因^[14-15]。LPS 能诱导巨噬细胞极化为 M1 表型,诱导巨噬细胞 IL-6、TNF- α 等炎性细胞因子的产生,进一步导致组织损伤和炎症反应,因此,LPS 刺激巨噬细胞已被用作多种炎症相关疾病的体外模型。然而,

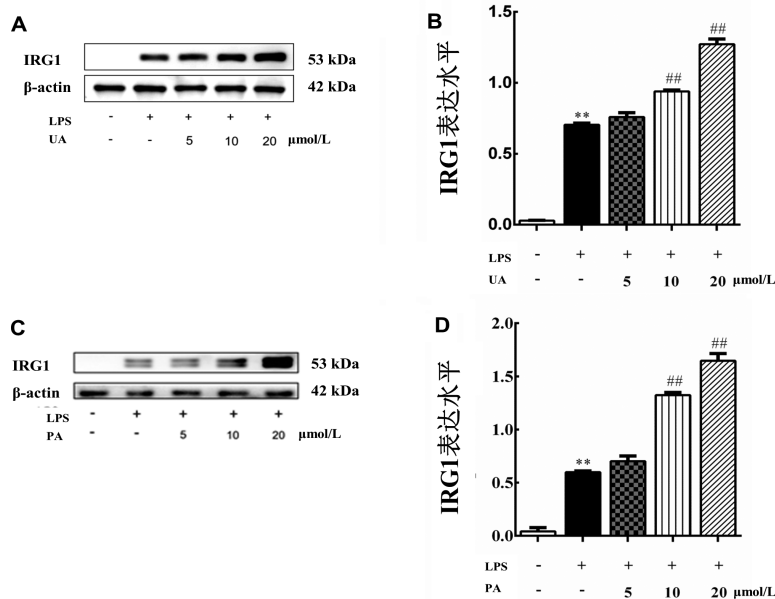


图4 UA和PA对LPS刺激下巨噬细胞IRG1蛋白表达的影响

注:A.UA处理后巨噬细胞IRG1蛋白表达情况;B.UA处理后巨噬细胞IRG1蛋白的相对表达水平;C.PA处理后巨噬细胞IRG1蛋白表达情况;D.PA处理后巨噬细胞IRG1蛋白的相对表达水平;与空白对照组比较,** $P<0.01$;与LPS组比较,## $P<0.01$ 。

研究表明,长期处于LPS刺激下,会诱导细胞处于内毒素耐受状态。

内毒素耐受是机体和细胞调控自身免疫状态和炎症反应的一种生理机制。免疫细胞长期处于LPS刺激下,会诱导细胞处于内毒素耐受状态。内毒素耐受作用也可被逆转和促进,比如巨噬细胞在LPS首次刺激前,加入IFN- γ 或GM-CSF可防止内毒素耐受^[16-17];而在巨噬细胞接受LPS第二次刺激前,加入H₂O₂,能够促进巨噬细胞免疫耐受^[18]。研究发现,鲎抗内毒素因子模拟肽CLP-19预处理巨噬细胞,可通过抑制内毒素耐受过程中I κ B α 和I κ B β 的降解,降低LPS诱导的巨噬细胞NF- κ B活性,起到促进内毒素耐受作用^[19]。

IRG1是炎症和感染中免疫代谢的调节因子,参与了免疫细胞的抗炎、抗菌等生理功能。在免疫细胞受到抗原侵袭时,细胞内IRG1蛋白的表达水平会升高。研究发现,IRG1的表达与炎症因子的产生呈负相关,并能够抑制炎症反应造成的组织损伤^[20-21]。IRG1抑制炎症反应的机制近年来受到了极大的关注。研究表明,IRG1可以将顺式乌头酸转化成衣康酸,进而修饰NLRP3,抑制炎症小体的激活^[22]。此外,IRG1还可以通过抑制TLR信号通路激活NF- κ B,从而减少TNF- α 等炎症因子的产生^[23]。

IL-6和TNF- α 均是由巨噬细胞受到LPS等抗原刺激所产生的炎症因子,在组织受到感染后会由免疫细胞大量产生并释放到组织中。作为一种调节

机制,内毒素耐受可以避免这些炎症因子无限制的产生,从而加重组织的损伤。研究表明,在发生内毒素耐受时,巨噬细胞产生的IL-6和TNF- α 均会出现显著下调^[24-25]。为了研究IRG1是否可以发挥促内毒素耐受的作用,本研究首先过表达IRG1,先后两次加入LPS刺激巨噬细胞,构建巨噬细胞内毒素耐受模型。研究结果发现,IRG1能抑制巨噬细胞在LPS第二次刺激下,炎症因子IL-6和TNF- α 的分泌,表明IRG1具有促进内毒素耐受的作用。

五环三萜具有广泛的生物活性,多种五环三萜化合物具有免疫调节作用。本研究在前期对部分五环三萜化合物促进巨噬细胞内毒素耐受的活性进行了筛选,从中得到了UA和PA两个乌苏烷型的五环三萜化合物,关于这类成分抑制巨噬细胞炎症因子释放的活性已经有着广泛的研究和报道^[26-27]。本次研究发现乌苏烷型三萜化合物具备有较好的促进巨噬细胞内毒素耐受的活性,这进一步丰富了该类成分对巨噬细胞调节作用的研究。此外,UA和PA均可上调免疫耐受阶段巨噬细胞IRG1蛋白的表达,表明调控IRG1的表达可能是这两个化合物促进免疫耐受的机制之一。本次研究对于UA、PA等五环三萜的生物活性的进一步认识、IRG1配体的寻找及促内毒素耐受药物的开发都有一定的意义。

参考文献

[1] 汪涛,孙新,李玲.琥珀酸在M1型巨噬细胞中积累及其信

- 号传递研究进展[J].中南药学,2020,18(11):1858-1862.
- [2] GILLEN J, ONDEE T, GURUSAMY D, et al. LPS tolerance inhibits cellular respiration and induces global changes in the macrophage secretome[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(2): 164.
- [3] SEELEY J J, GHOSH S. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2017, 101(1):107-119.
- [4] HALL C J, BOYLE R H, ASTIN J W, et al. Immunoresponsive gene 1 augments bactericidal activity of macrophage-lineage cells by regulating β -oxidation-dependent mitochondrial ROS production[J]. *Cell Metabolism*, 2013, 18(2): 265-278.
- [5] JAMAL UDDIN M, JOE Y, KIM S K, et al. IRG1 induced by heme oxygenase-1/carbon monoxide inhibits LPS-mediated sepsis and pro-inflammatory cytokine production[J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2016, 13(2): 170-179.
- [6] CHEON Y P, XU X P, BAGCHI M K, et al. Immune-responsive gene 1 is a novel target of progesterone receptor and plays a critical role during implantation in the mouse[J]. *Endocrinology*, 2003, 144(12): 5623-5630.
- [7] WU R L, CHEN F, WANG N, et al. ACO1 in immunometabolism and disease[J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2020, 17(8): 822-833.
- [8] HOOFTMAN A, O'NEILL L A J. The immunomodulatory potential of the metabolite itaconate [J]. *Trends in Immunology*, 2019, 40(8): 687-698.
- [9] LAMPROPOULOU V, SERGUSHICHEV A, BAMBOUSKOVA M, et al. Itaconate links inhibition of succinate dehydrogenase with macrophage metabolic remodeling and regulation of inflammation [J]. *Cell Metabolism*, 2016, 24(1): 158-166.
- [10] DHAKAL H, KIM M J, LEE S, et al. Ursolic acid inhibits Fc ϵ RI-mediated mast cell activation and allergic inflammation[J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 99: 107994.
- [11] SCHINELLA G, AQUILA S, DADE M, et al. Anti-inflammatory and apoptotic activities of pomolic acid isolated from *Cecropia pachystachya*[J]. *Planta Medica*, 2008, 74(3): 215-220.
- [12] 满兴战,周峰,谭洋,等.福建野鸦椿化学成分的研究[J].*中草药*,2019,50(24):5924-5929.
- [13] GILLEN J, ONDEE T, GURUSAMY D, et al. LPS tolerance inhibits cellular respiration and induces global changes in the macrophage secretome[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(2): 164.
- [14] KUROTAKI D, SASAKI H, TAMURA T. Transcriptional control of monocyte and macrophage development[J]. *International immunology*, 2017, 29(3):97-107.
- [15] MIZOBUCHI H, SOMA G I. Low-dose lipopolysaccharide as an immune regulator for homeostasis maintenance in the central nervous system through transformation to neuroprotective microglia[J]. *Neural Regeneration Research*, 2021, 16(10): 1928-1934.
- [16] ADIB-CONQUY M, CAVAILLON J M. Gamma interferon and granulocyte/monocyte colony-stimulating factor prevent endotoxin tolerance in human monocytes by promoting interleukin-1 receptor-associated kinase expression and its association to MyD88 and not by modulating TLR4 expression[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(31): 27927-27934.
- [17] BUNDSCHUH D S, BARSIG J, HARTUNG T, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN-gamma restore the systemic TNF-alpha response to endotoxin in lipopolysaccharide-desensitized mice[J]. *Journal of Immunology*, 1997, 158(6): 2862-2871.
- [18] LI Y K, ZHANG P, WANG C C, et al. Immune responsive gene 1 (IRG1) promotes endotoxin tolerance by increasing A20 expression in macrophages through reactive oxygen species[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(23): 16225-16234.
- [19] YANG Y, LI D, TIAN Z Q, et al. Looped limulus anti-lipopolysaccharide derived peptide CLP-19 induces endotoxin tolerance involved inhibition of NF- κ B activation [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 480(3): 486-491.
- [20] ZHU D, ZHAO Y, LUO Y, et al. Irg1-itaconate axis protects against acute kidney injury via activation of Nrf2[J]. *American Journal of Translational Research*, 2021, 13(3): 1155-1169.
- [21] NAIR S, HUYNH J P, LAMPROPOULOU V, et al. Irg1 expression in myeloid cells prevents immunopathology during *M. tuberculosis* infection[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2018, 215(4): 1035-1045.
- [22] HOOFTMAN A, ANGIARI S, HESTER S, et al. The immunomodulatory metabolite itaconate modifies NLRP3 and inhibits in inflammasome activation[J]. *Cell Metabolism*, 2020, 32(3): 468-478.
- [23] JAMAL UDDIN M, JOE Y, KIM S K, et al. IRG1 induced by heme oxygenase-1/carbon monoxide inhibits LPS-mediated sepsis and pro-inflammatory cytokine production [J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2016, 13(2): 170-179.
- [24] GU J Y, FU Z B, CHEN J L, et al. Endotoxin tolerance induced by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide alters macrophage polarization[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2022, 164: 105448.
- [25] HIRANO S, ZHOU Q, FURUYAMA A, et al. Differential regulation of IL-1 β and IL-6 release in murine macrophages[J]. *Inflammation*, 2017, 40(6): 1933-1943.
- [26] CHIANESE G, MASI F, CICIA D, et al. Isomadecassoside, a new ursane-type triterpene glycoside from *Centella asiatica* leaves, reduces nitrite levels in LPS-stimulated macrophages[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(4): 494.
- [27] MEI Y D, ZHANG N, ZHANG W Y, et al. Two new ursane-type nortriterpenes from *Lonicera macranthoides* and their iNOS-inhibitory activities[J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2019, 17(1): 27-32.

(本文编辑 苏维)