

四逆汤通过NLRP3-Caspase-1-IL-1 β /IL-18信号通路对脓毒症急性肾损伤大鼠的保护作用研究

鲁 婷¹, 宋国林^{1,2,3}, 代卓青^{1,2,3}, 江四华^{1,2,3*}

¹贵州中医药大学第二临床医学院, 贵州 贵阳

²石恩骏贵州省名老中医传承工作室, 贵州 贵阳

³贵州中医药大学中西医结合急重症研究中心, 贵州 贵阳

收稿日期: 2025年1月27日; 录用日期: 2025年2月21日; 发布日期: 2025年2月28日

摘 要

目的: 通过盲肠穿刺结扎法建立脓毒症大鼠模型, 观察四逆汤是否可以改善脓毒症SD大鼠肾损伤, 探讨四逆汤是否通过抑制NLRP3-Caspase-1-IL-1 β /IL-18信号通路改善脓毒症SD大鼠肾损伤。方法: 100只雌性大鼠, 按照大鼠体重进行初步分类, 采用轮次分配法, 确保每组大鼠体重分布均匀。平均分成3大组, 每组30只老鼠, 从中随机选取1组作为空白组, 剩下两组使用CLP法进行造模, 分别是实验组、对照组两个大组。随后又分别按大鼠体重采用轮次分类分为8小时组、16小时组和24小时组三个小组, 每个小组10只; 其中死亡10只, 继续造模补充; 实验组采用四逆汤灌胃、对照组和空白组采用生理盐水灌胃。分别在8 h、16 h、24 h时间点, 取各组大鼠肾组织进行HE染色, 计算肾损伤评分, WB检测肾组织中NLRP3、Caspase-1蛋白表达, ELISA法检测血清IL-1 β 、IL-18表达情况。结果: 1) 肾组织HE染色后高倍镜下对照组8小时开始可见肾脏正常形态被破坏, 肾小球体积明显增大, 肾小囊腔扩大, 系膜细胞肿胀、间质炎性细胞浸润; 16小时较8小时更加严重, 并且间质有明显出血及大量炎症细胞浸润; 24小时肾小球缺血皱缩, 失去正常形态; 球-囊间隙扩大, 炎性细胞渗出增多, 肾小管上皮细胞肿胀。实验组大鼠8小时及16小时的肾脏病理改变较对照组明显减轻。肾损伤评分中, 肾损伤随着时间的延长而逐渐加重($P < 0.05$), 使用四逆汤治疗后, 8小时及16小时可以明显减轻肾损伤($P < 0.05$), 但随着时间延长, 24小时后这种治疗效果不显著。2) Western Blot检测肾组织NLRP3及Caspase-1蛋白表达水平发现, 在四逆汤灌胃后8 h、16 h, 表达较对照组显著增强($P < 0.01$), 然而在24 h后, 实验组表达与对照组差异无显著性差异($P > 0.05$)。3) ELISA检测血清IL-1 β 、IL-18后发现, 总趋势是从8小时开始明显上升($P < 0.01$), 16小时显著升高($P < 0.05$); 24小时开始实验组表达与对照组差异无显著性差异($P > 0.05$)。这与WB检查结果相似。结论: 四逆汤可能通过介导NLRP3-Caspase-1-IL-1 β /IL-18信号通路改善脓毒症急性肾损伤SD大鼠肾损伤。

关键词

四逆汤, 脓毒症相关急性肾损伤, NLRP3-Caspase-1-IL-1 β /IL-18信号通路

*通讯作者。

Protective Effect of Sini Decoction on Sepsis-Induced Acute Kidney Injury Rats Through NLRP3-Caspase-1-IL- β /IL-18 Signaling Pathway

Ting Lu¹, Guolin Song^{1,2,3}, Zhuoqing Dai^{1,2,3}, Sihua Jiang^{1,2,3*}

¹The Second Clinical Medical College of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang Guizhou

²Shi Enjun's Inheritance Studio of Famous and Senior Traditional Chinese Medicine Practitioners in Guizhou, Guiyang Guizhou

³Research Center for Integrated Chinese and Western Medicine in Emergency and Critical Care, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang Guizhou

Received: Jan. 27th, 2025; accepted: Feb. 21st, 2025; published: Feb. 28th, 2025

Abstract

Objective: Sepsis rat model was established by cecal puncture and ligation to observe whether Sini Decoction could improve kidney injury of septic SD rats, and to explore whether Sini Decoction could improve kidney injury of septic SD rats by inhibiting NLRp3-caspase-1-IL-1 β /IL-18 signaling pathway. **Methods:** 100 female rats, initially classified according to the weight of the rats, using a round-robin allocation method to ensure an even distribution of weights in each group. Divided into 3 large groups on average, each group of 30 rats, from which 1 group was randomly selected as the blank, and the remaining two groups were used for modeling with the CLP method. A total of 100 female rats were initially classified according to their body weights. The round-robin allocation method was used to ensure a uniform distribution of body weights among each group. The rats were evenly divided into three major groups, with 30 rats in each group. One group was randomly selected as the blank group, and the remaining two groups were used to establish the model using the CLP method, namely the experimental group and the control group. Subsequently, according to the body weights of the rats, each of these two groups was further divided into three subgroups (8-hour group, 16-hour group, and 24-hour group) using the round-robin classification method, with 10 rats in each subgroup. Ten rats died during the process, and new rats were used to continue the modeling to make up for the loss. The experimental group was administered Sini Decoction by gavage, while the control group and the blank group were administered normal saline by gavage. At the time points of 8 h, 16 h, and 24 h, the renal tissues of the rats in each group were collected for HE staining, and the renal injury score was calculated. Western blotting (WB) was used to detect the protein expressions of NLRP3 and Caspase-1 in the renal tissues, and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the expressions of serum IL-1 β and IL-18. **Results:** 1) After HE staining of the renal tissues, under a high-power microscope, in the control group, the normal morphology of the kidneys was found to be damaged starting from 8 hours, with a significant increase in the volume of the glomeruli, expansion of the renal capsule cavity, swelling of the mesangial cells, and infiltration of interstitial inflammatory cells. The situation at 16 hours was more severe than that at 8 hours, with obvious interstitial bleeding and a large number of inflammatory cell infiltrations. At 24 hours, the glomeruli were ischemic and shrunk, losing their normal morphology; the glomerular-capsular space was enlarged, the exudation of inflammatory cells increased, and the tubular epithelial cells were swollen. The renal pathological changes in the experimental group at

8 hours and 16 hours were significantly milder than those in the control group. In the renal injury score, the renal injury gradually worsened over time ($P < 0.05$). After treatment with Sini Decoction, the renal injury was significantly reduced at 8 hours and 16 hours ($P < 0.05$). However, as time went on, this therapeutic effect was not significant after 24 hours. 2) Western Blot detection of NLRP3 and caspase-1 protein expression levels in renal tissue showed that the expression levels were significantly increased 8 h and 16 h after intragastric administration of Sini Decoction compared with the control group ($P < 0.01$). However, there was no significant difference in the expression levels between the experimental group and the control group 24 h later ($P > 0.05$). 3) Serum IL-1 β and IL-18 were detected by ELISA, and they began to increase at 8 h ($P < 0.01$), and were significantly increased at 16 h ($P < 0.05$). There was no significant difference in the expression between the experimental group and the control group from 24 h on ($P > 0.05$). This is similar to the WB results. Conclusion: Sini Decoction may improve renal function in SD rats with sepsis acute kidney injury by mediating NLRP3-Caspase-1-IL-1 β /IL-18 signaling pathway.

Keywords

Sini Decoction, Sepsis Associated Acute Kidney Injury, NLRP3-Caspase-1-IL-1 β /IL-18 Signaling Pathway

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

现代研究表明, 脓毒症主要表现为全身炎症反应, 其发生及发展都与机体炎症反应的激活密切相关[1]。有研究显示, 多种信号通路及效应分子参与了炎症反应的激活, 其中核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 炎性小体被证实参与脓毒症炎症反应的激活, 其作为炎症反应激活途径的上游信号, 通过激活下游 Caspase-1, 进一步促进下游促炎细胞因子(如: IL-1 β 、IL-18 等)来推动了脓毒症的发生发展[2]。实验研究也证明, NLRP3-Caspase-1-IL-1 β /IL-18 信号通路的激活参与了脓毒症相关急性肾损伤(sepsis-associated AKI, SA-AKI)的发生发展[3]。

2. 材料

2.1. 动物

健康的 SPF 级 SD 雌性大鼠, 体重在 200~250 g, 由湖南长沙市天勤生物技术有限公司提供(合格证号: SCXK(湘)2014-0011)。检疫后送至贵州中医药大学花溪校区动物试验中心饲养。

2.2. 主要试剂及设备

(1) 主要试剂: 蛋白质提取试剂盒、一抗: 鼠抗(bsm-33309m), 购于 MCE 公司。二抗: 山羊抗兔 IgG (ZB-2301), 购于北京中杉公司。ELISA 试剂盒(IL-1 β 、IL-18), 武汉华美生物工程有限公司。中药材: 产地: 制白附子四川、干姜贵州、甘草甘肃; 厂家: 制白附子、干姜: 贵阳济仁堂中药饮片厂, 甘草: 四川千方中药股份有限公司。

(2) 主要设备: 电泳设备、离心机。

2.3. 中药制备及服法

四逆汤中附片(先煎)45 g、干姜 27 g、甘草 18 g 按照 5:3:2 比例配置,加水 500 ml,煎煮 150 ml。服法:煎煮后按 1 ml/100g 灌胃,每隔 8 小时服药一次。

3. 实验方法

3.1. 动物模型制备

采用盲肠结扎穿刺法造模[4],大鼠腹腔内注射 10%水合氯醛麻醉(3.5 ml/kg),充分麻醉后,将大鼠面朝上固定在鼠夹板上进行脱毛,消毒、铺巾,腹壁正中切开 2 cm;拉出盲肠后在盲肠总长度 50%处结扎,用国产 25 号针头在结扎线下约 0.5 cm 处贯穿盲肠 1 次,造成 2 个漏口,挤出少量肠腔内粪便,回纳盲肠后关腹,术后予生理盐水(5 ml/100g)进行液体复苏;出现精神萎靡不振、寒战、嗜睡,眼鼻渗血、全身无力、腹胀等脓毒症表现。动物处死后可见腹腔内有血性渗出液,盲肠肿胀变黑,符合脓毒症表现[5],可认为脓毒症制模成功。且经本实验证明,SD 大鼠肾脏发生病理学改变,认为同时存在急性肾损伤。

3.2. 分组及给药方法

分组:SPF 级健康雌性 SD 大鼠 100 只,按照大鼠体重进行初步分类。采用轮次分配法,确保每组大鼠体重分布均匀。平均分成 3 大组,每组 30 只老鼠,从中随机选取 1 组作为空白组,剩下两组使用 CLP 法进行造模,分别是实验组、对照组两个大组。随后又分别按大鼠体重采用轮次分类分为 8 小时组、16 小时组和 24 小时组三个小组,每个小组 10 只;其中 8 小时对照组、16 小时实验组未达实验时间分别死亡 1 只,16 小时对照组、24 小时实验组分别死亡 2 只,24 小时对照组死亡 4 只,继续造模补充;标记后记录实验时间,分别装入笼中。

实验组:四逆汤灌胃(1 ml/100g),每 8 小时给药一次;对照组:生理盐水灌胃(1 ml/100g),每隔 8 小时给予一次;空白组:给与对照组同等量的生理盐水灌胃(1 ml/100g),每 8 小时给予一次。

3.3. 血清及组织标本取材方法

各小组分别沿 SD 大鼠腹正中线剖开腹腔,暴露腹主动脉,分离腹主动脉后采血针留取血标本,离心(3000 r/min, 10 分钟)后用移液枪取血清,将留取好的血清标本置于-80℃冰箱中保存待检。采血后迅速取出肾脏用冷 PBS 液充分冲洗后,剔除肾脏周围组织,剥离肾脏包膜,两侧肾组织分装,左肾用于 HE 染色,右肾置于-80℃冰箱中保存备用。

3.4. 肾组织石蜡包埋和 HE 染色

取一部分左肾组织置于 4%多聚甲醛中浸泡 72 小时,固定好的肾脏组织进行冲洗,洗净多聚甲醛,将固定好的肾脏组织依次放入 75%的乙醇脱水 4 小时、80%的乙醇脱水 4 小时、95%的乙醇中脱水 2 小时、100%的乙醇中脱水 80 分钟、100%的乙醇 II 中脱水 100 分钟,将脱水后的组织依次置入二甲苯和乙醇(1:1)混合溶液中 10 分钟、100%的二甲苯中 20 分钟。将二甲苯透明好的肾组织放入石蜡包埋机中进行包埋,包埋完成后放入-20℃冰箱冷却至凝固。将包埋好的蜡块修剪至合适的形状,切片后将组织平摊于一块玻璃上,滴加 30%酒精水溶液使组织完全展开,将切片置于电热恒温鼓风干燥箱中 60℃烤片 30 分钟后进行染色,最后显微镜下观察拍照。参照既往文献对肾损伤进行评分[5]:没有病变为 0 分;损伤范围 < 5%评 1 分;损伤范围 5%~25%评 2 分;损伤范围 25%~75%评 3 分;损伤范围 > 75%评 4 分。

3.5. Western Blot 法检测肾组织中 NLRP3、Caspase-1 的蛋白表达水平

取出各组大鼠肾脏组织，进行蛋白定量分析，每孔取 50 μg 蛋白上样，开始电泳直到染料抵达分离胶底部，电泳液为甘氨酸缓冲液。取下胶，用 5%脱脂奶粉封闭至少 1 小时。在封膜袋中用 5%的脱脂奶粉稀释一抗(稀释比例为：1:1000)，稀释后将 PVDF 膜放入封膜袋并密封，于水平摇床上摇 1 小时后置于 4℃冰箱内过夜。室温下用配置好的 TBST (pH = 7.6)于摇床上洗膜 3 次，每次洗膜 10 分钟。二抗孵育：在封膜袋中用 5%的脱脂奶粉稀释(稀释比例：1:5000)，室温孵育 1 h，TBST 洗膜，10 分钟 × 3 次。在暗室中使 X 光片曝光，常规方法显影、定影，并扫入凝胶成像系统进行图象分析(Blo-RAO Gel Doc 2000)，计算光密度值(OD 值)，重复 3 次。

3.6. ELISA 法检测

检测各组大鼠不同时点血清 IL-1β、IL-18 水平。

4. 实验结果

4.1. 雌性 SD 大鼠肾脏组织 HE 染色图

图 1 是不同时段的脓毒症 SD 大鼠肾脏组织经过 HE 染色后，在高倍镜下表现出的图像，空白组小鼠肾小球及肾小管结构无损伤；肾组织结构正常；可见正常的肾小管管腔，肾小管上皮细胞排列规则；对照组 8 小时大鼠肾脏正常形态被破坏，肾小球体积明显增大，肾小囊腔扩大，系膜细胞肿胀、间质炎性细胞浸润；16 小时较 8 小时更加严重，并且间质有明显出血、大量炎症细胞浸润及红细胞渗出；24 小时肾小球皱缩，失去正常形态；球囊间隙扩大，炎性细胞渗出增多，肾小管上皮细胞肿胀。实验组大鼠上述肾脏病理改变较对照组明显减轻(详见图 1)。肾损伤评分可见，肾损伤从 8 小时就可以见到，随着时间的延长而逐渐加重($P < 0.05$)；其中 8 小时和 16 小时实验组肾损伤评分均低于对照组($P < 0.05$)；而 24 小时后实验组虽低于对照组，但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

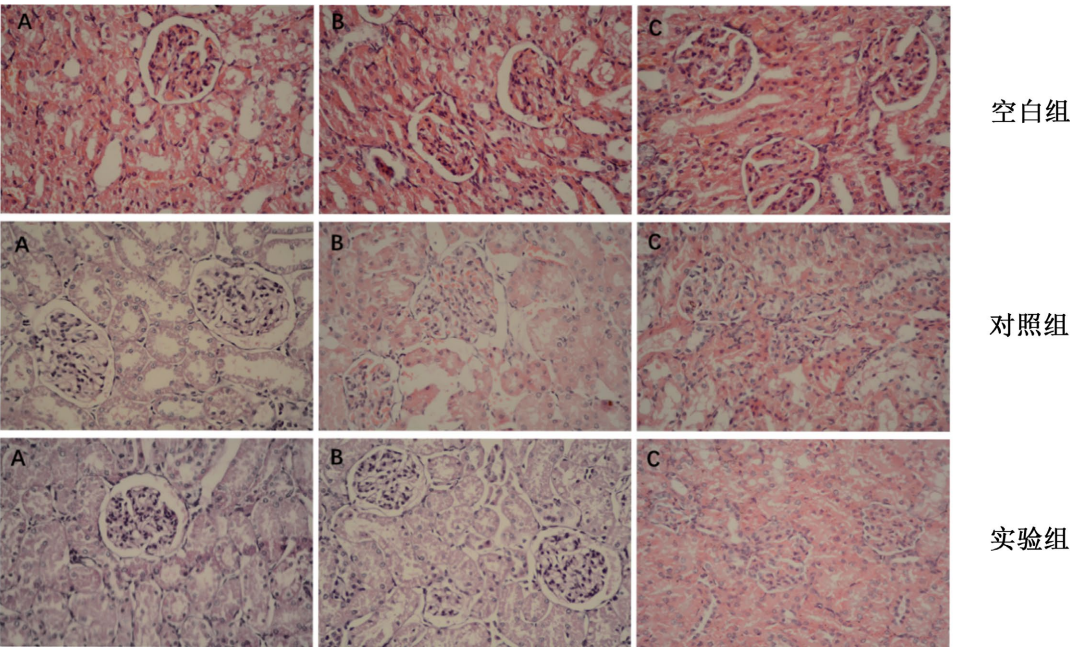


Figure 1. Pathological changes of renal structure in three groups of rats (HE staining × 400)
图 1. 三组大鼠肾脏结构病理变化(HE 染色 × 400)

Table 1. Renal histopathological score of SD rats in each group
表 1. 各组 SD 大鼠肾损伤评分

分组	数量(N)	肾损伤评分
8 小时空白组	10	0.10 ± 0.32
8 小时对照组	10	1.90 ± 0.57
8 小时实验组	10	1.20 ± 0.42**
16 小时空白组	10	0.10 ± 0.32
16 小时对照组	10	2.60 ± 0.52 [#]
16 小时实验组	10	1.70 ± 0.48 ^{&**}
24 小时空白组	10	0.10 ± 0.32
24 小时对照组	10	3.40 ± 0.52 [#]
24 小时实验组	10	3.20 ± 0.63 ^{&}

注：① 实验组与对照组比较* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ ；② 实验组与实验组比较[&] $P < 0.05$ ；③ 对照组与对照组比较，[#] $P < 0.05$ 。

4.2. Western Blot 法检测肾组织中 NLRP3、Caspase-1 的蛋白表达水平比较

(1) NLRP3 蛋白表达水平：

8 小时组：与空白组相比，对照组和实验组 NLRP3 表达水平均明显升高($P < 0.01$)；其中与对照组相比，实验组 NLRP3 表达减少($P < 0.01$)。

16 小时组：空白组 NLRP3 表达水平明显低于对照组和实验组($P < 0.01$)，与对照组相比，实验组 NLRP3 表达水平有所下降($P < 0.01$)。

24 小时组，实验组与空白组 NLRP3 水平均高于空白组($P < 0.01$)；实验组 NLRP3 表达水平较对照组有所下降，但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

各时段相互比较：在 8、16、24 三个不同时段中，空白组无明显差异，① 从对照组来看，NLRP3 表达水平从 8 小时开始明显增高($P < 0.01$)，于 16 小时达高峰($P < 0.01$)；24 小时 NLRP3 表达水平较 16 小时差异无统计学意义($P > 0.05$)；② 在实验组中，NLRP3 水平从 8 小时开始呈上升趋势($P < 0.05$)；③ 实验组与对照组相比，8 小时及 16 小时中实验组 NLRP3 表达水平较对照组明显下降($P < 0.01$)，且 16 小时下降更为明显($P < 0.01$)；而 24 小时后 NLRP3 表达水平虽然有所下降，但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2。

(2) Caspase-1 蛋白表达水平：

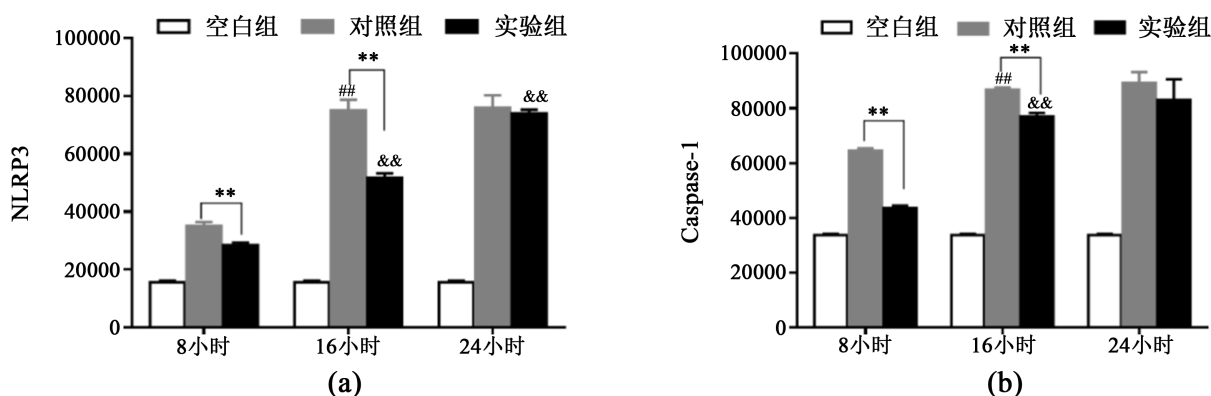
8 小时组：与空白组相比，对照组和实验组 Caspase-1 表达水平均明显升高($P < 0.01$)；其中与对照组相比，实验组 NLRP3 表达减少($P < 0.01$)。

16 小时组：空白组 Caspase-1 表达水平明显低于对照组和实验组($P < 0.01$)，与对照组相比，实验组 Caspase-1 表达水平明显下降($P < 0.01$)。

24 小时组，实验组与空白组 Caspase-1 水平均高于空白组($P < 0.01$)；实验组 Caspase-1 表达水平较对照组有所下降，但差异无统计学意义($P > 0.01$)。

各时段相互比较：在 8、16、24 三个不同时段中，空白组无明显差异，① 从对照组来看，Caspase-

1 表达水平从 8 小时开始明显增高($P < 0.01$), 于 16 小时升高明显($P < 0.01$); 24 小时 Caspase-1 表达水平较 16 小时差异无统计学意义($P > 0.05$); ② 在实验组中, 8 小时开始 Caspase-1 表达水平呈上升趋势($P < 0.01$), 24 小时后, Caspase-1 表达水平与 16 小时差异无统计学意义($P > 0.05$); ③ 实验组与对照组相比, 8 小时及 16 小时实验组 Caspase-1 表达水平较对照组下降($P < 0.01$); 而 24 小时后 NLRP3 表达水平虽然有所上升, 但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2。



注: 1) A 空白组; B 实验组 8 小时; C 对照组 8 小时; D 实验组 16 小时; E 对照组 16 小时; F 实验组 24 小时; G 对照组 24 小时; 2) ① 实验组与对照组比较* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; ② 实验组与实验组比较& $P < 0.05$; && $P < 0.01$; ③ 对照组与对照组比较, # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$ 。

Figure 2. The expression levels of NLRP3/caspase-1 in kidney tissues of each group

图 2. 各组大鼠肾脏组织中 NLRP3/caspase-1 的蛋白表达水平

4.3. ELISA 法检测血清中 IL-1 β 、IL-18 水平

(1) 各组大鼠不同时点血清 IL-1 β 水平

8 小时组: 与空白组相比, 对照组和实验组 IL-1 β 表达水平均明显升高($P < 0.01$); 其中与对照组相比, 实验组 IL-1 β 表达减少($P < 0.05$)。

16 小时组: 空白组 IL-1 β 表达明显低于对照组和实验组($P < 0.01$); 实验组表达低于对照组($P < 0.01$)。

24 小时组: 实验组与对照组 IL-1 β 表达水平明显高于空白组($P < 0.01$), 但实验组与对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

各时段相互比较: 在 8、16、24 三个不同时段, 空白组无明显差异, ① 在对照组中, IL-1 β 表达水平从 8 小时开始明显增高($P < 0.01$), 于 16 小时达高峰($P < 0.05$); 24 小时开始下降($P < 0.05$); ② 在实验组中, 16 小时 IL-1 β 表达水平与 8 小时相比明显下降($P < 0.05$); ③ 实验组与对照组相比, 8 小时及 16 小时中实验组 IL-1 β 表达水平较对照组下降($P < 0.05$), 其中以 16 小时下降最为显著($P < 0.01$), 而 24 小时后未见明显差异($P > 0.05$)。见表 2。

(2) 各组大鼠不同时点血清 IL-18 水平

8 小时组: 与空白组相比, 对照组和实验组 IL-18 表达水平明显升高($P < 0.01$), 其中 8 小时对照组增高显著($P < 0.01$); 其中与对照组相比, 实验组 IL-18 表达水平明显减少($P < 0.01$)。

16 小时组: 空白组 IL-18 表达明显低于对照组和实验组($P < 0.01$); 实验组表达低于对照组($P < 0.01$)。

24 小时组: 实验组与对照组 IL-18 表达水平明显高于空白组($P < 0.01$), 实验组表达低于对照组, 但

差异无统计学意义($P > 0.05$)。

各时段相互比较: 在 8、16、24 三个不同时段, 空白组无明显差异, ① 在对照组中, IL-18 表达水平从 8 小时开始明显增高($P < 0.01$), 于 16 小时达高峰($P < 0.05$); 24 小时表达水平较 16 小时有所下降, 但差异无统计学意义($P > 0.05$); ② 在实验组中, 16 小时 IL-18 表达水平与 8 小时相比明显升高($P < 0.01$); ③ 实验组与对照组相比, 8 小时及 16 小时中实验组 IL-18 表达水平较对照组明显下降($P < 0.01$), 而 24 小时后虽有下降但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

Table 2. The serum expression levels of IL-1 β and IL-18 in four groups ($\bar{X} \pm S$)

表 2. 各组大鼠血清 IL-1 β 、IL-18 的表达水平($\bar{X} \pm S$)

分组	数量	IL-1 β (pg/ml)	IL-18 (pg/ml)
8 h 空白组	10	3.27 $\pm$ 0.98	6.37 $\pm$ 3.25
8 h 实验组	10	10.83 $\pm$ 1.55* $\Delta\Delta$	11.36 $\pm$ 1.76** Δ
8 h 对照组	10	12.12 $\pm$ 1.15 $\Delta\Delta$	60.54 $\pm$ 5.45 $\Delta\Delta$
16 h 空白组	10	3.27 $\pm$ 0.97	6.26 $\pm$ 3.17
16 h 实验组	10	9.72 $\pm$ 1.16** $\#$	51.34 $\pm$ 6.40** $\#$
16 h 对照组	10	13.95 $\pm$ 1.79 $\star$	69.36 $\pm$ 8.22 $\star$
24 h 空白组	10	3.25 $\pm$ 1.02	6.27 $\pm$ 3.24
24 h 实验组	10	10.14 $\pm$ 2.03	57.45 $\pm$ 6.95
24 h 对照组	10	9.57 $\pm$ 1.66 $\star$	62.61 $\pm$ 4.72

注: ① 与空白组比较 $\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta P < 0.01$; ② 实验组与对照组比较 $\star P < 0.05$; $**P < 0.01$; ③ 实验组与实验组比较 $\#P < 0.05$; $\#P < 0.01$; ④ 对照组与对照组比较, $\star P < 0.05$ 。

5. 讨论

脓毒症急性肾损伤病情复杂、病死率高;发病机制作为重症医学研究的热点和难点,经过多年来的研究论证,至今尚未明确阐明。但研究表明,SA-AKI 的发生发展与机体炎症反应密切相关[6];而炎症小体又参与了脓毒症炎症反应的激活[2],炎症小体是细胞内的多聚蛋白复合物,它可以通过调节促炎因子的成熟和释放,从而抵抗入侵的病原体或免疫细胞中的危险信号[6];目前研究比较透彻的是 NLRP3,它参与多种疾病的炎症、免疫和代谢过程,被认为是一种重要的先天免疫传感器,可以对损伤相关分子模式(DAMPs)做出反应,从而激活炎症反应途径[2] [7]。当机体发生脓毒症时, NLRP3 被激活,通过与其适配体凋亡相关斑点样蛋白(ASC)相互作用,招募并将 pro-caspase-1 转化为活性形式,裂解 caspase-1, 剪切 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 至成熟形式,即 IL-1 β 和 IL-18,证实 NLRP3-Caspase-1-IL-1 β /IL-18 信号通路参与了脓毒症炎症反应的发生和发展[8];研究发现,慢性肾脏病、急性肾小管坏死等多种肾脏疾病的进程中都伴随 NLRP3 炎性体的激活[9]-[11]。近年来的一项实验结果证实,通过抑制 NLRP3 的激活减少了 SA-AKI 小鼠 Caspase-1 及促炎细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 的产生,抑制了肾脏的氧化应激,从而起到保护肾脏的作用[3]。这些研究均表明, NLRP3-Caspase-1-IL-1 β /IL-18 信号通路可能参与了 SA-AKI 的发生发展;此外,在发生脓毒症的肾小管上皮细胞以及肾小球细胞发现有 NLRP3 的表达[12],也印证了这一点。

本实验对 SD 大鼠使用 CLP 进行脓毒症模型制作,脓毒症造模成功后通过观察肾脏 HE 染色,发现

对照组大鼠肾脏正常形态被破坏, 肾小球体积先增大后皱缩, 失去正常形态; 球-囊间隙扩大, 间质炎性细胞浸润及肾小球瘀血, 这种改变随着时间的推移而逐渐加重; 而经过四逆汤治疗的实验组大鼠上述肾脏病理改变较对照组明显减轻, 明确脓毒症造成了 AKI, 而四逆汤对这种脓毒症相关急性肾损伤有治疗作用; 通过计算肾损伤评分后发现, 肾损伤随着时间的延长而逐渐加重($P < 0.05$), 使用四逆汤治疗后, 8 小时及 16 小时可以明显减轻肾损伤($P < 0.05$), 但 24 小时后这种治疗效果不显著; 通过 WB 法检测肾脏组织内的 NLRP3 炎性小体及 Caspase-1 表达水平后发现, SA-AKI 大鼠的 NLRP3 及 Caspase-1 蛋白表达水平从 8 小时开始较空白组明显增高($P < 0.01$), 16 小时达高峰($P < 0.05$), 24 小时与 16 小时差异无统计学意义($P > 0.05$); 证实了脓毒症相关急性肾损伤时, 存在 NLRP3 炎性小体被激活, 并且它的表达在 16 小时达较高水平。实验组与对照组经过对比后发现, 四逆汤在 8 小时及 16 小时对 SA-AKI 大鼠均有明显治疗作用($P < 0.01$); 其中 16 小时治疗效果最佳($P < 0.01$); 24 小时后虽有治疗作用, 但差异无统计学意义($P > 0.05$); 此外, 通过 ELISA 检测不同组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-18 表达水平发现, IL-1 β 、IL-18 表达均于 8 小时开始明显增高($P > 0.05$), 16 小时达高峰($P < 0.05$), 后于 24 小时开始有下降趋势($P > 0.05$); 8 小时及 16 小时有治疗效果, 但在 24 小时经过四逆汤治疗后与对照组无明显差异($P > 0.05$); 这种结果与 WB 检测结果相符合。出现这种结果的原因可能与脓毒症病理生理有关, 早期感染和相关治疗未采取, 随着时间推移, 随着脓毒症病情的进展, 仅仅使用四逆汤或者初始四逆汤浓度进行治疗并不能完全控制病情的发展, 可能需要增加抗生素等药物或者增加四逆汤药物浓度才能达到治疗效果; 所以在 24 小时后, 各组均无差别。针对这种问题, 可能需要增加四逆汤药物浓度、给药次数等更便于观察。

本研究证实, 四逆汤在脓毒症急性肾损伤中发挥的治疗效果与 NLRP3-Caspase-1-IL-1 β /IL-18 信号通路密切相关, 它可能通过抑制 NLRP3-Caspase-1-IL-1 β /IL-18 信号通路的激活, 减少 IL-1 β 、IL-18 炎性介质的释放而达到治疗作用; 并且这种治疗作用, 在 16 小时达到最佳, 24 小时后开始逐渐失去优势, 因此为临床上开展脓毒症急性肾损伤提供了治疗新思路。但是本研究也存在一定的缺陷, 相关研究表明 NLRP3 炎症小体的激活有两步, 一是与脂多糖(LPS)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和 IL-1 有关, 可促使炎症小体基因的转录, 一是与 ASC 和前半胱氨酸蛋白酶-1 有关, 最终激活该炎症小体[13], 本研究仅仅检测了相关两个蛋白的表达, 未完善与炎症小体相关的蛋白的表达, 故对于 NLRP3 炎症小体的调控作用阐述不够明确, 今后将继续完善实验, 争取为临床治疗提供新思路。

基金项目

贵州省科技计划项目, 项目编号: 黔科合基础-ZK[2024]一般 415。

参考文献

- [1] Wang, Y., Fu, X., Yu, B. and Ai, F. (2019) Long Non-Coding RNA THRIL Predicts Increased Acute Respiratory Distress Syndrome Risk and Positively Correlates with Disease Severity, Inflammation, and Mortality in Sepsis Patients. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, **33**, e22882. <https://doi.org/10.1002/jcla.22882>
- [2] Moon, J., Nakahira, K., Chung, K., DeNicola, G.M., Koo, M.J., Pabón, M.A., et al. (2016) RETRACTED ARTICLE: NOX4-Dependent Fatty Acid Oxidation Promotes NLRP3 Inflammasome Activation in Macrophages. *Nature Medicine*, **22**, 1002-1012. <https://doi.org/10.1038/nm.4153>
- [3] Zhao, W., Zhang, L., Sui, M., Zhu, Y. and Zeng, L. (2016) Protective Effects of Sirtuin 3 in a Murine Model of Sepsis-Induced Acute Kidney Injury. *Scientific Reports*, **6**, Article No. 33201. <https://doi.org/10.1038/srep33201>
- [4] Mishra, S.K. and Choudhury, S. (2018) Experimental Protocol for Cecal Ligation and Puncture Model of Polymicrobial Sepsis and Assessment of Vascular Functions in Mice. In: Tharakan, B., Eds., *Traumatic and Ischemic Injury*, Springer, 161-187. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7526-6_14
- [5] Gong, D., Wang, L., Yang, Y., Zhang, J. and Liu, X. (2019) Diabetes Aggravates Renal Ischemia and Reperfusion Injury in Rats by Exacerbating Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis. *Renal Failure*, **41**, 750-761. <https://doi.org/10.1080/0886022x.2019.1643737>

-
- [6] Vanmassenhove, J., Glorieux, G., Hoste, E., Dhondt, A., Vanholder, R. and Van Biesen, W. (2014) AKI in Early Sepsis Is a Continuum from Transient AKI without Tubular Damage over Transient AKI with Minor Tubular Damage to Intrinsic AKI with Severe Tubular Damage. *International Urology and Nephrology*, **46**, 2003-2008. <https://doi.org/10.1007/s11255-014-0822-y>
- [7] Chen, H., Mao, X., Meng, X., Li, Y., Feng, J., Zhang, L., *et al.* (2019) Hydrogen Alleviates Mitochondrial Dysfunction and Organ Damage via Autophagy-Mediated NLRP3 Inflammasome Inactivation in Sepsis. *International Journal of Molecular Medicine*, **44**, 1309-1324. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4311>
- [8] Luo, Y., Jiang, L., Kang, K., Fei, D., Meng, X., Nan, C., *et al.* (2014) Hemin Inhibits NLRP3 Inflammasome Activation in Sepsis-Induced Acute Lung Injury, Involving Heme Oxygenase-1. *International Immunopharmacology*, **20**, 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.02.017>
- [9] Chun, J., Chung, H., Wang, X., Barry, R., Taheri, Z.M., Platnich, J.M., *et al.* (2016) NLRP3 Localizes to the Tubular Epithelium in Human Kidney and Correlates with Outcome in IgA Nephropathy. *Scientific Reports*, **6**, Article No. 24667. <https://doi.org/10.1038/srep24667>
- [10] Hutton, H.L., Ooi, J.D., Holdsworth, S.R. and Kitching, A.R. (2016) The NLRP3 Inflammasome in Kidney Disease and Autoimmunity. *Nephrology*, **21**, 736-744. <https://doi.org/10.1111/nep.12785>
- [11] Souza, A.C.P., Tsuji, T., Baranova, I.N., Bocharov, A.V., Wilkins, K.J., Street, J.M., *et al.* (2015) TLR4 Mutant Mice Are Protected from Renal Fibrosis and Chronic Kidney Disease Progression. *Physiological Reports*, **3**, e12558. <https://doi.org/10.14814/phy2.12558>
- [12] Lorenz, G., Darisipudi, M.N. and Anders, H. (2013) Canonical and Non-Canonical Effects of the NLRP3 Inflammasome in Kidney Inflammation and Fibrosis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, **29**, 41-48. <https://doi.org/10.1093/ndt/gft332>
- [13] 张浩, 段力军. NLRP3 炎症小体的激活在骨关节疾病中的研究进展[J]. 现代医药卫生, 2024, 40(19): 3375-3380.