

· 基础研究 ·

水晶兰苷通过调节NF- κ B/NLRP3炎症小体通路改善脓毒症相关急性肾损伤和功能障碍

王巧¹, 强静超², 卞乐², 赵盼盼^{1*}, 刘毅^{1*}

¹南京医科大学连云港临床医学院(连云港市第一人民医院)病理科, 江苏 连云港 222000; ²江苏海洋大学药学院, 江苏省海洋生物资源与环境重点实验室, 江苏 连云港 222005

[摘要] 目的: 探讨水晶兰苷(monotropein, MON)对盲肠结扎穿孔(cecum ligation and puncture, CLP)诱导的小鼠脓毒症相关急性肾损伤(sepsis-associated acute kidney injury, S-AKI)的影响及其机制。方法: 将90只BALB/c小鼠随机分为阴性对照(negative control, NC)组、假手术(Sham)组、CLP组、CLP+MON组、Sham+MON组和CLP+地塞米松(dexamethasone, DEX)组。小鼠CLP术后连续5 d腹腔注射药物或等量的生理盐水, 第5天安乐死全部小鼠后, 采集血清和肾脏组织。使用生化试剂盒检测血清中尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)和肌酐(creatinine, CRE)浓度, 以及谷胱甘肽(glutathione, GSH)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平。HE染色评估肾脏组织病理学变化, 激光共聚焦显微镜观察二氢乙啶(dihydroethidium, DHE)染色的肾组织中活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平。ELISA和RT-qPCR检测血清和肾脏组织中肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 、白介素(interleukin, IL)-1 β 和IL-6的水平。Western blot检测NLR家族Pyrin域蛋白3(NLR family pyrin domain containing protein 3, NLRP3)炎症小体和核因子- κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)信号通路蛋白表达。此外, 用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)/腺苷三磷酸(adenosinetriphosphate, ATP)诱导人肾小管上皮细胞(human kidney-2, HK-2)建立体外脓毒症模型, 分为NC组、LPS/ATP组、LPS/ATP+MON组、NLRP3^{OE}+LPS/ATP+MON组和IKK β ^{OE}+LPS/ATP+MON组。CCK-8检测细胞活力, ELISA检测HK-2细胞中炎症因子分泌水平。结果: 与CLP组相比, CLP+MON组小鼠存活率显著增加, 血清BUN和CRE水平显著降低, 黑色的肾组织外观恢复至鲜红色, 肾组织病理学变化明显改善。与CLP组相比, CLP+MON组TNF- α 、IL-1 β 和IL-6水平显著降低, GSH、CAT和T-AOC水平升高, MDA和ROS含量显著下降。Western blot结果显示, 与CLP组相比, CLP+MON组NLRP3、Caspase-1、Cleaved-caspase-1和p-NF- κ B P65蛋白表达显著下降, 核因子 κ B抑制蛋白 α (inhibitor of nuclear factor kappa-B, I κ B α)表达明显增加。此外, 与LPS/ATP+MON组相比, NLRP3^{OE}+LPS/ATP+MON组和IKK β ^{OE}+LPS/ATP+MON组NLRP3炎症小体和NF- κ B通路激活, 逆转了MON对LPS/ATP刺激的HK-2细胞中炎症细胞因子的抑制作用。结论: MON通过抑制NF- κ B/NLRP3炎症小体通路减少炎症因子释放, 从而改善小鼠S-AKI和功能障碍。

[关键词] 水晶兰苷; 脓毒症相关急性肾损伤; NLRP3炎症小体; NF- κ B

[中图分类号] R692; R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2025)01-1-12

doi: 10.7655/NYDXBNSN240608

Monotropein improves sepsis - associated acute kidney injury and dysfunction by regulating the NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway

WANG Qiao¹, QIANG Jingchao², BIAN Le², ZHAO Panpan^{1*}, LIU Yi^{1*}

¹Department of Pathology, Lianyungang Clinical Colledge of Nanjing Medical University(The First People's Hospital of Lianyungang), Lianyungang 222000; ²College of Pharmacy, Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Environment, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of monotropein(MON) on sepsis-associated acute kidney injury(S-AKI) induced by cecum ligation and puncture(CLP) in mice and the underlying mechanisms. **Methods:** A total of 90 BALB/c mice were randomly

[基金项目] 2023年江苏省卫健委面上项目(H2023145); 连云港市卫生科技项目

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhaopp19@mails.jlu.edu.cn(ORCID: 0000-00002-2494-3148); 18905130006@189.cn(ORCID: 0009-0006-6703-8611)

divided into a negative control (NC) group, a Sham group, a CLP group, a CLP+MON group, a Sham+MON group, and a CLP+dexamethasone (DEX) group. Drug or equivalent saline was injected intraperitoneally once daily for consecutive five days after CLP. After all mice were euthanized on day 5, serum and kidney tissues were collected for subsequent experiments. Blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (CRE) concentrations in the serum were detected by biochemical kits, as well as renal oxidative stress related indicators, such as glutathione (GSH), catalase (CAT), total antioxidant capacity (T-AOC) and malondialdehyde (MDA) levels. The pathological changes of renal tissues were observed by the H&E staining, and the levels of reactive oxygen species (ROS) in renal tissues stained with dihydroethidium (DHE) were observed by laser confocal microscopy. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β and IL-6 in the serum and kidney tissues were detected by ELISA and RT-qPCR. Western blot was used to detect the protein expression levels of NLR family pyrin domain containing protein 3 (NLRP3) inflammasome and nuclear factor kappa-B (NF- κ B) signaling pathway. In addition, lipopolysaccharide (LPS)/adenosine triphosphate (ATP) was used to induce HK-2 cells to establish an *in vitro* sepsis model. Cell experiments were divided into a NC group, a LPS/ATP group, a LPS/ATP+MON group, a NLRP3^{OE}+LPS/ATP+MON group and a IKK β ^{OE}+LPS/ATP+MON group. CCK-8 was used to detect the cell viability, and ELISA was used to detect the secretion of inflammatory cytokines in HK-2 cells. **Results:** Compared with the CLP group, the survival rate of mice in the CLP+MON group was significantly increased, the appearance of renal tissues was restored from black to bright red, the serum BUN and CRE levels were significantly decreased, and the abnormal pathological changes of renal tissues with increased inflammatory cells were significantly improved. Compared with the CLP group, the levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 were significantly decreased, GSH, CAT, and T-AOC levels were increased, and MDA and ROS levels were significantly decreased in the MON treatment group. Western blot results showed that compared with the CLP group, the expression levels of NLRP3, Caspase-1, Cleaved-Caspase-1, and p-NF- κ B P65 protein in the CLP+MON group decreased significantly, but the expression levels of inhibitor of nuclear factor kappa-B α (IKK α) increased significantly. In addition, NLRP3^{OE}+LPS/ATP+MON group and IKK β ^{OE}+LPS/ATP+MON group activated NLRP3 inflammasome and NF- κ B pathway, and reversed the inhibitory effect of MON on inflammatory cytokines in the LPS/ATP-stimulated HK-2 cells, compared with the LPS/ATP+MON group. **Conclusion:** MON reduces the release of inflammatory factors by inhibiting the NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway to improve mouse S-AKI and dysfunction.

[Key words] monotropein; sepsis-associated acute kidney injury; NLRP3 inflammasome; NF- κ B

[J Nanjing Med Univ, 2025, 45(01): 1-12]

脓毒症是由细菌、真菌、病毒及寄生虫等引起的全身炎症反应综合征, 常见于严重的创伤或感染性疾病患者。器官衰竭在脓毒症病理生理过程中起着至关重要的作用, 对脓毒症的死亡率有着直接且显著的影响^[1]。肾脏是脓毒症中最先受损的器官之一, 高达2/3的脓毒症或脓毒性休克患者会发生急性肾损伤。脓毒症相关急性肾损伤(sepsis-associated acute kidney injury, S-AKI)是脓毒症的重要并发症之一, 具有较高的发病率和死亡率, 已成为全球重要的公共健康问题^[2]。了解S-AKI的发病机制将为其早期诊断和治疗策略的发展奠定基础, 对于提高脓毒症患者的生存率和生活质量具有重要意义。

S-AKI的发病机制非常复杂, 涉及多种因素的协同作用, 主要包括异常的炎症调节、氧化应激和细胞凋亡等^[3]。炎症反应是宿主抵抗感染的主要防御机制, 在启动和介导损伤后功能恢复的过程中发挥着至关重要的作用。当机体遭遇有害刺激时, 正常的炎症反应会被触发以进行防御。然而在S-AKI中, 这种炎症反应会出现失调, 主要表现为过度激活。炎症反应失调是导致S-AKI发病过程加剧的关

键因素^[4]。S-AKI的主要原因是病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP)和损伤相关分子模式(damage-associated molecular patterns, DAMP)的持续刺激。脓毒症发生时, PAMP和DAMP激活免疫系统, 启动细胞内的分子级联反应, 进而引发炎症反应和氧化应激, 最终导致肾组织损伤和器官功能障碍^[5]。

核因子- κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)是一种转录因子, NF- κ B通路在脓毒症的发病机制中起着关键作用, 它能够调控多种炎症相关基因的表达, 例如促炎细胞因子肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 和白介素(interleukin, IL)-1 β 。抑制NF- κ B通路可以阻断过度的炎症反应, 从而减轻组织损伤^[6]。研究表明, NF- κ B通路的激活可以调控NLR家族Pyrin域蛋白3(NLR family pyrin domain containing protein 3, NLRP3)炎症小体的表达和激活。此外, 活性氧(reactive oxygen species, ROS)也可以触发NF- κ B介导的NLRP3炎症小体激活。NLRP3炎症小体是由NLRP3、含CARD的凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD,

ASC)和半胱天冬氨酸蛋白酶1(Caspase-1)组成的复合体。当NLRP3炎症小体被激活时,Caspase-1自我剪切并活化,促进炎症因子(如IL-1 β 和IL-18)的成熟与分泌。研究表明,在脓毒症动物模型中,NLRP3炎症小体的表达水平显著上调,并伴随炎症介质的释放增加^[7]。抑制NLRP3炎症小体的激活能够减轻炎症反应和组织损伤,保护机体免受脓毒症的侵袭。由于NF- κ B通路和NLRP3炎症小体在脓毒症中的关键作用,抑制NF- κ B/NLRP3炎症小体通路可能成为治疗脓毒症的有效策略。

由于天然化合物具有多靶点特性和不良反应小或无不良反应的优点,它们成为抗肾毒性药物开发的潜在候选者。水晶兰苷(monotropein, MON)是巴戟天的主要环烯醚萜苷类成分,具有抗炎、抗氧化和抗细胞凋亡等多种药理活性^[8]。MON已被证明可以减轻过氧化氢(H₂O₂)诱导的氧化应激和炎症^[9]。研究表明,MON通过抑制TLR4/NF- κ B/NLRP3通路可减轻肝损伤^[10]。MON通过激活NRF2/PINK轴诱导自噬可缓解脓毒症相关结肠损伤^[11]。然而,MON对S-AKI的影响尚未被完全阐明。本研究采用盲肠结扎穿孔(cecum ligation and puncture, CLP)建立小鼠S-AKI模型和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)/腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)刺激人肾小管上皮细胞(human kidney-2, HK-2)建立体外脓毒症模型,旨在探讨MON对S-AKI的影响及其机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物

6周龄,体重20~25 g SPF级雄性BALB/c小鼠购自扬州大学动物实验中心。将小鼠置于温度(25 \pm 2)℃、相对湿度(55 \pm 15)%的环境中饲养,自由饮水饮食所有动物实验均按照3R原则进行。本研究涉及的所有动物实验均已通过江苏海洋大学动物伦理委员会的审查和批准(批准号:2022221091)。在动物实验中严格遵照《NIPRD标准操作程序(NIPRD/05.03.05-1)》和实验动物护理原则(NIH出版物第85-23号,1985年修正)。

1.1.2 试剂

MON(CAS# 5945-50-6, HPLC纯度 \geq 98%,上海Aladdin生化科技股份有限公司),其化学结构式如图1A所示;地塞米松(dexamethasone, DEX)(Med Chemexpress公司,美国);HK-2细胞(武汉旗赛生物

科技公司);尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)测定干片(比色法)和肌酐(creatinine, CRE)测定干片(速率法)试剂盒(奥森多临床诊断公司,美国);谷胱甘肽(glutathione, GSH)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所);NLRP3、Caspase-1、Cleaved-caspase-1和 β -actin一抗(武汉三鹰生物技术有限公司);核因子 κ B抑制蛋白(inhibitor of nuclear factor kappa-B, I κ B α)和p-NF- κ B p65一抗以及辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记山羊抗鼠和抗兔IgG二抗(沈阳万类生物科技有限公司);TNF- α 、IL-1 β 和IL-6 ELISA试剂盒(江苏酶免实业有限公司);胎牛血清(上海生工生物工程股份有限公司);青霉素-链霉素溶液和DMEM/F-12培养基(武汉塞维尔生物科技有限公司);ECL化学发光检测试剂盒、TRIzol试剂、逆转录试剂盒和荧光定量PCR试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司);CCK-8试剂盒和甲醛溶液(安徽白鲨生物科技有限公司);LPS和ATP(Sigma-Aldrich公司,美国);二氢乙啶(dihydroethidium, DHE)、RIPA裂解液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、BCA蛋白浓度测定试剂盒、DAPI染色液和Lipo6000™转染试剂(上海碧云天生物技术有限公司);pCMV-Myc-I κ kbk(human)和pCMV-NLRP3(human)-3 \times FLAG-Neo质粒(武汉淼灵生物科技有限公司);PCR引物(安徽通用生物系统有限公司)。引物序列如下:TNF- α (上游5'-GACGTG-GAACTGGCAGAAGA-3';下游5'-GGCTACAGGCTT-GTCACTCG-3'),IL-1 β (上游5'-TGCCTTCTT-GGGACTGATGC-3';下游5'-GCAAGTGCATCGTT-GTTC-3'),IL-6(下游5'-AGGAGAACCAAGCAAC-GACA-3';下游5'-CTCTGCTTGTGAGGTGCTGA-3')。

1.1.3 仪器

VITROS 4600全自动生化分析仪(强生公司,美国);Light Cycler480实时荧光定量PCR仪(罗氏公司,美国);蛋白电泳和转印仪(伯乐公司,美国);化学发光成像仪(杭州申花科技有限公司);恒温培养箱(WIGGENS公司,德国);全波长酶标仪(BioTek公司,美国)。

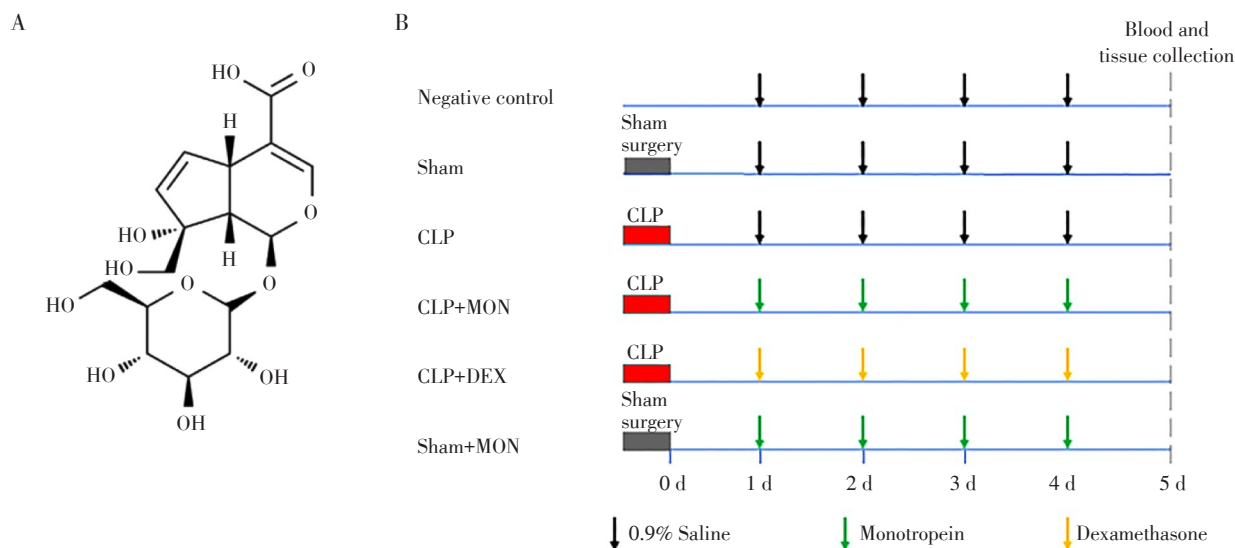
1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理

实验开始前,所有小鼠均适应环境1周。小鼠被随机分为6组(每组15只):阴性对照(negative control, NC)组、假手术(Sham)组、CLP组、CLP+MON

组、Sham+MON组和CLP+DEX组。通过腹腔注射氯胺酮(100 mg/kg)麻醉小鼠,在腹部中线切口以暴露盲肠,在回盲瓣远端分离并用3号丝线结扎盲肠。用21号针穿刺两次,挤出少许粪便,然后放回腹腔并缝合腹膜。皮下注射0.1 mL无菌生理盐水进行液体复苏^[12]。Sham组仅切开腹部并缝合切口,不

行盲肠结扎和穿刺。CLP术后连续5 d,每日1次腹腔注射药物或生理盐水。Sham+MON组和CLP+MON组小鼠腹膜内注射MON(20 mg/kg),CLP+DEX组给予DEX(2 mg/kg),其余各组注射等量生理盐水。每天监测各组小鼠存活率,第5天采集血液、安乐死全部小鼠后,采集肾脏皮质用于后续实验(图1B)。



A: Chemical structure formula of Monotropein. B: Experimental procedure.

图1 MON化学结构式和实验设计流程图

Figure 1 Chemical structure formula of MON and experimental design flow chart

1.2.2 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色

肾组织用4%多聚甲醛固定24 h,石蜡包埋后制备4 μm厚的切片,用HE染色切片。使用光学显微镜观察图像并进行病理学评分。由病理学家按照炎症细胞浸润程度进行评分。没有炎症细胞浸润计为0分,轻度炎症细胞浸润(40倍镜视野下可见1~10个炎症细胞)计为1分,中度炎症细胞浸润(11~50个炎症细胞)计为2分,重度炎症细胞浸润(>50个炎症细胞)计为3分。

1.2.3 生化指标检测

血液样本4℃静置过夜,第2天将样本在8 000 g 4℃离心10 min。按照生产商提供的说明,使用VITROS Chemistry Products BUN Slides和VITROS Chemistry Products CRE Slides商用试剂盒,在VITROS 4600全自动生化分析仪上检测BUN和CRE含量。

1.2.4 氧化应激指标检测

制备肾组织匀浆液,使用GSH、CAT、T-AOC和MDA试剂盒分别在412 nm、405 nm、520 nm和532 nm波长下,用多功能微孔板检测器测定吸光度,计算

酶活性或产品含量。

1.2.5 ROS检测

肾脏组织速冻后切片,分别使用5 μmol/L DHE和DAPI对肾组织进行ROS和细胞核染色。通过共聚焦显微镜进行成像,随机选取10个视野计算平均荧光强度。

1.2.6 RT-qPCR

使用TRIzol试剂从小鼠肾组织中提取总RNA,用MonScript RT III Super Mix将其逆转录为cDNA。用SYBR Green qPCR Mix配制RT-qPCR反应体系,按照制造商的说明在实时荧光定量PCR仪上设定反应程序并进行PCR检测。以β-actin为内参基因,采用2^{-ΔΔCT}法计算各靶基因的mRNA表达水平。

1.2.7 ELISA

收集血清和细胞培养上清液,按照ELISA试剂盒说明,检测TNF-α、IL-1β和IL-6的水平。首先,将梯度稀释的标准品和待测样本加入酶标板,37℃孵育0.5 h。接着,添加酶标试剂并在37℃避光条件下孵育0.5 h。加入1×TMB显色液,室温避光孵育10 min后,用2 mol/L H₂SO₄终止反应,使用酶标仪在

450 nm处测定样品吸光度。最后,绘制标准曲线并计算待测样品中细胞因子的含量。

1.2.8 HK-2细胞培养和处理

HK-2细胞在含10%胎牛血清和1%抗生素(100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素)的DMEM/F12培养基中培养。首先用MON(32 μ mol/L)预刺激细胞2 h,然后用LPS(1 μ g/mL)继续刺激6 h和ATP(5 mmol/L)刺激0.5 h,以建立MON干预的脓毒症诱导的肾损伤细胞模型。

1.2.9 CCK-8检测

将HK-2细胞以 1×10^5 个/孔的浓度接种在96孔板中。用不同浓度梯度的MON(0、4、8、16、32、64、128、256 μ mol/L)处理细胞12 h。然后每孔加入10 μ L的CCK-8试剂,置于37 $^{\circ}$ C培养箱中继续孵育2 h。最后,用酶标仪测定450 nm波长处的吸光度。

1.2.10 细胞转染

根据Lipo6000™转染试剂说明书,将含有pCMV-Myc-Ikbbk(human)和pCMV-NLRP3(human)-3 \times FLAG-Neo质粒DNA的培养基加入Lipo6000™溶液中制备质粒DNA-脂质体复合物,然后将DNA-脂质体复合物加入含有HK-2细胞的培养基中混匀。将细胞置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的培养箱中培养,6 h后更换为含2%胎牛血清的DMEM/F12培养基,继续培养48 h后,用于后续实验。

1.2.11 Western blot检测

使用RIPA裂解液制备肾组织蛋白样本,随后

用BCA试剂盒测定蛋白浓度。将等量蛋白样本通过12% SDS-PAGE进行蛋白分离,然后将蛋白转移到PVDF膜上,用5%脱脂奶粉室温封闭膜1 h。将PVDF膜与稀释好的一抗在4 $^{\circ}$ C孵育过夜,第2天将膜与HRP标记的二抗孵育室温1 h。TBST清洗膜3次,每次10 min。最后,使用ECL化学发光液对蛋白进行曝光显影。使用Image J软件分析蛋白条带的灰度值。 β -actin作为内参,用于定量每种蛋白的相对表达水平。

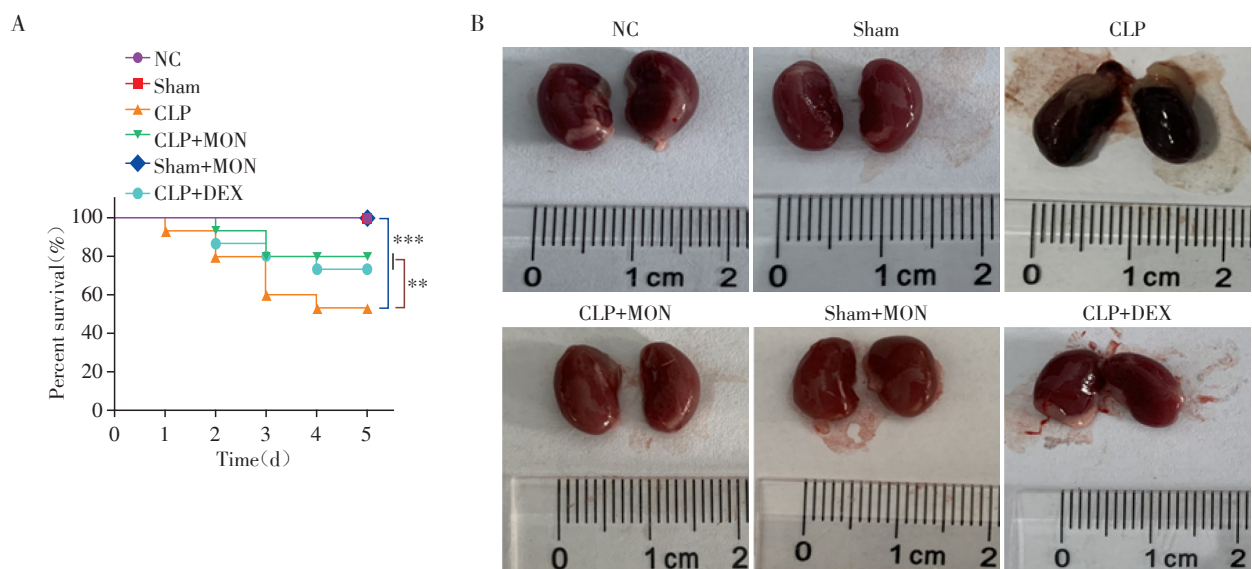
1.3 统计学方法

采用GraphPad Prism 9.5.1软件对实验数据进行统计学分析,数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组之间的比较采用 t 检验,多组比较采用单因素方差分析,随后用Tukey检验进行组间差异比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MON改善S-AKI小鼠存活率和肾脏外观

生存曲线结果显示,CLP组小鼠的死亡率较Sham组明显上升($P < 0.001$),表明成功建立了CLP诱导的小鼠模型;与CLP组相比,CLP+MON组和CLP+DEX组小鼠的死亡率下降($P < 0.01$ 、 $P < 0.001$),CLP+MON组与CLP+DEX组小鼠存活率接近,差异无统计学意义(图2A),证实MON可以提高CLP小鼠的存活率。进一步采集各组小鼠的新鲜肾脏并观察其外观,如图2B所示,与NC组和Sham组相比,CLP组肾脏外观颜色明显发黑。与CLP组相比,



A: The survival curve of mice in each group. B: Pictures of fresh kidneys of mice in each group. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ ($n=15$).

图2 MON对S-AKI小鼠存活率及肾脏外观的影响

Figure 2 Effects of MON on the survival rate and kidney appearance in the S-AKI mice

MON处理组和阳性对照药DEX处理组均显著改善了肾脏的颜色和质地,可将CLP诱导的肾组织病变颜色逐渐恢复正常鲜红色。以上结果表明,MON可减轻CLP引起的急性肾损伤。

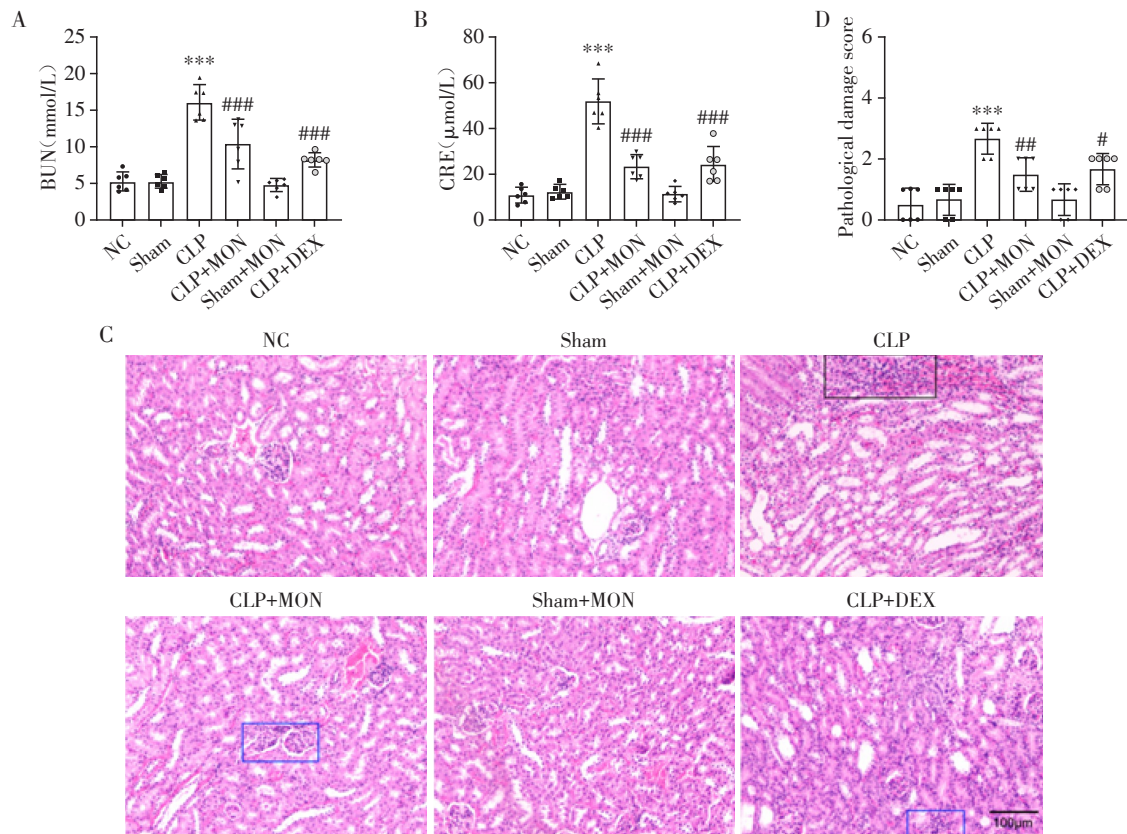
2.2 MON缓解S-AKI小鼠肾功能障碍和组织病理损伤

BUN和CRE是检测肾功能的关键指标,其浓度异常升高提示肾功能损伤。如图3A、B所示,NC组、Sham组和Sham+MON组的BUN和CRE水平差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。与Sham组相比,CLP组的BUN和CRE水平均显著升高(P 均 < 0.001)。然而MON或DEX均可降低S-AKI小鼠BUN和CRE浓度(P 均 < 0.001)。此外,HE染色结果显示,NC组、Sham组和Sham+MON组肾脏组织学形态正常,未见明显的炎症细胞。与Sham组相比,CLP组可见明显的炎症细胞浸润。然而,这一现象可通过MON治疗得到显著改善(图3C)。综上所述,MON可有效缓解CLP引起的肾功能指标的异常变化,并减轻肾脏的病理损伤。

2.3 MON缓解S-AKI小鼠肾脏氧化应激

S-AKI涉及多种病理生理学机制,其中氧化应激是脓毒症并发多器官功能障碍的关键发病机制之一。长期暴露于高水平的ROS会导致机体氧化还原系统失衡^[13]。如图4所示,与Sham组相比,CLP组小鼠肾组织中GSH、CAT和T-AOC水平显著降低($P < 0.01$),MDA含量显著升高($P < 0.001$),表明S-AKI小鼠肾脏氧化还原系统平衡被破坏。与CLP组相比,MON治疗部分逆转上述氧化应激相关指标($P < 0.05$)。这些结果表明,MON可通过增强机体的抗氧化酶活性和降低MDA含量,从而减轻脓毒症诱导的肾脏氧化损伤。

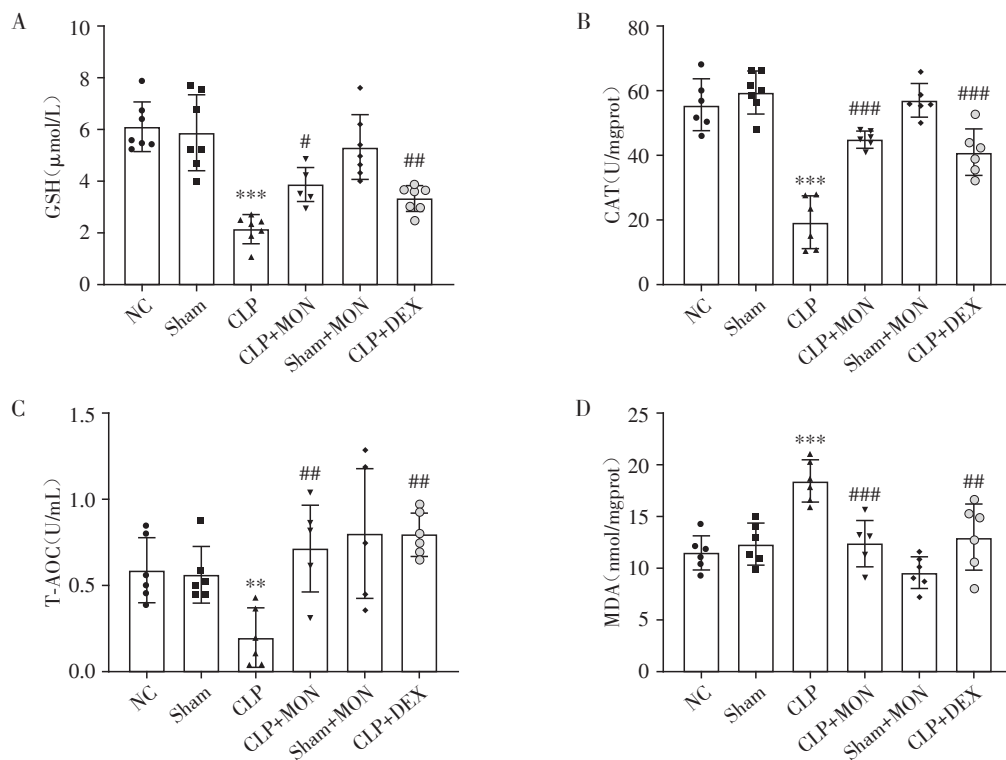
DHE染色检测肾组织ROS水平,发现与Sham组相比,CLP组红色荧光标记的ROS荧光强度明显增加($P < 0.001$),而CLP+MON组的ROS水平较CLP组明显下降($P < 0.001$)。这表明CLP可诱导小鼠肾脏ROS过度产生,而MON可以减少ROS水平,从而缓解S-AKI小鼠的氧化应激损伤(图5)。



A, B: Levels of BUN and CRE in the serum in each group of mice. C: HE staining images of mice kidney tissues($\times 100$). Scale bar=100 μ m. Black boxes indicated severe inflammatory cell infiltration and blue boxes indicated moderate inflammatory cell infiltration. D: The renal tissue pathological damage score. Compared with the sham group, $^{***}P < 0.001$; compared with the CLP group, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and $^{***}P < 0.001$ ($n=6$).

图3 MON对S-AKI小鼠肾功能障碍及组织病理损伤的影响

Figure 3 Effects of MON on the kidney dysfunction and histopathological injury in the S-AKI mice



A: GSH content of mice in each group. B: CAT activity of mice in each group. C: T-AOC content of mice in each group. D: MDA content of mice in each group. Compared with the sham group, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$; compared with the CLP group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ ($n=6$).

图4 MON对S-AKI小鼠肾脏氧化应激相关指标的影响

Figure 4 Effects of MON on kidney oxidative stress related indicators in the S-AKI mice

2.4 MON缓解S-AKI小鼠肾脏炎症反应

脓毒症期间肾脏最主要的病理生理改变是体内失衡的炎症反应,其贯穿脓毒症的整个发展过程。研究表明,脓毒症的发生与炎症细胞因子的释放密切相关。促炎细胞因子的过度释放可导致器官损伤,增加脓毒症的发病率和死亡率^[14]。本研究采用RT-qPCR和ELISA分别检测各组小鼠肾组织和血清中炎症因子水平。结果显示,与Sham组相比,CLP组小鼠肾脏中TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的mRNA表达水平显著增加($P < 0.001$)。然而,CLP+MON组上述炎症因子的转录水平较CLP组降低($P < 0.001$,图6A~C)。在小鼠血清中也观察到类似的结果趋势,与Sham组相比,CLP组小鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的水平明显增加($P < 0.001$,图6D~F),而MON治疗组部分逆转了这一变化($P < 0.05$)。这些结果表明MON通过抑制S-AKI小鼠肾组织中促炎细胞因子的释放,发挥良好的抗炎活性。

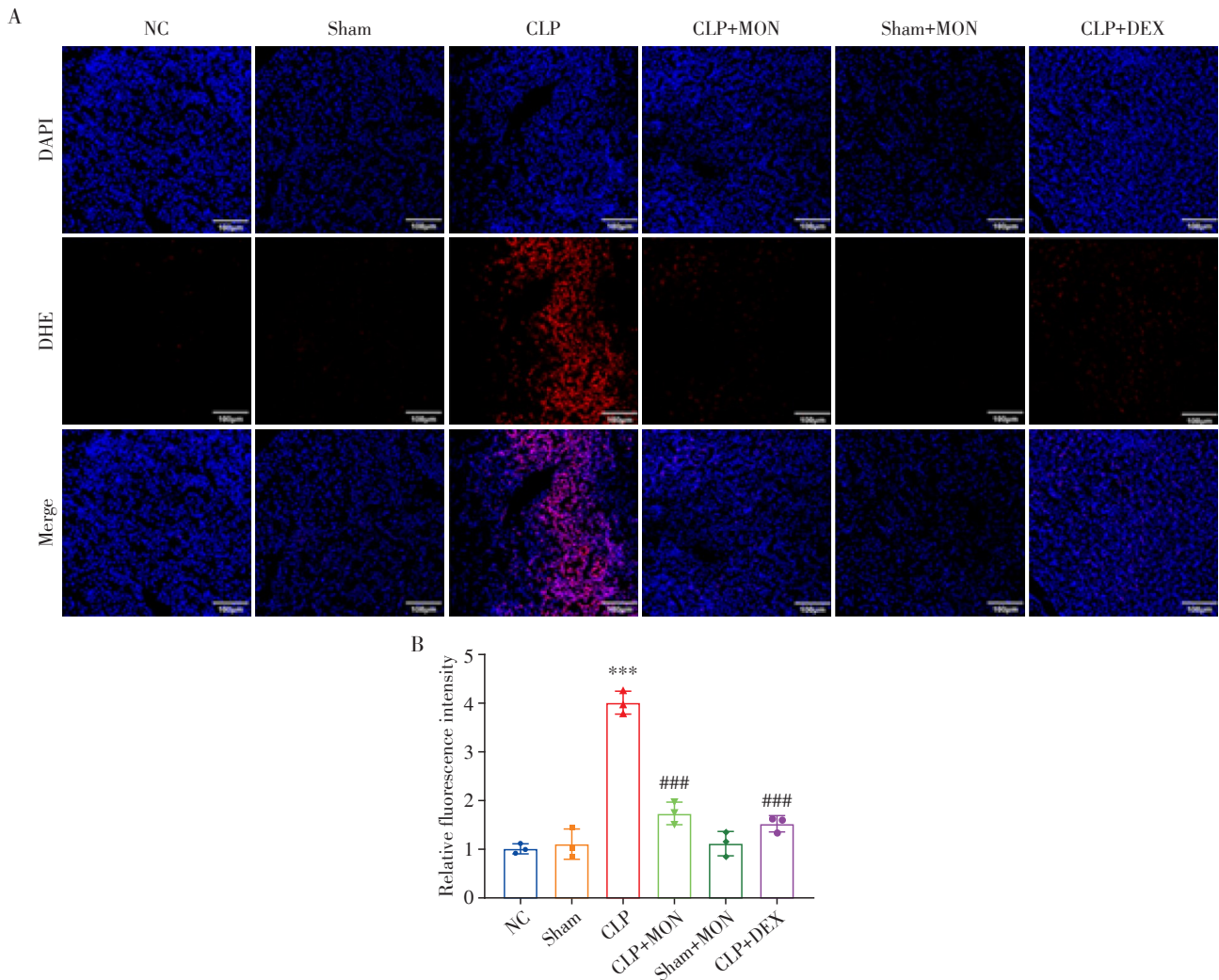
2.5 MON抑制S-AKI小鼠肾脏NLRP3炎性小体和NF-κB信号通路激活

NLRP3炎性小体参与调控脓毒症引起的炎症反应,其异常活化可促进炎症细胞因子和炎性介质

的过度释放^[15]。NF-κB是一种重要的炎症信号通路,主要参与调控促炎细胞因子的信号级联反应。因此,本研究探讨了MON对NF-κB/NLRP3炎症小体通路的影响。如图A~D所示,与Sham组相比,CLP组NLRP3、Caspase-1和Cleaved-Caspase-1的蛋白表达显著升高($P < 0.05$)。与CLP组相比,CLP+MON组NLRP3、Caspase-1和Cleaved-Caspase-1的蛋白表达明显下降($P < 0.05$),表明MON抑制了S-AKI中NLRP3炎性小体的激活。此外,CLP激活了NF-κB信号通路,表现为p-NF-κB P65蛋白表达增加,IκB α 水平降低($P < 0.05$,图7E~G)。相比之下,MON处理组肾脏IκB α 蛋白表达升高,并降低了NF-κB P65磷酸化水平($P < 0.05$)。这些结果表明,MON可能通过抑制S-AKI小鼠肾脏NF-κB信号通路和NLRP3炎性小体的激活减轻炎症。

2.6 MON以NF-κB/NLRP3炎性小体通路依赖的方式抑制LPS/ATP诱导的HK-2细胞炎症

为进一步阐明MON发挥抗炎作用的分子机制,采用HK-2细胞体外模拟S-AKI。CCK-8结果显示,MON在0、4、8、16、32、64 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对HK-2细胞活性无明显影响,但在128、256 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下显



A: ROS levels in the kidney tissues were measured by the DHE staining, where the red fluorescence signal indicates ROS accumulation. Scale bar = 100 μ m. B: The mean fluorescence intensity of ROS was quantified using Image J software. Compared with the sham group, *** $P < 0.001$; compared with the CLP group, ### $P < 0.001$ ($n=3$).

图5 MON对S-AKI小鼠肾脏ROS水平的影响

Figure 5 Effect of MON on the kidney ROS levels in the S-AKI mice

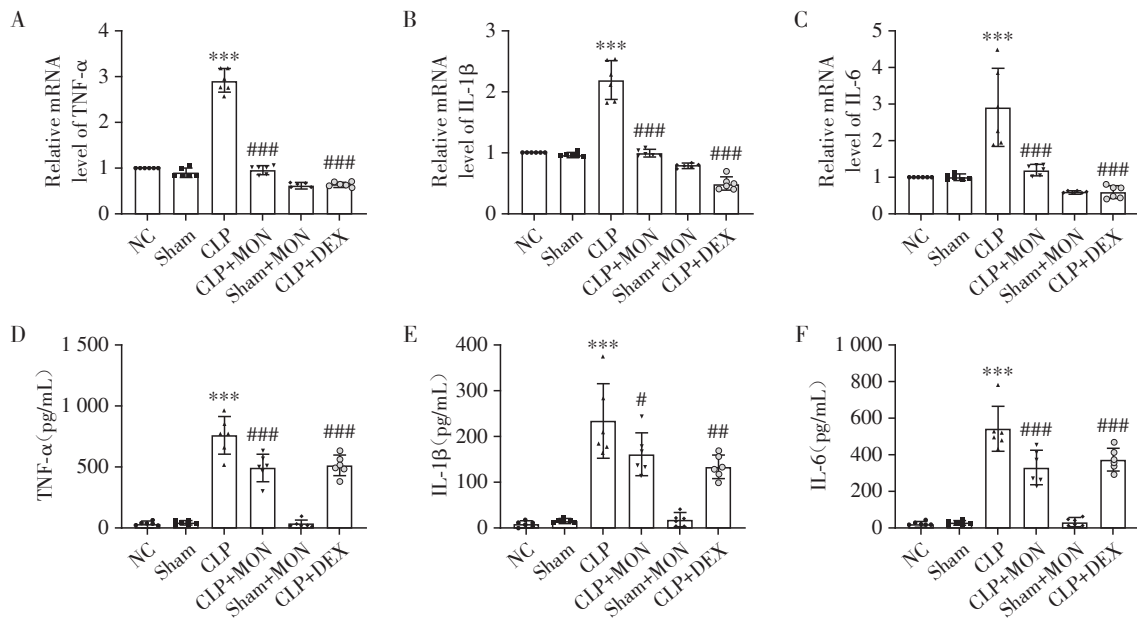
著抑制HK-2细胞活力($P < 0.01$, 图8A)。本研究选择32 μ mol/L MON对LPS/ATP刺激的HK-2细胞进行干预实验。同时,为了阐明MON的抗炎作用是否依赖于NLRP3炎性小体和NF- κ B通路,在HK-2细胞中进行了NLRP3和IKK β 过表达的研究(图8B、C)。研究发现,与NC组相比,LPS/ATP组细胞培养上清中TNF- α 、IL-1 β 和IL-6水平显著升高($P < 0.05$)。与LPS/ATP组相比,LPS/ATP+MON组TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的分泌水平明显降低($P < 0.05$)。与LPS/ATP+MON组相比,过表达NLRP3(NLRP3^{OE}+LPS/ATP+MON组)和IKK β (IKK β ^{OE}+LPS/ATP+MON组)均增加了IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平,逆转了MON抑制炎症因子释放的有益作用($P < 0.05$, 图8D~F)。这些结果表明,MON可能通过NF- κ B/NL-

RP3炎性小体通路依赖的方式减轻LPS/ATP诱导的HK-2细胞炎症反应。

3 讨论

脓毒症可导致多器官功能障碍,其中S-AKI是危重患者的常见并发症。S-AKI的发病机制复杂,涉及多种病理生理学变化,其具体分子机制尚未完全阐明。本研究采用CLP建立S-AKI小鼠模型,研究MON对S-AKI小鼠肾功能障碍和组织病理学损伤的影响,并从炎症和氧化应激方面探讨MON的潜在作用机制。

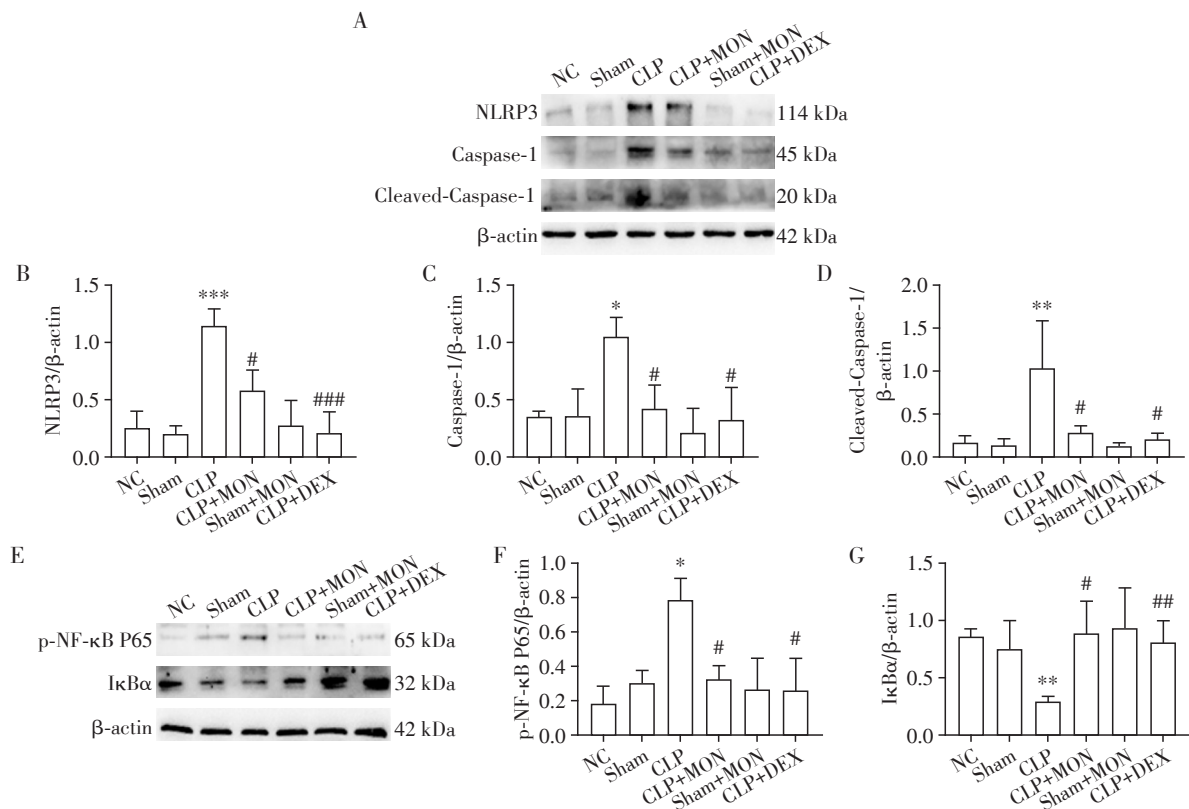
BUN和CRE是肾功能检查的主要检测指标,其异常升高与肾脏病理改变密切相关^[16]。通过测量这些指标,可评估肾损伤程度和MON的治疗效果。



A-C: The mRNA expression levels of TNF- α (A), IL-1 β (B) and IL-6 (C) in the kidney tissues were measured by RT-qPCR. D-F: ELISA was used to measure the secretion levels of TNF- α (D), IL-1 β (E) and IL-6 (F) in the serum of mice. Compared with the sham group, *** P < 0.001; compared with the CLP group, # P < 0.05, ## P < 0.01, and ### P < 0.001 (n =6).

图6 MON对S-AKI小鼠肾组织和血清中促炎细胞因子释放的影响

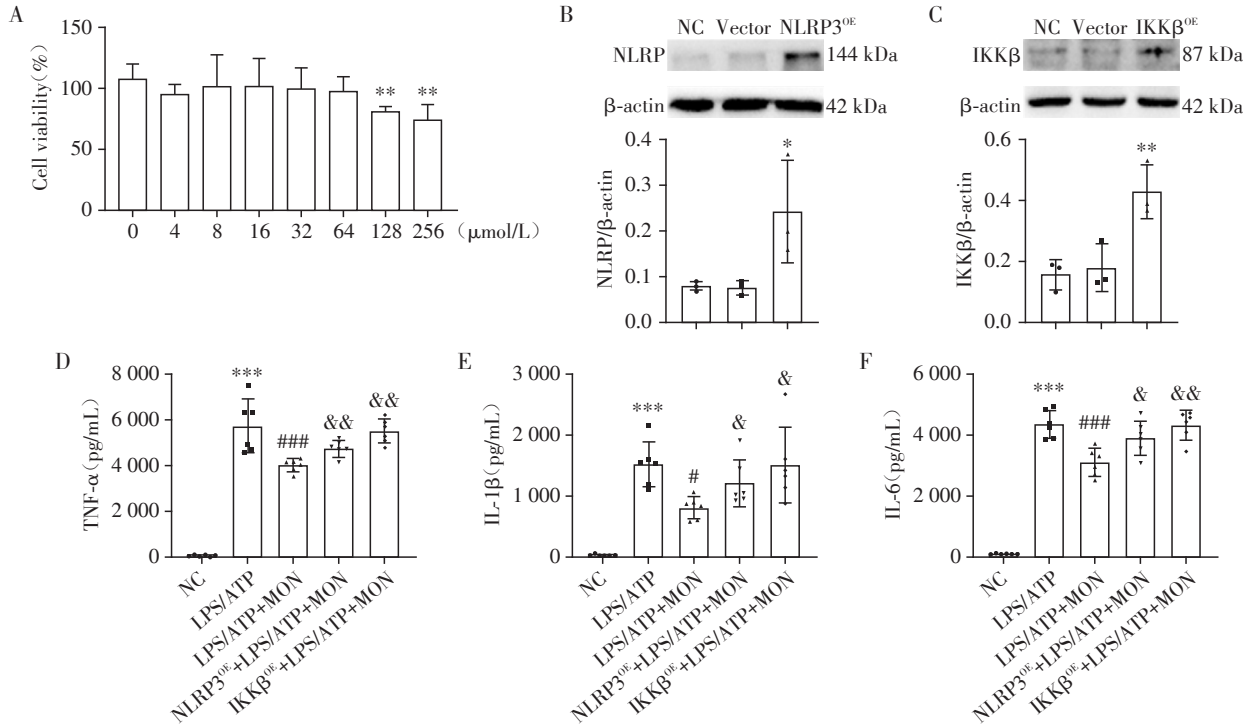
Figure 6 Effects of MON on the release of pro-inflammatory cytokines in kidney tissues and the serum of the S-AKI mice



A: Western blot was used to detect the protein expressions of NLRP3, Caspase-1, and Cleaved-Caspase-1 in the kidney. B-D: Quantification of NLRP3 (B), Caspase-1 (C), and Cleaved-Caspase-1 (D) protein expression levels. E: Western blot was used to detect the protein expression levels of p-NF- κ B P65 and I κ B α in the kidney. F, G: Quantification of p-NF- κ B P65 (F) and I κ B α (G) protein expression. Compared with the sham group, * P < 0.05, ** P < 0.01, and *** P < 0.001; compared with the CLP group, # P < 0.05, ## P < 0.01, and ### P < 0.001 (n =3).

图7 MON对S-AKI小鼠肾脏NLRP3炎症小体激活和NF-κB信号通路的影响

Figure 7 Effects of MON on NLRP3 inflammasome activation and NF- κ B signaling pathway in the kidney of the S-AKI mice



A: CCK-8 assay was used to determine the safe concentration of MON in HK-2 cells. B: Western blot was used to detect the expression levels of NLRP3 protein in HK-2 cells transfected with pCMV-NLRP3(human)-3×FLAG-Neo plasmid($n=3$). C: Western blot was used to detect the expression levels of IKK β protein in HK-2 cells transfected with pCMV-Myc-Ikkkb(human) plasmid($n=3$). D-F: ELISA was used to measure the secretion levels of TNF- α (D), IL-1 β (E) and IL-6(F) in HK-2 cells of the NC, LPS/ATP, LPS/ATP+MON, NLRP3^{OE}+LPS/ATP+MON, and IKK β ^{OE}+LPS/ATP+MON groups($n=6$). Compared with the NC group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$; compared with the LPS/ATP group, ### $P < 0.001$; compared with the LPS/ATP+MON group, & $P < 0.05$ and && $P < 0.01$.

图8 MON对LPS/ATP刺激的HK-2细胞中炎症细胞因子分泌的影响

Figure 8 Effects of MON on the secretion of inflammatory cytokines in the LPS/ATP-stimulated HK-2 cells

本研究发现CLP导致血清BUN和CRE水平异常升高,而MON可降低这些异常肾功能指标水平。S-AKI小鼠的肾组织病理学改变具有高度异质性。大多数病例不表现急性肾小管坏死,但肾组织可表现出从正常到严重异常的一系列变化,其中弥漫性肾炎症是这一过程中的重要阶段^[17]。本研究发现在S-AKI小鼠模型中可见炎症细胞浸润的病理变化,而MON可减轻肾组织病理学损伤。

氧化应激是脓毒症并发多种器官功能障碍的关键发病机制之一,在S-AKI中起着重要作用。脓毒症会导致体内ROS的过度产生,持续增强的氧化应激通过损耗内源性抗氧化酶,引发一系列如膜脂质过氧化等细胞结构和功能的破坏,最终导致肾组织的严重损伤^[18]。MDA是脂质过氧化的最终产物,可用于评估细胞膜脂质过氧化水平。MDA的含量可以反映细胞损伤和机体氧化应激程度。谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和CAT是

机体主要的抗氧化酶,可保护细胞免受氧化应激损伤。MON的抗氧化作用已被多项研究证实,例如MON通过降低MDA水平和增加GSH、SOD和CAT的活性来抑制顺铂诱导的氧化应激^[19]。本研究结果证实了S-AKI小鼠肾脏组织发生氧化应激,MON可以通过增加GSH、CAT和T-AOC水平,抑制肾脏ROS和MDA积累发挥抗氧化应激作用。

炎症在脓毒症发病机制中起着至关重要的作用,缓解炎症反应是治疗S-AKI的一种非常有效的策略。大量研究报道,MON可在多种疾病模型中发挥抗炎作用。例如,MON可以下调皮肤组织中的促炎细胞因子减轻特异性皮炎样皮肤炎症^[20]。MON通过AKT通路减轻阿霉素诱导的心脏炎症和心功能不全^[21]。脓毒症感染引发的全身炎症反应是一个复杂的病理生理过程,脓毒症发病过程中会释放大量炎性细胞因子,例如TNF- α 、IL-1 β 和IL-6等。这些细胞因子通过触发一系列炎症反应和免疫调节过程,在脓毒症的发生和发展中发挥重要作用。

TNF- α 是脓毒症早期释放的关键细胞因子之一,能够触发一系列炎症反应,包括激活内皮细胞、诱导其他炎性细胞因子的产生等。IL-1 β 能够促进炎症级联反应,诱导各种炎症基因的表达,如IL-6、IL-8等。IL-6在脓毒症的早期阶段快速升高,其异常升高提示患者有发生脓毒症的高危风险,IL-6能更好评估脓毒症患者的预后^[22]。本研究发现S-AKI小鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 和IL-6分泌水平显著升高,肾组织中这些促炎细胞因子的基因转录水平也明显升高。然而MON显著降低血清和肾组织中TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的水平,表明MON可以减轻S-AKI小鼠肾脏炎症。

众所周知,NF- κ B通路在炎症和免疫反应中起着关键作用,NF- κ B的过度激活与脓毒症期间炎症反应密切相关^[23]。NLRP3炎症小体是一种细胞内的多蛋白复合物,在脓毒症和多器官功能衰竭中发挥重要作用。NLRP3炎症小体的异常激活促进炎性细胞因子的释放,最终导致组织和细胞损伤。NF- κ B P65磷酸化能够促进炎症因子表达,导致炎症反应加剧。研究表明,MON通过抑制P65的磷酸化和I κ B α 的降解,抑制LPS诱导的破骨细胞中NF- κ B通路激活,从而缓解炎症性骨质流失^[24]。同样,本研究发现CLP组p-NF- κ B P65蛋白表达明显增加,而I κ B α 表达显著降低。然而,MON下调了p-NF- κ B P65蛋白水平,增加了I κ B α 表达,表明NF- κ B信号通路激活被抑制。这与MON在脓毒症诱导的肺损伤模型中的体外和体内作用一致^[25]。研究表明,NLRP3炎症小体在S-AKI患者肾脏中的表达显著升高。在一项LPS诱导的脓毒症小鼠模型中,研究发现NLRP3缺陷小鼠的肾损伤明显减轻。NLRP3基因敲除可抑制促炎细胞因子和趋化因子的表达,通过减少肾脏炎症和铁死亡来缓解LPS诱导的S-AKI^[26]。研究发现S-AKI小鼠肾组织中NLRP3炎症小体被活化,而MON可以抑制NLRP3炎症小体的异常激活。此外,为了阐明MON的抗炎活性是否依赖于NLRP3炎症小体和NF- κ B通路,本研究过表达HK-2细胞中NLRP3和IKK β 。NLRP3是NLRP3炎症小体信号通路激活的关键蛋白,IKK β 是NF- κ B通路激活的关键调控因子。研究结果表明,过表达NLRP3和IKK β 均显著抑制了MON在LPS/ATP刺激的HK-2细胞中的抗炎作用,这可通过炎症因子TNF- α 、IL-1 β 和IL-6水平的显著增加来证明。这些结果证实MON可能以NF- κ B/NLRP3炎症小体通路依赖的方式减轻细胞炎症反应。

综上所述,MON可提高S-AKI小鼠的存活率,减轻肾组织病理学损伤。MON通过增加内源性抗氧化剂活性抑制ROS过度产生发挥抗氧化作用。在机制上,MON通过抑制NF- κ B/NLRP3炎症小体通路减少炎症因子释放,从而改善小鼠S-AKI和功能障碍。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

Conflict of Interests:

All authors disclose no relevant conflict of interests.

作者贡献声明:

王巧参与了数据分析、软件使用和论文写作;强静超负责实验操作、实验数据分析和论文写作;卞乐参与实验数据分析、论文写作及修改;赵盼盼负责实验设计、资金获取和论文审核;刘毅负责确定研究目标、负责项目管理和监督。

Author's Contributions:

WANG Qiao participated in data analysis, software use, and paper writing. QIANG Jingchao was responsible for the experimental operation, data analysis and paper writing. BIAN Le participated in experimental data analysis, paper writing and revision. ZHAO Panpan was responsible for experimental design, funding acquisition and paper review. LIU Yi was responsible for determining the objectives of the study and for project management and supervision.

[参考文献]

- [1] CHANG Y M, CHOU Y T, KAN W C, et al. Sepsis and acute kidney injury: a review focusing on the bidirectional interplay[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(16): 9159
- [2] POSTON J T, KOYNER J L. Sepsis associated acute kidney injury[J]. BMJ, 2019, 364: k4891
- [3] REN Q, GUO F, TAO S B, et al. Flavonoid fisetin alleviates kidney inflammation and apoptosis *via* inhibiting Src-mediated NF- κ B p65 and MAPK signaling pathways in septic AKI mice[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 122: 109772
- [4] QIU W H, AN S, WANG T J, et al. Melatonin suppresses ferroptosis *via* activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway in the mouse model of sepsis-induced acute kidney injury[J]. Int Immunopharmacol, 2022, 112: 109162
- [5] BALKRISHNA A, SINHA S, KUMAR A, et al. Sepsis-mediated renal dysfunction: pathophysiology, biomarkers and role of phytoconstituents in its management [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 165: 115183
- [6] WANG R J, LI Q, WU P X, et al. Fe-capsaicin nanozymes attenuate sepsis-induced acute lung injury *via* NF- κ B signaling[J]. Int J Nanomedicine, 2024, 19: 73-90
- [7] HUANG G W, BAO J W, SHAO X H, et al. Inhibiting pan-

- nexin-1 alleviates sepsis-induced acute kidney injury *via* decreasing NLRP3 inflammasome activation and cell apoptosis[J]. *Life Sci*, 2020, 254: 117791
- [8] WU M Q, LAI H B, PENG W, et al. Monotropein: a comprehensive review of biosynthesis, physicochemical properties, pharmacokinetics, and pharmacology [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1109940
- [9] JIANG F, XU X R, LI W M, et al. Monotropein alleviates H₂O₂-induced inflammation, oxidative stress and apoptosis *via* NF- κ B/AP-1 signaling[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(6): 4828–4836
- [10] CHEN Y E, LU Y Y, PEI C Y, et al. Monotropein alleviates secondary liver injury in chronic colitis by regulating TLR4/NF- κ B signaling and NLRP3 inflammasome [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 883: 173358
- [11] QIANG J C, YANG R R, LI X Q, et al. Monotropein induces autophagy through activation of the NRF2/PINK axis, thereby alleviating sepsis-induced colonic injury [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 127: 111432
- [12] ZHANG Q Y, YANG X, PENG M, et al. Post-treatment with irisin attenuates acute kidney injury in sepsis mice through anti-ferroptosis *via* the SIRT1/Nrf2 pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 857067
- [13] JOFFRE J, HELLMAN J. Oxidative stress and endothelial dysfunction in sepsis and acute inflammation [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2021, 35(15): 1291–1307
- [14] ZHU Y, XU D L, DENG F, et al. Angiotensin(1-7) attenuates sepsis-induced acute kidney injury by regulating the NF- κ B pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 601909
- [15] BORGES-RODRIGUEZ M, SHIELDS C A, TRAVIS O K, et al. Platelet inhibition prevents NLRP3 inflammasome activation and sepsis-induced kidney injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 10330
- [16] SALVADOR L G, CAROLINA G F, JESÚS R D, et al. A low BUN/creatinine ratio predicts histologically confirmed acute interstitial nephritis [J]. *BMC Nephrol*, 2023, 24(1): 75
- [17] GONG S H, XIONG H W, LEI Y C, et al. Usp9x contributes to the development of sepsis-induced acute kidney injury by promoting inflammation and apoptosis in renal tubular epithelial cells *via* activation of the TLR4/nf- κ b pathway [J]. *Ren Fail*, 2024, 46(2): 2361089
- [18] LI J M, WANG L Y, WANG B, et al. NOX4 is a potential therapeutic target in septic acute kidney injury by inhibiting mitochondrial dysfunction and inflammation [J]. *Theranostics*, 2023, 13(9): 2863–2878
- [19] ZHANG Y P, CHEN Y E, LI B X, et al. The effect of monotropein on alleviating cisplatin-induced acute kidney injury by inhibiting oxidative damage, inflammation and apoptosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129: 110408
- [20] YANG L, JEONG N H, CHOI Y A, et al. Monotropein mitigates atopic dermatitis-like skin inflammation through JAK/STAT signaling pathway inhibition [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 176: 116911
- [21] FANG Z, WEI W, JIANG X J. Monotropein attenuates doxorubicin-induced oxidative stress, inflammation, and arrhythmia *via* the AKT signal pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, 638: 14–22
- [22] GIERLIKOWSKA B, STACHURA A, GIERLIKOWSKI W, et al. The impact of cytokines on neutrophils' phagocytosis and NET formation during sepsis—a review [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(9): 5076
- [23] XIA Y M, GUAN Y Q, LIANG J F, et al. TAK-242 improves sepsis-associated acute kidney injury in rats by inhibiting the TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Ren Fail*, 2024, 46(1): 2313176
- [24] ZHANG Q, HU S J, HE Y Q, et al. Monotropein protects against inflammatory bone loss and suppresses osteoclast formation and bone resorption by inhibiting NFATc1 *via* NF- κ B and Akt/GSK-3 β pathway [J]. *Nutrients*, 2022, 14(19): 3978
- [25] GONG Y Z, WANG J Y. Monotropein alleviates sepsis-elicited acute lung injury *via* the NF- κ B pathway [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2023, 75(9): 1249–1258
- [26] LI Z L, WANG X, PENG Y, et al. Nlrp3 deficiency alleviates lipopolysaccharide-induced acute kidney injury *via* suppressing renal inflammation and ferroptosis in mice [J]. *Biology*, 2023, 12(9): 1188

[收稿日期] 2024-06-15

(本文编辑:戴王娟)