

# 凉血活血方对脓毒症急性肾损伤小鼠肠道菌群及 NLRP3/caspase-1/GSDMD 焦亡通路的影响

周旻<sup>1</sup> 杨磊<sup>2</sup> 卓玉珍<sup>2</sup> 李棣华<sup>2</sup> 张兰秋<sup>2</sup> 崔凌志<sup>3</sup> 李家瑞<sup>1</sup>

<sup>1</sup>天津市南开医院肾内科,天津 300100; <sup>2</sup>天津市南开医院中西医结合急腹症研究所,天津 300100; <sup>3</sup>天津医科大学研究生院,天津 300070

通信作者:李家瑞,Email:13821359282@163.com

**【摘要】目的** 探讨凉血活血方对脓毒症急性肾损伤(AKI)小鼠肠道菌群、肠道屏障及肾组织 NOD 样受体蛋白 3/ 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1/ 焦孔素 D (NLRP3/caspase-1/GSDMD) 细胞焦亡信号通路的影响。**方法** 将 30 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为假手术组(Sham 组)、脓毒症组(CLP 组)、脓毒症 + 凉血活血方组(CLP+LXHX 组),每组 10 只。通过盲肠结扎穿孔术(CLP)建立脓毒症 AKI 小鼠模型;Sham 组仅进行开腹处理。制模前 2 h, CLP+LXHX 组给予凉血活血方水煎剂(6 g/kg)灌胃治疗;Sham 组及 CLP 组给予等体积生理盐水灌胃。制模后 24 h,麻醉处死小鼠,取结肠和肾组织及结肠内新鲜粪便。光镜下观察小鼠肾组织和结肠组织的病理变化;采用实时聚合酶链反应(RT-PCR)检测小鼠肾脏组织炎症因子白细胞介素(IL-1 $\beta$  和 IL-18)的 mRNA 表达;采用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测小鼠肾组织中 NLRP3、caspase-1 和 GSDMD 的蛋白表达;采用 16S rDNA 高通量测序检测小鼠肠道菌群的变化。**结果** 与 Sham 组比较,CLP 组肾脏组织炎症细胞浸润增加,肾脏空泡化,肾脏组织中 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的 mRNA 表达及 NLRP3、caspase-1 和 GSDMD 的蛋白表达均明显升高;结肠组织病理损伤显著,肠道菌群的物种丰富度显著降低,肠球菌和埃希菌-志贺菌的相对丰度显著增加,回肠杆菌属、拟普雷沃菌属、毛螺菌属、克雷伯菌属和副萨特菌属的相对丰度显著升高。与 CLP 组比较,凉血活血方可以显著减轻脓毒症小鼠肾脏组织和结肠组织病理损伤,并降低病理评分(分:肾脏组织为 1.75 $\pm$ 0.43 比 3.50 $\pm$ 0.50,结肠组织为 1.25 $\pm$ 0.43 比 4.50 $\pm$ 0.50,均  $P < 0.05$ ),改善肠道菌群组成,降低肠球菌和埃希菌-志贺菌的相对丰度,并显著增加乳酸杆菌和阿克曼菌属的相对丰度,显著降低肾脏组织中 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的 mRNA 表达[IL-1 $\beta$  mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ): 1.59 $\pm$ 0.05 比 4.61 $\pm$ 0.88, IL-18 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ): 1.69 $\pm$ 0.17 比 2.86 $\pm$ 0.63,均  $P < 0.05$ ]及 NLRP3、caspase-1 和 GSDMD 的蛋白表达(NLRP3/GAPDH: 0.71 $\pm$ 0.04 比 0.89 $\pm$ 0.01, caspase-1/GAPDH: 1.04 $\pm$ 0.04 比 1.48 $\pm$ 0.04, GSDMD/GAPDH: 0.90 $\pm$ 0.01 比 1.41 $\pm$ 0.02,均  $P < 0.05$ )。**结论** 凉血活血方对脓毒症所致 AKI 具有明显的保护作用,其作用机制可能通过调节肠道菌群改善肠道屏障,从而抑制肾脏组织中 NLRP3/caspase-1/GSDMD 信号通路的活化,降低焦亡相关炎症因子的表达。

**【关键词】** 脓毒症; 凉血活血方; 细胞焦亡; 肠道菌群; 急性肾损伤

**基金项目:** 天津市自然科学基金(19JCZDJC36200, 18JCQNJC13400); 内蒙古自治区自然科学基金(2022MS08029); 天津市卫健委中西医结合课题(2019038, 2021009, 2021044)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20221122-01018

## Effect of Liangxue Huoxue decoction on intestinal flora and NLRP3/caspase-1/GSDMD signaling pathway in mice model of sepsis-induced acute kidney injury

Zhou Min<sup>1</sup>, Yang Lei<sup>2</sup>, Zhuo Yuzhen<sup>2</sup>, Li Dihua<sup>2</sup>, Zhang Lanqiu<sup>2</sup>, Cui Lingzhi<sup>3</sup>, Li Jiarui<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Nephrology, Nankai Hospital, Tianjin 300100, China; <sup>2</sup>Institute of Acute Abdomen, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China; <sup>3</sup>Graduate School of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Corresponding author: Li Jiarui, Email: 13821359282@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of Liangxue Huoxue decoction on intestinal flora, intestinal barrier and NOD-like receptor protein 3 (NLRP3)/caspase-1/gasdermin D (GSDMD) pyroptosis signaling pathway in mice model of sepsis-induced acute kidney injury (AKI). **Methods** The model of AKI was established by cecal ligation and perforation (CLP). Thirty male C57BL/6 mice were randomly divided into sham operation group (Sham group), sepsis group (CLP group) and sepsis+Liangxue Huoxue decoction (CLP+LXHX group), with 10 mice in each group. Mice in Sham group only underwent laparotomy. Two hours before model establishment, mice in CLP+LXHX group were treated with Liangxue Huoxue decoction (6 g/kg) by gavage; mice in Sham group and CLP group were given equal volume of normal saline by gavages. After 24 hours of modeling, all mice were sacrificed under anesthesia, and the colon and kidney tissues and fresh feces in the colon were taken. The pathological changes of kidney and colon were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining under light microscope. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect inflammatory factors (interleukins, IL-1 $\beta$  and IL-18) in renal tissue. The expressions of NLRP3, caspase-1 and GSDMD were detected by Western blotting. The changes of intestinal flora in mice were detected by 16S rDNA high-throughput sequencing. **Results** Compared with the Sham group, the inflammatory cell infiltration of the kidney

tissue was increased and the kidney became vacuolated in CLP group, the mRNA expressions of IL-1 $\beta$ , IL-18, and the protein expressions of NLRP3, caspase-1 and GSDMD were significantly increased in CLP group, the species richness of intestinal microflora decreased significantly, the relative abundance of *Enterococcus* and *Escherichia-Shigella* increased significantly, and the relative abundance of *Ileibacterium*, *Alloprevotella*, *Lachnospiraceae*, *Klebsiella* and *Parasutterella* increased significantly in CLP group. Compared with CLP group, Liangxue Huoxue decoction can significantly reduce the pathological changes of kidney and colon tissue, reduce the pathological score ( $1.75 \pm 0.43$  vs.  $3.50 \pm 0.50$  for kidney tissue,  $1.25 \pm 0.43$  vs.  $4.50 \pm 0.50$  for colon tissue, both  $P < 0.05$ ), improve the composition of intestinal flora, reduce the relative abundance of *Enterococcus* and *Escherichia-Shigella*, and significantly increase the relative abundance of *Lactobacillus* and *Akkermansia*. In addition, Liangxue Huoxue decoction can significantly reduce mRNA expressions of IL-1 $\beta$  and IL-18 in kidney tissue [IL-1 $\beta$  mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $1.59 \pm 0.05$  vs.  $4.61 \pm 0.88$ , IL-18 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $1.69 \pm 0.17$  vs.  $2.86 \pm 0.63$ , both  $P < 0.05$ ] and the protein expressions of NLRP3, caspase-1 and GSDMD (NLRP3/GAPDH:  $0.71 \pm 0.04$  vs.  $0.89 \pm 0.01$ , caspase-1/GAPDH:  $1.04 \pm 0.04$  vs.  $1.48 \pm 0.04$ , GSDMD/GAPDH:  $0.90 \pm 0.01$  vs.  $1.41 \pm 0.02$ , all  $P < 0.05$ ).

**Conclusions** Liangxue Huoxue decoction has obvious protective effect on AKI induced by sepsis. It can improve intestinal barrier by regulating intestinal flora, thereby inhibiting the activation of NLRP3/caspase-1/GSDMD signaling pathway in kidney tissue and reducing the expression of proptosis-related inflammatory factors.

**[Key words]** Sepsis; Liangxue Huoxue decoction; Pyroptosis; Intestinal flora; Acute kidney injury

**Fund program:** Natural Science Foundation of Tianjin Municipal of China (19JCZDJC36200, 18JCQNJC13400); Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region of China (2022MS08029); Science Foundation of Tianjin Municipal Health Bureau (2019038, 2021009, 2021044)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20221122-01018

脓毒症是一种危及生命的临床综合征,其特征是患者对感染的反应失调导致器官功能障碍,其中肾脏是常见的受累器官,并导致脓毒症相关的急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)。有研究表明,高达60%的脓毒症患者患有AKI,与无AKI患者相比,伴有AKI的脓毒症患者病死率显著增加<sup>[1-2]</sup>。脓毒症AKI的发病机制尚不明确,主要与微循环障碍、炎症反应失调和肠道菌群失调等因素相关。脓毒症可造成肠道黏膜屏障破坏、肠道菌群紊乱和肠道营养素缺乏,进一步影响AKI的发生发展<sup>[3-5]</sup>。最新的研究表明,焦孔素D(gasdermin D, GSDMD)介导的肾小管上皮细胞焦亡在脓毒症相关AKI的发病机制中起重要作用,脓毒症诱导的AKI可以显著促进NOD样受体蛋白3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)炎症小体形成、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶1(caspase-1)激活和GSDMD N端片段切割,从而导致肾小管上皮细胞膜破裂和细胞死亡<sup>[5-6]</sup>。最新研究表明,多种中药复方及中药活性成分对脓毒症诱导的AKI有显著保护作用<sup>[7-9]</sup>。本课题组前期研究表明,凉血活血方可以通过抑制核转录因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)/信号转导和转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)信号通路的活化保护脓毒症诱导的急性肺损伤<sup>[10]</sup>。本研究通过观察凉血活血方对脓毒症AKI小鼠肠道菌群组成、肠道屏障、炎症因子表达和NLRP3/caspase-1/GSDMD信号通路的影响,探索其对AKI的保护作用及机制,为凉血活血方治疗脓毒症诱导的AKI提供实验支持和理

论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物:**30只SPF级雄性C57BL/6小鼠,6~8周龄,体质量为20~25g,购于北京华富康实验动物技术有限公司[实验动物许可证号:SCXK(京)2014-0013],制模前在SPF环境适应1周。

**1.2 实验药物:**凉血活血方由大血藤、丹皮、赤芍和延胡索4种中药组成,所用饮片购于安国市普天和中药饮片有限公司(执行标准参照《中国药典》2015年版),由天津市南开医院药物实验室提取中药有效成分,通过减压旋转蒸发仪回收浓缩溶剂,冷冻干燥,确定生药含量为0.6kg/L,置于4℃冰箱保存。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 动物分组及制模方法:**采用随机数字表法将小鼠分为假手术组(Sham组)、脓毒症组[盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture, CLP)组]、脓毒症+凉血活血方组(CLP+LXHX组),每组10只。采用CLP制备脓毒症小鼠模型<sup>[9]</sup>;Sham组仅进行开腹处理。制模前2h,CLP+LXHX组给予凉血活血方水煎剂(0.2mL,6g/kg)灌胃治疗,其余两组给予等体积生理盐水灌胃。制模后24h,过量麻醉处死大鼠,取结肠和肾组织及结肠内新鲜粪便备检。本实验研究方案经过天津市南开医院动物伦理委员会批准(审批号:NKYY-DWLL-2020-038)。

**1.3.2 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色:**取肾组织和结肠组织,经4%多聚甲醛固定24h后进行脱水、石蜡包埋、切片、HE染色,光镜下观察组织病理学改变,并进行病理评分。

**1.3.3 实时聚合酶链反应(real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)** 检测肾组织中白细胞介素(interleukins, IL-1 $\beta$ 、IL-18)的 mRNA 表达:取肾脏组织提取总 RNA,反转录为 cDNA。以 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为内参,根据  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算肾脏组织 IL-1 $\beta$ 、IL-18 的 mRNA 表达。IL-18 的上游引物:5'-GTGAACCCCAGACCAGACTG-3',下游引物:5'-CCTGGAACACGTTTCTGAAAGA-3';IL-1 $\beta$  的上游引物:5'-GCCACCTTTTGACAGTGATGAG-3',下游引物:5'-ATGTGCTGCTGCCGAGATTTG-3';GAPDH 的上游引物:5'-GCCTCGTCTCATAGACAAGATG-3',下游引物:5'-CAGTAGACTCCACGACATAC-3'。

**1.3.4 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)** 检测肾脏组织中 NLRP3、caspase-1 和 GSDMD 的蛋白表达:用 RIPA 裂解缓冲液提取肾脏组织总蛋白,BSA 法定量,将 40  $\mu$ g 蛋白质转移至十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 进行分离,转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜。在室温下用 5% 脱脂乳封闭 1.5 h 后,将膜与特异性一抗在 4  $^{\circ}$ C 下孵育过夜(稀释比例均为 1:1 000),室温下与辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP) 结合的二抗孵育 2 h,使用凝胶成像系统显色成像。

**1.3.5 肠道菌群 16S rDNA 测序:**收集各组小鼠结肠中的新鲜粪便放入无菌冻存管,于液氮中保存。提取各样本总细菌 DNA,1% 琼脂糖凝胶电泳,合成带有 Barcode 的引物进行 PCR 扩增,检测 PCR 产物扩增目的条带大小,用 Agencourt AMPure XP 核酸纯化试剂盒纯化,使用 Illumina Miseq PE300 高通量测序平台进行双端测序。测序原始序列上传至美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)的 SRA 数据库。下机数据根据 Barcode 序列拆分样本,对数据进行过滤、拼接,并进行  $\alpha$  多样性指数和  $\beta$  多样性距离矩阵分析及组间差异分析。

**1.4 统计学分析:**采用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据分析和处理,采用 GraphPad Prism v7.0 软件进行作图。计量资料符合正态分布,以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD- $t$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组小鼠肾脏组织病理表现及评分(图 1):**制模后 24 h,光镜下显示 CLP 组小鼠肾脏组织发生显著病理改变,病理评分较 Sham 组明显升高(分:  $3.50 \pm 0.50$  比 0,  $P < 0.05$ );经凉血活血方治疗后,脓毒症小鼠病理损伤明显减轻,病理评分较 CLP 组明显降低(分:  $1.75 \pm 0.43$  比  $3.50 \pm 0.50$ ,  $P < 0.05$ )。

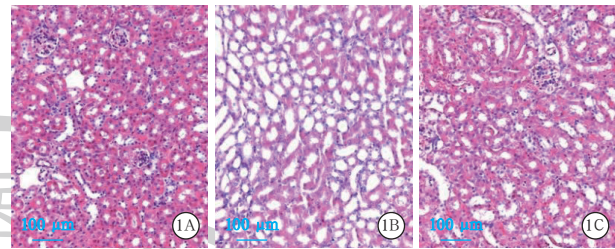
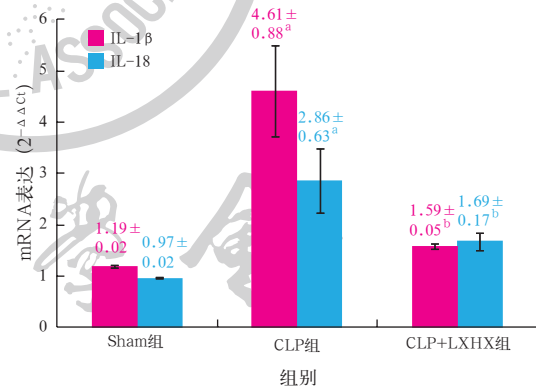


图 1 光镜下观察各组小鼠肾脏组织病理学改变 假手术组(Sham 组, A)肾组织形态正常;盲肠结扎穿孔术致脓毒症组(CLP 组, B)肾小管上皮细胞水肿,细胞体积增大,空泡变性,肾小球结构紊乱,并伴有肾小管管腔狭窄;脓毒症 + 凉血活血方组(CLP+LXHX 组, C)肾组织病理损伤较 CLP 组明显减轻 苏木素-伊红(HE)染色 中倍放大

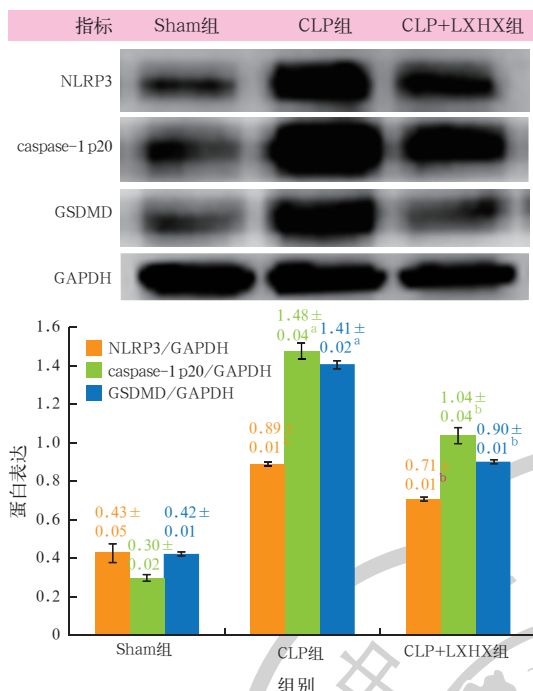
**2.2 各组小鼠肾脏组织 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的 mRNA 表达(图 2):**与 Sham 组比较,CLP 组肾脏组织中 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的 mRNA 表达均明显升高(均  $P < 0.05$ );经凉血活血方治疗后,脓毒症小鼠 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的 mRNA 表达均较 CLP 组明显降低(均  $P < 0.05$ )。



注:Sham 组为假手术组,CLP 组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症组,CLP+LXHX 组为脓毒症 + 凉血活血方组;IL-1 $\beta$  为白细胞介素-1 $\beta$ ,IL-18 为白细胞介素-18;与 Sham 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 CLP 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

图 2 各组小鼠肾脏组织 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的 mRNA 表达

**2.3 各组小鼠肾脏组织 NLRP3、caspase-1 和 GSDMD 的蛋白表达(图 3):**与 Sham 组比较,CLP 组肾脏组织中 NLRP3、caspase-1 和 GSDMD 的蛋白表达均明显升高(均  $P < 0.05$ );经凉血活血方治疗后,脓毒症小鼠 NLRP3、caspase-1 和 GSDMD 的蛋白表达均较 CLP 组明显降低(均  $P < 0.05$ )。



Sham 组为假手术组, CLP 组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症组, CLP+LXHX 组为脓毒症 + 凉血活血方组; NLRP3 为 NOD 样受体蛋白 3, caspase-1 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1, GSDMD 为焦毒素 D, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 与 Sham 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 CLP 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

图3 各组小鼠肾脏组织中 NLRP3、caspase-1 和 GSDMD 的蛋白表达

2.4 各组小鼠结肠组织病理表现及评分(图4): 制模后 24 h, 光镜下显示, 与 Sham 组比较, CLP 组小鼠结肠组织黏膜完整性破坏, 病理评分较 Sham 组明显降低(分:  $4.50 \pm 0.50$  比 0,  $P < 0.05$ ); 经凉血活血方治疗后, 脓毒症小鼠黏膜完整性明显改善, 病理评分较 CLP 组明显降低(分:  $1.25 \pm 0.43$  比  $4.50 \pm 0.50$ ,  $P < 0.05$ )。

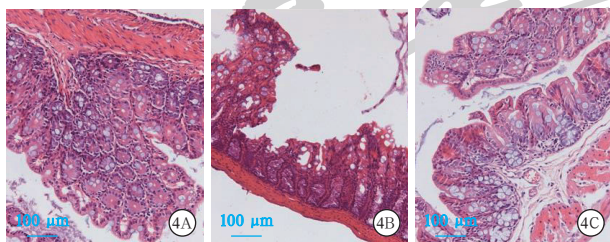
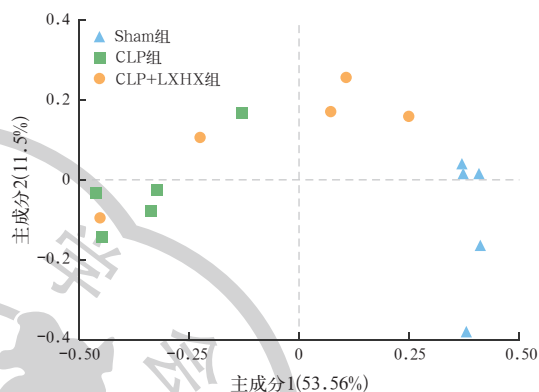


图4 光镜下观察各组小鼠结肠组织病理学改变 假手术组(Sham 组, A)结肠组织形态正常;盲肠结扎穿孔术致脓毒症组(CL P 组, B)结肠组织黏膜完整性破坏,上皮细胞脱离坏死;脓毒症 + 凉血活血方组(CL P+LXHX 组, C)结肠组织黏膜完整性较 CLP 组明显改善 苏木素 - 伊红(HE)染色 中倍放大

2.5 各组小鼠肠道菌群多样性分析: 通过主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA)发现, 各组小鼠肠道菌群结构存在显著差异( $P < 0.05$ ; 图5)。单样品的多样性( $\alpha$ 多样性)分析显示, 与 Sham 组

比较, CLP 组 Chao1 指数、Observed species 指数、PD\_whole\_tree 指数和 Shannon 指数均明显降低(均  $P < 0.05$ ); 经凉血活血方治疗后上述指标均明显升高(均  $P < 0.05$ ; 表 1), 提示脓毒症小鼠肠道菌群的丰富度显著降低, 凉血活血方在一定程度上可以恢复脓毒症小鼠的肠道菌群丰富度, 改善肠道菌群失调。



注: Sham 组为假手术组, CLP 组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症组, CLP+LXHX 组为脓毒症 + 凉血活血方组

图5 各组小鼠肠道菌群多样性指数主坐标分析(PCoA)图

表1 各组小鼠肠道菌群  $\alpha$ 多样性指数比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数(只)	Observed species 指数	Chao1 指数
Sham 组	5	493.98 ± 209.99	774.35 ± 320.93
CLP 组	5	280.40 ± 146.02 <sup>a</sup>	477.81 ± 137.01 <sup>a</sup>
CLP+LXHX 组	5	764.52 ± 274.47 <sup>b</sup>	1033.04 ± 366.46 <sup>b</sup>

组别	动物数(只)	Shannon 指数	PD_whole_tree 指数
Sham 组	5	4.60 ± 1.78	34.96 ± 11.99
CLP 组	5	2.45 ± 0.92 <sup>a</sup>	23.81 ± 8.01 <sup>a</sup>
CLP+LXHX 组	5	5.66 ± 1.85 <sup>b</sup>	46.61 ± 14.00 <sup>b</sup>

注: Sham 组为假手术组, CLP 组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症组, CLP+LXHX 组为脓毒症 + 凉血活血方组; 与 Sham 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 CLP 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

2.6 各组小鼠肠道菌群结构分析: 进一步分析各组小鼠肠道菌群的物种组成, 在门和属水平上分别绘制各组小鼠的肠道菌群物种丰度聚类图(图6)。在门水平上, 与 Sham 组比较, CLP 组肠道变形菌门水平显著升高, 脱硫杆菌、放线杆菌、弯曲杆菌、疣状微生物群、厚壁菌和拟杆菌门水平显著降低; 与 CLP 组比较, 凉血活血方可以降低肠道变形菌门水平, 升高脱硫杆菌、放线杆菌、弯曲杆菌、疣状微生物群、厚壁菌和拟杆菌门水平。在属水平上, 根据 3 组微生物的相对丰度差异, 进一步绘制肠道菌群物种丰度聚类图(图7)。与 Sham 组比较, CLP 组肠球菌和埃希菌 - 志贺菌致病菌的相对丰度显著增加, 回肠杆菌属、拟普雷沃菌属、毛螺菌属、克雷

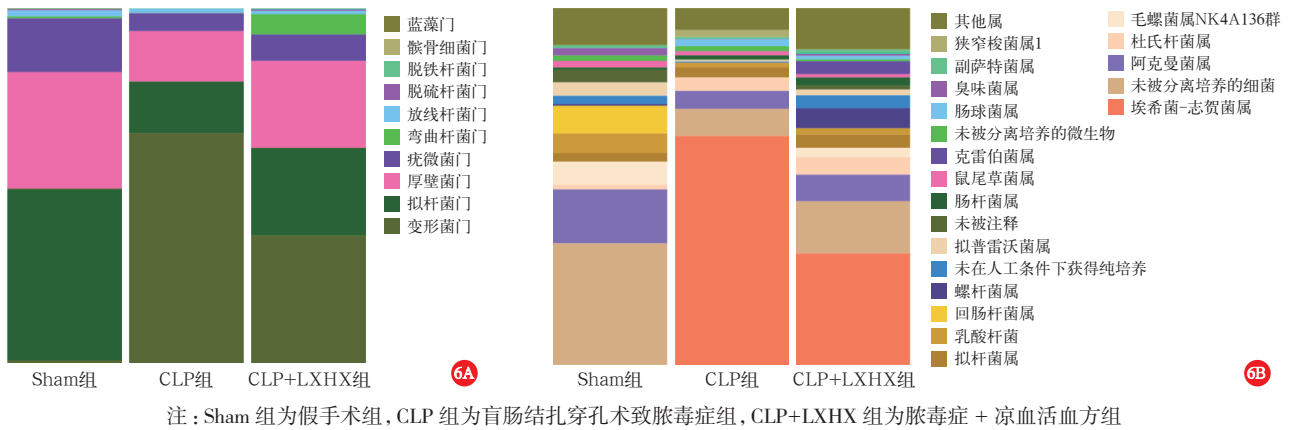


图6 各组小鼠肠道菌群门水平(A)和属水平(B)丰度聚类图

伯菌属和副萨特菌属的相对丰度显著降低;与 CLP 组比较,凉血活血方可以显著降低肠球菌和埃希菌 - 志贺菌致病菌的相对丰度,并显著增加乳酸杆菌属和阿克曼菌属的相对丰度。

的氧供<sup>[14-16]</sup>;另外,本课题组前期研究显示,凉血活血方通过抑制 NF-κB/STAT3 信号通路活化,减轻肺部病理损伤和炎症反应<sup>[10]</sup>。本研究采用 CLP 建立脓毒症 AKI 模型,探讨凉血活血方对脓毒症诱导 AKI 的保护作用及潜在机制,结果显示,凉血活血方可以改善脓毒症小鼠的肠道菌群,抑制肾脏组织炎症因子 IL-1β 和 IL-18 的表达,改善肾脏组织病理损伤,是治疗脓毒症 AKI 的有效方剂。

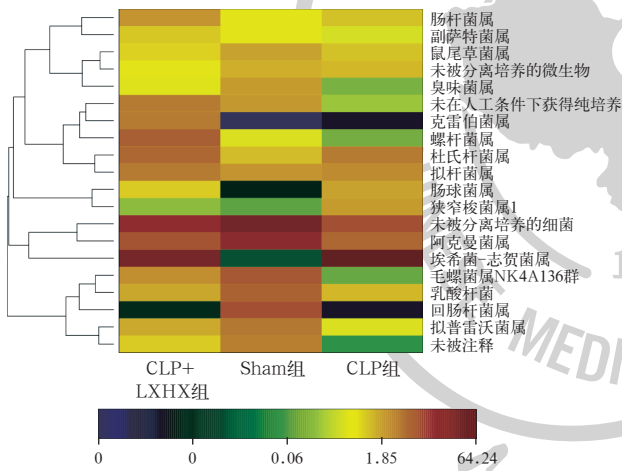


图7 各组小鼠肠道菌群在属水平上物种丰度聚类图

### 3 讨论

脓毒症是引起 AKI 的常见原因之一,本病在中医古籍上没有相关记载,但是根据其临床表现主要归于“温病”和“伤寒病”范畴<sup>[11]</sup>。王金达教授采用中西医结合治疗脓毒症,将脓毒症治疗归纳为“三证三法”,即毒热证、血瘀证和急性虚证,并采用活血化瘀法、清热解毒法和固本扶正法给予治疗<sup>[12-13]</sup>。凉血活血方主要由红藤、赤芍、丹皮和延胡索 4 位中药组成,具有清热解毒,化瘀止痛的功效。前期研究表明,凉血活血方可以减轻脓毒症大鼠肠道屏障的破坏,并减少肠道菌群移位,降低外周血脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 水平,改善肠道血流和组织

细胞焦亡是新发现的一种程序性细胞死亡方式,主要功能是诱导强烈的炎症反应,保护宿主免受微生物感染。然而,过度的细胞焦亡会导致脓毒症和脓毒症器官损伤。GSDMD 介导的细胞焦亡主要包括经典途径和非经典途径 2 个方面,分别通过 caspase-1 和 caspase-4、caspase-5、caspase-11 (人为 caspase-4、caspase-5,小鼠为 caspase-11) 将 GSDMD 切割成 N-末端和 C-末端。切割后, GSDMD 的 N 端 (GSDMD-N) 形成跨膜孔,释放细胞因子 (如 IL-1β 和 IL-18),最终导致强烈的炎症反应和细胞死亡<sup>[17]</sup>。NLRP3 炎症小体介导的 caspase-1 活化在脓毒症诱导的 AKI 中发挥重要的调控作用,外源性一氧化碳通过抑制 NLRP3 炎症小体激活,对脓毒症大鼠 AKI 有明显的保护作用<sup>[18-19]</sup>。本研究显示,制模后 24 h,与 Sham 组比较, CLP 组小鼠肾脏组织中 NLRP3、caspase-1 p20 和 GSDMD 的表达均明显升高,同时焦亡相关炎症因子 IL-1β 和 IL-18 的 mRNA 表达明显升高;给予凉血活血方治疗可以显著抑制相关蛋白及炎症因子的表达,提示凉血活血方可以通过抑制 NLRP3/caspase-1/GSDMD 信号通路的活化,抑制肾上皮细胞焦亡。

大量研究表明,肠道菌群紊乱和肠道屏障破坏对脓毒症的发生发展具有重要调控作用<sup>[20]</sup>。肠

道微生物失调被认为是通过增加肠道屏障通透性来影响炎症反应,从而允许病原菌转移到全身循环中。肠道微生物群的组成受到脓毒症的显著影响,脓毒症引起的人体微生物群变化被认为是另一种器官衰竭<sup>[21-22]</sup>。有研究表明,根据 $\beta$ 多样性评估,与非脓症患者相比,脓症患者具有独特的肠道微生物群落<sup>[23]</sup>。这些变化主要包括生物多样性显著减少,包括共生细菌(如双歧杆菌、乳酸菌)的丧失和致病菌(如肠球菌、葡萄球菌和梭菌)的过度生长<sup>[24]</sup>。本研究采用16S rDNA技术检测凉血活血方对肠道菌群的影响,结果显示,凉血活血方在一定程度上可以恢复脓毒症小鼠肠道菌群丰富度,改善肠道菌群失调。与Sham组比较,CLP组致病菌肠球菌和埃希菌-志贺菌致病菌的相对丰度显著增加;与CLP组比较,凉血活血方可以显著降低致病菌肠球菌和埃希菌-志贺菌致病菌的相对丰度,并显著增加乳酸杆菌属和阿克曼菌属的相对丰度,结果表明,凉血活血方可以部分恢复脓毒症小鼠肠道菌群的组成,同时HE染色结果表明,凉血活血方可以通过改善结肠组织黏膜的完整性,改善肠道屏障。NLRP3炎症小体主要由病原体相关分子模式和损伤相关分子模式激活,包括来自致病性细菌的LPS,肠道微生物群与肾组织之间的串扰(肠-肾轴)已被确定为影响脓毒症AKI的潜在机制<sup>[25]</sup>。本研究尚未阐明凉血活血方调节肠道菌群和肾脏组织焦亡直接的关联性,值得进一步深入探究。

综上所述,本研究表明,脓毒症可以造成肠道菌群失调和物种的多样性降低,进一步证明脓毒症的发生发展与肠道菌群密切相关,同时,脓毒症导致肠道屏障破坏和肠道菌群移位;而凉血活血方可能通过改善肠道菌群,恢复肠道菌群的物质多样性,以及降低肠道屏障的通透性,从而抑制肾脏组织NLRP3/caspase-1/GSDMD信号通路的活化及炎症因子IL-1 $\beta$ 和IL-18的表达,并有效缓解脓毒症模型小鼠肾组织病理损伤,起到治疗AKI的作用。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] Poston JT, Koyner JL. Sepsis associated acute kidney injury [J]. *BMJ*, 2019, 364: k4891. DOI: 10.1136/bmj.k4891.
- [2] Chen WY, Cai LH, Zhang ZH, et al. The timing of continuous renal replacement therapy initiation in sepsis-associated acute kidney injury in the intensive care unit: the CRTSAKI study (continuous RRT timing in sepsis-associated AKI in ICU): study protocol for a multicentre, randomised controlled trial [J]. *BMJ Open*, 2021, 11 (2): e040718. DOI: 10.1136/bmjopen-2020-040718.
- [3] 曾世永, 林锦乐, 张文武. 脓毒症致急性肾损伤的研究进展 [J]. *中华危重病急救医学*, 2018, 30 (7): 703-707. DOI: 10.3760/ema.

- j.issn.2095-4352.2018.07.018.
- [4] Yuan JJ, Chang XN, Li M, et al. Clinical utility of characterizing intestinal flora in septic kidney injury [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2020, 133 (7): 842-846. DOI: 10.1097/CM9.0000000000000724.
- [5] 蔺晨雨, 肖漓. 急性肾损伤实验室诊断的研究进展 [J/CD]. *实用器官移植电子杂志*, 2021, 9 (2): 163-168. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2021.02.018.
- [6] Li TL, Sun HB, Li YM, et al. Downregulation of macrophage migration inhibitory factor attenuates NLRP3 inflammasome mediated pyroptosis in sepsis-induced AKI [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8 (1): 61. DOI: 10.1038/s41420-022-00859-z.
- [7] 乐健伟, 樊恒, 孙敏, 等. 黄芩苷对脓毒症小鼠急性肾损伤的保护作用及机制研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2021, 33 (7): 866-870. DOI: 10.3760/ema.j.cn121430-20210204-00756.
- [8] 刘雪, 秦振志, 管陈, 等. 野黄芩苷通过CCN1介导抑制核转录因子 $\kappa$ B信号通路改善脂多糖诱导的肾损伤 [J]. *中华危重病急救医学*, 2022, 34 (4): 400-406. DOI: 10.3760/ema.j.cn121430-20210401-00767.
- [9] 李弘毅, 翟瑞卿, 梁海燕, 等. 基于16S rDNA测序分析脓毒症大鼠早期肠道微生态的变化 [J]. *中华危重病急救医学*, 2022, 34 (1): 28-34. DOI: 10.3760/ema.j.cn121430-20210215-00754.
- [10] Deng JH, Tan W, Luo QL, et al. Long non-coding RNA MEG3 promotes renal tubular epithelial cell pyroptosis by regulating the miR-18a-3p/GSDMD pathway in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury [J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 663216. DOI: 10.3389/fphys.2021.663216.
- [11] 卓玉珍, 杨磊, 鹿燕敏, 等. 凉血活血方通过抑制NLRP3炎症小体活化保护脓毒症急性肺损伤小鼠的实验研究 [J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2022, 28 (2): 173-178. DOI: 10.3969/j.issn.1007-6948.2022.02.005.
- [12] 李银平, 武子霞, 李志军, 等. “菌毒共治”与“三证三法”理论的创立及发展: “菌毒炎共治”与“四证四法”(一) [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2017, 24 (1): 1-2. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2017.01.001.
- [13] 李银平, 武子霞, 李志军, 等. “菌毒共治”与“三证三法”理论的创立及发展: “菌毒炎共治”与“四证四法”(二) [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2017, 24 (2): 113-114. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2017.02.001.
- [14] 李志军. 脓毒症的中西医结合治疗对策 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2008, 15 (6): 323-325. DOI: 10.3321/j.issn:1008-9691.2008.06.001.
- [15] 鹿燕敏, 李东华, 王蓓, 等. 凉血活血方对腹腔感染脓毒症大鼠肠组织纤维及胶原代谢的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18 (21): 200-203.
- [16] 王宇敏, 周静, 杜凡, 等. 凉血活血方有效组分对脓毒症大鼠肠道血液循环及氧供的影响 [J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2012, 18 (4): 372-375. DOI: 10.3969/j.issn.1007-6948.2012.04.013.
- [17] Burdette BE, Esparza AN, Zhu H, et al. Gasdermin D in pyroptosis [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11 (9): 2768-2782. DOI: 10.1016/j.apsb.2021.02.006.
- [18] Dai XG, Li Q, Li T, et al. The interaction between C/EBP $\beta$  and TFAM promotes acute kidney injury via regulating NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis [J]. *Mol Immunol*, 2020, 127: 136-145. DOI: 10.1016/j.molimm.2020.08.023.
- [19] Wang P, Huang J, Li Y, et al. Exogenous carbon monoxide decreases sepsis-induced acute kidney injury and inhibits NLRP3 inflammasome activation in rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16 (9): 20595-20608. DOI: 10.3390/ijms160920595.
- [20] Abu Y, Vitari N, Yan Y, et al. Opioids and sepsis: elucidating the role of the microbiome and microRNA-146 [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (3): 1097. DOI: 10.3390/ijms23031097.
- [21] Miller WD, Keskey R, Alverdy JC. Sepsis and the microbiome: a vicious cycle [J]. *J Infect Dis*, 2021, 223 (12 Suppl 2): S264-S269. DOI: 10.1093/infdis/jiaa682.
- [22] Tourelle KM, Boutin S, Weigand MA, et al. Sepsis and the human microbiome. Just another kind of organ failure? A review [J]. *J Clin Med*, 2021, 10 (21): 4831. DOI: 10.3390/jcm10214831.
- [23] Agudelo-Ochoa GM, Valdés-Duque BE, Giraldo-Giraldo NA, et al. Gut microbiota profiles in critically ill patients, potential biomarkers and risk variables for sepsis [J]. *Gut Microbes*, 2020, 12 (1): 1707610. DOI: 10.1080/19490976.2019.1707610.
- [24] Kullberg R, Wiersinga WJ, Haak BW. Gut microbiota and sepsis: from pathogenesis to novel treatments [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2021, 37 (6): 578-585. DOI: 10.1097/MOG.0000000000000781.
- [25] Zhang JX, Ankawi G, Sun J, et al. Gut-kidney crosstalk in septic acute kidney injury [J]. *Crit Care*, 2018, 22 (1): 117. DOI: 10.1186/s13054-018-2040-y.

(收稿日期: 2022-11-22)