

虫草素缓解脓毒症急性肺损伤的作用： 与坏死性凋亡的关系

孙佳璇¹ 张东潮¹ 李梦涵^{1,2,3} 余剑波^{1,2,3} 张圆^{1,2,3}

¹天津医科大学附属南开医院麻醉科与重症医学科,天津 300100; ²天津市中西医结合急腹症研究所,天津 300100; ³天津市急腹症器官损伤与中西医修复重点实验室,天津 300100

通信作者:张圆, Email: 13642066361@126.com

【摘要】目的 探讨虫草素在减少脓毒症所致急性肺损伤(ALI)中的潜在作用机制,并验证其与坏死性凋亡之间的关联。**方法** 选取 30 只 18~20 g 8 周龄成年雄性野生型 C57BL/6 小鼠,按随机数字表法分为正常对照组、盲肠结扎穿孔术(CLP)模型组和虫草素干预组,每组 10 只。采用 CLP 制备脓毒症 ALI 模型,虫草素干预组在 CLP 术后静脉持续 2 h 注射虫草素($75 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)进行干预。于制模后 24 h 采集肺组织和血样本,测定肺组织湿重/干质量(W/D)比值以评价肺水肿程度;采用苏木素-伊红(HE)染色结合肺组织病理学评分评估肺部组织学改变;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清及肺组织中炎症因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素(IL-1 β 、IL-6)的表达水平;采用流式细胞术分析肺组织中坏死性凋亡阳性细胞比例;采用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测坏死性凋亡相关蛋白的表达水平。**结果** 与正常对照组比较,CLP 模型组小鼠肺组织病理学损伤显著加重,肺损伤评分及 W/D 比值均明显升高,血清及肺组织中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平显著升高,肺组织中凋亡细胞比例显著增加,受体相互作用蛋白激酶 3(RIPK3)与混合谱系激酶结构域样蛋白(MLKL)的总蛋白表达水平比较差异无统计学意义,而磷酸化-RIPK3(p-RIPK3)与磷酸化-MLKL(p-MLKL)的蛋白表达水平显著升高。与 CLP 模型组比较,虫草素干预组小鼠肺组织病理损伤明显减轻,肺损伤评分(分: 2.70 ± 0.67 比 4.50 ± 0.97)及 W/D 比值(4.47 ± 0.24 比 5.66 ± 0.21)均明显降低(均 $P < 0.05$);肺组织及血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平均显著降低[肺组织: TNF- α (ng/g): 263.94 ± 10.79 比 308.65 ± 16.78 , IL-1 β (ng/g): 50.34 ± 4.76 比 59.82 ± 2.59 , IL-6 (ng/g): 2.75 ± 0.22 比 3.11 ± 0.24 ; 血清: TNF- α (ng/L): 266.15 ± 7.70 比 291.94 ± 17.52 , IL-1 β (ng/L): 51.34 ± 3.91 比 55.52 ± 1.48 , IL-6 (ng/L): 2.68 ± 0.27 比 3.05 ± 0.20 , 均 $P < 0.05$];肺组织凋亡细胞比例明显减少(0.26 ± 0.05 比 0.31 ± 0.02 , $P < 0.05$);p-RIPK3 与 p-MLKL 的蛋白表达水平显著下调[p-RIPK3 蛋白表达(p-RIPK3/GADPH): 0.311 ± 0.011 比 0.403 ± 0.005 , p-MLKL 蛋白表达(p-MLKL/GADPH): 0.359 ± 0.006 比 0.446 ± 0.008 , $P < 0.05$],而 RIPK3 与 MLKL 的蛋白表达水平比较差异无统计学意义[RIPK3 蛋白表达(RIPK3/GADPH): 0.262 ± 0.005 比 0.267 ± 0.005 , MLKL 蛋白表达(MLKL/GADPH): 0.242 ± 0.006 比 0.236 ± 0.008 , 均 $P > 0.05$]。**结论** 虫草素可减轻脓毒症所致 ALI,其作用机制可能与抑制坏死性凋亡、缓解炎症反应有关。

【关键词】 虫草素; 脓毒症; 急性肺损伤; 坏死性凋亡; 炎症反应

基金项目:天津市中医药重点领域科研项目(2023009);天津市医学重点学科建设资助(TJYXZDXK-3-013B)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2025.06.004

The effect of cordycepin in alleviating sepsis-induced acute lung injury: association with necroptosis

Sun Jiaxuan¹, Zhang Dongchao¹, Li Menghan^{1,2,3}, Yu Jianbo^{1,2,3}, Zhang Yuan^{1,2,3}

¹Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300100, China; ²Tianjin Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Acute Abdominal Diseases, Tianjin 300100, China; ³Tianjin Key Laboratory of Organ Injury and Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Repair for Acute Abdomen, Tianjin 300100, China

Corresponding author: Zhang Yuan, Email: 13642066361@126.com

【Abstract】Objective To investigate the potential mechanism of cordycepin in alleviating sepsis-induced acute lung injury (ALI) and verify its association with necroptosis. **Methods** Thirty 8-week-old adult male wild-type C57BL/6 mice weighing 18–20 g were randomly divided into a sham control group, a cecal ligation and puncture (CLP) model group, and a cordycepin intervention group, with 10 mice in each group. A sepsis-associated ALI model was established by CLP. In the intervention group, cordycepin was administered via continuous intravenous injection for 2 hour at a dose of $75 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ after CLP. Lung tissues and blood samples were collected 24 hours after modeling. The lung wet/dry weight (W/D) ratio was determined to evaluate the severity of pulmonary edema. Histological alterations in lung tissues were assessed by hematoxylin-eosin (HE) staining combined with a lung histopathological scoring system. The expression levels of inflammatory factors including tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukins (IL-1 β , IL-6) in serum and lung tissues were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The

proportion of necroptosis-positive cells in lung tissues was analyzed by flow cytometry. The expression levels of necroptosis-related proteins were detected by Western blotting. **Results** Compared with the normal control group, the CLP model group showed significantly aggravated lung pathological injury, markedly increased lung injury score and W/D ratio, significantly increased proportion of apoptotic cells in lung tissues, there was no significant difference in the total protein expression levels of receptor interacting protein kinases 3 (RIPK3) and mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL), while significantly elevated expression levels of phosphorylated-RIPK3 (p-RIPK3) and phosphorylated-MLKL (p-MLKL). Compared with the CLP model group, the cordycepin intervention group exhibited significantly alleviated lung pathological injury, with remarkably reduced lung injury score (2.70 ± 0.67 vs. 4.50 ± 0.97 , $P < 0.05$) and W/D ratio (4.47 ± 0.24 vs. 5.66 ± 0.21 , $P < 0.05$). The levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in lung tissues and serum were significantly downregulated [lung tissues: TNF- α (ng/g): 263.94 ± 10.79 vs. 308.65 ± 16.78 , IL-1 β (ng/g): 50.34 ± 4.76 vs. 59.82 ± 2.59 , IL-6 (ng/g): 2.75 ± 0.22 vs. 3.11 ± 0.24 ; serum: TNF- α (ng/L): 266.15 ± 7.70 vs. 291.94 ± 17.52 , IL-1 β (ng/L): 51.34 ± 3.91 vs. 55.52 ± 1.48 , IL-6 (ng/L): 2.68 ± 0.27 vs. 3.05 ± 0.20 , all $P < 0.05$]. The proportion of apoptotic cells in lung tissues was markedly decreased (0.26 ± 0.05 vs. 0.31 ± 0.02 , $P < 0.05$). The protein expression of p-RIPK3 and p-MLKL were significantly reduced [protein expression of p-RIPK3 (p-RIPK3/GAPDH): 0.311 ± 0.011 vs. 0.403 ± 0.005 , protein expression of p-MLKL (p-MLKL/GAPDH): 0.359 ± 0.006 vs. 0.446 ± 0.008 ; both $P < 0.05$], while the expression levels of RIPK3 and MLKL remained unchanged [protein expression of RIPK3 (RIPK3/GAPDH): 0.262 ± 0.005 vs. 0.267 ± 0.005 , protein expression of MLKL (MLKL/GAPDH): 0.242 ± 0.006 vs. 0.236 ± 0.008 ; both $P > 0.05$]. **Conclusion** Cordycepin can alleviate sepsis-induced ALI, and its mechanism may be related to the inhibition of necroptosis and the attenuation of inflammatory responses.

【Key words】 Cordycepin; Sepsis; Acute lung injury; Necroptosis; Inflammatory response

Fund program: Tianjin Key Research Project of Traditional Chinese Medicine (2023009); Tianjin Medical Key Discipline Construction Program (TJYXZDXK-3-013B)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2025.06.004

脓毒症是由机体对感染产生失控性全身炎症反应所引发的一种临床综合征。在该病理过程中,肺脏作为主要靶器官之一,极易受到损伤^[1]。目前,针对脓毒症所致急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的治疗仍以对症支持为主,尽管已采取了积极的综合救治措施,患者的病死率仍超过 40%。因此,如何有效防治脓毒症 ALI 已成为急危重症医学领域亟待解决的关键临床问题^[2]。

冬虫夏草是我国传统名贵中药材,始载于清代汪昂所著《本草备要》,具有补肾益肺、止血化痰的功效,临床上常用于呼吸系统相关疾病的辅助治疗^[3]。虫草素是冬虫夏草的主要活性成分之一,具有抗炎、抗氧化等多种生物活性^[4-5]。研究表明,冬虫夏草提取物可通过抑制肺组织中核转录因子- κ B p65 (nuclear factor- κ B p65, NF- κ B p65)的磷酸化及环氧合酶(cyclooxygenase, COX-2)与诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的表达,显著减轻脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的 ALI^[4,6]。另有研究显示,虫草素可通过抑制 p38 丝裂素活化蛋白激酶(p38 mitogenactivated protein kinase, p38 MAPK)与 NF- κ B 信号通路的级联激活,延缓小鼠过敏性哮喘的进展;亦可通过激活血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)与核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)信号通路,抑制 NF- κ B 活化,协同缓解肺部炎

症反应及氧化应激损伤,从而发挥肺组织保护作用,改善小鼠 ALI 模型的病理损伤程度^[7-9]。上述研究提示,虫草素在脓毒症所致 ALI 中有一定的肺保护效应,可能与其抑制促炎因子释放有关,但其具体作用机制仍有待进一步阐明。

正常的炎症反应是机体重要的防御机制,但当炎症反应失衡时,可表现为促炎因子[如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)]的过度释放及抗炎因子的相对不足,进而引发全身性组织损伤。炎症反应失衡被认为是脓毒症所致 ALI 的核心发病机制之一^[10-12]。坏死性凋亡是一种由细胞稳态失衡诱导的程序性细胞死亡形式,其发生依赖于受体相互作用蛋白激酶 3 (receptor interacting protein kinases 3, RIPK3) 和混合谱系激酶结构域样蛋白(mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL)的激活。此类细胞死亡有显著的促炎特性,可通过释放损伤相关分子模式(damage-associated molecular pattern, DAMP),促进促炎介质的分泌及炎症细胞的浸润,从而直接参与脓毒症 ALI 的病理进程^[13-15]。目前鲜见有关虫草素是否通过下调坏死性凋亡以抑制炎症反应、减轻脓毒症 ALI 的报告。本研究拟通过构建盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture, CLP)经典脓毒症 ALI 模型,探讨虫草素对脓毒症 ALI 的影响及其潜在作用机制,旨在为

虫草素在脓毒症 ALI 防治中的应用提供理论依据,并找出可能的作用靶点。

1 材料与方 法

1.1 实验动物:30 只 8 周龄 SPF 级健康成年雄性野生型 C57BL/6 小鼠,体质量 18 g~20 g,分笼饲养于通风、昼夜节律 12 h/12 h 光照循环、恒温(23±1)℃、相对湿度在 40%~60% 的环境中,给予正常食物和水。

1.2 主要试剂及药物:虫草素购于天津市嘉格生物有限公司。苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)试剂盒、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒、抗体 MLKL、磷酸化-MLKL(phosphorylated-MLKL, p-MLKL)、RIPK3、磷酸化-RIPK3(phosphorylated-RIPK3, p-RIPK3)、3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)均购于天津市宝坻区卓普斯实验室用品有限公司,批号分别 G1120、ab208348、ab197742、ab222503、66675-1-Ig、#37333、17563-1-AP、#91702、60004-1-Ig。

1.3 实验分组与模型制备:小鼠饲养 7 d 后检测体温及白细胞计数(white blood cell count, WBC),确认正常后进行实验。将 30 只小鼠按随机数字表法分为正常对照组、CLP 模型组、虫草素干预组,每组 10 只。实验过程中若出现动物死亡(如麻醉意外、术后感染),需补充实验样本以保证统计效能。CLP 术前 8 h 禁食,自由饮水,术前称重,按体质量(0.055 mL/g)腹腔注射 2% 水合氯醛溶液麻醉实施手术。于小鼠下腹部正中行皮肤纵向切口(长约 1.5~2.0 cm),找到盲肠进行结扎,在距离回盲部 1 cm 处穿刺盲肠,同时从穿刺部位轻柔挤出少量粪便后将盲肠回纳至腹腔原位,最后按层次逐层缝合腹部切口。虫草素干预组于制模成功后 3 h 开始由尾静脉持续滴注虫草素(剂量为 75 mg·kg⁻¹·h⁻¹)2 h。正常对照组未予药物干预及 CLP 制模,其他操作同模型组及虫草素干预组。

1.4 伦理学:本实验中动物处置方法符合有关实验动物的伦理管理及使用规定,并经天津医科大学附属南开医院实验动物伦理委员会批准(审批号:ZXHK-DWLL-2025-0140)。

1.5 检测指标与方法

1.5.1 肺湿/干质量(wet/dry weight, W/D)比值测定:放血处死小鼠,开胸取全肺称湿质量后,置于 80℃

恒温干燥箱干燥至恒重并称取干质量,并计算肺组织 W/D 比值。

1.5.2 病理观察及肺损伤评分:HE 染色组织石蜡切片,在光镜下观察肺组织病理学改变;并进行小鼠肺损伤评分。病理学评分包含 4 项指标,每项指标按严重程度分为 0~3 分,具体标准:肺泡充血和间质水肿,无异常为 0 分、轻度异常为 1 分、中度异常为 2 分、重度异常为 3 分;肺内出血,无红细胞为 0 分、极少数红细胞为 1 分、较多数红细胞为 2 分、红细胞充满肺泡腔为 3 分;肺泡腔或血管壁中性粒细胞浸润或聚集,无白细胞为 0 分、极少数白细胞为 1 分、较多数白细胞为 2 分、白细胞充满肺泡腔为 3 分;肺泡壁增厚和透明膜形成,无透明膜形成 0 分、<20% 肺泡出现透明膜为 1 分、20%~50% 肺泡出现透明膜为 2 分、>50% 肺泡出现透明膜为 3 分^[16-17]。

1.5.3 肺组织、血清中炎症因子测定:处死小鼠取肺组织和血清,采用 ELISA 测定 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 水平,操作严格按试剂盒说明书进行。

1.5.4 细胞坏死性凋亡数检测:取肺组织酶消化液制备组织匀浆,放入一次性细胞筛网,筛网下方离心管承接,用注射器胶头轻轻碾碎组织,用离心管 300 g(离心半径为 10 cm)离心 5 min 收集细胞。经表面抗原染色后离心去上清液,加入 CD45 流式抗体避光孵育,重悬细胞,取细胞悬液加碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色液混匀,室温避光孵育。稀释样本后用流式细胞仪检测细胞坏死性凋亡数。

1.6 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检验坏死性凋亡相关蛋白水平:取肺组织裂解液裂解 30 min,12 000 g(离心半径为 10 cm)离心 15 min 取上清;用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定蛋白浓度,经电泳、转膜、室温封闭、孵育、洗膜二抗孵育,电化学发光(electrochemiluminescent immunoassay, ECL)显影液进行曝光,Image J 软件分析条带灰度值,以目的蛋白与内参照蛋白灰度的比值表示目的蛋白的相对表达水平。

1.7 统计学分析:使用 SPSS 26.0 统计软件分析数据。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,先经 Shapiro-Wilk 检验验证正态性,符合正态分布的数据行 Levene 方差齐性检验;方差齐性者采用单因素方差分析(One-way ANOVA)+LSD 检验,方差不齐者采用 One-way ANOVA+Dunnett T3 检验;非正态分布数据采用 Kruskal-Wallis H 检验。 $P<0.05$ 为

差异有统计学意义。

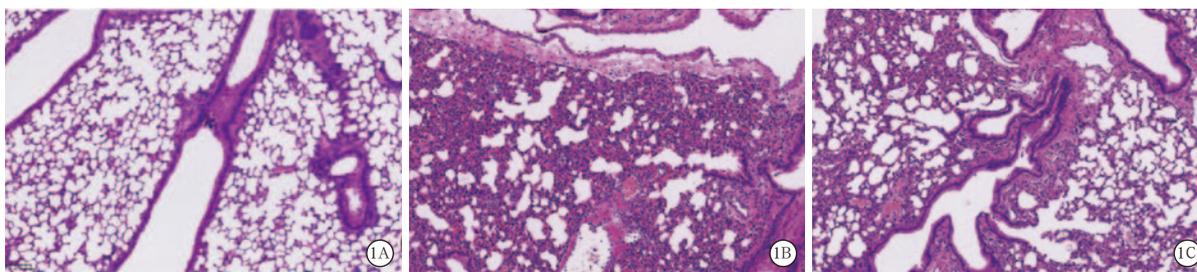
2 结果

2.1 虫草素对肺组织 W/D 比值的影响(表 1):与正常对照组比较, CLP 模型组小鼠的 W/D 比值显著升高 ($P < 0.05$), 表明制模成功并诱发了明显的肺水肿; 与 CLP 模型组比较, 虫草素干预组 W/D 比值显著降低 ($P < 0.05$), 提示虫草素对缓解脓毒症相关性肺水肿有一定作用。

组别	动物数 (只)	W/D 比值	肺损伤评分 (分)	CD45 ⁺
正常对照组	10	4.15 ± 0.06	1.80 ± 0.92	0.23 ± 0.05
CLP 模型组	10	5.66 ± 0.21 ^a	4.50 ± 0.97 ^a	0.31 ± 0.67 ^a
虫草素干预组	10	4.47 ± 0.24 ^{ab}	2.70 ± 0.67 ^{ab}	0.26 ± 0.05 ^{ab}

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 CLP 模型组比较, ^b $P < 0.05$

2.2 虫草素对脓毒症小鼠肺组织病理学改变的影响(图 1; 表 1):光镜下观察显示, 正常对照组肺泡大小均匀, 排列规整, 肺泡壁未见增厚, 无明显病理学异常; CLP 模型组可见肺泡壁显著增厚, 伴有毛细血管淤血、中性粒细胞浸润、血管周围淋巴细胞聚集以及支气管腔内出血; 虫草素治疗组主要表现为肺泡壁轻度增厚及少量肺泡扩张。CLP 模型组肺损伤评分明显高于正常对照组; 而虫草素干预组肺损伤评分明显低于 CLP 模型组 (均 $P < 0.05$), 表明虫草素可以有效减轻 CLP 所致的肺组织病理学损伤。



注: A 为正常对照组, B 为 CLP 模型组, C 为虫草素干预组

图 1 各组小鼠肺组织病理学观察 HE 染色 中倍放大

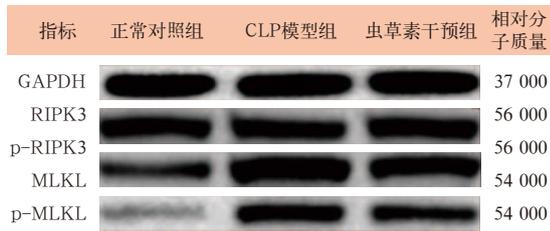
组别	动物数 (只)	肺组织 (ng/g)			血清 (ng/L)		
		TNF- α	IL-1 β	IL-6	TNF- α	IL-1 β	IL-6
正常对照组	10	234.22 ± 20.75	40.23 ± 2.27	2.37 ± 0.23	257.33 ± 5.26	44.77 ± 2.57	2.20 ± 0.09
CLP 模型组	10	308.65 ± 16.78 ^a	59.82 ± 2.59 ^a	3.11 ± 0.24 ^a	291.94 ± 17.52 ^a	55.52 ± 1.48 ^a	3.05 ± 0.20 ^a
虫草素干预组	10	263.94 ± 10.97 ^{ab}	50.34 ± 4.76 ^{ab}	2.75 ± 0.22 ^{ab}	266.15 ± 7.70 ^{ab}	51.34 ± 3.91 ^{ab}	2.68 ± 0.27 ^{ab}

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 CLP 模型组比较, ^b $P < 0.05$

2.3 虫草素对脓毒症小鼠肺组织、血清中炎症因子水平的影响(表 2):CLP 模型组小鼠肺组织及血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的水平均明显高于正常对照组 (均 $P < 0.05$); 虫草素干预组中上述炎症因子水平均明显低于 CLP 模型组 (均 $P < 0.05$), 提示虫草素可有效抑制脓毒症诱导的全身性及肺局部炎症反应。

2.4 虫草素对肺实质细胞凋亡的影响(表 1):流式细胞术检测结果显示, CLP 模型组 CD45⁺ 凋亡细胞比例较正常对照组明显升高, 虫草素干预组 CD45⁺ 凋亡细胞比例较 CLP 模型组明显降低 (均 $P < 0.05$), 提示虫草素可显著抑制脓毒症肺损伤模型小鼠肺实质细胞的凋亡。

2.5 虫草素对坏死性凋亡相关蛋白表达的影响(图 2; 表 4):Western blotting 结果显示, 与正常对照组比较, CLP 模型组中总蛋白 RIPK3/GAPDH 及总蛋白 MLKL/GAPDH 的相对表达水平比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 但其磷酸化形式 p-RIPK3/GAPDH 和 p-MLKL/GAPDH 的相对表达水平均显著升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。与 CLP 模型组比较, 虫草素干预组中总蛋白 RIPK3/GAPDH 及总蛋白 MLKL/GAPDH 的相对表达水平比较差异亦无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 而 p-RIPK3/GAPDH 和 p-MLKL/GAPDH 的相对表达水平均显著降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 提示虫草素可有效降低 RIPK3 与 MLKL 蛋白的磷酸化活化水平。



注：A 为空白对照组，B 为 CLP 模型组，C 为虫草素干预组

图 2 虫草素对脓毒症相关急性肺损伤肺组织中坏死性凋亡相关蛋白表达水平的影响

表 4 各组小鼠 MLKL、RIPK3 及其磷酸化形式蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	MLKL 蛋白表达 (MLKL/GAPDH)	p-MLKL 蛋白表达 (p-MLKL/GAPDH)
正常对照组	10	0.241 ± 0.006	0.192 ± 0.004
CLP 模型组	10	0.236 ± 0.008	0.446 ± 0.008 ^a
虫草素干预组	10	0.242 ± 0.006	0.359 ± 0.006 ^{ab}

组别	动物数 (只)	RIPK3 蛋白表达 (RIPK3/GAPDH)	p-RIPK3 蛋白表达 (p-RIPK3/GAPDH)
正常对照组	10	0.262 ± 0.004	0.151 ± 0.007
CLP 模型组	10	0.267 ± 0.005	0.403 ± 0.005 ^a
虫草素干预组	10	0.262 ± 0.005	0.311 ± 0.011 ^{ab}

注：与正常对照组比较^a $P < 0.05$ ；与 CLP 模型组比较，^b $P < 0.05$

3 讨论

根据本课题组前期研究，采用 CLP 建立经典的脓毒症 ALI 动物模型^[18-19]。结合预实验结果及本次实验数据，在虫草素干预组中虫草素通过预实验确定最佳给药剂量为 $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ，持续泵入 2 h，该剂量的虫草素可抑制坏死性凋亡并改善肺组织损伤，验证了其药理作用的稳定性与可靠性。本研究结果显示，与正常对照组比较，CLP 模型组的肺组织病理损伤程度、肺损伤评分、肺 W/D 比值、局部及全身炎症水平，以及凋亡相关指标和坏死性凋亡特异性蛋白磷酸化形式 p-RIPK3、p-MLKL 的表达水平均显著升高，表明 CLP 制模成功；与 CLP 模型组比较，虫草素干预组上述各项指标均显著降低，提示虫草素可有效干预脓毒症所致 ALI，其机制可能与抑制坏死性凋亡以减轻炎症反应相关。

脓毒症 ALI 的病理机制涉及细胞异常死亡与炎症反应的相互调控，肺组织细胞的异常死亡及其介导的巨噬细胞相关炎症反应被认为是导致肺功能障碍的关键环节^[12]。坏死性凋亡是一种由死亡受体 (death receptor, DR) 信号通路介导的非天冬氨酸特异性蛋白酶 (caspase) 依赖性程序性细胞死亡方式，已被证实广泛参与多种炎症性疾病的病理过程，并发挥关键调控作用。该过程以 RIPK1 与 RIPK3 的

磷酸化及活化为特征，随后特异性招募 MLKL，并催化其激酶样结构域的磷酸化，进而形成坏死体。坏死体与细胞膜紧密连接蛋白共定位，最终导致细胞及细胞器肿胀、质膜破裂以及 DNA 随机降解。坏死细胞释放 DAMP 和炎症因子，激活先天免疫细胞中促炎基因的表达，并促进炎症复合物在质膜上组装成跨膜孔道，引发质膜崩解，伴随大量 DAMP 释放，从而触发强烈的炎症级联反应^[20-21]。本研究结果显示，与正常对照组比较，CLP 模型组的肺损伤程度、局部与全身炎症水平、坏死性凋亡相关指标及特异性蛋白磷酸化形式 p-RIPK3、p-MLKL 的表达水平均明显升高，提示 CLP 模型可能通过促进坏死性凋亡加剧局部及全身炎症反应。

虫草素已被证实有抗炎、抗氧化应激损伤等多种生物学活性。Lei 等^[8]和 Qing 等^[9]的研究表明，虫草素可通过激活 HO-1 与 Nrf2 信号通路，增强对 TNF- α 和 IL-6 等炎症因子分泌的抑制作用，从而缓解 LPS 诱导的 ALI。另有研究显示，冬虫夏草提取物可通过抑制肺组织中 NF- κ B p65 的磷酸化以及 COX-2 和 iNOS 的表达，减轻 LPS 诱导的 ALI^[4]。Jiang 等^[12]进一步揭示了虫草素可抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路的活化，进而减轻急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 的炎症反应。在揭示虫草素治疗脓毒症 ALI 中的分子机制方面，本研究结果显示，与 CLP 模型组比较，虫草素干预组的肺组织病理学损伤程度、局部和全身炎症水平及坏死性凋亡水平均显著降低，提示虫草素可能通过抑制坏死性凋亡，减轻局部与全身炎症反应，进而缓解脓毒症 ALI。

值得关注的是，虫草素对于坏死性凋亡的抑制具有明确的分子特异性，即仅靶向 RIPK3/MLKL 的磷酸化激活过程，而不影响总蛋白的表达水平。在分子机制方面，坏死性凋亡的启动依赖于 RIPK3 与 MLKL 的连续磷酸化，RIPK3 被上游信号激活后发生自身磷酸化，进而招募并磷酸化 MLKL，磷酸化后的 MLKL 会迁移至细胞膜形成孔道，最终导致细胞坏死^[22]，在此通路中，总蛋白 RIPK3/MLKL 反映了细胞内该分子的总储备量，而磷酸化修饰是激活分子功能、启动通路的关键开关。本研究 Western blotting 结果提示脓毒症并非通过调控总蛋白合成或降解激活坏死性凋亡，而是依赖于磷酸化过程启动通路；虫草素则是通过直接阻断 RIPK3/MLKL 磷酸化激活这一核心步骤发挥肺保护作用，这一结论

与既往池文婕等^[23]针对虫草素对肠道炎症的保护作用得出的结论基本一致,该特异性调控模式的重要意义在于总蛋白稳定表达可维持细胞正常生理功能,而虫草素仅靶向病理状态下过度激活的磷酸化通路,避免了因总蛋白水平下调可能引发的正常细胞功能紊乱,作为其临床应用安全性的潜在理论支持。

综上所述,虫草素可有效减轻脓毒症 ALI 程度,其作用机制与抑制坏死性凋亡进而缓解炎症反应密切相关。该结果揭示了虫草素在调控脓毒症所致细胞坏死性凋亡中的关键作用,为其临床转化提供了重要的实验依据,尽管本研究在小鼠模型中取得了积极结果,但仍存在若干局限性:其一,临床脓毒症患者存在显著的个体差异(如基础疾病、免疫状态、病程进展等),动物模型难以完全复刻人类的病理生理特征,因此后续需开展临床前大动物模型研究及规范化临床试验,进一步验证虫草素的治疗效果;其二,虫草素的给药方式(如口服、静脉注射等)可能影响其生物利用度与疗效,未来应系统探究不同给药途径对其治疗脓毒症 ALI 效果的影响规律;其三,虫草素的潜在不良反应及长期用药的安全性尚未明确,需在后续研究中予以系统评估。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] O'Brien JM Jr, Ali NA, Aberegg SK, et al. Sepsis [J]. *Am J Med*, 2007, 120 (12): 1012–1022. DOI: 10.1016/j.amjmed.2007.01.035.
- [2] Jiang L, Yang DD, Zhang ZY, et al. Elucidating the role of *Rhodiola rosea* L. in sepsis-induced acute lung injury via network pharmacology: emphasis on inflammatory response, oxidative stress, and the PI3K-AKT pathway [J]. *Pharm Biol*, 2024, 62 (1): 272–284. DOI: 10.1080/13880209.2024.2319117.
- [3] Wang XY, Zhang K, Zhang JY, et al. Cordyceps militaris solid medium extract alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via regulating gut microbiota and metabolism [J]. *Front Immunol*, 2025, 15: 1528222. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1528222.
- [4] Fu SQ, Lu WN, Yu WQ, et al. Protective effect of Cordyceps sinensis extract on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39 (6): BSR20190789. DOI: 10.1042/BSR20190789.
- [5] 陈才伟, 陈家亮, 李华娟, 等. 虫草素调节 MAPK/AP-1 信号通路对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺组织损伤的影响 [J]. *临床肺科杂志*, 2023, 28 (11): 1656–1661. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6663.2023.11.008.
- [6] Zuo WZ, Tian FN, Ke J, et al. Mechanisms and research progress of traditional Chinese medicine regulating NF- κ B in the treatment of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome [J]. *Chin Med*

- [7] Nat Products, 2024, 4 (3): 93–105. DOI: 10.1055/s-0044-1790228.
- [7] Yang XF, Li YX, He YH, et al. Cordycepin alleviates airway hyperreactivity in a murine model of asthma by attenuating the inflammatory process [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 26 (2): 401–408. DOI: 10.1016/j.intimp.2015.04.017.
- [8] Lei JJ, Wei YL, Song PC, et al. Cordycepin inhibits LPS-induced acute lung injury by inhibiting inflammation and oxidative stress [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 818: 110–114. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.10.029.
- [9] Qing R, Huang ZZ, Tang YF, et al. Cordycepin alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 60: 18–25. DOI: 10.1016/j.intimp.2018.04.032.
- [10] Wang ZY, Wang Z. The role of macrophages polarization in sepsis-induced acute lung injury [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1209438. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1209438.
- [11] Qiao XY, Yin JH, Zheng ZH, et al. Endothelial cell dynamics in sepsis-induced acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and therapeutic implications [J]. *Cell Commun Signal*, 2024, 22 (1): 241. DOI: 10.1186/s12964-024-01620-y.
- [12] Jiang T, Liu ER, Li ZY, et al. SIRT1-Rab7 axis attenuates NLRP3 and STING activation through late endosomal-dependent mitophagy during sepsis-induced acute lung injury [J]. *Int J Surg*, 2024, 110 (5): 2649–2668. DOI: 10.1097/JS9.0000000000001215.
- [13] Kolbrink B, von Samson-Himmelstjerna FA, Murphy JM, et al. Role of necroptosis in kidney health and disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2023, 19 (5): 300–314. DOI: 10.1038/s41581-022-00658-w.
- [14] Zhong WJ, Zhang J, Duan JX, et al. TREM-1 triggers necroptosis of macrophages through mTOR-dependent mitochondrial fission during acute lung injury [J]. *J Transl Med*, 2023, 21 (1): 179. DOI: 10.1186/s12967-023-04027-4.
- [15] Sha HX, Liu YB, Qiu YL, et al. Neutrophil extracellular traps trigger alveolar epithelial cell necroptosis through the cGAS-STING pathway during acute lung injury in mice [J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20 (12): 4713–4730. DOI: 10.7150/ijbs.99456.
- [16] Song DY, Adrover JM, Felice C, et al. PTPIB inhibitors protect against acute lung injury and regulate CXCR4 signaling in neutrophils [J]. *JCI Insight*, 2022, 7 (14): e158199. DOI: 10.1172/jci.insight.158199.
- [17] Chen R, Cao C, Liu HM, et al. Macrophage Sprouty4 deficiency diminishes sepsis-induced acute lung injury in mice [J]. *Redox Biol*, 2022, 58: 102513. DOI: 10.1016/j.redox.2022.102513.
- [18] Guo CX, Zhang Y, Kong C, et al. Electroacupuncture pretreatment ameliorates Golgi stress and the inflammation response against endotoxin-induced lung injury [J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 146: 113868. DOI: 10.1016/j.intimp.2024.113868.
- [19] Cao YY, Zhang Y, Gerle W, et al. PLK1 protects intestinal barrier function during sepsis by targeting mitochondrial dynamics through TANK-NF- κ B signalling [J]. *Mol Med*, 2022, 28 (1): 163. DOI: 10.1186/s10020-022-00597-z.
- [20] Hu KB, He RF, Xu MX, et al. Identification of necroptosis-related features in diabetic nephropathy and analysis of their immune microenvironment and inflammatory response [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1271145. DOI: 10.3389/fcell.2023.1271145.
- [21] 吴梦瑶, 姚人骐, 段昱, 等. 应激诱导蛋白 Sestrin2 对脂多糖诱发树突状细胞坏死性凋亡的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2024, 36 (3): 237–243. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20240118-00057.
- [22] Shi FL, Yuan LS, Wong TS, et al. Dimethyl fumarate inhibits necroptosis and alleviates systemic inflammatory response syndrome by blocking the RIPK1-RIPK3-MLKL axis [J]. *Pharmacol Res*, 2023, 189: 106697. DOI: 10.1016/j.phrs.2023.106697.
- [23] 池文婕, 魏岚, 张秀霞, 等. 虫草素通过抑制 RIP1/RIP3/MLKL 信号通路减轻溃疡性结肠炎大鼠结肠组织坏死性凋亡的机制研究 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2024, 32 (6): 511–517. DOI: 10.3969/j.issn.1671-038X.2024.06.11

(收稿日期: 2025-11-10)

(责任编辑: 邸美仙)

关于经过广告审批后的广告中存在不规范医学名词术语未予更改的声明

依照广告审批的相关规定,按照广告厂家的要求,本刊刊登的血必净、力文广告图片和内容均按照广告审查批准文件的原件刊出,故广告内容“成份”未修改为“成分”,“适应症”“禁忌症”未按标准医学名词术语修改为“适应证”“禁忌证”,时间单位仍用汉字表示,剂量单位“ml”未修改为“mL”,“kcal”未修改为“kJ”,“其它”未修改为“其他”,“甘油三酯”未修改为“三酰甘油”。特此声明!