

本文引用:李堤,王建刚,刘新宇.阿魏酸哌嗪预处理对脓毒症大鼠急性肾损伤的保护作用及机制[J].新乡医学院学报,2023,40(12):1101-1106. DOI:10.7683/xyxyxb.2023.12.001.

【基础研究】

阿魏酸哌嗪预处理对脓毒症大鼠急性肾损伤的保护作用及机制

李 堤^{1,2}, 王建刚², 刘新宇²

(1. 新乡医学院研究生院, 河南 新乡 453003; 2. 南阳市中心医院血液净化科, 河南 南阳 473000)

摘要: 目的 探讨阿魏酸哌嗪(PF)对脓毒症大鼠急性肾损伤的保护作用及机制。方法 将24只雄性Sprague-Dawley大鼠随机分为假手术组、模型组、低剂量PF组和高剂量PF组,每组6只。低剂量PF组、高剂量PF组大鼠每天分别给予50、100 mg·kg⁻¹ PF混悬液灌胃,连续7 d;假手术组、模型组大鼠每天给予9 g·L⁻¹氯化钠溶液(0.1 mL·kg⁻¹)灌胃,连续7 d。假手术组大鼠行盲肠探查后关腹,不做盲肠结扎穿孔手术;模型组、低剂量PF组和高剂量PF组大鼠均行盲肠结扎穿孔手术制备急性肾损伤模型。造模后24 h,取各组大鼠颈动脉血并分离血清,应用生物化学法检测大鼠血清肌酐(Scr)、血尿素氮(BUN)水平,酶联免疫吸附试验法检测大鼠血清中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)、白细胞介素-6(IL-6)、降钙素原(PCT)水平。断头处死各组大鼠,取肾脏,应用苏木精-伊红(HE)染色观察大鼠肾组织病理学变化,Western blot法检测肾组织中核因子κB(NF-κB)、Toll样受体4(TLR4)、NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)蛋白的相对表达量。**结果** 模型组和低剂量PF组大鼠Scr、BUN及血清NGAL、IL-6、PCT水平显著高于假手术组($P<0.05$);高剂量PF组大鼠Scr、血清PCT水平显著高于假手术组($P<0.05$);高剂量PF组与假手术组大鼠BUN及血清NGAL和IL-6水平比较差异无统计学意义($P>0.05$);低剂量PF组和高剂量PF组大鼠Scr、BUN及血清NGAL、IL-6、PCT水平显著低于模型组($P<0.05$);高剂量PF组大鼠Scr、BUN及血清NGAL、IL-6、PCT水平显著低于低剂量PF组($P<0.05$)。HE染色显示,假手术组大鼠肾组织无明显异常改变;模型组大鼠肾小管上皮细胞明显肿胀变性,细胞质内有较多红染物,可见肾小管充血、变性坏死,管腔有大量炎症细胞浸润,系膜毛细血管间细胞增殖;低剂量PF组大鼠部分肾小管上皮细胞呈现轻、中度肿胀,部分肾小管上皮细胞变性坏死,未见大量炎症细胞浸润;高剂量PF组大鼠肾小管上皮细胞轻度肿胀,未见明显变性坏死及炎症细胞浸润。模型组和低剂量PF组大鼠肾组织中TLR4、NF-κB、NLRP3蛋白水平显著高于假手术组($P<0.05$);高剂量PF组大鼠肾组织中TLR4蛋白水平显著高于假手术组($P<0.05$),高剂量PF组与假手术组大鼠肾组织中NF-κB、NLRP3蛋白水平比较差异无统计学意义($P>0.05$);低剂量PF组和高剂量PF组大鼠肾组织中TLR4、NLRP3蛋白水平显著低于模型组($P<0.05$);高剂量PF组大鼠肾组织中NF-κB水平显著低于模型组($P<0.05$),低剂量PF组与模型组大鼠肾组织中NF-κB水平比较差异无统计学意义($P>0.05$);高剂量PF组大鼠肾组织中TLR4、NLRP3蛋白水平显著低于低剂量PF组($P<0.05$),高剂量PF组与低剂量PF组大鼠肾组织中NF-κB水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** PF干预可有效降低脓毒症急性肾损伤大鼠Scr、BUN及血清NGAL、IL-6和PCT水平,对脓毒症急性肾损伤大鼠肾脏发挥一定保护作用;其作用机制可能与抑制TLR4、NF-κB、NLRP3的表达,进而调控TLR4/NF-κB/NLRP3信号通路有关。

关键词: 阿魏酸哌嗪;急性肾损伤;脓毒症;降钙素原;核因子 κ B;Toll 样受体 4

中图分类号: R285.5; R692 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2023)12-1101-06

Protective effect and mechanism of piperazine ferulate pretreatment on acute kidney injury of rats with sepsis

LI Di^{1,2}, WANG Jiangang², LIU Xinyu²

(1. Department of Postgraduate, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; 2. Department of Blood Purification, Nanyang Central Hospital, Nanyang 473000, Henan Province, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effect and mechanism of piperazine ferulate (PF) on acute kidney

DOI:10.7683/xyxyxb.2023.12.001

收稿日期:2023-04-12

基金项目:河南省科技攻关计划项目(编号:212102310810);河南省医学科技攻关计划联合共建项目(编号:LHGJ20200906);南阳市科技发展计划项目(编号:JCQY020)。

作者简介:李 堤(1993-),男,河南南阳人,硕士研究生在读,住院医师,研究方向:血液净化。

通信作者:王建刚(1966-),男,河南南阳人,硕士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:血液净化;E-mail:wjg66777@163.com。

injury of rats with sepsis. **Methods** Twenty-four male Sprague Dawley rats were randomly divided into sham operation group, model group, low-dose PF group and high-dose PF group, with 6 rats in each group. The rats in the low-dose PF group and high-dose PF group were given 50 and 100 mg · kg⁻¹ PF suspension by gavage every day for 7 days, respectively. The rats in the sham operation group and model group were given 9 g · L⁻¹ sodium chloride solution (0.1 mL · kg⁻¹) by gavage every day for 7 days. The rats in the sham operation group underwent cecal exploration and closed their stomachs without undergoing cecal ligation and perforation surgery. The rats in the model group, low-dose PF group and high-dose PF group underwent cecal ligation and perforation surgery to prepare the acute kidney injury models. At 24 hours after modeling, carotid artery blood of rats in each group was collected and the serum was separated. The levels of serum creatinine (Scr) and blood urea nitrogen (BUN) were measured by biochemical methods, and the levels of neutrophil gelatinase related lipid transport protein (NGAL), interleukin-6 (IL-6), and procalcitonin (PCT) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The rats in each group were executed by decapitation, then the kidneys were taken. The pathological changes of the kidney tissues were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The relative expression levels of nuclear factor- κ B (NF- κ B), Toll-like receptor 4 (TLR4) and NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3) in renal tissues were detected by Western blot method. **Results** The levels of Scr, BUN and serum NGAL, IL-6 and PCT of rats in the model group and low-dose PF group were significantly higher than those in the sham operation group ($P < 0.05$). The levels of Scr and serum PCT of rats in the high-dose PF group were significantly higher than those in the sham operation group ($P < 0.05$); there was no statistically significant difference in the levels of BUN and serum NGAL and IL-6 of rats between the high-dose PF group and the sham operation group ($P > 0.05$). The levels of Scr, BUN and serum NGAL, IL-6 and PCT of rats in the low-dose PF group and high-dose PF group were significantly lower than those in the model group ($P < 0.05$). The levels of Scr, BUN and serum NGAL, IL-6 and PCT of rats in the high-dose PF group were significantly lower than those in the low-dose PF group ($P < 0.05$). HE staining showed that there were no significant abnormal changes in the renal tissues of rats in the sham operation group. The renal tubular epithelial cells of rats in the model group showed significant swelling and degeneration, with a large amount of red staining in the cytoplasm; the renal tubular had congestion, degeneration, and necrosis, with a large number of inflammatory cells infiltrating the lumen, and cell proliferation in the mesangial-capillaries space. In the low dose PF group, some renal tubular epithelial cells of rats showed mild to moderate swelling, some renal tubular epithelial cells showed degeneration and necrosis, and no significant infiltration of inflammatory cells was observed. The renal tubular epithelial cells of rats in the high-dose PF group showed mild swelling, without significant degeneration, necrosis and inflammatory cell infiltration. The levels of TLR4, NF- κ B and NLRP3 protein in renal tissues of rats in the model group and low-dose PF group were significantly higher than those in the sham operation group ($P < 0.05$). The level of TLR4 protein in renal tissues of rats in the high-dose PF group was significantly higher than that in the sham operation group ($P < 0.05$); there was no statistically significant difference in the levels of NF- κ B and NLRP3 protein in the renal tissues of rats between the high-dose PF group and sham operation group ($P > 0.05$). The levels of TLR4 and NLRP3 proteins in the renal tissues of rats in the low-dose PF group and high-dose PF group were significantly lower than those in the model group ($P < 0.05$); the level of NF- κ B in renal tissues of rats in the high-dose PF group was significantly lower than that in the model group ($P < 0.05$); there was no statistically significant difference in the level of NF- κ B in renal tissues of rats between the low-dose PF group and model group ($P > 0.05$). The levels of TLR4 and NLRP3 proteins in tissues of rats in the high-dose PF group were significantly lower than those in the low-dose PF group ($P < 0.05$); there was no statistically significant difference in the level of NF- κ B in renal tissues of rats between the high-dose PF group and low-dose PF group ($P > 0.05$). **Conclusion** PF intervention can effectively reduce the levels of Scr, BUN and serum NGAL, IL-6 and PCT of rats with septic acute kidney injury, and play a certain protective role on the kidneys of rats with septic acute kidney injury; its mechanism may be related to inhibiting the expression levels of TLR4, NF- κ B and NLRP3, thereby regulating TLR4/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway.

Key words: piperazine ferulate; acute kidney injury; sepsis; procalcitonin; nuclear factor- κ B; Toll-like receptor 4

脓毒症是造成急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)的主要原因之一^[1],约60%的脓毒症患者并发AKI^[2],而重症监护病房中脓毒症并发AKI患者病死率高达41%^[3]。既往研究表明,脓毒症在AKI的病因和发病机制中起重要作用,肾组织对脓毒症的反应机制与AKI有关^[4]。目前,脓毒症并发AKI患

者的治疗方法有限,主要包括抗生素控制感染、及时应用液体复苏、血液净化技术等治疗手段^[5]。阿魏酸哌嗪(piperazine ferulate, PF)是由川芎的有效成分阿魏酸和哌嗪环缩合成的化合物,通过抗凝血、舒张血管、抑制血小板聚集和炎症、减少血管内膜、松弛血管平滑肌、扩张肾血管等作用,改善肾血流动力学

和微循环;PF 在临床中主要应用于慢性肾小球肾炎、肾病综合征、高血压肾病以及糖尿病肾病的治疗^[6-7]。有研究表明,PF 联合黄芪注射液能有效降低 AKI 患者 β_2 微球蛋白、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL)水平,从而改善肾功能^[8]。有研究报道,PF 可抑制转化生长因子- β_1 和纤连蛋白(fibronectin, FN)的表达,从而改善高血压肾病大鼠的肾功能^[9]。但是,目前 PF 治疗 AKI 患者的具体机制仍不清楚。本研究主要观察 PF 对 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)/核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)/NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)信号通路的影响,探讨 PF 在 AKI 治疗中的作用机制,以期 PF 的临床应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级雄性 Sprague Dawley(SD)大鼠 32 只,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物许可证:SCXK(湘)2019-0004,体质量(300 ± 20) g;饲养于南阳医学高等专科学校动物实验室,温度(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度 50%,12 h/12 h 光-暗循环;用标准的实验室饲料喂养,自由饮水。所有动物实验程序均按照中国《实验动物护理与使用指南》执行。

1.2 主要试剂与仪器

PF 分散片购自山东希尔康泰药业有限公司(国药准字 H20052333), $9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠溶液购自石家庄第四制药有限公司,血清肌酐(serum creatinine, Scr)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所,NGAL、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、降钙素原(procalcitonin, PCT)酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司,多聚甲醛固定液购自武汉赛维尔生物科技有限公司,苏木精染色液购自美国 Sigma 公司,伊红染色液、无水乙醇、二甲苯、盐酸、包埋石蜡、中性树胶均购自上海国药集团化学试剂有限公司,磷酸酶抑制剂和放射免疫沉淀法(radio immunoprecipitation assay, RIPA)裂解液购自大连美仑生物技术有限公司,二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白检测试剂盒购自广州捷倍斯生物科技有限公司,鼠单抗 TLR4 购自武汉三鹰生物技术有限公司,甘油

醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体购自杭州贤至生物有限公司,兔多抗 NF- κ B、兔多抗 NLRP3 购自美国 Affinity 公司;Multiskan FC 酶标仪购自美国 Thermo Scientific 公司,DS-Fi3 光学显微镜购自日本尼康公司,DK-20000-IIIIL 电热恒温水浴锅购自河北菲斯福仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组与处理

PF 混悬液制备:将 PF 分粉碎,溶于 $9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠溶液,充分摇匀震荡。按照随机数字表法将 32 只 SD 大鼠分为假手术组、模型组、低剂量 PF 组、高剂量 PF 组,每组 8 只。低剂量 PF 组、高剂量 PF 组大鼠每天分别给予 50 、 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PF 混悬液灌胃,连续 7 d;假手术组、模型组大鼠每天灌胃 $9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠溶液($0.1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),连续 7 d。假手术组大鼠仅打开大鼠腹腔缓慢翻动并找到盲肠后将其归位,缝线关闭腹腔。模型组、低剂量 PF 组、高剂量 PF 组大鼠采用盲肠结扎穿孔手术构建大鼠 AKI 模型^[10-11]:术前禁食 12 h,可自由饮水。在无菌条件下,大鼠腹腔注射 $0.04 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 水合氯醛麻醉。麻醉下进行腹部正中线切开约 2 cm,缓慢找到盲肠,在回肠盲肠瓣下 3-0 缝线结扎盲肠,维持肠道连续性。在盲肠表面上 3 个间隔约 0.8 cm 的位置用 18G 针头贯穿 3 次盲肠,轻轻挤压,挤出少量粪便。之后按大鼠肠道生理位置还纳盲肠,逐层缝合关闭腹腔,手术操作后立即用 $9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠溶液($0.1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)皮下注射,防止大鼠出现休克死亡。术后大鼠可以自由进食饮水。造模前药物灌胃后出现 2 只大鼠死亡(高剂量 PF 组 1 只,低剂量 PF 组 1 只),造模过程出现 4 只大鼠死亡(模型组 2 只,高低剂量 PF 组和低剂量 PF 组各 1 只),最后分别剔除假手术组 Scr 最高和最低值各 1 只,纳入后续实验共 24 只大鼠,假手术组、模型组、低剂量 PF 组、高剂量 PF 组各 6 只。

1.3.2 血液及肾脏组织标本收集

造模 24 h 后,各组大鼠腹腔注射 $0.04 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 水合氯醛进行麻醉,在麻醉状态下剪开大鼠颈动脉,取血并置于不含抗凝剂的血液生化管中,室温静置 2 h 后, $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,收集血清备用。断头处理各组大鼠,打开腹腔,切除肾脏,采用 $9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠溶液清洗肾脏组织;取部分肾组织, $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醛固定液固定;剩余肾组织置于

-80 ℃ 冰箱保存备用。

1.3.3 生物化学法检测大鼠 Scr、BUN 水平

取各组大鼠血清标本,应用生物化学法检测 Scr、BUN 水平,严格按试剂盒说明书进行操作。

1.3.4 ELISA 法检测大鼠血清 NGAL、IL-6 和 PCT 水平

取各组大鼠血清标本,应用 ELISA 法检测血清 NGAL、IL-6 和 PCT 水平,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.3.5 苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察大鼠肾组织病理变化

取固定于 40 g · L⁻¹多聚甲醛溶液中的肾组织,流水冲洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,制作厚约 4 μm 切片;取组织切片,行 HE 染色,显微镜下观察大鼠肾组织病理变化。

1.3.6 Western blot 法检测大鼠肾组织中 TLR4、NF-κB、NLRP3 蛋白表达

取保存于冰箱中的大鼠肾组织,使用 200 μL RIPA 裂解液裂解肾组织,用含蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物提取总蛋白,BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度;应用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样品,电转移至聚偏二氟乙烯膜,用脱脂奶粉溶液在室温下封闭 2 h;然后,滴加 TLR4 (滴度为 1 : 4 000)、兔多抗 NF-κB (滴度为 1 : 1 000)、兔多抗 NLRP3 (滴度为 1 : 1 000)和 GAPDH (滴度为 1 : 1 000)一抗,4 ℃ 孵育过夜;滴加二抗辣根过氧化物酶,室温孵育 2 h;使用增强型电化学发光溶液显影,应用 Image Pro Plus 软件分析灰度值,以 GAPDH 为内参对照,目的蛋白相对表达量以目的蛋白条带灰度值与内参蛋白条带灰度值的比值表示。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用最小显著性差异法 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组大鼠 Scr、BUN 水平比较

模型组和低剂量 PF 组大鼠 Scr、BUN 水平显著高于假手术组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05);高剂量 PF 组大鼠 Scr 水平显著高于假手术组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05);高剂量 PF 组与假手术组大鼠 BUN 水平比较差异无统计学意义 (*P* > 0.05);低剂

量 PF 组和高剂量 PF 组大鼠 Scr、BUN 水平显著低于模型组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05);高剂量 PF 组大鼠 Scr、BUN 水平显著低于低剂量 PF 组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。结果见表 1。

表 1 4 组大鼠 Scr、BUN 水平比较

Tab.1 Comparison of the levels of Scr and BUN of rats among the four groups ($\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	Scr/(μmol · L ⁻¹)	BUN/(mmol · L ⁻¹)
假手术组	6	70.07 ± 6.17	8.25 ± 1.19
模型组	6	141.19 ± 5.08 ^a	16.74 ± 0.47 ^a
低剂量 PF 组	6	119.75 ± 4.45 ^{ab}	14.35 ± 0.52 ^{ab}
高剂量 PF 组	6	89.08 ± 3.83 ^{abc}	9.15 ± 0.39 ^{bc}

注:与假手术组比较^a*P* < 0.05;与模型组比较^b*P* < 0.05;与低剂量 PF 组比较^c*P* < 0.05。

2.2 4 组大鼠血清 NGAL、IL-6 和 PCT 水平比较

模型组和低剂量 PF 组大鼠血清 NGAL、IL-6、PCT 水平显著高于假手术组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05);高剂量 PF 组大鼠血清 PCT 水平显著高于假手术组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05);高剂量 PF 组与假手术组大鼠血清 NGAL 和 IL-6 水平比较差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。低剂量 PF 组和高剂量 PF 组大鼠血清 NGAL、IL-6 和 PCT 水平显著低于模型组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05);高剂量 PF 组大鼠血清 NGAL、IL-6 和 PCT 水平均显著低于低剂量 PF 组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。结果见表 2。

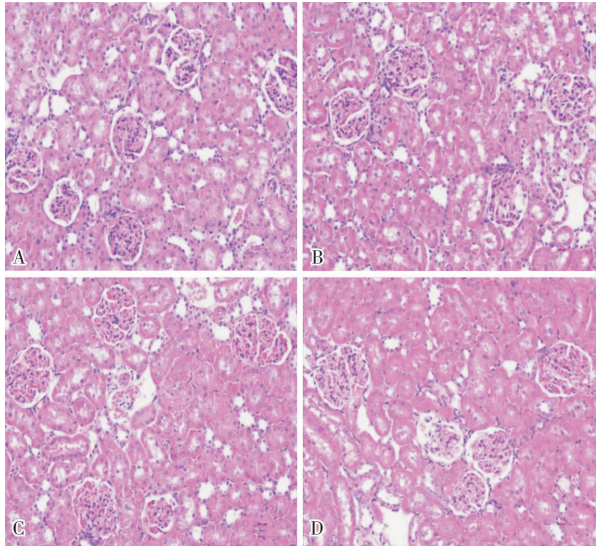
表 2 4 组大鼠血清 NGAL、IL-6 和 PCT 水平比较

Tab.2 Comparison of serum NGAL,IL-6 and PCT levels of rats among the four groups (ng · L ⁻¹ , $\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	NGAL	IL-6	PCT
假手术组	6	170.87 ± 30.72	7.63 ± 1.60	62.26 ± 4.37
模型组	6	505.94 ± 57.56 ^a	23.46 ± 3.35 ^a	214.47 ± 16.99 ^a
低剂量 PF 组	6	430.32 ± 54.38 ^{ab}	15.05 ± 1.70 ^{ab}	155.25 ± 6.99 ^{ab}
高剂量 PF 组	6	231.90 ± 38.91 ^{bc}	9.70 ± 2.30 ^{bc}	90.477 ± 8.94 ^{abc}

注:与假手术组比较^a*P* < 0.05;与模型组比较^b*P* < 0.05;与低剂量 PF 组比较^c*P* < 0.05。

2.3 4 组大鼠肾组织病理学变化

假手术组大鼠肾组织无明显异常改变 (图 1A)。模型组大鼠肾小管上皮细胞明显肿胀变性,细胞质内有较多红染物,可见肾小管充血、变性坏死,管腔有大量炎症细胞浸润,系膜毛细血管间细胞增殖 (图 1B)。低剂量 PF 组大鼠部分肾小管上皮细胞呈现轻中度肿胀,部分肾小管上皮细胞变性坏死,未见大量炎症细胞浸润 (图 1C)。高剂量 PF 组大鼠肾小管上皮细胞轻度肿胀,未见明显变性坏死及炎症细胞浸润 (图 1D)。



A:假手术组;B:模型组;C:低剂量 PF 组;D:高剂量 PF 组。

图 1 4 组大鼠肾组织病理学(HE 染色, ×200)

Fig.1 Histopathology of renal tissues of rats in the four groups (HE staining, ×200)

2.4 4 组大鼠肾组织中 TLR4、NF-κB 和 NLRP3 蛋白水平比较

模型组和低剂量 PF 组大鼠肾组织中 TLR4、NF-κB、NLRP3 蛋白水平显著高于假手术组,差异有统计学意义($P<0.05$);高剂量 PF 组大鼠肾组织中 TLR4 蛋白水平显著高于假手术组,差异有统计学意义($P<0.05$)。高剂量 PF 组与假手术组大鼠肾组织中 NF-κB、NLRP3 蛋白水平比较差异无统计学意义($P>0.05$);低剂量 PF 组和高剂量 PF 组大鼠肾组织中 TLR4、NLRP3 蛋白水平显著低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$);PF 高剂量组大鼠肾组织中 NF-κB 水平显著低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$);低剂量 PF 组与模型组大鼠肾组织中 NF-κB 水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。高剂量 PF 组大鼠肾组织中 TLR4、NLRP3 蛋白水平显著低于低剂量 PF 组,差异有统计学意义($P<0.05$);高剂量 PF 组与低剂量 PF 组大鼠肾组织中 NF-κB 水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结果见表 3。

表 3 4 组大鼠肾组织中 TLR4、NF-κB 和 NLRP3 蛋白相对表达量比较

Tab.3 Comparison of the relative expressions of TLR4, NF-κB and NLRP3 protein in renal tissues of rats among the four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TLR4/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	NF-κB/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	NLRP3/($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)
假手术组	6	0.092 ± 0.041	0.619 ± 0.042	0.049 ± 0.010
模型组	6	0.624 ± 0.079 ^a	0.820 ± 0.071 ^a	0.440 ± 0.052 ^a
低剂量 PF 组	6	0.437 ± 0.069 ^{ab}	0.742 ± 0.048 ^a	0.305 ± 0.062 ^{ab}
高剂量 PF 组	6	0.234 ± 0.061 ^{abc}	0.684 ± 0.031 ^b	0.094 ± 0.028 ^{bc}

注:与假手术组比较^a $P<0.05$;与模型组比较^b $P<0.05$;与低剂量 PF 组比较^c $P<0.05$ 。

3 讨论

脓毒症是目前临床中急危重症患者主要面临的

并发症之一^[12]。NGAL 是近年来发现的与脓毒症并发 AKI 相关的生物标志物;正常情况下,NGAL 主要在中性粒细胞及肾小管上皮细胞中呈低水平表达^[13]。而在 AKI 模型大鼠尿液及血浆中 NGAL 水平会明显升高,认为其可作为 AKI 的判断依据^[14]。Scr 和 BUN 是常用的反映肾功能的指标。本研究结果显示,模型组、低剂量 PF 组大鼠 Scr、BUN 及血清 NGAL 水平显著高于假手术组,高剂量 PF 组大鼠 Scr 水平显著高于假手术组,低剂量 PF 组和高剂量 PF 组大鼠 Scr、BUN 及血清 NGAL 水平显著低于模型组,高剂量 PF 组大鼠 Scr、BUN 及血清 NGAL 水平显著低于低剂量 PF 组。另外,肾组织病理学检测显示,假手术组大鼠肾组织无明显异常改变;模型组大鼠肾小管上皮细胞明显肿胀变性,细胞质内有较多红染物,可见肾小管有充血变性坏死,管腔有大量炎症细胞浸润,系膜毛细血管间细胞增殖;低剂量 PF 组大鼠部分肾小管上皮细胞呈现轻中度肿胀,部分肾小管上皮细胞变性坏死,未见大量炎症细胞浸润;高剂量 PF 组大鼠肾小管上皮细胞轻度肿胀,未见明显变性坏死及炎症细胞浸润;提示 PF 预处理对 AKI 具有保护性作用,且这种作用呈一定的剂量依赖性。

IL-6 和 PCT 在全身炎症反应中起重要作用,与机体感染严重程度及脓毒症患者的预后密切相关^[15]。有研究表明,IL-6 对脓毒症具有较高的诊断效能、敏感度及特异度^[16-17]。PCT 水平在全身炎症反应尤其是细菌感染导致的炎症反应时会明显升高,可作为脓毒症或脓毒性休克早期诊断的血清标志物,且动态监测 PCT 水平有助于指导脓毒症感染患者的治疗^[18]。本研究结果显示,模型组和低剂量 PF 组大鼠血清 IL-6、PCT 水平显著高于假手术组,高剂量 PF 组大鼠血清 PCT 水平显著高于假手术组,低剂量 PF 组和高剂量 PF 组大鼠血清 IL-6、PCT 水平显著低于模型组,高剂量 PF 组大鼠血清 IL-6、PCT 水平显著低于低剂量 PF 组;提示 PF 预处理可能通过抑制 IL-6 和 PCT 水平对脓毒症肾损伤发挥保护效应。

TLR4 受体是免疫细胞表面识别病原的识别受体家族成员之一,在脓毒症发生过程,可激活 NF-κB,引起 IL-6、PCT 及肿瘤坏死因子-α 等炎症因子的表达,加重炎症反应^[19-20]。NLRP3 炎症复合体是一组多蛋白组成的分子,由 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白和半胱天冬酶前体-1 组成的多蛋白复合体^[21-22]。研究表明,NLRP3 炎症复合体主要参与 AKI 病理过程,可促进 Scr 水平升高,增加中性粒细胞浸润,促进炎症反应^[23]。本研究结果显示,模型组和低剂量 PF 组大鼠肾组织中 TLR4、NF-κB、NLRP3 蛋白水平显著高于假手术组,高剂量 PF 组大鼠肾组织中 TLR4 蛋白水平显著高于假手术组,低剂量 PF 组和高

剂量 PF 组大鼠肾组织中 TLR4、NLRP3 蛋白水平显著低于模型组,高剂量 PF 组大鼠肾组织中 NF- κ B 水平显著低于模型组,高剂量 PF 组大鼠肾组织中 TLR4、NLRP3 蛋白水平显著低于低剂量 PF 组;提示 AKI 大鼠肾组织中 TLR4、NF- κ B、NLRP3 蛋白表达水平显著升高,而 PF 可抑制 TLR4、NF- κ B、NLRP3 的表达,进而调控 TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路,从而对脓毒症 AKI 发挥保护作用。

4 结论

PF 干预可有效降低大鼠 Scr、BUN 及血清 NGAL、IL-6 和 PCT 水平,对 AKI 大鼠肾脏发挥一定保护性作用,其作用机制可能与抑制 TLR4、NF- κ B、NLRP3 的表达,进而调控 TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路有关。

参考文献:

- [1] MANRIQUE-CABALLERO C L, DEL RIO-PUERTAS G, GOMEZ H. Sepsis-associated acute kidney injury[J]. *Crit Care Clin*, 2021, 37(2): 279-301.
- [2] 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.
- [3] PEERAPORNATANA S, MANRIQUE-CABALLERO C L, GÓMEZ H, et al. Acute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment[J]. *Kidney Int*, 2019, 96(5): 1083-1099.
- [4] KUWABARA S, GOGGINS E, OKUSA M D. The pathophysiology of sepsis-associated AKI[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2022, 17(7): 1050-1069.
- [5] GUAN M, WANG H, TANG X, et al. Continuous renal replacement therapy with adsorbing filter oXiris in acute kidney injury with septic shock: a retrospective observational study[J]. *Front Med*, 2022, 9: 789623.
- [6] 邓榕榕, 姚亮元, 向大雄. 阿魏酸哌嗪药理作用研究进展[J]. *中南药学*, 2018, 16(11): 1575-1578.
DENG R R, YAO L Y, XIANG D X. Pharmacological effect of piperazine ferulate[J]. *Cent South Pharm*, 2018, 16(11): 1575-1578.
- [7] 李文歌, 李贵森, 姚丽, 等. 阿魏酸哌嗪片治疗肾脏疾病临床应用专家共识[J]. *中国实用内科杂志*, 2021, 41(7): 584-589.
LI W G, LI G S, YAO L, et al. Expert consensus on clinical application of piperazineferulate tablets on kidney diseases[J]. *Chin J Pract Intern Med*, 2021, 41(7): 584-589.
- [8] 吴霞, 石帅, 陈庆云, 等. 阿魏酸哌嗪片联合黄芪注射液治疗急性肾衰竭临床研究[J]. *现代医用影像学*, 2019, 28(4): 914-916.
WU X, SHI S, CHEN Q Y, et al. Clinical study of piperazine ferulate tablets combined with Astragalus injection in the treatment of acute renal failure[J]. *Mod Med Imageol*, 2019, 28(4): 914-916.
- [9] 郝伟迤, 苏强, 刘丹. 阿魏酸哌嗪对高血压肾病大鼠肾脏损伤的保护作用机制分析[J]. *解放军医药杂志*, 2019, 31(3): 29-33.
HAO W Y, SU Q, LIU D. Protective mechanism of piperazine ferulate on renal damage in rats with hypertensive nephropathy[J]. *Med Pharm J Chin PLA*, 2019, 31(3): 29-33.
- [10] 彭光辉, 邓晓彬, 吕立文. 脓毒症动物模型的研究进展[J]. *广西医科大学学报*, 2020, 37(8): 1577-1581.
PENG F H, DENG X B, LYU L W. Research progress in animal models of sepsis[J]. *J Guangxi Med Univ*, 2020, 37(8): 1577-1581.
- [11] CAI L, RODGERS E, SCHOENMANN N, et al. Advances in rodent experimental models of sepsis[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(11): 9578.
- [12] 王光权, 李洪, 潘在轩. 微 RNA-204 靶向硫氧还蛋白相互作用蛋白对脓毒症大鼠急性肺损伤的保护作用[J]. *新乡医学院学报*, 2021, 38(7): 612-618.
WANG G Q, LI H, PAN Z X, et al. Protective effect of microRNA-204 on acute lung injury of rats with sepsis by targeting thioredoxin interacting protein[J]. *J Xinxiang Med Univ*, 2021, 38(7): 612-618.
- [13] CHO S Y, HUR M. New issues with neutrophil gelatinase-associated lipocalin in acute kidney injury[J]. *Ann Lab Med*, 2023, 43(6): 529-530.
- [14] MARAKALA V. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in kidney injury: a systematic review[J]. *Clin Chim Acta*, 2022, 536: 135-141.
- [15] 李晓飞, 王静. 中性粒细胞 CD64 与白细胞介素-6 和降钙素原对 ICU 脓毒症患者的诊断及预后评估[J]. *中华危重病急救医学*, 2023, 35(5): 463-468.
LI X F, WANG J. Diagnostic and prognostic value of neutrophil CD64, IL-6, and PCT in ICU patients with sepsis[J]. *Chin Crit Care Med*, 2023, 35(5): 463-468.
- [16] 莫金英, 余希, 符青松, 等. IL-6 对脓毒症的早期预警作用及抗感染疗效的预测价值[J]. *川北医学院学报*, 2022, 37(11): 1439-1442.
MO J Y, YU X, FU Q S, et al. Clinical study of IL-6 on early warning sepsis and predicting anti-infective efficacy[J]. *J N Sichuan Med Coll*, 2022, 37(11): 1439-1442.
- [17] HUANG W, HUANG L, WEN M, et al. Long non-coding RNA DILC is involved in sepsis by modulating the signaling pathway of the interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3/Toll-like receptor 4 axis[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(6): 5775-5783.
- [18] 鲁静. 血清降钙素原在新生儿败血症病情和预后评估中的应用价值[J]. *新乡医学院学报*, 2021, 38(12): 1171-1174.
LU J. Value of serum procalcitonin in evaluating the condition and prognosis of neonatal sepsis[J]. *J Xinxiang Med Univ*, 2021, 38(7): 612-618.
- [19] LIU H H, WANG J S, LIN J Z, et al. LPS induced PCT production via TLR4/NF- κ B pathway: it is the difference of G-/G+ bacteremia rats[J]. *Cytokine*, 2021, 137: 155317.
- [20] 曹裕孟, 潘华勤, 张固琴, 等. Toll 样受体 4 在脓毒症中的研究进展[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2023, 44(2): 234-239.
CAO Y M, PAN H Q, ZHANG G Q, et al. Research advances of toll-like receptor 4 in sepsis[J]. *Med J Wuhan Univ*, 2023, 44(2): 234-239.
- [21] 许超, 王松田. 原发性开角型青光神经损伤患者血浆内皮素-1 水平与核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 炎症复合体及炎症因子和眼动脉血流的相关性[J]. *新乡医学院学报*, 2021, 38(6): 550-554.
XU C, WANG S T. Correlation of plasma endothelin-1 level with nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 inflammatory complex, inflammatory factors and ophthalmic artery blood flow in patients with primary open angle glaucoma and optic nerve injury[J]. *J Xinxiang Med Univ*, 2021, 38(6): 550-554.
- [22] 吴俊, 卢一琛, 黄竹, 等. 腹腔穿刺引流对重症急性胰腺炎大鼠胰腺细胞焦亡的影响及其意义[J]. *解放军医学杂志*, 2022, 47(9): 863-870.
WU J, LU Y C, HUANG Z, et al. Effect of abdominal paracentesis drainage on pancreatic pyroptosis of rats with severe acute pancreatitis and its significance[J]. *Med J Chin PLA*, 2022, 47(9): 863-870.
- [23] 赵婷, 张芳菲, 汪年松, 等. NLRP3 炎症小体作为肾脏疾病潜在治疗靶标的研究进展[J]. *中国临床医学*, 2022, 29(4): 685-695.
ZHAO T, ZHANG F F, WANG N S, et al. Research progress of NLRP3 inflammasome as a potential therapeutic target for kidney disease[J]. *Chin J Clin Med*, 2022, 29(4): 685-695.

(本文编辑:周二强)