

# 鹅掌楸苷对脓毒症急性肾损伤大鼠肠道菌群及铁死亡通路的影响

郭婵<sup>1</sup> 崔凌志<sup>2</sup> 周旻<sup>1</sup> 卓玉珍<sup>3</sup> 杨磊<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>天津医科大学研究生院,天津 300070; <sup>3</sup>天津市南开医院中西医结合急腹症研究所,天津 300100

通信作者:李家瑞,Email:13821359282@163.com

**【摘要】 目的** 探讨鹅掌楸苷对脓毒症诱导的急性肾损伤(AKI)大鼠肠道菌群和肾组织铁死亡信号通路的影响。**方法** 将30只雄性SD大鼠按随机数字表法分为假手术组(Sham组)、盲肠结扎穿孔术(CLP)致脓毒症模型组(CLP组)、鹅掌楸苷干预组(CLP+LIR组),每组10只。CLP+LIR组于制模前2h给予100 mg/kg的鹅掌楸苷0.2 mL灌胃;Sham组和CLP组给予等体积生理盐水灌胃。制模后24h麻醉动物取材,采用苏木素-伊红(HE)染色观察肾组织病理变化;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测外周血肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(IL-1 $\beta$ 、IL-6)等炎症因子水平,同时测定外周血肌酐(Cr)和尿素(UREA)等肾功能指标及肾组织中丙二醛(MDA)和铁离子( $\text{Fe}^{2+}$ )含量;采用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测肾组织中核因子E2相关因子2(Nrf2)、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)和血红素加氧酶1(HO-1)的表达;采用16S rDNA高通量测序检测肠道菌群变化。**结果** 与Sham组比较,CLP组大鼠肾小球体积增大,肾间质水肿明显,肾组织结构紊乱,病理评分显著升高;外周血中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、Cr和UREA含量及肾脏组中MDA、 $\text{Fe}^{2+}$ 水平明显升高;肾组织中Nrf2、GPX4和HO-1的蛋白表达显著下调;肠道菌群的物种丰富度显著降低,摩根菌属、柠檬酸杆菌属、变形杆菌属、克雷伯菌属、志贺菌属、聚集杆菌属和肠球菌属等致病菌的相对丰度显著增加,丁酸单胞菌属、韦荣球菌属、普雷沃菌属、乳杆菌属、双歧杆菌属和瘤胃球菌属等有益菌的相对丰度显著降低。与CLP组相比,CLP+LIR组可以显著减轻大鼠肾脏组织病理损伤,病理评分显著降低(分:  $1.80 \pm 0.84$  比  $4.20 \pm 1.30$ ,  $P < 0.05$ );改善肠道菌群组成,降低变形杆菌属、克雷伯菌属、志贺菌属、聚集杆菌属和肠球菌属等致病菌的相对丰度,并显著增加乳杆菌属、双歧杆菌属和瘤胃球菌属的相对丰度;显著降低外周血中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、Cr和UREA含量及肾组织中MDA、 $\text{Fe}^{2+}$ 水平[血TNF- $\alpha$  (ng/L):  $191.31 \pm 7.23$  比  $254.90 \pm 47.89$ , 血IL-1 $\beta$  (ng/L):  $11.15 \pm 4.04$  比  $23.06 \pm 1.67$ , 血IL-6 (ng/L):  $163.20 \pm 17.83$  比  $267.69 \pm 20.92$ , 血Cr ( $\mu\text{mol/L}$ ):  $24.14 \pm 4.25$  比  $41.17 \pm 5.43$ , 血UREA (mmol/L):  $4.59 \pm 0.90$  比  $8.01 \pm 1.07$ , 肾MDA ( $\mu\text{mol/g}$ ):  $9.67 \pm 0.46$  比  $16.05 \pm 0.88$ , 肾 $\text{Fe}^{2+}$  (mg/g):  $0.71 \pm 0.07$  比  $0.93 \pm 0.04$ , 均  $P < 0.05$ ],增加肾组织中Nrf2、GPX4和HO-1的蛋白表达(Nrf2/GAPDH:  $1.21 \pm 0.01$  比  $0.39 \pm 0.01$ , GPX4/GAPDH:  $0.74 \pm 0.04$  比  $0.48 \pm 0.04$ , HO-1/GAPDH:  $0.91 \pm 0.01$  比  $0.41 \pm 0.02$ , 均  $P < 0.05$ )。**结论** 鹅掌楸苷对脓毒症所致大鼠AKI具有明显的保护作用,其作用机制可能涉及调节肠道菌群、激活肾脏组织中Nrf2/HO-1/GPX4信号通路,以及抑制铁死亡。

**【关键词】** 脓毒症; 鹅掌楸苷; 铁死亡; 肠道菌群; 急性肾损伤

**基金项目:** 天津市卫生健康委员会中医中西医结合科研课题(2023048)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20250421-00384

## Effect of liriodendrin on intestinal flora and ferroptosis pathway in septic rats with acute kidney injury

Guo Chan<sup>1</sup>, Cui Lingzhi<sup>2</sup>, Zhou Min<sup>1</sup>, Zhuo Yuzhen<sup>3</sup>, Yang Lei<sup>3</sup>, Li Jiarui<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Nephrology, Nankai Hospital, Tianjin 300100, China; <sup>2</sup>Graduate School of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; <sup>3</sup>Tianjin Nankai Hospital Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Acute Abdomen Research Institute, Tianjin 300100, China

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

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of liriodendrin on the intestinal flora and the ferroptosis signaling pathway in renal tissue of rats with sepsis-induced acute kidney injury (AKI). **Methods** Thirty male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into sham operation group (Sham group), sepsis model induced by cecal ligation and puncture group (CLP group), and liriodendrin intervention group (CLP+LIR group), with 10 rats in each group. The CLP+LIR group was given 0.2 mL of 100 mg/kg liriodendrin by gavage 2 hours before modeling; Sham group and CLP group were given the same volume of normal saline by gavage. The samples were collected after anesthesia 24 hours after modeling. The pathological changes of renal tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The levels of inflammatory factors such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukins (IL-1 $\beta$ , IL-6) were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The levels of renal function indicators such as creatinine (Cr), and urea nitrogen (UREA) in peripheral blood, and the content of malondialdehyde (MDA) and  $\text{Fe}^{2+}$  in renal

tissue were detected. Western blotting was used to detect the expressions of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2), glutathione peroxidase 4 (GPX4) and heme oxygenase-1 (HO-1) in renal tissues. The changes of intestinal flora were detected by 16S rDNA high-throughput sequencing. **Results** Compared with the Sham group, the CLP group showed significantly enlarged glomeruli, noticeable renal interstitial edema, disorganized kidney tissue, and significantly increased pathological scores. The contents of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, Cr, and UREA in peripheral blood and the levels of MDA and Fe<sup>2+</sup> in renal tissue were significantly increased. The protein expressions of Nrf2, GPX4, and HO-1 in renal tissue were significantly down-regulated. The species richness of intestinal flora decreased significantly, and the relative abundances of pathogenic bacteria such as *Morganella*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Aggregatibacter*, and *Enterococcus* increased significantly, while the relative abundances of beneficial bacteria such as *Butyricimonas*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Ruminococcus* decreased significantly. Compared with the CLP group, CLP+LIR group could significantly reduce the pathological damage of renal tissue, the pathological score significantly decreased ( $1.80 \pm 0.84$  vs.  $4.20 \pm 1.30$ ,  $P < 0.05$ ), and improve the composition of intestinal flora, reduce the relative abundances of pathogenic bacteria such as *Proteus*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Aggregatibacter*, and *Enterococcus*, and significantly increase the relative abundances of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Ruminococcus*, significantly reduce the contents of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, Cr, and UREA in peripheral blood and the levels of MDA and Fe<sup>2+</sup> in renal tissue [blood TNF- $\alpha$  (ng/L):  $191.31 \pm 7.23$  vs.  $254.90 \pm 47.89$ , blood IL-1 $\beta$  (ng/L):  $11.15 \pm 4.04$  vs.  $23.06 \pm 1.67$ , blood IL-6 (ng/L):  $163.20 \pm 17.83$  vs.  $267.69 \pm 20.92$ , blood Cr ( $\mu\text{mol/L}$ ):  $24.14 \pm 4.25$  vs.  $41.17 \pm 5.43$ , blood UREA (mmol/L):  $4.59 \pm 0.90$  vs.  $8.01 \pm 1.07$ , renal MDA ( $\mu\text{mol/g}$ ):  $9.67 \pm 0.46$  vs.  $16.05 \pm 0.88$ , renal Fe<sup>2+</sup> (mg/g):  $0.71 \pm 0.07$  vs.  $0.93 \pm 0.04$ , all  $P < 0.05$ ], and increase the protein expressions of Nrf2, GPX4, and HO-1 (Nrf2/GAPDH:  $1.21 \pm 0.01$  vs.  $0.39 \pm 0.01$ , GPX4/GAPDH:  $0.74 \pm 0.04$  vs.  $0.48 \pm 0.04$ , HO-1/GAPDH:  $0.91 \pm 0.01$  vs.  $0.41 \pm 0.02$ , all  $P < 0.05$ ). **Conclusions** Liriodendrin has an obvious protective effect on sepsis-induced AKI. The mechanism may involve regulating the intestinal flora, increasing the activation of the Nrf2/HO-1/GPX4 signaling pathway in renal tissue, and reducing ferroptosis.

**【Key words】** Sepsis; Liriodendrin; Ferroptosis; Gut microbiota; Acute kidney injury

**Fund program:** Science Foundation of Tianjin Municipal Health Bureau (2023048)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20250421-00384

脓毒症是感染引起的宿主反应失调所致的危及生命的器官功能障碍,其中急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是脓毒症较常见且严重的并发症<sup>[1-2]</sup>。脓毒症相关 AKI 的发生率高达 47.9%, 28 d 病死率为 32.7%<sup>[3]</sup>。近年来,随着对细胞死亡机制研究的深入,铁死亡作为一种新型的非凋亡性细胞死亡形式被发现在 AKI 的发病机制中发挥重要作用<sup>[4-6]</sup>。铁死亡是一种依赖铁的调控性细胞死亡形式,其特征是细胞内 Fe<sup>2+</sup> 积累和脂质过氧化物大量产生<sup>[7-8]</sup>。通过抑制铁死亡关键环节,能有效减轻脓毒症诱导的 AKI<sup>[9]</sup>。研究表明,肠道微生物群在维持肠道菌群稳态和宿主免疫系统功能中发挥重要作用<sup>[10]</sup>。脓毒症所致的肠道菌群紊乱在 AKI 中发挥重要的调控作用<sup>[11]</sup>。最新研究表明,多种中药复方及中药活性成分可调节肠道菌群,保护脓毒症诱导的 AKI<sup>[12]</sup>。本课题组前期研究发现,凉血活血方可以通过抑制 NOD 样受体蛋白 3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)信号通路的活化,抑制肾上皮细胞焦亡,保护脓毒症诱导的 AKI<sup>[13]</sup>。鹅掌楸苷是凉血活血方的主要活性成分,可以抑制核转录因子- $\kappa\text{B}$  (nuclear factor- $\kappa\text{B}$ , NF- $\kappa\text{B}$ ) 信号通路,保护脓毒症诱导的急性肺损伤<sup>[14]</sup>。本研究中通过观察鹅掌楸苷对脓毒症诱导的 AKI 大鼠肠道菌群组成、炎症

因子表达、肾功能、铁死亡和核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)/ 血红素加氧酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1)/ 谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 信号通路的影响,探讨其对 AKI 的保护作用及机制,为鹅掌楸苷治疗脓毒症诱导的 AKI 提供实验支持和理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物、药物及主要试剂:** 30 只 SPF 级、6~8 周龄、体质量 220~250 g 的雄性 SD 大鼠购自斯佩福(北京)生物技术有限公司,动物生产许可证号: SCXK(京)2024-0001,在严格的 SPF 环境中适应性喂养 1 周。鹅掌楸苷由天津市南开医院药物实验室提取,置于 4℃ 冰箱保存。3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、Nrf2、GPX4 和 HO-1 抗体购自杭州华安生物技术有限公司;白细胞介素(interleukins, IL-6、IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自睿信生物科技有限公司;肌酐(creatinine, Cr)、尿素(urea nitrogen, UREA)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和 Fe<sup>2+</sup> 含量试剂盒购自南京建成有限公司。

**1.2 动物分组及制模方法:** 按随机数字表法将动

物分为假手术组(Sham 组)、盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture, CLP)致脓毒症模型组、鹅掌楸苷干预组(CLP+LIR 组)3 组,每组 10 只。采用 CLP 制备脓毒症大鼠模型;Sham 组只进行开腹处理。CLP+LIR 组于制模前 2 h 给予 100 mg/kg 鹅掌楸苷 0.2 mL 灌胃;Sham 组和 CLP 组给予等体积的生理盐水灌胃。

本实验研究方案符合动物伦理学标准,经过天津市南开医院动物伦理委员会批准(审批号: NKYY-DWLL-2023-181)。

**1.3 检测指标及方法:**制模后 24 h 过量麻醉处死大鼠,取肾组织和肠内的新鲜粪便备检。

**1.3.1 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色:**将肾组织置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h,充分脱水后石蜡包埋、切片(片厚 4  $\mu\text{m}$ ),HE 染色后置于光镜下观察肾组织病理学变化,包括细胞形态、组织结构、炎症细胞浸润情况、细胞坏死程度等,同时进行组织病理学评分。以肾组织损伤范围记为 0 分(无损伤)、1 分(<25%)、2 分(25%~<50%),3 分(50%~<75%),4 分( $\geq 75\%$ )。每张切片取 10 个高倍镜视野,综合评估肾小管损伤表现,包括刷状缘丢失、空泡变性、上皮细胞扁平、基底膜裸露、管型形成、肾小管扩张及细胞坏死等。

**1.3.2 ELISA 检测外周血炎症因子水平:**取腹主动脉血置于无菌抗凝管中,低温 3 000 r/min(离心半径 20 cm)离心 15 min,收集上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书操作,包括加样、温育、洗涤、加酶标抗体、再次温育和洗涤等步骤,最后加入底物显色,用酶标仪测定各孔在特定波长下的吸光度(A)值,根据标准曲线计算外周血中炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的水平。

**1.3.3 外周血 Cr 和 UREA 含量检测:**取外周血,严格依照检测试剂盒说明书步骤,分别在对应的反应管中精准加入适量血清样本与配套试剂,充分振荡混匀,确保反应充分。将反应管置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温孵育箱中充分孵育,使用生化分析仪在特定波长下测定各管 A 值,根据标准曲线计算出外周血中 Cr 和 UREA 的含量。

**1.3.4 肾组织 MDA 和  $\text{Fe}^{2+}$  含量检测:**取肾组织制成 10% 组织匀浆,3 000 r/min(离心半径 20 cm)离心 10 min 取上清液,按试剂盒说明书步骤,分别在相应反应体系中加入适量上清液、试剂充分混匀,孵育结束后用酶标仪在指定波长下测定 A 值,绘制

标准曲线计算出肾组织中 MDA 和  $\text{Fe}^{2+}$  含量。

**1.3.5 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测肾脏组织中蛋白表达:**用含有磷酸酶和蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液充分匀浆肾组织后,在冰浴条件下裂解 30 min,每隔 5 min 轻轻振荡 1 次,随后 4  $^{\circ}\text{C}$  下 12 000 r/min(离心半径 10 cm)离心 15 min,收集上清即为总蛋白提取液。提取蛋白进行定量,取 40  $\mu\text{g}$  蛋白质样本经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),采用湿转法在恒流条件下将蛋白转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,室温下用 5% 脱脂乳封闭 1.5 h,以减少非特异性结合;随后将膜与特异性一抗(Nrf2、GPX4、GAPDH 和 HO-1)按照 1:1 000 的比例稀释后,在摇床上 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜;次日用含吐温的 Tris-缓冲盐溶液(Tris-buffered saline Tween, TBST)充分洗涤后,室温下与辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)结合的二抗孵育 2 h,加入电化学发光显色液,用凝胶成像系统完成显色成像,从而获取清晰的蛋白条带图像。使用 Image J 软件对蛋白条带进行灰度分析,以 GAPDH 作为内参对目的蛋白进行半定量分析。

**1.3.6 肠道菌群 16S rDNA 测序:**提取各组肠道粪便总 DNA,用超微量分光光度计定量,用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳测质量;以菌群相关序列为靶点,加条形码设计引物,用 Pfu 高保真 DNA 聚合酶进行聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增,设阴性对照,弃有扩增条带样本群;经磁珠纯化回收扩增产物,用 PicoGreen 荧光染料试剂和 BioTek FLx800 荧光酶标仪定量后混样;用 Illumina 测序文库构建试剂盒经多步制备测序文库,质检定量合格后梯度稀释、变性,按测序仪选对应试剂上机测序;分析流程包括初筛数据、划分样本、去噪聚类、分析多样性及物种差异、构建网络、预测代谢功能。

**1.4 统计学分析:**用 SPSS 20.0 统计学软件分析数据,GraphPad Prism(v7.0)软件作图。对计量数据进行正态性检验,均符合正态分布,以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较采用 LSD- $t$  检验。检验水准  $\alpha$  值取双侧 0.05。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠肾组织病理变化及病理学评分(图 1):**HE 染色显示,与 Sham 组相比,CLP 组肾组织出



现显著的病理变化,病理学评分显著升高(分:  $3.20 \pm 0.40$  比 0,  $P < 0.05$ ),表明 CLP 导致脓毒症大鼠肾组织损伤。CLP+LIR 组肾组织病理损伤较 CLP 组明显改善,病理学评分明显降低(分:  $1.80 \pm 0.60$  比  $3.20 \pm 0.40$ ,  $P < 0.05$ )。

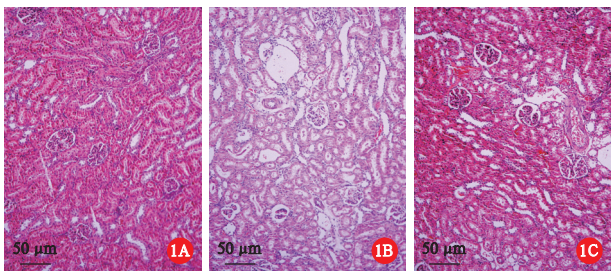


图1 光镜下观察各组大鼠肾组织病理学改变 假手术组(Sham组)肾组织形态正常;盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组(CLP组)肾小球体积增大,部分肾小球内可见中性粒细胞浸润,肾小管上皮细胞明显肿胀,胞质内可见空泡变性,肾间质水肿明显,间隙增宽,肾组织结构紊乱;鹅掌楸苷干预组(CLP+LIR组)肾组织病理学改变较CLP组明显改善 苏木素-伊红(HE)染色 中倍放大

2.2 各组大鼠外周血炎症因子水平(表1):与 Sham 组比较,CLP 组外周血 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平均显著升高(均  $P < 0.05$ )。与 CLP 组比较,CLP+LIR 组能够显著降低这些炎症因子水平,差异有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。

表 1 各组大鼠外周血炎症因子水平比较 (ng/L, $\bar{x} \pm s$ )				
组别	动物数 (只)	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6
Sham 组	10	$151.60 \pm 18.97$	$11.75 \pm 1.65$	$107.23 \pm 2.56$
CLP 组	10	$254.90 \pm 47.89^a$	$23.06 \pm 1.67^a$	$267.69 \pm 20.92^a$
CLP+LIR 组	10	$191.31 \pm 7.23^b$	$11.15 \pm 4.04^b$	$163.20 \pm 17.83^b$

注:Sham 组为假手术组,CLP 组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组,CLP+LIR 组为鹅掌楸苷干预组;TNF- $\alpha$  为肿瘤坏死因子- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  为白细胞介素-1 $\beta$ , IL-6 为白细胞介素-6;与 Sham 组比较,  $^aP < 0.05$ ;与 CLP 组比较,  $^bP < 0.05$

2.3 各组大鼠外周血 Cr 和 UREA 水平(表2):与 Sham 组比较,CLP 组大鼠外周血中 Cr 和 UREA 的含量均显著升高(均  $P < 0.05$ )。与 CLP 组比较,CLP+LIR 组能够显著降低 Cr 和 UREA 的水平,差异有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。

表 2 各组大鼠外周血 Cr 和 UREA 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )			
组别	动物数 (只)	Cr ( $\mu\text{mol/L}$ )	UREA (mmol/L)
Sham 组	10	$23.47 \pm 2.82$	$2.67 \pm 0.36$
CLP 组	10	$41.17 \pm 5.43^a$	$8.01 \pm 1.07^a$
CLP+LIR 组	10	$24.14 \pm 4.25^b$	$4.59 \pm 0.90^b$

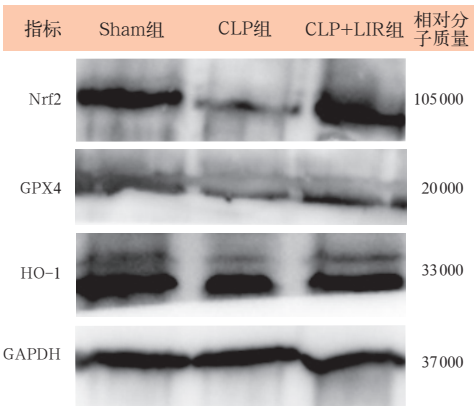
注:Sham 组为假手术组,CLP 组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组,CLP+LIR 组为鹅掌楸苷干预组;Cr 为肌酐,UREA 为尿素;与 Sham 组比较,  $^aP < 0.05$ ;与 CLP 组比较,  $^bP < 0.05$

2.4 各组大鼠肾组织 MDA 和 Fe<sup>2+</sup> 含量(表3):与 Sham 组比较,CLP 组大鼠肾组织中 MDA 和 Fe<sup>2+</sup> 的含量均显著升高(均  $P < 0.05$ )。与 CLP 组比较,CLP+LIR 组能够显著降低 MDA 和 Fe<sup>2+</sup> 的含量,差异有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。

表 3 各组大鼠肾组织中 MDA 和 Fe <sup>2+</sup> 含量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )			
组别	动物数 (只)	MDA ( $\mu\text{mol/g}$ )	Fe <sup>2+</sup> (mg/g)
Sham 组	10	$5.36 \pm 0.15$	$0.31 \pm 0.07$
CLP 组	10	$16.05 \pm 0.88^a$	$0.93 \pm 0.04^a$
CLP+LIR 组	10	$9.67 \pm 0.46^b$	$0.71 \pm 0.07^b$

注:Sham 组为假手术组,CLP 组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组,CLP+LIR 组为鹅掌楸苷干预组;MDA 为丙二醛;与 Sham 组比较,  $^aP < 0.05$ ;与 CLP 组比较,  $^bP < 0.05$

2.5 各组大鼠肾组织 Nrf2、GPX4 和 HO-1 的蛋白表达(图2;表4):与 Sham 组比较,CLP 组大鼠肾组织中 Nrf2、GPX4 和 HO-1 的蛋白表达均明显降低(均  $P < 0.05$ )。与 CLP 组比较,CLP+LIR 组能够显著升高 Nrf2、GPX4 和 HO-1 的蛋白表达,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。



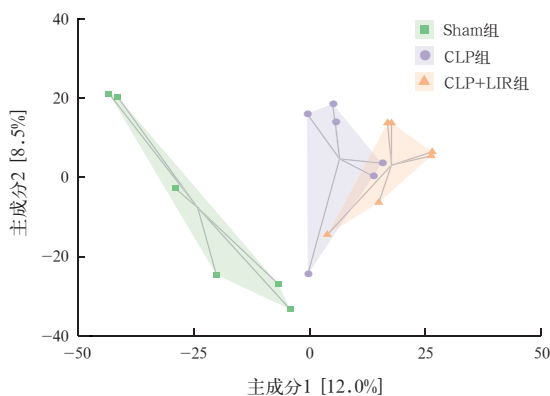
注:Sham 组为假手术组,CLP 组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组,CLP+LIR 组为鹅掌楸苷干预组;Nrf2 为核因子 E2 相关因子 2, GPX4 为谷胱甘肽过氧化物酶 4, HO-1 为血红素加氧酶-1, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图2 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测各组大鼠肾组织中 Nrf2、GPX4 和 HO-1 蛋白表达

表 4 各组大鼠肾组织 Nrf2、GPX4 和 HO-1 蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )				
组别	动物数 (只)	Nrf2/GAPDH	GPX4/GAPDH	HO-1/GAPDH
Sham 组	5	$1.43 \pm 0.05$	$0.90 \pm 0.02$	$1.32 \pm 0.01$
CLP 组	5	$0.39 \pm 0.01^a$	$0.48 \pm 0.04^a$	$0.41 \pm 0.02^a$
CLP+LIR 组	5	$1.21 \pm 0.01^b$	$0.74 \pm 0.04^b$	$0.91 \pm 0.01^b$

注:Sham 组为假手术组,CLP 组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组,CLP+LIR 组为鹅掌楸苷干预组;Nrf2 为核因子 E2 相关因子 2, GPX4 为谷胱甘肽过氧化物酶 4, HO-1 为血红素加氧酶-1, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶;与 Sham 组比较,  $^aP < 0.05$ ;与 CLP 组比较,  $^bP < 0.05$

**2.6 各组大鼠肠道菌群多样性分析：主坐标分析** (principal co-ordinates analysis, PCoA) 菌群  $\beta$  多样性显示 (图 3), 各组大鼠肠道菌群组成存在显著差异。 $\alpha$  多样性分析显示 (表 5), 与 Sham 组比较, CLP 组用于估计肠道菌群物种丰度和多样性水平的 Chao1 指数、Shannon 指数、Pielou\_e 指数、Faith\_pd 指数和观测物种数均显著下降 (均  $P < 0.05$ )。与 CLP 组比较, CLP+LIR 组这些指数均显著回升 (均  $P < 0.05$ )。表明鹅掌楸苷对脓毒症诱导的肠道菌群失调具有一定的改善作用。

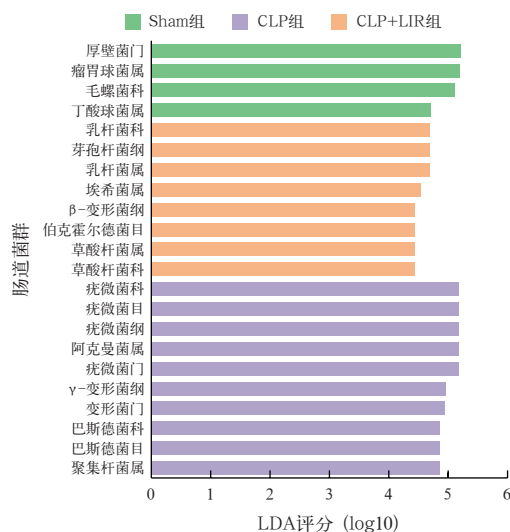


注: Sham 组为假手术组, CLP 组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组, CLP+LIR 组为鹅掌楸苷干预组

图 3 主坐标分析各组大鼠肠道菌群  $\beta$  多样性

**2.7 各组大鼠肠道菌群结构分析：线性判别分析效应量** (linear discriminant analysis effect quantity, LEfSe) 显示 (图 4), 各组具有显著差异的微生物类群, 其中, Sham 组显著差异微生物菌群是厚壁菌门、瘤胃球菌属、毛螺菌科、丁酸球菌属; CLP 组显著差异微生物菌群是疣微菌科、疣微菌目、疣微菌纲、阿克曼菌属、疣微菌门、 $\gamma$ -变形菌纲、变形菌门、巴斯德菌科、巴斯德菌目、聚集杆菌属; CLP+LIR 组显著差异微生物菌群是乳杆菌科、芽孢杆菌纲、乳杆菌属、埃希菌属、 $\beta$ -变形菌纲、伯克霍尔德菌目、草酸杆菌属、草酸杆菌科。

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 5), 结果显示, 与 Sham 组相比, CLP 组摩根菌属、柠檬酸杆



注: Sham 组为假手术组, CLP 组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组, CLP+LIR 组为鹅掌楸苷干预组; LDA 为线性判别分析

图 4 各组大鼠肠道菌群线性判别分析效应量 (LEfSe)

菌属、变形杆菌属、克雷伯菌属、志贺菌属、聚集杆菌属和肠球菌属等致病菌的相对丰度显著增加, 丁酸单胞菌属、韦荣球菌属、普雷沃菌属、乳杆菌属、双歧杆菌属和瘤胃球菌属等有益菌的相对丰度显著降低。与 CLP 组相比, CLP+LIR 组可以显著改善肠道菌群组成, 降低变形杆菌属、克雷伯菌属、志贺菌属、聚集杆菌属和肠球菌属等致病菌的相对丰度, 并显著增加乳杆菌属、双歧杆菌属和瘤胃球菌属的相对丰度。表明鹅掌楸苷可以部分改善脓毒症肠道菌群紊乱。

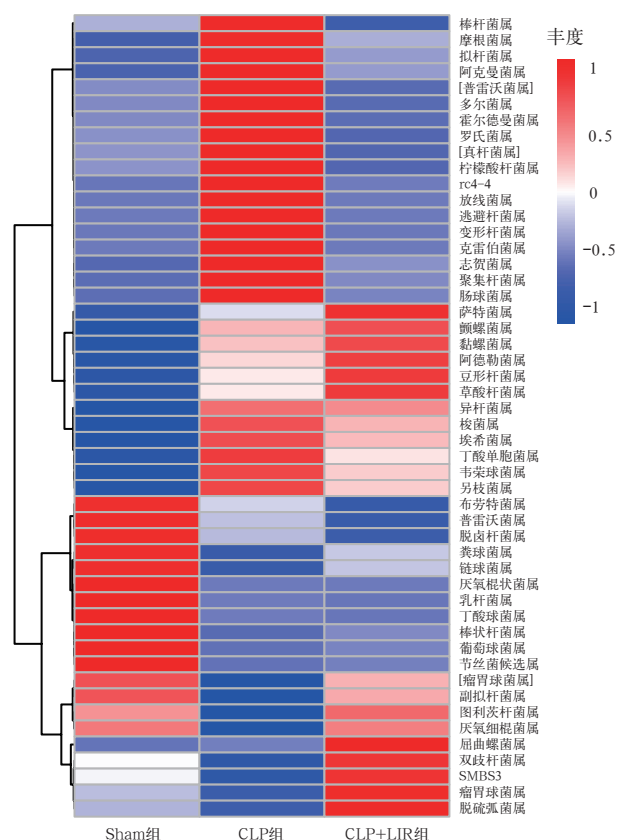
### 3 讨论

脓毒症是引发 AKI 的重要诱因, 其复杂的发病机制涉及“炎症风暴”、免疫失调以及肠道菌群紊乱等, 严重危及患者生命<sup>[15]</sup>。本实验中采用 CLP 法构建脓毒症相关 AKI 大鼠模型, 可模拟脓毒症引发的全身感染, 激活炎症级联反应, 进而导致肾脏功能受损。本研究全面评估了鹅掌楸苷对肾脏病理损伤、炎症反应、氧化应激、铁死亡通路以及肠道菌群的影响, 结果表明, 鹅掌楸苷通过多靶点调控机制可显著改善脓毒症导致的肾损伤, 下调促炎因子, 减轻炎症对肾脏的损害, 还能激活 Nrf2/GPX4/HO-1 抗氧化

表 5 各组大鼠肠道菌群  $\alpha$  多样性指数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	Chao1 指数	Shannon 指数	Pielou_e 指数	Faith_pd 指数	观测物种数
Sham 组	5	828.35 $\pm$ 76.12	7.31 $\pm$ 0.25	0.76 $\pm$ 0.02	58.95 $\pm$ 14.24	791.32 $\pm$ 99.08
CLP 组	5	648.65 $\pm$ 142.94 <sup>a</sup>	5.80 $\pm$ 0.86 <sup>a</sup>	0.63 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	43.44 $\pm$ 6.30 <sup>a</sup>	588.06 $\pm$ 152.38 <sup>a</sup>
CLP+LIR 组	5	1 181.53 $\pm$ 195.58 <sup>b</sup>	7.79 $\pm$ 0.43 <sup>b</sup>	0.77 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	69.14 $\pm$ 9.08 <sup>b</sup>	1 008.12 $\pm$ 179.72 <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模型组, CLP+LIR 组为鹅掌楸苷干预组; 与 Sham 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 CLP 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$



注: Sham 组为假手术组, CLP 组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组, CLP+LIR 组为鹅掌楸苷干预组

图5 各组大鼠肠道菌群在属水平上物种丰度聚类图

通路,增强机体抗氧化能力,缓解氧化应激损伤,降低肾组织铁死亡;同时,可调节肠道菌群,增加有益菌、减少有害菌,改善肠道微生态,间接保护肾脏。

本研究显示,CLP 组大鼠肾组织呈现典型的 AKI 病理特征,表现为肾小球体积增大伴中性粒细胞浸润,肾小管上皮细胞空泡变性及间质水肿,而这些改变与脓毒症诱导的微循环障碍、炎症介质释放及氧化应激密切相关<sup>[16]</sup>。经鹅掌楸苷干预后,CLP 诱导的脓毒症大鼠肾小球结构完整性恢复、炎症浸润减少,表明鹅掌楸苷能有效减轻脓毒症肾实质损伤。Cr、UREA 是评估肾功能的主要指标。本研究结果显示,CLP 组肾组织 Cr、UREA 较 Sham 组显著升高,与病理损伤程度一致;而鹅掌楸苷干预后可使 Cr 和 UREA 水平接近 Sham 组,提示其不仅可改善肾组织形态学损伤,还可恢复肾小球滤过功能。这一结果可能源于鹅掌楸苷对肾小管上皮细胞凋亡的抑制作用,或通过改善肾血流动力学实现,但需进一步研究验证。

研究表明,脓毒症肾组织中脂质过氧化标志物 MDA 和  $\text{Fe}^{2+}$  水平显著升高,提示氧化应激与铁死亡

参与 AKI 进程<sup>[17]</sup>。铁死亡是一种新型的程序性细胞死亡方式,其特征为铁依赖性的脂质过氧化和抗氧化防御系统的崩溃。近年来,铁死亡在脓毒症发生发展中的作用日益受到关注<sup>[7]</sup>。在铁死亡的调控机制中, Nrf2、GPX4 和 HO-1 被认为是关键的调控蛋白<sup>[18]</sup>。这些蛋白质在细胞抗氧化防御、铁代谢和脂质过氧化调控中发挥着重要作用。最新研究表明,穿心莲内酯可通过抑制 Nrf2/成纤维细胞特异性蛋白 1 通路的铁死亡,减轻脓毒症诱导的 AKI<sup>[19]</sup>。右美托咪定可通过调节 GPX4 降解 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1,减轻脓毒症相关 AKI 中的肾小管铁死亡<sup>[20]</sup>。本研究显示,CLP 组 Nrf2、GPX4 和 HO-1 蛋白表达较 Sham 组显著降低,而经鹅掌楸苷干预后三者表达上调,表明鹅掌楸苷可通过激活 Nrf2 通路增强细胞抗氧化能力。Nrf2 作为氧化应激的主要调节因子,可促进 GPX4 和 HO-1 的转录。GPX4 通过还原脂质过氧化物抑制铁死亡,而 HO-1 降解血红素产生的胆红素具有抗氧化效应。

随着研究的深入,肠道微生物群在 AKI 中的作用逐渐显现。AKI 发生后,肠道微生物群的组成发生变化,导致肠道屏障破坏、肠道免疫反应异常和细菌移位。同时,肠道微生物群的代谢产物可能加剧 AKI 的进展<sup>[21]</sup>。本研究显示,CLP 组  $\alpha$  多样性指数(Chao1、Shannon 等)较 Sham 组显著下降,表明脓毒症导致肠道菌群紊乱;而经鹅掌楸苷干预后  $\alpha$  多样性恢复甚至超过 Sham 组,提示其对菌群生态具有强效调节作用。进一步 LEfSe 分析显示,CLP 组富集的疣微菌门、变形菌门与肠道屏障破坏和全身炎症相关,而 CLP+LIR 组乳杆菌属、双歧杆菌属的增多可能通过增强肠道屏障功能、调节宿主免疫应答及抑制过度炎症反应等机制保护肾脏。值得注意的是,CLP+LIR 组反映菌群系统发育多样性的 Faith<sub>pd</sub> 指数较 CLP 组显著升高,表明其不仅增加菌群丰度,还促进功能基因的多样性,这可能通过代谢物互作增强宿主抗炎能力。在脓毒症病理过程中,过度释放的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 等促炎因子通过激活 NF- $\kappa$ B 通路加剧组织损伤<sup>[22]</sup>。本研究中,CLP 组外周血炎症因子水平较 CLP 组显著升高,而经鹅掌楸苷干预可使上述炎症因子显著下降,提示鹅掌楸苷具有明确的抗炎效应。本课题组既往研究表明,鹅掌楸苷可通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路,减少炎症介质释放<sup>[14]</sup>,这可能解释了本实验中炎症因子水平的降低。此外,肠道菌群分析显示 CLP 组致病菌



(如变形杆菌属、克雷伯菌属)丰度较 Sham 组增加,这些菌群可能通过释放内毒素激活全身炎症反应;而经鹅掌楸苷干预后乳杆菌属、双歧杆菌属等有益菌的恢复可能通过竞争性抑制致病菌定植,减少内毒素入血,从而间接抑制肾脏炎症。这种“肠-肾轴”调控可能是鹅掌楸苷发挥抗炎作用的重要途径。

综上所述,本研究表明鹅掌楸苷可能通过多重机制改善脓毒症 AKI:① 直接抑制全身炎症反应,降低 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平;② 激活 Nrf2/GPX4/HO-1 通路,拮抗氧化应激与铁死亡;③ 重塑肠道菌群结构,恢复有益菌优势并抑制致病菌增殖。这些发现为脓毒症 AKI 的防治提供了新的多靶点治疗策略,同时凸显了“肠-肾轴”在脓毒症病理损伤过程中的重要性。后续研究应着重解析鹅掌楸苷的直接作用靶点及对菌群代谢物的影响,以推动其临床转化应用。

**利益冲突** 所有作者声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 郭婵:文章撰写;崔凌志:数据分析;周旻:作图;卓玉珍:动物实验;杨磊:分子实验;李家瑞:基金支持

## 参考文献

- [1] Zarbock A, Nadim MK, Pickkers P, et al. Sepsis-associated acute kidney injury: consensus report of the 28th Acute Disease Quality Initiative workgroup [J]. Nat Rev Nephrol, 2023, 19 (6): 401–417. DOI: 10.1038/s41581-023-00683-3.
- [2] Kounatidis D, Vallianou NG, Psallida S, et al. Sepsis-associated acute kidney injury: where are we now? [J]. Medicina (Kaunas), 2024, 60 (3): 434. DOI: 10.3390/medicina60030434.
- [3] Manrique-Caballero CL, Del Rio-Pertuz G, Gomez H. Sepsis-associated acute kidney injury [J]. Crit Care Clin, 2021, 37 (2): 279–301. DOI: 10.1016/j.ccc.2020.11.010.
- [4] Zheng Q, Xing JH, Li XZ, et al. PRDM16 suppresses ferroptosis to protect against sepsis-associated acute kidney injury by targeting the NRF2/GPX4 axis [J]. Redox Biol, 2024, 78: 103417. DOI: 10.1016/j.redox.2024.103417.
- [5] Xiao Z, Zhang J, Qiu ZM, et al. Ferroptosis and inflammation are modulated by the NFIL3-ACSL4 axis in sepsis associated-acute kidney injury [J]. Cell Death Discov, 2024, 10 (1): 349. DOI: 10.1038/s41420-024-02113-0.
- [6] Yang YT, Lin QS, Zhu XY, et al. Activation of lipophagy is required for RAB7 to regulate ferroptosis in sepsis-induced acute kidney injury [J]. Free Radic Biol Med, 2024, 218: 120–131. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2024.04.213.
- [7] Huo L, Liu CF, Yuan YJ, et al. Pharmacological inhibition of ferroptosis as a therapeutic target for sepsis-associated organ damage [J]. Eur J Med Chem, 2023, 257: 115438. DOI: 10.1016/j.ejmech.2023.115438.
- [8] Chen FQ, Kang R, Tang DL, et al. Ferroptosis: principles and significance in health and disease [J]. J Hematol Oncol, 2024, 17 (1): 41. DOI: 10.1186/s13045-024-01564-3.
- [9] Yang SY, Ye ZH, Chen W, et al. BMAL1 alleviates sepsis-induced AKI by inhibiting ferroptosis [J]. Int Immunopharmacol, 2024, 142 (Pt B): 113159. DOI: 10.1016/j.intimp.2024.113159.
- [10] Wiersinga WJ, van der Poll T. Immunopathophysiology of human sepsis [J]. EBioMedicine, 2022, 86: 104363. DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.104363.
- [11] Dicu-Andreescu I, Penescu MN, Verzan C. Septic acute kidney injury and gut microbiome: Should we change our approach? [J]. Nefrologia (Engl Ed), 2024, 44 (2): 119–128. DOI: 10.1016/j.nefro.2024.03.024.
- [12] Fan XQ, Mai CT, Zuo L, et al. Herbal formula BaWei BaiDuSan alleviates polymicrobial sepsis-induced liver injury via increasing the gut microbiota *Lactobacillus johnsonii* and regulating macrophage anti-inflammatory activity in mice [J]. Acta Pharm Sin B, 2023, 13 (3): 1164–1179. DOI: 10.1016/j.apsb.2022.10.016. Erratum in: Acta Pharm Sin B, 2023, 13 (8): 3575–3576. DOI: 10.1016/j.apsb.2023.07.003.
- [13] 周旻, 杨磊, 卓玉珍, 等. 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 [J]. 中华危重病急救医学, 2023, 35 (3): 250–255. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20221122-01018.
- [14] Yang L, Li DH, Zhuo YZ, et al. Protective role of lirioidendrin in sepsis-induced acute lung injury [J]. Inflammation, 2016, 39 (5): 1805–1813. DOI: 10.1007/s10753-016-0416-1.
- [15] Basalely A, Menon S. Sepsis and AKI: a two-way street [J]. Kidney360, 2023, 4 (3): 289–290. DOI: 10.34067/KID.000000000000106.
- [16] Kuwabara S, Goggins E, Okusa MD. The pathophysiology of sepsis-associated AKI [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2022, 17 (7): 1050–1069. DOI: 10.2215/CJN.00850122.
- [17] Wang YC, Lv WY, Ma XT, et al. NDUFS3 alleviates oxidative stress and ferroptosis in sepsis induced acute kidney injury through AMPK pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2024, 143 (Pt 2): 113393. DOI: 10.1016/j.intimp.2024.113393.
- [18] Huang QG, Ding YW, Fang C, et al. The emerging role of ferroptosis in sepsis, opportunity or challenge? [J]. Infect Drug Resist, 2023, 16: 5551–5562. DOI: 10.2147/IDR.S419993.
- [19] Zhang YX, Zeng YC, Huang M, et al. Andrographolide attenuates sepsis-induced acute kidney injury by inhibiting ferroptosis through the Nrf2/FSP1 pathway [J]. Free Radic Res, 2024, 58 (3): 156–169. DOI: 10.1080/10715762.2024.2330413.
- [20] Li JR, Liu YS, Bai JJ, et al. Dexmedetomidine alleviates renal tubular ferroptosis in sepsis-associated AKI by KEAP1 regulating the degradation of GPX4 [J]. Eur J Pharmacol, 2023, 961: 176194. DOI: 10.1016/j.ejphar.2023.176194.
- [21] Yang S, Guo J, Kong Z, et al. Causal effects of gut microbiota on sepsis and sepsis-related death: insights from genome-wide Mendelian randomization, single-cell RNA, bulk RNA sequencing, and network pharmacology [J]. J Transl Med, 2024, 22 (1): 10. DOI: 10.1186/s12967-023-04835-8.
- [22] 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. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115183.

(收稿日期: 2025-04-21)

(本文编辑: 保健媛 马英)

## 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,本刊刊登的伊力佳广告图片和内容均按照广告审查批准文件的原件刊出,故广告内容中“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”。特此声明!

(本刊编辑部)