网络出版时间:2024-02-01 15:58:46 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065. R. 20240201.1114.013

脂氧素 A4 抑制 TLR4/MyD88/NF-кB 通路 减缓脓毒症性急性肾损伤

龚书豪1,曹春水1,王 缨2,梅松波3

目的 探讨脂氧素 A4(LXA4)通过抑制 TLR4/ MyD88/NF-κB 通路减缓脓毒症性急性肾损伤(SAKI)。方法 将 40 只无特定病原体级雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为 SAKI 组、SAKI + LXA4 组、假手术组、假手术 + LXA4 组,每 组10只。采用盲肠结扎穿孔术进行 SAKI 造模, SAKI + LXA4 组、假手术 + LXA4 组在术后 30 min 腹腔注射 LXA4 (40 ng/kg)。各组小鼠在造模术后 24 h 收集血清、尿液、肾 组织。酶联免疫吸附试验(ELISA)测定各组小鼠血肌酐 (Scr)、血尿素氮(Bun)、白细胞介素-1β(IL-1β)、IL-6、肿瘤 坏死因子- $\alpha(TNF-\alpha)$,尿液中性粒细胞明胶酶相关性脂质运 载蛋白(NGAL)及肾损伤分子1(KIM-1);HE及PAS染色观 察小鼠肾脏损伤情况;实时荧光定量 PCR 检测各组小鼠肾 脏 Toll 样受体 4(TLR4)、髓样分化因子 88(MyD88)、核因子кВ p65(NF-кВ p65) mRNA 水平;免疫组化法、蛋白免疫印迹 实验检测各组小鼠 TLR4、MyD88、NF-κB p65、磷酸化 NF-κB p65(p-NF-κB p65)的表达。结果 ELISA 实验提示 SAKI 组 Ser、Bun、IL-1β、IL-6、TNF-α、NGAL、KIM-1 水平均高于 SAKI +LXA4 组(P < 0.05), 假手术组及假手术 + LXA4 组 Scr、 Bun、IL-1β、IL-6、TNF-α、NGAL、KIM-1 无明显上升; HE 及 PAS 染色提示 SAKI 组肾损伤程度明显高于 SAKI + LXA4 组 (P < 0.05),假手术组及假手术 + LXA4 组无明显肾损伤;实 时荧光定量 PCR 提示 SAKI 组较 SAKI + LXA4 组 TLR4、 MyD88、NF-кВ p65 mRNA 升高(P<0.05), 假手术组与假手 术 + LXA4 组 TLR4、MyD88、NF-кВ p65 mRNA 均低于 SAKI 组及 SAKI + LXA4 组(P < 0.05); 免疫组化法、蛋白免疫印 迹实验结果提示 SAKI 组较 SAKI + LXA4 组 TLR4、MyD88、 NF-κB p65 \ p-NF-κB p65 表达升高(P < 0.05), 假手术组与 假手术 + LXA4 组 TLR4、MyD88、NF-кВ p65、p-NF-кВ p65 表 达均低于 SAKI 组及 SAKI + LXA4 组(P < 0.05)。结论 TLR4/MyD88/NF-κB通路在SAKI发生发展中起重要作用, LXA4 可能通过抑制 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路减缓 SA-

关键词 脂氧素 A4; Toll 样受体 4; 髓样分化因子 88; 核转录

2023 - 10 - 15 接收

KI.

基金项目:江西省教育厅科学技术研究项目(编号:GJJ2200203) 作者单位:南昌大学第一附属医院 ¹ 急诊科、² 肾内科、³ 重症医学 科,南昌 330000

作者简介:龚书豪,男,硕士研究生,主治医师;

曹春水,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:13672228823@139.com

因子 kappa B;脓毒症;急性肾损伤

中图分类号 R 692.5

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2024)02 - 0275 - 07 doi:10.19405/j. cnki. issn1000 - 1492.2024.02.015

脓毒症是感染导致的全身炎症性反应,可引起远离感染部位的各个器官功能障碍,是导致患者发生急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)的重要原因之一^[1]。肾脏是脓毒症最容易受累的靶器官,当脓毒症性急性肾损伤(sepsis-induced acute kidney injury, SAKI)出现时,患者的死亡率将升高至70%^[2]。

脂氧素 A4(lipoxin A4, LXA4)具有显著的炎症负性调控作用^[3],可减轻脓毒症相关的炎症反应并改善脓毒症患者的生存率^[4]。Toll 样受体 4(toll-like receptor4, TLR4)是一类重要的病原模式识别受体,被认为是炎症反应的启动闸门^[5]。急性炎症反应中,炎症细胞因子的产生可激活 TLR4,经髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor88, MyD88)依赖通路产生炎症级联反应。随后,核因子кB(nuclear factor-кB, NF-кB)进入细胞核, NF-кB核转位促进炎症因子产生及释放^[6]。该研究拟建立 SAKI 小鼠模型,探讨 TLR4/MyD88/NF-кB 通路在 SAKI 发生发展中的作用以及 LXA4 是否通过抑制 TLR4/MyD88/NF-кB 信号通路减缓 SAKI,为 SA-KI 的诊治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料 无特定病原体级雄性 C57BL/6J 小鼠 40 只,体质量 18 ~ 22 g,由南昌大学医学院动物科学部提供。LXA4 购于美国 Cayman 公司;血清、尿液生化指标及炎症因子测定相关的 ELISA 试剂盒购于无锡艾尔诺生物技术有限公司;兔抗小鼠 TLR4 多克隆抗体、兔抗小鼠 MyD88 多克隆抗体、兔抗小鼠 NF-κB p65、p-NF-κB p65 多克隆抗体购于美国 Santa Cruz 公司;鼠抗 β-Actin 单克隆抗体购于石家庄博海公司;辣根酶标记羊抗鼠 IgG、辣根酶标记羊

抗兔 IgG 购于无锡艾尔诺生物技术有限公司;免疫细胞化学试剂盒购于江苏晶美公司;PCR 试剂盒购于美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

- 1.2.1 动物分组及 SAKI 小鼠模型的制备 依据 随机数表法将 40 只 C57BL/6J 小鼠分为 SAKI 组、 SAKI + LXA4 组、假手术组、假手术 + LXA4 组,每组 小鼠各 10 只。采用盲肠结扎穿孔术制备 SAKI 小 鼠模型[7],小鼠予以2%戊巴比妥腹腔麻醉,以腹部 正中为手术切口,大约制备1 cm 的切口,将小鼠腹 膜逐层打开,找到盲肠后对盲肠远端游离处理,并将 盲肠内的粪便挤向远端,使用3号丝线对小鼠盲肠 中段进行结扎,使用12号针头对盲肠远端进行穿孔 处理,将少许粪便挤压至盲肠表面,随后回纳盲肠、 缝合腹膜、关闭腹腔, 术毕使用生理盐水 1 ml 皮下 注射以补充术中丢失的体液,术后小鼠自由饮水、进 食。造模后小鼠直肠温度较造模前升高至少1℃、 心率及呼吸频率为术前的2倍、尿量减少并出现精 神萎靡、竖毛、少动等表现,术后 24 h 监测小鼠血肌 酐(serum creatinine, Scr)、血尿素氮(blood urea nitrogen, Bun)、尿液中性粒细胞明胶酶相关性脂质运 载蛋白 (neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL) 及肾损伤分子 1 (kidney injury molecule 1, KIM-1) 水平, 若小鼠出现上述表现且 Scr、Bun、 NGAL、KIM-1 较正常值升高则表示造模成功。SAKI + LXA4 组在 SAKI 造模术后 30 min 腹腔注射 LXA4 (40 ng/kg)^[8]。假手术组除不行盲肠结扎穿孔外, 余操作同 SAKI 组。假手术 + LXA4 组在假手术术 后 30 min 腹腔注射 LXA4(40 ng/kg)^[8]。
- 1.2.2 标本留取 尿液标本:各组小鼠分别在造模术后 24 h 给予 3% 戊巴比妥钠腹腔麻醉,行腹正中纵行切口,分离小鼠膀胱行膀胱穿刺术以收集膀胱内的尿液,离心后取上清液置于 -80℃冰箱;留取小鼠尿液标本后,打开小鼠胸腔心脏取血,离心后取上清液置于 -80℃冰箱;留取小鼠尿液及血液标本后,立即剥离肾皮质周围结缔组织,切下肾脏组织,剥离肾包膜,并沿肾脏矢状面切开肾脏,切取肾脏皮质,予以9 g/L 盐水冲洗,使用无菌纱布吸干表面水分,将部分肾脏皮质置于 10% 中性甲醛固定,石蜡包埋,用于病理染色以及免疫组化,将另一部分肾脏皮质放置于 -80℃冰箱中用于免疫印迹实验及实时荧光定量 PCR 检测。
- 1.2.3 血清、尿液生化指标及因子测定 采用酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay,

- ELISA) 检测小鼠 Scr、Bun、白细胞介素-1β(interleu-kin-1β, IL-1β)、IL-6、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α), 尿液 NGAL 及 KIM-1 水平。
- 1.2.4 光镜检查及肾组织病理评分 肾组织予以 10%中性甲醛固定 24 h 后,石蜡包埋,并予以切片,厚度为 2 μm,进行 HE 及 PAS 染色,观察并拍照记录。每张切片在光镜(×400)观察下,在病变严重处用 Paller 法对肾小管损伤程度进行评分,即每个高倍视野随机选择 10 个有病变的肾小管,按 100 个肾小管计分,标准如下:肾小管明显扩张、细胞扁平(1分)、刷状缘损伤(1分)、刷状缘脱落(2分)、管型(2分)、肾小管管腔内有脱落或坏死的细胞(1分)。
- 1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测 TRIzol 法以提取细胞总 RNA,并用紫外分光光度计以检测 RNA 浓度,要求 $A_{260\,\text{nm}}/A_{280\,\text{nm}}$ 比值在 1.8 至 2.0 之间,以 RNA 为模板反转录生成 cDNA。定量 PCR 检测均使用 SYBRGreen 法,所有引物序列由 Invitrogen 公司提供。各引物序列见表 1。

表1 基因引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	长度(bp)
β-actin	正义链 TCAGGTCATCACTATCGGCAAT	240
	反义链 AAAGAAAGGGTGTAAAACGCA	
TLR4	正义链 CCGCTCTGGCATCATCTTCA	108
	反义链 TCCCACTCGAGGTAGGTGTT	
MyD88	正义链 TGATCCGGCAACTAGAACAG	146
	反义链 ATCGTCAGAAACAACCACCA	
NF-κB p65	正义链 GAACCTGGGGATCCAGTGTG	504
	反义链 TCACTGAGCTCCCGATCAGA	

- 1.2.6 免疫组织化学法 石蜡切片二甲苯脱蜡 2次,并运用微波热修复抗原,冷却后用磷酸缓冲盐 (phosphate buffer salt, PBS)液冲洗。滴加 3% 过氧 化氢阻断内源性过氧化物酶,室温孵育 15 min,用 PBS 液冲洗,滴加合适浓度的一抗:兔抗小鼠 TLR4 (1:100),兔抗小鼠 MyD88 (1:150),兔抗小鼠 NF-κB p65 (1:150),兔抗小鼠 p-NF-κB p65 (1:150)以 PBS 液替代一抗为阴性对照。PBS 液冲洗切片,并滴加辣根过氧化物酶以标记二抗 IgG 多聚体,滴加新鲜二氨基联苯胺显色剂,运用显微镜观测,棕褐色或棕黄色则为阳性信号。显色终止,使用 Image-ProPlus6.0 图片分析软件予以半定量分析,同一条件下选取 20 个不同的 400 倍视野,以阳性面积/视野总面积来表示相对阳性表达量。
- 1.2.7 蛋白免疫印迹实验 将-80℃冰箱保存的

小鼠肾皮质取出,加裂解液匀浆,测定各蛋白浓度,取各样品 50 μg 总蛋白上样电泳,再转入聚偏二氟乙烯膜。加入封闭液稀释的兔抗 TLR4 多克隆抗体 (1:1000),兔抗 MyD88 多克隆抗体 (1:300),兔抗 NF-κB p65 多克隆抗体 (1:300),兔抗 p-NF-κB p65 多克隆抗体 (1:300),鼠抗 β-Actin 单克隆抗体 (1:200)一抗。4℃过夜。TBST 洗涤缓冲液洗膜,再加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:500),室温条件下孵育、洗膜,增强化学发光法显色并曝光。运用 LabWork4.5 软件系统对其进行定量分析,光密度 (optical density, OD) 值代表目的蛋白相对表达量。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 14.0 统计软件分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本 t 检验;不符合正态分布的计量资料以[$M(P_{25}, P_{75})$] 表示,多组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验,两组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验小鼠观察 SAKI 组 10 只小鼠术后 24 h 均出现精神萎靡、毛发蓬乱、活动迟缓,伴有呼吸及心跳加快、发热、少尿等表现,1 只小鼠于 6 h 死亡,剩余 9 只小鼠术后 24 h 经检测 Scr、Bun、NGAL、KIM-1 均较正常值升高,表示造模成功。SAKI + LXA4 组 10 只小鼠术后 24 h 均存活,并出现 SAKI 组类似表现,但症状均较 SAKI 组小鼠轻,且 Scr、

Bun、NGAL、KIM-1 也较正常值升高。假手术组及假 手术 + LXA4 组小鼠术后无死亡,一般情况良好, Ser、Bun、NGAL、KIM-1 均在正常范围值内。

2.2 各组小鼠血清、尿液生化指标、因子测定结果 SAKI 及 SAKI + LXA4 组 Ser、Bun、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、NGAL、KIM-1 均高于假手术组、假手术 + LXA4 组(P < 0.05),SAKI + LXA4 组小鼠各项指标 均低于 SAKI 组小鼠(P < 0.05),假手术组与假手术 + LXA4 组各项指标无明显升高,且两组相比差异无统计学意义(P > 0.05)。各组小鼠各项指标测定结果见表 2。

2.3 各组小鼠光镜结果及肾组织病理评分比较 SAKI 组肾小球体积明显增大,系膜细胞以及基质明 显增多,肾小管明显扩张,可见大量刷状缘损伤及刷 状缘脱落,并可见大量管型、部分肾小管管腔内有脱 落或坏死的细胞;SAKI + LXA4 组肾小球体积稍增 大,系膜细胞以及基质增多,肾小管可见扩张,少量 肾小管上皮细胞出现肿胀、空泡变性,未见刷状缘脱 落,可见少量管型,少量肾小管管腔内有脱落或坏死 的细胞;假手术组及假手术 + LXA4 组肾小球形态 和系膜细胞正常,肾小管基本正常,未见明显坏死和 凋亡。小鼠 HE 及 PAS 染色见图 1。SAKI 组肾脏组 织病理评分(16.41 ± 2.22) 高于 SAKI + LXA4 组 (9.17 ± 2.01),且 SAKI 组、SAKI + LXA4 组肾脏组 织病理评分均高于假手术组及假手术 + LXA4 组(F =6.432,P<0.05),假手术组(1.68±0.16)及假手 术 + LXA4 组(1.69 ± 0.14) 肾脏组织病理评分相比 差异无统计学意义。

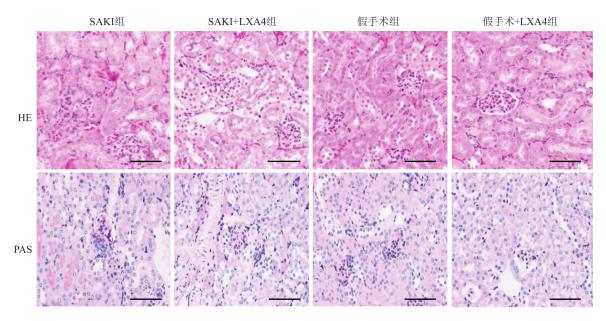


图1 各组小鼠肾脏病理 ×400

指标	SAKI 组(n = 9)	SAKI + LXA4 组 (n = 10)	假手术组(n=10)	假手术 + LXA4 组(n = 10)	F 值		
Ser(µmol/L)	168.83 ± 1.01 *	101.35 ± 0.48 * #	15.29 ± 0.36	15.37 ±0.39	21.859		
Bun(mmol/L)	14.81 ± 2.01 *	10.87 ± 1.97 * #	7.33 ± 1.87	7.35 ± 1.89	5.804		
IL-1 β (ng/L)	49.87 ± 1.33 *	39.57 ± 1.48 * #	27.54 ± 0.69	27.24 ± 0.87	9.804		
IL-6 (ng/L)	68.41 ± 0.77 *	58.91 ± 0.69 * #	36.44 ± 1.58	36.54 ± 1.33	12.657		
TNF-α(ng/L)	288.57 \pm 13.13 *	238.88 \pm 16.11 * #	139.59 ± 8.89	138.31 ± 9.28	16.121		
NGAL(μg/L)	41.33 ± 1.32 *	23.77 ± 0.63 * #	13.69 ± 0.33	13.47 ± 0.48	8.453		
KIM-1 (μ g/L)	99.43 \pm 10.32 *	78.96 ± 13.47 *#	17.46 ± 2.25	17.43 ± 2.27	6.899		

表 2 各组小鼠血清、尿液生化指标、炎症因子测定结果 $(\bar{x} \pm s)$

与假手术组及假手术 + LXA4 组比较: *P < 0.05; 与 SAKI 组比较: *P < 0.05

2.4 实时荧光定量 PCR 对比各组小鼠肾脏 TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA 水平 SAKI 组 TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA 水平均高于 SAKI + LXA4 组(P < 0.05),且 SAKI 组、SAKI + LXA4 组 TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA 水平均高于假手术组及假手术 + LXA4 组(F = 6.338,P < 0.05),假手术组及假手术 + LXA4 组 TLR4、MyD88、NF-κB p65 mRNA 相比差异无统计学意义。运用实时荧光定量PCR 技术,SAKI 组、SAKI + LXA4 组、假手术组、假手术组、假手术生、XA4 组 TLR4、MyD88、NF-κB p65 的 mRNA 水平见图 2。

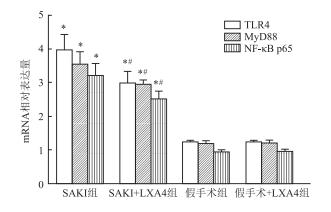


图 2 各组小鼠 TLR4、MyD88、NF-кB p65 mRNA 的比较与假手术组及假手术 + LXA4 组比较: * P < 0.05; 与 SAKI 组比较: *P < 0.05

2.5 免疫组化法对比各组小鼠肾脏 TLR4、MyD88、NF-κB p65、p-NF-κB p65 的表达 SAKI组 TLR4、MyD88、NF-κB p65、p-NF-κB p65 表达量均高于 SAKI+LXA4组(P<0.05),且 SAKI组、SAKI+LXA4组(TLR4、MyD88、NF-κB p65、p-NF-κB p65表达量均高于假手术组及假手术+LXA4组(F=4.456,P<0.05),假手术组及假手术+LXA4组(TLR4、MyD88、NF-κB p65、p-NF-κB p65表达量相比差异无统计学意义。运用免疫组化法,SAKI组、SA-KI+LXA4组、假手术组、假手术生、XA4组TLR4、

MyD88、NF-κB p65、p-NF-κB p65 的表达见图 3、4。 2.6 蛋白免疫印迹实验检测对比各组小鼠肾脏 TLR4、MyD88、NF-κB p65、p-NF-κB p65 蛋白水平

SAKI 组 TLR4、MyD88、NF-κB p65、p-NF-κB p65 表达量均高于 SAKI + LXA4 组 (P < 0.05),且 SAKI 组、SAKI + LXA4 组 TLR4、MyD88、NF-κB p65、p-NF-κB p65 表达量均高于假手术组及假手术 + LXA4 组 (F = 7.338, P < 0.05),假手术组及假手术 + LXA4 组 TLR4、MyD88、NF-κB p65、p-NF-κB p65 表达量相比无统计学差异(P > 0.05)。运用蛋白免疫印迹实验,SAKI 组、SAKI + LXA4 组、假手术组、假手术 + LXA4 组 TLR4、MyD88、NF-κB p65、p-NF-κB p65 的表达情况见图 5。

3 讨论

SAKI 患者肾组织出现毛细血管内皮损伤、肾间质中性粒细胞等炎性细胞浸润,炎症因子高表达,提示炎症反应在 SAKI 发病过程中发挥重要调控作用^[9]。脓毒症早期积极抑制炎症反应,对 SAKI 的预防和治疗具有较好的效果。对脓毒症和非脓毒症的重症监护室患者的肾脏病理进行分析,脓毒症患者肾脏病理改变以炎症细胞浸润为主要特征,非脓毒症患者并无相关病理改变^[10]。以上研究表明炎症反应与 SAKI 发生发展密切相关。

TLRs 是一类重要的病原模式识别受体,是固有免疫的启动因子和连接固有免疫与获得性免疫的桥梁,被认为是炎症反应的启动闸门。在炎症反应中,TLR4/MyD88/NF-κB 通路的激活是普遍认可的机制之一。该通路激活后促进 IL-1β、IL-6、TNF-α等多种促炎细胞因子和黏附分子等基因的转录。这些炎症介质又可以进一步激活机体的防御系统,二者互为因果,形成炎症瀑布,造成炎症介质持续过度释放,最终导致以细胞自身破坏为特征的全身炎症反应综合征[11]。

LX 是Serhan et al^[12]于1984年发现的二十烷

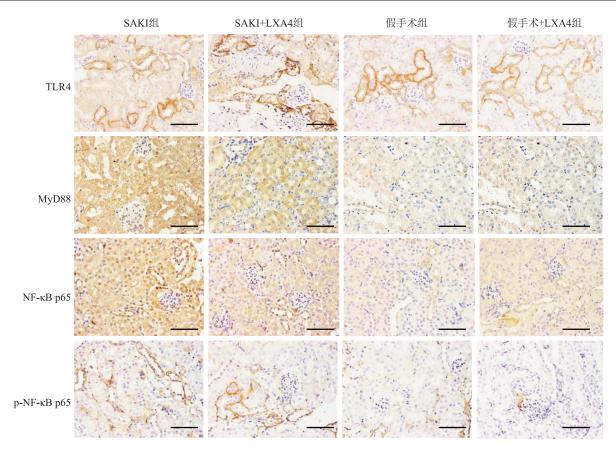
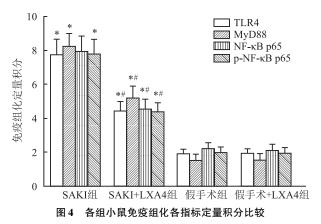


图 3 各组小鼠肾脏组织中 TLR4、MyD88、NF-κB p65、p-NF-κB p65 的表达情况 免疫组化染色×400



与假手术组及假手术 + LXA4 组比较 : * P < 0. 05 ; 与 SAKI 组比较 : *P < 0. 05

类家族中一类花生四烯酸的产物,通过作用于多种细胞表面的受体发挥其强大的抗炎作用。LX 的抗炎作用可通过调控多种炎症信号通路以抑制炎症因子的产生及释放,其中就包括了 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路。最近的研究^[13]表明,LXA4 通过调控 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路以抑制牙龈炎的发生,同样 LXA4 也可通过调控 TLR4/MyD88/NF-κB 通路以抑制百草枯相关急性肺损伤的进展^[14]。然

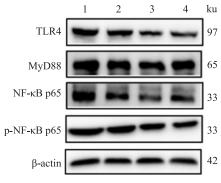


图 5 各组小鼠 TLR4、MyD88、NF-κB p65、 p-NF-κB p65 蛋白表达情况

1:SAKI 组;2:SAKI + LXA4 组;3:假手术组;4:假手术 + LXA4 组

而 TLR4/MyD88/NF-κB 通路在 SAKI 发生发展中的作用以及 LXA4 是否通过抑制 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路减缓 SAKI 却鲜有研究报道。本研究中,依据文献制备 SAKI 小鼠模型,造模术后 24 h 小鼠出现精神萎靡、毛发蓬乱、活动迟缓,伴有呼吸及心跳加快、发热、少尿等 SAKI 相关表现且 Scr、Bun 明显升高,诊断 AKI 的有效生物学标志 NGAL 及 KIM-1 也明显升高,提示 SAKI 小鼠造模成功,处死各组小鼠后收集血清、尿液、肾脏标本。

HE 及 PAS 染色显示 SAKI + LXA4 组较 SAKI 组小鼠肾脏损伤轻,应用 Paller 法对肾小管损伤程 度进行评分,SAKI + LXA4 组评分明显低于 SAKI 组小鼠。同时课题组也运用 ELISA 法对 Ser、Bun、NGAL、KIM-1 进行检测,显示 SAKI + LXA4 组小鼠 Ser、Bun、NGAL、KIM-1 较 SAKI 组小鼠减低,由此推测 LXA4 可以减缓 SAKI 的肾损伤。运用 ELISA 法对 IL-1β、IL-6、TNF-α 炎症因子进行检测,显示 SA-KI + LXA4 组小鼠上述炎症因子较 SAKI 组明显减低,这说明 LXA4 作用于 SAKI 小鼠可以减少炎症因子的产生。

实时荧光定量 PCR、免疫组化法、免疫印迹实 验显示 SAKI 小鼠 TLR4、MyD88、NF-кВ 在肾组织中 表达升高,使用 LXA4 作用于 SAKI 小鼠, TLR4、 MyD88、NF-κB在肾组织中的表达则明显减低。在 炎症反应中,TLR4/MyD88/NF-кВ 信号通路促进炎 症因子如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的产生及释放。脓毒 症早期减少炎症因子 IL-1β、IL-6、TNF-α产生及释 放,对肾功能的保护及 SAKI 的预防和治疗具有较 好的效果[15]。本研究也表明 SAKI 小鼠 TLR4/ MyD88/NF-кВ 在肾组织中高表达,且血液炎症因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 明显升高,推测 TLR4/MyD88/ NF-κB 通路介导 IL-1β、IL-6、TNF-α 在内的炎症因 子高表达, LXA4 则抑制 TLR4/MyD88/NF-кB 通路 介导 IL-1β、IL-6、TNF-α 在内的炎症因子高表达。 目前的共识是,肾小管损伤在 SAKI 的进展中起着 重要作用。脓毒症发病期间,肾小管上皮细胞可被 IL-1β、IL-6、TNF-α 在内的炎症因子直接损伤,受损 的肾小管上皮细胞反过来可以调节和放大肾内炎症 反应[15],而课题组应用 Paller 法对肾小管损伤程度 进行评分,SAKI + LXA4 组小鼠肾小管损伤程度明 显低于 SAKI 组小鼠。由此推测 TLR4/MyD88/NFκB 信号通路通过介导 IL-1β、IL-6、TNF-α 在内的炎 症因子的产生及释放,加重肾组织损伤,参与 SAKI 的发生发展。LXA4 则通过抑制 TLR4/MyD88/NFκB 信号通路以减少 IL-1β、IL-6、TNF-α 等炎症因子 产生及释放,减缓肾损伤从而抑制 SAKI 的发生发 展。此项研究为 SAKI 的发病机制及治疗提供了新 的依据,但 LXA4 作用于 TLR4/MyD88/NF-кB 信号 通路的具体机制仍需体内及体外实验进一步探讨。

参考文献

[1] Peerapornratana S, Manrique-Caballero C L, Gómez H, et al. A-

- cute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment[J]. Kidney Int, 2019, 96(5): 1083-99.
- [2] Molema G, Zijlstra J G, van Meurs M, et al. Renal microvascular endothelial cell responses in sepsis-induced acute kidney injury [J]. Nat Rev Nephrol, 2022, 18(2): 95-112.
- [3] Han M, Lai S, Ge Y, et al. Changes of lipoxin A4 and the antiinflammatory role during parturition [J]. Reprod Sci, 2022, 29 (4):1332-42.
- [4] Hu X H, Situ H L, Chen J P, et al. Lipoxin A4 alleviates lung injury in sepsis rats through p38/MAPK signaling pathway[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2020, 34(3): 807-14.
- [5] Schattner M. Platelet TLR4 at the crossroads of thrombosis and the innate immune response[J]. J Leukoc Biol, 2019, 105(5): 873 -80.
- [6] Zhou M, Xu W, Wang J, et al. Boosting mTOR-dependent autophagy via upstream TLR4-MyD88-MAPK signalling and downstream NF-κB pathway quenches intestinal inflammation and oxidative stress injury [J]. EBioMedicine, 2018, 35(7): 345 – 60.
- [7] 金 魁,刘 宝,邵 敏,等. 小鼠脓毒症急性肾损伤模型制备及肾功能损伤指标评价[J]. 中国急救医学,2015,35(5):394-7.
- [8] Guo Y P, Jiang H K, Jiang H, et al. Lipoxin A4 may attenuate the progression of obesity-related glomerulopathy by inhibiting NFκB and ERK/p38 MAPK-dependent inflammation [J]. Life Sci, 2018, 198(8): 112-8.
- [9] Zarbock A, Nadim M K, 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): 401-17.
- [10] Lamontagne F, Masse M H, Menard J, et al. Intravenous vitamin C in adults with sepsis in the intensive care unit[J]. N Engl J Med, 2022, 386(25): 2387-98.
- [11] Feng D, Wang Y, Liu Y, et al. DC-SIGN reacts with TLR-4 and regulates inflammatory cytokine expression *via* NF-κB activation in renal tubular epithelial cells during acute renal injury [J]. Clin Exp Immunol, 2018, 191(1): 107 15.
- [12] Serhan C N, Hamberg M, Samuelsson B. Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81 (17): 5335-9.
- [13] Ali M, Yang F, Jansen J A, et al. Lipoxin suppresses inflammation *via* the TLR4/MyD88/NF-κB pathway in periodontal ligament cells[J]. Oral Dis, 2020, 26(2): 429 38.
- [14] Li Y, Wang N, Ma Z, et al. Lipoxin A4 protects against paraquatinduced acute lung injury by inhibiting the TLR4/MyD88-mediated activation of the NF-κB and PI3K/AKT pathways [J]. Int J Mol Med, 2021, 47(5): 86-9.
- [15] 邓凤仪, 王 跃, 范星宇, 等. 度拉糖肽对脓毒症小鼠急性肾损伤的保护作用[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58 (8): 1329-34.

LipoxinA4 protects sepsis-induced acute kidney injury *via* the TLR4/MyD88/NF-κB pathway

Gong Shuhao¹, Cao Chunshui¹, Wang Ying², Mei Songbo³
(¹Dept of Emergency, ²Dept of Nephrology, ³Dept of Critical Care Medicine,
The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330000)

Abstract *Objective* To study the protective effect of lipoxin A4 (LXA4) against sepsis-induced acute kidney injury (SAKI) in rats and its effect on the expression of toll-like receptor 4 (TLR4), myeloid differentiation factor88 (MyD88), nuclear factor kappa B(NF-κB) in the kidney. *Methods* Forty male specific pathogen-free C57BL/6J mice were randomly divided into SAKI group, SAKI + LXA4 group, sham procedure group, sham procedure + LXA4 group. The mice in SAKI group and SAKI + LXA4 group were given cecum ligation and puncture (CLP) to establish SAKI animal models. The mice in SAKI + LXA4 group and sham procedure + LXA4 group were given LXA4 (40 ng/ kg) with intraperitoneal injection 30 mins after CLP. All mice were sacrificed at the 24th hour after CLP to collect serum, urine and kidney tissues. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to test the serum creatinine (Scr), blood urea nitrogen (Bun), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), kidney injury molecule 1 (KIM-1) levels of mice. The pathological changes were examined through hematoxylin-eosin(HE) staining and Periodic Acid-Schiff(PAS) staining. And the mRNA levels of TLR4, MyD88, NF-κB p65 were detected through real-time PCR(RT-PCR); the expression levels of TLR4, MyD88, NF-κB p65, phospho-NF-κB p65 (p-NF-κB p65) were detected through immunohistochemistry (IHC) and Western blot assay. **Results** ELISA showed that the values of Scr., Bun., IL-1β, IL-6, TNF-α, NGAL, KIM-1 in SAKI group were higher than those in SAKI + LXA4 group (P < 0.05), and there were no significant differences in Scr, Bun, IL-1β, IL-6, TNF-α, NGAL, KIM-1 between sham procedure group and sham procedure + LXA4 group. HE and PAS staining showed that SAKI group had severer pathological changes than SAKI + LXA4 group in the kidney structure (P < 0.05), while pathological structures of the kidney were normal in sham procedure group and sham procedure + LXA4 group. RT-PCR showed that the mRNA levels of TLR4, MyD88, N F-κB p65 in SAKI group, SAKI + LXA4 group were higher than sham procedure group and sham procedure + LXA4 group (P<0.05); the mRNA levels of TLR4, MyD88, NF-κB p65 in SAKI group were higher than SAKI + LXA4 group (P < 0.05); The results of IHC, Western blot assay were as follows: The expression levels of TLR4, MyD88, NF- κ B p65, p-NF-κB p65 in SAKI group, SAKI + LXA4 group were higher than sham procedure group and sham procedure + LXA4 group (P < 0.05); the expression levels of TLR4, MyD88, NF-κB p65, p-NF-κB p65 in SAKI group were higher than SAKI + LXA4 group (P < 0.05). Conclusion TLR4/MyD88/NF- κ B pathway plays an important role in the occurrence and development of SAKI, and LXA4 may reduce SAKI by inhibiting TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway.

Key words lipoxinA4; toll-like receptor 4; myeloid differentiation factor88; nuclear factor kappa B; sepsis; acute kidney injury