

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research迷迭香酸抑制巨噬细胞 M1 极化减轻脂多糖
诱导急性肾损伤的研究Research of rosmarinic acid inhibiting macrophage M1 polarization and alleviating
lipopolysaccharide - induced acute kidney injury

何晓华, 徐 旭

(阳光融和医院 药学部, 山东 潍坊 261000)

HE Xiao - hua, XU Xu

(Department of Pharmacy, Sunshine
Ronghe Hospital, Weifang 261000,
Shandong Province, China)

摘要:目的 探讨迷迭香酸减轻脓毒症相关肾损伤的潜在作用机制。方法 在动物实验部分,将 BALB/c 小鼠随机分为动物对照组、动物模型组[10 mg · kg⁻¹ 脂多糖(LPS)建模]、动物低剂量实验组(建模 + 10 mg · kg⁻¹ 迷迭香酸)、动物高剂量实验组(建模 + 20 mg · kg⁻¹ 迷迭香酸),每组 10 只。在细胞实验部分,将 RAW264.7 细胞随机分为细胞空白组、细胞模型组(1 μg · mL⁻¹ LPS)、细胞低剂量实验组(建模 + 20.00 μmol · mL⁻¹ 迷迭香酸)和细胞高剂量实验组(建模 + 40.00 μmol · mL⁻¹ 迷迭香酸)。用酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒法及实时荧光定量聚合酶链反应(RT - qPCR)法分析血清及肾组织炎症相关指标,用免疫组织荧光法检测肾组织分化簇 86(CD86)⁺ 细胞与 F4/80⁺ 细胞共定位。**结果**

在动物实验部分,动物对照组、动物模型组、动物低剂量实验组和动物高剂量实验组的血清肌酐(Scr)水平分别为(14.80 ± 0.73)、(59.73 ± 6.79)、(50.06 ± 5.12)和(43.62 ± 3.73)mmol · L⁻¹,诱导型一氧化氮合酶(iNOS)水平分别为(1.26 ± 0.11)、(4.74 ± 0.11)、(3.86 ± 0.23)和(2.48 ± 0.28)U · L⁻¹,肿瘤坏死因子(TNF - α)水平分别为(14.00 ± 1.47)、(85.90 ± 6.66)、(64.97 ± 5.62)和(46.84 ± 1.95)pg · mL⁻¹,白细胞介素(IL) - 6水平分别为(6.93 ± 0.47)、(50.05 ± 3.84)、(39.93 ± 3.50)和(27.26 ± 2.09)pg · mL⁻¹,IL - 1β水平分别为(22.17 ± 2.27)、(122.42 ± 12.77)、(91.54 ± 6.84)和(61.23 ± 6.31)pg · mL⁻¹;CD86⁺/F4/80⁺ 共定位细胞分别为(100.00 ± 4.85)%、(476.99 ± 39.89)%、(322.15 ± 24.15)%和(219.90 ± 19.81)%,动物模型的与动物对照组比较、动物低、高剂量实验组与动物模型组比较、动物高剂量实验组与动物低剂量实验组比较,上述指标在统计学上差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。在细胞实验部分,细胞空白组、细胞模型组、细胞低剂量实验组和细胞高剂量实验组的 iNOS mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.10、3.26 ± 0.31、2.51 ± 0.27 和 1.94 ± 0.19, TNF - α mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.14、2.54 ± 0.26、2.07 ± 0.22 和 1.77 ± 0.18, IL - 1β mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.12、2.24 ± 0.30、1.83 ± 0.22 和 1.52 ± 0.17, IL - 6 mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.08、2.43 ± 0.17、1.85 ± 0.21 和 1.54 ± 0.16,细胞模型组与细胞空白组比较、细胞低、高剂量实验组与细胞模型组比较、细胞高剂量实验组与细胞低剂量实验组比较,上述指标在统计学上差异均有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.001$)。**结论** 迷迭香酸可以通过抑制巨噬细胞活化并同时抑制其向 M1 型巨噬细胞转化对 LPS 诱导的急性肾损伤发挥保护作用。

关键词:迷迭香酸;脓毒症;急性肾损伤;M1 型巨噬细胞;炎症反应

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.08.013

中图分类号:R285 文献标志码:A

文章编号:1001-6821(2026)08-1130-07

作者简介:何晓华(1982 -),女,副主任药师,
主要从事中药学方面的研究和工作

通信作者:徐旭,主管中药师

Tel: (0536)5039051

E - mail: Hexiaohua6621@126.com

Abstract: Objective To explore the potential mechanism of rosmarinic

acid in reducing sepsis related kidney injury. **Methods** In the animal experiment, BALB/c mice were randomly divided into animal control group, animal model group [$10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ lipopolysaccharide (LPS) modeling], animal low-dose experimental group (modeling + $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ rosmarinic acid) and animal high-dose experimental group (modeling + $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ rosmarinic acid), with 10 mice in each group. In the cell experiment part, RAW264.7 cells were randomly divided into cell blank group, cell model group ($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS), cell low-dose experimental group (modeling + $20.00 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ rosmarinic acid) and cell high-dose experimental group (modeling + $40.00 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ rosmarinic acid). Serum and renal tissue inflammatory related indicators were analyzed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit and real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Renal tissue differentiation cluster 86 (CD86)⁺ cells and F4/80⁺ cells were co-located by immunohistochemistry.

Results In the animal experiment part, the serum creatinine (Scr) levels of animal control group, animal model group, low-dose experimental group and high-dose experimental group were (14.80 ± 0.73), (59.73 ± 6.79), (50.06 ± 5.12) and (43.62 ± 3.73) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; the levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) were (1.26 ± 0.11), (4.74 ± 0.11), (3.86 ± 0.23) and (2.48 ± 0.28) $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) were (14.00 ± 1.47), (85.90 ± 6.66), (64.97 ± 5.62) and (46.84 ± 1.95) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the levels of interleukin(IL)-6 were (6.93 ± 0.47), (50.05 ± 3.84), (39.93 ± 3.50) and (27.26 ± 2.09) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the levels of IL-1 β were (22.17 ± 2.27), (122.42 ± 12.77), (91.54 ± 6.84) and (61.23 ± 6.31) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the CD86⁺/F4/80⁺ co-located cells were (100.00 ± 4.85)%, (476.99 ± 39.89)%, (322.15 ± 24.15)% and (219.90 ± 19.81)%, respectively. There were statistically significant differences in the above indexes between animal model and animal control group, between low-dose, high-dose experimental groups and animal model group, and between high-dose experimental group and low-dose experimental group ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). In the cell experiment, the relative expression levels of iNOS mRNA in the cell blank group, cell model group, cell low-dose experimental group and cell high-dose experimental group were 1.00 ± 0.10 , 3.26 ± 0.31 , 2.51 ± 0.27 and 1.94 ± 0.19 , respectively; the relative expression levels of TNF- α mRNA were 1.00 ± 0.14 , 2.54 ± 0.26 , 2.07 ± 0.22 and 1.77 ± 0.18 , respectively; the relative expression levels of IL-1 β mRNA were 1.00 ± 0.12 , 2.24 ± 0.30 , 1.83 ± 0.22 and 1.52 ± 0.17 , respectively; the relative expression levels of IL-6 mRNA were 1.00 ± 0.08 , 2.43 ± 0.17 , 1.85 ± 0.21 and 1.54 ± 0.16 , respectively. There were statistically significant differences in the above indexes between cell model group and cell blank group, between low-dose and high-dose experimental groups and cell model group, and between high-dose experimental group and low-dose experimental group ($P < 0.01$, $P < 0.001$).

Conclusion Rosmarinic acid plays a protective role in LPS-induced acute kidney injury by inhibit macrophage activation and inhibition of their transformation into M1-type macrophages.

Key words: rosmarinic acid; sepsis; acute kidney injury; M1 macrophage; inflammatory response

脓毒症是一种危及生命的感染反应,是危重患者急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)的主要原因。目前,脓毒性 AKI 的治疗包括快速使用抗生素、充分的液体复苏和血管加压治疗^[1],然而,目前的治疗策略是非特异性和反应性的,因此,为脓毒性 AKI 患者开发新的治疗药物是必要的。研究表明,在脓毒症 AKI 早期,M1 型巨噬细胞被迅速激活并占据主导地位,通过释放大量促炎因子加剧肾脏局部炎症微环境,导致肾小管上皮细胞损伤和功能衰竭^[2],因此,干预巨噬细胞极化(特别是抑制 M1 型活化)被视为改善 AKI 的重要治疗策略。迷迭香酸是一种从草本植

物迷迭香中提取的多酚类化合物,具有显著的抗炎作用,先前的研究表明,迷迭香酸可通过调控巨噬细胞极化抑制炎症反应,进而减轻脏器损伤^[3],然而其是否可通过调控巨噬细胞极化在 AKI 中发挥保护作用仍需进一步研究,基于此,本研究旨在探究迷迭香酸对 AKI 中 M1 型巨噬细胞的调控作用。

材料与方法

1 材料

动物 40 只雄性 BALB/c 小鼠,周龄 8 周龄,体

质量 20 ~ 22 g, 购自山东艾茂达康生命科学有限公司, 动物生产许可证号: SCXK(鲁)2023 0010, 所有小鼠均饲养在清洁级动物房中。本试验已获得阳光融和医院伦理委员会的批准(伦理批号: 2025052810)。

细胞 RAW264.7 小鼠单核巨噬细胞, 购自湖北武汉普诺赛生命科技有限公司。

药品与试剂 迷迭香酸(rosmarinic acid, RA), 规格: 每瓶 25 mg, 纯度: 98.5%, 批号: 20240318, 四川成都普思生物科技股份有限公司生产; 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS), 规格: 5 mg, 批号: 20250113, 上海爱必信生物科技有限公司生产; TRIzol 和逆转录试剂盒, 均由上海酶联生物科技有限公司生产; 苏木精-伊红(hematoxylin eupatorium, HE)染色液, 上海博湖生物科技有限公司生产; F4/80、分化簇 86(cluster of differentiation 86, CD86)和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)抗体、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素(interleukin, IL)-6 和 IL-1 β 酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒, 均由湖北武汉博士德生物公司生产; iNOS 试剂盒, 上海梵态生物科技公司生产; 达尔伯克改良伊格培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)培养基, 北京索莱宝科技有限公司产品; 引物序列, 上海碧云天生物技术公司合成。

仪器 Revolve Generation 2 荧光显微镜, 美国 Echo 公司产品; 7500 Fast 实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)仪, 美国 ABI 公司产品; AU400 全自动生化分析仪, 日本 OLYMPUS 公司产品。

2 实验方法

2.1 动物实验

2.1.1 AKI 模型构建^[4]

LPS 为革兰氏阴性菌内毒素的主要成分, 其进入机体后可刺激多种炎症因子的大量产生, 导致肾损

伤, 肾功能发生改变产生一系列病理生理学反应后导致 AKI, LPS 可以直接造成肾损伤, 也可间接通过破坏肾脏细胞后导致细胞坏死, 引起肾损伤, 是构建脓毒性 AKI 动物模型常用的方法, 基于此, 本研究参考已发表参考文献[4]用 LPS 进行建模, 小鼠适应性饲养 1 周后, 一次性腹腔注射 10 mg · kg⁻¹ 的 LPS 构建 AKI 模型。

2.1.2 动物分组与药物处理方法

将小鼠随机分为动物对照组、动物模型组、动物低剂量实验组和动物高剂量实验组, 每组 10 只小鼠, 除动物对照组外其余组均腹腔注射 10 mg · kg⁻¹ LPS 建模, 动物对照组腹腔注射等剂量的生理盐水。建模成功后, 动物低、高剂量实验组小鼠注射 LPS 后 3 h 分别腹腔注射 10、20 mg · kg⁻¹ 的迷迭香酸, 1 天 1 次, 连续注射 4 d, 动物模型组和动物对照组小鼠腹腔注射等剂量的生理盐水, 末次给药 24 h 后腹主动脉采血备用, 并处死小鼠留取肾组织备用。

2.1.3 生化分析仪检测血清血清肌酸酐(serum creatinine, Scr)和尿氮素(blood urea nitrogen, BUN)水平^[5]

取各组小鼠全血标本, 以 2 000 r · min⁻¹ 离心 15 min 后, 收集血清, 然后用全自动生化分析仪检测 Scr 和 BUN 水平。

2.1.4 RT-qPCR 实验法检测相关 mRNA 相对表达水平^[6]

收集各组小鼠肾组织, 用 TRIzol 法提取总 RNA (检测质量和浓度), 然后用试剂盒将 RNA 逆转录为模板 DNA, 并进行实时荧光定量 PCR 扩增, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参, 计算 NGAL、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 iNOS mRNA 相对表达水平, 引物序列见表 1。

2.1.5 HE 染色法检测肾组织病理学改变^[7]

收集小鼠肾组织经 4% 多聚甲醛固定、梯度乙

表 1 各基因引物序列

Table 1 Primers sequence of each gene

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	NCBI reference sequence
NGAL(Lcn2)	GGAGCGATCAGTTCGGG	CTGATCCAGTAGCGACAGCC	NM_008491.1
TNF- α	GATCGGTCCCAAAGGGATG	CCACTTGGTGGTTTGTGAGTG	NM_001278601.1
IL-6	GACAAAGCCAGAGTCTTCAGA	TGTGACTCCAGCTTATCTCTTGG	NM_001314054.1
IL-1 β	TGCCACCTTTTGACAGTGATG	TGATGTGCTGCTGCGAGATT	NM_008361.4
iNOS	CTAGTGAAGCAAAGCCCAACA	CCTCACATACTGTGGACGGG	NM_001313921.1
GAPDH	ACCCTTAAGAGGGATGCTGC	CCCAATACGCCCAAATCCGT	NM_001289726.2

NGAL: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin; TNF- α : Tumor necrosis factor- α ; IL-6: Interleukin-6; iNOS: Inducible nitric oxide synthase; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

醇脱水、二甲苯透明后,进行石蜡包埋并制备石蜡切片,切片脱蜡至水后苏木素染色 30 s,1% 盐酸乙醇快速分化,流水返蓝后用伊红试剂染色 30 min,经充分冲洗后脱水、透明,中性树胶封片,最后用光学显微镜观察肾组织病理学形态变化。

2.1.6 免疫组织荧光实验法检测肾组织 CD86⁺细胞与 F4/80⁺细胞共定位^[7]

取小鼠肾组织制作石蜡切片,经脱蜡至水后,用 Tri-EDTA 抗原修复液进行高温抗原修复,自然冷却至室温。然后用 5% 牛血清白蛋白封闭 1 h,以减少非特异性结合。结束后,弃去封闭液,用不同种属的 F4/80 一抗与 CD86 一抗孵育过夜(4℃),次日用与一抗对应的荧光二抗孵育 1 h,清洗后 4',6-二脒基-2-苯基吲哚核染,抗荧光淬灭封片剂封片后,用荧光显微镜观察。

2.1.7 ELISA 实验法检测血清 M1 巨噬细胞炎性因子分泌^[4]

取各组小鼠血样,静置 30 min 后,以 3 500 r·min⁻¹离心 15 min,取上清液,然后严格按照试剂盒操作步骤检测 TNF-α、IL-6、IL-1β 和 iNOS 含量。

2.2 细胞实验

2.2.1 细胞培养^[8]

RAW264.7 小鼠单核巨噬细胞用 DMEM 培养基进行培养,培养基中添加 1% 青链霉素双抗与 10% 胎牛血清,以维持细胞正常增殖并预防微生物污染。将细胞置于培养箱中培养(37℃,5% CO₂),每日用倒置显微镜下观察细胞形态与生长状态。待细胞生长融合度达到 80% 左右按照常规细胞传代方法进行消化、吹打与传代接种,保证细胞持续处于良好的生长状态。

2.2.2 细胞分组与处理方法

将 RAW264.7 细胞随机分为细胞空白组、细胞模型组、细胞低剂量实验组、细胞高剂量实验组,细胞模型组用 1 μg·mL⁻¹ LPS 刺激 24 h,细胞低剂量实验组先用 LPS 刺激细胞 2 h 后加入 20.00 μmol·mL⁻¹

迷迭香酸共同孵育 24 h,细胞高剂量实验组先用 1 μg·mL⁻¹ LPS 刺激细胞 2 h 后加入 40.00 μmol·mL⁻¹迷迭香酸共同孵育 24 h。

2.2.3 RT-qPCR 实验法检测细胞中炎性因子分泌

收集处理后的各组细胞,用 TRIzol 法提取各细胞总 RNA,然后根据“2.1.4”中方法检测 iNOS、TNF-α、IL-6 和 IL-1β mRNA 水平。

2.2.4 细胞免疫荧光实验检测 iNOS 表达^[9]

收集处理后的各组细胞,多聚甲醛固定 30 min,用 Triton X-100 试剂处理 10 min,然后 BSA 封闭 1 h,加入 iNOS 一抗试剂孵育过夜后再滴加二抗试剂孵育 2 h,DAPI 试剂染色 5 min,用荧光显微镜观察。

3 统计学处理

用 SPSS 23.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较用独立样本 *t* 检验,多组间比较用单因素方差分析。

结 果

1 迷迭香酸改善 AKI 小鼠血清肾功能指标

动物模型组的血清 Scr 和 BUN 水平与 NGAL mRNA 相对表达水平均显著高于动物对照组(均 $P < 0.001$);动物低、高剂量实验组的小鼠血清 Scr 和 BUN 水平与 NGAL mRNA 相对表达水平均显著低于动物模型组($P < 0.01$, $P < 0.001$);动物高剂量实验组的小鼠血清 Scr 和 BUN 水平与 NGAL mRNA 相对表达水平均显著低于动物低剂量试验组($P < 0.01$, $P < 0.001$),见表 2。

2 迷迭香酸减轻 AKI 小鼠肾组织病理学变化

动物对照组和动物低、高剂量实验组小鼠肾组织无明显的病理学改变,动物模型组小鼠肾组织出现大量炎性细胞浸润,肾小球萎缩,肾小管结构破坏,相比动物模型组,动物低、高剂量实验组小鼠肾组织损伤得到不同程度的改善,见图 1。

表 2 各组小鼠血清肾功能指标水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum levels of renal function indicators of mice in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	Scr (mmol·L ⁻¹)	BUN (mmol·L ⁻¹)	NGAL mRNA
Animal control	10	14.80 ± 0.73	6.31 ± 0.48	1.00 ± 0.14
Animal model	10	59.73 ± 6.79***	24.61 ± 2.69***	2.56 ± 0.33***
Animal experimental - L	10	50.06 ± 5.12 ^{ΔΔ}	20.43 ± 1.94 ^{ΔΔ}	2.01 ± 0.18 ^{ΔΔΔ}
Animal experimental - H	10	43.62 ± 3.73 ^{ΔΔΔ@}	14.62 ± 1.45 ^{ΔΔΔ@@}	1.55 ± 0.18 ^{ΔΔΔ@@@}

Animal control group:0.9% NaCl; Animal model group:0.9% NaCl + 10 mg·kg⁻¹ LPS; Animal experimental - L group:10 mg·kg⁻¹ LPS + 10 mg·kg⁻¹ rosmarinic acid; Animal experimental - H group:10 mg·kg⁻¹ LPS + 20 mg·kg⁻¹ rosmarinic acid; Scr: Serum creatinine; BUN: Blood urea nitrogen; NGAL: Neutrophil gelatinase - associated lipocalin; Compared with animal control group, *** $P < 0.01$; Compared with animal model group, ^{ΔΔ} $P < 0.01$, ^{ΔΔΔ} $P < 0.001$; Compared with animal experimental - L group, [@] $P < 0.01$, ^{@@} $P < 0.001$.

3 迷迭香酸抑制 AKI 小鼠巨噬细胞 M1 极化

动物对照组、动物模型组、动物低剂量实验组、动物高剂量实验组肾组织 CD86⁺/F4/80⁺ 共定位细胞比分别为 (100.00 ± 4.85)%、(476.99 ± 39.89)%、(322.15 ± 24.15)% 和 (219.90 ± 19.81)%；动物模型组与动物对照组比较,动物低、高剂量实验组分别与动物模型组比较,动物高剂量实验组与动物低剂量实验组比较,CD86⁺ 细胞/F4/80⁺ 细胞百分比在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

4 迷迭香酸抑制 AKI 小鼠 M1 巨噬细胞型相关因子表达

动物模型组的血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 iNOS 水平及其 mRNA 相对表达水平均显著高于动物对照组 (均 $P < 0.001$)；动物低、高剂量实验组的血清

TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 iNOS 水平及其 mRNA 相对表达水平均显著低于动物模型组 (均 $P < 0.001$)；动物高剂量实验组的血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 iNOS 水平及其 mRNA 相对表达水平均显著低于动物高剂量实验组 (均 $P < 0.001$)，见表 3。

5 体外探究迷迭香酸对 LPS 刺激后 RAW264.7 细胞的抗炎作用

相比细胞空白组,细胞模型组细胞的 iNOS、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β mRNA 相对表达水平均显著升高 (均 $P < 0.001$)，细胞低剂量实验组及细胞高剂量实验组的 iNOS、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β mRNA 相对表达水平均显著下降 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)，且细胞低、高剂量实验组间 iNOS、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β mRNA 相对表达水平在统计学上差异均有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)，见表 4。

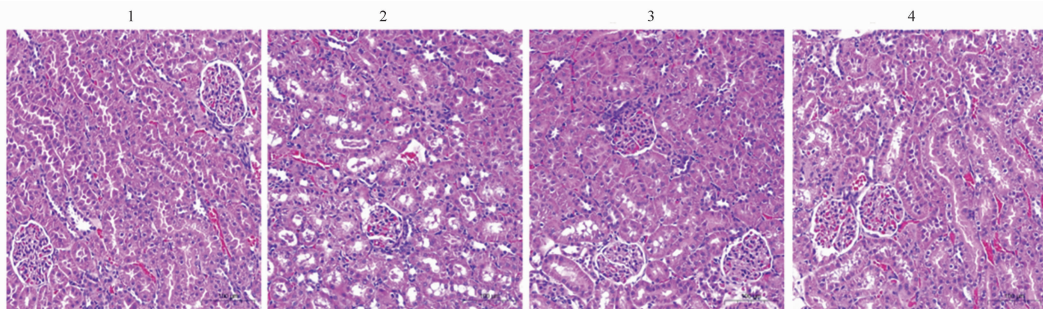


图 1 苏木精伊红 (HE) 染色法观察肾组织病理学损伤 ($\times 100$)

Figure 1 Renal histopathological injury was observed by hematoxylin eupatorium (HE) staining ($\times 100$)

1: Animal control; 2: Animal model; 3: Animal experimental - L; 4: Animal experimental - H.

表 3 各组小鼠血清 M1 巨噬细胞型相关因子及其 mRNA 相对表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of levels of serum M1 macrophage - type related factors and the relative expression levels in mice of the mRNA in all groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Serum levels			
		TNF- α (pg $\cdot$ mL ⁻¹)	IL-6 (pg $\cdot$ mL ⁻¹)	IL-1 β (pg $\cdot$ mL ⁻¹)	iNOS (U $\cdot$ mL ⁻¹)
Animal control	10	14.00 $\pm$ 1.47	6.93 $\pm$ 0.47	22.17 $\pm$ 2.27	1.26 $\pm$ 0.11
Animal model	10	85.90 $\pm$ 6.66 ***	50.05 $\pm$ 3.84 ***	122.42 $\pm$ 12.77 ***	4.74 $\pm$ 0.11 ***
Animal experimental - L	10	64.97 $\pm$ 5.62 ^{ΔΔΔ}	39.93 $\pm$ 3.50 ^{ΔΔΔ}	91.54 $\pm$ 6.84 ^{ΔΔΔ}	3.86 $\pm$ 0.23 ^{ΔΔΔ}
Animal experimental - H	10	46.84 $\pm$ 1.95 ^{ΔΔΔ@@@}	27.26 $\pm$ 2.09 ^{ΔΔΔ@@@}	61.23 $\pm$ 6.31 ^{ΔΔΔ@@@}	2.48 $\pm$ 0.28 ^{ΔΔΔ@@@}
Group	n	mRNA			
		TNF- α	IL-6	IL-1 β	iNOS
Animal control	10	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.14	1.00 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.17
Animal model	10	2.66 $\pm$ 0.19 ***	2.05 $\pm$ 0.12 ***	1.85 $\pm$ 0.17 ***	2.39 $\pm$ 0.16 ***
Animal experimental - L	10	1.91 $\pm$ 0.13 ^{ΔΔΔ}	1.71 $\pm$ 0.14 ^{ΔΔΔ}	1.53 $\pm$ 0.12 ^{ΔΔΔ}	2.06 $\pm$ 0.16 ^{ΔΔΔ}
Animal experimental - H	10	1.52 $\pm$ 0.10 ^{ΔΔΔ@@@}	1.43 $\pm$ 0.11 ^{ΔΔΔ@@@}	1.24 $\pm$ 0.13 ^{ΔΔΔ@@@}	1.56 $\pm$ 0.14 ^{ΔΔΔ@@@}

TNF- α : Tumor necrosis factor - α ; IL-6: Interleukin - 6; iNOS: Inducible nitric oxide synthase; Compared with animal control group, *** $P < 0.001$; Compared with animal model group, ^{ΔΔΔ} $P < 0.001$; Compared with animal experimental - L group, ^{@@@} $P < 0.001$.

表4 各组细胞相关因子表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)Table 4 Comparison of expression levels of cell-related factors in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	iNOS mRNA	TNF- α mRNA	IL-1 β mRNA	IL-6 mRNA	iNOS fluorescence intensity (a. u.)
Cell blank	1.00 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.14	1.00 $\pm$ 0.12	1.00 $\pm$ 0.08	1 145.33 $\pm$ 85.73
Cell model	3.26 $\pm$ 0.31 ***	2.54 $\pm$ 0.26 ***	2.24 $\pm$ 0.30 ***	2.43 $\pm$ 0.17 ***	3 090.05 $\pm$ 234.11 ***
Cell experimental-L	2.51 $\pm$ 0.27 ^{ΔΔΔ}	2.07 $\pm$ 0.22 ^{ΔΔΔ}	1.83 $\pm$ 0.22 ^{ΔΔ}	1.85 $\pm$ 0.21 ^{ΔΔΔ}	2 456.99 $\pm$ 249.56 ^{ΔΔΔ}
Cell experimental-H	1.94 $\pm$ 0.19 ^{ΔΔΔ@@@}	1.77 $\pm$ 0.18 ^{ΔΔΔ@@}	1.52 $\pm$ 0.17 ^{ΔΔΔ@@}	1.54 $\pm$ 0.16 ^{ΔΔΔ@@}	1 554.03 $\pm$ 135.46 ^{ΔΔΔ@@@}

Cell blank group: Normal culture; Cell model group: 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS; Cell experimental-L group: 20.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ rosmarinic acid; Cell experimental-H group: 40.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ rosmarinic acid; Compared with cell blank group, *** $P < 0.01$; Compared with cell model group, ^{ΔΔ} $P < 0.01$, ^{ΔΔΔ} $P < 0.001$; Compared with cell experimental-L group, [@] $P < 0.01$, ^{@@@} $P < 0.001$.

讨 论

迷迭香酸在唇形科、葫芦科、紫草科等中较为常见,其是一种天然的水溶性酚类化合物,许多研究表明迷迭香酸具有较好的抗炎、抗氧化、免疫调节、抗菌等多种生物学活性,在改善睡眠、提高记忆力、心肌保护、保护肝肾等方面也具有特殊的药理作用^[10]。另有研究表明迷迭香酸可有效改善肾组织病理改变,如CHEN等^[11]在糖尿病肾病模型小鼠和细胞中发现,迷迭香酸能减轻肾损伤和炎症反应,如陈瑞丹等^[12]也在高血压肾病模型小鼠实验中发现,迷迭香酸通过抑制炎症小体通路改善高血压造成的肾损伤,纪敏^[13]等研究发现,迷迭香酸对顺铂所致的小鼠急性肾损伤也起到缓解作用,这些研究表明,迷迭香酸在治疗肾损伤中具有较大潜力。脓毒症是重症患者AKI的首要诱因,其核心病理机制为LPS激活肾脏固有免疫细胞,引发过度炎症级联反应,最终导致肾小管上皮细胞损伤与肾功能衰竭^[14],最近有研究表明,迷迭香酸对脓毒症AKI和庆大霉素引起的AKI具有明显的改善作用^[15-16],但目前,关于迷迭香酸改善LPS刺激的肾损伤的作用及其潜在作用机制并不明确。本研究聚焦巨噬细胞极化这一AKI炎症调控的核心环节,首次系统证实迷迭香酸可通过抑制M1型巨噬细胞活化,减轻LPS诱导的小鼠肾损伤,为脓毒症AKI的治疗提供了新的天然药物候选与机制依据。

本研究显示,LPS诱导的AKI模型小鼠血清Scr、BUN和NGAL水平均显著升高,NGAL是一种新的肾损伤标志物,研究报道,其可以比连续测量Scr更早发现AKI^[17],此外,本研究小鼠肾组织出现大量炎性细胞浸润、肾小管萎缩及结构破坏,同时肾组织CD86⁺/F4/80⁺共定位M1型巨噬细胞比例、血清M1相关促炎因子TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和iNOS水平均显著上

调,提示M1型巨噬细胞过度活化是脓毒症AKI炎症损伤的关键驱动因素。给予迷迭香酸干预后,小鼠肾功能指标呈剂量依赖性改善,肾组织病理损伤显著减轻,同时M1型巨噬细胞浸润数量及促炎因子释放被有效抑制,且体外RAW264.7细胞实验进一步验证,迷迭香酸可以直接抑制LPS诱导的巨噬细胞M1极化及促炎因子分泌,明确了迷迭香酸对M1型巨噬细胞的直接调控作用,上述结论与既往研究中“抑制M1型巨噬细胞极化可减轻AKI肾损伤”的结论高度一致^[18-19],同时补充了迷迭香酸在脓毒症AKI中的作用证据。既往研究多聚焦迷迭香酸的广谱抗炎活性,本研究则明确其在AKI中通过靶向巨噬细胞M1极化发挥保护作用,深化了对迷迭香酸药理机制的认知。

从机制层面分析,LPS作为革兰氏阴性菌内毒素,可以通过Toll样受体4/核因子- κ B(Toll-like receptor 4/nuclear factor kappa-B,TLR4/NF- κ B)经典通路激活巨噬细胞,促使其向促炎M1表型极化,大量释放TNF- α 、IL-1 β 等促炎因子,进一步加重肾小管损伤与肾间质炎症^[20-21]。本研究中,迷迭香酸显著降低M1型巨噬细胞比例及下游促炎因子水平,提示其可能通过抑制TLR4/NF- κ B信号通路,阻断巨噬细胞M1极化的启动与活化,从而打断炎症级联反应,发挥肾保护作用。这一机制与迷迭香酸在其他炎症性疾病中的抗炎作用相呼应^[22],同时为其在AKI中的应用提供了理论支撑。与现有AKI疗药物相比,迷迭香酸作为天然多酚类化合物,具有安全性高、毒副作用小的优势,且本研究证实其低、高剂量均具有明确疗效,为临床转化提供了剂量参考。

本研究提示:迷迭香酸可通过抑制肾组织巨噬细胞活化并同时抑制其向M1型巨噬细胞转化,进而抑制炎症反应,对LPS刺激的AKI发挥保护作用。未来

需进一步开展临床前毒理学研究与临床试验,明确迷迭香酸的临床应用剂量与安全性,同时深入探索其调控巨噬细胞极化的具体分子靶点,为其临床推广应用奠定基础。

参考文献:

- [1] PEERAPORN RATANA S, MANRIQUE - CABALLERO C L, GOMEZ H, *et al.* Acute kidney injury from sepsis: Current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment [J]. *Kidney Int*, 2019, 96(05):1083—1099.
- [2] 段宇鑫, 张燕妮, 柏艺, 等. 急性肾损伤中巨噬细胞调控机制进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2025, 30(1):110—117.
- [3] 朱培烨. 迷迭香酸调节肺泡巨噬细胞极化改善冲击波所致急性肺损伤的作用及机制研究[D]. 重庆: 重庆理工大学, 2025.
- [4] 顾海燕, 王仲建. 藜本内酯通过抑制 RhoA/ROCK 信号通路改善脂多糖诱导小鼠肾足细胞损伤[J]. 广州中医药大学学报, 2024, 41(6):1573—1581.
- [5] 张星, 张令歌, 赵田田, 等. 左旋肉碱对脓毒症小鼠急性肾损伤的干预作用及其机制[J]. 山东医药, 2024, 64(32):42—46.
- [6] 李卉, 王林群, 张雪荣, 等. 金水清合剂对 IgA 肾病大鼠 TGF- β 1、CTGF、VEGF 表达的影响[J]. 世界中医药, 2020, 15(7):1016—1020.
- [7] 朱琳. *FgI2* 敲除促进巨噬细胞向 M1 型极化并加重急性肾损伤的作用机制研究[D]. 重庆: 中国人民解放军陆军军医大学, 2024.
- [8] 郑洋, 王佳慧, 赵铁建, 等. 莪术醇对 RAW264.7 巨噬细胞 M1/M2 表型分化以及炎症因子分泌的影响[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(11):77—80, 278.
- [9] 李帅帅, 罗瑞熙, 韦亚琼, 等. 黄芩苷通过调控 TLR4/NF- κ B 信号通路对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞极化的影响[J]. 中成药, 2022, 44(12):3835—3841.
- [10] AMOAH S K, SANDJO L P, KRATZ J M, *et al.* Rosmarinic acid - pharmaceutical and clinical aspects[J]. *Planta medica*, 2016, 82(5):388—406.
- [11] CHEN J, ZHANG Q, GUO J, *et al.* Single - cell transcriptomics reveals the ameliorative effect of rosmarinic acid on diabetic nephropathy - induced kidney injury by modulating oxidative stress and inflammation [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2024, 14(4):1661—1676.
- [12] 陈瑞丹, 张彦, 杨培丽, 等. 迷迭香酸通过抑制 NADPH 氧化酶/ROS/NLRP3 炎症小体通路改善高血压肾病[J]. 第三军医大学学报, 2021, 43(12):1153—1161.
- [13] 纪敏. 迷迭香酸对顺铂致小鼠急性肾损伤的保护作用及其机制研究[D]. 广西 南宁: 广西大学, 2020.
- [14] YOO J Y, CHA D R, KIM B, *et al.* LPS - induced acute kidney injury is mediated by NOX4 - SH3YL1 [J]. *Cell Rep*, 2020, 33(3):108245.
- [15] 张练, 王茂娟, 谢红, 等. 迷迭香酸对脓毒症急性肾损伤大鼠 NF- κ B 和 p38 MAPK 信号通路的影响[J]. 现代免疫学, 2024, 44(3):221—226, 233.
- [16] TAVAFI M, AHMADVAND H. Effect of rosmarinic acid on inhibition of gentamicin induced nephrotoxicity in rats [J]. *Tissue Cell*, 2011, 43(6):392—397.
- [17] SZUMILAS D, OWCZAREK A J, BRZOZOWSKA A, *et al.* The value of urinary NGAL, KIM - 1, and IL - 18 measurements in the early detection of kidney injury in oncologic patients treated with cisplatin - based chemotherapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(2):1074.
- [18] 魏思灿, 张洪玲, 吴青青, 等. 氯沙坦调控 GPR84 表达抑制巨噬细胞 M1 极化减轻脓毒症肾损伤的研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2025, 41(21):3067—3074.
- [19] 聂迪菲. 草酰乙酸调控巨噬细胞表型在急性肾损伤中的作用及机制研究[D]. 江苏 南京: 东南大学, 2024.
- [20] 魏春玲. 鸢尾黄素经 KLF4/NF- κ B 通路抑制巨噬细胞 M1 样极化减轻脓毒症急性肾损伤[D]. 山东 青岛: 青岛大学, 2025.
- [21] 吕冬菊, 黄东明, 段伟静. 黄芪甲苷调控 HMGB1/NF- κ B 通路对脓毒症大鼠巨噬细胞极化和急性肾损伤的机制研究[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2025, 28(1):1—7.
- [22] 程成, 沙舟, 陈想, 等. 迷迭香酸通过上调 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬增强巨噬细胞抗菌免疫的机制研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(23):6450—6456.

(本文编辑: 马凌云 投稿日期 2026 - 03 - 16)