

大黄干预炎症小体活化调控线粒体自噬改善脓毒症全身炎症反应及保护肠道结构机制研究

王婷, 李绿, 许少金, 张汉洪, 李泉*

广东省中医院海南医院, 海南 海口 570203

摘要 目的:探讨大黄通过干预炎症小体 NLRP3 活化、激活 PINK1/Parkin 途径调控线粒体自噬,从而对脓毒症小鼠全身炎症反应的抑制及肠道结构的保护机制。方法:将 40 只 6~8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠采用随机数字表法分为大黄高剂量组、大黄中剂量组、大黄低剂量组、模型组、空白组;大黄高剂量组、大黄中剂量组、大黄低剂量组以及模型组均运用盲肠结扎与穿孔术建立脓毒症小鼠模型,造模成功后大黄各剂量组每天灌胃相应浓度的大黄液 0.52 mL/d,持续给药 7 d,第 8 天采集血液,制备血清,留取肠道组织;采用 HE 染色观察各组小鼠肠组织病理学改变,采用 ELISA 法检测血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平,应用 Western Blot 法检测各组小鼠回肠组织 NLRP3、PINK1、Parkin、LC3I、LC3II 的蛋白表达水平。结果:HE 染色可见模型组小鼠肠黏膜上皮细胞损伤最严重,见多个溃疡形成,明显的肠绒毛大量坏死及大片脱落,并伴有黏膜出血和水肿,炎性细胞浸润达黏膜肌层,杯状细胞明显减少,潘氏细胞明显增多;与模型组相比,大黄各剂量组小鼠肠黏膜上皮细胞损伤、微绒毛破坏及炎症细胞浸润均改善、杯状细胞数量增加,而潘氏细胞数量减少,炎性细胞浸润基本局限于固有层,其中大黄高剂量组小鼠肠黏膜上皮细胞损伤、肠绒毛破坏程度最轻,黏膜腺体排列形态趋于正常形态,黏膜无明显出血及水肿。模型组小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平明显升高($P < 0.01$),大黄各剂量组给药后血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平均降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。模型组小鼠肠道组织中 NLRP3 表达水平明显升高($P < 0.01$),PINK1、Parkin 的表达水平升高($P < 0.01$),自噬相关蛋白 LC3I、LC3II 表达水平明显升高($P < 0.01$),大黄各剂量组给药后 NLRP3 水平均不同程度降低($P < 0.01$),且与大黄剂量呈负相关,PINK1、Parkin、自噬相关蛋白 LC3I、LC3II 表达水平不同程度升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),与大黄剂量呈正相关。结论:大黄通过对肠道 NLRP3 炎症小体活化的抑制,激活 PINK1/Parkin 途径增加线粒体自噬程度,从而达到减少全身炎症因子产生及肠道结构保护作用。

关键词 大黄;线粒体自噬;PINK1/Parkin 途径;NLRP3;脓毒症;肠道结构

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1002-2392(2026)04-0024-07

DOI:10.19664/j.cnki.1002-2392.260071

脓毒症是一种疾病综合征,1991 年美国重症医学会(SCCM)联合美国胸科医师学会(ACCP)提出了其最早的定义,称为 Sepsis 1.0,将其定义为感染引起的全身炎症反应综合征(Systemic inflammatory response, SIRS),Sepsis 1.0 的重心是抗菌药物的使用;2001 年进入 Sepsis 2.0 时代,是在 Sepsis 1.0 提出炎症反应综

合征基石上关注器官功能障碍指标及组织灌注指标,Sepsis 2.0 的重点是液体复苏;2016 年 Sepsis 3.0 定义将脓毒症病理生理机制放在主要位置,脓毒症的定义由“感染引起的全身炎症反应综合征”改为“机体对感染的反应失调而导致危及生命的器官功能障碍”^[1-3]。近年来,控制脓毒症炎症风暴通路机制的研究已经逐步细化,且研究内容一直是热点。脓毒症不仅血液中存在炎症风暴,肠道组织中也存在炎症风暴,因肠道免疫系统强大,存在多种抗原提呈细胞及多种炎症小体,一旦血液出现炎症风暴,能快速感受到并对炎症反应进行放大,对全身感染加重起到推波助澜的作用。近年来研究^[4]发现,线粒体自噬是控制脓毒症炎症反应过度的关键因素,线粒体自噬是一种选择性的自噬,它

收稿日期:2024-12-09 修回日期:2025-10-25

基金项目:海南省自然科学基金青年基金项目(822QN477);张汉洪全国名老中医药专家传承工作室

作者简介:王婷(1990-),女,硕士,主治医师,从事中医急危重症治疗相关研究。

* 通信作者:李泉(1980-),男,副主任医师,从事中医急危重症治疗相关研究。

能够减少因脓毒症炎症导致的功能减退或者线粒体损伤,避免因损伤线粒体导致趋化因子和促炎因子增加,从而起到控制炎症反应的作用。大量研究^[5-7]表明大黄治疗脓毒症具有良好效果,具体包括增加肠道益生菌丰度、促进肠道益生菌稳定定植、减轻肠道组织炎症因子分泌、抑制肠道屏障破坏等,其中减轻肠道组织炎症因子分泌的分子通路尚不明确,本研究选择不同浓度大黄水溶液,发现最佳大黄浓度干预下,PINK1 - Parkin 线粒体自噬途径可能是脓毒症全身炎症控制及保护肠道结构的重要通路,为推动临床使用最优大黄剂量选择提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

C57BL/6J 雄性小鼠 6~8 周龄,体质量 22~24 g,购自珠海百试通生物科技有限公司,许可证号:SCXK(粤)2020-0051,均在 SPF 级实验房(温度 20~26℃,相对湿度 40%~70%,照度 15~20 lx)内适应性喂养 7 d,本实验经广东省中医院海南医院实验动物伦理委员会批准(IACUC-HHGP HCM-2406022)。

1.2 药物及制备

大黄颗粒购买于广东一方制药有限公司,批号为 A3022061,产地为甘肃陇南,品种为蓼科植物掌叶大黄。临床常规使用大黄生药人体正常剂量为 12 g/d,根据《药理实验方法学》^[8]中体表面积换算法,计算出 20 g 小鼠剂量约为 0.026 g/d,每次小鼠灌胃体积为 0.52 mL,即将 0.026 g 生药质量溶于 0.52 mL 超纯水中,可得 5% (质量/体积)的大黄水煎液,设低剂量组为 5% 大黄组、中剂量组为 10% 大黄组、高剂量组为 20% 大黄组。将 120 g 生药质量溶于 120 mL 超纯水中即可配制成 100% 大黄液,120 g 生药质量为 100 g 颗粒质量,将 100 g 颗粒质量溶于 120 mL 超纯水中,震荡约 15 min 使药物完全溶解,配制成 100% 大黄液保存。取 5 mL 100% 大黄液溶于 95 mL 超纯水中配制为 5% 大黄液;取 10 mL 100% 大黄溶液溶于 90 mL 超纯水中配制 10% 大黄液;取 20 mL 100% 大黄液溶于 80 mL 超纯水中配制为 20% 大黄液。

1.3 主要仪器与试剂

Model-680 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);SCI-ENTZ-12 高通量组织研磨器(上海新芝生物);CF1524R 冷冻离心机(北京兰杰柯科技有限公司);L-OSK LED 数显圆周摇床(北京兰杰柯科技有限公司);732BR1630WB 成像系统(美国 Bio-Rad 公司);165-8004 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

小鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α) ELISA 试剂盒、小

鼠白细胞介素 1 β (IL-1 β) ELISA 试剂盒、小鼠白细胞介素 6 (IL-6) ELISA 试剂盒(江苏晶美生物科技有限公司,批号:JM-02415M2、JM-02323M2、JM-02446M2);WB 及 IP 细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型,上海碧云天生物技术股份有限公司,批号:P0013、P0010);12% 蛋白预制胶、电泳缓冲液、转膜缓冲液、TBS、PVDF 转印膜、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5 $\times$)、ECL 化学发光底物(特超敏,北京兰杰柯科技有限公司,批号:BL626A、BL534A、BL602A、TM-PVDF-R-45、BL502B、BL520A);预染蛋白标准品 Protein Ladder(美国 ThermoFisher,批号:26616);NLRP3 单克隆抗体(NLRP3 Monoclonal antibody)、Occludin 多克隆抗体(Occludin Polyclonal antibody)、Claudin 1 多克隆抗体(Claudin 1 Polyclonal antibody)、ZO-1 多克隆抗体(ZO-1 Polyclonal antibody)、PINK1 克隆抗体(PINK1 Polyclonal antibody)、PARK2 多克隆抗体(PARK2 Polyclonal antibody)、LC3 多克隆抗体(LC3 Recombinant antibody,武汉三鹰生物技术有限公司,批号:68102-1-Ig、27260-1-AP、13050-1-AP、21773-1-AP、23274-1-AP、14060-1-AP、81004-1-RR)。

1.4 动物分组及给药

采用随机数字表法对小鼠进行分组,分别为大黄高剂量组、大黄中剂量组、大黄低剂量组、模型组和空白组,每组 8 只。大黄高、中、低剂量组分别灌胃 20%、10%、5% 大黄液 0.52 mL,每天 1 次,持续 7 d。模型组和空白组灌胃等体积生理盐水。

1.5 脓毒症小鼠模型制备及症状评分

各组均运用盲肠结扎与穿孔术(Cecal ligation and puncture, CLP)^[9]建立脓毒症小鼠模型,具体操作流程如下,称体质量后按照 1% 戊巴比妥钠(4 g/kg)腹腔注射进行麻醉,完成麻醉后将小鼠仰卧固定在手术板上;75% 医用酒精用对小鼠进行腹部消毒,于左腹部下 1/4 象限纵切 1~2 cm,逐层打开腹膜,将盲肠找出,用镊子游离出盲肠至腹壁外,将盲肠内容物向远端推挤以防止空气留置,在盲肠上 1/3 处用丝线结扎盲肠,在盲肠尾端用 21 G 针头由系膜侧指向系膜对侧,注意避开两侧血管穿孔 1 次,从穿孔内挤出少量粪便到盲肠外,将挤出的肠内容物擦拭干净并纳入盲肠,缝合线逐层缝合腹壁;后用 10 号注射器于颈下注射 0.9% 氯化钠 2 mL,进行液体复苏,最后放回饲养笼内,待其自然苏醒,常规饲养;以上操作在 10 min 之内完成。标准饮食,随意饮水,密切观察小鼠生命体征及一般情况。

症状评分细则参考 Shrum 等^[10]指定的小鼠脓毒

症评估表,评分越高提示症状越差,详细内容如下;
①外观(0 - 毛发光滑,1 - 毛发竖起;2 - 背部大部分毛发竖起;3 - 毛发竖起、小鼠看起来“浮肿”;4 - 毛发勃起、小鼠看起来消瘦);②活动量(0 - 小鼠处于活动状态;1 - 小鼠处于活动状态但避免直立;2 - 小鼠活动明显减慢但还在走动;3 - 活动受损、小鼠只有在受到刺激时才会移动,运动有震颤;4 - 活跃性严重受损、小鼠在受到刺激时保持静止不动可能还会颤抖);③对刺激的反应(0 - 小鼠对听觉刺激或触摸立即做出反应;1 - 对听觉刺激反应缓慢或无反应、对触摸反应强烈,移动以逃避;2 - 对听觉刺激没有反应、对触摸反应适中如移动几步;3 - 对听觉刺激没有反应、对触摸反应轻微或无运动;4 - 对听觉刺激没有反应、很少或没有对触摸的反应,如果被推倒,就不能自我纠正);④眼睛(0 - 睁开;1 - 眼睛未完全睁开,可能有分泌物;2 - 眼睛至少半闭、可能有分泌物;3 - 半闭或更多、可能有分泌物;4 - 闭着或呈乳白色)。

1.6 标本采集

采集各组小鼠造模成功后第 7 天的眼球血,制备血清,摘眼球取血约 200 μ L,于 4 $^{\circ}$ C 下,3 500 r/min 离心 10 min,收集血清,保存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱 2 h,再转入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。回肠采集:拨开肠道,探查回盲部,在近盲肠处取回肠末端约 4 cm。取 2 cm 回肠置于 4% 多聚甲醛溶液常温固定 72 h,用于 HE 染色后光镜观察;剩余部分肠管用 1 $\times$ PBS 溶液冲洗干净,液氮暂时保存随后转移到 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。

1.7 观察指标及检测方法

1.7.1 HE 染色观察各组小鼠肠组织病理学改变

取结肠组织,10% 甲醛固定,常规石蜡包埋,连续 4 μ m 病理切片(HE 染色),显微镜下观察结肠黏膜病理。每个组织块选取 4 张 HE 染色切片,每张切片随机选取 3 个视野,用 Olympus BX60 显微镜观察,评分方法参照 Gaudio 标准^[11],根据病理形态累计积分,积分方法如下,①上皮和腺体的破坏(正常 0 分,点状上皮破坏和/或隐窝丢失 1 分,带状上皮破坏和/或隐窝丢失 2 分,弥漫性上皮破坏和/或隐窝丢失和/或溃疡累及黏膜下 3 分);②腺体隐窝的扩大(正常 0 分,点状隐窝扩大 1 分,带状隐窝扩大 2 分,弥漫性隐窝扩大 3 分);③杯状细胞的减少(正常 0 分,轻度减少 1 分,带状或中度减少 2 分,弥漫性或完全丢失 3 分);④炎症细胞的浸润(无浸润 0 分,浸润局限在固有层或隐窝基底部 1 分,浸润达黏膜肌层 2 分,浸润达黏膜下和/或肌层 3 分);⑤水肿(无 0 分,轻度水肿 1 分,带状和/或中度水肿 2 分,广泛和严重水肿 3 分);⑥黏膜出

血(无 0 分,点状 1 分,带状 2 分,弥漫性 3 分);⑦隐窝脓肿(无 0 分,点状 1 分,带状 2 分,弥漫性 3 分);⑧异型增生(无 0 分,点状 1 分,带状 2 分)。通过显微镜分别在 400 倍镜下观察,并采集分析脓毒症小鼠肠道组织、大黄各浓度组干预脓毒症小鼠肠道组织进行对比。
1.7.2 ELISA 法检测各组小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平

打开低温高速离心机(4 $^{\circ}$ C 预冷),取冻存的小鼠血清复温 30 ~ 40 min,将血清以 4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心,取上清液待检测。根据 ELISA 试剂盒步骤进行检测。完成 ELISA 试剂盒操作,打开酶标仪,设置好排版布局、震荡、吸光度(λ = 450 nm),震荡(时间 10 s,中度震荡)后测量各孔的吸光度(OD 值)。测定过程应在加完终止液后 5 min 内进行。

1.7.3 Western Blot 法检测各组小鼠肠道组织 NLRP3、细胞线粒体自噬相关蛋白 PINK1、Parkin、LC3(LC3 I、LC3 II)水平

肠道组织蛋白样品制备:称取 100 mg 肠组织于培养皿中,用干净的剪刀将组织块尽量剪碎,加入 1 mL 预冷的 Lysis Buffer,在组织匀浆机中进行匀浆 3 次,每次 20 s,尽可能使组织碾碎,冰上静置 15 ~ 30 min。将匀浆液移至离心管中,放入预冷至 4 $^{\circ}$ C 的离心机中,12 000 r/min,离心 5 min。将上清移至新的预冷的离心管中,用 BCA 试剂盒测样品的总蛋白浓度。浓度测定后,进行蛋白变性,按 Loading buffer: 样品 = 1:4 的体积比,在样品中加入含 β -巯基乙醇的 Loading buffer(Loading Buffer: β -巯基乙醇 = 50:3),混匀后沸水煮 5 min,室温冷却,放 -20 $^{\circ}$ C 保存待用。SDS-PAGE 电泳和转膜,免疫印迹,显影。

1.8 统计学方法

利用 SPSS20.0 软件进行统计学分析。采用 Shapiro-Wilk 检验检测正态分布性,采用 Levene 检验检测方差齐性,如数据分布为正态分布且组间方差齐,采用单因素方差分析(one-way ANOVA),用 Bonferroni 法进行校正分析,进行组间两两比较,数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;数据不满足正态分布,采用非参数检验分析,用 Kruskal-Wallis 检验进行组间两两比较,数据用四分位数统计描述; $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 回肠组织病理学 HE 染色结果

5 组小鼠回肠组织病理学观察结果见图 1、表 1。空白组小鼠肠黏膜上皮细胞、黏膜腺体隐窝结构和形态基本正常,仅见散在个别慢性炎症细胞,主要分布于黏膜固有层浅表;与空白组比较,模型组小鼠肠黏膜上

皮细胞损伤最严重,见多个溃疡形成,明显的肠绒毛大量坏死及大片脱落,并伴有黏膜出血和水肿,杯状细胞明显减少,潘氏细胞明显增多,炎性细胞浸润达黏膜肌层,病理评分差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组小鼠相比,大黄各剂量组小鼠肠黏膜上皮细胞损伤、微绒毛破坏及炎症细胞浸润均改善,杯状细胞分布增加,病理评分差异具有统计学意义($P < 0.01$),其中大黄高剂量组小鼠肠黏膜上皮细胞损伤、肠绒毛破坏程度最轻,黏膜腺体排列形态趋于正常形态,黏膜无

明显出血及水肿,杯状细胞、潘氏细胞分布密度最高,炎性细胞浸润基本局限于固有层;大黄低剂量组肠道黏膜黏膜腺体排列紊乱,仍可见肠绒毛坏死及脱落,并伴有局部黏膜出血和水肿,杯状细胞较模型组增多,可见炎症细胞浸润主要位于隐窝基底部;大黄中剂量组肠道黏膜黏膜腺体排列紊乱,仍可见肠绒毛坏死及脱落,并伴有局部黏膜出血和水肿,潘氏细胞分布较模型组减少,杯状细胞分布较模型组增加,固有层、黏膜肌层见炎症细胞浸润。

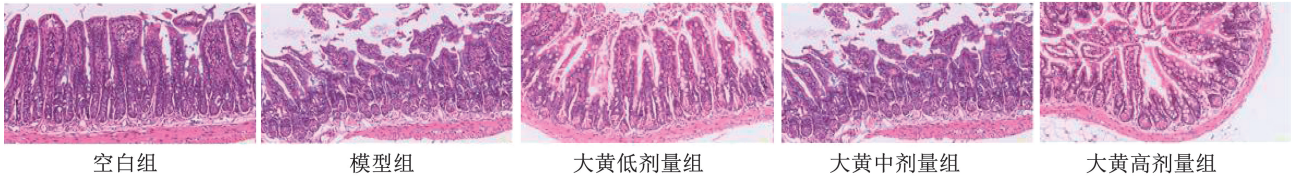


图1 各组回肠组织病理学情况(HE, ×400)

表1 各组病理损伤 Gaudio 评分比较($\bar{x} \pm s$,分)

组别	n	评分
空白组	8	0.00 ± 0.00
模型组	8	19.75 ± 0.48 ^{##}
大黄低剂量组	8	16.38 ± 0.50 ^{**}
大黄中剂量组	8	11.00 ± 0.45 ^{**}
大黄高剂量组	8	2.88 ± 0.20 ^{**}

注:与空白组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{**} $P < 0.01$ 。

2.2 各组小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的含量
与空白组比较,模型组小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平明显升高($P < 0.01$),存在明显全身炎症反应,提示造模成功;与模型组比较,大黄低、中、高

剂量组 TNF- α 水平均降低,差异均有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$),其中大黄中剂量组 TNF- α 水平降低最明显($P < 0.01$),但大黄高剂量组与大黄中剂量组水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较,大黄低、中、高剂量组 IL-1 β 水平均降低,差异存在统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$),其中大黄高剂量组 IL-1 β 水平降低最明显($P < 0.01$)。与模型组比较,大黄低、中、高剂量组 IL-6 水平均降低($P < 0.05, P < 0.01$),其中大黄高剂量组 IL-6 水平降低最明显($P < 0.01$)。说明大黄对脓毒症全身炎症反应具有抑制作用,其治疗效果与大黄剂量呈正相关。见表2。

表2 各组小鼠血清相关炎症指标结果比较($\bar{x} \pm s$,ng/g)

组别	n	TNF- α	IL-1 β	IL-6
空白组	8	84.37 ± 26.59	63.93 ± 10.37	180.19 ± 29.03
模型组	8	184.20 ± 30.29 ^{##}	180.73 ± 27.43 ^{##}	574.80 ± 45.33 ^{##}
大黄低剂量组	8	153.09 ± 25.13 [*]	145.69 ± 24.16 [*]	423.67 ± 41.60
大黄中剂量组	8	133.62 ± 22.11 ^{**}	135.14 ± 22.83 [*]	391.24 ± 40.77 [*]
大黄高剂量组	8	134.56 ± 23.17 ^{**}	117.46 ± 22.12 ^{**}	307.48 ± 35.16 ^{**}

注:与空白组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

2.3 各组小鼠肠道组织 NLRP3、PINK1、Parkin、LC3I、LC3II 的蛋白表达水平

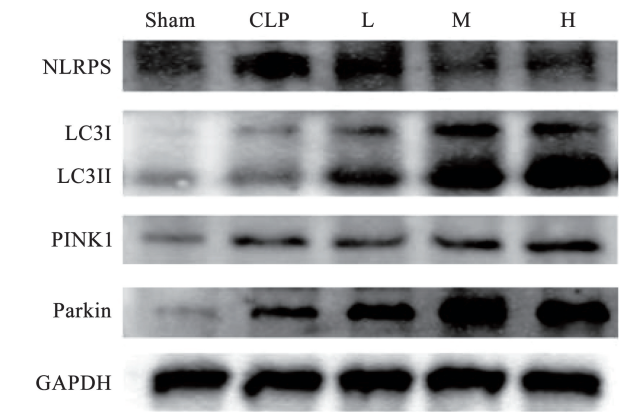
与模型组相比,大黄各剂量组 PINK1、Parkin 表达水平均增强($P < 0.05, P < 0.01$),大黄高剂量组 PINK1 表达水平最高($P < 0.01$);大黄中剂量组 Parkin 表达水平最高($P < 0.01$),但大黄中剂量组、高剂量组 Parkin 表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$),提示 PINK1/Parkin 通路激活程度与大黄剂量呈正相关。与

模型组相比,大黄各剂量组自噬相关蛋白 LC3I、LC3II 表达水平均增加($P < 0.01$),大黄高剂量组最高($P < 0.01$),大黄高剂量组 LC3II/LC3I 比值最高($P < 0.01$),提示大黄高剂量组对线粒体自噬激活效果最强。与模型组相比,大黄各剂量组 NLRP3 炎症小体表达水平均不同程度下降($P < 0.01$),大黄高剂量组下降程度最明显($P < 0.01$)。见表3,图2。

表 3 各组小鼠线粒体自噬相关指标表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LC3I	LC3II	PINK1	Parkin	NLRP3
空白组	8	0.107 ± 0.06	0.204 ± 0.02	0.391 ± 0.05	0.202 ± 0.03	0.385 ± 0.07
模型组	8	0.423 ± 0.03 ^{##}	0.409 ± 0.03 ^{##}	0.685 ± 0.08 ^{##}	0.596 ± 0.06 ^{##}	0.933 ± 0.19 ^{##}
大黄低剂量组	8	0.723 ± 0.05 ^{**}	0.769 ± 0.06 ^{**}	0.640 ± 0.05 [*]	0.726 ± 0.07 ^{**}	0.584 ± 0.09 ^{**}
大黄中剂量组	8	0.924 ± 0.10 ^{**}	0.937 ± 0.07 ^{**}	0.671 ± 0.07	1.116 ± 0.11 ^{**}	0.358 ± 0.05 ^{**}
大黄高剂量组	8	1.052 ± 0.09 ^{**}	1.407 ± 0.06 ^{**}	0.987 ± 0.10 ^{**}	0.950 ± 0.13 ^{**}	0.214 ± 0.06 ^{**}

注:与空白组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。



注:Sham. 空白组;CLP. 模型组;L. 大黄低剂量组;M. 大黄中剂量组;H. 大黄高剂量组。

图 2 线粒体自噬相关蛋白表达印迹图

3 讨论

线粒体自噬是通过自噬途径选择性降解损伤线粒体的过程。线粒体自噬主要分为两种调控途径:由 PINK1 - Parkin 介导的线粒体自噬以及 Nix (BNIP3L)、BNIP3、FUNDC1 等线粒体外膜自噬受体介导的线粒体自噬,目前主流认为 PINK1 - Parkin 途径是线粒体稳态最重要的调节途径^[12],线粒体自噬是保护机体的调节方式,当细胞中的线粒体受损,PINK1 - Parkin 信号通路被激活,稳定的 PINK1 从内膜到外膜转位并锚定在线粒体外膜上,通过磷酸化作用将 Parkin 招募到受损的线粒体上,活化的 Parkin 构建多泛素链,招募衔接蛋白和自噬体膜上的微管相关蛋白 1 轻链 3 (Microtubule - associated protein 1 light chain 3,LC3) 结合,启动线粒体降解的程序,减轻因受损线粒体引发的机体炎症级联反应^[13],可以认为适当的线粒体自噬启动是避免过度炎症反应对机体产生过度免疫反应刺激造成进一步组织细胞损伤,可维护机体功能稳态。目前多方面研究均支持细胞自噬和炎症小体激活之间存在密切的联系,炎症小体 NLRP3 形成参与了细胞线粒体自噬^[14];梁海燕^[15]造模 LPS 诱导小鼠急性心肌损伤,发现心肌中自噬相关蛋白 LC - 3 表达增加,PINK1/Parkin 途径相关蛋白表达增加;而通过抑制炎症,则 NL-

RP3、IL - 1 β 、IL - 18 表达均下降,而线粒体自噬相关蛋白 LC3 - I、LC3 - II 分泌水平却表现出升高;朱云龙等^[16]敲除了脓毒症急性肺损伤小鼠肺泡巨噬细胞 TIM - 3 基因,发现细胞炎症因子表达下降的同时抑制了 NLRP3 表达,PINK1/Parkin 途径相关的 PINK1、Parkin 蛋白表达却升高,自噬相关蛋白 LC3 - I、LC3 - II 分泌水平相关性升高。由此可得出,抑制了 NLRP3 表达则激活 PINK1/Parkin 线粒体自噬途径,能通过增强线粒体自噬减少全身炎症反应。

大黄作为通腑泻下法的典型代表药物,已经有大量的研究证实了大黄具有较好的抗炎效果,近期研究^[17]发现大黄中的重要物质大黄蒽醌还通过下调肠组织中 NLRP3 炎性小体及相关蛋白 Caspase - 1、IL - 1 β 的表达,抑制血液中 IL - 1 β 、TNF - α 和 NO 水平,提示大黄能通过调控肠道组织的 NLRP3 炎性小体从而调控全身炎症反应状态;其中从大黄中提取的大黄蒽醌也发现能下调肠组织中 NLRP3 炎性小体及相关蛋白 Caspase - 1、IL - 1 β 的表达,抑制血液中 IL - 1 β 、TNF - α 和 NO 水平;以上结论与本次实验结论基本一致,理论上支持了本次实验结果,认为大黄通过作用于肠道 NLRP3 炎性小体从而调控脓毒症小鼠全身炎症反应,而本次实验同时研究 PINK1/Parkin 通路,发现其机制可能是大黄通过抑制 NLRP3 炎性小体从而增强线粒体自噬 PINK1/Parkin 途径激活达到控制脓毒症全身炎症反应的作用。

本实验成功复刻运用盲肠结扎与穿孔术造模方法建立脓毒症小鼠模型,模型组小鼠血清中 IL - 1 β 、TNF - α 、IL - 6 分泌水平均明显升高,NLRP3 的肠道组织表达量明显增加,达到明显脓毒症全身炎症反应及肠道炎症反应状态;运用不同浓度大黄水溶液寻找对减轻肠道炎症反应最佳剂量,大黄低、中、高剂量组 TNF - α 、IL - 1 β 、IL - 6 水平均较模型组明显降低,IL - 1 β 、IL - 6 在大黄高剂量组均最低,而大黄高剂量组对肠道 NLRP3 的表达抑制作用最明显,说明大黄治疗抑制炎症疗效与中药剂量正相关;尽管 TNF - α 在大黄中剂量组分泌水平降低幅度最大,但大黄中剂量组与

大黄高剂量组之间差异不存在统计学意义,可以认为因 $\text{TNF}-\alpha$ 为多通路炎症因子, NLRP3 炎症小体对其调控作用不为主导作用,故受其他通路影响,故综合以上实验结果认为大黄高剂量组对肠道组织 NLRP3 的表达抑制作用最明显,从而降低了全身炎症反应 $\text{IL}-1\beta$ 、 TNF 、 $\text{IL}-6$ 的水平,抑制脓毒症全身炎症反应与剂量呈正相关。对大黄如何通过抑制肠道 NLRP3 炎症小体从而影响全身炎症变化,课题组认为与 PINK1 - Parkin 介导的线粒体自噬相关,进一步研究中,发现脓毒症小鼠肠组织中 NLRP3 的表达显著增加, PINK1、Parkin 的表达量明显增加,自噬相关蛋白 LC3I、LC3II 表达量明显增加,考虑是脓毒症全身炎症反应状态下机体保护性反应激活 PINK1 - Parkin 信号通路,活化 Parkin 与自噬体膜上的 LC3 结合,从而启动被炎症风暴损伤的细胞线粒体吞噬,减少机体因全身炎症反应失常引起细胞损伤、细胞器外泄引发进一步的炎症风暴, PINK1 - Parkin 通路的激活启动是机体对自身保护的机制。

大黄各剂量组脓毒症小鼠肠道内组织 PINK1、Parkin 表达水平较前明显升高,与剂量呈正相关,提示大黄能激活 PINK1、Parkin 表达水平,同时能增强线粒体自噬相关蛋白 LC3I、LC3II 表达水平,综合提高线粒体自噬能力,且治疗效果与大黄治疗剂量呈正相关,大黄高剂量组 LC3I、LC3II 表达量最高且 LC3II/LC3I 比值最高,而 LC3II 相比 LC3I 是 LC3I 经过 PE 共轭后形成, LC3II 是形成稳定线粒体自噬体的蛋白质标志^[18],故大黄高剂量组的 LC3II/LC3I 比值最高提示存在的线粒体自噬体更稳定,吞噬能力最强。以上实验结果提示大黄治疗后能增强脓毒症小鼠肠道组织线粒体自噬程度,提高线粒体自噬能力是通过抑制 NLRP3 炎症小体活化、增强激活 PINK1 - Parkin 通路增强线粒体自噬完成的,大黄高剂量对 NLRP3 炎症小体的抑制作用及 PINK1 - Parkin 通路激活作用最明显。

目前多项研究^[19-20]发现肠道炎症状态与肠道组织结构息息相关,课题组通过对脓毒症小鼠肠道组织观察发现,脓毒症小鼠肠黏膜上皮细胞损伤严重,可见多发溃疡形成,明显的肠绒毛大量坏死脱落并伴有黏膜出血和水肿,杯状细胞明显减少,潘氏细胞明显增多,炎性细胞浸润达黏膜肌层;给予大黄水溶液口服治疗后,不同程度可见肠道黏膜修复,杯状细胞数量增加,而潘氏细胞数量减少,炎性细胞浸润基本局限于固有层。杯状细胞的作用是通过胞吞作用将肠腔内病原体抗原吞噬,同时招募大量树突状细胞、中性粒细胞聚

集固有层激活免疫系统,这个过程称为杯状细胞相关抗原传递通道;杯状细胞还是肠黏液蛋白分泌主要场所,增加肠道黏液分泌起到肠道冲刷作用,同时减少因肠道微生物负荷增加诱发的肠道炎症反应^[21]。潘氏细胞因含有大量内质网及高尔基体可合成并向肠腔内分泌防御素、溶菌酶从而起到抑菌杀菌作用^[22]。杯状细胞主要分布在肠绒毛表层,与吸收细胞间断分布,当肠道绒毛破坏时首当其冲破坏,脓毒症肠道的杯状细胞的减少极大削弱对肠道感染病原体吞噬灭活作用,同时肠道黏液分泌减少肠道冲刷作用减弱,以上反应均增加病原学对肠道上皮细胞的接触,加强炎症级联反应激活,而脓毒症肠道潘氏细胞的增多考虑与潘氏细胞分布位置相关,潘氏细胞主要分布在肠隐窝下基底层,肠绒毛破坏时并未严重波及,故潘氏细胞并未被破坏,反而因肠道绒毛损伤炎症反应明显使潘氏细胞大量聚集;故经过大黄水溶液的治疗,肠黏膜修复,使杯状细胞数量增加、潘氏细胞数量减少,同时肠道组织内 NLRP3 炎症小体表达量明显减少,提示了可能大黄通过修复肠黏膜组织结构、调整杯状细胞及潘氏细胞表达量,影响肠道炎症反应。

综上所述,大黄通过激活 PINK1 - Parkin 通路,增强线粒体自噬相关蛋白 LC3I、LC3II 的含量、增加 LC3I 向 LC3II 转化速度,从而加快脓毒症导致的肠道损伤线粒体自噬,减少因脓毒症肠道 NLRP3 炎症小体过激活从而改善全身炎症状态、保护肠道正常组织结构。

参考文献:

- [1] YÉBENES J C, LORENCIO C. Sepsis code: looking for our “ST - segment” in the fog [J]. Med Clin, 2023, 161 (9): 386 - 388.
- [2] KLOUCHE K, MONNET X, ZARBOCK A. Balanced solution versus saline in critically ill patients: a new piece to the puzzle! [J]. Intensive Care Med, 2024, 50 (1): 134 - 135.
- [3] ZHANG Z H, CHEN L, LIU X L, et al. Exploring disease axes as an alternative to distinct clusters for characterizing sepsis heterogeneity [J]. Intensive Care Med, 2023, 49 (11): 1349 - 1359.
- [4] HU D X, SHEEJA PRABHAKARAN H, ZHANG Y Y, et al. Mitochondrial dysfunction in sepsis: mechanisms and therapeutic perspectives [J]. Crit Care, 2024, 28 (1): 39227925.
- [5] 于晓政, 刘瑞霞, 阴赓宏. 大黄素与细胞凋亡、自噬作用关系的研究进展 [J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39 (3): 381 - 384.
- [6] 杨梦霞, 武浩文, 赵春铭, 等. 大黄牡丹汤治疗脓毒症胃肠功能障碍作用机制的网络药理学研究 [J]. 中国中医急症, 2024, 33 (4): 582 - 586, 600.
- [7] 戴璇, 陈少裕, 李京心, 等. 大黄基于肠道菌群调节治疗脓毒症的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2023, 20 (36): 41 - 45.
- [8] 徐叔云. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 1698.
- [9] 李青青, 张宇轩, 徐桂萍. 两种麻醉方法建立大鼠盲肠结扎穿孔术脓毒症模型比较 [J]. 新疆医学, 2022, 52 (2): 121 - 123, 134.
- [10] SHRUM B, ANANTHA R V, XU S X, et al. A robust scoring system to

- evaluate sepsis severity in an animal model[J]. BMC Res Notes, 2014, 12(7):24725742.
- [11] 龙鑫月. 基于 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 细胞焦亡信号通路探讨祛湿疏肝方改善 UC 小鼠肠黏膜屏障的机制[D]. 天津: 天津中医药大学, 2023.
- [12] AGARWAL S, MUQIT M M K. PTEN-induced kinase 1 (PINK1) and Parkin: Unlocking a mitochondrial quality control pathway linked to Parkinson's disease[J]. Curr Opin Neurobiol, 2022, 72:111-119.
- [13] YANG Y X, PENG Y Q, LI Y Y, et al. Sestrin2 balances mitophagy and apoptosis through the PINK1-Parkin pathway to attenuate severe acute pancreatitis[J]. Cell Signal, 2025, 126:111518.
- [14] ZHANG Y N, LUO L X, XU X M, et al. Acetylation is required for full activation of the NLRP3 inflammasome[J]. Nat Commun, 2023, 14(1):8396.
- [15] 梁海燕. PINK1/Parkin 通路介导的自噬在心肌细胞缺氧/复氧损伤中的作用研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2021.
- [16] 朱云龙, 吴芳, 张杰, 等. 基于 Tim-3 促进肺泡巨噬细胞线粒体自噬和抑制 NLRP3 炎症小体激活对脓毒症急性肺损伤保护作用的研究[J]. 中国免疫学杂志, 2025, 41(11):2567-2572.
- [17] 刘桂元, 罗利亚, 李晓, 等. 大黄蒽醌类化合物抗炎作用研究进展[J]. 中成药, 2023, 45(11):3693-3701.
- [18] 刘晓健, 陈睿琦, 胡峰, 等. 糖尿病大鼠心肌组织中自噬基因微管相关蛋白 1 轻链 3 的表达[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(14):3464-3466.
- [19] 宋婷婷, 柴瑞峰, 杨春波, 等. NLRP3 炎症小体对脓毒症大鼠肠道炎症与损伤及 JAK/STAT3 信号通路的影响[J]. 现代生物医学进展, 2024, 24(13):2423-2427.
- [20] 苗金雪. 通过 PINK1/Parkin 线粒体自噬通路探究黄芩汤对溃疡性结肠炎大鼠的治疗作用[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2021.
- [21] 刘莹, 侯晓华, 宋军. 消除对肠杯状细胞的“刻板印象”——肠杯状细胞的研究进展[J]. 临床消化病杂志, 2023, 35(2):159-163.
- [22] 伏扬, 曾悦. 潘氏细胞及其与急性胰腺炎关系的研究进展[J]. 国际消化病杂志, 2021, 41(5):338-341.

Mechanism Study on Rhubarb Improving Systemic Inflammatory Response and Protecting Intestinal Structure in Sepsis through Regulating Mitophagy by Intervening in Inflammasome Activation

WANG Ting, LI Lv, XU Shaojin, ZHANG Hanhong, LI Quan

Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Hainan Hospital, Haikou 570203, China

Abstract Objective: To investigate the mechanism of rhubarb by activating the PINK1/Parkin pathway to regulate mitophagy and intervene in inflammasome activation to inhibit systemic inflammatory response and protect intestinal structure in sepsis mice. Method: A total of 40 6-8-week-old C57BL/6J male mice were randomly divided into high-dose rhubarb group, medium-dose rhubarb group, low-dose rhubarb group, sepsis model group and blank group. The high-dose rhubarb group, the medium-dose group, the low-dose group, and the sepsis model group were all modeled by cecal ligation and perforation to establish a mouse model of sepsis. After successful modeling, each dose group of rhubarb was given 0.52 mL/day of rhubarb liquid by gavage every day for 7 days, and on the 8th day, the eyeball blood of mice in each group was collected after successful modeling, serum was prepared, and intestinal tissue was retained; HE staining was used to observe the histopathological changes of intestinal tissue, and the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in serum were detected by ELISA, Western blot was used to detect the expression levels of NLRP3, PINK1, Parkin, LC3I, LC3II in ileal tissues of mice in each group. Results: HE staining showed that the intestinal mucosal epithelial cell injury was the most serious in the sepsis model group, with multiple ulcers formed, obvious intestinal villi with a large amount of necrosis and large sloughing, accompanied by mucosal bleeding and edema, inflammatory cell infiltration reached the muscularis mucosa, goblet cells were significantly reduced, paneth cells were significantly increased, and inflammatory cells infiltrated into the muscularis mucosa; Compared with the model group, the intestinal mucosal epithelial cell damage, microvilli destruction and inflammatory cell infiltration in the rhubarb group were improved, and the number of goblet cells increased, while the number of paneth cells decreased, and the inflammatory cell infiltration was basically limited to the lamina propria. The serum TNF- α , IL-1 β , IL-6 level in the sepsis model group was significantly increased ($P < 0.01$), and the serum TNF- α , IL-1 β , IL-6 level in the rhubarb group decreased after treatment ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The expression levels of NLRP3, PINK1, Parkin, LC3I, LC3II were significantly increased in the intestinal tissues of mice in the sepsis model group ($P < 0.01$). After treatment, the level of NLRP3 in each dose group of rhubarb decreased ($P < 0.01$), which was negatively correlated with the dose, and the expression level of PINK1, Parkin, LC3I, LC3II increased to varying degrees ($P < 0.05$, $P < 0.01$), which was positively correlated with the dose. Conclusion: By inhibiting the activation of intestinal NLRP3 inflammasomes, rhubarb activates the PINK1/Parkin pathway and increases the degree of mitophagy, thereby reducing the production of systemic inflammatory factors and protecting the intestinal structure.

Key words Rhubarb; Mitophagy; PINK1/Parkin pathway; NLRP3; Sepsis; Intestinal structure