

基于AIM2焦亡途径探讨化瘀解毒方减轻慢性肾脏病炎性损伤的作用机制^Δ

薛瑾环^{1*}, 武子雯¹, 杨帆¹, 楼芸芸¹, 丁英钧¹, 肖郁朋², 刘胤慧¹, 梁文杰^{1#} (1. 河北中医药大学河北省中西医结合肝病证研究重点实验室, 石家庄 050200; 2. 河北省儿童医院中医儿科, 石家庄 050031)

中图分类号 R965; R25 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)21-2638-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.21.04



摘要 目的 探讨化瘀解毒方减轻慢性肾脏病(CKD)炎性损伤的作用机制。方法 将50只雄性SD大鼠随机分为假手术组(10只)、造模组(40只),后者采用单侧输尿管梗阻手术复制CKD模型。造模成功的大鼠随机分为模型组、艾沙利酮组(阳性对照)和中药低、高剂量组,每组10只。艾沙利酮组给予艾沙利酮1 mg/kg,中药低、高剂量组分别给予化瘀解毒方13.7、27.4 g/kg,假手术组和模型组给予等体积生理盐水,连续给药14 d。采用苏木精-伊红、Masson染色观察大鼠肾组织病理形态改变。常规生化法检测血清尿素(SUr)、血清肌酐(SCr)、血清丙二醛(MDA)及超氧化物歧化酶(SOD)水平;酶联免疫吸附试验检测血清白细胞介素1 β (IL-1 β)、IL-6及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平。免疫组化、Western blot法检测肾组织中过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子1 α (PGC-1 α)、线粒体转录因子A(TFAM)、黑色素瘤缺乏因子2(AIM2)、胱天蛋白酶1(caspase-1)、消皮素D(GSDMD)、IL-1 β 、IL-18的蛋白表达;实时荧光定量PCR检测AIM2的mRNA表达。结果 与假手术组比较,模型组大鼠肾组织出现肾小球变形破坏、肾小管严重扩张、蓝色纤维蛋白沉积增多等病理改变;SUr、SCr、MDA、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平,AIM2、GSDMD、caspase-1、IL-1 β 、IL-18蛋白表达,AIM2 mRNA表达均显著升高或上调($P < 0.01$);SOD水平,PGC-1 α 、TFAM蛋白表达均显著降低或下调($P < 0.01$)。与模型组比较,各治疗组大鼠上述症状和多数指标均有所改善。结论 化瘀解毒方可能通过调控AIM2焦亡途径改善肾功能,减轻肾脏炎性损伤和细胞焦亡,发挥肾脏保护作用。

关键词 慢性肾脏病;化瘀解毒方;黑色素瘤缺乏因子2;焦亡途径

Mechanism of Huayu jiedu formula in alleviating inflammatory injury in chronic kidney disease based on AIM2 pyroptosis pathway

XUE Jinhuan¹, WU Ziwen¹, YANG Fan¹, LOU Yunyun¹, DING Yingjun¹, XIAO Yupeng², LIU Xianhui¹, LIANG Wenjie¹ (1. Hebei Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Hepatorenal Diseases, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China; 2. Dept. of Traditional Chinese Medicine Pediatrics, Hebei Children's Hospital, Shijiazhuang 050031, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the mechanism of Huayu jiedu formula in regulating inflammatory injury in chronic kidney disease (CKD). **METHODS** Fifty male SD rats were randomly divided into a sham surgery group (10 rats) and a modeling group (40 rats). The CKD model was replicated in the modeling group by unilateral ureteral obstruction surgery. After successful modeling, the rats were randomly divided into model group, esaxerenone group (positive control), and TCM low- and high-dose groups, with 10 rats in each group. The Esaxerenone group was given 1 mg/kg of esaxerenone, while the TCM low- and high-dose groups were given 13.7 and 27.4 g/kg of Huayu jiedu formula respectively, the sham surgery group and model group were given an equal volume of physiological saline, all groups were intervened continuously for 14 days. Hematoxylin eosin and Masson staining were used to observe the pathological changes in rat kidney tissue. Conventional biochemical methods were used to detect serum urea (SUr), serum creatinine (SCr), malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD) levels; enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the levels of serum interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, and tumor necrosis factor- α (TNF- α); immunohistochemistry and Western blot were used to detect the protein expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α), mitochondrial transcription factor A (TFAM), absent in melanoma 2 (AIM2), caspase-1, gasdermin D (GSDMD), IL-1 β and IL-18 in renal tissue; real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the mRNA expression of AIM2. **RESULTS** Compared with the sham surgery group, the renal tissue of the model group showed pathological changes such as glomerular deformation and destruction, severe tubular dilation, and increased deposition

^Δ 基金项目 河北省自然科学基金项目(No.H2022423356); 国家自然科学基金项目(No.82305121)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向: 中医药防治慢性肾脏病的机制。E-mail: YJS20232070@hebcm.edu.cn

通信作者 教授, 博士生导师, 博士。研究方向: 无菌性炎症机制及中医药调控。E-mail: liangwenjie@hebcm.edu.cn

of blue fibrin; the levels of SUr, SCr, MDA, IL-1 β , IL-6, TNF- α , the protein expression of AIM2, GSDMD, caspase-1, IL-1 β , IL-18, and the mRNA expression of AIM2 were significantly increased or up-regulated ($P < 0.01$); the levels of SOD, the protein expression of PGC-1 α , TFAM were significantly reduced or down-regulated ($P < 0.01$). Compared with the model group, all treatment groups showed improvement in the above symptoms and most indicators in rats. **CONCLUSIONS** Huayu jiedu formula may improve renal function, alleviate renal inflammatory damage and pyroptosis, and exert renal protective effects by regulating the AIM2 pyroptosis pathway.

KEYWORDS chronic kidney disease; Huayu jiedu formula; absent in melanoma 2; pyroptosis pathway

慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)是全球范围内的重要公共卫生问题,在其复杂的病理进程中,炎症损伤被视为核心环节,它驱动着氧化应激、线粒体功能障碍,并最终导致肾纤维化的发生^[1]。在成年糖尿病和高血压患者中,CKD相关的高发病率和死亡率高与持续的炎症损伤密切相关^[2]。研究表明,线粒体功能障碍和炎症小体激活是驱动肾脏炎症损伤的两大核心机制^[3-5]。炎症小体作为细胞焦亡的核心调控分子,其异常活化与肾脏损伤密切相关^[6]。本团队前期研究发现,核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)炎症小体介导的细胞焦亡在梗阻性肾病炎症损伤中扮演着重要角色^[7]。黑色素瘤缺乏因子2(absent in melanoma 2, AIM2)是继NLRP3之后发现的又一个炎症小体分子,本团队前期研究已证明,AIM2在糖尿病所致CKD模型动物肾脏中表达上调^[8-9]。然而,AIM2如何通过识别细胞损伤释放的DNA来激活细胞焦亡,进而推动CKD进展,其具体作用机制目前仍不明确。

化癥解毒方是著名医家赵玉庸教授的经验方,本方共计11味中药,是在前期7味化癥涤痰通络方(地龙、僵蚕、醋鳖甲、赤芍、丹参、黄芪、大黄)的基础上,进一步加入乌梢蛇、黄芩、金银花、蒲公英4味药化裁而成,其主治功能精准对应CKD中“虚”“癥”“毒”并存的核心病机。方中黄芪益气扶正;地龙、僵蚕、赤芍、丹参、醋鳖甲、乌梢蛇活血通络;黄芩、金银花、蒲公英清热解毒,大黄通腑泻浊,协同清除病理产物。本团队前期研究已证明化癥解毒方可抑制NLRP3炎症小体活化所导致的细胞焦亡以及抑制白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)的释放^[10]。本实验采用单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)方式复制CKD模型^[11-13],基于AIM2焦亡途径探讨化癥解毒方减轻CKD炎症损伤的作用机制,以期为其临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有ECLIPSE Ci-L plus型正置显微镜(日本Nikon公司)、PowerPac™ Universal Power Supply型电泳仪和Trans-Blot SD型半干转膜仪(美国Bio-Rad公司)、WIX-miniPRO4型垂直电泳槽[韦克斯科

技(北京)有限公司]、Touch Imager型接触式化学发光成像仪(上海易亨特光电技术有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

化癥解毒中药全颗粒制剂[化癥解毒方中药汤剂的颗粒形式,包括黄芪8 g(相当于生药20 g)、醋鳖甲1.67 g(相当于生药10 g)、僵蚕1 g(相当于生药10 g)、乌梢蛇1.6 g(相当于生药10 g)、地龙2.5 g(相当于生药10 g)、赤芍3.03 g(相当于生药10 g)、丹参10 g(相当于生药20 g)、黄芩4.55 g(相当于生药10 g)、金银花3.33 g(相当于生药10 g)、蒲公英2.7 g(相当于生药10 g)、大黄1.5 g(相当于生药6 g)]购自石家庄以岭药业股份有限公司;艾沙利酮试剂(批号GC19143)购自美国Glpbio公司;鼠源过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α)抗体、鼠源 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(批号分别为66369-1-Ig、66009-1-Ig)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;兔源线粒体转录因子A(mitochondrial transcription factor A, TFAM)抗体、兔源胱天蛋白酶1(caspase-1)抗体、兔源IL-1 β 抗体(批号分别为1065876-16、ab179515、ab254360)均购自美国Abcam公司;兔源AIM2抗体、山羊抗兔二抗(批号分别为YT0151、RS0002)均购自美国Immunoway公司;兔源消皮素D(gasdermin D, GSDMD)抗体(批号AF4012)购自江苏亲科生物研究中心有限公司;鼠源IL-18抗体(批号M027287F)购自艾比玛特生物医药(上海)有限公司;山羊抗鼠二抗(批号H6162S)购自苏州优逸兰迪生物科技有限公司;免疫组化小鼠/兔试剂盒(批号246NA1013)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;血清肌酐(serum creatinine, SCr)、血清尿素(serum urea, SUr)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-1 β 、IL-6酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号分别为C011-2-1、C013-2-1、D731168、D731007、D731010、A003-1、A001-3)均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;苏木精-伊红(HE)染液、Masson三色染色液(批号分别为CR2403091、CR2403005)均购自武汉塞维尔生物科技有限公司;苏木精染液(批号20220622)购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 实验动物

SPF级健康雄性6周龄SD大鼠50只[体质量(200±10)g],购自辽宁长生生物技术股份有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(辽)2020-0001。大鼠饲养于河北中医药大学河北省中西医结合肝肾病证研究重点实验室,在室温25℃、12 h/12 h光暗周期条件下自由饮水、摄食,适应性喂养1周后用于实验。动物实验经河北中医药大学伦理委员会批准,审批号为DWLL202203126。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

将50只SD大鼠按照随机数表法分为假手术组($n=10$)和造模组($n=40$)。造模组参考文献[12]的方法构建CKD大鼠模型,具体如下:持续吸入异氟烷麻醉大鼠后,在大鼠左侧中下腹部切开皮肤,分离暴露左肾,游离左侧近端输尿管,分别在输尿管上1/3处和中1/3处用4-0手术线结扎,切断输尿管,逐层缝合皮肤。假手术组大鼠仅切开左侧腹部皮肤,暴露且游离左侧输尿管,不做结扎或切断处理。所有造模组大鼠均造模成功,采用随机数字表法将造模组大鼠分为模型组、艾沙利酮组(阳性对照)和中药低、高剂量组,每组10只。中药低、高剂量组别大鼠灌胃化痰解毒方13.7、27.4 g/kg(按生药量计),艾沙利酮组大鼠灌胃艾沙利酮1 mg/kg^[14-15],假手术组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水。所有大鼠每天灌胃1次,连续14 d。经灌胃及取材过程,中药低、高剂量组分别损失2、1只大鼠,最终分别纳入8、9只大鼠进行后续实验。

2.2 大鼠左侧肾脏质量的称定与样本取材

灌胃14 d后麻醉处死大鼠,取出左侧肾脏并称定其质量。随后将1/2肾组织置于4%多聚甲醛溶液中固定,用于后期病理染色;剩余肾组织迅速置于-80℃冰箱中冻存,用于提取组织蛋白及RNA。

2.3 大鼠血清肾功能及氧化应激指标检测

采用常规生化法检测。在灌胃第13天晚上对大鼠进行断食不断水处理,使大鼠空腹12 h后,异氟烷吸入麻醉,从腹主动脉采血,置于10 mL离心管中,室温静置2 h后,在4℃以12 000 r/min离心10 min,取部分上清液,根据试剂盒说明书检测SCr、SUr、MDA、SOD水平。

2.4 大鼠肾组织病理形态变化观察

取“2.2”项下用4%多聚甲醛溶液中固定的肾脏标本,经梯度脱水、透明、石蜡包埋后切片(厚度为4 μm),经二甲苯脱蜡,梯度浓度乙醇脱蜡后,进行HE染色和Masson染色,再次漂洗脱水透明后进行封片,于显微镜下观察大鼠肾组织病理形态变化。以HE染色法观察大鼠肾组织形态结构以及肾小管的扩张状态;以Masson染色法观察大鼠肾组织纤维化程度以及胶原纤维的分布情况,蓝色纤维蛋白表示胶原的分布。

2.5 大鼠血清炎症因子检测

取“2.3”项下剩余血清,置于4℃冰箱使其缓慢解冻,按照试剂盒说明书检测血清TNF-α、IL-1β、IL-6水平。

2.6 大鼠肾组织AIM2焦亡途径相关蛋白表达检测

2.6.1 免疫组化法

取“2.2”项下置于-80℃冰箱中冻存的肾组织,进行石蜡包埋切片,并将切片在40℃的温水中展平,并用防脱玻片捞片,将其置于60℃的烤箱中烘烤2~4 h;将切片置于二甲苯I、二甲苯II、无水乙醇以及95%和75%乙醇进行脱蜡,采用枸橼酸钠缓冲液进行抗原修复;经磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤和内源性过氧化物酶阻断之后,分别加入PGC-1α、TFAM、AIM2、GSDMD、caspase-1、IL-1β、IL-18一抗(稀释度分别为1:1 000、1:100、1:125、1:200、1:150、1:100、1:100),4℃孵育过夜;第2天加入反应增强液,37℃水温孵育30 min后用PBS清洗;之后滴加二抗(稀释度为1:200),37℃孵育1 h,PBS清洗,采用新鲜配比的DAB染色液进行组织着色;显色后,苏木精染核,脱水、透明,树胶封片,于显微镜下观察并拍照。通过Image J软件分析单位面积内阳性(黄褐色沉淀)染色结果并进行分析,计算蛋白阳性表达面积百分比(阳性染色区域面积/整个视野面积)。

2.6.2 Western blot法

取“2.2”项下置于-80℃冰箱中冻存的肾组织30 mg置于冰上,加入RIPA裂解液后进行研磨,在4℃以12 000 r/min离心10 min,提取上清液,按照BCA试剂盒测定蛋白浓度后,将其煮沸使其变性。取对应比例的蛋白样品,经10%、12%聚丙烯酰胺凝胶电泳2 h,采用半干转法将凝胶上的目的蛋白条带转移至聚偏二氟乙烯膜上,5%~8%脱脂奶粉室温封闭2 h,TBST洗膜3遍;分别滴加PGC-1α、TFAM、AIM2、GSDMD、caspase-1、IL-1β、IL-18、β-actin一抗(稀释度分别为1:5 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:4 000),4℃孵育过夜。次日,取出聚偏二氟乙烯膜,TBST洗膜3遍,室温孵育相应二抗(稀释度为1:5 000);清洗后,加入超敏性ECL发光液使各组蛋白条带显色。采用Image J软件分析,以目标蛋白与内参蛋白(β-actin)条带灰度值的比值表示目标蛋白的相对表达量。上述试验重复3次。

2.7 大鼠肾组织中AIM2 mRNA的表达检测

采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测。取-80℃冰箱中冻存的肾组织,于液氮环境中研磨,转移至含RNA裂解液的离心管中,加入无水乙醇混匀,在4℃以10 000 r/min离心10 min,转移上清液至新管;加入50 μL新鲜配制的DNase I孵育液,室温静置15 min,加入600 μL RNA洗液,室温以10 000 r/min离心1 min,弃上清液。使用逆转录试剂盒进行cDNA合成,95℃10

min, 44个循环反应: 95 °C 15 s, 60 °C 60 s。以 β -actin为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算AIM2 mRNA的相对表达量。qRT-PCR引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物序列及产物长度见表1。

表1 qRT-PCR引物序列及产物长度

基因	引物序列(5'-3')	产物长度/bp
AIM2	上游: CCACCTCATGGACCTGTATCAT	146
	下游: TCACCTACTTGATGCCACACAG	
β -actin	上游: GCAGGAGTACGATGAGTCCG	74
	下游: ACGCAGCTCAGTAACAGTCC	

2.8 统计学处理

采用GraphPad Prism 9.5软件进行数据分析。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, 组间进一步两两比较采用Tukey法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 各组大鼠左侧肾脏质量比较

假手术组、模型组、中药低剂量组、中药高剂量组、艾沙利酮组大鼠左侧肾脏质量分别为(1.12 ± 0.09)、(2.11 ± 0.29)、(1.87 ± 0.12)、(1.77 ± 0.17)、(1.70 ± 0.20) g。与假手术组比较, 模型组大鼠左侧肾脏质量显著增加($P < 0.01$); 与模型组比较, 中药高剂量组、艾沙利酮组大鼠左侧肾脏质量显著降低($P < 0.01$)。

3.2 各组大鼠血清肾功能及氧化应激指标比较

与假手术组比较, 模型组大鼠血清中SUr、SCr、MDA水平均显著升高, SOD水平显著降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 中药高剂量组、艾沙利酮组大鼠血清中SUr、SCr、MDA水平均显著降低, SOD水平显著升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 中药低剂量组大鼠血清中SUr水平显著降低($P < 0.05$)。结果见表2。

3.3 各组大鼠肾组织病理形态变化比较

HE染色结果显示, 与假手术组比较, 模型组大鼠肾脏可见肾小管严重扩张, 肾小球变形破坏; 与模型组比较, 中药高剂量组和艾沙利酮组大鼠肾脏结构损伤情况有所缓解。Masson染色结果显示, 与假手术组比较, 模型组大鼠蓝色纤维蛋白沉积增多, 主要表达在肾小球及

表2 各组大鼠血清中SUr、SCr、MDA、SOD水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	SUr/(mmol/L)	SCr/(μ mol/L)	MDA/(nmol/mL)	SOD/(U/mL)
假手术组	10	4.91 ± 0.62	77.85 ± 4.34	6.66 ± 0.60	211.8 ± 24.89
模型组	10	6.98 ± 0.48 ^a	87.83 ± 4.98 ^a	8.18 ± 0.41 ^a	157.8 ± 16.77 ^b
中药低剂量组	8	6.46 ± 0.40 ^b	84.96 ± 5.59	7.54 ± 0.55	176.7 ± 26.92
中药高剂量组	9	6.28 ± 0.39 ^b	79.31 ± 5.11 ^c	7.43 ± 0.57 ^b	201.6 ± 18.69 ^c
艾沙利酮组	10	5.98 ± 0.58 ^c	78.20 ± 7.76 ^c	7.38 ± 0.60 ^b	209.6 ± 25.43 ^c

a: 与假手术组比较, $P < 0.01$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

肾间质; 与模型组比较, 中药低、高剂量组和艾沙利酮组大鼠蓝色纤维蛋白沉积减少。结果见图1。

3.4 各组大鼠血清炎症因子水平比较

与假手术组比较, 模型组大鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平均显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 中药高剂量组、艾沙利酮组大鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平均显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 中药低剂量组大鼠血清中TNF- α 水平显著降低($P < 0.05$)。结果见表3。

表3 各组大鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平比较($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

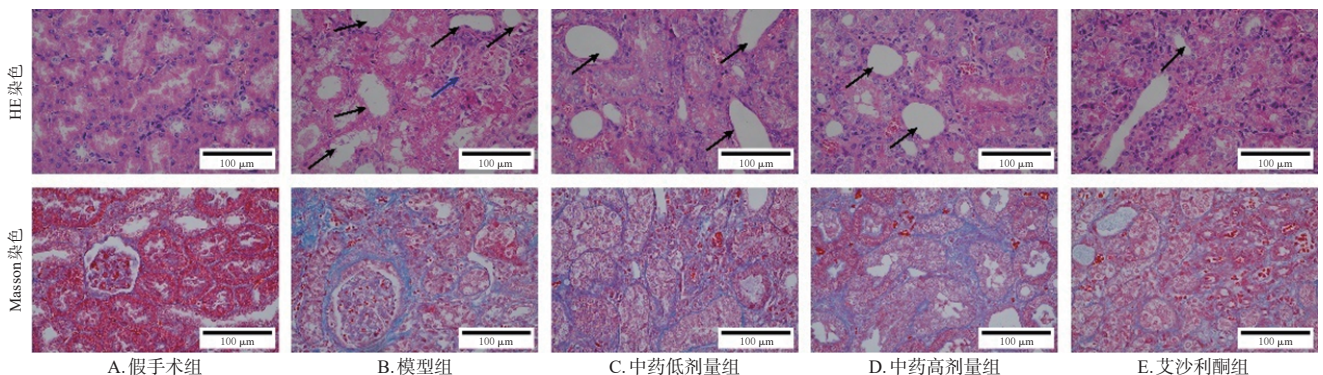
组别	只数	TNF- α	IL-1 β	IL-6
假手术组	10	11.37 ± 1.71	14.97 ± 4.46	15.54 ± 3.24
模型组	10	15.79 ± 2.07 ^a	21.42 ± 4.48 ^a	19.86 ± 1.82 ^a
中药低剂量组	8	13.35 ± 1.14 ^b	16.90 ± 2.24	16.72 ± 3.86
中药高剂量组	9	12.40 ± 0.94 ^b	16.80 ± 2.61 ^b	15.95 ± 1.80 ^b
艾沙利酮组	10	11.88 ± 1.67 ^c	16.63 ± 2.23 ^b	15.67 ± 2.57 ^b

a: 与假手术组比较, $P < 0.01$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

3.5 各组大鼠肾组织AIM2焦亡途径相关蛋白表达比较

3.5.1 免疫组化法检测结果

免疫组化染色结果(图2)显示, 假手术组大鼠肾小管上皮细胞胞质及肾小球中, PGC-1 α 、TFAM蛋白阳性表达区域呈明显黄褐色; 同时, 其肾小管上皮细胞质中AIM2、caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18蛋白阳性表达面积处于较低水平。与假手术组比较, 模型组大鼠PGC-1 α 、TFAM蛋白阳性表达面积百分比均显著减少($P <$



注: 黑色箭头所指处为扩张的肾小管; 蓝色箭头所指处为变形的肾小球。

图1 各组大鼠肾组织病理形态观察显微图

0.01), AIM2、caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18 蛋白阳性表达面积百分比均显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,中药高剂量组、艾沙利酮组大鼠 PGC-1 α 、TFAM 蛋白阳性表达面积百分比均显著增加($P < 0.01$),同时 AIM2、caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18 蛋白阳性表达面积百分比均显著减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);中药低剂量组大鼠 PGC-1 α 蛋白阳性表达面积百分比显著增加($P < 0.05$), AIM2、GSDMD、IL-18 蛋白阳性表达面积百分比均显著减少($P < 0.01$)。结果见表 4。

3.5.2 Western blot 法检测结果

与假手术组比较,模型组大鼠肾组织 PGC-1 α 、TFAM 蛋白相对表达量均显著降低($P < 0.01$), AIM2、caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18 蛋白相对表达量均显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,中药高剂量组、艾

表 4 各组大鼠肾组织 AIM2 焦亡途径相关蛋白阳性表达面积百分比比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	只数	PGC-1 α	TFAM	AIM2	caspase-1	GSDMD	IL-1 β	IL-18
假手术组	10	63.37 \pm 3.73	48.72 \pm 0.55	9.73 \pm 1.13	23.42 \pm 2.96	15.34 \pm 3.36	17.19 \pm 7.00	26.46 \pm 0.86
模型组	10	14.15 \pm 2.14 ^a	30.77 \pm 4.41 ^a	60.12 \pm 2.15 ^c	43.30 \pm 4.14 ^a	31.33 \pm 1.92 ^a	45.94 \pm 1.56 ^a	47.92 \pm 0.53 ^c
中药低剂量组	8	24.52 \pm 1.86 ^b	36.61 \pm 1.28	33.43 \pm 4.13 ^c	34.36 \pm 3.93	21.6 \pm 1.61 ^c	40.42 \pm 4.86	37.49 \pm 1.47 ^c
中药高剂量组	9	30.90 \pm 2.79 ^b	42.22 \pm 4.07 ^b	25.91 \pm 3.38 ^c	30.00 \pm 4.33 ^c	19.72 \pm 2.81 ^c	34.04 \pm 1.54 ^a	34.01 \pm 1.23 ^c
艾沙利酮组	10	42.73 \pm 3.81 ^b	44.86 \pm 2.31 ^b	14.03 \pm 2.49 ^c	23.12 \pm 0.92 ^c	19.19 \pm 2.60 ^c	28.30 \pm 4.02 ^a	29.35 \pm 2.41 ^c

a: 与假手术组比较, $P < 0.01$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

沙利酮组大鼠肾组织 PGC-1 α 、TFAM 蛋白相对表达量均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), AIM2、caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18 蛋白相对表达量均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);中药低剂量组大鼠肾组织 caspase-1 蛋白相对表达量均显著降低($P < 0.05$)。见表 5、图 3。

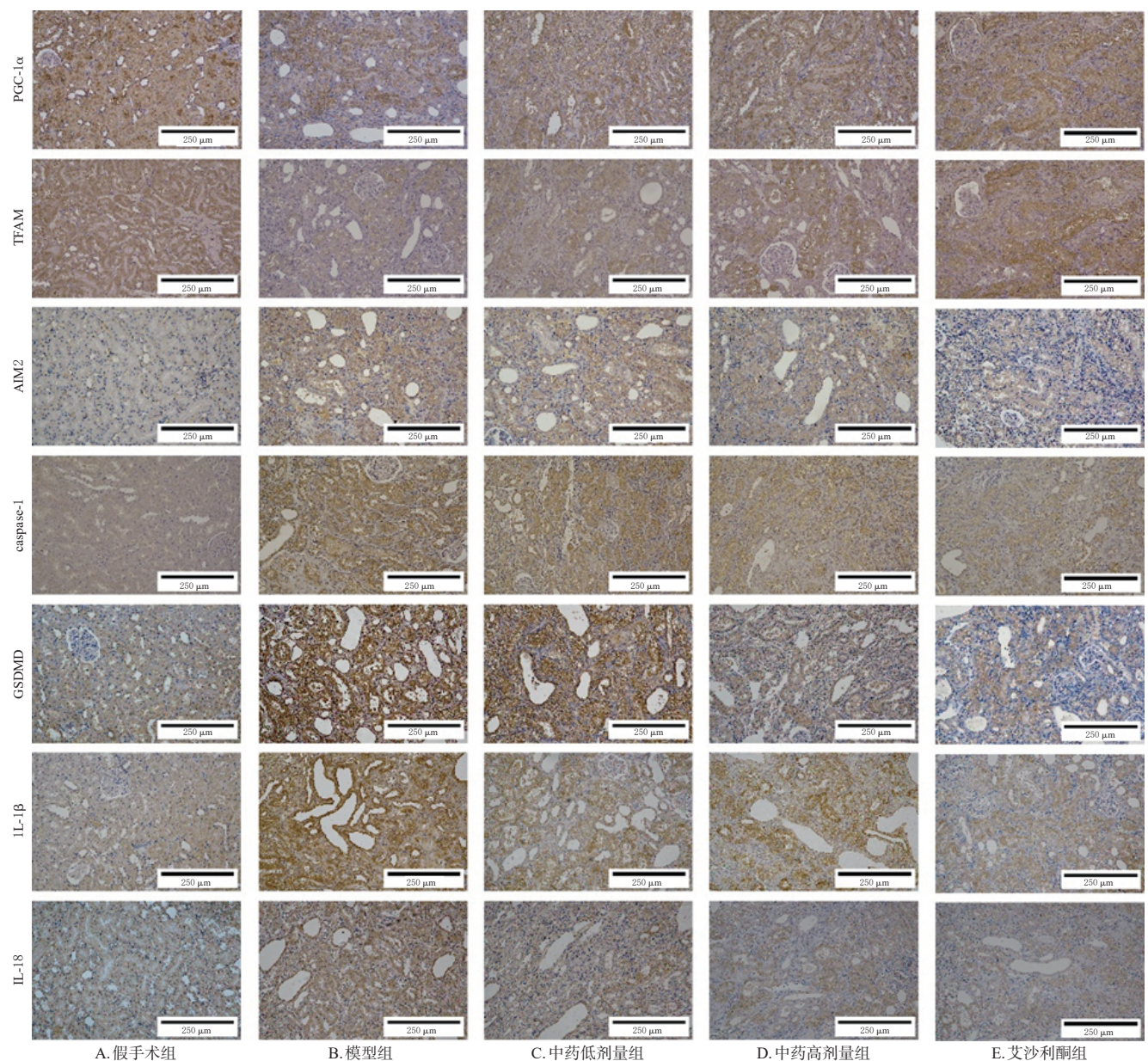
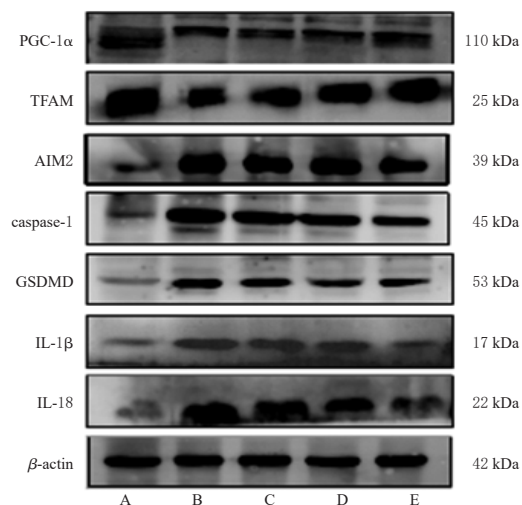


图 2 各组大鼠肾组织 AIM2 焦亡途径相关蛋白表达免疫组化染色结果

表5 各组大鼠肾组织 AIM2 焦亡途径相关蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	PGC-1 α / β -actin	TFAM/ β -actin	AIM2/ β -actin	caspase-1/ β -actin	GSDMD/ β -actin	IL-1 β / β -actin	IL-18/ β -actin
假手术组	10	1.00 \pm 0.14	1.00 \pm 0.04	1.00 \pm 0.16	1.00 \pm 0.07	1.00 \pm 0.18	1.00 \pm 0.17	1.00 \pm 0.51
模型组	10	0.55 \pm 0.03 ^a	0.44 \pm 0.06 ^a	2.07 \pm 0.22 ^a	2.02 \pm 0.16 ^a	1.50 \pm 0.05 ^a	2.40 \pm 0.40 ^a	3.49 \pm 0.06 ^a
中药低剂量组	8	0.73 \pm 0.04	0.57 \pm 0.03	1.91 \pm 0.26	1.55 \pm 0.12 ^b	1.30 \pm 0.07	2.12 \pm 0.24	2.70 \pm 0.24
中药高剂量组	9	0.79 \pm 0.08 ^b	0.69 \pm 0.11 ^b	1.56 \pm 0.13 ^b	1.40 \pm 0.24 ^c	1.17 \pm 0.11 ^b	1.66 \pm 0.25 ^b	2.30 \pm 0.45 ^b
艾沙利酮组	10	0.90 \pm 0.07 ^c	0.78 \pm 0.16 ^c	1.37 \pm 0.09 ^c	1.20 \pm 0.17 ^c	1.08 \pm 0.04 ^c	1.34 \pm 0.20 ^c	1.94 \pm 0.41 ^c

a:与假手术组比较, $P<0.01$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与模型组比较, $P<0.01$ 。



A:假手术组;B:模型组;C:中药低剂量组;D:中药高剂量组;E:艾沙利酮组。

图3 各组大鼠肾组织 AIM2 焦亡途径相关蛋白表达的电泳图

3.6 各组大鼠肾组织 AIM2 mRNA 表达比较

假手术组、模型组、中药低剂量组、中药高剂量组、艾沙利酮组大鼠肾组织 AIM2 mRNA 相对表达量分别为 1.04 ± 0.30 、 3.17 ± 1.29 、 1.77 ± 1.09 、 1.50 ± 0.61 、 1.38 ± 0.29 。与假手术组比较,模型组大鼠肾组织 AIM2 mRNA 相对表达量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,中药低、高剂量组和艾沙利酮组大鼠肾组织 AIM2 mRNA 相对表达量均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

4 讨论

CKD 的特征之一是肾脏进行性炎症损伤^[16]。CKD 肾组织活性氧的升高,导致线粒体生物合成受损,线粒体 DNA 释放至胞质,胞质中累积的线粒体 DNA 可作为损伤相关分子模式,被模式识别受体识别^[17-18]。AIM2 是双链 DNA (dsDNA) 的感受器^[19],被线粒体 DNA 激活后的 AIM2 炎症小体可切割 GSDMD,诱导细胞焦亡,释放 IL-1 β 、IL-18 等促炎因子,加剧肾间质炎症和纤维化,促进肾小管上皮细胞焦亡和炎症反应^[20]。本团队前期研究发现,AIM2 炎症小体在糖尿病肾病金黄地鼠肾脏表达上调,触发细胞焦亡过程,最终导致肾脏炎症损伤^[8]。Zhen 等^[21]研究发现,在感染乙型肝炎病毒的人肾小球系膜细胞中,通过小干扰 RNA 敲低 AIM2 可导致 caspase-1、IL-1 β 、IL-18 表达下调。Komada 等^[22]在 CKD 小鼠中观察到 AIM2 炎症小体激活,其活化水平与肾小

管损伤和纤维化程度呈正相关。

本实验着重探索 AIM2 焦亡途径在 CKD 大鼠肾脏的表达以及化瘀解毒方对此的调控作用机制。化瘀解毒方是由化瘀涤痰通络方加味而来,具有活血化瘀、解毒通络、益气扶正的功效。本团队前期研究证实,化瘀解毒方具有较好的临床疗效,并可调控 NLRP3 炎症小体,抑制细胞焦亡,减轻 CKD 大鼠肾组织的炎症损伤,发挥肾脏保护作用^[10,13]。本实验结果表明,CKD 大鼠肾脏中 AIM2 表达显著升高,促进 AIM2 炎症小体活化,caspase-1 表达上调,引发细胞焦亡;同时 caspase-1 裂解促进 IL-1 β 、IL-18 成熟,加速炎症因子释放,加重炎症损伤。本实验结果同时显示,化瘀解毒方可抑制 CKD 大鼠肾脏 AIM2 炎症小体表达,下调 caspase-1 表达,进而抑制 GSDMD 生成,减少 IL-1 β 和 IL-18 等炎症因子的成熟与释放。可见该方能减轻肾脏炎症性损伤、保护肾功能、延缓疾病进展,其机制可能与抑制 AIM2 炎症小体介导的细胞焦亡有关。

本实验进一步发现,化瘀解毒方可上调 CKD 大鼠肾脏 PGC-1 α 及 TFAM 表达。PGC-1 α 是线粒体生物合成的关键调控因子,通过促进 TFAM 表达,维持线粒体 DNA 的稳定性和氧化磷酸化功能,而 TFAM 是维持线粒体基因组完整性的关键因子^[23-24]。本实验发现,CKD 大鼠肾组织中 PGC-1 α 及其下游靶分子 TFAM 的表达显著降低,说明线粒体功能障碍和线粒体 DNA 稳定性受损,线粒体 DNA 释放可激活 AIM2 分子。这与以往研究一致,即临床观察与动物模型研究证实,在急性肾损伤以及包括糖尿病肾病在内的多种 CKD 中,普遍存在 PGC-1 α 蛋白表达下调及其下游转录调控靶点的表达异常,此外,PGC-1 α 的缺失与特定 CKD 亚型的易感性呈显著正相关,提示其可能在肾损伤进展中发挥关键调控作用^[23]。化瘀解毒方减轻 CKD 大鼠氧化应激损伤,上调肾脏 PGC-1 α 和 TFAM 表达,维持 PGC-1 α /TFAM 信号通路的正常功能,减少线粒体损伤和线粒体 DNA 异常释放,从而抑制 AIM2 介导的细胞焦亡^[19-20]。

综上所述,AIM2 焦亡途径是 CKD 大鼠肾脏炎症损伤的重要机制,化瘀解毒方可能通过直接靶向 AIM2 炎症小体,抑制其介导的焦亡途径,从而改善肾功能,减轻肾脏炎症性损伤和细胞焦亡,发挥肾脏保护作用。但化瘀解毒方作为一种复杂的中药复方,其具体哪些活性成分是抑制 AIM2 焦亡途径的关键物质尚未明确,未来研究

将聚焦于分离鉴定化痰解毒方的核心有效成分,并利用体外模型,结合基因敲除、过表达等技术,在离体水平进一步确证该方及其活性成分对 AIM2 炎症小体介导的细胞焦亡的具体作用机制和靶点。

参考文献

- [1] HO H J, SHIRAKAWA H. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in chronic kidney disease[J]. *Cells*, 2022, 12(1):88.
- [2] KALANTAR-ZADEH K, JAFAR T H, NITSCH D, et al. Chronic kidney disease[J]. *Lancet*, 2021, 398 (10302): 786-802.
- [3] GUO H L, BI X, ZHOU P, et al. NLRP3 deficiency attenuates renal fibrosis and ameliorates mitochondrial dysfunction in a mouse unilateral ureteral obstruction model of chronic kidney disease[J]. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017:8316560.
- [4] BHARGAVA P, SCHNELLMANN R G. Mitochondrial energetics in the kidney[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2017, 13 (10):629-646.
- [5] TIRICHEN H, YAIGOUB H, XU W W, et al. Mitochondrial reactive oxygen species and their contribution in chronic kidney disease progression through oxidative stress[J]. *Front Physiol*, 2021, 12:627837.
- [6] POLI G, FABI C, BELLET M M, et al. Epigenetic mechanisms of inflammasome regulation[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(16):5758.
- [7] 熊云昭,王萱,常奕,等.化痰解毒中药抑制梗阻性肾病巨噬细胞浸润减轻炎性损伤的作用[J].*天然产物研究与开发*, 2019, 31(2):5-10.
- [8] 肖郁朋,丁英钧,丁宝珠,等.肾消解毒通络方对糖尿病肾病金黄地鼠肾脏 AIM2 介导细胞焦亡的影响[J].*中成药*, 2024, 46(11):3603-3612.
- [9] 侯树杰,刘坤,冯亚萌,等.肾消解毒通络方含药血清调控 AIM2 炎症小体表达抑制高糖诱导的肾小管上皮细胞焦亡的作用机制[J].*时珍国医国药*, 2024, 35(12):2763-2770.
- [10] 梁文杰,马雪莲,王萱,等.化痰解毒方对梗阻性肾病大鼠肾脏 NLRP3、Caspase1、IL-1 β 表达的影响[J].*中国中西医结合杂志*, 2017, 37(4):470-475.
- [11] ZHANG Z H, HE J Q, QIN W W, et al. Biomarkers of obstructive nephropathy using a metabolomics approach in rat[J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 296:229-239.
- [12] MARTÍNEZ-KLIMOVA E, APARICIO-TREJO O E, TAPIA E, et al. Unilateral ureteral obstruction as a model to investigate fibrosis-attenuating treatments[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(4):141.
- [13] XIONG Y Z, CHANG Y, HAO J, et al. Eplerenone attenuates fibrosis in the contralateral kidney of UUO rats by preventing macrophage-to-myofibroblast transition[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:620433.
- [14] 梁文杰.化痰解毒中药调控 NLRP3 炎症小体信号通路抑制细胞焦亡(Pyroptosis)的实验研究[D].石家庄:河北医科大学, 2017.
- [15] SHIKATA K, ITO S, KASHIHARA N, et al. Reduction in the magnitude of serum potassium elevation in combination therapy with esaxerenone (CS-3150) and sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor in patients with diabetic kidney disease: subanalysis of two phase III studies[J]. *J Diabetes Investig*, 2022, 13(7):1190-1202.
- [16] GUO J X, LIU Z, WANG P J, et al. Global, regional, and national burden inequality of chronic kidney disease, 1990-2021: a systematic analysis for the global burden of disease study 2021[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2025, 11: 1501175.
- [17] FENG J, CHEN Z W, LIANG W, et al. Roles of mitochondrial DNA damage in kidney diseases: a new biomarker[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(23):15166.
- [18] JIN L N, YU B F, ARMANDO I, et al. Mitochondrial DNA-mediated inflammation in acute kidney injury and chronic kidney disease[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021:9985603.
- [19] YANG K, WANG X, PAN H Y, et al. The roles of AIM2 in neurodegenerative diseases: insights and therapeutic implications[J]. *Front Immunol*, 2024, 15:1441385.
- [20] LI L A, ZHANG L, CAI Y T, et al. DNA damage-induced AIM2 pyroptosis in high glucose-induced proximal tubular epithelial cell[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2024, 12: 1457369.
- [21] ZHEN J H, ZHANG L, PAN J C, et al. AIM2 mediates inflammation-associated renal damage in hepatitis B virus-associated glomerulonephritis by regulating caspase-1, IL-1 β , and IL-18[J]. *Mediators Inflamm*, 2014, 2014:190860.
- [22] KOMADA T, CHUNG H, LAU A, et al. Macrophage uptake of necrotic cell DNA activates the AIM2 inflammasome to regulate a proinflammatory phenotype in CKD[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2018, 29(4):1165-1181.
- [23] FONTECHA-BARRIUSO M, MARTIN-SANCHEZ D, MARTINEZ-MORENO J M, et al. The role of PGC-1 α and mitochondrial biogenesis in kidney diseases[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(2):347.
- [24] XIE H Y, YANG N H, LU L, et al. Uremic toxin receptor AhR facilitates renal senescence and fibrosis via suppressing mitochondrial biogenesis[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(33):e2402066.

(收稿日期:2025-08-11 修回日期:2025-10-18)

(编辑:舒安琴)