DOI:10.16016/j.2097-0927.202307058

柚皮苷通过 P2X7 受体抑制非经典焦亡减轻腹腔感染小鼠肠黏膜损伤

马 源[1],段倩雯[1],董旭鹏[1],刘 澈[1],张 铭[1],马玉清[2] 730000 兰州,兰州大学:第一临床医学院[1],第一医院麻醉科[2]

[摘要] **目的** 探究柚皮苷(naringin, Ng)在腹腔感染(intra-abdominal infection, IAI)小鼠肠黏膜损伤中的治疗作用及其机制。**方法** 腹腔注射脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)建立 IAI 小鼠肠黏膜损伤模型。64 只健康雄性小鼠采用随机数字表法分为 4 组(n=16):对照组(Control 组,0.2 mL PBS),脂多糖组(LPS 组,LPS 10 mg/kg),柚皮苷组(Ng 组,Ng 50 mg/kg+ LPS 10 mg/kg)和 BzATP 组(BzATP 5 mg/kg+Ng 50 mg/kg+LPS 10 mg/kg)。Ng 和 BzATP 在造模前 1 h 进行腹腔注射,Control 组予以等量 PBS。各组于造模 24 h 随机选 6 只小鼠获取回肠。HE 染色观察回肠黏膜病理学变化和 Chiu's 评分;免疫荧光观察肠黏膜 P2X7、焦亡效应蛋白 GSDMD、巨噬细胞标记物 CD68 表达和分布情况;Western blot 检测回肠组织 P2X7 和焦亡效应蛋白 NLRP3、Caspase11、GSDMD 及 GSDMD-N 表达量;ELISA 检测回肠炎症因子 IL-1β、IL-18 和 IL-10 水平。记录 7 d 内小鼠脓毒症评分(mouse sepsis score, MSS)。**结果** LPS 组与 Control 组相比,MSS 和 Chiu's 评分增高(P<0.05),回肠黏膜炎性损伤;肠黏膜 P2X7、GSDMD 和 CD68 免疫荧光分布一致且信号增强(P<0.05);促炎因子 IL-1β、IL-18 水平上升,抗炎因子 IL-10 水平下降(P<0.05);回肠组织 P2X7、NLRP3、Caspase11、GSDMD 和 GSDMD-N 蛋白表达增加(P<0.05)。Ng 组与 LPS 组相比,MSS 下降;HE 染色和 Chiu's 评分表明肠黏膜炎性损伤减轻;P2X7、GSDMD、CD68 荧光信号减弱(P<0.05);IL-1β、IL-18 水平下降(P<0.05),IL-10 水平上升(P<0.05);P2X7、NLRP3、Caspase11、GSDMD 和 GSDMD-N 蛋白表达下降(P<0.05)。BzATP 组实验结果与 Ng 组相反。**结论** IAI 小鼠肠黏膜 P2X7 受体表达升高,Caspase11 介导的非经典焦亡发生,加重其肠黏膜损伤;Ng 可能通过抑制 P2X7 受体调控非经典焦亡,改善 IAI 小鼠肠黏膜损伤。

[关键词] 腹腔感染;肠黏膜损伤;非经典焦亡;胱天蛋白酶 11;脓毒症
[中图法分类号] R282.71; R285.5; R574 [文献标志码] A

Naringin alleviates intestinal mucosal injury in mice with intra-abdominal infection by inhibiting non-canonical pyroptosis through P2X7 receptor

MA Yuan[1], DUAN Qianwen[1], DONG Xupeng[1], LIU Che[1], ZHANG Ming[1], MA Yuqing[2] [1]First School of Clinical Medicine of Lanzhou University, [2] Department of Anesthesiology, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730000, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the therapeutic efficacy and underlying mechanism of naringin (Ng) for intestinal mucosal injury in mice with intra-abdominal infection (IAI). **Methods** A mouse IAI model was established by intraperitoneal injection (i.p.) of lipopolysaccharide (LPS). Sixty-four healthy male mice were randomly assigned to 4 groups (n=16): Control group (0.2 mL PBS), LPS group (LPS 10 mg/kg), Ng group (50 mg/kg Ng+10 mg/kg LPS), and BzATP group (5 mg/kg BzATP +50 mg/kg Ng +10 mg/kg LPS). Ng and BzATP were administered i.p. 1 h before modeling, while the Control group received an equivalent volume of PBS. At 24 h post-modeling, 6 mice from each group were randomly selected and sacrificed for ileum collection, and the histopathological changes in the ileal mucosa and Chiu's score

[基金项目] 甘肃省自然科学基金(21JRIRA077)
[通信作者] 马玉清,E-mail: myq2392466@163.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

were assessed using HE staining. Immunofluorescence assay was employed to investigate the expression and distribution of intestinal mucosal P2X7, pyroptosis effector protein GSDMD, and macrophage marker CD68. Western blotting was conducted to detect the expression of P2X7 and pyroptosis-related proteins NLRP3, Caspase11, GSDMD, and GSDMD-N protein in ileum tissue. ELISA was utilized to measure the contents of inflammatory factors IL-1β, IL-18, and IL-10 in the ileum. The mouse sepsis score (MSS) was recorded within 7 d. **Results** In comparison to the Control group, the LPS group exhibited significantly higher MSS and Chiu's scores ($P<0.05$), along with inflammation-associated damage to the ileal mucosa; Immunofluorescence assay displayed consistent and intensified distribution of intestinal mucosal P2X7, GSDMD, and CD68 ($P<0.05$); Levels of pro-inflammatory factors IL-1β and IL-18 were increased, while that of anti-inflammatory factor IL-10 was decreased ($P<0.05$); Additionally, the protein expression of P2X7, NLRP3, Caspase11, GSDMD, and GSDMD-N in ileum tissue was increased ($P<0.05$). In contrast to the LPS group, the Ng group displayed a decrease in MSS; HE staining and Chiu's scores indicated a reduction in inflammatory damage to the intestinal mucosa; Moreover, fluorescence signals for P2X7, GSDMD, and CD68 were decreased ($P<0.05$). Levels of IL-1β and IL-18 were decreased ($P<0.05$), while that of IL-10 was elevated ($P<0.05$). The expression of P2X7, NLRP3, Caspase11, GSDMD, and GSDMD-N protein was decreased ($P<0.05$). The results of the BzATP group were in contrast to those of the Ng group. **Conclusion** Elevoted expression of P2X7 receptor and Caspase11-mediated non-canonical pyroptosis aggravates the intestinal mucosal injury IAI mice. Ng may ameliorate the injury in IAI mice by suppressing P2X7 receptor and modulating non-canonical pyroptosis.

[**Key words**] abdominal infection; intestinal mucosal injury; non-canonical; Caspase11; sepsis

Supported by the Natural Science Foundation of Gansu Province (21JRIRA077). Corresponding author: MA Yuqing, E-mail: myq2392466@163.com

腹腔感染(intra-abdominal infection,IAI)是住院患者高发的感染性疾病,腹腔炎症介质吸收入血诱发脓毒症[1]。本课题组前期发现,肠黏膜损伤增加肠道通透性,破坏肠道黏膜屏障[2-3]。腹腔和肠内细菌、毒素或其他炎症介质经受损的肠黏膜移位入血,IAI 向脓毒症、多器官功能障碍甚至脓毒症休克进展,病死率可由 1.2%升至 67.8%[4]。

细胞焦亡属于程序性细胞死亡,具有溶解细胞膜和释放细胞内炎症介质的功能[5]。细胞焦亡由 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3,NLRP3)炎症小体活性蛋白 Caspase1 切割 Gasdermin D(GSDMD)触发[6]。Caspase11 介导的焦亡定义为非经典焦亡,Caspase11 可独立于 NLRP3 炎症小体直接切割 GSDMD 诱导细胞焦亡[7]。嘌呤能离子通道型 7 受体(purinergic ligand-gated ion channel 7 purine receptor,P2X7)是腺苷三磷酸(adenosine triphosphate,ATP)门控通道,调节体内免疫和炎症平衡[8]。FIGLIUOLO 等[9]发现,P2X7 受体在炎症性肠病患者肠黏膜过度表达,抑制小鼠 P2X7 表达可以缓减其结肠炎。P2X7 是 K^+激活经典细胞焦亡的重要通道[10],但 P2X7 受体是否调控非经典焦亡尚有待探索。

柚皮苷(naringin,Ng)是天然双氢黄酮类化合物,具有抗菌消炎、降低胆固醇、改善微循环等作用[11]。CHEN 等[12]发现,Ng 抑制大鼠海马 P2X7 受体,能改善阿尔兹海默症模型大鼠的学习和记忆功能。Ng 在 IAI 小鼠肠黏膜损伤中的作用尚不清楚。本实验拟腹腔注射(intraperitoneal,i.p.)感染源内毒素脂多糖(lipopolysaccharides,LPS),构建 IAI 小鼠肠黏膜损伤模型,观察非经典细胞焦亡和 P2X7 受体在肠黏膜损伤中的作用,探讨 Ng 能否通过 P2X7 受体改善 IAI 小鼠肠黏膜损伤及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要试剂

C57BL/6J 雄性小鼠 64 只,6~8 周龄,体质量(20±2)g,购自兰州大学实验动物中心[SCXK(甘)2018-0002]。小鼠饲养于兰州大学实验动物中心,环境温度(23±3)℃,12 h 昼夜节律,相对湿度 40%~70%,自由饮水、进食,适应性饲养 1 周。实验方案经兰州大学第一医院伦理委员会批准(LDYYLL2023-326),全程遵循学校和医院相关指南。

Ng(≥95%,71662-25 g)、LPS(大肠杆菌 055:B5,L2880-10 mg)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;2'(3')-O-(4-苯甲酰苯甲酰)腺苷 5'-三磷酸三乙铵盐(Bz-ATP,P2X7 受体激动剂,≥98%,B7358-1 mg)购

自美国 APExBIO 公司;内源性过氧化物酶阻断剂(3% H_2O_2)、5%BSA 封闭液、生物素化山羊抗兔 IgG、链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC)、柠檬酸钠缓冲液(BL604A)购自韩国 Biosharp。一抗:P2X7 兔多克隆抗体(GTX31600)购自美国 GeneTex 公司,兔多抗 Caspase11(ab180673)购自英国 Abcam 公司,兔多抗 NLRP3(bs-24563R)、GSDMD(bs-14287R)、CD68(bs-0649R)购自北京博奥森生物技术有限公司;二抗:山羊抗兔 IgG(BS13278)购自美国 Bioword;RIPA 裂解液(R0010)、蛋白上样缓冲液(P1041)购自北京索莱宝公司,TBST(CW00435)购自康为世纪生物科技股份有限公司。

1.2 实验动物分组和标本采集

64 只小鼠按随机数字表法分为对照组(Control 组,0.2 mL PBS)、LPS 组(LPS 10 mg/kg)[13]、Ng 组(Ng 50 mg/kg+LPS 10 mg/kg)[14] 和 BzATP 组(Ng 50 mg/kg+BzATP 5 mg/kg+LPS 10 mg/kg)[15],每组 16 只。Ng 和 BzATP 在 LPS 造模前 1 h i.p.,Ng 在 37 ℃复温后振荡,直至颜色介于浅绿色-无色,Ng、LPS、BzATP 溶解于 PBS。

各组随机选 6 只小鼠于造模 24 h 取材:固定小鼠,腹中线去毛、消毒,麻醉后开腹暴露肠道,距回盲瓣 2 cm 处获取回肠后处死。清除肠腔内容物和粘连系膜,PBS 清洗,吸干表面液。收集标本置于 EP 管,远端回肠使用 4%多聚甲醛常温固定,近端回肠于超低温冰箱冻存。实验设计见图 1。

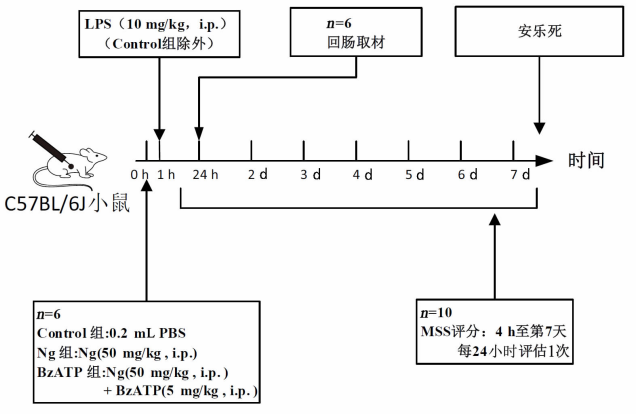


图 1 实验设计

1.3 小鼠脓毒症评分

由 2 名实验人员依据小鼠脓毒症评分(murine sepsis score,MSS)[16-17],连续 7 d 评估各组小鼠向脓毒症进展情况。造模 4 h 起,每 24 小时评估 1 次小鼠背部毛发竖立范围与凌乱程度、自主意识、自主活动、对声音刺激和触碰后的反应、闭眼和眼角分泌物、呼吸频率和质量下降程度,共 7 项指标,各分 5 级(0~4 分),记录其总分变化[16-17]。

1.4 HE 染色和小鼠肠黏膜损伤评分

固定回肠于次日取出,半自动 LEICA 系列 ASP300S 脱水、石蜡包埋、RM2245 切片(纵切,0.3 μm)、AUTOSTAINER XL 染色。HE 染色观察小肠黏膜病理学变化。每组随机选取 2 份标本,各制备 2 张切片,40×物镜随机选取 8 个视野,病理科医师以小鼠肠黏膜损伤 Chiu's 评分为标准[18],单盲法评估肠黏膜损伤情况。绒毛顶端黏膜下 Grunhagen 空间形成,毛细血管充血记 1 分;黏膜下间隙增加记 2 分;部分绒毛损伤记 3 分;绒毛完全剥脱记 4 分;固有层溃疡形成记 5 分[18]。

1.5 免疫荧光检测

P2X7、GSDMD、巨噬细胞标记物 CD68[19] 均为细胞膜蛋白,同一标本连续制 3 张白片(制片步骤同 1.4)进行免疫荧光单标。白片脱蜡:烤片 2 h,经二甲苯(10 min×3 次)、无水乙醇(95%、90%,2 min)脱蜡至水。抗原修复封闭:蒸馏水清洗(2 min×2 次),高压 3 min,冷却后 PBS 清洗(5 min×3 次),柠檬酸钠抗原修复,高火和中高火各 10 min,冷却后 PBS 清洗。3% H_2O_2 孵育 15 min,PBS 清洗。5%BSA 封闭液(牛血清白蛋白)室温 20 min,倾去血清不洗。抗体标记:滴加一抗(P2X7 1∶50;GSDMD 1∶250;CD68 1∶250),37 ℃ 1 h,PBS 清洗。滴加荧光标记的二抗(生物素化山羊抗兔 IgG),37 ℃ 1 h,PBS 清洗,SABC 37 ℃ 20 min,PBS 清洗,中性树胶封片。荧光显微镜(日本奥林巴斯 BX43+DP27)不同波长光源观察回肠黏膜:P2X7 绿色、GSDMD 红色、CD68 蓝色,采用 Image J 软件进行半定量分析。

1.6 Western blot 检测

提取、变性回肠蛋白液:每组取 3×100 mg 回肠,加入液氮充分研磨,裂解液(1 mL RIPA∶10 μL PMSF)30 min,每 10 min 混匀 1 次,离心管离心(4 ℃,14 650×g,10 min),上清液分装 1.5 mL EP 管;蛋白样本 4∶1 上样,沸水 10 min 后冰浴降温,-80 ℃冻存备用。电泳、转膜:组装电泳仪(北京六一生物科技有限公司,DYCZ-40D)和 SDS-PAGE 彩色凝胶快色制备试剂盒(P0012A),配置分离胶并上样,浓缩胶(80 V,400 mA,30 min),分离胶(120 V,400 mA,2 h)。目标蛋白所在位置上下 2 条 Marker 条带分离后转膜,PVDF 膜(美国 Millipore 公司,IRVH00010)于转膜仪湿转(DYCZ-24DN)(恒流 250 mA,1~1.5 h)。免疫杂交:PVDF 膜于封闭液室温孵育 1 h,一抗 4 ℃过夜孵育[GSDMD、NLRP3、Caspase11、GAPDH(1∶2 000),P2X7(1∶10 000)],次日二抗室温孵育 2 h 后 TBST 摇洗(1∶100 000,

10 min×3 次)。试纸吸干 PVDF 膜上液体,均匀滴加 ECL 发光液(BL520A),化学发光成像仪(Bioword,COMPLEX2000)曝光。Image J 量化条带灰度值,目标蛋白和内参蛋白灰度比值反映蛋白表达量。

1.7 ELISA 检测

取超低温冰箱储存的回肠,1 mg 回肠∶4 μL PBS∶10 μL RIPA 冰上充分研磨,组织匀浆离心(4 ℃,407×*g*, 20 min)取上清液。参照白介素-1β(interleukin-1β,IL-1β)、IL-10、IL-18 酶联免疫吸附实验(ELISA)试剂盒(上海研抗生物科技有限公司,YJ301814、YJ037873、YJ002294)说明书,检测炎症因子含量并换算为实际浓度。

1.8 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9 进行绘图分析,实验结果均为计量资料,以 $\bar{x}\pm s$ 表示。MSS 通过两因素重复测量方差分析,多组数据间比较采用单因素方差分析,Tukey 多重检验用以组间两两比较,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 腹腔感染小鼠脓毒症评分

Control 组小鼠 7 d 内一般情况良好。LPS、Ng、BzATP 组 MSS 评分于 24 h 达峰值,6 d 时各组 MSS 评分<3,趋于正常。造模 4 h,LPS 组小鼠 MSS 评分高于 Control 组($P<0.05$),LPS 组小鼠毛发蓬松、凌乱,自主意识迟缓,活动减少,对声音或触碰反应弱或无,眼睛半闭,眼角或有浑浊分泌物,呼吸频率降低,呼吸困难伴喘气。造模 3 d 内,Ng 组小鼠一般情况优于 LPS 组,MSS 评分有效降低($P<0.05$)。造模后 4 h 至第 5 天,BzATP 组小鼠一般情况最差,MSS 评分高于 LPS 组($P<0.05$),见图 2。

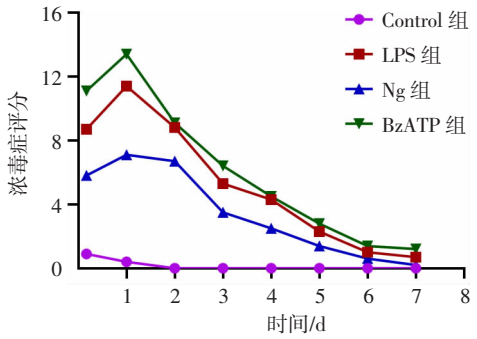
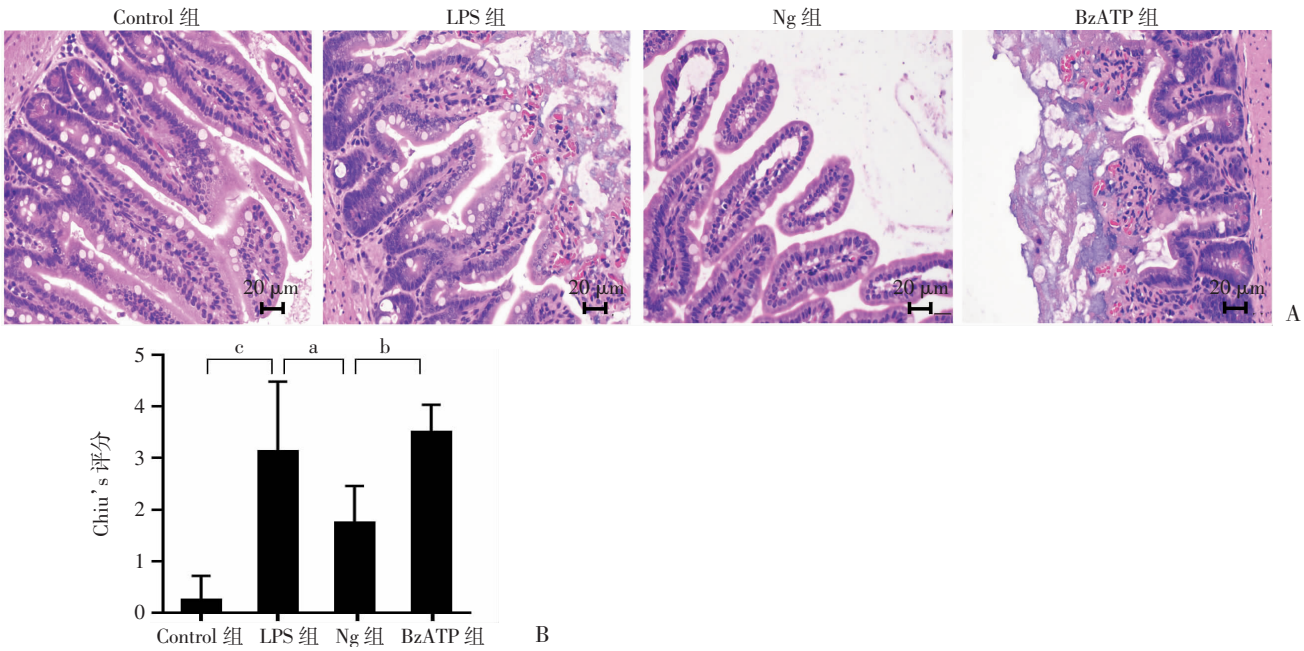


图 2 各组小鼠 MSS 评分随时间变化($n=10$)

2.2 小鼠回肠黏膜病理学变化与肠黏膜损伤评分

HE 染色结果显示,造模 24 h,Control 组肠黏膜绒毛和腺体形态正常;LPS 组顶端绒毛部分游离、剥脱,固有层毛细血管暴露,炎症细胞浸润;Ng 组肠黏膜损伤减轻,可见损伤早期上皮下空间扩展(Gruenhagen's 空间),固有层少量炎症细胞浸润;BzATP 组黏膜上皮细胞间隙增加,绒毛结构剥脱、溶解,固有层分解、出血,炎症细胞大量浸润,见图 3A。LPS 组小鼠肠黏膜损伤 Chiu's 评分明显高于 Control 组($P<0.000\ 1$),Ng 组低于 LPS 组($P<0.05$),BzATP 组高于 Ng 组($P<0.01$),见图 3B。

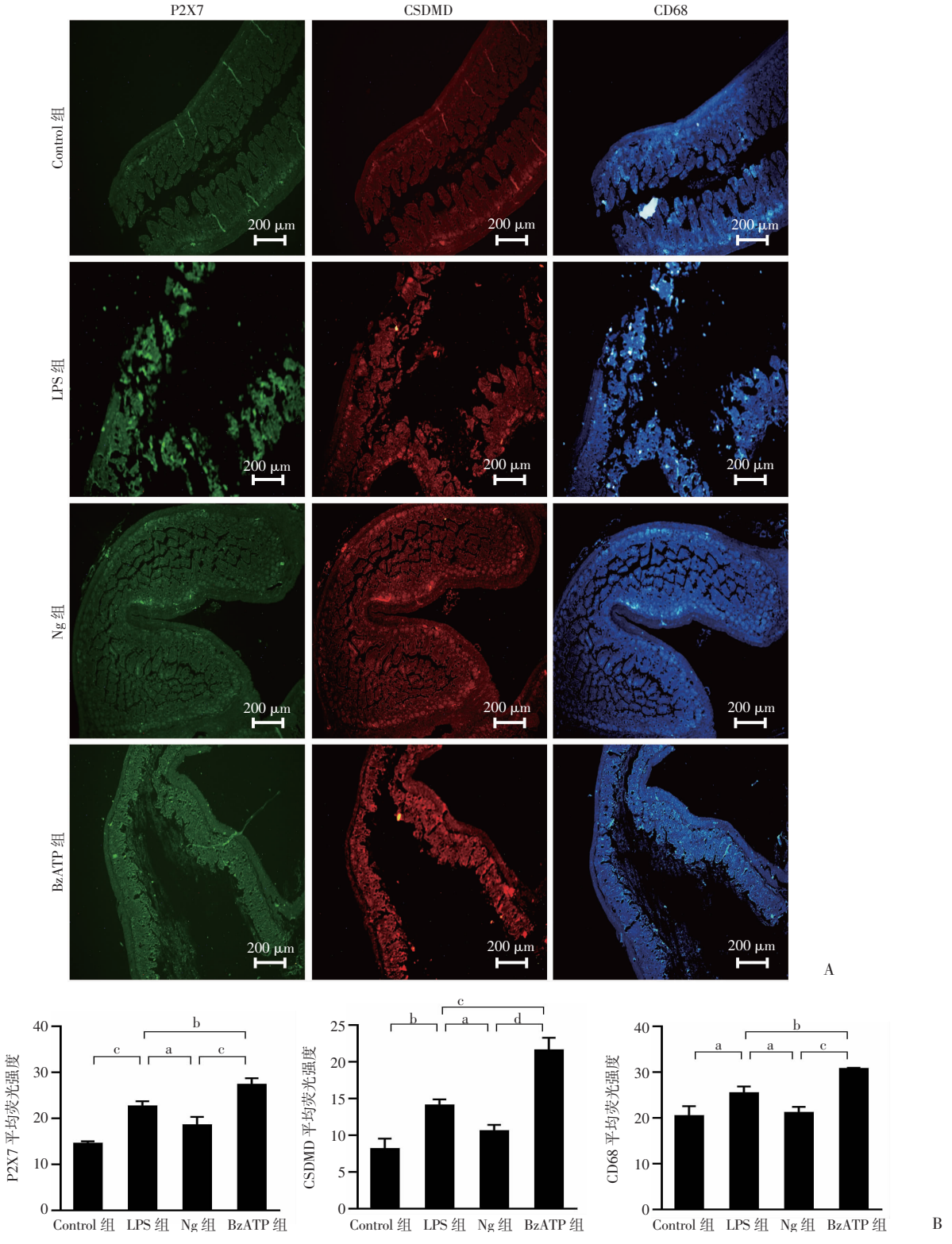


A:小鼠回肠 HE 染色;B:小鼠回肠黏膜 Chiu's 评分($n=8$) a:$P<0.05$;b:$P<0.01$;c:$P<0.000\ 1$

图 3 各组小鼠回肠黏膜病理学变化和 Chiu's 评分

2.3　小鼠肠黏膜 P2X7、CD68、GSDMD 的表达

各组小鼠肠黏膜 P2X7 绿色、GSDMD 红色、CD68 蓝色荧光分布一致。Control 组 P2X7、GSDMD、CD68 荧光信号弱;LPS 组 P2X7、GSDMD、CD68 荧光信号强于 Control 组($P<0.05$);Ng 组 P2X7、GSDMD、CD68 荧光信号弱于 LPS 组($P<0.05$);BzATP 组 P2X7、GSDMD、CD68 荧光信号明显强于 Ng 组($P<0.001$)和 LPS 组($P<0.01$),见图 4。



A:免疫荧光检测;B:P2X7、GSDMD、CD68 表达半定量分析($n=3$)　a:$P<0.05$;b:$P<0.01$;c:$P<0.001$;d:$P<0.0001$

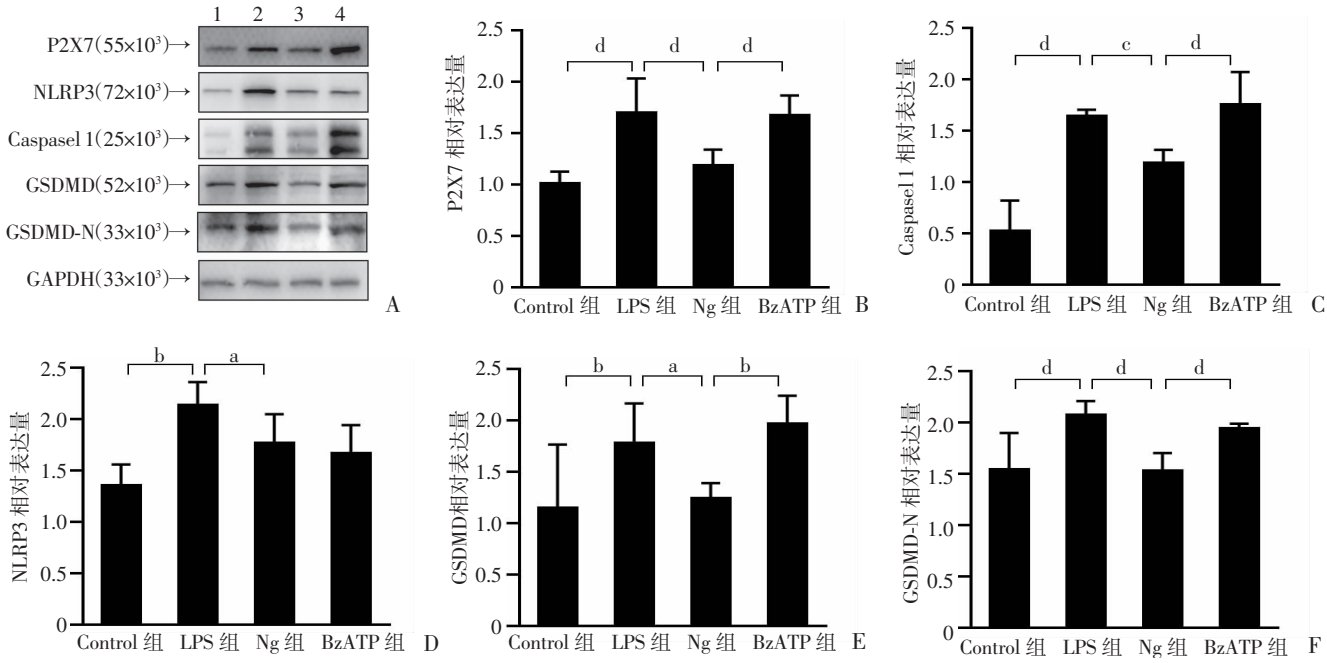
图 4　免疫荧光检测各组小鼠肠黏膜 P2X7、CD68、GSDMD 表达

2.4 小鼠回肠组织 P2X7、NLRP3、Caspase11、GSDMD 蛋白表达

Westernblot 检测结果显示,LPS 组回肠组织 P2X7、NLRP3、Caspase11、GSDMD、GSDMD-N 蛋白表达高于 Control 组($P<0.01$);Ng 组 P2X7、NLRP3、Caspase11、GSDMD、GSDMD-N 蛋白表达低于 LPS 组($P<0.05$);BzATP 组 P2X7、Caspase11、GSDMD、GSDMD-N 蛋白表达高于 Ng 组($P<0.01$)。BzATP 组 NLRP3 蛋白表达与 Ng 组相比,差异无统计学意义,见图 5。

2.5 酶联免疫吸附测定回肠组织 IL-1β、IL-10、IL-18 水平

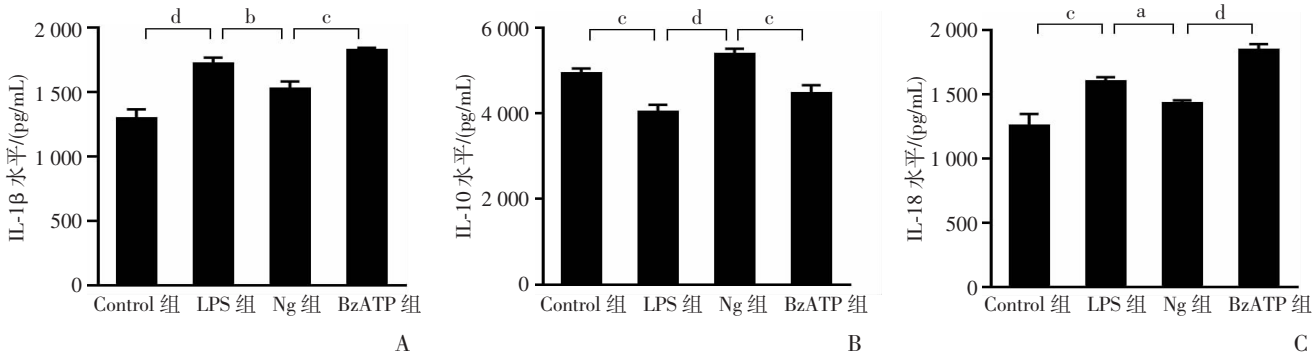
LPS 组小鼠回肠组织 IL-1β、IL-18 水平高于 Control 组($P<0.001$),IL-10 水平低于 Control 组($P<0.001$);Ng 组 IL-1β、IL-18 水平低于 Control 组($P<0.05$),IL-10 水平高于 Control 组($P<0.000\ 1$);BzATP 组 IL-1β、IL-18 水平高于 LPS 组($P<0.001$),IL-10 水平低于 LPS 组($P<0.001$),见图 6。



a:$P<0.05$;b:$P<0.01$;c:$P<0.001$;d:$P<0.0001$

A:Western blot 检测 1:Control 组;2:LPS 组;3:Ng 组;4:BzATP 组;B~F:蛋白相对表达量分析

图 5 Western blot 检测各组小鼠回肠组织 P2X7、NLRP3、Caspase11、GSDMD、GSDMD-N 蛋白表达 ($n=3$)



a:$P<0.05$;b:$P<0.01$;c:$P<0.001$;d:$P<0.000\ 1$

图 6 各组小鼠回肠组织 IL-1β(A)、IL-10(B)、IL-18(C)水平 ($n=3$)

3 讨论

肠道黏膜损伤可诱导 IAI 向脓毒性休克和多器官功能衰竭进展[4]。本研究通过腹腔注射感染源 LPS 以构建 IAI 小鼠肠黏膜损伤模型[15,20]。从造模 4 h 起,LPS 组小鼠一般情况变差,24 h MSS 达峰值且大于 10 分。SHRUM 等[16]证实,MSS>3 分的小鼠诊断为脓毒症,即 IAI 小鼠造模 24 h 已进展为脓毒症,故选此时取材。LPS 组小鼠腹腔和肠管粘连、水肿、充血;回肠绒毛和固有层受损,Chiu's 评分和炎症因子水平升高,肠黏膜炎性损伤明显。IAI 小鼠肠黏膜损伤模型制备成功。

Ng 具有抗炎、抗癌、调节血脂等多种作用[11],为探究 Ng 在 IAI 小鼠肠损伤中的作用及其与 P2X7 受体的关系,Ng 和 P2X7 受体激动剂 BzATP 在造模前 1 h i.p.。Ng 组肠黏膜 P2X7 荧光信号减弱,回肠组织 P2X7 受体蛋白表达降低,炎症因子水平下降,肠黏膜损伤减轻,MSS 评分降低。PALOMBIT 等[21]发现,抑制 P2X7 受体可以改善回肠缺血再灌注大鼠肠道功能和炎性损伤,这与本实验结果一致。BzATP 组小鼠回肠 P2X7 荧光信号及其蛋白表达增强,肠黏膜炎性损伤加重,小鼠一般情况变差。检索 HERB 数据库(http://herb.ac.cn),Ng 与脓毒症高度相关($P<0.01$,Ingredient id:HBIN036380)。Ng 抑制 P2X7 受体,IAI 小鼠肠黏膜炎性损伤减轻,限制了 IAI 向脓毒症的进展,因此,P2X7 可能是肠黏膜损伤的有效治疗靶点。

细胞焦亡由 Caspase1、11 和 NLRP3 介导,细胞形态表现为持续肿胀,在 GSDMD 活性蛋白 GSDMD-N 端作用下,细胞膜焦亡孔道形成甚至破裂,大量 IL-1β、IL-18 释放到细胞外,诱发炎症因子风暴,加重局部炎症反应和组织器官损伤[22-23]。LPS 组小鼠回肠组织经典焦亡 NLRP3、非经典焦亡 Caspase11、效应蛋白 GSDMD 及 GSDMD-N 关键蛋白表达增加,肠黏膜 GSDMD 荧光信号增强,焦亡孔道释放的 IL-1β、IL-18 水平升高。提示经典和非经典细胞焦亡共同参与 IAI 小鼠肠黏膜损伤。

P2X7 受体参与调控一系列炎症信号通路,通过释放细胞内 K^+,激活炎性小体并打开炎症关键开关——经典细胞焦亡[10]。本实验进一步探究肠黏膜 P2X7 受体表达是否影响非经典焦亡。Ng 组回肠 P2X7 受体表达降低,非经典焦亡关键蛋白表达降低,焦亡孔道释放的炎症介质减少,肠黏膜 GSDMD 荧光信号减弱。BzATP 特异性激活 P2X7,肠黏膜非经典焦亡显著发生。因此,肠黏膜非经典焦亡发生与 BzATP、Ng 激活或抑制 P2X7 受体有关,Ng 减轻 IAI 小鼠肠黏膜损伤的机制可能是通过 P2X7 受体抑制非经典焦亡。有意思的是,NLRP3 蛋白未受 BzATP 影响,这可能和非经典焦亡独立于 NLRP3/Caspase1 有关[7]。YANG 等[24]证实,P2X7 细胞内结构域存在与 LPS 结合蛋白相匹配的位点,细胞内 LPS 是 Caspase11 强激活物质,这可能是 IAI 小鼠肠黏膜 P2X7 激活非经典焦亡的原因之一。

P2X7 受体表达[25]和细胞焦亡[26]多发生于巨噬细胞。本实验通过典型标志物 CD68[19]观察各组肠黏膜巨噬细胞活化,以提供 P2X7 受体和焦亡发生与巨噬细胞相关的证据。免疫荧光检测结果表明,各组肠黏膜活化巨噬细胞荧光分布和信号强弱变化与 P2X7 和 GSDMD 一致。提示 IAI 小鼠肠黏膜 P2X7 受体表达和焦亡发生场所可能在巨噬细胞。在今后研究中,巨噬细胞层面特异性调控 P2X7 受体,P2X7 激活 Caspase11 的途径,P2X7 受体对 Gasdermin B、C、E 蛋白调控焦亡的影响等方面,是值得关注的方向。

综上所述,IAI 小鼠肠黏膜巨噬细胞相关的 P2X7 受体激活,非经典焦亡明显发生,加重 IAI 小鼠肠黏膜损伤。Ng 可能通过抑制 P2X7 受体,调控 Caspase11 介导的非经典细胞焦亡,减轻肠黏膜炎性损伤,并限制 IAI 向肠源性脓毒症进展。

参考文献:

[1] ANGUS D C, BINDMAN A B. Achieving diagnostic excellence for *Sepsis*[J]. JAMA, 2022, 327(2): 117. DOI: 10.1001/jama.2021.23916.

[2] 郭娜, 宁海慧, 邢博民, 等. Rho 激酶抑制剂 Y27632 对脓毒症大鼠肠屏障功能障碍的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(3): 238-242.
GUO N, NING H H, XING B M, *et al*. Effect of Rho kinase inhibitor Y27632 on intestinal barrier dysfunction in septic rats[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2022, 38(3): 238-242.

[3] 陈聪敏, 张晓慧, 丁新耘, 等. 基于中性粒细胞胞外诱捕网探究丹参酮ⅡA 对脓毒症小鼠肠损伤的影响及机制[J]. 中国急救医学, 2023, 43(2): 119-125. DOI: 10.3969/j.issn.1002-1949.2023.02.008.
CHEN C M, ZHANG X H, DING X Y, *et al*. Effect and mechanism of tanshinone Ⅱ A on intestinal injury in septic mice based on NETs[J]. Chin J Crit Care Med, 2023, 43(2): 119-125. DOI: 10.3969/j.issn.1002-1949.2023.02.008.

[4] SARTELLI M, CHICHOM-MEFIRE A, LABRICCIOSA F M, *et al*. Erratum to: the management of intra-abdominal infections from a global perspective: 2017 WSES guidelines for management of intra-abdominal infections[J]. World J Emerg Surg, 2017, 12: 36. DOI: 10.1186/s13017-017-0148-z.

[5] KAMERITSCH P, POGODA K. The role of connexin 43 and

pannexin 1 during acute inflammation[J]. Front Physiol, 2020, 11: 594097. DOI: 10.3389/fphys.2020.594097.

[6] MORETTI J, JIA B S, HUTCHINS Z, *et al*. Caspase-11 interaction with NLRP3 potentiates the noncanonical activation of the NLRP3 inflammasome[J]. Nat Immunol, 2022, 23(5): 705-717. DOI: 10.1038/s41590-022-01192-4.

[7] KAYAGAKI N, WARMING S, LAMKANFI M, *et al*. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11[J]. Nature, 2011, 479(7371): 117-121. DOI: 10.1038/nature10558.

[8] ILLES P, MÜLLER C E, JACOBSON K A, *et al*. Update of P2X receptor properties and their pharmacology: IUPHAR Review 30[J]. Br J Pharmacol, 2021, 178(3): 489-514. DOI: 10.1111/bph.15299.

[9] FIGLIUOLO V R, SAVIO L E B, SAFYA H, *et al*. P2X7 receptor promotes intestinal inflammation in chemically induced colitis and triggers death of mucosal regulatory T cells[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017, 1863(6): 1183-1194. DOI: 10.1016/j.bbadis.2017.03.004.

[10] LI Z H, HUANG Z Y, ZHANG H, *et al*. P2X7 receptor induces pyroptotic inflammation and cartilage degradation in osteoarthritis *via* NF-κB/NLRP3 crosstalk[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 8868361. DOI: 10.1155/2021/8868361.

[11] 杨新荣, 窦霞, 李国峰, 等. 柚皮苷药理作用及机制的研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(10): 3226-3240. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.10.033.
YANG X R, DOU X, LI G F, *et al*. Research progress on pharmacological effects and mechanism of naringin[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(10): 3226-3240. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.10.033.

[12] CHEN Q, WU H, TAO J, *et al*. Effect of naringin on gp120-induced injury mediated by P2X7 receptors in rat primary cultured microglia[J]. PLoS One, 2017, 12(8): e0183688. DOI: 10.1371/journal.pone.0183688.

[13] SUN L J, QIAO W, XIAO Y J, *et al*. Naringin mitigates myocardial strain and the inflammatory response in sepsis-induced myocardial dysfunction through regulation of PI3K/AKT/NF-κB pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 75: 105782. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.105782.

[14] LI Z L, GAO M, YANG B C, *et al*. Naringin attenuates MLC phosphorylation and NF-κB activation to protect sepsis-induced intestinal injury via RhoA/ROCK pathway[J]. Biomedecine Pharmacother, 2018, 103: 50-58. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.03.163.

[15] WU X W, REN J N, CHEN G P, *et al*. Systemic blockade of P2X7 receptor protects against sepsis-induced intestinal barrier disruption[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 4364. DOI: 10.1038/s41598-017-04231-5.

[16] 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, 7: 233. DOI: 10.1186/1756-0500-7-233.

[17] HO J, CHAN H, LIANG Y H, *et al*. Cathelicidin preserves intestinal barrier function in polymicrobial sepsis[J]. Crit Care, 2020, 24(1): 47. DOI: 10.1186/s13054-020-2754-5.

[18] CHIU C J. Intestinal mucosal lesion in low-flow states[J]. Arch Surg, 1970, 101(4): 478. DOI: 10.1001/archsurg.1970.01340280030009.

[19] MANTANI Y, HARUTA T, NAKANISHI S, *et al*. Ultrastructural and phenotypical diversity of macrophages in the rat ileal mucosa[J]. Cell Tissue Res, 2021, 385(3): 697-711. DOI: 10.1007/s00441-021-03457-0.

[20] TAN F, CAO Y L, ZHENG L, *et al*. Diabetes exacerbated sepsis-induced intestinal injury by promoting M1 macrophage polarization *via* miR-3061/Snail1 signaling[J]. Front Immunol, 2022, 13: 922614. DOI: 10.3389/fimmu.2022.922614.

[21] PALOMBIT K, MENDES C E, TAVARES-DE-LIMA W, *et al*. Blockage of the P2X7 receptor attenuates harmful changes produced by ischemia and reperfusion in the myenteric plexus[J]. Dig Dis Sci, 2019, 64(7): 1815-1829. DOI: 10.1007/s10620-019-05496-8.

[22] 于百莹, 惠雪, 赵曙, 等. 细胞焦亡及其与癌症的关系[J]. 现代肿瘤医学, 2022, 30(13): 2471-2475. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2022.13.037.
YU B Y, HUI X, ZHAO S, *et al*. Pyrolysis and its relationship with cancer[J]. J Mod Oncol, 2022, 30(13): 2471-2475. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2022.13.037.

[23] CHEN K W, DEMARCO B, HEILIG R, *et al*. Extrinsic and intrinsic apoptosis activate pannexin-1 to drive NLRP3 inflammasome assembly[J]. EMBO J, 2019, 38(10): e101638. DOI: 10.15252/embj.2019101638.

[24] YANG D H, HE Y, MUÑOZ-PLANILLO R, *et al*. Caspase-11 requires the pannexin-1 channel and the purinergic P2X7 pore to mediate pyroptosis and endotoxic shock[J]. Immunity, 2015, 43(5): 923-932. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.10.009.

[25] DE CAMPOS N E, MARQUES-DA-SILVA C, CORRÊA G, *et al*. Characterizing the presence and sensitivity of the P2X7 receptor in different compartments of the gut[J]. J Innate Immun, 2012, 4(5/6): 529-541. DOI: 10.1159/000336628.

[26] XIA S Y, HOLLINGSWORTH L R 4th, WU H. Mechanism and regulation ofgasdermin-mediated cell death[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2020, 12(3): a036400. DOI: 10.1101/cshperspect.a036400.

(收稿:2023-07-11;修回:2023-09-06)

(编辑 刘秋池)