DOI:10.16016/j.1000-5404.202011142

ghrelin 对小鼠脓毒症肺损伤焦亡通路及炎症因子的影响

袁 羞[1,2],李少军[1],伏春晓[1,2],周 亮[1],邹志平[1],谭利平[1,2] 400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院:急诊科[1];儿童发育疾病研究教育部重点实验室,国家儿童健康与疾病临床医学研究中心[2]

[摘要] **目的** 分析 ghrelin 蛋白对小鼠脓毒症肺损伤焦亡通路及炎症因子表达的影响,探讨其在脓毒症肺损伤中的保护机制。**方法** 将健康雄性 C57BL/6 小鼠 180 只,分为假手术组(sham,$n=24$)、盲肠结扎穿刺模型组(the cecal ligation and puncture CLP,$n=78$)和 ghrelin 组($n=78$)。使用盲肠结扎穿刺法建立脓毒症模型,ghrelin 组于造模后 3、20 h 腹腔各给药 ghrelin 12 nmol/kg,其他组给予等量生理盐水。观察各组 120 h 的生存率,分别留取术后 6、12、24 h CLP 组、ghrelin 组和 24 h sham 组小鼠肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid,BALF)以及肺组织,检测 BALF 中总蛋白浓度和细胞总数,ELISA 法检测 ghrelin、IL-10、IL-6、TNF-α、IL-1β 和 IL-18,免疫荧光染色法检测 GSDMD 表达,qPCR、Western blot 检测焦亡信号通路 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD 蛋白的表达。**结果** 与 sham 组比较,CLP 组的死亡率、肺组织病理改变以及炎症因子(IL-10、IL-6、TNF-α、IL-1β 和 IL-18)明显升高($P<0.05$);肺组织 ghrelin 水平降低,NLRP3、ASC、Caspase-1 和 GSDMD 蛋白水平明显升高($P<0.05$)。给予外源性 ghrelin 后,ghrelin 组小鼠死亡率降低,肺组织病理结构损害减轻,炎症因子以及 NLRP3、ASC、Caspase-1 和 GSDMD 蛋白水平表达降低($P<0.05$)。**结论** ghrelin 改善脓毒症肺损伤小鼠生存率,减轻肺组织病理学改变,可能通过抑制焦亡途径、降低炎症反应等发挥保护作用。

[关键词] ghrelin;脓毒症肺损伤;焦亡;炎症

[中图法分类号] R341;R392.3;R563 [文献标志码] A

Effects of ghrelin on pyroptosis pathway and inflammatory factors in mice with septic lung injury

YUAN Xiu[1,2], LI Shaojun[1], FU Chunxiao[1,2], ZHOU Liang[1], ZOU Zhiping[1], TAN Liping[1,2] [1]Department of Emergency, [2]Key Laboratory of Child Developmental Disorders of Ministry of Education, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, Affiliated Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China

[**Abstract**] **Objective** To analyze the effects of ghrelin on the pyroptosis pathway and the expression of inflammatory factors in septic lung injury, and explore its protective mechanism. **Methods** A total of 180 healthy male C57 BL/6 mice were divided into sham operation group (sham, $n=24$), cecal ligation and puncture group (CLP, $n=78$) and ghrelin group ($n=78$). The ghrelin group was intraperitoneally given ghrelin 12 nmol/kg at 3 h and 20 h after CLP surgery, while the other groups were given the same amount of normal saline. The 120-hour survival rate of each group was observed, and the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung tissues of mice in 6, 12 and 24 h after CLP group, ghrelin group and in 24 h for sham groups were collected respectively, and the total protein concentration and total cell number in BALF were detected. The expression of ghrelin as well as inflammatory cytokines such as IL-10, IL-6, TNF-α, IL-1β and IL-18 was tested by ELISA. Moreover, the expression of gasdermin D (GSDMD) was determined by

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2020jcyj-msxmX0642)

[通信作者] 谭利平,E-mail:tanlp0825@hotmail.com

1000-5404/Copyright © 2021,陆军军医大学(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/)

immunofluorescence staining, and the levels of pyroptosis signal pathway proteins including NOD-like receptor protein (NLRP3), ASC, Caspase-1 and GSDMD were detected by qPCR and Western blotting. **Results** As compared with sham group, the mortality, pathological changes of lung tissue and levels of inflammatory factors (IL-10, IL-6, TNF-α, IL-1β and IL-18) in CLP group were significantly increased ($P<0.05$); the level of ghrelin in the lung tissue was dropped, while those of NLRP3, ASC, Caspase-1 and GSDMD rose in the CLP group ($P<0.05$). After administration of exogenous ghrelin, the death rate of septic lung injury mice was declined, the pathological damage of lung tissue was alleviated, and the expression levels of inflammatory cytokines and NLRP3, ASC, Caspase-1 and GSDMD were all decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Ghrelin improves the survival rate of septic lung injury mice and reduces the pathological changes of lung tissue, which may play a protective role by inhibiting the pathway of pyroptosis and alleviating inflammation.

[**Key words**] ghrelin; septic lung injury; pyroptosis; inflammation

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2020jcyj-msxmX0642). Corresponding author: TAN Liping, E-mail: tanlp0825@hotmail.com

脓毒症是儿童 ICU 常见的危重症,具有高发病率、高病死率、高治疗费用等特点[1]。脓毒症疾病进展过程中,肺脏常是第一个被攻击的靶器官[2]。临床表现为急性肺损伤(acute lung injury,ALI),甚至发展为急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome,ARDS)[3]。过度失调的全身炎症反应综合征是导致脓毒症相关性 ALI 发生的关键环节[4-5]。焦亡作为炎症反应介导的程序性细胞死亡模式之一,主要由 NOD 样受体蛋白 3(NOD-like receptor protein 3,NLRP3)炎症小体以半胱天冬酶-1(Caspase-1)依赖的方式触发,导致 GSDMD(gasdermin D)的切割和多聚化,使细胞膜崩解穿孔,导致主要炎症因子 IL-1β 和 IL-18 的释放。NLRP3 炎症小体主要由 NLRP3 炎症小体受体蛋白、ASC、Caspase-1 构成[6-7]。当其被重症感染等病理刺激触发后,会裂解细胞释放出炎性介质,引发生物体级联放大免疫反应,从而抵御病原体攻击,但过度的免疫应答也会对机体的免疫功能造成损害[8]。因此,了解细胞焦亡途径对脓毒症 ALI 的免疫机制研究至关重要。

近年来研究发现,主要由胃黏膜细胞产生的 ghrelin 蛋白,除具有生长激素促分泌剂的最初特征外,还具有抗炎、调节免疫等多种生理学特性[9-10]。ghrelin 在肺、肝、肾及胎盘等器官和免疫器官及 T、B 淋巴细胞、中性粒细胞、单核细胞等免疫细胞也可分泌[9],其可能对脓毒症 ALI 具有潜在的保护作用。因此,本研究拟从 ghrelin 对细胞焦亡途径及炎症因子表达作用研究着手,探讨其对脓毒症肺损伤的保护机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康雄性 6~8 周龄 C57BL/6 小鼠 180 只,体质量 16~22 g,购于重庆医科大学实验动物中心。提供小鼠标准的食物和水,小鼠饲养在室温(20~22 ℃),湿度 30%~70%并且保持每隔 12 h 的光暗循环的环境中。所有实验方案均经重庆医科大学附属儿童医院实验动物伦理委员会批准(271/2 019),按机构指南执行。随机数学表法分为 3 组:假手术(sham,$n=24$)组、盲肠结扎穿刺模型(the cecal ligation and puncture, CLP,$n=78$)组、ghrelin 组($n=78$)。

1.2 脓毒症模型的建立

根据有关脓毒症模型的文献[11],使用盲肠结扎穿刺法建立脓毒症动物模型。小鼠腹腔注射 0.5%戊巴比妥钠(50 mg/kg),无菌手术环境下腹部脱毛、消毒,腹部正中逐层切开 1~2 cm 显露盲肠,在距离盲肠末端大约 1/3 处用外科 4-0 带针缝合线进行结扎。用 20 号针从盲肠远端 3/4 处穿盲肠 2 次,并从穿刺点挤出少量粪便,以确保穿刺口通畅,后将肠道送回腹部。用 6-0 号无菌丝绸缝合切口。sham 组小鼠不结扎盲肠,不穿孔,其他手术步骤一致。术后皮下注射 0.5 mL 预温无菌生理盐水进行复苏。ghrelin 组于造模后 3、20 h 腹腔给药 ghrelin(12 nmol/kg, phoenix031-31, 溶于 0.5 mL 生理盐水中),sham 组和 CLP 组给予等量的生理盐水。各组行 120 h 观察生存率。收集小鼠 6、12、24 h CLP 组、ghrelin 组和 24 h sham 的肺泡灌洗液和肺组织,于-80 ℃中保存。

1.3 支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中细胞计数和蛋白量

造模后 6、12、24 h,用 0.5%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠,颈部消毒,分离小鼠颈部支气管,将留置针置入气管中固定,缓慢将预冷的 0.5 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)注入肺中,吸出后再次注入,反复 3 次,抽出的灌洗液置于无菌 EP 管中,反复灌洗 2 次,保证回收率在 80%以上为合格。将灌洗液在 4 ℃下 3 000 r/min

离心 10 min,收集上清液并分装后冻存于-80 ℃冰箱保存。其沉淀用 PBS 进行重悬,计数板计数各组细胞数,用 BCA 蛋白分析试剂盒(Bio-Rad 实验室)测定 BALF 蛋白含量。

1.4 小鼠肺组织病理检查

取小鼠左上肺组织 4%多聚甲醛固定,行石蜡包埋,5 μm 厚度切片后行 HE 染色。观察肺泡腔中性粒细胞数目、肺间质中性粒细胞数目、透明膜、肺泡腔蛋白碎片及肺泡间隔厚度[12]。

1.5 BALF 中 ghrelin 和炎症因子 IL-10、IL-6、TNF-α、IL-1β 和 IL-18 水平检测

按照 ELISA 试剂盒说明书检测 BALF 中 ghrelin(Ebioscience)浓度及 IL-10、IL-6、TNF-α、IL-1β 和 IL-18(欣博盛)浓度。

1.6 ghrelin 水平及通路蛋白在脓毒症肺损伤小鼠中的表达

1.6.1 Real-time PCR 检测肺组织中 ghrelin 水平及通路蛋白的表达 使用 eastep™ Super TotalRNA Extraction 试剂盒(Promega)提取小鼠肺脏组织中的 RNA,通过 QuantiNova SYBR Green PCR 试剂盒(QIAGEN)反转录为 cDNA,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,运用 SYBR Green 荧光染料法,数据分析根据公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各组与 sham 组之间目的基因相对表达含量的变化。GAPDH 作为内参,每个样本 3 个复孔。

1.6.2 免疫荧光检测 GSDMD 将石蜡切片于 60 ℃烘烤至少 1 h,脱蜡后经枸橼酸钠抗原修复液进行修复,PBS 洗 3 次/5 min,通过 5%浓度 BSA 孵育封闭 30 min,将封闭液轻轻甩干,加入一抗 GSDMD(抗体用缓冲液按 1∶200 稀释)在 4 ℃孵育过夜,在室温黑暗条件下与荧光二抗(北京中杉金桥生物公司)孵育 1 h,DAPI 染核 5 min 后,防荧光淬灭剂封片,显微镜下观察。

1.6.3 Western blot 检测焦亡通路蛋白的表达 试剂盒提取组织蛋白(上海贝博科技有限公司),通过 BCA 试剂盒(凯基生物公司)测定蛋白浓度,蛋白样品经 10% SDS-PAGE 电泳分离,转移到 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭,与一抗在 4 ℃孵育过夜,在室温下与二抗孵育 70 min,使用 Bio-Rad 成像系统检测蛋白条带。Image J 软件分析各组焦亡通路及内参 GAPDH(Zenbio,1∶5 000)的灰度值,NLRP3(Abcam,1∶1 000)、ASC[ASC (F-9), Santa Cruz Biotechnology, 1∶1 000]、Caspase-1(Genetex, 1∶1 000)、GSDMD[GSDMDC1 (A-7), Santa Cruz Biotechnology, 1∶1 000]水平分别用 NLRP3/GAPDH、ASC/GSDMD、Caspase-1/GAPDH 和 GSDMD/GAPDH 表示。

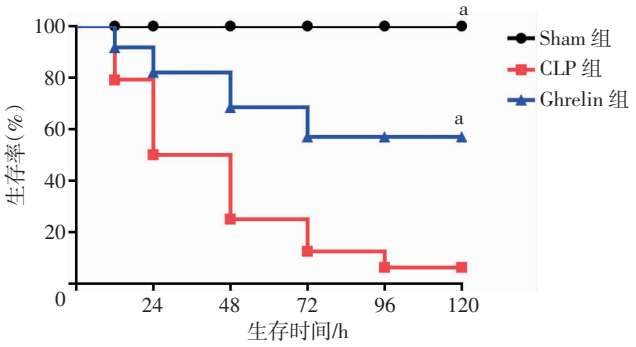
1.7 统计学分析

采用 SPSS21.0 统计软件,所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异通过单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD 法)。通过 Kaplan-Meier 方法(log-rank 检验)分析各组存活率,并且绘制生存曲线,生存时间组间比较采用秩和检验。

2 结果

2.1 ghrelin 对脓毒症小鼠存活率的影响

观察 3 组小鼠 120 h 生存率发现,sham 组存活率为 100%,CLP 小鼠 24 h 存活率为 50%,48 h 为 20%,而 ghrelin 干预组提高了存活率,24 h 为 80%,48 h 为 70%,显著高于 CLP 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 1。



a:$P<0.05$,与 CLP 组比较

图 1 Ghrelin 对脓毒症小鼠存活率的影响 ($n=24,\bar{x}\pm s$)

2.2 脓毒症小鼠肺组织中 ghrelin 水平

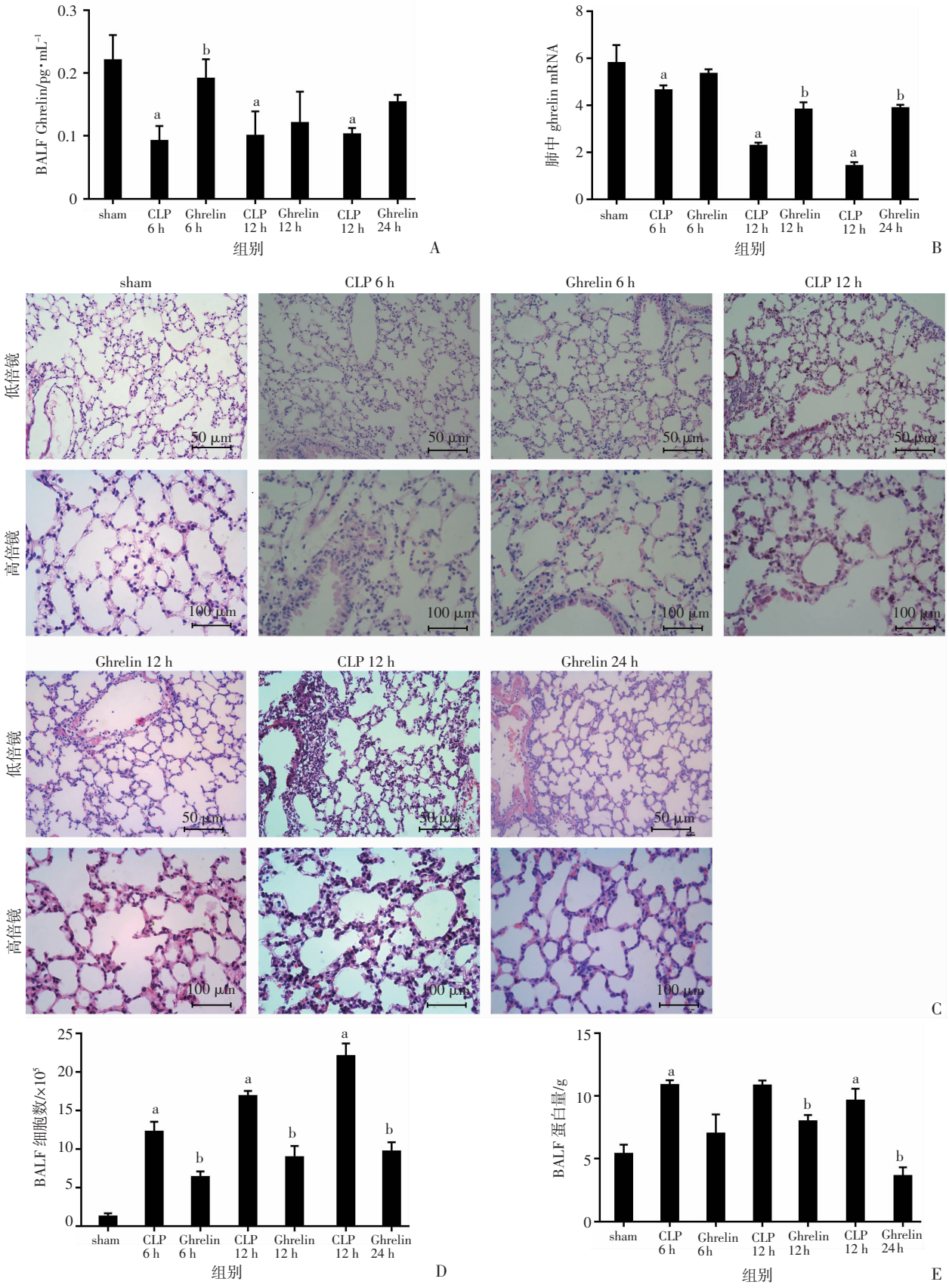
CLP 小鼠肺组织和 BALF 中 ghrelin 水平低于 sham 组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。给予外源性 ghrelin 后,CLP 小鼠 ghrelin 水平明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图 2A、B。

2.3 肺组织病理学检查

sham 组肺泡结构完整,CLP 组肺泡腔与肺泡间质中性粒细胞增加以及肺泡壁增厚,24 h CLP 组病理学改变更明显,ghrelin 组改善了以上病理组织改变。与 sham 组相比,CLP 组 BALF 中细胞总数、总蛋白均显著增加,ghrelin 干预后 BALF 中细胞总数、总蛋白明显减少,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图 2C~E。

2.4 ghrelin 对脓毒症小鼠炎症因子的影响

CLP 小鼠 BALF 中炎症因子 IL-6、TNF-α 和 IL-10 明显高于 sham 组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。ghrelin 组促炎因子 IL-6 和 TNF-α 水平低于 CLP 组,抗炎因子 IL-10 水平明显高于 CLP 组,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 3A~C。



A:BALF 中 ghrelin 的含量;B:肺组织中 ghrelin mRNA 含量;C:HE 染色检测各组肺组织病理变化;D:BALF 中细胞计数;E:BALF 中蛋白的含量;a:$P<0.05$,与 sham 组比较;b:$P<0.05$,与 CLP 组比较

图 2 ghrelin 对脓毒症小鼠肺组织病理的影响 ($n=14$, $\bar{x}\pm s$)

2.5 ghrelin 对脓毒症肺损伤小鼠中 GSDMD 通路的影响

2.5.1 qPCR 检测 ghrelin 对小鼠肺组织中 GSDMD 通路 mRNA 的影响 CLP 组和 ghrelin 组肺组织 GSDMD 通路 mRNA 相对表达升高,与 sham 组比较差异有统计学意义($P<0.05$),与 CLP 组相比,ghrelin 组显著降低了 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD mRNA 的表达($P<0.05$,图 3D)。

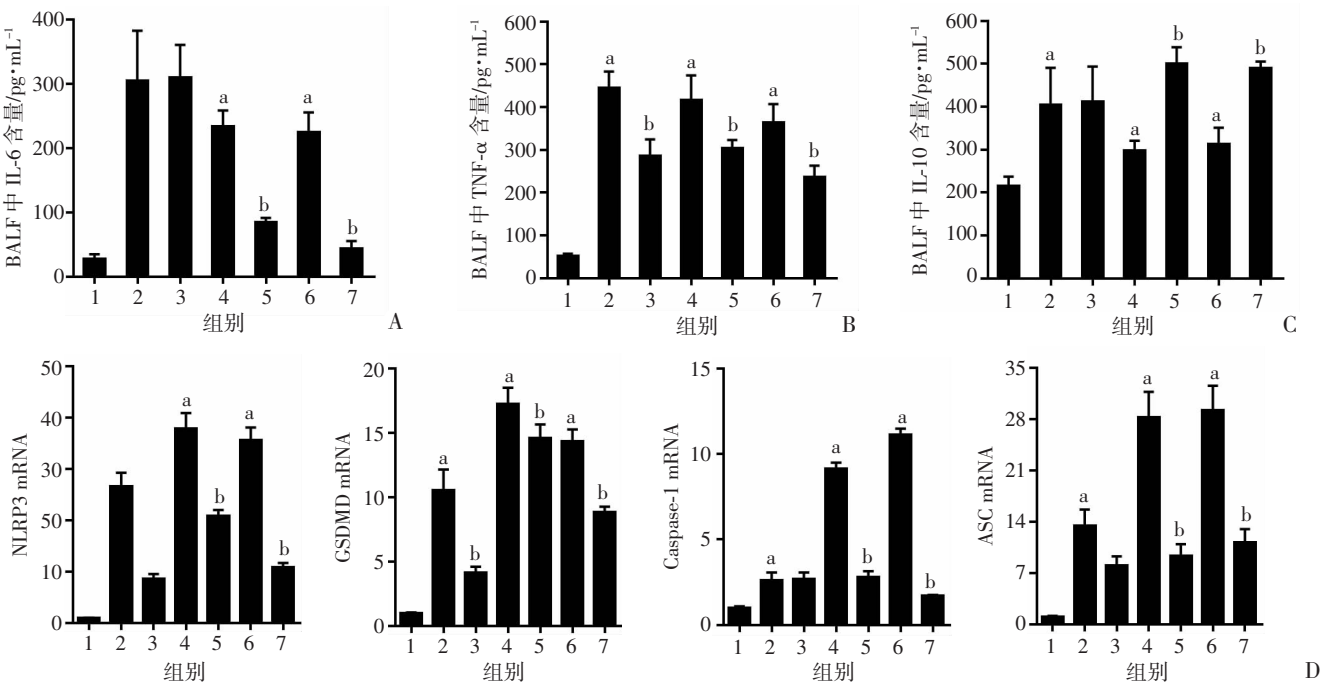
2.5.2 免疫荧光检测小鼠肺组织 GSDMD 的表达 通过免疫荧光观察小鼠肺组织 GSDMD 定位表达,与 sham 组相比,CLP 组 GSDMD 共定位表达明显增强,ghrelin 降低了其表达($P<0.05$,图 4A)。

2.5.3 Western blot 检测 ghrelin 对小鼠肺组织中 GSDMD 通路蛋白的影响 与 sham 组比较,CLP 组的 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$),ghrelin 组蛋白表达水平显著低于 CLP 组($P<0.05$,图 4B~F)。

2.5.4 ELISA 检测 ghrelin 对小鼠 BALF 中焦亡相关炎症因子的影响 ELISA 检测 BALF 中 IL-1β 和 IL-18 的表达水平,CLP 组高于 sham 组,差异有统计学意义($P<0.05$),ghrelin 组降低了焦亡相关炎症因子 IL-1β 和 IL-18 的水平,差异有统计学意义($P<0.05$,图 5)。

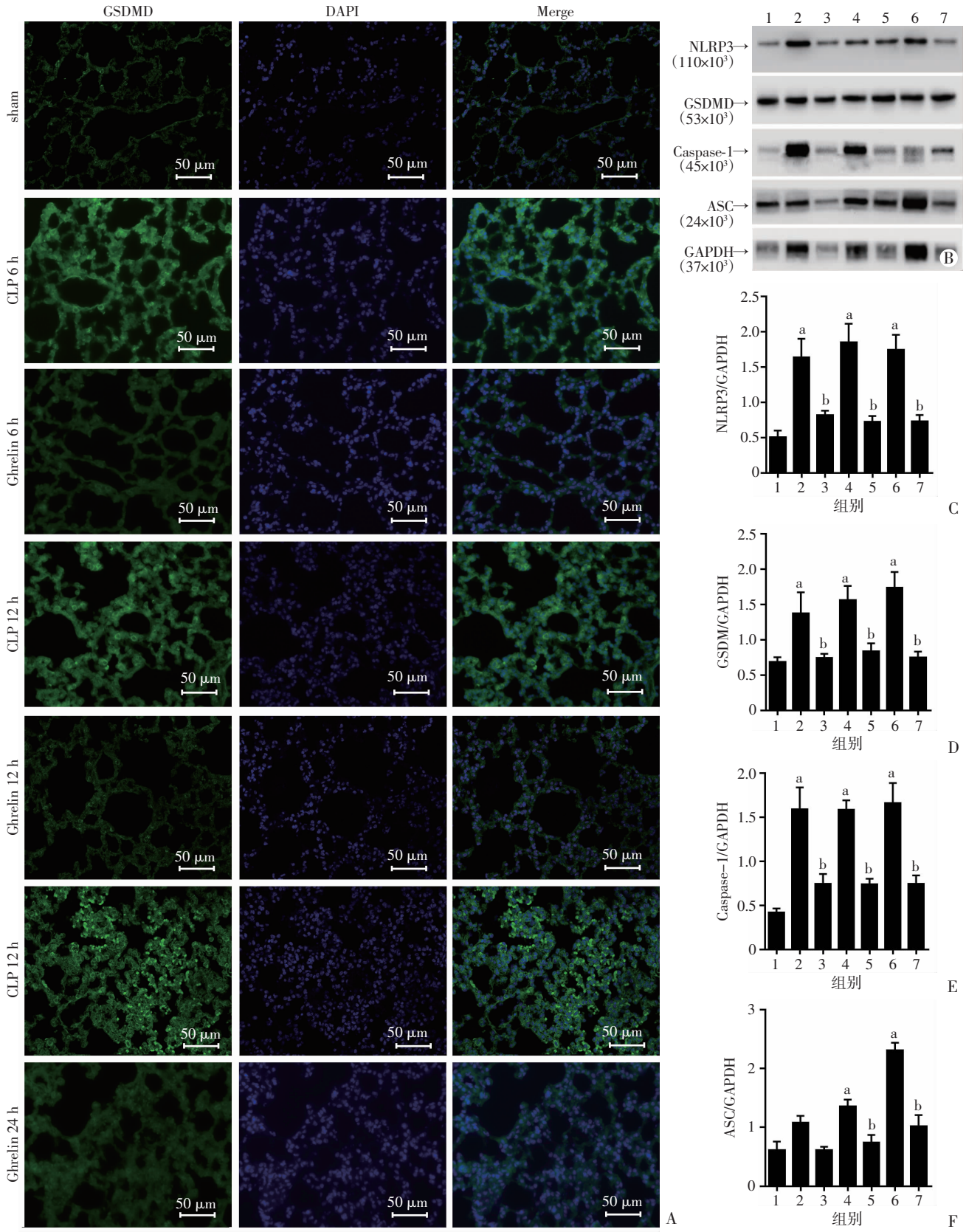
3 讨论

脓毒症是宿主对感染的反应失调而导致的危及生命的器官功能障碍,机体表现过度的炎症反应和免疫抑制[13],患者短期死亡风险高[14]。作为炎性细胞程序性死亡的焦亡模式,广泛参与了多种疾病的细胞死亡过程。焦亡有 3 种类型,依赖 Caspase-1 炎症小体的经典途径、Caspase-11 的非经典炎症小体途径以及 Caspase-3 的凋亡向焦亡转化途径。焦亡途径会释放 IL-1β 和 IL-18 等炎症因子,导致炎症级联放大反应[15]。经典焦亡途径主要是 NLRP3 炎性小体激活 Caspase-1,将前体 IL-1β 和前体 IL-18 裂解成有活性的 IL-1β 和 IL-18[16]。其中 GSDMD 是焦亡的一个关键靶点,Caspase-1 通过裂解 GSDMD 为 IL-1β 和 IL-18 释放提供条件,是焦亡的执行者[17]。如能有效地调控细胞焦亡通路中的关键分子或蛋白复合体,有助于了解脓毒症肺损伤复杂的发病机制,并为寻找干预治疗的靶点提供理论依据。本研究结果表明,脓毒症肺损伤时小鼠 BALF 中 IL-1β 和 IL-18 水平升高,肺组织含量 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD 明显升高,免疫荧光共聚焦提示 GSDMD 表达明显,提示脓毒症肺损伤其炎性反应与焦亡途径激活来促进炎性因子大量释放有关。



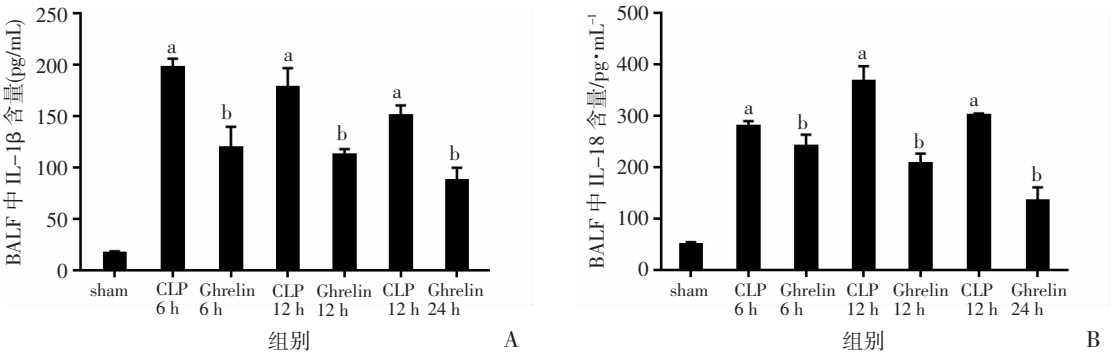
A~C 分别为 BALF 中 IL-6、TNF-α、IL-10 的含量;D~G 分别为各组肺组织中 NLRP3、GSDMD、Caspase-1、ASCmRNA 的表达;1:sham 组;2:CLP 6 h 组;3:ghrelin 6 h 组;4:CLP 12 h 组;5:ghrelin 12 h 组;6:CLP 12 h 组;7:ghrelin 24 h 组;a:$P<0.05$,与 sham 组比较;b:$P<0.05$,与 CLP 组比较

图 3 ghrelin 对脓毒症小鼠的炎症因子及 GSDMD 通路 mRNA 的影响 ($n=14$,$\bar{x}\pm s$)



A:免疫荧光检测各组小鼠肺组织 GSDMD 的表达;B:Western blot 检测各组 GSDMD 焦亡通路蛋白表达;C~F 分别为各组肺组织中 NLRP3、GSDMD、Caspase-1、ASC 相当表达量;1:sham 组;2:CLP 6 h 组;3:ghrelin 6 h 组;4:CLP 12 h 组;5:ghrelin 12 h 组;6:CLP 12 h 组;7:ghrelin 24 h 组;a:$P<0.05$,与 sham 组比较;b:$P<0.05$,与 CLP 组比较($n=14$,$\bar{x}\pm s$)

图 4 ghrelin 对小鼠肺组织中 GSDMD 通路蛋白表达的影响



A:BALF 中 IL-1β 的含量;B:BALF 中 IL-18 的含量;a:$P<0.05$,与 sham 组比较;b:$P<0.05$,与 CLP 组比较

图 5 ghrelin 对小鼠 BALF 中焦亡相关炎症因子表达的影响 ($n=14$,$\bar{x}\pm s$)

ghrelin 是 GHSR-1a 的内源性配体,近年来研究表明 ghrelin 具有调节免疫和炎症的功能[18-19]。在油酸诱导的大鼠 ALI 模型,ALI 大鼠血浆和肺组织 ghrelin 含量降低,mRNA 表达下调,ghrelin 可改善油酸诱导的大鼠 ALI 模型肺损伤、炎性细胞浸润等[20]。本研究中 CLP 脓毒症模型可导致肺间质充血水肿、炎症细胞浸润和肺内出血,表现为典型急性肺损伤病理改变。研究还显示,CLP 组 ghrelin 水平降低,给予外源性 ghrelin 后,BALF 中炎性细胞数及总蛋白明显减少,肺泡壁结构改善,肺泡间质炎症浸润减轻,中性粒细胞减少,同时 BALF 中促炎细胞因子 TNF-α 和 IL-6 水平降低,抗炎因子 IL-10 水平升高。结果表明,ghrelin 对 CLP 诱导的脓毒症 ALI 具有保护作用。

多项研究发现,ghrelin 蛋白在多种危重疾病状态下,表现出其对细胞焦亡的积极影响[21-23]。在创伤性脑损伤诱导的 ALI 中,ghrelin 减弱了 IL-1β、IL-6、TNF-α 和 IL-18 mRNA 水平与凋亡相关的蛋白 NLRP3 炎症小体和 GSDMD,因此认为 ghrelin 通过调节细胞焦亡减轻炎症反应,从而减轻 ALI 的病情[22]。在实验性自身免疫性脑脊髓炎中发现,ghrelin 可抑制 NLRP3 炎性体信号传导途径和焦亡,以及促炎细胞因子的分泌,使实验组大鼠的神经系统症状得以延迟,行为功能得到改善[24]。本研究结果显示,脓毒症小鼠给予外源性 ghrelin 干预后,IL-1β 和 IL-18 显著降低,GSDMD 的共聚焦定位明显弱于 CLP 组,脓毒症 ALI 肺组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD 的表达水平明显低于 CLP 组,生存率也明显提高。

综上所述,急性肺损伤是脓毒症多器官功能障碍的重要组成部分,过度失调的炎症反应是其发生发展的关键环节,而焦亡途径参与了脓毒症肺损伤的病理生理过程。近年来 ghrelin 多系统效应中,其减轻炎症的能力受到越来越多的关注,本研究提示 ghrelin 提高了脓毒症 ALI 小鼠生存率,改善了肺组织病理损伤,对 CLP 诱导的脓毒症 ALI 具有保护作用,其机制可能与抑制焦亡信号通路及降低炎症因子的表达相关。

参考文献:

[1] SINGER M, DEUTSCHMAN C S, SEYMOUR C W, *et al*. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3)[J]. JAMA, 2016, 315(8): 801-810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.

[2] WU R, DONG W, ZHOU M, *et al*. Ghrelin attenuates sepsis-induced acute lung injury and mortality in rats[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 176(8): 805-813. DOI: 10.1164/rccm.200604-511OC.

[3] WONG J J, JIT M, SULTANA R, *et al*. Mortality in pediatric acute respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis[J]. J Intens Care Med, 2019, 34(7): 563-571. DOI: 10.1177/0885066617705109.

[4] RUDD K E, JOHNSON S C, AGESA K M, *et al*. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the global burden of disease study[J]. Lancet, 2020, 395(10219): 200-211. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)32989-7.

[5] ROWAN C M, SMITH L S, LOOMIS A, *et al*. Pediatric acute respiratory distress syndrome in pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplants: a multicenter study[J]. Pediatr Crit Care Med, 2017, 18(4): 304-309. DOI: 10.1097/PCC.0000000000001061.

[6] LIU Y, JING Y Y, ZENG C Y, *et al*. Scutellarin suppresses NLRP3 inflammasome activation in macrophages and protects mice against bacterial sepsis[J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 975. DOI: 10.3389/fphar.2017.00975.

[7] CHEN Y L, XU G, LIANG X, *et al*. Inhibition of hepatic cells pyroptosis attenuates CLP-induced acute liver injury[J]. Am J Transl Res, 2016, 8(12): 5685-5695.

[8] JORGENSEN I, MIAO E A. Pyroptotic cell death defends

against intracellular pathogens[J]. Immunol Rev, 2015, 265(1): 130-142. DOI: 10.1111/imr.12287.

[9] NARULA T, DEBOISBLANC B P. Ghrelin in critical illness [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2015, 53(4): 437-442. DOI: 10.1165/rcmb.2014-0226TR.

[10] AMITANI M, AMITANI H, CHENG K C, *et al*. The role of ghrelin and ghrelin signaling in aging[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(7): 1511. DOI: 10.3390/ijms18071511.

[11] ZHU H, LUO P, FU Y, *et al*. Dihydromyricetin prevents cardiotoxicity and enhances anticancer activity induced by adriamycin[J]. Oncotarget, 2015, 6(5): 3254-3267. DOI: 10.18632/oncotarget.2410.

[12] LI K, YANG J, HAN X. Ketamine attenuates sepsis-induced acute lung injury via regulation of HMGB1-RAGE pathways[J]. Int Immunopharmacol, 2016, 34: 114-128. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.01.021.

[13] ZHOU J, TIAN H, DU X, *et al*. Population-based epidemiology of sepsis in a subdistrict of beijing[J]. Crit Care Med, 2017, 45(7): 1168-1176. DOI: 10.1097/CCM.0000000000002414.

[14] 王照良, 张文玲, 黄涛, 等. 动态联合监测血清淀粉样蛋白A、血清可溶性髓系细胞触发受体-1、D-二聚体对Sepsis患者预后的评估价值:前瞻性巢式病例对照研究[J]. 协和医学杂志, 2020, 11(1): 34-39. DOI: 10.3969/j.issn.1674-9081.20190051.
WANG Z L, ZHANG W L, HUANG T, *et al*. Value of dynamic combined monitoring of serum amyloid a protein, soluble triggering receptor expressed on myeloid cell-1, and D-dimer in evaluating the prognosis of patients with sepsis: a prospective nested case-control study[J]. Med J PUMCH, 2020, 11(1): 34-39. DOI: 10.3969/j.issn.1674-9081.20190051.

[15] SHI J, ZHAO Y, WANG K, *et al*. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death[J]. Nature, 2015, 526(7575): 660-665. DOI: 10.1038/nature15514.

[16] WU D, PAN P, SU X, *et al*. Interferon regulatory factor-1 mediates alveolar macrophage pyroptosis during LPS-induced acute lung injury in mice[J]. Shock, 2016, 46(3): 329-338. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000595.

[17] KAYAGAKI N, STOWE I B, LEE B L, *et al*. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling[J]. Nature, 2015, 526(7575): 666-671. DOI: 10.1038/nature15541.

[18] ZHANG L N, GONG W D, LUO J, *et al*. Exogenous ghrelin ameliorates acute lung injury by modulating the nuclear factor kappaB inhibitor kinase/nuclear factor kappaB inhibitor/nuclear factor kappaB pathway after hemorrhagic shock [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 69: 95-102. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.01.019.

[19] NIKITOPOULOU I, KAMPISIOULI E, JAHAJ E, *et al*. Ghrelin alterations during experimental and human sepsis [J]. Cytokine, 2020, 127: 154937. DOI: 10.1016/j.cyto.2019.154937.

[20] TIAN X, LIU Z, YU T, *et al*. Ghrelin ameliorates acute lung injury induced by oleic acid via inhibition of endoplasmic reticulum stress[J]. Life Sci, 2018, 196: 1-8. DOI: 10.1016/j.lfs.2017.07.023.

[21] SONG F, HOU J, CHEN Z, *et al*. Sphingosine-1-phosphate receptor 2 signaling promotes caspase-11-dependent macrophage pyroptosis and worsens Escherichia coli sepsis outcome [J]. Anesthesiology, 2018, 129(2): 311-320. DOI: 10.1097/ALN.0000000000002196.

[22] SHAO X F, LI B, SHEN J, *et al*. Ghrelin alleviates traumatic brain injury-induced acute lung injury through pyroptosis/NF-kappaB pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 79: 106175. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.106175.

[23] WANG Y, AN R, UMANAH G K, *et al*. A nuclease that mediates cell death induced by DNA damage and poly(ADP-ribose) polymerase-1[J]. Science, 2016, 354(6308): aad6872. DOI: 10.1126/science.aad6872.

[24] LIU F, LI Z, HE X, *et al*. Ghrelin attenuates neuroinflammation and demyelination in experimental autoimmune encephalomyelitis involving NLRP3 inflammasome signaling pathway and pyroptosis[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 1320. DOI: 10.3389/fphar.2019.01320.

(**收稿**:2020-11-16;**修回**:2021-01-15)

(编辑 张 维)