

# 芦丁对小鼠脓毒症多器官功能障碍的作用与机制研究

晏竹林<sup>▲</sup> 吴伏鹏<sup>▲</sup> 李海东<sup>△</sup>

(复旦大学附属闵行医院急诊科 上海 201199)

**【摘要】** 目的 探究芦丁对脓毒症小鼠多器官损伤的影响并从炎症角度探究其机制。方法 雄性C57BL/6小鼠分为正常对照组(sham)、盲肠结扎穿孔(cecal ligation and puncture, CLP)组、芦丁低剂量(25 mg/kg)组、芦丁中剂量(50 mg/kg)组和芦丁高剂量(100 mg/kg)组,每组20只。所有小鼠8周龄时开始每天灌胃给药7天(芦丁各剂量组给予对应剂量的药物, sham组和CLP组给予相同体积的生理盐水), 随后通过CLP诱导小鼠脓毒症。分析小鼠生存率;通过HE染色分析小鼠肺、肝、肾病理损伤;测量小鼠肺系数与肺湿干重(wet/dry, W/D)比;检测小鼠血清中谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、肌酐(creatinine, CRE)、尿素氮(urea nitrogen, BUN)含量;检测小鼠尿蛋白含量;RT-qPCR检测小鼠组织肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、IL-6的mRNA水平;Western blot分析JAK2-STAT3信号通路的活化情况。结果 芦丁降低脓毒症小鼠的死亡率,减轻其肝、肺、肾损伤并改善肝、肺、肾功能,抑制组织JAK2-STAT3信号通路的活化并减少促炎因子的mRNA表达。结论 芦丁可能通过抑制JAK2-STAT3信号通路的活化减轻炎症,对脓毒症小鼠的肝、肺、肾损伤具有保护作用。

**【关键词】** 芦丁; 脓毒症; 多器官功能障碍; 炎症; 小鼠

**【中图分类号】** R631.2 **【文献标志码】** A **doi:**10.3969/j.issn.1672-8467.2025.02.009

## The mechanism of *Rutin* on multiple organ dysfunction induced by sepsis in mice

YAN Zhu-lin<sup>▲</sup>, WU Fu-peng<sup>▲</sup>, LI Hai-dong<sup>△</sup>

(Department of Emergency, Minhang Hospital, Fudan University, Shanghai 201199, China)

**【Abstract】** **Objective** To explore the effects of *Rutin* on multiple organ damage in septic mice and to investigate its mechanism from the perspective of inflammation. **Methods** Male C57BL/6 mice were divided into the normal control (sham) group, cecal ligation and puncture (CLP) group, low-dose *Rutin* group (25 mg/kg), medium-dose *Rutin* group (50 mg/kg), and high-dose *Rutin* group (100 mg/kg), there are 20 mouse in each group. All mice were given gavage daily for 7 days starting at 8 weeks of age (the *Rutin* groups were administered the corresponding doses of the drug, while the sham and CLP groups were given the same volume of saline). Subsequently, sepsis was induced in mice by CLP. The survival rate of mice was analyzed; pathological damage of the lungs, liver, and kidneys in mice was assessed by HE staining; the lung coefficient and wet/dry (W/D) ratio of the lungs were measured; the levels of alanine transaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatinine (CRE), and urea nitrogen

国家自然科学基金青年项目(82302420);上海市卫健委科研课题青年项目(20234Y0227)

<sup>▲</sup>YAN Zhu-lin and WU Fu-peng contributed equally to this work

<sup>△</sup>Corresponding author E-mail: 755936186@qq.com

网络首发时间:2025-03-03 17:50:45 网络首发地址:https://link.cnki.net/urlid/31.1885.R.20250303.1138.002

(BUN) in mouse serum were detected; the content of urinary protein in mice was measured; the mRNA levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and IL-6 in mouse tissues were detected by RT-qPCR; and the activation of the JAK2-STAT3 signaling pathway was analyzed by Western blot. **Results** Rutin reduced the mortality rate of septic mice, alleviated liver, lung, and kidney damage, improved liver, lung, and kidney functions, inhibited the activation of the JAK2-STAT3 signaling pathway in tissues, and reduced the mRNA expression of pro-inflammatory factors. **Conclusion** Rutin may alleviate inflammation by inhibiting the activation of the JAK2-STAT3 signaling pathway, and has a protective effect on liver, lung, and kidney damage in septic mice.

**【Key words】** Rutin; sepsis; multiple organ dysfunction; inflammation; mice

\* This work was supported by the Youth Program of National Natural Science Foundation of China (82302420) and the Youth Program of Scientific Research Project of Shanghai Municipal Health Commission (20234Y0227).

脓毒症是一种由感染引起的全身炎症反应综合征,常见于严重创伤或感染性疾病患者<sup>[1]</sup>。发病因素主要是细菌、真菌、病毒及寄生虫等引起的感染,导致机体炎症反应及免疫调节失衡<sup>[2]</sup>。全球每年脓毒症患病人数超过1 900万,其中约600万患者死亡<sup>[3]</sup>。我国脓毒症年发病率为16.78/10万人,在ICU患者中脓毒症占比为20.6%,在住院患者中占比0.29%<sup>[4]</sup>。由此导致的病死率居高不下,28天病死率高达31.87%,90天病死率为35.49%<sup>[4]</sup>。此外,脓毒症通常会造成严重的不良预后,并带来沉重的社会负担<sup>[1]</sup>。

目前临床上对于脓毒症的治疗手段十分有限,主要为液体复苏、器官支持和抗感染治疗等,然而这些治疗效果并不能令人满意<sup>[5]</sup>。随着我国传统中医药的发展,越来越多的中药被用于脓毒症的临床治疗。芦丁(Rutin),也称芸香苷或维生素P,分子式为 $C_{27}H_{30}O_{16}$ ,是一种天然黄酮苷,广泛分布于芸香叶、烟叶、枣、杏、橙皮、番茄和荞麦花等植物中<sup>[6]</sup>。既往研究<sup>[7-9]</sup>表明,芦丁在抗炎、抗氧化、抗过敏和抗病毒等方面均有活性。然而其对于脓毒症多器官损伤的作用我们知之甚少,本文通过盲肠结扎穿孔(cecal ligation and puncture, CLP)构建小鼠脓毒症模型,探究芦丁对脓毒症多器官损伤的作用。

## 材料和方 法

**实验动物** 雄性C57BL/6小鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司(实验动物生产许可证:SCXK(沪)2014-0004),分笼饲养于复旦大学药学院SPF级动物房。饲养温度20~24℃,湿度50%±5%。给予灭菌饲料和灭菌水由小鼠自由摄取。所有小

鼠实验前适应性饲养7天。

**药品与试剂** 芦丁(纯度>97%)购于大连美仑生物技术有限公司。谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)测定试剂盒(C010-1)、谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)测定试剂盒(C009-1)、肌酐(creatinine, CRE)测定试剂盒(C011-2-1)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)测试盒(C013-2-1)和尿蛋白定量测试盒(CBB法)(C035-2-1)均购于南京建成生物工程研究所。小鼠IL-6 ELISA、小鼠肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )ELISA(1211002)试剂盒均购于达科为生物技术有限公司。抗-p-JAK2抗体(3776,批号:201403)购于美国Cell Signaling Technology公司。抗-p-STAT3抗体(610189,批号:2326685)购于美国Becton Dickinson公司。anti- $\beta$ -actin(AF0003)购于上海碧云天生物技术有限公司。

**动物分组、造模与给药** 根据文献<sup>[7]</sup>和预实验结果确定给药剂量,所有小鼠按体质量随机分为5组(每组20只),分别为正常对照(sham)组、CLP组、芦丁低剂量(25 mg/kg)组、芦丁中剂量(50 mg/kg)组和芦丁高剂量(100 mg/kg)组。所有药物用生理盐水溶解,所有小鼠8周龄时开始每天灌胃给药(芦丁各剂量组给予对应剂量的药物,sham组和CLP组给予相同体积的生理盐水),连续给药7天。7天后,所有小鼠进行CLP或sham手术。CLP手术的步骤如下:小鼠置于麻醉室中,通过面罩以1 L/min的速率将3%的异氟醚输送到氧气里,以此对小鼠实施麻醉;术前5 min给予丁丙诺啡(0.05 mg/kg)进行镇痛;在小鼠前腹部的中线切口暴露盲肠,在盲肠远端约0.5 cm处结扎,并在结扎段用22 G针刺穿一

次并挤出少量粪便;然后重新复位盲肠,皮下注射 1 mL 无菌生理盐水,缝合切口。sham 组仅进行腹部切口并缝合,不进行 CLP 手术<sup>[10]</sup>。

实验严格按照国际伦理准则、《实验动物—福利通则》(中华人民共和国国家标准,GB/T 42011—2022)进行。对动物实施安乐死的具体标准符合 Remick 实验室报告<sup>[11]</sup>。所有方案均经上海市闵行区中心医院动物伦理委员会批准(批准号:K2023-008)。所有动物实验研究都遵循 ARRIVE 指南<sup>[12]</sup>。

**生存率分析** 小鼠接受芦丁(25、50、100 mg/kg)连续给药后 7 天,通过 CLP 诱导脓毒症。每天记录并统计存活的小鼠数量,持续 7 天。通过 GraphPad Prism 软件中的 log-rank 检验分析存活率,利用 Prism 软件中的 Kaplan-Meier 方法自动生成每组小鼠的生存曲线。

**尿蛋白浓度测定** 通过提尾反射法收集小鼠尿液,将小鼠轻轻固定,使用无菌棉签轻触小鼠的生殖器区域以刺激小鼠排尿。尿液排出时,使用经灭菌的 EP 管收集尿液,并将收集到的尿液样品轻轻摇匀。采用尿蛋白检测试剂盒检测小鼠尿蛋白浓度。用双蒸水调零,以 563 mg/L 蛋白标准液为标准,吸取 5  $\mu$ L 尿液样品与 300  $\mu$ L 考马斯亮蓝试剂充分混匀后,室温反应 5 min,使用多功能酶标仪在波长 595 nm 处读取 *D* 值,并根据使用说明书的公式计算尿液中的蛋白质浓度。

**AST、ALT、CRE 与 BUN 检测** 用试剂盒检测实验结束时小鼠血清中 CRE、BUN、ALT、AST 的含量,按照试剂盒说明书操作。

**肺湿干比重(W/D)与肺系数的测定** 小鼠处死后采集肺组织,使用滤纸擦拭肺组织表面,去除多余的液体,然后迅速称重以获取肺组织的湿重。将肺组织放置于 80  $^{\circ}$ C 的烘箱中干燥 72 h,以去除组织中的水分,再次称量肺组织即获得干重。计算湿重干重的比值即 W/D。肺系数=肺湿重(g)/体重(g) $\times$ 100。

**Western blot** 分离小鼠肺、肝、肾的相同部分并使用 RIPA 裂解液进行裂解以提取总蛋白,使用 BCA 法对提取的蛋白进行定量。将等量的总蛋白通过 10% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离。电泳完成后,将含有分离蛋白的凝胶转移到硝酸纤维素膜上。使用 5% 脱脂奶粉在室温下孵育 2 h。将膜与特异性识别目标蛋白的一抗 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。使用 TBST 洗涤 3 次后在室温下孵育二抗 1 h。

TBST 洗涤 3 次后化学发光检测膜上的蛋白条带,使用成像系统捕获图像,并用 ImageJ 软件进行分析<sup>[13]</sup>。

**RNA 分离和 RT-qPCR** 分离小鼠肺、肝、肾的相同部分在液氮中研磨后加入 Trizol 裂解。向裂解后的样本中加入氯仿,体积为 Trizol 的 1/5,剧烈混合后室温静置,然后离心(4  $^{\circ}$ C, 12 000 $\times$ g, 10 min)以分离有机和水相。将上层水相小心转移至新的 EP 管中。加入等体积的异丙醇,混匀后室温孵育 10 min。离心(4  $^{\circ}$ C, 12 000 $\times$ g, 10 min)后,用预冷的 75% 乙醇洗涤 RNA 沉淀并离心(4  $^{\circ}$ C, 7 500 $\times$ g, 5 min)。室温下干燥后加入 DEPC 水溶解。RNA 经逆转录后,在实时荧光定量 PCR 检测系统(Bio-Rad)中使用 SYBR 进行实时荧光定量 PCR。PCR 程序包括在 95  $^{\circ}$ C 下初始变性 30 s, 95  $^{\circ}$ C、5 s 循环 40 次, 60  $^{\circ}$ C、30 s。引物序列如下: $\beta$ -Actin, 上游引物 5'-CTGTCCCTGTATGCCTCTG-3', 下游引物 5'-ATGTCACGCACGATTTCC-3'; TNF- $\alpha$ , 上游引物 5'-AGGCTGCCCGACTACGT-3', 下游引物 5'-GACTTTCTCCTGGTATGAGATAGCAAA-3'; IL-6, 上游引物 5'-ACAAGTCGGAGGCTTAATTACACAT-3', 下游引物 5'-TTGCCATTGCACTCTTTC-3'。

**肺、肝、肾脏病理学检测** 取小鼠左侧肾、左叶肺、左叶肝,于 4% 多聚甲醛中固定,固定后的组织样本经过梯度乙醇(70%、80%、95%、100%)进行脱水处理后,在二甲苯中进行透明处理。透明后的组织块在恒温箱中用石蜡逐渐替换二甲苯,完成透蜡过程。然后将组织块包埋在熔化的石蜡中,冷却硬化后形成包埋块。使用切片机将包埋好的组织块切成薄片后使用苏木精染核和伊红染胞浆。染色后的切片在显微镜下观察并由病理科医师进行病理评分。

**统计学分析** 通过 GraphPad Prism 软件中的 log-rank 检验分析存活率。其他数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 SPSS 13.0 软件分析数据,多组数据之间的比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

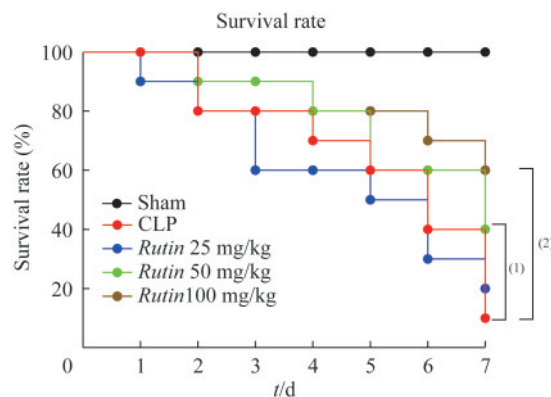
## 结 果

**芦丁提高 CLP 诱导的脓毒症小鼠的生存率** 雄性 C57BL/6 小鼠灌胃给药芦丁(25、50、100 mg/kg)

7天,然后经CLP诱导脓毒症,统计小鼠生存率。结果显示,芦丁25 mg/kg组与CLP组生存率无显著性差异。而相比于CLP组,芦丁50、100 mg/kg组则显著提高了脓毒症小鼠的生存率( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,图1)。这一结果表明,中高剂量芦丁预处理(50、100 mg/kg)可以使CLP诱导的脓毒症小鼠生存率有明显提高。

**芦丁缓解CLP诱导的小鼠脓毒症体重体温下降** 小鼠灌胃给药芦丁(25、50、100 mg/kg)7天后经CLP诱导脓毒症,随后24 h测量小鼠的体温和体重变化。结果显示,相比于sham组,CLP组小鼠体重和体温显著下降,25 mg/kg组相比CLP组有一定提高但差异没有统计学意义,而芦丁50、100 mg/kg组的体重、体温下降幅度显著低于CLP组(图2)。

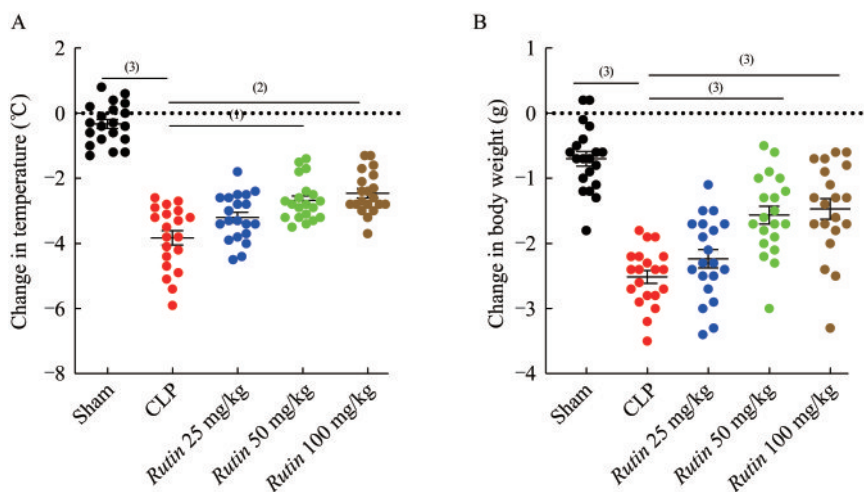
**芦丁改善CLP诱导的脓毒症小鼠肾损伤** 小鼠灌胃给药芦丁(25、50、100 mg/kg)7天后经CLP诱导脓毒症,随后24 h分离小鼠肾脏并HE染色,结果显示,CLP组小鼠肾脏出现严重的肾小球、肾间质及血管病理损伤,肾小球硬化,部分向内凹陷,大量细胞浸润在血管周及间质区域,肾小球出现严重的肿胀和增生,而各剂量芦丁组小鼠肾病理均有所改善(图3A)。



Survival analysis was performed using the Kaplan-Meier method. <sup>(1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>(2)</sup> $P < 0.01$ .

图1 芦丁对脓毒症小鼠生存率的影响  
Fig 1 Effect of *Rutin* on survival rate of sepsis mice

取小鼠外周血并分离血清,检测CRE、BUN;收集小鼠尿液并检测尿蛋白含量。结果显示,相比于sham组,CLP组小鼠CRE、BUN与尿蛋白水平显著上升,芦丁各剂量组相比CLP组均有下降,其中芦丁50、100 mg/kg组的下降幅度显著低于CLP组,并有一定的剂量依赖性( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ,图3B~3D)。说明芦丁可剂量依赖性地改善脓毒症小鼠的肾功能。



Body weight (A) and body temperature (B) of each group of mice. <sup>(1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>(2)</sup> $P < 0.01$ , <sup>(3)</sup> $P < 0.001$ . CLP: Cecal ligation and puncture.

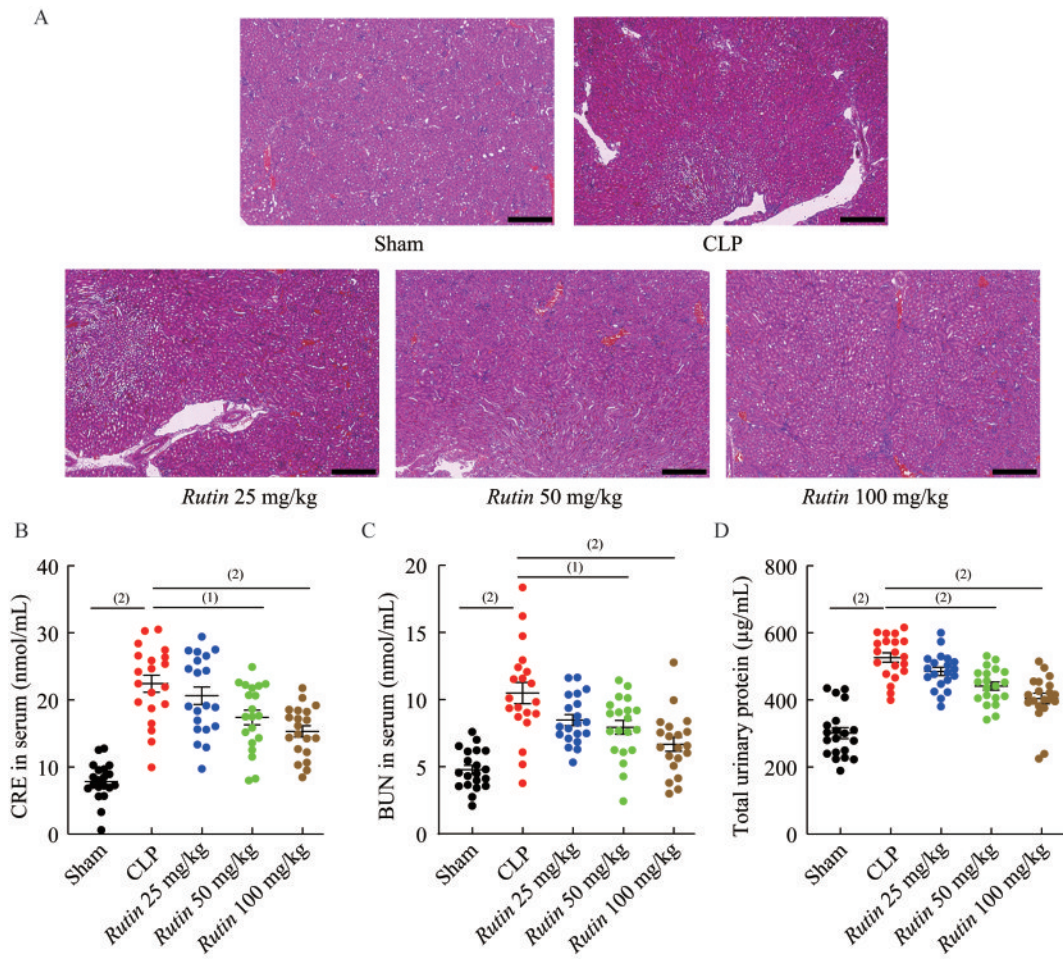
图2 芦丁对脓毒症小鼠体重体温的影响

Fig 2 Effect of *Rutin* on body weight and body temperature in mice with sepsis

**芦丁通过抑制JAK2-STAT3信号通路减轻脓毒症小鼠的肾脏炎症** 提取各组小鼠肾脏组织总RNA并检测TNF- $\alpha$ 、IL-6的mRNA表达水平;提取肾脏组织总蛋白并检测JAK2-STAT3通路的激活情况。结果显示,相比于sham组,CLP组小鼠肾组织的JAK2-STAT3通路明显激活,TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA水平显著上升。而芦丁各剂量组TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA水平

相比CLP组均有降低,且P-JAK2、P-STAT3的水平也有所下降。其中芦丁50、100 mg/kg组与CLP组具有显著性差异,并具有一定的剂量依赖关系(图4)。说明芦丁可通过抑制JAK2-STAT3通路激活从而剂量依赖性地改善脓毒症小鼠的肾脏炎症水平。

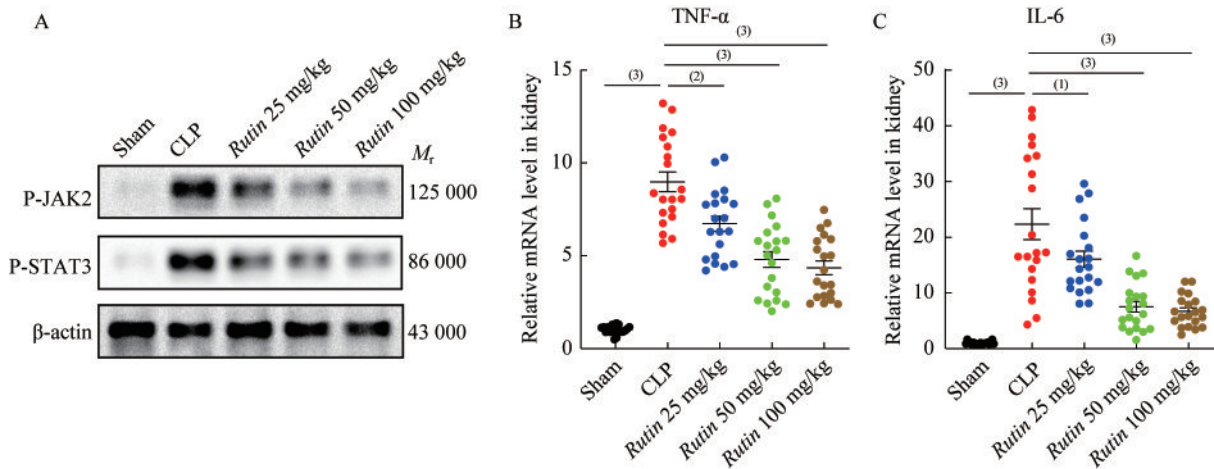
**芦丁改善CLP诱导的脓毒症小鼠肝功能** 小鼠经CLP诱导脓毒症后24 h分离小鼠肝脏并HE染



A: Representative images (scale bars=100 μm) of HE staining; B: CRE; C: BUN; D: Total urine protein. <sup>(1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>(2)</sup> $P < 0.001$ . CRE: Creatinine; BUN: Blood urea nitrogen.

图3 芦丁对脓毒症小鼠肾损伤的影响

Fig 3 Effect of *Rutin* on renal injury in mice with sepsis



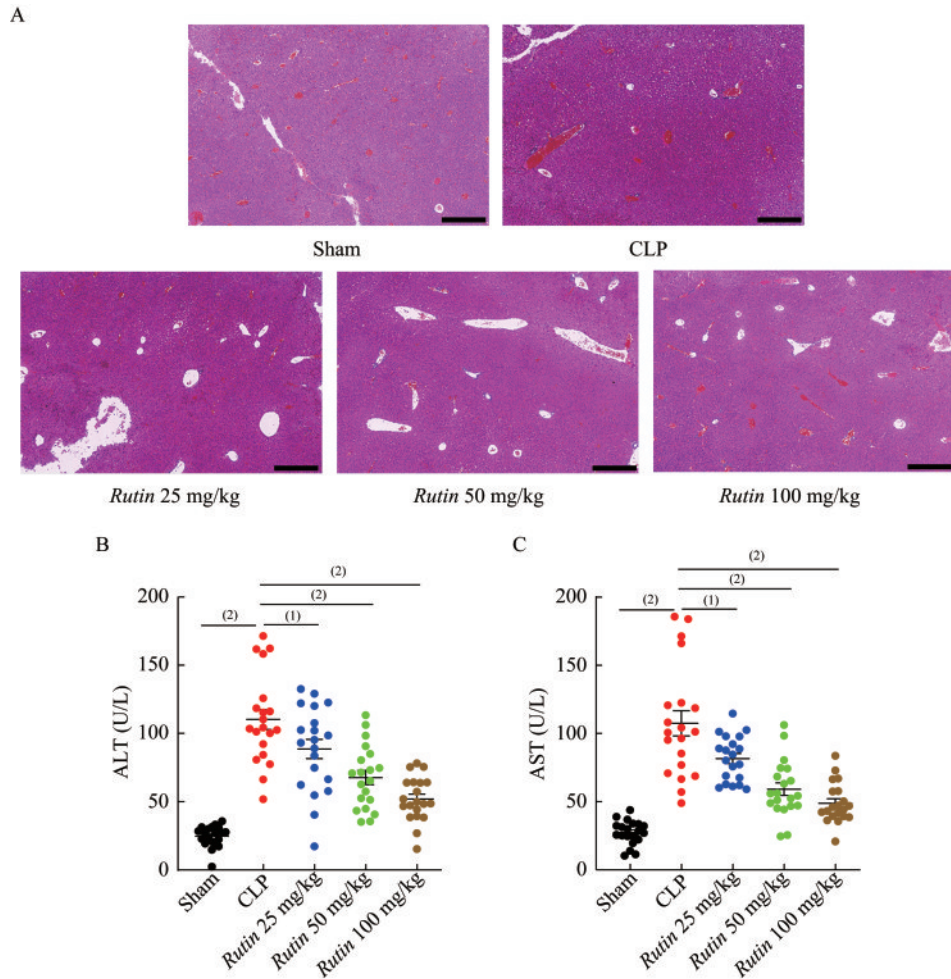
A: Protein levels of P-JAK2 and P-STAT3 in renal tissues of mice in each group; B and C: mRNA levels of TNF-α (B) and IL-6 (C) in kidney. <sup>(1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>(2)</sup> $P < 0.01$ , <sup>(3)</sup> $P < 0.001$ .

图4 芦丁对脓毒症小鼠肾脏炎症的影响

Fig 4 Effect of *Rutin* on renal inflammation in mice with sepsis

色,结果显示,CLP组小鼠肝脏过度充血,肝细胞脂肪变性,肝小叶结构破坏,纤维化严重,而各剂量芦丁组小鼠肝脏病理状况均有所改善(图5A)。取小鼠外周血并分离血清,检测ALT、AST水平。结果显示,相比于sham组,CLP组小鼠ALT、AST水平显著上

升,芦丁各剂量组相比CLP组均有下降且随着剂量的提高下降幅度增加,其中芦丁50、100 mg/kg组的下降幅度显著低于CLP组( $P<0.05$ , $P<0.001$ ,图5B、5C)。说明芦丁可剂量依赖性地改善脓毒症小鼠的肝功能。



A: Representative images (scale bars=100  $\mu$ m) of HE staining; B: ALT; C: AST. <sup>(1)</sup> $P<0.01$ , <sup>(2)</sup> $P<0.001$ . ALT: Alanine transaminase; AST: Aspartate aminotransferase.

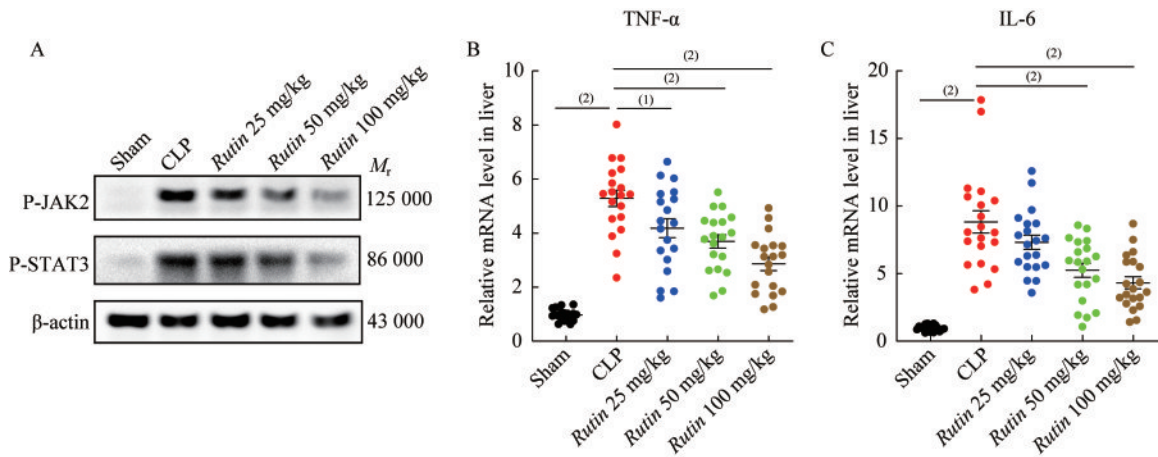
图5 芦丁对脓毒症小鼠肝损伤的影响

Fig 5 Effect of *Rutin* on liver injury in mice with sepsis

芦丁通过抑制 JAK2-STAT3 信号通路减轻脓毒症小鼠的肝脏炎症 提取各组小鼠肝脏组织总 RNA 并检测 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的 mRNA 表达水平;提取肝脏组织总蛋白并检测 JAK2-STAT3 通路的激活情况。结果显示,相比于 sham 组,CLP 组小鼠肝组织的 TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA 水平显著上升, JAK2-STAT3 通路明显激活。而芦丁各剂量组 TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA 水平相比 CLP 组均有降低,且 P-JAK2、P-STAT3 的水平也有所下降,并呈现出剂量依赖关系。其中芦丁 50、100 mg/kg 组的 TNF- $\alpha$ 、IL-6

mRNA 水平和 JAK2-STAT3 通路激活水平与 CLP 组有显著性差异(图 6)。说明芦丁可通过抑制 JAK2-STAT3 通路激活从而剂量依赖性地改善脓毒症小鼠的肝脏炎症水平。

芦丁减轻 CLP 诱导的脓毒症小鼠肺损伤 雄性 C57BL/6 小鼠灌胃给药芦丁(25、50、100 mg/kg) 7 天后经 CLP 诱导脓毒症,随后 24 h 分离小鼠肺组织并 HE 染色,结果显示,CLP 组小鼠肺泡及毛细血管损伤严重,而各剂量芦丁组小鼠肺部病理损伤均有所改善(图 7A)。CLP 组小鼠 W/D 比与肺系数显



A: Protein levels of P-JAK2, P-STAT3 in liver tissues of mice in each group; B and C: mRNA levels of TNF- $\alpha$  (B) and IL-6 (C). <sup>(1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>(2)</sup> $P < 0.001$ .

图6 芦丁对脓毒症小鼠肝脏炎症的影响

Fig 6 Effect of Rutin on liver inflammation in mice with sepsis

著高于 sham 组,而芦丁各剂量组相比 CLP 组均有下降,且芦丁 50、100 mg/kg 组的肺 W/D 比值与肺系数显著低于 CLP 组,并具有一定剂量依赖性( $P < 0.001$ ,图 7B、7C)。说明芦丁可剂量依赖性地减轻脓毒症小鼠的肺损伤。

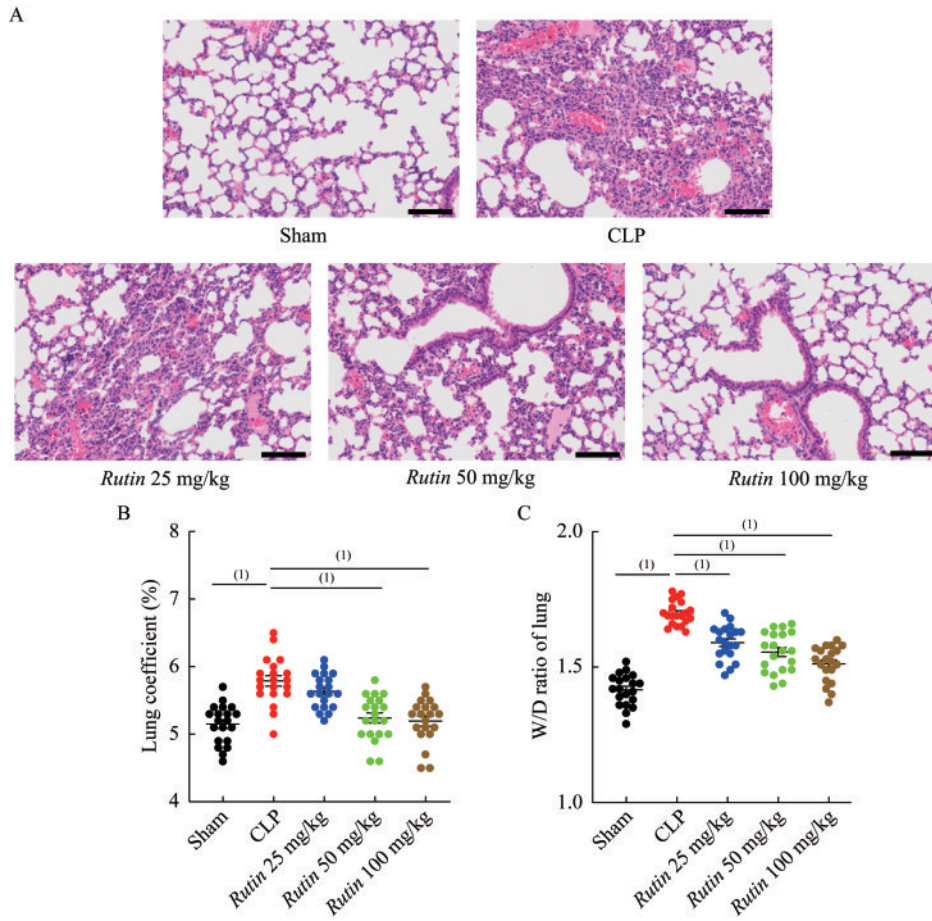
**芦丁通过抑制 JAK2-STAT3 信号通路减轻脓毒症小鼠的肺部炎症** 提取各组小鼠肺组织总 RNA 并检测 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的 mRNA 表达水平;提取肺组织总蛋白并检测 JAK2-STAT3 通路的激活情况。结果显示,CLP 组小鼠的 TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA 水平相比于 sham 组显著上升,JAK2-STAT3 通路相比于 sham 组明显激活。芦丁各剂量组 TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA 水平相比 CLP 组均有降低,且 P-JAK2、P-STAT3 的水平也有所下降,其中芦丁 50、100 mg/kg 组的 TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA 水平和 P-JAK2、P-STAT3 水平与 CLP 组相比,差异有统计学意义(图 8)。说明芦丁可通过抑制 JAK2-STAT3 通路激活从而剂量依赖性地降低脓毒症小鼠的肺部炎症水平。

## 讨 论

脓毒症是一种由感染引起的全身性炎症反应综合征,常常伴随多器官损伤,最终可能发展为多器官功能障碍综合征,是脓毒症患者的常见并发症和重要死亡原因<sup>[14]</sup>。脓毒症导致多器官功能障碍的主要原因包括炎症、感染、损伤、灌注不足和高代谢等<sup>[15]</sup>。多器官功能障碍发生过程中,炎症反应起

到了关键的作用。首先,当脓毒症发生时,病原体及其毒素进入血液循环系统,会导致感染引发机体的免疫反应,导致 JAK2 激活并磷酸化 STAT3,磷酸化的 STAT3 会形成二聚体并转位到细胞核内,可以调控多种炎症相关基因的表达,导致 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等炎症介质被大量释放,过度激活的炎症因子会进一步加重全身炎症反应,激活凝血系统,导致微循环障碍和细胞代谢紊乱,进而导致血管扩张、血管通透性增加、白细胞黏附与渗出等病理生理变化<sup>[16]</sup>。这会进一步损伤内皮细胞,破坏血管完整性,导致组织器官的低灌注和缺氧,从而引发多器官功能障碍。此外,发生脓毒症时,机体抗氧化能力下降,氧化应激反应增强,导致大量氧自由基的产生,进一步损伤组织细胞,加重肺、肝、肾等多器官功能障碍<sup>[17]</sup>。

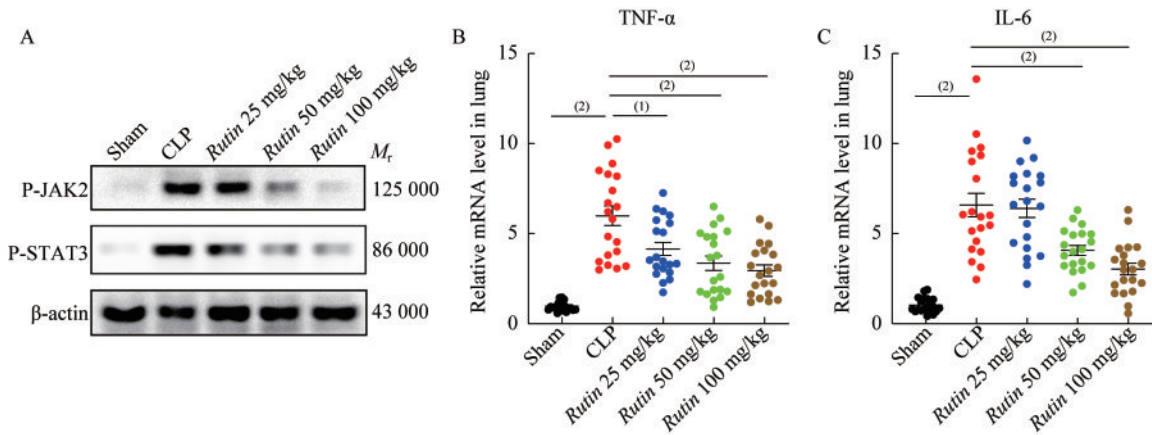
肾脏是重要的排泄器官,参与多种生理过程如电解质平衡、血压调节、酸碱平衡等的调节。CRE 是肌肉代谢的产物,大部分由肾脏排泄。肾脏功能正常时,血液中的 CRE 浓度相对稳定,而当肾脏损伤尤其是肾小球滤过功能减退时,血液中的 CRE 浓度会升高<sup>[18]</sup>。尿素是肝脏中蛋白质代谢的终产物,主要通过肾脏排泄,当肾脏损伤时,尿素排泄能力下降,可导致 BUN 浓度升高。肾小球对大分子蛋白质有选择性的通过作用,因而肾功能正常时尿液中的蛋白量很少。当肾小球滤过膜损伤时,大量蛋白质可能会从尿液中漏出,表现为尿蛋白增多<sup>[19]</sup>。本研究中,CLP 诱导的脓毒症小鼠血清中 CRE、



A: Representative images (scale bars=50 μm) of HE staining; B: Lung coefficient; C: W/D ratio of lung. <sup>(1)</sup>*P*<0.001.

图7 芦丁对脓毒症小鼠肺损伤的影响

Fig 7 Effect of *Rutin* on lung injury in mice with sepsis



A: Protein levels of P-JAK2, P-STAT3 in lung tissues of mice in each group; B and C: mRNA levels of TNF-α (B) and IL-6 (C). <sup>(1)</sup>*P*<0.01, <sup>(2)</sup>*P*<0.001.

图8 芦丁对脓毒症小鼠肺部炎症的影响

Fig 8 Effect of *Rutin* on lung inflammation in mice with sepsis

BUN浓度显著升高,尿蛋白显著增多,表明脓毒症造成了小鼠严重的肾损伤。脓毒症引起的肾脏损伤与炎症反应密切相关。炎症细胞的浸润和炎症

介质的释放可能导致肾小球滤过功能的损害。而芦丁可以剂量依赖性地降低小鼠的CRE、BUN浓度和尿蛋白水平,表明芦丁可以剂量依赖性地改善

脓毒症小鼠的肾功能。而这一作用很可能与芦丁抑制了 JAK2-STAT3 信号通路从而缓解肾脏炎症相关,具体机制需进一步探讨。考虑到肾脏由多种细胞类型组成,包括肾小管上皮细胞、肾间质成纤维细胞和内皮细胞等,芦丁起抗炎作用的具体细胞种类需要进一步确定。除了 CRE 和 BUN,我们后续还可以检测其他肾脏损伤的生物标志物,如肾脏损伤分子-1、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白等,以更全面地评估肾脏损伤的程度,同时进一步探讨脓毒症 JAK2-STAT3 激活的抑制对脓毒症肾损伤改善的机制。

ALT 和 AST 主要分布在肝脏中,其中 ALT 主要分布于肝细胞的胞质,而 AST 则主要分布于肝细胞线粒体。正常情况下,这两种酶在血清中的含量很低。然而当肝细胞受损时,细胞膜通透性增加,导致 ALT 和 AST 从肝细胞内释放到血液中,使得血清中的这两种酶活性升高<sup>[20-21]</sup>。本研究中,CLP 诱导的脓毒症小鼠血清中 ALT 和 AST 显著升高,表明随着脓毒症的进展,小鼠出现严重的肝损伤,导致严重的肝功能障碍。后续将进一步检测其他血清标志物,如碱性磷酸酶、 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶和总胆红素等,对肝损伤和肝功能障碍进行更深入的评估。脓毒症引起的肝损伤与炎症反应密切相关,炎症细胞的浸润和炎症介质的释放可能导致肝细胞损伤。研究炎症细胞在肝脏中的分布和活化状态对于理解炎症在肝损伤中的作用至关重要。本研究中,肝脏部位 JAK2-STAT3 信号通路高度激活, TNF- $\alpha$ 、IL-6 的 mRNA 表达水平显著上升,提示脓毒症过程中肝脏炎症浸润很可能是导致肝损伤及肝功能障碍的重要原因。而提前给予芦丁可以降低肝脏 JAK2-STAT3 信号通路的激活水平并减少促炎因子的表达,这也可能是缓解小鼠肝损伤并保护其肝功能的关键因素。

正常情况下,肺系数和 W/D 比会保持相对稳定。然而,当肺部受到损伤或发生水肿时,肺部组织间隙中积聚过多的液体,导致肺湿重增加,进而使肺系数和 W/D 比升高<sup>[22-23]</sup>。肺系数和 W/D 比的升高程度与肺水肿的严重程度呈正相关<sup>[24]</sup>。肺泡液体的清除和分泌平衡对于维持肺部功能至关重要。研究芦丁对肺泡液体平衡调节机制的影响,如调节肺泡上皮细胞的离子通道和转运蛋白,可能揭示其减轻肺水肿的机制。本研究中,CLP 诱导的脓

毒症小鼠肺系数和 W/D 比显著升高,表明脓毒症导致小鼠的肺损伤严重。而肺组织 JAK2-STAT3 信号通路高度激活导致的 TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA 表达水平显著上升,很可能是造成肺损伤的关键原因。在炎症过程中,活化的免疫细胞和受损的组织细胞会释放多种细胞因子(如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ )和趋化因子,可以吸引更多的免疫细胞到损伤部位。炎症介质也可以增加血管的通透性,使得血液中的液体和蛋白质更容易渗出到周围组织。炎症介质还导致肺微血管内皮细胞和肺泡上皮细胞的损伤,破坏血管和肺泡的屏障功能<sup>[25]</sup>。而芦丁可以降低肺部 JAK2-STAT3 信号通路的活化程度并减少炎症浸润,这与其对脓毒症肺损伤的改善作用密切相关。

本研究中芦丁是在脓毒症诱导前给药,提前给药可以引起细胞的预适应反应,这种反应有助于增强细胞对后续应激或损伤的抵抗力,其抗炎特性有助于在炎症发生之前降低炎症反应的强度。然而在临床上,脓毒症的诊断往往存在延迟。因此,探索不同时间窗内芦丁治疗效果的研究具有重要意义。考虑到脓毒症幸存者可能会有长期的并发症,评估芦丁对肺、肝、肾等长期功能的保护作用,以及其是否能够减少慢性肺、肝、肾疾病的发生,是未来研究的重要方向。虽然芦丁显示出了潜在的治疗作用,但脓毒症的治疗可能需要综合多种策略。探索芦丁与其他药物或治疗方法的联合使用,可能会产生协同效应,提高治疗效果。

本研究也存在一些不足。研究仅观察了短期效果(24 h 后),没有评估芦丁对脓毒症小鼠长期生存和器官功能的影响;本研究结果需要在临床试验中进一步验证,以确定芦丁的安全性和有效性。

综上所述,芦丁可能通过抑制 JAK2-STAT3 信号通路的活化减轻炎症,而这对 CLP 诱导脓毒症小鼠的肝、肺、肾损伤具有保护作用,并改善多脏器功能。这显示了芦丁在抗炎方面的新功效,并展示出其对于脓毒症的治疗作用,同时也证明了其用于临床治疗的潜力。我们的研究很可能为脓毒症的治疗提供了新的天然中药单体。同时也为未来的研究提供了思路,包括扩大样本量、进行长期效果研究、探索芦丁对不同脓毒症亚型的影响。另外,我们也将设置不同时间点的干预组,以及对性别、年龄和遗传背景等可能的影响因素进行分析,以更全面地评估芦丁的效果。

**作者贡献声明** 晏竹林 实验设计, 数据分析, 论文撰写。吴伏鹏 论文撰写, 数据审查。李海东 实验设计, 论文撰写, 数据分析和审查。

**利益冲突声明** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] GONG T, LIU YT, FAN J. Exosomal mediators in sepsis and inflammatory organ injury: unraveling the role of exosomes in intercellular crosstalk and organ dysfunction [J]. *Mil Med Res*, 2024, 11(1):24.
- [ 2 ] MUSHTAQ A, KAZI F. Updates in sepsis management [J]. *Lancet Infect Dis*, 2022, 22(1):24.
- [ 3 ] KHETERPAL S, SINGH K, TOPOL EJ. Digitising the prediction and management of sepsis [J]. *Lancet*, 2022, 399(10334):1459.
- [ 4 ] KIRBY T. Surviving sepsis with multiple serious complications [J]. *Lancet Respir Med*, 2023, 11(4):317-318.
- [ 5 ] BROWN RM, WANG L, COSTON TD, et al. Semler, balanced crystalloids versus saline in sepsis. A secondary analysis of the SMART clinical trial [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 200(12):1487-1495.
- [ 6 ] GHORBANI A. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 96:305-312.
- [ 7 ] 李海东, 王旭, 王艺睿, 等. 芦丁通过抑制 JAK2-STAT3 信号通路活性改善 MRL/lpr 狼疮小鼠的肾损伤 [J]. *医药导报*, 2023, 42(2):160-166.
- [ 8 ] CHUA LS. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 150(3):805-817.
- [ 9 ] LIU XC, LIU M. Rutin improves diabetes-induced muscle atrophy in mice [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2023, 36(1):217-221.
- [ 10 ] LIU L, ZHANG S, WANG Y, et al. BIG1 controls macrophage pro-inflammatory responses through ARF3-mediated PI(4,5)P2 synthesis [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(5):374.
- [ 11 ] NEMZEK JA, XIAO HY, MINARD AE, et al. Humane endpoints in shock research [J]. *Shock*, 2004, 21(1):17-25.
- [ 12 ] PERCIE DU SERT N, HURST V, AHLUWALIA A, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research [J]. *PLoS Biol*, 2020, 18(7):e3000410.
- [ 13 ] SHEN W, GUAN YY, WU RM, et al. Protective effects of Wang-Bi tablet on bone destruction in collagen-induced arthritis by regulating osteoclast-osteoblast functions [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 238:111861.
- [ 14 ] VINCENT JL. Current sepsis therapeutics [J]. *EBioMedicine*, 2022, 86:104318.
- [ 15 ] PIERRAKOS C, VELISSARIS D, BILDORFF M, et al. Biomarkers of sepsis: time for a reappraisal [J]. *Crit Care*, 2020, 24(1):287.
- [ 16 ] ZANDERS L, KNY M, HAHN A, et al. Sepsis induces interleukin 6, gp130/JAK2/STAT3, and muscle wasting [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2022, 13(1):713-727.
- [ 17 ] WANG Y, CHU Y, DAI H, et al. Protective role of pretreatment with anisodamine against sepsis-induced diaphragm atrophy via inhibiting JAK2/STAT3 pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 133:112133.
- [ 18 ] AOMATSU A, KANEKO S, YANAI K, et al. MicroRNA expression profiling in acute kidney injury [J]. *Transl Res*, 2022, 244:1-31.
- [ 19 ] CHEN Y, JIN S, TENG X, et al. Hydrogen sulfide attenuates LPS-induced acute kidney injury by inhibiting inflammation and oxidative stress [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018:6717212.
- [ 20 ] JIN GL, LIU HP, HUANG YX, et al. Koumine regulates macrophage M1/M2 polarization via TSPO, alleviating sepsis-associated liver injury in mice [J]. *Phytomedicine*, 2022, 107:154484.
- [ 21 ] SONG H, ZHANG X, ZHAI R, et al. Metformin attenuated sepsis-associated liver injury and inflammatory response in aged mice [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(2):4598-4609.
- [ 22 ] CAO Z, QIN H, HUANG Y, et al. Crosstalk of pyroptosis, ferroptosis, and mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2-related mechanisms in sepsis-induced lung injury in a mouse model [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(3):4810-4820.
- [ 23 ] LI X, JAMAL M, GUO P, et al. Irisin alleviates pulmonary epithelial barrier dysfunction in sepsis-induced acute lung injury via activation of AMPK/SIRT1 pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118:109363.
- [ 24 ] CHEN Y, PENG M, LI W, et al. Inhibition of inflammasome activation via sphingolipid pathway in acute lung injury by Huanglian Jiedu decoction: an integrative pharmacology approach [J]. *Phytomedicine*, 2022, 107:154469.
- [ 25 ] WANG J, XUE X, ZHAO X, et al. Forsythiaside A alleviates acute lung injury by inhibiting inflammation and epithelial barrier damages in lung and colon through PPAR-gamma/RXR-alpha complex [J]. *J Adv Res*, 2024, 60:183-200.

(收稿日期:2024-05-08; 编辑:王蔚)