

基于NF- κ B/NLRP3/Caspase-1信号轴探究白藜芦醇对痛风性肾病模型大鼠肾脏的保护作用机制

徐晓敏, 卢芳, 于栋华, 王宇, 张莹, 徐鹏, 蒋鑫, 刘树民*

黑龙江中医药大学 中医药研究院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 基于NF- κ B/NLRP3/Caspase-1信号轴探究白藜芦醇对痛风性肾病模型大鼠的肾脏的保护作用机制。方法 将60只SD雄性大鼠随机分为对照组、模型组、秋水仙碱(阳性对照, 0.03 mg·kg⁻¹)组和白藜芦醇高、中、低剂量(1 000、500、250 mg·kg⁻¹)组, 连续7 d ig给药, 给药过程中, 除对照组外, 其余各组使用氧嗪酸钾合并尿酸钠的方法制备大鼠痛风性肾病模型。ELISA法检测大鼠血清中白细胞介素(IL)-1 β 、IL-18、尿酸、肌酐(SCr)、尿素氮(BUN)水平, 肾脏组织匀浆中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、环氧合酶-2(COX-2)水平; HE、Masson染色观察肾脏组织细胞形态变化; PAS染色检测大鼠肾组织中肾小球损伤情况, TUNEL观察肾脏组织细胞DNA损伤情况; 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)、免疫组化法检测肾脏组织中核因子- κ B(NF- κ B)、NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)、半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)mRNA以及蛋白的表达量, 最后采用分子对接研究白藜芦醇与NF- κ B、NLRP3、Caspase-1的结合情况。结果 与模型组比较, 秋水仙碱组及白藜芦醇各给药组大鼠血清中IL-1 β 、IL-18、SCr、BUN及肾脏TNF- α 、MCP-1、COX-2水平显著降低($P < 0.01$), 白藜芦醇高剂量组尿酸、中和高剂量组BUN显著降低($P < 0.05$); 白藜芦醇各剂量组不同程度降低肾组织中胶原纤维化面积、肾小球阳性率以及肾组织细胞TUNEL染色阳性率, 减缓病理损伤情况, 其中高剂量组作用最显著($P < 0.05$); qRT-PCR、免疫组化结果表明, 白藜芦醇各给药组均抑制肾脏组织细胞中NF- κ B、NLRP3、Caspase-1 mRNA和蛋白的表达, 其中高剂量组作用最显著($P < 0.05$); 分子对接结果进一步表明, 白藜芦醇与NF- κ B、NLRP3、Caspase-1结合状态良好, 即白藜芦醇对NF- κ B、NLRP3、Caspase-1具有良好的靶向调控作用。结论 白藜芦醇对痛风性肾病模型大鼠的肾脏保护作用可能为抑制NF- κ B信号通路, 进而抑制NLRP3的激活从而阻断Caspase-1招募IL-1 β 、IL-18, 降低其分泌, 遏制肾脏细胞程序性死亡的初始阶段细胞焦亡的发生, 从而逆转痛风性肾病大鼠肾组织的炎症损伤。

关键词: 痛风性肾损伤; 白藜芦醇; 核因子- κ B(NF- κ B); NLRP3炎症小体; Caspase-1; 细胞焦亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)03-0496-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.03.006

Exploring protective mechanism of resveratrol on rat kidney in gouty nephropathy model based on NF- κ B/NLRP3/Caspase-1 signaling axis

XU Xiaomin, LU Fang, YU Donghua, WANG Yu, ZHANG Ying, XU Peng, JIANG Xin, LIU Shumin

Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: **Objective** Exploring the protective mechanism of resveratrol on rat kidney in gouty nephropathy model based on NF- κ B/NLRP3/Caspase-1 signaling axis. **Method** Sixty male SD rats were randomly divided into control group, model group, colchicine (positive control, 0.03 mg·kg⁻¹) group, and resveratrol high, medium, and low dose (1 000, 500, 250 mg·kg⁻¹) group. The rats were administered ig for seven consecutive days. During the administration process, except for the control group, the other groups were prepared with potassium oxazinate combined with sodium urate to create a rat model of gouty nephropathy. Level of interleukin (IL)-1 β , IL-18, uric acid, creatinine (SCr), urea nitrogen (BUN) in serum, and tumor necrosis factor- α (TNF- α), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2) levels in renal tissue homogenate were detected by ELISA method. The morphological changes of kidney tissues were observed by HE and Masson staining. The glomerular injury in rat renal tissue was detected by PAS staining. The DNA damage in kidney tissue cells was observed by TUNEL. The expression levels of NF- κ B,

收稿日期: 2023-12-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82074149); 黑龙江省自然科学基金项目(JJ2020ZD0087)

第一作者: 徐晓敏, 女, 博士研究生。研究方向为中药药性理论及药物功效研究。E-mail: 2381236162@qq.com

*通信作者: 刘树民, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药性理论及药物功效研究。E-mail: keji-liu@163.com

NLRP3, Caspase-1 mRNA and protein in kidney tissues were detected by qRT-PCR and immunohistochemistry. Finally, molecular docking technology was used to study the combination between resveratrol and NF- κ B, NLRP3, Caspase-1. **Result** Compared with model group, the levels of IL-1 β , IL-18, SCr, and BUN in the serum and and TNF- α , MCP-1 and COX-2 in renal of rats treated with colchicine and resveratro were significantly reduced ($P < 0.01$). While uric acid in the high-dose group of resveratrol, and BUN in medium and high dose group showed a significant decrease ($P < 0.05$). Each dose group of resveratrol reduced the collagen fibrosis area, glomerular positivity rate, and TUNEL staining positivity rate of renal tissue cells to varying degrees, slowing down pathological damage, and the high-dose group had the most significant effect among them ($P < 0.05$). qRT-PCR and immunohistochemistry results showed that all treatment groups of resveratrol inhibited NF- κ B, NLRP3, and Caspase-1 mRNA and protein in renal tissue cells, with the high-dose group having the most significant effect ($P < 0.05$). The molecular docking results further indicate that resveratrol interacts with NF- κ B. The binding state of NLRP3 and Caspase-1 is good, indicating that resveratrol has an effect on NF- κ B. NLRP3 and Caspase-1 have good targeted regulatory effects. The molecular docking results further indicated that, resveratrol binds well to NF- κ B, NLRP3, and Caspase-1, resveratrol showed good targeted regulation of NF- κ B, NLRP3 and Caspase-1. **Conclusion** The renal protective effect of resveratrol in GN model of gouty arthritis with hyperuricemia is related to the inhibition of inflammatory factor secretion. Its anti-inflammatory mechanism may be through the inhibition of NF- κ B signaling pathway, and then NLRP3 activation to block Caspase-1 recruitment of IL-1 IL-1 and IL-18, reduce the secretion of inflammatory factors such as IL-1 β and IL-18, and curb the occurrence of cell pyroptosis in the initial stage of programmed renal cell death, thus reversing the inflammatory injury of renal tissue in GN.

Key words: gouty nephropathy; resveratrol; nuclear factor- κ B (NF- κ B); NLRP3 inflammasome; Caspase-1; pyroptosis

痛风性肾病又名尿酸性肾病,是一种常见的肾脏疾病。由于血清中尿酸水平过高,毛细血管中沉积的过量尿酸大大增加了肾脏的负担,使其处于长期代偿工作的状态,最终导致肾脏滤过功能下降,尿酸盐结晶长期积聚在肾小管和间质中,引起周围巨噬细胞的反应以及肾组织破坏的炎症事件^[1],尿酸性肾病的典型病理学特征就是肾小管和间质中的尿酸盐沉积,可观察到双折射针状尿酸盐晶体^[2]。随着疾病的进程,大多数患者会出现腰痛、夜尿,一些患者可能会出现血尿、水肿、高血压和其他症状,甚至可能出现肾衰竭,因此,对于该疾病的预防与治疗尤为重要^[3-4]。目前,治疗痛风的临床一线药物为非甾体类抗炎药以及糖皮质激素,然而,其不适用于老年肾损伤以及具有并发症的患者,同时,秋水仙碱已被禁止用于治疗痛风发作且伴有肾损伤的患者^[5-6]。近年来,随着人们对药物安全性的关注越来越高,寻找安全有效、不良反应低的替代药物的需求也越来越大。中草药及其化合物是探索治疗各种疾病新药的宝贵资源,且越来越多的中药对肾脏具有保护作用,且作用温和。因此,本课题组寻找可以有效预防和治疗痛风性肾病的中药,以改善痛风性肾病患者的健康状况,探索如何通过应用传统中医方法来治疗痛风性肾病,以更好地保护和恢复患者的健康状况。

中草药及其产生的天然产物具有不良反应小以及药理活性丰富的特点,在痛风及其并发症的预防和发展方面受到越来越多的关注。白藜芦醇是

从虎杖中提取出的多酚类化合物,具有广泛的药理活性,包括抑制炎症、抗氧化、免疫调节、抗血小板聚集作用^[7-8],研究表明,其可显著降低高尿酸血症(HUA)小鼠的血尿酸含量^[8],改善痛风性关节炎(GA)小鼠关节肿胀度,降低GA的发病率^[9],但对痛风性肾病的保护机制尚未阐明。

核因子- κ B(NF- κ B)/NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)/半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)是介导细胞焦亡的重要途径,调控着痛风性肾病等疾病进程,被广泛研究^[10]。NF- κ B是一种重要的炎症调节因子,其通过结合并激活白细胞介素-1 β (IL-1 β)等多种炎症因子来启动多种生理和病理过程^[11]。高尿酸水平下,尿酸钠晶体可以通过与Toll样受体2(TLR2)和Toll样受体4(TLR4)结合,核因子 κ B抑制蛋白激酶(IKK)复合物被磷酸化,然后NF- κ B抑制蛋白核因子 κ B抑制蛋白激酶 α (I κ B α)被磷酸化,它增加NF- κ B磷酸化水平并刺激NF- κ B易位到细胞核,进而激活NF- κ B信号通路^[12]。同时,尿酸钠晶体还可以通过刺激NLRP3炎症小体间接加速NF- κ B的激活,激活的NF- κ B反过来参与NLRP3的转录^[13]。NLRP3是Caspase-1介导的细胞焦亡途径的核心炎症小体,其经过NF- κ B活化后,活化的Capase-1促进IL-1 β 和白细胞介素18(10)[IL-18(10)]释放,引起肾小管上皮细胞焦亡发生,加剧肾损伤^[14]。本研究从NF- κ B/NLRP3/Caspase-1通路入手,深入探究白藜芦醇对痛风性肾病的保护

作用及分子机制,以期为痛风性肾病的早期预防及治疗提供新思路。

1 材料

1.1 动物

清洁级(SPF级)SD雄性大鼠60只,体重(200±20)g,由黑龙江中医药大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号SCXK(黑)2018-007,实验获得黑龙江中医药大学伦理委员会批准,批准号DXLL2019081601。

1.2 主要试剂

白藜芦醇(CAS号:501-36-0,批号:S30630,四川省维克奇生物科技有限公司);秋水仙碱(西双版纳版纳药业有限责任公司,批号:H53021369);尿酸钠(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:J2122579);戊巴比妥钠(天津市大茂化学试剂厂,批号:20190112);4%多聚甲醛组织固定液(上海碧云天生物技术有限公司,批号:P0099);苏木精-伊红染色液(珠海贝索生物技术有限公司,批号:BA4025);IL-1 β 、IL-18、尿酸、肌酐(SCr)、尿素氮(BUN)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、环氧化酶-2(COX-2)ELISA试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所;PrimeScript RT试剂盒(Takara公司);NLRP3、Caspase-1、NF- κ B免疫组化抗体(Abcam公司)。

1.3 主要仪器

ZMN-7803全自动组织包埋机(常州市华利电子有限责任公司);Chemray360全自动生化分析仪(雷度米特医疗设备上海有限公司);R139轮转切片机、EMAC20全自动染色机[徕卡显微系统(上海)贸易有限公司];FRESCO 17台式高速冷冻离心机(Thermo公司);ClinxChemiScope 6000化学发光仪(上海勤翔科学仪器有限公司);A28132实时荧光定量PCR检测系统[赛默飞十二科技(中国)有限公司];Eclipse Ci-L正置白光拍照显微镜(Nikon, Japan)。

2 方法

2.1 动物造模与给药

适应性喂养1周后,将60只SD雄性大鼠随机分为对照组、模型组、秋水仙碱(阳性对照,0.03 mg·kg⁻¹)组和白藜芦醇高、中、低剂量(1 000、500、250 mg·kg⁻¹)组。给药组连续7 d ig 10 mL·kg⁻¹相应药液;对照组、模型组 ig 0.9%氯化钠溶液10 mL·kg⁻¹。给药过程中,除对照组外,其余各组参照文献方法^[15]使用氧嗪酸钾合并尿酸钠的方法制

备大鼠痛风性肾病模型。

2.2 大鼠血清IL-1 β 、IL-18、尿酸、SCr、BUN和肾脏TNF- α 、MCP-1、COX-2水平的检测

末次给药后,大鼠麻醉后进行腹主动脉取血,静置0.5 h后,4℃、600×g离心10 min,取上清液,ELISA法检测大鼠血清中IL-1 β 、IL-18、尿酸、SCr、BUN水平;取出大鼠肾脏,称量后制备肾组织匀浆,ELISA法检测肾脏组织匀浆中TNF- α 、MCP-1、COX-2水平。

2.3 大鼠肾脏组织HE、Masson、过碘酸雪夫(PAS)、TUNEL染色

肾组织经10%多聚甲醛固定后进行石蜡包埋及切片,进行HE、Masson、PAS、TUNEL染色,光学显微镜下观察,并计算Masson染色中胶原纤维的面积百分比、肾小球上PAS阳性的面积百分比、TUNEL阳性率。

2.4 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测肾脏组织NF- κ B、NLRP3、Caspase-1 mRNA的表达

采用qRT-PCR检测肾脏组织NF- κ B、NLRP3、Caspase-1 mRNA的表达,从肾脏组织中分离总RNA,并使用PrimeScript RT试剂盒合成cDNA,以GAPDH基因为内参,对各组大鼠肾脏组织内NF- κ B、NLRP3、Caspase-1基因进行PCR扩增反应。扩增反应条件为:95℃预热30 s,95℃变性5 s,60℃退火31 s,40个循环,95℃扩增15 s。目的基因的检测:待测样本需要做3个复孔,结果通过2^{- $\Delta\Delta C_t$} 公式进行相对定量,引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列
GAPDH	F 5'-TTTGAGGGTGCAGCGAACTT-3'
	R 5'-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC-3'
NF- κ B	F 5'-TGACGGGAGGGGAAGAAATC-3'
	R 5'-TGAACAAACACGGAAGCTGG-3'
NLRP3	F 5'-AGTAGGCTCTCCATCCATT-3'
	R 5'-TCTGTCTGTCTGTCTGTCT-3'
Caspase-1	F 5'-TGCTACGCTCCGAATCTA-3'
	R 5'-GTTCCACATCTGACTTAGGT-3'

2.5 免疫组化法检测大鼠肾脏组织中NLRP3、Caspase-1、NF- κ B蛋白表达

免疫组化法测定肾脏组织中NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达水平,并采用Image Pro Plus 6.0软件分析其阳性表达的吸光度值,

并计算阳性率。

2.6 分子对接验证

应用 Pubchem 数据库下载 NLRP3、Caspase-1、NF- κ B 的 3D 结构并以 mol2 格式保存, AutoDock 软件将白藜芦醇和目标靶基因转化为 pdbqt 格式。利用 AutoDock vina 1.5.6 软件对白藜芦醇和目标靶基因进行分子对接, 并利用 PyMOL 软件可视化, 对接参数见表 2。

2.7 统计学处理

数据均采用 SPSS 26.0 软件进行分析, 实验数据统计结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间水平比较, 数据符

表 2 白藜芦醇与靶蛋白间的对接参数

Table 2 Docking parameters between resveratrol and target proteins

靶点	center_x	center_y	center_z
NF- κ B	14	27	30
NLRP3	49	56	18
Caspase-1	95	115	101

合正态分布且方差齐采用 LSD 法检验, 若不齐则采用 Tamhane's T2; 不符合正态分布则采用非参数检验。

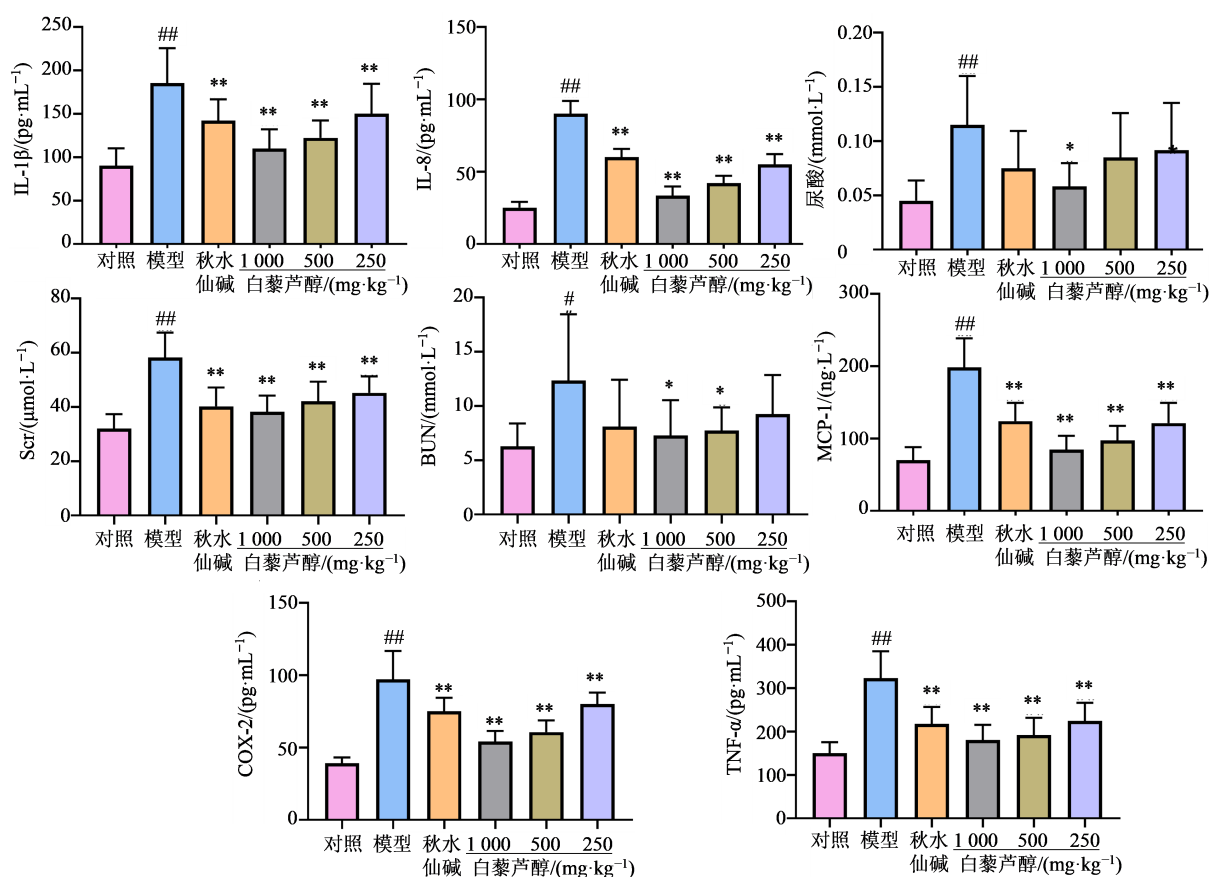
3 结果

3.1 大鼠血清 IL-1 β 、IL-18、尿酸、SCr、BUN 和肾脏 TNF- α 、MCP-1、COX-2 水平

结果如图 1 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清 IL-1 β 、IL-18、尿酸、SCr、BUN 及肾脏 TNF- α 、MCP-1、COX-2 水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$); 与模型组比较, 秋水仙碱组及白藜芦醇各给药组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-18、SCr 及肾脏 TNF- α 、MCP-1、COX-2 水平显著降低 ($P < 0.01$), 白藜芦醇高剂量组尿酸、中和高剂量组 BUN 显著降低 ($P < 0.05$), 其中以白藜芦醇高剂量组效果最优。

3.2 白藜芦醇对大鼠肾脏组织病理形态学变化的影响

3.2.1 大鼠肾脏组织 HE、Masson 染色 结果如图 2、3 所示, 对照组大鼠 HE 染色可见肾小球结构完



与对照组比较: # $P < 0.01$ ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group.

图 1 各组大鼠血清 IL-1 β 、IL-18、尿酸、SCr、BUN 及肾脏 TNF- α 、MCP-1、COX-2 水平 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 1 Serum levels of IL-1 β , IL-18, UA, SCr, BUN, and kidney TNF- α , MCP-1, and COX-2 in each group of rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

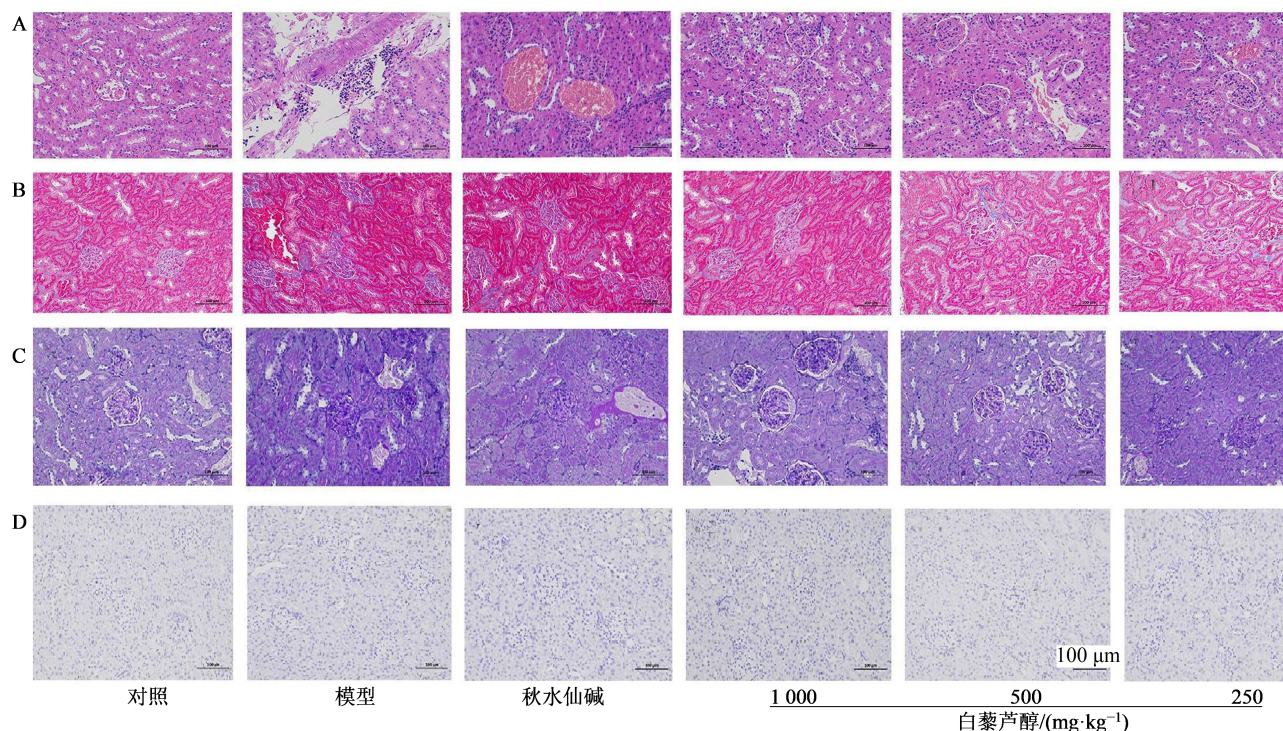


图2 各组大鼠肾脏HE(A)、Masson(B)、PAS(C)、TUNEL(D)染色($\times 200$)

Fig. 2 HE (A), Masson (B), PAS (C), and TUNEL (D) staining of rat kidney in each group ($\times 200$)

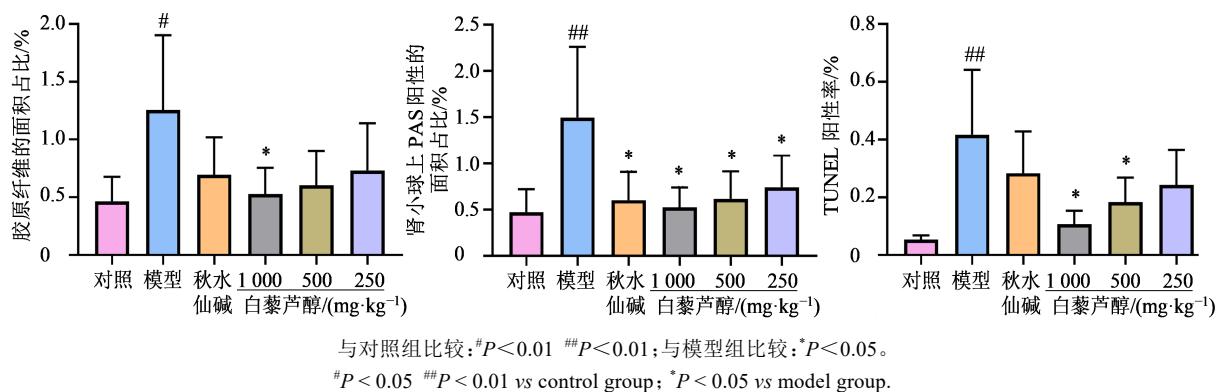


图3 各组大鼠胶原纤维的面积百分比、肾小球上PAS阳性的面积百分比、TUNEL阳性率($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 3 Area percentage of collagen fibers, ratio of PAS positive areas on glomeruli, and TUNEL positive rate in each group of rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

整; Masson 染色未见组织纤维化。与对照组比较, 模型组大鼠肾脏组织大量的集合管及少量的肾小管扩张, 管腔形状不规则, 上皮扁平化, 血管周围多数淋巴细胞炎性浸润, Masson 染色组织纤维化面积显著增多($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组大鼠肾脏组织病理损伤程度降低, 组织纤维化面积减少, 其中高剂量组纤维化面积差异显著($P < 0.05$)。

3.2.2 大鼠肾脏组织PAS染色 PAS染色又称糖原染色, 用于检测肾小球蛋白沉积物。沉积物选择性地染成深蓝色, 与相邻肾小球结构的染色形成鲜明对比, 可以准确分类多种肾小球病变^[16]。PAS染色

结果如图2、3所示, 与对照组比较, 模型组大鼠肾组织中肾小球阳性率显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠肾脏组织中肾小球阳性率均显著降低($P < 0.05$), 以白藜芦醇高剂量组效果最优。

3.2.3 大鼠肾组织细胞DNA的损伤情况(TUNEL染色) TUNEL染色用于检测核酸内切酶的细胞死亡相关DNA片段化(3'-OH DNA末端)。由于这些酶在肾脏中特别活跃, 因此TUNEL被广泛用于鉴定和定量损伤的肾细胞中的DNA片段化和细胞死亡^[17]。TUNEL染色结果见图2、3, 对照组仅见少量阳性细胞, 与对照组比较, 模型组大鼠肾组织细胞

阳性率显著升高($P<0.01$);与模型组比较,阳性对照组和白藜芦醇高、中、低剂量组大鼠肾组织细胞阳性率均降低,其中中、高剂量组差异显著($P<0.05$),表示白藜芦醇各剂量组大鼠DNA断裂损伤细胞数量降低,其中以高剂量组效果最优。

3.3 对大鼠肾脏中 $NF-\kappa B$ 、 $NLRP3$ 、 $Caspase-1$ mRNA 表达的影响

由图4可知,与对照组比较,模型组大鼠肾脏 $NF-\kappa B$ 、 $NLRP3$ 、 $Caspase-1$ mRNA 表达量均显著升高($P<0.05$ 、 0.01);与模型组比较,白藜芦醇组大鼠肾脏 $NF-\kappa B$ 、 $NLRP3$ 、 $Caspase-1$ mRNA 表达量均明显降低,其中以高剂量组效果最优($P<0.05$)。

3.4 对大鼠肾脏组织中 $NF-\kappa B$ 、 $NLRP3$ 、 $Caspase-1$ 蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组大鼠肾脏 $NF-\kappa B$ 、 $NLRP3$ 、 $Caspase-1$ 蛋白阳性率显著增加($P<0.05$ 、 0.01);与模型组比较,白藜芦醇组大鼠肾脏 $NF-\kappa B$ 、 $NLRP3$ 、 $Caspase-1$ 阳性率均有不同程度降低,其中

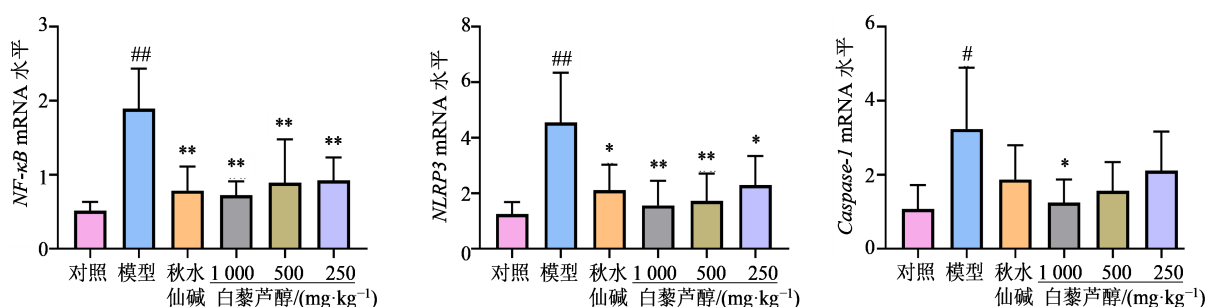
以高剂量组降低最为明显($P<0.05$ 、 0.01)。结果见图5、6。

3.5 分子对接验证

利用 $NF-\kappa B$ 、 $NLRP3$ 和 $Caspase-1$ 的结合能来确定配体与蛋白质的结合能力。分子对接结果(图7)显示, $NF-\kappa B$ 、 $NLRP3$ 和 $Caspase-1$ 与白藜芦醇的结合能分别为 -37.62 、 -41.80 、 -33.02 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$,说明白藜芦醇对核心靶点有调控作用。

4 讨论

细胞焦亡是一种炎症细胞程序性死亡方式,其主要为经典的 $Caspase-1$ 依赖型与非经典的 $Caspase-1$ 依赖型2种。经典的 $Caspase-1$ 依赖型焦亡途径与 $NLRP3$ 炎症小体密切相关^[18-19];相关研究显示^[12, 20-23],在痛风性肾病发展过程中,血尿酸水平过高诱发单钠尿酸盐的形成,会导致 $NLRP3$ 炎症体的过度激活,从而也会促使 $Caspase-1$ 激活以促进 $\text{pro-IL-1}\beta$ 的成熟,而 $Caspase-1$ 激活会破坏消皮素 D(GSDMD)中氨基末端 GSDMD-N 和羧基末端



与对照组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$;与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。

* $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group.

图4 白藜芦醇对大鼠肾脏中 $NF-\kappa B$ 、 $NLRP3$ 、 $Caspase-1$ mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Fig. 4 Effect of resveratrol on $NF-\kappa B$, $NLRP3$, and $Caspase-1$ mRNA expression in rat kidney ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

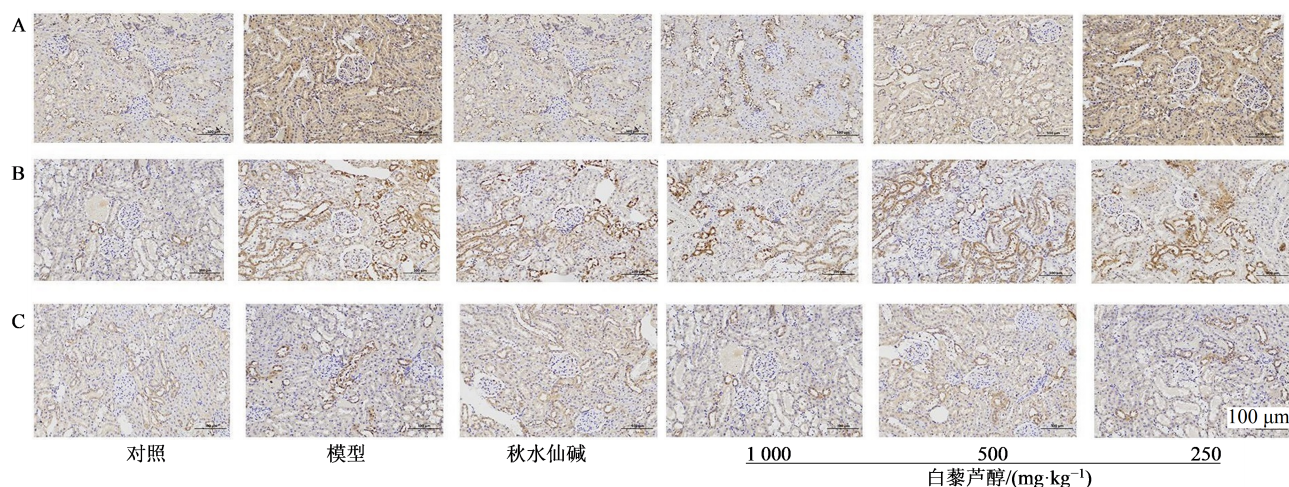


图5 白藜芦醇对痛风性肾病模型大鼠肾脏组织中 $NF-\kappa B$ (A)、 $NLRP3$ (B)、 $Caspase-1$ (C) 蛋白表达的影响(免疫组化, $\times 200$)

Fig. 5 Effect of resveratrol on $NF-\kappa B$ (A), $NLRP3$ (B), and $Caspase-1$ (C) protein expression in kidney tissues of GN model rats (immunohistochemistry, $\times 200$)

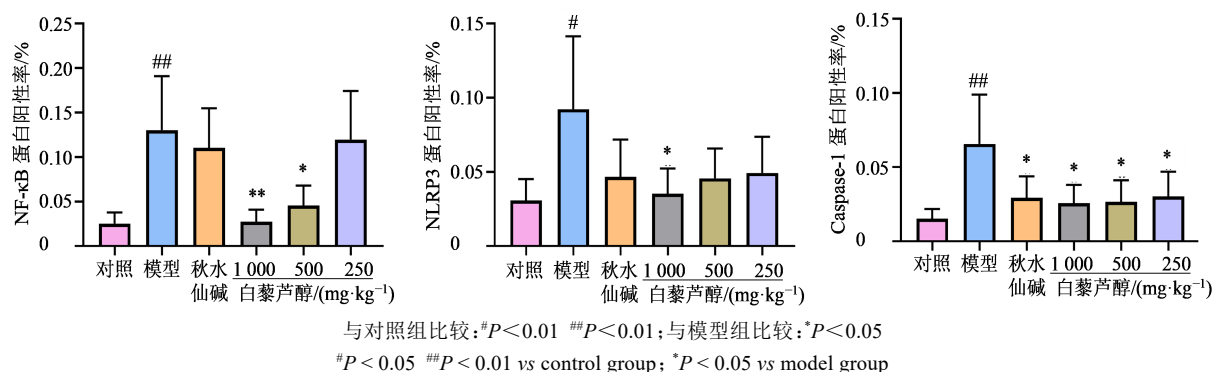


图6 白藜芦醇对痛风性肾病模型大鼠肾脏中NF-κB、NLRP3、Caspase-1蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 6 Effect of resveratrol on NF-κB, NLRP3, and Caspase-1 protein expression in GN model rat kidney ($\bar{x} \pm s, n=10$)

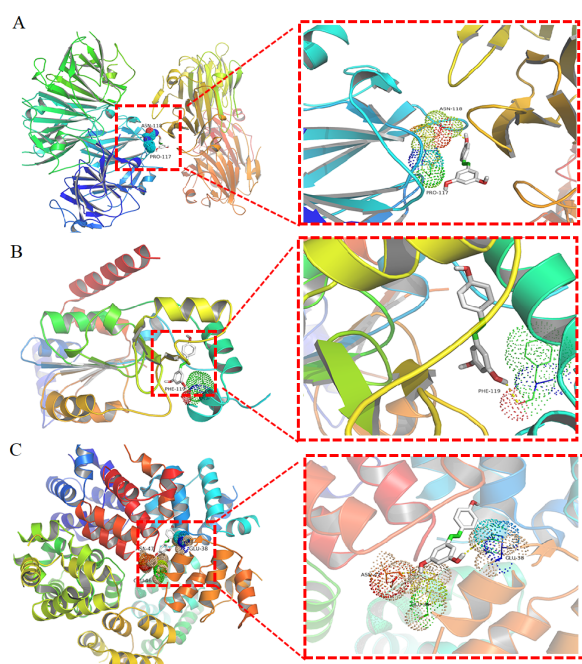


图7 白藜芦醇与NF-κB(A)、NLRP3(B)、Caspase-1(C)的分子对接结果示意图

Fig. 7 Schematic results of molecular docking of resveratrol with NF-κB (A), NLRP3 (B), and Caspase-1 (C)

GSDMD-C结构域之间的接头,导致膜孔的形成,从而诱导焦亡开始。

NF-κB/NLRP3/Caspase-1信号通路活化不仅能够诱发炎症因子的释放,同时也是细胞焦亡的重要激活通路^[24],研究显示^[25],尿酸激活细胞质磷脂酶A2和炎症转录因子NF-κB,从而增加TNF-α、MCP-1、COX-2等炎症相关细胞因子的产生。此外,高尿酸水平状态下NF-κB信号通路活化可激活巨噬细胞中的NLRP3炎症小体并促进近端肾小管细胞中的趋化因子分泌来加重肾损伤^[26-27]。

白莉等^[28]研究表明阻断NLRP3炎症小体/Caspase-1信号通路与NF-κB通路间的相互作用,可

减缓痛风性肾病肾脏的损伤程度。本研究结果显示,模型大鼠肾组织中NLRP3、Caspase-1、NF-κB的mRNA及蛋白含量显著升高,且组织中TNF-α、MCP-1、COX-2指标含量也显著升高,而白藜芦醇可显著降低NLRP3、Caspase-1、NF-κB的mRNA及蛋白含量及TNF-α、MCP-1、COX-2水平;且白藜芦醇减轻模型大鼠肾脏组织中肾小管细胞损伤,降低肾小球阳性率,减轻DNA断裂损伤。可见,白藜芦醇可通过下调NF-κB的表达,抑制TNF-α、MCP-1、COX-2的表达,同时也抑制NLRP3炎症小体活化,使其无法完成相关分子的量变积累,从而抑制Caspase-1剪切,减少IL-1β、IL-18的释放进而抑制焦亡的发生,进而有效减轻炎症损伤。

本研究结果提示白藜芦醇防治痛风性肾病进程中肾脏损伤的机制为通过抑制NF-κB/NLRP3/Caspase-1信号轴进而降低焦亡发生从而减缓疾病进程及肾脏损伤程度,且其调控的焦亡机制为Caspase-1依赖型焦亡途径。然而,对于NF-κB/NLRP3/Caspase-1信号轴中相关蛋白的研究尚不完全,以及其对焦亡具体的调控机制尚不明确,仍需进一步的研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Mei Y S, Dong B Z, Geng Z, et al. Excess uric acid induces gouty nephropathy through crystal formation: A review of recent insights [J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 911968.
- [2] Towiwat P, Chhana A, Dalbeth N. The anatomical pathology of gout: A systematic literature review [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2019, 20(1): 140.
- [3] Roughley M J, Belcher J, Mallen C D, et al. Gout and risk of chronic kidney disease and nephrolithiasis: Meta-

- analysis of observational studies [J]. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17(1): 90.
- [4] Ma Q, Fang L, Su R, et al. Uric acid stones, clinical manifestations and therapeutic considerations [J]. *Postgrad Med J*, 2018, 94(1114): 458-462.
- [5] FitzGerald J D, Dalbeth N, Mikuls T, et al. 2020 American college of rheumatology guideline for the management of gout [J]. *Arthritis Care Res*, 2020, 72(6): 744-760.
- [6] Bardin T, Richette P. Impact of comorbidities on gout and hyperuricaemia: An update on prevalence and treatment options [J]. *BMC Med*, 2017, 15(1): 123.
- [7] Shi Y W, Wang C P, Liu L, et al. Antihyperuricemic and nephroprotective effects of resveratrol and its analogues in hyperuricemic mice [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2012, 56(9): 1433-1444.
- [8] 张文静, 徐浩群, 李冲, 等. 白藜芦醇对脑缺血损伤的保护作用及机制研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(22): 7564-7576.
- Zhang W J, Xu H Q, Li C, et al. Research progress on protective effect and mechanism of resveratrol on cerebral ischemic injury [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(22): 7564-7576.
- [9] Chen H Y, Zheng S C, Wang Y K, et al. The effect of resveratrol on the recurrent attacks of gouty arthritis [J]. *Clin Rheumatol*, 2016, 35(5): 1189-1195.
- [10] Paone S, Baxter A A, Hulett M D, et al. Endothelial cell apoptosis and the role of endothelial cell-derived extracellular vesicles in the progression of atherosclerosis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(6): 1093-1106.
- [11] Liu J B, Jia S S, Yang Y, et al. Exercise induced meteorin-like protects chondrocytes against inflammation and pyroptosis in osteoarthritis by inhibiting PI3K/Akt/NF- κ B and NLRP3/caspase-1/GSDMD signaling [J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2023, 158: 114118.
- [12] Zhang Y Z, Sui X L, Xu Y P, et al. Association between Nod-like receptor protein 3 inflammasome and gouty nephropathy [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(1): 195-204.
- [13] Heneka M T, Kummer M P, Stutz A, et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice [J]. *Nature*, 2013, 493(7434): 674-678.
- [14] Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(3): 210-215.
- [15] Zheng S C, Zhu X X, Xue Y, et al. Role of the NLRP3 inflammasome in the transient release of IL-1 β induced by monosodium urate crystals in human fibroblast-like synoviocytes [J]. *J Inflamm*, 2015, 12: 30.
- [16] 徐晓敏, 李姗姗, 卢芳. 穿山龙复方水煎液对痛风性关节炎合并高尿酸血症诱导痛风性肾病大鼠肾脏的保护作用 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45(4): 663-672.
- Xu X M, Li S S, Lu F. Study on mechanism of Diostrodia Compound Decoction on gouty arthritis combined with hyperuricemia induced gouty nephropathy [J]. *Drug Eval Res*, 2022, 45(4): 663-672.
- [17] Moore C L, Savenka A V, Basnakian A G. TUNEL assay: A powerful tool for kidney injury evaluation [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(1): 412.
- [18] Gamble C N. Periodic acid-Schiff-light green stain to detect glomerular protein deposits by routine light microscopy [J]. *Am J Clin Pathol*, 1975, 63(3): 310-317.
- [19] Abe J, Morrell C. Pyroptosis as a regulated form of necrosis: PI+/annexin V-/ high caspase 1/low caspase 9 activity in cells = pyroptosis? [J]. *Circ Res*, 2016, 118(10): 1457-1460.
- [20] Yu P, Zhang X, Liu N, et al. Pyroptosis: Mechanisms and diseases [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 128.
- [21] Zhang Y Z, Sui X L, Xu Y P, et al. NLRP3 inflammasome and lipid metabolism analysis based on UPLC-Q-TOF-MS in gouty nephropathy [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(1): 172-184.
- [22] Guo H T, Callaway J B, Ting J P. Inflammasomes: Mechanism of action, role in disease, and therapeutics [J]. *Nat Med*, 2015, 21(7): 677-687.
- [23] Wang L F, Ding Y J, Zhao Q, et al. Investigation on the association between NLRP3 gene polymorphisms and susceptibility to primary gout [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(4): 16410-16414.
- [24] Sun L B, Ma W, Gao W L, et al. Propofol directly induces caspase-1-dependent macrophage pyroptosis through the NLRP3-ASC inflammasome [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(8): 542.
- [25] Gul A, Zager P. Does altered uric acid metabolism contribute to diabetic kidney disease pathophysiology? [J]. *Curr Diab Rep*, 2018, 18(4): 18.
- [26] Prasad Sah O S, Qing Y X. Associations between

- hyperuricemia and chronic kidney disease: A review [J]. Nephrourol Mon, 2015, 7(3): e27233.
- [27] 伊宏煜, 王涛, 谷孙泽栋, 等. 细胞焦亡与临床疾病及其相关信号通路 [J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(16): 2038-2042.
- Yi H Y, Wang T, Gu S, et al. Relationship between pyroptosis and clinical disease and its signal pathway [J]. Chin J Immunol, 2019, 35(16): 2038-2042.
- [28] 白莉, 刘广运, 魏湘萍, 等. 牡丹花总黄酮对痛风性肾病大鼠 NLRP3 炎症小体及炎症因子表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 8(9): 43-51.
- Bai L, Liu G Y, Wei X P, et al. Total flavonoids of peony flower regulate NLRP3 inflammasome and expression of inflammatory cytokines in gouty nephropathy rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2022, 8(9): 43-51.

[责任编辑 兰新新]