

# H<sub>2</sub>S 通过抑制 TLR4/MyD88/PI3K 信号通路减轻尿源性脓毒症诱导的急性肾损伤\*

许武军, 谢娟娟<sup>△</sup>, 陈 仙

(南华大学附属第二医院泌尿外科, 湖南 衡阳 421000)

**[摘要]** **目的:** 探讨硫化氢(H<sub>2</sub>S)减轻尿源性脓毒症诱导的急性肾损伤的作用机制。**方法:** 40只新西兰白兔随机分为对照组、假手术组、脓毒症模型组、脓毒症模型 NaHS 处理组和脓毒症模型 NaHS 联合 TAK-242 (TLR4 抑制剂)处理组, 每组 8 只。各组分别按分组处理 72 h 后, 采用 HE 染色观察兔肾组织病理学变化; 使用全自动生化分析仪检测血尿素氮(BUN)和血清肌酐(Scr)水平; 采用 ELISA 法检测血液中中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)、肾损伤分子 1(KIM-1)、降钙素原(PCT)以及炎症因子白细胞介素 1β(IL-1β)、白细胞介素 6(IL-6)和肿瘤坏死因子 α(TNF-α)的水平; 采用 Western blot 检测 TLR4/MyD88/PI3K 信号通路相关蛋白的表达。**结果:** 与对照组相比, 脓毒症兔肾组织呈现明显损伤, NaHS 处理后肾脏病理明显改善, 且血液中 BUN、Scr、NGAL、KIM-1、PCT、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平显著提高( $P < 0.05$ ), 但 NaHS 处理或联合 TAK-242 处理后显著降低; 脓毒症兔肾脏组织中的 TLR4、MyD88、p-PI3K 和 p-Akt 蛋白水平显著升高; NaHS 处理或抑制 TLR4 则显著抑制 TLR4/MyD88/PI3K 信号通路激活。**结论:** H<sub>2</sub>S 可能通过抑制 TLR4/MyD88/PI3K 信号通路减少炎症因子及肾损伤因子的释放, 从而有效减轻尿源性脓毒症诱导的急性肾损伤。

**[关键词]** 尿源性脓毒症; 硫化氢; TLR4/MyD88/PI3K 信号通路; 急性肾损伤

**[中图分类号]** R692.9; R363.2

**[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.02.009

## Hydrogen sulfide attenuates urosepsis-induced acute kidney injury by blocking TLR4/MyD88/PI3K signaling pathway

XU Wu-jun, XIE Juan-juan, CHEN Xian

(Department of Urology, The Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421000, China. E-mail: 383277430@qq.com)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To explore the effect of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) on urosepsis-induced acute kidney injury. **METHODS:** New Zealand white rabbits were randomly divided into control group, sham group, model (sepsis) group, NaHS treatment (NaHS) group, and NaHS combined with TAK-242 (a TLR4 inhibitor) treatment (NaHS + TAK-242) group. After treatment for 72 h, HE staining was used to measure the histopathological changes of rabbit kidney. The levels of blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (Scr) were detected by automatic biochemical analyzer. The serum levels of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), kidney injury molecule 1 (KIM-1), procalcitonin (PCT), interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) were measured by ELISA. The TLR4/MyD88/PI3K signaling pathway-related proteins in the kidney were determined by Western blot. **RESULTS:** Compared with control group, obvious damage was observed in the kidneys of septic rabbits, but the kidneys were markedly improved by treatment with NaHS. The levels of BUN, Scr, NGAL, KIM-1, PCT, IL-1β, IL-6 and TNF-α in the septic rabbits were higher than those in control group, and decreased significantly in NaHS group and NaHS + TAK-242 group. The protein levels of TLR4, MyD88, p-PI3K and p-Akt in septic rabbit kidneys were higher than those in control group. However, NaHS or NaHS + TAK-242 inhibited the activation of TLR4/MyD88/PI3K signaling pathway in the kidneys of septic rabbits. **CONCLUSION:** H<sub>2</sub>S play a protective effect on the rabbits with urosepsis-induced acute kidney injury by blocking TLR4/MyD88/PI3K signaling pathway to inhibit inflammatory response.

**[KEY WORDS]** Urosepsis; Hydrogen sulfide; TLR4/MyD88/PI3K signaling pathway; Acute kidney injury

[收稿日期] 2018-04-20

[修回日期] 2018-06-13

\* [基金项目] 湖南省自然科学基金联合基金资助项目 (No. 13JJ9009); 衡阳市科技局指导性项目 (No. S2018F903102224)

△ 通讯作者 Tel: 0734-8899691; E-mail: 383277430@qq.com

尿源性脓毒血症 (urosepsis) 是由泌尿生殖系统感染引起的全身性恶性炎症反应综合征, 约占脓毒血症的 30%<sup>[1]</sup>。近年来, 随着医疗水平的不断提高, 抗感染治疗以及器官功能支持疗法获得快速发展, 但是脓毒血症的死亡率仍高达 30% ~ 70%<sup>[2]</sup>。肾脏是尿源性脓毒血症中最易受损的脏器之一, 急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 是脓毒血症常见的重症并发症, 脓毒血症诱导的 AKI 死亡率可达 75% 左右<sup>[3]</sup>。研究证实硫化氢 (hydrogen sulfide, H<sub>2</sub>S) 作为继 NO 和 CO 之后公认的第 3 种气体信号分子, 具有调节中枢神经的作用<sup>[4]</sup>。秦文瀚等<sup>[5]</sup>研究发现外源性 H<sub>2</sub>S 能够显著降低内毒素脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤; 舒维等<sup>[6]</sup>研究证实 H<sub>2</sub>S 供体 NaHS 可以通过调节炎症介质的释放减轻大鼠急性肺损伤。不仅如此, H<sub>2</sub>S 还可以通过调节感染性免疫应答反应减轻脓毒血症引发的急性肺损伤<sup>[7-8]</sup>。Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 可以通过激活下游髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor-88, MyD88) 依赖的信号通路, 刺激炎症因子的合成以及释放。磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 是细胞内重要的调控蛋白, 参与细胞的生长、分化、增殖和凋亡。TLR4 通路的激活可以促进 PI3K 下游蛋白 Akt 的磷酸化, 从而激活核因子  $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B), 最终诱导炎症反应。本研究通过使用大肠杆菌建立兔上尿路感染所致的脓毒血症模型, 探究 TLR4/MyD88/PI3K 通路在 H<sub>2</sub>S 保护尿源性脓毒性肾损伤中的作用机制。

## 材 料 和 方 法

### 1 实验动物

40 只雄性新西兰白兔, 体重 (2.0 ± 0.2) kg, 购自南华大学实验动物学部, 许可证号为 SYXK (湘) 2015-0001。实验开始前, 实验动物先在动物室适应性喂养 2 周, 温度 (23 ± 2) °C。大肠杆菌 (ATCC 25922) 由南华大学附二医院微生物室提供。

### 2 主要试剂

NaHS 购自 Sigma; 抗 TLR4、MyD88、PI3K、p-PI3K、Akt 和 p-Akt 抗体购自 Abcam; 白细胞介素 1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、IL-6 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) ELISA 试剂盒购自 Bio-swamp; 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL)、肾损伤分子 1 (kidney injury molecule 1, KIM-1) 和血降钙素原 (procalcitonin, PCT) ELISA 试剂盒购自上海远慕生物科技有限公司; TLR4 通路抑制剂 TAK-242 购

自 MedchemExpress; BCA 试剂盒购自碧云天生物公司。

### 3 主要方法

**3.1 尿源性脓毒血症动物模型的建立** 根据随机数字表法将 40 只新西兰白兔随机分为正常对照 (control) 组、假手术 (sham) 组、模型 (sepsis) 组、NaHS 处理 (NaHS) 组及 NaHS 联合 TAK-242 处理 (NaSH + TAK-242) 组, 每组 8 只。对照组 8 只白兔给予正常饲料和水喂养, 不做处理。造模前腹腔注射戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉动物, 假手术组 8 只白兔麻醉后左下腹腹直肌旁切口打开腹腔分离出左输尿管中段, 肠管复位后关闭并缝合切口; 24 只白兔分离并结扎左侧输尿管中段, 将 1 × 10<sup>11</sup>/L 的大肠杆菌悬液注入输尿管管腔内, 注射剂量 0.5 mL/kg。NaHS 处理组在造模后经耳缘静脉注射浓度为 50 mmol/L 的 NaHS, 注射剂量为 8.4  $\mu$ mol/kg, TAK-242 组术后耳缘静脉注射 0.5 mg/kg TAK-242。所有白兔术后给予正常颗粒饲料和水喂养。术后 72 h 将所有白兔安乐死, 动脉取血, 取适量肾组织固定于 4% 多聚甲醛中用于组织病理学检测, 另取适量肾组织于 EP 管中保存于 -80 °C 备用。

**3.2 肾组织的 HE 染色** 取适量肾脏组织使用 4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋制作病理切片。将石蜡切片经脱蜡、苏木精染色、分化以及蓝化后伊红染色、洗涤脱水以及透明后封片。使用光学显微镜观察组织变化情况并摄片。

**3.3 血液指标的检测** 静脉取血 5 mL, 3 000 r/min, 离心 10 min, 取上清。使用全自动生化分析仪检测血清肌酐 (serum creatinine, SCr) 和血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 水平。使用 ELISA 法检测血清中 NGAL、KIM-1、PCT 以及炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的水平。

**3.4 Western blot 检测蛋白水平** 取兔肾脏组织 50 mg 于 2.0 mL EP 管中, 加入 1 mL 含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 每管加入 2 粒玻璃珠, 均浆器匀浆 5 min 后, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min。取上清使用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。每组取 30  $\mu$ g 蛋白进行 SDS-PAGE, 检测 TLR4、MyD88、PI3K、p-PI3K、Akt 和 p-Akt 的蛋白水平。以 GAPDH 作为内参照, 使用 BanScan 5.0 软件进行灰度值分析。

### 4 统计学处理

使用 SPSS 19.0 软件进行所有数据的统计学分析。实验数据均采用均数 ± 标准差 (mean ± SD) 表示, 各组之间的比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验, 以 *P* <

0.05 表示差异有统计学意义。

## 结 果

### 1 NaHS 对脓毒血症兔肾脏组织病理学影响

HE 染色结果显示, control 组和 sham 组的兔肾脏组织结构完整, 无充血以及炎性细胞浸润; sepsis 组兔肾小球变形, 肾曲小管浊肿变形坏死, 肾小管管腔变大, 肾间质充血, 大量炎性细胞浸润; NaHS 和 NaHS 联合 TAK-242 处理后上述变化显著减轻, 见图 1。

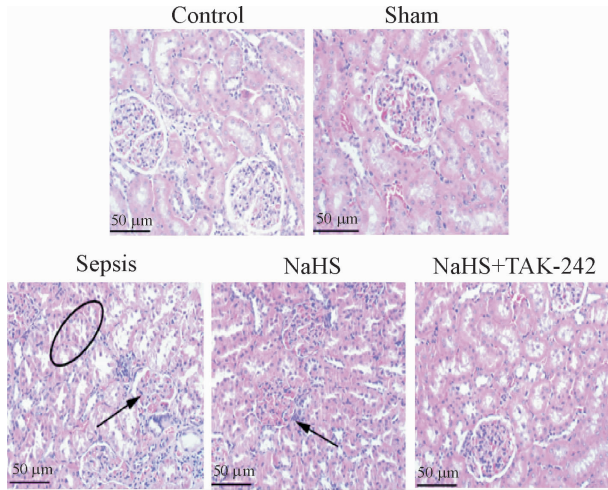


Figure 1. The histopathological changes of rabbit kidneys were observed by HE staining. Arrow: renal interstitial hyperemia and edema, and inflammatory cell infiltration; oval: necrosis and detachment of renal tubular epithelial cells.

图 1 HE 染色观察兔肾脏组织病理变化

### 2 NaHS 处理显著改善脓毒血症兔血清 SCr 和 BUN 水平

Sepsis 组兔血清中 SCr 和 BUN 水平显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 但 NaHS 处理后兔血清中 SCr 和 BUN 水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 且 TAK-242 联合 NaHS 处理后脓毒血症兔血清中 BUN 水平显著低于 NaHS 组 ( $P < 0.05$ ), 见图 2。

### 3 NaHS 处理显著改善脓毒血症兔血清 NGAL、KIM-1 和 PCT 水平

Sepsis 组兔血清中 NGAL、KIM-1 和 PCT 水平与对照组比显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与 sepsis 组相比, NaHS 处理后兔血清 NGAL、KIM-1 和 PCT 的水平显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与 NaHS 组相比, NaHS 联合 TAK-242 处理组兔血清中 NGAL 和 PCT 进一步降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。

### 4 NaHS 处理显著改善脓毒血症兔血清炎症因子水平

脓毒血症模型组兔血清中的促炎因子 IL-1 $\beta$ 、IL-

6 和 TNF- $\alpha$  水平显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ); NaHS 处理 72 h 后能显著降低脓毒血症兔血清中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的水平, 说明 NaHS 能在一定程度上缓解脓毒血症诱发的炎症反应 ( $P < 0.05$ ); 使用 TAK-242 抑制 TLR4 通路以后, 血清炎症因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平进一步降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 4。

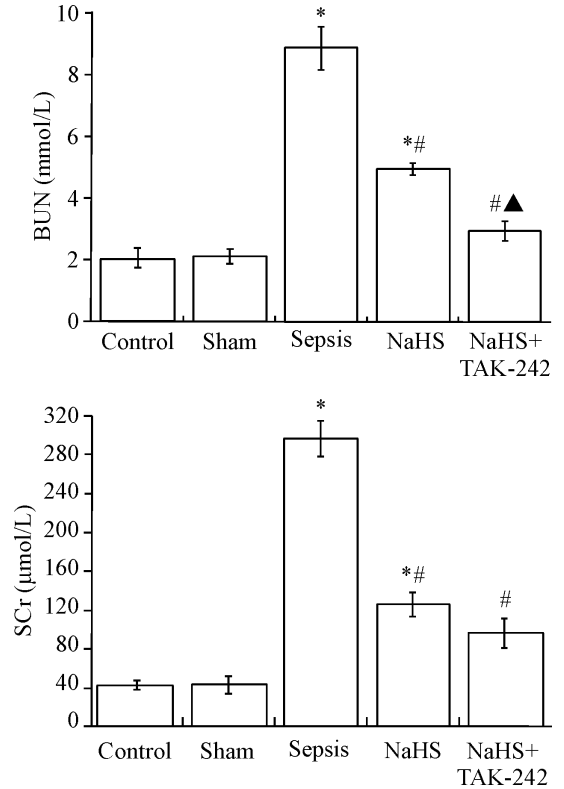


Figure 2. The levels of BUN and SCr in the rabbits of each group. Mean  $\pm$  SD.  $n = 8$ . \*  $P < 0.05$  vs control group; #  $P < 0.05$  vs sepsis group; ▲  $P < 0.05$  vs NaHS group.

图 2 各组兔 BUN 和 SCr 水平的变化

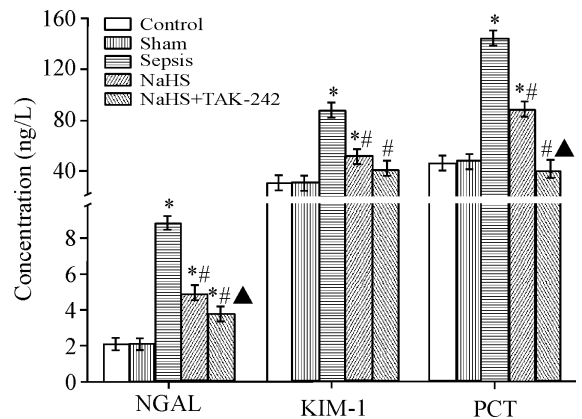


Figure 3. The levels of NGAL, KIM-1 and PCT in the rabbit serum of each group. Mean  $\pm$  SD.  $n = 8$ . \*  $P < 0.05$  vs control group; #  $P < 0.05$  vs sepsis group; ▲  $P < 0.05$  vs NaHS group.

图 3 各组兔血清中 NGAL、KIM-1 和 PCT 含量的变化

### 5 TLR4/MyD88/PI3K 通路参与 NaHS 减轻脓毒血症诱导的急性肾损伤的作用

脓毒血症兔肾组织中 TLR4 和 MyD88 蛋白水平显著上升 ( $P < 0.05$ ), PI3K/Akt 通路激活, p-PI3K 和 p-Akt 的蛋白水平显著上升 ( $P < 0.05$ ); NaHS 处理后 TLR4/MyD88/PI3K 通路激活受到显著抑制, 说明 NaHS 可以通过抑制 TLR4/MyD88/PI3K 信号通路激活减轻脓毒血症型肾损伤, 见图 5。

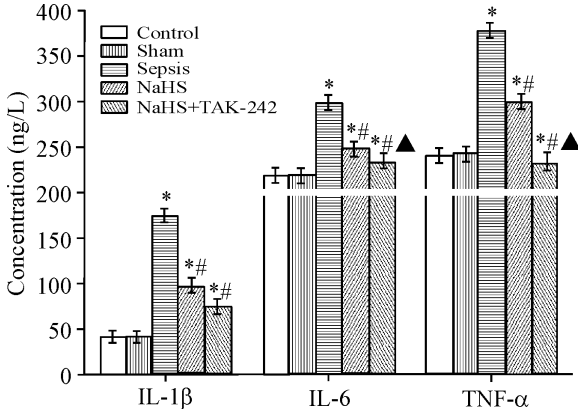


Figure 4. The levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in the rabbit serum of each group. Mean  $\pm$  SD.  $n = 8$ . \*  $P < 0.05$  vs control group; #  $P < 0.05$  vs sepsis group; ▲  $P < 0.05$  vs NaHS group.

图 4 各组兔血清炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量的变化

### 讨 论

脓毒血症的致病机制是诱发全身性恶性炎症反应, 急性肾损伤是其常见的并发症, 若不及时采取有效的治疗措施极易诱发多器官功能衰竭。炎症介质的释放在脓毒血症诱导的机体损伤中起关键作用, 与病情发展的严重程度以及预后明显相关<sup>[9]</sup>。在脓毒血症急性肾损伤发展过程中, 炎症反应介导血管内皮损伤和肾小管功能紊乱, 提示抑制机体炎症免疫反应可能为有效治疗脓毒血症急性肾损伤提供新的治疗策略。

本研究中兔源性脓毒血症造模 72 h 后血清 SCr 和 BUN 浓度显著升高, 说明脓毒血症造模成功; 且脓毒血症相关 AKI 标志物 NGAL、KIM-1 和 PCT 含量也显著升高, 说明发生了急性肾功能损伤。此外, 免疫调节因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  在 sepsis 模型动物血液中的水平也显著提高, 说明炎症反应在尿源性脓毒血症肾损伤中发挥重要作用。TLR4/MyD88 通路在调节炎症因子释放过程中发挥重要作用。TLR4 作为炎症上游因子可以通过识别细胞表面抗原, 发挥信号转导功能以及介导炎症反应<sup>[10]</sup>; MyD88 作为 TLR4 的下游信号分子, 可以通过与 TLR4 结合调控炎症因子的合成与释放, 参与炎症反应<sup>[11]</sup>; PI3K

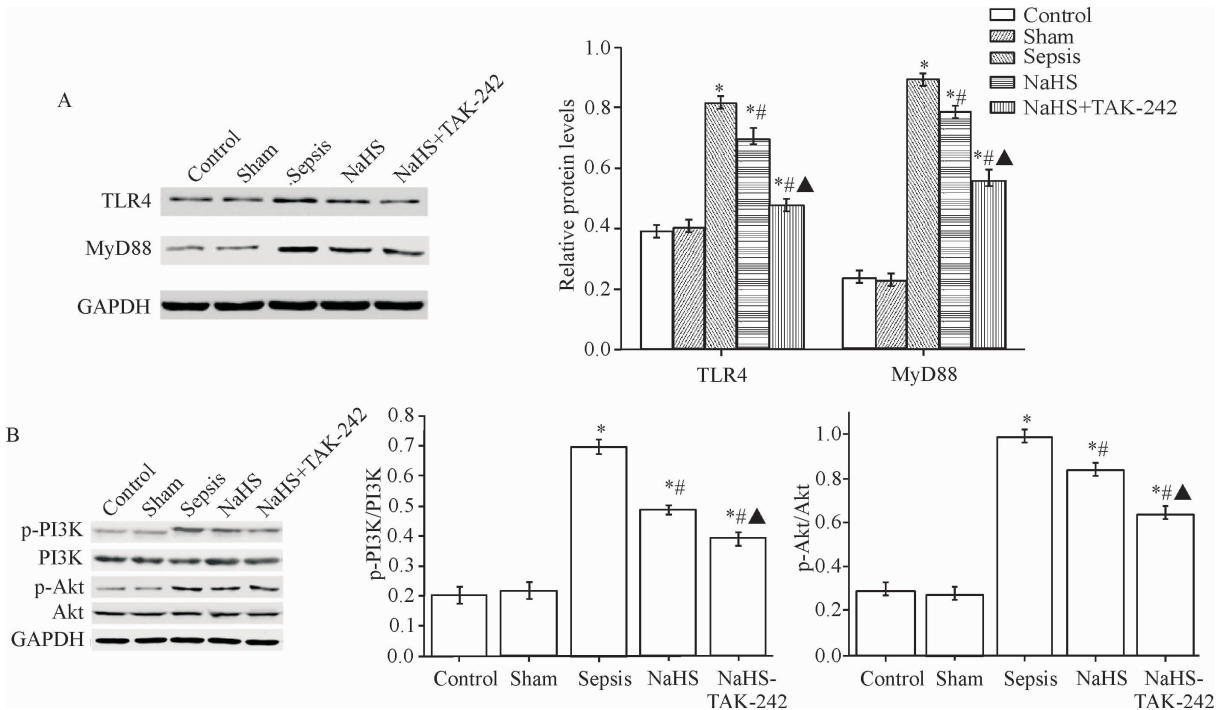


Figure 5. The protein levels of TLR4, MyD88, PI3K, p-PI3K, Akt and p-Akt in the rabbit kidney tissues. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs control group; #  $P < 0.05$  vs sepsis group; ▲  $P < 0.05$  vs NaHS group.

图 5 兔肾组织中 TLR4、MyD88、PI3K、p-PI3K、Akt 和 p-Akt 蛋白水平的变化

作为细胞内重要的调节因子,在细胞的生长和凋亡中发挥重要作用;TLR4 可以通过作用于 p85 亚基激活 PI3K/Akt 通路。本研究通过 Western blot 技术检测 TLR4、MyD88 以及 PI3K/Akt 通路蛋白的表达情况,结果发现在尿源性脓毒血症兔肾组织中 TLR4 和 MyD88 蛋白表达显著升高,且 PI3K/Akt 信号通路激活,表明尿源性脓毒血症 AKI 与 TLR4/MyD88/PI3K 信号通路相关。

研究表明肾组织可以通过胱硫醚  $\beta$ -合成酶和胱硫醚  $\gamma$ -裂解酶作用于含硫氨基酸产生内源性  $H_2S$ ,发挥肾功能调节作用<sup>[12]</sup>。越来越多的研究证实  $H_2S$  在脓毒血症肾损伤中发挥重要保护作用。我们的前期研究也证实  $H_2S$  可以通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路阻断炎症因子的表达,减轻尿源性脓毒血症肾损伤<sup>[13]</sup>。本研究结果也发现 NaHS 处理后,sepsis 兔血液中炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  及 Scr、BUN 水平显著降低,肾损伤相关标志物 NGAL、KIM-1 和 PCT 也显著降低,说明 NaHS 处理能够显著缓解尿源性脓毒血症急性肾损伤。TLR4/MyD88 信号通路作为 NF- $\kappa$ B 的上游调节因子可以调控 NF- $\kappa$ B 的表达。为进一步探究 NaHS 在保护尿源性脓毒血症性肾损伤中的作用机制,我们检测了肾组织中 TLR4/MyD88/PI3K 信号通路,以及使用 NaHS 联合 TLR4 抑制剂 TAK-242 处理,结果发现 NaHS 显著抑制肾组织中 TLR4/MyD88/PI3K 信号通路的激活,且使用联合 TLR4 抑制剂处理后对损伤肾脏的保护作用加强。陈克研等<sup>[14]</sup>研究也证实抑制 TLR4 信号通路,可以通过抑制炎症反应发挥对肾脏的保护作用。

#### [参 考 文 献]

- [1] 李华福,叶 啸,邱广富,等. 尿源性脓毒血症早期淋巴细胞亚群以及相关指标改变的临床研究[J]. 临床急诊杂志, 2017, 18(6):411-415.
- [2] Dennen P, Douglas IS, Anderson R. Acute kidney injury in the intensive care unit: an update and primer for the intensivist[J]. Crit Care Med, 2010, 38(1):261-275.
- [3] Suh SH, Kim CS, Choi JS, et al. Acute kidney injury in patients with sepsis and septic shock: risk factors and clinical outcomes[J]. Yonsei Med J, 2013, 54(4):965-972.
- [4] Shefa U, Kim MS, Jeong NY, et al. Antioxidant and cell-signaling functions of hydrogen sulfide in the central nervous system[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018:1873962.
- [5] 秦文瀚,杨从文,杨 贞,等. 外源性硫化氢对内毒素致急性肺损伤小鼠肺巨噬细胞表型转化的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2017, 37(5):609-612.
- [6] 舒 维,陈文龙,谢 妹,等. 硫化氢对百草枯中毒大鼠急性肺损伤及炎症介质的影响[J]. 江西医药, 2016, 51(11):1162-1164.
- [7] Chen X, Xu WJ, Wang YI, et al. Hydrogen sulfide reduces kidney injury due to urinary-derived sepsis by inhibiting NF- $\kappa$ B expression, decreasing TNF- $\alpha$  levels and increasing IL-10 levels[J]. Exp Ther Med, 2014, 8(2):464-470.
- [8] Bhatia M. Role of hydrogen sulfide in the pathology of inflammation [J]. Scientifica (Cairo), 2012, 2012:159680.
- [9] Zhao H, Liu Z, Shen H, et al. Glycyrrhizic acid pretreatment prevents sepsis-induced acute kidney injury via suppressing inflammation, apoptosis and oxidative stress[J]. Eur J Pharmacol, 2016, 781:92-99.
- [10] Qin C, Zhang B, Zhang L, et al. MyD88-dependent Toll-like receptor 4 signal pathway in intervertebral disc degeneration[J]. Exp Ther Med, 2016, 12(2):611-618.
- [11] Parpaleix A, Amsellem V, Houssaini A, et al. Role of interleukin-1 receptor 1/MyD88 signalling in the development and progression of pulmonary hypertension[J]. Eur Respir J, 2016, 48(2):470-483.
- [12] Bętkowski J. Hypoxia in the renal medulla: implications for hydrogen sulfide signaling[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2010, 334(2):358-363.
- [13] 许武军,陈 仙,罗志刚,等.  $H_2S$  对尿源性脓毒血症肾损伤的影响[J]. 天津医药, 2014, 42(8):769-773.
- [14] 陈克研,董婉维. 富氢液对大鼠肾缺血再灌注肾功能及 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路表达的影响[J]. 解剖科学进展, 2017, 23(2):174-176, 180.

(责任编辑:林白霜,罗 森)