DOI: 10.14188/j.1671-8852.2024.0867

文章编号 1671-8852(2025)11-1388-06

IL-5抑制caspase-1细胞焦亡信号通路减轻脓毒症小鼠急性肾损伤

任永栋 陈海瑞 胡念丹 艾 波 李文强
武汉大学人民医院急诊科 湖北 武汉 430060

摘要 目的：探究白细胞介素-5(IL-5)对脓毒症所致小鼠急性肾损伤的影响及机制。方法：盲肠结扎穿孔法(CLP)构建小鼠脓毒症急性肾损伤模型，40只小鼠随机分为假手术(Sham)组、脓毒症模型(CLP)组、IL-5干预(CLP+IL-5)组、假手术+IL-5(Sham+IL-5)组。造模后24 h取材，ELISA检测各组小鼠血清中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、IL-6、IL-1β、肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)的含量；HE染色观察肾脏病理学改变；TUNEL染色检测肾组织细胞凋亡情况；Western Blot检测肾脏组织中NLRP3、caspase-1蛋白表达。结果：IL-5减轻了脓毒症小鼠肾脏病理损伤程度，降低脓毒症小鼠血清中TNF-α、IL-6、IL-1β、Scr、BUN的浓度及肾组织NLRP3、caspase-1蛋白表达水平($P<0.05$)，抑制细胞凋亡与炎症反应，改善脓毒症相关急性肾损伤。结论：IL-5能够抑制全身炎症反应，从而减轻脓毒症所致的急性肾损伤，其作用机制可能与IL-5抑制NLRP3炎症小体的激活以及caspase-1介导的经典细胞焦亡途径的活化相关。

关键词 脓毒症；白细胞介素-5；急性肾损伤；细胞焦亡；NLRP3炎症小体

中图分类号 R34

文献标识码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)：

IL-5 alleviates acute kidney injury in septic mice by inhibiting the caspase-1 pyroptosis signaling pathway

REN Yongdong, CHEN Hairui, HU Niandan, AI Bo, LI Wenqiang
Department of Emergency, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China

Abstract

Objective: To explore the effects of interleukin-5 (IL-5) on sepsis-induced acute kidney injury in mice. **Methods:** A mouse model of septic acute kidney injury was established using the cecal ligation and puncture (CLP) method. Forty mice were randomly assigned to four groups: Sham group, sepsis model (CLP) group, IL-5 intervention (CLP+IL-5) group, and Sham+IL-5 group. Tissue samples were collected 24 hours post-modeling. ELISA was utilized to measure serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), IL-6, IL-1β, creatinine (Scr), and blood urea nitrogen (BUN). HE staining was performed to evaluate renal tissue pathology, TUNEL staining to assess apoptosis, and Western Blot to determine NLRP3 and caspase-1 proteins expression in kidney tissues. **Results:** IL-5 significantly attenuated renal histological injury in septic mice. It reduced serum levels of TNF-α, IL-6, IL-1β, Scr, and BUN, and suppressed NLRP3 and caspase-1 protein expression in kidney tissues ($P<0.05$). By inhibiting apoptosis and the inflammatory response, IL-5 markedly ameliorated sepsis-

作者简介：任永栋，男，1999—，医学硕士生，主要从事脓毒症的基础与临床研究，E-mail：2022283020123@whu.edu.cn
通信作者：李文强，男，1967—，医学博士，主任医师，硕士生导师，主要从事脓毒症的基础与临床研究，E-mail：wenqiangli@whu.edu.cn

associated acute kidney injury. **Conclusion:** IL-5 inhibits the systemic inflammatory response, thereby mitigating acute kidney injury induced by sepsis. This protective effect may be mediated through the suppression of NLRP3 inflammasome activation and inhibition of the caspase-1-mediated classical pyroptosis pathway.

Key Words　Sepsis; Interleukin-5; Acute Kidney Injury; Cell Pyroptosis; NLRP3 Inflammasomes

脓毒症是机体对全身严重感染反应失调引发的危及生命的器官功能障碍[1]。急性肾损伤(acute kidney injury，AKI)是脓毒症患者中常见的并发症，通常被称为脓毒症相关急性肾损伤(sepsis-associated acute kidney injury，SA-AKI)，与危重症患者的预后不良密切相关[2]。研究[2]表明，高达60%的脓毒症患者会发生AKI，其死亡率显著高于未发生AKI患者的死亡率。此外，合并急性肾损伤的患者住院时间延长，通常需要有创治疗(如导管放置、血液透析)，导致更高的医疗费用[3]。尽管在预防、检测和治疗SA-AKI方面已取得一定进展，但SA-AKI仍是临床的重要挑战，亟需进一步研究以减少其不良后果并减轻疾病负担[2,4]。脓毒症与AKI作为两个独立的综合征，能够相互促进宿主的易感性。然而，脓毒症复杂的病理生理特征使SA-AKI显著区别于其他类型的AKI[5]。脓毒症可引发严重的全身炎症反应，而与炎症密切相关的细胞焦亡过程，包括炎性小体的形成、caspase-1的激活以及GSDMD N端片段的裂解，进一步导致细胞膜破裂和细胞死亡。这一过程可能是脓毒症诱发AKI的关键病理机制之一[6]。

白细胞介素-5(interleukin-5，IL-5)是一种由Th2细胞和2型固有淋巴样细胞分泌的细胞因子，可调控固有免疫和适应性免疫反应[7]。研究表明，IL-5对炎症反应的作用具有双向性。在支气管哮喘和过敏性皮炎等疾病中，IL-5通过刺激嗜酸粒细胞活化，进一步加重过敏性炎症并引发组织损伤[8]。然而，部分研究[9]发现，IL-5在某些以慢性炎症为主要特征的疾病中，如2型糖尿病，它可以减轻慢性低度炎症引起的胰岛素抵抗；在心血管疾病中，能缓解动脉粥样硬化时炎症反应造成的血管损伤[10]，发挥一定的保护作用。最新研究[7]显示，IL-5能够减轻脓毒症引发的炎症反应，并对脓毒症导致的肺、心、肾等靶器官损伤具有一定的保护作用。然而，IL-5在脓毒症相关急性肾损伤中的抗炎机制及其治疗潜力尚不明确。本研究将进一步探究IL-5缓解脓毒症小鼠急性肾损伤与细胞焦亡之间的关系。

1　材料与方法

1.1　实验动物　本研究选用40只8～10周龄、体质量(23±2) g的雄性C57BL/6小鼠，均来自武汉大学人民医院实验动物中心。小鼠饲养与SPF环境，环境湿度55%，温度22～26 ℃，12 h/12 h光/暗循环。严格遵循动物实验3R原则及伦理要求，所有实验步骤均依照中国实验动物管理相关法律法规执行。研究方案经武汉大学人民医院动物实验伦理委员会批准[WDRM动(福)第20230205D，Date：2023-02-15]。

1.2　分组及动物模型制作　将小鼠随机分为4组，假手术组(Sham组)、脓毒症模型组(CLP组)、IL-5干预组(CLP＋IL-5组)、假手术＋IL-5组(Sham＋IL-5组)。小鼠适应性饲养1周后，参考文献[11]中盲肠结扎穿孔法建立脓毒症小鼠模型。Sham组仅探查盲肠不进行盲肠结扎穿孔。术后于小鼠背部注射0.5 mL无菌生理盐水补液。进行IL-5干预的小鼠术后立即腹腔内注射IL-5(每只1 μg)[7]。

1.3　取材　造模24 h后从小鼠眶后静脉丛取血，4 ℃ 3 000 r/min离心15 min制备血清；取血后处死小鼠，取出小鼠双侧肾脏，左侧肾脏用4%多聚甲醛固定，右侧肾脏取材后立即放入液氮中保存，随后放入－80 ℃冰箱冻存备用。

1.4　脏器系数的检测　试验开始前，称量每只小鼠体质量作为初始体质量，经过7 d适应性饲养后，再次称重作为最终体质量。取出肾脏后，称量双肾质量，依据公式计算脏器系数：脏器系数＝双肾质量(g)/小鼠最终体质量(g)×100%

1.5　酶联免疫吸附测定(ELISA)法　按ELISA试剂盒说明，分别检测各组小鼠血清中肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)、IL-6、IL-1β的浓度。

1.6　HE染色及肾组织病理评分　各组小鼠的肾组织取出后，用4%多聚甲醛溶液固定、脱水后，进行石蜡包埋和切片。随后使用苏木精-伊红(HE)染色，再经乙醇脱水透明并用树脂封片。最后，在光

学显微镜下观察肾组织的形态学变化,并对其进行肾组织病理评分。采用双盲法进行Paller评分[12],分数越高表示受损越严重,主要评分标准见表1。

表1 Paller评分标准

评分项目	评分/分	评估内容
肾小管上皮细胞肿胀脱落	0～1	正常为0分,肿胀脱落为1分
刷状缘缺失	0～1	正常为0分,缺失为1分
细胞膜泡形成	0～2	无泡形成:0分,少量:1分,广泛:2分
肾间质水肿	0～1	无水肿为0分,水肿为1分
细胞质空泡化	0～1	无空泡化为0分,空泡化为1分
细胞坏死	0～2	无坏死为0分,少量为1分,大量坏死为2分
肾小管管腔阻塞	0～2	无阻塞为0分,轻度为1分,广泛阻塞为2分

1.7 TUNEL实验 使用预先制作好的肾组织切片,根据TUNEL试剂盒的说明步骤进行染色、固定后,利用日本Olympus荧光倒置显微镜观察细胞的凋亡情况。每张切片随机选择5个高倍镜视野。

1.8 Western Blot实验 取预先保存的肾组织,加入蛋白裂解液研磨组织使其尽量碾碎,裂解液于冰浴上裂解30 min,1.2×10^4 r•min^{-1}离心15 min,收集上清液;取上清液用BCA法定量蛋白质,目标蛋白经上样、电泳、转膜、封闭、抗体孵育、显影、摄像等步骤实现目标蛋白的定量。

1.9 统计学分析 结果分析使用GraphPad Prism 8.0软件完成。所有实验数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,计量资料采用t检验,计数资料通过方差分析法进行检验,差异具有统计学意义的标准为$P<0.05$。

2 结果

2.1 脓毒症建模 与Sham组相比,CLP组的小鼠体温降低,常聚集在一起,活动量减少,行动较缓慢。小鼠处死后,打开腹腔取双侧肾脏,双侧肾脏较对照组颜色偏深,伴有淤血。并且通过计算肾脏系数,发现CLP组明显较高,CLP+IL-5组小鼠的肾脏系数较CLP组明显降低(图1)。光镜下脓毒症模型组小鼠肾组织病理,可见肾小管上皮细胞水肿、脱落,间质内淤血等(见2.3.2),且脓毒症模型组小鼠血清炎症因子水平较对照组显著升高(图2),提示脓毒症小鼠建模成功。

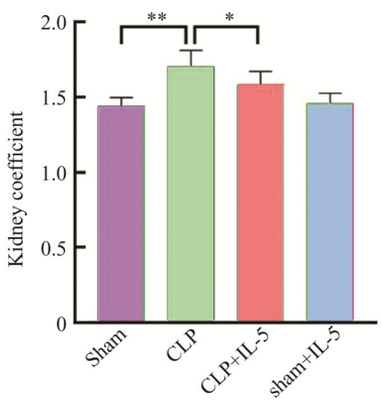


图1 IL-5改善脓毒症小鼠肾脏系数

$^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$。

2.2 IL-5缓解了脓毒症小鼠的全身炎症反应 检测小鼠血清中TNF-α、IL-6和IL-1β炎症因子的水平,结果显示:与对照组相比,CLP组小鼠血清中被检测的炎症因子水平均显著升高;而CLP+IL-5组小鼠的上述指标水平较CLP组显著降低(图2)。结果表明,IL-5具有显著的抗炎作用。

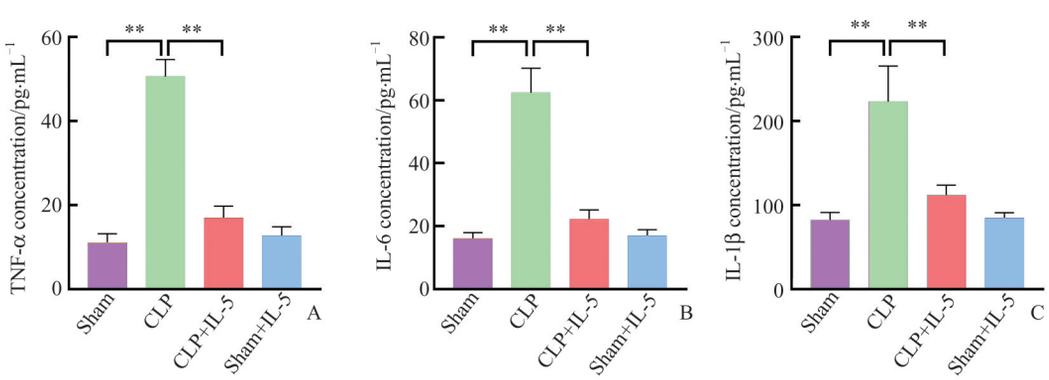


图2 IL-5降低脓毒症肾损伤小鼠血清中炎症因子水平

A. TNF-α水平;B. IL-6水平;C. IL-1β水平。$^{**}P<0.01$。

2.3 IL-5减轻了脓毒症诱导的小鼠急性肾损伤

2.3.1 小鼠血清中肌酐及尿素氮水平 与Sham组比,CLP组小鼠血清Scr、BUN水平显著升高;而与CLP组比,CLP+IL-5组小鼠血清Scr、BUN水

平显著降低；此外，Sham＋IL-5 组小鼠血清 Scr、BUN 水平与 Sham 组相比差异无统计学意义（$P>0.05$，图 3）。

2.3.2　小鼠肾脏组织病理学变化　通过 HE 染色观察小鼠肾组织切片，发现 Sham 组小鼠肾脏结构正常，肾小管排列规则，无出血或炎症浸润（图 4A）。相较之下，CLP 组小鼠肾小管上皮细胞明显水肿，体积增大，同时伴有肾小球结构紊乱、毛细血管扩张、管腔狭窄，且间质中出现大量红细胞及炎性细胞浸润（图 4B）。而 CLP＋IL-5 组小鼠肾组织病理改变明显缓解，红细胞及炎性细胞浸润显著减少（图 4C）。此外，CLP 组 Paller 评分显著升高，而 IL-5 干预显著降低了 Paller 评分（图 4E）。

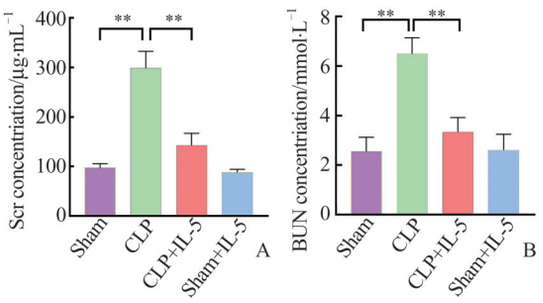


图 3　IL-5 降低脓毒症小鼠血清中肌酐及尿素氮水平

A.Scr 水平；B.BUN 水平。$^{**}P<0.01$。

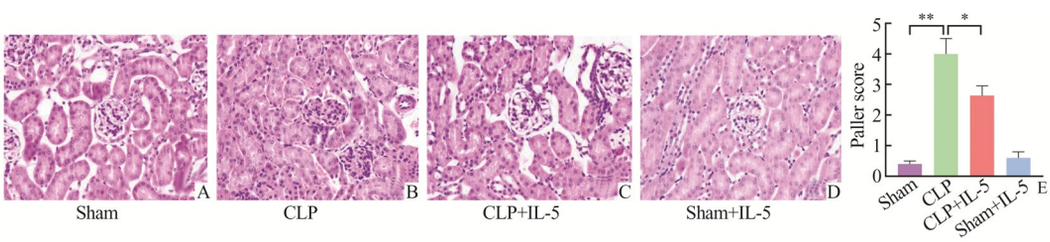


图 4　各组小鼠肾脏组织病理学表现（HE 染色×400）

A.Sham 组；B.CLP 组；C.CLP＋IL-5 组；D.Sham＋IL-5 组；E.Paller 评分。$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

2.4　IL-5 减轻了脓毒症诱导的小鼠肾脏细胞凋亡　TUNEL 染色显示，脓毒症组小鼠肾组织的细胞凋亡率显著增加，而经 IL-5 处理后，脓毒症小鼠肾组织的细胞凋亡率明显下降（图 5）。

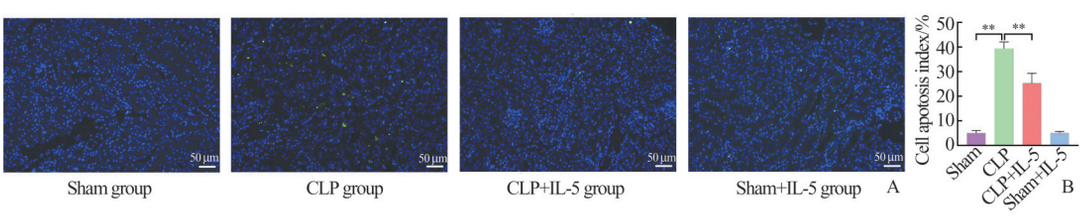


图 5　IL-5 缓解脓毒症小鼠肾脏细胞的凋亡（TUNEL 染色，标尺：50 μm）

A. TUNEL 染色图片；B. 细胞凋亡率比较。$^{**}P<0.01$。

2.5　IL-5 降低脓毒症小鼠肾脏中 NLRP3、caspase-1 蛋白的表达　Western Blot 分析结果表明，在脓 CLP 组小鼠的肾脏组织中，NLRP3 和 caspase-1 蛋白的表达水平较 Sham 组显著增加。而给予 IL-5 治疗的脓毒症小鼠中，这两种蛋白的表达水平较 CLP 组显著下降（见图 6）。结果提示 IL-5 对脓毒症小鼠肾脏中 NLRP3 和 caspase-1 蛋白表达具有抑制作用。

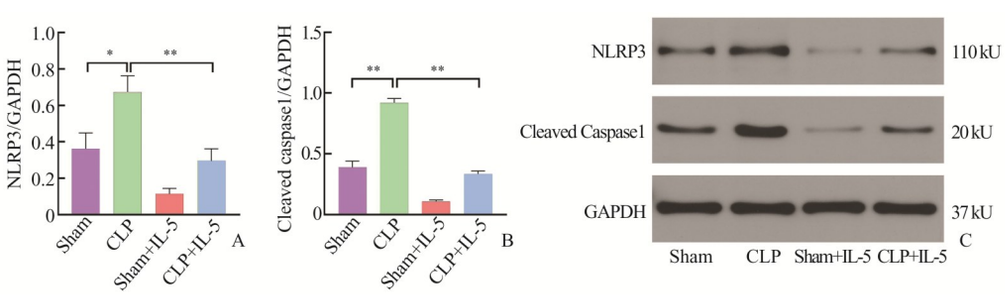


图 6　IL-5 降低脓毒症小鼠肾脏中 NLRP3 及 caspase-1 表达水平

A. NLRP3 蛋白表达水平；B. caspase-1 蛋白表达水平；C. 蛋白印迹图。$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

3 讨论

脓毒症相关性AKI是一种危及生命的并发症，它与危重症患者的高发病率和死亡率密切相关[13-14]。在危重的成人患者中，脓毒症约占所有AKI患者的50%[15]，并且与未患AKI的脓毒症患者相比，脓毒症并发AKI的患者死亡率显著增加[14]。本研究通过CLP方法建立脓毒症小鼠急性肾损伤模型。造模后，肉眼观察显示CLP组小鼠肾脏明显肿胀，体积较Sham组增大，颜色加深，充血显著，伴随肾包膜增厚等肉眼可见的结构变化。此外，小鼠的血清中肌酐和尿素氮水平显著增加，说明脓毒症相关急性肾损伤模型的成功构建。

IL-5属于IL-2家族，主要由淋巴细胞和巨噬细胞分泌。作为Th2细胞分泌的重要细胞因子，其在刺激B细胞分化和促进IgA合成等方面具有重要功能。研究[16]发现幸存的脓毒症患者血浆中的IL-5水平显著高于死亡患者。此外，多项研究[17-18]还显示IL-5可以调节免疫反应减轻脓毒症小鼠的全身炎症反应，从而减轻脓毒症所致的器官功能障碍。本实验结果也进一步证实了该结论。有研究[19]认为，IL-5对脓毒症的保护作可能与其刺激巨噬细胞功能的增强密切相关。我们发现IL-5治疗后，小鼠血清中Scr和BUN水平较CLP组明显降低，肾组织病理评分有所改善，同时肾脏的大体观也明显好转。这些结果表明，IL-5对脓毒症引起的AKI具有一定的保护作用。然而IL-5对于SA-AKI的保护作用的机制尚不完全清楚，近期研究[6, 20]表明脓毒症相关急性肾损伤的发病机制与细胞焦亡过程高度相关。LI等[21]的研究显示，NLRP3的缺失可以减轻脓毒症相关急性肾损伤，其机制在于缓解肾脏的炎症反应以及缺铁性贫血，说明在SA-AKI中NLRP3发挥了促进作用。此外，NLRP3炎性小体的激活能够引发caspase-1的裂解，进一步上调下游炎症因子的表达，加剧炎症反应并加速肾损伤的进程[22]。我们推测IL-5可能通过抑制细胞焦亡来缓解SA-AKI。本研究表明，IL-5干预显著减少了脓毒症小鼠肾组织中凋亡细胞的数量，表明其能够对脓毒症引起的细胞死亡产生抑制作用。Western Blot结果表明，脓毒症发生时小鼠NLRP3炎症小体及caspase-1依赖的细胞焦亡途径被激活，与此前的研究[23]结果相符。相比之下，IL-5干预显著降低了这两种蛋白的表达，表明IL-5能够抑制细胞焦亡相关通路的活化。

综上所述，IL-5通过抑制全身性炎症反应，有效减轻了脓毒症引起的急性肾损伤。其作用机制可能与抑制NLRP3炎症小体的活化以及阻断caspase-1依赖的细胞焦亡途径相关。然而，本研究仍存在一些局限性。首先，仅选择了单一剂量、单一给药时间点和单一用药途径，无法全面评估IL-5在SA-AKI治疗中的药效、药代动力学、毒理学特性及最佳治疗剂量。其次，本研究以急性模型为对象，未观察IL-5对远期预后及生存率等指标的影响。另外，由于CLP模型涉及全身性损伤，而IL-5通过腹腔内注射给药，对肾脏产生的保护作用可能既包括直接效应，也可能源于改善其他器官系统后产生的间接效应，这一点尚未明确。最后，尽管研究显示IL-5能够抑制NLRP3和caspase-1蛋白表达，其作用可能与caspase-1经典细胞焦亡通路相关，但具体的分子机制仍待进一步研究探讨。

参考文献

[1] EVANS L, RHODES A, ALHAZZANI W, et al. Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of sepsis and septic shock 2021[J]. Intensive Care Med, 2021, 47(11): 1181-1247.

[2] PAIS T, JORGE S, LOPES J A. Acute kidney injury in sepsis[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(11): 5924.

[3] ZARBOCK A, NADIM M K, PICKKERS P, et al. Sepsis-associated acute kidney injury: Consensus report of the 28th Acute Disease Quality Initiative workgroup [J]. Nat Rev Nephrol, 2023, 19: 401-417.

[4] BAGSHAW S M, UCHINO S, BELLOMO R, et al. Septic acute kidney injury in critically ill patients: Clinical characteristics and outcomes[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2007, 2(3): 431-439.

[5] PEERAPORNRATANA S, MANRIQUE-CABALLERO C L, GÓMEZ H, et al. Acute kidney injury from sepsis: Current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment [J]. Kidney Int, 2019, 96(5): 1083-1099.

[6] LI T L, SUN H B, LI Y M, et al. Downregulation of macrophage migration inhibitory factor attenuates NLRP3 inflammasome mediated pyroptosis in sepsis-induced AKI[J]. Cell Death Discov, 2022, 8: 61.

[7] 沈灵芝，李莉，严静. 白细胞介素-5对脓毒症小鼠的保护作用研究[J]. 中华内科杂志，2019，58(6)：456-459.
SHEN L Z, LI L, YAN J. The protective effect of interleukin-5 in septic mice[J]. Chin J Intern Med, 2019, 58(6): 456-459.

[8] FOSTER P S, MALTBY S, ROSENBERG H F, et al. Modeling T_H 2 responses and airway inflammation to understand fundamental mechanisms regulating the pathogenesis of asthma[J]. Immunol Rev, 2017, 278(1): 20-40.

[9] DAMRON C L, BLOODWORTH J C, HOJI A, et al. Increased allergic inflammation and decreased lung insulin sensitivity in offspring of obese allergic mothers [J]. J Leukoc Biol, 2024, 116(5): 985-994.

[10] SHEN C, WU N, CHEN X, et al. Interleukin-5 alleviates cardiac remodelling *via* the STAT3 pathway in angiotensin Ⅱ-infused mice[J]. J Cell Mol Med, 2024, 28(13): e18493.

[11] MOHYELDIN R H, ALAAELDIN R, SHARATA E E, et al. LCZ696 attenuates sepsis-induced liver dysfunction in rats; the role of oxidative stress, apoptosis, and JNK1/2-P38 signaling pathways[J]. Life Sci, 2023, 334: 122210.

[12] PALLER M S, HOIDAL J R, FERRIS T F. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat[J]. J Clin Invest, 1984, 74(4): 1156-1164.

[13] KUWABARA S, GOGGINS E, OKUSA M D. The pathophysiology of sepsis-associated AKI[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2022, 17(7): 1050-1069.

[14] POSTON J T, KOYNER J L. Sepsis associated acute kidney injury[J]. BMJ, 2019, 364: k4891.

[15] ZARBOCK A, KOYNER J L, GOMEZ H, et al. Sepsis-associated acute kidney injury-treatment standard [J]. Nephrol Dial Transplant, 2023, 39(1): 26-35.

[16] LINCH S N, DANIELSON E T, KELLY A M, et al. Interleukin 5 is protective during sepsis in an eosinophil-independent manner[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 186(3): 246-254.

[17] POLAT B, CADIRCI E, HALICI Z, et al. The protective effect of amiodarone in lung tissue of cecal ligation and puncture-induced septic rats: A perspective from inflammatory cytokine release and oxidative stress [J]. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2013, 386(7): 635-643.

[18] WEI B, CHEN Y, ZHOU W, et al. Interleukin IL-5 alleviates sepsis-induced acute lung injury by regulating the immune response in rats[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 2132-2139.

[19] HERCUS T R, KAN W L T, BROUGHTON S E, et al. Role of the β common (βc) family of cytokines in health and disease[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018, 10(6): a028514.

[20] SHARAWY M H, SERRYA M S. Pirfenidone attenuates gentamicin-induced acute kidney injury by inhibiting inflammasome-dependent NLRP3 pathway in rats [J]. Life Sci, 2020, 260: 118454.

[21] LI Z, WANG X, PENG Y, et al. *Nlrp3* deficiency alleviates lipopolysaccharide-induced acute kidney injury *via* suppressing renal inflammation and ferroptosis in mice[J]. Biology (Basel), 2023, 12(9): 1188.

[22] HAN S, LI S, LI J, et al. Hederasaponin C inhibits LPS-induced acute kidney injury in mice by targeting TLR4 and regulating the PIP2/NF-κB/NLRP3 signaling pathway[J]. Phytother Res, 2023, 37(12): 5974-5990.

[23] 房尚萍，孙任珂，苏慧，等 . 绿原酸减轻脓毒症诱导的小鼠急性肾损伤：基于抑制 caspase-1 经典细胞焦亡信号通路[J]. 南方医科大学学报，2024, 44(2): 317-323.
FANG S P, SUN R K, SU H, et al. Chlorogenic acid alleviates acute kidney injury in septic mice by inhibiting NLRP3 inflammasomes and the caspase-1 canonical pyroptosis pathway[J]. J South Med Univ, 2024, 44(2): 317-323.

（2024-11-11 收稿）
编辑　沈建国