

骨化三醇通过VDR/Ca²⁺/细胞焦亡信号通路逆转脓毒症免疫抑制[△]

尚圣兰^{1,2*},邹硕^{1,2},魏宇琪^{2,3},余梦辰²,周帆²,赵燕²,余爱荣^{2#}(1.武汉科技大学医学院,武汉 430065;2.中部战区总医院临床药学科,武汉 430070;3.湖北科技学院药学院,湖北咸宁 437100)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)18-2232-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.18.03



摘要 目的 探讨骨化三醇对脓毒症免疫抑制的影响及可能机制。方法 采用盲肠结扎穿孔术(CLP)建立脓毒症免疫抑制小鼠模型,检测假手术组、CLP组和骨化三醇(1 μg/kg)组小鼠7 d生存率和血清中肿瘤坏死因子α(TNF-α)、白细胞介素6(IL-6)、IL-1β水平,观察肺组织形态学变化。选用小鼠巨噬细胞系RAW264.7细胞建立脂多糖(LPS)耐受细胞(即脓毒症免疫抑制细胞模型),检测培养基组、LPS组、LPS耐受组和骨化三醇(5 μmol/L)组细胞上清液中TNF-α、IL-6水平和细胞中IL-1β、核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体3(NLRP3)、IL-18、胱天蛋白酶1(caspase-1)mRNA表达量,以及碘化丙啶(PI)阳性率、caspase-1活性、乳酸脱氢酶(LDH)漏出率和Ca²⁺水平。结果 与CLP组比较,骨化三醇组小鼠的7 d生存率和血清中TNF-α、IL-6和IL-1β水平均显著升高($P<0.05$),肺组织损伤明显减轻。与LPS耐受组比较,骨化三醇组细胞上清液中TNF-α和IL-6水平,以及细胞中IL-1β、NLRP3、IL-18、caspase-1 mRNA表达量和PI阳性率、caspase-1活性、LDH漏出率、Ca²⁺水平均显著升高($P<0.05$)。结论 骨化三醇可逆转脓毒症免疫抑制,该作用机制可能是通过骨化三醇与维生素D受体结合,从而促进内质网释放Ca²⁺,进而驱动NLRP3/caspase-1介导的细胞焦亡途径来实现的。

关键词 骨化三醇;脓毒症;免疫抑制;细胞焦亡;Ca²⁺

Calcitriol reverses sepsis-induced immunosuppression via VDR/Ca²⁺/pyroptosis signaling pathway

SHANG Shenglan^{1,2}, ZOU Shuo^{1,2}, WEI Yuqi^{2,3}, YU Mengchen², ZHOU Fan², ZHAO Yan², YU Airong²(1. School of Medicine, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, China; 2. Dept. of Clinical Pharmacy, General Hospital of Central Theater Command of PLA, Wuhan 430070, China; 3. School of Pharmacy, Hubei University of Science and Technology, Hubei Xianning 437100, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effects of calcitriol on sepsis-induced immunosuppression and its potential mechanism. **METHODS** A sepsis-induced immunosuppression mice model was established using cecal ligation and puncture (CLP). The 7-day survival rate, serum levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6), and IL-1β were determined in sham operation group, CLP group and calcitriol group (1 μg/kg); the morphological changes of lung tissue in mice were observed. Lipopolysaccharide (LPS) tolerance macrophage models (representing sepsis-induced immunosuppression) were established using mice macrophage cell line RAW264.7 cells. The levels of TNF-α and IL-6 in cell supernatants as well as mRNA expressions of IL-1β, nucleotide-binding domain leucine-rich repeat and pyrin domain-containing receptor 3 (NLRP3), IL-18 and caspase-1 were assessed in culture medium group, LPS group, LPS tolerance group, and calcitriol (5 μmol/L) group. The following parameters were measured: propidium iodide (PI)-positive cell ratio, caspase-1 activity, lactate dehydrogenase (LDH) release, and Ca²⁺ levels. **RESULTS** Compared with CLP group, 7-day survival rate and serum levels of TNF-α, IL-6 and IL-1β were increased significantly in calcitriol group ($P<0.05$). Additionally, pulmonary tissue damage was markedly attenuated in calcitriol group. Compared with LPS tolerance group, the levels of TNF-α and IL-6 in cell supernatants, mRNA expressions of IL-1β, NLRP3, IL-18 and caspase-1, PI-positive cell ratio, caspase-1 activity, LDH release, and Ca²⁺ levels were all increased significantly in calcitriol group ($P<0.05$).

△基金项目 国家自然科学基金项目(No.82304576);中国博士后科学基金项目(No.2022M713859);湖北省自然科学基金项目(No.2022CFB879);武汉市知识创新专项(No.2022020801020521)

***第一作者** 主管药师,硕士生导师,博士。研究方向:抗炎与抗感染药物药理学。E-mail:s_shang0818@163.com

#通信作者 主任药师,硕士生导师,博士。研究方向:临床药学。E-mail:yarfwy@163.com

CONCLUSIONS Calcitriol can reverse sepsis-induced immunosuppression, and the mechanism of action may be achieved by the binding of calcitriol to vitamin D receptor,

which promotes the release of Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum, thereby driving the NLRP3/caspase-1-mediated pyroptosis pathway.

KEYWORDS calcitriol; sepsis; immunosuppression; pyroptosis; Ca^{2+}

脓毒症是创/烧伤和感染患者的常见并发症,病死率为30%~70%,由二次感染导致的免疫抑制是脓毒症中晚期患者死亡的主要原因^[1~2]。研究发现,严重缺乏维生素D(vitamin D, VD)会增加脓毒症的易感性^[3]。本课题组前期研究亦发现,维生素D受体(vitamin D receptor, VDR)在脓毒症免疫抑制中发挥重要作用^[4~5]。骨化三醇作为VD的活性代谢产物,通过与VDR结合发挥作用,不仅能维持机体钙磷代谢平衡,更关键的是可发挥调节免疫与炎症的作用^[6]。内质网释放的大量 Ca^{2+} 内流是驱动细胞焦亡和免疫反应的重要内源性信号,会激活核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体3(nucleotide-binding domain leucine-rich repeat and pyrin domain-containing receptor 3, NLRP3)和胱天蛋白酶1(caspase-1),分泌促炎性细胞因子,最终导致细胞焦亡^[7]。细胞焦亡参与机体抵御病原体侵袭的过程,使病原体抗原暴露于适应性免疫系统并释放炎症因子,促进炎症反应和组织修复,而免疫抑制状态的形成也与细胞焦亡受到抑制密切相关^[7]。

VD/VDR信号系统广泛分布于单核-巨噬细胞等免疫细胞中,表现出显著的免疫调节和抗炎特性^[6]。因此,本研究采用盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture, CLP)建立脓毒症免疫抑制小鼠模型^[8],同时,选用小鼠巨噬细胞系RAW264.7建立脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)耐受细胞模型(即脓毒症免疫抑制细胞模型),在体内外探究骨化三醇逆转免疫抑制的作用及潜在机制,为脓毒症免疫抑制治疗提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有Model 550型酶联分析仪和CFX Connect型荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Bio-Rad公司)、SCIENTZ-96型高通量组织匀浆器(宁波新芝生物科技股份有限公司)、VMR型小动物呼吸麻醉机(美国Matrx公司)、NanoDrop型微量核酸蛋白浓度测定仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)、CKX53型荧光倒置显微镜(日本Olympus公司)、Zeiss LSM780型共聚焦显微镜(德国Analytik Jena AG公司)。

1.2 主要药品与试剂

骨化三醇(纯度≥98%,批号2219294)、改良苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(批号G1121)均购自北京索莱宝科技有限公司,LPS(纯度≥98%,批号046M4045V)购自美国Sigma公司,动物用异氟烷(批号217150301)购自深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司,DMEM细胞培养基(批号6124614)购自美国Hyclone公司,胎牛血清(批

号ST210506)购自德国PAN-Biotech GmbH公司,肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为326012-009、330384-011、303156-011)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司,CCK-8试剂盒(批号22346564)购自北京兰杰柯科技有限公司,乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒、钙黄绿素(calcein-AM)/碘化丙啶(propidium iodide, PI)活/死细胞双染试剂盒、caspase-1活性检测试剂盒、 Ca^{2+} 荧光探针Fluo-AM(批号分别为081823231211、080223231212、013123231211、073023231225)均购自上海碧云天生物技术有限公司, RNA快速提取盒(批号20231121)购自苏州新赛美生物科技有限公司, RNA逆转录试剂盒(批号962433L13W01)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司, SYBR Green定量预混液(批号64506228)购自美国Bio-Rad公司, 蕤麻油(批号20230503)购自河北武邑炎威医疗科技有限公司。

1.3 实验动物与细胞

BALB/c小鼠(SPF级),雌雄各半,体重18.0~22.0 g,4~6周龄,购自广东南模生物科技有限公司,生产许可证号为SCXK(粤)2022-0062。小鼠在温度(25±1)°C,相对湿度50%±5%,每12 h明暗交替循环的动物房中饲养,自由摄食、饮水。动物实验通过中部战区总医院实验动物伦理委员会批准,编号:中总动(福)第20221027号。

小鼠巨噬细胞系RAW264.7购于中国医学科学院基础研究所(国家生物医学实验细胞资源库)。

2 方法

2.1 体内实验

2.1.1 小鼠分组、建模与给药

体内模型采用本课题组已建立的CLP诱导脓毒症免疫抑制小鼠模型^[8]。取小鼠随机分为假手术组、CLP组和骨化三醇组,每组16只,雌雄各半。CLP组和骨化三醇组小鼠经麻醉后,开腹分离盲肠并结扎1.0 cm,使用16号钢针穿孔后缝合腹腔,建立脓毒症免疫抑制模型。此时间点记为术后0 h。假手术组小鼠除不结扎外,其余操作同CLP组。骨化三醇组小鼠于术后0、24、48、72 h灌胃骨化三醇(1 $\mu\text{g}/\text{kg}$)^[9],假手术组和CLP组小鼠同时灌胃等体积蓖麻油,每10 g(体重)给予0.1 mL。

2.1.2 小鼠7 d生存率分析

观察“2.1.1”项下各组小鼠术后7 d内的生存情况,计算7 d生存率。

2.1.3 小鼠血清中炎症细胞因子水平检测

另取24只小鼠按“2.1.1”项下方法分组、建模、给药,每组8只,雌雄各半。术后28 h,各组小鼠眼底静脉丛采血至无菌EP管中,5 000×g离心10 min,取上清液,按ELISA试剂盒要求操作,检测TNF- α 、IL-1 β 和IL-6水平。

2.1.4 小鼠肺组织形态学观察

“2.1.3”项下小鼠采血后处死,取肺组织,经水洗、脱水、透明、浸蜡、包埋后切片(3 μ m),进行常规HE染色,中性树胶封片,显微镜下观察肺组织病理学变化,并拍照。

2.2 体外实验

2.2.1 骨化三醇使用浓度的选择

将RAW264.7细胞接种于96孔板中,待细胞贴壁后更换无血清培养基,加入不同浓度(10、100 nmol/L和1、2、5、10、50 μ mol/L)骨化三醇处理细胞,每个浓度设置5个复孔。另设培养基(Medium)组为对照。处理24 h后,每孔加入10 μ L CCK-8溶液,继续培养2 h,使用酶标仪检测450 nm波长处吸光度(A)值,以Medium组细胞活性为100%,计算其他各组细胞活性,细胞活性=A值_{实验组}/A值_{Medium组}×100%。选择不影响细胞活性的最大浓度作为骨化三醇的使用浓度。

2.2.2 细胞建模、分组与给药

将RAW264.7细胞接种于培养皿中,待细胞贴壁后更换无血清培养基,加入5 ng/mL LPS处理12 h,然后更换上清液,加入100 ng/mL LPS处理细胞4 h,建立LPS耐受细胞模型,作为LPS耐受组。除不加入5 ng/mL LPS处理12 h外,其余方法同LPS耐受组操作,作为LPS组。2次均不加入,其余方法同LPS耐受组操作,作为Medium组。在LPS耐受组基础上,随2次LPS同时加入骨化三醇(根据“2.2.1”考察结果设置浓度)处理细胞,作为骨化三醇组。每组设置5个复孔。

2.2.3 细胞中TNF- α 和IL-6水平检测

收集“2.2.2”项下各组细胞上清液,按ELISA试剂盒要求操作,检测其中TNF- α 和IL-6水平。

2.2.4 细胞中焦亡相关基因表达检测

采用实时荧光定量PCR法检测。收集“2.2.2”项下各组细胞,裂解细胞提取总RNA,反转录为cDNA。按SYBR Green定量预混液说明书配制反应体系:cDNA模板1 μ L, SYBR Green 4 μ L, 正、反向引物各0.5 μ L, ddH₂O 4 μ L。反应条件为:95 °C预变性3 min;95 °C变性30 s,55 °C退火30 s,72 °C延伸1 min,共39个循环。以 β -肌动蛋白(β -actin)为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算IL-1 β 、NLRP3、IL-18和caspase-1 mRNA的表达量,并以Medium组为参照进行归一化处理。引物由北京擎科生物科技股份有限公司设计合成。IL-1 β 的正向引物为5'-TCGCAGCAGCACATCAACAGAG-3',反向引物

为5'-AGGTCCACGGAAAGACACAGG-3',产物大小为97 bp;NLRP3的正向引物为5'-CTCTGTTCACTGG-CTGCGGATG-3',反向引物为5'-TGGTCCTTCCTCACGGTCTCC-3',产物大小为243 bp;IL-18的正向引物为5'-CCGGATATCAACTTGGCCGACTTCACT-3',反向引物为5'-CCGCTCGAGACTTGATGTAAGTTAG-TGAGAGTG-3',产物大小为93 bp;caspase-1的正向引物为5'-ATGGCCGACAAGGTCTGAGG-3',反向引物为5'-GACATGATCGCACAGGTCTCGTG-3',产物大小为183 bp; β -actin的正向引物为5'-CGTAAAGACCTCT-ATGCCAAC-3',反向引物为5'-TAGGAGCCAGGGC-AGTAATC-3',产物大小为100 bp。

2.2.5 细胞焦亡观察和Ca²⁺水平检测

按“2.2.2”项下方法建模、分组、给药处理细胞,收样前30 min分别加入calcein-AM/PI染料(观察细胞焦亡)或Fluo-AM荧光探针(检测Ca²⁺水平)并放回细胞培养箱中继续培养。30 min后使用共聚焦显微镜观察并拍照,同时采用Image J(V1.8.0.112)软件分析PI阳性率和Ca²⁺荧光强度。

2.2.6 细胞中LDH漏出率和caspase-1活性检测

按“2.2.2”项下方法建模、分组、给药处理细胞,收样前1 h按LDH检测试剂盒或caspase-1活性检测试剂盒说明书操作后继续培养。1 h后使用酶标仪测定450 nm波长处的A值。以Medium组的LDH和caspase-1活性均为100%,计算LDH漏出率和caspase-1活性。LDH漏出率/caspase-1活性=A值_{实验组}/A值_{Medium组}×100%。

2.3 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.0.2软件对数据进行统计处理及绘图。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用SNK-q检验。采用Kaplan-Meier法处理生存数据并绘制曲线,采用Log-rank检验比较曲线间的差异。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 体内实验结果

3.1.1 骨化三醇对模型小鼠7 d生存率的影响

假手术组、CLP组和骨化三醇组小鼠7 d生存率分别为100.00%、68.75%、81.25%,生存曲线见图1。

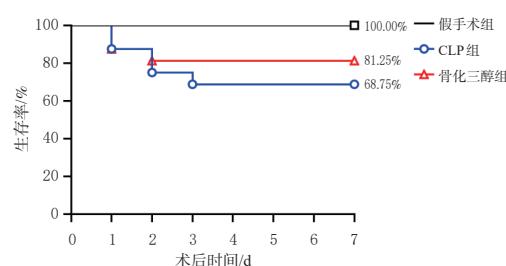


图1 各组小鼠的7 d生存曲线($n=16$)

3.1.2 骨化三醇对模型小鼠血清中炎症细胞因子水平的影响

与假手术组比较,CLP组小鼠血清中TNF- α 、IL-6水平均显著升高($P<0.05$),IL-1 β 水平无显著变化($P>0.05$)。与CLP组比较,骨化三醇组小鼠血清中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平均显著升高($P<0.05$)。结果见表1。

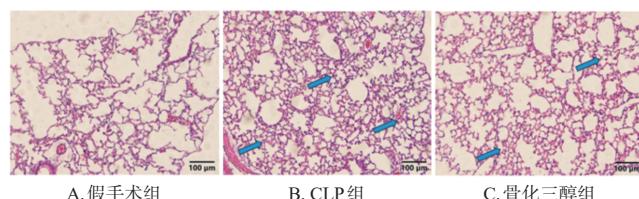
表1 各组小鼠血清中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平比较($\bar{x}\pm s, n=8, \text{pg/mL}$)

| 组别 | TNF- α | IL-6 | IL-1 β |
|-------|---------------------------|------------------------------|--------------------------|
| 假手术组 | 32.72±1.71 | 121.31±15.70 | 55.77±0.81 |
| CLP组 | 62.92±21.23 ^a | 2 072.98±188.75 ^a | 56.13±2.88 |
| 骨化三醇组 | 139.18±52.54 ^b | 3 694.58±765.38 ^b | 74.45±17.20 ^b |

a:与假手术组比较, $P<0.05$;b:与CLP组比较, $P<0.05$ 。

3.1.3 骨化三醇对模型小鼠肺组织形态学的影响

假手术组小鼠肺组织形态规则,肺泡结构清晰完整。CLP组小鼠肺组织出现不同程度的水肿、肺泡壁和肺泡间隔增厚以及炎症细胞浸润。骨化三醇组小鼠的肺组织损伤较CLP组明显减轻。结果见图2。



蓝色箭头:炎症细胞浸润。

图2 各组小鼠肺组织形态学显微图(HE染色)

3.2 体外实验结果

3.2.1 骨化三醇使用浓度的选择

10、100 nmol/L和1、2、5 $\mu\text{mol/L}$ 骨化三醇处理组细胞活性分别为($96.20\pm2.93\%$)%、($96.14\pm2.87\%$)%、($98.01\pm1.61\%$)%、($97.68\pm4.51\%$)%、($96.16\pm2.63\%$)%($n=5$),与Medium组(细胞活性为100%)比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);10和50 $\mu\text{mol/L}$ 骨化三醇处理组细胞活性分别为($93.20\pm0.45\%$)%和($17.14\pm0.11\%$)%($n=5$),均显著低于Medium组($P<0.05$)。后续研究采用5 $\mu\text{mol/L}$ 骨化三醇处理RAW264.7细胞,考察其对LPS耐受细胞的影响。

3.2.2 骨化三醇对LPS耐受细胞上清液中TNF- α 和IL-6水平的影响

与Medium组比较,LPS组细胞上清液中TNF- α 和IL-6水平均显著升高($P<0.05$)。与LPS组比较,LPS耐受组细胞上清液中TNF- α 和IL-6水平均显著降低($P<0.05$),表明LPS耐受细胞建模成功。与LPS耐受组比较,骨化三醇组细胞上清液中TNF- α 和IL-6水平均显著升高($P<0.05$)。结果见表2。

表2 各组细胞上清液中TNF- α 和IL-6水平比较($\bar{x}\pm s, n=5, \text{pg/mL}$)

| 组别 | TNF- α | IL-6 |
|---------|------------------------------|------------------------------|
| Medium组 | 139.39±9.63 | 41.81±12.03 |
| LPS组 | 6 262.16±288.58 ^a | 7 007.09±558.24 ^a |
| LPS耐受组 | 1 744.80±145.61 ^b | 3 323.90±188.99 ^b |
| 骨化三醇组 | 5 183.82±112.62 ^c | 6 362.72±427.49 ^c |

a:与Medium组比较, $P<0.05$;b:与LPS组比较, $P<0.05$;c:与LPS耐受组比较, $P<0.05$ 。

3.2.3 骨化三醇对LPS耐受细胞中焦亡相关基因表达的影响

与Medium组比较,LPS组细胞中IL-1 β 、NLRP3、IL-18和caspase-1 mRNA表达量均显著升高($P<0.05$)。与LPS组比较,LPS耐受组细胞中IL-1 β 、NLRP3、IL-18和caspase-1 mRNA表达量均显著降低($P<0.05$)。与LPS耐受组比较,骨化三醇组细胞中IL-1 β 、NLRP3、IL-18和caspase-1 mRNA表达量均显著升高($P<0.05$)。结果见表3。

表3 各组细胞焦亡相关基因表达比较($\bar{x}\pm s, n=5$)

| 组别 | IL-1 β mRNA | NLRP3 mRNA | IL-18 mRNA | caspase-1 mRNA |
|---------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| Medium组 | 1.00±0.05 | 1.00±0.14 | 1.00±0.04 | 1.00±0.03 |
| LPS组 | 21.39±1.49 ^a | 14.21±0.31 ^a | 2.91±0.12 ^a | 2.92±0.05 ^a |
| LPS耐受组 | 5.78±0.20 ^b | 5.45±0.48 ^b | 1.58±0.07 ^b | 1.76±0.18 ^b |
| 骨化三醇组 | 19.38±0.65 ^c | 21.11±1.35 ^c | 2.39±0.26 ^c | 2.50±0.11 ^c |

a:与Medium组比较, $P<0.05$;b:与LPS组比较, $P<0.05$;c:与LPS耐受组比较, $P<0.05$ 。

3.2.4 骨化三醇对LPS耐受细胞焦亡相关指标的影响

与Medium组比较,LPS组细胞的PI阳性率、caspase-1活性和LDH漏出率均显著升高($P<0.05$)。与LPS组比较,LPS耐受组细胞的PI阳性率、caspase-1活性和LDH漏出率均显著降低($P<0.05$)。与LPS耐受组比较,骨化三醇组细胞的PI阳性率、caspase-1活性和LDH漏出率均显著升高($P<0.05$)。结果见表4和图3。

表4 各组细胞焦亡相关指标比较($\bar{x}\pm s, n=5$)

| 组别 | PI阳性率/% | caspase-1活性/% | LDH漏出率/% | Ca ²⁺ 荧光强度 |
|---------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------|
| Medium组 | 3.08±1.75 | 100.00 | 100.00 | 0 |
| LPS组 | 45.50±1.87 ^a | 349.25±15.93 ^a | 388.66±6.91 ^a | 7.40±0.33 ^a |
| LPS耐受组 | 16.30±1.24 ^b | 204.34±14.88 ^b | 266.40±13.01 ^b | 4.51±0.31 ^b |
| 骨化三醇组 | 36.71±2.03 ^c | 257.38±21.26 ^c | 341.12±20.66 ^c | 6.57±0.31 ^c |

a:与Medium组比较, $P<0.05$;b:与LPS组比较, $P<0.05$;c:与LPS耐受组比较, $P<0.05$ 。

3.2.5 骨化三醇对LPS耐受细胞中Ca²⁺水平的影响

与Medium组比较,LPS组细胞中Ca²⁺荧光强度显著升高($P<0.05$)。与LPS组比较,LPS耐受组细胞中Ca²⁺荧光强度显著降低($P<0.05$)。与LPS耐受组比较,骨化三醇组细胞中Ca²⁺荧光强度显著升高($P<0.05$)。结果见表4和图4。

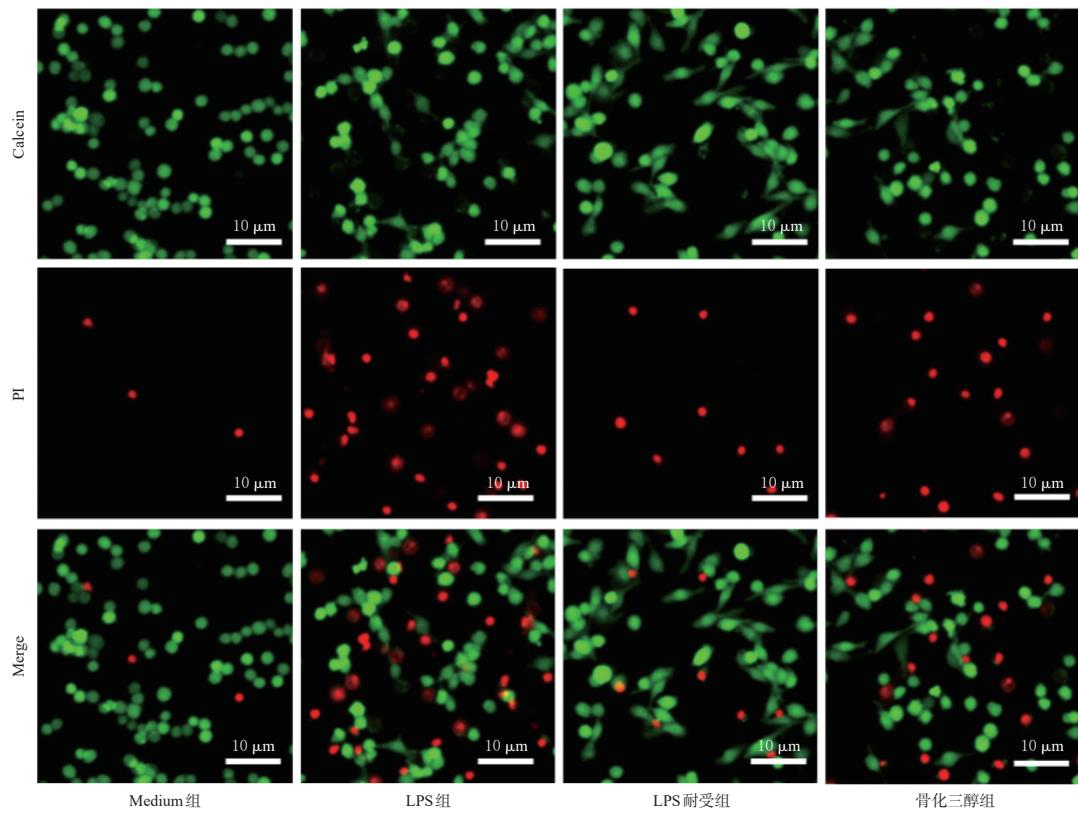


图3 各组细胞焦亡的显微图(calcein-AM/PI染色)

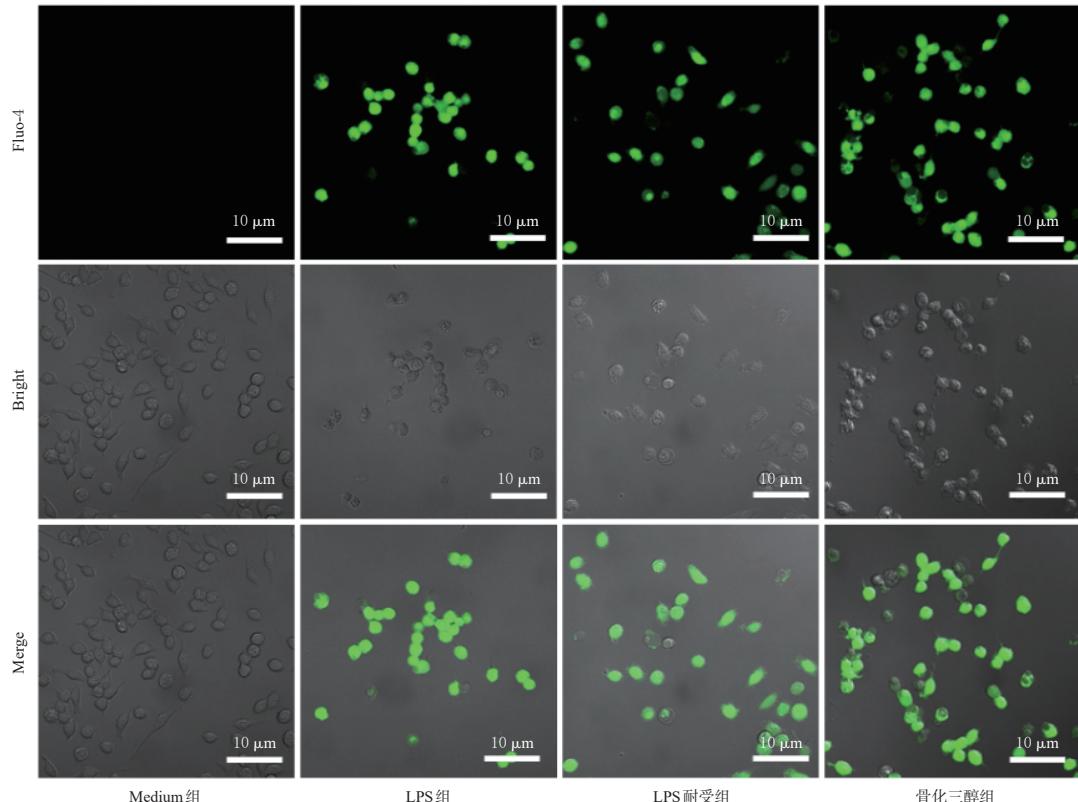


图4 各组细胞中 Ca^{2+} 水平的显微图(Fluo-AM 荧光探针)

4 讨论

脓毒症患者在经历炎症风暴后,会进入免疫抑制状态,抗二次感染能力显著下降,表现为炎症细胞因子水平降低及免疫应答失调^[1]。有研究发现,一定水平的炎

症细胞因子有助于激活免疫系统,提高机体对致病菌的清除能力^[10]。本课题组前期研究亦发现,CLP诱导的脓毒症免疫抑制模型小鼠处于免疫低反应状态,其炎症细胞因子水平较低^[4,8]。本研究结果显示,脓毒症免疫抑制

模型小鼠血清中TNF- α 和IL-6水平均显著高于假手术组,此结果与本课题组前期研究结果一致。骨化三醇可进一步显著提高模型小鼠血清中TNF- α 、IL-6和IL-1 β 水平,同时还能提升小鼠的7 d生存率,减轻其肺损伤,提示骨化三醇可逆转小鼠的脓毒症免疫抑制。

单核-巨噬细胞系统作为固有免疫核心防线,其功能抑制直接导致宿主抗感染能力下降^[11]。本研究采用LPS耐受细胞模型,通过低剂量LPS反复刺激诱导免疫低反应状态,精准模拟脓毒症患者的免疫抑制状态^[12]。体外实验发现,LPS耐受细胞分泌到上清液中的炎症细胞因子减少,骨化三醇可逆转LPS耐受细胞中炎症细胞因子分泌的抑制状态,恢复单核-巨噬细胞对病原信号的应答功能。

细胞焦亡是一种程序性促炎死亡方式,最初发现于巨噬细胞抗感染过程中,适度激活细胞焦亡有助于提升宿主的防御功能。其经典通路由NLRP3炎性小体激活caspase-1,随后Gasdermin蛋白被切割形成质膜孔隙,促使IL-1 β /IL-18释放及细胞溶解^[13]。本研究发现,骨化三醇可提高LPS耐受细胞中焦亡相关基因IL-1 β 、NLRP3、IL-18、caspase-1 mRNA表达量,并通过calcein-AM/PI染色、caspase-1活性和LDH漏出率初步鉴别焦亡细胞。PI仅能进入细胞膜受损或完全崩解的细胞,而胞内LDH可从受损的细胞孔隙中漏出胞外^[14]。本研究结果显示,骨化三醇可显著提高LPS耐受细胞的PI阳性率、caspase-1活性和LDH漏出率,提示骨化三醇可能通过适度激活焦亡通路来增强炎症反应并促进组织修复,从而帮助机体恢复对病原体的抵抗力。既往研究表明,骨化三醇与VDR结合后可促进内质网释放Ca²⁺^[15]。本研究进一步发现,骨化三醇可显著提高LPS耐受细胞中Ca²⁺水平,提示骨化三醇可通过促进内质网释放Ca²⁺参与细胞焦亡的调控,进而逆转脓毒症诱导的免疫抑制。

综上所述,本研究通过体内外模型系统揭示了骨化三醇可逆转脓毒症免疫抑制,该作用机制可能是通过骨化三醇与VDR结合,从而促进内质网释放Ca²⁺,进而驱动NLRP3/caspase-1介导的细胞焦亡途径来实现的。本研究为拓宽骨化三醇的临床新适应证和靶向VDR/Ca²⁺/细胞焦亡信号通路治疗脓毒症免疫抑制提供了重要的实验依据。

(致谢:诚挚感谢陆军军医大学药理教研室周红教授对本课题的指导;感谢陆军军医大学第一附属医院中心实验室郑江教授、刘鑫副研究员团队为课题的开展提供实验平台和技术支持)

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.
- [2] HOTCHKISS R S, MONNERET G, PAYEN D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy[J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13 (12) : 862-874.
- [3] CUTULI S L, FERRANDO E S, CAMMAROTA F, et al. Update on vitamin D role in severe infections and sepsis [J]. *J Anesth Analg Crit Care*, 2024, 4 (1) : 4.
- [4] SHANG S L, WU J Q, LI X L, et al. Artesunate interacts with the vitamin D receptor to reverse sepsis-induced immunosuppression in a mouse model via enhancing autophagy[J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177 (18) : 4147-4165.
- [5] ZHANG Y, ZHOU J, HUA L, et al. Vitamin D receptor (VDR) on the cell membrane of mouse macrophages participates in the formation of lipopolysaccharide tolerance; mVDR is related to the effect of artesunate to reverse LPS tolerance[J]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21 (1) : 124.
- [6] CHAROENNGAM N, HOLICK M F. Immunologic effects of vitamin D on human health and disease[J]. *Nutrients*, 2020, 12 (7) : 2097.
- [7] MURAKAMI T, OCKINGER J, YU J J, et al. Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109 (28) : 11282-11287.
- [8] DENG D M, LI X L, LIU C, et al. Systematic investigation on the turning point of over-inflammation to immunosuppression in CLP mice model and their characteristics [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 42: 49-58.
- [9] LEAF D E, RAED A, DONNINO M W, et al. Randomized controlled trial of calcitriol in severe sepsis[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014, 190 (5) : 533-541.
- [10] BOSMANN M, WARD P A. The inflammatory response in sepsis[J]. *Trends Immunol*, 2013, 34 (3) : 129-136.
- [11] QIU P, LIU Y, ZHANG J. Review: the role and mechanisms of macrophage autophagy in sepsis[J]. *Inflammation*, 2019, 42 (1) : 6-19.
- [12] CAVAILLON J M, ADIB-CONQUY M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis[J]. *Crit Care*, 2006, 10 (5) : 233.
- [13] BROZ P. Immunology: caspase target drives pyroptosis [J]. *Nature*, 2015, 526 (7575) : 642-643.
- [14] ATELE N, GUPTA S, YADAV U S, et al. Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques[J]. *J Microsc*, 2014, 255 (1) : 7-19.
- [15] HII C S, FERRANTE A. The non-genomic actions of vitamin D[J]. *Nutrients*, 2016, 8 (3) : 135.

(收稿日期:2025-05-13 修回日期:2025-08-12)

(编辑:邹丽娟)