

[文章编号] 1007-7669(2024)07-0535-06

[DOI号] 10.14109/j.cnki.xyylc.2024.07.10

小檗碱调节 Nrf2/HO-1 信号通路改善脓毒症肠道损伤

仇先明¹, 代文², 王全珍¹, 张飞虎³, 孔立³, 姜志明¹, 周蕾^{1,4}

(1. 山东第一医科大学第一附属医院 / 山东省千佛山医院 重症医学科, 山东 济南 250014; 2. 滨州医学院附属烟台分院 急诊医学科, 山东 烟台 264100; 3. 山东中医药大学附属医院 急诊中心, 山东 济南 250014; 4. 山东中医药大学第一临床医学院, 山东 济南 250399)

[关键词] 脓毒症; 肠屏障; 核因子 E2 相关因子 2; 血红素加氧酶 -1; 小檗碱; 炎症

[摘要] 目的 探讨小檗碱改善脓毒症大鼠肠道损伤的作用及其机制。方法 将 40 只雄性健康 SD 大鼠随机分为假手术组, 模型组, 小檗碱低、中、高剂量 (25、50、100 mg·kg⁻¹) 组, 每组 8 只, 灌胃给予对应剂量 7 d 后采用盲肠结扎穿孔 (CLP) 法造脓毒症大鼠模型。造模后 24 h 麻醉取血并留取回肠标本, 观察大鼠回肠组织光镜下的病理变化并进行病理评分比较。利用 ELISA 法检测各组大鼠血清血红素加氧酶 -1 (HO-1)、二胺氧化酶 (DAO)、肠脂肪酸结合蛋白 (iFABP)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL)-6、IL-1 β 的含量, 比色分析法检测大鼠回肠组织中丙二醛 (MDA) 含量及超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, Western blot 法检测回肠组织 HO-1、核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 及 IL-1 β 蛋白水平。结果 与假手术组相比, 模型组回肠组织病理学评分显著升高 ($P < 0.01$), 血清 HO-1、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、DAO、iFABP 及肠组织 MDA 含量升高, 而肠组织 SOD 活性降低, Nrf2、HO-1 及 IL-1 β 蛋白表达明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 小檗碱高剂量组回肠组织病理学评分明显降低 ($P < 0.01$), 血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、DAO、iFABP 及肠组织 MDA 含量也降低 ($P < 0.05$), 而血清 HO-1 含量及肠组织 SOD 活性升高 ($P < 0.01$), Nrf2、HO-1 表达上调, IL-1 β 表达降低 ($P < 0.05$)。结论 小檗碱能有效改善脓毒症导致的肠损伤, 其机制可能与小檗碱上调 Nrf2/HO-1 表达相关。

[中图分类号] R975

[文献标志码] A

Berberine ameliorates intestinal injury in sepsis by regulating Nrf2/HO-1 pathway

QIU Xian-ming¹, DAI Wen², WANG Quan-zhen¹, ZHANG Fei-hu³, KONG Li³, JIANG Zhi-ming¹, ZHOU Lei^{1,4}

(1. Department of Respiratory Intensive Care Unit, First Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, Ji-nan SHANDONG 250014, China; 2. Department of Emergency, Yantai Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Yantai SHANDONG 264100, China; 3. Department of Emergency Center, Shandong University of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital, Ji-nan SHANDONG 250014, China; 4. First Clinical Medical College of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji-nan SHANDONG 250399, China)

[KEY WORDS] sepsis; intestinal barrier; nuclear factor E2-related factor 2; heme oxygenase-1; berberine; inflammatory

[ABSTRACT] AIM To explore the effects of berberine on intestinal injury in sepsis rats and its mechanism.

[收稿日期] 2023-06-26 [接受日期] 2024-05-06

[基金项目] 国家重点研发计划资助项目 (2018YFC2002000); 国家自然科学基金面上项目 (81974545); 中国民族医药学会科研项目 (2021Z1041-370104); 山东省中医药科技发展计划 (2019-0390)

[作者简介] 仇先明, 男, 主治医师, 硕士, 主要从事中西医结合急危重症救治的研究, E-mail: qfsqiu@126.com

[责任作者] 周蕾, E-mail: lily_zhoulei@126.com

METHODS Forty male healthy SD rats were randomly divided into sham group, model group, berberine low, medium, and high dose (25, 50, 100 mg · kg⁻¹) groups, with 8 rats in each group, and the corresponding dose was given by gavage for 7 d. Sepsis model was prepared by cecum ligation and perforation (CLP). After 24 h of modeling, the rats were anesthetized and the ileum specimens were collected. The pathological changes of the ileum were observed and scored under light microscope. The contents of serum heme oxygenase-1 (HO-1), diamine oxidase (DAO), intestinal fatty acid binding protein (iFABP), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-6 and IL-1 β were detected by ELISA. The content of malondialdehyde (MDA) and the activity of superoxide dismutase (SOD) in ileum were detected by colorimetric analysis. The protein levels of HO-1, nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) and IL-1 β in ileum were detected by Western blot. **RESULTS** Compared with the sham group, ileum histopathological score was significantly increased in the model group ($P < 0.01$), and contents of HO-1, IL-1 β , IL-6, TNF- α , DAO, iFABP in serum, and MDA in intestinal tissue were increased, while SOD activity was decreased, and the expressions of Nrf2, HO-1 and IL-1 β protein in the model group were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the ileum histopathologic score of the berberine high dose group was significantly decreased ($P < 0.01$), the contents of IL-1 β , IL-6, TNF- α , DAO, iFABP in serum and MDA in intestinal tissue were also decreased ($P < 0.05$), while the HO-1 content in serum and SOD activity in intestinal tissue were increased ($P < 0.01$), and the protein expressions of Nrf2 and HO-1 in the berberine high dose group were significantly increased, but the IL-1 β protein expression was decreased ($P < 0.05$). **CONCLUSION** Berberine can effectively improve intestinal damage caused by sepsis, and its mechanism may be related to the up-regulation of Nrf2/HO-1 expression.

脓毒症是常见的急危重症病种, 因感染诱发宿主全身炎症反应综合征以及免疫反应异常调节, 最终引起宿主器官功能障碍, 进而危及生命^[1]。脓毒症诱发内源性和外源性炎症刺激破坏肠道屏障, 增强上皮通透性, 导致全身性炎症反应和脏器功能损伤的发生^[2]。小檗碱 (berberine) 是一种植物生物碱, 存在于多种植物的根和树皮中, 包括黄连 (金线)、小檗 (俄勒冈葡萄) 和小檗 (树姜黄)。小檗碱具有多种药理作用, 包括抗癌、抗糖尿病、抗肥胖、抗高脂血症、心脏保护、空间记忆改善、免疫抑制特性, 以及抗氧化和抗炎活性^[3]。

小檗碱可以改善肠道炎症, 减少炎症细胞浸润, 修复肠黏膜屏障^[4]。研究表明小檗碱能通过调控氧化/抗氧化相关介质来改善脓毒症炎症反应。核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) / 血红素加氧酶 -1 (HO-1) 通路为重要的抗氧化应激信号途径, 该通路可改善脓毒症诱导的肾、肺、肠急性损伤^[5]。本研究观察小檗碱通过 Nrf2/HO-1 通路对脓毒症肠损伤的影响及可能的作用机制。

材料与方法

药物、试剂与仪器 小檗碱 (纯度: HPLC $\geq 98\%$) 购自美国 MCE 公司。大鼠 HO-1、白细胞介素 (IL)-1 β 、肿瘤坏死因子 - α (TNF- α)、IL-6、二胺氧化酶 (DAO)、肠脂肪酸结合蛋白 (iFABP) ELISA 试剂盒均购自天津

安诺瑞康生物技术有限公司, Anti-Nrf2 兔多克隆抗体购自杭州华安生物技术有限公司, Anti-HO-1 兔多克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司, Anti-IL-1 β 兔多克隆抗体购自英国 Abcam 公司, 丙二醛 (MDA) 检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 检测试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司。电动组织匀浆器 (上海净信实业发展有限公司), 移液器 (德国艾本德有限公司), 1658040 型垂直电泳槽、Chemidoc 化学发光凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司), Stratos 高速冷冻离心机 (赛默飞世尔有限公司), Bio Tek EpochME 酶标仪 (宝特伯美国有限公司)。

实验动物 8 周龄雄性 SD 大鼠 40 只, 体重 180~220 g, 购自济南朋悦实验动物繁育有限公司, 动物合格证号: SCXK (鲁) 2019-0003。标准饲料, 专人单笼饲养 1 周。实验前 12 h 禁食, 自由饮水。本实验经过山东第一医科大学第一附属医院伦理委员会审查批准 ([2022] 动伦审字 S681)。

建模与分组 采用随机数字表法随机将大鼠分为 5 组, 假手术组, 模型组, 小檗碱低、中、高剂量 (25、50、100 mg · kg⁻¹) 组, 均 $n=8$ 。小檗碱各剂量组灌胃给予对应剂量每日 1 次, 假手术组大鼠给予同等剂量生理盐水 (每 100 g 体重 2 mL) 灌胃。在第 7 日灌胃 2 h 后, 模型组和小檗碱各剂量组采用盲肠结扎穿孔 (CLP) 法造脓毒症大鼠模型: 3% 戊巴比妥钠 30 mg · kg⁻¹ 腹腔内注射麻醉, 切口取上腹部正中部位, 取出

盲肠, 分离盲肠远端 1/3 处用线结扎, 用针穿 2 孔, 然后挤出少许肠内容物于腹腔内, 回纳盲肠, 后分层缝合腹腔, 术后 6 h 成模。假手术组开腹后, 探查腹腔后关腹, 其他操作相同。术后 22 h 小檗碱组继续给予对应剂量灌胃 1 次, 假手术组和模型组大鼠同时给予生理盐水灌胃。造模后 24 h 用 3% 戊巴比妥 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻醉大鼠, 腹主动脉取血后分离血清用于 ELISA 检测。于近回盲端取回肠组织约 5 cm, 清洗后分为 3 份, 用于病理学检查、Western blot 及 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

肠组织病理学改变 于 10% 甲醇水溶液中固定 72 h, 常规处理后经 HE 染色, 镜下观察病理学变化, 并依据 Chiu's 评分标准^[6]。1 分为正常肠黏膜绒毛; 2 分为绒毛顶端黏膜下出现间隙, 毛细血管充血; 3 分为肠黏膜下间隙扩大, 肠黏膜与黏膜下层分离; 4 分为黏膜与黏膜下层分离延伸到肠绒毛两侧; 5 分为绒毛变钝, 固有膜及其血管暴露, 炎性组织浸润; 6 分为固有层消化崩解, 出血或溃疡形成。

血清 DAO、iFABP、HO-1、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量

大鼠腹主动脉采血后立即离心后取血清, 根据 ELISA 试剂盒说明书步骤检测血清 DAO、iFABP、HO-1、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的含量, 操作按试剂盒说明书进行。

肠组织 MDA 含量及 SOD 活性 留取 100 mg 肠组织, 加入生理盐水制备为 10% 组织匀浆, 离心后取上清液 500 μL , 应用硫代巴比妥酸比色分析法测定 MDA 含量, 应用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性。

HO-1 通路相关蛋白表达 新鲜肠组织称重后按照 1:10 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的比例放入 RIPA 强裂解液中, 使用电动匀浆器将其充分研磨, 后置于冰上裂解 30 min, 裂解过程中反复涡旋混匀。12 000 $\times g$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 高速离心 15 min 后收集上清液并使用 BCA 蛋白试剂盒测量总蛋白浓度。各组样本经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 转到 PVDF 膜上, 用 5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h, TBST 缓冲液洗膜 3 次, 与 HO-1 (1:1 000)、Nrf2 (1:1 000)、IL-1 β (1:1 000)、GAPDH (1:2 000) 一抗在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱的摇床上孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 然后与荧光二抗 (1:10 000) 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育过夜, 用化学发光凝胶成像系统将结果可视化, 并测定条带灰度值, 以目的蛋白与 GAPDH 的灰度值比值表示蛋白的相对表达量。

统计学分析 应用 SPSS Statistic 26 和 GraphPad Prism 8.0 软件对实验数据进行统计分析并作图。符合正态分布的计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 方差齐性采用 LSD 检验。若方差不齐则用秩和检验。 $P < 0.05$ 表示有显著差异。

结 果

一般情况 模型组大鼠在造模后 3 h 可见到竖毛、蜷缩、反应迟钝、发热寒战等表现。假手术组大鼠行为表现未见异常。小檗碱组大鼠以上表现较模型组轻微, 不同剂量组之间未见明显差异。

肠组织病理损伤及评分 与假手术组相比, 模型组大鼠肠组织镜下可见黏膜萎缩, 绒毛破坏, 上皮细胞坏死, 炎症细胞大量浸润。小檗碱中、高剂量组肠组织细胞的损伤表现及炎症细胞浸润情况较模型组轻, 见图 1。与假手术组相比, 模型组肠组织病理学评分显著增高 (1.25 ± 0.89 vs. 4.12 ± 0.64 , $P < 0.01$)。与模型组相比, 小檗碱中、高剂量组肠道损伤评分均显著降低 (分别为 2.38 ± 0.52 和 1.88 ± 0.64 , $P < 0.01$), 小檗碱低剂量组无显著差异 (3.75 ± 0.71 , $P > 0.05$)。

血清 DAO、iFABP 含量 与假手术组相比, 模型组 DAO 和 iFABP 含量显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比,

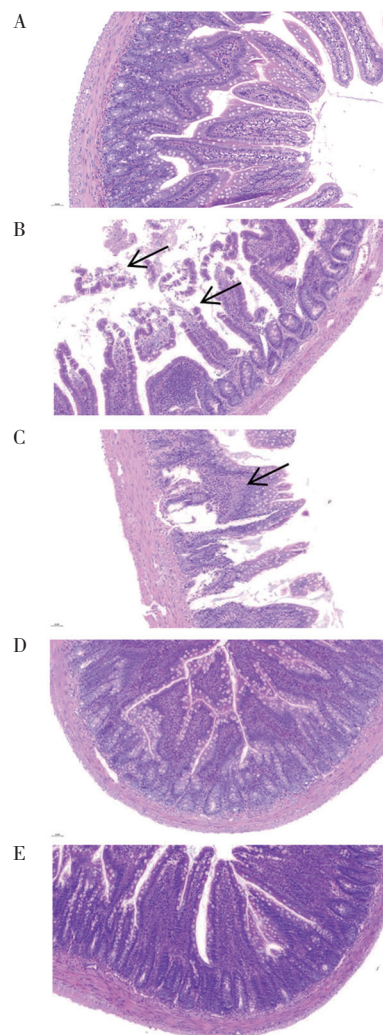


图 1 各组大鼠肠组织病理改变 (HE 染色, $\times 100$, $n=8$)

A: 假手术组, B: 模型组, C: 小檗碱低剂量组, D: 小檗碱中剂量组, E: 小檗碱高剂量组

小檗碱高剂量组 DAO 和 iFABP 含量均显著降低 ($P<0.05$), 小檗碱中剂量组血清 iFABP 含量显著降低 ($P<0.05$), 呈剂量依赖趋势。见表 1。

肠组织氧化应激相关指标 与假手术组相比, 模型组 MDA 含量显著升高, SOD 活性降低 ($P<0.01$)。与模型组相比, 小檗碱中、高剂量组大鼠 MDA 含量降低 ($P<0.05$), 小檗碱高剂量组 SOD 活性升高 ($P<0.01$), 见表 1。

血清 HO-1、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量 与假手术组相比, 模型组血清 HO-1 及 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量均显著升高 ($P<0.01$)。与模型组相比, 小檗碱中、高剂量组血清 HO-1 含量升高 ($P<0.01$), TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量降低 ($P<0.05$), 呈剂量依赖趋势。见表 2。

肠组织 HO-1、Nrf2、IL-1 β 蛋白表达 与假手术组相比, 模型组肠组织 IL-1 β 、HO-1、Nrf2 蛋白表达显著上调 ($P<0.01$)。与模型组相比, 小檗碱各剂量组 HO-1、Nrf2 蛋白表达显著升高, 呈剂量依赖性, 小檗碱高剂量组 IL-1 β 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$)。见表 3, 图 2。

讨 论

脓毒症的高死亡率与肠上皮屏障功能损伤有着密切关系。因此, 探寻脓毒症肠黏膜屏障损伤的关键环节, 需找到阻断脓毒症发生发展的有效手段。本研究发现盲肠结扎术后 24 h 大鼠血清 DAO、iFABP 含量升高, 血清炎症因子水平上升, 肠组织病理显示肠道明显受损, 表明盲肠结扎穿孔法成功制备了脓毒症肠道损伤大鼠模型。

表 1 各组 DAO、iFABP、MDA、SOD 比较

组别	DAO	iFABP	MDA	SOD
假手术	9.73 ± 2.06	233.19 ± 119.77	0.50 ± 0.14	31.80 ± 8.14
模型	14.87 ± 6.54 ^a	306.42 ± 54.57 ^c	2.14 ± 0.89 ^c	14.36 ± 3.28 ^c
小檗碱低剂量	10.97 ± 4.69 ^d	313.42 ± 113.46 ^d	1.17 ± 0.60 ^d	22.56 ± 4.17 ^d
小檗碱中剂量	11.39 ± 1.78 ^{de}	239.09 ± 85.15 ^{de}	0.78 ± 0.15 ^{de}	21.75 ± 8.01 ^{de}
小檗碱高剂量	9.45 ± 2.95 ^{ej}	220.68 ± 67.19 ^{ej}	0.68 ± 0.33 ^{fi}	27.64 ± 6.53 ^{fi}

DAO: 二胺氧化酶, iFABP: 肠脂肪酸结合蛋白, MDA: 丙二醛, SOD: 超氧化物歧化酶。经 *t* 检验: 与假手术组比较, ^a $P<0.01$; 与模型组比较, ^d $P>0.05$, ^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$; 与小檗碱低剂量组比较, ^{de} $P>0.05$, ^{fi} $P<0.01$; 与小檗碱中剂量组比较, ^{ij} $P>0.05$

表 2 各组大鼠血清 HO-1 和炎症因子比较

组别	HO-1	IL-1 β	IL-6	TNF- α
假手术	0.72 ± 0.18	4.83 ± 0.83	10.31 ± 5.50	40.01 ± 4.38
模型	4.58 ± 0.49 ^c	232.50 ± 157.60 ^c	250.50 ± 113.10 ^c	52.39 ± 3.53 ^c
小檗碱低剂量	5.18 ± 1.83 ^d	120.60 ± 107.70 ^c	248.30 ± 161.70 ^d	50.03 ± 3.94 ^d
小檗碱中剂量	11.75 ± 1.84 ^{fi}	25.57 ± 11.97 ^{fi}	130.00 ± 173.90 ^{fi}	47.38 ± 3.21 ^{de}
小檗碱高剂量	12.83 ± 2.43 ^{fi}	24.11 ± 15.70 ^{fk}	37.14 ± 36.24 ^{fk}	45.64 ± 7.28 ^{hij}

HO-1: 血红素加氧酶-1, TNF- α : 肿瘤坏死因子- α , IL: 白细胞介素。经 *t* 检验: 与假手术组比较, ^c $P<0.01$; 与模型组比较, ^d $P>0.05$, ^f $P<0.05$, ⁱ $P<0.01$; 与小檗碱低剂量组比较, ^{de} $P>0.05$, ^{fi} $P<0.05$, ^{ij} $P<0.01$; 与小檗碱中剂量组比较, ^{ij} $P>0.05$, ^h $P<0.05$

表 3 各组肠组织 HO-1、Nrf2、IL-1 β 蛋白比较

组别	HO-1	Nrf2	IL-1 β
假手术	0.21 ± 0.05	0.47 ± 0.06	0.76 ± 0.15
模型	0.34 ± 0.04 ^c	0.81 ± 0.19 ^c	1.20 ± 0.15 ^c
小檗碱低剂量	0.47 ± 0.07 ^e	0.92 ± 0.19 ^e	1.02 ± 0.11 ^d
小檗碱中剂量	0.70 ± 0.11 ^{ch}	1.28 ± 0.20 ^{ch}	0.91 ± 0.12 ^{de}
小檗碱高剂量	1.58 ± 0.38 ^{ehi}	1.32 ± 0.11 ^{ek}	0.85 ± 0.02 ^{hij}

HO-1: 血红素加氧酶-1, Nrf2: 核因子 E2 相关因子 2, IL: 白细胞介素。经 *t* 检验: 与假手术组比较, ^c $P<0.01$; 与模型组比较, ^d $P>0.05$, ^e $P<0.05$; 与小檗碱低剂量组比较, ^{de} $P>0.05$, ^h $P<0.05$, ⁱ $P<0.01$; 与小檗碱中剂量组比较, ^{ij} $P>0.05$, ^k $P<0.05$, ^l $P<0.01$

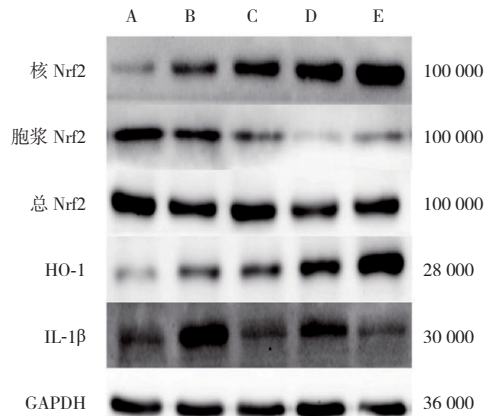


图 2 各组肠组织核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)、血红素加氧酶-1 (HO-1) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 蛋白 A: 假手术组, B: 模型组, C: 小檗碱低剂量组, D: 小檗碱中剂量组, E: 小檗碱高剂量组

iFABP 是一种存在于肠黏膜微绒毛顶端的蛋白, 组织特异性高, 生理状态下不存在于体循环中。当消化道受到各种原因的损伤后, 黏膜通透性发生改变, iFABP 释放入血, 因此, iFABP 可以作为肠道缺血的生物标志物^[7], 并与急性胰腺炎^[8]和脑膜炎球菌血

症^[9]等一些危重疾病引起的肠道损伤的严重程度相关。DAO 是一种催化组胺等二胺类发生氧化反应的酶, 在肠缺血、炎症及类似应激的患者中组胺样二胺含量升高^[10]。本研究采用 Chiu's 评估法对脓毒症大鼠肠道上皮组织损伤进行评估, 根据 HE 染色结果可看到脓毒症严重损伤肠道上皮组织, 小檗碱中、高剂量组肠黏膜层上皮细胞脱落减轻, 炎症细胞浸润减少, 血清 DAO、iFABP 含量均降低, 再次证明小檗碱保护肠黏膜屏障的作用, 而且高剂量组的保护作用更强。

机体一旦发生脓毒症, 巨噬细胞、中性粒细胞等炎症细胞和局部产生的 TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子入血, 诱导 IL-6、IL-8 的产生, 引起炎症瀑布式的级联反应, 造成炎症介质过多释放, 破坏了肠上皮细胞间正常的紧密连接^[11]。氧化应激和炎症可以互为因果。MDA、SOD 是常见的氧化应激标志物^[12], 控制过度的炎症反应, 可以改善肠屏障功能, 降低肠上皮细胞通透性, 进而提高脓毒症整体存活率^[13]。本研究结果显示, 模型组血清炎症因子含量增加, 肠组织中 IL-1 β 高表达, MDA 含量升高, SOD 活性降低, 而小檗碱各剂量组炎症因子含量及表达均有不同程度地降低, MDA 含量降低, 而 SOD 活性升高, 说明小檗碱可以抑制脓毒症大鼠肠道炎症及氧化应激水平, 提高肠道抗氧化能力。

Nrf2 是自身抗氧化应激调节因子, 在生理条件下, Nrf2 位于细胞质, 与 kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Keap1) 结合, 并且不断被泛素化降解。一旦机体出现损伤, Nrf2 与 Keap1 分离释放并转移到细胞核中, 通过与 Nrf2 结合抗氧化反应元件 (ARE) 相互结合, 增加抗氧化基因的转录, 从而起到抗氧化应激的作用^[14]。HO-1 的激活是细胞对氧化应激的适应性反应^[15]。本研究发现, 假手术组大鼠肠组织核 Nrf2、HO-1 蛋白表达较低, 模型组核内 Nrf2 及 HO-1 表达增高, 提示模型组大鼠肠组织内抗氧化应激系统也同时激活, 但却不足以对抗过度升高的氧化应激, 从而出现肠黏膜损伤, 这与 LI 等^[16]的研究结果一致。小檗碱中、高剂量组肠组织中核内 Nrf2 及 HO-1 蛋白表达进一步升高, 提示小檗碱可能通过激活 Nrf2/HO-1 通路提高脓毒症肠道抗氧化水平, 进而抑制了炎症因子表达。

综上所述, 小檗碱可能通过 Nrf2/HO-1 通路抑制脓毒症大鼠炎症因子的释放, 减轻机体炎症反应、改善脓毒症肠损伤。

[参考文献]

- [1] KHETERPAL S, SINGH K, TOPOL EJ. Digitising the prediction and management of sepsis [J]. *Lancet*, 2022, 399 (10334): 1459.
- [2] ASSIMAKOPOULOS SF, TRIANTOS C, THOMOPOULOS K, *et al*. Gut-origin sepsis in the critically ill patient: pathophysiology and treatment [J]. *Infection*, 2018, 46 (6): 751-760.
- [3] HABTEMARIAM S. Berberine pharmacology and the gut microbiota: a hidden therapeutic link [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 155: 104722.
- [4] ZHANG B, LIU K, YANG H, *et al*. Gut microbiota: the potential key target of TCM's therapeutic effect of treating different diseases using the same method-UC and T2DM as examples [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 855075.
- [5] FENG J, LIU Z, CHEN H, *et al*. Protective effect of cynaroside on sepsis-induced multiple organ injury through Nrf2/HO-1-dependent macrophage polarization [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 911: 174522.
- [6] 雷泓, 顾莹, 陈军仿, 等. Stattic 对脂多糖诱导的肠道屏障功能障碍小鼠小肠组织基质金属蛋白酶-9 表达的影响 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2021, 35 (10): 997-1000.
- [6] LEI H, GU Y, CHEN JF, *et al*. Effect of Stattic on the expression of matrix metalloproteinase-9 in mice with lipopolysaccharide-induced intestinal barrier dysfunction [J]. *J Chin Pract Diagn Ther*, 2021, 35 (10): 997-1000.
- [7] ZAIGHAM H, OLSSON REGNER A, EKELUND M, *et al*. The role of citrulline, intestinal fatty acid-binding protein, and D-dimer as potential biomarkers in the diagnosis of internal herniation after Roux-en-Y gastric bypass [J]. *Surg Obes Relat Dis*, 2021, 17 (10): 1704-1712.
- [8] ZHANG Y, JIANG Y, LI H, *et al*. Effect of STING signaling on intestinal barrier damage in severe acute pancreatitis [J]. *Exp Cell Res*, 2023, 428 (2): 113630.
- [9] DERIKX JP, BIJKER EM, VOS GD, *et al*. Gut mucosal cell damage in meningococcal sepsis in children: relation with clinical outcome [J]. *Crit Care Med*, 2010, 38 (1): 133-137.
- [10] CAI C, LI W, CHEN J, *et al*. Diamine oxidase as a marker for diagnosis of superior mesenteric arterial occlusion [J]. *Hepatogastroenterology*, 2012, 59 (113): 155-158.
- [11] LEPPKES M, ROULIS M, NEURATH MF, *et al*. Pleiotropic functions of TNF-alpha in the regulation of the intestinal epithelial response to inflammation [J]. *Int Immunol*, 2014, 26 (9): 509-515.
- [12] YIN Y, HAN W, CAO Y. Association between activities of SOD, MDA and Na⁺-K⁺-ATPase in peripheral blood of patients with acute myocardial infarction and the complication of varying degrees of arrhythmia [J]. *Hellenic J Cardiol*, 2019, 60 (6): 366-371.
- [13] PULEO F, ARVANITAKIS M, VAN GOSSUM A, *et al*. Gut failure

- in the ICU [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2011, 32 (5): 626–638.
- [14] 蒋 艳, 赵琳琳, 马 静, 等. 藏药三果汤调节 Nrf2/HO-1 信号通路干预高脂血症大鼠的作用机制 [J]. *中国现代应用药学*, 2024, 41 (6): 743–749. JIANG Y, ZHAO LL, MA J, *et al*. Mechanism of tibetan medicine Sanguo decoction prevent high-fat diet-induced hyperlipidemia rats by regulating Nrf2/HO-1 signal pathway [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2024, 41 (6): 743–749.
- [15] ZHANG Q, LIU J, DUAN H, *et al*. Activation of Nrf2/HO-1 signaling: an important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis via the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress [J]. *J Adv Res*, 2021, 34: 43–63.
- [16] LI J, LU K, SUN F, *et al*. Panaxydol attenuates ferroptosis against LPS-induced acute lung injury in mice by Keap1-Nrf2/HO-1 pathway [J]. *J Transl Med*, 2021, 19 (1): 96.

[文章编号] 1007-7669(2024)07-0540-07

[DOI号] 10.14109/j.cnki.xyylc.2024.07.11

卡格列净激活 cGAS-STING 通路抑制肝癌细胞增殖

崔茜如¹, 吴 勇², 冯 吉^{2,3}, 周 静¹, 卢国栋^{2,3}

(1. 广西医科大学基础医学院 生理学教研室, 广西 南宁 530021; 2. 广西医科大学公共卫生学院 卫生毒理学教研室, 广西 南宁 530021; 3. 复旦大学公共卫生学院, 上海 200032)

[关键词] 卡格列净; 肝癌; 降血糖药; DNA, 线粒体; cGAS-STING

[摘要] 目的 探究卡格列净对肝癌细胞的影响及调控机制。方法 卡格列净处理人肝癌细胞 HepG2、Huh7 和 HCCM 以及人正常肝细胞 MIHA 细胞后, 通过细胞克隆形成实验和 CCK-8 实验检测细胞增殖能力, 流式细胞术检测细胞和线粒体内活性氧 (ROS) 水平和线粒体膜电位变化, Western blot 法检测增殖相关蛋白和 cGAS-STING 通路相关蛋白表达情况, RT-qPCR 法检测线粒体 DNA (mtDNA) 释放水平和炎症因子 mRNA 表达水平。结果 与人正常肝细胞 MIHA 相比, 卡格列净对 HepG2 细胞增殖的抑制作用更显著 ($P<0.05$, 半抑制浓度分别为 $>40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。与对照组相比, 卡格列净组肝癌细胞增殖数目、增殖相关蛋白的表达均降低, 呈浓度依赖性, 细胞内和线粒体 ROS 水平升高, 线粒体膜电位降低, 胞质 mtDNA 释放水平、cGAS-STING 通路相关蛋白表达和炎症因子 mRNA 水平均升高 (均 $P<0.05$)。与卡格列净组相比, *N*-乙酰-L-半胱氨酸 (NAC) + 卡格列净组细胞内和线粒体 ROS 水平、胞质 mtDNA 释放水平, cGAS-STING 通路相关蛋白的表达和炎症因子的 mRNA 水平均降低 (均 $P<0.05$)。与卡格列净组相比, cGAS 抑制剂 RU.521+ 卡格列净组肝癌细胞增殖活力和增殖相关蛋白的表达均显著增加 (均 $P<0.05$)。结论 卡格列净诱导肝癌细胞氧化应激和线粒体功能受损, 导致 mtDNA 外泄至胞质中, 进而激活 cGAS-STING 通路, 引起细胞内炎症因子水平升高, 最终抑制肝癌细胞增殖。

[中图分类号] R977.1; R979.1

[文献标志码] A

Canagliflozin inhibits proliferation of liver cancer cells by activating cGAS-STING pathway

[收稿日期] 2023-11-08 [接受日期] 2024-05-08

[基金项目] 国家自然科学基金委员会面上项目 (81972291); 广西自然科学基金委员会重点项目 (2018GXNSFDA050006); 广西研究生教育创新计划项目 (YCBZ2023087)

[作者简介] 崔茜如, 女, 硕士在读, 主要从事肿瘤分子生物学的研究, E-mail: 1159390632@qq.com。卢国栋, 男, 教授, 博士, 主要从事肿瘤分子生物学和毒理学的研究, E-mail: lugd@fudan.edu.cn

[责任作者] 卢国栋