

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.24.005

## 抗炎合剂对脓毒症小鼠心肌损伤的保护作用及机制\*

王馨璐 汪海慧 沈一凡 李万义 曲立哲<sup>△</sup>

(上海市中医医院 上海 200071)

**摘要 目的:**探讨抗炎合剂对脓毒症致心肌损伤的保护作用及可能机制。**方法:**将 32 只体重 22~25 g 的雄性 C57 小鼠随机分为 4 组:正常组、假手术组、模型组(脓毒症模型)、抗炎合剂组。采用盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture, CLP)建立脓毒症模型,模型组、抗炎合剂组在造模后分别用生理盐水、抗炎合剂(Anti-inflammation mixture, AIM)对大鼠进行干预。正常组:正常进食饮水;假手术组:假手术前每天给予生理盐水(1.4 mL/100 g),并腹腔注射生理盐水(5 mg/kg)每日 1 次,连续 3 日。第 4 日行假手术;模型组(CLP 组):CLP 术前给予生理盐水(1.4 mL/100 g),每天 1 次,并腹腔注射生理盐水(5 mg/kg)每日 1 次,连续 3 日。第 4 日 CLP;抗炎合剂组:CLP 术前给予中药抗炎合剂(1.4 mL/100 g),每天 1 次,并腹腔注射生理盐水(5 mg/kg)每日 1 次,连续 3 日。第 4 日行 CLP;各组分于手术后 24 小时行标本采集,采用 HE 染色和 TUNEL 染色观察小鼠心肌组织损伤情况,同时检测小鼠血清肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和炎症因子白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )水平。**结果:**与正常对照组或假手术组相比,CLP 模型组小鼠的心肌组织出现大量炎性细胞浸润,心肌细胞凋亡率显著升高( $P<0.01$ );而抗炎合剂组相较于 CLP 模型组心肌细胞凋亡率显著下降( $P<0.01$ )。与正常对照组或假手术组相比,CLP 模型小鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平显著升高( $P<0.001$ ),而中药抗炎合剂组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平相较于模型组显著降低( $P<0.01$ )。此外,与正常对照组和假手术组相比,模型组 SIRT1 mRNA 水平和蛋白表达水平显著降低,抗炎合剂显著提高 SIRT1 的 mRNA 和蛋白表达水平。**结论:**抗炎合剂可能通过提高 SIRT1 的表达,抑制 CLP 脓毒症小鼠的炎症反应,进而减轻心肌损伤。

**关键词:**抗炎合剂;脓毒症;心肌损伤;沉默信息调节因子 1

**中图分类号:**R-33;R613.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)24-4627-06

## Effects of Anti-inflammation Mixture on Sepsis-induced Myocardial Injury in Mice and its Mechanisms\*

WANG Xin-lu, WANG Hai-hui, SHEN Yi-fan, LI Wan-yi, QU Li-zhe<sup>△</sup>

(Shanghai Traditional Chinese Medicine Hospital, Shanghai, 200071, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the protective effects of anti-inflammatory mixture of traditional Chinese medicine on myocardial injury caused by sepsis and its mechanisms. **Methods:** A total of 32 mice were randomly assigned into 4 groups: normal control group, sham operation group, and model group (sepsis group), and anti-inflammatory mixture group. After cecal ligation and perforation (CLP), rats in the sepsis group and anti-inflammatory mixture group were given normal saline, anti-inflammatory mixture respectively. Normal saline (1.4 mL/100 g) was given once a day before sham operation, and normal saline (5 mg/kg) was intraperitoneally injected once a day for 3 consecutive days. Sham operation was performed on the fourth day; In the model group (sepsis group), CLP mice were given normal saline (1.4 mL/100 g) once a day and intraperitoneal injection of normal saline (5 mg/kg) once a day for 3 consecutive days. In the anti-inflammatory mixture group: anti-inflammatory mixture (1.4 mL/100 g) was given once a day before surgery, and normal saline (5 mg/kg) was given once a day for 3 consecutive days. Specimens were collected at 24 hours after operation in each group. HE staining and TUNEL staining were used to observe the myocardial tissue damage, and serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and inflammatory factor interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) were detected. **Results:** Compared with the normal control group or sham group, significant damage of myocardial tissue was observed in CLP model group, a large number of inflammatory cells infiltrated, and myocardial cell apoptosis increased significantly ( $P<0.01$ ); Compared with CLP model group, anti-inflammation mixture (AIM) group had less myocardial damage and the number of apoptotic myocardial cells significantly decreased ( $P<0.01$ ). Compared with normal control group or sham group, serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in CLP model mice were significantly increased ( $P<0.001$ ), and the levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in TCM AIM group were significantly decreased compared with model group ( $P<0.01$ ). In addition, compared with normal control group and sham group, mRNA and protein expression levels of SIRT1 were significantly decreased in the model group, and AIM significantly improved SIRT1 transcription and protein expression levels. **Conclusions:** Anti-inflammation mixture could protect mice against

\* 基金项目:海派中医流派传承延伸计划项目(ZY(2021-2023)-0209-11);上海中医药大学理科预算内项目(2020LK067)

作者简介:王馨璐,女,硕士研究生,主要研究方向:脓毒症,E-mail: 786000786@qq.com

<sup>△</sup> 通讯作者:曲立哲(1971-),女,硕士生导师,主要研究方向:针刺与术后胃肠功能康复,E-mail: q18116070399@163.com

(收稿日期:2023-05-22 接受日期:2023-06-14)

sepsis-induced myocardial injury, which might be related to increase the expression of SIRT1 and decrease of inflammatory response.

**Key words:** Anti-inflammation mixture; Sepsis; Myocardial injury; Sirtuin [silent mating type information regulation 2 homolog] 1

**Chinese Library Classification (CLC):** R-33; R613.2 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2023)24-4627-06

## 前言

脓毒症(Sepsis)是危及生命的多器官功能障碍综合征,主要因机体对感染的炎症反应失调所致,重症脓毒症可导致多器官功能衰竭,已成为ICU高居首位的死亡因素,是急危重症研究领域的重大难题<sup>[1,2]</sup>。多器官功能损伤在脓毒症发病初期即可发生,心脏是脓毒症损伤的靶器官之一。流行病学调查研究显示40%的脓症患者并发心肌功能损伤,主要表现为射血分数降低和左室心肌收缩力不足,由此引发的心功能不全常常导致患者预后不良,病死率显著升高<sup>[3,4]</sup>。然而,脓毒症致心肌损伤的相关分子机制尚未完全阐明。

沉默信息调节因子1(sirtuin [silent mating type information regulation 2 homolog] 1, SIRT1)是一种NAD<sup>+</sup>(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)依赖性的III类组蛋白去乙酰化酶,是Sirtuins家族研究最广泛的成员<sup>[5]</sup>。Sirtuins具有能和NAD<sup>+</sup>结合的催化结构域,可以促进组蛋白的赖氨酸残基去乙酰化,从而调节多个转录因子的活性,在细胞凋亡<sup>[6]</sup>、细胞衰老<sup>[7]</sup>、细胞自噬<sup>[8]</sup>、氧化应激<sup>[9]</sup>等生物学过程中发挥关键作用,参与调节免疫应答<sup>[10]</sup>、生物节律<sup>[11]</sup>、脂质代谢<sup>[12]</sup>、炎症反应<sup>[13]</sup>等多种重要的病理生理过程。

SIRT1在脓毒症发病过程中同样扮演了重要的角色。激活SIRT1可显著改善脓毒症的器官损伤和炎症反应<sup>[14,15]</sup>。SIRT1介导Beclin1的去乙酰化从而激活自噬,缓解脓毒症所致急性肾损伤<sup>[16]</sup>。SIRT1可调节PPAR $\alpha$ 通路以减缓心肌肥大的发生<sup>[17]</sup>。在脓毒症诱导的心肌病变中,SIRT1活化可改善炎症、氧化应激和凋亡<sup>[18]</sup>。因此SIRT1被认为是治疗脓毒症心肌损伤的潜在干预靶标。

中医学根据脓毒症心肌损伤的临床表现及证候特点可将其归为"心悸""胸闷""喘证""水肿"等范畴<sup>[19]</sup>。素体正气亏虚、毒邪侵袭、瘀血阻络是脓毒症心肌损伤的基本病机,故治疗上以"扶正、解毒、通络"为主<sup>[20]</sup>。中药联合抗生素的使用可以减少细菌的耐药性,又可以改善胃肠功能,降浊气以通腹泄热、通脉络以疏通气机而减轻脓毒症心肌损伤的程度。抗炎合剂为中医院脓毒症临床常用中药合剂,主要成分为:生大黄(后下)、黄芩、黄连、厚朴、败酱草、人参草、附子、炙甘草。大黄为君,泻下攻积,清热泻火,活血祛瘀,通腑给邪以出路,祛瘀使全身血脉通畅。黄芩、黄连为臣,清热燥湿,泻火解毒。三者合用,热清则血不受其煎灼,血脉通畅。厚朴、败酱草为佐,厚朴辛温,行气,燥湿,消积,平喘,气行则血行,同时使清热而不伤正。败酱草清热解毒,消痈排脓,祛瘀止痛,协同清热兼活血祛瘀之大黄使全身血脉通畅,共奏通畅血脉,通腑排毒之效。加用人参滋阴益气,附子、炙甘草、干姜温阳益气,取"少火生气"之意。全方共奏苦寒并用以清热,通腑活血以排毒之功。前期研究证实,抗炎合剂临床联合抗生素治疗早期和严重脓症患者均获效良好<sup>[21,22]</sup>,并能显著降低脓症患者血清炎症因子水平<sup>[23]</sup>。在动物实验中,抗炎合剂可减缓脓毒症大鼠的肺组织坏死<sup>[24]</sup>,显著

抑制脓毒症急性肺损伤大鼠血清TNF- $\alpha$ 等炎症因子水平<sup>[25]</sup>,并能够调节TLR4/MyD88通路,从而介导炎症反应<sup>[26,27]</sup>。然而,抗炎合剂在脓毒症所致心肌损伤中的作用及相关机制尚未探明。

本研究应用动物实验探究中药抗炎合剂对脓毒症小鼠心肌损伤的影响,探讨清热解毒,通腑化痰活血法对脓毒症小鼠心肌损伤的治疗效果及其机制,为清热解毒,通腑化痰活血法治疗脓毒症心肌损伤应用于临床提供支撑依据。

## 1 材料与与方法

### 1.1 实验动物

8周龄C57BL/6J小鼠,雄性,SPF级,重量22~25g,动物许可证编号:20190005022369,饲养许可证号SYXK(沪)2014-0019。饲养于上海市中医医院干燥清洁级动物实验中心,实验动物伦理号2020027。小鼠适应性喂养10天后,采用盲肠结扎穿孔术建立脓毒症小鼠模型。

### 1.2 实验药物与化学试剂

抗炎合剂用量(一剂):生大黄9g(后下)、人参草9g、附子3g、败酱草30g、厚朴12g、黄芩12g、黄连15g、炙甘草3g,所有药材购自上海市中医医院药房并且符合2010年版《中国药典》规定要求。具体煎煮方法如下:用蒸馏水将饮片浸泡30分钟,人参草、附子、黄芩、黄连、厚朴、败酱草、炙甘草、干姜浸泡半小时,将诸药煮沸后改文火继续煎煮20分钟,头煎药用无菌纱布滤过,第二煎续蒸馏水抹过草药,煮沸后改文火再煎煮20分钟,剩少许药汁后加入生大黄,此次煎煮5min,将药汁用无菌纱布滤过,合并2次煎煮液后再次滤过成药,放置冰箱冷藏后保存备用。成人用量为每日一剂。

动物用药计算:小鼠每日用量按孙瑞元方法(孙瑞元.《定量药理学》.北京:人民卫生出版社,1987:247)计算。 $DB=DA*KB/KA$ ;DB:标准体重小鼠每日用量,DA:标准体重成人每日用量,KB:小鼠剂量折算系数(1),KA:成人剂量折算系数(388);即:标准体重小鼠(20g)每日用量= $DA*1/388$ 。

化学试剂:BCA蛋白质定量试剂盒,购自上海富勒科技有限公司,批号2020031;HE染色试剂盒,购自碧云天有限公司,货号C0105S;TUNEL试剂盒,购自罗氏诊断,货号11684817910;SIRT1一抗,购自Abcam公司,货号ab189494,和 $\beta$ -actin一抗,购自爱博泰克生物科技有限公司,货号81115-1-RR;动物组织总RNA提取试剂盒,货号DP431;cDNA逆转录试剂盒,货号KR116,荧光定量试剂(SYBR Green),货号FP201,均购自北京天根生物科技有限公司;ELISA试剂盒(TNF $\alpha$ ,货号EK282;IL1 $\beta$ ,货号EK201B)购自联科生物技术股份有限公司;DEPC水、生理盐水购自上海生物工程技术公司;TBST缓冲液、PBS缓冲液等均购自上海雅酶生物医药科技有限公司;其余化学试剂如异丙醇、甲醇、无水乙醇、氯仿(HPLC级)等均购自国药集团。

### 1.3 主要仪器设备

仪器: Thermo 离心机, 型号: FRESCO17; 酶标仪 (Bio-Rad 680); 匀浆器 (FLUKO 6-10); 低温离心机; 低温冷冻离心机 1-15K3K15; 显微镜: OLYMPUS BX51; 电泳仪型号 mini protean 3 cell. BIO-RAD 公司; 电转仪, PS-9, 大连竞迈科技有限公司; 空气摇床培养箱 stuart150 型, barloworld scientific 公司产品。小鼠呼吸麻醉机, 瑞沃德 R550IE。

## 2 实验方法

### 2.1 实验动物分组及给药方法

将小鼠随机分为 4 组: 正常组、假手术组、模型组 (CLP 组)、抗炎合剂组。正常组小鼠可以正常进食饮水; 假手术组小鼠在假手术前仅予生理盐水 (1.4 mL/100 g), 每天 1 次, 并腹腔注射生理盐水, 5 mg/kg, 每日 1 次, 连续 3 日。第 4 日行假手术; 模型组 (CLP) 小鼠在盲肠结扎穿孔术前给予生理盐水 (1.4 mL/100 g), 每天 1 次, 并腹腔注射生理盐水, 5 mg/kg, 每日 1 次, 连续 3 日。第 4 日行盲肠结扎穿孔术 (CLP); 抗炎合剂组小鼠在 CLP 术前每天给予一次中药抗炎合剂 (1.4 mL/100 g), 并同时腹腔内给与注射生理盐水 (5 mg/kg) 每日 1 次, 连续 3 日。第 4 日行盲肠结扎穿孔术 (CLP)。

### 2.2 动物模型制备

小鼠适应性喂养 10 天后准备造模脓毒症小鼠。用呼吸机产生混合气体 (2% 异氟烷和 98% 纯氧) 麻醉小鼠, 待小鼠小鼠仰卧时心跳及呼吸均匀、肌肉松弛、四肢无活动, 胡须无触碰反应, 踏板反射消失时, 确认小鼠已完全麻醉, 开始盲肠结扎穿孔手术。在小鼠腹正中偏左处做一长约 0.5 cm 的切口, 小心切开腹膜, 露出肠道, 拨出盲肠, 用 1 号手术缝线在盲肠根部约 1/3 处结扎。用 5 mL 注射器针头穿通盲肠壁 3 次, 并旋转针头使穿孔处扩大, 轻轻挤压穿孔处, 使肠内容物少量流出。将盲肠回放入腹腔中开始逐层缝合切口, 同时给予生理盐水 1 mL/100 g 皮下注射补充液体容量。假手术小鼠开腹后则翻动肠道随即关腹, 手术过程中避开肠壁血管组织以防损伤。

### 2.3 组织石蜡切片制备

小鼠麻醉仰卧固定后, 用 4% 多聚甲醛进行心脏灌注, 取出脑组织, 置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 取材, 脱水, 透明, 石蜡包埋, 使用石蜡切片机制备组织切片并贴片在静电吸附型盖玻片上, 常规切片 5 mm 厚度。

### 2.4 心肌组织 HE 染色

取心肌组织石蜡切片 (切片厚度 5  $\mu$ m) 进行 HE 染色, 实验步骤主要按照苏木素伊红 (Hematoxylin-Eosin, HE) 染色试剂盒 (C0105S, 碧云天, 上海) 说明书进行, 伊红染色细胞质 (红色), 苏木素复染细胞核 (紫色), 使用乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片, 在光学显微镜 (BX51, Olympus) 下观察并拍照 (目镜 10 倍, 物镜 20 倍)。

### 2.5 心肌组织 TUNEL 染色

实验步骤主要按照 TUNEL 染色试剂盒 (11684817910, Roche) 的说明书进行。简而言之, 取心肌组织石蜡切片 (切片厚度 5  $\mu$ m) 用 4% 多聚甲醛固定后, 用蛋白酶 K 进行细胞通透, TUNEL 反应液染色 10 分钟, 25 $^{\circ}$ C, 漂洗后用 POD 转换液将荧光信号转化为辣根过氧化物酶信号, 最后用 DAB 底物显色 (棕

色), 漂洗后用苏木素复染细胞核, 经乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。心肌凋亡率表示为 TUNEL 阳性细胞核数与总细胞核数的比值  $\times$  100%。

### 2.6 血清 TNF- $\alpha$ 和 IL-1 $\beta$ 水平测定

各组小鼠分别于手术后 24 小时采集静脉血分离血清, 并用酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (EK282, EK201B, 联科生物) 检测血清 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的蛋白含量。参照说明书的操作步骤, 分别做空白孔、标准孔和样品孔, 每孔加样 50  $\mu$ L 并使样品稀释度达到 5 倍; 在 37 $^{\circ}$ C 条件下封板膜封板后置 60 分钟进行温育; 揭掉封板膜干爽后每孔再加满洗涤液并静置 30 秒后再丢弃, 这样反复做 5 次并拍干。空白孔除外, 每孔加入酶标试剂 50  $\mu$ L; 依次加入显色剂 A 50  $\mu$ L 和显色剂 B 50  $\mu$ L, 摇晃使之混匀并避光显色 15 分钟; 最后每孔加终止液 50  $\mu$ L, 终止反应。然后以空白空调零并分别测量各孔的吸光度 (OD 值), 该操作在加终止液后 15 分钟以内进行完成。

### 2.7 实时定量聚合酶链反应 (qRT-PCR)

参照试剂盒步骤提取心肌组织的总 RNA (DP431, TIANGEN), 逆转录成 cDNA (KR116, TIANGEN), 使用荧光定量试剂 (SYBR Green) (FP201) 进行实时定量 PCR 检测相关基因的转录水平。

PCR 反应体系 (参考 PCR 说明书):

Taq Master Mix 25  $\mu$ L, 上下游引物各 1  $\mu$ L (0.4  $\mu$ mol/L), 模板 DNA 0.4  $\mu$ g, 加 DEPC 水补至 50  $\mu$ L。PCR 反应条件: 预变性 94 $^{\circ}$ C, 2 min, 变性 94 $^{\circ}$ C, 30 s, 退火 55~65 $^{\circ}$ C, 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C, 1 min, 终延伸 72 $^{\circ}$ C, 5 min (30 个循环)。

SIRT1 引物序列: 正向 5'-gtctctgtgggattcctga-3', 反向 5'-caaacatgcttgagggtct-3';  $\beta$ -actin 引物序列: 正向 5'-gatctggcacacaccttct-3'; 反向 5'-gggggtgtgaaggtctcaaa-3'。

### 2.8 Western-blot 检测 SIRT1 蛋白表达

在冰上用 RIPA 裂解液裂解心肌组织提取蛋白质, 而后用 BCA 试剂盒检测组织蛋白的浓度, 使用 10% SDS-PAGE 分离蛋白质样品 (40  $\mu$ g) 后湿转至 PVDF 膜; 用 5% 脱脂牛奶在室温下封闭 PVDF 膜 2 小时, 将 PVDF 膜与 SIRT1 一抗 (ab189494, Abcam, 1:1000 稀释) 和  $\beta$ -actin (81115-1-RR, Abclonal, 1:10000 稀释) 一抗抗体在 4 $^{\circ}$ C 下孵育 12 小时后, 将膜用 TBST 缓冲液连续洗涤 3 次, 每次进行 5 分钟, 并与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔二抗 (1:5000 稀释) 以及羊抗鼠二抗 (1:5000 稀释) 在室温下孵育 2 小时; 将膜用 TBST 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 分钟; 用 ECL 化学发光液、BioRad 成像系统和 Image Lab 软件测定脓毒症小鼠心肌组织 SIRT1 蛋白表达情况<sup>[11]</sup>。

### 2.9 统计学分析

实验数据应用 SPSS 25.0 软件进行统计分析, 结果表示为均数  $\pm$  标准误 ( $\bar{x} \pm$  SEM), 统计方法采用 One-Way ANOVA 和 Tukey's multiple comparison post hoc.  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 各组小鼠心肌细胞损伤情况比较

小鼠心脏 HE 染色显示, NC 组和 Sham 组心肌纤维细胞

完整,排列整齐,无坏死和炎症细胞浸润,心肌横纹清晰可见,排列较整齐,细胞核为深蓝色。CLP 组心肌纤维断裂、心肌横纹模糊,部分消失,间质水肿,有红细胞渗出,炎症浸润,细胞核为

淡蓝色。CLP+AIM 组肌丝排列较整齐,无炎症浸润和红细胞渗出(图 1)。

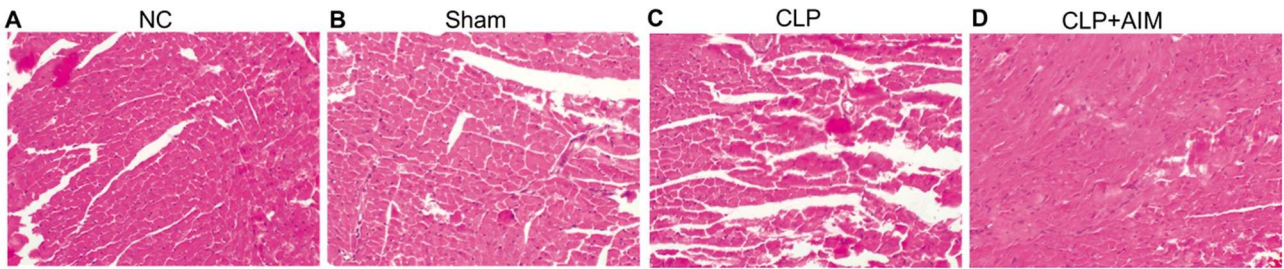


图 1 各组小鼠心肌组织 HE 染色(× 200)

Fig. 1 HE staining of myocardial tissue of each group (× 200)

注:A 正常组 B 假手术组 C 脓毒症模型组 D 抗炎合剂组

Note: A. normal group; B. sham group; C. CLP group; D. CLP+anti-inflammation mixture (AIM) group.

### 3.2 各组小鼠心肌细胞凋亡情况比较

由图 2 可见:正常组和假手术组心肌组织 TUNEL 阳性(棕色)信号的凋亡细胞核数量很少;模型组 TUNEL 阳性的细

胞较正常组及假手术组显著增多;中药抗炎合剂组与模型组相比,细胞凋亡率显著降低。

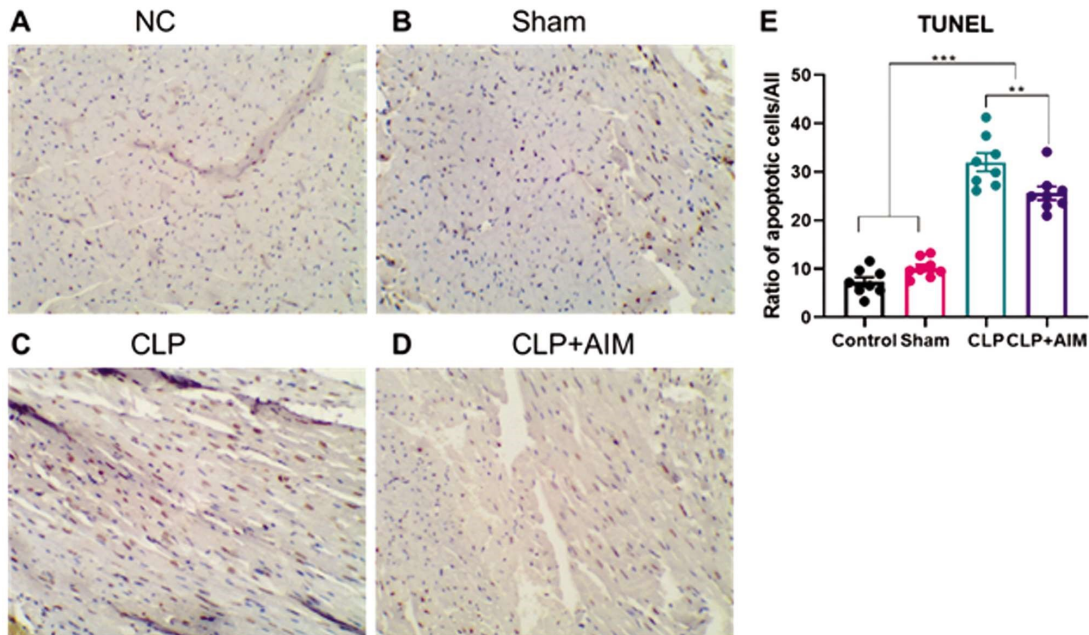


图 2 各组小鼠心肌组织 TUNEL 染色(× 200)及统计图

Fig. 2 TUNEL staining of myocardial tissue of each group (× 200)

注:A 正常组 B 假手术组 C 脓毒症模型组 D 抗炎合剂组 E TUNEL 阳性细胞统计图

Note: A. normal group; B. sham group; C. CLP group; D. CLP+anti-inflammation mixture group;

E. Statistical analysis of apoptotic cells; n = 8; The significant differences were shown in the bracket with \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

### 3.3 各组大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平比较

由表 1 可见,与正常组和假手术组相比,模型组小鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平显著升高,而中药抗炎合剂组血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平则较模型组显著降低(表 1)。

### 3.4 各组大鼠心肌组织 SIRT1 表达的比较

我们通过实时定量 PCR 检测了小鼠心肌组织中的 SIRT1 转录水平。与正常对照组或假手术组相比,模型组心肌组织的 SIRT1 mRNA 水平均显著下降,而抗炎合剂组心肌组织的 SIRT1 mRNA 水平较 CLP 小鼠明显增加。进一步通过 Western

Blot 检测小鼠心肌组织中的 SIRT1 蛋白表达。与正常对照组或假手术组相比,模型组心肌组织的 SIRT1 蛋白表达均显著减少,而与模型组相比,抗炎合剂组心肌组织的 SIRT1 表达显著升高。以上结果提示抗炎合剂可能通过上调 SIRT1 的表达,以减轻脓毒症小鼠的心肌损伤。

## 4 讨论

脓毒症是机体对感染诱发的免疫反应失调引发的多器官功能障碍综合征,严重危害人类健康,目前尚无有效的治疗手

表 1 各组小鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 血水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  between rats of each group ( $\bar{x} \pm s$ )

Groups	n	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-1 $\beta$ (pg/mL)
NC	8	78.357 $\pm$ 2.47	54.90 $\pm$ 8.75
Sham	8	96.278 $\pm$ 4.31	66.681 $\pm$ 10.57
Model	8	239.905 $\pm$ 9.19**	147.77 $\pm$ 31.25**
AIM	8	165.53 $\pm$ 10.83 <sup>△</sup>	117.135 $\pm$ 30.19 <sup>△</sup>

Note: Compared with the normal group \*\* $P < 0.01$ , compared with the model group <sup>△</sup>  $P < 0.01$ .

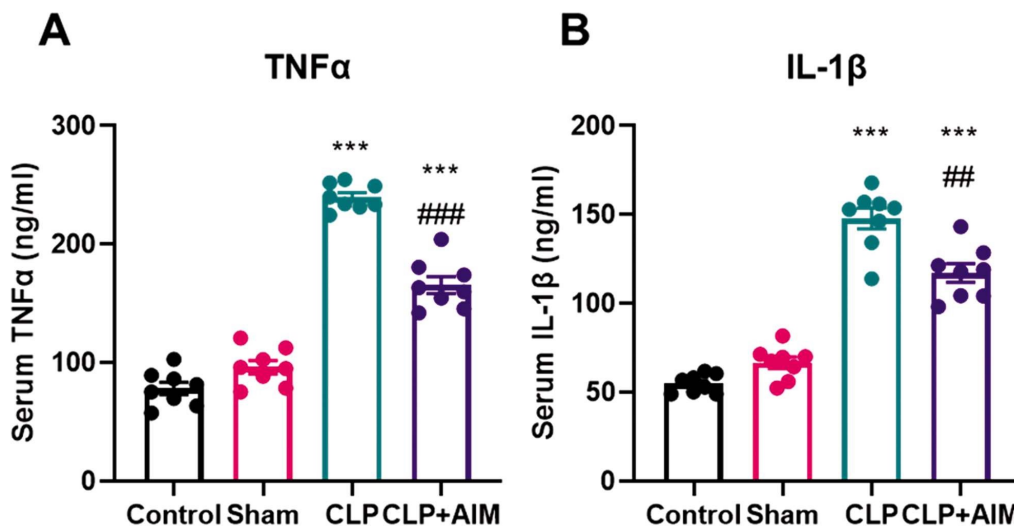


图 3 小鼠心肌组织 SIRT1 mRNA 表达水平

Fig.3 The mRNA level of SIRT1 in the myocardial tissue of all groups

Note: n=8; Significant differences were shown in the bracket (compared with Control or Sham group \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; compared with CLP group <sup>##</sup>  $P < 0.01$ , <sup>###</sup>  $P < 0.001$ ).

段<sup>[4]</sup>。本研究探索了脓毒症临床常用中药抗炎合剂在 CLP 诱导脓毒症小鼠模型中的保护作用及其改善脓毒症心肌损伤的可能机制。研究表明,CLP 诱导的脓毒症小鼠模型心肌组织显著损伤,细胞凋亡显著增多,血清炎症因子 TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等含量显著升高,表现出典型的脓毒症心肌损伤特征。抗炎合剂给药显著减少了 CLP 小鼠的心肌损伤及细胞凋亡,并下调了 CLP 小鼠血清中的炎症因子水平,表明抗炎合剂可能通过减缓脓毒症小鼠的氧化应激损伤及炎症反应,从而减轻心肌损伤。此外,CLP 小鼠心肌组织的 SIRT1 转录水平及蛋白水平相较于正常对照组和假手术组显著降低,而抗炎合剂处理显著增强了 CLP 小鼠心肌组织 SIRT1 的 mRNA 水平及蛋白表达水平,提示抗炎合剂可能通过上调 SIRT1 的表达,从而减缓脓毒症小鼠的氧化应激损伤,减缓炎症因子的产生,从而减缓脓毒症小鼠的心肌损伤。

《2019 单纯中药或联合抗生素治疗脓毒症临床实践指南》中<sup>[20]</sup>提及,在脓毒症及其并发的各脏器功能衰竭的治疗中,中医药联合抗生素治疗可显著改善细菌的耐药性,提高临床用药效果。中医论证“正虚毒盛、瘀血阻络”为脓毒症的基本病机。热毒之邪侵袭人体,迫津外泄,阴阳失调,扰乱心神;筋脉失于濡养,气血失于运行,血滞成瘀,痹阻心脉;素体虚弱,气血阴阳亏虚,心神失养;由此现毒热炽盛、瘀血阻络、正气亏虚之证<sup>[20]</sup>,故治疗以“扶正、解毒、通络”为主。抗炎合剂乃多年的重症临床工作经验荟萃而成,由生大黄、人参草、附子、黄芩、败酱草、

厚朴、黄连等药组成。大黄性寒,取其泻下攻积、清热泻火,凉血以解毒、逐瘀以通经之功效。黄芩、黄连为臣,黄芩苦寒,能清肺胃、肝胆、大肠的湿热,入肺经则可以清肺热,同时有清热泻火解毒之功效;黄连则有清热、解毒、燥湿之功。厚朴、败酱草为佐,厚朴具有燥湿消痰、下气平喘、行气消积之功,气行则血行,同时使清热而不伤正。败酱草清热解毒,祛瘀排脓。加用人参滋阴益气,附子、炙甘草、干姜补火救阳、温阳益气。全方共奏苦寒并用清热,通腑活血以排毒之功。抗炎合剂已在多项前期临床和动物实验研究中证实显著减缓脓毒症炎症及相关器官损伤<sup>[21,24]</sup>,本研究再次证实抗炎合剂可在 CLP 脓毒症小鼠模型中减缓炎症反应。此外,抗炎合剂可能通过上调 SIRT1 mRNA 和蛋白水平表达,改善心肌组织损伤和心肌细胞凋亡。抗炎合剂配伍中的几味中药已被证实脓毒症的治疗中颇具疗效。大黄可以改善脓毒症患者的血管内皮细胞功能<sup>[30]</sup>,大黄附子汤在临床治疗中可帮助改善老年脓毒症患者的胃肠损伤<sup>[31]</sup>。黄芪及其活性成分可减缓脓毒症损伤<sup>[32]</sup>,其主要活性成分如黄芪甲苷可通过调节 PPAR $\alpha$  通路改善脂多糖诱导的小鼠脓毒症心肌病变<sup>[33]</sup>。黄连提取物也被报道能够减缓脓毒症相关急性肾脏损伤<sup>[33]</sup>。抗炎合剂集合了多味已被证实抗炎的中药,并在脓毒症小鼠和临床样本中证实疗效,再一次证实了中医清热解毒、扶正通络理论在脓毒症临床应用的有效性。

沉默信息调节因子 1(SIRT1)在脓毒症及其他炎症损伤模型中,通过去乙酰化调控相关因子,从而抑制凋亡和炎症反应。

本研究发现抗炎合剂可上调 SIRT1 的表达, 发挥心肌保护功能, 佐证了激活 SIRT1 可减缓机体炎症、改善脓毒症损伤的相关分子机制<sup>[2,18,34]</sup>。SIRT1 作为组蛋白去乙酰化酶的重要成员, 受其调控的转录因子众多, 因此参与了自噬、凋亡、代谢等多种生物学过程, 因此抗炎合剂上调 SIRT1 后的下游具体调控机制仍有待进一步发掘和阐明, 为其临床应用提供坚固的理论和实验证据, 以推进抗炎合剂在脓毒症临床治疗中的中西医结合应用, 为提高危重脓毒症患者的存活率创造希望。

参考文献(References)

- [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] Wang R, Xu Y, Zhang W, et al. Inhibiting miR-22 Alleviates Cardiac Dysfunction by Regulating SIRT1 in Septic Cardiomyopathy[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 650666
- [3] Martin G S, Mannino D M, Eaton S, et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000[J]. N Engl J Med, 2003, 348(16): 1546-1554
- [4] Thavamani A, Umapathi K K, Dhanpalreddy H, et al. Epidemiology, Clinical and Microbiologic Profile and Risk Factors for Inpatient Mortality in Pediatric Severe Sepsis in the United States From 2003 to 2014: A Large Population Analysis [J]. Pediatr Infect Dis J, 2020, 39(9): 781-788
- [5] Vaziri H, Dessain S K, Ng Eaton E, et al. hSIR2 (SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase[J]. Cell, 2001, 107(2): 149-159
- [6] Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein C J. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(36): 13421-13426
- [7] Langley E, Pearson M, Faretta M, et al. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence [J]. EMBO J, 2002, 21(10): 2383-2396
- [8] Lee I H, Cao L, Mostoslavsky R, et al. A role for the NAD-dependent deacetylase SIRT1 in the regulation of autophagy [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(9): 3374-3379
- [9] Brunet A, Sweeney L B, Sturgill J F, et al. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase [J]. Science, 2004, 303(5666): 2011-2015
- [10] Wu X, Kong X, Chen D, et al. SIRT1 links CIITA deacetylation to MHC II activation[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(22): 9549-9558
- [11] Asher G, Gatfield D, Stratmann M, et al. SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation[J]. Cell, 2008, 134(2): 317-328
- [12] Li T Y, Song L, Sun Y, et al. Tip60-mediated lipin 1 acetylation and ER translocation determine triacylglycerol synthesis rate [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 1916
- [13] Yang Z, Kahn B B, Shi H, et al. Macrophage alpha1 AMP-activated protein kinase (alpha1AMPK) antagonizes fatty acid-induced inflammation through SIRT1[J]. J Biol Chem, 2010, 285(25): 19051-19059
- [14] Khader A, Yang W L, Hansen L W, et al. SIRT1720, a sirtuin 1 activator, attenuates organ injury and inflammation in sepsis [J]. J Surg Res, 2017, 219: 288-295
- [15] Li T, Zhang J, Feng J, et al. Resveratrol reduces acute lung injury in a LPS-induced sepsis mouse model via activation of SIRT1 [J]. Mol Med Rep, 2013, 7(6): 1889-1895
- [16] Deng Z, Sun M, Wu J, et al. SIRT1 attenuates sepsis-induced acute kidney injury via Beclin1 deacetylation-mediated autophagy activation[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(2): 217
- [17] Planavila A, Iglesias R, Giralto M, et al. SIRT1 acts in association with PPARalpha to protect the heart from hypertrophy, metabolic dysregulation, and inflammation[J]. Cardiovasc Res, 2011, 90(2): 276-284
- [18] Jiang W, Li W, Hu X, et al. CTRP1 prevents sepsis-induced cardiomyopathy via SIRT1-dependent pathways [J]. Free Radic Biol Med, 2020, 152: 810-820
- [19] 梁立新, 吴彦青, 狄浩然, 等. 当代医家论治脓毒症心肌抑制经验探析[J]. 北京中医药, 2017, 36(05): 439-442
- [20] 刘清泉, 张伟, 姜良铎. 瘀毒伤络、阻络病机与脓毒症[J]. 中国中医药现代远程教育, 2010, 8(17): 199-200
- [21] 杨英才, 韦红, 郑天虹, 等. 基于免疫调理的中药抗炎合剂对严重脓毒症患者治疗作用的研究 [J]. 中国中医急症, 2017, 26(08): 1451-1453
- [22] 卜建宏, 李越华, 何文姬. 抗炎合剂在早期脓毒症患者中的治疗作用[J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(32): 4047-4049+4055
- [23] 李越华, 李海涛. 抗炎合剂对脓毒症患者核因子 NF-κB 及炎症因子的影响[J]. 中国中医急症, 2012, 21(05): 692-693+704
- [24] 汪海慧, 闫国良, 楼丹飞, 等. 抗炎合剂减轻脓毒症致急性肺损伤大鼠肺组织程序性坏死的实验研究 [J]. 中国中医急症, 2021, 30(05): 762-765
- [25] 汪海慧, 闫国良, 熊旭东. 抗炎合剂对脓毒症急性肺损伤大鼠血清可溶性 CD80、CD86、TNF-α、IL-10 水平的影响[J]. 中国中医急症, 2016, 25(06): 981-984
- [26] 李淑芳, 汪海慧, 闫国良. 抗炎合剂对脓毒症急性肺损伤 TLR4/MyD88 信号通路的干预研究 [J]. 海中医药杂志, 2017, 51(S1): 177-180
- [27] 闫国良, 李淑芳, 王馨璐, 等. 抗炎合剂通过 TLR4/MyD88/NF-κB 通路抑制脂多糖诱导的过表达高迁移率蛋白-1 转染小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞炎症反应的机制研究[J]. 河北中医, 2020, 42(09): 1362-1368+1441
- [28] Zhao G Z, Chen R B, Li B, et al. Clinical practice guideline on traditional Chinese medicine therapy alone or combined with antibiotics for sepsis[J]. Ann Transl Med, 2019, 7(6): 122
- [29] 王今达, 李志军, 李银平. 从 "三证三法" 辨证论治脓毒症[J]. 中国危重病急救医学, 2006, (11): 643-644
- [30] 何龙平, 窦建林, 钟林翠, 等. 大黄对脓毒症患者血管内皮细胞功能的保护作用[J]. 解放军医学杂志, 2022, 47(10): 1013-1019
- [31] 刘锦, 方晓磊, 孙琛琛, 等. 大黄附子汤加味治疗老年脓毒症急性胃肠损伤的随机对照研究 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(11): 6868-6872
- [32] 谢静, 裴易昕悦, 丁立生, 等. 黄芪及其活性成分对脓毒症临床和药理作用的研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(08): 2502-2510
- [33] 郑约楠, 邵国建, 张一帆, 等. 黄连提取物减轻脓毒症相关急性肾损伤的代谢组学研究[J]. 药学实践杂志, 2020, 38(05): 435-440
- [34] Wen Q, Wang Y, Pan Q, et al. MicroRNA-155-5p promotes neuroinflammation and central sensitization via inhibiting SIRT1 in a nitroglycerin-induced chronic migraine mouse model [J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1): 287