

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.05.002

钙蛋白酶抑制剂 Calpeptin 在脓毒症膈肌功能障碍中的作用研究 *

张利敏^{1#} 刘雨佳^{2#} 陈云秋¹ 张苗苗¹ 张 甦¹ 赵 帅¹王新琢¹ 张文妍¹ 郝丽英³ 焦光宇^{1Δ}

(1 中国医科大学附属盛京医院呼吸与危重症医学科 辽宁 沈阳 110004; 2 辽宁中医药大学 辽宁 沈阳 110032;

3 中国医科大学药学院药物毒理学教研室 辽宁 沈阳 110122)

摘要 目的:探究钙蛋白酶抑制剂 Calpeptin 在脓毒症膈肌功能障碍中的保护作用及其分子机制。**方法:**通过腹腔内注射 8 mg/kg LPS 的方法构建大鼠脓毒症模型,将雄性 SD 大鼠分为 3 组($n=6$ /组):正常对照组(Con 组)、脓毒症组(Sepsis 组)和钙蛋白酶抑制剂预处理组(Calpeptin 组)。处死大鼠,快速分离大鼠膈肌组织,采用苏木精-伊红(HE)染色法检测膈肌组织病理学改变,通过实时荧光定量 PCR 法(qRT-PCR)分别检测膈肌组织中钙蛋白酶 μ -Calpain、凋亡相关基因天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)、自噬相关蛋白 Beclin-1、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素-6(IL-6)mRNA 表达水平。**结果:**与正常对照组相比,LPS 处理 24 h 的脓毒症组大鼠膈肌组织 HE 染色未见明显膈肌萎缩改变,但膈肌收缩力下降,这与我们以往的研究结果一致。qRT-PCR 法检测到脓毒症组大鼠膈肌组织中上述基因 mRNA 表达量明显增加($P<0.05$),而 Calpeptin 预处理后,上述基因 mRNA 表达水平显著下降($P<0.05$)。**结论:**脓毒症时膈肌发生功能障碍,钙蛋白酶抑制剂 Calpeptin 可显著减轻 LPS 诱导的炎症、凋亡、自噬的激活。

关键词:脓毒症;膈肌;钙蛋白酶抑制剂;作用机制;保护

中图分类号:R-33;R631.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)05-808-06

The Effect of Calpeptin Inhibitor on Diaphragmatic Dysfunction under Sepsis in Rats*

ZHANG Li-min^{1#}, LIU Yu-jia^{2#}, CHEN Yun-qiu¹, ZHANG Miao-miao¹, ZHANG Su¹, ZHAO Shuai¹,WANG Xin-zhuo¹, ZHANG Wen-yan¹, HAO Li-ying³, JIAO Guang-yu^{1Δ}

(1 Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning, 110004, China; 2 Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning, 110032, China; 3 Department of Pharmaceutical Toxicology, School of Pharmacy, China Medical University, Shenyang, Liaoning, 110122, China)

ABSTRACT Objective: This investigation was under taken to explore probable mechanisms and signal pathways involved in diaphragm dysfunction induced by Sepsis. **Methods:** The rat sepsis model was constructed by injecting 8 mg/kg LPS into the abdominal cavity. Male SD rats were divided into 3 groups ($n=6$ /group): comparing control group (Con group), LPS group (Sepsis group) and calcium Protease inhibitor pretreatment group (Calpeptin group). Each group of rats was sacrificed, and then their diaphragm tissues were quickly separated. The pathological changes of the diaphragm tissue were observed by using the hematoxylin-eosin (HE) staining method. Additionally, the mRNA expression levels of μ -Calpain, caspase-3, Beclin-1, TNF- α and IL-6 in diaphragm tissue were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). **Results:** Under the light microscope, we could see that the diaphragm cross-section in the Con group was regular, with full and orderly muscle fibers, closely spaced muscle fibers, and nuclei distributed along the edge of the lens. In the diaphragm muscle cells of the Con group, there were intact capillary endothelium and no interstitial hyperplasia. Compared with the Con group, HE staining of the sepsis group rats with LPS for 24 h showed no obvious changes in diaphragm atrophy, but the contractility of the diaphragm decreased, which was consistent with our previous research results. The mRNA expression levels of the above genes in sepsis group were significantly increased ($P<0.05$), and were significantly decreased after Calpeptin pretreatment($P<0.05$) by qRT-PCR. **Conclusions:** Diaphragm muscles are prone to dysfunction during sepsis. Calpeptin, a calpain inhibitor, can significantly reduce the activation of inflammation, apoptosis and autophagy pathways induced by LPS.

* 基金项目:国家自然科学基金项目(21677030);辽宁省重点研发攻关项目(2017225009);沈阳市科技计划项目(202054021)

为共同第一作者

作者简介:张利敏(1994-),女,硕士,主要从事呼吸疾病基础与临床研究,电话:15734009675,E-mail: Thintime_zlm@163.com

刘雨佳(2001-),女,主要从事细胞信号转导基础研究,电话:15509829340,E-mail: lyj15509829340@163.com

Δ 通讯作者:焦光宇(1967-),女,教授,主任医师,主要从事呼吸衰竭基础与临床研究,电话:18940251105,E-mail: jiaogy@sj-hospital.org

(收稿日期:2021-09-23 接受日期:2021-10-18)

Key words: Sepsis; Diaphragm; Calpeptin; Mechanism; Protection

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R631.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)05-808-06

前言

脓毒症是机体对感染反应失调引起的全身炎症反应综合征,导致多器官系统功能障碍进而威胁生命^[1]。尽管过去几十年里医疗技术取得了重大进步,但脓毒症的发病率仍在持续上升^[2]。脓毒症是重症监护室(ICU)最常见的疾病,也是最常见的死亡原因^[3]。据估计,脓毒症影响着全球至少 4890 万患者,其中 1100 万人死于脓毒症,占全球死亡总数的 19.7%^[4]。最近一项研究表明,危重症患者中膈肌无力的发生率是肢体无力的两倍^[5]。这常与不良预后相关,包括 ICU 死亡率增加、脱机困难和机械通气持续时间延长^[6]。危重症时膈肌无力的两个最重要危险因素分别是机械通气和脓毒症^[7]。越来越多临床证据表明,70-100%严重脓毒症患者需要长时间机械通气维持生命,这与膈肌功能障碍密切相关^[8,9]。然而,目前临床上尚没有针对膈肌无力的有效治疗药物。

膈肌无力是由膈肌收缩力降低和肌肉质量减少共同造成的。四种主要的蛋白水解系统(即泛素-蛋白酶体、自噬、caspase-3 和钙蛋白酶 calpain)在肌肉蛋白降解中发挥作用。蛋白水解泛素-蛋白酶体途径(UPP)是骨骼肌的主要蛋白水解途径,涉及 MAFbx 和 MuRF1 等关键酶^[10]。在机械通气的动物和 ICU 患者膈肌中 UPP 的不同成分被激活^[11,12]。但 UPP 不能降解完整的肌原纤维。其他酶(如 calpain)可裂解主要的细胞骨架蛋白(如肌联蛋白和尼布林蛋白),从而释放出适合 UPP 降解的肌丝^[13,14]。最近研究指出 calpain 介导的蛋白水解在多种疾病发病机制中起重要作用^[15]。

Calpain 是细胞内 Ca^{2+} 依赖的半胱氨酸蛋白酶,在酶家族中已知有 15 个成员。它们起着调节酶的作用,其底物在许多生理过程中起着重要作用。Calpain 功能异常往往与多种疾病(例如神经退行性疾病、癌症、2 型糖尿病或肢带型肌营养不良症 2A 型)有关^[16]。Calpeptin(苯甲酰羧基二肽醛)是一种细胞透性钙蛋白酶抑制剂。多项研究表明,抑制钙蛋白酶可减少与脑缺血再灌注相关的损伤,保护肝脏、心脏和肾脏^[17]。以往研究表明,抑制钙蛋白酶可减轻内毒素诱导的膈肌无力,可能是改善感染患者呼吸肌功能的潜在治疗方法^[18]。然而,Calpeptin 在脓毒症相关膈肌功能障碍中的作用尚不明确。因此,本研究进一步探究 Calpeptin 对脓毒症相关膈肌功能障碍的保护作用及其分子机制,为钙蛋白酶抑制剂的治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料和分组

1.1.1 实验动物 成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠(重量 250-300 g)购自中国医科大学实验动物中心。所有大鼠均置于恒温室内($22 \pm 2^\circ\text{C}$),光/暗循环 12 h,相对湿度 40-60%,并提供标准的啮齿动物食物和水。这项研究得到中国医科大学动物伦理委员会的批准。

1.1.2 实验仪器和设备 钙蛋白酶抑制剂(Calpeptin, apexbio

A4411), LPS(来自大肠杆菌 055:B5, L2880, 批号 110M4086V, 每毫克 LPS 含 3000000 内毒素单位), 购自密苏里州圣路易斯的 Sigma-Aldrich 公司;RNAiso Plus 试剂盒(Code No. 9108), PrimeScript™ RT reagent Kit(Code No. RR037A), TB Green Premix Ex Taq™ II(Code No. RR820A), 购自日本 TARKARA 公司;PCR 专用无酶八连管(规格 0.2 mL), 购自上海卧宏生物科技有限公司;GT100 Thermal Cycler PCR 仪, 产自美国 Bio-Rad 公司;ThermoABI QuantStudio 1 实时荧光定量 PCR 仪(货号 A40426), 产自美国赛默飞世尔(Thermo Fisher)科技公司。

1.1.3 实验分组 将大鼠随机分为 3 组:正常对照组(Con 组, $n=6$)、LPS 处理脓毒症组(Sepsis 组, $n=6$)、钙蛋白酶抑制剂+LPS 处理组(Calpeptin 组, $n=6$)。在构建脓毒症大鼠模型前, Calpeptin 组大鼠腹腔注射钙蛋白酶抑制剂 Calpeptin(4 mg/kg ^[19], 溶于 DMSO 中)。Con 组和 Sepsis 组大鼠腹腔注射等量 DMSO。预处理 2 h 后, 向 Sepsis 组和 Calpeptin 组大鼠腹腔注射 LPS(8 mg/kg ^[20], 溶于生理盐水中)。Con 组小鼠腹腔注射等量生理盐水。在 LPS 处理 24 h 后, Con 组大鼠均存活, Sepsis 组大鼠死亡率为 33.3%, 即 2 只大鼠死亡, Calpeptin 组大鼠死亡率为 16.7%, 即 1 只大鼠死亡, 将三组大鼠消毒麻醉, 快速剖腹分离新鲜的膈肌组织, 分离膈肌组织剪成 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 组织块备用。

1.2 膈肌组织病理学观察

HE 染色:通过三次二甲苯去蜡 5-10 分钟;蜡脱水洗 3 分钟, 无水乙醇、95%乙醇、80%乙醇和 70%乙醇分别浸润 1 分钟;苏木紫液染色 3-5 分钟, 具体时间根据实际情况予有效调整;用 1%的酸性乙醇或 1%盐酸分化并水洗;流水下浸润清洗 15 分钟以上, 直到细胞核逐渐变为蓝色即可。如果细胞核染色效果不明显, 可再一次分化或重新进行染色;用伊红液染色 30 秒-1 分钟, 用 85%乙醇、95%乙醇、无水乙醇分别清洗 2 次, 每次 1-2 分钟;二甲苯透明三次, 每次 3-5 分钟;用中性树胶盖片及封。

1.3 实时荧光定量 PCR 法(qRT-PCR)检测 mRNA 表达

膈肌组织总 RNA 提取: 使用 RNAiso Plus 试剂盒提取三组大鼠膈肌组织的总 RNA。将膈肌组织肌条置于 1 mL RNAiso Plus 溶液中, 剪碎裂解组织。将 0.2 mL 氯仿加入到组织裂解物中。向水相中加入 1 mL 异丙醇沉淀 RNA, 再加入 1 mL 75%乙醇洗涤 RNA, 去除异丙醇。加入适量的 DEPC 水溶解沉淀。总 RNA 浓度通过 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ nm(吸光度比 1.7-2.1)定量, 然后用于 cDNA 合成。

cDNA 的合成: 用 PrimeScript™ RT reagent Kit 试剂盒进行 cDNA 合成。将 DEPC 水和总 RNA 样品($0.5 \mu\text{g}$)共 $6.5 \mu\text{L}$, $2 \mu\text{L}$ $5 \times$ PrimeScript Buffer、 $0.5 \mu\text{L}$ PrimeScript RT Enzyme Mix I、 $0.5 \mu\text{L}$ Oligo dT Primer($50 \mu\text{M}$)、 $0.5 \mu\text{L}$ Random 6 mers($100 \mu\text{M}$)加入 0.2 mL 无菌无酶管中, 置于冰上。将反应混合物轻轻混合, 放入 T100 Thermal Cycler PCR 仪进行逆转录(37°C 反转录 15 分钟, 85°C 反应 5 秒钟使反转录酶失活反应, 最后降至 4°C 结束反应)。合成的 cDNA 用于 qRT-PCR。

实时聚合酶链式反应: 对于 qRT-PCR, 使用以下组分制备

10 μ L 目标基因反应混合物:5 μ L TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)(2 $\times$), PCR Forward Primer(10 μ M)和 PCR Reverse Primer(10 μ M)各 0.4 μ L、0.2 μ L ROX Reference Dye or Dye II(50 $\times$), 1 μ L RT 反应液(50 ng cDNA 溶液)和 3 μ L DEPC 水。将反应混合物添加到 0.2 mL PCR 专用八连管中,两步法 PCR 标准程序进行扩增:在变性(95 $^{\circ}$ C 下 30 秒)后扩增产物,95 $^{\circ}$ C 下进行 40 个循环,每个循环 5 秒,然后 60 $^{\circ}$ C 下退火

30 秒。融解阶段以 1.6 $^{\circ}$ C/s 的加热速率升至 95 $^{\circ}$ C 反应 15 秒,以 1.6 $^{\circ}$ C/s 的降温速率降至 60 $^{\circ}$ C 反应 1 分钟,最后以 0.15 $^{\circ}$ C/s 的速率升至 95 $^{\circ}$ C 反应 15 秒。根据 Pfaffl 法得出 CT 值,计算 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 分析基因相对表达量。

根据相关基因的 cDNA 序列,利用 Primer 5.0 设计特异性引物,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物信息见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences in this study

Genes Names	Forward primers (5'-3')	Reverse primers(5'-3')
μ -calpain	TCAACCTTCGGGAAGTCAGC	CATGTCATCCCCTGCCAACT
Caspase-3	ACTGGAAGCCGAAACTC	GCAAGCCATCTCCTCATC
TNF- α	GACGTGGAAGTGGCAGAAGAG	CCGCCTGGAGTTCTGGAA
IL-6	AAGGTCACTATGAGGTCTAC	CATATTGCCAGTTCTTCGTA
Beclin-1	AGCTGCCGTTATACTGTTCTG	ACTGCCTCTGTGTCTTCAATCTT
β -actin	CAGCCTTCCTTCTTGGGTAT	TGGCATAGAGGTCTTTACGG

1.4 统计学处理

采用 SPSS2.1 软件进行统计学分析,计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较采用独立样本 t 检验,多组间两两比较采用 LSD 法。 $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 膈肌组织学改变

将对照组和脓毒症组大鼠膈肌组织进行 HE 染色,光学显微镜下分析结果显示,正常对照组大鼠膈肌横截面形态规则,肌纤维饱满,排列整齐,肌纤维间隔紧密,细胞核分布于肌细胞边缘,毛细血管内皮完整,无间质增生。与对照组相比,LPS 处理 24 h 后的脓毒症组大鼠膈肌横截面形态仍较规则,肌纤维未见显著改变。以上说明,本研究中 8 mg/kg LPS 处理 24 h 的脓毒症模型中膈肌组织未发生明显萎缩,肌纤维结构未见明显破坏。见图 1。

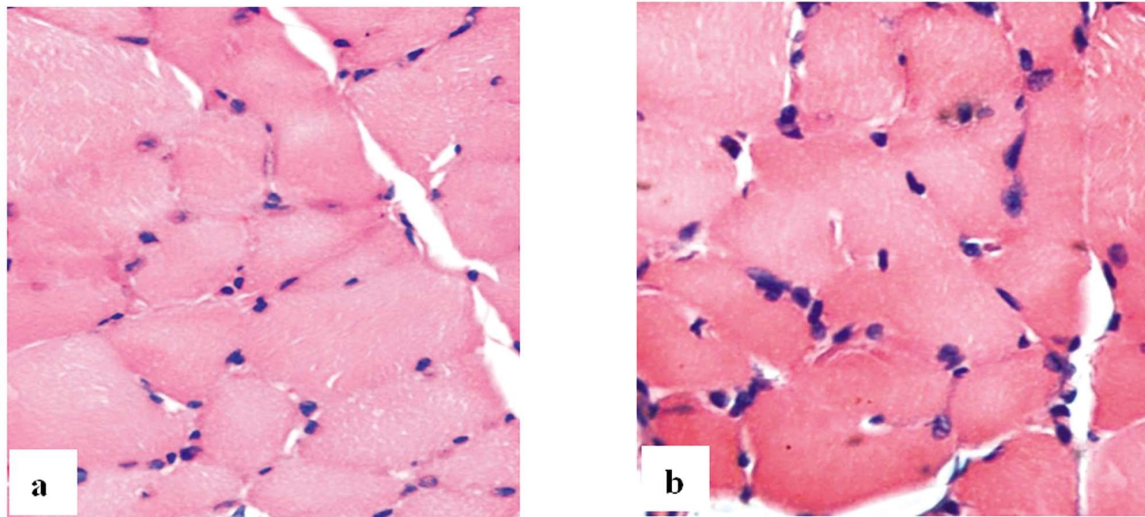


图 1 光镜下观察两组大鼠膈肌组织学改变(HE 染色, $\times 400$)

Fig.1 Histological changes in the diaphragm of rats in the two groups were observed under light microscope

Note: A, HE statining on diaphragm in normal control group; B, HE staining on diaphragm in sepsis group.

2.2 相关因子 mRNA 表达量

2.2.1 膈肌组织 μ -calpain 表达 与正常对照组相比,在脓毒症大鼠模型,膈肌组织中钙蛋白酶 μ -calpain mRNA 表达升高($P<0.05$),而在钙蛋白酶抑制剂 Calpeptin 预处理后, μ -calpain mRNA 表达显著降低($P<0.05$),与正常对照组相比 μ -calpain

mRNA 表达有所降低($P<0.05$)。这表明,脓毒症时钙蛋白酶的表达被激活,钙蛋白酶抑制剂 Calpeptin 能明显抑制钙蛋白酶的表达。

2.2.2 膈肌组织炎症因子表达 与正常对照组相比,在脓毒症大鼠模型,膈肌组织中炎症因子 TNF- α mRNA 和 IL-6 mRNA

表达显著增加($P<0.001$),钙蛋白酶抑制剂 Calpeptin 预处理后, TNF- α mRNA 表达显著降低($P<0.01$),但仍高于正常对照组表达量($P<0.01$),IL-6 mRNA 表达下降不明显。这表明,脓毒症时炎症通路被激活, TNF- α 和 IL-6 表达增加,这些炎症因子在膈肌功能障碍时起积极作用,钙蛋白酶抑制剂 Calpeptin 可以减少炎症因子表达,抑制炎症通路激活。

2.2.3 膈肌组织自噬与凋亡相关因子表达 与正常对照组相

比,在 LPS 诱导的脓毒症模型中,膈肌组织的凋亡相关因子 caspase-3 和自噬相关因子 Beclin-1 mRNA 表达明显增加($P<0.001$)。与脓毒症组相比,钙蛋白酶抑制剂 Calpeptin 组膈肌组织中 caspase-3 和 Beclin-1 mRNA 表达显著降低($P<0.001$),表达量甚至低于正常对照组($P<0.01$)。以上说明,脓毒症导致膈肌功能障碍时,自噬和凋亡通路被激活,钙蛋白酶抑制剂 Calpeptin 预处理可显著抑制其表达通路激活。

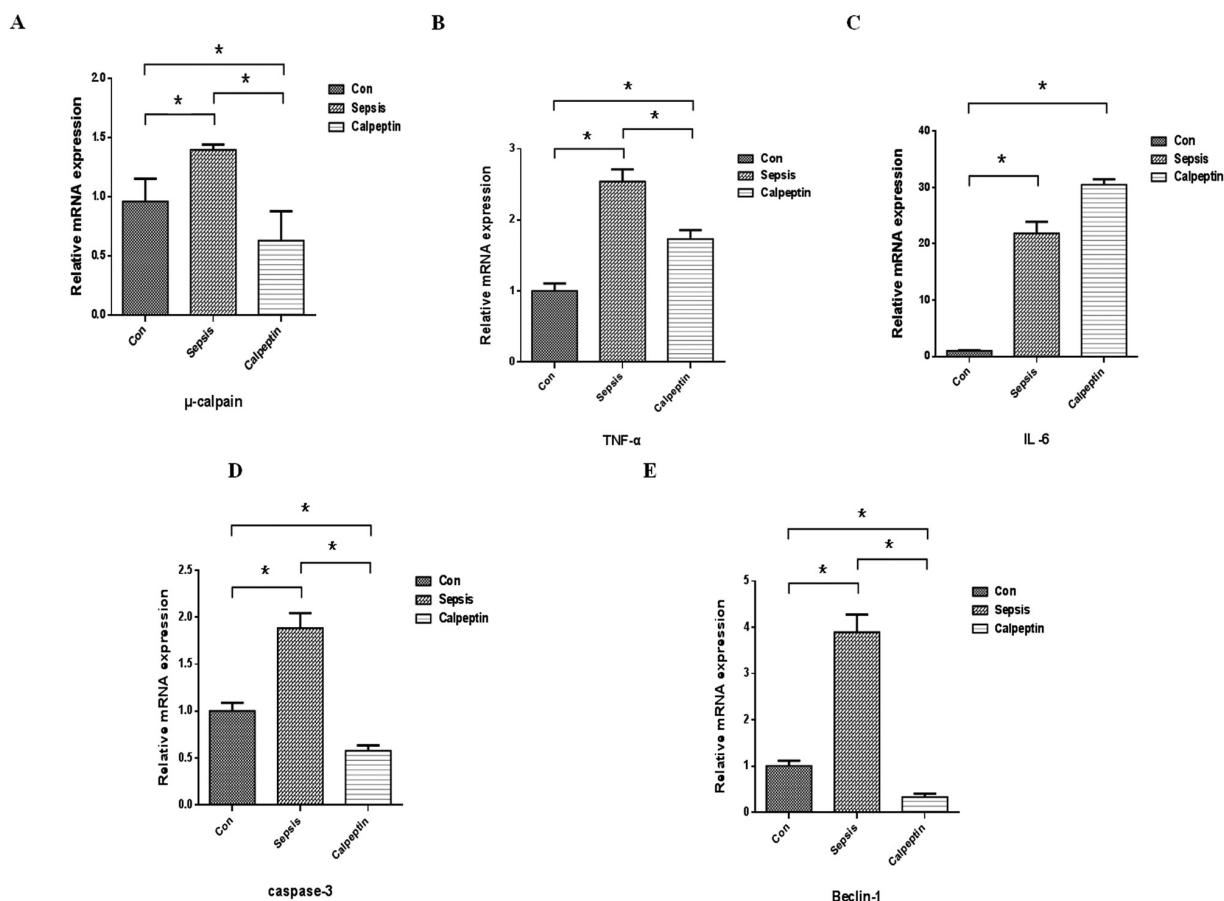


图 2 三组大鼠膈肌组织各相关因子 mRNA 相对表达量

Fig. 2 Relative mRNA expression levels of related factors in the diaphragm tissue of rats in the three groups

Note: Compared with the normal control group, the mRNA expression levels of inflammatory, autophagy and apoptotic factors were significantly increased in sepsis group, while Calpeptin significantly reduce their expression levels.* $P<0.05$. * represents a statistically significant difference between the two groups, $P<0.05$.

3 讨论

在本研究中,我们用腹腔注射 LPS 的经典方法构建脓毒症大鼠模型,给予 8 mg/kg LPS 处理 24 h 后,与正常对照组相比, HE 染色未见大鼠膈肌组织发生明显萎缩。这同我们以往的实验结果相同^[21]。既往我们的研究表明,8 mg/kg LPS 处理 24 h 构建的脓毒症大鼠膈肌峰抽搐压力 Pt、不同刺激频率(10Hz, 20Hz, 30Hz, 40Hz, 50Hz, 75Hz, 100Hz)下的收缩力和疲劳指数均显著降低^[22]。本研究表明,在脓毒症时炎症、自噬、凋亡通路被激活最终导致了膈肌功能障碍,同时证明了钙蛋白酶抑制剂 Calpeptin 通过抑制上述通路激活对脓毒症时膈肌功能起保护作用。脓毒症定义为由于宿主对感染的反应失调而导

致的危及生命的器官功能障碍^[23]。脓毒症的机制涉及复杂的全身炎症网络效应、遗传多态性、免疫功能障碍、凝血功能障碍、组织损伤以及宿主对同不感染病原微生物及其毒素的异常反应,可以导致各器官发生病理生理变化^[24]。图 3 阐述了 LPS 诱导的脓毒症大鼠膈肌组织发生功能障碍的合理机制和钙蛋白酶抑制剂减少各种相关因子的生物功能。

既往研究证实,与肢体肌肉相比,脓毒症时膈肌组织中产生了更多的细胞因子,这表明膈肌更容易遭受脓毒症所致的损伤^[25]。脓毒症诱导骨骼肌改变与过度的局部促炎细胞因子、自由基生成显著增加以及蛋白水解途径(包括半胱天蛋白酶和钙蛋白酶)的激活密切相关^[26]。脓毒症诱导膈肌功能障碍的发病机制存在不同的理论解释,最常见的理论是膈肌组织中增多的炎

症因子发挥作用。在过去几年的研究中,转化生长因子(TGF) β 家族成员,如肌肉生长抑制素、激活素 A 和 TGF- β 1,被报道强烈参与触发肌肉萎缩的蛋白水解途径激活^[27]。许多先前的研究也表明 LPS 对蛋白质存在降解作用。Russell 等人报道,LPS 通过激活 caspase-3、caspase-8、PKR、p38MAPK 和 ROS 的形成而诱导小鼠肌管中的蛋白质降解,从而激活 NF- κ B,最终导致蛋白质发生降解^[28]。近年来,自噬在脓毒症中的作用机制越来越多受到关注。自噬是一种进化保守的细胞降解系统,参与建立细胞内稳态。自噬过程包括自噬体形成、自噬体-溶酶体融合及降解产物生成^[29]。长期以来,自噬在脓毒症中被认为是一种限制细胞损伤和凋亡的细胞适应性保护机制^[30]。自噬不仅可以清除受损的蛋白质和细胞器,还可以清除存在于细胞质中的细菌和病原体。虽然一些特殊细菌如金黄色葡萄球菌可以通过激

活宿主细胞激酶来选择性逃避自噬,但自噬在脓毒症中仍起着重要作用^[31]。在脓毒症早期,自噬和高水平的细胞活力可能是对微生物感染的细胞保护机制。然而,这种保护作用是有限的。当发生严重脓毒症时,即使自噬显著增加也不能逆转压倒性的炎症反应。在脓毒症晚期,自噬反应往往是细胞适应死亡环境的结果,而不是导致细胞死亡的机制。尽管炎症和坏死增加,细胞死亡也可能是其他死亡信号级联激活的结果^[32]。在脓毒症引起的器官衰竭的发病机制中,细胞生物能量供应不足,即线粒体功能障碍和代谢异常扮演着关键角色。在脓毒症所致器官衰竭的发病机制中,细胞生物能量不足,更确切地说是线粒体功能障碍和代谢异常扮演着关键角色^[33]。脓毒症时线粒体产生过多自由基,选择性消耗电子传递链的关键组成部分,减少电子流、质子泵和ATP的形成,进而引起肌肉功能障碍^[34]。

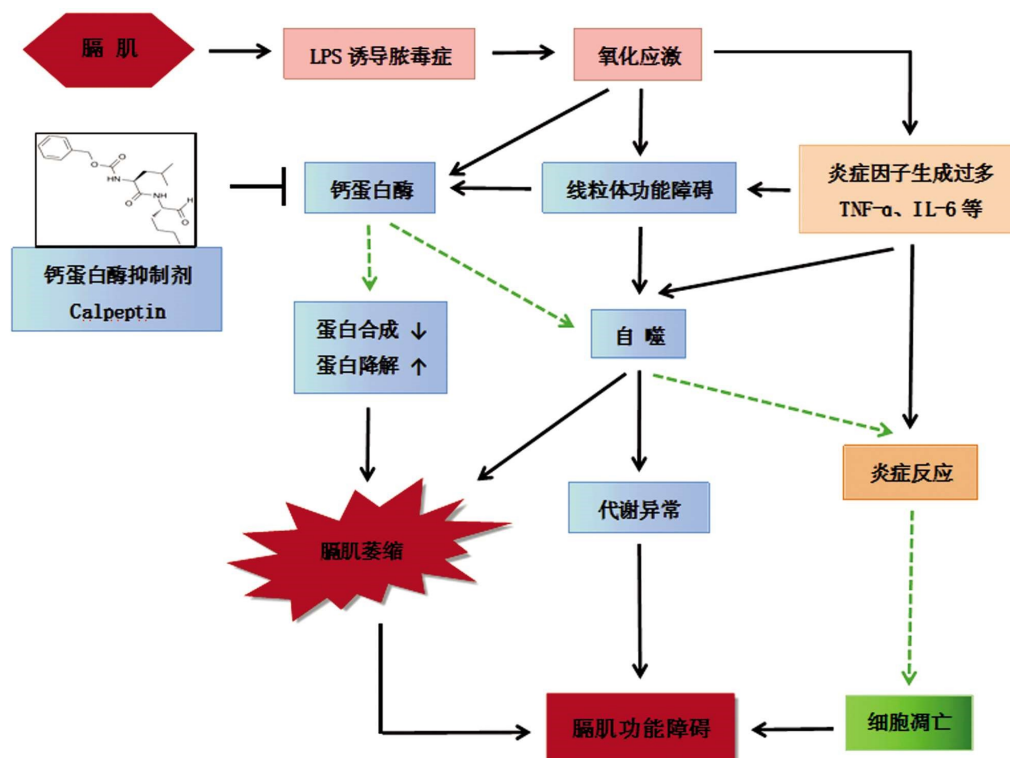


图3 在脓毒症中膈肌功能障碍炎症发生和钙蛋白酶抑制剂下调相关因子的可能机制

Fig. 3 The mechanisms by which inflammation occurs and Calpeptin inhibitors downregulate related factors in sepsis with diaphragmatic dysfunction

在脓毒症时,通过以上途径的级联反应,最终激活细胞凋亡通路,这加速了骨骼肌蛋白降解,减弱了膈肌收缩能力,进一步导致了膈肌功能障碍。以往研究表明,脓毒症时钙蛋白酶水解途径被激活,而钙蛋白酶抑制剂可减轻内毒素诱导的膈肌无力^[35]。但是其中潜在的分子机制有待进一步深入研究。我们的研究试图阐明钙蛋白酶的激活与以上通路之间的直接联系。总之,钙蛋白酶抑制剂降低了脓毒症大鼠膈肌组织 μ -calpain、caspase-3、Beclin-1 和 TNF- α 的 mRNA 表达,抑制了 LPS 诱导的炎症、自噬、凋亡通路激活。我们的研究结果也表明,钙蛋白酶抑制剂可能通过阻断靶向线粒体依赖途径 caspase-3 改善膈肌功能。本研究概述了钙蛋白酶在脓毒症诱导膈肌功能障碍中的作用机制,为临床上脓毒症相关膈肌无力的药物治疗提供理论依据。

参考文献(References)

- [1] Michael D Font, Bhagadheeswar Thyagarajan, Ashish K Khanna. Sepsis and Septic Shock - Basics of diagnosis, pathophysiology and clinical decision making [J]. Med Clin North Am, 2020, 104 (4): 573-585
- [2] Silvano Esposito, Giuseppe De Simone, Giovanni Boccia, et al. Sepsis and septic shock: New definitions, new diagnostic and therapeutic approaches[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2017, 10: 204-212
- [3] Anders Perner, Anthony C Gordon, Daniel De Backer, et al. Sepsis: frontiers in diagnosis resuscitation and antibiotic therapy[J]. Intensive Care Med, 2016, 42(12): 1958-1969
- [4] Kristina E Rudd, Sarah Charlotte Johnson, Kareha M Agesa, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study [J].

- Lancet, 2020, 395(10219): 200-211
- [5] Dres M, Dube BP, Mayaux J, et al. Coexistence and impact of limb muscle and diaphragm weakness at time of liberation from mechanical ventilation in medical intensive care unit patients[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017, 195(3): 57-66
- [6] Martin Dres, Ewan C Goligher, Leo M A Heunks, et al. Critical illness-associated diaphragm weakness[J]. *Intensive Care Med*, 2017, 43(10): 1441-1452
- [7] Basil J Petrof. Diaphragm Weakness in the Critically Ill: Basic Mechanisms Reveal Therapeutic Opportunities [J]. *Chest*, 2018, 154(6): 1395-1403
- [8] Greg S Martin, David M Mannino, Stephanie Eaton, et al. Peripheral nerve function in sepsis and multiple organ failure [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(16): 1546-1554
- [9] Jaffar Khan, Taylor B Harrison, Mark M Rich, et al. Early development of critical illness myopathy and neuropathy in patients with severe sepsis[J]. *Neurology*, 2006, 67(8): 1421-1425
- [10] Russell AP. Molecular regulation of skeletal muscle mass [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010, 37: 378-384
- [11] Levine S, Biswas C, Dierov J, et al. Increased proteolysis, myosin depletion, and atrophic AKT-FOXO signaling in human diaphragm disuse[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183(4): 483-90
- [12] Hooijman PE, Beishuizen A, Witt CC, et al. Diaphragm muscle fiber weakness and ubiquitin-proteasome activation in critically ill patients [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015, 191(10): 1126-1138
- [13] Nelson WB, Smuder AJ, Hudson MB, et al. Cross-talk between the calpain and caspase-3 proteolytic systems in the diaphragm during prolonged mechanical ventilation [J]. *Crit Care Med*, 2012, 40: 1857-1863
- [14] Fareed MU, Evenson AR, Wei W, et al. Treatment of rats with calpain inhibitors prevents sepsis-induced muscle proteolysis independent of atrogin-1/MAFbx and MuRF1 expression [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006, 290: R1589-1597
- [15] Hayden W Hyatt, Mustafa Ozdemir, Toshinori Yoshihara, et al. Calpains play an essential role in mechanical ventilation-induced diaphragmatic weakness and mitochondrial dysfunction[J]. *Redox Biol*, 2021, 38: 101802
- [16] Levente Endre Dókus, Mo'ath Yousef, Zoltán Bánócz. Modulators of calpain activity: inhibitors and activators as potential drugs[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2020, 15(4): 471-486
- [17] Stefania Marzocco, Rosanna Di Paola, Giuseppina Autore, et al. Calpain inhibitor I reduces intestinal ischemia-reperfusion injury in the rat[J]. *Shock*, 2004, 21(1): 38-44
- [18] Gerald S Supinski, Leigh Ann Callahan. Calpain activation contributes to endotoxin-induced diaphragmatic dysfunction [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010, 42(1): 80-87
- [19] Moin U Fareed, Amy R Evenson, Wei Wei, et al. Treatment of rats with calpain inhibitors prevents sepsis-induced muscle proteolysis independent of atrogin-1/MAFbx and MuRF1 expression [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006, 290(6): R1589-97
- [20] Rong Luo, Xuepin Chen, Huihui Ma, et al. Myocardial caspase-3 and NF- κ B activation promotes calpain-induced septic apoptosis: The role of Akt/eNOS/NO pathway[J]. *Life Sci*, 2019, 222: 195-202
- [21] Jiao G, Hao L, Wang M, Zhong B, et al. Upregulation of endoplasmic reticulum stress is associated with diaphragm contractile dysfunction in a rat model of sepsis[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(1): 366-374
- [22] Wang MM, Hao LY, Guo F, et al. Decreased intracellular $[Ca^{2+}]$ coincides with reduced expression of Dhpr α 1s, RyR1, and diaphragmatic dysfunction in a rat model of sepsis [J]. *Muscle Nerve*, 2017, 56(6): 1128-1136
- [23] Mervyn Singer, Clifford S Deutschman, Christopher Warren Seymour, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) [J]. *JAMA*, 2016, 315(8): 801-810
- [24] Xin Yin, Huang Xin, Shuai Mao, et al. The Role of Autophagy in Sepsis: Protection and Injury to Organs [J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 1071
- [25] Alexandre Demoule, Maziar Divangahi, Linda Yahiaoui, et al. Endotoxin triggers nuclear factor-kappaB-dependent up-regulation of multiple proinflammatory genes in the diaphragm [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 174(6): 646-653
- [26] Leigh Ann Callahan, Gerald S Supinski. Sepsis-induced myopathy[J]. *Crit Care Med*, 2009, 37(10 Suppl): S354-367
- [27] Baptiste Jude, Florine Tissier, Audrey Dubourg, et al. TGF- β Pathway Inhibition Protects the Diaphragm From Sepsis-Induced Wasting and Weakness in Rat[J]. *Shock*, 2020, 53(6): 772-778
- [28] Amna T, Hassan MS, Sheikh FA, et al. Zinc oxide-doped poly (urethane) spider web nanofibrous scaffold via one-step electrospinning: a novel matrix for tissue engineering [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(4): 1725-1734
- [29] Daniel J Klionsky, Fabio C Abdalla, Hagai Abeliovich, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy [J]. *Autophagy*, 2012, 8(4): 445-544
- [30] Ioannis Karagiannidis, Agapi Katakaki, Georgia Glustianou, et al. Extended cytoprotective effect of autophagy in the late stages of sepsis and fluctuations in signal transduction pathways in a rat experimental model of kidney injury[J]. *Shock*, 2016, 45(2): 139-147
- [31] Yvonne Neumann, Svenja A Bruns, Manfred Rohde, et al. Intracellular *Staphylococcus aureus* eludes selective autophagy by activating a host cell kinase[J]. *Autophagy*, 2016, 12(11): 2069-2084
- [32] Ioannis Karagiannidis, Agapi Katakaki, Georgia Glustianou, et al. Extended cytoprotective effect of autophagy in the late stages of sepsis and fluctuations in signal transduction pathways in a rat experimental model of kidney injury[J]. *Shock*, 2016, 45(2): 139-147
- [33] Giacomo Stanzani, Michael R Duchon, Mervyn Singer. The role of mitochondria in sepsis-induced cardiomyopathy[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865(4): 759-773
- [34] Leigh A Callahan, Gerald S Supinski. Sepsis induces diaphragm electron transport chain dysfunction and protein depletion[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 172(7): 861-868
- [35] Gerald S Supinski, Leigh Ann Callahan. Calpain activation contributes to endotoxin-induced diaphragmatic dysfunction [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010, 42(1): 80-87