

网络出版时间:2023-11-30 11:14:05 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20231129.1027.015

NADH 通过 SIRT1/Nrf2 通路缓解小鼠 抗结核药物性肝损伤及凋亡

李金凤,崔梦祥,龙奕妃,孟春燕,任琦,冯福民

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.12.015

摘要 **目的** 探究烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)通过SIRT1/Nrf2通路调控小鼠抗结核药物性肝损伤和凋亡的机制。**方法** 将24只6周龄SPF级雄性小鼠按体重随机分成4组:ADLI组[90 mg/(kg·d)异烟肼+135 mg/(kg·d)利福平+315 mg/(kg·d)吡嗪酰胺灌胃]、对照组[与抗结核药物性肝损伤(ADLI)组等体积生理盐水灌胃]、NADH组(对照组基础上应用30 mg/kg NADH灌胃)和NADH干预组(ADLI组基础上应用30 mg/kg NADH灌胃),每组6只,连续灌胃7 d,收集血清和肝组织。qRT-PCR法和Western blot法分别检测SIRT1/Nrf2通路中的沉默信息调节因子1(SIRT1)、核因子E2相关因子2(Nrf2)和凋亡相关指标B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、人胱天蛋白酶3(caspase-3)的mRNA和蛋白表达情况;HE染色法观察小鼠肝脏组织形态;称取小鼠肝脏质量,将其质量除以体质量获得肝脏指数;微板法检测肝损伤指标谷氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)的水平。**结果** 与对照组相比,ADLI组SIRT1和Nrf2蛋白、mRNA表达水平下降($P < 0.05$);肝组织结构紊乱,细胞明显肿胀、边界不清;小鼠体质量下降,肝指数上升;抗凋亡因子Bcl-2 mRNA和蛋白表达水平降低,凋亡因子Bax、caspase-3 mRNA和蛋白表达增强;肝损伤指标ALT、AST、LDH水平升高($P < 0.05$)。而与ADLI组相比,NADH干预后,SIRT1、Nrf2的mRNA和蛋白表达升高;肝组织结构清晰,细胞呈多边形;抗凋亡因子Bcl-2 mRNA和蛋白表达升高,凋亡因子Bax、caspase-3 mRNA和蛋白水平降低;小鼠体质量上升,肝指数下降;肝损伤指标ALT、AST、LDH表达降低($P < 0.05$)。**结论** NADH可能通过调控SIRT1/Nrf2通路缓解小鼠抗结核药物性肝损伤和细胞凋亡。

关键词 抗结核药物性肝损伤;凋亡;炎症;烟酰胺腺嘌呤二核苷酸;沉默信息调节因子1;核因子E2相关因子2

中图分类号 R 965

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)12-2089-06

抗结核药物性肝损伤(antituberculosis drug-induced liver injury, ADLI)是抗结核药物最严重且最常见的副反应,严重的ADLI会导致肝功能衰竭甚至死亡,但其发生发展机制尚未完全阐明。沉默信息调节蛋白1(silence information regulator 1, SIRT1)是一类烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)依赖性的Ⅲ型组蛋白去乙酰化酶,其引起的组蛋白乙酰化的异常与ADLI的发生发展密不可分^[1]。有研究^[2]显示组蛋白乙酰化水平的改变可通过调控细胞凋亡参与ADLI进程。SIRT1可调控核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2)的稳定性与表达^[3]。在正常情况下,Nrf2能与细胞质中的Kelch样ECH关联蛋白1(Kelch like ECH associated protein 1, Keap1)结合,导致Nrf2的活动暂时受到抑制。而SIRT1可触发Nrf2与Keap1分离,Nrf2转位进入细胞核,同时改变细胞内正常的生理状态^[4]。因此本研究推测SIRT1/Nrf2信号通路在ADLI进展中可能发挥重要作用。

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)能够与NAD⁺相互转换,参与细胞氧化还原状态的调节,其外源给药可以预防鱼藤酮诱导的细胞损伤并调节凋亡相关基因的表达^[5]。因此,本研究拟应用一线抗结核药物异烟肼、利福平、吡嗪酰胺构建ADLI小鼠模型,利用NADH进行干预,旨在探讨NADH通过调节SIRT1/Nrf2通路,改变凋亡信号从而调控小鼠ADLI的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 异烟肼(货号:84-85-3)、利福平(货号:13292-46-1)、吡嗪酰胺(货号:98-96-4)购于日本TCI公司;TRIzol试剂盒(货号:RP1001)购于北京百泰克生物技术有限公司;qRT-PCR试剂盒(货号:MF303-05)购于北京聚合美生物科技有限公司;反转录试剂盒(货号:AG11705)购于湖南艾科瑞

2023-09-02 接收

基金项目:河北省自然科学基金(编号:H2021209052);河北省高等学校基本科研业务费项目(编号:JQN2021032)

作者单位:华北理工大学公共卫生学院,唐山 063210

作者简介:李金凤,女,博士研究生;

冯福民,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:fm_feng@sina.com

生物工程有限公司;丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)(货号:C009-2-1)、门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)(货号:C010-2-1)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒(货号:A020-2-2)购于南京建成生物工程研究所;SIRT1 抗体(货号:13161-1-AP)、Nrf2 抗体(货号:16396-1-AP)、B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体(货号:26593-1-AP)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)抗体(货号:60267-1-AP)、caspase-3 抗体(货号:19677-1-AP)、 β -actin 抗体(货号:8115-1-RR)、HRP 标记羊抗兔二抗(货号:PR30011)均购于武汉三鹰生物技术有限公司;NADH(货号:ST358)、BCA 蛋白定量试剂盒(货号:P0012)购于上海碧云天生物技术有限公司;SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(货号:ZD304)购于北京庄盟国际生物科技有限公司。电泳仪(型号:DYY-8)、全波长酶标仪(型号:SpectraMax Plus 384 型)购于上海美谷分子仪器有限公司;快速湿转仪(型号:L00686C)购于南京金斯瑞生物科技有限公司;荧光定量 PCR 仪(型号:StepOnePlus)购于美国 Applied Biosystems 公司;光学显微镜(型号:CX43)购于日本奥林巴斯株式会社;Alpha 凝胶成像系统(型号:Alpha Imager HP 型)购于美国 AlphaImaging 公司。

1.2 ADLI 小鼠模型和 NADH 干预组模型制备

24 只 6 周龄 SPF 级雄性小鼠,饲养于华北理工大学实验动物中心屏障实验室(实验动物许可证号:SYXK 冀 2020-007),体质量 20~30 g,饲养温度 18~25 ℃,相对湿度 40%~60%。适应性饲养 1 周后,随机分为 4 组,每组 6 只。其中,ADLI 组用 90 mg/(kg·d)异烟肼+135 mg/(kg·d)利福平+315 mg/(kg·d)吡嗪酰胺灌胃处理(剂量按照临床成人正常用药剂量的 9 倍计算所得);对照组用 ADLI 组相同体积生理盐水灌胃;NADH 组在对照组的基础上应用 NADH 30 mg/kg 灌胃处理;NADH 干预组在 ADLI 组的基础上应用 NADH 30 mg/kg 灌胃处理。每 d 灌胃 1 次,连续灌胃 7 d,末次灌胃后处死小鼠并收集血清和肝组织,-80 ℃保存。

1.3 HE 染色法检测肝组织形态 小鼠肝组织标本收集后经固定→透明→包埋→切片等步骤制作病理切片,HE 染色后,在光学显微镜下观察小鼠肝组织的病理形态学改变。

1.4 qRT-PCR 法检测 SIRT1、Nrf2、Bcl-2、Bax、caspase-3 mRNA 表达情况 按照 Trizol 试剂盒说

明书提取小鼠肝组织中的总 RNA,按照反转录试剂盒说明书将其反转录为 cDNA。构建 PCR 反应体系,共 20 μ l,其中 Mix 10 μ l,无酶水 6 μ l,cDNA 2 μ l,上下游引物共 2 μ l;反应条件为 95 ℃ 30 s,62 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,40 个循环。以 GAPDH 作为内参。具体引物序列如下表 1 所示。

表 1 引物序列表

基因	引物序列(5'-3')
SIRT1	F:CCAGACCTCCCAGACCCTCAAG
	R:CTCCACGAACAGCTTCACAATCAAC
Nrf2	F:ACGAGGCGGTACAAGTTTGGGAAG
	R:AGGGACTGGAGAGATGGCTAAACC
Bcl-2	F:CTTCACACCCAAATCTCACCTCCTC
	R:TCTCAAGCCTTCACGCAAGTTCAG
Bax	F:GGCACCCTTTCTCTCTCTCTC
	R:TGCTGTCCAGTTCATCTCCAATTCG
caspase-3	F:CGTGTGCGAGATGAGGTGTTGG
	R:CCAGAGCGAGATGACATTCCAGTG
GAPDH	F:TGCGACTTCAACAGCAACTC
	R:ATGTAGGCAATGAGGTCCAC

1.5 Western blot 法检测蛋白表达情况 取 1.2 中提及的不同处理组的小鼠肝组织,提取总蛋白,应用 BCA 蛋白定量试剂盒对各组细胞提取的蛋白进行定量。经上样→SDS-PAGE 电泳→转膜→封闭→一抗孵育→二抗孵育→洗膜→显色等步骤观察蛋白表达情况,其中一抗浓度为 1:1 000,4 ℃条件下孵育过夜;羊抗兔二抗浓度为 1:10 000,室温条件下孵育 2 h。应用 ImageJ 软件分析蛋白灰度值。

1.6 微板法检测肝损伤指标的表达情况 按照 ALT、AST、LDH 试剂盒要求,将双蒸水、丙酮酸标准液、待测样本、基质缓冲液、辅酶 I 混合,37 ℃温育 15 min,加入 2,4-二硝基苯肼后,再次混合,37 ℃温育 15 min,最后加入 NaOH 溶液混匀,于 450 nm 波长处检测吸光度值。

1.7 统计学处理 各实验数据均录入 SPSS 22.0 软件中。计量数据采用($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析进行多组间比较,事后两两比较采用 LSD-t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NADH 对 SIRT1/Nrf2 通路表达水平的影响

与对照组相比,ADLI 组小鼠 SIRT1 和 Nrf2 蛋白和 mRNA 表达均降低($t = 5.18、6.21、8.09、6.29$,均 $P < 0.05$);与 ADLI 组相比,NADH 干预后 SIRT1、

Nrf2 蛋白和 mRNA 表达均升高 ($t = 4.17, 8.00, 6.14, 4.49$, 均 $P < 0.05$), SIRT1/Nrf2 信号通路被激活, 表明 NADH 可逆转抗结核药物引起的各指标的低表达。见图 1。

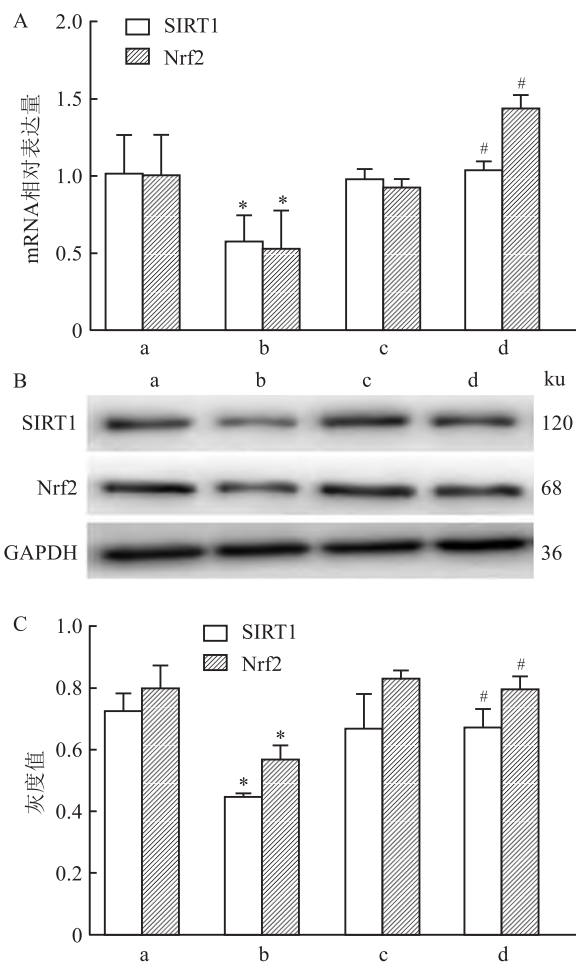


图1 SIRT1/Nrf2 通路相关指标 mRNA 和蛋白检测结果 ($n = 3$)

A: SIRT1/Nrf2 通路相关指标 mRNA 相对表达量; B: Western blot 结果; C: 蛋白灰度值; a: 对照组; b: ADLI 组; c: NADH 组; d: NADH 干预组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 ADLI 组比较: # $P < 0.05$

2.2 NADH 对小鼠肝组织形态学的影响 HE 染色结果显示, 与对照组相比, ADLI 组小鼠肝组织结构紊乱, 细胞明显肿胀、边界不清; 而 NADH 干预后, 肝组织结构较清晰, 细胞呈多边形。见图 2。

2.3 NADH 对小鼠体质量和肝指数的影响 与对照组相比, ADLI 组小鼠肝指数升高、体质量降低 ($t = 8.51, 4.38$, 均 $P < 0.05$); NADH 干预后, ADLI 组小鼠肝指数明显降低、体质量升高 ($t = 6.10, 3.49$, 均 $P < 0.05$)。见图 3。

2.4 NADH 对小鼠血清中凋亡指标的影响 与对照组相比, ADLI 组抗凋亡因子 Bcl-2 的蛋白及 mR-

NA 表达降低 ($t = 5.20, 4.89$, 均 $P < 0.05$), 凋亡指标 Bax、caspase-3 的蛋白、mRNA 表达水平均升高 ($t = 8.16, 8.85, 3.89, 8.03$, 均 $P < 0.05$); 而 NADH 干预后, Bcl-2 的蛋白、mRNA 表达升高 ($t = 6.16, 5.01$, 均 $P < 0.05$), 凋亡指标 Bax、caspase-3 的蛋白及 mRNA 表达水平均降低 ($t = 9.39, 6.10, 3.81, 7.29$, 均 $P < 0.05$), 逆转了抗结核药物引起的指标变化。见图 4。

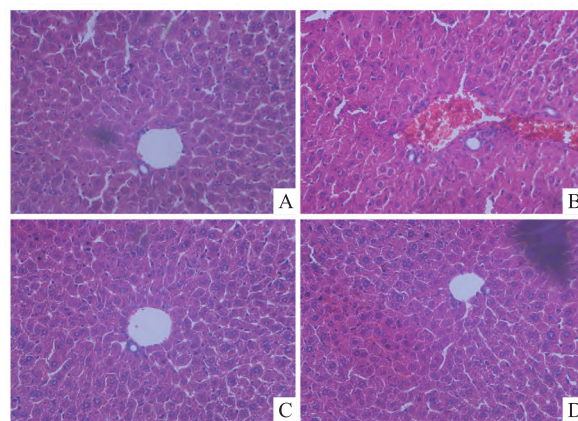


图2 小鼠 HE 染色肝组织形态图 ($\times 40$)

A: 对照组; B: ADLI 组; C: NADH 组; D: NADH 干预组

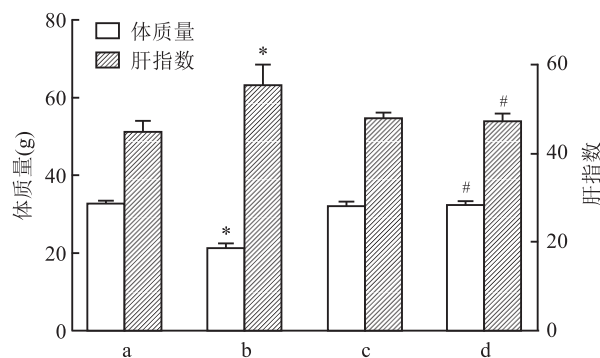


图3 各组小鼠体质量及肝指数比较 ($n = 3$)

a: 对照组; b: ADLI 组; c: NADH 组; d: NADH 干预组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 ADLI 组比较: # $P < 0.05$

2.5 NADH 对小鼠血清中肝损伤指标的影响 结果显示, 与对照组相比, ADLI 组小鼠 ALT、AST、LDH 活性增强 ($t = 6.29, 10.81, 8.51$, 均 $P < 0.05$); 而 NADH 干预后 ALT、AST、LDH 活性降低 ($t = 3.64, 9.63, 4.80$, 均 $P < 0.05$)。见图 5。

3 讨论

抗结核药物性肝损伤是异烟肼、利福平、乙醇丁胺和吡嗪酰胺等一线抗结核药物长期联合应用导致

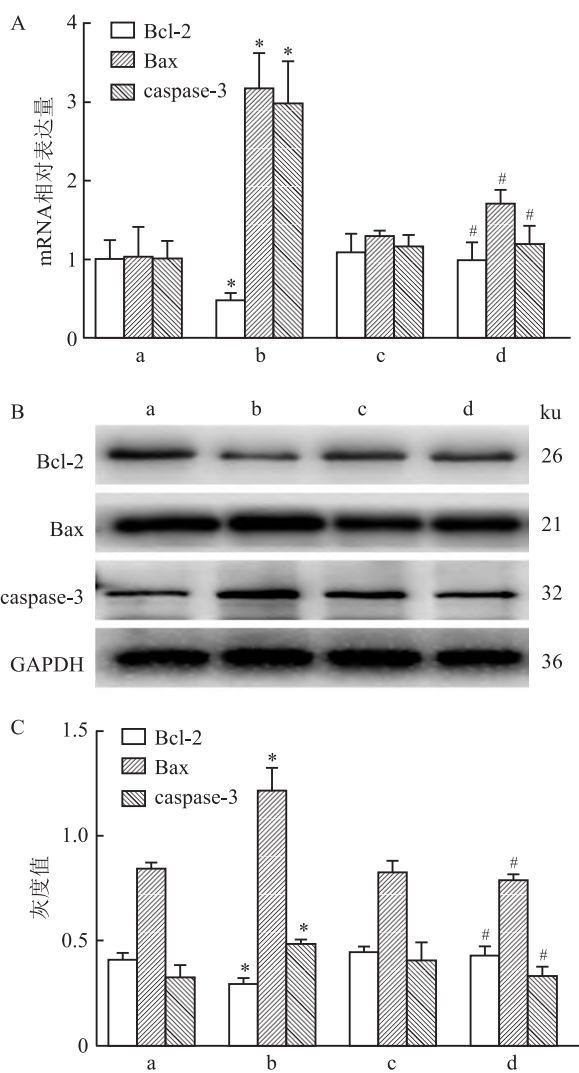


图4 凋亡相关指标 mRNA 及蛋白检测结果 ($n=3$)

A: 凋亡相关指标 mRNA 相对表达量; B: Western blot 结果; C: 蛋白灰度值; a: 对照组; b: ADLI 组; c: NADH 组; d: NADH 干预组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 ADLI 组比较: # $P < 0.05$

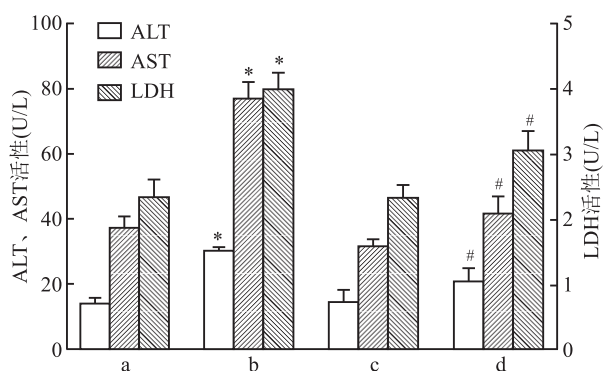


图5 各组血清中肝损伤指标活性比较 ($n=3$)

a: 对照组; b: ADLI 组; c: NADH 组; d: NADH 干预组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 ADLI 组比较: # $P < 0.05$

的最严重的副反应,其机制至今尚未完全阐明。本

研究应用抗结核药物构建小鼠 ADLI 模型,并予以 NADH 处理,探讨 NADH 通过 SIRT1/Nrf2 信号通路在 ADLI 发展中的调控机制。结果表明,NADH 处理后,SIRT1/Nrf2 信号通路被激活,小鼠肝细胞形态趋于正常,肝脏损伤得到缓解,凋亡水平下降,证实 NADH 可激活 SIRT1/Nrf2 信号通路,并改变凋亡指标蛋白和 mRNA 表达情况,缓解 ADLI。

有研究^[6-7]证实,抗结核药物在肝脏代谢产生的活性代谢产物会诱导炎症反应和细胞凋亡,但其具体机制尚未完全阐明。本研究在 ADLI 模型中发现抗结核药物能够引起肝细胞肿胀、边界不清等现象,ALT、AST、LDH 等肝损伤指标表达上调,凋亡相关因子 Bcl-2 蛋白、mRNA 表达降低,Bax、caspase-3 蛋白和 mRNA 表达升高,与前期研究^[8]结果一致。

此外,ADLI 的发生被认为与组蛋白修饰密不可分,SIRT1 是组蛋白去乙酰化酶 Sirtuins 家族的主要成员,已被证实可以发挥去乙酰化功能,缓解抗结核药物引起的细胞损伤^[2]。SIRT1 还可以去除 Nrf2 基因的乙酰化修饰,并通过生成抗氧化酶促进其功能的发挥^[9],因此,SIRT1/Nrf2 信号通路在肾脏损伤^[10]、肝损伤^[11]等疾病中具有重要的调节功能,被认为是调节基因表达、缓解氧化损伤的关键信号通路。本研究显示 ADLI 小鼠模型的 SIRT1/Nrf2 通路受到抑制,SIRT1 和 Nrf2 的 mRNA 和蛋白表达水平均明显降低,而在应用 NADH 后,该通路被激活,二者活性明显增强。有研究^[12]表明,在对乙酰氨基酚诱导的人正常肝细胞损伤中应用 SIRT1 的特异性激动剂,不仅会激活 SIRT1 的表达,使其活性增强,还可显著促进 Nrf2 的表达,最终逆转对乙酰氨基酚诱导的小鼠肝损伤。SIRT1/Nrf2 通路还可在乙醇诱导的肝纤维化中抑制炎症因子的表达,从而改善酒精性肝纤维化^[13]。这与本研究结果相一致,可见在 ADLI 的发生发展过程中,SIRT1/Nrf2 通路也可发挥抗炎作用。

SIRT1 作为 NAD⁺ 依赖性的去乙酰化酶,降低 NAD⁺ 含量能够明显抑制 SIRT1 蛋白的表达和活性^[14-15]。因此,本研究在 ADLI 小鼠模型中应用 NADH,SIRT1 和 Nrf2 的水平均升高,可见 NADH 增加了小鼠体内 NAD⁺ 的含量,为 SIRT1 提供底物,激活了 SIRT1/Nrf2 信号通路。除此之外,NADH 的作用机制与改善线粒体功能、增加抗凋亡蛋白、降低促凋亡蛋白的表达有关。本研究显示 NADH 改变了小鼠肝组织中凋亡相关指标 Bcl-2、Bax、caspase-3 的表达,引起了凋亡信号的变化;同时 ALT、AST、LDH

等肝损伤指标活性均降低,ADLI 小鼠炎症反应得到缓解。

本研究通过在 ADLI 小鼠中应用 NADH,证明了 NADH 可改变 SIRT1/Nrf2 信号通路中 SIRT1、Nrf2 蛋白和 mRNA 的表达,缓解 ADLI 小鼠的炎症反应和细胞凋亡,为 ADLI 的治疗提供新的方向。但本研究尚有不足之处。首先,本研究仅以小鼠为研究对象,在体内水平进行研究,研究结果不能外推。其次,仅观察了 SIRT1/Nrf2 信号通路中 SIRT1、Nrf2 蛋白和 mRNA 的表达情况,并未研究二者之间的相互作用机制,具有一定的局限性。未来应从人群、体外等水平进一步探讨 NADH 对 ADLI 的保护作用,并深入研究 SIRT1 对 Nrf2 的具体调控机制,为阐明 ADLI 的发生机制提供理论依据。

参考文献

- [1] Zhang Y, Li Y, Li J, et al. SIRT1 alleviates isoniazid-induced hepatocyte injury by reducing histone acetylation in the IL-6 promoter region[J]. *Int Immunopharmacol*,2019,67:348–55.
- [2] Li J F, Li Y S, Zhang Y Y, et al. Regulation of P300 and HDAC1 on endoplasmic reticulum stress in isoniazid-induced HL-7702 hepatocyte injury[J]. *J Cell Physiol*,2019,234 (9):15299–307.
- [3] Guarente L, Franklin H. Epstein lecture: Sirtuins, aging, and medicine[J]. *N Engl J Med*,2011, 364(23):2235–44.
- [4] Liu X, Zhang D, Cai Q, et al. Involvement of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in neonatal intestinal interleukin-17D expression in hyperoxia[J]. *Int J Mol Med*,2020,46(4):1423–32.
- [5] 张积仁,温居一,徐 萌,等. 还原型辅酶 I (NADH) 对 PC12 细胞鱼藤酮损伤的分子调控[J]. *解放军医学杂志*,2002(3):192–3.
- [6] Wang P, Pradhan K, Zhong X B, et al. Isoniazid metabolism and hepatotoxicity[J]. *Acta Pharm Sin B*,2016,6(5):384–92.
- [7] Metushi I, Uetrecht J, Phillips E. Mechanism of isoniazid-induced hepatotoxicity: then and now[J]. *Br J Clin Pharmacol*,2016,81(6):1030–6.
- [8] Li B, Ren Q, Li Y, et al. Screening differential circular RNA expression profiles reveals the regulatory role of circMARS in anti-tuberculosis drug-induced liver injury[J]. *J Cell Mol Med*,2022,26(4):1050–9.
- [9] Patel S, Khan H, Majumdar A. Crosstalk between Sirtuins and Nrf2: SIRT1 activators as emerging treatment for diabetic neuropathy[J]. *Metab Brain Dis*,2022,37(7):2181–95.
- [10] Ma F, Wu J, Jiang Z, et al. P53/NRF2 mediates SIRT1's protective effect on diabetic nephropathy[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*,2019,1866(8):1272–81.
- [11] Sun L, He D, Liu Y, et al. Corynoline protects against zearalenone-induced liver injury by activating the SIRT1/Nrf2 signaling pathway[J]. *J Biochem Mol Toxicol*,2023,37(1):e23224.
- [12] Liu X, Zhao H, Luo C, et al. Acetaminophen responsive miR-19b modulates SIRT1/Nrf2 signaling pathway in drug-induced hepatotoxicity[J]. *Toxicol Sci*,2019,170(2):476–88.
- [13] Abu-Risha S E, Sokar S S, Elbohuty H R, et al. Combined carvedilol and cilostazol ameliorate ethanol-induced liver fibrosis in rats: possible role of SIRT1/Nrf2/HO-1 pathway[J]. *Int Immunopharmacol*,2023,116:109750.
- [14] Aragonès G, Suárez M, Ardid-Ruiz A, et al. Dietary proanthocyanidins boost hepatic NAD(+) metabolism and SIRT1 expression and activity in a dose-dependent manner in healthy rats[J]. *Sci Rep*,2016,6:24977.
- [15] 李艳琴. 胍致心肌纤维细胞凋亡机制及 NADH 防治作用的研究[D]. 武汉:武汉大学,2005.

NADH alleviates anti-tuberculosis drug-induced liver injury and apoptosis in mice through SIRT1/Nrf2 pathway

Li Jinfeng, Cui Mengxiang, Long Yifei, Meng Chunyan, Ren Qi, Feng Fumin

(School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210)

Abstract Objective To investigate the mechanism by which Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) regulates anti-tuberculosis drug-induced liver injury and apoptosis in mice through SIRT1/Nrf2 pathway. **Methods** Twenty-four six-week-old SPF male mice were randomly divided into four groups according to body weight, ADLI group[90 mg/(kg·d) Isoniazid, 135 mg/(kg·d) Rifampicin, 315 mg/(kg·d) Pyrazinamide were given by gavage], control group[thesame volume of saline was given by gavage as antituberculosis drug-induced liver injury (ADLI) group], NADH group (30 mg/kg NADH was given by gavage on the basis of control group) and NADH intervention group (30 mg/kg NADH was given by gavage on the basis of ADLI group), with six mice in each group. They were gavaged continuously for seven days, and their serum and liver tissues were collected. The mRNA and protein expression of silence information regulator 1 (SIRT1), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) in SIRT1/Nrf2 pathway, apoptosis indicators B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax) and caspase-3 were detected by qRT-PCR and Western blot, respectively. HE staining was performed to observe the

网络出版时间:2023-12-05 10:25:52 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20231204.1525.001

穿心莲内酯调控铁死亡中 SLC7A11/GPX4 轴减轻脓毒症肠损伤

黄 铭¹, 张艺馨¹, 曹国栋², 曾佑成¹, 林 靛¹, 王晓悦¹, 程青虹^{1,3}

摘要 目的 探讨穿心莲内酯(AG)能否通过激活铁死亡中的 SLC7A11/GPX4 轴减轻脓毒症患者肠损伤。**方法** 将 40 只大鼠随机分为假手术组(sham 组)、脓毒症组(CLP 组)、AG 低、中、高剂量组(5、10、20 mg/kg);HE 染色观察肠道病理变化;ELISA 法测定白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、肠脂肪酸结合蛋白(I-FABP)、D-乳酸含量;以 AG 高剂量组(AG20 组)探讨铁死亡机制,40 只大鼠随机分为 sham 组、CLP 组、铁死亡抑制剂(Fer-1)组、AG20 + Fer-1 组;HE 染色和透射电镜观察肠道病理变化;试剂盒测定氧化应激 MDA、GSH 水平和 Fe^{3+} 含量;Western blot 检测溶质载体家族 7 成员 11(SLC7A11)、谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)、铁重链蛋白 1(FTH-1)蛋白水平。**结果** 与 sham 组相比,

CLP 组小肠形态损伤严重,炎症水平、I-FABP 及 D-乳酸水平明显增高(均 $P < 0.05$),AG 组逆转上述变化,且呈浓度依赖性($P < 0.05$);与 CLP 组相比,AG20 组及 Fer-1 组小肠病理损伤得到改善,MDA 水平、 Fe^{3+} 含量降低,GSH 含量升高,SLC7A11、GPX4、FTH-1 蛋白表达升高(均 $P < 0.05$),AG20 + Fer-1 组病理损伤及氧化应激减轻,SLC7A11、GPX4、FTH-1 蛋白表达升高更明显(均 $P < 0.05$)。**结论** AG 减轻脓毒症肠损伤的机制可能与铁死亡中的 SLC7A11/GPX4 轴激活有关。

关键词 脓毒症;肠损伤;穿心莲内酯;铁死亡;SLC7A11/GPX4 通路;肠脂肪酸结合蛋白

中图分类号 R 965

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)12-2094-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.12.016

2023-09-30 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81860336)

作者单位:¹石河子大学医学院,石河子 832000

²伊犁州友谊医院重症医学一科,伊犁哈萨克自治州
835000

³石河子大学第一附属医院重症医学二科,石河子
832000

作者简介:黄 铭,女,硕士研究生;

程青虹,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:xunfeicheng@163.com

脓毒症是机体对感染反应失调导致的危及生命的器官功能障碍^[1]。在脓毒症发展过程中,肠道是容易受损的器官之一。铁死亡是一种铁依赖性、脂质过氧化物累积诱发的细胞死亡方式,经研究证明可通过抑制铁死亡保护脓毒症心脏功能^[2],然而铁死亡对于脓毒症肠损伤的作用少有研究。穿心莲内酯(andrographolide,AG)化学式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_5$,具有抗

morphology of liver tissue. The liver was weighed and the liver index was obtained by dividing weight by body weight. The levels of glutamate aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH), which are indicators of liver injury, were detected by microplate method. **Results** Compared with control group, the protein and mRNA expression of SIRT1, Nrf2 decreased significantly in ADLI group. Liver tissue structure was disturbed, hepatocytes were obviously swollen, and their boundary was unclear. The weight of mice decreased, but liver index increased. The mRNA and protein expression level of anti-apoptotic factor Bcl-2 decreased, while that of Bax and caspase-3 was raised. The level of ALT, AST and LDH were also elevated. The differences above were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with ADLI group, the protein and mRNA expression of SIRT1, Nrf2 were higher after NADH intervention. Liver tissue structure became clear, and hepatocytes were polygonal. The protein and mRNA expression of anti-apoptosis factor Bcl-2 was elevated and while that of Bax and caspase-3 was lower. The weight of mice increased and liver index decreased. The expression of ALT, AST and LDH decreased. The differences above were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** NADH may alleviate anti-tuberculosis drug-induced liver injury and apoptosis in mice by regulating SIRT1/Nrf2 pathway.

Key words antituberculosis drug-induced liver injury; apoptosis; inflammation; nicotinamide adenine dinucleotide; silence information regulator 1; nuclear factor erythroid 2-related factor 2