

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000362

黄芪多糖对 CLP 诱导的脓毒症小鼠急性肝损伤 MDA、caspase-3 和 ICAM-1 的影响研究

罗 成¹, 沈 娜²

(重庆医科大学附属第一医院 1. 老年病科; 2. 急诊医学科和重症医学科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨黄芪多糖(astragalus polysaccharide, APS)对脓毒症诱导的小鼠急性肝损伤丙二醛(methane dicarboxylic aldehyde, MDA)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(caspase-3)和细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)的影响。**方法:**将小鼠随机分为假手术组(SHAM 组, $n=25$)、脓毒症组(SEP 组, $n=25$)、APS 处理组(APS 组, $n=25$)、生理盐水处理组(NS 组, $n=25$), 采用盲肠结扎穿刺术(cecal ligation puncture, CLP)造模, APS 组经腹腔注射 APS 50 mg/(kg·d), NS 组经腹腔注射等量生理盐水, SHAM 组和 SEP 组不做特殊处理。染色观察肝脏组织病理变化; 检测①血浆中 MDA、caspase-3 和 ICAM-1 变化; ②肝组织匀浆 MDA 和 caspase-3 变化; ③肝脏组织中 caspase-3 蛋白的表达。**结果:**SEP 组 12 h 开始表现肝细胞水肿进行性加重, 48 h 达到高峰。APS 干预后, 肝细胞损害严重程度较 SEP 组明显改善。通过 APS 处理后, 24、48 h APS 组血浆中 MDA [(29.69 ± 4.62) mol/ml, $P=0.041$; (23.95 ± 4.10) mol/ml, $P=0.003$], caspase-3 [(33.12 ± 9.01) μ mol/L, $P=0.000$; (31.25 ± 8.68) μ mol/L, $P=0.000$]和 ICAM-1 [(439.49 ± 71.66) μ g/L, $P=0.009$; (321.87 ± 68.64) μ g/L, $P=0.000$]浓度降低, 肝组织匀浆 MDA 与 caspase-3 浓度亦在相应时相点开始降低。24、48 h APS 组 caspase-3 蛋白[(19.93 ± 4.53) μ mol/L, $P=0.005$; (16.91 ± 4.76) μ mol/L, $P=0.000$]表达较 SEP 组明显降低。**结论:**APS 可有效减轻急性肝损伤, 其作用可能与降低 MDA、ICAM-1 以及抑制 caspase-3 表达有关。

【关键词】黄芪多糖; 脓毒症; 急性肝损伤; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3

【中图分类号】R515.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-01-10

作者介绍: 罗 成, Email: arachnoid@sina.com,

研究方向: 糖尿病、多器官功能衰竭。

通信作者: 沈 娜, Email: dazhunnana@sohu.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000362.html>

FcgammaR III B, and systemic lupus erythematosus[J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1183: 69-88.

[4] Yajima K, Nakamura A, Sugahara A, et al. FcgammaR II B deficiency with Fas mutation is sufficient for the development of systemic autoimmune disease[J]. Eur J Immunol, 2003, 33(4): 1020-1029.

[5] Horton HM, Chu SY, Ortiz EC, et al. Antibody-mediated coengagement of FcγR II b and B cell receptor complex suppresses humoral immunity in systemic lupus erythematosus[J]. J Immunol, 2011, 186(7): 4223-4233.

[6] Willcocks LC, Smith KG, Clatworthy MR. Low-affinity Fcgamma receptors, autoimmunity and infection[J]. Expert Rev Mol Med, 2009, 13(11): e24.

[7] Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc gamma receptors: old friends and new family members[J]. Immunity, 2006, 24(1): 19-28.

[8] Sohn HW, Pierce SK, Tzeng SJ. Live cell imaging reveals that the inhibitory FcγR II B destabilizes B cell receptor membrane-lipid interactions and blocks immune synapse formation[J]. J Immunol, 2008, 180

(2): 793-799.

[9] Mackay M, Stanevsky A, Wang T, et al. Selective dysregulation of the Fcgamma II B receptor on memory B cells in SLE[J]. J Exp Med, 2006, 203(9): 2157-2164.

[10] Tackenberg B, Jelcic I, Baerenwaldt A, et al. Impaired inhibitory Fcgamma receptor II B expression on B cells in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(12): 4788-4792.

[11] Espéli M, Clatworthy MR, Bökers S, et al. Analysis of a wild mouse promoter variant reveals a novel role for FcγR II b in the control of the germinal center and autoimmunity[J]. J Exp Med, 2012, 209(12): 2307-2319.

[12] Rahman ZS, Alabyev B, Manser T. FcγR II B regulates autoreactive primary antibody forming cell, but not germinal center B cell, activity[J]. J Immunol, 2007, 178(2): 897-907.

(责任编辑: 冉明会)

Effects of astragalus polysaccharides on MDA, caspase-3 and ICAM-1 in mice with sepsis-induced acute hepatic injury

Luo Cheng¹, Shen Na²

(1. Department of Geriatrics; 2. Department of Emergency and Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of astragalus polysaccharides on methane dicarboxylic aldehyde (MDA), caspase-3 and intercellular adhesion molecule -1 (ICAM-1) in mice with sepsis-induced acute hepatic injury by cecal ligation puncture (CLP). **Methods:** The mice were randomly divided into sham group (SHAM group, $n=25$), sepsis group (SEP group, $n=25$), APS treatment group (APS group, $n=25$) and saline-treated group (NS group, $n=25$). Mouse model of acute hepatic injury was copied by CLP. The mice in APS group were injected with APS at a dosage of 50 mg/(kg·d); no special treatment was made in SEP group and SHAM group; the mice in NS group was injected with equal volume of normal saline. Pathological changes in liver tissues were observed by staining. MDA, caspase-3 and ICAM-1 changes in plasma and liver homogenates, and the expression of caspase-3 in liver tissues were detected. **Results:** In SEP group, hepatocyte swelling began to show progressive increase at 12 h and peaked at 48 h. The severity of liver damage improved significantly in APS than in SEP group. The concentration of MDA ((29.69 ± 4.62) mol/ml, $P=0.041$; (23.95 ± 4.10) mol/ml, $P=0.003$), caspase-3 ((33.12 ± 9.01) μ mol/L, $P=0.000$; (31.25 ± 8.68) μ mol/L, $P=0.000$) and ICAM-1 ((439.49 ± 71.66) μ g/L, $P=0.009$; (321.87 ± 68.64) μ g/L, $P=0.000$) in plasma of APS group decreased at 24 h and 48 h, after treatment by APS. The concentration of MDA and caspase-3 in liver homogenates also began to decrease in the corresponding time points. The expression of caspase-3 ((19.93 ± 4.53) μ mol/L, $P=0.005$; (16.91 ± 4.76) μ mol/L, $P=0.000$) in liver tissue of APS group was significantly lower than that in SEP group at 24 h and 48 h. **Conclusion:** Acute hepatic injury can be reduced by APS; its effect may be associated with the decreased expression of MDA, ICAM-1 and caspase-3.

[Key words] astragalus polysaccharide; sepsis; acute hepatic injury; caspase-3

脓毒症是病原体与宿主免疫系统、炎症反应间相互作用,造成机体多器官功能损害的复杂临床综合征,是一种高致命性疾病,每年导致近百万人死亡^[1],是目前 ICU 患者死亡的主要原因。脓毒症常导致多个器官功能障碍^[2-3],肝脏是其中的一个重要的攻击目标,易发生急性肝损伤,临床治疗困难。黄芪多糖(astragalus polysaccharide, APS)是传统中药黄芪的重要有效成分,具有免疫调控、炎症调节、保护心血管、抗肿瘤以及促进体内免疫复合物的清除等多种生物学功能^[4-5]。本文对 APS 抑制脓毒症小鼠丙二醛(methane dicarboxylic aldehyde, MDA)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(caspase-3)和细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)表达以实现肝脏保护作用进行了探讨,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6~8 周雄性昆明小鼠 100 只,体质量 20~24 g(由重庆医科大学实验动物中心提供)。

1.2 主要试剂

APS(纯度:98%)购自上海士锋生物科技有限公司,MDA 和 ICAM-1 的 ELISA 试剂盒购自中山生物技术有限公司, caspase-3 ELISA 试剂盒购自 Epitomics 公司,小鼠抗人 HBsAg 单克隆抗体和羊抗兔/鼠 IgG 购自中山生物技术有限公司。Trizol[®]购自 Invitrogen 公司,硝酸纤维素膜购自 Pall 公司。

1.3 实验动物准备与模型制备

1.3.1 动物分组 将昆明小鼠随机分为 4 组,分别为假手术组(SHAM 组)、脓毒症组(SEP 组)、APS 处理组(APS 组)、生理盐水处理组(NS 组),每组 25 只。

1.3.2 动物预处理 SEP 组和 APS 组给予 APS 50 mg/(kg·d)腹腔注射,其余 2 组注射 0.9%氯化钠注射液,适应性饲养 1 周。

1.3.3 脓毒症模型制备及分组 适应性饲养 1 周后,SEP 组、APS 组和 NS 组按盲肠结扎穿孔法(cecal ligation puncture, CLP)制备脓毒症模型,SHAM 组仅开腹翻动盲肠。术后禁食 12 h,自由饮水。24 h 造模成功,所有动物按 0、12、24 h 和 48 h 被评价,每个时相点为 5 只。

1.3.4 取材 用 10%水合氯醛 3 ml/kg 腹腔内注射麻醉,麻醉后固定,开腹后先经腹主动脉穿刺抽血,再取肝脏组织,留取形态学标本,剩余组织剪碎后分别加 1 ml Trizol 或制备肝脏组织匀浆放入-70 °C 冰箱保存备用。

1.4 评价指标

1.4.1 肝脏组织形态学观察 取出肝脏标本经固定、石蜡包埋 5 μm 组织切片、HE 染色后,光镜下观察肝脏病理组织学改变。

1.4.2 血清中 MDA、caspase-3 和 ICAM-1 的测定 血液离心后取上清液,按试剂盒的要求检测 MDA、caspase-3 和 ICAM-1 含量。

1.4.3 肝组织匀浆 MDA、caspase-3 的测定 取肝组织,加入冰生理盐水,用匀浆机制成 10% 的肝组织匀浆,离心 (3 000 r/min, 10 min),取上清液,按试剂盒的要求检测 MDA 和 caspase-3 含量。

1.4.4 Western blot 法检测肝脏组织中 caspase-3 蛋白表达 取 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存的肝脏组织 100 mg,加入 1 ml 裂解液,提取总蛋白,并用 BCA 测定蛋白浓度。用 SDS-PAGE 分离含 50 μg 蛋白的抽提物;电泳结束后,将蛋白电转印至硝酸纤维素膜;TBST 洗膜后,用 caspase-3 鼠抗兔单克隆抗体工作液 (稀释比例为 1:1 000) 分别孵膜,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;TBST 洗膜 4 次后,用辣根标记羊抗兔 IgG 工作液 (稀释比例为 1:2 500) 孵膜,37 $^{\circ}\text{C}$ 下 2 h;TBST 洗膜 4 次后压片,观察结果。采用 Quantity One 4.3.1 软件进行图像分析。

1.5 统计学方法

所有数据采用 SPSS 11.5 软件处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用析因方差分析,组间比较用 SNK- q 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 肝脏组织形态学观察

SHAM 组见肝细胞轻度水肿 (见图 1),各时间点未见明显差异;SEP 组和 NS 组 12 h 开始表现肝细胞水肿并进行性加重,24 h 偶见散在肝细胞点状坏死;48 h 达到高峰,肝细胞点状坏死灶增加,并有肝索排列紊乱、肝窦挤压变窄等改变;APS 组肝细胞水肿程度进行性加重,于 48 h 达到高峰,但在 24 h 时肝细胞水肿程度开始轻于同时间点 SEP 组和 NS 组,48 h 时虽然可见散在肝细胞点状坏死灶,但其病变严重程度较 SEP 组明显改善。

2.2 血清中 MDA、caspase-3 和 ICAM-1 变化 (见表 1)

0 h SEP 组和 NS 的血清中 MDA、caspase-3 和 ICAM-1 较 SHAM 组没有明显增高 ($P>0.05$);SEP 组和 NS 组的血清中 MDA、caspase-3 和 ICAM-1 与 SHAM 组比较在 12 h 开始明显升高 ($P<0.05$);24、48 h SEP 组和 NS 组的血清中 MDA、caspase-3 和 ICAM-1 浓度明显高于 SHAM 组 ($P<0.05$);通过 APS 对模型进行处理后,0、12 h SEP 组的血清中 MDA、caspase-3 和 ICAM-1 浓度与 APS 组没有明显差异 ($P>0.05$),24、48 h SEP 组的血清中 MDA、caspase-3 和 ICAM-1 浓度降低明显 ($P<0.05$),但 APS 组 12、24、48 h 肝血清中 MDA 和 ICAM-1 浓度仍高于 SHAM 组 ($P<0.05$),而 caspase-3 浓度仅在 12 h 高于 SHAM 组 ($P<0.05$),存在一定不确定性;而 NS 组的相应时间点 (12、24、48 h) 血浆中 MDA、caspase-3 和 ICAM-1 浓度较 SEP 组没有明显降低 ($P>0.05$)。

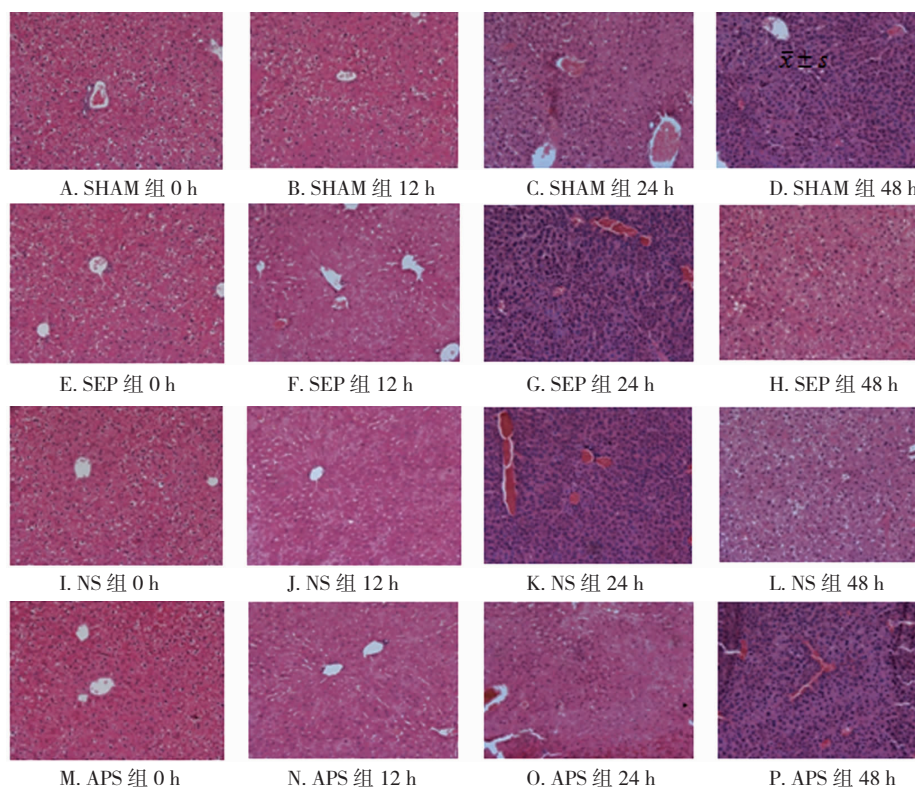


图 1 光学显微镜观察小鼠肝脏组织形态 (HE, 400 $\times$)

Fig.1 Pathological changes in liver tissue under optical microscope (HE, 400 $\times$)

表 1 APS 对脓毒症急性肝损伤小鼠血清 MDA、caspase-3 和 ICAM-1 的影响情况 ($\bar{x} \pm s$)Tab.1 Effects of APS on MDA, caspase-3 and ICAM-1 in mice with sepsis-induced acute hepatic injury ($\bar{x} \pm s$)

组别		MDA(mol/ml)	q/P 值	caspase-3(μ mol/L)	q/P 值	ICAM-1(μ g/L)	q/P 值
SHAM组 (n=25)	0 h	13.26 $\pm$ 2.91	0.425/0.240 ^a 6.887/0.110 ^b	21.72 $\pm$ 5.41	3.644/0.487 ^a 1.691/0.736 ^b	46.99 $\pm$ 3.82	2.833/0.069 ^a 8.245/0.400 ^b
	12 h	14.60 $\pm$ 2.99 ^{ab}	1.754/0.022 ^a 2.095/0.044 ^b	25.27 $\pm$ 9.85 ^{ab}	3.065/0.004 ^a 1.708/0.011 ^b	47.53 $\pm$ 10.84 ^{ab}	13.233/0.000 ^a 8.197/0.000 ^b
	24 h	14.09 $\pm$ 3.33 ^{ab}	3.406/0.000 ^a 0.082/0.000 ^b	26.86 $\pm$ 8.61 ^a	0.179/0.000 ^a 0.470/0.294 ^b	45.05 $\pm$ 4.71 ^{ab}	12.647/0.000 ^a 13.901/0.000 ^b
	48 h	13.77 $\pm$ 2.65 ^{ab}	10.137/0.000 ^a 0.659/0.002 ^b	26.97 $\pm$ 5.22 ^a	1.635/0.000 ^a 1.323/0.372 ^b	44.87 $\pm$ 10.17 ^{ab}	5.865/0.000 ^a 10.741/0.000 ^b
	0 h	15.43 $\pm$ 2.48	2.119/0.809	25.35 $\pm$ 9.72	0.185/0.881	61.00 $\pm$ 14.44	0.954/0.617
SEP组 (n=25)	12 h	21.83 $\pm$ 4.87	0.099/0.919	44.87 $\pm$ 4.98	0.080/0.489	333.86 $\pm$ 90.68	1.204/0.553
	24 h	43.19 $\pm$ 11.50 ^b	2.534/0.041	60.95 $\pm$ 5.99 ^b	2.711/0.000	691.32 $\pm$ 149.30 ^b	2.898/0.009
	48 h	53.49 $\pm$ 14.72 ^b	7.666/0.003	73.11 $\pm$ 8.62 ^b	0.003/0.000	807.10 $\pm$ 67.10 ^b	0.053/0.000
APS组 (n=25)	0 h	15.73 $\pm$ 0.98	2.119/0.809	24.13 $\pm$ 14.50	0.185/0.881	55.21 $\pm$ 20.32	0.954/0.617
	12 h	21.48 $\pm$ 5.71	0.099/0.919	42.28 $\pm$ 6.24	0.080/0.489	303.38 $\pm$ 62.41	1.204/0.553
	24 h	29.69 $\pm$ 4.62 ^a	2.534/0.041	33.12 $\pm$ 9.01 ^a	2.711/0.000	439.49 $\pm$ 71.66 ^a	2.898/0.009
	48 h	23.95 $\pm$ 4.10 ^a	7.666/0.003	31.25 $\pm$ 8.68 ^a	0.003/0.000	321.87 $\pm$ 68.64 ^a	0.053/0.000
NS组 (n=25)	0 h	15.94 $\pm$ 2.96	2.119/0.809	26.67 $\pm$ 9.12	0.553/0.749	58.74 $\pm$ 17.37	0.103/0.775
	12 h	23.78 $\pm$ 8.33	1.599/0.624	47.51 $\pm$ 16.34	1.921/0.552	351.05 $\pm$ 75.55	0.287/0.308
	24 h	40.25 $\pm$ 10.39	5.493/0.071	58.86 $\pm$ 19.39 ^b	1.831/0.027	646.78 $\pm$ 109.46 ^b	0.813/0.008
	48 h	51.00 $\pm$ 7.28 ^b	0.269/0.000	75.72 $\pm$ 7.38 ^b	0.200/0.000	815.29 $\pm$ 56.85 ^b	0.323/0.000

注:a,与 SEP 组比较, $P < 0.05$;b,与 APS 组比较, $P < 0.05$

表 2 APS 对脓毒症急性肝损伤小鼠血清 MDA、caspase-3 和 ICAM-1 的影响组间效应检验

Tab.2 Effects of APS on MDA, caspase-3 and ICAM-1 in mice with sepsis-induced acute hepatic injury between groups

效应	指标	F 值	P 值
分组	MDA	37.890	0.000
	caspase-3	35.251	0.000
	ICAM-1	183.620	0.000
时间点	MDA	40.403	0.000
	caspase-3	26.201	0.000
	ICAM-1	185.892	0.000
分组 $\times$ 时间点	MDA	8.709	0.000
	caspase-3	6.086	0.000
	ICAM-1	33.426	0.000

注:结果表明分组因素、时间点因素对以下指标都有影响,且二者存在交互效应

2.3 肝组织匀浆 MDA 和 caspase-3 变化(见表 3)

0 h SEP 组和 NS 的肝组织匀浆 MDA 与 caspase-3 浓度较 SHAM 组没有明显增高($P > 0.05$);SEP 组、NS 组的肝组织匀浆 MDA、caspase-3 与 SHAM 组比较在 12 h 开始明显升高($P < 0.05$);24, 48 h SEP 组和 NS 组的肝组织匀浆 MDA、caspase-3 浓度明显高于 SHAM 组($P < 0.05$);通过 APS 对模型进行处理后,0、12 h SEP 组的肝组织匀浆 MDA、caspase-3 浓度与 APS 组没有明显差异($P > 0.05$),24 h MDA 浓度差异

无统计学意义($P > 0.05$),48 h SEP 组的肝组织匀浆 MDA 与 caspase-3 浓度降低明显($P < 0.05$),但 APS 组 12、24、48 h 肝组织匀浆 MDA 与 caspase-3 浓度仍高于 SHAM 组($P < 0.05$);而 NS 组的相应时间点(24、48 h)肝组织匀浆 MDA 与 caspase-3 浓度较 SEP 组没有明显降低($P > 0.05$),且高于 APS 组($P < 0.05$)。

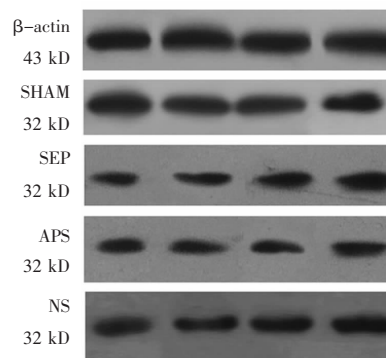


图 2 APS 对脓毒症急性肝损伤小鼠肝脏组织 caspase-3 蛋白表达的影响

Fig.2 Effects of APS on the expression of caspase-3 in liver tissue of mice with sepsis-induced acute hepatic injury

2.4 Western blot 检测肝脏组织 caspase-3 蛋白表达

SEP 组和 NS 组与 SHAM 组比较,12 h caspase-3 蛋白表达开始增高(P 值分别为 0.026/0.015 和 0.021/0.019)。予以

表 3 APS 对脓毒症急性肝损伤小鼠肝组织匀浆 MDA 和 caspase-3 影响情况 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Effects of APS on MDA and caspase-3 in liver tissue homogenate in mice with sepsis-induced acute hepatic injury ($\bar{x} \pm s$)

组别		MDA(mol/ml)	q/P 值	caspase-3(μ mol/L)	q/P 值
SHAM组 (n=25)	0 h	3.87 $\pm$ 1.29	0.297/0.210 ^a 0.344/0.133 ^b	6.24 $\pm$ 2.73	0.686/0.328 ^a 0.291/0.361 ^b
	12 h	3.76 $\pm$ 0.35 ^{ab}	9.384/0.000 ^a 13.427/0.000 ^b	6.67 $\pm$ 1.72 ^{ab}	10.456/0.000 ^a 7.386/0.002 ^b
	24 h	3.71 $\pm$ 0.61 ^{ab}	13.819/0.000 ^a 10.599/0.000 ^b	6.97 $\pm$ 2.76 ^{ab}	7.243/0.000 ^a 0.366/0.001 ^b
	48 h	3.82 $\pm$ 0.44 ^{ab}	4.349/0.001 ^a 23.538/0.000 ^b	7.35 $\pm$ 2.07 ^{ab}	9.898/0.000 ^a 1.343/0.003 ^b
SEP组 (n=25)	0 h	5.15 $\pm$ 1.65	0.813/0.954	7.86 $\pm$ 2.16	0.011/0.979
	12 h	12.30 $\pm$ 3.32	0.753/0.532	29.05 $\pm$ 7.07	0.634/0.752
	24 h	29.20 $\pm$ 9.98	5.407/0.067	36.01 $\pm$ 8.03 ^b	2.975/0.004 5
	48 h	41.02 $\pm$ 17.49 ^b	1.937/0.023	36.44 $\pm$ 5.19 ^b	0.594/0.000
APS组 (n=25)	0 h	5.21 $\pm$ 1.23	0.813/0.954	7.83 $\pm$ 2.43	0.011/0.979
	12 h	11.13 $\pm$ 2.24	0.753/0.532	27.23 $\pm$ 10.30	0.634/0.752
	24 h	19.10 $\pm$ 3.70	5.407/0.067	19.93 $\pm$ 4.53 ^a	2.975/0.004 5
	48 h	18.19 $\pm$ 4.74 ^a	1.937/0.023	16.91 $\pm$ 4.76 ^a	0.594/0.000
NS组 (n=25)	0 h	5.35 $\pm$ 1.21	0.006/0.860	7.23 $\pm$ 1.73	0.191/0.669
	12 h	13.53 $\pm$ 2.10	0.172/0.119	26.73 $\pm$ 6.68	0.959/0.930
	24 h	29.46 $\pm$ 4.10 ^b	0.026/0.003	38.95 $\pm$ 8.38 ^b	1.172/0.002
	48 h	39.15 $\pm$ 7.31 ^b	0.169/0.001	33.88 $\pm$ 5.52 ^b	0.124/0.001

注:a,与 SEP 组比较,P<0.05;b,与 APS 组比较,P<0.05

APS干预后,24、48 h APS 组 caspase-3 蛋白表达较 SEP 组明显降低(P 值分别为 0.031 和 0.017)。

表 4 APS 对脓毒症急性肝损伤小鼠肝组织匀浆 MDA 和 caspase-3 影响组间效应检验

Tab.4 Effects of APS on MDA and caspase-3 in liver tissue homogenate in mice with sepsis-induced acute hepatic injury between groups

效应	指标	F 值	P 值
分组	MDA	44.010	0.000
	caspase-3	62.500	0.000
时间点	MDA	52.340	0.000
	caspase-3	47.524	0.000
分组 $\times$ 时间点	MDA	9.171	0.000
	caspase-3	8.933	0.000

注:结果表明分组因素、时间点因素对以下指标都有影响,且二者存在交互效应

3 讨 论

脓毒症是一种高致命性疾病,它仍然是威胁人类健康首要原因。最近研究发现,从《拯救脓毒症患者运动》推出 2 年来,院内脓毒症死亡率已减少至 30.8%^[6],但这一死亡率仍然非常高。同时,目前很少

有特异性的治疗性药物,可以显著降低脓毒症的死亡率和发病率。脓毒症发生后,由于强烈的全身性炎症反应综合征以及感染、免疫等综合因素,常导致多个器官、系统功能损伤或障碍,其中肝脏的损害是目前临床上容易忽略的。急性肝损伤在脓毒症救治中的重视地位已经得到大幅的提升。

脓毒症时,氧自由基生成增多,会直接造成肝组织损伤。自由基可引发脂质过氧化反应,从而生成 MDA 等大量代谢产物,造成膜完整性受损,进而发生细胞水肿、线粒体肿胀、溶酶体破裂等,并最终导致肝损伤的发生。同时,急性炎症反应和肝细胞凋亡是促成肝脏损伤的重要发病机制。研究表明:在炎症反应中 ICAM 参与中性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞向血管内皮黏附,对白细胞向炎症区移行起重要作用。若 ICAM 异常表达,可能引起内皮细胞的损伤,也能够造成白细胞释放更多细胞因子或炎性介质。在丹酚酸 B 镁盐这一具有强效抗凋亡和潜在的抗炎药理学特性的药物后,血清TNF- α 、CXCL-10 和 ICAM-1 显著减少^[7]。caspase-3 是的细胞凋亡性死亡的一个必要的效应蛋白酶^[8]。研究发现:caspase-3 可通过作用于细胞凋亡和炎症通路对造成肌肉的张

力下降起着重要的作用^[9]。caspase-3A 可能在某些重金属诱导的细胞凋亡中发挥核心作用^[10]。某些中药的主要活性成分(如:藏红花素)可通过抑制 p38 MAPK、p53 和 caspase-3 的活化,减轻氧化应激,对抗癌药物或细胞毒性药物诱发的肝脏损害发挥保护作用^[11]。此外,在组织损伤过程中,巨噬细胞识别并吞噬中性粒细胞和其他细胞,避免炎症反应发生。可见,caspase-3 在其细胞凋亡过程中有重要意义。

黄芪药效成分主要包括 APS、黄酮和皂苷三大类,其中含量最多且免疫活性最强的一类是 APS。目前研究表明:APS 具有免疫调节、抗炎、提高巨噬细胞活性、抗肿瘤、心肌保护及抗氧化等多方面的药理学作用。有研究发现:在糖尿病动物模型中,APS 可通过改善棕榈酸诱导 AMPK 活性以增加胰岛素活性从而改善其生存率,这一作用与 APS 的促炎性效应有关^[12]。APS 亦具化效应,可通过恢复 Akt、m-TOR、P70s6k、rpS6 和 FoxO3A/FoxO1 的磷酸化从而抑制地塞米松诱导的肌肉萎缩^[13]。APS 还能通过清除活性氧自由基,实现抑制小鼠肝脏线粒体转换通透性和提高抗氧化酶活性,从而实现线粒体的保护作用^[14]。而在急性肝损伤的急性期,免疫反应常常被炎症激活^[15]。可见,APS 可能成为一种治疗脓毒症诱发的急性肝损伤的潜在性药物。

本研究发现:SEP 组 12 h 开始表现肝细胞水肿并进行性加重,48 h 达到高峰。APS 干预后,肝细胞损害严重程度较 SEP 组明显改善。SEP 组血浆中 MDA、caspase-3 和 ICAM-1 12 h 开始明显升高,24、48 h 明显高于 SHAM 组;通过 APS 处理后,24、48 h APS 组血浆中 MDA、caspase-3 和 ICAM-1 浓度开始降低,肝组织匀浆 MDA 与 caspase-3 浓度亦在相应时相点开始降低。APS 干预后,24、48 h APS 组 caspase-3 蛋白表达较 SEP 组明显降低。可见,APS 对脓毒症诱发的急性肝损伤有保护作用,其可以通过免疫调节、炎症抑制等环节,有效减轻急性肝损伤,表现为 MDA、ICAM-1 的降低和 caspase-3 表达抑制,这可能是 APS 在治疗脓毒症诱发的肝损伤中的作用关键点,其深入分子生物学机制有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Wheeler DS. Death to sepsis: targeting apoptosis pathways in sepsis[J]. Crit Care, 2009, 13(6): 1010.
- [2] Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis[J]. New Engl J Med, 2003, 348(2): 138-150.
- [3] Azevedo LC. The many facets of sepsis pathophysiology and treatment[J]. Shock, 2013, 39 (S1): 1-2.
- [4] 郭进强,覃 旻,罗炳德. 黄芪多糖对脂多糖诱导人 THP21 单核细胞 MCP-1 与 IL-6 表达的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2012, 4(4): 258-261.
- [5] Li H, Deng CQ, Chen BY, et al. Total saponins of Panax notoginseng modulate the expression of caspases and attenuate apoptosis in rats following focal cerebral ischemia-reperfusion[J]. J Ethnopharmacol, 2009, 121(3): 412-418.
- [6] Levy MM, Dellinger RP, Townsend SR, et al. The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis[J]. Crit Care Med, 2010, 38(2): 367-374.
- [7] Song S, Liu W, Liu F, et al. Magnesium lithospermate B reduces inflammatory response in a mouse model of hepatic ischemia-reperfusion injury[J]. Cell Biochem Biophys, 2014[Epub ahead of print].
- [8] Garcia-Faroldi G, Melo FR, Rönnberg E, et al. Active caspase-3 is stored within secretory compartments of viable mast cells[J]. J Immunol, 2013, 191(3): 1445-1452.
- [9] Zhu S, Nagashima M, Khan MA, et al. Lack of caspase-3 attenuates immobilization-induced muscle atrophy and loss of tension generation along with mitigation of apoptosis and inflammation[J]. Muscle Nerve, 2013, 47(5): 711-721.
- [10] Sun Y, Yang J, Wang LZ, et al. Crocin attenuates cisplatin-induced liver injury in the mice[J]. Hum Exp Toxicol, 2013[Epub ahead of print].
- [11] Gao D, Xu Z, Qiao P, et al. Cadmium induces liver cell apoptosis through Caspase-3A activation in purple red common carp (Cyprinus carpio)[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e83423.
- [12] Lu J, Chen X, Zhang Y, et al. Astragalus polysaccharide induces anti-inflammatory effects dependent on AMPK activity in palmitate-treated RAW264.7 cells[J]. Int J Mol Med, 2013, 31(6): 1463-1467.
- [13] Lu L, Wang DT, Shi Y, et al. Astragalus polysaccharide improves muscle atrophy from dexamethasone- and peroxide-induced injury in vitro[J]. Int J Biol Macromol, 2013(61): 7-16.
- [14] Li XT, Zhang YK, Kuang HX, et al. Mitochondrial protection and anti-aging activity of astragalus polysaccharides and their potential mechanism[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(2): 1747-1761.
- [15] Lu L, Feng M, Gu J, et al. Restoration of intrahepatic regulatory T cells through MMP-9/13-dependent activation of TGF- β is critical for immune homeostasis following acute liver injury[J]. J Mol Cell Biol, 2013, 5(6): 369-379.

(责任编辑:冉明会)