

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003470

Maresin1 通过 Sirt1 抑制 Caspase11/GSDMD 通路减轻小肠缺血再灌注损伤的研究

蔡宏星, 李 潼, 朱 鹏

(重庆医科大学附属第二医院胃肠外科, 重庆 400010)

【摘要】目的:探讨巨噬素 1 (Maresin1, Mar1) 在小肠缺血再灌注 (ischemia-reperfusion, IR) 中的作用及其可能机制。**方法:**通过夹闭肠系膜上动脉 (superior mesenteric artery, SMA) 建立小肠 IR 模型。第一部分①组 12 只小鼠随机分为 Control 组、IR 组和 IR+Mar1 组。第二部分②组 20 只小鼠随机分为 Control 组、IR 组、IR+Mar1 组、IR+EX527 组、IR+Mar1+EX527 组。Mar1 于术前 30 min 采用 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 腹腔注射。EX527 于术前 1 d 10 mg/kg 经腹腔注射。Control 组仅分离 SMA 而不夹闭。其余模型组均用无损伤血管夹夹闭 SMA 根部, 45 min 后松开血管夹形成小肠 IR 模型。各组小鼠均于再灌注后 4 h 采集静脉血和回肠标本。检测①组小鼠肠组织超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 含量; 检测血清 4 kD 荧光素异硫氰酸酯-葡聚糖 (FITC-Dextran 4000, FD-4) 含量; 免疫荧光染色检测肠 Occludin 蛋白表达, HE 染色观察肠组织病理形态。Western blot 检测①、②组肠组织 Sirt1、P-NF- κB p65 (P-p65)、Caspase11、GSDMD-N 蛋白表达。**结果:**①组中与 Control 组相比, IR 组肠组织 MDA 水平, 血清 FD-4 含量, 病理学损伤程度均升高 ($P<0.01$); SOD、GSH 水平, Sirt1 蛋白表达下降; P-p65、Caspase11、GSDMD-N 蛋白表达增加。与 IR 组比较, IR+Mar1 组肠组织 MDA 水平及血清 FD-4 含量, 病理组织学损伤程度均下降 ($P<0.05$); SOD、GSH 水平, Sirt1 蛋白表达增加; P-p65、Caspase-11、GSDMD-N 蛋白表达减少。②组中与 IR+Mar1 组比较, IR+Mar1+EX527 组 Sirt1 蛋白表达下降; P-p65、Caspase11、GSDMD-N 蛋白表达增加。而 IR+EX527 组与 IR+Mar1+EX527 组蛋白表达差异无统计学意义。**结论:**Mar1 预处理通过 Sirt1 抑制 Caspase11/GSDMD 通路减少肠组织缺血再灌注损伤。

【关键词】巨噬素 1; 缺血再灌注损伤; 小肠; 焦亡**【中图分类号】**R656.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2023-12-26

Maresin1 alleviates small intestinal ischemia-reperfusion injury by inhibiting the Caspase11/GSDMD pathway via Sirt1

Cai Hongxing, Li Tong, Zhu Peng

(Department of Gastrointestinal Surgery, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the role and possible mechanisms of Maresin1 (Mar1) in intestinal ischemia-reperfusion (IR) in mice. **Methods:** Clamping of the superior mesenteric artery (SMA) was performed to establish a model of small intestinal IR. In the first part of the experiment, 12 mice were randomly divided into Control group, IR group, and IR+Mar1 group, and in the second part, 20 mice were randomly divided into Control group, IR group, IR+Mar1 group, IR+EX527 group, and IR+Mar1+EX527 group. Mar1 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ was injected intraperitoneally at 30 min before surgery, and EX527 10 mg/kg was injected intraperitoneally at 1 day before surgery. In the control group, the SMA was isolated without clamping, and in the other model groups, the root of the SMA was clamped with a damage-free vascular clip, which was released after 45 min to establish a model of small intestinal IR. Venous blood and ileal specimens were collected at 4 hours after reperfusion in all groups. For the first part of the experiment, the levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and glutathione (GSH) in the intestinal tissue of each group were measured, as well as the serum level of FITC-Dextran 4000 (FD-4); immunofluorescent staining was used to measure the protein expression level of intestinal Occludin; HE staining was used to observe the pathological morphology of intestinal tissue. For the first and second parts of the experiment, western blot was used to measure the protein expression levels of Sirt1, P-NF- κB p65 (P-p65), Caspase11, and GSDMD-N in intestinal tissue. **Results:** In the first part of the experiment, compared with the Control group, the IR group had significant increases in the level of MDA in intestinal tissue, the content of FD-4 in serum, and the degree of pathological damage ($P<0.01$), significant reductions in the protein expression levels of SOD, GSH, and Sirt1, and signifi-

作者介绍: 蔡宏星, Email: caihongxing100@qq.com,

研究方向: 胃肠外科方向的研究。

通信作者: 朱 鹏, Email: zupeng@cqmu.edu.cn。

基金项目: 重庆市自然科学基金面上资助项目 (编号: cstc2021jcyj-msxmX0266)。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240418.1459.020>

(2024-04-22)

cant increases in the protein expression levels of P-p65, Caspase11, and GSDMD-N; compared with the IR group, the IR+Mar1 group had significant reductions in the level of MDA in intestinal tissue, the content of FD-4 in serum, and the degree of pathological damage ($P<0.05$), significant increases in the protein expression levels of SOD, GSH, and Sirt1, and significant reductions in the protein expression levels of P-p65, Caspase11, and GSDMD-N. In the second part of the experiment, compared with the IR+Mar1 group, the IR+Mar1+EX527 group had a significant reduction in the protein expression level of Sirt1 and significant increases in the protein expression levels of P-p65, Caspase11, and GSDMD-N, while there was no significant difference in the expression of proteins between the IR+EX527 group and the IR+Mar1+EX527 group. **Conclusion**: Mar1 pretreatment can alleviate small intestinal IR injury by inhibiting the Caspase11/GSDMD pathway via Sirt1.

[Key words] Maresin1; ischemia-reperfusion injury; small intestine; pyroptosis

小肠缺血再灌注 (ischemia-reperfusion, IR) 是一类危及生命的外科急症, 常见于肠系膜栓塞、失血性休克、肠移植、绞窄性肠梗阻等疾病^[1]。肠道是机体耐受缺血再灌注较低的器官之一, 可迅速进展为肠坏死。据报道, 肠缺血损伤如不能得到积极的治疗, 患者存活率通常不超过 50%^[1-2]。提高患者对肠缺血炎症的耐受具有积极意义。在组织缺血再灌注期间, 多种细胞死亡方式共同调节病理进程^[3], 细胞焦亡途径的调节被认为是治疗干预缺血性损伤的一个新靶点^[4]。

细胞焦亡是一类由半胱天冬酶 (Caspase) 介导的, 由 Gasdermin 蛋白家族执行的一类程序性细胞炎性死亡^[5]。通过调节焦亡通路减少炎症损伤是目前研究的一个热点。去乙酰化酶 1 (silent information regulator of transcription 1, Sirt1) 是一种 III 类组蛋白去乙酰化酶, 属于 NAD⁺ 依赖的组蛋白去乙酰化酶家族, 在线粒体生物发生、癌症、代谢、基因沉默等方面发挥着重要作用^[6-7]。Sirt1 激活能够调节肠上皮内环境稳态及控制炎症状态^[6,8], 但在肠缺血性疾病中对焦亡通路的调节尚不清楚。

Maresin1 (Mar1) 是一类具有共轭三烯双键的 14s-二羟基分子, 在炎症消退过程中由二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA) 通过脂氧合酶氧化途径合成^[9]。Mar1 被证明具有强大的促炎症消退作用^[10]。目前研究表明, Mar1 在脓毒症、肺炎、肝炎、结肠炎等多种疾病中有积极的治疗作用^[11]。但在肠缺血性疾病中尚未报道, 本研究旨在通过建立小肠 IR 模型, 探讨 Mar1 是否通过 Sirt1 缓解 Caspase11/GSDMD 通路诱导的焦亡损伤改善小肠缺血再灌注。

1 材料与方法

1.1 动物

选取 6~8 周无病原体雄性 C57BL/6 小鼠 32 只 (体质量 19~23 g), 购自重庆医科大学实验动物中心。动物使用许可证号: CQLA-2021-0433, 所有小鼠均在 IVC 环境饲养, 自由

饮水, 普通饮食, 温度湿度适宜。动物实验均遵循实验相关规定进行, 动物实验经过重庆医科大学附属第二医院伦理委员会批准 (伦理审查编号: 2023 年研伦审第 14 号)。

1.2 试剂

Maresin1 (Cayman, No. 10878)、超氧化物歧化酶检测试剂盒 (superoxide dismutase, SOD, Solarbio #BC0175)、丙二醛检测试剂盒 (malondialdehyde, MDA, Solarbio #BC0025)、谷胱甘肽检测试剂盒 (glutathione, GSH, Solarbio #BC1175)、Anti-Sirt1 (万类 #WL02995)、Anti-Caspase11 (CST #14340)、Anti-Phospho-NF- κ B p65 (CST #3033s, 磷酸化位点 Ser536)、Anti-GSDMD-N (affinity #DF13758)、Anti-Occludin (Abcam #ab216327)、Anti-Claudin1 (Abcam #ab180158)、Anti- β -Actin (Servicebio #GB15001)、羊抗兔二抗 (Boster #BA1056)、FITC 标记山羊抗兔二抗 (Servicebio #GB22303)。

1.3 方法

1.3.1 动物建模及分组 参照文献^[12]方法建立模型, 所有小鼠术前禁食 12 h, 自由饮水, 备皮后经腹腔注射异戊巴比妥 50 mg/kg (购自 sigma 公司) 麻醉, 沿腹中线开口 1~2 cm 逐层分离入腹, 钝性分离肠系膜上动脉 (superior mesenteric artery, SMA), 用微动脉夹夹闭 SMA 造成小鼠肠缺血, 观察到小肠挛缩苍白即缺血成功, 缺血 45 min 后开放血管再灌注, 关闭腹腔后置于暖垫复温, 再灌注 4 h 后处死小鼠。分组如下: 第一部分①组小鼠随机分为 3 组 ($n=4$), Control 组、IR 组和 IR+Mar1 组; 第二部分②组小鼠随机分为 5 组 ($n=4$), Control 组、IR、IR+Mar1 组、IR+EX527 组、IR+EX527+Mar1 组。假手术组仅分离 SMA, 不做夹闭处理; 模型组操作同假手术组并夹闭 SMA; Mar1 组于术前 0.5 h 5 μ g/kg 腹腔注射给药并做夹闭 SMA 处理。Sirt1 抑制剂 (EX527, Targetmol, T6111) 于术前 1 d 10 mg/kg 经腹腔注射^[6]。

1.3.2 病理组织学 取回盲部 5 cm 内小肠组织用 4% 多聚甲醛固定 24 h, 石蜡包埋, 切片后行苏木精-伊红 (Hematoxylin-Eosin, HE) 染色。组织病理评分采用 Chiu's 评分^[13]。即 0 分: 正常绒毛和腺体; 1 分: 绒毛中轴出现肠黏膜上皮间隙 (Gruenhagen's 腔), 伴随毛细血管充血; 2 分: 固有层肠黏膜上皮抬高, 肠上皮间隙明显扩张; 3 分: 肠黏膜上皮抬高, 绒毛向两侧倒状, 部分绒毛顶端脱落; 4 分: 大量绒毛及固有层脱落, 毛细血管扩张裸露; 5 分: 固有层蜕变或被消化, 出血或溃疡形成。

1.3.3 SOD、MDA、GSH 试剂盒检测

1.3.3.1 SOD 检测 取相同部位回肠组织, 1:10 加入提取液后冰浴匀浆, 8 000 r/min 4 °C 离心 10 min, 取上清。96 孔板中依次加入相关检测试剂后, 37 °C 温育 30 min, 560 nm 检测光密度(optical density, OD)值。根据试剂盒说明书计算 SOD 活性。

1.3.3.2 MDA 检测 取相同部位回肠组织, 1:10 加入提取液后冰浴匀浆, 8 000 r/min 4 °C 离心 10 min, 取上清。加入相关检测试剂后, 置于 100 °C 干式恒温锅 60 min, 冷却后 10 000 r/min 常温离心 10 min, 取上清。测定各样本 532 nm 和 600 nm OD 值。根据试剂盒说明书计算 MDA 活性。

1.3.3.3 GSH 检测 取相同部位回肠组织, 1:10 加入提取液后冰浴匀浆, 8 000 r/min 4 °C 离心 10 min, 取上清。96 孔板中加入相关试剂后常温静置 2 min, 412 nm 检测 OD 值, 绘制标曲, 根据试剂盒说明书计算 GSH 活性。

1.3.4 肠道渗透率测定 用 4 kd 荧光素异硫氰酸酯-葡聚糖(4 kd FITC-Dextran, FD-4, Sigma-Aldrich, USA)测定 IR 后肠道屏障通透性的变化。参照报道^[14], 小鼠行 IR 处理, 缺血开始时, 按照 0.25 mg/g 立即予以 FD-4 溶液灌胃, 夹闭回盲部连接处小肠, 再灌注 4 h 后收集血液, 4 °C 4 000 r/min 离心收集上清, 置于多功能酶标仪, 480/520 nm 检测荧光强度, 绘制标曲, 计算 FD-4 含量。

1.3.5 免疫切片荧光 4% 多聚甲醛固定肠组织, 石蜡包埋切片, 行脱蜡、抗原修复、封闭处理。Anti-Occludin 一抗孵育 4 °C 过夜, 次日 PBS 清洗后行二抗常温避光孵育 30 min, 清洗后 DAPI 常温避光孵育 10 min 后滴加荧光淬灭剂封片, 正置荧光显微镜下观察荧光强度。

1.3.6 蛋白质印记法(Western blot) PBS 润洗小肠, 取 20 mg 相同部位肠组织, 加入含蛋白酶抑制剂组织裂解液 200 μ L, 置于匀浆仪中充分裂解, 而后冰上裂解 30 min, 4 °C 13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, BCA 试剂盒检测提取蛋白浓度, 加入 1/4 体积 5X 上样缓冲液, 100 °C 金属浴 5~10 min, 按照 30 μ g/孔蛋白上样电泳, 转移蛋白至 PVDF 膜, 后用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入到稀释一抗液(Anti-Sirt1、Anti-Phospho-NF- κ B p65、Anti-Caspase11、Anti-GSDMD-N、Anti- β -Actin、Anti-Occludin、Anti-Claudin1, 1:1 000 稀释), 在 4 °C 孵育过夜, 次日用 TBST 洗膜后, 用 HRP 标记的羊抗小鼠二抗室温孵育 1 h, ECL 显影液(四正柏)在分子凝胶成像系统成像。Image J 进行半定量分析。

1.4 统计学方法

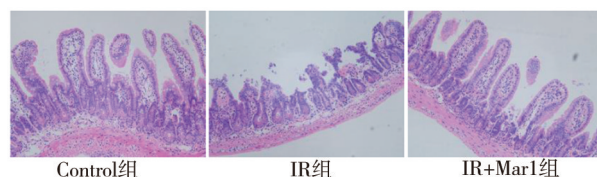
采用 SPSS 25.0 软件进行统计处理。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用单因素方差分析, 2 组组间比较采用 LSD-*t* 检验分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

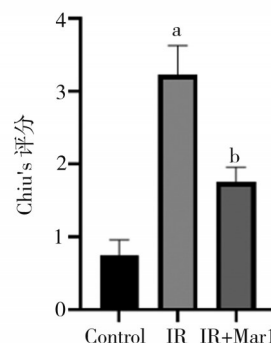
2.1 Mar1 预处理对小肠上皮病理组织损伤的影响

在对小鼠行 Mar1 治疗后, 取小肠组织样本进行病理学检查(图 1A), 并根据小肠 Chiu's 评分分级(图 1B)。图示 Control 组肠绒毛结构完整, 排列整齐, 无腺体损伤, 无 Gruenhagen's 腔出现; 与 Control 组比较, IR 组可见绒毛缩短大量丢失, 炎症细胞聚集, 可见增大的 Gruenhagen's 腔及腺体损伤, 评分

较高($t=10.910, P<0.001$)。在对缺血小鼠进行 Mar1 治疗后, 肠绒毛损伤明显减轻, 绒毛排列大致整齐, 对比 IR 组有明显改善, 总体评分降低($t=6.502, P<0.001$)。



A. HE 染色评估组织病理学损伤(200 \times)



B. 小肠损伤 Chiu's 评分

注: a, 与 Control 组比较 $P<0.01$; b, 与 IR 组比较, $P<0.01$

图 1 Mar1 预处理对小肠上皮组织学变化的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

2.2 Mar1 预处理对小肠通透性的影响

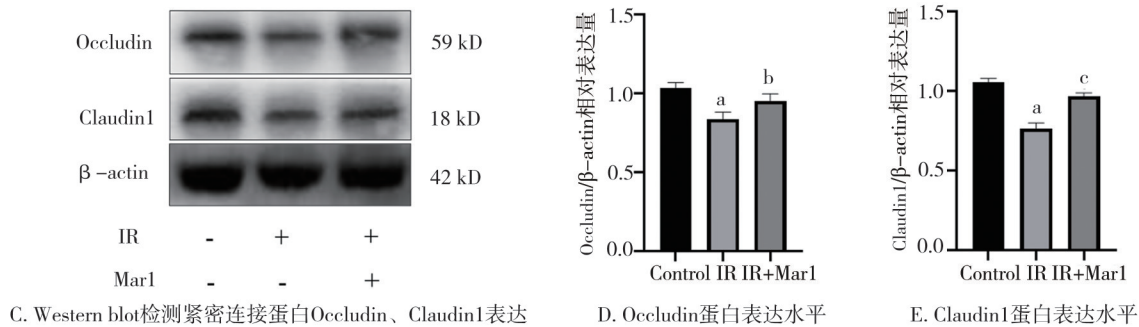
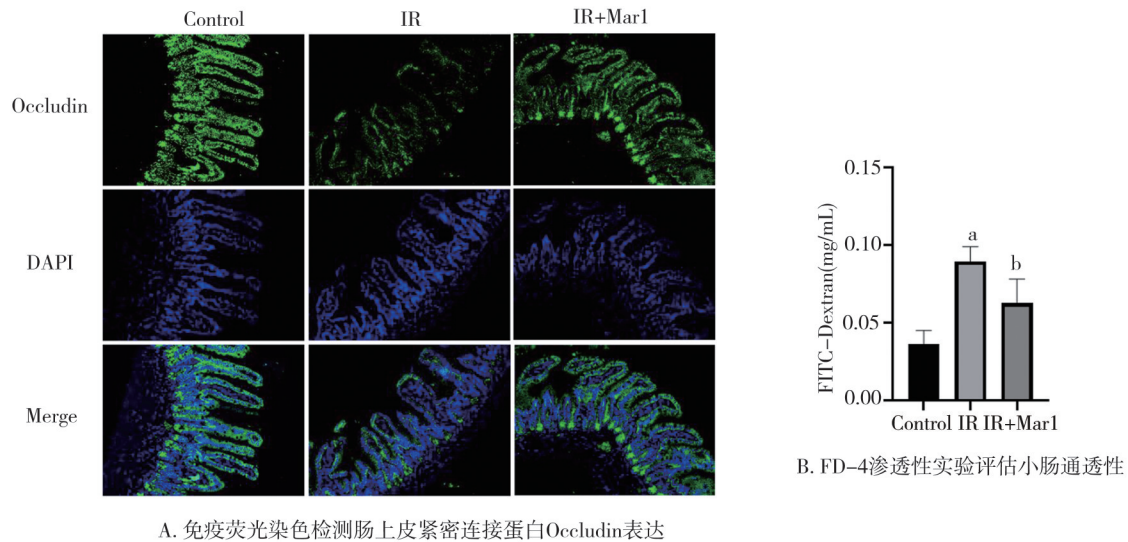
肠道通过上皮细胞间紧密连接形成物理屏障抵御肠内抗原^[15]。测定了各组小鼠紧密连接蛋白含量, 小肠上皮 Occludin 蛋白免疫荧光染色(图 2A), 相比于 Control 组, IR 组肠上皮 Occludin 蛋白大量丢失, IR+Mar1 组较 IR 组丢失减少。Western blot 结果示(图 2C), IR 组相比于 Control 组, Occludin 蛋白(图 2D, $t=6.810, P<0.001$)及 Claudin1 蛋白(图 2E, $t=9.968, P<0.001$)丢失较多, Mar1 预处理可减少 Occludin(图 2D, $t=3.669, P=0.011$)、Claudin1(图 2E, $t=7.354, P=0.002$)蛋白丢失。与免疫荧光染色检测结果一致。通过评估各组小鼠血清 FD-4 含量发现(图 2B), IR 组与 Control 组比较, 小鼠血清 FD-4 含量升高($t=8.066, P<0.001$), IR+Mar1 组较 IR 组降低($t=2.939, P=0.026$)。

2.3 Mar1 预处理对小肠上皮氧化应激的影响

SOD、GSH 是抗氧化应激系统的重要成员, MDA 是组织细胞脂质过氧化代谢的产物。检测结果发现(图 3), Control 组与 IR 组比较, IR 组血清 SOD(图 3A, $t=7.157, P<0.001$)、GSH(图 3B, $t=4.865, P=0.003$)含量下降, MDA 含量上升(图 3C, $t=4.862, P=0.003$); Mar1 预处理后, 相比 IR 组, IR+Mar1 组 SOD(图 3A, $t=11.170, P<0.001$)、GSH(图 3B, $t=2.600, P=0.041$)含量上升, MDA 含量下降(图 3C, $t=2.834, P=0.029$)。

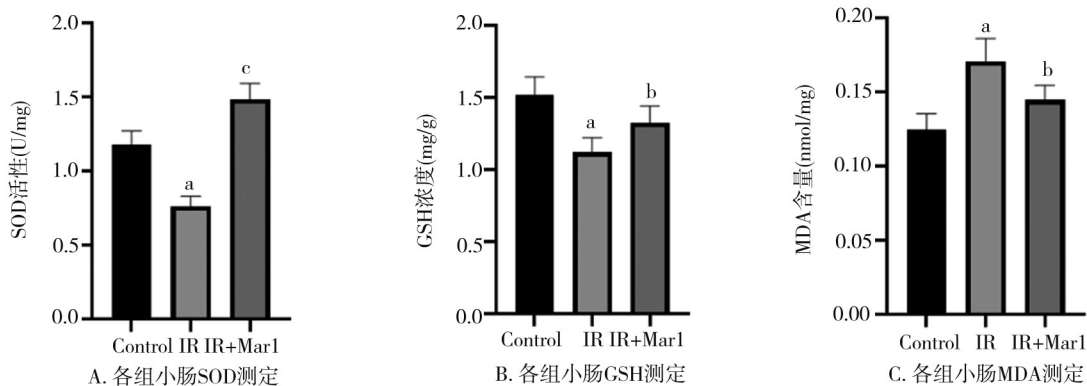
2.4 Mar1 预处理对 Sirt1、P-NF- κ B p65、Caspase11、GSDMD 蛋白表达的影响

对各组小鼠小肠组织行 Western blot 检测发现(图 4A), IR 与 Control 组相比, Sirt1 表达降低(图 4B, $t=11.350, P<0.001$), P-NF- κ B p65(图 4C, $t=19.810, P<0.001$)、Cleaved-Caspase11(图 4E, $t=5.351, P=0.006$)、GSDMD-N(图 4D, $t=$



注:a,与Control组比较, $P<0.01$;b,与IR组比较, $P<0.05$;c,与IR组比较, $P<0.01$

图2 Mar1预处理对小肠上皮紧密连接蛋白及通透性的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)



注:a,与Control组比较, $P<0.01$;b,与IR组比较, $P<0.05$;c,与IR组比较, $P<0.01$

图3 Mar1预处理对小肠上皮氧化应激的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

4.348, $P=0.012$)表达升高。Mar1预处理后,相比于IR组, Sirt1表达上升(图4B, $t=3.576$, $P=0.023$), P-NF- κ B p65(图4C, $t=9.635$, $P<0.001$)、Cleaved-Caspase11(图4E, $t=4.444$, $P=0.011$)、GSDMD-N(图4D, $t=3.476$, $P=0.026$)表达下降。

2.5 Mar1预处理对特异性抑制Sirt1小鼠的影响

EX527是Sirt1特异性抑制剂。通过给药EX527抑制Sirt1受体,分组行IR造模Western blot示(图5A)。与IR+Mar1组比较,IR+Mar1+EX527组Sirt1表达降低(图5B, $t=$

9.686, $P<0.001$), P-NF- κ B p65(图5C, $t=4.512$, $P=0.011$)、Cleaved-Caspase11(图5E, $t=10.050$, $P<0.001$)、GSDMD-N(图5D, $t=4.727$, $P=0.009$)表达均升高。与IR+EX527组比较, IR+Mar1+EX527组Sirt1(图5B, $t=1.550$, $P=0.196$)、P-NF- κ B p65(图5C, $t=1.967$, $P=0.121$)、Cleaved-Caspase11(图5E, $t=0.583$, $P=0.591$)、GSDMD-N(图5D, $t=1.084$, $P=0.339$)表达无统计学意义。以上结果提示Mar1可通过Sirt1抑制caspase11/GSDMD通路减少肠组织焦亡炎症损伤。

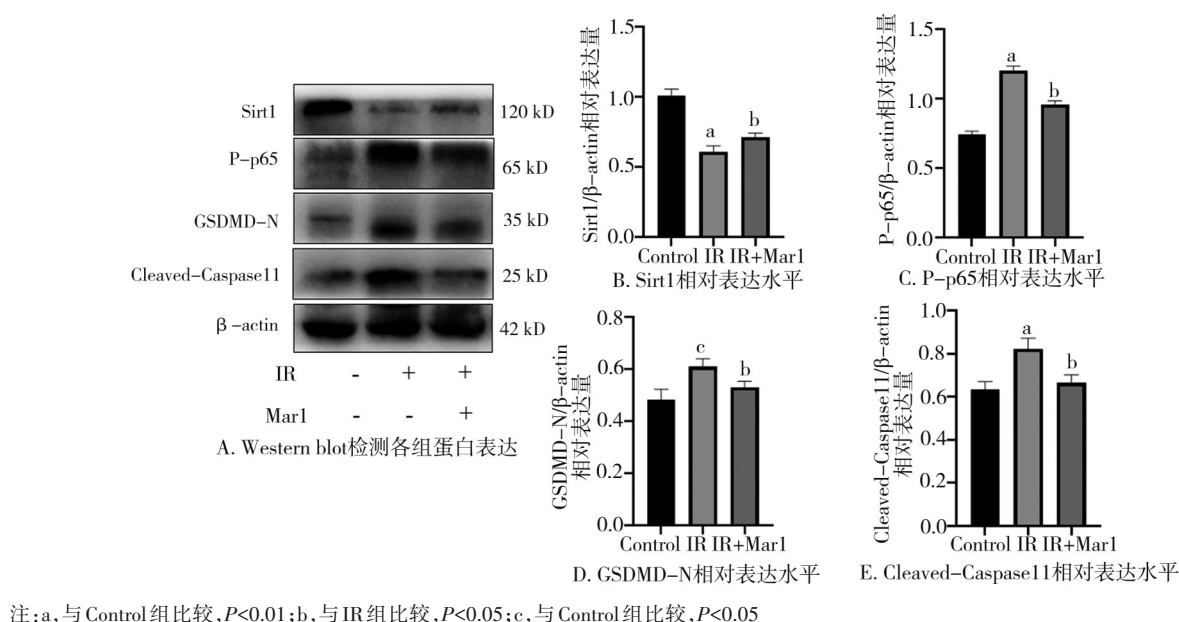


图4 Mar1 预处理对 Sirt1、P-p65、GSDMD-N、Cleaved-Caspase11 蛋白影响

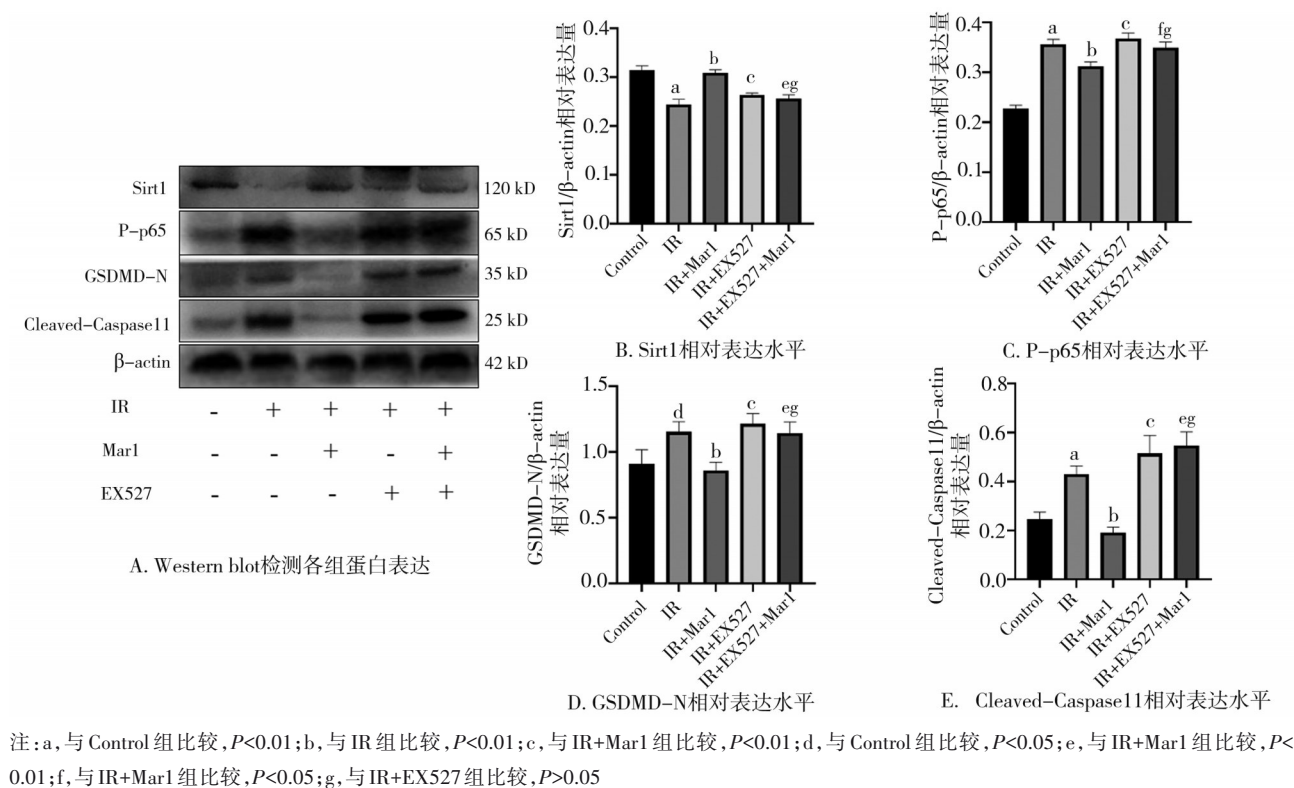


图5 Mar1 及 EX527 预处理对 Sirt1、P-p65、GSDMD-N、Cleaved-Caspase11 蛋白影响

3 讨论

肠 IR 发病机制复杂,线粒体损伤、自由基累积、钙超载、炎症反应等多种因素均可能加重机体损伤^[16]。因其发病诱因较多,且病情进展迅速,患者生存率低,一直是外科急症较为棘手的问题。探寻一

种能够提高患者对炎症耐受,抑制过度炎症的药物具有积极的治疗意义。Mar1 是一种源自 DHA 的促炎症消退介质 (specialized pro-resolving lipid mediator, SPM),文献报道,Mar1 可通过 NF- κ B 通路抑制 NLRP3 介导的神经根细胞死亡^[17],减轻组织损伤;在小鼠脓毒症模型中,Mar1 可通过提高小鼠炎症耐受从而提高整体存活率^[18]。急性炎症反应是机体的

一种自我保护机制,但不受控制的急性炎症反应可能会造成组织严重损伤并导致慢性炎症^[19]。据报道,Mar1 可通过抑制 NF- κ B 显著减少 DSS 诱导结肠炎中炎症因子的表达及中性粒细胞 (polymorphonuclear leukocyte, PMN) 浸润抑制过度炎症^[20],此外,Mar1 也能通过抑制 M1 巨噬细胞浸润和促进 M2 巨噬细胞极化来减少炎症损伤^[21-22]。由于涉及 SPM 作为激动剂阻止 PMN 浸润和巨噬细胞非炎症反应的激活,SPM 控制过度炎症机制并不等同于抗炎反应^[23]。这为控制机体过度炎症提供了一种潜在的治疗方法。在结肠炎模型小鼠中,Mar1 可以改善结肠炎模型小鼠疾病活动指数,减少体质量下降趋势和结肠组织病理损伤^[24]。机制上可能通过负调控 Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4) 抑制 NF- κ B 通路减少中性粒细胞迁移和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生,激活 Nrf 改善肠上皮紧密连接蛋白表达,以及增强巨噬细胞 M2 表型缓解结肠炎损伤^[20,25]。而在肠缺血再灌注疾病方面,尚未见相关 Mar1 疗效的报道。因此,作为一种有效的促炎症消退药物,Mar1 对于小肠缺血再灌注的治疗具有潜在的应用前景。

肠道内环境的稳态依赖于微生物群、肠道上皮细胞和宿主免疫系统之间复杂的相互作用^[26],完整的肠道黏膜上皮层是小肠作为功能屏障,物质交换和营养吸收的基础^[27]。当肠道上皮绒毛遭到破坏时,肠道屏障功能受损可能导致致病菌的菌群位移及其代谢物从肠腔进入血液循环系统,进而诱发全身炎症反应,甚至多器官功能衰竭^[28]。本研究通过建立小鼠小肠 IR 模型,探究了 Mar1 对小肠 IR 的保护作用,结果显示 IR 组小肠上皮绒毛大量脱落,Gruehagen's 腔形成以及肠绒毛上皮的不连续性。此外,通过测定紧密连接蛋白含量以及肠道渗透性实验发现,模型组紧密连接蛋白大量丢失,肠道渗透率提高。提示小肠 IR 后小肠上皮的内环境稳态及肠道黏膜屏障功能遭到严重破坏。而 Mar1 处理组相较于 IR 组,上述现象可得到逆转。表明 Mar1 可能通过保护肠上皮病理形态,减少上皮紧密连接蛋白丢失从而保护肠道黏膜屏障功能。

组织缺血再灌注损伤往往伴随着氧化应激的发生。目前有大量文献聚焦于缺血再灌注损伤抗氧化应激的治疗。在缺血再灌注过程中,过量的 ROS 会触发各种信号通路的激活,诱导细胞死亡,增加炎症反应,损害肠道屏障。线粒体抗氧化剂 MitoQ 可以通过抗氧化通路 Nrf2/ARE 防止氧化应激导致的线粒体 DNA 损伤,保护小肠屏障功能^[29]。Mar1 也被证明可以有效降低血清 MDA 水平,增加血清 SOD 和 GSH 水平缓解脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的心肌损伤^[30]。SOD 和 GSH 是机体

抗氧化体系的重要成员。因此本研究检测了各组小鼠小肠组织中的 SOD、MDA、GSH 含量。IR 组相较于 Control 组,小鼠血清中 SOD、GSH 含量下降,MDA 含量升高。而与 IR 组比较,Mar1 处理组 SOD、GSH 升高,MDA 降低。提示 Mar1 可有效抑制小肠缺血再灌注过程中脂质过氧化反应,提高小肠组织抗氧化应激能力。

焦亡是一种重要的自然免疫反应,可特异性拮抗感染和危险信号,激活先天免疫诱导免疫吞噬^[31],在病菌先天免疫防御和致命性内毒素血症中有着重要的作用^[32]。经典的焦亡途径由抗原刺激模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 介导组装炎症小体,通过活化 Caspase1 裂解焦亡“刽子手”—GSDMD,产生具有细胞膜成孔能力的 GSDMD-N,致使细胞产生焦亡。而非经典途径可直接由 LPS 活化人类 Caspase4/5 或者小鼠 Caspase11 裂解 GSDMD 产生细胞焦亡^[5]。据报道,LPS 诱导的非经典途径 Caspase11 的活化,也会触发炎症小体 NLRP3 和 ASC 依赖的 Caspase-1 的激活^[32],形成“炎症瀑布”。既往实验证实,肠道 IR 的发展与细胞焦亡有着密切的联系^[33]。在肠道屏障受损、肠道菌群移位以及内毒素血症的背景下,减少由 LPS 诱导的组织焦亡显得愈加重要。为了明确 Mar1 是否通过抑制肠道细胞焦亡保护小肠缺血再灌注损伤,本研究检测了 Sirt1、NF- κ B 的表达与焦亡通路相关蛋白 Caspase11、GSDMD 的关系。结果显示,IR 组相较于 Control 组 Sirt1 表达降低,NF- κ B 与焦亡通路相关蛋白表达升高。而 Mar1 处理组 Sirt1 表达上升,NF- κ B 与焦亡通路相关蛋白表达下降。提示 Mar1 可能通过 Sirt1 抑制 Caspase11 活化,进而抑制细胞焦亡,减轻肠组织缺血再灌注损伤。

为了进一步验证推测,本研究使用了 Sirt1 抑制剂 EX527,特异性抑制 Sirt1 表达。结果显示,IR+EX527 组 NF- κ B 与焦亡相关通路蛋白表达增加,Mar1 处理后没有明显降低组织焦亡相关蛋白水平。证明 Mar1 能通过 Sirt1 抑制 NF- κ B/Caspase11/GSDMD 焦亡通路,改善小肠缺血再灌注损伤。NF- κ B 对于各种免疫细胞发育及促炎细胞因子和趋化因子转录均发挥着重要作用^[34]。之前的研究已有报道,Sirt1 激活可以减少炎症因子的表达,减轻肠道氧化应激,以维持肠道内稳态^[8],机制上可能通过抑制 NF- κ B 通路抑制炎症反应^[35]。最近的研究报道,Mar1 可以通过抑制 SIRT1/PGC-1 α /PPAR- γ 通路抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 巨噬细胞炎症反应^[36],与本实验结论一致。

综上所述,Mar1 预处理可以通过 Sirt1 抑制 Caspase11/GSDMD 途径减少肠组织焦亡,保护肠上皮屏障功能,提高肠组织抗氧化能力,从而减少肠组织缺

血再灌注损伤。作为一种有效的治疗手段,Mar1 对肠缺血疾病的潜在作用机制有待进一步探索。

参 考 文 献

- [1] Gonzalez LM, Moeser AJ, Blikslager AT. Animal models of ischemia-reperfusion-induced intestinal injury: progress and promise for translational research[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2015, 308(2):G63-G75.
- [2] Schoenberg MH, Beger HG. Oxygen radicals in intestinal ischemia and reperfusion[J]. *Chem Biol Interact*, 1990, 76(2):141-161.
- [3] Yan WT, Zhao WJ, Hu XM, et al. PANoptosis-like cell death in ischemia/reperfusion injury of retinal neurons[J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(2):357-363.
- [4] Kadono K, Kageyama S, Nakamura K, et al. Myeloid Ikaros-SIRT1 signaling axis regulates hepatic inflammation and pyroptosis in ischemia-stressed mouse and human liver[J]. *J Hepatol*, 2022, 76(4):896-909.
- [5] Yu P, Zhang X, Liu N, et al. Pyroptosis: mechanisms and diseases[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1):128.
- [6] Caruso R, Marafini I, Franzè E, et al. Defective expression of SIRT1 contributes to sustain inflammatory pathways in the gut[J]. *Mucosal Immunol*, 2014, 7(6):1467-1479.
- [7] Gong L, He J, Sun XY, et al. Activation of sirtuin1 protects against ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury[J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2020, 125:110021.
- [8] Hansen LW, Khader A, Yang WL, et al. Sirtuin 1 activator srt1720 protects against organ injury induced by intestinal ischemia-reperfusion[J]. *Shock*, 2016, 45(4):359-366.
- [9] Sasaki K, Urabe D, Arai H, et al. Total synthesis and bioactivities of two proposed structures of maresin[J]. *Chem Asian J*, 2011, 6(2):534-543.
- [10] Im DS. Maresin-1 resolution with ROR α and LGR6[J]. *Prog Lipid Res*, 2020, 78:101034.
- [11] Saito-Sasaki N, Sawada Y, Nakamura M. Maresin-1 and inflammatory disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3):1367.
- [12] Li Y, Feng DC, Wang ZY, et al. Ischemia-induced ACSL4 activation contributes to ferroptosis-mediated tissue injury in intestinal ischemia/reperfusion[J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(11):2284-2299.
- [13] Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, et al. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal[J]. *Arch Surg*, 1970, 101(4):478-483.
- [14] Liu LW, Yao JH, Li ZL, et al. miR-381-3p knockdown improves intestinal epithelial proliferation and barrier function after intestinal ischemia/reperfusion injury by targeting nurr1[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3):411.
- [15] Wang XY, Pan LY, Lu J, et al. N-3 PUFAs attenuate ischemia/reperfusion induced intestinal barrier injury by activating I-FABP-PPAR γ pathway[J]. *Clin Nutr*, 2012, 31(6):951-957.
- [16] Hauet T, Pisani DF. New strategies protecting from ischemia/reperfusion[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(24):15867.
- [17] Wang YH, Li Y, Wang JN, et al. Maresin 1 attenuates radicular pain through the inhibition of NLRP3 inflammasome-induced pyroptosis via NF- κ B signaling[J]. *Front Neurosci*, 2020, 14:831.
- [18] Gu JQ, Luo LC, Wang Q, et al. Maresin 1 attenuates mitochondrial dysfunction through the ALX/cAMP/ROS pathway in the cecal ligation and puncture mouse model and sepsis patients[J]. *Lab Invest*, 2018, 98(6):715-733.
- [19] Broom LJ, Kogut MH. Inflammation: friend or foe for animal production?[J]. *Poult Sci*, 2018, 97(2):510-514.
- [20] Qiu SJ, Li P, Zhao HF, et al. Maresin 1 alleviates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis by regulating NRF2 and TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 78:106018.
- [21] Yang WC, Tao KX, Zhang P, et al. Maresin 1 protects against lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver injury by inhibiting macrophage pyroptosis and inflammatory response[J]. *Biochem Pharmacol*, 2022, 195:114863.
- [22] Lu YY, Lu GT, Gao L, et al. The proresolving lipid mediator Maresin1 alleviates experimental pancreatitis via switching macrophage polarization[J]. *Mediators Inflamm*, 2021, 2021:6680456.
- [23] Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology[J]. *Nature*, 2014, 510(7503):92-101.
- [24] Marcon R, Bento AF, Dutra RC, et al. Maresin 1, a proresolving lipid mediator derived from omega-3 polyunsaturated fatty acids, exerts protective actions in murine models of colitis[J]. *J Immunol*, 2013, 191(8):4288-4298.
- [25] Das UN. Inflammatory bowel disease as a disorder of an imbalance between pro- and anti-inflammatory molecules and deficiency of resolution bioactive lipids[J]. *Lipids Health Dis*, 2016, 15:11.
- [26] Gamez-Belmonte R, Erkert L, Wirtz S, et al. The regulation of intestinal inflammation and cancer development by type 2 immune responses[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(24):9772.
- [27] Odenwald MA, Turner JR. The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target?[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(1):9-21.
- [28] Chen JY, Wang Y, Shi YX, et al. Association of gut microbiota with intestinal ischemia/reperfusion injury[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12:962782.
- [29] Hu QY, Ren JN, Li GW, et al. The mitochondrially targeted antioxidant MitoQ protects the intestinal barrier by ameliorating mitochondrial DNA damage via the Nrf2/ARE signaling pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3):403.
- [30] Li D, Wang ML, Ye J, et al. Maresin 1 alleviates the inflammatory response, reduces oxidative stress and protects against cardiac injury in LPS-induced mice[J]. *Life Sci*, 2021, 277:119467.
- [31] Wei X, Xie F, Zhou XX, et al. Role of pyroptosis in inflammation and cancer[J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(9):971-992.
- [32] Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling[J]. *Nature*, 2015, 526(7575):666-671.
- [33] Jia YF, Cui RX, Wang C, et al. Metformin protects against intestinal ischemia-reperfusion injury and cell pyroptosis via TXNIP-NLRP3-GSDMD pathway[J]. *Redox Biol*, 2020, 32:101534.
- [34] Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B in immunobiology[J]. *Cell Res*, 2011, 21(2):223-244.
- [35] Sun HJ, Xiong SP, Cao X, et al. Polysulfide-mediated sulphydration of SIRT1 prevents diabetic nephropathy by suppressing phosphorylation and acetylation of p65 NF- κ B and STAT3[J]. *Redox Biol*, 2021, 38:101813.
- [36] Wang W, Xu RL, He P, et al. MAR1 suppresses inflammatory response in LPS-induced RAW 264.7 macrophages and human primary peripheral blood mononuclear cells via the SIRT1/PGC-1 α /PPAR- γ pathway[J]. *J Inflamm*, 2021, 18(1):8.

(责任编辑:曾 玲)