

中图分类号: R965; R285 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)08-0050-06
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.08.012



紫檀芪对革兰阴性菌致脓毒症模型大鼠肝损伤的改善作用*

刘建军¹, 曹炜炜¹, 林莫凡¹, 张叶^{1△}, 郭雪梅²

(1. 上海市奉贤区中心医院, 上海 201400; 2. 上海市第四人民医院, 上海 200080)

摘要:目的 探讨紫檀芪对革兰阴性菌致脓毒症模型大鼠肝损伤的改善作用。方法 将40只SD大鼠随机分为对照组(等体积生理盐水)、模型组(等体积生理盐水)、PTE组(25 mg/kg)和PTE+EX 527组(25,5 mg/kg),各10只。各组大鼠均腹腔注射 10^9 CFU大肠杆菌以复制革兰阴性菌致脓毒症大鼠模型,建模前30 min,各组大鼠腹腔注射相应药物或生理盐水。建模后每6 h监测1次,连续观察24 h。苏木精-伊红(HE)染色,观察大鼠肝组织病理形态变化;采用电生化法检测大鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、胆红素(BiL)水平;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测大鼠肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、髓过氧化物酶(MPO)及白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平;RT-PCR法和Western blot法检测大鼠肝组织中SIRT1、p-STAT3 mRNA及蛋白的表达水平。结果 模型组大鼠肝小叶被破坏,肝细胞水肿变性,且有大量炎症细胞浸润;PTE组肝小叶结构趋于完整,仅有少量肝细胞水肿,且炎症细胞浸润较模型组明显减轻;PTE+EX 527组肝组织损伤程度与模型组相似。与模型组比较,PTE组大鼠血清中AST、ALT、BiL水平及肝组织中MPO、IL-6、TNF- α 水平均显著降低,肝组织中SOD、GSH水平及SIRT1、p-STAT3 mRNA和蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$);与PTE组比较,PTE+EX 527组大鼠血清中AST、ALT、BiL水平及肝组织中MPO、IL-6、TNF- α 水平均显著升高,肝组织中SOD、GSH水平及SIRT1、p-STAT3 mRNA和蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$)。结论 紫檀芪可改善革兰阴性菌所致脓毒症模型大鼠肝损伤,抑制肝细胞的炎症反应,其作用机制可能与激活SIRT1/STAT3信号通路有关。

关键词:紫檀芪;革兰阴性菌;脓毒症;肝损伤;SIRT1/STAT3信号通路

Improvement Effect of Pterostilbene on Liver Injury in Sepsis Model Rats Induced by Gram - Negative Bacteria

LIU Jianjun¹, CAO Weiwei¹, LIN Mofan¹, ZHANG Ye¹, GUO Xuemei²

(1. Fengxian Central Hospital, Shanghai, China 201400; 2. Shanghai Fourth People's Hospital, Shanghai, China 200080)

Abstract: Objective To investigate the improvement effect of pterostilbene on liver injury in sepsis model rats induced by gram - negative bacteria. **Methods** A total of 40 SD rats were randomly divided into control group (equal volume of normal saline), model group (equal volume of normal saline), PTE group (25 mg / kg) and PTE + EX 527 group (25,5 mg / kg), with 10 rats in each group. Rats in each group were intraperitoneally injected with 10^9 CFU of *Escherichia coli* to replicate the sepsis rat model of Gram - negative bacteria. 30 minutes before modeling, rats in each group were intraperitoneally injected with corresponding drugs or normal saline. After modeling, the rats were monitored every 6 hours, with continuous observation for 24 hours. Hematoxylin - eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of liver tissue in rats. The levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and bilirubin (BiL) in serum of rats were detected by electrobiochemical method. The levels of superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), myeloperoxidase (MPO), interleukin - 6 (IL - 6) and tumor necrosis factor - α (TNF - α) in liver tissue of rats were detected by enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA and protein expression levels of SIRT1 and p - STAT3 in rat liver tissues were detected by RT - PCR and Western blot. **Results** In the model group, the hepatic lobules of rats were destroyed, the liver cells were edematous and degenerated, and there were a large number of inflammatory cell infiltration. In the PTE group, the structure of hepatic lobules tended to be complete, with only a small amount of hepatocyte edema, and the infiltration of inflammatory cells was significantly reduced compared with the model group. The degree of liver tissue injury in the PTE + EX 527 group was similar to that in the model group. Compared with the model group,

*基金项目:上海市虹口区卫生健康委员会中医药课题立项建设项目[HKQ-ZYY-2020-46]。

第一作者:刘建军,男,大学本科,住院医师,研究方向为重症感染,(电子信箱)1053455568@qq.com。

△通信作者:张叶,男,硕士,主治医师,研究方向为重症感染,(电子信箱)785159837@qq.com。

Inhibitors:Part I[J]. Clin Pharmacokinet,2010,49(3):141-175.
[24] GREGERS J, GREEN H, CHRISTENSEN IJ, et al. Polymorphisms in the *ABCB1* gene and effect on outcome and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. Pharmacogenomics J, 2015, 15(4): 372 - 379.

[25] WU T, KANG H, ZHUANG DX, et al. The role of *ABCB1* polymorphism as a prognostic marker for primary central nervous system lymphoma [J]. Annals of Hematology, 2019, 98(4):923-930.

(收稿日期:2024-07-11;修回日期:2024-12-19)

the levels of AST, ALT, BiL in serum and MPO, IL - 6, TNF - α in liver tissue of PTE group were significantly decreased, and the levels of SOD, GSH, the mRNA and protein expression of SIRT1, p - STAT3 and in liver tissue were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with PTE group, the levels of AST, ALT, BiL in serum and MPO, IL - 6, TNF - α in liver tissue of rats in PTE + EX 527 group were significantly increased, the levels of SOD, GSH, and the mRNA and protein expression of SIRT1, p - STAT3 in liver tissue were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Pterostilbene can improve liver injury in septic rats caused by Gram - negative bacteria and inhibit the inflammatory response of hepatocytes. The mechanism may be related to the activation of SIRT1 / STAT3 signaling pathway.

Key words: Pterostilbene; Gram - negative bacteria; sepsis; liver injury; SIRT1 / STAT3 signaling pathway

脓毒症为感染导致的严重疾病,也是导致重症监护患者死亡的原因之一^[1]。其主要病理学特征是失控的炎性反应,随疾病进展可发展为脓毒性休克,进而导致患者多个器官功能障碍,甚至死亡^[2-3]。脓毒症早期会累及肝脏,目前临床常用控制感染、恢复血流动力学稳定、抗氧化等方法治疗脓毒性肝损伤,但疗效欠佳。研究发现^[4],虽然多种非感染因素(如创伤、缺氧、胰腺炎等)均可诱发脓毒症的发生,但感染仍是目前临床诱导脓毒症发生的主要因素。脓毒症致病菌以革兰阴性细菌常见,该类菌具有1个脂多糖(LPS)结构,是引发脓毒性休克的关键触发因子之一^[5]。紫檀芪(PTE)是抗毒性物质之一,与白藜芦醇化学结构相似,在蓝莓、葡萄和花生等植物中广泛表达^[6]。近期研究发现,PTE具有抗炎、抗氧化、抗衰老、抗病毒等多种生物学活性,且在细胞周期、凋亡和增殖等多种生物学过程中发挥调控作用^[7-8]。但PTE对脓毒症的作用机制尚未见报道。沉默信息调节因子1(SIRT1)为主要由松果体分泌的吡啶胺类激素,有研究发现,SIRT1能减少氧化应激和特定致炎介质的产生,进而减轻脓毒症或药物毒性引起的多器官损伤^[9]。信号转导和转录激活因子3(STAT3)为关键的核转录因子,其可参与包括肝脏糖脂代谢在内的多种细胞过程。但PTE能否通过调控SIRT1 / STAT3信号影响脓毒症尚未明确,因此,本研究中对这一问题进行了探讨。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂、动物与菌株

仪器:3-30KS型低温高速离心机(美国Sigma公司);ChemiDoc™ MP型凝胶成像分析仪(美国Bio-Rad公司);Primo Star型光学显微镜(德国Carl Zeiss AG公司);ME204型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为0.1 mg);AV 480型全自动生化分析仪(日本Beckman Coulter公司);Quant Studio 5型PCR仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)。

试剂:PTE(上海义森生物科技有限公司,含量>99%,批号为B21572);SIRT1抑制剂EX 527(美国Sigma公司,批号为E7035);白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(美国Pierce公司,批号分别为BMS213HS、BMS223HS);

丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、胆红素(BiL)、谷胱甘肽(GSH)、髓过氧化物酶(MPO)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为C009-2-1、C010-2-1、C019-1-1、A006-2-1、A044-1-1);SIRT1抗体、p-STAT3抗体(美国Santa Cruz公司,批号分别为SC-74465、SC-8059);HRP标记的二抗(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号为GMS40034);超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(碧云天技术有限公司,批号为11305);TUNEL检测试剂盒、Trizol裂解液(上海生工生物工程股份有限公司,批号分别为B500058、B511311);苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(索莱宝科技有限公司,批号为G1120)。

动物:SPF级SD大鼠40只,雄性,7周龄,体质量220~250 g,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2017-0022。均饲养于奉贤区中心医院动物房内,在温度22~24℃和相对湿度50%~65%、室内光照12 h/黑暗12 h循环交替、自由饮水摄食条件下适应性喂养1周。本研究经医院动物伦理委员会批准(批准号:院科伦审2022-012-03)。

菌株:大肠杆菌(*Escherichia. coli* O18,美国Sigma-Aldrich公司,批号为SAB4200697)。

1.2 分组与模型复制

将40只SD大鼠随机分为对照组(等体积生理盐水)、模型组(等体积生理盐水)、PTE组(25 mg/kg)和PTE+EX 527组(25,5 mg/kg),各10只。各组大鼠均腹腔注射 10^9 CFU大肠杆菌以复制革兰阴性菌脓毒症大鼠模型,建模前30 min,各组大鼠腹腔注射相应药物或生理盐水^[10]。建模后每6 h监测1次,连续观察24 h。

1.3 观察指标

肝组织病理形态:每组随机处死3只大鼠,取肝组织,固定于4%多聚甲醛溶液中,乙醇梯度脱水,二甲苯中透明,石蜡包埋,切成5 μ m厚片,二甲苯脱蜡,HE染色,脱水,置显微镜下观察。

血清生化指标:大鼠均腹腔注射2%戊巴比妥钠(3 mL/kg)麻醉,取主动脉血3 mL,1 500 r/min离心10 min,收集上层血清,采用全自动生化分析仪检测ALT、AST和BiL水平。

肝组织中各因子水平:采用ELISA法。取大鼠肝组织适量,冰上剪碎,加入组织提取液3 mL,8 000 r/min离心10 min,收集上清液。检测肝组织中SOD、GSH、MPO、IL-6和TNF- α 水平。

肝组织中SIRT1和p-STAT3 mRNA表达:采用RT-PCR法。取大鼠肝组织适量,加入Trizol裂解液裂解,提取总RNA,逆转录为cDNA,后进行qRT-PCR扩增(引物序列见表1)。分别取引物各0.6 μ L,总反应体系为20 μ L。PCR反应条件,95 $^{\circ}$ C预变性5 min,95 $^{\circ}$ C变性15 s,58 $^{\circ}$ C退火25 s,72 $^{\circ}$ C延伸20 s;共45个循环。以 β -actin为内参, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析相对表达水平。

表1 引物序列表

Tab 1. Primer sequence list

基因	引物序列
SIRT1	F:5'-GGAAGATGGTTGGAAGGCAG-3'
	R:5'-AGAAGATGGCCCCAGGATAAG-3'
p-STAT3	F:5'-TCCTTCTCCAGGCACATTCAA-3'
	R:5'-GATCCAGGTTCCACCACTGC-3'
β -actin	F:5'-TAGATGACCATGAGTCGCTTGC-3'
	R:5'-GCCAACTTGCTCCATGTCCGG-3'

肝组织中SIRT1和p-STAT3蛋白表达:采用Western blot法。取大鼠肝组织适量,加入RIPA裂解液裂解,用BCA法测定总蛋白含量,热水煮沸蛋白样品(终质量浓度为2 μ g/mL)10 min,取50 μ g加入上样缓冲液混匀,于沸水中变性。将蛋白样品用SDS-PAGE分离后转移到PVDF膜上,用脱脂牛奶(5%)封闭1 h;用含1 mL吐温的Tris缓冲盐溶液(TBST)洗膜,加入一抗(1:1 000, V/V),4 $^{\circ}$ C下孵育过夜,洗净;加入二抗(1:1 000, V/V),室温下孵育2 h,加入ECL发光液,曝光显影,用Image Lab软件分析条带的灰度值。

1.4 统计学分析

使用Graphpad Prism 8.0软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,不同组间数据分析行单因素方差分析(one-way ANOVA),后以LSD-t检验进行多重比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝组织病理学形态

模型组大鼠肝小叶被破坏,肝细胞水肿变性,且有大量炎性细胞浸润;PTE组肝小叶结构趋于完整,仅有少量肝细胞水肿,且炎性细胞浸润较模型组明显减轻;PTE+EX 527组肝组织损伤程度与模型组相似。详见图1。

2.2 血清生化指标

与对照组比较,模型组大鼠血清中AST、ALT、Bil水平明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,PTE组大鼠血清中上述3个指标水平均明显降低($P < 0.05$);与PTE组比较,PTE+EX 527组大鼠血清中上述3个指标水平

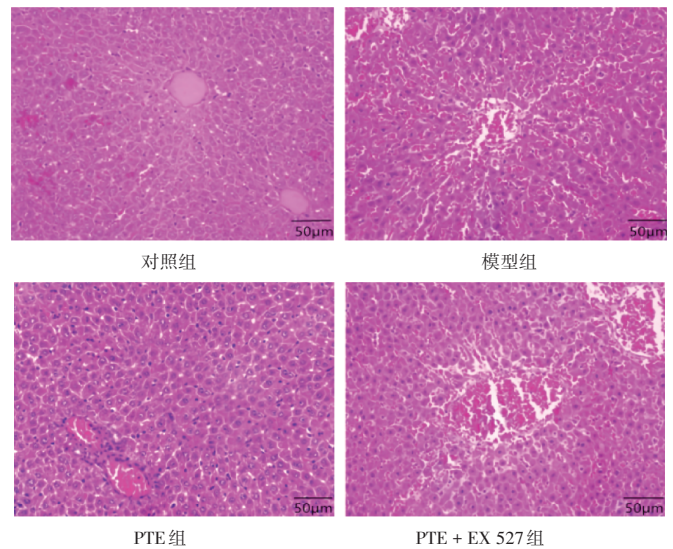
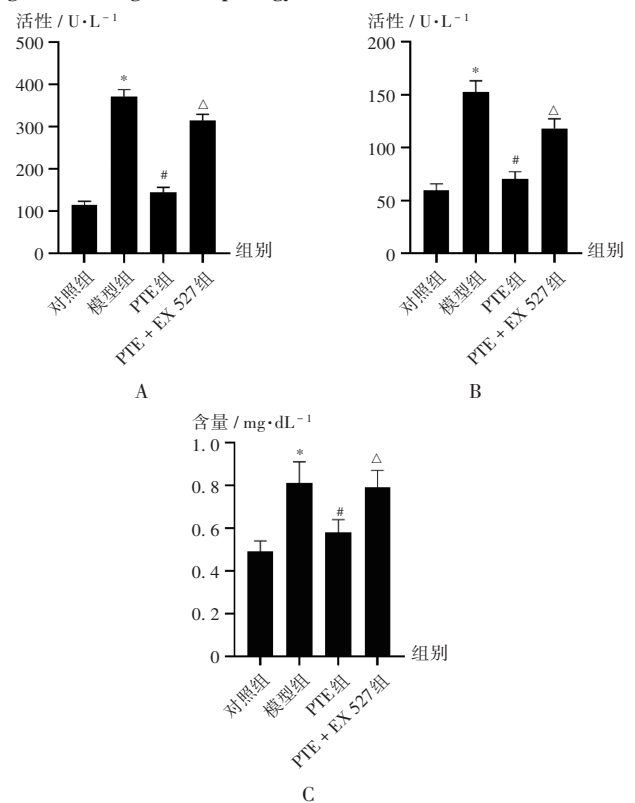


图1 大鼠肝组织病理形态(HE, $\times 200$)

Fig. 1 Pathological morphology of rats' liver tissue (HE, $\times 200$)



A. ALT B. AST C. Bil

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$;与PTE组比较, $\Delta P < 0.05$ 。下图同。

图2 大鼠血清生化指标

A. ALT B. AST C. Bil

Note: Compared with those in the control group, * $P < 0.05$. Compared with those in the model group, # $P < 0.05$. Compared with those in the PTE group, $\Delta P < 0.05$. (for Fig. 2 - 6)

Fig. 2 Serum biochemical indexes of rats

明显升高($P < 0.05$)。详见图2。

2.3 肝组织中GSH及MPO水平

与对照组比较,模型组大鼠肝组织中SOD、GSH、

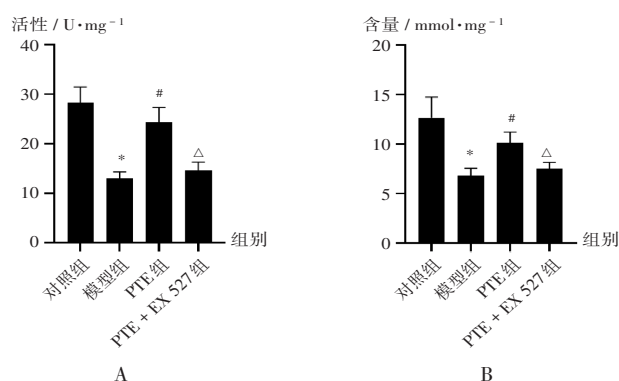


图3 大鼠肝组织中GSH和MPO水平
A. SOD B. GSH C. MPO

Fig. 3 Levels of GSH and MPO in rats' liver tissue
MPO水平明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,PTE组大鼠肝组织中上述3个指标水平明显降低($P < 0.05$);与PTE组比较,PTE + EX 527组大鼠肝组织中上述3个指标水平明显升高($P < 0.05$)。详见图3。

2.4 肝组织中IL-6及TNF-α水平

与对照组比较,模型组大鼠肝组织中IL-6及TNF-α水平明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,PTE组大鼠肝组织中上述2个指标水平明显降低($P < 0.05$);与PTE组比较,PTE + EX 527组大鼠肝组织中上述2个指标水平明显升高($P < 0.05$)。详见图4。

2.5 肝组织中SIRT1及p-STAT3 mRNA表达水平

与对照组比较,模型组大鼠肝组织中SIRT1及p-STAT3 mRNA表达水平明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,PTE组大鼠上述2个指标表达水平明显升高($P < 0.05$);与PTE组比较,PTE + EX527组大鼠上述2个指标表达水平明显降低($P < 0.05$)。详见图5。

2.6 肝组织中SIRT1及p-STAT3蛋白表达水平

与对照组比较,模型组大鼠肝组织中SIRT1、p-STAT3蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,PTE组大鼠上述2个指标表达水平明显升高($P < 0.05$);与PTE组比较,PTE + EX 527组大鼠上述2个指标表达水平明显降低($P < 0.05$)。详见图6。

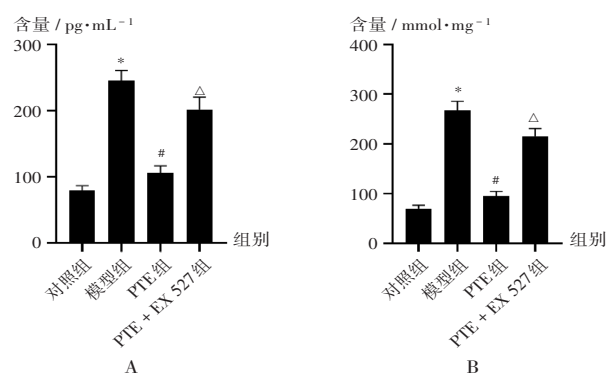


图4 大鼠肝组织中IL-6和TNF-α水平
A. IL-6 B. TNF-α

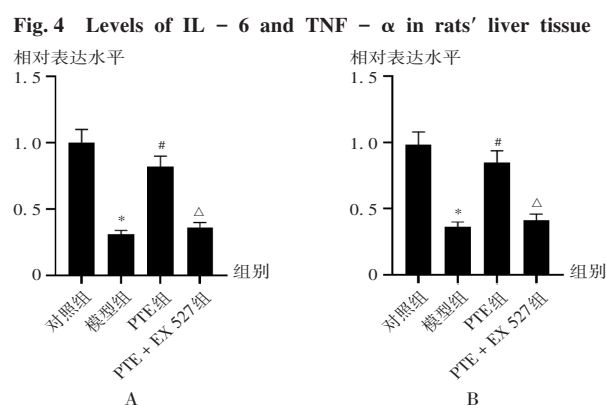
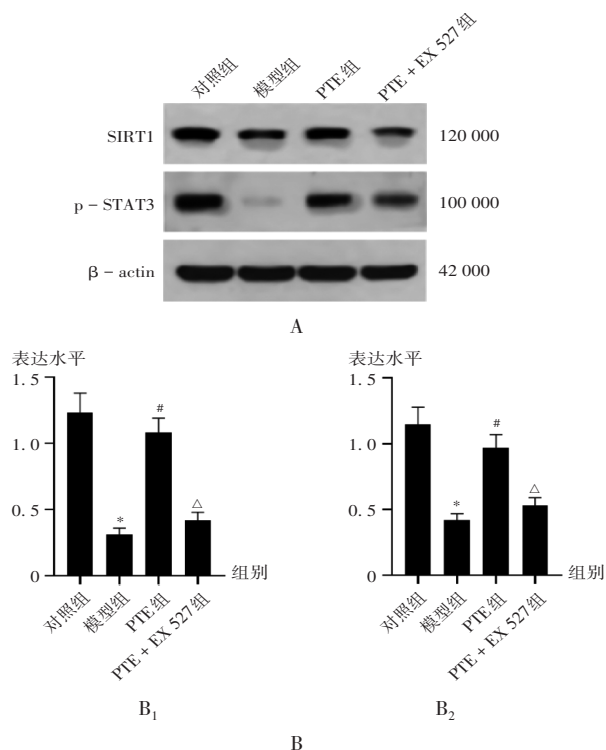


图5 大鼠肝组织中SIRT1和p-STAT3 mRNA表达水平
A. SIRT1 B. p-STAT3

3 讨论

脓毒症通常由严重烧伤、创伤、感染性休克等导致,大量的炎性介质及细胞内毒素是导致其发生的重要因素^[11]。革兰阴性菌是导致脓毒症的主要原因,其中最常见的致病原为大肠埃希菌。目前,临床常采用抗生素治疗脓毒症,但效果欠佳。PTE为天然化合物,有抗癌、抗炎、抗肥胖等多种药理学特性。相关研究发现,PTE可抑制活性氧的形成^[12]。ZHANG等^[13]研究发现,PTE能清除或抑制体内外自由基活性,对大鼠肝脏线粒体中脂质、蛋白质和DNA损伤发挥保护作用。基于此,本研究中采用革兰阴性菌复制脓毒症大鼠模型,探讨PTE对该模型的作用。

肝脏为机体进行物质代谢和解毒的重要器官^[14]。研究指出,抑制肝脏的氧化合成代谢可产生大量氧自由基,通过破坏线粒体膜功能诱导肝细胞大量凋亡,从而导致肝损伤的发生^[15]。AST和ALT主要存在于肝细胞中,当肝细胞受损时会释放到血液中,故两者水平升高可反映脓毒症模型大鼠肝功能状态。BiL由肝脏分解血红蛋白产生,正常情况下其会通过肝脏排出体外,但



A. 蛋白电泳图 B. 数据统计(B₁, SIRT1; B₂, p - STAT3)

图6 大鼠肝组织中SIRT1和p - STAT3蛋白表达水平

A. Protein electrophoresis B. Data statistics (B₁, SIRT1; B₂, p - STAT3)

Fig. 6 Protein expression levels of SIRT1 and p - STAT3 in rats' liver tissue

当肝细胞损伤时其代谢和排泄功能受到影响,从而导致血液中BiL的水平升高^[16]。本研究结果显示,PTE组血清中AST、ALT和BiL水平均明显低于模型组,提示PTE能有效改善脓毒症模型大鼠肝损伤。芦雅丽等^[17]研究证实,PTE可通过上调Nrf2水平,抑制氧化应激反应来改善模型小鼠急性肝损伤程度。

脓毒症发生时,促炎性细胞因子过度释放,导致组织和肝发生严重的损伤。GSH属抗氧化剂,正常情况下其存在于细胞中,起到维持细胞内氧化还原平衡的作用。脓毒症肝损伤发生时,炎症反应和氧化应激会促进氧自由基产生,破坏细胞内氧化还原平衡,GSH水平下降可反映氧化应激的程度,并提示肝损伤程度加重。MPO为嗜中性粒细胞中的蛋白质,在脓毒症大鼠肝功能损伤中,炎症反应会导致细胞浸润肝组织,释放MPO,从而进一步加重炎症反应。本研究结果显示,PTE组大鼠肝组织中IL - 6、TNF - α 和MPO水平均明显低于模型组,GSH水平高于模型组,提示PTE可能改善炎症反应导致的脓毒症模型大鼠肝脏病变和损伤。陈卓等^[18]研究证实,PTE可抑制棕榈酸诱导的巨噬细胞炎症因子的表达。

SIRT1属烟酰胺嘌呤二核苷酸依赖性三类蛋白去乙酰化酶,可介导多种病理生理过程,如细胞生长、存活、炎症等。相关研究表明,SIRT1在脓毒症或药物毒性引起

的肝、肾、肺和脑损伤中具有防护作用。STAT3在脓毒症诱导的肝脏炎症反应中起重要作用^[19],并参与机体多种病理生理过程。XU等^[20]报道,SIRT1在脓毒症条件下介导肝脏中的STAT3磷酸化和去乙酰化反应,这对代谢调节至关重要。可见,SIRT1和STAT3相互作用可能成为治疗脓毒症引起的肝功能障碍的新靶点。本研究结果显示,PTE组大鼠肝组织中SIRT1和p - STAT3 mRNA和蛋白表达水平均明显高于模型组,因此猜测PTE可能通过激活SIRT1 / STAT3信号改善脓毒症模型大鼠肝损伤。

本研究中指标检测结果显示,PTE + EX527组大鼠各指标均较PTE组明显恶化,且各指标水平均接近模型组,提示EX527能减弱PTE对脓毒症模型大鼠肝损伤的改善作用。

综上所述,PTE可能通过激活SIRT1 / STAT3信号通路改善革兰阴性菌所致脓毒症模型大鼠肝损伤,抑制肝细胞炎症反应。由于时间和成本等因素,本研究中未能对SIRT1 / STAT3信号通路的上下游信号进行相关研究,导致结果存在一定局限性,后续研究中会增加相关的实验,为临床治疗脓毒症提供更真实的实验数据。此外,目前虽有较多的PTE动物相关研究,但缺少大规模、多中心的药物临床试验验证其在脓毒症中的有效性和安全性。

参考文献

- [1] CHIU C, LEGRAND M. Epidemiology of sepsis and septic shock[J]. Curr Opin Anaesthesiol, 2021, 34(2): 71 - 76.
- [2] ZHANG YY, NING BT. Signaling pathways and intervention therapies in sepsis[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 407.
- [3] LIANG H, SONG H, ZHANG X, et al. Metformin attenuated sepsis - related liver injury by modulating gut microbiota[J]. Emerg Microbes Infect, 2022, 11(1): 815 - 828.
- [4] GARDUNO A, MARTÍN - LOECHES I. Efficacy and appropriateness of novel antibiotics in response to antimicrobial - resistant gram - negative bacteria in patients with sepsis in the ICU[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2022, 20(4): 513 - 531.
- [5] HOLMES CL, ANDERSON MT, MOBLEY HLT, et al. Pathogenesis of Gram - Negative Bacteremia[J]. Clin Microbiol Rev, 2021, 34(2): e00234 - 20.
- [6] KIM H, SEO KH, YOKOYAMA W. Chemistry of Pterostilbene and Its Metabolic Effects[J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(46): 12836 - 12841.
- [7] XU C, SONG Y, WANG Z, et al. Pterostilbene suppresses oxidative stress and allergic airway inflammation through AMPK / Sirt1 and Nrf2 / HO - 1 pathways[J]. Immun Inflamm Dis, 2021, 9(4): 1406 - 1417.
- [8] YANG H, HUA C, YANG X, et al. Pterostilbene prevents LPS - induced early pulmonary fibrosis by suppressing oxidative stress, inflammation and apoptosis in vivo[J]. Food Funct, 2020, 11(5): 4471 - 4484.
- [9] CHEN J, XIA H, ZHANG L, et al. Protective effects of