

# 基于 PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路探讨骆驼乳清蛋白对不同菌种所致脓毒症小鼠心肌损伤的保护作用

姜波<sup>1</sup> 尤伟艳<sup>2</sup> 薛庆<sup>1</sup> 张琪<sup>1</sup> 赵长甲<sup>1</sup> 任珊<sup>1</sup>

<sup>1</sup>石河子大学第一附属医院重症医学一科,石河子 832000; <sup>2</sup>新疆生产建设兵团危重症疾病临床医学研究中心,石河子 832000

通信作者:任珊,Email:newllyshan@163.com

**【摘要】** **目的** 探讨骆驼乳清蛋白(CWP)对革兰阳性菌或革兰阴性菌所致脓毒症小鼠心肌损伤的保护作用及机制。**方法** 采用随机数字表法将 40 只雄性 C57BL/6 小鼠分为假手术组(Sham 组)、革兰阳性菌脓毒症组(G<sup>+</sup>组)、CWP 预处理革兰阳性菌脓毒症组(G<sup>+</sup>CWP 组)、革兰阴性菌脓毒症组(G<sup>-</sup>组)、CWP 预处理革兰阴性菌脓毒症组(G<sup>-</sup>CWP 组)5 组,每组 8 只。分别经腹腔注射金黄色葡萄球菌/大肠埃希菌悬液 1 mL 构建革兰阳性菌/革兰阴性菌脓毒症模型;Sham 组注射等量生理盐水。预处理组分别于制模前 7 d 每日灌胃 CWP (200 mg/kg)250  $\mu$ L,每日 1 次;其余组灌胃等量生理盐水。制模后 7 d,超声心动图评估左室射血分数(LVEF)、左室短轴缩短率(LVFS)、左室舒张期末内径(LVEDD)、左室收缩期末内径(LVESD)、左室舒张期末容积(LVEDV)、左室收缩期末容积(LVESV)等心功能指标;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清心肌损伤标志物[肌酸激酶同工酶(CK-MB)、心肌肌钙蛋白 I(cTnI)]和炎症因子[白细胞介素(IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )]水平;苏木素-伊红(HE)染色观察心肌组织病理学改变;蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测心肌组织中 PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白的表达。**结果** 与 Sham 组相比,G<sup>+</sup>组/G<sup>-</sup>组心功能指标 LVEF、LVFS 降低,LVEDD、LVESD、LVEDV、LVESV 升高,血清中 CK-MB、cTnI、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10 水平升高;心肌组织可见心肌纤维间隙增大,间质充血,炎症细胞浸润,心肌损伤病理评分增加;心肌组织中磷酸化 PI3K(p-PI3K)、磷酸化 AKT(p-AKT)、磷酸化 P65(p-P65)蛋白表达上调(均  $P < 0.05$ )。与相应 G<sup>+</sup>组/G<sup>-</sup>组相比,G<sup>+</sup>CWP 组/G<sup>-</sup>CWP 组心功能改善,LVEF、LVFS 升高[LVEF:0.582 $\pm$ 0.033 比 0.464 $\pm$ 0.019,0.636 $\pm$ 0.040 比 0.561 $\pm$ 0.027;LVFS:(29.66 $\pm$ 1.92)% 比 (22.11 $\pm$ 1.67)%,(33.13 $\pm$ 2.80)% 比 (27.69 $\pm$ 1.93)%],LVEDD、LVESD、LVEDV、LVESV 降低[LVEDD(mm):2.64 $\pm$ 0.13<sup>3</sup> 比 3.38 $\pm$ 0.29,2.58 $\pm$ 0.19 比 2.98 $\pm$ 0.27;LVESD(mm):1.65 $\pm$ 0.09 比 2.42 $\pm$ 0.24,1.70 $\pm$ 0.12 比 2.45 $\pm$ 0.21;LVEDV( $\mu$ L):43.67 $\pm$ 8.93 比 70.08 $\pm$ 3.31,35.40 $\pm$ 2.94 比 47.73 $\pm$ 4.86;LVESV( $\mu$ L):19.73 $\pm$ 4.79 比 36.36 $\pm$ 2.89,14.16 $\pm$ 2.54 比 21.90 $\pm$ 3.49],血清中 cTnI、CK-MB、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平降低[cTnI(ng/L):855.37 $\pm$ 15.22 比 1415.93 $\pm$ 14.85,727.42 $\pm$ 18.55 比 1089.57 $\pm$ 15.11;CK-MB( $\mu$ g/L):14.13 $\pm$ 1.30 比 20.63 $\pm$ 1.52,8.75 $\pm$ 1.48 比 17.81 $\pm$ 0.88;IL-1 $\beta$ (ng/L):252.79 $\pm$ 18.77 比 398.89 $\pm$ 11.23,242.09 $\pm$ 13.49 比 363.45 $\pm$ 8.78;IL-6(ng/L):142.93 $\pm$ 5.78 比 205.15 $\pm$ 2.74,104.18 $\pm$ 7.16 比 173.29 $\pm$ 5.60;TNF- $\alpha$ (ng/L):181.33 $\pm$ 4.47 比 271.44 $\pm$ 7.43,134.97 $\pm$ 10.49 比 241.20 $\pm$ 6.86],抗炎因子 IL-10 水平上升(ng/L:248.22 $\pm$ 11.71 比 205.57 $\pm$ 13.69,312.90 $\pm$ 8.82 比 256.52 $\pm$ 8.12),心肌组织病理损伤减轻,评分降低[分:0.83 $\pm$ 0.20 比 1.71 $\pm$ 0.12,0.73 $\pm$ 0.08 比 1.74 $\pm$ 0.13];心肌组织中 p-PI3K、p-AKT、p-P65 蛋白表达水平平均降低[p-PI3K/ $\beta$ -actin:0.49 $\pm$ 0.20 比 0.93 $\pm$ 0.08,0.53 $\pm$ 0.02 比 0.67 $\pm$ 0.05;p-AKT/ $\beta$ -actin:0.75 $\pm$ 0.17 比 1.10 $\pm$ 0.12,0.73 $\pm$ 0.10 比 0.92 $\pm$ 0.05;p-P65/ $\beta$ -actin:0.38 $\pm$ 0.04 比 0.59 $\pm$ 0.09,0.39 $\pm$ 0.07 比 0.54 $\pm$ 0.03],差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。**结论** CWP 可抑制革兰阳性菌或革兰阴性菌所致脓毒症小鼠血清促炎因子的过度释放,促进抗炎细胞因子的表达上调,减轻心肌组织炎症反应,并改善其心功能,其机制可能与调控 PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路有关。

**【关键词】** 骆驼乳清蛋白;脓毒症;心肌损伤;炎症反应;PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路

**基金项目:**兵团指导性计划项目(2023ZD020)

DOI:10.3760/cma.j.cn121430-20250904-00473

Exploring the protective effect of camel whey protein on myocardial damage in mice with sepsis caused by different bacterial strains based on the PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signaling pathway

Jiang Bo<sup>1</sup>, You Weiyang<sup>2</sup>, Xue Qing<sup>1</sup>, Zhang Qi<sup>1</sup>, Zhao Changjia<sup>1</sup>, Ren Shan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Critical Care Medicine I, First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi 832000, China; <sup>2</sup>Clinical Medical Research Center for Critical Diseases, Xinjiang Production and Construction Corps, Shihezi 832000, China

Corresponding author: Ren Shan, Email: newllyshan@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the protective effects and mechanisms of camel whey protein (CWP) against myocardial injury in mice with sepsis caused by Gram-positive bacteria or Gram-negative bacteria. **Methods** Using a random number table, 40 male C57BL/6 mice were divided into the Sham group, Gram-positive bacterial sepsis group ( $G^+$  group), CWP-pretreated Gram-positive bacterial sepsis group ( $G^+$ CWP group), Gram-negative bacterial sepsis group ( $G^-$  group), CWP-pretreated Gram-negative bacterial sepsis group ( $G^-$ CWP group), with 8 mice in each group. The Gram-positive bacterial sepsis model and the Gram-negative bacterial sepsis model were established by intraperitoneal injection of 1 mL of *Staphylococcus aureus*/*Escherichia coli* suspension, respectively; the Sham group received an equal volume of saline. In the pretreatment groups, CWP (200 mg/kg, 250  $\mu$ L) was administered via oral gavage once daily for 7 days prior to model induction; the remaining groups received an equal volume of saline via oral gavage. Seven days after modeling, echocardiography was used to assess cardiac function parameters, including left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular fractional shortening (LVFS), left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD), left ventricular end-systolic diameter (LVESD), left ventricular end-diastolic volume (LVEDV), and left ventricular end-systolic volume (LVESV). The levels of serum myocardial injury markers [MB isoenzyme of creatine kinase (CK-MB), cardiac troponin I (cTnI)] and inflammatory factors [interleukins (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )] were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Pathological changes in myocardial tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The expression of proteins associated with the PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signaling pathway in myocardial tissue were detected by Western blotting. **Results** Compared with the Sham group, the  $G^+$  and  $G^-$  groups showed decreased cardiac function parameters (LVEF and LVFS) and increased LVEDD, LVESD, LVEDV, and LVESV, as well as elevated serum levels of CK-MB, cTnI, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-10; myocardial tissue showed widened interfiber spaces, marked interstitial congestion, inflammatory cell infiltration, and increased myocardial injury pathological scores; the expression of phosphorylated PI3K (p-PI3K), phosphorylated AKT (p-AKT), and phosphorylated P65 (p-P65) proteins were upregulated in myocardial tissue (all  $P < 0.05$ ). Compared with the corresponding  $G^+$  and  $G^-$  groups, the  $G^+$ CWP and  $G^-$ CWP groups showed improvements in cardiac function, with increased LVEF and LVFS [LVEF:  $0.582 \pm 0.033$  vs.  $0.464 \pm 0.019$ ,  $0.636 \pm 0.040$  vs.  $0.561 \pm 0.027$ ; LVFS:  $(29.66 \pm 1.92)\%$  vs.  $(22.11 \pm 1.67)\%$ ,  $(33.13 \pm 2.80)\%$  vs.  $(27.69 \pm 1.93)\%$ ], while LVEDD, LVESD, LVEDV, and LVESV decreased [LVEDD (mm):  $2.64 \pm 0.13$  vs.  $3.38 \pm 0.29$ ,  $2.58 \pm 0.19$  vs.  $2.98 \pm 0.27$ ; LVESD (mm):  $1.65 \pm 0.09$  vs.  $2.42 \pm 0.24$ ,  $1.70 \pm 0.12$  vs.  $2.45 \pm 0.21$ ; LVEDV ( $\mu$ L):  $43.67 \pm 8.93$  vs.  $70.08 \pm 3.31$ ,  $35.40 \pm 2.94$  vs.  $47.73 \pm 4.86$ ; LVESV ( $\mu$ L):  $19.73 \pm 4.79$  vs.  $36.36 \pm 2.89$ ,  $14.16 \pm 2.54$  vs.  $21.90 \pm 3.49$ ]; reduced serum levels of cTnI, CK-MB, IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  [cTnI (ng/L):  $855.37 \pm 15.22$  vs.  $1415.93 \pm 14.85$ ,  $727.42 \pm 18.55$  vs.  $1089.57 \pm 15.11$ ; CK-MB ( $\mu$ g/L):  $14.13 \pm 1.30$  vs.  $20.63 \pm 1.52$ ,  $8.75 \pm 1.48$  vs.  $17.81 \pm 0.88$ ; IL-1 $\beta$  (ng/L):  $252.79 \pm 18.77$  vs.  $398.89 \pm 11.23$ ,  $242.09 \pm 13.49$  vs.  $363.45 \pm 8.78$ ; IL-6 (ng/L):  $142.93 \pm 5.78$  vs.  $205.15 \pm 2.74$ ,  $104.18 \pm 7.16$  vs.  $173.29 \pm 5.60$ ; TNF- $\alpha$  (ng/L):  $181.33 \pm 4.47$  vs.  $271.44 \pm 7.43$ ,  $134.97 \pm 10.49$  vs.  $241.20 \pm 6.86$ ], levels of the anti-inflammatory factor IL-10 increased (ng/L:  $248.22 \pm 11.71$  vs.  $205.57 \pm 13.69$ ,  $312.90 \pm 8.82$  vs.  $256.52 \pm 8.12$ ); pathological damage to myocardial tissue was reduced, with lower scores ( $0.83 \pm 0.20$  vs.  $1.71 \pm 0.12$ ,  $0.73 \pm 0.08$  vs.  $1.74 \pm 0.13$ ); the expression of p-PI3K, p-AKT, and p-P65 proteins were all reduced in myocardial tissue [p-PI3K/ $\beta$ -actin:  $0.49 \pm 0.20$  vs.  $0.93 \pm 0.08$ ,  $0.53 \pm 0.02$  vs.  $0.67 \pm 0.05$ ; p-AKT/ $\beta$ -actin:  $0.75 \pm 0.17$  vs.  $1.10 \pm 0.12$ ,  $0.73 \pm 0.10$  vs.  $0.92 \pm 0.05$ ; p-P65/ $\beta$ -actin:  $0.38 \pm 0.04$  vs.  $0.59 \pm 0.09$ ,  $0.39 \pm 0.07$  vs.  $0.54 \pm 0.03$ ], with all differences being statistically significant (all  $P < 0.05$ ). **Conclusions** CWP can suppress the excessive release of pro-inflammatory cytokines in the serum of mice with sepsis caused by Gram-positive bacteria or Gram-negative bacteria, promote the upregulation of anti-inflammatory cytokines, alleviate inflammatory responses in the myocardial tissue of septic mice, and improve their cardiac function; its mechanism may be related to the regulation of the PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**【Key words】** Camel whey protein; Sepsis; Myocardial injury; Inflammatory response; PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signaling pathway

**Fund program:** Corps Guiding Plan Project (2023ZD020)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20250904-00473

脓毒症定义为宿主应对各种微生物及免疫原性物质侵入反应失调所导致的危害生命的器官功能障碍综合征。脓毒症是重症监护病房患者常见的死亡原因之一,治疗费用高,医疗资源消耗大。除引起全身性炎症反应外,脓毒症常并发器官功能障碍<sup>[1]</sup>。心脏是脓毒症易受损的器官之一,伴有心功能不全者占脓毒症患者的 40%~50%,病死率高达 70%~90%<sup>[2]</sup>,是脓毒症的主要死亡原因之一。脓毒症心肌损伤(sepsis-induced myocardial injury, SIMI)是由脓毒症引起的一种可逆的心肌功能障碍

碍,主要表现为心肌抑制,心脏收缩和(或)舒张功能受限、心脏扩大、射血分数改变等,其发生的潜在病理生理机制并未完全明确。炎症刺激后的机体免疫应答始终是脓毒症发生发展的关键因素。过度的炎症反应、机体免疫调控失衡是引发后续一系列多器官损伤及患者死亡的重要因素<sup>[3]</sup>。目前脓毒症治疗的标准方案是早期复苏、感染灶清除、抗菌药物使用和器官支持,但即使严格依照标准方案治疗后,脓毒症病死率仍然居高不下<sup>[4]</sup>。其中,磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/核转录因子- $\kappa$ B

(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/nuclear factor- $\kappa$ B, PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B) 信号通路在调控炎症反应及脓毒症器官功能损伤的进程中起着关键作用<sup>[5]</sup>。

驼奶是我国新疆地区常见的乳制品,骆驼乳清蛋白 (camel whey protein, CWP) 作为驼奶蛋白的主要成分之一,其具有抗炎抑菌、抗氧化、调节免疫细胞功能等作用<sup>[6]</sup>。CWP 中的活性成分复杂多样,其中乳铁蛋白 (lactoferrin, Lf) 属于转铁蛋白家族,是哺乳动物体内铁离子水平的重要调节因子,它能够以高亲和力结合  $\text{Fe}^{3+}$  并将其保持在低 pH 值环境中,从而发挥抑菌和抗氧化特性,由于 Lf 强大的抗菌、抗炎活性,被视为一种保护性蛋白<sup>[7]</sup>。溶菌酶是一种细菌溶解酶,具有强大的裂解活性,可裂解细菌细胞壁肽聚糖中的  $\beta$ -1,4-糖苷键,对革兰阴性菌如大肠埃希菌也显示出裂解作用<sup>[8]</sup>。乳过氧化物酶 (lactoperoxidase, LPO) 是一种天然存在于分泌物中的糖蛋白,对铜绿假单胞菌具有显著的抗菌作用,对革兰阳性菌如金黄色葡萄球菌有抑菌作用,对革兰阴性菌如大肠埃希菌同样有灭菌作用<sup>[9]</sup>。

基于上述研究背景以及脓毒症疾病发生发展的病理生理机制,我们推测 CWP 可通过调节机体严重感染后的炎症反应,有望实现脓毒症治疗的新思路。目前关于 CWP 在 SIMI 中的作用及机制鲜见报道。本研究使用不同类型菌种 (革兰阳性菌 / 革兰阴性菌) 腹腔注射构建脓毒症小鼠模型,从机体炎症反应变化的角度探讨 CWP 预处理对脓毒症小鼠心肌损伤的保护作用及其对 PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路的调控作用,为 SIMI 治疗提供新策略。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及主要试剂:**健康雄性 C57BL/6 小鼠 40 只,体质量 ( $25 \pm 5$ )g,购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK (京) 2024-0001,使用许可证号:SYXK (京)-0010。将小鼠置于石河子大学实验动物中心 SPF 级屏障系统内、温度 ( $22.5 \pm 0.5$ ) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 ( $50 \pm 5$ )%、12 h 光照 / 12 h 黑暗环境中自由饮食饮水,定期通风。

新鲜驼奶购自新疆旺源驼奶实业有限公司;心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI)、肌酸激酶同工酶 (MB isoenzyme of creatine kinase, CK-MB)、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-10

(interleukin-10, IL-10) 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂盒购自武汉贝茵莱生物科技有限公司;PI3K 抗体、AKT 抗体、磷酸化 AKT (phosphorylated AKT, p-AKT) 抗体、P65 抗体、 $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 均购自武汉三鹰生物技术有限公司;磷酸化 PI3K (phosphorylated PI3K, p-PI3K) 抗体、磷酸化 P65 (p-P65) 抗体购自江苏亲科生物研究中心有限公司;苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

**1.2 细菌的制备:**金黄色葡萄球菌 (ATCC6538) 和大肠埃希菌 (ATCC25922) 由石河子大学第一附属医院检验中心惠赠。实验前,将冻存于  $-80^{\circ}\text{C}$  的菌株解冻后接种于 LB 液体培养基中,于  $37^{\circ}\text{C}$  恒温培养 12 ~ 16 h,直至菌液达到对数生长期,随后使用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 将菌液稀释至目标浓度:金黄色葡萄球菌为  $9 \times 10^{11}$  CFU/L,大肠埃希菌为  $9 \times 10^{10}$  CFU/L (细菌的最适成模浓度已通过预实验验证)<sup>[10-11]</sup>。为确保细菌悬液的均一性和制模质量,菌液浓度分别通过分光光度法和稀释涂布法进行双重验证。稀释后的细菌悬液于  $4^{\circ}\text{C}$  保存,并在 24 h 内使用。

**1.3 CWP 的制备:**将新鲜的驼乳以 5 000 r/min (离心半径 10 cm) 离心 20 min,去除脂肪及沉淀,得到脱脂乳;将脱脂乳于  $40^{\circ}\text{C}$  水浴 20 min,用 10% 冰乙酸调节 pH 值至 4.6,置于  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜;将放置过夜的脱脂乳置于离心管中以 8 000 r/min (离心半径 10 cm) 离心 20 min,收集中间乳清部分调整 pH 值为 6.8 后冷冻干燥,得到 CWP 冻干粉,并置于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。

**1.4 动物分组及处理:**按随机数字表法将小鼠分为 5 组,即假手术组 (Sham 组)、革兰阳性菌脓毒症组 ( $G^{+}$  组)、CWP 预处理革兰阳性菌脓毒症组 ( $G^{+}$ CWP 组)、革兰阴性菌脓毒症组 ( $G^{-}$  组)、CWP 预处理革兰阴性菌脓毒症组 ( $G^{-}$ CWP 组),每组 8 只。参考相关文献<sup>[12]</sup>,予小鼠腹腔注射金黄色葡萄球菌 / 大肠埃希菌悬液 1 mL 分别构建革兰阳性菌脓毒症模型 / 革兰阴性菌脓毒症模型;Sham 组注射等量生理盐水。 $G^{+}$ CWP/ $G^{-}$ CWP 组于制备脓毒症模型前 7 d 每日灌胃 CWP (CWP 冻干粉溶于生理盐水, 200 mg/kg) 250  $\mu\text{L}$ ,每日 1 次; $G^{+}$  组、 $G^{-}$  组、Sham 组则每日灌胃等量生理盐水。制模后将小鼠放回笼内自由食水,观察并记录小鼠的活动水平、饮水量、精神状态和

呼吸情况。

本实验符合 3R 原则,且经石河子大学第一附属医院实验动物伦理委员会审查并通过(审批号:A2025-293)。

### 1.5 检测指标及方法

**1.5.1 超声心动图评估心功能:**于制模后 7 d 用戊巴比妥麻醉小鼠后胸部备皮,并放置在加热垫上以保温。进行 M 型超声心动图检测,以乳头肌为参照观察左心室运动状况,检测左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、左室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening, LVFS)、左室舒张期末内径(left ventricular end-diastolic diameter, LVEDD)、左室收缩期末内径(left ventricular end-systolic diameter, LVESD)、左室舒张期末容积(left ventricular end-diastolic volume, LVEDV)、左室收缩期末容积(left ventricular end-systolic volume, LVESV)。

**1.5.2 心肌损伤标志物及炎症因子检测:**于制模后 7 d 用戊巴比妥麻醉小鼠,取腹主动脉血,立即离心分离血清,按 ELISA 试剂盒说明书步骤检测血清 cTnI、CK-MB 等心肌损伤标志物以及 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10 等炎症因子水平。

**1.5.3 HE 染色观察心肌损伤:**于制模后 7 d 用戊巴比妥麻醉小鼠,颈椎脱臼法予以安乐死,快速取下心脏置于预冷至 4  $^{\circ}$ C 的 PBS 中,在左心耳处剪开,用 PBS 灌洗心腔。剪取心尖部分,置于 4% 多聚甲醛固定液中固定,予以石蜡包埋、切片后进行 HE 染色,镜下观察心肌组织病理改变,并对心肌损伤程度进行细化评分<sup>[13]</sup>。

**1.5.4 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测心肌组织 PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路中相关蛋白的表达:**于制模后 7 d 取小鼠心肌组织充分匀浆,加入 200  $\mu$ L 预先配置好的裂解液混合物,于组织匀浆器中混匀,在 4  $^{\circ}$ C 环境下 15 000 r/min(离心半径

10 cm)离心 15 min,收集上清液于小离心管中,采用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定总蛋白浓度。蛋白上清中加入缓冲液,煮沸充分变性蛋白,煮沸变性后经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),转移分离后的蛋白于聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,洗脱后加入一抗并于 4  $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜,洗脱一抗后加入对应二抗孵育 2 h,用含吐温 20 的 Tris 缓冲盐溶液(Tris-buffered saline with Tween-20, TBST)洗脱后,在样本中滴加增强型化学发光液,用凝胶成像系统完成显色成像,从而获取清晰的蛋白条带。利用 Image J 软件分析蛋白条带的灰度值,以  $\beta$ -actin 作为内参对目的蛋白进行半定量分析。

**1.6 统计学分析:**使用 SPSS 26.0 统计软件分析数据,使用 GraphPad Prism 9.5.0 软件绘图。检测数据用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐时组间两两比较采用 LSD 法,方差不齐则采用 Tamhane 检验。检验水准  $\alpha$  值取双侧 0.05。

## 2 结果

**2.1 各组小鼠心功能指标比较:**表 1 和图 1 显示,与 Sham 组相比, G<sup>+</sup> 组 / G<sup>-</sup> 组小鼠 LVEF、LVFS 降低, LVEDD、LVESD、LVEDV、LVESV 增加,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。与相应 G<sup>+</sup> 组 / G<sup>-</sup> 组相比, G<sup>+</sup>CWP 组 / G<sup>-</sup>CWP 组小鼠 LVEF、LVFS 增加, LVEDD、LVESD、LVEDV、LVESV 减小,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。

**2.2 各组小鼠血清心肌损伤标志物水平比较(表 2):**G<sup>+</sup> 组 / G<sup>-</sup> 组 cTnI、CK-MB 水平高于 Sham 组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。与相应 G<sup>+</sup> 组 / G<sup>-</sup> 组相比, G<sup>+</sup>CWP 组 / G<sup>-</sup>CWP 组 cTnI、CK-MB 水平下降,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。

表 1 各组小鼠心功能指标比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                   | 动物数(只) | LVEF                           | LVFS(%)                       | LVEDD(mm)                    | LVESD(mm)                    | LVEDV( $\mu$ L)               | LVESV( $\mu$ L)               |
|----------------------|--------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Sham 组               | 8      | 0.763 $\pm$ 0.020              | 43.28 $\pm$ 1.37              | 2.18 $\pm$ 0.10              | 1.15 $\pm$ 0.10              | 27.54 $\pm$ 3.71              | 7.53 $\pm$ 2.67               |
| G <sup>+</sup> 组     | 8      | 0.464 $\pm$ 0.019 <sup>a</sup> | 22.11 $\pm$ 1.67 <sup>a</sup> | 3.38 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup> | 2.42 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup> | 70.08 $\pm$ 3.31 <sup>a</sup> | 36.36 $\pm$ 2.89 <sup>a</sup> |
| G <sup>+</sup> CWP 组 | 8      | 0.582 $\pm$ 0.033 <sup>b</sup> | 29.66 $\pm$ 1.92 <sup>b</sup> | 2.64 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup> | 1.65 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup> | 43.67 $\pm$ 8.93 <sup>b</sup> | 19.73 $\pm$ 4.79 <sup>b</sup> |
| G <sup>-</sup> 组     | 8      | 0.561 $\pm$ 0.027 <sup>a</sup> | 27.69 $\pm$ 1.93 <sup>a</sup> | 2.98 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup> | 2.45 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup> | 47.73 $\pm$ 4.86 <sup>a</sup> | 21.90 $\pm$ 3.49 <sup>a</sup> |
| G <sup>-</sup> CWP 组 | 8      | 0.636 $\pm$ 0.040 <sup>b</sup> | 33.13 $\pm$ 2.80 <sup>b</sup> | 2.58 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup> | 1.70 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup> | 35.40 $\pm$ 2.94 <sup>b</sup> | 14.16 $\pm$ 2.54 <sup>b</sup> |

注:Sham 组为假手术组, G<sup>+</sup> 组为革兰阳性菌脓毒症组, G<sup>+</sup>CWP 组为骆驼乳清蛋白预处理革兰阳性菌脓毒症组, G<sup>-</sup> 组为革兰阴性菌脓毒症组, G<sup>-</sup>CWP 组为骆驼乳清蛋白预处理革兰阴性菌脓毒症组;LVEF 为左室射血分数, LVFS 为左室短轴缩短率, LVEDD 为左室舒张期末内径, LVESD 为左室收缩期末内径, LVEDV 为左室舒张期末容积, LVESV 为左室收缩期末容积;<sup>a</sup>与 Sham 组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>与相应 G<sup>+</sup> 组 / G<sup>-</sup> 组比较,  $P < 0.05$

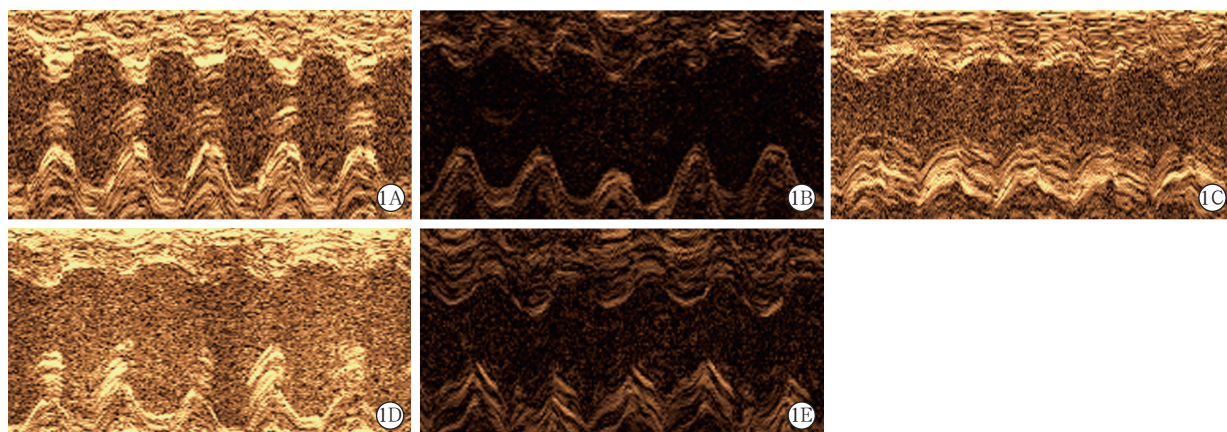


图 1 超声心动图评估各组小鼠心功能情况 假手术组(Sham 组,A)小鼠心肌运动节律整齐,收缩幅度正常;革兰阳性菌脓毒症组(G<sup>+</sup>组,B)和革兰阴性菌脓毒症组(G<sup>-</sup>组,C)心肌运动幅度减低,纹理紊乱;骆驼乳清蛋白预处理革兰阳性菌脓毒症组(G<sup>+</sup>CWP 组,D)和骆驼乳清蛋白预处理革兰阴性菌脓毒症组(G<sup>-</sup>CWP 组,E)心肌运动幅度恢复,结构排列趋于规整

| 组别                   | 动物数(只) | cTnI (ng/L)                   | CK-MB ( $\mu\text{g/L}$ ) |
|----------------------|--------|-------------------------------|---------------------------|
| Sham 组               | 8      | 455.16 ± 17.09                | 6.31 ± 0.68               |
| G <sup>+</sup> 组     | 8      | 1 415.93 ± 14.85 <sup>a</sup> | 20.63 ± 1.52 <sup>a</sup> |
| G <sup>+</sup> CWP 组 | 8      | 855.37 ± 15.22 <sup>b</sup>   | 14.13 ± 1.30 <sup>b</sup> |
| G <sup>-</sup> 组     | 8      | 1 089.57 ± 15.11 <sup>a</sup> | 17.81 ± 0.88 <sup>a</sup> |
| G <sup>-</sup> CWP 组 | 8      | 727.42 ± 18.55 <sup>b</sup>   | 8.75 ± 1.48 <sup>b</sup>  |

注:Sham 组为假手术组,G<sup>+</sup>组为革兰阳性菌脓毒症组,G<sup>+</sup>CWP 组为骆驼乳清蛋白预处理革兰阳性菌脓毒症组,G<sup>-</sup>组为革兰阴性菌脓毒症组,G<sup>-</sup>CWP 组为骆驼乳清蛋白预处理革兰阴性菌脓毒症组;cTnI 为心肌肌钙蛋白 I,CK-MB 为肌酸激酶同工酶;<sup>a</sup>与 Sham 组比较, $P < 0.05$ ;<sup>b</sup>与相应 G<sup>+</sup>组/G<sup>-</sup>组比较, $P < 0.05$

| 组别                   | 动物数(只) | IL-1 $\beta$ (ng/L)         | IL-6 (ng/L)                |
|----------------------|--------|-----------------------------|----------------------------|
| Sham 组               | 8      | 132.25 ± 9.27               | 66.63 ± 4.29               |
| G <sup>+</sup> 组     | 8      | 398.89 ± 11.23 <sup>a</sup> | 205.15 ± 2.74 <sup>a</sup> |
| G <sup>+</sup> CWP 组 | 8      | 252.79 ± 18.77 <sup>b</sup> | 142.93 ± 5.78 <sup>b</sup> |
| G <sup>-</sup> 组     | 8      | 363.45 ± 8.78 <sup>a</sup>  | 173.29 ± 5.60 <sup>a</sup> |
| G <sup>-</sup> CWP 组 | 8      | 242.09 ± 13.49 <sup>b</sup> | 104.18 ± 7.16 <sup>b</sup> |

| 组别                   | 动物数(只) | TNF- $\alpha$ (ng/L)        | IL-10 (ng/L)                |
|----------------------|--------|-----------------------------|-----------------------------|
| Sham 组               | 8      | 88.57 ± 6.28                | 172.96 ± 7.31               |
| G <sup>+</sup> 组     | 8      | 271.44 ± 7.43 <sup>a</sup>  | 205.57 ± 13.69 <sup>a</sup> |
| G <sup>+</sup> CWP 组 | 8      | 181.33 ± 4.47 <sup>b</sup>  | 248.22 ± 11.71 <sup>b</sup> |
| G <sup>-</sup> 组     | 8      | 241.20 ± 6.86 <sup>a</sup>  | 256.52 ± 8.12 <sup>a</sup>  |
| G <sup>-</sup> CWP 组 | 8      | 134.97 ± 10.49 <sup>b</sup> | 312.90 ± 8.82 <sup>b</sup>  |

注:Sham 组为假手术组,G<sup>+</sup>组为革兰阳性菌脓毒症组,G<sup>+</sup>CWP 组为骆驼乳清蛋白预处理革兰阳性菌脓毒症组,G<sup>-</sup>组为革兰阴性菌脓毒症组,G<sup>-</sup>CWP 组为骆驼乳清蛋白预处理革兰阴性菌脓毒症组;IL-1 $\beta$  为白细胞介素-1 $\beta$ ,IL-6 为白细胞介素-6,TNF- $\alpha$  为肿瘤坏死因子- $\alpha$ ,IL-10 为白细胞介素-10;<sup>a</sup>与 Sham 组比较, $P < 0.05$ ;<sup>b</sup>与相应 G<sup>+</sup>组/G<sup>-</sup>组比较, $P < 0.05$

**2.3 各组小鼠血清炎症因子水平比较(表 3):**与 Sham 组相比,G<sup>+</sup>组/G<sup>-</sup>组血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-10 水平升高,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。与相应 G<sup>+</sup>组/G<sup>-</sup>组相比,G<sup>+</sup>CWP 组/G<sup>-</sup>CWP 组促炎因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平降低,抗炎因子 IL-10 水平升高,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。

**2.4 各组小鼠心肌组织病理改变及病理学评分比较:**HE 染色结果显示(图 2),Sham 组心肌组织结构基本正常。与 Sham 组相比,G<sup>+</sup>组/G<sup>-</sup>组心肌组织出现明显病理变化,病理评分升高(分:1.71 ± 0.12、1.74 ± 0.13 比 0,均  $P < 0.05$ )。G<sup>+</sup>CWP 组/G<sup>-</sup>CWP 组心肌组织病理损伤较相应 G<sup>+</sup>组/G<sup>-</sup>组减轻,心肌损伤病理评分降低(分:0.83 ± 0.20 比 1.71 ± 0.12、0.73 ± 0.08 比 1.74 ± 0.13,均  $P < 0.05$ )。

**2.5 各组小鼠心肌组织 PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白表达比较:**Western blotting 结果显示(图 3;表 4),与 Sham 相比,G<sup>+</sup>组/G<sup>-</sup>组 p-PI3K、p-AKT、p-P65 蛋白表达水平均上调(均  $P < 0.05$ )。与相应 G<sup>+</sup>组/G<sup>-</sup>组相比,G<sup>+</sup>CWP 组/G<sup>-</sup>CWP 组 p-PI3K、p-AKT、p-P65 蛋白表达水平均降低(均  $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

脓毒症是指宿主对明确或可能的感染产生反应失调而引起的危及生命的器官功能障碍,其核心病理生理特征为全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),严重损害人体健康。在脓毒症早期,脓毒症的感染源可以是各种细菌,包括但不限于革兰阳性球菌(金黄色葡萄球菌)、革兰阴性菌(大肠埃希菌)、厌氧菌等,除细菌外,还包括真菌、病毒、立克次体等其他因素也能诱发 SIRS<sup>[14]</sup>。SIMI 作为脓毒症重要死亡原因之一,其具体发病机制尚不明确,仍缺乏行之有效的针对性治疗手段。当前针对 SIMI 的治疗策略主要聚焦于控制原发性疾病,预防继发性 SIMI,主要包括液体复苏、抗感染、使用血管活性药物、 $\beta$  受体阻滞剂及器官支持疗法,改善心肌功能;以及借助器官

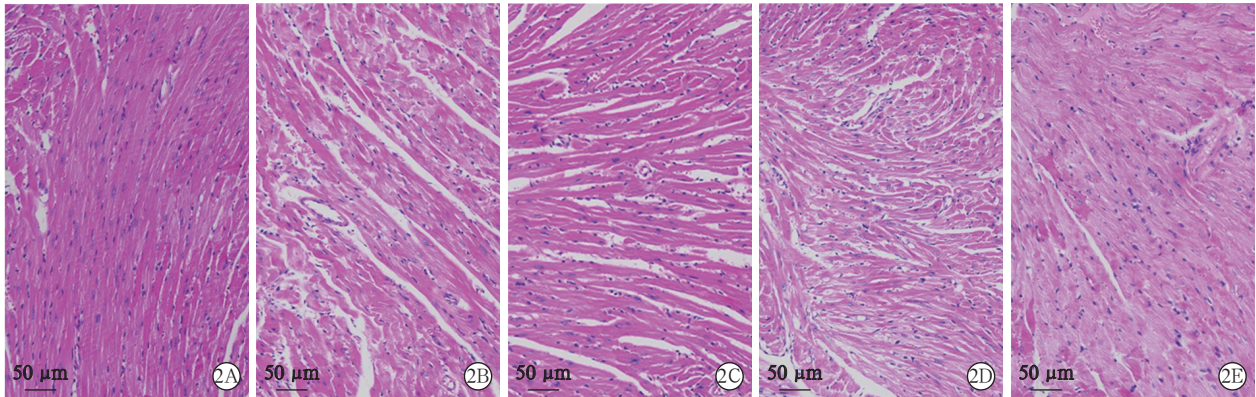


图2 光镜下观察各组小鼠心肌组织病理学改变 假手术组(Sham组, A)心肌纤维排列整齐,无炎症细胞浸润;革兰阳性菌脓毒症组(G<sup>+</sup>组, B)和革兰阴性菌脓毒症组(G<sup>-</sup>组, C)心肌纤维排列紊乱、间隙增大,心肌细胞水肿,可见中性粒细胞浸润;骆驼乳清蛋白预处理革兰阳性菌脓毒症组(G<sup>+</sup>CWP组, D)和骆驼乳清蛋白预处理革兰阴性菌脓毒症组(G<sup>-</sup>CWP组, E)心肌损伤程度减轻,心肌纤维排列较规整,炎症细胞浸润减少 苏木素-伊红(HE)染色 中倍放大



注: Sham组为假手术组, G<sup>+</sup>组为革兰阳性菌脓毒症组, G<sup>+</sup>CWP组为骆驼乳清蛋白预处理革兰阳性菌脓毒症组, G<sup>-</sup>组为革兰阴性菌脓毒症组, G<sup>-</sup>CWP组为骆驼乳清蛋白预处理革兰阴性菌脓毒症组; PI3K为磷脂酰肌醇3-激酶, AKT为蛋白激酶B, NF-κB为核转录因子-κB, p-PI3K为磷酸化PI3K, p-AKT为磷酸化AKT, p-P65为磷酸化P65, β-actin为β-肌动蛋白

图3 蛋白质免疫印迹试验(Westernblotting)检测各组小鼠心肌组织PI3K/AKT/NF-κB信号通路相关蛋白表达

表4 各组小鼠心肌组织PI3K/AKT/NF-κB信号通路相关蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                  | 动物数(只) | p-PI3K/<br>β-actin       | p-AKT/<br>β-actin        | p-P65/<br>β-actin        |
|---------------------|--------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Sham组               | 8      | 0.39 ± 0.21              | 0.67 ± 0.10              | 0.24 ± 0.08              |
| G <sup>+</sup> 组    | 8      | 0.93 ± 0.08 <sup>a</sup> | 1.10 ± 0.12 <sup>a</sup> | 0.59 ± 0.09 <sup>a</sup> |
| G <sup>+</sup> CWP组 | 8      | 0.49 ± 0.20 <sup>b</sup> | 0.75 ± 0.17 <sup>b</sup> | 0.38 ± 0.04 <sup>b</sup> |
| Sham组               | 8      | 0.26 ± 0.02              | 0.56 ± 0.07              | 0.20 ± 0.04              |
| G <sup>-</sup> 组    | 8      | 0.67 ± 0.05 <sup>a</sup> | 0.92 ± 0.05 <sup>a</sup> | 0.54 ± 0.03 <sup>a</sup> |
| G <sup>-</sup> CWP组 | 8      | 0.53 ± 0.02 <sup>b</sup> | 0.73 ± 0.10 <sup>b</sup> | 0.39 ± 0.07 <sup>b</sup> |

注: Sham组为假手术组, G<sup>+</sup>组为革兰阳性菌脓毒症组, G<sup>+</sup>CWP组为骆驼乳清蛋白预处理革兰阳性菌脓毒症组, G<sup>-</sup>组为革兰阴性菌脓毒症组, G<sup>-</sup>CWP组为骆驼乳清蛋白预处理革兰阴性菌脓毒症组; PI3K为磷脂酰肌醇3-激酶, AKT为蛋白激酶B, NF-κB为核转录因子-κB, p-PI3K为磷酸化PI3K, β-actin为β-肌动蛋白, p-AKT为磷酸化AKT, p-P65为磷酸化P65; <sup>a</sup>与Sham组比较, P<0.05; <sup>b</sup>与相应G<sup>+</sup>组/G<sup>-</sup>组比较, P<0.05

支持疗法,维持机体重要器官的基本功能等<sup>[15]</sup>。有研究进一步表明,对已经发生SIMI的治疗措施主要包括减轻过度炎症反应、改善线粒体功能、调控心肌细胞自噬、抑制心肌细胞凋亡等几个方面<sup>[16]</sup>。

CWP中含有的免疫球蛋白、乳铁蛋白、溶菌酶和过氧化物酶、免疫球蛋白等保护性蛋白<sup>[6]</sup>,在其发挥生物学作用中起到至关重要的作用。CWP通过调节细胞因子的产生和释放,抑制炎症反应的发展。Al-Omari等<sup>[17]</sup>研究显示, CWP治疗可降低结肠癌Balb/c小鼠结肠组织中炎症细胞因子IL-6和IL-8基因的表达,减少血便和腹泻,减轻大肠炎症表现。乳清蛋白中的Lf等成分具有广谱抗菌活性,能够抑制多种细菌的生长和繁殖。el Agamy等<sup>[18]</sup>

从驼奶中提取出上述保护性蛋白成分,并检测这些保护蛋白对乳酸乳球菌亚种、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门菌和轮状病毒活性的影响,证实 LPO 对革兰阳性菌株具有抑菌作用,对革兰阴性菌株具有杀菌作用。Kamal 等<sup>[19]</sup>通过模拟人体胃肠道消化环境发现,CWP 经消化酶(如胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶)分解后产生的蛋白水解物在清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼和 2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐自由基等方面表现出显著增强的抗氧化活性,证实 CWP 在生理条件下具有强大的抗氧化潜力。此外,有研究显示,CWP 能够显著增强淋巴细胞向淋巴组织的趋化能力,促进细胞因子的释放,并通过抗凋亡和抗炎途径修复免疫器官损伤,展现出对多种免疫细胞的综合调节功能<sup>[20]</sup>。Badr 等<sup>[21]</sup>在糖尿病小鼠模型中发现,CWP 治疗可降低促炎细胞因子 IL-1 $\beta$  和 IL-6 的水平,并升高抗炎因子 IL-4 水平。另有研究者明确指出,CWP 中的免疫球蛋白分子量是人类抗体的 1/10,易于从肠道吸收,可以到达人免疫球蛋白无法到达的组织和细胞,发挥与病原体结合并促进其清除的能力<sup>[22]</sup>。还有研究者发现,CWP 能够有效提高小鼠胰岛  $\beta$  细胞株(MIN6 细胞)损伤后的细胞活性,上调 PI3K、AKT 的基因及蛋白表达,表明 CWP 可能通过激活 PI3K/AKT 信号通路来改善胰岛细胞损伤和抑制凋亡<sup>[23]</sup>。同时,Dou 等<sup>[24]</sup>研究证实,CWP 不仅能减轻 2 型糖尿病大鼠的肝损伤,还能抑制 HepG2 细胞(肝炎 G2 细胞模型)的胰岛素抵抗,其机制与调控 PI3K/AKT 信号通路密切相关。

本研究中分别通过腹腔注射革兰阳性菌(金黄色葡萄球菌)或革兰阴性菌(大肠埃希菌)构建脓毒症小鼠心肌损伤模型,探讨 CWP 对脓毒症小鼠心肌损伤的保护作用。结果显示,G<sup>+</sup>组/G<sup>-</sup>组小鼠 LVEF、LVFS 低于 Sham 组,而 LVEDD、LVESD、LVEDV、LVESV 较 Sham 组升高,提示腹腔注射金黄色葡萄球菌/大肠埃希菌后,脓毒症小鼠表现出左心功能障碍。而予以 CWP 预处理的革兰阳性菌脓毒症小鼠和革兰阴性菌脓毒症小鼠心功能指标均有改善,提示 CWP 可以显著改善脓毒症小鼠心功能。cTnI、CK-MB 是心肌损伤的重要生物标志物。本研究显示,与 Sham 组相比,G<sup>+</sup>组/G<sup>-</sup>组小鼠血清 cTnI、CK-MB 水平均升高;而 G<sup>+</sup>CWP 组/G<sup>-</sup>CWP 组 cTnI、CK-MB 水平较相应 G<sup>+</sup>组/G<sup>-</sup>组下降,亦表

明 CWP 预处理可以改善脓毒症小鼠心肌细胞损伤。以上结果表明,CWP 预处理可以从减轻心肌细胞损伤、增加心肌收缩能力等多方面发挥对 SIMI 的保护作用。

基于 CWP 调控炎症的研究基础,本研究进一步从炎症反应及炎症因子变化的角度,初步探讨 CWP 实现 SIMI 保护作用的可能机制。促炎/抗炎反应失调是脓毒症发展过程中的重要环节。本研究显示,与 Sham 组相比,G<sup>+</sup>组/G<sup>-</sup>组小鼠血清促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平和抗炎因子 IL-10 水平均升高,证实脓毒症小鼠存在炎症反应失调。与相应 G<sup>+</sup>组/G<sup>-</sup>组比较,予以 CWP 预处理后的脓毒症小鼠血清促炎因子水平下降,而抗炎因子水平上升,表明 CWP 在 SIMI 小鼠疾病发生发展过程中具有免疫调节的作用。心肌组织病理学检测结果亦显示,G<sup>+</sup>组/G<sup>-</sup>组小鼠心肌组织均出现心肌纤维间隙增大、间质充血、炎症细胞浸润等改变;而予以 CWP 预处理后的革兰阳性菌脓毒症小鼠和革兰阴性菌脓毒症小鼠心肌组织病理学改变明显改善。以上结果表明 CWP 可能通过调节机体严重感染后促炎/抗炎反应,从而实现其对脓毒症小鼠心肌损伤的保护作用。

有研究发现,PI3K/AKT 通路是一条重要的信号转导通路,参与大多数的炎症反应过程。AKT 是 PI3K 的下游受体,在细胞增殖、分化、凋亡、迁移和转录等多种细胞过程中发挥着重要作用。NF- $\kappa$ B 家族成员众多,其中发挥转录激活作用的是 P65,因此 P65 又被视为该通路活化的标志<sup>[25]</sup>。本研究结果显示,与 Sham 组相比,G<sup>+</sup>组/G<sup>-</sup>组小鼠心肌组织 p-PI3K 表达水平增加。而 AKT 是 PI3K 的关键下游靶标,AKT 的磷酸化是 AKT 的活性构象,结果显示 G<sup>+</sup>组/G<sup>-</sup>组小鼠心肌组织中 p-AKT 表达也较 Sham 组升高,即脓毒症小鼠心肌损伤期间 PI3K/AKT 信号通路被激活。AKT 还可通过磷酸化 I $\kappa$ B 激酶- $\alpha$ ,调节 NF- $\kappa$ B 信号转导,调节基因表达,并可影响到各种不同的生物学过程,包括先天性免疫、适应性免疫、炎症、应激反应、B 细胞发育和淋巴器官形成。Western blotting 结果显示,G<sup>+</sup>组/G<sup>-</sup>组心肌组织 p-P65 表达也较 Sham 组升高。而与相应 G<sup>+</sup>组/G<sup>-</sup>组比较,G<sup>+</sup>CWP 组/G<sup>-</sup>CWP 组 p-PI3K、p-AKT 及 p-P65 表达水平降低。由此认为,CWP 能够抑制 PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路活化,减轻脓毒症小鼠心肌损伤,改善心功能。

综上所述, CWP 的抗炎、抗氧化、免疫调节等生物学作用在 SIM1 小鼠中发挥作用, 可减轻炎症反应, 减轻脓毒症小鼠心肌损伤, 改善心功能, 其机制可能与抑制 PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路活化有关, 为 SIM1 的治疗提供了新思路。然而, 本研究仍存在一定局限性, 其中并未对 CWP 的剂量与减轻 SIM1 的量-效关系进行研究; 同时, CWP 是否还通过调节其他信号通路来影响脓毒症小鼠心肌损伤的发展尚不清楚, 仍需后续进一步研究。

**利益冲突** 所有作者声明不存在利益冲突

**致谢** 感谢本次科研及论文写作过程中导师及同学的指导和大力支持

**作者贡献声明** 姜波: 酝酿和设计实验、实施研究、起草文章; 尤伟艳: 酝酿和设计实验、分析/解释数据; 薛庆: 采集数据、统计分析; 张琪: 实施研究、采集数据; 赵长甲: 实施研究、统计分析; 任珊: 酝酿和设计实验, 对文章的知识性内容作批评性审阅, 获取研究经费, 行政、技术或材料支持, 指导, 支持性贡献

## 参考文献

- [1] Fleischmann-Struzek C, Mellhammar L, Rose N, et al. Incidence and mortality of hospital- and ICU-treated sepsis: results from an updated and expanded systematic review and meta-analysis[J]. *Intensive Care Med*, 2020, 46(8): 1552-1562. DOI: 10.1007/s00134-020-06151-x.
- [2] Ehrman RR, Sullivan AN, Favot MJ, et al. Pathophysiology, echocardiographic evaluation, biomarker findings, and prognostic implications of septic cardiomyopathy: a review of the literature[J]. *Crit Care*, 2018, 22(1): 112. DOI: 10.1186/s13054-018-2043-8.
- [3] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3)[J]. *JAMA*, 2016, 315(8): 801-810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.
- [4] Ford JS, Morrison JC, Kyaw M, et al. The effect of severe sepsis and septic shock management bundle (SEP-1) compliance and implementation on mortality among patients with sepsis: a systematic review[J]. *Ann Intern Med*, 2025, 178(4): 543-557. DOI: 10.7326/ANNALS-24-02426.
- [5] Liu Z, Ting Y, Li M, et al. From immune dysregulation to organ dysfunction: understanding the enigma of sepsis[J]. *Front Microbiol*, 2024, 15: 1415274. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1415274.
- [6] Badr G, Ramadan NK, Sayed LH, et al. Why whey? Camel whey protein as a new dietary approach to the management of free radicals and for the treatment of different health disorders[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2017, 20(4): 338-349. DOI: 10.22038/IJBMS.2017.8573.
- [7] Kim JW, Lee JS, Choi YJ, et al. The multifaceted functions of lactoferrin in antimicrobial defense and inflammation[J]. *Biomolecules*, 2025, 15(8): 1174. DOI: 10.3390/biom15081174.
- [8] Ragland SA, Criss AK. From bacterial killing to immune modulation: recent insights into the functions of lysozyme[J]. *PLoS Pathog*, 2017, 13(9): e1006512. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006512.
- [9] El-Fakharany EM, Abd-Elhamid AI, El-Deeb NM. Preparation and characterization of novel nanocombination of bovine lactoperoxidase with Dye Decolorizing and anti-bacterial activity[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 8530. DOI: 10.1038/s41598-019-44961-2.
- [10] He XH, Ouyang DY, Xu LH. Injection of *Escherichia coli* to induce sepsis[J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2321: 43-51. DOI: 10.1007/978-1-0716-1488-4\_5.
- [11] Kannan SK, Kim CY, Heidarian M, et al. Mouse models of sepsis[J]. *Curr Protoc*, 2024, 4(3): e997. DOI: 10.1002/cpz1.997. Erratum in: *Curr Protoc*, 2024, 4(7): e1111. DOI: 10.1002/cpz1.1111.
- [12] Liu Y, Jing YY, Zeng CY, et al. Scutellarin suppresses NLRP3 inflammasome activation in macrophages and protects mice against bacterial sepsis[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 8: 975. DOI: 10.3389/fphar.2017.00975.
- [13] Jačević V, Wu QH, Nepovimova E, et al. Cardiomyopathy induced by T-2 toxin in rats[J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 137: 111138. DOI: 10.1016/j.fct.2020.111138.
- [14] 吴森, 白稼玮, 严颜, 等. 脓毒症基础研究[J]. *中华危重病急救医学*, 2024, 36(6): 561-566. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20240326-00287.
- [15] Lima MR, Silva D. Septic cardiomyopathy: a narrative review[J]. *Rev Port Cardiol*, 2023, 42(5): 471-481. DOI: 10.1016/j.repc.2021.05.020.
- [16] 黄颖, 唐立丽, 关于琳, 等. 脓毒症心肌损伤发病机制及治疗研究进展[J]. *实用医学杂志*, 2023, 39(14): 1848-1852. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2023.14.021.
- [17] Al-Omari MM, Al-Ghariebeh RB, Alhaija AAA, et al. Camel milk whey inhibits inflammatory colorectal cancer development via down regulation of pro-inflammatory cytokines in induced AOM/DSS mouse model[J]. *Emirates J Food Agric*, 2019, 31(4): 256-262. DOI: 10.9755/ejfa.2019.v31.i4.1935.
- [18] el Agamy EL, Ruppanner R, Ismail A, et al. Antibacterial and antiviral activity of camel milk protective proteins[J]. *J Dairy Res*, 1992, 59(2): 169-175. DOI: 10.1017/s0022029900030417.
- [19] Kamal H, Jafar S, Mudgil P, et al. Camel whey protein with enhanced antioxidative and antimicrobial properties upon simulated gastro-intestinal digestion[J]. *Nutr Health*, 2024, 30(2): 371-379. DOI: 10.1177/02601060221122213.
- [20] Ezzat GM, Meki AMA, Meligy FY, et al. Antiapoptotic and chemotaxis-stimulating effects of poly(D, L-lactide-co-glycolide)-chitosan and whey proteins against aflatoxicosis-induced splenic and thymic atrophy[J]. *Mol Biol Rep*, 2023, 50(12): 9805-9824. DOI: 10.1007/s11033-023-08902-7.
- [21] Badr G, Sayed LH, Omar HEM, et al. Camel whey protein protects B and T cells from apoptosis by suppressing activating transcription factor-3 (ATF-3)-mediated oxidative stress and enhancing phosphorylation of AKT and I $\kappa$ B- $\alpha$  in type I diabetic mice[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(1): 41-54. DOI: 10.1159/000455935.
- [22] Abdel Galil ACM, Alhaidar AA. The unique medicinal properties of camel products: a review of the scientific evidence[J]. *J Taibah Univ Med Sci*, 2016, 11(2): 98-103. DOI: 10.1016/j.jtumed.2015.12.007.
- [23] 侯志梅, 刘宸, 梁敏, 等. 新疆双峰驼乳清对棕榈酸损伤 MIN6 细胞的保护作用[J]. *中国乳品工业*, 2021, 49(4): 4-8, 18. DOI: 10.19827/j.issn1001-2230.2021.04.001.
- [24] Dou ZH, Liu C, Feng XH, et al. Camel whey protein (CWP) ameliorates liver injury in type 2 diabetes mellitus rats and insulin resistance (IR) in HepG2 cells via activation of the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Food Funct*, 2022, 13(1): 255-269. DOI: 10.1039/d1fo01174j.
- [25] Bai X, Guo YR, Zhao ZM, et al. Macrophage polarization in cancer and beyond: from inflammatory signaling pathways to potential therapeutic strategies[J]. *Cancer Lett*, 2025, 625: 217772. DOI: 10.1016/j.canlet.2025.217772.

(收稿日期: 2025-09-04)

(本文编辑: 保健媛 张耘菲)