

基于 mTOR-TFEB 自噬信号通路探讨白藜芦醇抑制脓毒性心肌损伤的实验研究

陈敏儿¹ 肖艳² 丁洪光³ 韩永丽² 曾举浩² 刘新强^{1,2}

¹广东省心血管病研究所,广东省人民医院,广东省医学科学院,广东广州 510080;南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)²重症医学科,³急诊科,广东广州 510080

通信作者:刘新强,Email:liuxinqiang@gdph.org.cn

【摘要】目的 分析白藜芦醇是否可以通过调控雷帕霉素靶蛋白-转录因子 EB (mTOR-TFEB) 信号通路抑制脓毒症心肌病的炎症反应。**方法** 选择清洁级雄性 SD 大鼠 32 只,按随机数字表法分为假手术组 (Sham 组)、脓毒症模型组 [盲肠结扎穿孔术 (CLP) 组]、白藜芦醇处理组 (Res 组) 和 mTOR 抑制剂组 (Torin1 组),每组 8 只。采用 CLP 构建脓毒症大鼠模型;Sham 组仅进行剖腹手术,不进行盲肠结扎、穿孔;Torin1 组于制模前 10 d 开始腹腔注射 mTOR 抑制剂 Torin1 注射液 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,每日 1 次,连用 10 d;Sham 组和 CLP 组于制模前通过相同途径给予等量生理盐水;Res 组制模前经腹腔注射 60 mg/kg 白藜芦醇注射液。各组制模后 6 h 采用超声心动图评价心功能;采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定大鼠血清中心肌钙蛋白 I (cTnI) 的水平;采用实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 检测各组大鼠心肌组织白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的 mRNA 表达;采用蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测各组大鼠心肌组织中磷酸化-mTOR (p-mTOR) 蛋白、TFEB (核)、TFEB (总)、轻链 3-II (LC3-II) 的蛋白表达;采用网络药理学方法模拟白藜芦醇与 mTOR 之间的相互作用。**结果** 与 Sham 组比较,CLP 组左室射血分数 (LVEF)、左室短轴缩短率 (FES) 均明显降低 [LVEF: 0.37 ± 0.02 比 0.69 ± 0.01 , FES (%): 17.8 ± 3.1 比 33.9 ± 2.8 ,均 $P < 0.01$],血清 cTnI 水平明显升高 (ng/L: 1935.96 ± 47.78 比 87.95 ± 7.98 , $P < 0.01$),血清炎症因子 IL-6、TNF- α 的 mRNA 表达水平明显上调 [IL-6 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 26.10 ± 2.08 比 1.61 ± 0.03 , TNF- α mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 12.80 ± 1.51 比 1.26 ± 0.22 ,均 $P < 0.01$],心肌组织 p-mTOR 的蛋白表达水平明显升高 (p-mTOR/ β -actin: 0.60 ± 0.07 比 0.30 ± 0.05),TFEB (总)、TFEB (核)、LC3-II 的蛋白表达水平明显降低 [TFEB (总)/ β -actin: 0.52 ± 0.08 比 0.80 ± 0.09 , TFEB (核)/H3: 0.36 ± 0.06 比 0.09 ± 0.07 , LC3-II/ β -actin: 0.25 ± 0.08 比 0.48 ± 0.08 ,均 $P < 0.01$];与 CLP 组比较,Res 组和 Torin1 组 LVEF、FES 明显升高 [LVEF: 0.66 ± 0.02 、 0.67 ± 0.03 比 0.37 ± 0.02 ; FES (%): 32.5 ± 3.5 、 33.7 ± 3.3 比 17.8 ± 3.1 ,均 $P < 0.01$],血清 cTnI 水平明显降低 (ng/L: 1216.88 ± 36.66 、 1225.78 ± 35.64 比 1935.96 ± 47.78 ,均 $P < 0.01$),血清炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 表达水平均明显下调 [IL-6 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 3.91 ± 0.46 、 4.14 ± 0.39 比 26.10 ± 2.08 , TNF- α mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 4.67 ± 1.16 、 5.16 ± 1.25 比 12.8 ± 1.51 ,均 $P < 0.01$],心肌组织 p-mTOR 的蛋白表达水平明显下降 (p-mTOR/ β -actin: 0.22 ± 0.05 、 0.24 ± 0.06 比 0.60 ± 0.07 ,均 $P < 0.01$),TFEB (总)、TFEB (核)、LC3-II 的蛋白水平均明显升高 [TFEB (总)/ β -actin: 0.86 ± 0.06 、 0.84 ± 0.07 比 0.52 ± 0.08 ; TFEB (核)/H3: 0.96 ± 0.08 、 0.86 ± 0.07 比 0.36 ± 0.06 ; LC3-II/ β -actin: 0.57 ± 0.07 、 0.55 ± 0.06 比 0.25 ± 0.08 ,均 $P < 0.01$]。使用网络药理学方法验证白藜芦醇与 mTOR 结合性良好。**结论** 白藜芦醇可以通过 mTOR-TFEB 信号通路增强心肌自噬,进而抑制脓毒症大鼠心肌病的炎症反应,以减轻脓毒性心肌损伤。

【关键词】 白藜芦醇; 脓毒性心肌损伤; 雷帕霉素靶蛋白; 转录因子 EB

基金项目: 广东省广州市科技计划项目 (202102080123); 广东省中医药局科研项目 (20211009)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2024.06.012

Mechanism of resveratrol inhibiting inflammatory response in sepsis associated cardiomyopathy based on mammalian target of rapamycin-transcription factor EB autophagy signaling pathway

Chen Min'er¹, Xiao Yan², Ding Hongguang³, Han Yongli², Zeng Juhao², Liu Xinqiang^{1,2}

¹Guangdong Cardiovascular Institute, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, Guangdong, China; ²Department of Critical Care Medicine, ³Department of Emergency, Guangdong Provincial People's Hospital (Guangdong Academy of Medical Sciences), Guangdong 510080, Guangzhou, China

Corresponding author: Liu Xinqiang, Email: liuxinqiang@gdph.org.cn

【Abstract】 Objective To analyse whether Resveratrol can inhibit the inflammatory response in septic cardiomyopathy by modulating the mammalian target of rapamycin-transcription factor EB (mTOR-TFEB) signaling pathway. **Methods** A total of 32 clean-grade male Sprague-Dawley (SD) rats were selected and divided into sham operation group (Sham group), sepsis model group [cecal ligation and puncture (CLP) group], Resveratrol group (Res group) and mTOR inhibitor group (Torin1 group), with 8 rats in each group. Sepsis was induced by CLP. The sham group only underwent laparotomy and did not perform CLP. In the Torin1 group, $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ of mTOR inhibitor Torin 1

injection was injected intraperitoneally 10 days before molding, once a day for 10 days. The Sham group and the CLP group were given the same amount of normal saline through the same route before molding. The Res group was injected intraperitoneally with 60 mg/kg Resveratrol injection before molding. At 6 hours after model establishment, the heart function was evaluated by echocardiography; Serum cardiac troponin I (cTnI) levels were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA expressions of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The protein expressions of phosphorylation-mTOR (p-mTOR), TFEB (nuclear), TFEB (total) and light chain 3- β (LC3- β) of myocardial tissue were detected by Western blotting. The interaction between Resveratrol and mTOR was simulated using a network pharmacology approach. **Results** Compared with the sham group, the left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular short-axis shortening rate (FES) were significantly reduced in the CLP group [LVEF: 0.37 ± 0.02 vs. 0.69 ± 0.01 , FES (%): 17.8 ± 3.1 vs. 33.9 ± 2.8 , both $P < 0.01$], serum cTnI levels were elevated (ng/L: 1935.96 ± 47.78 vs. 87.95 ± 7.98 , $P < 0.01$), the mRNA expression levels of IL-6 and TNF- α were significantly up-regulated [IL-6 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 26.10 ± 2.08 vs. 1.61 ± 0.03 , TNF- α mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 12.80 ± 1.51 vs. 1.26 ± 0.22 , both $P < 0.01$], serum levels of inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α mRNA were increased [IL-6 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 26.10 ± 2.08 vs. 1.61 ± 0.03 , TNF- α mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 12.80 ± 1.51 vs. 1.26 ± 0.22 , both $P < 0.01$], the expression level of p-mTOR protein in myocardial tissue was significantly increased (p-mTOR/ β -actin: 0.60 ± 0.07 vs. 0.30 ± 0.05), while the protein levels of TFEB (total), TFEB (nuclear) and LC3- β were significantly decreased [TFEB (total)/ β -actin: 0.52 ± 0.08 vs. 0.80 ± 0.09 , TFEB (nuclear)/H3: 0.36 ± 0.06 vs. 0.09 ± 0.07 , LC3- β / β -actin: 0.25 ± 0.08 vs. 0.48 ± 0.08 , all $P < 0.01$]; Compared with the CLP group, the Res group and the Torin1 group had significantly higher LVEF and FES [LVEF: 0.66 ± 0.02 , 0.67 ± 0.03 vs. 0.37 ± 0.02 ; FES (%): 32.5 ± 3.5 , 33.7 ± 3.3 vs. 17.8 ± 3.1 , both $P < 0.01$], serum cTnI level was decreased (ng/L: 1216.88 ± 36.66 , 1225.78 ± 35.64 vs. 1935.96 ± 47.78 , both $P < 0.01$), mRNA levels of serum inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α were decreased [IL-6 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 3.91 ± 0.46 , 4.14 ± 0.39 vs. 26.1 ± 2.08 , TNF- α mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 4.67 ± 1.16 , 5.16 ± 1.25 vs. 12.8 ± 1.51 , both $P < 0.01$], the p-mTOR protein expression in myocardial tissue was significantly decreased (p-mTOR/ β -actin: 0.22 ± 0.05 , 0.24 ± 0.06 vs. 0.60 ± 0.07 , all $P < 0.01$), the protein levels of TFEB (total), TFEB (nuclear), LC3- β were significantly increased [TFEB (total)/ β -actin: 0.86 ± 0.06 , 0.84 ± 0.07 vs. 0.52 ± 0.08 ; TFEB (nuclear)/H3: 0.96 ± 0.08 , 0.86 ± 0.07 vs. 0.36 ± 0.06 ; LC3- β / β -actin: 0.57 ± 0.07 , 0.55 ± 0.06 vs. 0.25 ± 0.08 , all $P < 0.01$]. Network pharmacology was used to verify that resveratrol binds well to mTOR. **Conclusion** Resveratrol enhanced cardiac autophagy via the mTOR-TFEB pathway, thereby attenuating myocardial inflammation and subsequent cardiac injury in septic rats.

【Key words】 Resveratrol; Sepsis associated cardiomyopathy; Mammalian target of rapamycin; Transcription factor EB

Fund program: Science and Technology Program of Guangzhou, Guangdong Province (202102080123); Scientific Research Project of Guangdong Traditional Chinese Medicine Bureau (20211009)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2024.06.012

脓毒症是临床常见的危重疾病,常伴有多器官功能障碍,表现在心脏为急性心肌抑制,以左心或右心可逆性收缩或舒张功能障碍为主,即脓毒性心肌病^[1]。在脓毒症患者中,发生心肌抑制的概率高达 18%~65%,病死率为 40%~70%,其发病机制复杂,病情进展迅速,目前西医领域尚缺乏针对脓毒性心肌抑制的特异性有效治疗方法,是脓毒症引起患者死亡的重要原因^[2]。白藜芦醇是一种多酚类化合物,可以从藜芦、虎杖苷等中药材中提取分离而来,具有抗炎、抗氧化、改善微循环和抑制血小板聚集等多种生物学功效^[3]。脓毒症急性炎症反应时,大量炎症因子导致的心肌细胞损伤是脓毒性心肌病的重要发病机制^[4]。目前的研究显示,白藜芦醇可减轻脓毒症大鼠炎症反应和急性心功能障碍^[5],但作用机制仍不明确。而既往的研究表明,雷帕霉素靶蛋白-转录因子 EB (mammalian target of rapamycin-transcription factor EB, mTOR-TFEB) 自噬信号通

路可能参与了调节脓毒性心肌损伤时的炎症反应^[6-7]。本研究通过分析白藜芦醇减轻心肌炎症反应,改善脓毒性心肌病大鼠心脏功能的作用机制,以期对脓毒性心肌病的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组: 选取 32 只 8~12 周龄、体质量 250~300 g 的清洁级雄性 SD 大鼠作为实验对象,均由华南理工大学动物实验中心提供,动物实验许可证号:SYXK(粤)2017-0178。按随机数字表法将大鼠分为假手术组(Sham 组)、脓毒症模型组(CLP 组)、mTOR 抑制剂处理组(Torin1 组)和白藜芦醇处理组(Res 组),每组 8 只。

1.2 动物模型制备和处置: 制模前 12 h,对大鼠实施禁食不禁水的预处理后,用 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,采用盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture, CLP)复制脓毒症动物模型^[8]。CLP 组、Res 组、Torin1 组采用 CLP 复制脓毒症动物模型;

Sham 组仅剖腹,不进行盲肠结扎、穿孔;Torin1 组于制模前 10 d 开始腹腔注射 mTOR 抑制剂 Torin 1 注射液 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,每日 1 次,连用 10 d^[9];Res 组制模前腹腔注射白藜芦醇注射液 60 mg/kg ^[10];其余各组制模前以相同途径注射等量生理盐水。

1.3 伦理学:本实验中动物处置方法符合动物伦理标准,并遵守华南理工大学实验动物中心管理规定,并已取得广东省人民医院医学研究伦理委员会批准(审批号:KY2020-444-01)。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 心脏功能检测:于制模前及制模成功后 6 h 行心脏超声检查,由 1 名不熟悉实验设计、经验丰富的操作者在胸骨旁短轴切面、乳头肌水平用 M 型超声心动图测量左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)和左室短轴缩短率(left ventricle fractional shortening, LVFS),连续测定 3~5 个心动周期,取平均值。

1.4.2 血清心肌损伤标志物测定:于制模前及制模成功后 6 h,经左心室取血 5~6 mL,离心后分离血清,采用酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)测定血清大鼠心肌肌钙蛋白 I(cardiac troponin I, cTnI)。

1.4.3 采用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测各组大鼠心肌组织白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的 mRNA 表达水平:采用颈椎脱臼法处死大鼠,取心脏后提取心肌组织总 RNA,通过反转录获得与 RNA 互补的 cDNA,然后采用特定引物进行 PCR 扩增。以 β 肌动蛋白(β -actin)为内参对照基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的表达量。

1.4.4 采用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测各组大鼠心肌组织中自噬相关蛋白的表达水平:取各组大鼠心脏组织,提取总蛋白及核蛋白,运用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定蛋白浓度,并依据测定结果调整上样体积,蛋白经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离定量后进行电泳、转膜、封闭,分别加入鼠源的抗磷酸化 mTOR(phosphate-mTOR, p-mTOR)抗体、TFEB 抗体、微管相关蛋白 1 轻链 3-II(light chain 3-II, LC3-II)抗体(1:1 000 稀释)4℃孵育过夜。次日用含吐温的 Tris 盐缓冲液(Tris buffered saline

with Tween, TBST)漂洗 3 次后,于 4℃环境下加入经 1:3 000 稀释的二抗,孵育 2 h。完成 TBST 洗膜步骤后,在暗室中加入发光液进行压片和曝光处理。采用 Fluor Chem 8900 软件分析图像的灰度值,以目的蛋白的灰度值与 β -actin 或组蛋白 H3 灰度值的比值作为目的蛋白的表达水平。

1.5 分子对接:分子对接技术是一种计算方法,可以预测大分子受体和小分子配体之间的非共价相互作用,目标是预测结合强度和结合构象^[11]。为了研究白藜芦醇与靶点 mTOR 之间的相互作用关系,通过 RCSB PDB 数据库获取白藜芦醇(PDB ID:4Q93)的 mol2 结构文件和 mTOR(PDB ID:4DRI)的 PDB 文件。采用 PyMOL 软件将蛋白质与配体分离、去除水分子。利用 AutoDockTools1.5.7 软件对受体蛋白进行优化处理,并将其转换为 pdbqt 格式。然后进行靶点 mTOR 与白藜芦醇的分子对接以获得结合能评分。使用 PyMOL 软件对分子对接的结果进行可视化呈现。

1.6 统计学分析:使用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析,呈正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,在进行组间及同组内不同时间点间的比较时,采用单因素方差分析方法,涉及两组数据的对比分析时则应用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

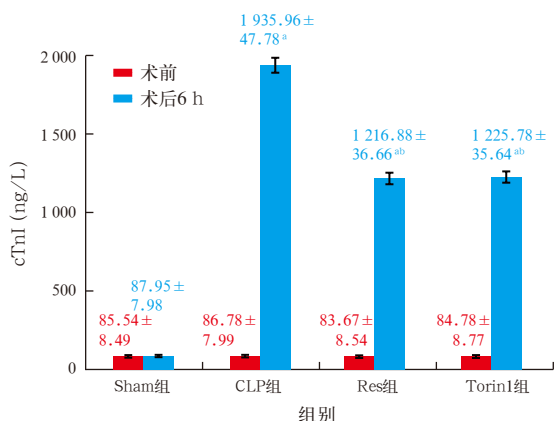
2.1 各组心脏功能指标比较(表 1):两组制模前 LVEF、LVFS 比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);制模后 6 h,与 Sham 组比较,CLP 组 LVEF、LVFS 明显降低($P < 0.01$);与 CLP 组比较,Res 组和 Torin1 组 LVEF、LVFS 明显升高(均 $P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠制模前后超声心动图测量参数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	LVEF		LVFS (%)	
		术前	术后 6 h	术前	术后 6 h
Sham 组	8	0.69 \pm 0.01	0.69 \pm 0.01	35.5 \pm 2.6	33.9 \pm 2.8
CLP 组	8	0.69 \pm 0.01	0.37 \pm 0.02 ^a	36.6 \pm 3.2	17.8 \pm 3.1 ^a
Res 组	8	0.69 \pm 0.01	0.67 \pm 0.03 ^b	34.9 \pm 3.5	32.5 \pm 3.5 ^b
Torin1 组	8	0.69 \pm 0.01	0.66 \pm 0.02 ^b	36.1 \pm 3.3	33.7 \pm 3.3 ^b

注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.01$;与 CLP 组比较,^b $P < 0.01$

2.2 各组血清心肌损伤标志物水平比较(图 1):两组制模前 cTnI 比较差异无统计学意义($P > 0.05$);制模后 6 h,CLP 组 cTnI 水平明显高于 Sham 组,Res 组和 Torin1 组 cTnI 水平较 CLP 组明显下降(均 $P < 0.01$)。



注：与 Sham 组比较，^a*P*<0.01；与 CLP 组比较，^b*P*<0.01

图1 各组大鼠制模前和制模后6h cTnI水平的比较

2.3 各组血清炎症因子水平比较(表2)：制模后6h, CLP组IL-6、TNF- α mRNA水平均明显高于Sham组；Res组和Torin1组IL-6、TNF- α mRNA水平均较CLP组明显下降(均*P*<0.01)。

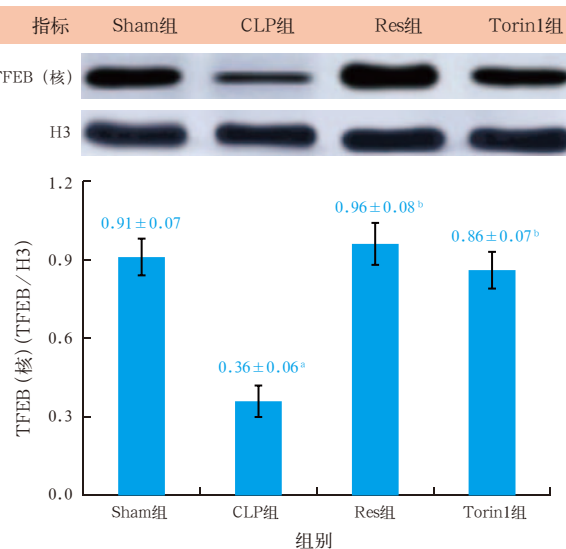
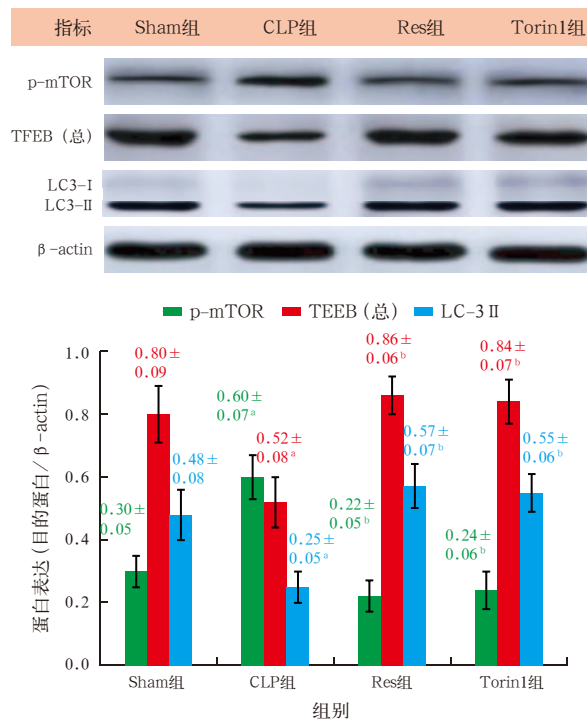
表2 各组大鼠制模前后心肌组织炎症因子mRNA表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	IL-6 mRNA 表达($2^{-\Delta\Delta Ct}$)		TNF- α mRNA 表达($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	
		制模前	制模后6h	制模前	制模后6h
Sham组	8	1.43 ± 0.04	1.61 ± 0.03	1.31 ± 0.23	1.26 ± 0.22
CLP组	8	1.25 ± 0.06	26.10 ± 2.08 ^a	1.25 ± 0.24	12.80 ± 1.51 ^a
Res组	8	1.34 ± 0.04	3.91 ± 0.46 ^b	1.29 ± 0.22	4.67 ± 1.16 ^b
Torin1组	8	1.19 ± 0.07	4.14 ± 0.39 ^b	1.30 ± 0.25	5.16 ± 1.25 ^b

注：与 Sham 组比较，^a*P*<0.01；与 CLP 组比较，^b*P*<0.01

2.4 各组心肌组织自噬相关蛋白的表达水平比较(图2)：自噬形成时胞浆型LC3即LC3-I会酶解掉一小段多肽,转变为自噬体膜型即LC3-II, LC3蛋白通常在Western blotting结果中呈现两个条带。制模后6h,与Sham组比较,CLP组心肌组织p-mTOR蛋白表达水平明显升高,TFEB(总)、TFEB(核)、LC3-II的蛋白表达水平均明显下降(*P*<0.01)；与CLP组比较,Res组和Torin1组p-mTOR的蛋白表达水平均明显下降,而TFEB(总)、TFEB(核)、LC3-II的蛋白表达水平均明显升高(均*P*<0.01)。

2.5 分子对接(图3)：若结合能<0,表明配体分子能和受体蛋白自发地结合,结合能 ≤ -5.02 kJ/mol,表明其结合性好,配体分子与受体蛋白的结合能越低,分子间的结合就越稳定,因此配体分子与受体蛋白相互作用的可能性就越大^[12]。将靶蛋白mTOR、与白藜芦醇对接,mTOR与白藜芦醇的结合能为27.32 kJ/mol,结果表明,mTOR与白藜芦醇结合性良好。运用PyMOL完成分子对接结果的可视化。



注：与 Sham 组比较，^a*P*<0.01；与 CLP 组比较，^b*P*<0.01

图2 各组大鼠制模后6h心肌组织自噬相关蛋白表达

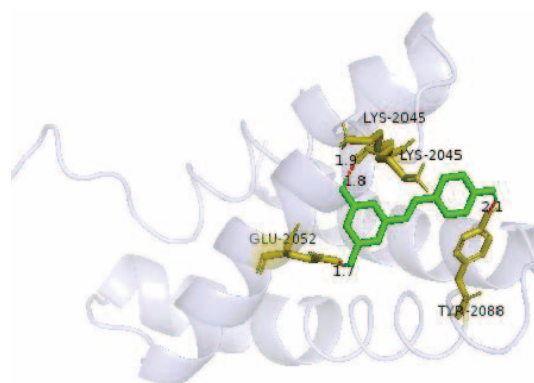


图3 mTOR与白藜芦醇分子对接的3D可视化效果

3 讨论

从现代西医学角度看,脓毒性心肌病是脓毒症发展过程中累及心脏的急性损伤,即当脓毒症诱发心肌抑制而未出现心肌结构改变时的一类疾病,表现为患者感染后外周血管功能和双心室功能障碍,严重影响患者的近期生存率^[1-2]。传统中医学文献中尚无脓毒性心肌病的命名,结合脓毒性心肌病患者的主要症状,中医学认为脓毒性心肌病可以归为“胸痹”范畴,汉代张仲景在《金匱要略》中,把胸痹的病因病机概括为“阳微阴弦”,指出其本质是本虚标实之证,即正气亏虚,邪气趁虚而入^[13]。研究表明,脓毒性心肌病的中医基本病机为毒热内蕴、络脉瘀滞以及正气不足^[14-15],因此清热解毒、活血化瘀、通里攻下和扶正固本为其治疗原则^[14, 16-17]。虽然近年来脓毒性心肌病已经受到临床医师的广泛关注,治疗策略较前已取得部分进展,但其仍有高发病率及高病死率的特点,目前临床治疗效果仍较差,给临床医疗体系带来了沉重负担。因此,从中医和西医结合的角度出发,探究脓毒性心肌病的发病机制及治疗靶点,寻求有效的药物干预,对于提高并发心肌抑制脓毒症患者的生存率和改善预后至关重要。

脓毒症所致全身炎症反应是心肌损害的重要机制^[1, 4]。脓毒症时,循环系统激活和心肌细胞释放的大量炎症因子(IL-1、IL-6、IL-8、TNF- α)可直接损伤心肌细胞,抑制心脏功能^[1, 4];而细胞自噬活性是调节脓毒症炎症反应的重要环节。自噬是活细胞内的核心分解代谢途径之一,主要通过自噬溶酶体降解胞内损伤的蛋白或细胞器等,以维持胞内微环境的平衡状态^[17]。细胞自噬在脓毒症发展过程中可以加快清除细菌毒性代谢产物,减轻炎症反应,以发挥细胞保护作用。其中,LC3-II 或 LC3-II/I 的比值与自噬的比例呈正相关,可以反映自噬活性^[18-19]。自噬活性在脓毒症早期可短暂升高,随即出现活性衰减^[20];由于自噬活性衰减不足以应对脓毒症的炎症因子风暴,可导致免疫细胞凋亡和免疫麻痹^[21]。本研究显示,与 Sham 组比较,CLP 模型组大鼠心脏功能指标 LVEF、LVFS 明显下降,而血清 cTnI 水平升高,反映出脓毒症大鼠存在心肌细胞损伤及心功能障碍,且血清炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 水平明显升高,但 LC3-II 未见明显改变,说明心肌细胞自噬活性抑制、炎症反应级联扩大导致心肌细胞损伤是脓毒性心肌病发生发展的关键环

节。因此,探索药物增加损伤心肌细胞自噬活性,减轻心肌炎症反应,以期改善脓毒症时心脏功能障碍。

从中医学角度分析发病机制,脓毒性心肌病的病性主要为病原菌实邪致病,辨证应用扶正祛邪的药物(黄芪、当归、金银花、青蒿、虎杖等)可有一定改善^[22]。白藜芦醇是从藜芦、虎杖等多种天然中医药种子中提取的非黄酮类多酚类有机成分,具有抗炎、抗氧化、促进微循环、抑制血小板聚集等多种生物学功效,当其进入机体后,主要在血流丰富的器官如心脏、肝脏、肾脏和大脑等部位被吸收并分布^[3]。早期研究表明,白藜芦醇有治疗休克的作用,能一定程度上预防和治疗重症休克后的毛细血管无复流现象以及难治性低血压;此外,白藜芦醇还能提高脓毒性休克模型动物的生存率,其疗效甚至优于目前已知的抗休克药物^[23]。近年来研究表明,白藜芦醇在脓毒症中可以减轻心肌损伤、改善心脏功能以及减少炎症因子形成^[3]。本研究证实,与 CLP 组比较,白藜芦醇干预后脓毒症大鼠心脏功能(LVEF、LVFS)显著改善,而血清 cTnI 及炎症因子(TNF- α 、IL-1 β)水平下调,LC3 II 含量明显增加,表明白藜芦醇增加细胞自噬活性,减少炎症反应及心肌细胞损伤,从而改善心脏功能。但目前白藜芦醇保护心脏功能的机制仍不明确。

于自噬而言,已有多种机制通路证实参与其调控,其中 mTOR-TFEB 信号通路与细胞的自噬功能密切相关^[7, 24]。当细胞受到损伤刺激后, p-mTOR 蛋白表达增加,增加 mTOR 活性, TFEB 磷酸化水平上调, TFEB 入核数量减少,自噬活性降低。在心肌缺血缺氧模型中证实,白藜芦醇可以通过调节 mTOR 自噬信号通路,增强心肌细胞自噬,从而增加心肌细胞的存活,且国内研究表明,白藜芦醇可以通过激活 TFEB 去磷酸化的表达,减少血管内皮细胞氧化应激水平,从而增加细胞的存活^[25]。采用网络药理学方法,发现 mTOR 与白藜芦醇结合性良好;与 CLP 组比较,白藜芦醇可以下调 p-mTOR 水平,抑制 mTOR 活性,从而增加 TFEB 的去磷酸化水平,促进 TFEB 入核并结合相应自噬靶蛋白,上调 LC3-II 的表达。因此人们推断:白藜芦醇可以通过 mTOR-TFEB 信号通路调控心肌自噬活性,抑制心肌细胞炎症反应并改善心脏功能。

综上所述,心功能障碍是危重脓毒症引起患者死亡的重要原因之一。本研究表明,在脓毒症大鼠心肌组织中,炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 的 mRNA 表

达水平显著上调,从而导致心肌细胞受损;而白藜芦醇干预后可减轻心肌细胞炎症反应,改善心功能,其发挥心功能保护作用的机制可能是通过调节 p-mTOR 水平,促使 TFEB 入核,增加脓毒性心肌细胞自噬活性,减轻细胞炎症反应。本研究为中医药白藜芦醇在脓毒性心肌病治疗中的临床应用提供了新的理论支持,对减少重症脓毒症患者出现心功能障碍有重要意义。但白藜芦醇的生物利用度较低,且代谢速率较快,难以维持体内药物浓度。白藜芦醇的生物学安全性基本得到全球性认可,但其野生原材料采集和提取质量控制尚未形成体制,有待进一步完善。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hollenberg SM, Singer M. Pathophysiology of sepsis-induced cardiomyopathy [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2021, 18 (6): 424–434. DOI: 10.1038/s41569-020-00492-2.
- [2] Xie JF, Wang HL, Kang Y, et al. The epidemiology of sepsis in Chinese ICUs: a national cross-sectional survey [J]. *Crit Care Med*, 2020, 48 (3): e209–e218. DOI: 10.1097/CCM.0000000000004155.
- [3] Li JJ, Zeng XT, Yang FX, et al. Resveratrol: potential application in sepsis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 821358. DOI: 10.3389/fphar.2022.821358.
- [4] Wang RZ, Xu YR, Fang YX, et al. Pathogenetic mechanisms of septic cardiomyopathy [J]. *J Cell Physiol*, 2022, 237 (1): 49–58. DOI: 10.1002/jcp.30527.
- [5] An R, Zhao L, Xu J, et al. Resveratrol alleviates sepsis-induced myocardial injury in rats by suppressing neutrophil accumulation, the induction of TNF- α and myocardial apoptosis via activation of Sirt1 [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14 (6): 5297–5303. DOI: 10.3892/mmr.2016.5861.
- [6] Krakauer T, Buckley M, Issaq HJ, et al. Rapamycin protects mice from staphylococcal enterotoxin B-induced toxic shock and blocks cytokine release *in vitro* and *in vivo* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54 (3): 1125–1131. DOI: 10.1128/AAC.01015–09.
- [7] Li F, Lang FF, Zhang HL, et al. Role of TFEB mediated autophagy, oxidative stress, inflammation, and cell death in endotoxin induced myocardial toxicity of young and aged mice [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 5380319. DOI: 10.1155/2016/5380319.
- [8] Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, et al. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis [J]. *Trends Microbiol*, 2011, 19 (4): 198–208. DOI: 10.1016/j.tim.2011.01.001.
- [9] Zhao XC, Chen YH, Tan XF, et al. Advanced glycation end-products suppress autophagic flux in podocytes by activating mammalian target of rapamycin and inhibiting nuclear translocation of transcription factor EB [J]. *J Pathol*, 2018, 245 (2): 235–248. DOI: 10.1002/path.5077.
- [10] Shang XL, Lin KY, Yu RG, et al. Resveratrol protects the

myocardium in sepsis by activating the phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K)/AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway and inhibiting the nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 9290–9298. DOI: 10.12659/MSM.918369.

- [11] Yuan HJ, Liu Y, Huang K, et al. Therapeutic mechanism and key active ingredients of Shenfu injection in sepsis: a network pharmacology and molecular docking approach [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 9686149. DOI: 10.1155/2022/9686149.
- [12] 王恺,王琳,于勇,等.基于网络药理学及分子对接技术探讨小承气汤治疗急性胰腺炎机制的研究[J].中国中西医结合急救杂志,2023,30(5):568–575. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2023.05.011.
- [13] 赵丹,杨志旭.《金匱要略》治疗胸痹心痛“角药”的配伍应用分析[J].中国中医急症,2020,29(2):352–354. DOI: 10.3969/j.issn.1004-745X.2020.02.049.
- [14] 李志军,李银平.王今达教授“菌毒炎并治”脓毒症的实验基础与临床实践总结[J].中华危重病急救医学,2017,29(12):1062–1064. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.12.002.
- [15] 李昕原,吴彩军,郭楠,等.脓毒症心肌病的研究进展[J].中国中西医结合急救杂志,2019,26(3):373–378. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2019.03.030.
- [16] 冯志乔,李银平,李志军.弘扬“三衰”抢救精神践行“四证四法”防治脓毒症[J].中国中西医结合急救杂志,2021,28(1):8–10. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2021.01.003.
- [17] 李志军,李银平.从“卫气营血”辨证到“三证三法”看脓毒症的诊治思辨[J].中华危重病急救医学,2019,31(2):135–138. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.02.002.
- [18] Mizushima N, Levine B. Autophagy in human diseases [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383 (16): 1564–1576. DOI: 10.1056/NEJMr2022774.
- [19] 张卫丰,马海龙,张金玲.橙皮素抑制 TLR4-mTOR-ULK1 信号通路对心肌缺血再灌注损伤大鼠细胞自噬和凋亡的影响[J].实用检验医师杂志,2024,16(2):133–138. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2024.02.010.
- [20] Takahashi W, Watanabe E, Fujimura L, et al. Kinetics and protective role of autophagy in a mouse cecal ligation and puncture-induced sepsis [J]. *Crit Care*, 2013, 17 (4): R160. DOI: 10.1186/cc12839.
- [21] Lo S, Yuan SS, Hsu C, et al. LC3 over-expression improves survival and attenuates lung injury through increasing autophagosomal clearance in septic mice [J]. *Ann Surg*, 2013, 257 (2): 352–363. DOI: 10.1097/SLA.0b013e318269d0e2.
- [22] 刘洋,梁群,李鹤然,等.中医药治疗脓毒症心肌损伤的研究进展[J].中国中医急症,2022,31(7):1298–1301. DOI: 10.3969/j.issn.1004-745X.2022.07.048.
- [23] 周明明,蒋正英,李蕊,等.白藜芦醇对脓毒症所诱导大鼠心肌损伤的保护作用及其机制研究[J].免疫学杂志,2018,34(12):1053–1058. DOI: 10.13431/j.cnki.immunol.j.20180164.
- [24] Kumar S, Jain A, Choi SW, et al. Mammalian Atg8-family proteins are upstream regulators of the lysosomal system by controlling mTOR and TFEB [J]. *Autophagy*, 2020, 16 (12): 2305–2306. DOI: 10.1080/15548627.2020.1837423.
- [25] Zhou X, Yang JN, Zhou M, et al. Resveratrol attenuates endothelial oxidative injury by inducing autophagy via the activation of transcription factor EB [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2019, 16: 42. DOI: 10.1186/s12986-019-0371-6.

(收稿日期:2024-06-13)

(责任编辑:邸美仙)

关于杜绝和抵制第三方机构代写代投稿件的通知

近期本刊编辑部监测到部分用户使用虚假的手机号和 Email 地址注册账号,这些账号的投稿 IP 地址与作者所在单位所属行政区域严重偏离,涉嫌第三方机构代写代投。此类行为属于严重的学术不端,我们已将排查到的稿件信息通报编辑部各位编审人员,杂志社处理收稿的编务部门也将对此类账号做封禁处理,相关稿件一律做退稿处理。

为弘扬科学精神,加强科学道德和学风建设,抵制学术不端行为,端正学风,维护风清气正的良好学术生态环境,请广大读者和作者务必提高认识,规范行为,以免给作者的学术诚信、职业发展和所在单位的声誉带来不良影响。