DOI:10.16016/j.2097-0927.202303166

线粒体分裂抑制剂 Mdivi-1 对脓毒症大鼠肠道屏障功能的保护作用

汤春琼[1],朱 娱[2],王 易[1],叶 蕤[1],刘良明[2],李 涛[2],毛庆祥[1] 400042 重庆,陆军特色医学中心:麻醉科[1],野战外科研究部战伤休克与输血研究室,创伤与化学中毒全国重点实验室[2]

[摘要] **目的** 拟探讨线粒体分裂抑制剂 Mdivi-1 对脓毒症大鼠肠道屏障功能的保护作用。**方法** 采用盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture,CLP)复制大鼠脓毒症模型,根据脓毒症救治指南采用乳酸林格氏液(35 mL/kg)进行常规复苏,输液速度 3 mL/h。同时在常规复苏的基础上静脉予以 1 mg/kg Mdivi-1 进行治疗。复苏结束后 2 h 观察各组大鼠肠道屏障功能、肠道中闭锁小带蛋白(zonula occludes-1,ZO-1)的表达、小肠病理变化、血清炎症因子肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor α,TNF-α)和白介素 1-β(Interleukin-1β,IL-1β)的浓度、平均动脉血压(mean arterial blood pressure,MAP)和生存时间及 72 h 存活率。**结果** 与假手术组相比,脓毒症大鼠肠通透性明显增加,D-乳酸明显升高,血清中炎性因子 TNF-α 和 IL-1β 浓度显著增高($P<0.05$);病理结果显示肠绒毛断裂,腺体萎缩,炎性细胞显著增多。常规复苏治疗后,与脓毒症组相比,血清中 TNF-α 和 IL-1β 浓度、肠通透性、D-乳酸浓度轻微降低,肠绒毛紊乱轻微改善,提示常规复苏治疗后对脓毒症的保护作用是有限的。与常规治疗组相比,常规治疗联合线粒体分裂抑制剂 Mdivi-1 治疗后大鼠血清中 TNF-α 和 IL-1β 浓度、肠通透性、D-乳酸浓度显著降低($P<0.05$),病理结果显示肠绒毛结构清晰,炎性细胞浸润明显改善。肠组织免疫荧光结果显示,与假手术组相比,脓毒症后紧密连接发生断裂,Mdivi-1 治疗后较脓毒症组紧密连接断裂发生明显好转。细胞水平上,LPS 刺激后肠上皮细胞间 ZO-1 表达量显著降低($P<0.05$),Mdivi-1 治疗后可逆转 LPS 导致的 ZO-1 表达量的降低($P<0.05$)。**结论** Mdivi-1 对脓毒症大鼠的肠道屏障功能具有保护作用,其机制可能是通过调节 ZO-1 的表达。

[关键词] Mdivi;脓毒症;肠屏障功能;线粒体
[中图法分类号] R322.45; R631.1; R977.6 [文献标志码] A

Mitochondrial division inhibitor Mdivi-1 protects intestinal barrier function in septic rats

TANG Chunqiong[1], ZHU Yu[2], WANG Yi[1], YE Rui[1], LIU Liangming[2], LI Tao[2], MAO Qingxiang[1] [1]Department of Anesthesiology, [2]State Key Laboratory of Trauma and Chemical Poisoning, Department of War Wound Shock and Transfusion, Army Medical Center of PLA, Chongqing, 400042, China

[**Abstract**] **Objective** To investigates the protective effect of mitochondrial division inhibitor, Mdivi-1, on intestinal barrier function in septic rats. **Methods** A total of 160 SD rats were randomly and equally divided into sham operation group, sepsis group (established by cecal ligation and puncture), conventional treatment group, and Mdivi-1 treatment group. The rats from the conventional treatment group were given lactated Ringer's solution (35 mL/kg) at an infusion rate of 3 mL/h according to the guidelines for sepsis treatment, and those from the Mdivi-1 treatment group were added with intravenous administration of 1 mg/kg Mdivi-1 for resuscitation on the basis of conventional treatment. After 2 h of resuscitation, intestinal barrier function, intestinal expression of zonula occludes-1 (ZO-1), pathological changes in small intestine, serum concentrations of inflammatory cytokines (including TNF-α and IL-1β), mean arterial blood pressure

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82270523)
[通信作者] 毛庆祥,E-mail:maomaosmmu@126.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

(MAP), survival time and 72-hour survival rate were observed. Intestinal epithelial cells (IECs) were employed to observe the effect of Mdivi-1 on the expression of ZO-1 under the simulation of LPS. **Results** The septic rats had significantly increased intestinal permeability, D-lactate level and serum concentrations of TNF-α and IL-1β when compared with those of the sham operation group ($P<0.05$), and showed intestinal villus rupture, glandular atrophy, and great amount of inflammatory cells in pathological observation. Conventional treatment resulted in slightly decreased serum concentrations of TNF-α and IL-1β, intestinal permeability, and D-lactate level ($P>0.05$), and mildly improved intestinal villus disturbance when compared with the sepsis group. Mdivi-1 treatment combined with conventional treatment significantly decreased serum concentrations of TNF-α and IL-1β, intestinal permeability, and D-lactate level in comparison with septic rats ($P<0.05$), and pathological results showed clear intestinal villus structure and significantly improved inflammatory cell infiltration. The immunohistochemical results of intestinal tissue showed that ruptured tight junction was observed after sepsis, and Mdivi-1 treatment significantly improved the tight junction rupture. At the cellular level, the expression level of ZO-1 between IECs was significantly decreased after LPS stimulation ($P<0.05$), and Mdivi-1 treatment increased LPS-induced decrease in ZO-1 expression ($P<0.05$). **Conclusion** Mdivi-1 has a protective effect on intestinal barrier function in septic rats, which may be through its regulating ZO-1 expression.

[**Key words**] Mdivi-1; sepsis; intestinal barrier function; mitochondria

Supported by the General Program of the National Natural Science Foundation of China (82270523). Corresponding author: MAO Qingxiang, E-mail: maomaosmmu@126.com

脓毒症是细菌等病原微生物侵入机体,细菌毒素等成分激活机体炎症反应细胞,产生并释放大量炎性介质,导致局部或全身炎症反应的综合征,严重时可引起器官功能障碍。据统计全球每年有数百万人患脓毒症,死亡率高达25%[1]。肠道屏障功能受损是脓毒症重要的病理生理过程,细菌移位进一步加重脓毒症,这是启动多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome,MODS)中的重要环节[2-3]。因此,保护肠道屏障功能对脓毒症治疗及预后至关重要,然而目前针对脓毒症肠屏障功能障碍的治疗缺乏有效手段。

线粒体是体内重要的细胞器,是细胞进行有氧呼吸的重要场所[4]。有研究表明,线粒体一直处于分裂和融合的动态平衡中,但过度的分裂或融合对线粒体的功能存在着一定的影响[5]。本课题组前期研究发现,脓毒症时线粒体分裂与融合的动态平衡被破坏,线粒体分裂明显增加[6]。有研究表明,维持线粒体形态可改善内毒素诱导的肺功能损伤[7],但是尚不清楚恢复线粒体形态是否可改善脓毒症时肠道屏障功能受损。

Mdivi-1是一种线粒体分裂抑制剂,通过抑制动力相关蛋白1(dynamin-related protein 1,Drp1)GTPase活性,减少Drp1转位,从而抑制线粒体分裂。既往研究发现Mdivi-1能改善实验性蛛网膜下腔出血后的脑损伤[4]。同时,Mdivi-1能通过抑制Drp1依赖的线粒体分裂,恢复线粒体形态,减轻血管紧张素诱导的高血压[8]。但目前关于Mdivi-1对脓毒症肠屏障功能损伤影响的研究报道较少。

本研究利用盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture,CLP)复制脓毒症大鼠模型和LPS诱导的肠上皮细胞(intestinal epithelial cells,IEC)脓毒症模型,观察Mdivi-1对脓毒症肠道屏障功能的保护作用。

1 材料与方法

1.1 试剂

SPF级SD大鼠,雌雄各半,12~14周龄,体质量(200±20) g(陆军特色医学中心实验动物中心提供)。Mdivi-1购自美国Tocris bioscience公司;闭锁小带蛋白(zonula occludes-1,ZO-1)抗体购自中国博士德公司;DMEM培养基、胰蛋白酶购自美国HyClone公司;胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)购自美国Science Cell公司;脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)、伊文思蓝(Evans Blue,EB)和异硫氰酸荧光素标记的牛血清白蛋白(albumin fluorescein isothiocyanate conjugate,FITC-BSA)购自美国Sigma公司;肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)、白介素-1β(interleukin-1β,IL-1β)、二胺氧化酶(diamineoxidase,DAO)和D-乳酸(D-lactate,D-lac)ELISA试剂盒购自中国南京建成生物工程研究所。

1.2 脓毒症模型的建立

脓毒症模型制备按文献[6]的方法进行,SD大鼠用戊巴比妥钠(35 mg/kg)麻醉后,碘酒消毒腹部,沿腹直肌剪开腹部,剪去腹腔内大网膜,暴露盲肠,将盲肠内的粪便往盲肠末端充实直至末端盲肠没有气泡,在距盲肠

末端 0.7 cm 处用无菌丝线结扎,采用直径为 0.8 cm 无菌锥形针在已结扎盲肠远端中央处贯通穿刺后,将盲肠按原位送回腹腔,逐层缝合肌肉皮肤,按 2 mL/100 g 大鼠注射无菌生理盐水,放回笼中禁食不禁水饲养。模型制作 12 h 以后,动脉置管监测平均动脉压(mean arterial blood pressure,MAP),当 MAP 下降 30%或以上,认为模型成功。本实验模型成功率为 85%。

1.3 实验方案

160 只 SD 大鼠按照随机数字表法分为 4 组:假手术组、脓毒症组、常规治疗组、Mdivi-1 治疗组,每组 40 只。脓毒症组采用盲肠结扎穿孔的方法制备;常规治疗组给予乳酸林格氏液体(35 mL/kg)复苏,输液速度 3 mL/h,同时予以血管活性药物多巴胺(1.75 mg/kg)及头孢呋辛钠(100 mg/kg)持续静脉推注[9];Mdivi-1 治疗组在常规治疗的基础上静脉予以 1 mg/kg Mdivi-1 进行治疗[6];假手术组仅对实验大鼠做剖腹探查盲肠术,不做其他处理。复苏结束后 2 h 观察各组大鼠肠通透性、小肠病理变化、血清炎症因子 TNF-α 和 IL-1β 的浓度、肠道功能、MAP 和生存时间及 72 h 存活率。

培养 IEC,分为正常对照组、LPS 组、Mdivi-1 组。正常对照组:实验前 1 d 用无血清培养基培养 24 h;LPS 组:实验前 1 d 用无血清培养基培养 24 h 后,1 μg/mL LPS 刺激 12 h;Mdivi-1 组:实验前 1 d 用无血清培养基培养 24 h,1 μg/mL LPS 刺激 12 h,再加入 10 μmol/L Mdivi-1 处理 1 h。检测肠上皮细胞 ZO-1 的蛋白表达量。

1.4 方法

1.4.1 肠道通透性测定 采用 Evans Blue(EB)测定肠通透性,距胃约 6 cm 处取大鼠小肠 7 cm,PBS 将肠腔冲净并制备肠囊。一端用丝线结扎后,向肠囊注入 0.2 mL 1.5% EB 溶液,结扎另一端。将肠囊置于 37 ℃水浴锅中水浴 30 min,取出用 2.5%枸橼酸钠冲洗至澄清后,置于 50 ℃烤箱干燥 24 h,称肠干质量后加入 2 mL 甲酰胺溶液 37 ℃水浴锅下孵育 24 h,稀释 3 倍后在酶标仪上 650 nm 处测定光密度(OD)值,并根据标准曲线计算肠组织中 EB 含量,以每克肠组织的 OD 值表示肠道通透性。

1.4.2 肠系膜微血管通透性的改变 沿腹直线做 3~4 cm 大小的切口,将小肠展开放在观察板上,滴加 37 ℃生理盐水使小肠保持湿度和温度,用配用的 37 ℃恒温装置的生物显微镜进行观察;选择直径 30~50 μm、长 200 μm 且无分支、无明显弯曲的肠系膜微静脉,通过连接在显微镜的 CCD 彩色摄像机在显示屏上观察,记录股静脉注射 FITC-BSA(9 mg/kg)0、1、3、5 min 后微血管的通透性变化。

1.4.3 血清 TNF-α、DAO、IL-1β 浓度测定 大鼠取全血后,3 500×*g* 10 min 离心,取上清用于测定 TNF-α、DAO、IL-1β 浓度,根据试剂盒说明书操作,各孔加 100 μL 待测上清和标准品倍比稀释液在酶标板上,设置复孔,37 ℃下孵育 90 min 后,甩尽孔内液体,加入生物素化抗体工作液,37 ℃下孵育 60 min,洗板 3 次,每孔加入 100 μL 酶结合物工作液,37 ℃下孵育 30 min,洗板 5 次,各孔加入 90 μL 底物溶液,37 ℃孵育直至标准孔前 4 个出现明显梯度(最晚不可超过 30 min),每孔加入 90 μL 反应终止液,酶标仪 450 nm 处测定 OD 值。

1.4.4 血清 D-lac 浓度测定 大鼠取全血后,3 500×*g* 10 min 离心,取上清用于测定 D-lac 浓度,根据试剂盒说明书操作,每孔加入 5 μL 待测样品或标准品,各孔依次加入 100 μL 酶工作液和 20 μL 显色剂,37 ℃孵育 10 min,各孔加入 180 μL 终止液,于波长 530 nm 处测定各孔 OD 值。

1.4.5 肠道组织苏木精-伊红(HE)染色 距胃端约 6 cm 处取 1 段小肠进行 HE 染色,具体步骤如下:用 PBS 将肠腔冲净后放入 4%多聚甲醛中浸泡 48 h 以上,脱水透明 12 h,包埋,切片机上按每张切片厚度 4 μm 切片,HE 染色后在显微镜下观察。400 倍镜下观察每组各视野肠绒毛与腺体排列的整齐程度、杯状细胞的数量以及绒毛间质有无炎性细胞的浸润。

1.4.6 肠组织 ZO-1 免疫荧光的观察 距胃端约 6 cm 处取 1 段小肠,冲洗干净后放入 4%多聚甲醛浸泡 48 h 以上,脱水透明 12 h,包埋,切片机上按每张切片厚度为 4 μm 切片,脱蜡和复水,高压锅加热在二级水中修复抗原 3 min,0.3%Triton 破膜 4 min,3%过氧化氢浸泡 5 min,滴加 ZO-1(1∶200),4 ℃过夜。吸去一抗,孵育二抗(ALEXA 488,抗兔,1∶200)1 h,吸去二抗,37 ℃孵育 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)5 min,显微镜下观察肠组织 ZO-1 的表达情况。

1.4.7 MAP、存活率及生存时间 戊巴比妥钠麻醉 SD 大鼠后,按各分组处理,输液过程中每 30 min 记录大鼠 MAP 变化情况。输液完毕后,结扎伤口,缝合,肌注双抗(青霉素 20 万单位/kg,链霉素 20 万单位/kg),放回笼中饲养,并计算大鼠 72 h 存活率和存活时间。

1.5 统计学分析

存活时间和存活率用中位数及四分位数间距分析,其他计量数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,进行重复测量单因素方差分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

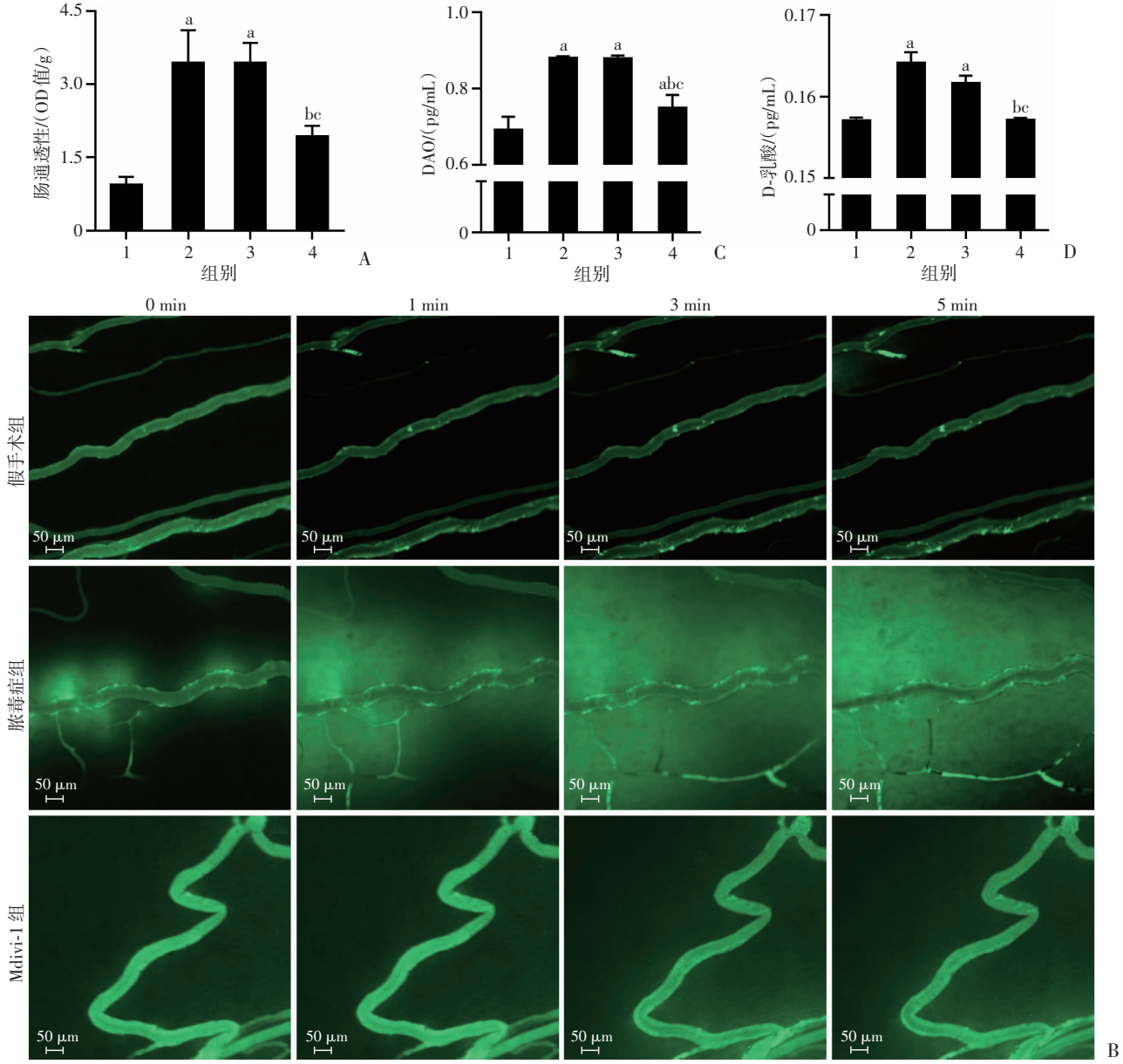
2.1 Mdivi-1 对脓毒症大鼠肠通透性的保护作用

观察肠道对 EB 的渗漏与肠道微血管的渗漏情况

及 DAO 和 D-lac 的变化。结果发现,与假手术组比较,脓毒症大鼠的肠通透性明显升高,主要表现为大鼠肠组织对 EB 的通透性增加,假手术组肠 EB 的含量为 0.9 OD 值/g,脓毒症组肠 EB 的含量显著增加,与假手术组比较,增加了 2.7 倍,常规治疗后可轻微降低肠通透性。Mdivi-1 治疗后肠 EB 的含量明显降低,与常规治疗组比较,降低了 44%,说明 Mdivi-1 可改善肠通透性(图 1A)。

脓毒症后肠系膜微血管受到损伤,其通透性明显增加,用 FITC-BSA 观察肠系膜微血管的通透性。结果发现:假手术组肠系膜微静脉在 FITC-BSA 作用 5 min 下无明显改变;脓毒症组肠系膜微静脉在 FITC-BSA 1 min 后开始从血管往组织渗漏,并随着 FITC-BSA 作用时间延长,渗漏到组织间隙的越多,到 FITC-BSA 作用 5 min 时,整个视野都散布着 FITC-BSA;Mdivi-1 处理组可明显改善 FITC-BSA 在微血管的渗漏(图 1B)。

脓毒症后,大鼠的肠道功能破坏,表现为脓毒症大鼠血清 DAO、D-lac 显著增加。常规治疗可轻微改善脓毒症大鼠的肠道功能,但与脓毒症比较差异无统计学意义。用 Mdivi-1 治疗后,血清 DAO、D-lac 显著降低,说明 Mdivi-1 可改善肠道功能(图 1C、D)。



1:假手术组;2:脓毒症组;3:常规治疗组;4:Mdivi-1 治疗组;a:$P<0.05$,与假手术组比较;b:$P<0.05$,与常规治疗组比较;c:$P<0.05$,与脓毒症组比较

A:肠道通透性的测定;B:肠系膜微血管通透性的测定;C:大鼠血清 DAO 的测定;D:大鼠血清 D-乳酸的测定

图 1 Mdivi-1 对脓毒症大鼠肠通透性的保护作用 ($n=8$,$\bar{x}\pm s$)

2.2　肠上皮细胞中 ZO-1 表达的变化

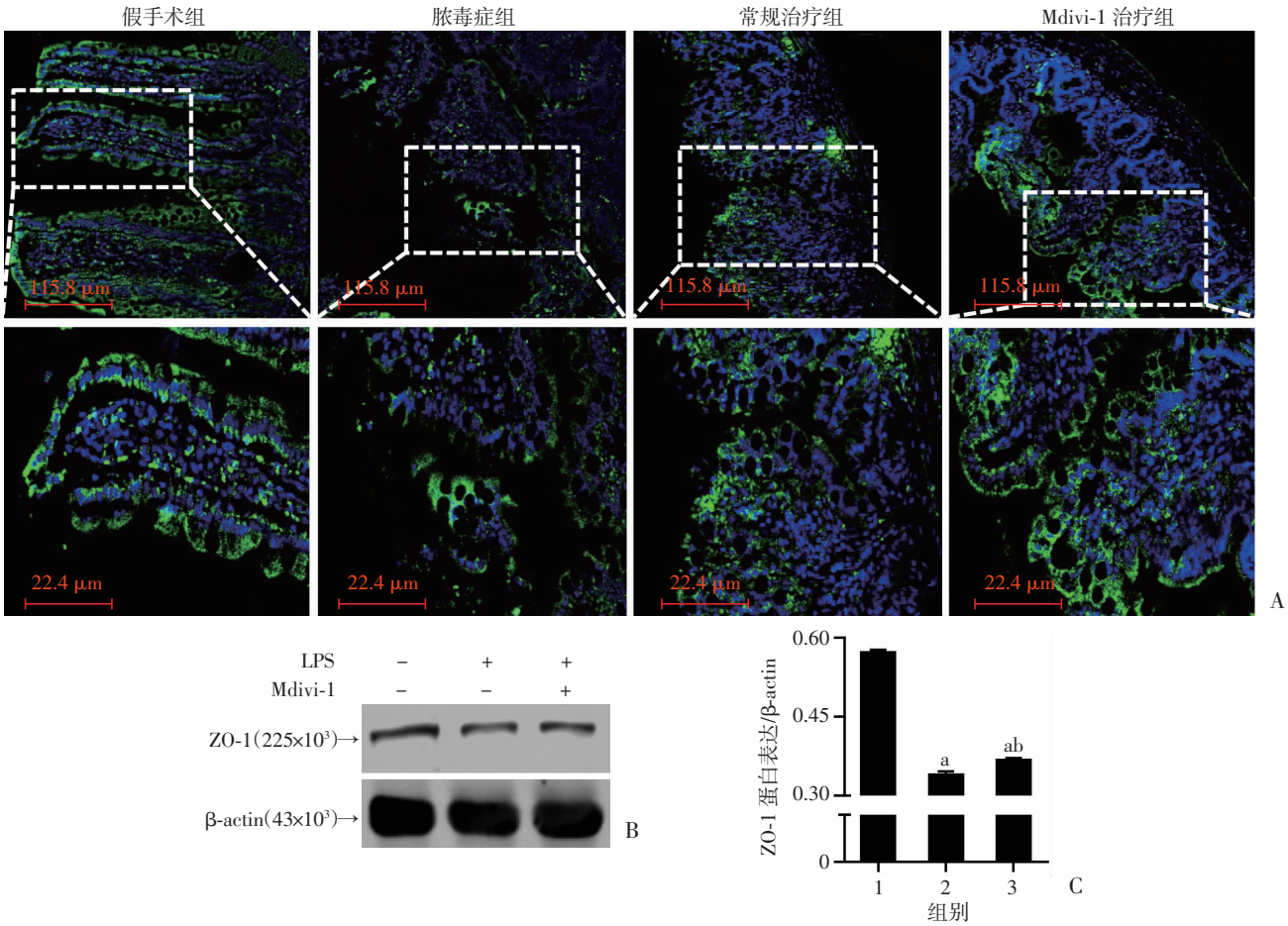
在动物水平上,通过组织免疫荧光观察紧密连接的改变,结果显示,假手术组肠组织紧密连接完整,脓毒症组肠组织紧密连接发生多处断裂,常规复苏后肠组织紧密连接断裂稍有改善,Mdivi-1 处理后肠组织紧密连接断裂情况明显改善(图 2A)。在动物实验中,观察到 Mdivi-1 可明显改善脓毒症时的肠道屏障功能受损,但在细胞水平上,Mdivi-1 对肠道的保护作用暂不清楚,进一步通过 IEC 细胞来验证 Mdivi-1 对肠道屏障功能的保护作用。ZO-1 蛋白表达结果显示,LPS 刺激后 ZO-1 蛋白的相对表达量显著降低,与正常对照组比较,降低了 40%,Mdivi-1 处理后可逆转 LPS 导致的 ZO-1 蛋白相对表达量的明显降低(图 2B、C)。

2.3　Mdivi-1 对脓毒症大鼠小肠病理结构的影响

小肠病理 HE 染色显示假手术组小肠绒毛与腺体整齐排列,结构清楚,可见少许杯状细胞,绒毛间质未见炎性细胞。脓毒症大鼠小肠病理结构显示小肠绒毛发生萎缩,部分肠绒毛断裂,排列紊乱,腺体萎缩,杯状细胞大量增加,绒毛间质有炎性细胞浸润。常规治疗后小肠绒毛排列整齐程度轻微改善,但绒毛间质炎性浸润仍很明显,Mdivi-1 治疗后小肠绒毛排列较整齐,绒毛结构清晰,杯状细胞减少,绒毛间质炎性细胞浸润明显改善,说明 Mdivi-1 可改善脓毒症大鼠小肠的病理结构(图 3)。

2.4　Mdivi-1 对脓毒症大鼠血清炎症因子的影响

脓毒症大鼠体内发生明显的炎症反应,表现为血清中 TNF-α、IL-1β 水平显著升高,与假手术组比较,分别升高了 5 倍和 34%。用乳酸林格氏液体常规治疗后,大鼠的炎症反应轻微减轻,用 Mdivi-1 治疗后,炎症因子 TNF-α、IL-1β 显著降低,与常规治疗组比较,TNF-α 降低了 46%,说明 Mdivi-1 可减轻脓毒症大鼠的炎症反应(图 4)。



A:显微镜下观察肠组织 ZO-1 的情况;B:IEC 细胞 ZO-1 的蛋白表达水平;C:IEC 细胞 ZO-1 的蛋白表达水平的定量分析　1:正常对照组;2:LPS 组;3:Mdivi-1 治疗组;a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 组比较

图 2　Mdivi-1 对肠上皮细胞紧密连接蛋白 ZO-1 表达水平的影响

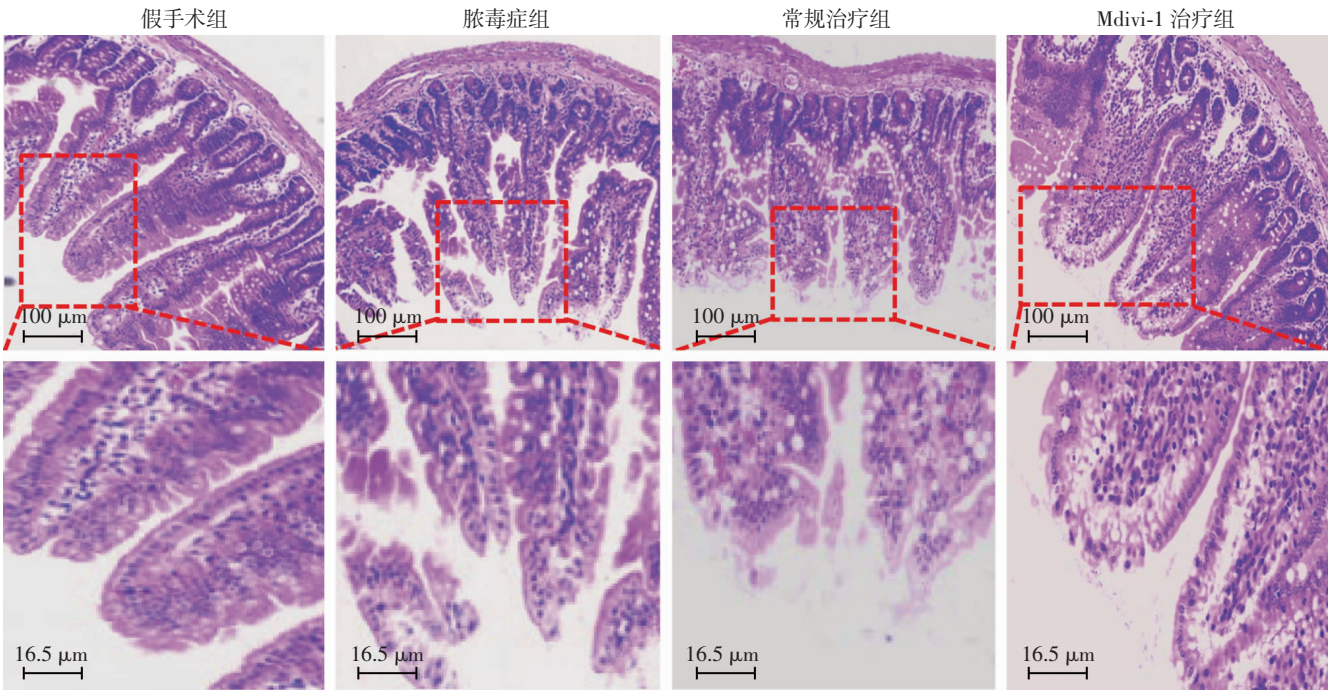
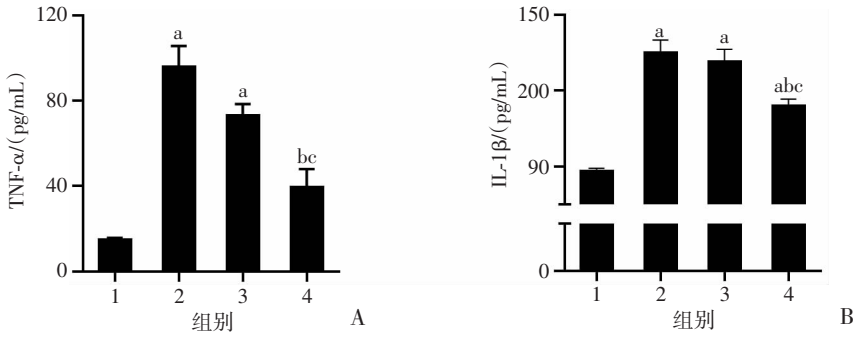


图 3 Mdivi-1 对小肠病理结构的影响(HE)



1:假手术组;2:脓毒症组;3:常规治疗组;4:Mdivi-1 治疗组;a:$P<0.05$,与假手术组比较;b:$P<0.05$,与常规治疗组比较;c:$P<0.05$,与脓毒症组比较

A:Mdivi-1 对脓毒症大鼠血清 TNF-α 的影响;B:Mdivi-1 对脓毒症大鼠血清 IL-1β 的影响

图 4 Mdivi-1 对脓毒症大鼠血清炎症因子的影响 ($n=8$,$\bar{x}\pm s$)

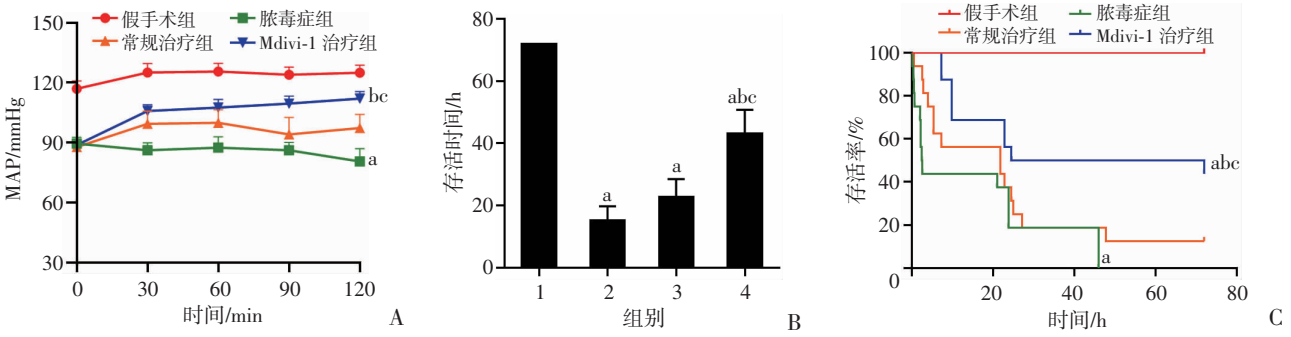
2.5 Mdivi-1 对脓毒症大鼠 MAP、存活时间、72 h 存活率的影响

脓毒症大鼠 MAP 明显较假手术组降低,常规治疗后脓毒症大鼠 MAP 有所改善,但无明显差异,Mdivi-1 治疗后脓毒症大鼠 MAP 显著升高(图 5A)。同时,大鼠的存活结果表明脓毒症大鼠的存活率明显下降。脓毒症大鼠 24 h 的存活率为 25%(4/16),无 1 只大鼠存活时间超过 72 h(0/16),其存活时间为(15.9±18.1)h。常规治疗后脓毒症大鼠的存活率、存活时间可稍改善,但与脓毒症比较差异无统计学意义。Mdivi-1 治疗组大鼠 24 h 存活率和 72 h 存活率显著增加,72 h 存活率为 37.5%(6/16),存活时间为(28.1±29.7)h(图 5B、C)。

3 讨论

脓毒症是由感染引起的全身炎症反应综合征,可导致危及生命的多器官功能障碍,具有较高的病死率。脓毒症发生时,肠道屏障功能受损,主要表现为肠道黏膜上皮细胞脱落,同时肠道屏障通透性增加,肠道细菌移位,进一步加重脓毒症的发生。

本研究通过 CLP 复制脓毒症模型来观察抑制线粒体分裂对脓毒症大鼠肠道屏障功能的保护作用。结果发现:脓毒症后大鼠肠道屏障功能严重受损,常规治疗(包括液体复苏、抗感染以及使用血管活性药物)后可轻微改善肠道屏障功能,Mdivi-1治疗对肠道屏障功



1:假手术组;2:脓毒症组;3:常规治疗组;4:Mdivi-1 治疗组;a:$P<0.05$,与假手术组比较;b:$P<0.05$,与常规治疗组比较;c:$P<0.05$,与脓毒症组比较

A:Mdivi-1 对脓毒症大鼠平均动脉压的影响;B:Mdivi-1 对脓毒症大鼠存活时间的影响;C:Mdivi-1 对脓毒症大鼠 72 h 存活率的影响

图 5 Mdivi-1 对脓毒症大鼠平均动脉压、存活时间、72 h 存活率的影响 ($n=16$,$\bar{x}\pm s$)

能有明显的保护作用,改善肠道功能和降低体内炎症,同时可延长脓毒症大鼠的生存率。

线粒体是机体进行氧化代谢的部位,是细胞的能量加工厂。同时,线粒体还能调节膜电位、储备钙离子并控制细胞程序性死亡、合成胆固醇及某些血红素。既往研究显示,脓毒症时线粒体分裂、融合的平衡被打破,这是脓毒症进展的原因之一[10]。Mdivi-1 是一种线粒体分裂抑制剂,可选择性抑制 Drp1,与 GTPase 结构域表面结合,扰乱寡聚体结合,进而抑制 Drp1 GTPase 的活化,恢复线粒体形态而达到保护线粒体的作用[11]。有文献报道,Mdivi-1 可能通过抑制线粒体裂变,保护线粒体功能,从而缓解 LPS 诱导的化脓性急性肾损伤[12]。本研究也发现 Mdivi-1 可改善脓毒症肠道屏障功能,其机制可能与抑制线粒体形态,保护线粒体功能有关。

脓毒症时肠道通透性增加,肠道屏障功能减弱,肠上皮细胞大量死亡会进一步加重脓毒症[13]。有文献报道,Mdivi-1 通过抑制细胞凋亡改善了镉暴露后导致的小鼠胎盘大小衰减[14]。另外,Mdivi-1 对蛛网膜下腔出血后的神经功能障碍具有保护作用,其潜在机制可能是通过抑制细胞凋亡途径[15]。Mdivi-1 对肠道屏障的保护作用是否与抑制细胞死亡有关,需进一步研究。

脓毒症时肠屏障功能受损,紧密连接蛋白 ZO-1 降解增加[16]。既往研究表明,在 LPS 的刺激下,ZO-1 的合成减少,其机制是 LPS 可激活蛋白激酶 B(protein kinase B,Akt),反过来 Akt 激活下游信号分子使 ZO-1 合成减少[17]。另外,研究发现 ZO-1 的表达受细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases,ERK)、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase,JNK)和缺氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor-1α,HIF-1α)调节[18-19]。Mdivi-1 增加 ZO-1 的表达是否与以上机制有关,需进一步研究。

有研究表明,Mdivi-1 可抑制 p-65 和 IκBα 磷酸化,减少 NF-κB 信号通路的激活,减弱炎性因子的释放[20]。Mdivi-1 通过抑制 Toll 样受体 2/4(Toll-like receptor 2/4,TLR2/4)和糖原合成酶激酶 3β(glycogen synthase kinase-3β,GSK-3β)介导的 NF-κB 活化去促进 2 型巨噬细胞极化,从而缓解小鼠的炎症[21]。本实验结果显示脓毒症大鼠体内炎症因子 TNF-α、IL-1β 明显增加,Mdivi-1 处理后大鼠体内炎症因子有明显改善,提示 Mdivi-1 治疗可显著降低脓毒症大鼠体内的炎症。

由于脓毒症大鼠的病理过程与临床上极为相似,因此可采用 CLP 模型进行干预治疗研究,为临床上脓毒症患者治疗提供实验基础。目前 Mdivi-1 对脓毒症的作用尚未有一致性的结论,期望更多研究证实 Mdivi-1 用于脓毒症患者可增加对肠道通透性的保护作用,为治疗脓毒症肠道屏障功能提供新思路。

参考文献:

[1] RUDD K E, JOHNSON S C, AGESA K M, *et al*. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study[J]. Lancet, 2020, 395(10219): 200-211. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)32989-7.

[2] 孟蕾, 宋维鹏, 刘秀娟, 等. 不同疾病进展及预后的脓毒症患者肠道屏障功能指标变化研究[J]. 长春中医药大学学报, 2023, 39(2): 188-191. DOI: 10.13463/j.cnki.cczyy.2023.02.017.
MENG L, SONG W P, LIU X J, *et al*. Changes of intestinal barrier function indicators in sepsis patients with different disease progression and prognosis[J]. J Changchun Univ Chin Med, 2023, 39(2): 188-191. DOI: 10.13463/j.

cnki.cczyy.2023.02.017.

[3] 吴长江. 脓毒症的病理生理机制及其诊疗研究进展[J]. 智慧健康, 2022, 8(8): 29-36. DOI: 10.19335/j.cnki.2096-1219.2022.08.010.
WU C J. Research progress on pathophysiological mechanism diagnosis and treatment of sepsis[J]. Smart Healthc, 2022, 8(8): 29-36. DOI: 10.19335/j.cnki.2096-1219.2022.08.010.

[4] CHEN W, ZHENG D D, CHEN Y R, *et al*. Electrospun fibers improving cellular respiration *via* mitochondrial protection[J]. Small, 2021, 17(46): e2104012. DOI: 10.1002/smll.202104012.

[5] YAPA N M B, LISNYAK V, RELJIC B, *et al*. Mitochondrial dynamics in health and disease[J]. FEBS Lett, 2021, 595(8): 1184-1204. DOI: 10.1002/1873-3468.14077.

[6] ZHU Y, KUANG L, WU Y, *et al*. Protective effects of inhibition of mitochondrial fission on organ function after sepsis[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 712489. DOI: 10.3389/fphar.2021.712489.

[7] SHI J, YU T X, SONG K, *et al*. Dexmedetomidine ameliorates endotoxin-induced acute lung injury *in vivo* and *in vitro* by preserving mitochondrial dynamic equilibrium through the HIF-1a/HO-1 signaling pathway[J]. Redox Biol, 2021, 41: 101954. DOI: 10.1016/j.redox.2021.101954.

[8] DENG Y, LI S Y, CHEN Z Z, *et al*. Mdivi-1, a mitochondrial fission inhibitor, reduces angiotensin-II-induced hypertension by mediating VSMC phenotypic switch [J]. Biomedecine Pharmacother, 2021, 140: 111689. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111689.

[9] RHODES A, EVANS L E, ALHAZZANI W, *et al*. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016[J]. Intensive Care Med, 2017, 43(3): 304-377. DOI: 10.1007/s00134-017-4683-6.

[10] CAO Y Y, ZHANG Y, GERILE W, *et al*. PLK1 protects intestinal barrier function during sepsis by targeting mitochondrial dynamics through TANK-NF-κB signalling [J]. Mol Med, 2022, 28(1): 163. DOI: 10.1186/s10020-022-00597-z.

[11] DING J, ZHANG Z H, LI S, *et al*. Mdivi-1 alleviates cardiac fibrosis post myocardial infarction at infarcted border zone, possibly *via* inhibition of Drp1-Activated mitochondrial fission and oxidative stress[J]. Arch Biochem Biophys, 2022, 718: 109147. DOI: 10.1016/j.abb.2022.109147.

[12] LIU R J, WANG S C, LI M, *et al*. Erratum to "an inhibitor of DRP1 (mdivi-1) alleviates LPS-induced septic AKI by inhibiting NLRP3 inflammasome activation"[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 8493938. DOI: 10.1155/2020/8493938.

[13] SUBRAMANIAN S, 耿华, 谭小弟. 肠道疾病中肠上皮细胞的死亡[J]. 生理学报, 2020, 72(3): 308-324.
SUBRAMANIAN S, GENG H, TAN X D. Cell death of intestinal epithelial cells in intestinal diseases[J]. Acta Physiol Sinica, 2020, 72(3): 308-324.

[14] ZHU H L, DAI L M, XIONG Y W, *et al*. Gestational exposure to environmental cadmium induces placental apoptosis and fetal growth restriction *via* Parkin-modulated MCL-1 degradation[J]. J Hazard Mater, 2022, 424(Pt A): 127268. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.127268.

[15] CHUNG C L, HUANG Y H, LIN C J, *et al*. Therapeutic effect of mitochondrial division inhibitor-1 (mdivi-1) on hyperglycemia-exacerbated early and delayed brain injuries after experimental subarachnoid hemorrhage[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(13): 6924. DOI: 10.3390/ijms23136924.

[16] LIU X F, ZHU H Q. Curcumin improved intestinal epithelial barrier integrity by up-regulating ZO-1/occludin/claudin-1 in septic rats[J]. Evid Based Complementary Altern Med, 2022, 2022: 1-9. DOI: 10.1155/2022/2884522.

[17] ZOU P C, YANG F, DING Y J, *et al*. Lipopolysaccharide downregulates the expression of ZO-1 protein through the Akt pathway[J]. BMC Infect Dis, 2022, 22(1): 774. DOI: 10.1186/s12879-022-07752-1.

[18] LI Y, LIU X T, ZHANG P L, *et al*. Hydroxysafflor yellow A blocks HIF-1α induction of NOX2 and protects ZO-1 protein in cerebral microvascular endothelium [J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(4): 728. DOI: 10.3390/antiox11040728.

[19] BI S Y, LI L, GU H, *et al*. Lycopene upregulates ZO-1 and downregulates claudin-1 through autophagy inhibition in the human cutaneous squamous cell carcinoma cell line COLO-16[J]. J Cancer, 2019, 10(2): 510-521. DOI: 10.7150/jca.26578.

[20] 刘军辉, 胡雪茹, 曾婷婷, 等. 线粒体分裂抑制剂-1 在香烟诱导小鼠气道炎症与氧化应激中的作用机制[J]. 西南医科大学学报, 2022, 45(5): 387-392. DOI: 10.3969/j.issn.2096-3351.2022.05.005.
LIU J H, HU X R, ZENG T T, *et al*. Effect of mitochondria division inhibitor-1 on cigarette smoke-induced airway inflammation and oxidative stress in mouse[J]. J Southwest Med Univ, 2022, 45(5): 387-392. DOI: 10.3969/j.issn.2096-3351.2022.05.005.

[21] LIU X Q, ZHANG X J, NIU X J, *et al*. Mdivi-1 modulates macrophage/microglial polarization in mice with EAE via the inhibition of the TLR2/4-GSK3β-NF-κB inflammatory signaling axis[J]. Mol Neurobiol, 2022, 59(1): 1-16. DOI: 10.1007/s12035-021-02552-1.

(**收稿**:2023-03-28;**修回**:2023-06-12)

(编辑 张艺霖)