DOI:10.16016/j.2097-0927.202202048

# 木犀草素通过激活 SIRT1 减轻脓毒性心脏损伤

刘 彬,龙 军,司良毅 401120 重庆,重庆医科大学附属第三医院心血管疾病中心

[摘要] **目的** 探究木犀草素(luteolin,LTN)改善脓毒性心脏损伤的作用与机制。**方法** 采用盲肠结扎穿孔术(caecal ligation perforation, CLP)建立小鼠脓毒症模型,将 42 只小鼠按随机数字表法分为 3 组:Sham 组、CLP 组和 CLP+LTN 组,每组 14 只。评估 48 h 生存情况,使用超声检测心脏功能,Western blot 检测 SIRT1、p-p65、p65 的表达变化,PCR 检测炎症因子 mRNA 表达水平。细胞实验中,使用 1 μg/mL LPS 处理小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 12 h,并取其培养基处理小鼠心肌细胞 HL-1,加入不同浓度的 LTN 后,分别使用 TNF-α ELISA 试剂盒和 CCK-8 法确定最佳 LTN 处理浓度。敲低 RAW 264.7 和 HL-1 细胞 SIRT1 表达后,Western blot 检测蛋白表达,PCR 检测炎性因子 mRNA 水平,商用试剂盒检测 ATP 含量,CCK-8 检测细胞活力。**结果** 与 Sham 组相比,CLP 组小鼠 48 h 生存率、心功能和 SIRT1 的表达明显降低($P<0.05$),而 p65 的磷酸化水平(p-p65/p65),TNF-α、IL-1、IL-6 的 mRNA 表达水平显著上升($P<0.05$),但这些效应均可被 LTN 治疗抵消($P<0.05$)。在 RAW 264.7 细胞中,LTN 处理可以明显改善 LPS 引起的 SIRT1 的表达下降,以及 p65 磷酸化水平和 IL-1、TNF-α、IL-6 的 mRNA 表达水平升高($P<0.05$),但 SIRT1 敲低则可抵消 LTN 的作用($P<0.05$)。在 HL-1 细胞中,LTN 处理可显著减少 RAW 264.7+LPS 培养基(RLM)处理引起的 SIRT1 表达、ATP 含量和细胞活力下降($P<0.05$),但该作用在敲低 SIRT1 后被部分消除($P<0.05$)。**结论** LTN 可通过激活 SIRT1 抑制炎症反应,提高心肌细胞抗炎作用,从而减少脓毒性心功能障碍。

[关键词] 木犀草素;脓毒症;SIRT1;心功能障碍;炎症反应

[中图法分类号] R285.5; R541; R631.2 [文献标志码] A

# Luteolin alleviates sepsis-induced cardiac injury by activating SIRT1

LIU Bin, LONG Jun, SI Liangyi Center for Cardiovascular Diseases, the Third Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 401120, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect and mechanism of luteolin (LTN) in sepsis-induced cardiac injury. **Methods** Caecal ligation perforation (CLP) was used to establish a septic model in mice, and 42 mice were randomly divided into Sham group, CLP group and CLP+LTN group, with 14 mice in each group. The 48-hour survival rate was observed. Ultrasonography was used to detect cardiac function, Western blotting was employed to detect the expression of SIRT1, p-p65 and p65, and PCR was applied to measure the mRNA levels of inflammatory cytokines. In *in vitro* study, LPS of 1 μg/mL was used to treat mouse macrophagocyte RAW 264.7, and then the medium was used to treat mouse cardiomyocytes HL-1. LPS-treated RAW 264.7 cells and RAW 264.7+LPS medium-treated HL-1 cells were co-cultured with different concentrations of LTN, and the optimal LTN concentration was determined by TNF-α ELISA kit and CCK-8 assay. Then after SIRT1 expression of RAW 264.7 cells and HL-1 cells was knocked down by siRNA, the expression of above proteins was detected by Western blotting, and mRNA expression levels of inflammatory cytokines were measured by PCR, ATP content was detected by reagent kit, and cell viability was detected by CCK-8 assay. **Results** The mice of the CLP group had significantly lower 48-hour survival rate, cardiac

[通信作者] 司良毅,E-mail:650273@hospital.cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2022, 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/)

function and SIRT1 expression ($P<0.05$), and increased protein level of p-p65/p65 and mRNA levels of IL-1, TNF-α and IL-6 ($P<0.05$) when compared with the Sham group. However, these effects were reversed by LTN treatment ($P<0.05$). In RAW 264.7 cells, LTN treatment significantly reversed LPS-induced decrease of SIRT1 expression, and increases in protein level of p-p65 and mRNA levels of IL-1, TNF-α and IL-6 ($P<0.05$). Nevertheless, SIRT1 knockdown abolished the effect of LTN ($P<0.05$). In HL-1 cells, LTN treatment significantly reversed the decrease of SIRT1 expression, ATP content and cell viability induced by RAW 264.7+LPS medium ($P<0.05$), but this effect could be partially eliminated by SIRT1 knockdown ($P<0.05$). **Conclusion** LTN can inhibit inflammatory response and enhance the anti-inflammatory effect of cardiomyocytes by activating SIRT1, and thus reduce sepsis-induced cardiac dysfunction.

[**Key words**] luteolin; sepsis; SIRT1; cardiac dysfunction; inflammatory response

Corresponding author: SI Liangyi, E-mail: 650273@hospital.cqmu.edu.cn

脓毒症是一种由于宿主对感染反应失调引起的疾病,晚期常发生危及生命的多器官功能障碍[1-3]。尽管现代医学在脓毒症治疗上已取得长足的进步,但脓毒症每年仍会导致许多患者死亡[4]。脓毒性心脏功能损伤是脓毒症最常见的并发症,一旦出现心功能障碍,其病死率可达 70%[5]。因此,探究脓毒性心功能障碍的相关机制及有效的治疗策略,对治疗脓毒症有非常重要的意义。

SIRT1 是一种保守的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD+)依赖的组蛋白去乙酰化酶,参与多种细胞内信号,如衰老、凋亡、自噬和炎症[6-7]。研究显示 SIRT1 可通过抑制 NF-κB 的激活减少炎症介质的分泌,从而减轻炎症反应[8]。此外 SIRT1 对维持心肌细胞正常功能具有重要的作用[9]。既往研究表明,SIRT1 在脓毒症小鼠心肌中含量降低,而激活 SIRT1 则可改善脓毒症引起的心功能障碍[10]。因此,SIRT1 被认为是治疗脓毒性心功能障碍的靶点。

木犀草素(luteolin,LTN)是一种具有生物活性的类黄酮多酚化合物,可从许多蔬菜、水果和草本植物中分离出来[11]。LTN 已被证明具有多种药理作用,包括抗氧化、抗癌和抗炎等生物学特性[12]。LTN 可通过改善心肌收缩功能和减少细胞凋亡来减少大鼠心脏缺血再灌注损伤[13],也可通过发挥其抗炎作用减少脂毒性心肌损伤[14]。尽管越来越多的证据表明 LTN 具有心血管保护作用,但 LTN 对脓毒症引起的心功能障碍是否具有保护作用尚不明确。因此,本实验采用盲肠结扎穿孔术(caecal ligation perforation, CLP)建立小鼠脓毒症模型,探究 LTN 对脓毒性心脏损伤的作用及潜在机制,为临床治疗脓毒性心脏损伤提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

SIRT1 抗体(WL02995)、p-p65 抗体(WL02169)、p65 抗体(WL01980)、β-actin 抗体(WL01372)和山羊抗兔二抗(WLA023)均购自沈阳万类生物科技有限公司。木犀草素(LTN,HY-N0162)购自美国 MCE 公司。LPS(S1732)、Mouse TNF-α ELISA Kit(PT512)、增强型 ATP 检测试剂盒(S0027)和 DMSO(ST038-100 mL)均购自上海碧云天生物技术有限公司。MEM 培养基(PM150410)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。DMEM 高糖培养基(11965092)购自美国 Gibco 公司。胎牛血清(ST30-2602)购自德国 PAN SERATECH 公司。CCK-8 试剂(B34304)购自上海毕傲图生物科技有限公司。

### 1.2 实验动物与细胞培养

42 只体质量约 20 g 的 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠购自重庆医科大学实验动物中心,饲养于 SPF 级别的动物房中,温度保持在 20~22 ℃,光/暗 12 h 一循环,湿度保持在 55%~60%,所有动物均可随意获取标准啮齿动物食物和水。本实验全过程严格遵循《实验动物保护条例》。将小鼠按随机数字表法分为 3 组:Sham 组、CLP 组和 CLP+LTN 组,每组 14 只。小鼠心肌细胞 HL-1 和小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。HL-1 细胞培养在含 10%胎牛血清的 MEM 培养基中,RAW 264.7 细胞培养在含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中。LTN 溶于 DMSO 用于处理 HL-1 和 RAW 264.7 细胞,在非 LTN 处理的细胞中加入同等体积的 DMSO,防止溶剂产生影响。使用培养 RAW 267.4 的培养基处理 HL-1 细胞:将 RAW 264.7 接种于培养皿,处理时先更换新鲜的培养基。使用 1 μg/mL LPS 伴或不伴 LTN、siSIRT1 处理 RAW 264.7 细胞,LPS 使用浓度参考文献[15]。待处理 12 h 后,收集培养基并离心吸取上清液用于 ELISA 检测或者处理 HL-1 细胞 24 h。

### 1.3 盲肠结扎穿孔术

使用 2%异氟烷将小鼠麻醉,并放置在 37 ℃操作平台上妥善固定,在左下腹做一约 0.5 cm 的切口。找

到并取出盲肠,用4-0丝线在盲肠二分之一处结扎,再用21 g规格的针头将盲肠末端刺穿。挤压盲端确保穿孔处通畅,并还纳盲肠入腹中。逐层缝合切口后,按5 mL/100 g的剂量皮下注射温热的生理盐水以促进术后苏醒。Sham组接受同样的操作过程,但盲肠不结扎,不穿孔。用于动物实验的LTN溶于溶剂(10% DMSO、40%聚乙二醇、5% Tween-80、45%生理盐水)。CLP+LTN组小鼠术前1 h通过腹腔注射0.2 mg/kg LTN,剂量依据文献[16],每12小时再次给予0.2 mg/kg LTN,其他非LTN注射组小鼠注射同等体积溶剂。术后24 h,完善心脏超声检测,断颈法处死小鼠并取出心脏冻于液氮中备用。

### 1.4 生存实验

总共30只小鼠用于术后48 h小鼠生存观察实验,每组10只。生存实验的小鼠不取材,不检查心脏超声,以防止任何多余操作对实验结果的影响。CLP+LTN组小鼠术前1 h予以0.2 mg/kg LTN腹腔注射,术后每12小时再次给予0.2 mg/kg LTN,除此之外无其他操作。期间小鼠可以自由获取水和标准啮齿动物食物。每12小时检查小鼠存活情况。

### 1.5 心脏超声

使用Vivid E95(GE Healthcare)超声仪进行心脏超声检测,使用2%异氟烷将小鼠麻醉,保持心率在400~500次/min区间且相互之间差异无统计学意义。心脏超声检测时,从乳头肌水平的短轴视图上获得二维导向M型测量。测量的参数包括左室射血分数和左室缩短系数。

### 1.6 Western blot检测

用含1%PMSF和1%磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液提取小鼠心肌、RAW 264.7细胞和HL-1细胞中的蛋白。用BCA法测定蛋白浓度并用RIPA裂解液配平蛋白。加入上样缓冲液后于100 ℃水浴锅加热10 min,得到可进行Western blot检测的样品。使用10%的SDS-PAGE凝胶分离样品蛋白并转印到PVDF膜上。用含5%脱脂奶粉的TBST于室温封闭膜1 h,再于4 ℃冰箱中孵育对应抗体。次日取出膜于室温中孵育二抗1.5 h,最后用ECL化学发光法检测蛋白表达。

### 1.7 Real-time PCR检测

采用Real-time PCR的方法检测小鼠心肌组织和RAW 264.7细胞中的炎性因子mRNA表达水平。用RNA提取试剂盒提取总RNA,取1 μg提取的RNA进行逆转录。用SYBR green对逆转录的18个cDNA进行Real-time PCR扩增。引物序列如下:TNF-α正义链5′-GAGAAAGTCAACCTCCTCTCTG-3′,反义链5′-GAAGACTCCTCCCAGGTATATG-3′;IL-1正义链5′-TTCAGGCAGGCAGTATCACTC-3′,反义链5′-GAAGGTCCACGGGAAAGACAC-3′;IL-6正义链5′-GGAGCCCACCAAGAACGATAGTCAA-3′,反义链5′-TGTCACCAGCATCAGTCCCAAGAAGG-3′;β-actin正义链5′-GCAAGCAGGAGTACGATGAG-3′,反义链5′-CCATGCCAATGTTGTCTCTT-3′。

### 1.8 细胞活力

炎性损伤降低细胞活力,包括细胞数量和新陈代谢的降低[17-18]。采用CCK-8法对细胞活力进行检测,将细胞以$1\times10^4$/孔接种于96孔板中。予以相应处理后,弃去孔中液体,每孔加入100 μL无血清培养基+10 μL CCK-8试剂,放入37℃敷箱孵育1~4 h,用酶标仪测定波长450 nm处的光密度值[$D(450)$]。

### 1.9 siRNA转染

SIRT1 siRNA购自上海吉玛基因。转染时将SIRT1 siRNA+5 μL Lipofectamine™ 3000+250 μL Opti-MEM混匀,使SIRT1 siRNA终浓度为50 nmol/L。阴性对照组中将SIRT1 siRNA换成等量的NC。将转染工作液加入培养皿中混匀。6 h后换新鲜的含10%胎牛血清培养基继续培养24 h再进行相关实验。

### 1.10 ELISA检测

使用TNF-α ELISA检测试剂盒检测RAW 264.7细胞培养基中TNF-α的含量,具体方法参考说明书。将样品或标准品按每孔100 μL加入相应的孔中,封板后室温孵育2 h,洗板后每孔加入100 μL生物素化抗体室温孵育1 h,再次洗板后每孔加入100 μL辣根过氧化物酶标记Streptavidin室温避光孵育20 min。洗板后每孔加入100 μL显色剂室温避光孵育20 min。最后每孔加入50 μL终止液混匀,测量$D(450)$值。

### 1.11 ATP含量检测

HL-1细胞内ATP含量检测使用增强型ATP检测试剂盒,具体方法参考说明书。HL-1细胞培养于6孔板,去培养基后,每孔加入200 μL裂解液充分裂解并吸入EP管,于4 ℃下12 000×$g$离心5 min,取上清液备用。取96孔板,每孔加入ATP检测工作液100 μL,室温放置5 min。每孔加入20 μL样品或标准品,后检测化学发光。

### 1.12 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,使用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析。组间差异采用单因素方差分析,然后进行Turkey检验。采用Kaplan-Meier生存曲线,并采用log-rank检验进行分析。$P<0.05$被认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 LTN 治疗可提高脓毒症小鼠生存率

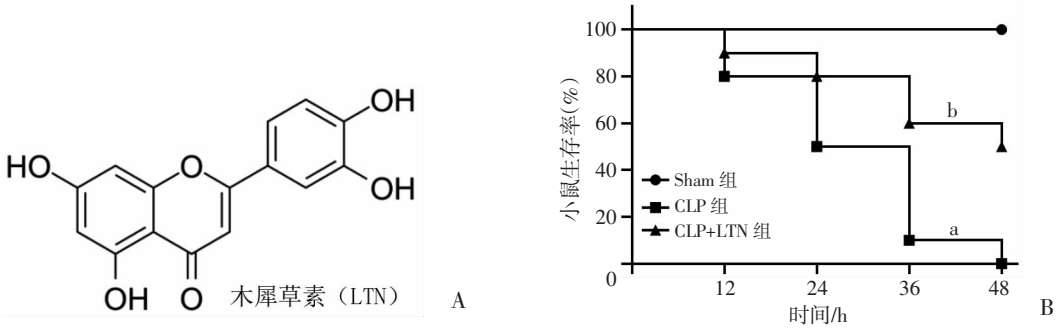
对小鼠实施 CLP 手术建立脓毒症模型,观测 Sham 组、CLP 组和 CLP+LTN 组 48 h 生存情况,并记录死亡情况。结果显示:CLP 组 12 h 出现 2 例死亡,24 h 死亡达到 50%,48 h 生存率为 0,与 Sham 组相比,生存率显著降低($P<0.05$)。而 CLP+LTN 组的生存率得到改善,48 h 生存率为 50%,与 CLP 组相比,生存率显著提高($P<0.05$),见图 1。提示 LTN 治疗明显提高 CLP 小鼠生存率。

### 2.2 LTN 治疗减少脓毒症导致的小鼠心功能障碍

CLP 术后 24 h,运用超声检测 Sham 组、CLP 组和 CLP+LTN 组小鼠心脏功能。与 Sham 组相比,CLP 组小鼠左室射血分数和左室缩短系数显著下降($P<0.05$),而 LTN 治疗可部分逆转 CLP 对心脏功能的损伤($P<0.05$),见图 2。提示 LTN 治疗可改善 CLP 小鼠心脏功能。

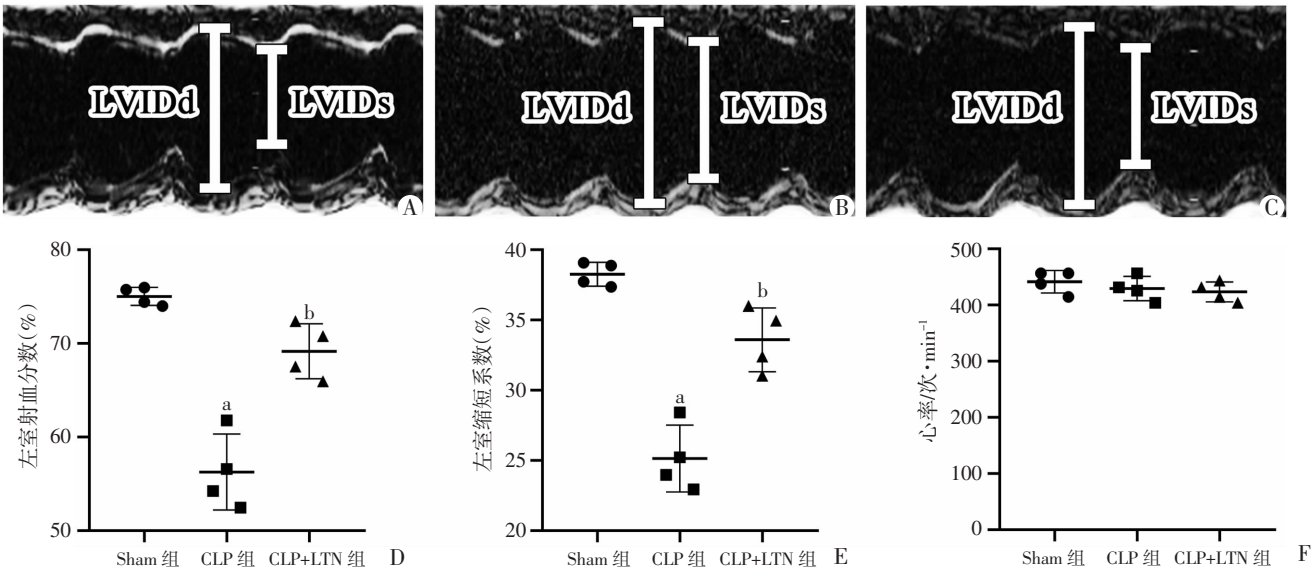
### 2.3 LTN 治疗防止脓毒症引起的小鼠心肌 SIRT1 表达下降,并降低炎症反应

CLP 术后 24 h,取各组心脏进行 Western blot 和 PCR 检测。与 Sham 组相比,CLP 组 SIRT1 表达明显降低,p65 磷酸化水平和 TNF-α、IL-1、IL-6 mRNA 表达水平明显提高($P<0.05$)。而 LTN 治疗可逆转这些效应($P<0.05$),见图 3。提示 LTN 治疗可能通过 SIRT1/NF-κB 途径降低脓毒症小鼠心脏炎症反应。




A:LTN 化学结构;B:小鼠生存率($n=10$) a: $P<0.05$,与 Sham 组比较; b: $P<0.05$,与 CLP 组比较

**图 1 LTN 治疗提高脓毒症小鼠生存率**




a: $P<0.05$,与 Sham 组比较; b: $P<0.05$,与 CLP 组比较

A~C:各组小鼠心脏 M 型超声图 A:Sham 组;B:CLP 组;C:CLP+LTN 组;D:各组小鼠左室射血分数;E:各组小鼠左室缩短系数;F:各组小鼠心率

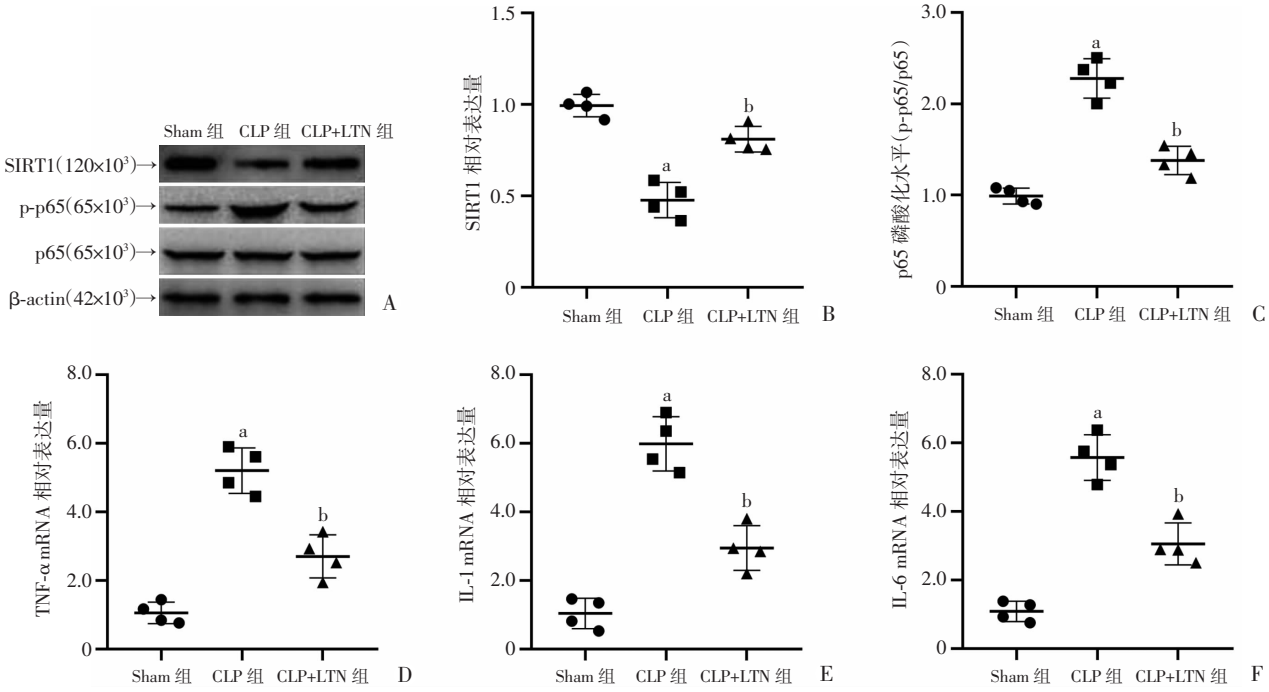
**图 2 LTN 治疗减少脓毒症导致的小鼠心功能障碍($n=4$)**

### 2.4　LTN 减少 LPS 处理下 RAW 264.7 细胞 TNF-α 分泌,提高 RLM 处理下 HL-1 细胞活力

使用 1 μg/mL LPS 处理 RAW 264.7 细胞 12 h 后,检测培养基中 TNF-α 含量,结果见图 4A。LPS 处理可显著提高培养基中 TNF-α 的含量($P<0.05$),但可被 LTN 处理降低且呈浓度依赖($P<0.05$)。收集 RAW 264.7 对照组培养基(RAW 264.7 Control Medium,RCM)和 RLM 处理 HL-1 心肌细胞 24 h,并检测细胞活力。RCM 模拟正常环境,RLM 模拟脓毒症环境。在使用 RLM 处理的 HL-1 细胞中加入不同浓度的 LTN,以判断脓毒症环境中 LTN 对心肌细胞活力的影响。与 RCM 处理相比,RLM 可显著降低 HL-1 细胞的活力($P<0.05$);但加入 LTN 处理后,细胞活力得到显著改善,且呈浓度依赖性($P<0.05$),见图 4B。综合上述结果,选取 8 μmol/L 浓度的 LTN 用于后续细胞实验。

### 2.5　siSIRT1 敲低 RAW 264.7 细胞和 HL-1 细胞中 SIRT1 表达效率验证

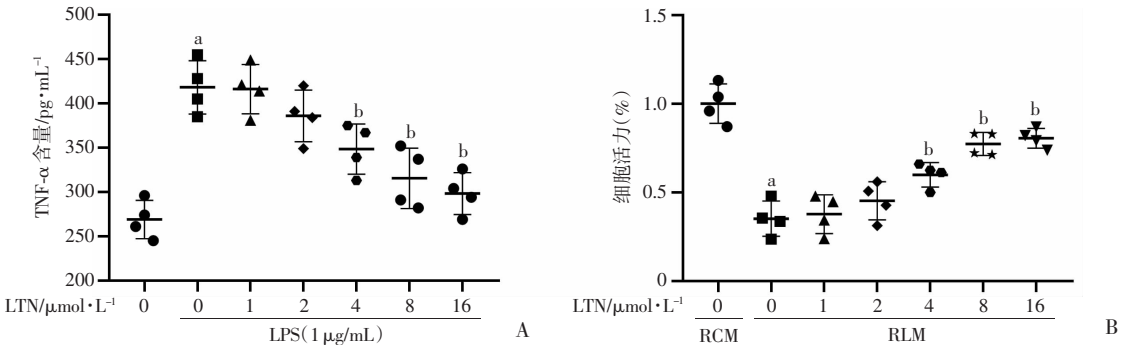
为验证 siSIRT1 敲低效率,使用 Western blot 检测 Control 组、NC 组和 siSIRT1 组 SIRT1 表达。RAW 264.7 细胞和 HL-1 细胞实验结果均显示:与 Control 组相比,NC 组 SIRT1 表达差异无统计学意义;与 NC 组相比,siSIRT1 组可显著降低 SIRT1 的表达($P<0.05$),见图 5。




a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 CLP 组比较

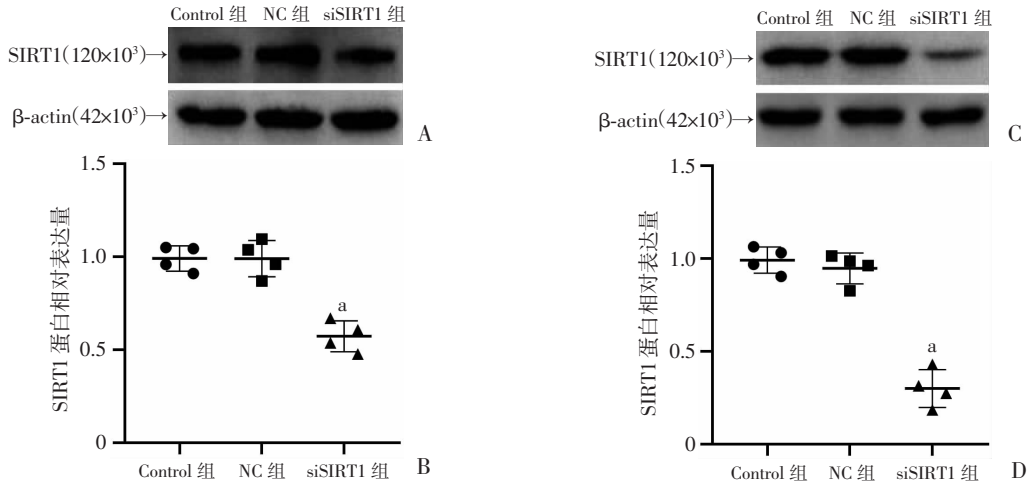
A:Western blot 检测;B:SIRT1 相对表达量;C:p65 磷酸化水平;D:TNF-α mRNA 相对表达量;E:IL-1 mRNA 相对表达量;F:IL-6 mRNA 相对表达量

**图 3　LTN 治疗防止脓毒症引起的小鼠心肌 SIRT1 表达下降并降低炎症反应($n=4$)**




A:RAW 264.7 细胞培养基中 TNF-α 含量检测　a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 LPS+0 μmol/L LTN 组比较;B:HL-1 细胞活力检测　a:$P<0.05$,与 RCM 组比较;b:$P<0.05$,与 RLM+0 μmol/L LTN 组比较

**图 4　LTN 减少炎性反应中巨噬细胞分泌 TNF-α 并提高心肌细胞活力($n=4$)**

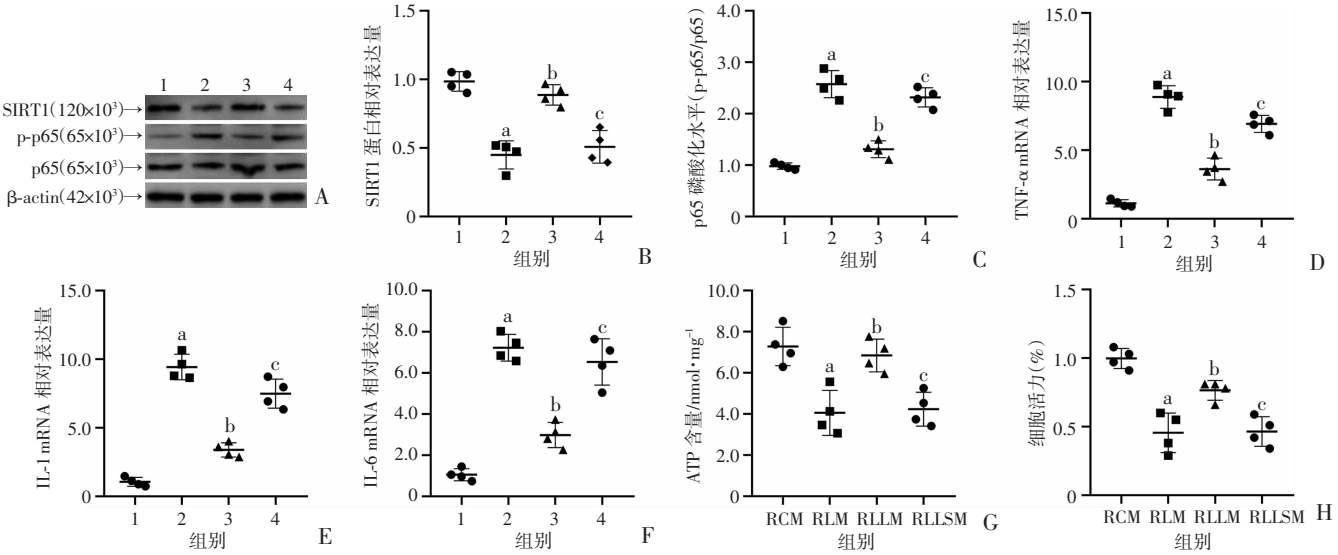



A、B:Western blot 检测 RAW 264.7 细胞中 SIRT1 的表达及半定量分析;C、D:Western blot 检测 HL-1 细胞中 SIRT1 的表达及半定量分析 a:$P<0.05$,与 NC 组比较

**图 5 siSIRT1 敲低 RAW 264.7 细胞和 HL-1 细胞中 SIRT1 表达效率验证**($n=4$)

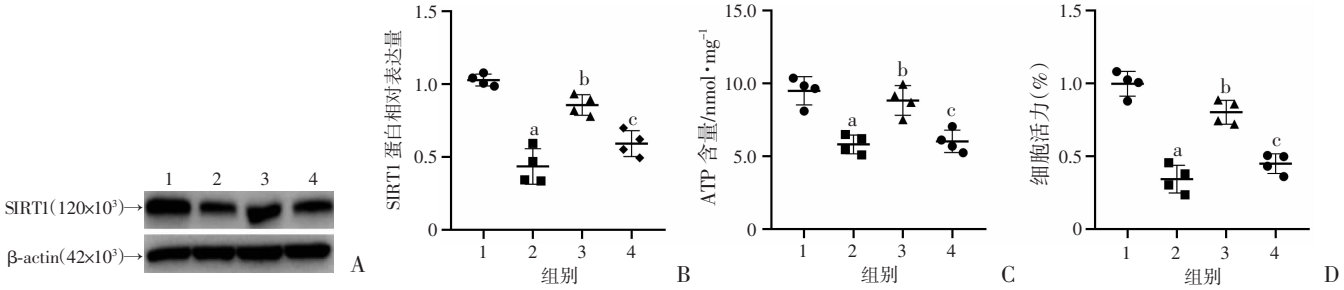
## 2.6 LTN 通过激活 SIRT1 抑制炎症反应

为探究 LTN 减轻炎症是否通过 SIRT1 起作用,使用 siRNA 敲低 RAW 264.7 细胞 SIRT1 表达。与 Control 组相比,LPS 可明显降低 SIRT1 表达,提高 p65 磷酸化水平和 TNF-α、IL-1、IL-6 mRNA 表达($P<0.05$)。LTN 治疗可以部分逆转 LPS 的作用($P<0.05$)。使用 siSIRT1 可使 LTN 的抗炎作用被抵消($P<0.05$)。使用各个 RAW 264.7 细胞处理组的培养基处理 HL-1 细胞 24 h,检测 HL-1 细胞 ATP 含量和细胞活力,结果显示,与 RCM 处理相比,RLM 可显著减低 HL-1 的 ATP 含量和细胞活力($P<0.05$),而使用 RAW 264.7+LPS+LTN 组的培养基(RLLM)处理的 HL-1 细胞的 ATP 含量和细胞活力较 RLM 组高($P<0.05$),使用 RAW 264.7+LPS+LTN+siSIRT1 组的培养基(RLLSM)处理的 HL-1 细胞的 ATP 含量和细胞活力则低于 RLLM 处理组($P<0.05$),见图 6。提示 LTN 通过改善 SIRT1 表达来降低炎症反应,进而减少心肌损伤。




1:Control 组;2:LPS 组;3:LPS+LTN 组;4:LPS+LTN+siSIRT1 组;A:Western blot 检测结果;B:SIRT1 表达半定量分析;C:p65 磷酸化水平半定量分析;D:TNF-α mRNA 相对表达量;E:IL-1 mRNA 相对表达量;F:IL-6 mRNA 相对表达量 a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 组比较;c:$P<0.05$,与 LPS+LTN 组比较;G:HL-1 细胞 ATP 含量;H:HL-1 细胞活力 a:$P<0.05$,与 RCM 组比较;b:$P<0.05$,与 RLM 组比较;c:$P<0.05$,与 RLLM 组比较

**图 6 LTN 通过激活 SIRT1 抑制炎症反应**($n=4$)




1:RCM 组;2:RLM 组;3:RLM+LTN 组;4:RLM+LTN+siSIRT1 组;a: $P<0.05$,与 RCM 组比较; b: $P<0.05$,与 RLM 组比较;c: $P<0.05$,与 RLM+LTN 组比较

A:Western blot 检测;B:SIRT1 表达半定量分析;C:ATP 含量;D:细胞活力

**图 7　LTN 通过激活 SIRT1 增强心肌细胞对抗炎性损伤的能力**($n=4$)

### 2.7　LTN 通过激活 SIRT1 增强心肌细胞对抗炎性损伤的能力

为进一步探究 LTN 对心肌细胞自身对抗炎性损伤能力的影响,使用 RCM、RLM、RLM+LTN 和 RLM+LTN+siSIRT1 处理细胞,结果显示,与 RCM 组相比,RLM 显著降低 HL-1 细胞 SIRT1 蛋白表达、ATP 含量和细胞活力($P<0.05$)。而 LTN 处理可以逆转上述作用($P<0.05$),但 LTN 的保护作用可被 siSIRT1 抵消($P<0.05$),见图 7。提示 LTN 可以通过激活 SIRT1 增强 HL-1 细胞自身对抗炎性损伤的能力,减少炎性损伤对功能和细胞活力的抑制。

## 3　讨论

脓毒症是一种非常严重的全身性疾病,是重症医学中较常见、病死率较高的疾病之一[19-20]。其病情进展快,常导致患者死亡[21]。本实验探究了 LTN 在脓毒性心肌损伤中的保护作用与相关机制。本研究首先发现 LTN 可以减少脓毒症小鼠的死亡率,保护心功能,减少炎症反应。在细胞实验中,敲低 SIRT1 表达可以抵消 LTN 在脓毒症中带来的抗炎和心肌细胞保护作用。本研究证明了 LTN 可以通过提高 SIRT1 表达来防止脓毒性心功能障碍。

本研究通过生存观察实验发现 CLP 小鼠 24 h 死亡率可达到 50%,而 48 h CLP 小鼠全部死亡。但 LTN 治疗可明显提高 CLP 小鼠的生存率,降低脓毒症致死率。心功能障碍是脓毒症最常见的并发症,据报道,50%的脓毒症患者表现出脓毒性心功能障碍,而脓毒性心功能障碍与死亡率增加有关[22]。由于心脏的泵功能减弱,无法泵出足够多的血液参与血液循环,患者常常出现持续性的低血压甚至休克[5]。已有研究指出保护心脏功能对治疗脓毒症具有重要意义[23-24]。本研究发现 LTN 治疗可明显提高 CLP 小鼠的左室射血分数和左室缩短系数,表明在 LTN 治疗的脓毒症小鼠中,心脏泵功能得到改善。

研究表明 SIRT1 对心脏功能具有重要保护作用,是心功能障碍的重要治疗靶点[25-26]。近期有研究显示,提高 SIRT1 可以保护 LPS 诱导脓毒症小鼠心脏功能[27]。本研究结果显示,LTN 治疗可以提高脓毒症小鼠心脏 SIRT1 表达,提示 SIRT1 或许在 LTN 抗脓毒性心肌损伤中具有重要的作用。

过度的炎症反应是造成脓毒性心肌损伤最为重要的原因之一,许多研究表明抑制炎症反应可以减少脓毒性心功能损伤[28-29]。NF-κB 是一条非常经典的炎症反应通路,SIRT1 被证实可通过抑制 NF-κB 减少炎症反应[30-31]。p65 是 NF-κB 最重要的亚基。当 p65 发生磷酸化时,NF-κB 转位入核进而启动炎症因子转录,如 TNF-α、IL-1、IL-6 等[32]。本研究发现 LTN 治疗的脓毒症小鼠心脏中 p65 磷酸化水平受到抑制,炎性因子的转录也减少。通过细胞实验加以验证,在小鼠巨噬细胞系 RAW 264.7 细胞实验中,发现 LTN 可以减少 LPS 引起的 TNF-α 分泌、NF-κB 激活和相关炎症介质转录,而敲低 SIRT1 可以逆转 LTN 的抗炎作用。ATP 是细胞的直接供能物质,心肌细胞需要消耗大量 ATP 来完成收缩舒张等生理功能,若 ATP 含量下降可以导致细胞功能下降[33-34]。本研究使用不同 RAW 264.7 细胞处理组的培养基刺激 HL-1 细胞,结果表明使用 RLLM 处理的 HL-1 细胞较 RLM 处理组有更高的 ATP 含量和细胞活力,这可能得益于 LTN 处理 RAW 264.7 细胞后减少了 LPS 引起的炎症反应。结果表明 LTN 治疗通过激活 SIRT1 来减少炎症反应,从而保护心肌细胞,提高心脏功能。

为了探究 LTN 治疗对提高心肌细胞自身抗炎性损

伤的作用,以及 SIRT1 在其中的角色,本研究使用小鼠心肌细胞系 HL-1 进行了相关实验。结果显示 LTN 可以通过激活 SIRT1 来减少 RLM 处理引起的 HL-1 细胞 ATP 含量和细胞活力下降。这些结果表明 LTN 激活 SIRT1 不仅可以通过减轻炎症反应来保护心脏功能,还可通过提高心肌细胞自身对抗炎性损伤的能力来减少脓毒症引起的心功能障碍。

综上所述,本研究发现 LTN 治疗可以通过激活 SIRT1 来抑制 NF-κB 相关的炎症反应,并提高心肌细胞自身抗炎性损伤的能力,从而减少心功能障碍,改善脓毒症小鼠生存率,为临床治疗脓毒性心肌损伤提供了新的思路。

**参考文献:**


[1] 林源希, 李真玉. 糖萼在脓毒症血管内皮损伤中的变化及其修复策略研究进展[J/OL]. 解放军医学杂志, 2022. https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1056.R.20220318.1029.002.html.
LIN Y X, LI Z Y. Changes of glycocalyx in sepsis with vascular endothelial injury and its repair strategy[J]. Med J Chin PLA, 2022. https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1056.R.20220318.1029.002.html.

[2] WALD E L, BADKE C M, HINTZ L K, *et al*. Vitamin therapy in sepsis[J]. Pediatr Res, 2022, 91(2): 328-336. DOI: 10.1038/s41390-021-01673-6.

[3] HOLLENBERG S M, SINGER M. Pathophysiology of sepsis-induced cardiomyopathy[J]. Nat Rev Cardiol, 2021, 18(6): 424-434. DOI: 10.1038/s41569-020-00492-2.

[4] PLEVIN R, CALLCUT R. Update in sepsis guidelines: what is really new? [J]. Trauma Surg Acute Care Open, 2017, 2(1): e000088. DOI: 10.1136/tsaco-2017-000088.

[5] MERX M W, WEBER C. Sepsis and the heart [J]. Circulation, 2007, 116(7): 793-802. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.678359.

[6] ZHANG W X, HE B M, WU Y, *et al*. Melatonin protects against sepsis-induced cardiac dysfunction by regulating apoptosis and autophagy *via* activation of SIRT1 in mice[J]. Life Sci, 2019, 217: 8-15. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.11.055.

[7] 邵晓丽, 余江毅, 倪卫惠. 汉黄芩苷通过上调 SIRT1 表达减轻糖尿病视网膜病变引起的细胞和组织损伤[J]. 南方医科大学学报, 2022, 42(4): 463-472. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2022.04.02.
SHAO X L, YU J Y, NI W H. Wogonoside alleviates high glucose-induced dysfunction of retinal microvascular endothelial cells and diabetic retinopathy in rats by up-regulating SIRT1 [J]. J South Med Univ, 2022, 42(4): 463-472. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2022.04.02.

[8] SHI X J, JIN Y, XU W M, *et al*. MicroRNA-23a reduces lipopolysaccharide-induced cellular apoptosis and inflammatory cytokine production through Rho-associated kinase 1/sirtuin-1/nuclear factor-kappa B crosstalk[J]. Chin Med J (Engl), 2021, 134(7): 829-839. DOI: 10.1097/CM9.0000000000001369.

[9] SAMOKHVALOV V, JAMIESON K L, VRIEND J, *et al*. CYP-epoxygenase metabolites of docosahexaenoic acid protect HL-1 cardiac cells against LPS-induced cytotoxicity through SIRT1[J]. Cell Death Discov, 2015, 1: 15054. DOI: 10.1038/cddiscovery.2015.54.

[10] HAN D, LI X, LI S, *et al*. Reduced silent information regulator 1 signaling exacerbates sepsis-induced myocardial injury and mitigates the protective effect of a liver X receptor agonist[J]. Free Radic Biol Med, 2017, 113: 291-303. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.005.

[11] 储娜, 张璇, 陈思远, 等. 木犀草素显著减轻镉诱导的肺上皮 Beas-2B 细胞的损伤[J]. 南方医科大学学报, 2021, 41(5): 729-735. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2021.05.14.
CHU N, ZHANG X, CHEN S Y, *et al*. Luteolin has a significant protective effect against cadmium-induced injury in lung epithelial Beas-2B cells[J]. J South Med Univ, 2021, 41(5): 729-735. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2021.05.14.

[12] LÓPEZ-LÁZARO M. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin[J]. Mini Rev Med Chem, 2009, 9(1): 31-59. DOI: 10.2174/138955709787001712.

[13] XU T, LI D, JIANG D. Targeting cell signaling and apoptotic pathways by luteolin: cardioprotective role in rat cardiomyocytes following ischemia/reperfusion [J]. Nutrients, 2012, 4(12): 2008-2019. DOI: 10.3390/nu4122008.

[14] ABU-ELSAAD N, EL-KAREF A. The falconoid luteolin mitigates the myocardial inflammatory response induced by high-carbohydrate/high-fat diet in wistar rats [J]. Inflammation, 2018, 41(1): 221-231. DOI: 10.1007/s10753-017-0680-8.

[15] RUAN W, JI X, QIN Y, *et al*. Harmine alleviated sepsis-induced cardiac dysfunction by modulating macrophage polarization *via* the STAT/MAPK/NF-κB pathway [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 792257. DOI: 10.3389/fcell.2021.792257.

[16] RUNGSUNG S, SINGH T U, RABHA D J, *et al*. Luteolin attenuates acute lung injury in experimental mouse model of sepsis[J]. Cytokine, 2018, 110: 333-343. DOI: 10.1016/j.cyto.2018.03.042.

[17] MATTOX T A, PSALTIS C, WEIHBRECHT K, *et al*. Prohibitin-1 is a dynamically regulated blood protein with cardioprotective effects in sepsis[J]. J Am Heart Assoc, 2021, 10(14): e019877. DOI: 10.1161/JAHA.120.019877.

[18] ZHANG W Q, WANG H J, LI Y Z, *et al*. Inhibition of microRNA-543 alleviates sepsis-induced acute kidney injury *via* targeting Bcl-2[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2022, 26(7): 2305-2312. DOI: 10.26355/eurrev_202204_28460.

[19] SALOMÃO R, FERREIRA B L, SALOMÃO M C, *et al*. Sepsis: evolving concepts and challenges[J]. Braz J Med Biol Res, 2019, 52(4): e8595. DOI: 10.1590/1414-431X20198595.

[20] 王鹏, 耿欢, 姜晔, 等. 中医辨治脓毒症合并心肌损伤探析[J]. 医学争鸣, 2021, 12(5): 47-49. DOI: 10.13276/j.issn.1674-8913.2021.05.012.
WANG P, GENG H, JIANG Y, *et al*. Sepsis complicated with myocardial damage treated by traditional Chinese medicine based on syndrome differentiation[J]. Negative, 2021, 12(5): 47-49. DOI: 10.13276/j.issn.1674-8913.2021.05.012.

[21] 孙立柱, 张晟, 马泽通, 等. 腺相关病毒介导的高迁移率族蛋白1抗体基因转导治疗小鼠脓毒症的效果[J]. 第二军医大学学报, 2021, 42(3): 249-254. DOI: 10.16781/j.0258-879x.2021.03.0249.
SUN L Z, ZHANG S, MA Z T, *et al*. Effectiveness of adeno-associated virus-mediated gene transduction of high mobility group box-1 protein antibody for treatment of sepsis in mice[J]. Acad J Second Mil Med Univ, 2021, 42(3): 249-254. DOI: 10.16781/j.0258-879x.2021.03.0249.

[22] LEGER T, AZARNOUSH K, TRAORÉ A, *et al*. Antioxidant and cardioprotective effects of EPA on early low-severity sepsis through UCP3 and SIRT3 upholding of the mitochondrial redox potential[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 9710352. DOI: 10.1155/2019/9710352.

[23] L'HEUREUX M, STERNBERG M, BRATH L, *et al*. Sepsis-induced cardiomyopathy: a comprehensive review[J]. Curr Cardiol Rep, 2020, 22(5): 35. DOI: 10.1007/s11886-020-01277-2.

[24] YANG C, XIA W, LIU X, *et al*. Role of TXNIP/NLRP3 in sepsis-induced myocardial dysfunction[J]. Int J Mol Med, 2019, 44(2): 417-426. DOI: 10.3892/ijmm.2019.4232.

[25] CHEN W K, TSAI Y L, SHIBU M A, *et al*. Exercise training augments Sirt1-signaling and attenuates cardiac inflammation in D-galactose induced-aging rats[J]. Aging (Albany NY), 2018, 10(12): 4166-4174. DOI: 10.18632/aging.101714.

[26] D'ONOFRIO N, SERVILLO L, BALESTRIERI M L. SIRT1 and SIRT6 signaling pathways in cardiovascular disease protection[J]. Antioxid Redox Signal, 2018, 28(8): 711-732. DOI: 10.1089/ars.2017.7178.

[27] XU Z H, SU X, YANG G, *et al*. Ganoderma lucidum polysaccharides protect against sepsis-induced cardiac dysfunction by activating SIRT1[J]. J Pharm Pharmacol, 2022, 74(1): 124-130. DOI: 10.1093/jpp/rgab142.

[28] ZHANG J, LIU Y, LIU L. Hyperoside prevents sepsis-associated cardiac dysfunction through regulating cardiomyocyte viability and inflammation *via* inhibiting miR-21[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 138: 111524. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111524.

[29] GUO H, TANG L, XU J, *et al*. MicroRNA-495 serves as a diagnostic biomarker in patients with sepsis and regulates sepsis-induced inflammation and cardiac dysfunction[J]. Eur J Med Res, 2019, 24(1): 37. DOI: 10.1186/s40001-019-0396-3.

[30] DE GREGORIO E, COLELL A, MORALES A, *et al*. Relevance of SIRT1-NF-κB axis as therapeutic target to ameliorate inflammation in liver disease[J]. Int J Mol Sci, 2020,21(11):3858. DOI: 10.3390/ijms21113858.

[31] CHEN M, CHEN Z, HUANG D, *et al*. Myricetin inhibits TNF-α-induced inflammation in A549 cells *via* the SIRT1/NF-κB pathway[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2020, 65: 102000. DOI: 10.1016/j.pupt.2021.102000.

[32] TANAKA T, TSUCHIYA R, HOZUMI Y, *et al*. Reciprocal regulation of p53 and NF-κB by diacylglycerol kinase ζ[J]. Adv Biol Regul, 2016, 60: 15-21. DOI: 10.1016/j.jbior.2015.09.009.

[33] CHENG Z, ZHANG M, HU J, *et al*. Cardiac-specific Mst1 deficiency inhibits ROS-mediated JNK signalling to alleviate Ang Ⅱ-induced cardiomyocyte apoptosis[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(1): 543-555. DOI: 10.1111/jcmm.13958.

[34] ZHOU D C, SU Y H, JIANG F Q, *et al*. CpG oligodeoxynucleotide preconditioning improves cardiac function after myocardial infarction *via* modulation of energy metabolism and angiogenesis[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(5): 4245-4257. DOI: 10.1002/jcp.26243.

(收稿:2022-02-14;修回:2022-04-25)

(编辑 张 维)