doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2007088

论著·实验研究

罗汉果皂苷Ⅵ对小鼠脓毒症致急性肝损伤的作用及其机制探讨

周海银　隆彩霞　罗兰　陈艳瑛　刘萍萍　肖政辉

（湖南省儿童医院急救中心急诊综合二科，湖南 长沙　410007）

［摘要］　**目的**　探讨罗汉果皂苷Ⅵ（M Ⅵ）对小鼠脓毒症致急性肝损伤的作用及其可能作用机制。**方法**　将 60 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分成假手术组、模型组、M Ⅵ低剂量组（低剂量组，25 mg/kg）、M Ⅵ高剂量组（高剂量组，100 mg/kg）和过氧化物酶增殖激活受体 γ 辅助激活物 1α（PGC-1α）抑制剂组（抑制剂组，100 mg/kg M Ⅵ +30 mg/kg PGC-1α 抑制剂 SR-18292），每组 12 只。采用盲肠结扎穿孔术制备脓毒症小鼠模型，造模成功后开始腹腔注射给药，每天 1 次，连续 3 d。ELISA 法检测血清中丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天冬氨酸氨基转移酶（AST）浓度；比色法检测肝组织中丙二醛（MDA）、超氧化物歧化酶（SOD）和谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）水平；苏木精－伊红染色观察肝组织病理学变化；检测肝脏线粒体呼吸功能，计算线粒体呼吸控制率；RT-PCR 检测肝组织线粒体 DNA（mtDNA）的拷贝数及肝组织中 PGC-1α、核呼吸因子 1（NRF-1）、线粒体转录因子 A（TFAM）的 mRNA 水平；Western blot 检测肝组织中 PGC-1α、NRF-1 和 TFAM 的蛋白表达水平。**结果**　与假手术组比较，模型组小鼠血清中 ALT、AST 水平及肝组织中 MDA 含量显著增加（*P*<0.05），肝组织中 GSH-Px 和 SOD 活性显著降低（*P*<0.05）；肝组织病理学损伤严重；肝组织线粒体呼吸控制率和 mtDNA 拷贝数，以及肝组织中 PGC-1α、NRF-1、TFAM 的 mRNA 及其蛋白表达水平均显著降低（*P*<0.05）。与模型组比较，高剂量组小鼠血清中 ALT、AST 水平及肝组织中 MDA 含量显著减少（*P*<0.05），肝组织中 GSH-Px 和 SOD 活性显著增加（*P*<0.05）；肝组织病理学损伤得到改善；肝组织线粒体呼吸控制率和 mtDNA 拷贝数，以及肝组织中 PGC-1α、NRF-1、TFAM 的 mRNA 及其蛋白表达水平均显著上升（*P*<0.05）；低剂量组上述指标差异均无统计学意义（*P*>0.05）。PGC-1α 抑制剂 SR-18292 可显著抑制高剂量 M Ⅵ的干预效果（*P*<0.05）。**结论**　M Ⅵ能有效减轻小鼠脓毒症致急性肝损伤，其机制可能与增强 PGC-1α 介导的线粒体生物合成有关。

［中国当代儿科杂志，2020，22（11）：1233-1239］

［关键词］　脓毒症；急性肝损伤；罗汉果皂苷Ⅵ；线粒体生物合成；小鼠

Effect of mogroside VI on acute liver injury induced by sepsis in mice and related mechanisms

ZHOU Hai-Yin, LONG Cai-Xia, LUO Lan, CHEN Yan-Ying, LIU Ping-Ping, XIAO Zheng-Hui. Department of Second Emergency, First Aid Center of Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, China (Xiao Z-H, Email: xiaozh888@126.com)

Abstract: Objective　To study the effect of mogroside VI (MVI) on acute liver injury induced by sepsis in mice and its possible mechanisms. **Methods**　A total of 60 male C57BL/6 mice were randomly divided into five groups: sham-operation, model, low-dose MVI (25 mg/kg), high-dose MVI (100 mg/kg), peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha (PGC-1α) inhibitor (100 mg/kg MVI+30 mg/kg PGC-1α inhibitor SR-18292), with 12 mice in each group. Cecal ligation and puncture were performed to establish a mouse model of sepsis. The drugs were given by intraperitoneal injection after the model was established, once a day for 3 consecutive days. ELISA was used to measure the serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). Colorimetry was used to measure the levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GSH-Px) in liver tissue. Hematoxylin-eosin staining was used to observe liver histopathological changes. Liver mitochondrial respiratory function

［收稿日期］2020-07-13；［接受日期］2020-10-14
［基金项目］湖南省科技创新平台与人才计划（2018TP1028）；2018 年度湖南省重点研发计划项目（2018SK2135）。
［作者简介］周海银，女，硕士，副主任医师。
［通信作者］肖政辉，女，主任医师，教授。Email：xiaozh888@126.com。

was measured, and mitochondrial respiratory control rate was calculated. RT-PCR was used to measure the copy number of mitochondrial DNA (mtDNA) in liver tissue and the mRNA expression levels of PGC-1α, nuclear respiratory factor-1 (NRF-1), and mitochondrial transcription factor A (TFAM) in liver tissue. Western blot was used to measure the protein expression levels of PGC-1α, NRF-1, and TFAM in liver tissue. **Results** Compared with the sham-operation group, the model group had significant increases in the serum levels of ALT and AST and the content of MDA in liver tissue (P<0.05) and significant reductions in the activities of GSH-Px and SOD in liver tissue (P<0.05). The model group had also severe liver histopathological injury and significant reductions in the mitochondrial respiratory control rate, the copy number of mtDNA, and the mRNA and protein expression levels of PGC-1α, NRF-1, and TFAM in liver tissue (P<0.05). Compared with the model group, the high-dose group had significant reductions in the serum levels of ALT and AST and the content of MDA in liver tissue (P<0.05), significant increases in the activities of GSH-Px and SOD in liver tissue (P<0.05), significant improvement in liver histopathological injury, and significant increases in the mitochondrial respiratory control rate, the copy number of mtDNA, and the mRNA and protein expression levels of PGC-1α, NRF-1, and TFAM in liver tissue (P<0.05). There were no significant differences in the above indicators between the low-dose and model groups (P>0.05). The PGC-1α inhibitor SR-18292 significantly inhibited the intervention effect of high-dose MVI (P<0.05). **Conclusions** MVI can effectively alleviate acute liver injury caused by sepsis in mice, possibly by enhancing mitochondrial biosynthesis mediated by PGC-1α.
[Chin J Contemp Pediatr, 2020, 22(11): 1233-1239]

Key words: Sepsis; Acute liver injury; Mogroside VI; Mitochondrial biosynthesis; Mice

脓毒症是由多种病原菌感染引起的全身炎症反应综合征，肝脏是脓毒症最容易累及的重要脏器之一，而肝细胞线粒体损伤是脓毒症介导急性肝损伤的主要机制之一[1-3]。罗汉果皂苷Ⅵ（mogroside Ⅵ，M Ⅵ）是罗汉果中的主要活性成分之一，目前对于 M Ⅵ作用的报道中，Niu 等[4]发现，罗汉果皂苷Ⅵ B（mogroside Ⅵ B，M Ⅵ B）是一种从罗汉果粗提物中分离得到的葫芦糖苷，对过氧化物酶增殖激活受体 γ 辅助激活物 1α（PGC-1α）的转录有激活作用，而 PGC-1α 在线粒体生物合成中起着主导作用，可以启动线粒体生物合成，调控线粒体 DNA（mtDNA）的复制和转录[5]。由此推测，M Ⅵ可能通过促进 PGC-1α 的表达及活化在脓毒症致急性肝损伤中发挥肝保护作用。本研究拟探讨 M Ⅵ对脓毒症致急性肝损伤小鼠肝组织的保护作用及其可能作用机制，以期为 M Ⅵ的临床应用和脓毒症致急性肝损伤的防治提供新的思路和理论依据。

1　材料与方法

1.1　实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 60 只，体重（20 ± 2）g，由湖南省动物实验中心提供，动物合格证编号：SCXK（湘）2018-0010。饲养条件为温度 22~24 ℃，湿度 40%~60%，12 h/12 h 明暗交替，术前禁食 12 h，不禁水。

1.2　主要试剂及仪器

M Ⅵ（纯度 ≥ 98%）购自上海纯优生物科技有限公司；PGC-1α 抑制剂 SR-18292 购自美国 MedChemExpress 公司；丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天冬氨酸氨基转移酶（AST）、丙二醛（MDA）、超氧化物歧化酶（SOD）和谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）试剂盒购于南京建成生物工程研究所；RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒和苏木精 – 伊红（HE）染色液购于上海碧云天生物技术有限公司；RNA 提取试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司；PGC-1α、核呼吸因子 1（NRF-1）、线粒体转录因子 A（TFAM）多克隆抗体及 GAPDH 抗体购于美国 Abcam 公司；线粒体 DNA（mtDNA）提取试剂盒购于德国 QIAGEN 公司。酶标仪购于美国 Bio-Rad 公司；凝胶成像仪购于美国 Thermo Fisher Science 公司；Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统购于美国 Media Cybernetics 公司。

1.3　动物造模及分组处理

将 60 只小鼠适应性饲养 1 周后，随机分成假手术组、模型组、M Ⅵ低剂量组（低剂量组，25 mg/kg）、M Ⅵ高剂量组（高剂量组，100 mg/kg）和 PGC-1α 抑制剂组（抑制剂组，100 mg/kg M Ⅵ + 30 mg/kg SR-18292），每组 12 只。3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠，除假手术组外，其他各组小鼠均采用盲肠结扎穿孔术（CLP）制备脓毒症小鼠模型[6]，假手术组小鼠只进行相同开腹手术操作，不进行盲肠结扎和穿孔。术后 6~12 h，小鼠出现寒战、高热（肛温 ≥ 40 ℃）、尿少、呼吸急促、萎靡少动等现象，即造模成功。造模成功后，根据前期预实验结果，低剂量组和高剂量组小鼠分

别按照 25 mg/kg 和 100 mg/kg M Ⅵ的剂量腹腔注射给药，而抑制剂组按照 100 mg/kg M Ⅵ +30 mg/kg SR-18292 的剂量腹腔注射给药，假手术组和模型组腹腔注射等量 0.9% 氯化钠溶液，每天 1 次，连续 3 d。

1.4 ELISA 检测血清中 ALT 和 AST 浓度

取各组小鼠血清，按照 ALT 及 AST 试剂盒说明书进行操作，采用酶标仪在 450 nm 波长处测定 OD 值，根据标准曲线计算小鼠血清中 ALT 和 AST 的含量。

1.5 比色法检测肝组织中 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 水平

取各组小鼠部分肝组织称重，再置于冰上碾磨匀浆，4℃下 11 800 r/min 离心 15 min，取上清液。按照 SOD、GSH-Px 及 MDA 试剂盒操作说明书分别加入相应试剂，孵育后测各样品吸光度值，计算 SOD 和 GSH-Px 活性及 MDA 水平。

1.6 HE 染色观察肝组织病理学变化

取各组小鼠部分肝组织于 10% 甲醛缓冲液中固定 24 h，将组织脱水浸蜡、包埋，制作 3~4 μm 石蜡切片后行 HE 染色，于显微镜下观察肝组织病理学损伤并进行评分，评分标准包括[7]：碎片状坏死、血管炎性浸润、汇管区淋巴细胞浸润、肝细胞气球样病变和脂肪变性。损伤程度由轻到重依次标记为 0、1、2、3 分，累计总分为最终损伤评分。

1.7 RT-PCR 检测肝组织中线粒体生物合成相关基因的 mRNA 水平

取各组小鼠部分肝组织，采用 TRIzol 法提取各样本的总 RNA，紫外分光光度计测定总 RNA 浓度。取 2 μg 总 RNA，采用逆转录试剂盒合成 cDNA，以 cDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增。反应体系为：TB Green Premix 25 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 1 μL，cDNA 4 μL，灭菌水 18 μL。反应条件为：95℃预变性 60 s；95℃变性 15 s，60℃退火 15 s，共 40 个循环；72℃延伸 45 s。以 GAPDH 为内参，采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算 PGC-1α、NRF-1 和 TFAM mRNA 相对表达量。引物由南京金斯瑞生物科技有限公司设计合成，引物序列见表 1。

1.8 Western blot 检测肝组织中线粒体生物合成相关基因的蛋白表达水平

取各组小鼠部分肝组织，剪碎后加入适量 RIPA 裂解液于冰上充分裂解 30 min，4℃条件下 11 800 r/min 离心 20 min，弃上清，采用 BCA 法测定蛋白浓度。取 25 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白，并将蛋白转移至 PVDF 膜上，5% 脱脂牛奶室温封闭 30 min，分别加入 PGC-1α、NRF-1、TFAM 和 GAPDH 一抗，4℃孵育过夜。次日加入辣根过氧化物酶标记的二抗，孵育 1 h 后用 TBST 洗涤 3 次，电化学发光显色、凝胶成像仪显像后，以 GAPDH 为内参计算总蛋白相对表达量。

表 1 引物序列

基因	引物	序列
PGC-1α	上游	5'-CCTGCATGAGTGTGTGCTCT-3'
	下游	5'-CAGCACACTCGATGTCACTCC-3'
NRF-1	上游	5'-TCCTGGTCCAGAACTTTACACA-3'
	下游	5'-TGAAGTTCTACAAGTTTTGTCCTGT-3'
TFAM	上游	5'-CTTCACCTTGGTCTCGGTGT-3'
	下游	5'-AGGAGCAGAGCCACAGTCAT-3'
GAPDH	上游	5'-ACTAGGCGCTCACTGTTCTC-3'
	下游	5'-ATCCGTTGACTCCGACCTTC-3'

注：[*PGC-1α*] 过氧化物酶增殖激活受体 γ 辅助激活物 1α；[*NRF-1*] 核呼吸因子 1；[*TFAM*] 线粒体转录因子 A。

1.9 肝组织线粒体提取

取各组小鼠部分肝组织，剪碎后置于冰上研磨，并用 PBS 冲洗 3 次，随后加入 5 mL/g 线粒体分离试剂（0.07 mol/L 蔗糖、0.22 mol/L 甘露醇、0.001 mol/L 乙二胺四乙酸、0.005 mol/L 乙二醇双四乙酸、0.02 mol/L Tris 缓冲液），在预冷的玻璃匀浆器中进行匀浆，6 450 r/min 离心 10 min 后收集上清，12 900 r/min 离心 10 min 后弃上清，沉淀即为粗提线粒体，将得到的线粒体重悬于预冷的线粒体冻存液中置于 –80℃储存。

1.10 肝组织线粒体呼吸功能测定

清洗呼吸测定仪的反应槽数次，加入测定介质（0.07 mol/L 蔗糖、0.22 mol/L 甘露醇、0.001 mol/L 乙二胺四乙酸），待基线平稳后加入提取出的肝组织线粒体悬液，待内源底物完全消耗，基线走平后，加入外源底物，出现Ⅱ态呼吸，2 min 后加入 0.05 mol/L ADP，出现Ⅲ态呼吸。线粒体呼吸控制率 = Ⅲ态呼吸率 / Ⅱ态呼吸率。

1.11 RT-PCR 检测肝组织线粒体 DNA 的拷贝数

测定肝组织 mtDNA 浓度后，mtDNA 拷贝数以线粒体编码基因细胞色素 b 的拷贝数为代表。

引物序列：细胞色素 b 上游 5'-AAAGCCACCTTGACCCGATT-3'，下游 3'-GATTCGTAGGGCCGCGATA-5'，以 β-actin 作为内参，上游 5'-AGTGTGACGTTGACATCCGTA-3'，下游 3'-CCAGAGCAGTAATCTCCTTCT-5'。反应条件同 1.7，采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算 mtDNA 相对表达量。

1.12 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行统计分析，计量资料采用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，两组间数据比较采用两独立样本 t 检验，多组间数据比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 SNK-q 法。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 M Ⅵ对脓毒症致急性肝损伤小鼠肝功能的影响

与假手术组比较，模型组小鼠血清中 ALT 和 AST 水平显著上升（P<0.05）；与模型组比较，高剂量组小鼠血清中 ALT 和 AST 水平显著下降（P<0.05），而低剂量组差异无统计学意义（P>0.05）；与高剂量组比较，抑制剂组小鼠血清中 ALT 和 AST 水平显著上升（P<0.05）。见表 2。

2.2 M Ⅵ对脓毒症致急性肝损伤小鼠肝组织病理结构的影响

假手术组小鼠肝小叶结构完整清晰，肝细胞围绕中央静脉放射状排列，未见炎症细胞浸润；模型组和低剂量组小鼠肝小叶结构被破坏，中央静脉和汇管区周围出现桥接坏死，伴有大量炎症细胞浸润；高剂量组小鼠肝组织结构损伤较模型组明显减轻，肝小叶结构较清晰，少量炎症细胞浸润；抑制剂组汇管区炎症细胞浸润较高剂量组加重，肝细胞也出现肿胀，伴有大量炎症细胞浸润（图 1）。假手术组、模型组、低剂量组、高剂量组和抑制剂组小鼠肝组织病理学损伤评分分别为（1.3 ± 0.5）、（9.4 ± 1.1）、（8.6 ± 1.1）、（4.9 ± 0.6）和（7.8 ± 1.4）分，各组比较差异有统计学意义（F=15.677，P=0.002）。与假手术组比较，模型组小鼠肝组织病理学损伤评分显著增加（P<0.05）；与模型组比较，高剂量组小鼠肝组织病理学损伤评分显著降低（P<0.05），而低剂量组差异无统计学意义（P>0.05）；与高剂量组比较，抑制剂组小鼠肝组织病理学损伤评分显著增加（P<0.05）。

表 2 各组小鼠血清中 ALT 和 AST 水平比较

（$\bar{x} \pm s$，U/L，n=12）

组别	AST	ALT
假手术组	144 ± 7	55 ± 5
模型组	350 ± 12[a]	166 ± 10[a]
低剂量组	331 ± 10	153 ± 7
高剂量组	205 ± 6[b]	85 ± 6[b]
抑制剂组	312 ± 8[c]	129 ± 10[c]
F 值	314.510	105.615
P 值	<0.01	<0.01

注：[ALT] 丙氨酸氨基转移酶；[AST] 天冬氨酸氨基转移酶。a 示与假手术组比较，P<0.01；b 示与模型组比较，P<0.01；c 示与高剂量组比较，P<0.01。

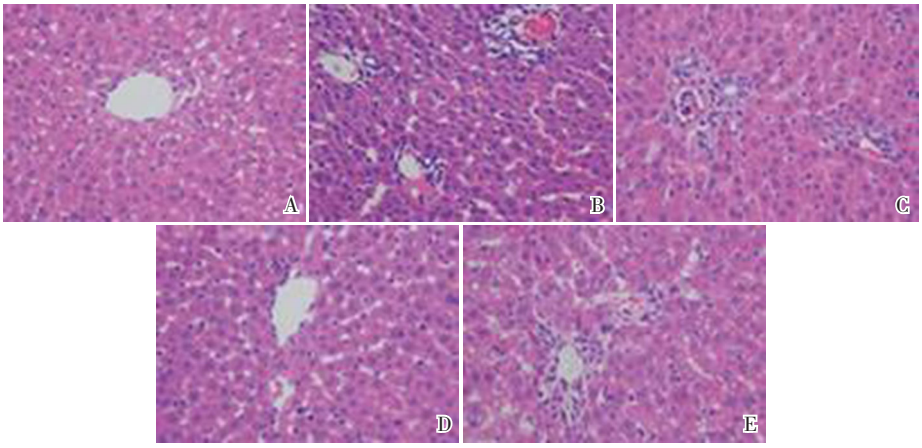

图 1 各组小鼠肝组织切片病理观察（HE 染色，×200） A：假手术组；B：模型组；C：低剂量组；D：高剂量组；E：抑制剂组。假手术组小鼠肝小叶结构完整清晰，无损伤症状；模型组小鼠肝小叶结构破坏明显，中央静脉和汇管区周围出现桥接坏死，伴有大量炎症细胞浸润；低剂量组小鼠肝小叶结构破坏严重，损伤程度较模型组没有明显区别；高剂量组小鼠肝组织结构损伤较模型组明显减轻，肝小叶结构较清晰，少量炎症细胞浸润；抑制剂组小鼠汇管区炎症细胞浸润较高剂量组加重，肝细胞也出现肿胀，伴有大量炎症细胞浸润。

2.3 M Ⅵ对脓毒症致急性肝损伤小鼠肝组织中氧化应激水平的影响

与假手术组比较，模型组小鼠肝组织中 MDA 含量显著增加，GSH-Px 和 SOD 活性显著降低（P<0.05）；与模型组比较，高剂量组小鼠肝组织中 MDA 含量显著减少，GSH-Px 和 SOD 活性显著增加（P<0.05），而低剂量组差异无统计学意义（P>0.05）；与高剂量组比较，抑制剂组小鼠肝组织中 MDA 含量显著增加，GSH-Px 和 SOD 活性显著降低（P<0.05）。见表 3。

表 3 各组小鼠肝组织中 MDA、GSH-Px 和 SOD 含量比较 （$\bar{x}\pm s$，n=12）

组别	SOD (U/mL)	MDA (nmol/mL)	GSH-Px (U/mL)
假手术组	167 ± 14	16.4 ± 1.2	1 375 ± 164
模型组	105 ± 9[a]	34.9 ± 1.9[a]	508 ± 47[a]
低剂量组	118 ± 8	31.7 ± 1.0	629 ± 79
高剂量组	143 ± 8[b]	20.0 ± 1.1[b]	1 024 ± 115[b]
抑制剂组	123 ± 9[c]	28.3 ± 1.0[c]	768 ± 68[c]
F 值	24.468	16.390	36.589
P 值	<0.01	<0.01	<0.01

注：[SOD] 超氧化物歧化酶；[MDA] 丙二醛；[GSH-Px] 谷胱甘肽过氧化物酶。a 示与假手术组比较，P<0.01；b 示与模型组比较，P<0.01；c 示与高剂量组比较，P<0.01。

2.4 M Ⅵ对脓毒症致急性肝损伤小鼠肝组织中线粒体生物合成相关基因表达的影响

与假手术组比较，模型组小鼠肝组织中 PGC-1α、NRF-1、TFAM 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低（P<0.05）；与模型组比较，高剂量组小鼠肝组织中 PGC-1α、NRF-1、TFAM 的 mRNA 和蛋白表达水平显著增加（P<0.05），而低剂量组差异无统计学意义（P>0.05）；与高剂量组比较，抑制剂组小鼠肝组织中 PGC-1α、NRF-1、TFAM 的 mRNA 和蛋白表达水平显著减少（P<0.05）。见图 2 和表 4。

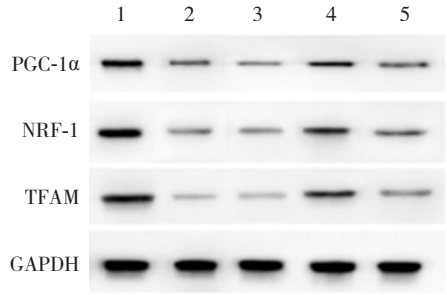

图 2 Western blot 检测肝组织中 PGC-1α、NRF-1 和 TFAM 蛋白表达电泳图 1. 假手术组；2. 模型组；3. 低剂量组；4. 高剂量组；5. 抑制剂组。

表 4 各组小鼠肝组织中 PGC-1α、NRF-1 和 TFAM mRNA 及其蛋白表达水平比较 （$\bar{x}\pm s$，n=12）

组别	mRNA 相对表达水平			蛋白相对表达水平		
	PGC-1α	NRF-1	TFAM	PGC-1α	NRF-1	TFAM
假手术组	1.011 ± 0.003	0.992 ± 0.001	1.001 ± 0.001	0.853 ± 0.063	0.906 ± 0.051	0.966 ± 0.063
模型组	0.332 ± 0.041[a]	0.263 ± 0.009[a]	0.189 ± 0.002[a]	0.111 ± 0.023[a]	0.084 ± 0.003[a]	0.051 ± 0.001[a]
低剂量组	0.377 ± 0.023	0.307 ± 0.009	0.265 ± 0.011	0.117 ± 0.007	0.122 ± 0.007	0.074 ± 0.010
高剂量组	0.826 ± 0.039[b]	0.754 ± 0.044[b]	0.783 ± 0.052[b]	0.533 ± 0.042[b]	0.643 ± 0.031[b]	0.665 ± 0.028[b]
抑制剂组	0.561 ± 0.010[c]	0.487 ± 0.034[c]	0.436 ± 0.018[c]	0.300 ± 0.020[c]	0.317 ± 0.017[c]	0.410 ± 0.022[c]
F 值	338.311	545.769	593.150	425.407	502.965	522.041
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注：[PGC-1α] 过氧化物酶增殖激活受体 γ 辅助激活物 1α；[NRF-1] 核呼吸因子 1；[TFAM] 线粒体转录因子 A。a 示与假手术组比较，P<0.01；b 示与模型组比较，P<0.01；c 示与高剂量组比较，P<0.01。

2.5 M Ⅵ对脓毒症致急性肝损伤小鼠肝组织线粒体呼吸功能的影响

假手术组、模型组、低剂量组、高剂量组和抑制剂组小鼠肝组织线粒体呼吸控制率分别为（2.88 ± 0.21）%、（1.36 ± 0.15）%、（1.40 ± 0.13）%、（2.47 ± 0.18）% 和（1.67 ± 0.09）%，各组比较差异有统计学意义（F=34.304，P<0.001）。与假手术组比较，模型组小鼠肝组织线粒体呼吸控制率显著降低（P<0.05）；与模型组比较，高剂量组小鼠肝组织线粒体呼吸控制率显著增加（P<0.05），而低剂量组差异无统计学意义（P>0.05）；与高剂量组比较，抑制剂组小鼠肝组织线粒体呼吸控制率显著降低（P<0.05）。

2.6 M Ⅵ对脓毒症致急性肝损伤小鼠肝脏 mtDNA 拷贝数的影响

假手术组、模型组、低剂量组、高剂量组和抑制剂组小鼠肝脏 mtDNA 相对拷贝数分别为 0.999 ± 0.031、0.378 ± 0.010、0.355 ± 0.013、0.754 ± 0.022 和 0.506 ± 0.020，各组比较差异有统计学意义（F=27.554，P<0.001）。与假手术组比较，模型组小鼠 mtDNA 拷贝数显著减少（P<0.05）；与模型组比较，高剂量组小鼠 mtDNA 拷贝数显著增加（P<0.05），而低剂量组差异无统计学意义（P>0.05）；与高剂量组比较，抑制剂组小鼠 mtDNA 拷贝数显著减少（P<0.05）。

3 讨论

在脓毒症状态下，肝细胞线粒体的损伤可引起肝脏能量代谢和解毒功能障碍，导致肝功能不全甚至发生肝衰竭，而通过线粒体生物合成补充新的线粒体对于组织正常功能及应激条件下细胞的适应性至关重要[8]。近年来“代谢复苏”的概念被越来越多的学者提及，即可通过线粒体靶向治疗达到对脓毒症致急性肝损伤的治疗目的。本研究通过构建脓毒症小鼠模型，探讨 M Ⅵ对脓毒症致肝损伤的保护作用及可能作用机制。

血清 ALT 和 AST 是急性肝损伤的早期标志，具有很高的特异度和灵敏度，临床上最常用于反映肝功能损害程度，其含量与肝损伤程度呈正比[9]。本研究结果显示，模型组小鼠血清中 ALT 和 AST 含量显著升高，同时肝组织 HE 染色结果显示肝小叶结构紊乱，肝细胞病变明显，且伴有大量炎症细胞浸润，说明脓毒症造模成功且已导致肝损伤。而高剂量 M Ⅵ干预可降低脓毒症小鼠血清中 ALT 和 AST 含量，并改善肝脏病理变化，初步说明 M Ⅵ对脓毒症引发的肝损伤具有保护作用。

脓毒症时体内会产生大量的氧自由基，而自由基的形成及其引发的脂质过氧化反应是肝损伤的主要机制之一。MDA 是脂质过氧化物的主要降解产物，而 SOD 和 GSH-Px 是两种主要的抗氧化剂，在维持机体的氧化 – 抗氧化动态平衡中起着重要作用，可将其作为抗氧化能力的检测指标[10]。Bacanlı 等[11]研究结果显示，脓毒症大鼠模型肝组织中 GSH-Px 和 SOD 活性降低，而 MDA 含量上升。本研究结果显示，模型组小鼠肝组织中 MDA 含量明显升高，GSH-Px 和 SOD 活性明显降低；而高剂量 M Ⅵ能显著降低小鼠肝组织中 MDA 含量，增加 GSH-Px 和 SOD 活性，提示 M Ⅵ能有效降低脓毒症致肝损伤小鼠肝组织氧化应激水平。

众多研究发现[12-13]，脓毒症可通过诱导 mtDNA 的损伤，导致 mtDNA 基因突变和数量发生改变，从而降低线粒体氧化磷酸化效应使 ATP 合成障碍，进一步造成组织损伤。线粒体损伤后会启动一系列的自我保护机制，包括启动线粒体生物合成来增加线粒体的数量，从而代偿受损线粒体的功能。而肝脏线粒体呼吸控制率可反映线粒体膜的完整性和氧化磷酸化的偶联程度，是反映线粒体功能的重要指标之一[14]。本研究结果显示，模型组小鼠肝组织线粒体呼吸控制率和 mtDNA 拷贝数均显著降低，而高剂量 M Ⅵ干预可显著增加小鼠肝组织线粒体呼吸控制率和 mtDNA 拷贝数，提示 M Ⅵ可通过改善肝脏线粒体功能障碍，减轻脓毒症造成的急性肝损伤症状。

线粒体生物合成过程受到细胞内外多个蛋白及信号通路的调控，PGC-1α 作为主要的辅助激活因子，在线粒体生物合成的调控中起到中心作用，其通过激活 NRF1/2 成为 TFAM 的启动子，从而启动线粒体基因的转录和复制。NRF-1 是调控线粒体生物合成最主要的转录因子，可促进线粒体氧化磷酸化，转录调控呼吸酶相关的细胞核基因，影响线粒体基因组的复制、转录、相关蛋白的表达[15]。为进一步明确 M Ⅵ改善脓毒症致肝损伤的具体作用机制，本研究对肝组织中线粒体生物合成相关基因的表达水平进行了检测，结果显示，模型组小鼠肝组织中 PGC-1α、NRF-1、TFAM 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低，而高剂量 M Ⅵ干预可显著上调小鼠肝组织中 PGC-1α、NRF-1、TFAM 的 mRNA 和蛋白表达水平。为了进一步探讨 M Ⅵ干预是否通过调控 PGC-1α 表达参与对脓毒症致肝损伤的保护作用，本研究采用 PGC-1α 抑制剂 SR-18292 联合高剂量 M Ⅵ进行干预。结果显示，与单纯的高剂量 M Ⅵ干预结果相比，抑制剂组小鼠肝组织损伤程度又加重，肝组织氧化应激水平又显著增加，且肝组织中 PGC-1α、NRF-1、TFAM 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低，表明 SR-18292 可抑制高剂量 M Ⅵ的干预效果。提示，

M Ⅵ可能通过 PGC-1α 途径促进肝细胞线粒体的生物合成，降低氧化应激水平，改善脓毒症小鼠的肝组织损伤程度。

综上所述，M Ⅵ可通过降低肝脏氧化应激水平，改善脓毒症小鼠肝组织损伤，其机制可能是通过促进 PGC-1α 的表达及活化，进而增强肝脏线粒体生物合成途径实现的。

［参　考　文　献］

[1] Huang M, Cai S, Su J. The pathogenesis of sepsis and potential therapeutic targets[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(21): 5376.

[2] Woźnica EA, Inglot M, Woźnica RK, et al. Liver dysfunction in sepsis[J]. Adv Clin Exp Med, 2018, 27(4): 547-551.

[3] 赵广明 , 胡占升 . 脓毒症肝损伤的发病机制与治疗研究进展 [J]. 解放军医学杂志 , 2019, 44(6): 515-520.

[4] Niu B, Ke CQ, Li BH, et al. Cucurbitane glucosides from the crude extract of Siraitia grosvenorii with moderate effects on PGC-1α promoter activity[J]. J Nat Prod, 2017, 80(5): 1428-1435.

[5] Cheng CF, Ku HC, Lin H. PGC-1α as a pivotal factor in lipid and metabolic regulation[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(11): 3447.

[6] 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.

[7] 闫梦莹 , 王妍妍 , 毛幸 , 等 . 脓毒症小鼠肝损伤时 FUNDC1/LC3 Ⅱ信号通路的变化 [J]. 中华麻醉学杂志 , 2018, 38(6): 736-738.

[8] Xing W, Yang L, Peng Y, et al. Ginsenoside Rg3 attenuates sepsis-induced injury and mitochondrial dysfunction in liver via AMPK-mediated autophagy flux[J]. Biosci Rep, 2017, 37(4): BSR20170934.

[9] 王洪雨 , 宋学敏 , 张宗泽 , 等 . 脓毒症小鼠肝损伤时胆碱能抗炎通路与自噬的关系 [J]. 中华麻醉学杂志 , 2019, 39(2): 239-242.

[10] Kingir ZB, Özdemir Kural ZN, Cam ME, et al. Effects of dapagliflozin in experimental sepsis model in rats[J]. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg, 2019, 25(3): 213-221.

[11] Bacanlı M, Aydın S, Taner G, et al. Does rosmarinic acid treatment have protective role against sepsis-induced oxidative damage in Wistar Albino rats?[J]. Hum Exp Toxicol, 2016, 35(8): 877-886.

[12] Harrington JS, Choi AMK, Nakahira K. Mitochondrial DNA in sepsis[J]. Curr Opin Crit Care, 2017, 23(4): 284-290.

[13] Zuo Y, Dang R, Peng H, et al. LL-37 exacerbates local inflammation in sepsis-induced acute lung injury by preventing mitochondrial DNA (mtDNA) degradation-induced autophagy[J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 6193-6203.

[14] 张媛媛 , 董艾莉 , 王妍妍 , 等 . 氢对脓毒症小鼠心肌线粒体 Drp1 表达的影响 [J]. 中华麻醉学杂志 , 2017, 37(9): 1136-1138.

[15] Lu P, Hogan-Cann AD, Kamboj A, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibits mitochondrial respiration by suppressing PGC-1α activity in neurons[J]. Neuropharmacology, 2019, 160: 107755.

（本文编辑：万静）