

· 论 著 ·

胡黄连苷Ⅱ调节cGAS-STING信号通路对感染性休克大鼠心肌损伤的保护作用

王梦梦¹, 杨开宁¹, 闫瑾², 丁乾³, 胡菊²

(1.河北省保定市第二中心医院药剂科,河北保定 072750;2.河北省保定市第二中心医院检验科,河北保定 072750;3.河北省保定市第二中心医院中医科,河北保定 072750)

[摘要] 目的 分析胡黄连苷Ⅱ(picroside Ⅱ, Pic-Ⅱ)调节环鸟苷酸-腺苷酸合成酶(cyclic guanylate adenylate synthetase, cGAS)-干扰素基因刺激蛋白(stimulator of interferon genes, STING)信号通路对感染性休克大鼠心肌损伤的保护作用。方法 将大鼠随机分为6组:假手术组、模型组、Pic-Ⅱ低治疗组、Pic-Ⅱ中治疗组、Pic-Ⅱ高治疗组和激活剂组,每组10只。除假手术组外,其余组采用盲肠结扎穿孔术构建感染性休克大鼠模型。超声心动图检测各组大鼠心功能,HE染色观察心肌组织病理变化,TUNEL染色观察心肌细胞凋亡情况,采用试剂盒法检测心肌损伤标志物肌钙蛋白Ⅰ(cardiac troponin I, cTn I)、脑利钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)和肌酸激酶(creatinase kinase-MB, CK-MB),酶联免疫吸附实验检测心肌组织白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-8和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平,Western blot检测心肌组织cGAS-STING通路蛋白。结果 与假手术组比较,模型组心肌纤维紊乱,心肌细胞变性坏死、左心室缩短分数(left ventricular fraction shorting, LVFS)、左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)降低,左心室舒张末期内径(left ventricular end diastolic diameter, LVEDD)、心肌细胞凋亡率增加,cTn I、BNP、CK-MB、IL-1 β 、IL-8、TNF- α 、cGAS、STING、p-TANK结合激酶1(TANK-binding kinase 1, TBK1)/TBK1、磷酸化干扰素调节因子3(phosphorylated-interferon regulatory factor 3, p-IRF3)/干扰素调节因子3(interferon regulatory factor 3, IRF3)表达升高($P < 0.05$);与模型组比较,Pic-Ⅱ低治疗组、Pic-Ⅱ中治疗组、Pic-Ⅱ高治疗组心肌损伤程度减轻,心肌细胞排列规律恢复,LVFS、LVEF升高,LVEDD、心肌细胞凋亡率下降,cTn I、BNP、CK-MB、IL-1 β 、IL-8、TNF- α 、cGAS、STING、p-TBK1/TBK1、p-IRF3/IRF3表达降低($P < 0.05$);与Pic-Ⅱ高治疗组比较,激活剂组心肌损伤进一步加重,LVFS、LVEF降低,LVEDD、心肌细胞凋亡率增加,cTn I、BNP、CK-MB、IL-1 β 、IL-8、TNF- α 、cGAS、STING、p-TBK1/TBK1、p-IRF3/IRF3表达升高($P < 0.05$)。结论 Pic-Ⅱ能够保护感染性休克大鼠心肌损伤,减少心功能障碍、心肌细胞凋亡和炎症,作用机制可能与抑制cGAS-STING信号通路有关。

[关键词] 休克;心肌损伤;胡黄连苷Ⅱ doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2025.04.011

[中图分类号] R631.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-3205(2025)04-0436-08

Protective effect of picroside Ⅱ on myocardial injury in septic shock rats by regulating GAS-STING signaling pathway

WANG Meng-meng¹, YANG Kai-ning¹, YAN Jin², DING Qian³, HU Ju²

(1. Department of Pharmacy, the Second Central Hospital of Baoding City, Hebei Province, Baoding 072750, China; 2. Department of Laboratory, the Second Central Hospital of Baoding City, Hebei Province, Baoding 072750, China; 3. Department of Traditional Chinese Medicine, the Second Central Hospital of Baoding City, Hebei Province, Baoding 072750, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the protective effect of picroside Ⅱ (Pic-Ⅱ) on myocardial injury in septic shock rats by regulating the cyclic guanylate adenylate synthetase

[收稿日期] 2024-04-02

[基金项目] 保定市科技计划项目(2241ZF017)

[作者简介] 王梦梦(1991-),女,河北涿州人,河北省保定市第二中心医院主管药师,理学硕士,从事药理学、循证药学研究。

(cGAS)-stimulator of interferon genes (STING) signaling pathway. **Methods** Rats were randomly separated into six groups: Sham group, model group, low, medium, and high Pic-Ⅱ treatment groups, and activator group, with 10 rats in each group. Except the Sham group, the other groups received cecal ligation and perforation surgery to construct a rat model of septic shock. Ultrasound echocardiography was applied to detect the cardiac function of rats in each group. HE staining was applied to observe pathological changes in myocardial tissue, and TUNEL staining was applied to observe myocardial cell apoptosis. The kit method was applied to detect myocardial injury markers, including cardiac troponin I (cTn I), brain natriuretic peptide (BNP), and creatine kinase-MB (CK-MB). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to measure interleukin (IL)-1 β , IL-8, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in myocardial tissue, and Western blot was applied to measure cGAS-STING pathway proteins in myocardial tissue. **Results** Compared with Sham group, the model group showed myocardial fiber disorder, myocardial cell degeneration and necrosis, decreased the left ventricular fraction shorting (LVFS) and left ventricular ejection fraction (LVEF), increased left ventricular end diastolic diameter (LVEDD) and myocardial cell apoptosis rate, and increased level of cTn I, BNP, CK-MB, IL-1 β , IL-8, TNF- α , cGAS, STING, p-TANK-binding kinase 1(TBK1)/TBK1, and phosphorylated-interferon regulatory factor 3 (p-IRF3)/interferon regulatory factor 3 (IRF3) ($P < 0.05$). Compared with the model group, the degree of myocardial injury in low, medium, and high Pic-Ⅱ treatment groups was reduced, and the arrangement of myocardial cells was restored to a regular pattern; the LVFS and LVEF were increased, the LVEDD and myocardial cell apoptosis rate were reduced, and the cTn I, BNP, CK-MB, IL-1 β , IL-8, TNF- α , cGAS, STING, p-TBK1/TBK1, and p-IRF3/IRF3 were reduced ($P < 0.05$). Compared with the high Pic-Ⅱ treatment group, the activator group had further aggravated myocardial injury, reduced LVFS and LVEF, increased LVEDD and myocardial cell apoptosis rate, and increased expression of cTn I, BNP, CK-MB, IL-1 β , IL-8, TNF- α , cGAS, STING, p-TBK1/TBK1, and p-IRF3/IRF3 ($P < 0.05$). **Conclusion** Pic-Ⅱ can protect against myocardial injury in septic shock rats, reduce cardiac dysfunction, and myocardial cell apoptosis and inflammation. The mechanism of action may be related to the inhibition of cGAS-STING signaling pathway.

[Key words] shock; myocardial injury; picroside Ⅱ

脓毒症是一种临床上常见的危重疾病,是由于机体对感染的反应失调而导致的危及生命的器官功能障碍^[1]。脓毒症休克即感染性休克,是脓毒症的严重表现,脓毒症休克引起炎症系统广泛激活,释放一系列促炎细胞因子,导致多器官功能障碍,在世界范围内具有较高的病死率^[2]。脓毒症休克引起的心脏损伤是脓毒症期间常见的心血管并发症,表现为左心室充盈压正常或降低,射血分数降低,以及血液循环中肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTn I)、脑利钠肽 (brain natriuretic peptide, BNP) 等升高^[3]。脓毒性休克诱发心肌损伤的机制是多方面的,目前尚不清楚。因此,探讨脓毒症休克引起心功能障碍的原因和机制具有重要意义。脓毒性休克最基本的治疗方法是尽早进行液体复苏,然而只有一半患者对该治疗有反应且疗效短暂,近年来脓毒性休克一

直是药物治疗的目标,但目前尚未开发出针对性的治疗药^[4-5]。天然产品,包括传统和草药,已被应用于医疗应用的开发。注射中药制剂已被认为是感染性休克患者的辅助治疗方法,且有研究证实中药活性成分对脓毒性休克有治疗作用^[6-7]。胡黄连苷Ⅱ (picroside Ⅱ, Pic-Ⅱ) 是从传统中草药胡黄连中提取的类黄酮化合物,具有抗炎、抗氧化等多种药理作用^[8]。研究发现, Pic-Ⅱ 能减轻脓毒症小鼠的炎症反应,还对心肌细胞损伤有保护作用^[9-10]。因此,猜测 Pic-Ⅱ 可能对脓毒症休克引起的心肌损伤有改善作用。环鸟苷酸一腺苷酸合成酶 (cyclic guanylate adenylate synthetase, cGAS) 是胞质 DNA 的传感器,能够与双链 DNA 结合,刺激三磷酸腺苷和三磷酸鸟苷转化为环鸟苷酸一腺苷酸单磷酸 (cyclic guanosine monophosphate-adenosine

monophosphate, cGAMP), 触发内质网中干扰素基因刺激蛋白 (stimulator of interferon genes, STING) 的激活, 从而引发炎症反应, 加剧组织损伤^[11]。已有研究表明, cGAS-STING 通路参与脂多糖诱导的感染性休克, 还与脓毒症诱发的心肌损伤有关^[12-13]。因此, 推测 cGAS-STING 信号可能是预防脓毒症休克心肌损伤的重要靶点。但 Pic-Ⅱ 对脓毒症休克心肌损伤保护作用的机制尚不清楚。本研究通过构建脓毒症休克模型, 探究 Pic-Ⅱ 对脓毒症休克心肌损伤的影响及其可能机制。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 选用 SPF 雄性 SD 大鼠, 体重 200~250 g, 购自上海吉辉实验动物饲养有限公司, 动物号 2130306, 生产许可证号 SCXK(沪)2022-0009, 使用许可证号 SYXK(沪)2022-0039。饲养条件为屏障环境, 恒温(25±2)℃、恒湿(55±10)%条件下, 明暗循环时间 12 h:12 h。所有大鼠均可随意进食和饮水, 实验前禁食 1 h。

本研究经河北大学动物伦理委员会批准通过(202309114)。

1.2 主要试剂与仪器 Pic-Ⅱ(上海广锐生物科技有限公司); cGAS-STING 通路激活剂(2'3'-cGAMP)(美国 MCE 公司); 苏木素伊红染色液、cTn I 试剂盒(江西江蓝纯生物试剂公司); 二抗、TUNEL 试剂盒(上海和元李记公司); BNP 试剂盒、肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor-α, TNF-α) 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(上海一研生物科技有限公司); 白细胞介素(interleukin, IL)-1β、IL-8 ELISA 试剂盒、肌酸激酶(creatine kinase-MB, CK-MB)试剂盒(上海富雨生物科技有限公司); cGAS、STING、TANK 结合激酶 1(TANK-binding kinase 1, TBK1)、磷酸化 TBK1(phosphorylated TBK1, p-TBK1)、磷酸化干扰素调节因子 3(phosphorylated-interferon regulatory factor 3, p-IRF3)、干扰素调节因子 3(interferon regulatory factor 3, IRF3)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)一抗和羊抗兔 IgG 二抗(英国 Abcam 公司)。

小动物超声成像系统(加拿大 VisualSonics 公司); 显微镜(日本 Nikon 公司); 包埋机(金华市宇典医疗器械厂); 电泳仪(上海江美生物公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型构建、分组及干预 将大鼠随机分为 6 组: 假手术组、模型组、Pic-Ⅱ 低治疗组(5 mg/kg)、Pic-Ⅱ 中治疗组(10 mg/kg)、Pic-Ⅱ 高治疗组(20 mg/kg)和激活剂组(Pic-Ⅱ 20 mg/kg + 500 μg/kg 2'3'-cGAMP), 每组 10 只, Pic-Ⅱ 和 2'3'-cGAMP 的剂量是根据参考文献^[14]和^[15]与前期预实验确定的。除假手术组外, 其余组采用盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture, CLP)构建脓毒症休克大鼠模型^[16], 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠, 腹腔消毒后在前腹部正中切开 2~3 cm 长切口, 露出盲肠, 在盲肠末端 1 cm 处结扎盲肠, 并用无菌针穿刺, 形成两对孔, 最后将盲肠放回腹腔, 逐层缝合腹部切口。假手术组大鼠开腹和闭腹, 不进行 CLP。大鼠保持在清醒、安静状态, 使用无创血压仪测量平均动脉压(mean arterial pressure, MAP), 取 3 个连续稳定血压波形的数值, 以 3 次平均值作为大鼠最终的 MAP。当造模大鼠的 MAP 降至初始血压的 2/3 时, 认为建模成功。Pic-Ⅱ 低治疗组、Pic-Ⅱ 中治疗组、Pic-Ⅱ 高治疗组和激活剂组分别于 CLP 成功后 2 h 和 14 h 经尾静脉注射相应剂量的 Pic-Ⅱ 和 2'3'-cGAMP, 假手术组和模型组尾静脉注射等量生理盐水。

1.3.2 超声心动图 给药 24 h 后, 使用无创血压仪测量 MAP, 然后腹腔注射 40 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉大鼠, 使用小动物超声成像系统评估心功能: 大鼠呈仰卧位固定, 去除胸部和上腹部的毛发, 探头置于左侧胸骨旁, 测量并记录大鼠左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、左心室缩短分数(left ventricular fraction shorting, LVFS)和左心室舒张末期内径(left ventricular end diastolic diameter, LVEDD)值。

1.3.3 血浆和组织样本收集 取心脏血, 置于肝素抗凝管中, 在室温下 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清, -80℃ 保存, 用于后续分析。然后安乐死大鼠, 将一部分心脏组织用 4% 多聚甲醛 4℃ 保存, 进行苏木精和伊红染色和 TUNEL 染色, 另一部分心脏组织在液氮中低温保存, 进行蛋白检测。

1.3.4 组织学检查 取 4% 多聚甲醛固定的心脏组织, 梯度乙醇脱水后石蜡包埋心肌组织, 切片(3 μm)。切片用二甲苯脱蜡, 梯度乙醇脱水, 并分别用苏木精溶液和伊红染色, 然后用梯度乙醇脱水。二甲苯和中性香脂透明和密封切片, 使用光学显微镜观察切片。

1.3.5 TUNEL 染色 取大鼠心肌组织石蜡切片, 用二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水合, 再用蛋白酶 K 在

37 ℃ 孵育 20 min, 将制备好的 TUNEL 检测液加入切片中, 37 ℃ 黑暗中孵育 60 min。PBS 洗涤 3 次, 然后用 DAPI 溶液对细胞核进行染色 10 min。在 CX33 荧光显微镜下观察切片, 对图像拍照。凋亡率 = 绿色荧光标记的单位细胞数/总细胞数 × 100%。

1.3.6 心肌损伤标志物检测 取大鼠血清, 按照试剂盒说明处理血清, 使用 SpectraMax iD3 酶标仪检测血清中 cTn I、BNP 和 CK-MB 水平。

1.3.7 炎症因子水平检测 收集大鼠心肌组织, 匀浆后离心取上清, 按照 ELISA 试剂盒处理上清, 使用 SpectraMax iD3 酶标仪检测上清中的 IL-1 β 、IL-8 和 TNF- α 水平。

1.3.8 Western blot 检测心肌组织蛋白表达 将大鼠心肌组织加入 RIPA 裂解液中, 用组织匀浆仪匀浆。组织在冰上裂解 30 min, 然后在 4 ℃ 下 10 000 r/min 离心 20 min。收集蛋白的上清, 用 BCA 试剂盒检测总蛋白的浓度, 加入 30 μ g 总蛋白进行变性处理, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 将蛋白转移到 PVDF 膜上。此外, 将膜在 5% 脱脂牛奶中

阻断 2 h。用 Tris 缓冲盐水洗涤 3 次, 用稀释的一抗 cGAS、STING、p-TBK1、TBK1、p-IRF3、IRF3 和 GAPDH 在 4 ℃ 下孵育过夜。再用 TBST 洗涤 3 次, 加入稀释后的二抗, 室温孵育 1 h。用 TBST 冲洗膜 3 次, 在凝胶成像系统显影后, 对膜进行拍照, 采用 Image-pro plus 软件分析相关蛋白表达。以目的蛋白与内参蛋白 GAPDH 灰度值的比值表示蛋白表达水平。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 26.0 统计软件分析数据。计量资料比较采用单因素方差分析和 SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Pic- II 对 CLP 所致 MAP 和心功能降低的影响 与假手术组比较, 模型组 MAP、LVFS、LVEF 降低, LVEDD 升高; 与模型组比较, Pic- II 低治疗组、Pic- II 中治疗组、Pic- II 高治疗组 MAP、LVFS、LVEF 升高, LVEDD 降低; 与 Pic- II 高治疗组比较, 激活剂组 MAP、LVFS、LVEF 降低, LVEDD 升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1, 表 1。

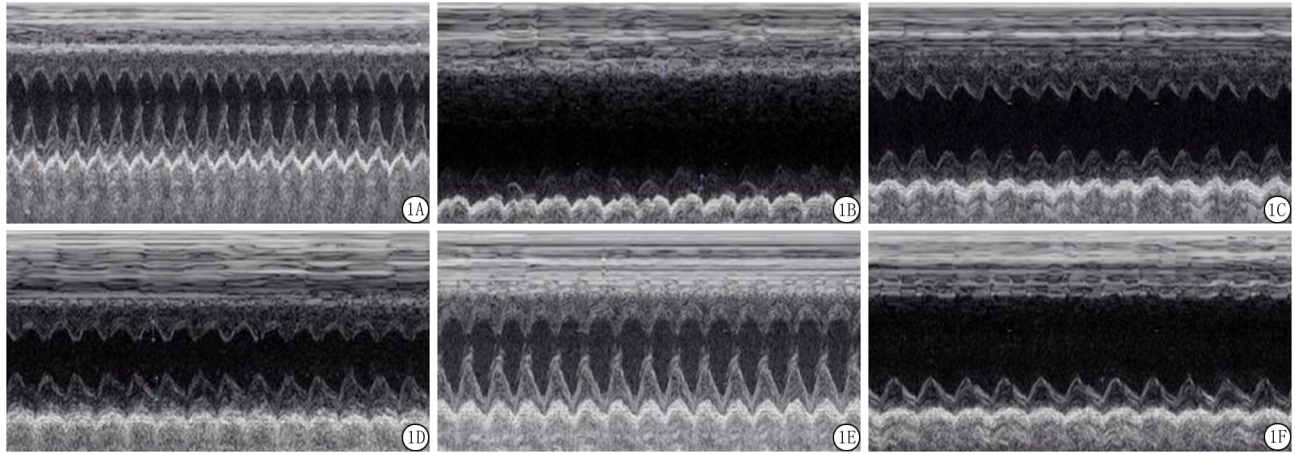


图 1 各组大鼠超声心动图

A. 假手术组; B. 模型组; C. Pic- II 低治疗组; D. Pic- II 中治疗组; E. Pic- II 高治疗组; F. 激活剂组

Figure 1 Echocardiogram of rats in each group

表 1 各组大鼠 MAP 及心功能指标

Table 1 MAP and cardiac function indexes of rats in each group

($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	MAP(mmHg)	LVEF(%)	LVFS(%)	LVEDD(mm)
假手术组	89.63 \pm 8.78	71.85 \pm 7.93	53.94 \pm 5.83	61.82 \pm 6.47
模型组	39.15 \pm 3.26*	42.68 \pm 4.71*	25.84 \pm 2.73*	98.35 \pm 10.51*
Pic- II 低治疗组	52.34 \pm 5.31 $\#$	51.83 \pm 5.72 $\#$	33.72 \pm 3.85 $\#$	87.51 \pm 9.36 $\#$
Pic- II 中治疗组	70.12 \pm 7.96 $\#$	60.19 \pm 6.97 $\#$	41.63 \pm 4.79 $\#$	78.15 \pm 8.24 $\#$
Pic- II 高治疗组	83.06 \pm 8.21 $\#$	69.55 \pm 7.26 $\#$	50.37 \pm 5.61 $\#$	65.93 \pm 6.79 $\#$
激活剂组	46.38 \pm 5.06 Δ	46.83 \pm 4.92 Δ	27.96 \pm 2.89 Δ	93.68 \pm 9.73 Δ
F 值	93.412	35.676	68.784	29.618
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

* P 值 < 0.05 与假手术组比较 # P 值 < 0.05 与模型组比较 Δ P 值 < 0.05 与 Pic- II 高治疗组比较 (SNK- q 检验) 1 mmHg = 0.133 kPa

2.2 Pic-Ⅱ对CLP所致心肌组织病理损伤的影响

假手术组心肌组织结构正常,心肌纤维排列整齐,细胞边界清晰;模型组心肌纤维紊乱,心肌细胞变性坏死,细胞边界不清,心肌纤维断裂、溶解、紊乱,并

伴有炎性细胞浸润;Pic-Ⅱ低治疗组、Pic-Ⅱ中治疗组、Pic-Ⅱ高治疗组心肌损伤程度减轻,心肌细胞排列规律恢复,少量或无炎性细胞浸润;激活剂组心肌损伤进一步加重,心肌紊乱严重,见图2。

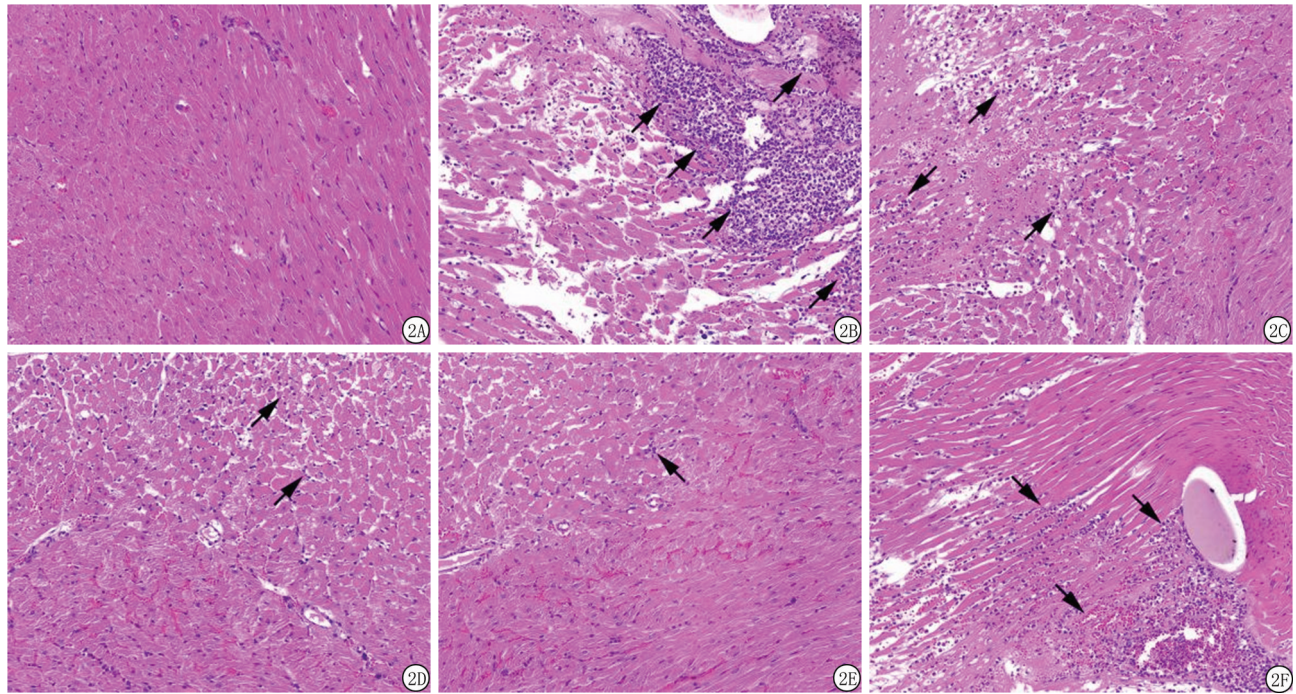


图2 心肌组织病理变化(箭头:粒细胞浸润;HE × 200)

A.假手术组;B.模型组;C.Pic-Ⅱ低治疗组;D.Pic-Ⅱ中治疗组;E.Pic-Ⅱ高治疗组;F.激活剂组

Figure 2 Pathological changes of myocardial tissue (Arrow: granulocyte infiltration; HE × 200)

2.3 Pic-Ⅱ对CLP所致心肌细胞凋亡增高的影响

与假手术组比较,模型组心肌细胞凋亡率升高;与模型组比较,Pic-Ⅱ低治疗组、Pic-Ⅱ中治疗组、

Pic-Ⅱ高治疗组心肌细胞凋亡率降低;与Pic-Ⅱ高治疗组比较,激活剂组心肌细胞凋亡率升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图3,表2。

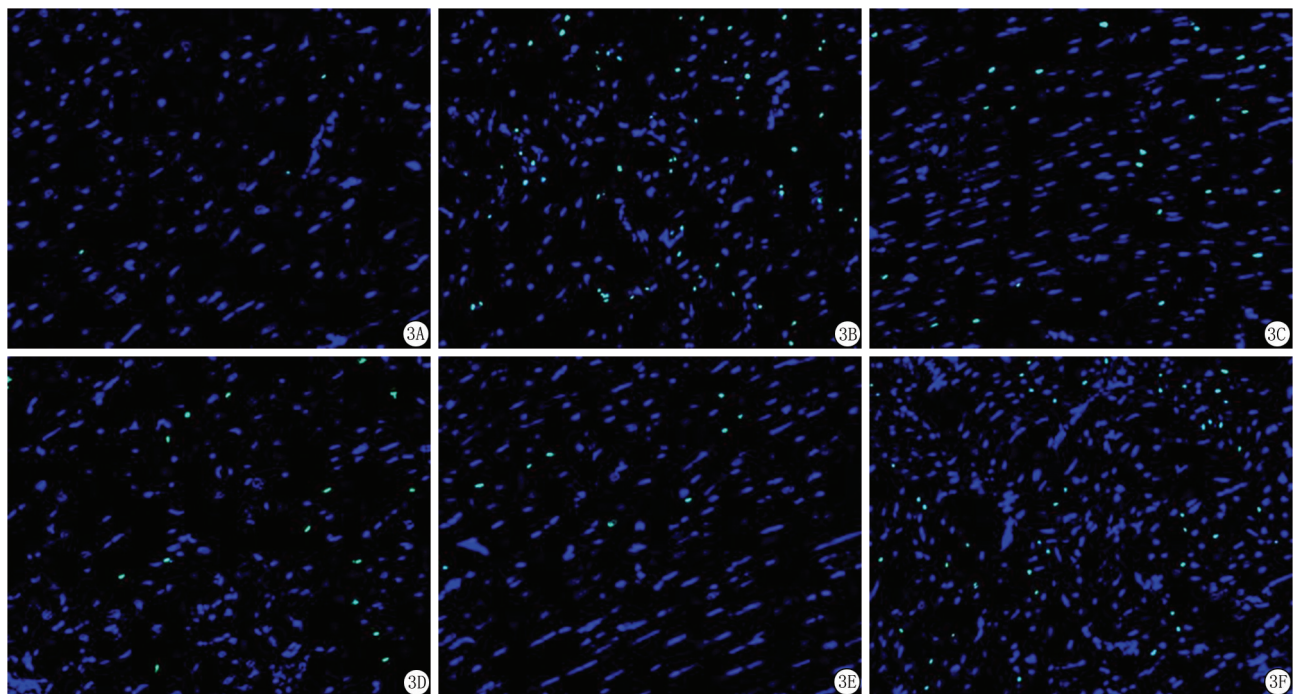


图3 心肌细胞凋亡(TUNEL × 400)

A.假手术组;B.模型组;C.Pic-Ⅱ低治疗组;D.Pic-Ⅱ中治疗组;E.Pic-Ⅱ高治疗组;F.激活剂组

Figure 3 Myocardial cell apoptosis (TUNEL ×400)**表2 各组大鼠心肌细胞凋亡率****Table 2 Apoptosis rate of myocardial cells in each group**(n=10, $\bar{x} \pm s, \%$)

组别	凋亡率
假手术组	1.03±0.14
模型组	11.72±1.48*
Pic-Ⅱ低治疗组	9.37±1.06#
Pic-Ⅱ中治疗组	7.13±0.92#
Pic-Ⅱ高治疗组	5.68±0.79#
激活剂组	10.35±1.16 [△]
F 值	145.812
P 值	<0.001

* P 值<0.05 与假手术组比较 # P 值<0.05 与模型组比较

[△]P 值<0.05 与 Pic-Ⅱ高治疗组比较(SNK-q 检验)

2.4 Pic-Ⅱ对 CLP 所致心肌损伤标志物增高的影响 与假手术组比较,模型组 cTn I、BNP、CK-MB 水平升高;与模型组比较,Pic-Ⅱ低治疗组、Pic-Ⅱ中治疗组、Pic-Ⅱ高治疗组 cTn I、BNP、CK-MB 水平降低;与 Pic-Ⅱ高治疗组比较,激活剂组 cTn I、BNP、CK-MB 水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表3 各组大鼠心肌损伤标志物水平**Table 3 Levels of myocardial injury markers in rats in each group**(n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	cTn I (ng/L)	BNP(ng/L)	CK-MB(U/L)
假手术组	31.59±3.68	42.59±4.86	33.49±3.91
模型组	142.63±18.96*	228.53±26.81*	96.75±10.37*
Pic-Ⅱ低治疗组	109.53±14.72#	174.73±21.09#	74.92±8.65#
Pic-Ⅱ中治疗组	83.51±9.64#	122.84±16.51#	58.29±6.33#
Pic-Ⅱ高治疗组	51.92±6.38#	82.06±9.70#	45.28±4.94#
激活剂组	128.09±15.74 [△]	191.63±22.58 [△]	91.38±9.86 [△]
F 值	117.361	144.489	107.267
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

* P 值<0.05 与假手术组比较 # P 值<0.05 与模型组比较

[△]P 值<0.05 与 Pic-Ⅱ高治疗组比较(SNK-q 检验)

2.5 Pic-Ⅱ对 CLP 所致心肌炎症因子升高的影响 与假手术组比较,模型组 IL-1 β 、IL-8、TNF- α 水平升高;与模型组比较,Pic-Ⅱ低治疗组、Pic-Ⅱ中治疗组、Pic-Ⅱ高治疗组 IL-1 β 、IL-8、TNF- α 水平降低;与 Pic-Ⅱ高治疗组比较,激活剂组 IL-1 β 、IL-8、

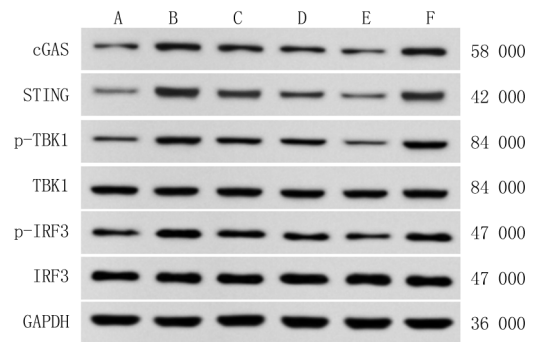
TNF- α 水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 4。

2.6 Pic-Ⅱ对 CLP 所致 cGAS-STING 通路激活的影响 与假手术组比较,模型组 cGAS、STING、p-TBK1/TBK1、p-IRF3/IRF3 表达升高;与模型组比较,Pic-Ⅱ低治疗组、Pic-Ⅱ中治疗组、Pic-Ⅱ高治疗组 cGAS、STING、p-TBK1/TBK1、p-IRF3/IRF3 表达降低;与 Pic-Ⅱ高治疗组比较,激活剂组 cGAS、STING、p-TBK1/TBK1、p-IRF3/IRF3 表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 4、表 5。

表4 各组大鼠炎症因子水平**Table 4 Levels of inflammatory factors in rats in each group**(n=10, $\bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

组别	IL-1 β	IL-8	TNF- α
假手术组	61.38±6.92	53.06±6.35	121.53±14.82
模型组	147.16±16.82*	104.27±11.53*	264.27±29.37*
Pic-Ⅱ低治疗组	126.58±14.73#	91.52±9.24#	203.51±22.94#
Pic-Ⅱ中治疗组	91.63±10.25#	75.39±7.87#	168.43±18.59#
Pic-Ⅱ高治疗组	74.29±8.37#	59.22±6.31#	135.36±14.72#
激活剂组	131.75±15.82 [△]	95.32±9.74 [△]	226.45±25.83 [△]
F 值	73.763	56.276	63.847
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

* P 值<0.05 与假手术组比较 # P 值<0.05 与模型组比较

[△]P 值<0.05 与 Pic-Ⅱ高治疗组比较(SNK-q 检验)**图4 各组大鼠心肌组织 cGAS-STING 通路蛋白表达**

A.假手术组;B.模型组;C.Pic-Ⅱ低治疗组;D.Pic-Ⅱ中治疗组;E.Pic-Ⅱ高治疗组;F.激活剂组

Figure 4 Expression of cGAS-STING pathway proteins in myocardial tissue of rats in each group

表5 各组 cGAS-STING 通路蛋白表达
Table 5 Expression of cGAS-STING pathway proteins in each group

(n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	cGAS	STING	p-TBK1/TBK1	p-IRF3/IRF3
假手术组	0.25±0.03	0.31±0.04	0.38±0.04	0.42±0.06
模型组	0.88±0.09*	1.05±0.11*	0.95±0.10*	0.98±0.10*
Pic-Ⅱ 低治疗组	0.70±0.07#	0.83±0.09#	0.74±0.08#	0.82±0.09#
Pic-Ⅱ 中治疗组	0.54±0.06#	0.61±0.07#	0.62±0.07#	0.70±0.08#
Pic-Ⅱ 高治疗组	0.32±0.04#	0.43±0.05#	0.42±0.04#	0.51±0.06#
激活剂组	0.92±0.06 Δ	0.92±0.10 Δ	0.91±0.09 Δ	0.92±0.10 Δ
F 值	208.960	128.719	106.748	72.504
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

* P 值<0.05 与假手术组比较 # P 值<0.05 与模型组比较 Δ P 值<0.05 与 Pic-Ⅱ 高治疗组比较(SNK-q 检验)

3 讨 论

脓毒症是重症监护室病死率的主要原因之一，可发展为脓毒症休克甚至危及生命的器官功能障碍^[2]。在脓毒症休克患者中，由于组织和器官长期暴露于病原体而引起的炎症会导致重要器官功能障碍和衰竭，特别是心肌功能障碍，这是造成脓毒症休克相关器官损害的发病率和病死率高的主要原因^[17]。脓毒症休克心肌损伤的发病机制包括炎症反应、氧化应激、钙调节障碍、自噬损伤、细胞凋亡损伤、线粒体功能障碍和内皮功能障碍，但其确切机制尚不完全清楚^[18]。尽管近年来在器官功能支持、微循环稳定和抗感染治疗方面改善显著，但对于脓毒症休克及相关并发症仍然没有令人满意的药物或治疗方法。因此，寻找可治疗脓毒症休克心肌损伤的药物对于改善脓毒症患者预后具有重要意义。Pic-Ⅱ已被发现具有抗氧化、抗炎和抗凋亡活性，在心机损伤、肝损伤、炎症和癌症等方面发挥重要作用^[8]。Yao 等^[14]发现，Pic-Ⅱ能够通过抑制炎症小体的产生减轻硫酸葡聚糖钠诱导的溃疡性结肠炎；Piao 等^[19]发现，Pic-Ⅱ能够通过抑制炎症和氧化应激发挥对急性胰腺炎诱导的肝细胞损伤的保护作用。此外，Pic-Ⅱ分别对脓毒症、心肌细胞损伤均有改善作用^[12-13]，因此，推测 Pic-Ⅱ对脓毒症休克后引起的心肌损伤可能有改善作用。

脓毒症休克引起的心肌损伤发病机制与收缩功能障碍、心肌细胞凋亡和长期炎症有关^[20]。本研究采用 CLP 法构建脓毒症大鼠模型，发现大鼠表现出 LVEF、LVFS 下降，LVESD 增加，心肌纤维紊乱，心肌细胞变性坏死，表明脓毒症休克模型构建成功，且大鼠出现心肌损伤。cTn I、BNP、CK-MB 是检测心肌损伤的高度敏感标志物，其水平升高预示着脓毒症休克患者预后不良和病死率增加^[21]。本研究结果显示，CLP 大鼠血清 cTn I、BNP、CK-MB

水平升高，进一步证明脓毒症休克大鼠出现心肌损伤。Pic-Ⅱ已被发现对脓毒症及心肌损伤有保护作用，Pic-Ⅱ治疗后 CLP 大鼠心肌损伤程度减轻，心功能恢复，cTn I、BNP、CK-MB 水平降低，提示 Pic-Ⅱ能够减轻脓毒症休克引起的心肌损伤。细胞凋亡可能是导致脓毒症休克心脏动力学改变的原因^[20]。炎症反应也是心脏病理性损伤加重的触发点，甚至发展为急性心力衰竭，TNF- α 、IL-1 β 和 IL-8 水平上调已被证实与脓毒症引起的心肌损伤密切相关^[22]。Pic-Ⅱ能够抑制炎症反应减少细胞凋亡^[23]。本研究结果显示，CLP 大鼠心肌细胞凋亡率和炎症因子 IL-1 β 、IL-8、TNF- α 水平显著升高，进而影响心功能；而 Pic-Ⅱ治疗后 CLP 大鼠心肌细胞凋亡率降低，炎症因子 IL-1 β 、IL-8、TNF- α 水平降低，提示 Pic-Ⅱ可能通过抑制心肌细胞凋亡和炎症反应发挥对脓毒症休克大鼠的心肌保护作用。

cGAS 作为 DNA 的细胞质传感器，主要来源于病原体，激活的 cGAS 触发 cGAMP 的产生，cGAMP 与内质网中的 STING 结合，使其转移到高尔基体，激活 TBK1 和 IRF3 磷酸化，触发多种炎症因子的表达^[11]。cGAS-STING 信号级联异常激活与多种炎症疾病密切相关，如 cGAS-STING 通路与感染性休克有关，阻断 cGAS-STING 信号转导可预防脓毒症相关的急性肝损伤^[8,24]。cGAS-STING 通路的激活还与心肌缺血/再灌注损伤、阿霉素诱导的心脏毒性有关^[25-26]。本研究结果显示，CLP 大鼠 cGAS、STING、p-TBK1/TBK1、p-IRF3/IRF3 表达升高，提示感染性休克诱导 cGAS-STING 信号通路的激活，引发心肌损伤。Pic-Ⅱ治疗后心肌组织中 cGAS-STING 信号通路受到抑制，提示 Pic-Ⅱ可能通过抑制 cGAS-STING 信号通路，发挥对脓毒症休克大鼠心肌损伤的保护作用，改善心功能。STING 激动剂 2' 3'-cGAMP 能够激活 cGAS-STING 通路，本研究在 Pic-Ⅱ治疗组的基础上使用

2'3'-cGAMP,发现 Pic- II 对 cGAS-STING 信号通路的抑制和对脓毒症休克大鼠心肌损伤的保护作用被抵消,进一步验证 Pic- II 的治疗作用机制。

综上所述,Pic- II 能够保护感染性休克大鼠心肌损伤,减少心功能障碍、心肌细胞凋亡和炎症,作用机制可能与抑制 cGAS-STING 信号通路有关。Pic- II 可能是未来治疗感染性休克一种有前景的药物,但是本研究结果都是基于动物的,未来应增加感染性休克心肌损伤患者的样本,以制定治疗新策略。

[参考文献]

- [1] Liu D, Huang SY, Sun JH, et al. Sepsis-induced immunosuppression: mechanisms, diagnosis and current treatment options[J]. *Mil Med Res*,2022,9(1):56.
- [2] Liu YC, Yao Y, Yu MM, et al. Frequency and mortality of sepsis and septic shock in China: a systematic review and meta-analysis[J]. *BMC Infect Dis*,2022,22(1):564.
- [3] Liu J,Zhang X,Lao Y,et al. Protective effect of topiroxostat on myocardial injury induced by lipopolysaccharide[J]. *J Surg Res*,2022,271:171-179.
- [4] Ibarra-Estrada M,Kattan E,Aguilera-González P,et al. Early adjunctive methylene blue in patients with septic shock: a randomized controlled trial[J]. *Crit Care*,2023,27(1):110.
- [5] Foster DM,Kellum JA. Endotoxic septic shock:diagnosis and treatment[J]. *Int J Mol Sci*,2023,24(22):16185.
- [6] Huang P, Chen Y, Liu Q, et al. Comparative efficacy of Chinese herbal injections for septic shock: A protocol for systematic review and network meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*,2022,101(5):e28183.
- [7] Zhao J, Liu H, Hong Z, et al. Tanshinone I specifically suppresses NLRP3 inflammasome activation by disrupting the association of NLRP3 and ASC[J]. *Mol Med*,2023,29(1):84.
- [8] Ma S,Wang X,Lai F,et al. The beneficial pharmacological effects and potential mechanisms of picoside II :Evidence of its benefits from in vitro and in vivo [J]. *Biomed Pharmacother*,2020,130:110421.
- [9] Huang Y,Zhou M,Li C,et al. Picoside II protects against sepsis via suppressing inflammation in mice[J]. *Am J Transl Res*,2016,8(12):5519-5531.
- [10] 陈烁帆,赵金丹,饶红.胡黄连苷 II 减轻阿霉素诱发 H9C2 心肌细胞损伤的潜在机制研究[J].*重庆医学*,2023,52(19):2899-2904,2911.
- [11] Skopelja-Gardner S, An J, Elkon KB. Role of the cGAS-STING pathway in systemic and organ-specific diseases[J]. *Nat Rev Nephrol*,2022,18(9):558-572.
- [12] Gu Y, Tang J, Zhang F, et al. Manganese potentiates lipopolysaccharide-induced innate immune responses and septic shock[J]. *Int J Biol Macromol*,2023,230:123202.
- [13] Liu H, Hu Q, Ren K, et al. ALDH2 mitigates LPS-induced cardiac dysfunction, inflammation, and apoptosis through the cGAS/STING pathway[J]. *Mol Med*,2023,29(1):171.
- [14] Yao H, Yan J, Yin L, et al. Picoside II alleviates DSS-induced ulcerative colitis by suppressing the production of NLRP3 inflammasomes through NF- κ B signaling pathway [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*,2022,44(3):437-446.
- [15] Ding R, Li H, Liu Y, et al. Activating cGAS-STING axis contributes to neuroinflammation in CVST mouse model and induces inflammasome activation and microglia pyroptosis[J]. *J Neuroinflammation*,2022,19(1):137.
- [16] 杨洋,王晓静,王前,等.过表达中介素对感染性休克大鼠心肌损伤的保护机制[J].*中华医院感染学杂志*,2023,33(3):335-339.
- [17] Chen Y, Cui M, Cui Y. Vagus nerve stimulation attenuates septic shock-induced cardiac injury in rats[J]. *Physiol Res*,2023,72(6):731-739.
- [18] Yang Z, Wang J, Ma J, et al. Fibroblast growth factor 23 during septic shock and myocardial injury in ICU patients[J]. *Heliyon*,2024,10(6):e27939.
- [19] Piao X, Sui X, Liu B, et al. Picoside II improves severe acute pancreatitis-induced hepatocellular injury in rats by affecting JAK2/STAT3 phosphorylation signaling [J]. *Biomed Res Int*,2021,2021:9945149.
- [20] Zhao H, Wang Y, Zhu X. Chrysophanol exerts a protective effect against sepsis-induced acute myocardial injury through modulating the microRNA-27b-3p/Peroxisomal proliferating-activated receptor gamma axis[J]. *Bioengineered*,2022,13(5):12673-12690.
- [21] Tang F, Liu D, Wan F, et al. Ameliorative effect of anisodamine (654-1/654-2) against myocardial dysfunction induced by septic shock via the NF- κ B/NLRP-3 or the PI3K-AKT/NF- κ B pathway[J]. *Phytomedicine*,2024,123:155277.
- [22] Zhang L, Jian X, Yu J, et al. Pterostilbene interferes with lipopolysaccharide-induced myocardial injury through oxidative stress and inflammasome pathways [J]. *Front Physiol*,2022,13:862187.
- [23] Li H, Du W, Yuan Y, et al. The protective effect of picoside II on isoflurane-induced neuronal injury in rats via downregulating miR-195 [J]. *Neuroimmunomodulation*,2022,29(3):202-210.
- [24] Li J, Lu Y, Lin G. Blocking cGAS/STING signaling protects against sepsis-associated acute liver injury [J]. *Int Immunopharmacol*,2022,113(Pt A):109276.
- [25] Li JK, Song ZP, Hou XZ. Scutellarin ameliorates ischemia/reperfusion injury-induced cardiomyocyte apoptosis and cardiac dysfunction via inhibition of the cGAS-STING pathway[J]. *Exp Ther Med*,2023,25(4):155.
- [26] Xiao Z, Yu Z, Chen C, et al. GAS-STING signaling plays an essential pathogenetic role in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity[J]. *BMC Pharmacol Toxicol*,2023,24(1):19.

(本文编辑:赵丽洁)