

· 论著 ·

鞣花酸灌胃对脂多糖诱导的脓毒症心功能不全的影响

刘江文 王凤媛 李彬 杨双 吴浩亮 唐艳红 王晞 黄从新

(武汉大学人民医院心内科 武汉大学心血管病研究所 心血管病湖北省重点实验室,湖北 武汉 430060)

【摘要】目的 探究鞣花酸(EA)对脂多糖(LPS)诱导的脓毒症所致心功能不全保护作用的潜在机制。**方法** 将 32 只 C57BL/6 小鼠分为 4 组:对照 Control(Con)组($n=8$),LPS 组($n=8$),20EA(20 mg/kg)组($n=8$),40EA(40 mg/kg)组($n=8$)。20EA 及 40EA 组用 EA 灌胃 14 d 后腹腔注射 10 mg/kg LPS,Con 组使用等量生理盐水灌胃。超声心动图评测心功能,分析射血分数及短轴缩短率,生化法检测超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)及乳酸脱氢酶(LDH)血清水平。**结果** 超声心动图显示 EA 以剂量依赖的方式改善 LPS 诱导的心脏的射血分数及短轴缩短率。生化检测显示,与对照组相比,LPS 组 SOD 血清水平下降,MDA、CK-MB 及 LDH 血清水平升高,EA 可呈剂量依赖性上调 SOD,下调 MDA、CK-MB 及 LDH 的血清水平。蛋白免疫印迹显示 EA 预处理可上调核转录因子红系 2 相关因子 2(Nrf2)以及血红素加氧酶 1(HO-1)的水平。**结论** EA 可有效改善 LPS 诱导的心功能不全,可能是通过减轻氧化应激水平及上调 Nrf2/HO-1 水平发挥作用。

【关键词】 鞣花酸;脓毒症;氧化应激

【DOI】10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2023.02.019

Effects of Ellagic Acid Intra-gastric Administration on Cardiac Insufficiency Induced by Lipopolysaccharide Sepsis

LIU Jiangwen, WANG Fengyuan, LI Bin, YANG Shuang, WU Haoliang, TANG Yanhong, WANG Xi, HUANG Congxin

(Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Cardiovascular Research Institute of Wuhan University, Hubei Key Laboratory of Cardiology, Wuhan 430060, Hubei, China)

【Abstract】Objective To investigate the probable mechanism of ellagic acid(EA)'s preventive effect on cardiac insufficiency caused by lipopolysaccharide (LPS)-induced sepsis. **Methods** 32 C57BL/6 mice were placed into four groups: Control(Con, $n=8$), LPS($n=8$), 20EA($n=8$), and 40EA($n=8$). 20EA and 40EA groups were administered EA for 14 days, followed by intraperitoneal injections of 10 mg/kg LPS. The Con group was given the equivalent saline by gastric gavage. The heart function was evaluated using echocardiography, ejection fraction and fractional shortening were assessed, and serum levels of superoxide dismutase(SOD), malondialdehyde(MDA), creatine kinase isoenzyme(CK-MB), and lactate dehydrogenase(LDH) were tested using a biochemical approach. **Results** Echocardiography showed that EA improved LPS-induced cardiac ejection fraction and fractional shortening in a dose-dependent manner. Biochemical assays showed that compared with the control group, levels of SOD decreased and serum levels of MDA, CK-MB and LDH increased in the LPS group. EA improved SOD and decreased the serum levels of MDA, CK-MB and LDH in a dose-dependent way. The western blot results indicate that EA pretreatment could increase nuclear factor erythroid 2-related factor 2(Nrf2) and hemeoxygenase-1(HO-1) levels. **Conclusion** EA can significantly ameliorate the cardiac dysfunction generated by LPS, which may play a role in reducing the level of oxidative stress and elevating the levels of Nrf2/HO-1.

【Key words】 Ellagic acid; Sepsis; Oxidative stress

脓毒症表现为机体对感染反应失调的炎症,可导致多器官的损伤甚至衰竭,因此在临床上具有极高的死亡率^[1]。脓毒症发生时,组织和循环中的炎症细胞因子显著升高,炎症因子产物可在心肌细胞周围产生大量活性氧和超氧阴离子继而导致组织的损伤^[2]。心脏功能障碍是脓毒症的致命并发症,主要表现为收缩功能下降。尽管支持治疗技术手段日益成熟,其死

亡率仍可达 70%^[3],探索脓毒症的发病机制及新的治疗方案愈发重要。鞣花酸(ellagic acid, EA)是一种植物来源的多酚,作为一种有效的过氧亚硝酸盐清除剂,EA 具有强大的抗炎抗氧化作用^[4]。之前的研究表明,EA 可以通过抑制氧化应激及细胞凋亡水平预防兔的动脉粥样硬化^[5],在阿霉素诱导的心肌损伤小鼠模型中,EA 灌胃预处理可有效减轻氧化应激水平

基金项目:湖北省技术创新专项(重大项目)(2016ACA153)

通信作者:黄从新, E-mail: huangcongxin@vip.163.com

从而保护心脏^[6]。尽管如此,EA 在脓毒症中的作用尚不明确。本研究旨在探索 EA 在脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的脓毒症心肌炎中的作用,并进一步探讨可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本研究选用 32 只体重 22 ~ 25 g 成年无特定病原体级 C57BL/6 小鼠(6 ~ 8 周龄),所有动物饲养于室温(24 ± 2)℃并自由饮水进食。实验动物被随机分为 4 组,对照 Control (Con) 组($n = 8$),LPS 组($n = 8$),20 mg/kg EA(20EA)组($n = 8$),40 mg/kg EA(40EA)组($n = 8$)。Con 组腹腔注射生理盐水,LPS 组注射 10 mg/kg LPS,20EA 及 40EA 组予 EA 及 LPS 处理。

1.2 实验设计

EA 灌胃,每天 1 次,连续 14 d,第 14 天灌胃 1 h 后,腹腔注射生理盐水或 LPS(10 mg/kg),小鼠毛发竖立,眼周出现脓性分泌物则为造模成功。动物的治疗遵循美国国立卫生研究院发布的《保护和使用实验动物的指导原则》。

1.3 超声心动图检查

LPS 注射 12 h 后用 3% 异氟醚麻醉小鼠,取仰卧位后超声心动图 M 型平面图像,测量的心功能指标包括射血分数(ejection fraction, EF)和短轴缩短率(fractional shortening, FS)。

1.4 血清生化检测

注射 LPS 或生理盐水 12 h 后,从小鼠眼球取血,静置 1 h 后,以 3 500 r/min 的速度离心。收集上清液储存于 -80 ℃冰箱中进行生化指标检测。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzyme, CK-MB)及乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)血清水平按照制造商(武汉赛维尔)的试剂盒进行检测。

1.5 蛋白免疫印迹

小鼠处死后取心脏储存于 -80 ℃冰箱中。随后

称取 30 g 心脏组织置于 1.5 mL 离心管中,加入蛋白裂解液提取总蛋白,使用 BCA 蛋白分析试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific)检测蛋白浓度。测量后用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳法分离每个样品的等量蛋白质,然后转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜(美国米利波)。PVDF 膜用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,随后将膜与特异性一抗于 4 ℃冰箱孵育过夜。第 2 天将一抗孵育的膜用 Tris 缓冲液加 Tween 20 液清洗 5 min 后与二抗在室温下孵育 2 h。最后,使用增强型化学发光试剂对孵育的膜进行蛋白可视化操作,并使用 Image J 软件对蛋白定量。

1.6 HE 染色

快速获取心脏组织,用生理盐水洗净并擦干,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定。将固定的组织用石蜡包埋,然后切成 5 μm 厚切片,进行 HE 染色并观察染色区域心肌组织结构与炎症浸润变化。

1.7 数据分析

采用 GraphPad Prism 9.0 软件分析和处理数据。所有数据均以均值 ± 标准误($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析比较多组间数据,两组间数据比较采用非配对 t 检验确定, $P < 0.05$ 有统计学意义。

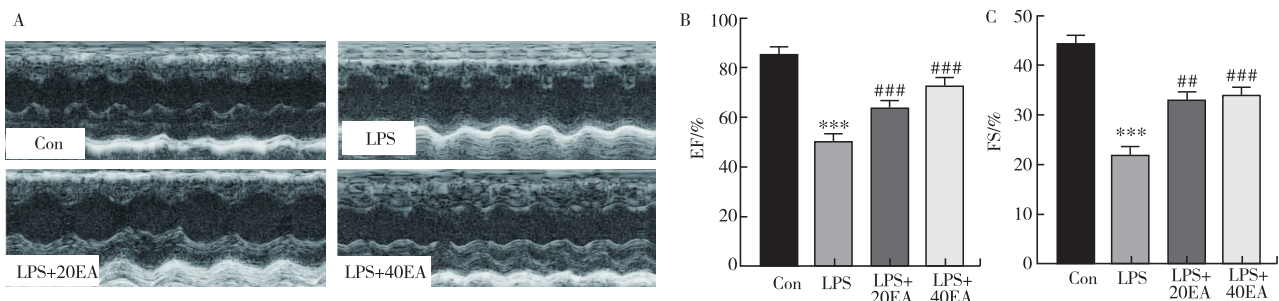
2 结果

2.1 EA 灌胃对 LPS 诱导的小鼠心肌功能障碍具有改善作用

3% 异氟醚轻度麻醉小鼠后使用超声心动图观察左心功能。表 1 数据显示,与接受生理盐水灌胃的 Con 组相比,注射 LPS 导致显著的左心室收缩功能障碍,EF 和 FS 显著降低。EA 预处理呈剂量依赖方式显著降低 LPS 对 EF 的影响(图 1)。提示 EA 可显著改善 LPS 诱导的心肌收缩功能障碍。

表 1 EA 对各组小鼠超声心动图的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

分组	EF/%	FS/%
Con	85.09 ± 1.20	44.45 ± 1.62
LPS	50.46 ± 2.41	22.20 ± 1.68
LPS + 20EA	64.50 ± 1.39	33.13 ± 1.86
LPS + 40EA	73.29 ± 1.07	34.34 ± 1.49



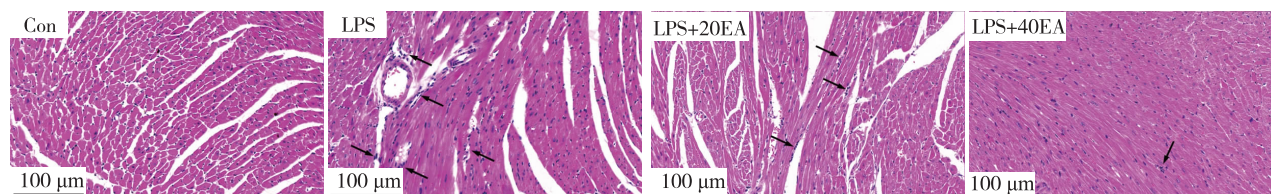
注:图 A 为胸骨旁短轴切面,M 型超声模式记录的四组动物左心室乳头肌平面超声图。图 B 和图 C 分别为各组 EF 和 FS 的直方图。
***表示与 Con 组对比, $P < 0.001$;##表示与 LPS 组对比, $P < 0.01$;###表示与 LPS 组对比, $P < 0.001$ 。

图 1 各组小鼠的超声心动图分析

2.2 EA 灌胃对 LPS 诱导的小鼠心肌形态变化的影响

之前的实验表明,脓毒症心肌炎可使心肌结构改变,如心室扩张。本研究观察了 EA 对 LPS 诱导的心肌功能不全的改善作用。结果表明,Con 组心肌纤维结

构正常,横纹清晰,未见炎性细胞浸润。使用 LPS 处理的小鼠可见明显的炎性细胞浸润及心肌纤维间隙变宽(图 2),而使用 EA 预处理的小鼠心肌炎症细胞明显呈剂量依赖性减少。该实验结果表明,EA 预处理可有效改善 LPS 诱导的心肌结构改变。



注:箭头表示聚集的炎症细胞。

图 2 通过 HE 染色观察 EA 预处理对 LPS 诱导的心肌组织形态的影响

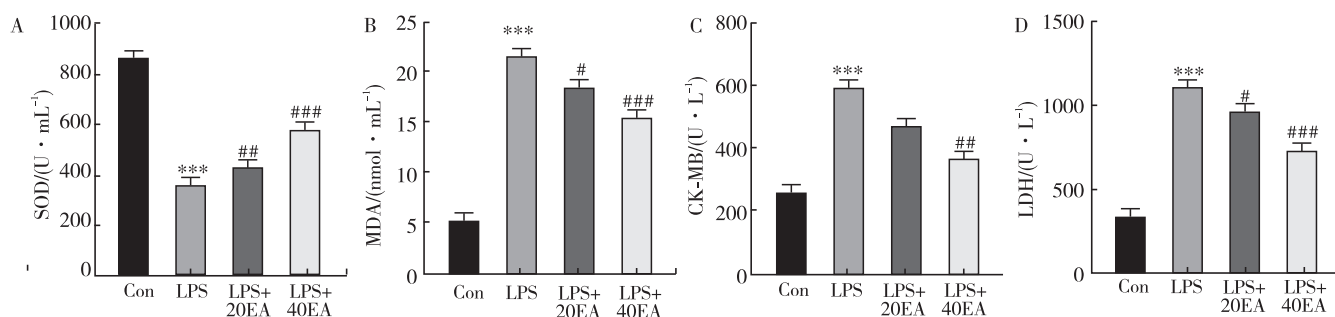
2.3 EA 对 LPS 诱导的脓毒症小鼠血清 SOD、MDA、CK-MB 和 LDH 变化的影响

为了研究 EA 对 LPS 导致心肌损伤的变化,本研究检测了血清 SOD 和 MDA 的水平,同时也检测了血清中心肌损伤标志物 CK-MB 及 LDH 的表达。表 2 展

示了 Con 组与 LPS 组炎症及氧化应激的比较数据,与对照组相比,LPS 组的 SOD 显著降低,MDA、CK-MB 和 LDH 显著升高,而 EA 灌胃预处理可呈剂量依赖性上调 SOD,下调 MDA、CK-MB 和 LDH 的血清水平(图 3)。

表 2 各组中 SOD、MDA、CK-MB、LDH 表达水平的比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

分组	SOD/(U·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)	CK-MB/(U·L ⁻¹)	LDH/(U·L ⁻¹)
Con	865.60 ± 11.59	5.21 ± 0.10	255.30 ± 6.99	329.90 ± 39.66
LPS	368.70 ± 12.97	21.56 ± 1.01	592.80 ± 63.25	1 109.00 ± 40.69
LPS+20EA	431.00 ± 5.40	18.31 ± 0.49	464.60 ± 5.13	959.40 ± 15.86
LPS+40EA	576.00 ± 8.17	15.32 ± 0.48	363.00 ± 9.19	724.80 ± 25.36



注:图 A~D 分别为血清中 SOD、MDA、CK-MB 和 LDH 的表达水平。***表示与 Con 组对比, $P < 0.001$;#表示与 LPS 组对比, $P < 0.05$;##表示与 LPS 组对比, $P < 0.01$;###表示与 LPS 组对比, $P < 0.001$ 。

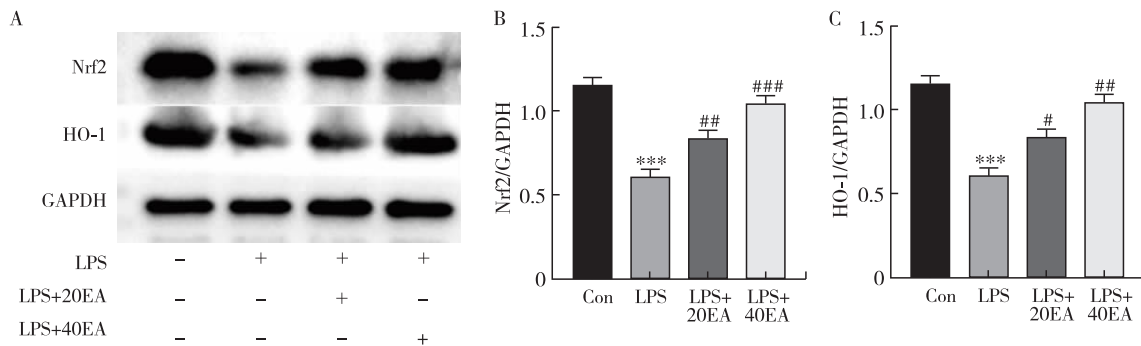
图 3 LPS 诱导的脓毒症小鼠心肌损伤指标

2.4 EA 预处理可上调 LPS 诱导的小鼠脓毒症心肌炎 Nrf2 蛋白水平

为了进一步确定 LPS 和 EA 对脓毒症心肌炎氧化应激水平的可能机制,本研究检测了抗氧化因子核转录因子红系 2 相关因子 2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 和血红素加氧酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 的蛋白表达水平。图 4 显示,相对于 Con 组,LPS 处理可引起明显的 Nrf2 及 HO-1 降低,而 EA 预处理可呈剂量依赖方式上调 Nrf2 及 HO-1。

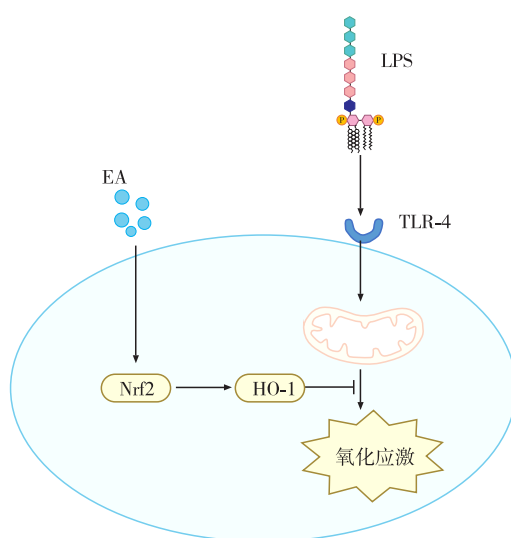
3 讨论

本实验表明,LPS 可造成小鼠的心肌损伤,表现为 SOD 水平的降低以及 MDA、CK-MB 及 LDH 水平的升高,EA 的灌胃预处理可显著改善 LPS 所致心肌损伤。超声心动图及 HE 染色结果表明,EA 灌胃可以减轻 LPS 诱导的脓毒症心功能不全,这可能是通过促进 Nrf2/HO-1 的表达从而抑制线粒体氧化应激发挥作用的(见图 5)。过去的研究^[7-8]已证实 EA 作为膳食多酚,具有抗氧化、抗炎以及保护神经作用。LPS 诱发的脓毒症导致心肌损伤主要是通过诱导炎症和氧化应激。



注:图 A 为 Nrf2 以及 HO-1 的蛋白条带,GAPDH 为蛋白表达内参;图 B 和图 C 分别代表 EA 上调 Nrf2 以及 HO-1 的表达水平。***表示与 Con 组对比, $P < 0.001$;#表示与 LPS 组对比, $P < 0.05$;##表示与 LPS 组对比, $P < 0.01$;###表示与 LPS 组对比, $P < 0.001$ 。

图 4 EA 对 LPS 诱导的小鼠心脏 Nrf2 以及 HO-1 蛋白水平的影响



注:TLR-4 为 LPS 在细胞膜上的受体。

图 5 EA 治疗 LPS 致脓毒症心功能不全机制图

有研究^[9-10]表明,LPS 会诱导巨噬细胞释放炎症因子,炎症因子在激活炎症级联反应损伤心肌的同时会导致心脏整体的收缩功能障碍。富含 EA 的石榴汁可以通过抑制炎症因子从而改善非酒精性脂肪肝^[11]。本次研究的 HE 染色及超声心动图结果显示,EA 能改善 LPS 诱导的心肌纤维结构损伤。生理状态下,机体自身的抗氧化系统可以消除活性氧,以避免过度氧化应激^[12-14],EA 的抗氧化应激作用主要归因于其结构上的 4 个羟基^[15]。核因子 Nrf2 可以编码抗氧化抗炎蛋白发挥保护因子的作用,HO-1 是 Nrf2 的下游,可以防止氧化损伤及炎症的发生发展^[16]。既往的研究^[17]发现,EA 可以通过上调 Nrf2 的表达减轻糖尿病大鼠的生殖毒性及功能障碍,也可减轻百草枯导致的仔猪氧化应激及肠道损伤^[18]。在神经保护方面,EA 上调的 Nrf2 可保护链脲佐菌素所致的大鼠海马区损伤和记忆丧失^[19],在鱼藤酮诱导的神经元损伤中也具有保护作用^[20]。在心血管疾病中,EA 可升高 Nrf2 和 HO-1 水平^[21],同时改善谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化氢酶

活性发挥心肌保护作用^[22],对抗异丙肾上腺素诱导氧化应激损伤。在本实验中观察到,EA 的预处理显著逆转了 LPS 导致的 Nrf2 及 HO-1 的降低,提示 EA 可能是通过上调 Nrf2/HO-1 来减轻脓毒症小鼠的心肌损伤。综上所述,EA 是一种有效的心脏保护剂,可以减轻 LPS 诱导的心肌损伤可能是通过上调 Nrf2/HO-1 从而抑制线粒体氧化损伤而发挥作用。

参考文献

- [1] Dickson K, Lehmann C. Inflammatory response to different toxins in experimental sepsis models[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18):4341.
- [2] Tan Y, Wan H, Sun M, et al. Cardamonin protects against lipopolysaccharide-induced myocardial contractile dysfunction in mice through Nrf2-regulated mechanism[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(3):404-413.
- [3] Wei A, Liu J, Li D, et al. Syringaresinol attenuates sepsis-induced cardiac dysfunction by inhibiting inflammation and pyroptosis in mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 913:174644.
- [4] Priyadarsini KI, Khopde SM, Kumar SS, et al. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(7):2200-2206.
- [5] Yu YM, Chang WC, Wu CH, et al. Reduction of oxidative stress and apoptosis in hyperlipidemic rabbits by ellagic acid[J]. *J Nutr Biochem*, 2005, 16(11):675-681.
- [6] Lin MC, Yin MC. Preventive effects of ellagic acid against doxorubicin-induced cardio-toxicity in mice[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2013, 13(3):185-193.
- [7] Aishwarya V, Solapriya S, Sivaramakrishnan V. Role of ellagic acid for the prevention and treatment of liver diseases[J]. *Phytother Res*, 2021, 35(6):2925-2944.
- [8] Gupta A, Singh AK, Kumar R, et al. Neuroprotective potential of ellagic acid: a critical review[J]. *Adv Nutr*, 2021, 12(4):1211-1238.
- [9] Liu YC, Yu MM, Shou ST, et al. Sepsis-induced cardiomyopathy: mechanisms and treatments[J]. *Front Immunol*, 2017, 8:1021.
- [10] Pathan N, Franklin JL, Eleftherohorinou H, et al. Myocardial depressant effects of interleukin 6 in meningococcal sepsis are regulated by p38 mitogen-activated protein kinase[J]. *Crit Care Med*, 2011, 39(7):1692-1711.
- [11] Noori M, Jafari B, Hekmatdoost A. Pomegranate juice prevents development of non-alcoholic fatty liver disease in rats by attenuating oxidative stress and inflammation[J]. *J Sci Food Agric*, 2017, 97(8):2327-2332.
- [12] Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 295(4):C849-C868.

- [13] Gu J, Luo L, Wang Q, et al. Maresin 1 attenuates mitochondrial dysfunction through the ALX/cAMP/ROS pathway in the cecal ligation and puncture mouse model and sepsis patients[J]. *Lab Invest*, 2018, 98(6):715-733.
- [14] Li D, Wang M, Ye J, et al. Maresin 1 alleviates the inflammatory response, reduces oxidative stress and protects against cardiac injury in LPS-induced mice[J]. *Life Sci*, 2021, 277:119467.
- [15] Pari L, Sivasankari R. Effect of ellagic acid on cyclosporine A-induced oxidative damage in the liver of rats[J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2008, 22(4):395-401.
- [16] Feng J, Liu Z, Chen H, et al. Protective effect of cynaroside on sepsis-induced multiple organ injury through Nrf2/HO-1-dependent macrophage polarization[J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 911:174522.
- [17] Altamimi JZ, Alfaris NA, Aljabryn DH, et al. Ellagic acid improved diabetes mellitus-induced testicular damage and sperm abnormalities by activation of Nrf2[J]. *Saudi J Biol Sci*, 2021, 28(8):4300-4310.
- [18] Xiao Y, Huang R, Wang N, et al. Ellagic acid alleviates oxidative stress by mediating Nrf2 signaling pathways and protects against paraquat-induced intestinal injury in piglets[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(2):252.
- [19] Alfaris NA, Alshammari GM, Altamimi JZ, et al. Ellagic acid prevents streptozotocin-induced hippocampal damage and memory loss in rats by stimulating Nrf2 and nuclear factor- κ B, and activating insulin receptor substrate/PI3K/Akt axis[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2021, 72(4):503-515.
- [20] Wei YZ, Zhu GF, Zheng CQ, et al. Ellagic acid protects dopamine neurons from rotenone-induced neurotoxicity via activation of Nrf2 signalling[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(16):9446-9456.
- [21] Gu L, Deng WS, Liu Y, et al. Ellagic acid protects Lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute hepatic injury in mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 22(2):341-345.
- [22] Yüce A, Ateşşahin A, Çeribaşı AO, et al. Ellagic acid prevents cisplatin-induced oxidative stress in liver and heart tissue of rats[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2007, 101(5):345-349.

收稿日期:2022-07-17

(上接第 180 页)

- [34] Wang LM, Wang P, Tekka T, et al. ¹H NMR and UHPLC/Q-Orbitrap-MS-based metabolomics combined with 16S rRNA gut microbiota analysis revealed the potential regulation mechanism of nuciferine in hyperuricemia rats[J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(47):14059-14070.
- [35] Bian M, Wang J, Wang Y, et al. Chicory ameliorates hyperuricemia via modulating gut microbiota and alleviating LPS/TLR4 axis in quail[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 131:110719.
- [36] Yang Q, Zhang J, Li J. Clinical effect of the Guizhi Shaoyao Zhimu Decoction in the treatment of hyperuricemia[J]. *Biomed Res Int*, 2022, 2022:5186210.
- [37] Kang L, Miao JX, Cao LH, et al. Total glucosides of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) flower attenuate adenine- and ethambutol-induced hyperuricaemia in rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 261:113054.
- [38] Gao J, Azad MAK, Han H, et al. Impact of prebiotics on enteric diseases and oxidative stress[J]. *Curr Pharm Des*, 2020, 26(22):2630-2641.
- [39] Guo Y, Yu Y, Li H, et al. Inulin supplementation ameliorates hyperuricemia and modulates gut microbiota in Uox-knockout mice[J]. *Eur J Nutr*, 2021, 60(4):2217-2230.
- [40] Ni C, Li X, Wang L, et al. Lactic acid bacteria strains relieve hyperuricaemia by suppressing xanthine oxidase activity via a short-chain fatty acid-dependent mechanism[J]. *Food Funct*, 2021, 12(15):7054-7067.
- [41] Wu Y, Ye Z, Feng P, et al. *Limosilactobacillus fermentum* JL-3 isolated from “Jiangshui” ameliorates hyperuricemia by degrading uric acid[J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1):1-18.
- [42] Xie YC, Jing XB, Chen X, et al. Fecal microbiota transplantation treatment for type 1 diabetes mellitus with malnutrition: a case report[J]. *Ther Adv Chronic Dis*, 2022, 13:20406223221117449.
- [43] Zhang L, Ma X, Liu P, et al. Treatment and mechanism of fecal microbiota transplantation in mice with experimentally induced ulcerative colitis[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2021, 246(13):1563-1575.
- [44] Xie WR, Yang XY, Deng ZH, et al. Effects of washed microbiota transplantation on serum uric acid levels, symptoms, and intestinal barrier function in patients with acute and recurrent gout: a pilot study[J]. *Dig Dis*, 2022, 40(5):684-690.

收稿日期:2022-09-01