

三七皂苷 R1 通过线粒体相关通路促进白血病细胞株 HL-60 凋亡

吴晓莉, 刘娜, 马夫天, 赵晓庆, 封雪枫, 张宝玺(河北医科大学第二医院 儿科, 河北 石家庄 050000)

[摘要] **目的:** 观察三七皂苷(notoginsenoside)R1 对白血病细胞株 HL-60 凋亡的影响, 探讨其可能的作用机制。 **方法:** 采用 MTT 法和流式细胞术(Annexin V-FITC 双染法)分别检测三七皂苷 R1(10、20、40 及 80 $\mu\text{mol/L}$)处理 HL-60 细胞 12、24、36 及 48 h 后 HL-60 细胞的凋亡情况, Western blotting 检测 HL-60 细胞内 Bcl-2、Bax 及细胞色素 C(cytochrome-C, Cyt C)蛋白的表达水平, JC-1 染色法观察 HL-60 线粒体膜电位的变化。 **结果:** MTT 和流式细胞术检测显示三七皂苷 R1 浓度依赖性诱导 HL-60 细胞的凋亡, 且细胞存活率随处理时间的增加而降低; 与空白对照组相比, 加入三七皂苷 R1 后细胞中 Bcl-2 蛋白表达显著减少[(0.45 \pm 0.03) vs (1.00 \pm 0.00), $P < 0.05$], Bax 蛋白表达显著增加[(1.72 \pm 0.08) vs (1.00 \pm 0.00), $P < 0.05$]; Bcl-2/Bax 比值减小[(0.21 \pm 0.01) vs (1.00 \pm 0.00), $P < 0.05$]; 线粒体膜电位降低[(0.56 \pm 0.09) vs (1.00 \pm 0.00), $P < 0.05$]; 胞质(cyto)中 Cyt-C 蛋白表达水平显著下降[(0.42 \pm 0.03) vs (1.00 \pm 0.00), $P < 0.05$]。 **结论:** 三七皂苷 R1 可显著诱导 HL-60 细胞凋亡, 其作用机制可能是通过线粒体通路促进细胞的凋亡; 本实验可为三七皂苷 R1 用于临床治疗白血病提供实验依据。

[关键词] 三七皂苷 R1; 白血病; HL-60 细胞; 凋亡; 线粒体

[中图分类号] R733.7; R730.54

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)01-0024-06

Notoginsenoside R1 enhances apoptosis of human leukemia cell line HL-60 through mitochondria-dependent pathway

WU Xiaoli, LIU Na, MA Futian, ZHAO Xiaoqing, FENG Xuefeng, ZHANG Baoxi(Department of Pediatrics, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Notoginsenoside R1 on the apoptosis of human leukemia cell line HL-60 and possible mechanisms. **Methods:** After HL-60 cells were incubated with different concentrations of Notoginsenoside R1 (10, 20, 40 and 80 $\mu\text{mol/L}$) for 12, 24, 36 h and 48 h, apoptosis of the HL-60 cells was determined by MTT and Annexin V-FITC flow cytometry assays respectively. The expression of Bcl-2, Bax and cytochrome C (Cyt-C) in the HL-60 cells was determined by Western blotting. The change of mitochondrial membrane potential was assessed by JC-1 dyeing method. **Results:** The results of MTT and flow cytometry assays showed that Notoginsenoside R1 induced the apoptosis of HL-60 cells in dose-dependent manners, and survival rate of the HL-60 cells decreased with increase of incubation time; after adding Notoginsenoside R1, expression of Bcl-2 protein in the HL-60 cells remarkably decreased ([0.45 \pm 0.03] vs [1.00 \pm 0.00], $P < 0.05$, compared with control group); expression of Bax protein significantly increased ([1.72 \pm 0.08] vs [1.00 \pm 0.00], $P < 0.05$, compared with control group); and the ratio of Bcl-2/Bax decreased ([0.21 \pm 0.01] vs [1.00 \pm 0.00], $P < 0.05$); the mitochondrial membrane potential decreased ([0.56 \pm 0.09] vs [1.00 \pm 0.00], $P < 0.05$); and expression level of Cyt-C protein in cytoplasm remarkably decreased ([0.42 \pm 0.03] vs [1.00 \pm 0.00], $P < 0.05$). **Conclusion:** Notoginsenoside R1 can remarkably induce apoptosis of HL-60 cells. Mitochondria-dependent pathway may be involved in Notoginsenoside R1-induced apoptosis of HL-60 cells. These findings suggest that Notoginsenoside R1 may be a new strategy for treatment of leukemia.

[基金项目] 河北省卫生和计划生育委员会基金资助项目(No. 20150238)。Project supported by the Foundation from Health and Family Planning Commission of Hebei Province(No. 20150238)

[作者简介] 吴晓莉(1973 -),女,河北省辛集市人,博士,副主任医师,主要从事小儿血液肿瘤的研究, E-mail: sjzds@sohu.com

[通信作者] 张宝玺(ZHANG Baoxi, corresponding author), E-mail: zhangbaoxi2008@sina.com

[**Key words**] notoginsenoside R1; leukemia; HL-60 cell; apoptosis; mitochondria

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(1): 24-29. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.01.004]

白血病是我国十大高发性的恶性肿瘤之一,由于造血干细胞分化异常导致白血病细胞过度增生,而血液内其他正常成分减少,产生各种病变及死亡。儿童白血病是儿童时期最常见的恶性肿瘤,其发病机制仍未完全清楚。目前多认为是由于遗传因素和环境作用的结果。白血病治疗困难,费用昂贵,因此,研究开发有效低价更易普及的药物迫在眉睫。

三七皂苷 R1(notoginsenoside R1)是从五加科植物三七 *Panax notoginseng*(Burk.)的根茎中提取的有效成分。近年研究^[1-3]发现其具有抗疲劳、抗突变、抗肿瘤、增强记忆力和增强免疫功能的作用。有研究^[4]表明,在心肌缺血复合恶性肿瘤的复杂病理状况下,三七皂苷具有改善心肌缺血损伤的同时抑制肿瘤生长的作用。本研究初步探讨三七皂苷 R1对白血病 HL-60 细胞凋亡的影响及其可能的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 主要材料与试剂

人白血病细胞株 HL-60 购自北京大学基础所细胞中心,三七皂苷 R1(纯度大于 99.0%)购自昆明制药厂,胎牛血清、RPMI1640 培养基均购自 Gibco 公司,MTT 购自美国 Sigma 公司,线粒体膜电位检测试剂盒购自碧云天生物有限公司,线粒体分离试剂盒购自 Thermo Fisher Scientific 公司,Annexin-V/PI 双染法细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物公司,Bcl-2、Bax、Cyt-C、 β -actin、Cox IV 抗体均购自 Cell Signaling Technology 公司,辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 均购自碧云天公司。激光共聚焦显微镜(FV1000)购自日本 Nikon 公司。

1.2 细胞培养与分组

HL-60 细胞株用灭活的含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基于 37℃、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养。临用前,将三七皂苷 R1 溶解在 0.9% NaCl 溶液中,配制成浓度为 10、20、40 和 80 μ mol/L 的三七皂苷 R1 工作液。HL-60 细胞中分别加入上述不同浓度的三七皂苷 R1 工作液作为低、中、高和超高剂量给药组(R1-L、R1-M、R1-H 和 R1-SH 组),细胞中加入 0.9% 生理盐水作为溶剂对照组(NaCl 组),细胞不给药处理作为空白对照组(blank control 组)。

1.3 MTT 法检测三七皂苷 R1 处理对 HL-60 细胞

存活率的影响

将处于对数生长期的 HL-60 细胞加入前述培养液,调整细胞密度为 0.5×10^5 个/ml 接种于 96 孔板中,给予不同浓度三七皂苷 R1、0.9% 生理盐水和不给药处理后置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 12、24、36 和 48 h,每孔加入 20 μ l MTT 继续培养 4 h 后,离心、弃培养液,加入 150 μ l 二甲基亚砷溶液,酶标仪测定 488 nm 处光密度(D)值,并计算细胞存活率。细胞存活率(%)=(给药组 D 值/空白对照组 D 值)×100%。

1.4 流式细胞术(Annexin-V/PI 双染法)检测三七皂苷 R1 处理对 HL-60 细胞凋亡的影响

将各组 HL-60 细胞按上述方法培养至对数生长期,更换无血清培养基培养 12 h,使细胞周期同步化。离心收集细胞,沿管壁缓缓加入预冷的 70% 乙醇,固定过夜。离心,PBS 洗涤,按 Annexin-V/PI 双染法细胞凋亡检测试剂盒说明书操作。

1.5 Western blotting 检测三七皂苷 R1 处理对 HL-60 凋亡相关蛋白表达的影响

HL-60 细胞按前述剂量培养 48 h 后,弃去培养液,PBS 洗涤,裂解细胞收集总蛋白,测定蛋白含量,用 10% 聚丙烯酰胺电泳分离,转移至硝酸纤维素膜,用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 室温封闭 1 h,加入 Bcl-2、Bax、Cyt-C、 β -actin 或 Cox IV 一抗室温孵育 1 h,TBST 洗膜 2 次;加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 或山羊抗兔 IgG 二抗室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次;显色,图像分析系统进行灰度扫描,计算蛋白相对表达量。

1.6 HL-60 细胞线粒体的提取

采用线粒体分离试剂盒提取 HL-60 细胞中的线粒体。收集约 1×10^7 个细胞,用预冷的 PBS 轻轻重悬细胞沉淀,取少量细胞计数, $800 \times g$ 、4℃ 离心 5 min,弃上清。加入线粒体分离试剂 A, $800 \times g$ 、4℃ 离心 10 s,冰上孵育 1 min,加入线粒体分离试剂 B, $800 \times g$ 、4℃ 离心 30 s,冰上孵育 4 min,其中每隔 1 min 涡旋震荡 1 次,加入线粒体分离试剂 C, $800 \times g$ 、4℃ 离心 5 min,沉淀即为线粒体。取上清, $10\,000 \times g$ 、4℃ 离心 5 min,此上清为细胞胞质部。

1.7 JC-1 染色法观察三七皂苷 R1 处理对 HL-60 线粒体跨膜电位及 Cyt-C 蛋白表达的影响

按照跨膜电位检测试剂盒说明书进行操作,步骤简述如下。HL-60 细胞给药处理后,PBS 洗细胞 1

次,加入 JC-1 染色工作液,置于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱孵育 20 min。孵育后,弃去上清,用 JC-1 缓冲液清洗细胞 2 次,立即在激光共聚焦显微镜下观察红色荧光与绿色荧光强度,两种荧光强度比值代表线粒体膜电位的改变。并用 Western blotting 分别检测线粒体与胞质中 Cyt-C 蛋白的表达水平。

1.8 统计学处理

应用 SPSS 15.0 统计软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三七皂苷 R1 处理明显降低 HL-60 细胞的存

活率

MTT 法检测结果(表 1)显示,HL-60 细胞经不同浓度的三七皂苷 R1 处理 12、24、36 和 48 h 后,各药物处理组的细胞存活率均显著低于空白对照组(均 $P < 0.05$),并随药物浓度的增加而降低。同一浓度药物组随着时间增加而存活率也降低。空白对照组与溶剂对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果提示,三七皂苷 R1 随处理时间增加而逐渐降低 HL-60 细胞的存活率,并呈明显的剂量依赖性。由于高剂量组与超高剂量组没有显著性差异,因此,后续实验均采用高剂量组(40 $\mu\text{mol/L}$)。

表 1 各组于各时间点的细胞存活率($n=3, \%$)

Tab. 1 Cell survival rate of each group at different time points ($n=3, \%$)

Group	12 h	24 h	36 h	48 h
Blank control	123.24 ± 10.23	168.54 ± 13.42	215.53 ± 15.43	245.34 ± 21.43
NaCl	131.24 ± 14.35	175.44 ± 13.54	221.43 ± 21.75	255.423 ± 23.11
R1-L	93.21 ± 3.38*	85.34 ± 2.44*	78.33 ± 2.32*	67.45 ± 2.16*
R1-M	92.41 ± 4.32*	83.42 ± 3.27*	76.54 ± 2.54*	66.43 ± 2.54*
R1-H	88.43 ± 3.21*	78.56 ± 3.25*	72.12 ± 2.78*	61.23 ± 3.29*
R1-SH	87.45 ± 4.32*	76.85 ± 3.65*	70.53 ± 3.27*	62.14 ± 3.87*

* $P < 0.05$ vs blank control group

2.2 三七皂苷 R1 呈浓度依赖性诱导 HL-60 细胞凋亡

流式细胞术检测结果(图 1)显示,与空白对照组相比,加入三七皂苷 R1 40 $\mu\text{mol/L}$ 后,细胞的凋

亡率明显增加 [(14.86 ± 1.86) vs (2.75 ± 0.38)], $P < 0.05$, 而空白对照组与溶剂对照组间差异无统计学意义($P > 0.05$),提示三七皂苷 R1 诱导 HL-60 细胞凋亡。

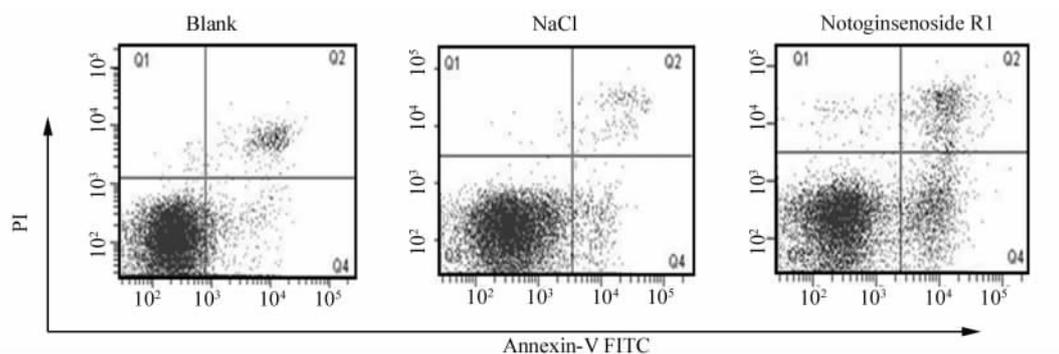


图 1 三七皂苷 R1 诱导 HL-60 细胞凋亡

Fig. 1 Apoptosis of HL-60 cells induced by Notoginsenoside R1

2.3 三七皂苷 R1 明显上调 HL-60 细胞 Bax 蛋白和下调 Bcl-2 蛋白的表达

Western blotting 检测结果(图 2)显示,与空白对照组相比,加 40 $\mu\text{mol/L}$ 三七皂苷 R1 组 HL-60 细

胞明显上调 Bax 蛋白表达[(1.72 ± 0.08) vs (1.00 ± 0.00), $P < 0.05$] 及下调 Bcl-2 蛋白表达[(0.45 ± 0.03) vs (1.00 ± 0.00), $P < 0.05$], 从而导致 Bcl-

2/Bax 比率显著减少[(0.21 ± 0.01) vs (1.00 ± 0.00), $P < 0.05$], 而空白对照组和溶剂对照组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

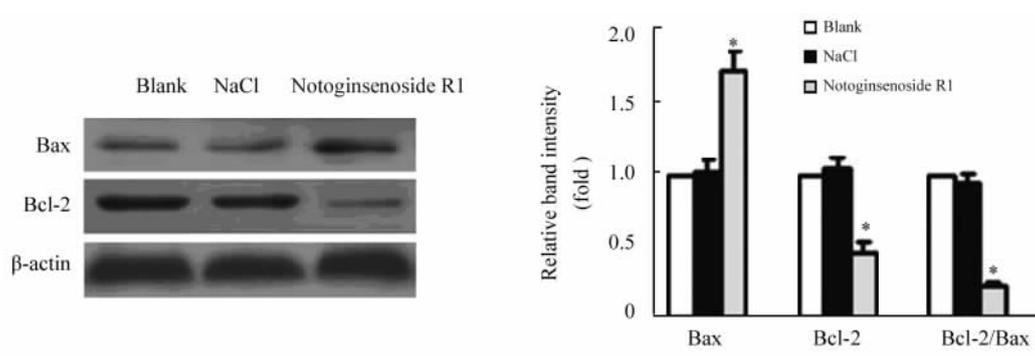


图2 三七皂苷 R1 对 HL-60 细胞中 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平的影响

Fig. 2 Effects of notoginsenoside R1 on the expressions of Bax and Bcl-2 protein in HL-60 cells

* $P < 0.05$ vs blank control group

2.4 三七皂苷 R1 明显降低 HL-60 细胞线粒体膜电位及促进 Cyt-C 从线粒体释放进入胞质

JC-1 染色激光共聚焦观察结果(图3)显示,与空白对照组相比,加入三七皂苷 R1 培养后,HL-60 细胞的红色荧光明显减弱,而绿色荧光明显增强,红绿荧光比值显著降低[(0.56 ± 0.09) vs (1.00 ± 0.00), $P < 0.05$]。结果提示,线粒体膜电位明显降低;空白对照组和溶剂对照组间差异无统计学意义[(1.00 ± 0.00) vs (1.02 ± 0.10), $P < 0.05$]。

Western blotting 检测结果(图4)显示,三七皂苷 R1 能显著上调 HL-60 细胞线粒体(mito)中 Cyt-C 蛋白的表达[(3.51 ± 0.13) vs (1.00 ± 0.00), $P < 0.05$], 而显著下调胞质(cyto)中 Cyt-C 的蛋白水平[(0.42 ± 0.03) vs (1.00 ± 0.00), $P < 0.05$], 导致胞质与线粒体中 Cyt-C 的比值增加。结果提示,三七皂苷 R1 能够促进 HL-60 细胞中 Cyt-C 从线粒体释放进入胞质。

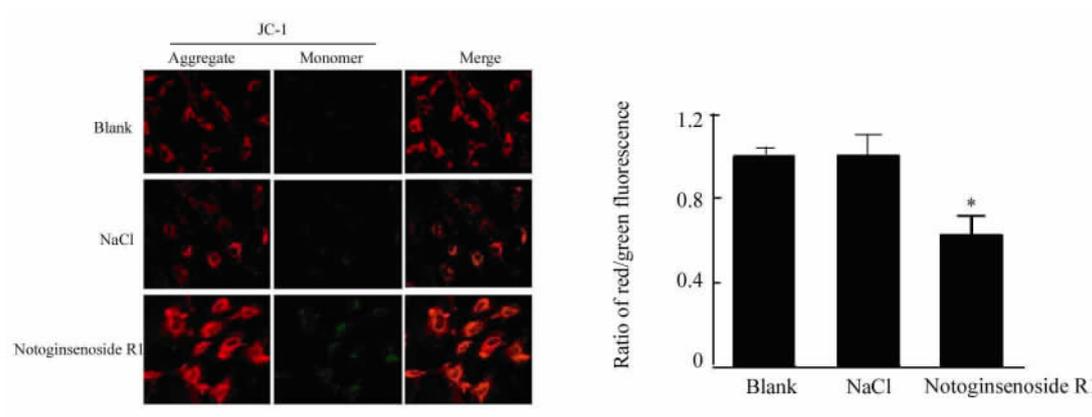


图3 三七皂苷 R1 降低 HL-60 细胞线粒体膜电位(×200)

Fig. 3 Decreased mitochondrial membrane potential of HL-60 cells induced by notoginsenoside R1(×200)

* $P < 0.05$ vs blank control group

3 讨论

随着白血病患者日益增多,而化疗药物容易产生耐药性和不良反应,因此,从天然药用植物中寻找

抗肿瘤的新型药物逐渐成为研究的热点^[2-3,5]。相关药理学研究^[6]发现,三七总皂苷(panax notoginseng saponin, PNS)是三七的主要活性成分,其中含有多种单体皂苷:人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Rg1、三

七皂苷 R1 和人参皂苷 Rg3 等。三七中三七皂苷 R1 能抑制结肠癌 SW480 细胞增值^[5], 人参皂苷 Rb1 能抑制白血病 K562 细胞增值^[7], 人参皂苷 Rg3 能抑制前列腺癌 LNCaP 细胞的增值^[8]。近年研究^[9-10]表明,三七皂苷 R1 具有保护缺血缺氧神经和抗细胞凋亡的作用。国内学者研究^[11-12]发现,三七

皂苷 R1 通过抑制线粒体通路来减弱 Aβ1-42 诱导 SHSY5Y 细胞和过氧化氢诱导大鼠星形胶质细胞凋亡的作用。此外,三七皂苷 R1 通过抑制 JNK 通路,具有保护过氧化氢诱导心肌细胞损伤的作用^[13]。尚未有对三七皂苷 R1 对白血病细胞株 HL-60 凋亡作用机制研究的报道。

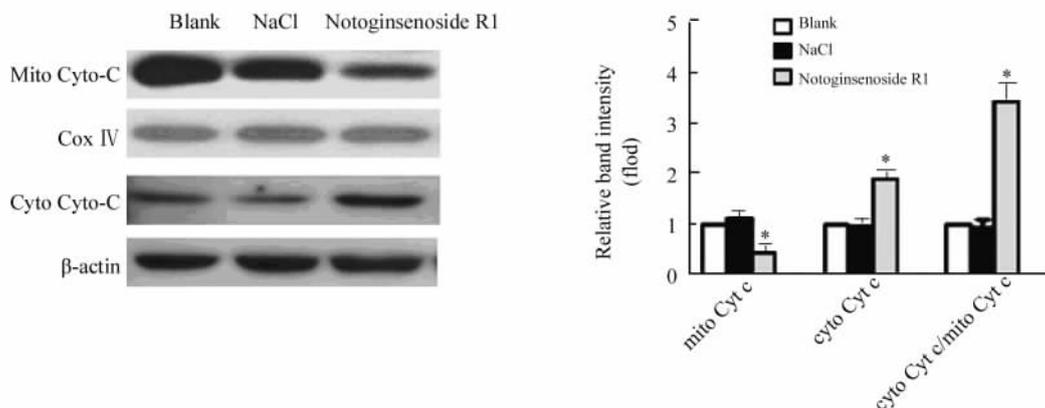


图4 三七皂苷 R1 对 HL-60 细胞中 Cyt C 蛋白表达的影响
Fig. 4 Effect of notoginsenoside R1 on expression of Cyt-C protein in HL-60 cells

* $P < 0.05$ vs blank control group

本实验以 HL-60 细胞为研究对象,采用三七皂苷 R1 进行体外实验。实验结果显示,该药物对 HL-60 细胞具有明显的促进凋亡的作用,并呈现明显的量效和时效关系;高剂量组和超高剂量组的结果差异无统计学意义 ($P > 0.05$),可能是因高剂量和超高剂量组的三七皂苷 R1 在二甲基亚砷中溶解已达到饱和状态,因此后续实验均采用高剂量组。线粒体途径是细胞凋亡的主要途径之一,当凋亡信号作用于线粒体时,细胞中线粒体膜电位会发生明显的变化。Bcl-2 基因是一种原癌基因,具有抑制凋亡的作用,可与促凋亡分子 Bax 共同调控细胞凋亡的功能^[14-15]。本实验结果表明,加入三七皂苷 R1 后,细胞中 Bcl-2 的蛋白表达减少同时 Bax 的蛋白表达增加,导致 Bcl-1/Bax 比值明显降低 ($P < 0.05$)。JC-1 是一种广泛用于检测线粒体膜电位的荧光探针,JC-1 染料以电势依赖性的方式积聚在线粒体内;正常线粒体内,JC-1 聚集在基质中形成聚合物,聚合物发出强烈的红色荧光,当线粒体异常,膜电位下降或丧失时,JC-1 以单体的形式存在于胞质中,产生绿色荧光。因此颜色的变化可直接反映出线粒体膜电位的变化。本实验在 HL-60 细胞中加入三七皂苷 R1 培养后,与空白对照组相比,其红色荧光显著减弱,红色荧光与绿色荧光比值显著降低 ($P <$

0.05),线粒体膜的通透性发生改变,结果提示 Cyt-C 从线粒体内释放到胞浆中,三七皂苷 R1 可能通过线粒体途径诱导 HL-60 细胞的凋亡。

综上,本实验结果为三七皂苷 R1 用于临床治疗儿童白血病提供了实验依据,且三七皂苷 R1 具有来源广泛,毒副作用小等优点,易于临床推广。

[参考文献]

[1] HE NW, ZHAO Y, GUO L, et al. Antioxidant, antiproliferative, and pro-apoptotic activities of a saponin extract derived from the roots of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen [J]. *J Med Food*, 2012, 15(4): 350-359.

[2] JIANG R, DONGJ, LI X, et al. Molecular mechanisms governing different pharmacokinetics of ginsenosides and potential for ginsenoside-perpetrated herb-drug interactions on OATP1B3 [J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(4): 1059-1073.

[3] YANG X, XIONG X, WANG H, et al. Protective effects of panax notoginseng saponins on cardiovascular diseases: a comprehensive overview of experimental studies [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014:204840. DOI: 10.1155/2014/204840.

[4] 王晓燕. 三七皂苷在心肌缺血复合肿瘤病理环境下的作用及其机制研究[D]. 上海:上海中医药大学,2013.

[5] WANG C Z, XIE J T, FISHBEIN A, et al. Antiproliferative effects of different plant parts of *Panax notoginseng* on SW480 human colorectal cancer cells [J]. *Phytother Res*, 2009, 23(1): 6-13.

- [6] DONG T X, CUI X M, SONG Z H, et al. Chemical assessment of roots of *Panax notoginseng* in China: regional and seasonal variations in its active constituents [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51 (16): 4617-4623.
- [7] LIU J, CAI S Z, ZHOU Y, ZHANG X P, et al. Senescence as a consequence of ginsenoside rg1 response on k562 human leukemia cell line [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(12): 6191-6196.
- [8] LIU W K, XU S X, CHE C T. Anti-proliferative effect of ginseng saponins on human prostate cancer cellline [J]. *Life Sci*, 2000, 67(11): 1297-1306.
- [9] 宋志斌,张丹参,王晖,等. 三七总皂苷 R1 体外抗氧化能力及其对血清剥夺神经细胞作用 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2012, 26(3): 417-418.
- [10] 杨晶晶,刘英,王承潇,等. 三七皂苷 R1 的现代研究进展 [J]. *中国医院药学杂志*, 2015, 35(5): 463-467.
- [11] 马涛,辛文锋,张文生,等. 三七皂苷 R1 对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡的保护作用 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40 (2): 303-307.
- [12] 张鑫,林永文,郑爱华,等. 三七皂苷 R1 对过氧化氢诱导大鼠星形胶质细胞凋亡的影响 [J]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2013, 7(15): 7048-7053.
- [13] 万强,潘芸芸,贾钰华,等. 三七皂苷 R1 抑制 JNK 通路减轻 H_2O_2 诱导心肌细胞损伤的作用 [J]. *时珍国医国药*, 2015, 26 (9): 2061-2064.
- [14] HIRATA H, LOPES G S, JURKIEWICZ A, et al. Bcl-2 modulates endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium stores in PC 12 cells [J]. *Neurochem Res*, 2012, 37(2): 238-243.
- [15] LUANPITPONG S, CHANVORACHOTE P, NIMMANNIT U, et al. Mitochondrial superoxide mediates doxorubicin-induced keratinocyte apoptosis through oxidative modification of ERK and Bcl-2 ubiquitination [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83(12): 1643-1654.
- [收稿日期] 2015 - 07 - 26 [修回日期] 2015 - 12 - 10
[本文编辑] 阮芳铭

· 科技动态 ·

肠道共生菌 *E. coli* 对肠道感染和损伤的保护作用及其机制

炎症可以引起机体的代谢紊乱,导致体质量明显减轻,机体严重消耗。肠道微生物与宿主共同进化,为宿主提供有益的代谢产物;宿主的活动也会改变肠道微生物的组成,对宿主本身产生影响。然而,人们对肠道微生物的认识还远远不够,肠道微生物在损伤和感染过程中的作用也不清楚。基于此,作者研究了肠道共生菌 *E. coli* O21: H⁺ Lnc-DC 在损伤和感染过程中对肠道的保护作用,以及介导对疾病耐受及控制损伤。

该研究利用损伤和感染模型,结合抗生素的使用展开研究,在硫酸葡聚糖(dextran sulfate sodium, DSS)诱导的肠炎模型中,小鼠肌肉和脂肪萎缩,体质量显著减轻(超过 15%);当小鼠肠道有 *E. coli* O21: H⁺ Lnc-DC 时,小鼠体质量趋于稳定;生存分析显示,当有 *E. coli* O21: H⁺ Lnc-DC 时,70% 的实验小鼠在 DSS 处理下可以存活,并显著高于对照。进一步采用致病菌感染模型证实 *E. coli* O21: H⁺ Lnc-DC 的保护作用:在伤寒沙门菌和伯克菌感染情况下,小鼠表现出显著的肌肉和脂肪萎缩,体质量迅速减轻;但当被植入 *E. coli* O21: H⁺ Lnc-DC 后,感染引起的消耗显著改善、生存情况明显好转,伤寒沙门菌感染只能导致约 30% 的实验小鼠死亡。另外还发现, *E. coli* O21: H⁺ Lnc-DC 的植入并不影响小鼠正常生理状态,不会导致损伤和感染时 TNF α 、IL-1 β 和 IL6 等炎症因子降低(IL18 显著升高),也不会改变炎症和组织损伤程度。正常情况下,肌肉的维持需要血清中有适当水平的胰岛素样生长因子 1(insulin-like growth factor 1, IGF-1);在病理或应激情况下, E3 泛素连接酶 Murf1 和 Atrogin-1 被显著诱导,血清中 IGF-1 水平显著降低,从而引起肌肉萎缩。因此,该实验进一步检测 Murf1、Atrogin-1 和 IGF-1 水平,发现在损伤和感染情况下,肌肉中 Murf1 和 Atrogin-1 被显著诱导,血清中 IGF-1 水平明显降低;当 *E. coli* O21: H⁺ Lnc-DC 存在时, Murf1 和 Atrogin-1 被抑制,血清中 IGF-1 得到维持,小鼠得到保护;当中和了 IGF-1 后, *E. coli* O21: H⁺ Lnc-DC 的保护作用基本被逆转,小鼠呈现消瘦状态,提示 *E. coli* O21: H⁺ Lnc-DC 发挥保护作用是通过维持 IGF-1 水平实现的。实验还发现,在感染和损伤情况下,只有白色脂肪组织中的 IGF-1 明显增加,且 *E. coli* O21: H⁺ Lnc-DC 能迁移到白色脂肪组织中。基因敲除小鼠中, *E. coli* O21: H⁺ Lnc-DC 的保护作用在 *Nlr4*^{-/-}、*Casp1*^{-/-} *Il11*^{-/-} 以及 *Il1b*^{-/-} *Il18*^{-/-} 小鼠中都无法发挥,敲除小鼠在伯克氏菌感染情况下, *E. coli* O21: H⁺ Lnc-DC 无法抑制 Murf1 和 Atrogin-1, 无法维持血清中 IGF-1 的水平,且体质量显著减轻,说明感染情况下对肠道感染和损伤的 *Nlr4* 炎性小体对于 IGF-1 的维持和 *E. coli* O21: H⁺ Lnc-DC 发挥保护作用是不可缺少的。研究结果阐释了 *E. coli* O21: H⁺ Lnc-DC 在损伤和感染中发挥保护作用的机制。

该研究的亮点在于发现肠道共生菌 *E. coli* 对肠道感染和损伤的调控机制,将肠道共生菌与疾病的转归联系起来,为疾病的治疗提供新的思路。

[张华 摘译,韩超峰 审阅. SCHIEBER A M, LEE Y M, CHANG M W, et al. *Science*, 2015, 350(6260): 558-563. DOI:10. 1126/science. aac6468]