

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.15.008

线粒体来源肽 MOTS-c 通过抑制促炎性因子分泌改善脓毒症小鼠生存率 *

崔敏萱¹ 王文文² 向安² 杨媛² 卢兹凡² 汪莉^{2Δ}

(1 空军军医大学基础医学院四大队十六队 陕西 西安 710032;

2 国家肿瘤重点实验室,空军军医大学药理学系生物制药学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:研究一种新的线粒体来源肽 MOTS-c 对脓毒症小鼠生存率的影响。**方法:**构建了 LPS 和 CLP 诱导的两种脓毒症小鼠模型,观察 MOTS-c 治疗对小鼠生存率及促炎性因子 TNF- α 和 IL-6 水平的影响。Western-blot 方法检测 MOTS-c 对巨噬细胞 NF- κ B 活化的影响。**结果:**与对照组相比,MOTS-c 治疗使 LPS 诱导的脓毒症小鼠生存率从 10%提高至 60% ($P<0.05$),而 CLP 诱导的脓毒症小鼠生存率则从 10%提高至 50% ($P<0.05$)。ELISA 结果显示,在 LPS 诱导的脓毒症模型中,MOTS-c 治疗使小鼠血浆中的 TNF- α 和 IL-6 的水平显著降低($P<0.05$);与之类似,在 CLP 诱导的脓毒症模型中,小鼠血浆和腹腔灌洗液中的 TNF- α 和 IL-6 的水平也显著下降($P<0.05$)。机制研究结果表明,MOTS-c 能够显著抑制巨噬细胞中 LPS 诱导的转录因子 NF- κ B 的活化。**结论:**MOTS-c 能够提高脓毒症小鼠的生存率,其机制可能与抑制 NF- κ B 的转录激活、降低体内促炎性细胞因子的水平相关。

关键词:线粒体来源肽;MOTS-c;脓毒症

中图分类号:R-33;R631.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)15-2839-06

Mitochondrial-derived Peptide MOTS-c Improves Survival in Septic Mice Via Reducing Pro-inflammatory Cytokine Production*

CUI Min-xuan¹, WANG Wen-wen², XIANG An², YANG Yuan², LU Zi-fan², WANG Li^{2Δ}

(1 Company 16, battalion 4, Student Brigade, School of Basic Medicine, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 2 State Key Laboratory of Cancer Biology, Department of Biopharmaceutics, School of Pharmacy, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: This study aimed to explore the effects of a mitochondrial-derived peptide MOTS-c treatment on survival in septic mice. **Methods:** Two models of sepsis were constructed, one due to lipopolysaccharide (LPS) and the other to cecal ligation and puncture (CLP). The survival rate and pro-inflammatory cytokine levels were detected and compared in septic mice. The influence of MOTS-c on LPS-induced NF- κ B activation in macrophages was also analyzed by western-blot. **Results:** Compared to control group, MOTS-c treatment increased the mice survival rate from 10% to 60% in LPS-induced model ($P<0.05$), and from 10% to 50% in CLP-induced sepsis ($P<0.05$) separately. The levels of TNF- α and IL-6 in mice blood plasma were decreased in both two septic models by ELISA analysis. Moreover, MOTS-c treatment reduced the TNF- α and IL-6 concentration in peritoneal fluid of CLP-induced septic mice ($P<0.05$). Mechanically, the NF- κ B activation was suppressed by MOTS-c in LPS challenged macrophages. **Conclusions:** Our data indicated that MOTS-c could inhibit the activation of NF- κ B and suppress the expression of pro-inflammatory cytokines, thus leading to increased survival in septic mice.

Key words: Mitochondrial-derived peptide; MOTS-c; Sepsis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R631.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)15-2839-06

前言

脓毒症是由感染所引发的全身炎症反应综合征,严重可导致多器官功能障碍综合征,甚至死亡^[1,2]。尽管新的诊疗方法的不断涌现,但是脓毒症患者的死亡率仍居高不下。据统计,北美每年至少有 700,000 人罹患此症,死亡率高达 30-50%^[3,4]。因此,进一步探讨脓毒症的发病机制,寻找新的治疗策略仍是危重医学研究的热点。

2015 年, Lee 等发现了一种新的线粒体 DNA 编码的肽 MOTS-c, 由 16 个氨基酸组成。研究表明, MOTS-c 能够维持脂肪和肌肉组织的代谢稳态, 预防高脂诱导的肥胖和胰岛素抵抗^[5-7], MOTS-c 还能够通过促进成骨细胞分化、抑制破骨细胞分化改善骨质疏松^[8,9]。然而, MOTS-c 在脓毒症中发挥何种作用, 相关研究仍未见报道。

1 材料与方法

* 基金项目: 国家肿瘤重点实验室自主课题(CBSKL2017Z18)

作者简介: 崔敏萱(1997-), 本科, 主要研究方向: 药理学, E-mail: cuiminxuan0430@163.com

Δ 通讯作者: 汪莉(1979-), 博士, 讲师, 主要研究方向: 药理学, E-mail: wanglifw@fmmu.edu.cn, 电话: 029-84774772

(收稿日期: 2019-01-26 接受日期: 2019-02-22)

1.1 材料

MOTS-c 肽由浙江丹港生物科技公司合成 (HPLC 检测纯度 95%); LPS 购自 Sigma 公司; 小鼠细胞因子 ELISA 检测试剂盒购自深圳达科为生物工程有限公司; 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 购自美国 ATCC; 小牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司; RPMI 1640 培养基 (赛默飞世尔科技有限公司); RIPA 裂解液购自碧云天公司; 兔抗鼠的 p65 抗体、磷酸化 p65 抗体 (p-p65) 及 actin 抗体均购自上海生工生物工程有限公司; 辣根过氧化物酶 (Horseradish Peroxidase, HRP) 标记抗兔的二抗购自 sigma 公司; 凝胶成像系统购自美国 UVP 公司; 多功能酶标仪购自 TECAN 公司。8 周龄的雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠购自空军军医大学实验动物中心。

1.2 MOTS-c 治疗对 LPS 诱导的脓毒症小鼠的生存率影响实验

1.2.1 实验动物及分组 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠共 40 只, 按照体重随机分为 4 组: 1) PBS 组 (正常对照组); 2) 10 mg/kg 的 LPS 组 (LPS 组); 3) 治疗组, 10 mg/kg 的 LPS + 5 mg/kg MOTS-c 组; 4) 治疗组, 腹腔注射 10 mg/kg 的 LPS + 15 mg/kg MOTS-c 组。

1.2.2 LPS 诱导的小鼠脓毒症模型建立^[10] 本实验采用 LPS 腹腔注射诱导脓毒症模型, 用 PBS 缓冲液将 LPS 配制成 2 mg/mL 的浓度。除 PBS 组外, 其余 3 组小鼠全部腹腔注射 2 mg/mL 的 LPS, 注射体积为 0.2 mL/只小鼠, 使用终剂量为 10 mg/kg。正常对照组同时给予 0.2 mL/只小鼠的 PBS。治疗组在注射 LPS 后 1 小时, 腹腔注射 MOTS-c 肽治疗。

1.2.3 观察指标 每 12 小时观察并记录小鼠生存情况, 持续 7 天, 并按照以下公式计算小鼠生存率指标: 小鼠生存率 (%) = 每组小鼠存活数 / 每组小鼠总数 × 100%。

1.3 MOTS-c 治疗对盲肠结扎穿孔术 (Cecal Ligation Puncture) 诱导的脓毒症小鼠的生存率影响实验

1.3.1 实验动物及分组 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠共 40 只, 按照体重随机分为 4 组: 1) 假手术对照组, 即只打开小鼠腹腔, 取出盲肠, 没有其他处理; 2) 盲肠结扎穿孔手术对照组 (CLP 组); 3) 治疗组, CLP + 5 mg/kg MOTS-c 组; 4) CLP + 15 mg/kg MOTS-c 组。

1.3.2 CLP 诱导的小鼠脓毒症模型建立 所有动物术前均禁食, 自由饮水。脓毒症模型由盲肠结扎穿孔手术诱导。实验小鼠称重后, 用戊巴比妥钠 70 mg/kg 腹腔注射麻醉, 消毒, 在腹正中线下部行 1.5 cm 切口, 以 4 号线结扎盲肠, 避免结扎回肠及盲肠血管, 用 22 号穿刺针穿刺盲肠 1 次。随后盲肠还纳入腹腔, 逐层缝合关腹。手术完成后皮下注射 1 mL 生理盐水以补充体液, 同时腹腔注射 MOTS-c 治疗。小鼠麻醉清醒后自由进食、饮水。假手术组小鼠除不进行盲肠结扎穿孔外, 其余手术步骤均与其它组完全相同^[11]。

1.3.3 观察指标 每 12 小时观察并记录小鼠生存情况, 持续 7 天, 并按照以下公式计算小鼠生存率指标: 小鼠生存率 (%) = 每组小鼠存活数 / 每组小鼠总数 × 100%。

1.4 小鼠血浆及腹腔灌洗液中炎症因子水平测定

1.4.1 小鼠血浆制备 于不同时间点采用眼球摘除法收集小鼠血样于 EDTA 抗凝采血管, 静置 30 min, 1500 rpm、4 °C 离心 5 min, 取上层血浆, -80 °C 低温冰箱保存待用。

1.4.2 小鼠腹腔灌洗液制备 分别于 CLP 模型建立后不同时间点处死小鼠, 消毒胸腹部, 遵循无菌操作原则, 注射 PBS 对小鼠腹腔进行灌洗, 重复 2 次, 得到腹腔灌洗液, 置于冰上待用。

1.4.3 炎症因子 TNF-α 及 IL-6 水平测定 采用 ELISA 方法检测促炎性细胞因子 TNF-α、IL-6 的水平, 试剂使用前室温平衡 20-30 min, 预包被半条使用前, 平衡至室温后再打开外包装袋, 具体方法如下: 1) 样品准备: 将待测样本从冰箱中取出, 室温融化, 混匀; 2) 标准品的制备: 按试剂盒说明书将标准品分别稀释为 1000 pg/mL、500 pg/mL、250 pg/mL、125 pg/mL、62.5 pg/mL、31.3 pg/mL、15.6 pg/mL 和 7.8 pg/mL 的标准液, 待用; 3) 准备 ELISA 板子, 做好标记, 每孔加入 50 μL 检测稀释液; 4) 每孔加入 50 μL 标准液或待测样本, 并设置对照孔; 5) 室温放置 2 h, 倒出孔内液体, 加入 400 μL 洗涤液, 洗涤 4 次; 6) 每孔加入 100 μL TNF-α conjugate 或 IL-6 conjugate; 7) 室温放置 2 h, 倒出孔内液体, 加入 400 μL 洗涤液, 洗涤 4 次; 8) 每孔加入 100 μL 底物液, 避光放置 10-30 min; 9) 每孔加入 100 μL 终止液, 在酶标仪 450 nm 处读取吸光度值并计算浓度值。

1.5 MOTS-c 处理对巨噬细胞分泌炎症因子和 NF-κB 活性的影响

1.5.1 细胞预处理 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 (购自美国 ATCC, 本室保存) 生长至对数生长期, 胰蛋白酶消化, 计数, 调整细胞浓度至 1×10^6 个 / mL, 按照 1 mL / 孔浓度接种至 6 孔板中, 补充含 10 % 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基至 2 mL 液体 / 孔, 37 °C、5% 二氧化碳孵箱中培养过夜。次日, 同时加入 LPS (1 mg/mL) 和 MOTS-c (20 μg/mL 或 50 μg/mL)。8 h 后收集细胞进行 western-blot 检测, 24 h 后收集细胞培养上清, ELISA 检测细胞因子水平 (方法同上)。

1.5.2 实验分组 细胞实验分以下四组: 1) 对照组; 2) LPS 组 (1 mg/mL); 3) LPS (1 mg/mL) + MOTS-c (20 μg/mL); 4) LPS (1 mg/mL) + MOTS-c (50 μg/mL) 组。

1.5.3 western-blot 检测 LPS 刺激 8 h 后, 弃上清, 加入 RIPA 与冰上裂解细胞, BCA 方法测定蛋白浓度。在收集的蛋白样品中加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 沸水浴加热 5 min, 冷却至室温后, 将蛋白样品加入 SDS-PAGE 胶加样孔, 电泳, 转膜, 加入含 5% 脱脂奶粉的 PBS 缓冲液 37 °C 封闭 1 h, 一抗 4 °C 孵育过夜。次日, PBST 缓冲液洗膜 3 次, 二抗 37 °C 孵育 1 h, PBST 缓冲液洗膜 3 次, 扫膜。

1.6 统计学分析

所有数据采用均值 ± 标准差 (mean ± SD) 表示, 采用 GraphPad Prism 5 进行统计学处理, 生存率比较采用 log-rank 分析, 多组间比较用剂量资料的方差分析, 与对照组相比 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MOTS-c 治疗提高 LPS 诱导的脓毒症小鼠的生存率

C57BL/6 小鼠腹腔注射 10 mg/kg 的 LPS, 1 小时后, 注射不同剂量的 MOTS-c 治疗。如图 1 所示, 正常对照组 (即注射 PBS 组) 小鼠存活率为 100%, LPS 组小鼠 7 天存活率仅为 10%, 而 MOTS-c 治疗组第 7 天小鼠的存活率分别为 20% (5 mg/kg MOTS-c) 和 60% (15 mg/kg MOTS-c)。与 LPS 组相

比, 15 mg/kg MOTS-c 治疗能够显著提高 LPS 诱导脓毒症小鼠的生存率($P<0.05$)。

2.2 MOTS-c 治疗提高 CLP 诱导的脓毒症小鼠的生存率

小鼠盲肠结扎穿孔术后活动及进食明显减少, 竖毛, 体温降低。生存率结果如图 2 所示, 与 CLP 手术对照组相比,

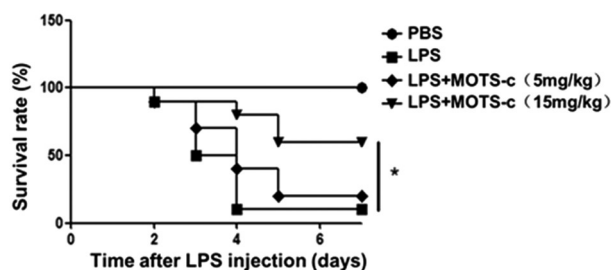


图 1 MOTS-c 对 LPS 诱导脓毒症小鼠生存率的影响

Fig.1 Effects of MOTS-c treatment on the survival of septic mice induced by LPS

Note: $n=10$. $*P<0.05$, compared with LPS group.

MOTS-c 治疗使小鼠的生存率从 10% 分别提高到 20% (5 mg/kg MOTS-c) 和 50% (15 mg/kg MOTS-c), 而假手术对照组小鼠 7 天内的存活率为 100%。因此, 结果显示, 15 mg/kg MOTS-c 治疗能够显著提高 CLP 诱导脓毒症小鼠的生存率($P<0.05$)。

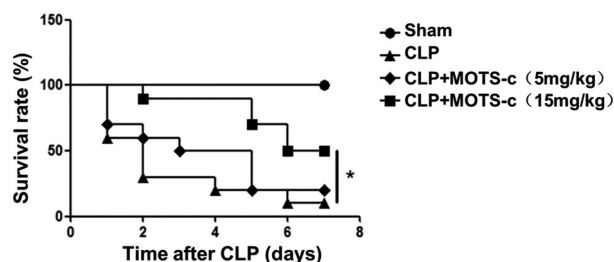


图 2 MOTS-c 对 CLP 诱导脓毒症小鼠生存率的影响

Fig.2 Effects of MOTS-c treatment on the survival of septic mice induced by CLP

Note: $n=10$. $*P<0.05$, compared with CLP group.

2.3 MOTS-c 治疗显著抑制 LPS 诱导的脓毒症模型小鼠血浆中促炎性细胞因子的水平

接下来我们进一步研究为什么 MOTS-c 治疗对脓毒症小鼠具有保护作用。我们首先用 ELISA 方法检测了 LPS 诱导脓毒症小鼠模型血浆中促炎性细胞因子 TNF- α 和 IL-6 的水平。如图 3A 所示, LPS 注射 2 h 后, 与对照组相比, MOTS-c 治疗组小鼠血清中 TNF- α 水平显著下降, 从 3.0 ± 0.51 ng/mL (LPS 组) 降至 2.1 ± 0.37 ng/mL (5 mg/kg MOTS-c, $P<0.05$) 和 $1.5 \pm$

0.35 ng/mL (15 mg/kg MOTS-c, $P<0.01$), 并且呈现出剂量依赖。LPS 注射 10 h 后, 小鼠血浆中的 TNF- α 水平从 1.2 ± 0.15 ng/mL (LPS 组) 降至 0.9 ± 0.13 ng/mL (5 mg/kg MOTS-c) 和 0.6 ± 0.12 ng/mL (15 mg/kg MOTS-c, $P<0.05$)。与 TNF- α 结果类似, 如图 3B 所示, LPS 注射 2 小时和 10 小时后, 与对照组相比, MOTS-c 治疗组小鼠血清中炎症因子 IL-6 的水平也显著下降, 结果具有统计学差异($P<0.05$), 并且呈现出剂量依赖。

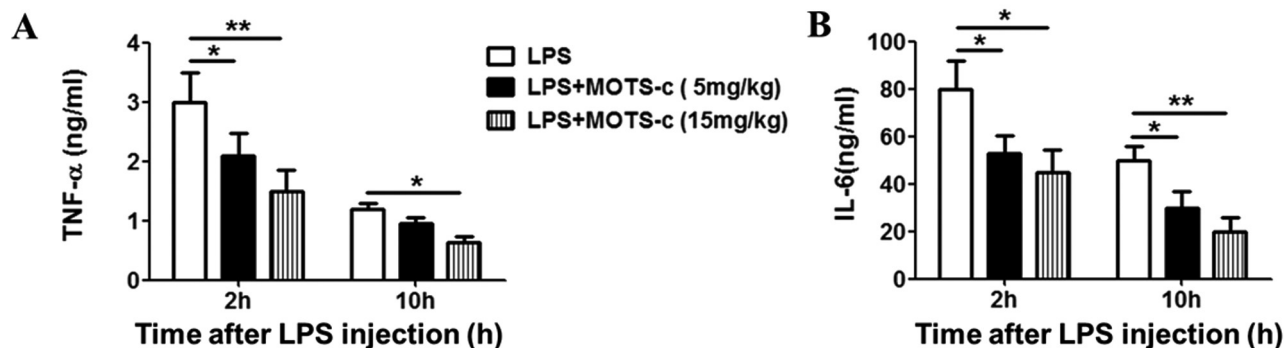


图 3 MOTS-c 对 LPS 诱导脓毒症小鼠血浆中炎症因子的影响

Fig.3 Influences of MOTS-c treatment on the expressions of TNF- α and IL-6 in blood plasma of LPS-induced septic mice.

Note: Data are presented as mean $\pm$ SD. $n=3$. $*P<0.05$, $*P<0.01$, compared with LPS group.

2.4 MOTS-c 治疗显著降低 CLP 诱导的脓毒症模型小鼠血浆及腹腔灌洗液中炎症细胞因子的水平

我们还用 ELISA 方法分别检测了 CLP 诱导的小鼠脓毒症模型中, 血浆及灌洗液中 TNF- α 和 IL-6 的浓度。如图 4A 和 4B 所示, 盲肠结扎穿孔术后 6 h, 小鼠血浆中的 TNF- α 浓度从 85.4 ± 13.21 pg/mL (CLP 对照组) 分别降至 61.2 ± 13.55 pg/mL (5 mg/kg MOTS-c) 和 48.5 ± 8.15 pg/mL (15 mg/kg MOTS-c, $P<0.05$); 而 IL-6 的浓度则从 11.3 ± 2.94 ng/mL (CLP 对照组) 分别降至 9.1 ± 2.15 ng/mL (5 mg/kg MOTS-c) 和 6.0 ± 2.04 ng/mL (15 mg/kg MOTS-c, $P<0.05$)。盲肠结扎穿孔术后 24 h, 小鼠血浆中的 TNF- α 浓度从 110.4 ± 22.16 pg/mL (CLP 对照组) 分别降至 77.5 ± 16.32 pg/mL (5 mg/kg MOTS-c) 和 39.2 ± 8.06 pg/mL (15 mg/kg MOTS-c, $P<0.01$); 而血浆中 IL-6 的浓度

则从 6.1 ± 2.03 ng/mL (CLP 对照组) 分别降至 3.2 ± 1.09 ng/mL (5 mg/kg MOTS-c) 和 2.7 ± 1.04 ng/mL (15 mg/kg MOTS-c, $P<0.05$)。

如图 4C 和 4D 所示, 盲肠结扎术后 6 h, 小鼠腹腔灌洗液中的 TNF- α 浓度从 180.5 ± 50.86 pg/ 10^6 细胞 (CLP 对照组) 降至 80.7 ± 20.24 pg/ 10^6 细胞 (15 mg/kg MOTS-c, $P<0.05$); 盲肠结扎术后 24 h, TNF- α 浓度则从 106.9 ± 25.72 pg/ 10^6 细胞 (CLP 对照组) 降至 47.3 ± 5.12 pg/ 10^6 细胞 (15 mg/kg MOTS-c, $P<0.01$)。MOTS-c 治疗组 IL-6 的浓度也呈现出显著下降的趋势, 6 h 后, 从 11.4 ± 2.17 ng/ 10^6 细胞 (CLP 对照组) 降至 4.9 ± 1.02 ng/ 10^6 细胞 (15 mg/kg MOTS-c, $P<0.05$); 24 h 后, 从 4.1 ± 0.52 ng/ 10^6 细胞 (CLP 对照组) 降至 1.8 ± 0.44 ng/ 10^6 细胞 (15 mg/kg MOTS-c, $P<0.05$)。

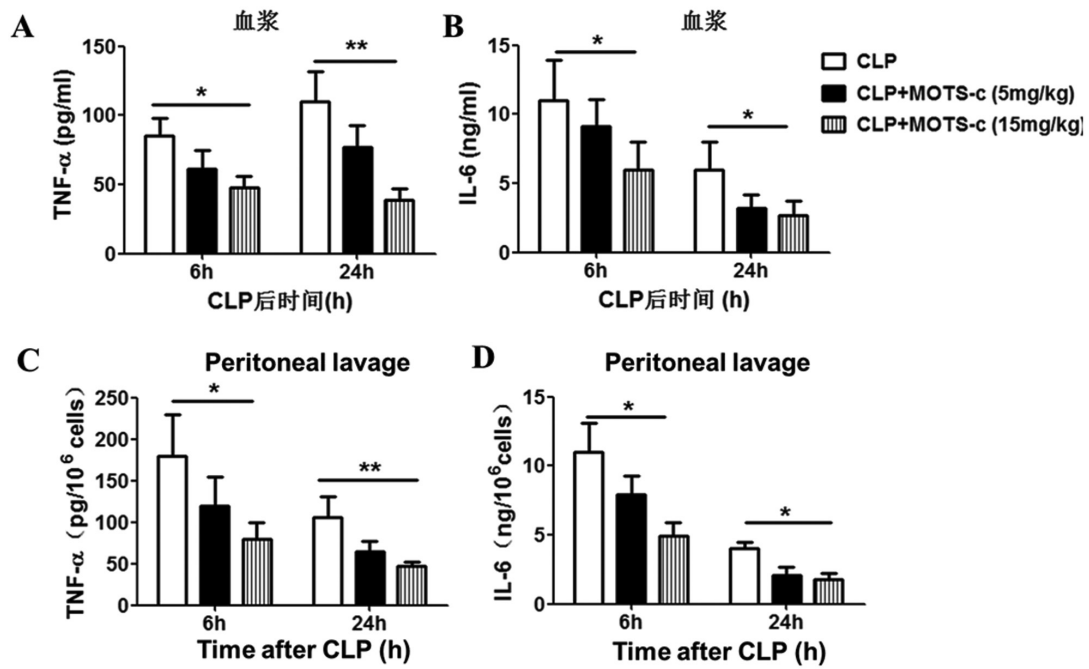


图4 MOTS-c 对 CLP 诱导脓毒症小鼠血浆、腹腔灌洗液中炎症因子的影响
Fig.4 MOTS-c treatment suppressed TNF-α and IL-6 levels in blood plasma and peritoneal lavage of CLP-induced septic mice.

Note: Data are presented as mean ± SD. n=3. *P<0.05, **P<0.01, compared with LPS group.

2.5 MOTS-c 通过抑制 NF-κB 活化下调巨噬细胞炎症因子的产生

巨噬细胞是脓毒症小鼠腹腔细胞中炎症因子的最主要来源^[12],我们在体外细胞水平进一步检测了 MOTS-c 对 LPS 刺激的巨噬细胞炎症因子分泌的影响,结果如图 5A 所示,MOTS-c 处理使 TNFα 的浓度从 336.6± 29.56 pg/mL 降至 176.7± 22.12 pg/mL, 而 IL-6 的浓度从 686.3± 56.22 pg/mL 降至 357.3± 37.15 pg/mL,并具有统计学差异 (P<0.05)。

接着我们又进一步探讨 MOTS-c 为什么能够降低炎症因子的水平,western-blot 方法检测了 MOTS-c 对 LPS 刺激的巨噬细胞中 NF-κB 介导的炎症信号通路的影响。如图 5B 所示, LPS 刺激能够上调 p65 (Ser 536) 和 IκKβ 的磷酸化水平,而 MOTS-c 则显著抑制了这种上调作用。我们的结果说明 MOTS-c 可能通过抑制 NF-κB 的活化来下调促炎症因子的表达。

3 讨论

脓毒症仍然是全球医学界面临的重大难题,也是导致重症监护病房病人死亡的主要原因。脓毒症通常由革兰氏阴性菌感染引起,其病理机制非常复杂,然而全身性的、失控的炎症反应是造成脓毒症高死亡率关键因素。病原微生物入侵后,固有免疫细胞表面的模式识别受体等分子迅速识别病原体的病原相关分子模式,激活细胞内下游信号通路,释放大量炎症因子 (TNF-α、IL-1β、IL-6 等) 以清除病原体。若病原微生物被成功清除,体内炎症反应和抗炎反应恢复平衡,脓毒症将痊愈。反之,将会引发 "细胞因子风暴", 这种致命的炎症反应使机体组织器官受损,甚至死亡^[13,14]。因此,抑制过度的炎症反应,恢复体的免疫平衡是治疗脓毒症的重要策略。

人类线粒体 DNA 总共编码 37 个已知基因, 包括 2 种 rRNA、22 种 tRNA 和构成呼吸酶复合物的 13 种多肽亚基。然而,研究

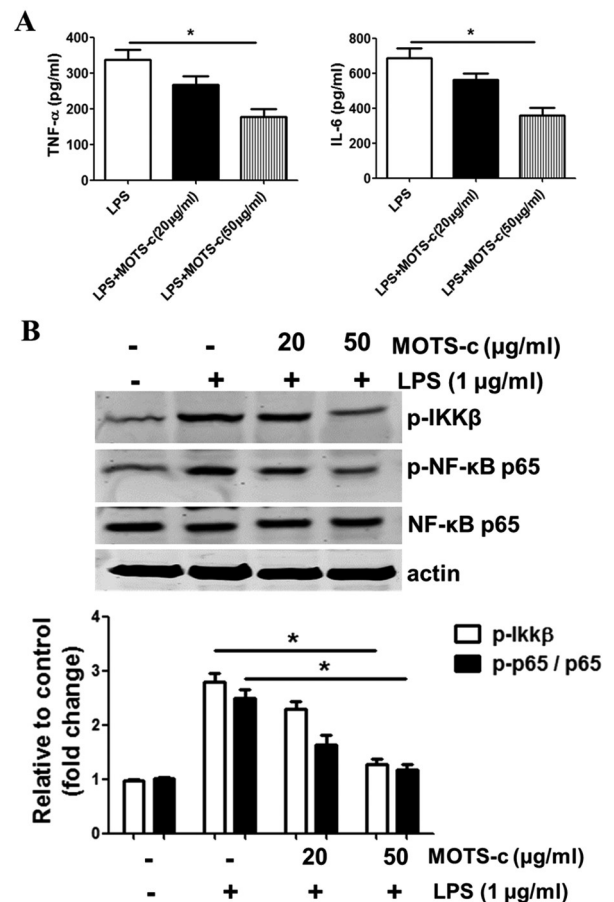


图5 在巨噬细胞中 MOTS-c 通过抑制 NF-κB 活化下调炎症因子生成

Fig.5 MOTS-c treatment suppressed the production of pro-inflammatory cytokines by inhibiting

NF-κB activation in macrophages stimulated with LPS.

发现, 线粒体 DNA 编码 rRNA 基因内部能够转录翻译出一些

短肽,把它们命名为线粒体来源肽^[15]。首先报道的就是一个由22个氨基酸组成的短肽 humanin, 其编码区位于16S核糖体RNA编码区内部,具有抗凋亡、损伤及氧化应激等作用^[16,17]。最近Lee等又报道了一种由16个氨基酸组成的线粒体来源肽MOTS-c, 其编码区位于12S核糖体RNA编码区内部。MOTS-c通过激活AMP活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)通路调控细胞的代谢,进而提高小鼠的胰岛素敏感性并防止肥胖^[5]。我们在卵巢切除术诱导的小鼠骨质疏松模型中研究发现,MOTS-c治疗对骨丢失具有保护作用,其机制依赖于MOTS-c对核因子 κ B受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)诱导的破骨细胞形成的抑制作用。另外一个研究小组报道,MOTS-c还能够通过TGF- β /Smad通路促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化,进而改善骨质疏松,这与我们的结果一致。然而,目前MOTS-c在炎症反应中的作用如何,仍鲜有报道。本研究在LPS和CLP诱导的两种脓毒症模型中发现,一种新的线粒体来源肽MOTS-c能够显著提高脓毒症小鼠的生存率,其机制可能是通过抑制NF- κ B活化,进而抑制TNF- α 、IL-6等炎症因子的分泌。

脓毒症造模方式多样,主要包括直接向动物体内注射活的病原菌,注射脂多糖(LPS)及盲肠结扎穿孔术(CLP)等^[18]。其中,脂多糖(LPS)注射和盲肠结扎穿孔术(CLP)是两种最常用的造模方法。LPS注射是应用最早的构建脓毒症动物模型的方法,通过向动物腹腔注射高浓度LPS来诱发机体发生急性、全身性的炎症反应,进而模拟人体脓毒症发生的炎症反应机制。CLP方法构建的脓毒症模型,其原理主要是通过腹腔内多种病原体感染引起腹膜炎,导致全身性炎症反应,进而发展为脓毒症。该方法诱导的脓毒症的病理过程最接近人类脓毒症患者,因此,也被认为是评价脓毒症动物模型的金标准,应用也最广泛。在本研究中,我们首先通过构建LPS和CLP诱导的两种脓毒症小鼠模型,观察了MOTS-c对脓毒症的治疗作用。结果发现,在两种模型中,MOTS-c治疗都能够显著提高小鼠的生存率。接下来,我们又进一步探讨了MOTS-c发挥保护作用的可能机制。促炎性因子检测结果显示,MOTS-c能够显著抑制小鼠体内TNF- α 和IL-6的水平,提示我们,MOTS-c可能是通过降低小鼠体内过度生成的促炎因子的水平进而起到对脓毒症小鼠的保护作用。

单核巨噬细胞是构成机体固有免疫系统的的关键细胞,它在宿主防御、清除病原菌、启动炎症反应过程中均发挥重要作用。在感染早期,巨噬细胞通过其表面的模式识别受体(如Toll样受体)识别其配体(如LPS等),分泌高水平的促炎性细胞因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12、IL-23和NO等,发挥促炎、杀伤病原菌活性,介导Th1细胞应答的作用。脓毒症小鼠腹腔中的巨噬细胞是促炎性因子TNF- α 、IL-6和IL-1 β 等的最主要来源^[19,20],文献报道,LPS能够通过与巨噬细胞表面的TLR4受体相互作用,激活髓系分化因子-88(myeloid differentiation factor-88, MyD88)依赖的信号通路,导致丝裂原活化蛋白(mitogen-activated protein, MAP)激酶、I κ B激酶(IKK)磷酸化,进而释放NF- κ B入核,促进促炎性细胞因子(TNF- α 、IL-6等)的大量表达^[21]。因此,我们进一步检测了IKK β 和p65的磷酸化水平,结果发现,MOTS-c能够抑制IKK β 和NF- κ B p65的磷酸化,这与

之前文献报道一致^[22]。因此,我们的证据表明,MOTS-c对脓毒症的保护作用机制可能是通过抑制NF- κ B活化,进而降低促炎性因子水平,从而抑制过度的炎症反应来实现的。然而,2018年最新文献报道,MOTS-c能够直接从胞浆中转运入核,通过与其它转录因子相互作用,直接调控核基因的表达^[23-25]。本研究的局限在于,MOTS-c究竟如何调控NF- κ B仍未阐述清楚,MOTS-c是通过影响其上游信号分子间接影响NF- κ B,进而调控炎症因子的表达,还是通过与NF- κ B直接相互作用促进其入核发挥转录调控作用,亦或是直接入核发挥转录因子的作用,更深入的机制仍有待于进一步研究。

此外,我们在细胞及动物实验中还观察到,MOTS-c作为一种体内天然存在的由线粒体DNA编码的多肽具有极低的细胞毒性,然而,由于其仅由16个氨基酸组成,分子量小,所以代谢迅速,后期还需对其进行改造,例如将MOTS-c与其它蛋白构建为融合蛋白等。

总之,本研究在LPS和CLP诱导的两种脓毒症小鼠模型中发现,MOTS-c对脓毒症具有保护作用,能够提高脓毒症小鼠的生存率,降低小鼠体内促炎性因子TNF- α 和IL-6的水平,其机制可能与抑制转录因子NF- κ B的激活相关。因此,本研究为将MOTS-c开发为一种治疗脓毒症的药物奠定了实验基础。

参考文献(References)

- [1] Rello J, Valenzuela-Sánchez F, Ruiz-Rodríguez M, et al. Sepsis: A Review of Advances in Management [J]. Adv Ther, 2017, 34 (11): 2393-2411
- [2] Seymour CW, Gesten F, Prescott HC, et al. Time to Treatment and Mortality during Mandated Emergency Care for Sepsis [J]. N Engl J Med, 2017, 376(23): 2235-2244
- [3] Minasyan H. Sepsis and septic shock: Pathogenesis and treatment perspectives[J]. J Crit Care, 2017, 40: 229-242
- [4] László I, Trásy D, Molnár Z, et al. Sepsis: From Pathophysiology to Individualized Patient Care[J]. J Immunol Res, 2015, 2015: 510436
- [5] Lee C, Zeng J, Drew BG, et al. The mitochondrial-derived peptide MOTS-c promotes metabolic homeostasis and reduces obesity and insulin resistance[J]. Cell Metab, 2015, 21(3): 443-454
- [6] Du C, Zhang C, Wu W, et al. Circulating MOTS-c levels are decreased in obese male children and adolescents and associated with insulin resistance[J]. Pediatr Diabetes, 2018[Epub ahead of print]
- [7] Kim SJ, Xiao J, Wan J, et al. Mitochondrially derived peptides as novel regulators of metabolism[J]. J Physiol, 2017, 595(21): 6613-6621
- [8] Hu BT, Chen WZ. MOTS-c improves osteoporosis by promoting osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells via TGF- β /Smad pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(21): 7156-7163
- [9] Ming W, Lu G, Xin S, et al. Mitochondria related peptide MOTS-c suppresses ovariectomy-induced bone loss via AMPK activation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 476(4): 412-419
- [10] Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, et al. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture[J]. Shock, 2000, 13 (2): 110-116
- [11] Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture[J]. Nat Protoc, 2009, 4(1): 31-36

- [12] Zong X, Song D, Wang T, et al. LFP-20, a porcine lactoferrin peptide, ameliorates LPS-induced inflammation via the MyD88/NF- κ B and MyD88/MAPK signaling pathways [J]. Dev Comp Immunol, 2015, 52(2): 123-131
- [13] Cheng B, Hoeft AH, Book M, et al. Sepsis: pathogenesis, biomarkers, and treatment[J]. Biomed Res Int, 2015: 846935
- [14] Mahabeleshwar GH, Kawanami D, Sharma N, et al. The myeloid transcription factor KLF2 regulates the host response to polymicrobial infection and endotoxic shock[J]. Immunity, 2011, 34(5): 715-728
- [15] Kim S.J, Xiao J, Wan J, et al. Mitochondrially derived peptides as novel regulators of metabolism[J]. J. Physiol, 2017, 595: 6613-6621
- [16] Guo B, Zhai D, Cabezas E, et al. Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation[J]. Nature, 2003, 423: 456-461
- [17] Maximov V, Martynenko A, Hunsmann G, et al. Mitochondrial 16S rRNA gene encodes a functional peptide, a potential drug for Alzheimer's disease and target for cancer therapy [J]. Med. Hypotheses, 2002, 59: 670-673
- [18] Fink MP. Animal models of sepsis[J]. Virulence, 2014, 5(1): 143-153
- [19] Selvaraj V, Nepal N, Rogers S, et al. Inhibition of MAP kinase/NF- κ B mediated signaling and attenuation of lipopolysaccharide induced severe sepsis by cerium oxide nanoparticles[J]. Biomaterials, 2015, 59: 160-171
- [20] He G, Zhang X, Chen Y, et al. Isoalantolactone inhibits LPS-induced inflammation via NF- κ B inactivation in peritoneal macrophages and improves survival in sepsis [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 90: 598-607
- [21] Selvaraj V, Manne ND, Arvapalli R, et al. Effect of cerium oxide nanoparticles on sepsis induced mortality and NF- κ B signaling in cultured macrophages[J]. Nanomedicine (Lond), 2015, 10(8): 1275-1288
- [22] Li H, Ren K, Jiang T, et al. MOTS-c attenuates endothelial dysfunction via suppressing the MAPK/NF- κ B pathway [J]. Int J Cardiol, 2018, 268: 40
- [23] Yong CQY, Tang BL. A Mitochondrial Encoded Messenger at the Nucleus[J]. Cells, 2018, 7(8): 1-9
- [24] Mangalharu KC, Shadel GS. A Mitochondrial-Derived Peptide Exercises the Nuclear Option[J]. Cell Metab, 2018, 28(3): 330-331
- [25] Kim KH, Son JM, Benayoun BA, et al. The Mitochondrial-Encoded Peptide MOTS-c Translocates to the Nucleus to Regulate Nuclear Gene Expression in Response to Metabolic Stress [J]. Cell Metab, 2018, 28(3): 516-524

(上接第 2887 页)

- [14] L Chasan-Taber. Lifestyle interventions to reduce risk of diabetes among women with prior gestational diabetes mellitus[J]. Best practice & research.Clinical obstetrics & gynaecology, 2015, 29(01): 110-122
- [15] 牛杨,李继,盛金叶,等.膳食营养干预对妊娠期糖尿病妊娠结局的作用[J].中华全科医学, 2017, 15(02): 295-297
- [16] 刘德振,赵效国,王琰,等.孕前超重/肥胖孕妇膳食模式建立及其相关分析[J].新疆医科大学学报, 2017, 40(06): 823-827
- [17] 热西旦阿依·艾合买提,李莉,赵效国,等.乌鲁木齐市超重/肥胖孕妇的膳食摄入量与妊娠结局研究 [J]. 职业与健康, 2017, 33(01): 89-92
- [18] 王丽萍,王鹂麟,夏英倩,等.超重孕妇孕期营养干预的效果评价[J].新疆医科大学学报, 2017, 40(05): 659-661, 665
- [19] 么亮,肖永红,孙贺,等.孕早期体质指数与妊娠期糖尿病发病率关系的流行病学研究[J].贵州医药, 2015, 39(03): 262-264
- [20] 张莉,赵明,李光辉.妊娠早期开始的强化生活方式干预对肥胖孕妇孕期增重和妊娠结局的影响[J].北京医学, 2015, 37(10): 1001-1002
- [21] 董彩霞,蒯士安.中国孕妇营养与健康状况十年回顾[J].中华预防医学杂志, 2018, 52(01): 94-100
- [22] S Gupta, C Dolin, A Jadhav, et al. Obstetrical outcomes in patients with early onset gestational diabetes [J]. The journal of maternal-fetal & neonatal medicine, 2016, 29(01): 27-31
- [23] 黄铭钧,李瑞满.妊娠期糖尿病的影响因素及其对不良妊娠结局的影响[J].暨南大学学报(自然科学与医学版), 2017, 38(03): 264-268
- [24] 曹晓辉,孙丽洲.孕期膳食营养素摄入水平与妊娠期糖尿病的关系研究[J].河北医药, 2015, 37(07): 1090-1093
- [25] 叶晖,程英祝,姜燕,等.糖代谢异常孕妇胰岛素水平的变化机制相关影响因素研究[J].河北医学, 2015, 21(02): 219-221
- [26] K Hashimoto, M Koga. Indicators of glycemic control in patients with gestational diabetes mellitus and pregnant women with diabetes mellitus[J]. World journal of diabetes, 2015, 6(08): 1045-1056