

DOI: 10.14188/j.1671-8852.2025.0960

文章编号 1671-8852(2026)05-0587-10

外源性亚精胺通过激活 AMPK/PGC-1 α 通路 减轻肠缺血再灌注损伤

王露思 张贻帼 黄子怡 李霄垚 汤 珊 丁 可 陈 榕 孟庆涛
武汉大学人民医院麻醉科 湖北 武汉 430060

摘要 目的:探究外源性亚精胺对肠缺血再灌注(IIR)损伤的保护作用,并明确其是否通过激活 AMPK/PGC-1 α 通路发挥作用。方法:①动物实验:将 24 只 C57BL/6J 小鼠分为假手术组(Sham 组)、肠缺血再灌注组(IIR 组)、假手术+亚精胺组(Sham+spd 组)、肠缺血再灌注+亚精胺组(IIR+spd 组),每组 6 只。制备小鼠 IIR 损伤模型,留取小肠组织,观察组织改变,行 Chiu's 病理学损伤评分, TUNEL 染色检测细胞凋亡, Western Blot 检测钙黏蛋白 E-Cadherin、AMPK、p-AMPK、PGC-1 α 蛋白表达,试剂盒检测 ROS、MDA、LDH 水平及 SOD 活性, ELISA 检测 TNF- α 、IL-1 β 的表达水平, RT-qPCR 检测 *Tnf- α* 、*Il-1 β* 、*Ampk*、*Pgc-1 α* 的 mRNA 表达。②细胞实验: Caco-2 细胞随机分为对照组(NC 组)、缺氧/复氧组(HR 组)、对照+亚精胺组(NC+spd 组)、缺氧/复氧+亚精胺组(HR+spd 组)。建立缺氧/复氧模型后, CCK-8 法检测细胞存活率, 试剂盒检测 ROS、MDA、LDH 水平及 SOD 活性, Western Blot 检测 AMPK、p-AMPK、PGC-1 α 蛋白表达, ELISA 检测 TNF- α 、IL-1 β 的表达水平, RT-qPCR 检测 *TNF- α* 、*IL-1 β* 、*AMPK*、*PGC-1 α* 的 mRNA 表达。结果:在动物实验中, IIR 组 Chiu's 病理学评分相较于 Sham 组显著增高, ROS、MDA、LDH 水平升高, SOD 活性降低, 促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 表达增多, AMPK、PGC-1 α 表达降低, p-AMPK/AMPK 比值降低($P<0.05$); 与 IIR 组相比, IIR+spd 组肠组织病理损伤减轻、Chiu's 评分降低, ROS、MDA、LDH 水平降低, SOD 活性升高, 细胞凋亡减少, 促炎因子表达降低, AMPK、PGC-1 α 表达升高, p-AMPK/AMPK 比值升高($P<0.05$)。细胞实验中, Caco-2 细胞在 HR 后存活率降低, ROS、MDA、LDH 水平升高, SOD 活性降低, 促炎因子表达升高, AMPK、PGC-1 α 表达降低, p-AMPK/AMPK 比值降低($P<0.05$); 而 HR+spd 组较 HR 组 ROS 水平降低, 炎症因子表达减少, AMPK、PGC-1 α 表达升高, p-AMPK/AMPK 比值升高($P<0.05$)。结论:外源性亚精胺可能通过激活 AMPK/PGC-1 α 通路减轻 IIR 损伤。

关键词 亚精胺; 肠缺血再灌注损伤; AMPK/PGC-1 α 通路

中图分类号 R574.5

文献标志码 A

Exogenous spermidine alleviates intestinal ischemia-reperfusion injury by activating the AMPK/PGC-1 α pathway

WANG Lusi, ZHANG Yiguo, HUANG Ziyi, LI Xiaoyao, TANG Shan, DING Ke, CHEN Rong,
MENG Qingtao

Department of Anesthesiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China

Abstract

Objective: To investigate the protective effect of exogenous spermidine on intestinal ischemia-reperfusion (IIR) injury and clarify whether it exerts the effect by activating the AMPK/PGC-1 α pathway. **Methods:** *In vivo*, 24 C57BL/6J mice were divided into 4 groups (6 mice in each group): sham

课题来源:国家自然科学基金面上项目(编号:82172155);国家自然科学基金青年项目(编号:82202410)。

作者简介:王露思,女,2000—,医学硕士生,主要从事肠缺血再灌注损伤免疫机制相关研究, E-mail:2895390550@qq.com。

通信作者:孟庆涛, E-mail:mengqingtao2018@126.com。

operation group (Sham group), intestinal ischemia-reperfusion group (IIR group), sham operation+spermidine group (Sham+spd group), and intestinal ischemia-reperfusion+spermidine group (IIR+spd group). A mouse IIR injury model was prepared, and intestinal tissue samples were harvested, then the histological alterations were observed, Chiu's pathological injury scoring was performed, the apoptosis was detected by TUNEL staining, and the protein expression of E-cadherin, AMPK, p-AMPK, and PGC-1 α was assessed by Western Blot. Kits were used to measure ROS, MDA, LDH levels, and SOD activity. ELISA was employed to detect TNF- α and IL-1 β expression levels. RT-qPCR was performed to assess mRNA expression of *Tnf- α* , *Il-1 β* , *Ampk*, and *Pgc-1 α* . *In vitro*, Caco-2 cells were randomly divided into the control group (NC group), hypoxia/reoxygenation group (HR group), control+spermidine group (NC+spd group), and hypoxia/reoxygenation+spermidine group (HR+spd group). Following establishment of the hypoxia/reoxygenation model, cell viability was assessed using the CCK-8 assay. Reagent kits were employed to measure ROS, MDA, LDH levels, and SOD activity. Western Blot analysis evaluated AMPK, p-AMPK, and PGC-1 α protein expression. ELISA assays determined TNF- α and IL-1 β expression levels. RT-qPCR quantified mRNA expression of *TNF- α* , *IL-1 β* , *AMPK*, and *PGC-1 α* . **Results:** *In vivo*, the IIR group exhibited significantly higher Chiu's pathological scores compared to the Sham group, along with elevated levels of ROS, MDA, and LDH, reduced SOD activity, increased expression of pro-inflammatory factors TNF- α and IL-1 β , decreased expression of AMPK and PGC-1 α , and a reduced p-AMPK/AMPK ratio ($P<0.05$). Compared with the IIR group, the IIR+spd group exhibited reduced intestinal histopathological damage, decreased Chiu's score, lower ROS, MDA, and LDH levels, increased SOD activity, reduced apoptosis, decreased proinflammatory factor expression, increased AMPK and PGC-1 α expression, and elevated p-AMPK/AMPK ratio ($P<0.05$). *In vitro*, Caco-2 cells exhibited reduced survival rates after HR exposure, elevated ROS, MDA, and LDH levels, decreased SOD activity, increased pro-inflammatory factor expression, reduced AMPK and PGC-1 α expression, and decreased p-AMPK/AMPK ratio ($P<0.05$). In contrast, the HR+spd group exhibited reduced ROS levels, decreased inflammatory factor expression, increased AMPK and PGC-1 α expression, and an elevated p-AMPK/AMPK ratio compared to the HR group ($P<0.05$). **Conclusion:** Exogenous spermidine may alleviate IIR injury by activating the AMPK/PGC-1 α pathway.

Key Words Spermidine; Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury; AMPK/PGC-1 α Signal Pathway

肠缺血再灌注(intestinal ischemia-reperfusion injury, IIR)损伤是临床中普遍存在的急性危重疾病。它与各种临床疾病的发病、进展和预后密切相关^[1]。IIR损伤指的是缺血所造成的局部组织损伤在血液再灌注后发生恶化,常由严重创伤、烧伤、休克、肠扭转、肠系膜血栓栓塞和小肠移植引起,会导致肠道黏膜屏障破坏、细菌及毒素入血,从而引起全身炎症反应和多器官功能障碍综合征^[2]。

IIR损伤涉及多种分子机制,其中氧化应激是核心驱动因素^[3]。氧化应激过程包括活性氧(reactive oxygen species, ROS)的过量产生和抗氧化系统失衡等多个环节。再灌注阶段产生的过量ROS可

攻击细胞膜、细胞器及DNA等生物分子,引发脂质过氧化、蛋白质氧化和DNA损伤,并通过信号通路诱导肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)等炎症介质释放,加剧组织损伤^[4]。当前研究重点在于抑制氧化应激,抗氧化剂在减轻IIR损伤中已得到广泛关注,靶向氧化应激是预防或减轻IIR损伤的有效策略之一^[5-6]。

腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)是一种细胞内能量传感器和调节剂^[7]。过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 共激活因子-1 α (PPAR γ coactivator-1 α , PGC-1 α)是一种转录

共激活因子,可协调多种组织的生理适应过程,在介导糖异生、糖酵解、脂肪生成、线粒体脂肪酸氧化以及线粒体呼吸效率方面具有多种作用^[8]。作为代谢稳态调控网络中的重要环节,AMPK/PGC-1 α 通路与氧化应激息息相关^[9],有研究证实,活化的AMPK通过PGC-1 α 缓解线粒体紊乱,减少活性氧的产生^[10];在人视网膜色素上皮细胞中,PGC-1 α 具有重要的调节氧化代谢作用及抗氧化能力^[11];AMPK/PGC-1 α 信号通路的激活,可以减少心肌细胞的氧化应激和线粒体功能障碍,从而减轻心肌缺血再灌注损伤^[12]。因此,调控AMPK/PGC-1 α 信号通路对代谢稳态的维持至关重要。

多胺是指含有两个以上氨基的脂肪族化合物,广泛分布于原核生物和真核生物中,包括腐胺(putrescine)、亚精胺(spermidine)、精胺(spermine)等。亚精胺已被证明能够参与调控动物机体内生物大分子物质合成、细胞信号转导^[13]和细胞抗氧化^[14]等许多生物学过程。诸多研究证实,补充外源性亚精胺对缺血再灌注损伤能够起到保护作用。既往研究^[15]表明,在缺血再灌注损伤的小鼠心肌细胞中,亚精胺抑制氧化应激,改善了心肌梗死诱导的心功能障碍降低。也有研究^[16]表明,补充亚精胺可减轻缺血再灌注后的肾小管损伤和肾功能障碍。目前尚不明确亚精胺是否对IIR损伤具有保护作用以及是否通过AMPK/PGC-1 α 通路发挥保护作用。因此本研究旨在通过体内外模型,特异性地探讨亚精胺对IIR损伤的作用以及其与AMPK/PGC-1 α 信号通路的关系,为临床预防和治疗IIR损伤提供新思路。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 亚精胺(spdc)购于美国MCE公司(货号:HY-B1776)。ROS试剂盒购(货号:CA1410)、人TNF- α 酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒(货号:SEKH-0047)、鼠TNF- α ELISA试剂盒(货号:SEKR-0009)、人IL-1 β ELISA试剂盒(货号:SEKH-0002)、鼠IL-1 β ELISA试剂盒(货号:SEKR-0002)购于北京索莱宝公司。丙二醛(MDA)试剂盒(货号:A003-1-2)、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(货号:A020-2-2)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)测定试剂盒(货号:A001-3-2)购于南京建成公司。DAPI(货号:C1002)、CCK-8试剂盒(货号:C0038)、RNA抽提试剂盒(货号:R0017S)、羊抗兔二抗(货号:A0208)购于上海碧云天公司。AB-

Script III RT Master Mix for qPCR 试剂盒(货号:RK20428)、2 $\times$ Universal SYBR Green Fast qPCR Mix(货号:RK21203)购于武汉爱博泰克公司。通用型组织固定液(货号:G1101)、RNA稳定保存液(货号:G3019)购于武汉赛维尔公司。兔源钙黏蛋白E-Cadherin单抗(货号:3195)、兔源AMPK抗体(货号:2532)、兔源p-AMPK单抗(货号:50081)、兔源PGC-1 α 单抗(货号:2178)、兔源 β -actin单抗(货号:4970)购于美国Cell Signal Technology公司。液氮研磨仪;NanoDrop;正置显微镜(奥林巴斯BX53);倒置显微镜(奥林巴斯IX71);罗氏PCR(Lightcycler 4800 II);酶标仪(美国PE公司);Bio-Rad ChemiDoc化学发光仪。

1.2 实验动物及分组 健康野生型SPF级雄性C57BL/6J小鼠24只,6~8周,体质量20~25 g,购自于河南斯克贝斯生物科技股份有限公司,适应性喂养1周。将C57BL/6J小鼠随机分成4组,分别为假手术组(Sham组)、肠缺血再灌注组(IIR组)、假手术+亚精胺组(Sham+spdc组)、肠缺血再灌注+亚精胺组(IIR+spdc组),各组均为6只。为了探讨亚精胺对肠缺血再灌注损伤的影响,术前对Sham+spdc组、IIR+spdc组小鼠经口灌胃20 mg $\cdot$ kg⁻¹亚精胺7 d。所有实验动物保持正常饮食。

1.3 小鼠肠缺血再灌注模型的建立 腹腔注射浓度为1.5%、剂量5 mL $\cdot$ kg⁻¹的戊巴比妥钠溶液以麻醉小鼠,使用胶带和缝线以仰卧位固定小鼠。于腹部正中行脱毛、消毒,正中切口进腹,分离肠系膜上动脉(superior mesenteric artery, SMA),使用微动脉夹夹闭SMA根部,观察动脉搏动及肠壁颜色,确定SMA血流被阻断后,缝合伤口。45 min后拆除缝线,经原切口进腹,松开微动脉夹。Sham组、Sham+spdc组行与IIR组相同的开腹等操作,但不夹闭SMA。所有小鼠于再灌注2 h后处死。取离回肠端5 cm的小肠组织,冲洗后分别用4%多聚甲醛固定、液氮冰冻,用于后续实验检测。

1.4 细胞培养及分组 人结肠癌细胞系(Caco-2)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。使用含有10%胎牛血清、1%链霉素-青霉素的MEM培养基,在37 $^{\circ}$ C、含有5% CO₂的加湿培养箱中培养Caco-2细胞。将细胞随机分为对照组(NC组)、对照+亚精胺组(NC+spdc组)、缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, HR)组(HR组)及缺氧/复氧+亚精胺组(HR+spdc组)。对于亚精胺处理组,待Caco-2细胞密度长到70%后,使用50 μ mol $\cdot$ L⁻¹亚精胺预处理

2 h, 更换培养基 2 h 后建立缺氧/复氧模型。

1.5 HR 模型 为模拟缺氧条件, 将细胞在 5% CO₂、1% O₂、94% N₂ 的环境中培养 12 h, 然后将细胞在常氧条件下培养 2 h, 完成复氧。

1.6 指标检测及方法

1.6.1 肠黏膜病理学检测 造模完成后取小鼠新鲜缺血区肠组织标本, 4% 多聚甲醛固定标本、石蜡包埋切片后进行 HE 染色, 光学显微镜观察肠组织病理学变化并采集图像, 每个标本取 2 个切片采集 10 个不同视野, 采用 Chiu's 评分分别对组织损伤进行独立评分。Chiu's 评分标准^[17]: 0 分, 正常小肠上皮绒毛; 1 分, 小肠绒毛顶端上皮间隙增宽, 伴毛细血管淤血; 2 分, 小肠绒毛顶端上皮间隙扩展, 伴上皮层与固有层中度分离; 3 分, 小肠绒毛两侧上皮层与固有层大量分离, 绒毛顶端部分破损; 4 分, 小肠绒毛破损, 伴固有层毛细血管暴露及炎性细胞增多; 5 分, 固有层破坏、出血和溃疡。

1.6.2 TUNEL 染色 取小肠组织样本固定, 石蜡包埋切片, 进行脱蜡、蛋白酶 K 修复、破膜、室温平衡等处理后按比例滴加 TUNEL 反应液, 在 37℃ 恒温箱孵育 2 h, 洗涤后滴加 DAPI 染液, 避光室温孵育 10 min, 再次洗涤后用抗荧光淬灭封片剂封片。切片于正置荧光显微镜下观察并采集图像, 统计分析荧光强度。

1.6.3 Western Blot 检测 冰上操作, 取各组小鼠小肠组织或 Caco-2 细胞, 按比例加入 RIPA 裂解液进行裂解, 30 min 后低温研磨, 超声, 4℃ 离心取上清后, 按照 BCA 试剂盒的步骤测蛋白浓度, 对蛋白进行定量。按比例加入上样缓冲液并煮沸变性 10 min。根据蛋白浓度计算上样量, 采用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜, 5% 脱脂奶粉室温摇床封闭 2 h, 分别使用兔源 E-Cadherin、AMPK、p-AMPK、PGC-1α、β-actin 单克隆抗体 4℃ 摇床孵育过夜, 次

日 TBST 室温洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入羊抗兔二抗室温孵育 1 h, 再次洗膜, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 显影条带, 采用 Image J 分析图像, 目的蛋白条带灰度值与 β-actin 条带灰度值的比值反映目的蛋白的相对表达。

1.6.4 肠道及细胞 MDA、SOD 及 LDH 的检测 依照说明书, 将小鼠肠组织裂解匀浆后取上清或将细胞提前接种, MDA 测定采用硫代巴比妥酸显色法, 通过酶标仪在 532 nm 处读数; SOD 活性测定采用水溶性四唑盐法, 通过酶标仪在 450 nm 处读数; LDH 测定采用微板法, 通过酶标仪在 440 nm 处读数。

1.6.5 ROS 检测 依照说明书, 提前将细胞接种于 12 孔板, 去除细胞培养基, 加入用无血清培养基稀释至 10 μmol·L⁻¹ 的 DCFH-DA, 37℃ 避光孵育 20~30 min, 孵育完成后用 PBS 洗涤 3 次, 随后在荧光显微镜下观察并采集图像, 使用 Image J 软件分析图像。

1.6.6 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 使用无菌无酶物品。使用 RNA 抽提试剂盒分离小鼠肠组织或 Caco-2 细胞总 RNA, 使用 ABScript III RT Master Mix for qPCR 试剂盒将 mRNA 逆转录为 cDNA, 按照 2×Universal SYBR Green Fast qPCR Mix 的反应体系在罗氏 PCR 仪进行 qPCR。所有引物均由上海碧云天生物技术公司合成, 引物序列见表 1。

1.6.7 CCK-8 检测 根据说明书, 将各组细胞用胰蛋白酶消化后再用培养基进行重悬, 接种于 96 孔板中, 在细胞培养箱中培养 24 min, 每个孔添加 CCK-8 试剂 10 μL, 孵育 30 min, 采用酶标仪测量 450 nm 处吸光度。

1.6.8 ELISA 法检测小肠组织及 Caco-2 细胞的炎症因子水平 取不同分组的小肠组织和 Caco-2 细

表 1 RT-qPCR 引物序列

物种	基因	正义 (5'—3')	反义 (5'—3')
鼠	<i>Tnf-α</i>	TAGCCACGTCGTAGCAAAC	TGTCTTTGAGATCCATGCCGT
鼠	<i>Il-1β</i>	TGCCACCTTTTGACAGTGATG	TGATGTGCTGCTGCGAGATT
鼠	<i>Ampk</i>	TTAAACCCACAGAAATCCAAACAC	CTTCGCACACGCAAATAATAGG
鼠	<i>Pgc-1α</i>	GAATCAAGCCACTACACACACACG	CATCCCTCTTGAGCCTTTTCGTG
鼠	<i>β-actin</i>	TTCTTTGCAGCTCCTTCGTT	ATGGAGGGGAATACAGCCC
人	<i>TNF-α</i>	CCTCTCTCTAATCAGCCCTCTG	GAGGACCTGGGAGTAGATGAG
人	<i>IL-1β</i>	CGAATCTCCGACCACCACTA	AGGGAAGAAGGTGCTCAGG
人	<i>AMPK</i>	TTGAAACCTGAAAATGTCCTGCT	GGTGAGCCACAACCTTGTCTT
人	<i>PGC-1α</i>	TCTGAGTCTGTATGGAGTGACAT	CCAAGTCGTTACATCTAGTTCA
人	<i>β-actin</i>	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT

胞,根据 ELISA 操作说明书,使用相对应的 ELISA 试剂盒检测 TNF- α 、IL-1 β 的表达水平。

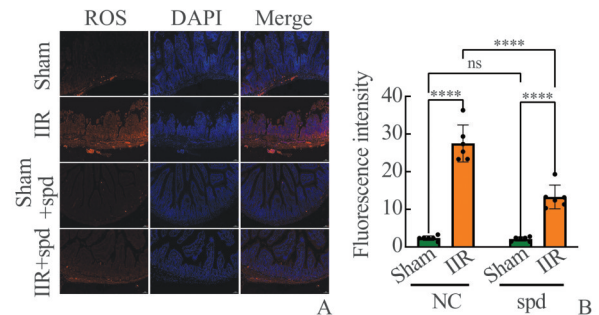
1.6.9 统计学方法 采用 GraphPad Prism 9.5 软件进行统计学分析,正态分布的定量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间采用双因素方差分析,多组间两两比较用 Turkey 法,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 亚精胺改善肠缺血再灌注后的组织损伤与屏障破坏 微型动脉夹夹闭小鼠肠系膜上动脉根部后,可见肠管失去血色,逐渐苍白,部分肠管肿胀,45 min 取下动脉夹后,可见肠管充血水肿。HE 染色切片显示(见图 1A),与 S 组相比,IIR 组小鼠肠组织损伤显著增加:小肠绒毛结构被明显破坏,绒毛断裂,可见炎性细胞浸润。Chiu's 病理学评分显示(见图 1B),IIR 组小鼠肠黏膜损伤程度比 S 组重,Chiu's 病理学评分显著增加;与 IIR 组相比,IIR+spd 组的 Chiu's 损伤评分显著降低($P<0.05$)。肠组织机械屏障的完整性方面,结果显示(见图 1C、1D),与 S 组相比,IIR 组小鼠肠组织 E-Cadherin 含量显著降低($P<0.05$);与 IIR 组相比,IIR+spd 组小鼠肠组织 E-Cadherin 含量显著升高($P<0.05$),提示亚精胺可以保护 IIR 后的肠道机械屏障的完整性。

2.2 亚精胺显著抑制 IIR 诱导的氧化应激反应 采用 DCFH-DA 荧光探针标记肠组织中的 ROS,通

过荧光显微镜观察并定量分析荧光强度。结果显示(见图 2A、2B),Sham 组仅呈现微弱的红色荧光,表明生理状态下 ROS 水平较低;IIR 组中荧光强度显著增强,提示 IIR 可诱导肠道内大量 ROS 生成,引发剧烈的氧化应激反应。而 IIR+spd 组的荧光强度较 IIR 组明显减弱($P<0.05$)。通过生化检测试剂盒进一步测定肠组织中 MDA 含量、SOD 活性及 LDH 水平,结果显示(见表 2),IIR 组 MDA、LDH 水平较 Sham 组升高($P<0.05$),SOD 活性较 Sham 组降低($P<0.05$)。而亚精胺处理后,IIR+spd 组 MDA、LDH 水平较 IIR 组降低($P<0.05$),SOD 活性升高($P<0.05$)。上述指标的协同变化进一步证实,亚精胺可减少 ROS 生成、增强内源性抗氧化酶活性,从而减轻 IIR 诱导的细胞氧化应激损伤。



A. 各组 ROS 荧光染色图片($\times 200$);B. 各组 ROS 相对荧光强度的比较。**** $P<0.0001$,ns. 无统计学意义。

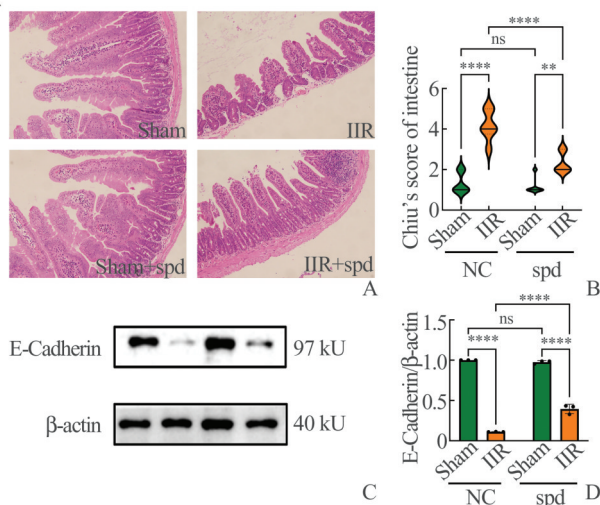
图 2 IIR 后 ROS 染色

表 2 各组小鼠肠组织 SOD、MDA、LDH 水平比较

($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	SOD /U $\cdot$ mg $^{-1}$	MDA /nmol $\cdot$ mg $^{-1}$	LDH /mmol $\cdot$ g $^{-1}$
Sham	184.99 $\pm$ 3.32	3.19 $\pm$ 0.19	0.27 $\pm$ 0.01
IIR	138.28 $\pm$ 2.19*	9.25 $\pm$ 0.28*	2.28 $\pm$ 0.15*
Sham+spd	181.86 $\pm$ 8.10	3.19 $\pm$ 0.15	0.28 $\pm$ 0.24
IIR+spd	146.76 $\pm$ 1.04#	7.86 $\pm$ 0.27#	1.97 $\pm$ 0.04#

注:与 Sham 组比较,* $P<0.05$,与 IIR 组比较,# $P<0.05$ 。



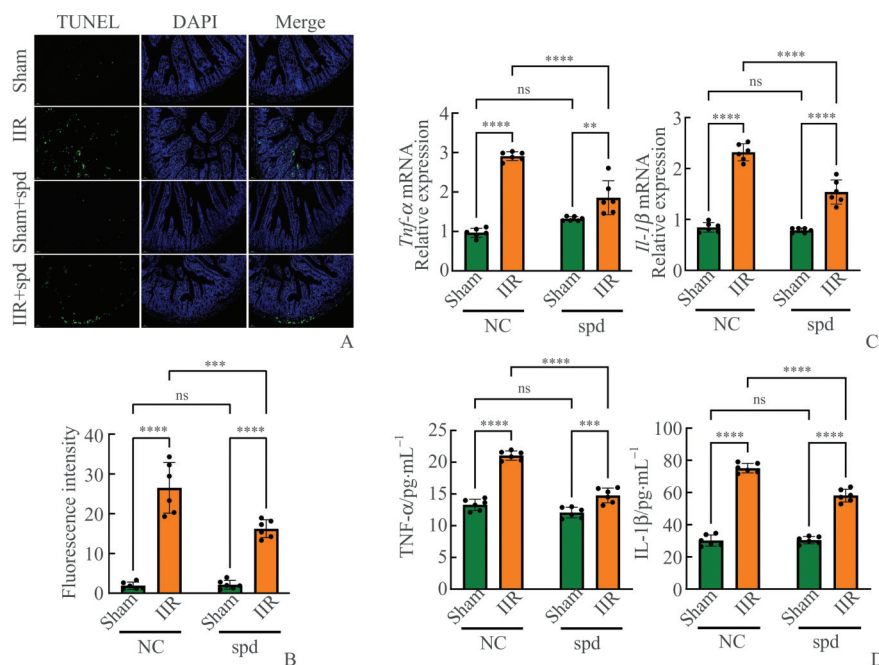
A. 各组小鼠肠组织病理学变化($\times 200$);B. 各组肠组织 Chiu's 评分的比较;C. 各组 E-Cadherin 的 Western Blot 结果;D. 各组 E-Cadherin 的相对表达量。** $P<0.01$,**** $P<0.0001$,ns. 无统计学意义。

图 1 IIR 后小肠病理学变化及肠黏膜紧密连接蛋白的表达

2.3 亚精胺减少 IIR 诱导的细胞凋亡和炎症反应 对小鼠肠组织进行 TUNEL 染色后结果显示(见图 3A、3B),IIR 组的肠黏膜上皮中出现大量阳性细胞,TUNEL 荧光强度显著高于 Sham 组($P<0.05$)。然而,在 IIR+spd 组中,肠组织 TUNEL 荧光强度显著降低($P<0.05$)。进一步通过实时荧光定量 PCR 技术检测了炎症因子 *Tnf- α* 、*Il-1 β* mRNA 的表达水平。结果显示(见图 3C),与 Sham 组相比,IIR 组小鼠肠组织中 *Tnf- α* 、*Il-1 β* 的 mRNA 相对表达量显著升高($P<0.05$),表明肠缺血再灌

注引发了强烈的炎症反应。值得注意的是,在给予亚精胺预处理后,*Tnf- α* 、*Il-1 β* 的 mRNA 表达水平显著降低($P<0.05$)。对各组小鼠肠组织进行 ELISA

检测,结果表明(见图 3D),与 Sham 组相比,IIR 组 *TNF- α* 和 *IL-1 β* 水平升高($P<0.05$),而 IIR+spd 组的炎症因子水平则较 IIR 组降低($P<0.05$)。



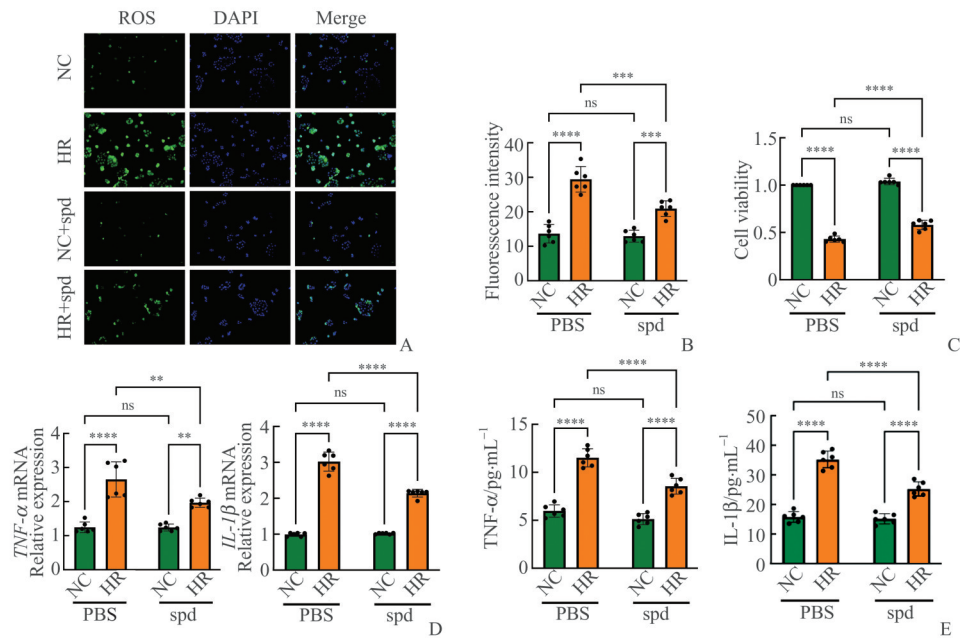
A. 各组 TUNEL 荧光染色照片,左至右分别为 TUNEL、DAPI 染色及融合(Merge)图片($\times 200$);B. 各组 DAPI 荧光强度的比较;C. 各组 *Tnf- α* 、*Il-1 β* 的 mRNA 相对表达量;D. 各组 *TNF- α* 、*IL-1 β* 水平。**** $P<0.0001$, *** $P<0.001$, ** $P<0.01$, ns. 无统计学意义。

图 3 IIR 后 TUNEL 染色图片及炎症因子表达水平

2.4 亚精胺降低 Caco-2 细胞 HR 后氧化应激水平 为进一步验证亚精胺在细胞层面的抗氧化应激作用,我们检测了细胞内的 ROS 水平,结果显示(见图 4A、4B),NC 组细胞仅见微弱绿色荧光,ROS 水平较低;HR 组细胞绿色荧光强度较 NC 组显著增强($P<0.05$),提示 HR 处理可诱导 Caco-2 细胞内 ROS 水平大量增加;而经亚精胺处理的 HR+spd 组细胞中,绿色荧光强度明显减弱($P<0.05$)。通过生化检测试剂盒进一步测定各组细胞 MDA 含量、SOD 活性及 LDH 水平,结果显示(见表 3),HR 组 MDA、LDH 水平较 NC 组升高($P<0.05$),SOD 活性较 NC 组降低($P<0.05$);而 HR+spd 组 MDA、LDH 水平则较 HR 组降低($P<0.05$),SOD 活性升高($P<0.05$)。通过 CCK-8 法检测细胞存活率,结果显示(见图 4C),HR 组细胞存活率较 Sham 组显著下降($P<0.05$);而 HR+spd 组细胞存活率则显著高于 HR 组($P<0.05$)。实时荧光定量 PCR 检测结果显示(见图 4D),HR 组 Caco-2 细胞中促炎因子 *TNF- α* 、*IL-1 β* 的 mRNA 相对表达量显著高于 NC 组($P<0.05$),而在亚精胺处理后,HR+spd 组 *TNF-*

α 、*IL-1 β* 的 mRNA 表达量较 HR 组降低($P<0.05$)。对各组细胞进行 ELISA 检测,结果表明(见图 4E),与 NC 组相比,HR 组 *TNF- α* 和 *IL-1 β* 水平升高($P<0.05$),而 HR+spd 组的炎症因子水平则较 HR 组降低($P<0.05$)。

2.5 亚精胺通过激活 AMPK/PGC-1 α 抗氧化通路发挥保护作用 在体内实验中,通过 Western Blot 检测各组小鼠肠组织中 AMPK/PGC-1 α 信号通路蛋白表达(见图 5A~5C),与 Sham 组相比,IIR 组中 PGC-1 α 蛋白相对表达量显著下降($P<0.05$),p-AMPK/AMPK 比值降低($P<0.05$)。在经亚精胺处理后,IIR+spd 组的 PGC-1 α 蛋白相对表达量较 IIR 组显著增加($P<0.05$),p-AMPK/AMPK 比值也显著升高($P<0.05$)。实时荧光定量 PCR 检测结果进一步验证了 AMPK、PGC-1 α 在转录水平的变化(见图 5D、5E)。在 IIR 组中,*Ampk*、*Pgc-1 α* 的 mRNA 相对表达量较 Sham 组显著降低($P<0.05$),而 IIR+spd 组上述基因的 mRNA 表达量则较 IIR 组回升($P<0.05$)。在体外实验中,通过 Western Blot 检测各组细胞中 AMPK/PGC-1 α 信号通路蛋



A. 各组细胞 ROS 染色图片($\times 200$);B. 各组 ROS 荧光强度的比较;C. 各组细胞存活率的比较;D. 各组细胞 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 的 mRNA 相对表达量;E. 各组细胞 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 水平。* $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ns. 无统计学意义。

图 4 Caco-2 细胞 HR 后 ROS 染色图片及炎症因子表达水平

表 3 各组 Caco-2 细胞 SOD、MDA、LDH 水平比较

($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	SOD /U $\cdot$ mg $^{-1}$	MDA /nmol $\cdot$ mg $^{-1}$	LDH /mmol $\cdot$ g $^{-1}$
NC	149.78 $\pm$ 10.80	2.87 $\pm$ 0.53	0.18 $\pm$ 0.06
HR	129.48 $\pm$ 4.44*	7.87 $\pm$ 0.43*	1.99 $\pm$ 0.22*
NC+spd	158.72 $\pm$ 7.23	2.30 $\pm$ 0.68	0.12 $\pm$ 0.09
HR+spd	141.93 $\pm$ 7.22 [#]	5.89 $\pm$ 0.49 [#]	1.53 $\pm$ 0.10 [#]

注:与 NC 组比较, * $P < 0.05$, 与 HR 组比较, [#] $P < 0.05$ 。

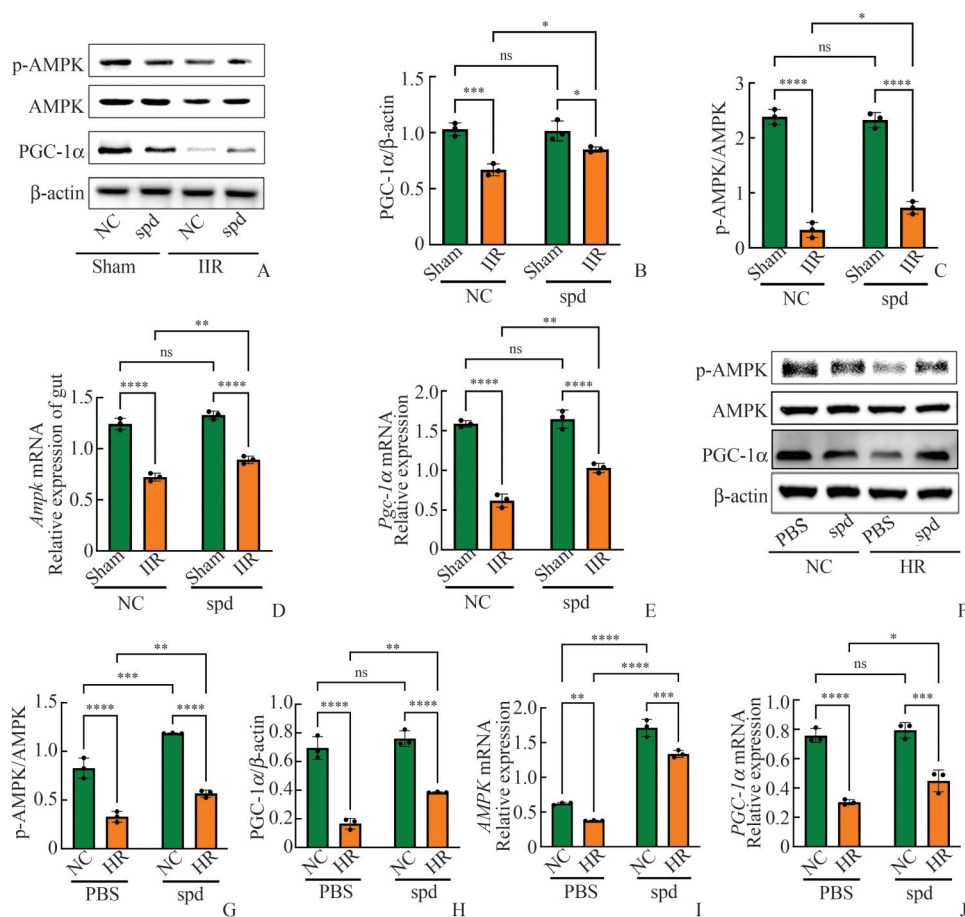
白表达(见图 5F~5H),HR 组中 p-AMPK/AMPK 比值较 NC 组降低($P < 0.05$),PGC-1 α 蛋白相对表达量也显著下降($P < 0.05$),而 HR+spd 组的 p-AMPK/AMPK 比值则较 HR 组显著升高($P < 0.05$),PGC-1 α 蛋白相对表达量也显著增加($P < 0.05$)。通过实时荧光定量 PCR 检测了 AMPK、PGC-1 α 的 mRNA 相对表达量(见图 5I、5J),HR 组较 NC 组显著降低($P < 0.05$),而亚精胺处理后使上述基因的 mRNA 表达量较 HR 组显著回升($P < 0.05$)。

3 讨论

IIR 损伤是临床常见的危重病理过程,其核心机制与氧化应激密切相关。在缺血阶段,肠道组织缺氧导致黄嘌呤脱氢酶不可逆转化为黄嘌呤氧化酶;再灌注时,氧气恢复使黄嘌呤氧化酶催化分子

氧生成大量 ROS,包括超氧阴离子、羟基自由基及过氧化氢等非自由基,同时线粒体呼吸链电子泄漏和炎症细胞也将释放 ROS。过量 ROS 可攻击细胞内各种生物分子,加剧组织损伤。正常情况下,机体通过超氧化物歧化酶、过氧化氢酶等酶类抗氧化剂及谷胱甘肽、褪黑素等非酶类抗氧化剂清除 ROS,但 IIR 损伤时 ROS 的生成远超清除能力,导致严重氧化应激损伤^[4]。在我们的研究中,IIR 组肠组织结构遭受严重破坏,肠组织病理学 Chiu's 评分较 Sham 组显著升高,E-Cadherin 含量显著降低,说明 IIR 引发的一系列病理反应破坏了肠黏膜上皮细胞间的连接结构,使黏膜屏障功能受损。IIR 组小鼠肠组织中的 MDA、LDH 含量较 Sham 组升高,SOD 活性降低,说明 IIR 后小鼠发生严重的氧化应激反应。此外,ROS 在 IIR 和 HR 处理后的肠组织和 Caco-2 细胞中显著增加,进一步支持了氧化应激的发生。TUNEL 染色结果显示,IIR 组肠黏膜上皮呈现出大量阳性细胞,表明存在广泛的细胞凋亡现象。进一步分析发现,IIR 组肠组织和 HR 组 Caco-2 细胞的促炎因子表达水平显著高于 S 组和 NC 组,表明 IIR 引发了强烈的炎症反应。

亚精胺是一种广泛分布于生物体内的多胺类化合物,它在细胞进程中发挥着诸多关键作用,例如稳定 DNA、促进细胞生长以及诱导自噬等^[13-14]。同时,亚精胺还具备强抗氧化活性,通过直接与自



A. 各组小鼠 AMPK、p-AMPK 和 PGC-1α 的 Western Blot 结果; B. 各组小鼠 PGC-1α 的相对表达量; C. 各组小鼠 p-AMPK/AMPK 比值的比较; D. 各组小鼠 *Ampk* 的 mRNA 相对表达量; E. 各组小鼠 *Pgc-1α* 的 mRNA 相对表达量; F. 各组细胞 AMPK、p-AMPK 和 PGC-1α 的 Western Blot 结果; G. 各组 p-AMPK/AMPK 比值的比较; H. 各组 PGC-1α 的相对表达量; I. 各组细胞 *AMPK* 的 mRNA 相对表达量; J. 各组细胞 *PGC-1α* 的 mRNA 相对表达量。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ns. 无统计学意义。

图 5 小鼠 IIR 后、Caco-2 细胞 HR 后 AMPK、p-AMPK 和 PGC-1α 表达

由基反应,将其转化为稳定物质,抑制自由基对 DNA、蛋白质和脂质的损伤;并且在体内能够促进抗氧化酶的表达,增强机体的抗氧化能力^[18]。此外,亚精胺促进谷胱甘肽等非酶抗氧化物质的合成,增强细胞的抗氧化防御,减少氧化损伤^[19]。此前已有不少文献^[16]证实亚精胺对缺血再灌注损伤具有保护作用。本研究进一步证实了亚精胺对 IIR 损伤的保护作用。体内实验结果表明,亚精胺处理后, IIR 小鼠的黏膜下层水肿减轻,肠道结构损伤减轻,病理学 Chiu's 评分降低, E-Cadherin 含量升高,表明亚精胺能够改善 IIR 后的肠组织损伤与屏障破坏。在氧化应激方面,亚精胺处理组的小鼠 ROS 荧光染色强度也较 IIR 组显著减少,说明亚精胺减少了 IIR 后 ROS 的生成;生化指标上,亚精胺处理使得肠组织 MDA、LDH 水平降低, SOD 活性升高,进一步证实了亚精胺可以减少 IIR 后的氧化应激损

伤。亚精胺的保护作用不仅体现在对肠黏膜屏障功能的维护和调节氧化应激,还体现在对炎症反应的抑制。在亚精胺的干预下, IIR 后的肠道 TUNEL 荧光染色强度显著降低,促炎细胞因子分泌减少,说明亚精胺能够减少 IIR 后的细胞凋亡与炎症反应。而在体外实验中,亚精胺处理组的 Caco-2 细胞内 ROS 水平降低,细胞存活率上升,促炎细胞因子分泌减少,进一步证实了亚精胺能够降低细胞 HR 后氧化应激水平,具有保护作用。综上所述,亚精胺能够改善 IIR 后的肠道组织损伤与屏障破坏,显著抑制 IIR 诱导的氧化应激反应,减少细胞凋亡与炎症反应。

AMPK 作为细胞能量感知与代谢调控的核心分子,在氧化应激状态下被激活后可磷酸化下游靶蛋白 PGC-1α^[20],后者作为线粒体生物合成与抗氧化应激的关键转录共激活因子,进一步上调抗氧化

转录因子的表达,启动抗氧化酶的合成,从而形成级联反应。有文献^[12]证明,AMPK/PGC-1 α 通路的激活能增强受损心肌细胞的抗氧化应激能力,对受损心肌起到保护作用。而我们的研究结果强烈提示亚精胺的保护效应与AMPK/PGC-1 α 通路激活之间的关系:亚精胺处理后的IIR组p-AMPK、PGC-1 α 蛋白表达显著增加; *Ampk*、*Pgc-1 α* 的mRNA表达较IIR组显著回升,类似的趋势同样出现于体外实验中。且有相关研究证实,亚精胺能够调控AMPK磷酸化水平及其下游基因表达,而AMPK抑制剂处理能够一定程度地抑制亚精胺促进AMPK磷酸化的功能^[21]。这一结果进一步佐证了亚精胺功能与AMPK/PGC-1 α 通路的紧密关联性。而在分子机制层面上,亚精胺激活AMPK的具体途径尚未明确,是直接结合AMPK亚基、间接影响线粒体功能,还是通过影响细胞内AMP/ATP比例、调控自噬通路等方式介导AMPK激活,仍需进一步探索。AMPK/PGC-1 α 通路下游具有多种潜在的功能效应器,如促进线粒体生物合成、改善线粒体功能、激活自噬通路、减少细胞凋亡等。值得注意的是,上述效应器的功能变化与本研究观察到的表型形成高度呼应:线粒体生物合成增加与功能改善,直接对应组织氧化应激水平的下降(表现为ROS含量降低、抗氧化酶SOD活性升高等);自噬激活与凋亡抑制,则与组织病理损伤减轻(如炎症因子水平下降)及细胞死亡数量减少(TUNEL阳性细胞率降低)的结果相契合。这一系列关联验证了AMPK/PGC-1 α 通路在保护效应中的核心地位,使本研究的保护机制假说更具说服力,也为后续针对性干预靶点的筛选提供了明确的理论框架。

研究结果提示,亚精胺可能通过激活AMPK/PGC-1 α 通路,显著减轻IIR损伤。后续研究我们将致力于通过条件性基因敲除小鼠构建与特异性抑制剂应用进一步夯实本研究的结论并为机制解析提供直接证据,从而为临床干预IIR提供了新的分子机制和精准的通路靶向策略。



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

参考文献

- [1] WANG F, HUANG H, WEI X, et al. Targeting cell death pathways in intestinal ischemia-reperfusion injury: A comprehensive review [J]. *Cell Death Discov*, 2024, 10(1): 112.
- [2] BALA M, CATENA F, KASHUK J, et al. Acute mesenteric ischemia: Updated guidelines of the World Society of Emergency Surgery [J]. *World J Emerg Surg*, 2022, 17(1): 54.
- [3] GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ G, GARCÍA-ALONSO I, GUTIÉRREZ SÁENZ DE SANTA MARÍA J, et al. Antioxidant-based therapy reduces early-stage intestinal ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(6):853.
- [4] LI G, WANG S, FAN Z. Oxidative stress in intestinal ischemia-reperfusion [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8: 750731.
- [5] WU L Q, XIONG X X, WU X M, et al. Targeting oxidative stress and inflammation to prevent ischemia-reperfusion Injury [J]. *Front Mol Neurosci*, 2020, 13:28.
- [6] SASAKI M, JOH T. Oxidative stress and ischemia-reperfusion injury in gastrointestinal tract and antioxidant, protective agents [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2007, 40(1): 1-12.
- [7] CAI J, CHEN X Y, LIU X Y, et al. AMPK: The key to ischemia - reperfusion injury [J]. *J Cell Physiol*, 2022, 237(11): 4079-4096.
- [8] HALLING J F, PILEGAARD H. PGC-1 α -mediated regulation of mitochondrial function and physiological implications [J]. *Appl Physiol Nutr Me*, 2020, 45(9): 927-936.
- [9] RIUS-PEREZ S, TORRES-CUEVAS I, MILLAN I, et al. PGC-1 α , inflammation, and oxidative stress: An integrative view in metabolism [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 1452696.
- [10] LI L L, CHU X, YAO Y, et al. (-)-Hydroxycitric acid alleviates oleic acid-induced steatosis, oxidative stress, and inflammation in primary chicken hepatocytes by regulating AMP-activated protein kinase-mediated reactive oxygen species levels [J]. *J Agr Food Chem*, 2020, 68(40): 11229-11241.
- [11] IACOVELLI J, ROWE G C, KHADKA A, et al. PGC-1 α induces human RPE oxidative metabolism and antioxidant capacity [J]. *Invest Ophth Vis Sci*, 2016, 57(3): 1038-1051.
- [12] ZHUANG Y, WANG Y, TANG X, et al. Exosomes generated from bone marrow mesenchymal stem cells limit the damage caused by myocardial ischemia-reperfusion via controlling the AMPK/PGC-1 α signaling pathway [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2025, 1871(6): 167890.
- [13] KURIHARA S. Polyamine metabolism and transport in gut microbes [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2022, 86(8): 957-966.
- [14] ZHAO Q, HUANG J F, CHENG Y, et al. Poly-

- amine metabolism links gut microbiota and testicular dysfunction [J]. *Microbiome*, 2021, 9(1):224.
- [15] YAN J, YAN J Y, WANG Y X, et al. Spermidine-enhanced autophagic flux improves cardiac dysfunction following myocardial infarction by targeting the AMPK/mTOR signalling pathway [J]. *Brit J Pharmacol*, 2019, 176(17): 3126-3142.
- [16] KIM J. Spermidine rescues proximal tubular cells from oxidative stress and necrosis after ischemic acute kidney injury [J]. *Arch Pharm Res*, 2017, 40(10): 1197-1208.
- [17] CHIU C J, MCARDLE A H, BROWN R, et al. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal [J]. *Arch Surg*, 1970, 101(4):478-483.
- [18] SUN J, XU J, LIU Y, et al. Exogenous spermidine alleviates diabetic cardiomyopathy via suppressing reactive oxygen species, endoplasmic reticulum stress, and Pannexin-1-mediated ferroptosis [J]. *Biomol Biomed*, 2023, 23(5): 825-837.
- [19] MADEO F, EISENBERG T, PIETROCOLA F, et al. Spermidine in health and disease [J]. *Science*, 2018, 359(6374): eaan2788.
- [20] AFINANISA Q, CHO M K, SEONG H A. AMPK localization: A key to differential energy regulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(20):10921.
- [21] GAO M Y, ZHAO W, LI C M, et al. Spermidine ameliorates non-alcoholic fatty liver disease through regulating lipid metabolism via AMPK [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2018, 505(1): 93-98.
- (2025-08-21 收稿)
编辑 孙孝云

.....

(上接第 586 页)

- [15] XU S L, HAO K K, XIONG Y, et al. Capsaicin alleviates neuronal apoptosis and schizophrenia-like behavioral abnormalities induced by early life stress[J]. *Schizophrenia*, 2023, 9(1): 77.
- [16] HAO K K, CHEN F S, XU S L, et al. The role of SIRT3 in mediating the cognitive deficits and neuroinflammatory changes associated with a developmental animal model of schizophrenia[J]. *Prog Neuro Psychopharmacol Biol Psychiatry*, 2024, 130: 110914.
- [17] NISHI M. Effects of early-life stress on the brain and behaviors: Implications of early maternal separation in rodents[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19): 7212.
- [18] 徐诗林, 王惠玲. TRPV1在中枢神经系统中的双重作用及其参与精神分裂症的可能机制[J]. *神经疾病与精神卫生*, 2024, 24(6): 429-435.
- XU S L, WANG H L. Dual role of TRPV1 in central nervous system and its possible mechanism of involvement in schizophrenia[J]. *J Neurosci Ment Health*, 2024, 24(6): 429-435.
- [19] KASCKOW J W, MULCHAHEY J J, GERACIOTI T D. Effects of the vanilloid agonist olvanil and antagonist capsazepine on rat behaviors[J]. *Prog Neuro Psychopharmacol Biol Psychiatry*, 2004, 28(2): 291-295.
- [20] SURAKUL P, CHUTABHAKDIKUL N, VANICH-VIRIYAKIT R, et al. Maternal stress induced autophagy dysfunction and immune activation in the hippocampus of adolescence rat pups[J]. *J Chem Neuroanat*, 2022, 121: 102085.
- [21] TOMODA T, SUMITOMO A, SHUKLA R, et al. BDNF controls GABA_AR trafficking and related cognitive processes *via* autophagic regulation of p62[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2022, 47(2): 553-563.
- (2025-03-15 收稿)
编辑 沈建国