DOI：10.12287/j.issn.2096-8965.20230110

# 栀子苷元通过抑制内质网应激改善脾细胞凋亡治疗脓毒症的机制研究

罗宁，陈贵兵，张腾，赵婕，付靖楠，逯宁，马涛*

（天津医科大学总医院，天津 300052）

**【摘要】目的** 评估栀子苷元（Genipin）对盲肠结扎穿孔术（Cecal Ligation and Puncture，CLP）诱导的脓毒症小鼠模型的治疗效果，并探讨其潜在的作用机制。**方法** 将雄性C57BL/6小鼠分为假手术组（Sham组）、脓毒症模型组（CLP组）、栀子苷元治疗脓毒症组（Genipin+CLP组）。栀子苷元治疗组在建模后0 h和20 h经尾静脉注射2.5 mg/kg栀子苷元，而Sham组和CLP组注射等体积生理盐水。实验1，观察栀子苷元对脓毒症小鼠120 h生存率的影响；实验2，基于生存率的结果选取建模后36 h为采样时间点，并行以下方法检测：利用酶联免疫吸附法（Enzym-linked Immunosorbent Assay，ELISA）检测肿瘤坏死因子α（Tumor Necrosis Factor α，TNF-α）和白细胞介素6（Interleukin 6，IL-6）含量；常规苏木精-伊红（Hematoxylin-eosin，HE）染色法检测肺和肝组织病理损害；Western Blot法检测脾脏内质网应激相关蛋白的表达变化，包括葡萄糖调节蛋白78（Glucose Regulated Protein 78，GRP78）、蛋白激酶R样内质网激酶（Protein Kinase R-like Endoplasmic Reticulum Kinase，PERK）、磷酸化真核翻译起始因子2α（p-eukaryotic Initation Factor 2α，p-eIF2α）和C/EBP同源蛋白（C/EBP Homologous Protein，CHOP）；脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法（Terminal-deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-labeling，TUNEL）检测脾细胞凋亡变化。**结果** 与CLP组相比，栀子苷元治疗提高了脓毒症小鼠120 h生存率（$P<0.05$），降低了血清TNF-α和IL-6含量（$P<0.05$），并减轻肺和肝脏组织病理学损伤。另外，栀子苷元显著下调了脾脏GRP78、PERK、p-eIF2α和CHOP蛋白的表达水平（$P<0.05$），并进而减少内质网应激诱导的脾细胞凋亡数量（$P<0.05$）。**结论** 栀子苷元能够明显减轻脓毒症所导致的脏器损害和过度炎症反应，改善脓毒症预后。该效应的作用机制可能与栀子苷元减轻脾脏内质网应激导致其凋亡机制的启动被阻断，进而减轻脾细胞凋亡有关。

**【关键词】**脓毒症；栀子苷元；内质网应激；未折叠蛋白反应

**中图分类号：**R631　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**2096-8965（2023）01-0078-06

# Genipin protects against sepsis via the inhibition of endoplasmic reticulum stress to attenuate splenocyte apoptosis

Luo Ning, Chen Guibing, Zhang Teng, Zhao Jie, Fu Jingnan, Lu Ning, Ma Tao*

(Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China)

**【Abstract】Objective** This study is undertaken to elucidate the protective effect and molecular mechanism of genipin against cecal ligation and puncture (CLP)-induced sepsis. **Methods** Male C57BL/6 mice were assigned to three groups: vehicle-treated sham group, vehicle-treated CLP group, and genipin-treated CLP group. Genipin (2.5 mg/kg) and vehicle (0.9% saline) were respectively administered to corresponding group via the tail vein at 0 h and 20 h after the CLP. First, for the survival experiment, mortality was monitored up to 120 h after the CLP

**收稿日期：**2022-10-08；**修回日期：**2023-02-12

**基金项目：**国家自然科学基金项目（82172122）；天津市医学重点学科（专科）建设项目（TJSYXZDXK010）

**通信作者：**马　涛（1972-），男，天津人，博士生导师，主要从事外科感染及脓毒症方面的研究。E-mail：taoma@tmu.edu.cn

procedure. Second, based on the survival test, 36 h time point after CLP was selected for further tests. The serum concentrations of tumor necrosis factor α (TNF-α) and interleukin 6 (IL-6) were detected by enzym-linked immunosorbent assay (ELISA). The pathological damages to lung and liver tissue were detected by hematoxylin-eosin staining (HE staining). The expression levels of endoplasmic reticulum (ER) stress-related proteins such as glucose regulated protein78 (GRP78), protein kinase r-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), p-eukaryotic initation factor 2α (p-eIF2α), and C/EBP homologous protein (CHOP) were determined by Western Blot. Detection of splenocyte apoptosis was performed by using the terminal-deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) method. **Results** Compared with the vehicle-treated CLP group, genipin significantly improved the survival of septic mice, decreased the serum levels of TNF-α and IL-6, and alleviated histopathological damages to lung and liver such as edema and inflammatory cell infiltration. Moreover, genipin significantly downregulated the expression levels of splenic GRP78, PERK, p-eIF2α, and CHOP, and lessened ER-induced splenocyte apoptosis. **Conclusion** Genipin significantly attenuates sepsis-induced organ injury and the excessive inflammatory response and improves the outcome of sepsis. The effect mechanisms of genipin against sepsis are probably associated with decreasing splenocyte apoptosis by attenuating ER stress to further block the ER stress-induced apoptosis.

【**Keywords**】Sepsis; Genipin; Endoplasmic reticulum stress; Unfolded protein response

脓毒症是以宿主对感染反应失衡为特点，以危及生命的器官功能障碍为表现的临床综合征。尽管综合应用重症监护、脏器支持、抗生素等治疗手段，脓毒症患者的死亡率仍高达30%~70%[1]。脓毒症病生理过程中，感染、创伤、缺血、缺氧等因素均可能导致内质网内未折叠或错误折叠蛋白质堆积和钙稳态失衡进而诱发内质网应激（Endoplasmic Reticulum Stress，ERS），如机体的保护性未折叠蛋白反应（Unfolded Protein Response，UPR）无法恢复细胞内稳态，ERS凋亡机制则被启动，成为脓毒症加重的重要病生理机制[2]。中药栀子是茜草科植物栀子的干燥成熟果实，是中医临床中常用的清热药。现代药理学研究显示，栀子具有抗炎、抑菌、抗氧化等作用[3, 4]，其中的主要有效成分是栀子苷元（Genipin）。近年研究显示，栀子苷元能够改善脓毒症预后，还能减轻脓毒症相关的肝损害和肺损伤，但其作用机制尚有待进一步研究[5]。因此，本研究通过构建盲肠结扎穿孔（Cecal Ligation and Puncture，CLP）脓毒症模型，进而验证栀子苷元治疗脓毒症的疗效，同时探讨栀子苷元的药理作用机制是否与改善ERS和减少脾细胞凋亡相关。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

雄性8–12周龄的C57BL/6小鼠，购于北京维通利华生物有限公司，许可证号：SCXK（京）2021–0011，饲养于实验动物中心。所有小鼠均在实验前经适应性喂养3天，可自由进食饮水。本研究按照实验动物管理和使用指南进行，善待动物并保障实验动物的福利。

#### 1.1.2 主要试剂

栀子苷元购于日本Wako Pure公司；小鼠血清肿瘤坏死因子α（Tumor Necrosis Factor α，TNF–α）和白细胞介素6（Interleukin 6，IL–6）预包被酶联免疫吸附法（Enzym–linked Immunosorbent Assay，ELISA）试剂盒购于北京达科为生物公司；葡萄糖调节蛋白78（Glucose Regulated Protein 78，GRP78）、蛋白激酶R样内质网激酶（Protein Kinase R–like Endoplasmic Reticulum Kinase，PERK）、磷酸化真核翻译起始因子2α（p–eukaryotic Initation Factor 2α，p–eIF2α）和C/EBP同源蛋白（C/EBP Homologous Protein，CHOP）一抗抗体以及HRP标记的二抗抗体均购于美国Cell Signaling Technology公司；β–actin购自北京普利来生物有限公司；脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法（Terminal–deoxynucleotidyl Transferase–mediated dUTP Nick End–labeling，TUNEL）试剂盒购于上海碧云天生物有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 构建CLP脓毒症小鼠模型和栀子苷元治疗

参照文献方法制备CLP脓毒症模型[6]。小鼠在

手术前8 h禁食水。采用2.5%异氟烷吸入麻醉，小鼠腹部按常规备皮、碘伏消毒和铺巾。沿腹中线剪开腹壁约1 cm，将盲肠提出腹腔，用4-0丝线在回盲瓣下方结扎盲肠，注意勿结扎到回肠及肠系膜血管，用20 G无菌针头扎穿结扎点远端的盲肠，轻轻挤压盲肠让少量肠内容物外溢，然后将盲肠还纳回腹腔，缝合腹壁切口。术后皮下注射1 mL生理盐水行液体复苏。假手术组（Sham组）小鼠仅行开关腹操作。将小鼠分为Sham组、CLP组和栀子苷元治疗组（Genipin+CLP组）。栀子苷元治疗组在建立CLP模型后0 h和20 h时经尾静脉注射2.5 mg/kg栀子苷元，而Sham组和CLP组注射等体积生理盐水作为对照。实验1，观察栀子苷元对脓毒症小鼠120 h生存率的影响；实验2，基于生存率的结果选取建模后36 h为采样时间点并完成后续相关检测。所有小鼠均在3.5%异氟烷深度麻醉下完成样本采集，然后用颈椎脱臼法处死。

**1.2.2** 肝、肺组织常规病理检查

将采集的肝组织和肺组织立即置于4%多聚甲醛溶液中固定至少24 h，然后行石蜡包埋和切片，将切片依次经过脱蜡、苏木精染色、返蓝、伊红染色、脱水封片五个步骤完成苏木精-伊红（Hematoxylin-Eosin，HE）染色。在光学显微镜下观察并评价肝、肺组织病理改变。

**1.2.3** ELISA检测血清细胞因子含量

通过心脏穿刺取血收集血液，室温静置4 h，以1 000×g离心15 min分离血清，将样本保存于-80℃直到检测。采用ELISA试剂盒检测血清中IL-6和TNF-α含量，依照试剂盒中的说明书完成具体的实验操作步骤。

**1.2.4** Western Blotting实验

将装有新鲜脾组织的EP管置于冰上，加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液，经充分匀浆后离心提取总蛋白，并用BCA法测定蛋白浓度。按等质量蛋白进行上样，经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白后转至聚偏二氟乙烯膜上，用8%脱脂奶粉室温下封闭1 h后洗涤。将剪切好的条带至于相对应的一抗稀释液（1∶1 000）中，分别为GRP78抗体、PERK抗体、p-eIF2α抗体、CHOP抗体和β-actin抗体，4℃摇床过夜孵育。次日将条带洗涤后放入二抗稀释液中，在摇床上室温孵育1 h。最后，使用ECL发光液经凝胶成像仪曝光拍照，观察相关蛋白的表达水平。Image J软件测量各条带灰度值，以目标蛋白与β-actin的比值作为其相对含量。

**1.2.5** TUNEL法检测脾细胞凋亡

将新鲜脾组织立即置于4%多聚甲醛中固定24 h，冲洗后置于30%蔗糖溶液中脱水24 h。将标本包埋入OCT胶中，在冰冻切片机上完成切片，切片厚度为5 μm。在切片上滴加0.5%TritonX-100细胞通透液，并在室温下孵育30 min。用磷酸盐缓冲液洗片后滴加TUNEL工作液，37℃下避光孵育1 h。用磷酸盐缓冲液再次洗片后滴加4′,6-二脒基-2-苯基吲哚（4′, 6-diamidino-2-phenylindole，DAPI）复染，盖玻片封片。最后，在荧光显微镜下观察切片并计数。

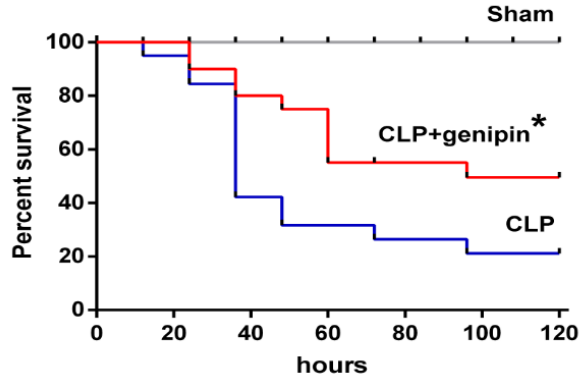
**1.2.6** 统计分析

采用GraphPad Prism5软件完成数据统计分析。计量资料以均数±标准差表示。多组间比较采用单因素方差分析，两组间比较采用独立样本$t$检验，生存曲线采用Log-rank检验。$P$<0.05被认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 栀子苷元对生存率的影响

生存曲线图显示，与Sham组相比，行CLP的小鼠生存率显著下降，说明CLP成功诱发了小鼠脓毒症。与生理盐水处理的CLP组相比，经栀子苷元治疗的脓毒症小鼠生存率明显提高（50% vs 20%，$P$<0.05，见图1）。另外，生存曲线图还显示，小鼠在CLP术后的36 h是死亡高峰，并以此时间点作为下一步实验中收集样本的时间终点。

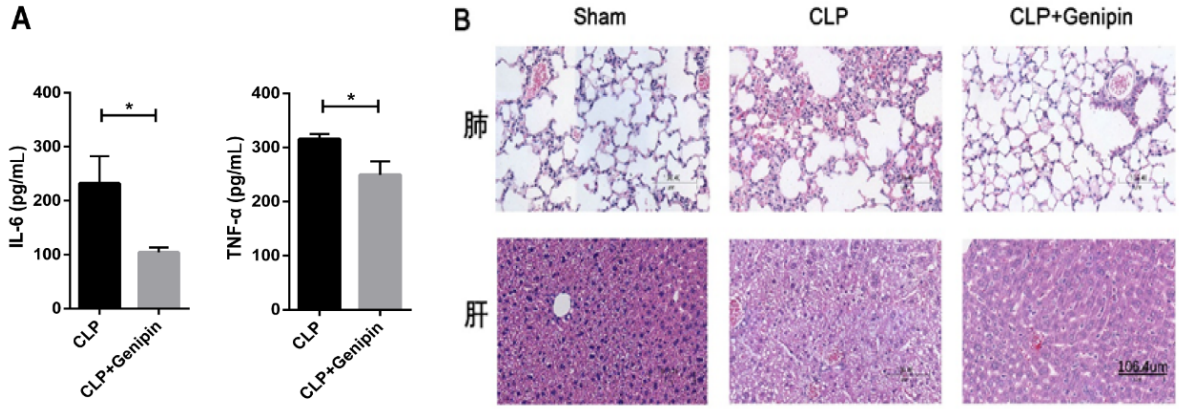



建模后每12 h监测一次生存状态，直到120 h为止。*与CLP组比较，$P$<0.05（log-rank检验），$n$=20只/组。

**图1 栀子苷元对脓毒症小鼠生存率的影响**

### 2.2 栀子苷元对炎症反应和脏器损害的影响

细胞因子检测结果显示，与对照组相比，栀子苷元治疗后脓毒症小鼠的血清IL-6和TNF-α含量明显降低（$P$<0.05，见图2A）。这说明栀子苷元能减轻脓毒症的全身炎症反应，提示其也可能缓解脏器损害。肝肺组织切片显示，与Sham组相比，CLP组可见肺泡腔和肺间质内大量炎性细胞浸润及弥漫性充血，肺间隔增宽；肝组织汇管区可见炎性细胞浸润，肝细胞明显肿胀，胞浆疏松。正如前面所预期的一样，栀子苷元治疗能明显减轻脓毒症引起的肺组织和肝组织病理损害（见图2B）。

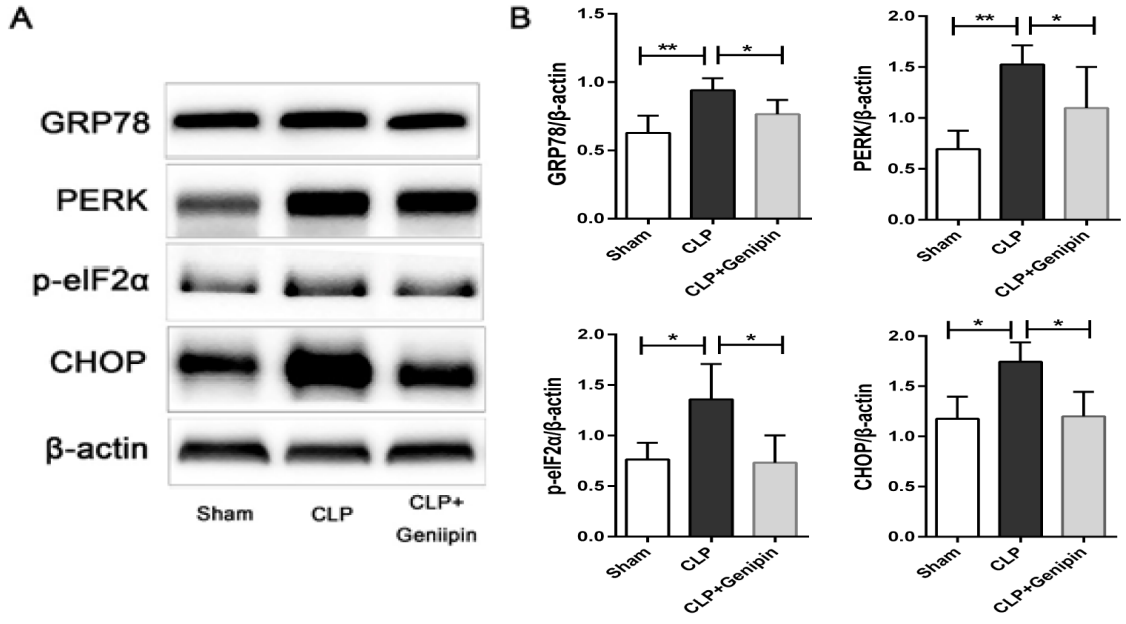



（A）ELISA法检测血清IL-6和TNF-α含量；（B）肺组织和肝组织病理学改变（×200，比例尺：106.4 μm）。*$P$< 0.05，$n$=4只/组。

图2 栀子苷元对细胞因子和肝肺损害的影响

### 2.3 栀子苷元对脾脏ERS信号通路的影响

脓毒症中感染、创伤、缺血、缺氧等因素均可能导致ERS，机体进而启动UPR以拮抗应激并试图恢复细胞稳态。本课题组前期研究发现CLP术后脾脏GRP78、CHOP蛋白明显活化[7]，又有研究报道栀子苷元能够抑制内质网应激下Neuro2α细胞中CHOP、GRP78蛋白表达[8]。因此，我们进一步分析栀子苷元对脓毒症的改善是否与脾脏ERS信号通路变化有关。Western Blot结果显示，与Sham组相比，CLP组脾脏组织中的GRP78、PERK和CHOP蛋白表达水平显著上调（$P$<0.05），磷酸化eIF2α含量亦明显增加（$P$<0.05）。而经栀子苷元治疗后，GRP78、PERK和CHOP蛋白表达水平以及eIF2α的磷酸化水平均明显下调（$P$<0.05，见图3）。以上结果提示，栀子苷元可能通过减轻脾脏内质网应激影响脓毒症的炎症反应和器官损害。

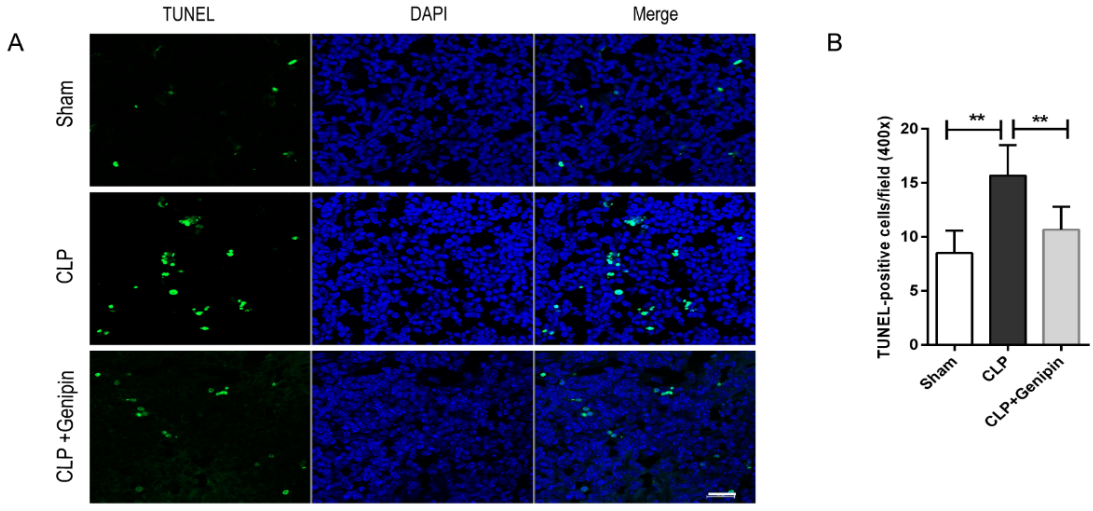



（A）GRP78、PERK、p-eIF2α和CHOP蛋白印迹的代表条带；（B）目标蛋白与β-actin的比值。*$P$< 0.05，**$P$< 0.01，$n$=4只/组。

图3 栀子苷元对脓毒症小鼠脾脏ERS信号通路的影响

### 2.4 栀子苷元对脾细胞凋亡的影响

在图3的结果中CLP组的CHOP表达水平显著上调，而CHOP是ERS诱发细胞凋亡相关机制中的重要功能蛋白[9]。结合前面细胞因子的结果，从而推测栀子苷元可能通过减轻免疫细胞凋亡改善脓毒症的炎症反应。因此，进一步采用TUNEL法检测各组脾细胞的凋亡改变。结果显示，与Sham组相比，CLP组阳性染色的脾凋亡细胞数明显增多（$P<0.05$）。而用栀子苷元治疗后，阳性染色的脾凋亡细胞数比CLP组明显减少（$P<0.05$）（见图4）。以上结果说明，栀子苷元可能通过缓解ERS进而减轻了脾细胞凋亡。




（A）TUNEL染色在荧光显微镜下的代表图片（×400，比例尺：20 μm）；（B）每个样本随机选择3个视野，计数每个视野的阳性细胞数，取其平均值。**$P<0.01$，$n$=3只/组。

**图4 栀子苷元对脓毒症小鼠脾细胞凋亡的影响**

## 3 讨论

尽管早期液体复苏、早期使用抗菌药物、清除感染灶及器官支持等“集束化治疗”不断更新，脓毒症的预后仍不容乐观，亟待有效的新干预措施。中医理论体系中虽没有“脓毒症”这一病名，但可根据其临床表现，将其归纳入“温热病”范畴。中医典籍中大量记载以清热解毒类中药或方剂治疗温热病，其中栀子常被使用。栀子性寒、味苦，归心、肺、三焦经，常用于治疗热病烦闷、湿热黄疸、血热出血、热毒疮疡等。现代药理学研究表明栀子具有抗炎、抑菌、抗氧化等作用，而栀子苷元等环烯醚萜苷类化合物是其主要的药效成分[10, 11]。近年来的研究表明，栀子苷元可剂量依赖性抑制角叉菜胶诱发的足肿胀炎症反应，降低渗出液中一氧化氮的含量[12]；可通过激活PI3K/Akt信号途径减轻脂多糖（Lipopolysaccharide，LPS）所导致的肺损伤[13]；可通过干预Toll样受体4信号途径抑制RAW264.7细胞促炎细胞因子的生成，还能改善LPS和CLP所致脓毒症模型的预后等[5]。据此，本研究采用CLP脓毒症模型，探索栀子苷元治疗脓毒症的疗效。结果证实，给予栀子苷元治疗后，脓毒症所导致的肝和肺组织病理损害明显减轻，促炎因子TNF-α和IL-6下调，CLP后120 h生存率得到明显改善。因此，提示栀子苷元具有明确的抗脓毒症效应。

内质网是真核细胞内最大的细胞器，对内外环境的刺激非常敏感。脓毒症病生理过程中存在的感染、创伤、缺血、缺氧等因素均可能导致内质网稳态失衡，造成ERS[14, 15]。研究显示，ERS在脓毒症病生理机制中发挥重要作用，对参与炎症免疫反应的巨噬细胞、T细胞、树突状细胞的功能和凋亡等均具有重要的影响[7, 16]。前期研究已提示，CLP脓毒症小鼠脾脏GRP78、CHOP等的表达明显增加[7]；本研究，除证实CLP建模后脾脏中GRP78和CHOP表达上调外，PERK和磷酸化eIF2α亦明显增加。GRP78是内质网中协助蛋白质正确折叠的重要伴侣蛋白[17]，它的表达上调提示细胞处于明显的ERS。PERK是内质网膜上的ERS跨膜感受器，生理条件下与GRP78结合于内质网膜上，一旦与GRP78解

离，PERK即发生活化，磷酸化eIF2α，启动下游信号通路。PERK的表达上调和eIF2α的磷酸化，表明PERK信号途径被活化，细胞启动UPR以拮抗应激，尽可能恢复细胞内稳态。首先，本研究通过对CLP脓毒症的观察结果表明PERK信号途径被活化。然后，经栀子苷元治疗能够明显下调GRP78、PERK的表达和eIF2α的磷酸化，提示其能够明显减轻脓毒症所导致的ERS。

生理状态下，CHOP在胞质含量低。病理条件下，受PERK信号通路调控，CHOP表达水平明显增加并移位至细胞核通过下调*Bcl*-2基因、上调*Bad*/*Bak*基因的表达等诱导凋亡发生[18, 19]。因此，CHOP是连接ERS与凋亡发生的重要转录因子。本研究结果表明，CLP诱发脓毒症后脾脏CHOP的表达上调，提示由于存在显著的ERS导致无法恢复细胞内环境稳态，从而触发了ERS凋亡机制。凋亡是由基因调控的细胞自主有序的死亡方式，凋亡的异常出现表明机体存在内环境的紊乱，与众多疾病的发生发展密切相关。1999年，Hotchkiss等[20]首先报道死于脓毒症的患者存在广泛的脾淋巴细胞凋亡，后续研究进一步证实脓毒症病生理过程中T细胞、B细胞和树突状细胞等均存在明显的异常凋亡，且与机体的免疫功能紊乱密切相关。由此，干预凋亡机制成为探索脓毒症治疗的重要着眼点。既往研究提示，栀子苷元能够明显抑制LPS所致的肝细胞凋亡，从而减轻肝功能损害[21]。另外，文献报道栀子苷元对衣霉素或A23187作用于Neuro2a细胞引起的ERS具有明显的保护作用[8]。本研究通过TUNEL法检测证实脓毒症小鼠确实存在明显的脾细胞凋亡。然而，经栀子苷元治疗后，脾脏CHOP蛋白的表达水平和TUNEL阳染细胞数均明显下降。由此提示，栀子苷元可能通过下调CHOP介导的ERS凋亡机制从而减轻脾细胞凋亡，以此发挥抗脓毒症效应。

综上，本研究显示栀子苷元具有明确的抗脓毒症效应，能够明显减轻脓毒症导致的脏器损害和炎症反应并改善预后，其作用机制可能与减轻ERS，下调CHOP表达，改善脾细胞凋亡有关。因此，栀子苷元具有转化为临床治疗脓毒症新药的潜力。

## 参 考 文 献


[1] SINGER M, DEUTSCHMAN C S, SEYMOUR C W, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3)[J]. Jama, 2016, 315(8): 801-810.

[2] KHAN M M, YANG W L, WANG P. Eedoplasmic reticulum stress in sepsis[J]. Shock, 2015, 44(4): 294-304.

[3] TSENG T H, CHU C Y, HUANG J M, et al. Crocetin protects against oxidative damage in rat primary hepatocytes[J]. Cancer Lett, 1995, 97(1): 61-67.

[4] KOO H J, SONG Y S, KIM H J, et al. Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia[J]. Eur J Pharmacol, 2004, 495(2-3): 201-208.

[5] KIM T H, YOON S J, Lee S M. Genipin attenuates sepsis by inhibiting Toll-like receptor signaling[J]. Mol Med, 2012, 18(1): 455-465.

[6] RITTIRSCH D, HUBER-LANG M S, FLIERL M A, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture[J]. Nat Protoc, 2009, 4(1): 31-36.

[7] MA T, HAN L, GAO Y, et al. The endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis signal pathway is involved in sepsis-induced abnormal lymphocyte apoptosis[J]. Eur Surg Res, 2008, 41(2): 219-225.

[8] TANAKA M, YAMAZAKI M, CHIBA K. Neuroprotective action of genipin on tunicamycin-induced cytotoxicity in neuro2a cells[J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(7): 1220-1223.

[9] TAJIRI S, YANO S, MORIOKA M, et al. CHOP is involved in neuronal apoptosis induced by neurotrophic factor deprivation[J]. FEBS Lett, 2006, 580(14): 3462-3468.

[10] N ISHIZAWA M, IZUHARA R, KANEKO K, et al. 5-Lipoxygenase inhibitors isolated from gardeniae fructus [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1988, 36(1): 87-95.

[11] YAMAZAKI M, SAKURA N, CHIBA K, et al. Prevention of the neurotoxicity of the amyloid beta protein by genipin[J]. Biol Pharm Bull, 2001, 24(12): 1454-1455.

[12] KOO H J, LIM K H, JUNG H J, et al. Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin[J]. J Ethnopharmacol, 2006, 103(3): 496-500.

[13] LUO X, LIN B, GAO Y, et al. Genipin attenuates mitochondrial-dependent apoptosis, endoplasmic reticulum stress, and inflammation via the PI3K/AKT pathway in acute lung injury[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 76: 105842.

[14] ARAKI K, NAGATA K. Protein folding and quality control in the ER[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011, 3(11): a007526.

[15] HETZ C, CHEVET E, HARDING H P. Targeting the


（下转第100页）