

DOI:10.13350/j.cjpb.241002

• 论著 •

# 吡喹酮对脂多糖诱导脓毒症小鼠急性肝损伤的保护作用\*

戴昱婕<sup>1</sup>, 胡婷婷<sup>1</sup>, 孙捷睿<sup>1</sup>, 邱竞帆<sup>1</sup>, 缪婷婷<sup>2\*\*</sup>, 王勇<sup>1\*\*</sup>

(1. 南京医科大学基础医学院病原生物学系, 江苏南京 211166; 2. 南昌大学第二附属医院核医学科)

**【摘要】** 目的 探讨吡喹酮(praziquantel, PZQ)对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导脓毒症小鼠急性肝损伤的保护作用。方法 将56只6-8周龄C57BL/6雄鼠每组14只随机分成4组:正常对照组, PZQ对照组, LPS模型组(LPS组)和PZQ治疗组。以LPS(10 mg/kg)构建小鼠脓毒症模型, PZQ(300 mg/kg)灌胃治疗24 h。每组分别取8只小鼠, 每12 h观察生存情况, 直至PZQ治疗组小鼠全部死亡, 绘制生存曲线; 各组另取6只小鼠检测血清中谷草转氨酶(glutaminoxaloacetic transaminase, AST)和谷丙转氨酶(glutamic pyruvic transaminase, ALT)水平; qRT-PCR检测肝脏TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、NLRP3 mRNA相对表达水平。体外培养RAW264.7巨噬细胞, 以1  $\mu$ g/ml浓度的LPS刺激RAW264.7巨噬细胞4 h后用30  $\mu$ g/ml PZQ处理24 h, qRT-PCR检测各组TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、NLRP3 mRNA相对表达水平; 流式细胞术检测各组Ly-6C<sup>hi</sup>亚群及Ly-6C<sup>lo</sup>亚群巨噬细胞数量变化。结果 各组小鼠生存曲线显示, PZQ治疗组生存率高于LPS造模组。血清AST、ALT检测结果显示, PZQ灌胃治疗组ALT、AST水平均明显低于LPS模型组( $P < 0.05$ )。小鼠肝脏与体外RAW264.7巨噬细胞系中qRT-PCR检测结果显示, PZQ灌胃治疗组均低于LPS模型组( $P < 0.05$ ), PZQ处理组均低于LPS刺激组( $P < 0.05$ )。流式细胞术检测结果显示, PZQ处理组Ly-6C<sup>hi</sup>亚群巨噬细胞的百分率低于LPS刺激组( $P < 0.05$ ); Ly-6C<sup>lo</sup>亚群巨噬细胞的百分率高于LPS刺激组( $P < 0.05$ )。结论 PZQ通过促进Ly-6C<sup>hi</sup>亚群巨噬细胞向Ly-6C<sup>lo</sup>亚群巨噬细胞转化, 减少促炎因子的表达, 缓解脓毒症小鼠肝脏炎症反应, 进而提高脓毒症小鼠生存率。

**【关键词】** 脓毒症; 肝脏损伤; 炎症; 吡喹酮; 巨噬细胞

**【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-5234(2024)10-1123-06

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Oct.; 19(10):1123-1128.]

## Protective effect of praziquantel on acute liver injury induced by lipopolysaccharide in mice with sepsis

DAI Yujie<sup>1</sup>, HU Tingting<sup>1</sup>, SUN Jierui<sup>1</sup>, QIU Jingfan<sup>1</sup>, MIAO Tingting<sup>2</sup>, WANG Yong<sup>1</sup> (1. Department of Pathogen Biology, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China; 2. Department of Nuclear Medicine, The Second Affiliated Hospital of Nanchang University)\*\*\*

**【Abstract】** **Objective** To investigate the protective effects of praziquantel (PZQ) on lipopolysaccharide (LPS)-induced acute liver injury in sepsis mice. **Methods** 56 C57BL/6 male mice aged 6-8 weeks were randomly divided into 4 groups: normal control group, PZQ control group, LPS model group (LPS group) and PZQ treatment group. The mouse sepsis model was established with LPS (10 mg/kg) and treated with PZQ (300 mg/kg) for 24 h. The survival of 8 mice in each group was observed every 12 hours until all mice in the PZQ treatment group died, and the survival curve was drawn. 6 mice in each group were selected to detect the glutamic oxaloacetic transaminase (AST) and glutamic pyruvic transaminase (ALT) levels in serum. The relative expression levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and NLRP3 mRNA in liver were detected by qRT-PCR. RAW264.7 macrophages were cultured in vitro and stimulated with 1  $\mu$ g/ml LPS for 4 h and treated with 30  $\mu$ g/ml PZQ for 24 h. The mRNA relative expression levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and NLRP3 in each group were detected by qRT-PCR. The number of macrophages in Ly-6C<sup>hi</sup> subgroup and Ly-6C<sup>lo</sup> subgroup were detected by flow cytometry. **Results** The survival curve of each group showed that the survival rate of PZQ group was higher than that of LPS group. The results of serum AST and ALT detection showed that the levels of ALT and AST in PZQ group were significantly lower than those in LPS group ( $P < 0.05$ ). The results of qRT-PCR in mouse liver and RAW264.7 macrophage cells in vitro showed that PZQ treatment group was lower than LPS model group ( $P < 0.05$ ), and PZQ treatment group was lower than LPS stimulation group ( $P < 0.05$ ). Flow cytometry showed that the percentage

\* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 82072301)。

\*\* **【通讯作者】** 缪婷婷, E-mail: Tingtingmiao888@163.com; 王勇, E-mail: yongwsh@njmu.edu.cn

**【作者简介】** 戴昱婕(1999-), 女, 江苏无锡人, 硕士研究生, 从事感染与免疫的研究。E-mail: 1216478063@qq.com

of Ly-6C<sup>hi</sup> subgroup macrophages in PZQ treated group was lower than that in LPS stimulated group ( $P < 0.05$ ). The percentage of macrophages in Ly-6C<sup>lo</sup> subgroup was higher than that in LPS stimulated group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** PZQ can promote the transformation of Ly-6C<sup>hi</sup> subgroup macrophages into Ly-6C<sup>lo</sup> subgroup macrophages, reduce the expression of pro-inflammatory factors, relieve liver inflammation in sepsis mice, and improve the survival rate of sepsis mice.

**【Keywords】** sepsis; liver injury; inflammation; praziquantel; macrophage

脓毒症(Sepsis)是由感染引起的可导致多器官损伤的全身炎症反应性综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)<sup>[1]</sup>。肝脏在调节代谢、维持内环境稳定等方面起着关键作用<sup>[3]</sup>。研究表明,脓毒症早期即可诱发肝损伤,由脓毒症引起的急性肝损伤造成的死亡率高达 38.2%~68.0%<sup>[4]</sup>。因此,早期控制急性肝损伤也是降低脓毒症死亡率的重要方面。

肝脏中存在着多种具有高度异质性的巨噬细胞亚群,根据起源可分为常驻型肝脏巨噬细胞即库普弗细胞(kuffer cells, KCs)和单核细胞衍生的巨噬细胞(monocyte-derived macrophages, MoMφs)<sup>[5]</sup>。MoMφs 在肝脏炎症和纤维化中具有双重调控作用,可根据表型和功能分为促炎的 Ly-6C<sup>hi</sup> 和促修复的 Ly-6C<sup>lo</sup> 两个亚群<sup>[6]</sup>。本课题组前期在 CCL<sub>4</sub> 诱导小鼠肝纤维化模型上研究发现,吡喹酮(praziquantel, PZQ)具有促进 Ly-6C<sup>hi</sup> 亚群巨噬细胞向 Ly-6C<sup>lo</sup> 亚群巨噬细胞转化并缓解肝损伤的作用,但对于 Ly-6C<sup>lo</sup> 亚群巨噬细胞在 PZQ 治疗脓毒症所致急性肝损伤中是否具有保护作用鲜有研究。

PZQ 是一种高效,低毒,价廉的抗血吸虫经典药物<sup>[7]</sup>。近来研究显示,PZQ 在治疗寄生虫感染以及在一些化合物诱导的炎症中不仅具有抗肝纤维化的作用,也同时具有抗炎作用<sup>[8]</sup>。本课题组前期研究发现,PZQ 在体内可以抑制血吸虫感染小鼠的肝脏炎症因子表达,在体外也可抑制巨噬细胞炎症因子表达<sup>[9]</sup>。Pinlaor 等<sup>[10]</sup> 在华支睾吸虫感染小鼠模型中发现,PZQ 能显著减少胆管周围炎症细胞的浸润等组织病理学改变,降低 DNA 的硝化和氧化损伤及 iNOS 的表达,提示 PZQ 具有潜在抗炎作用。然而,PZQ 对于脓毒症造成的肝脏损伤是否同样具有抗炎作用鲜有报道。本研究通过检测脓毒症小鼠生存状况、肝功能和肝脏炎症因子水平以明确脓毒症小鼠急性肝损伤程度,并进一步试验研究 PZQ 对脓毒症小鼠肝脏损伤的保护作用,以及 PZQ 处理对巨噬细胞亚群的影响,将有助于深入认识巨噬细胞的高度异质性及其在肝脏炎症发生发展过程中的作用。

## 材料与amp;方法

### 1 材料与仪器

**1.1 实验动物与细胞实验** 动物 C57BL/6 雄性小鼠(6~8 周龄,平均体重 20~25 g),购自南京医科大学医药实验动物中心(动物生产许可证号:SCXK(苏)2016-0002)。RAW264.7 巨噬细胞购自海星生物科技有限公司。

**1.2 主要仪器与试剂** PZQ、LPS 购自美国 Sigma 公司;DMEM、胎牛血清购自美国 Gibco 公司,青霉素、链霉素双抗购自江苏凯基生物技术股份有限公司;Trizol、反转录试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技有限公司;PE/CY7 anti-mouse Ly-6C 购自美国 BioLegend 公司。CO<sub>2</sub> 细胞培养箱购自美国 Thermo 公司;qRT-PCR 仪(Light Cycler96)购自美国 Roche 公司;分析型流式细胞仪(BD FACSVerse)购自美国 BD 公司。

## 2 方法

**2.1 动物分组与脓毒症小鼠模型建立** 将 56 只 C57BL/6 雄性小鼠分为 4 组(每组 14 只),即正常对照组、正常 PZQ 对照组、LPS 模型组和 PZQ 治疗组。脓毒症小鼠模型建立<sup>[11]</sup>:单次腹腔注射 10 mg/kg LPS 建立脓毒症小鼠模型。腹腔注射 LPS 数小时后,感染组小鼠逐渐出现活动减少、竖毛等不适情况,12~24 h 后出现小鼠死亡表示小鼠脓毒症模型造模成功。

**2.2 PZQ 混悬液配制及脓毒症小鼠 PZQ 治疗** 按常规配制吡喹酮混悬液<sup>[8]</sup>,4 °C 保存。10 mg/kg LPS 造模后 1 h,正常 PZQ 对照组和 PZQ 治疗组小鼠给予 300 mg/kg PZQ 混悬液灌胃,每 12 h 一次,共 2 次;正常对照组和 LPS 模型组小鼠给予同量生理盐水灌胃。

**2.3 小鼠血清 AST、ALT 检测** 小鼠麻醉后取眼球血,分离血清后用 Olympus AU5400 全自动生化分析仪检测血清 AST、ALT 水平。

**2.4 RAW264.7 巨噬细胞培养、分组及处理** RAW264.7 巨噬细胞于 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 恒温培养箱中,采用 DMEM 完全培养基(89% 高糖 DMEM + 10% 胎牛血清 + 1% 双抗)培养。

将 RAW264.7 巨噬细胞分为 4 组,即正常对照组、PZQ 对照组(30 μg/ml PZQ 处理)、LPS 刺激组(1 μg/ml 的 LPS 刺激)和 PZQ 处理组(1 μg/ml 的 LPS 刺激 + 30 μg/ml PZQ 处理)。将 1 × 10<sup>5</sup>/孔的 RAW264.7 巨噬细胞接种于 12 孔板并贴壁过夜,用

无血清培养基饥饿 6 h 后用终浓度  $1 \mu\text{g/ml}$  的 LPS 刺激 4 h, 再加入终浓度  $30 \mu\text{g/ml}$  PZQ 处理 24 h 后收集细胞进行后续检测。

**2.5 qRT-PCR 检测** 用 Trizol 法提取各组小鼠部分肝组织及各组 RAW264.7 巨噬细胞总 RNA, 按照逆转录试剂盒说明书将总 RNA 逆转录成 cDNA 后, 使用 SYBR Green PCR 预混液对 cDNA 进行 qRT-PCR 实验, 以 GAPDH 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法分析数据, 所需引物由北京擎科生物技术有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequence

基因 Gene	上游引物序列(5'-3') Forward Primer Sequence	下游引物序列(5'-3') Reverse Primer Sequence
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATGTAGACCATGTAGTTGAGTTTG	GTCA
TNF- $\alpha$	CTGTAGCCCACGTCGTAGC	TTGAGATCCATGCCGTTG
IL-1 $\beta$	GCAACTGTTCTGAACTATCTTTTGGGGTCCGTCACAACT	CT
IL-6	GAGGATACCACTCCAAAAGTGCATCATCGTTGTTCAGACC	ATACA
NLRP3	AGATGATGTTGGACTGGTCACCTCCCGACAGTGGATGCG	A

**2.6 流式细胞术检测** 收集培养的 RAW264.7 巨噬细胞后, 弃上清, 用预冷的 PBS 清洗 2 次, 每孔加入适量胰酶消化 1 min, 加入完全培养基终止消化, 将细胞吹落后收集到离心管中,  $4^\circ\text{C}$  1500 r/min (离心半径 8.67 cm) 离心 5 min, 弃上清; 加适量 Staining buffer (2% FBS+98% PBS) 将细胞悬液密度调整为  $10^7$  个细胞/ml; 每管吸取  $100 \mu\text{L}$  细胞悬液至离心管中, 并加入 Fc 受体阻断剂,  $4^\circ\text{C}$  孵育 15 min; 各管加入  $0.3 \mu\text{l}$  PE/CY7 anti-mouse Ly-6C,  $4^\circ\text{C}$  避光孵育 30 min; 孵育结束后, 各管加 1 mL Staining buffer 涡旋混匀,  $4^\circ\text{C}$  1500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 各管加入  $200 \mu\text{L}$  Staining buffer, 过滤膜, 在 BD Verse 流式仪器上检测 Ly-6C<sup>hi</sup> 和 Ly-6C<sup>lo</sup> 两群巨噬细胞比例, 用 Flowjo 软件分析数据。

### 3 统计分析

实验数据均以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析, 两组之间的比较采用独立样本  $t$  检验, 多组比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA Tukey) 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 1 吡喹酮治疗对脓毒症小鼠生存率的影响

各组生存率结果显示: PZQ 灌胃治疗 24 h 后的第

24、48、60、72 和 96 h, LPS 模型组生存率分别为 87.50%、25.00%、0.00%、0.00% 和 0.00%; PZQ 灌胃治疗组生存率分别为 100.00%、62.50%、37.50%、25.00% 和 0.00%, 正常对照组与正常 PZQ 对照组 24~96 h 小鼠生存率均为 100.00% (图 1)。

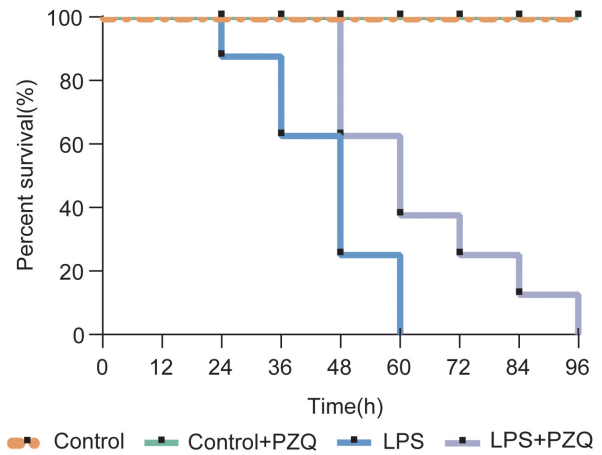


图 1 不同处理组中小鼠生存率比较  
Fig. 1 The comparison of survival rate of mice in different treatment groups

### 2 吡喹酮治疗对脓毒症小鼠肝脏功能的影响

检测各组小鼠血清检测肝损伤指标 AST、ALT 水平结果显示, 正常对照组、正常 PZQ 对照组、LPS 模型组和 PZQ 灌胃治疗组血清中 ALT 含量分别为 ( $33.33 \pm 6.11$ )、( $41.33 \pm 2.31$ )、( $145.33 \pm 26.63$ ) 和 ( $76.00 \pm 4.00$ ) U/L, LPS 模型组高于正常对照组 ( $t = 7.10, P < 0.05$ ), PZQ 灌胃治疗组低于 LPS 模型组 ( $t = 4.46, P < 0.05$ ) (图 2A); 对应各组血清 AST 含量分别为 ( $137.33 \pm 2.31$ )、( $154.67 \pm 12.22$ )、( $272.00 \pm 10.58$ ) 和 ( $144.00 \pm 27.71$ ) U/L, LPS 模型组高于正常对照组 ( $t = 21.53, P < 0.05$ ), PZQ 灌胃治疗组低于 LPS 模型组 ( $t = 7.47, P < 0.05$ ) (图 2B)。

### 3 吡喹酮治疗对脓毒症小鼠肝脏炎症因子表达的影响

qRT-PCR 检测结果显示, 正常对照组、正常 PZQ 对照组、LPS 模型组和 PZQ 灌胃治疗组 TNF- $\alpha$  mRNA 相对表达水平分别为  $1.11 \pm 0.06$ 、 $1.08 \pm 0.05$ 、 $14.70 \pm 2.61$  和  $3.73 \pm 0.88$ , LPS 模型组高于正常对照组 ( $t = 8.72, P < 0.05$ ), PZQ 灌胃治疗组低于 LPS 模型组 ( $t = 8.90, P < 0.05$ ) (图 3A); IL-6 mRNA 相对表达水平分别为  $1.04 \pm 0.30$ 、 $1.01 \pm 0.23$ 、 $2.16 \pm 0.26$  和  $1.25 \pm 0.20$ , LPS 模型组高于正常对照组 ( $t = 5.19, P < 0.05$ ), PZQ 灌胃治疗组低于 LPS 模型组 ( $t = 5.29, P < 0.05$ ) (图 3B); IL-1 $\beta$  mRNA 相对表达水平分别为  $1.01 \pm 0.51$ 、 $1.08 \pm 0.56$ 、 $6.52 \pm 0.67$  和  $2.27 \pm 1.37$ , LPS 模型组高于正

常对照组 ( $t=11.21, P<0.05$ ), PZQ 灌胃治疗组低于 LPS 模型组 ( $t=4.85, P<0.05$ ) (图 3C); NLRP3 mRNA 相对表达水平分别为  $1.14 \pm 0.38, 1.20 \pm 0.15, 5.94 \pm 0.58$  和  $1.92 \pm 0.35$ , LPS 模型组高于正常对照组 ( $t=15.53, P<0.05$ ), PZQ 灌胃治疗组低于 LPS 模型组 ( $t=12.13, P<0.05$ ) (图 3D)。

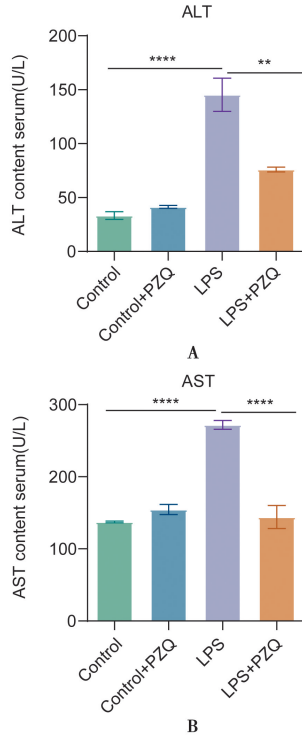


图 2 吡喹酮治疗对脓毒症小鼠血清中 ALT、AST 水平影响  
Fig. 2 The effect of praziquantel treatment on ALT, AST levels in sepsis mice

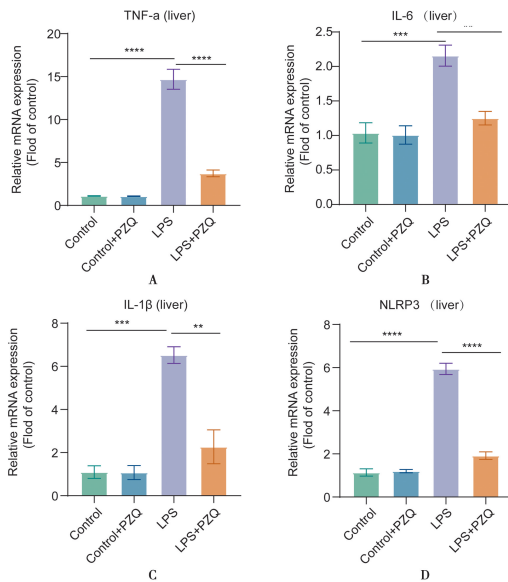


图 3 吡喹酮治疗对脓毒症小鼠肝脏促炎因子 TNF-α(A)、IL-6(B)、IL-1β(C)和 NLRP3(D)水平的影响  
Fig. 3 The effects of praziquantel treatment on levels of liver pro-inflammatory factors TNF-α(A), IL-6(B), IL-1β(C) and NLRP3(D) in sepsis mice

#### 4 吡喹酮处理对 LPS 刺激 RAW264.7 巨噬细胞炎症因子表达的影响

在体外 RAW264.7 巨噬细胞系中,正常对照组、PZQ 对照组、LPS 刺激组和 PZQ 处理组 TNF-α mRNA 相对表达水平分别为  $1.00 \pm 0.10, 0.86 \pm 0.03, 16.42 \pm 1.58$  和  $11.45 \pm 2.30$ , LPS 刺激组高于正常对照组 ( $t=16.86, P<0.05$ ), PZQ 处理组低于 LPS 刺激组 ( $t=3.09, P<0.05$ ) (图 4A); IL-6 mRNA 相对表达水平分别为  $1.03 \pm 0.29, 0.79 \pm 0.34, 578.89 \pm 86.54$  和  $341.58 \pm 73.40$ , LPS 刺激组高于正常对照组 ( $t=11.56, P<0.05$ ), PZQ 处理组低于 LPS 刺激组 ( $t=3.62, P<0.05$ ) (图 4B); IL-1β mRNA 相对表达水平分别为  $1.04 \pm 0.38, 1.24 \pm 0.41, 319.41 \pm 76.61$  和  $219.71 \pm 16.97$ , LPS 刺激组高于正常对照组 ( $t=7.20, P<0.05$ ), PZQ 处理组低于 LPS 刺激组,但差异无统计学意义 ( $t=2.20, P>0.05$ ) (图 4C); NLRP3 mRNA 相对表达水平分别为  $1.02 \pm 0.23, 0.75 \pm 0.18, 2.66 \pm 0.43$  和  $1.09 \pm 0.37$ , LPS 刺激组高于正常对照组 ( $t=5.84, P<0.05$ ), PZQ 处理组低于 LPS 刺激组 ( $t=4.75, P<0.05$ ) (图 4D)。

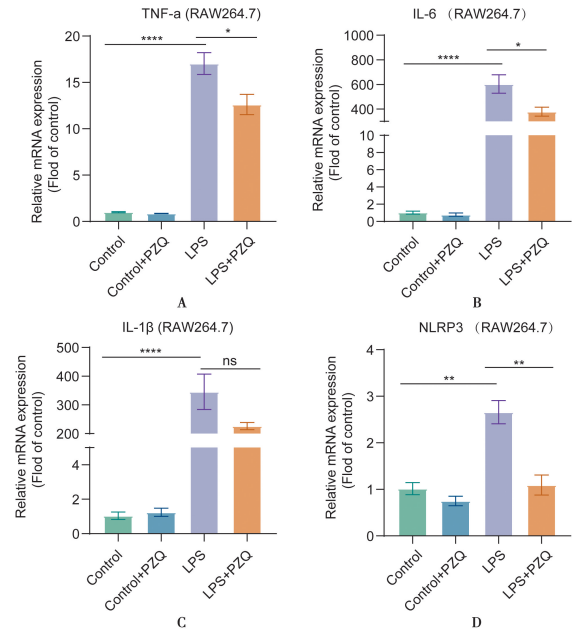


图 4 吡喹酮处理对 LPS 刺激 RAW264.7 巨噬细胞促炎因子 TNF-α(A)、IL-6(B)、IL-1β(C)和 NLRP3(D)水平的影响

Fig. 4 The effects of praziquantel treatment on LPS-stimulated levels of pro-inflammatory factors TNF-α(A), IL-6(B), IL-1β(C) and NLRP3(D) in RAW264.7 macrophages

#### 5 吡喹酮处理对 LPS 刺激 RAW264.7 巨噬细胞 Ly-6C<sup>hi</sup> 亚群巨噬细胞向 Ly-6C<sup>lo</sup> 亚群巨噬细胞转化的影响

流式细胞术检测结果显示,正常对照组、PZQ 对

对照组、LPS 刺激组和 PZQ 处理组中 RAW264.7 巨噬细胞中 Ly-6C<sup>hi</sup> 亚群巨噬细胞的百分率分别为 (4.93 ± 0.85)%、(3.19 ± 0.35)%、(83.47 ± 1.15)%、(28.07 ± 2.11)%，LPS 刺激组 Ly-6C<sup>hi</sup> 亚群巨噬细胞的百分率高于正常对照组 ( $t = 95.04, P < 0.05$ )，PZQ 处理组 Ly-6C<sup>hi</sup> 亚群巨噬细胞的百分率低于 LPS 刺激组 ( $t = 39.85, P < 0.051$ )；Ly-6C<sup>lo</sup> 亚群巨噬细胞的百分率分别为 (77.67 ± 2.22)%、(83.43 ± 1.46)%、(5.39 ± 1.18)% 和 (26.50 ± 2.77)%，LPS 刺激组 Ly-6C<sup>lo</sup> 亚群巨噬细胞的百分率低于正常对照组 ( $t = 49.79, P < 0.05$ )，PZQ 处理组 Ly-6C<sup>lo</sup> 亚群巨噬细胞的百分率高于 LPS 刺激组 ( $t = 12.13, P < 0.05$ ) (图 5)。

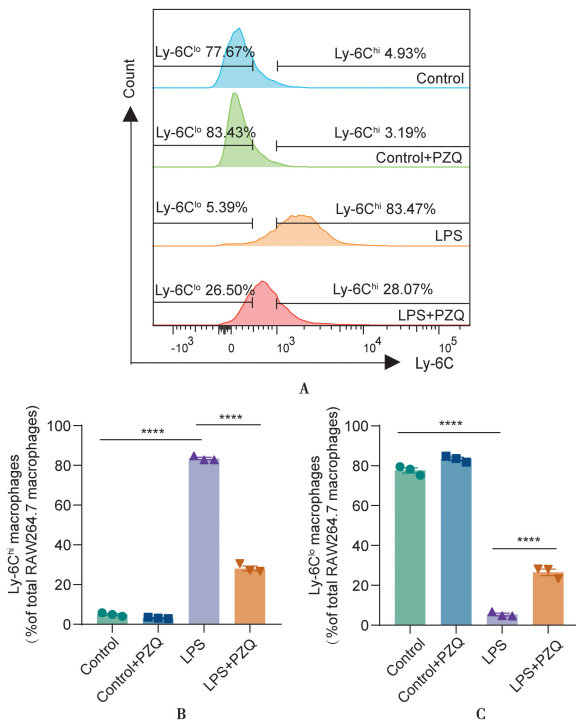


图 5 吡喹酮处理对 LPS 刺激 RAW264.7 巨噬细胞极化的影响  
Fig. 5 The effects of praziquantel treatment on RAW264.7 macrophage polarized status induced by LPS

## 讨论

脓毒症是一种以多器官损伤、氧化应激、炎症细胞因子刺激为特征的难治性疾病候群，早期即可诱发肝损伤<sup>[12]</sup>，其机制与过度炎症反应密切相关<sup>[13]</sup>。腹腔注射 LPS 诱导脓毒症模型虽然不能准确地反映人类脓毒症的复杂性，但能引起机体炎症介质释放并较好模拟脓毒症初期的炎症反应状态<sup>[14-15]</sup>。

为确定 PZQ 对脓毒症小鼠生存率以及急性肝脏炎症的保护作用，本研究前期经相关预实验后，采用腹腔注射 10 mg/kg LPS 造模后给与 PZQ 灌胃治疗 24 h 观察 PZQ 对脓毒症小鼠生存率的影响及对急性肝损伤的保护情况，结果显示 LPS 组小鼠于 24 h 时出

现死亡，于 60 h 时全部死亡，与研究报道的 LPS 构建脓毒症小鼠急性炎症模型死亡率相似<sup>[11]</sup>，表明脓毒症小鼠模型造模成功，而 PZQ 治疗组小鼠则于 48 h 时出现死亡，96 h 时全部死亡，相较于 LPS 组小鼠的生存周期明显延长。检测小鼠血清中 AST、ALT 水平及肝脏促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  和 NLRP3 mRNA 相对表达水平结果显示，相较于正常对照组小鼠，LPS 组小鼠血清 AST、ALT 水平显著增加，肝脏促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  和 NLRP3 mRNA 相对表达水平也明显升高，提示 LPS 能诱导小鼠肝脏组织损伤和炎症反应，而 PZQ 治疗则能明显降低小鼠血清中 AST、ALT 水平以及肝脏组织中炎症因子 mRNA 相对表达水平，表明 PZQ 能有效减轻脓毒症小鼠肝损伤，对肝脏起到明显的保护作用。

巨噬细胞是脓毒症中过度产生细胞因子的主要来源，在脓毒症炎症反应上起着关键作用<sup>[16]</sup>。因此，抑制脓毒症发生发展中巨噬细胞炎症因子的产生与释放也是治疗中的主要考量。本研究 qRT-PCR 结果显示，LPS 刺激后的 RAW264.7 巨噬细胞释放促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  和 NLRP3 mRNA 相对表达水平增加，表明体外巨噬细胞炎症刺激模型构建成功，而 PZQ 处理能够降低 RAW264.7 巨噬细胞中促炎因子的表达水平，提示 PZQ 对促炎状态的 RAW264.7 巨噬细胞有抗炎作用。巨噬细胞具有高度异质性，在疾病过程的不同阶段呈现不同功能的细胞表型，而继往将巨噬细胞简单分为具有促炎作用的 M1 型巨噬细胞和具有抗炎作用的 M2 型巨噬细胞并不能充分反映肝脏中巨噬细胞极化的复杂异质性<sup>[17]</sup>。近年来诸多研究根据表型和功能特征，将巨噬细胞分为促炎促损伤的 Ly-6C<sup>hi</sup> 和促修复的 Ly-6C<sup>lo</sup> 两个巨噬细胞亚群，则能更好反映巨噬细胞表型与功能的特征<sup>[18]</sup>。本研究采用 LPS 刺激 RAW264.7 巨噬细胞后通过流式细胞术检测发现，LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞向 Ly-6C<sup>hi</sup> 亚群巨噬细胞的极化，在 PZQ 处理后发生明显改变，能促进 RAW264.7 巨噬细胞中 Ly-6C<sup>hi</sup> 亚群巨噬细胞向 Ly-6C<sup>lo</sup> 亚群巨噬细胞转化。提示体内试验中 PZQ 治疗的抗炎作用，可能与改变了 Ly-6C<sup>hi</sup> 亚群和 Ly-6C<sup>lo</sup> 亚群巨噬细胞的组成和功能有关。

已知 PZQ 是经典的抗蠕虫药物<sup>[19]</sup>。本课题组前期研究发现，PZQ 可以减少血吸虫感染小鼠脾组织炎症因子的表达，发挥抗炎作用<sup>[20]</sup>，也可明显改善急性血吸虫感染小鼠的肾脏炎症和肾功能<sup>[21]</sup>。有研究表明，PZQ 是 5-羟色胺 2B 受体 (5-HT<sub>2B</sub> receptor) 的配体<sup>[22-23]</sup>，且 PZQ 能抑制 NF- $\kappa$ B 的活化<sup>[10]</sup>，而脓毒症导致急性肝损伤的机制与细菌产物激活 TLR-4 / MyD88 / NF- $\kappa$ B 信号通路产生大量炎症因子密切相

关<sup>[24-26]</sup>。但对于PZQ抗炎及缓解脓毒症小鼠急性肝损伤是否是通过5-HT<sub>2B</sub>受体发挥作用还有待深入研究明确。

综上所述,本研究揭示PZQ通过促进Ly-6C<sup>hi</sup>亚群巨噬细胞向Ly-6C<sup>lo</sup>亚群巨噬细胞转化,减少促炎因子的表达,从而缓解脓毒症小鼠急性肝脏炎症反应并提高小鼠生存率作用,对PZQ临床研究和脓毒症的抗炎治疗提供了试验依据。

#### 【参考文献】

- [1] Protti A, Singer M. Bench-to-bedside review: potential strategies to protect or reverse mitochondrial dysfunction in sepsis-induced organ failure[J]. *Crit Care*, 2006, 10(5): 228.
- [2] Lelubre C, Vincent JL. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(7): 417-427.
- [3] Strnad P, Tacke F, Koch A, et al. Liver-guardian, modifier and target of sepsis[J]. *Nat Rev*, 2017, 14(1): 55-66.
- [4] Kobashi HT, Shimori J, Yamamoto K. Sepsis-associated liver injury: Incidence, classification and the clinical significance[J]. *Hepatol Res*, 2013, 43(3): 255-266.
- [5] Krenkel O, Tacke F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease[J]. *Nat Rev Immun*, 2017, 17(5): 306-321.
- [6] Bl riot C, Dupuis T, Jouvion G, et al. Liver-resident macrophage necroptosis orchestrates type 1 microbicidal inflammation and type-2-mediated tissue repair during bacterial infection [J]. *Immunity*, 2015, 42(1): 145-158.
- [7] Fenwick A, Savioli L, Engels D, et al. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis[J]. *Trends Parasitol*, 2003, 19(11): 509-515.
- [8] Liu J, Kong D, Qiu J, et al. Praziquantel ameliorates CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in mice by inhibiting TGF- $\beta$ /Smad signalling via up-regulating Smad7 in hepatic stellate cells[J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(24): 4666-4680.
- [9] Kong D, Zhou C, Guo H, et al. Praziquantel targets M1 macrophages and ameliorates splenomegaly in chronic schistosomiasis[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62(1): e00005-17.
- [10] Pinlaor S, Hiraku Y, Yongvanit P, et al. iNOS-dependent DNA damage via NF- $\kappa$ B expression in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini* and its suppression by the anthelmintic drug praziquantel[J]. *Int J Cancer*, 2006, 119(5): 1067-1072.
- [11] Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, et al. Assessment of clinical criteria for sepsis: for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3)[J]. *JAMA*, 2016, 315(8): 762-764.
- [12] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3)[J]. *JAMA*, 2016, 315(8): 801-810.
- [13] Beyer D, Hoff J, Sommerfeld O, et al. The liver in sepsis: molecular mechanism of liver failure and their potential for clinical translation[J]. *Mol Med (Cambridge, Mass.)*, 2022, 28(1): 84.
- [14] Assinger A, Schrottmaier WC, Salzmann M, et al. Platelets in sepsis: An update on experimental models and clinical data[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1687.
- [15] Stortz JA, Raymond SL, Mira JC, et al. Murine models of sepsis and trauma: Can we bridge the gap? [J]. *ILAR J*, 2017, 58(1): 90-105.
- [16] Yao RQ, Ren C, Zheng LY, et al. Advances in immune monitoring approaches for sepsis-induced immunosuppression [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 891024.
- [17] Tacke F. Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases [J]. *J Hepatol*, 2017, 66(6): 1300-1312.
- [18] Wen Y, Lambrecht J, Ju C, et al. Hepatic macrophages in liver homeostasis and diseases-diversity, plasticity and therapeutic opportunities[J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(1): 45-56.
- [19] Shao B, Gui X, Lu Z, et al. Praziquantel promotes protection against *Schistosoma japonicum* infection in mice[J]. *Acta Trop*, 2023, 241: 106874.
- [20] 王伟, 赵成思, 缪婷婷, 等. 吡喹酮治疗对日本血吸虫感染小鼠脾巨噬细胞增殖和炎症反应的抑制作用[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2020, 38(3): 263-270.
- [21] 赵成思, 秦敏, 谭明娟, 等. 吡喹酮对日本血吸虫急性感染小鼠肾脏功能损伤的影响[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2021, 39(2): 200-209.
- [22] Chan JD, Cupit PM, Gunaratne GS, et al. The anthelmintic praziquantel is a human serotonergic G-protein-coupled receptor ligand[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1910.
- [23] Yahya NA, Lanham JK, Sprague DJ, et al. Molecular and cellular basis of praziquantel action in the cardiovascular system [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2023, 324(2): C573-C587.
- [24] Shi M, Zeng X, Guo F, et al. Anti-inflammatory pyranochalcone derivative attenuates lps-induced acute kidney injury via inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2017, 22(10): 1683.
- [25] Zhou S, Wang G, Zhang W. Effect of TLR4/MyD88 signaling pathway on sepsis-associated acute respiratory distress syndrome in rats, via regulation of macrophage activation and inflammatory response[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(4): 3376-3384.
- [26] Islam MS, Yu H, Miao L, et al. Hepatoprotective effect of the ethanol extract of *illicium henryi* against acute liver injury in mice induced by lipopolysaccharide [J]. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 2019, 8(10): 446.

【收稿日期】 2024-04-18 【修回日期】 2024-07-08