

# 黑茶提取物对脓毒症模型小鼠的保护作用

龙 伟,牟感恩,张广慧,董 辉,吴红英,周则卫,孙元明\*

中国医学科学院 & 北京协和医学院 放射医学研究所,天津 300192

**摘要:**研究黑茶提取物对脓毒症模型小鼠的保护作用。本实验采用腹腔注射高浓度 40 mg/kg 脂多糖 (LPS) 和盲肠结扎穿孔术 (CLP) 两种不同的方式建立小鼠脓毒症模型,考察黑茶提取物对脓毒症小鼠 7 d 存活率的影响;利用 LPS 诱导巨噬细胞程序性坏死实验研究黑茶提取物对小鼠脓毒症治疗作用的机制。结果显示,黑茶水提物可提高 LPS 和 CLP 诱导的脓毒症小鼠的 7 d 存活率,提高幅度达 40%;黑茶多糖可对 LPS 诱导的巨噬细胞程序性坏死有一定的抑制作用,与 LPS 对照组相比,差异具有显著性 ( $P < 0.05$ )。提示黑茶提取物对脓毒症模型小鼠有一定的治疗作用,其作用的机制可能与黑茶多糖抑制 LPS 诱导的巨噬细胞程序性坏死有关,更深入的作用机制有待进一步研究。

**关键词:**黑茶;脓毒症;巨噬细胞

中图分类号:R979.9

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.4.008

## Dark Tea Extracts Protect Mice from Sepsis

LONG Wei, MU Gan-en, ZHANG Gang-hui, DONG Hui, WU Hong-ying, ZHOU Ze-wei, SUN Yuan-ming\*

*Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China*

**Abstract:** This study aimed to investigate the dark tea extracts on the treatment of sepsis. Sepsis model mice were established by intraperitoneal injection of 40 mg/kg of lipopolysaccharide (LPS) and cecal ligation plus puncture (CLP), which were used to observe the 7 d survival of sepsis mice treated with dark tea extracts. Cell experiments were carried out to study the effect of dark tea extracts on the necroptosis of Macrophages induced by 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS, which was to further study the mechanism of treatment on sepsis. The results showed that dark tea water extract can improve the average survival time and 7 d survival rate of sepsis mice (40% lifted) induced by 40 mg/kg LPS and CLP; dark tea polysaccharide can inhibit the necroptosis of Macrophages induced by LPS (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), the difference was significant ( $P < 0.05$ ) when compared with LPS group. All these experimental results suggested that Dark tea extracts had a certain therapeutic effect on sepsis mice, which may be concerned with inhibition of macrophage necroptosis induced by LPS (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Their mechanism need to be further study.

**Key words:** dark tea; sepsis; macrophage

脓毒症是目前临床上所面临的棘手难题之一,由其诱发的脓毒性休克和多器官衰竭综合征一直是外科重症监护(intensive care units, ICU)病人死亡的主要原因。尽管目前有良好的监护措施及诊疗技术,脓毒症仍是发病率和病死率均较高的疾病,是全世界医学面临的一大难题。对脓毒症最新的定义是宿主对感染的反应失调而致的危及生命的器官功能障碍<sup>[1]</sup>。研究显示,脓毒症的发病机制极其复杂<sup>[2,3]</sup>,涉及到全身炎性网络效应、免疫抑制

反应、凝血功能障碍、基因多态性等等多个方面,同时还与多个器官和多个系统的病理生理改变密切相关。有文献报道,脓毒症几乎影响内皮细胞功能的所有方面,被认为是从败血症到器官衰竭进展的关键因素。受脓毒症影响的内皮功能包括血管扩张,屏障功能,炎症和止血等<sup>[4]</sup>。目前对脓毒症的病理生理机制还不完全清楚,至今还没有药物能有效治疗脓毒症。因此,建立脓毒症动物模型,对脓毒症致病机制研究和抗炎药物的筛选具有重要意义。

黑茶,六大茶类之一,属于后发酵茶,是中国特有的茶类。黑茶根据产地不同可分为:湖南安化黑茶、湖北老青茶、四川边茶、云南普洱茶及广西六堡茶等<sup>[5]</sup>。黑茶是以一定成熟度的鲜叶为原料,经杀

收稿日期:2017-06-22 接受日期:2017-10-13

基金项目:国家自然科学基金(81673106);中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2017-12M-1-012)

\* 通信作者 Tel:86-22-85683042;E-mail:sunyuanming@irm-cams.ac.cn

青、揉捻、渥堆发酵、干燥等四大工序加工而成,由于其独特的加工过程,尤其是微生物的参与使其具有特殊的中医药理活性<sup>[6]</sup>。研究发现微生物在渥堆发酵过程中起到关键作用<sup>[7]</sup>,使黑茶发酵后多种成分发生显著变化<sup>[8]</sup>。茶叶中的主要活性成分有:茶多酚类、茶多糖类、茶色素类和生物碱类等<sup>[9-11]</sup>。黑茶中多酚类物质经微生物代谢后,可能发生了氧化聚合形成十分复杂的多聚体,或降解形成没食子酸等简单酚类化合物最终形成茶色素<sup>[12,13]</sup>,使茶褐素含量增加。黑茶中含有丰富的多糖,属于植物多糖的一种,经发酵后其可溶性多糖的含量增加。研究发现,植物多糖,可通过多方面和多途径调节免疫系统,不仅能激活巨噬细胞、淋巴 T 细胞等免疫细胞,还能促进细胞因子生成,活化补体,对免疫系统发挥多方面的调节作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试药

湖南安化黑茶提取物由本实验室提取(水提取物和多糖提取物);0.9%生理盐水(中国大冢制药有限公司);水合氯醛(天津市富宇精细化工有限公司);12130MCSFC 细胞诱导因子(CYT-439,以色列 Prospec 公司);RPMI 1640 培养基(sh30809.01B,美国 Hclone 公司);胎牛血清(1662775,美国 Gibco 公司);胰蛋白酶(T1320,北京索莱宝科技公司);磷酸缓冲液(11310217,北京索莱宝科技公司)。

### 1.2 动物

ICR 雄性小鼠(SPF 级)由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号[SCXK(京)2012-0001],体重 18~20 g。每笼 5 只饲养于中国医学科学院放射医学研究所动物实验中心 SPF 级动物房(饲养设施合格证号:SVXK 津 2009-0002)。

### 1.3 主要仪器

电子天平(H2F-A500,福州华志科学仪器有限公司);带线缝合针(医用涤纶编织线 YHD-010,上海元洪医疗器械有限公司)。

### 1.4 溶液配制

#### 1.4.1 LPS 溶液配制

称取一定重量的 LPS,用 0.9% 的生理盐水配制成 4 mg/mL 的 LPS 溶液。

#### 1.4.2 黑茶多糖溶液

称取一定重量的黑茶多糖,用细胞培养基充分溶解,于超净台中用 0.22  $\mu\text{m}$  滤器过滤除菌,置于 4

℃冰箱保存。

#### 1.4.3 MTT 溶液

称取 50 mg MTT,用 10 mL PBS 充分溶解,浓度 5 mg/mL,于超净台中 0.22  $\mu\text{m}$  滤器抽滤除菌,分装避光保存于 -20 ℃ 冰箱中备用。

### 1.5 LPS 诱导建立脓毒症模型实验

#### 1.5.1 实验动物及分组

ICR 小鼠 40 只,按体重法随机分为 4 组( $n = 10$ ),具体分组如下:1)空白对照组:蒸馏水(0.2 mL/20 g);2)LPS 对照组:蒸馏水(0.2 mL/20 g) + LPS(40 mg/kg);3)黑茶水提取物给药组:黑茶水提取物(500 mg/kg) + LPS(40 mg/kg);4)黑茶多糖给药组:黑茶多糖(500 mg/kg) + LPS(40 mg/kg)。

#### 1.5.2 LPS 致脓毒症模型建立

本实验采用高浓度的 LPS 方法建立脓毒症模型,用 0.9% 生理盐水将 LPS 配制成 4mg/mL 的浓度,注射体积为 0.2 mL/20 g 体重。除空白对照组外,其余 3 组小鼠全部腹腔注射 4 mg/mL 的 LPS,使其终剂量为 40 mg/kg。2 组给药组小鼠腹腔注射 LPS 前 3 d 开始灌胃给予规定剂量的黑茶水提取物(500 mg/kg)和黑茶多糖(500 mg/kg)。腹腔注射 LPS 后,2 组给药组小鼠继续灌胃给予规定剂量的黑茶水提取物和黑茶多糖。空白对照组和 LPS 对照组同时给予 0.2 mL/20 g 体积的生理盐水。

#### 1.5.3 观察指标

每 8 h 观察并记录一次各组小鼠的存活情况并计算出小鼠腹腔注射 LPS 后的 7 d 存活率、平均存活时间。7 d 存活率(%) = (腹腔注射 LPS 后每组小鼠的存活数/每组小鼠总数)  $\times$  100%

### 1.6 盲肠结扎穿孔术(Cecal ligation -perforation, CLP)致脓毒症模型实验

#### 1.6.1 实验动物及分组

ICR 小鼠 48 只,按体重法随机分为 4 组( $n = 12$ ),具体分组如下:1)假手术对照组:仅打开腹腔取出盲肠,未对盲肠做任何处理 + 蒸馏水;2)手术对照组:盲肠结扎 + 蒸馏水;3)黑茶水提取物组:盲肠结扎 + 黑茶水提取物 500 mg/kg;4)黑茶多糖组:盲肠结扎 + 黑茶多糖 500 mg/kg。

#### 1.6.2 盲肠结扎致脓毒症模型建立

1)将每组中 22~24 g ICR 小鼠腹腔注射 4% 水合氯醛进行麻醉处理,按体重 0.1 mL/10 g,小鼠麻醉后四肢展开固定。2)剪掉腹部切口附近的毛发,用 75% 的酒精消毒腹部,沿腹部正中偏右 1~3 mm

处用眼科剪刀,逐步剪开 1 cm 左右的腹部皮肤和腹腔粘膜,切口右下方寻找盲肠并取出。3) 假手术组将每只小鼠取出的盲肠小心放回腹腔,并将腹腔粘膜和腹部皮肤分别缝合(大概 3 针)。手术对照组、黑茶水提物给药组和黑茶多糖给药组小鼠,将取出的盲肠进行肠粘膜血管分离,避免损伤血管,在盲肠末端到结肠 75% 的位置结扎,在末端到结扎的中间位置用 9 号针头,贯穿扎 2 次,挤出少量肠内容物,并将肠内容物涂抹在肠壁上。再将结扎穿孔后的盲肠小心放回腹腔(注意避免肠内容物在切口处残留),将腹腔粘膜和腹部皮肤分别缝合。手术前 3 d 和手术后 3 d 黑茶水提物给药组(500 mg/kg)和黑茶多糖给药组(500 mg/kg)小鼠,灌胃给予规定剂量的药物,假手术对照组和手术对照组同时给予相应体积的蒸馏水(0.2 mL/20 g)。4) 切口缝合后,在腹部左侧腹腔注射 0.5 mL 生理盐水,补充丢失的体液。整个手术过程 22~25 °C 环境温度进行,术后小鼠自由饮食饮水。

### 1.6.3 观察指标

每 8 h 观察并记录一次各组小鼠的存活情况,并计算出小鼠盲肠结扎手术后各组小鼠 7 d 的存活率、平均存活时间。 $7\text{ d 存活率}(\%) = (\text{盲肠结扎手术后每组小鼠的存活数} / \text{每组小鼠总数}) \times 100\%$ 。

## 1.7 LPS 诱导巨噬细胞程序性坏死实验

### 1.7.1 骨髓细胞诱导巨噬细胞

取 ICR 雄性小鼠 20 只,质量在 23~24 g 间,颈椎脱臼处死,于 75% 的酒精溶液中浸泡(5~10 min)消毒灭菌,在无菌的条件下取小鼠的所有股骨,踢出全部肌肉组织,剪去股骨头,梅花头一端用 2.5 mL 无菌注射器刺穿,用预冷的含 2% 胎牛血清的 PBS 反复冲洗骨髓腔,直至股骨变为白色(至少冲洗 5 遍),3~5 mL/只,混合所有冲洗液,用无菌 200 目过滤网布过滤,4 °C 离心 1500 rpm 5 min,用 0.075 mol/L KCL 低渗溶液破除其中的红细胞,用预冷的含 2% 胎牛血清的 PBS 冲洗两遍,用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液调节细胞浓度至  $2 \times 10^6 / \text{mL}$ 。在细胞悬液中加入诱导因子 M-CSF,使其浓度为 20 ng/mL。将细胞悬液转移至培养皿中,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度细胞培养箱中培养。3 d 换一次液,继续用含诱导因子的培养液培养。

### 1.7.2 瑞氏染色检测巨噬细胞的纯度

细胞培养至第 7 d,取部分细胞消化、离心和重悬,取细胞悬液 1 滴加于洁净载玻片上,制备涂片,

自然干燥,瑞氏染色后将干燥好的涂片置光学显微镜下观察。先用低倍镜观察涂片体尾交界处细胞薄厚分布及染色情况,再用油镜计数细胞,计算巨噬细胞的纯度。

### 1.7.3 LPS 诱导巨噬细胞程序性坏死

#### 1.7.3.1 细胞预处理

将鉴定过的巨噬细胞消化、离心、重悬和计数,按  $8 \times 10^3 / \text{孔}$  接种于 96 孔板(每孔 180  $\mu\text{L}$ )和  $1 \times 10^6 / \text{孔}$  接种于 12 孔板(每孔 500  $\mu\text{L}$ )中,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度细胞培养箱培养 24 h。24 h 后,细胞给药前 30 min 加 10  $\mu\text{L}$  LPS(终浓度为 10  $\mu\text{g} / \text{mL}$ )诱导其程序性坏死,然后给予 10  $\mu\text{L}$  不同浓度的黑茶多糖药物,空白给予等体积培养基,使每组终浓度分别 1、10、100  $\mu\text{g} / \text{mL}$  和 1 mg/mL,96 孔板每组做 5 个平行复孔,12 孔板每组做 3 个平行复孔,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度细胞培养箱继续培养 24 h。

#### 1.7.3.2 MTT 检测

1) 将 96 孔板中每孔培养液吸走 20  $\mu\text{L}$ ,每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTT 溶液(5 mg/mL,即 0.5% MTT),继续培养 4 h。2) MTT 加入培养 4 h 后,结晶可充分形成。用移液器将上清去掉,该过程要注意不能把 Formazan 结晶移走。3) 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的吸光值(OD 值)。

#### 1.7.3.3 流式细胞术检测

1) 将 12 孔板中加 LPS 和黑茶多糖药物培养 24 h 的巨噬细胞消化置于 1.5 mL EP 管中并离心,并用 PBS 缓冲液和 Banding Buffer 稀释液各冲洗一次,然后用 Banding Buffer 稀释液重悬至细胞浓度为  $1 \sim 5 \times 10^6$  个/mL。2) 吸取 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液置于新 EP 管中,加入 5  $\mu\text{L}$  荧光标记的 Annexin-V 至细胞悬液中,室温下孵育 10~15 min。3) 将细胞进行离心处理,并用 Banding Buffer 稀释液洗涤一次,离心后用 200  $\mu\text{L}$  的 Banding Buffer 稀释液重悬,然后加入 5  $\mu\text{L}$  的 PI 染液。4) 20 min 后,用流式细胞仪检测巨噬细胞的程序性坏死率。

### 1.7.4 观察指标

给药 24 h 后,用 MTT 法测定 96 孔板中巨噬细胞的存活情况,运用细胞凋亡试剂盒和流式细胞测定仪测定 12 孔板中巨噬细胞的坏死情况。

## 1.8 数据处理

各组数据平均存活时间以  $\pm s$  表示,采用 SPSS

19.0 统计学软件,统计方法使用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较检验( $\alpha = 0.05$  为检验水准, $P < 0.05$  有统计学差异),各组小鼠 7 d 生存曲线,采用 Graph Pad 5 软件作图。

## 2 实验结果

### 2.1 LPS 诱导脓毒症模型小鼠 7 d 存活率实验结果

LPS 腹腔注射 8 h 后,发现小鼠活动和进食均

逐渐减少、四肢无力、蜷缩发抖、反应迟钝、竖毛、双眼发炎且分泌物增多及粘液便等症状。小鼠的死亡时间主要集中在腹腔注射 LPS 后 24 ~ 48 h, LPS 对照组小鼠在此区间死亡达 8 只, 96 h 后 LPS 对照组小鼠全部死亡,而黑茶水提取组和黑茶多糖组小鼠 7 d 后分别有 4、和 3 只存活。而且与 LPS 对照组相比,两组给药组小鼠的平均存活时间明显延长。由表 1 和图 1 可见,黑茶水提物和黑茶多糖对 LPS 诱导的脓毒症小鼠均有一定的治疗作用。

表 1 黑茶各提取物对 LPS 诱导的脓毒症 7 d 存活率的影响 ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effects of dark tea extract on the survival rate of LPS-induced septic in seven days ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	动物总数 Animals	存活率 Survival rate	平均存活时间 Average survival time (h)
空白对照组 Control	10	100%	168.00 ± 0.00
LPS 对照组 LPS group	10	0	33.60 ± 22.56
黑茶水提物给药组 Dark tea water extract group	10	40%	85.60 ± 71.06
黑茶多糖给药组 Dark tea polysaccharide group	10	30%	67.60 ± 69.66

注:与单纯照射组相比,\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Compare with control, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

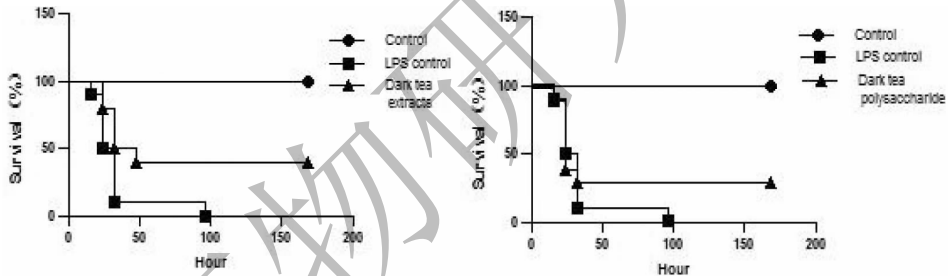


图 1 黑茶各提取物对 LPS 诱导的脓毒症 7 d 存活率的影响

Fig. 1 Effects of dark tea extract on the survival rate of LPS-induced septic in seven days

### 2.2 CLP 诱导脓毒症模型小鼠 7 d 存活率的实验结果

小鼠盲肠结扎 2 h 后逐渐苏醒,随后发现小鼠活动和进食均减少、四肢无力、反应迟钝、竖毛、粘液便等症状。小鼠的死亡时间主要集中在手术后 24 ~ 48 h,手术对照组小鼠在此区间死亡达 7 只,各黑

茶水提物给药组小鼠仅有 4 只死亡,而假手术对照组小鼠 7 d 均未死亡。与手术对照组相比,黑茶水提物给药组小鼠的平均存活时间明显延长且存活率提高达 25%。由表 2 和图 2 可见,黑茶水提物对 CLP 致脓毒症有一定的治疗作用,而黑茶多糖对该模型也具有一定的保护作用,但重复性较不稳定,此文暂未列出。

表 2 黑茶提取物对 CLP 致脓毒症小鼠 7 d 的存活率的影响 ( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effect of dark tea extract on the survival rate of CLP induced sepsis in 7 d ( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	动物总数 Animals	存活率 Survival rate	平均存活时间 Average survival time (h)
假手术对照组 Sham operation group	12	100%	168.00 ± 0.00 *
手术对照组 Operation group	12	33.3%	79.00 ± 66.81
黑茶水提物给药组 Dark Tea water extract group	12	58.3%	112.00 ± 69.85

注:与单纯照射组相比,\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Compare with control, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

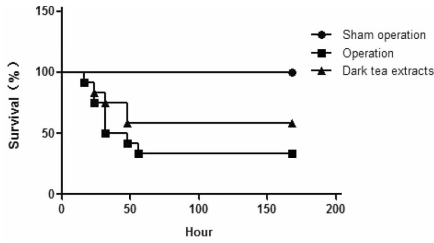


图2 黑茶水提取物对 CLP 致脓毒症小鼠 7 d 的存活率的影响

Fig. 2 Effect of dark tea extract on the survival rate of CLP induced sepsis in 7 d

### 2.3 LPS 诱导巨噬细胞程序性坏死实验结果

为进一步探索黑茶提取物治疗脓毒症的作用机理,我们采用了体外细胞实验方法,从黑茶提取物影响 LPS 诱导巨噬细胞程序性坏死这个角度进行了初步探讨。由于黑茶水提取物的颜色较深,不适合细胞实验给药,因此本文仅对黑茶多糖进行了相关细胞实验。经瑞氏染液鉴定, M-CSF 诱导的骨髓细胞成巨噬细胞,巨噬细胞所占比例达 98% 以上。由图 3 可见,巨噬细胞给予高浓度的 LPS 后发生坏死,而这种坏死可以被细胞程序性坏死抑制剂 Nec-1 逆转,因此可以初步判断, LPS 诱导的巨噬细胞死亡为细胞程序性坏死。实验中,给予不同浓度的黑茶多

糖,观察巨噬细胞的存活情况。MTT 实验结果发现,黑茶多糖可显著抑制 LPS 诱导的巨噬细胞的程序性坏死,并呈现浓度依赖性。为验证这一结果,我们又利用流式细胞术进一步证明黑茶多糖对 LPS 诱导的细胞程序性坏死有保护作用,也呈现一定的浓度依赖性(图 4)。综上,我们初步判断,黑茶多糖对 LPS 诱导巨噬细胞程序性坏死具有抑制作用,这很可能是黑茶提取物治疗脓毒症的重要机制之一。

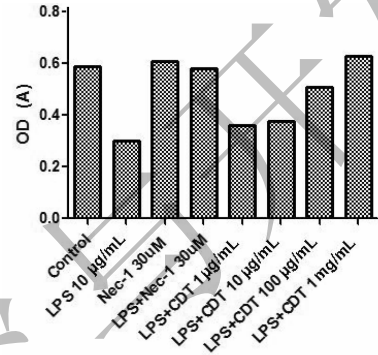


图3 黑茶多糖对 LPS 诱导巨噬细胞程序性坏死的影响 (CDT 代表黑茶多糖)

Fig. 3 Effect of dark tea polysaccharide on LPS-induced macrophage programmed necrosis (CDT stands for dark tea polysaccharide)

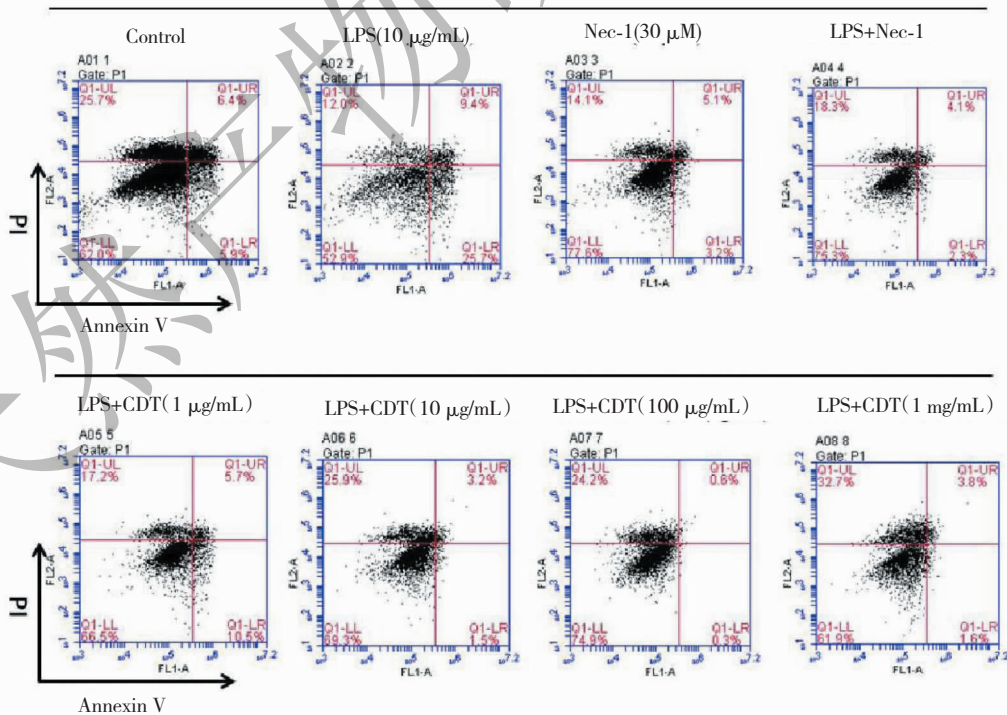


图4 黑茶多糖对 LPS 诱导巨噬细胞程序性坏死的影响

Fig. 4 Effect of dark tea polysaccharide on LPS-induced macrophage programmed necrosis

### 3 讨论与结论

注射 LPS 诱导致脓毒症模型,是早期研究脓毒症应用较多的造模方式,腹腔注射高浓度的 LPS 后,可诱发小鼠机体发生急性全身性炎症反应,是一种外源性的物质诱导的。CLP 模型是研究脓毒症应用最广泛的造模方式,其病理生理演变过程更接近于人类脓毒症患者,是一种内源性物质引起的,原理是腹腔内感染引起腹膜炎,多种病原体感染导致全身性炎症反应、脓毒症、脓毒症休克甚至死亡。

本实验中,外源性和内源性两种不同的方式建立脓毒症模型,探讨黑茶提取物对脓毒症的治疗作用。通过腹腔注射不同剂量的 LPS,最终选取死亡率在 80%~100% 的 40 mg/kg 的 LPS 剂量,可诱导稳定的脓毒症模型;利用盲肠结扎穿孔术建立脓毒症模型,控制腹部手术开口在 1 cm 以下,盲肠的结扎位置在盲肠末端距结肠 75% 处,在结扎处与末端的中间位置用 9 号针头避开肠壁毛细血管扎两个贯穿孔,并挤出适量的肠内容物并均匀涂抹在盲肠外壁上,将盲肠小心放回腹腔中并将腹部缝合,可建立稳定的脓毒症模型。因此,通过两种不同的方式建立脓毒症模型,并利用这两种模型探究黑茶提取物对脓毒症的治疗作用。

本研究中,将黑茶的各提取物:黑茶水提物和黑茶多糖对 40 mg/kg LPS 和 CLP 建立的小鼠脓毒症进行治疗。实验结果表明,黑茶水提物(500 mg/kg)和黑茶多糖(500 mg/kg)对 40 mg/kg LPS 诱导的脓毒症小鼠均有不同程度的治疗作用,与黑茶多糖相比,黑茶水提物作用效果略好,其原因可能是水提物中含有除多糖外的其它成分发挥了治疗作用,具体是何种成分有待进一步研究。另外,黑茶水提物(500 mg/kg)对 CLP 建立的小鼠脓毒症也有一定治疗作用。LPS 和 CLP 建立的脓毒症的病理机制不同,因此,本研究通过这两种不同的模型探究黑茶提取物对脓毒症的治疗作用,其作用的机制可能与黑茶提取物调节肠道菌群、肠道免疫力和抑菌作用<sup>[14-16]</sup>有关。

巨噬细胞属于机体的非特异性免疫,与单核细胞同属于吞噬细胞,是重要的炎性细胞,具有多种功能:吞噬和清除凋亡坏死细胞及其它异物,也可分泌各种细胞因子参与炎症反应。对维持机体内环境稳态,增强机体免疫力,及疾病的预防、治疗方面具有重要作用。LPS 是巨噬细胞潜在的激活剂,LPS 持

续刺激机体单核巨噬细胞系统,产生大量活性氧、溶酶体、NO 等活性物质。过量的细胞因子、活性氧、溶酶体酶、NO 等,可引起细胞的损伤和坏死,最终导致失控性炎症反应<sup>[17]</sup>。本实验中,利用 M-CSF 细胞因子诱导骨髓细胞成巨噬细胞,然后用 10 μg/mL 的 LPS 诱导巨噬细胞发生细胞程序性坏死,给予黑茶多糖后,通过 MTT 实验和流式细胞仪检测巨噬细胞的程序性坏死率实验,发现与 LPS 空白对照组相比,给药组细胞坏死率降低。提示黑茶多糖对 LPS 诱导的巨噬细胞程序性坏死有一定的抑制作用,即黑茶多糖对活化的巨噬细胞有一定的保护作用。黑茶多糖通过对巨噬细胞的保护作用,增强炎症小鼠的免疫防御能力,初步认为这可能是黑茶提取物对脓毒症发挥治疗作用的机制之一,更广泛和深入的机制研究有待进一步开展。

#### 参考文献

- 1 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, 315:762-774.
- 2 Koichi YK, Naoka MK. Sepsis pathophysiology and anesthetic consideration [J]. *Cardiovasc Hem Dis Drug Tar*, 2015, 15 (1):57-69.
- 3 Shi LL (师灵灵), Han YQ (韩艳秋), Ren HJ (任慧娟), *et al.* Research advance of pathology and physiology of sepsis [J]. *Chin J Nosocomiol Voi* (中华医院感染学杂志), 2016, 26:1914-1916.
- 4 Ince C, Mayeux PR, Nguyen T, *et al.* The endothelium sepsis [J]. *Shock*, 2016, 45:259-270.
- 5 Yuan HF (袁华芳). Study on chemical constituents and antioxidant activity of dark tea [D]. Dalian: Liaoning Normal University, 2008.
- 6 Yang FL (杨抚林), Deng FM (邓放明), Zhao LY (赵玲艳), *et al.* Development of black tea microbiology [J]. *J Microbiol* (微生物学杂志), 2006, 26(1):81-84.
- 7 Luo ZM, Ling TJ, Li LX, *et al.* A new norisoprenoid and other compounds from Fuzhuan brick tea [J]. *Moles*, 2012, 17:3539-3546.
- 8 Zheng WJ, Wan XC, Bao GH. Brick dark tea: a review of the manufacture, chemical constituents and bioconversion of the major chemical components during fermentation [J]. *Phytochem Rev*, 2015, 14:499-523.