

基于SIRT1/Akt/GSK3 β / β -catenin信号通路研究右美托咪定对脓毒症模型大鼠脑损伤的保护机制^A

董晓柳^{1*}, 宋丽华¹, 董伟², 高铭¹, 张秀清¹, 刘蔚然¹, 徐士军¹, 刘铁军³, 崔璐莎⁴(1.唐山市人民医院神经康复科, 河北唐山 063000; 2.唐山市人民医院神经外科, 河北唐山 063000; 3.华北理工大学附属医院麻醉科, 河北唐山 063000; 4.开滦精神卫生中心五病区, 河北唐山 063000)

中图分类号 R971[·]2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)21-2621-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.21.11

摘要 目的:通过右美托咪定(Dex)对脓毒症模型大鼠脑损伤中沉默信息调节因子1(SIRT1)/蛋白激酶B(Akt)/糖原合酶激酶3 β (GSK3 β)/ β -连环蛋白(β -catenin)信号通路的影响,探究其对脑损伤的保护作用机制。方法:选取雄性SD大鼠80只,随机分为假手术组(Sham组)、脓毒症组(CLP组)、CLP+Dex组(10 μ g/kg Dex)、CLP+Dex+Sirtinol组(10 μ g/kg Dex+2 μ L/100 g SIRT1抑制剂Sirtinol),每组20只。造模前2 h,CLP+Dex+Sirtinol组大鼠经侧脑室注射给予Sirtinol;各组大鼠采用盲肠结扎穿孔法制备脓毒症模型(Sham组仅手术但不结扎穿孔)。造模结束后0、3、6 h,CLP+Dex组、CLP+Dex+Sirtinol组大鼠分别腹腔注射Dex(10 μ g/kg),Sham组和CLP组大鼠腹腔注射等体积生理盐水。末次给药24 h后,检测大鼠脑组织含水量、伊文思蓝(EB)含量、大脑皮层组织细胞凋亡情况和脑组织中白细胞介素1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)表达水平,以及海马组织中SIRT1、p-Akt、p-GSK3 β 、 β -catenin蛋白表达水平。结果:与Sham组比较,CLP组大鼠脑组织含水量、EB含量、大脑皮层组织凋亡细胞数及脑组织中IL-1 β 、TNF- α 表达水平显著增加或升高($P<0.05$);海马组织SIRT1、p-Akt、p-GSK3 β 、 β -catenin蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。与CLP组比较,CLP+Dex组大鼠脑组织含水量、EB含量、大脑皮层组织凋亡细胞数及脑组织中IL-1 β 、TNF- α 表达水平显著减少或降低($P<0.05$);海马组织中SIRT1、p-Akt、p-GSK3 β 、 β -catenin蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$)。而Sirtinol可显著逆转Dex的上述脑保护和因子调节作用($P<0.05$)。结论:Dex对脓毒症模型大鼠具有脑保护作用,该作用可能是通过激活SIRT1/Akt/GSK3 β / β -catenin信号通路而发挥抗炎、抗凋亡等作用,从而减轻脑水肿、保护血脑屏障并减轻脑损伤。

关键词 右美托咪定;脓毒症;脑损伤;脑保护作用;SIRT1/Akt/GSK3 β / β -catenin信号通路;炎症反应;机制;大鼠

Study on Protective Mechanism of Dexmedetomidine on Cerebral Injury in Sepsis Model Rats Based on SIRT1/Akt/GSK3 β / β -catenin Signaling Pathway

DONG Xiaoli¹, SONG Lihua¹, DONG Wei², GAO Ming¹, ZHANG Xiuqing¹, LIU Weiran¹, XU Shijun¹, LIU Tiejun³, CUI Lusha⁴ (1. Dept. of Neurological Rehabilitation, Tangshan People's Hospital, Hebei Tangshan 063000, China; 2. Dept. of Neurosurgery, Tangshan People's Hospital, Hebei Tangshan 063000, China; 3. Dept. of Anesthesiology, the Affiliated Hospital of North China University of Technology, Hebei Tangshan 063000, China; 4. Five Wards, Kailuan Mental Health Center, Hebei Tangshan 063000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effects of dexmedetomidine (Dex) on SIRT1/Akt/GSK3 β / β -catenin signaling pathway in cerebral injury of sepsis model rats, and explore the mechanism of its protective effect on cerebral injury. METHODS: A total of 80 male SD rats were randomly divided into sham operation group (Sham group), sepsis group (CLP group), CLP+Dex group (10 μ g/kg Dex), CLP+Dex+Sirtinol group (10 μ g/kg Dex+2 μ L/100 g SIRT1 inhibitor sirtinol), with 20 mice in each group. Two hours before modeling, CLP+Dex+Sirtinol group was injected with sirtinol via lateral ventricle. Sepsis model was induced by cecal ligation and perforation in each group (in sham group, only operation was performed but no ligation was performed). At 0, 3, 6 h after modeling, CLP+Dex group and CLP+Dex+Sirtinol group were given Dex (10 μ g/kg) intraperitoneally, Sham group and CLP group were given constant volume of normal saline intraperitoneally. Cerebral tissue water content, Evans blue (EB) content, apoptosis in cerebral cortex, the levels of IL-1 β and TNF- α in cerebral tissue as well as the

[16] 郭涤亮,徐萍蔚,王亚敏.皮肤局部外用仿制药质量等同性评价的一般考虑[J].中国新药杂志,2018,27(18):

^A 基金项目:河北省医学科学研究课题计划(No.20191109)

* 副主任医师,博士研究生。研究方向:脑血管疾病及神经免疫。电话:0315-2864734。E-mail:12128012@qq.com

2116-2120.

[17] 张景景,王旭,崔占虎,等.瓜子金的化学成分及药理作用研究进展[J].中国现代中药,2015,17(11):1216-1222.

(收稿日期:2020-03-15 修回日期:2020-09-14)

(编辑:林静)

protein expression of SIRT1, p-Akt, p-GSK3 β and β -catenin in hippocampus were detected 24 h after last medication. RESULTS: Compared with Sham group, cerebral tissue water content, EB content, the number of apoptotic cells in cerebral cortex as well as the levels of IL-1 β and TNF- α in cerebral tissue were increased significantly ($P < 0.05$), while the protein expression of SIRT1, p-Akt, p-GSK3 β and β -catenin in hippocampus were decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with CLP group, cerebral tissue water content, EB content, the number of apoptotic cells in cerebral cortex as well as the levels of IL-1 β and TNF- α in cerebral tissue were decreased significantly in CLP+Dex group ($P < 0.05$), while the protein expression of SIRT1, p-Akt, p-GSK3 β and β -catenin in hippocampus were increased significantly ($P < 0.05$). Sirtinol could significantly reverse the above-mentioned cerebral protection and factor regulation effects of Dex ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Dex can protect the cerebral tissue of sepsis model rats, which may play an anti-inflammatory and anti-apoptotic role by activating SIRT1/Akt/GSK3 β / β -catenin signaling pathway, so as to reduce cerebral edema, protect blood-brain barrier and reduce cerebral injury.

KEYWORDS Dexmedetomidine; Sepsis; Cerebral injury; Brain protection effect; SIRT1/Akt/GSK3 β / β -catenin signaling pathway; Inflammation reaction; Mechanism; Rats

脓毒症是各种感染、重度烧创伤、休克及外科大手术后临床重症患者的严重并发症之一,是感染诱发的全身炎症反应综合征^[1]。脓毒症伴脑功能障碍是脓毒症患者死亡率上升的重要原因^[2]。右美托咪定(Dexmedetomidine, Dex)是一种新型高选择性 α_2 受体激动剂,其可通过血脑屏障,具有镇静、镇痛等作用且不引起呼吸抑制,已被广泛应用于术前镇静用药、术中全身麻醉辅助用药、术后镇痛等领域^[3]。研究表明,Dex对脓毒症模型大鼠有保护作用,但其发挥保护作用的具体机制目前尚不完全清楚^[4]。沉默信息调节因子1(Silent information regulator 1, SIRT1)是一种具有组蛋白脱乙酰化酶活性的转录调节因子,已有研究报道,SIRT1的激活在脑缺血再灌注损伤^[5]、蛛网膜下腔出血^[6]、脓毒症脑病^[7]等多种脑部疾病中发挥了明确的脑保护作用。SIRT1过表达可以增加蛋白激酶B(Akt)的活性^[8],而Akt是维持细胞存活的关键激酶。且有研究表明,糖原合酶激酶3(GSK3 β)/ β 连环蛋白(β -catenin)通路受Akt的调控^[9]。然而,Dex对脓毒症脑保护作用是否通过SIRT1/Akt/GSK3 β / β -catenin通路发挥作用目前尚不明确。Sirtinol是一种高效的去乙酰化酶(Sirtuin)抑制剂,Grozinger CM等^[10]发现在体外细胞中Sirtinol能够抑制SIRT1的表达。因此,本研究旨在通过考察Dex及Sirtinol的干预对脓毒症模型大鼠脑损伤中SIRT1/Akt/GSK3 β / β -catenin信号通路的影响,来探讨Dex对脓毒症模型大鼠脑保护的作用机制,为临床用药提供参考。

1 材料

1.1 仪器

68526型立体定位仪(深圳瑞沃德生命科技有限公司);KDS100型注射泵(美国KD Scientific公司);701RN型微量注射器(瑞士Hamilton公司);4-15C型常温离心机(美国Sigma公司);CM1900型冰冻切片仪(德国Leica公司);RL157252型免疫荧光显微镜(河北润创科技开发有限公司);Tissuelyser-192型组织匀浆仪(上海净信实业发展有限公司);H·SWX-600BS型恒温水浴箱(济宁市翰业机械设备有限公司);125-0143型酶标仪、12003153型凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2 药物与试剂

注射用Dex(扬子江药业集团有限公司,批号:20041631,规格:2 mL:0.2 mg);SIRT1抑制剂Sirtinol(美国Selleck公司,批号:S280401,纯度: $>97\%$);戊巴比妥钠(国药集团化学试剂有限公司,批号:20090505);磷酸盐缓冲液(PBS,碧云天生物技术有限公司,批号:CO221A);伊文思蓝(EB,批号:C195555)、原位末端标记(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒(批号:T2190-50T)、丙烯酰胺(批号:A8080-Amresco)、过硫酸铵(批号:A8090)、二甲基甲酰胺(批号:D4670)、Triton-X100(批号:T8200)、BCA试剂盒(批号:PC0020)、二甲亚砜(DMSO,批号:D8370)均购自北京索莱宝科技有限公司;鼠白细胞介素1 β (IL-1 β)酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(批号:ab197742)、鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α)ELISA检测试剂盒(批号:ab208348)均购自美国Abcam公司;PVDF膜(北京沃比森科技有限公司);兔p-Akt多克隆抗体(批号:4060)、兔p-GSK3 β 多克隆抗体(批号:9323)、兔 β -catenin多克隆抗体(批号:9582)均购自美国Cell Signaling Technology公司;兔SIRT1多克隆抗体(批号:ab189494)、兔神经元核抗原(NeuN)多克隆抗体(批号:ab177487)、内参 β -actin(批号:ab8226)均购自美国Abcam公司;绿色荧光二抗(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号:A32731);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(北京中杉金桥生物技术公司,批号:ZB-2301)。

1.3 动物

健康雄性SD大鼠80只,体质量250~300 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司[动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0008]。动物由华北理工大学中心实验室进行专人饲养,饲养条件为安静、通风、清洁、昼夜室温22~25 $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度40%~55%、自然光线12 h/12 h昼夜交替照明。大鼠实验前分笼饲养1周,以适应环境。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将80只大鼠随机分为假手术组(Sham组)、脓毒症组(CLP组)、CLP+Dex组(10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Dex)、CLP+Dex+

Sirtinol组(10 μg/kg Dex+2 μL/100 g Sirtinol), 每组 20 只。采用盲肠结扎穿孔(CLP)法构建脓毒症大鼠模型^[11]:大鼠术前一晚禁食,次日用 2% 戊巴比妥钠(0.1 mL/100 g)腹腔注射麻醉,取仰卧位固定,腹部消毒后,于其腹正中切开约 1.5 cm 切口,找出盲肠,结扎回盲瓣远端盲肠,用无菌注射器针头在结扎处与盲肠末端中点处做 2 次贯通穿孔,挤出肠内容物后,将盲肠连同挤出的肠内容物一同回纳腹腔,缝合切口。Sham 组大鼠进行同样实验操作,但不结扎穿孔盲肠。

CLP+Dex+Sirtinol 组大鼠于造模前 2 h 经侧脑室注射抑制剂 Sirtinol,具体操作方法^[12]如下:采用 2% 戊巴比妥钠(0.1 mL/100 g)腹腔注射将大鼠麻醉,将其固定在脑立体定位仪上,以 75% 乙醇消毒后暴露颅骨和前囟的位置,将前囟作为中心点,向右侧旁开 1.0 mm,向后面开 1.6 mm,用小颅钻磨 1 个骨孔,在骨孔处将微量注射器垂直进入深度约 3.6 mm 处,以 0.5 μL/min 的速度注射 Sirtinol(剂量为 2 μL/100 g;以 0.5% DMSO 溶液配成浓度为 2 mmol/L 的溶液,于 4 °C 保存,使用前加热至 37 °C 使其成透明水样物)^[13]。注射完毕,将注射器停留约 5 min,随后注射器每向上拔出 1 mm 停留 5 min,完全拔出后用骨蜡将骨孔封闭。处理大鼠手术伤口,麻醉未醒前给予电热毯保暖。

造模结束 0、3、6 h 后,CLP+Dex 组、CLP+Dex+Sirtinol 组大鼠分别腹腔注射 Dex(剂量为 10 μg/kg)^[13],Sham 组、CLP 组大鼠同法注射等体积的生理盐水。

2.2 指标检测

2.2.1 大鼠脑组织含水量 采用经典干湿质量法进行检测。末次给药 24 h 后,各组分别取 4 只大鼠,采用颈椎脱臼法处死,立即断头取新鲜脑组织,自中线将大脑切割成左半球和右半球组织,并分离出小脑组织。称量上述 3 个部分脑组织的湿质量并记录;然后用锡纸包裹好上述脑组织,迅速置于 100 °C 的烘箱中烘烤 24 h 后再称量,直至恒质量,此时称得的质量即为干质量。按公式计算脑组织含水量:脑组织含水量=(湿质量-干质量)/湿质量×100%。脑组织含水量越高,则表示大鼠脑水肿越严重。

2.2.2 血脑屏障渗漏程度 采用 EB 示踪剂进行检测。末次给药 24 h 后,各组分别取 4 只大鼠,于尾静脉注射 2% EB 溶液(2 mL/kg)为示踪剂。注射后,可见大鼠如巩膜、耳廓、前后爪垫等部位迅速变为蓝色,提示注射成功。2 h 后,将大鼠麻醉并处死,使用预冷的 PBS 进行心脏灌注[具体方法:用 10% 水合氯醛(0.3 mL/100 g)深度麻醉大鼠后,开胸、暴露心脏及主动脉,将钝针经心尖处插入左心室直至主动脉起始部,并在右心耳剪一小口,将 PBS 从输液管滴入大鼠体循环,先快后慢,持续 5~10 min(滴注体积为 200 mL)],确保将大鼠脑内血液尽量排出。灌注成功(当大鼠右心耳流出的液体基本无

色,肝变白、变硬,尾巴变直,四肢抽搐,表明灌注成功)后,将大鼠断头取脑,去掉嗅球及小脑,称量大脑半球湿质量,放入 10 mL 组织研磨管中,同时往其中加入 5 mL 二甲基甲酰胺,应用组织匀浆仪将脑组织匀浆,然后转移至 15 mL 试管中,并将试管于 60 °C 恒温水浴中孵育 72 h。孵育结束后,以 1 000 r/min 离心 5 min,弃去沉淀,取上清液,采用分光光度计于 570 nm 波长处测定各样本及标准品光密度(OD)值,根据标准品浓度(80、40、20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 5、0.156 25 μg/mL),利用 Excel 表计算出标准曲线($y=ax+b$),再根据各样本测得的 OD 值,代入上述标准曲线公式,计算出样本 EB 浓度;再根据公式计算大鼠脑组织中 EB 含量:EB 含量(μg/g)=EB 浓度(μg/mL)×二甲基甲酰胺体积(mL)/脑湿质量(g)。大鼠脑组织中 EB 含量越高,表示血脑屏障渗漏程度越严重。

2.2.3 大鼠大脑皮层组织细胞凋亡情况 采用 TUNEL/NeuN 免疫荧光双标染色法进行检测。末次给药 24 h 后,各组分别取 4 只大鼠,按“2.2.2”项下方法处死后进行心脏灌注,灌注成功后,大鼠断头取脑,冰冻后切片(厚度:8 μm),再采用 0.3% Triton-X100 打孔破膜,室温封闭,用 PBS 清洗 5 min×3 次,滴加 NeuN 一抗(稀释度为 1:500),4 °C 孵育过夜;将预先混合好的 TUNEL 反应液中加入绿光荧光二抗,滴加在玻片上(40 μL/片),于 37 °C 下湿盒内避光孵育 2 h;用 PBS 清洗 5 min×3 次,封片,在荧光显微镜下观察。在大脑皮层区域随机选取 6 个视野拍照,使用 Image Pro Plus 6.0 软件对每张图片的荧光强度和脑细胞数量进行半定量分析。以 TUNEL 染色阳性(镜下显红色荧光,表示凋亡细胞核)和 NeuN 染色阳性(镜下显绿色荧光,表示神经元细胞质)反映细胞凋亡情况(两者重叠处即为凋亡细胞),计算每个视野的凋亡细胞数量,取平均值(以每 mm² 凋亡细胞数表示)。

2.2.4 大鼠脑组织中 IL-1β、TNF-α 水平 采用 ELISA 法进行检测。末次给药 24 h 后,各组分别取 4 只大鼠,按“2.2.2”项下方法处死后进行心脏灌注,灌注成功后,大鼠断头取脑,制成匀浆。按照相应试剂盒说明书操作,采用酶标仪于 450 nm 波长处检测 IL-1β、TNF-α 水平。

2.2.5 大鼠海马组织中 SIRT1、p-Akt、p-GSK3β、β-catenin 蛋白表达水平 采用 Western blotting 法进行检测。末次给药 24 h 后,各组分别取 4 只大鼠,按“2.2.2”项下方法处死后进行心脏灌注,灌注成功后,大鼠断头取脑。分离海马组织,称定质量,加入现配的含蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液,于冰上研磨,充分裂解 30 min。将组织匀浆转移至 1.5 mL 离心管中,以 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液以 BCA 法检测蛋白质浓度。取适量蛋白煮沸变性后,以十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转膜,再以 5% 牛血清白蛋白室温封闭 1 h,加入 SIRT1、p-Akt、p-GSK3β、β-catenin 一抗、β-actin 内参(稀释度均为 1:1 000),于 4 °C 孵育过夜;再用 TBST 溶液清

洗,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(稀释度为1:2 000),于室温下孵育1 h;再用TBST溶液清洗,经ECL化学发光液法,在凝胶成像仪中曝光显影后采用Quantity One 4.4.0软件分析目标蛋白的灰度值,以 β -actin内参蛋白光密度值为参照计算相对灰度值,表示其表达水平。

2.3 统计学方法

采用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠脑组织含水量和EB含量比较

与Sham组比较,CLP组、CLP+Dex组、CLP+Dex+Sirtinol组大鼠脑组织含水量和EB含量均显著升高($P < 0.05$);与CLP组比较,CLP+Dex组大鼠脑组织含水量和EB含量均显著降低($P < 0.05$);与CLP+Dex组比较,CLP+Dex+Sirtinol组大鼠脑组织含水量和EB含量均显著升高($P < 0.05$)。各组大鼠脑组织中含水量和EB含量检测结果见表1。

3.2 各组大鼠大脑皮层组织细胞凋亡情况比较

与Sham组比较,CLP组、CLP+Dex组、CLP+Dex+Sirtinol组大鼠大脑皮层组织凋亡细胞数显著增加($P < 0.05$);与CLP组比较,CLP+Dex组大鼠大脑皮层组织凋亡细胞数显著减少($P < 0.05$);与CLP+Dex组比较,CLP+Dex+Sirtinol组大鼠大脑皮层组织凋亡细胞数显著增加($P < 0.05$)。各组大鼠大脑皮层组织凋亡细胞免疫荧光显微图见图1(图中“合并”表示凋亡细胞核与神经元细胞质的叠加图),凋亡细胞数检测结果见表2。

表1 各组大鼠脑组织中含水量和EB含量检测结果($\bar{x} \pm s, n=4$)

Tab 1 Water content and EB content in cerebral tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	脑组织含水量, %	脑组织EB含量, $\mu\text{g/g}$
Sham组	73.23 \pm 0.43	1.38 \pm 0.28
CLP组	78.12 \pm 0.76 [*]	3.24 \pm 0.36 [*]
CLP+Dex组	74.89 \pm 0.57 ^{**}	1.62 \pm 0.17 ^{**}
CLP+Dex+Sirtinol组	77.91 \pm 0.52 ^{*^Δ}	3.17 \pm 0.46 ^{*^Δ}
F	66.948	34.942
P	<0.05	<0.05

注:与Sham组比较,* $P < 0.05$;与CLP组比较,^{*} $P < 0.05$;与CLP+Dex组比较,^Δ $P < 0.05$

Note: vs. Sham group, * $P < 0.05$; vs. CLP group, ^{*} $P < 0.05$; vs. CLP+Dex group, ^Δ $P < 0.05$

3.3 各组大鼠脑组织中IL-1 β 、TNF- α 水平比较

与Sham组比较,CLP组、CLP+Dex组、CLP+Dex+Sirtinol组大鼠脑组织中IL-1 β 、TNF- α 水平均显著升高($P < 0.05$);与CLP组比较,CLP+Dex组大鼠脑组织中IL-1 β 、TNF- α 水平均显著降低($P < 0.05$);与CLP+Dex组比较,CLP+Dex+Sirtinol组大鼠脑组织中IL-1 β 、TNF- α 水平均显著升高($P < 0.05$)。各组大鼠脑组织中IL-1 β 、TNF- α 水平检测结果见表3。

3.4 各组大鼠海马组织中SIRT1、p-Akt、p-GSK3 β 、 β -catenin蛋白表达水平比较

与Sham组比较,CLP组、CLP+Dex组、CLP+Dex+Sirtinol组大鼠海马组织中SIRT1、p-Akt、p-GSK3 β 、 β -catenin蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$);与CLP组比较,CLP+Dex组大鼠海马组织中上述蛋白表达水平均

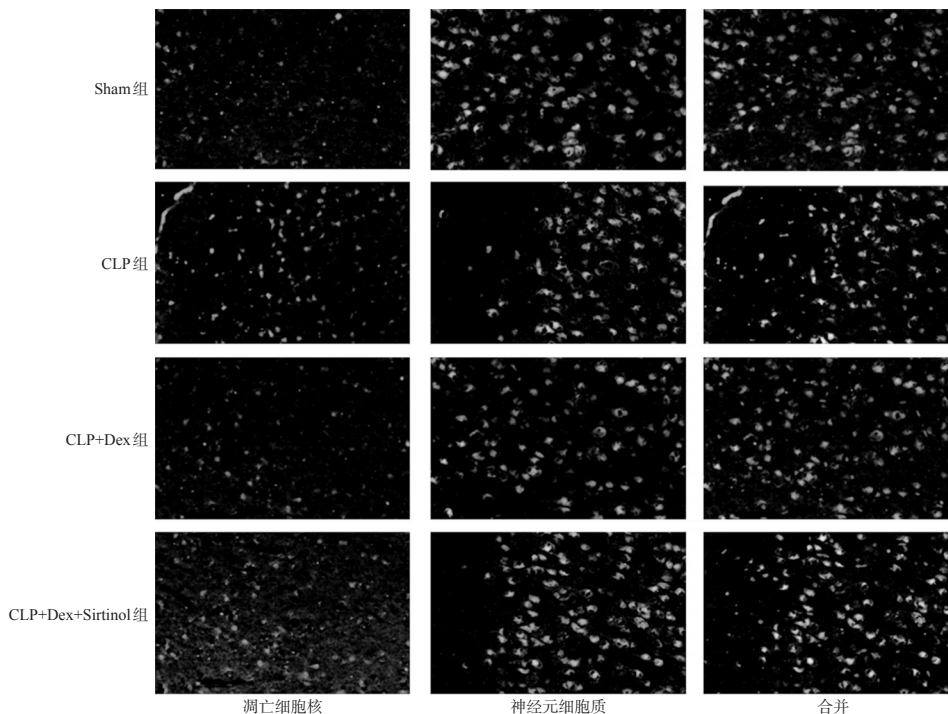


图1 各组大鼠大脑皮层组织凋亡细胞免疫荧光显微图($\times 200$)

Fig 1 Immunofluorescence micrograph of apoptotic cells in cerebral cortex of rats in each group($\times 200$)

表2 各组大鼠大脑皮层组织凋亡细胞数检测结果($\bar{x} \pm s, n=4$)

Tab 2 Number of apoptotic cells in cerebral cortex of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	凋亡细胞数量, mm ²
Sham组	30.62 ± 1.23
CLP组	274.13 ± 12.17*
CLP+Dex组	189.20 ± 4.16*
CLP+Dex+Sirtinol组	268.75 ± 11.34* ^Δ
F	698.071
P	<0.05

注:与Sham组比较, * $P < 0.05$;与CLP组比较, * $P < 0.05$;与CLP+Dex组比较, ^Δ $P < 0.05$

Note: vs. Sham group, * $P < 0.05$; vs. CLP group, * $P < 0.05$; vs. CLP+Dex group, ^Δ $P < 0.05$

表3 各组大鼠脑组织中IL-1 β 、TNF- α 水平检测结果($\bar{x} \pm s, n=4$)

Tab 3 Levels of IL-1 β and TNF- α in cerebral tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	IL-1 β , pg/mL	TNF- α , pg/mL
Sham组	63.54 ± 8.16	73.12 ± 5.61
CLP组	143.75 ± 16.62*	231.27 ± 23.19*
CLP+Dex组	106.28 ± 14.39**	107.54 ± 16.38**
CLP+Dex+Sirtinol组	141.93 ± 15.67* ^Δ	229.85 ± 14.26* ^Δ
F	28.647	103.805
P	<0.05	<0.05

注:与Sham组比较, * $P < 0.05$;与CLP组比较, * $P < 0.05$;与CLP+Dex组比较, ^Δ $P < 0.05$

Note: vs. Sham group, * $P < 0.05$; vs. CLP group, * $P < 0.05$; vs. CLP+Dex group, ^Δ $P < 0.05$

显著升高($P < 0.05$);与CLP+Dex组比较, CLP+Dex+Sirtinol组大鼠海马组织中上述蛋白表达水平均显著减低($P < 0.05$)。各组大鼠海马组织中SIRT1、p-Akt、p-GSK3 β 、 β -catenin蛋白表达水平检测结果见表4。

表4 各组大鼠海马组织中SIRT1、p-Akt、p-GSK3 β 、 β -catenin蛋白表达水平检测结果($\bar{x} \pm s, n=4$)

Tab 4 Protein expression of SIRT1, p-Akt, p-GSK3 β and β -catenin in hippocampus of rats after in each group($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	SIRT1/ β -actin	p-Akt/ β -actin	p-GSK3 β / β -actin	β -catenin/ β -actin
Sham组	1.03 ± 0.11	0.94 ± 0.16	1.02 ± 0.13	1.05 ± 0.17
CLP组	0.76 ± 0.12*	0.52 ± 0.11*	0.65 ± 0.08*	0.70 ± 0.10*
CLP+Dex组	0.91 ± 0.10**	0.75 ± 0.12**	0.79 ± 0.11**	0.86 ± 0.15**
CLP+Dex+Sirtinol组	0.79 ± 0.11* ^Δ	0.54 ± 0.10* ^Δ	0.62 ± 0.07* ^Δ	0.68 ± 0.14* ^Δ
F	5.010	10.092	13.215	5.831
P	0.018	0.001	<0.05	0.012

注:与Sham组比较, * $P < 0.05$;与CLP组比较, * $P < 0.05$;与CLP+Dex组比较, ^Δ $P < 0.05$

Note: vs. Sham group, * $P < 0.05$; vs. CLP group, * $P < 0.05$; vs. CLP+Dex group, ^Δ $P < 0.05$

4 讨论

脓毒症是感染的宿主因反应失调(即当病原体感染后,机体即启动自身免疫机制,在清除病原体的同时,也

常常造成自身毛细血管内皮的损伤、毛细血管的渗漏、凝血功能障碍以及局部炎症损伤)引起的致命性器官功能障碍性疾病,其病理特点是脑内皮细胞的紧密连接功能障碍,可导致全身炎症反应和神经毒性介质进入大脑,造成脓毒症性脑损伤^[14]。在脓毒症的发病过程中,机体会释放大量的细胞因子和炎症介质^[15],可引起中枢神经系统功能障碍和血脑屏障渗透性的变化^[16]。血脑屏障破坏后,大量有害物质可进入中枢神经系统,导致脑水肿,诱导脑损伤^[17]。脑组织含水量是反映脑水肿程度的重要指标;另外,在正常情况下,EB与白蛋白结合,不易透过血脑屏障,当血脑屏障受到破坏时,EB可大量通过血脑屏障进入脑组织^[2]。因此,脑组织含水量和EB含量均可反映血脑屏障的完整性。IL-1 β 和TNF- α 为细胞炎症因子,与机体炎症反应密切相关:IL-1 β 可激发中枢免疫细胞释放大量炎症因子;TNF- α 可介导血脑屏障的开放和星形胶质细胞水通道-4表达上调,导致脑水肿,还可激活一氧化氮合酶,诱导神经细胞凋亡^[18]。本研究通过对脓毒症模型大鼠脑组织含水量、血脑屏障渗漏程度(以EB含量显示)、脑细胞凋亡情况、脑组织炎症因子水平等检测,来评估脓毒症后脑损害情况。

目前,Dex被广泛应用于临床麻醉辅助用药,研究表明其对脓毒症模型大鼠的脑组织具有保护作用^[14],但其具体机制尚不完全清楚。SIRT1在哺乳动物下丘脑及海马神经元中表达丰富^[19]。研究表明,Dex可通过SIRT1信号通路减轻老龄大鼠术后的认知功能障碍^[20];且SIRT1过表达可使Akt磷酸化水平升高而使其激活^[21]。GSK3 β 是Akt下游靶酶,而 β -catenin是GSK3 β 的下游分子,当Akt发生磷酸化被激活后,其下游分子GSK3 β 活性受到抑制,此时 β -catenin的磷酸化途径被阻断而不能降解,从而导致 β -catenin在细胞内大量聚集并进入细胞核,进而可能激活或抑制一些重要的靶基因,来调控其他多种基因的表达^[22]。综上,笔者推测SIRT1/Akt/GSK3 β / β -catenin信号通路有可能参与Dex对脓毒症模型大鼠的脑组织保护过程。

本研究通过建立大鼠脓毒症模型,并给予Dex及SIRT1抑制剂等干预后发现,与Sham组比较,CLP组、CLP+Dex组、CLP+Dex+Sirtinol组大鼠脑组织含水量、EB含量、大脑皮层组织细胞凋亡数和脑组织中炎症因子IL-1 β 、TNF- α 水平均显著增加或升高,说明脓毒症可造成大鼠脑组织损害;海马组织中SIRT1、p-Akt、p-GSK3 β 、 β -catenin蛋白表达水平均显著降低,说明SIRT1/Akt/GSK3 β / β -catenin信号通路的抑制可能参与了脓毒症模型大鼠脑组织的损伤过程。与CLP组比较,CLP+Dex组大鼠脑组织含水量、EB含量、大脑皮层组织细胞凋亡数和脑组织中IL-1 β 、TNF- α 水平均显著减少或降低,说明Dex可减轻脓毒症模型大鼠的脑组织损伤;且海马组织中SIRT1、p-Akt、p-GSK3 β 、 β -catenin蛋白表

达水平均显著升高,说明其作用机制可能为:Dex可通过血脑屏障进入大鼠脑组织,激活SIRT1使其蛋白表达水平增加,从而使下游Akt磷酸化水平升高而活化,继而使GSK3 β 磷酸化水平升高而其活性被抑制,导致 β -catenin去磷酸化而被激活,并能够进入细胞核内,进而诱导细胞增殖和分化,从而发挥脑保护作用。

为反向验证上述脑保护作用机制,本研究采用SIRT1抑制剂Sirtinol进行干预。结果显示,与CLP+Dex组比较,CLP+Dex+Sirtinol组上述指标水平发生了逆转,进一步证实SIRT1/Akt/GSK3 β / β -catenin信号通路参与了Dex对脓毒症模型大鼠脑组织的保护作用。

综上所述,Dex对脓毒症模型大鼠具有脑保护作用,该作用可能是通过激活SIRT1/Akt/GSK3 β / β -catenin信号通路而发挥抗炎、抗凋亡等作用,从而减轻脑水肿、保护血脑屏障并减轻脑损伤。

参考文献

[1] 刘晓,刘志广,范志松,等.严重脓毒症与脓毒性休克患者预后分析[J]. 山东大学学报(医学版),2016,54(10):80-83.

[2] 王慧娴,侯立朝,熊利泽.右美托咪定对脓毒症小鼠脑损伤的保护作用[J]. 山西医科大学学报,2015,46(2):143-147,192.

[3] 强铭.右美托咪定用于全身麻醉临床观察[J]. 中国医学工程,2016,24(1):78-79.

[4] 乔虹,吴新民.右美托咪定对大鼠脓毒症转归的影响[J]. 中华麻醉学杂志,2009,29(7):644-647.

[5] LU H, WANG B. SIRT1 exerts neuroprotective effects by attenuating cerebral ischemia/reperfusion-induced injury via targeting p53/microRNA-22[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(1):208-216.

[6] QIAN C, JIN J, CHEN J, et al. SIRT1 activation by resveratrol reduces brain edema and neuronal apoptosis in an experimental rat subarachnoid hemorrhage model[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6):9627-9635.

[7] 魏明豪,曹屹东,贾栋,等.和厚朴酚通过激活SIRT1/FOXO1信号通路抵抗小鼠脓毒症脑损伤[J]. 现代生物医学进展,2019,19(10):1840-1844.

[8] SUNDARESAN NR, PILLAI VB, WOLFGEHER D, et al. The deacetylase SIRT1 promotes membrane localization and activation of Akt and PDK1 during tumorigenesis and cardiac hypertrophy[J]. *Sci Signal*, 2011. DOI: 10.1126/scisignal.2001465.

[9] XU BT, WANG TT, XIAO J, et al. FCPR03, a novel phosphodiesterase 4 inhibitor, alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury through activation of the Akt/GSK3 β / β -catenin signaling pathway[J]. *Biochem Pharmacol*, 2019. DOI: 10.1016/j.bcp.2019.02.023.

[10] GROZINGER CM, CHAO ED, BLACKWELL HE, et al.

Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(42):38837-38843.

[11] ZHU Y, WANG K, MA Z, et al. SIRT1 activation by butein attenuates sepsis-induced brain injury in mice subjected to cecal ligation and puncture via alleviating inflammatory and oxidative stress[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018. DOI:10.1016/j.taap.2018.10.013.

[12] ZHANG XS, WU Q, WU YL, et al. Sirtuin 1 activation protects against early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage in rats[J]. *Cell Death Dis*, 2016. DOI:10.1038/cddis.2016.292.

[13] 孙家潭,丁鹏,张义通,等.右美托咪定对脓毒症大鼠认知功能障碍的保护作用[J]. 解放军药学报,2015,31(4):301-303.

[14] 刘玉文,陈晓欢,梁佐迪,等.右美托咪定对脓毒症大鼠血脑屏障的影响[J]. 解剖科学进展,2019,35(3):293-295.

[15] ZHOU Q, LEE SK, JIANG SY, et al. Efficacy of an infection control program in reducing ventilator-associated pneumonia in a Chinese neonatal intensive care unit[J]. *Am J Infect Control*, 2013, 41(11):1059-1064.

[16] COMIM CM, VILELA MC, CONSTANTINO LS, et al. Traffic of leukocytes and cytokine up-regulation in the central nervous system in sepsis[J]. *Intensive Care Med*, 2011, 37(4):711-718.

[17] FLIERL MA, RITTIRSCH D, HUBER-LANG MS, et al. Pathophysiology of septic encephalopathy: an unsolved puzzle[J]. *Crit Care*, 2010. DOI: 10.1186/CC9035.

[18] LEVY RJ. Mitochondrial dysfunction, bioenergetic impairment, and metabolic down-regulation in sepsis[J]. *Shock*, 2007, 28(1):24-28.

[19] HWANG JW, YAO H, CAITO S, et al. Redox regulation of SIRT1 in inflammation and cellular senescence[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.015.

[20] 方四通,陈勇,姚鹏,等.右美托咪定可能通过SIRT1信号通路减轻老龄大鼠的术后认知功能障碍[J]. 南方医科大学学报,2018,38(9):1071-1075.

[21] IACONELLI J, LALONDE J, WATMUFF B, et al. Lysine deacetylation by HDAC6 regulates the kinase activity of Akt in human neural progenitor cells[J]. *ACS Chem Biol*, 2017, 12(8):2139-2148.

[22] JACOBS KM, BHAVE SR, FERRARO DJ, et al. GSK-3 β : a bifunctional role in cell death pathways[J]. *Int J Cell Biol*, 2012. DOI: 10.1155/2012/930710.

(收稿日期:2020-06-13 修回日期:2020-09-30)

(编辑:罗 瑞)