

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.15.011

实验研究

参附黄配方对脓毒症小鼠大脑皮质氧化损伤的影响

王宇琛¹, 王雪蕊², 徐霄龙², 李珍莹², 白云静², 刘清泉²✉

1. 北京中医药大学, 北京市朝阳区北三环东路 11 号, 100029; 2. 首都医科大学附属北京中医医院

[摘要] 目的 探讨参附黄配方对脓毒症神经元损伤的影响及作用机制。方法 C57BL/6J 小鼠随机分为假手术组、脓毒症组和参附黄组, 每组 26 只。假手术组小鼠麻醉后仅游离盲肠, 不结扎及穿刺。脓毒症组和参附黄组采取盲肠结扎穿孔术 (CLP) 建立脓毒症模型。参附黄组造模后 4 h 予参附黄组方 2.5 g/kg 灌胃, 每隔 12 h 进行下一次灌胃, 每日灌胃 2 次, 每次 0.5 ml; 脓毒症组和假手术组每次灌服纯净水 0.5 ml, 灌胃时间同参附黄组, 各组均灌胃 3 d。造模 72 h 后采用尼氏染色观察大脑前额叶皮层神经元数量的变化, 采用二氢乙啶染色检测大脑皮质组织中活性氧含量, 采用 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG) 免疫荧光染色评价大脑皮质氧化 DNA 损伤的情况。结果 与假手术组比较, 脓毒症组小鼠前额叶皮层神经元数量显著减少, 活性氧含量增加, 8-OHdG 表达增多 ($P<0.05$); 与脓毒症组相比较, 参附黄组神经元数量增多, 活性氧含量降低, 8-OHdG 表达减少 ($P<0.05$)。结论 参附黄配方对 CLP 小鼠前额叶皮质神经元损伤具有一定保护作用, 其机制可能降低氧化应激和氧化 DNA 损伤有关。

[关键词] 脓毒症; 大脑皮质; 氧化应激; 氧化 DNA 损伤; 参附黄配方

脓毒症 (sepsis) 是一种威胁生命的多因素疾病, 2016 年更新的第三版国际共识将其定义为机体对感染反应的失控引起的危及生命的器官功能障碍^[1]。现有的流行病学证据^[2]表明每年全球新增约 3100 万例脓毒症患者; 任何感染性疾病都有发展为脓毒症的可能性, 脓毒症的发病率高达所有住院患者的 1%~2%, 其居高不下的发病率和死亡率是全球急危重症领域面临的巨大难题。脓毒症经常导致弥漫性脑功能障碍, 被称为脓毒症相关性脑病 (sepsis-associated encephalopathy, SAE), 无论在脓毒症的急性期或急性期后存活的脓毒症患者中, SAE 都是最常见的并发症之一。在急性期可表现为患者行为改变、谵妄和昏迷, 是脓毒症患者死亡率增高的重要原因; 在急性期后存活的患者中也会导致长期的认知及情绪功能障碍, 对社会和家庭造成严重的负担^[1]。本团队基于长期临床实践经验, 提出“扶正解毒通络”为脓毒症主要治则^[3], 并根据该治则组成参附黄配方。研究^[4]发现, 该方可以显著改善脓毒症小鼠的认知功能障碍。脓毒症进程

中不断进展的脑神经元变性及凋亡是并发脑功能障碍的重要物质基础^[5], 而氧化应激是其关键机制之一^[6]。研究表明, 针对大脑皮层氧化应激的干预措施在脓毒症实验模型中显示出预防认知功能障碍的希望^[7], 前额叶皮层是认知功能的核心区域^[8]。本研究旨在探讨参附黄配方对脓毒症小鼠前额叶皮层氧化应激和氧化 DNA 损伤的影响, 为其防治脓毒症相关的认知功能障碍提供理论依据。本研究已获得北京市中医研究所实验动物伦理委员会批准, 伦理审批号: 2020080012。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 C57BL/6J 小鼠 78 只, 雄性, 10 周龄, 体质量 20~23 g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 生产许可证号: SCXK (京) 2014-0004, 使用许可证号: SCXK (京) 2015-0023, 由北京市中医研究所根据纯系动物要求专人饲养。

1.2 药物

参附黄配方中药物均由首都医科大学附属北京中医医院中药房提供。组成包括: 人参 30 g, 黑顺

基金项目: 国家自然科学基金 (82004292, 82174348)

✉ 通讯作者: liuqingquan_2003@126.com

片 60 g, 大黄 30 g。煎煮方法: 加水 400 ml, 浸泡 30 min, 沸腾后煎煮 30 min, 过滤收集药液, 再加水 300 ml 继续煎煮 30 min, 过滤收集药液, 合并 2 次药液并浓缩至 120 ml, 以浓度 1 g/ml 作为实验用药。实验用药 4 °C 冷藏备用, 存放时间不超过 1 个月。

1.3 主要仪器和试剂

BX51 型光学显微镜 (日本 Olympus 公司), CM185 型恒冷箱冰冻切片机 (德国 Leica 公司), N13462C 型移液器 (德国 Eppendorf 生命科学公司), Direct-Qwithpump 型纯水仪 (法国 Milipore 公司)。

阳离子防脱玻片、盖玻片、山羊血清封闭液和中性树脂 (批号分别为 ZLI-9506, 10212432C, ZLI-9022, PV9000), 北京中杉金桥生物技术有限公司; OCT 冰冻包埋剂 (批号 1603966), 日本樱花公司; 4% 多聚甲醛-30% 蔗糖溶液 (批号: RY0402), 中国捷世康生物科技有限公司; 多聚甲醛 (批号: 2021100749823), 尚柏生物医学技术 (北京) 有限公司; 无水乙醇和二甲苯 (批号分别为 202110854, 202132062), 北京化工厂; 兔抗 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG) 多克隆抗体、4',6-脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 荧光染料 (批号分别为 ab269324, 32062), 英国 Abcam 公司; 驴抗兔荧光二抗 (批号 A21203), 美国 KPL 公司; 二氢乙啶 (DHE) 染色液、尼氏染色液 (批号分别为 C0019R, R0016S), 中国上海碧云天生物技术有限公司; 戊巴比妥钠 (批号 AZ3017-6), 德国 Merck 公司。

1.4 分组、造模及给药

根据随机数字表法将 78 只小鼠分为假手术组、脓毒症组和参附黄组, 每组 26 只。脓毒症组和参附黄组依据既往研究方法^[9]进行盲肠结扎穿孔复制脓毒症模型: 用 1% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 腹腔注射麻醉小鼠后固定, 消毒后于剑突中线开口, 从腹腔中取出盲肠, 结扎 1/2 长度盲肠, 使用 5 ml 注射器针头于结扎段贯穿盲肠 1 次。假手术组小鼠麻醉后仅游离盲肠, 不结扎及穿刺。术毕假手术组、脓毒症组、参附黄组小鼠背部皮下注射生理盐水 2 ml 防止休克。参附黄组造模后 4 h 给予参附黄方 2.5 g/kg^[4,10] 灌胃, 每隔 12 h 进行下一次灌胃, 每日灌胃 2 次, 每次均为 0.5 ml。脓毒症组和假手术组每次灌服纯净水 0.5 ml, 灌胃时间同参附黄组。术后动物自由进食、饮水。各组均灌胃 3 日。

根据参考文献^[9]小鼠脓毒症模型盲肠结扎穿孔术 (CLP) 模型严重程度与盲肠穿刺位点有关, 团队前期已复制表型稳定的 CLP 模型, 以造模后

48 h 小鼠血清炎症因子白细胞介素 1 β (IL-1 β) 升高 3 倍以上提示造模成功^[9,11]。

1.5 观察指标及方法

造模 72 h 后, 小鼠用 1% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉后断头处死, 取出脑组织, 于冰盒上迅速分离出前额叶皮层, 固定于 4% 多聚甲醛-30% 蔗糖溶液脱水, 4 °C 条件下, 至组织沉底 2 天。

1.5.1 DHE 染色计算活性氧 (ROS) 水平 每组小鼠前额叶皮层用 OCT 冰冻包埋剂包埋, 冠状位厚度为 10 μ m 连续冰冻切片。冰冻切片用 PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 然后按 1:100 浓度用 PBS 稀释配制 DHE 染色液, 每个样品滴加 50 μ l 染色液, 室温下避光孵育 60 min。在荧光显微镜下观察并拍片, 并用 Image J V1.8.0 图像分析软件对荧光强度进行定量分析, 并计算每个视野内 DHE 细胞阳性数。ROS 水平以 DHE 细胞阳性数表示。

1.5.2 尼氏染色观察前额叶皮层神经元情况 各组小鼠大脑前额叶皮层用 OCT 冰冻包埋剂包埋, 冠状位厚度为 10 μ m 连续冰冻切片。脑冷冻切片用 4% 多聚甲醛固定后, 采用 PBS 清洗。滴加尼氏染色液染色 10 min。PBS 清洗后, 在连续稀释的乙醇中脱水, 并在二甲苯中透明, 后封片。使用荧光显微镜拍摄图像, 并使用 Image J V1.8.0 进行定量分析。

1.5.3 前额叶皮层 8-OHdG 表达 各组小鼠大脑皮层组织用 OCT 冰冻包埋剂包埋, 冠状位厚度为 10 μ m 连续冰冻切片。脑冷冻切片采用 4% 多聚甲醛固定后, 采用 PBS 清洗。滴加山羊血清封闭液, 37 °C 封闭 1 h。滴加一抗混合液 (用 0.3% Triton X-100 溶液按照 1:1000 稀释一抗), 4 °C 冰箱孵育过夜。第二天孵育荧光二抗 (1:10000 比例稀释), 室温 1 h。最后用 DAPI 和盖玻片封片。使用荧光显微镜拍摄图像, 并使用 Image J V1.8.0 进行定量分析。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行数据分析, 计量资料均符合正态分布且方差齐, 以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组比较采用单因素方差分析, 采用 LSD 检验法进行组间比较。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠前额叶皮层神经元数量比较

表 1 示, 与假手术组比较, 脓毒症组前额叶皮层神经元数量显著减少 ($P<0.05$); 与脓毒症组

相比，参附黄组前额叶皮层神经元数量增加（ $P<0.05$ ）。

表 1 各组前额叶皮层神经元数量、ROS、8-OHdG 表达比较

Table 1 Comparison of the number of prefrontal cortex neurons, ROS, and 8-OHdG expression in each group ($\bar{x}\pm s$)				
项目	鼠数	神经元数量/个	ROS/个	8-OHdG/%
假手术组	26	487.66±18.81	121.67±12.21	7.65±1.88
脓毒症组	26	378.34±17.99 ^{a)}	321.54±27.97 ^{a)}	18.92±3.83 ^{a)}
参附黄组	26	415.44±20.14 ^{b)}	196.88±19.81 ^{b)}	12.31±2.14 ^{b)}

注：ROS，活性氧；8-OHdG，8-羟基脱氧鸟苷。
a) 与假手术组比较， $P<0.05$ ；b) 与脓毒症组比较， $P<0.05$ 。

2.2 各组小鼠前额叶皮层 ROS 含量比较

图 1 示，与假手术组相比，脓毒症组小鼠 ROS

相对荧光强度显著增加；与脓毒症组相比，参附黄组小鼠 ROS 相对荧光强度显著降低。表 1 示，与假手术组相比，脓毒症组小鼠前额叶皮层 ROS 含量显著增加（ $P<0.05$ ）；与脓毒症组相比，参附黄组小鼠前额叶皮层 ROS 含量显著减少（ $P<0.05$ ）。

2.3 各组小鼠前额叶皮层 8-OHdG 表达比较

图 2 示，与假手术组小鼠相比，脓毒症组小鼠亮蓝色及绿色染色明显增多，表明细胞凋亡增加，核固缩，细胞膜破坏；与脓毒症组相比，参附黄组小鼠亮蓝色及绿色染色明显减少，表明细胞凋亡及细胞膜破坏都在参附黄治疗后得到抑制。表 1 示，与假手术组小鼠相比，脓毒症组小鼠前额叶皮层 8-OHdG 含量显著增加（ $P<0.05$ ）；与脓毒症组相

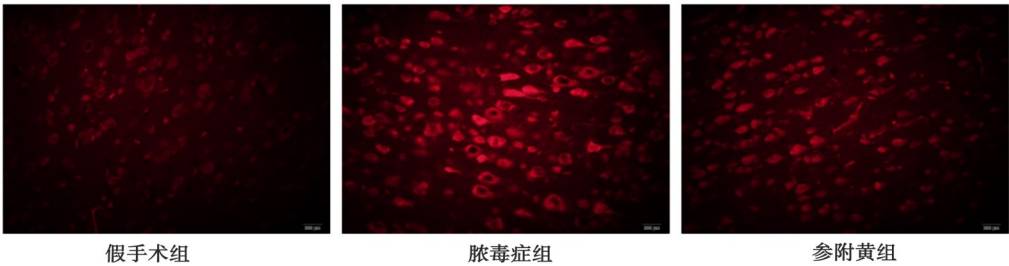
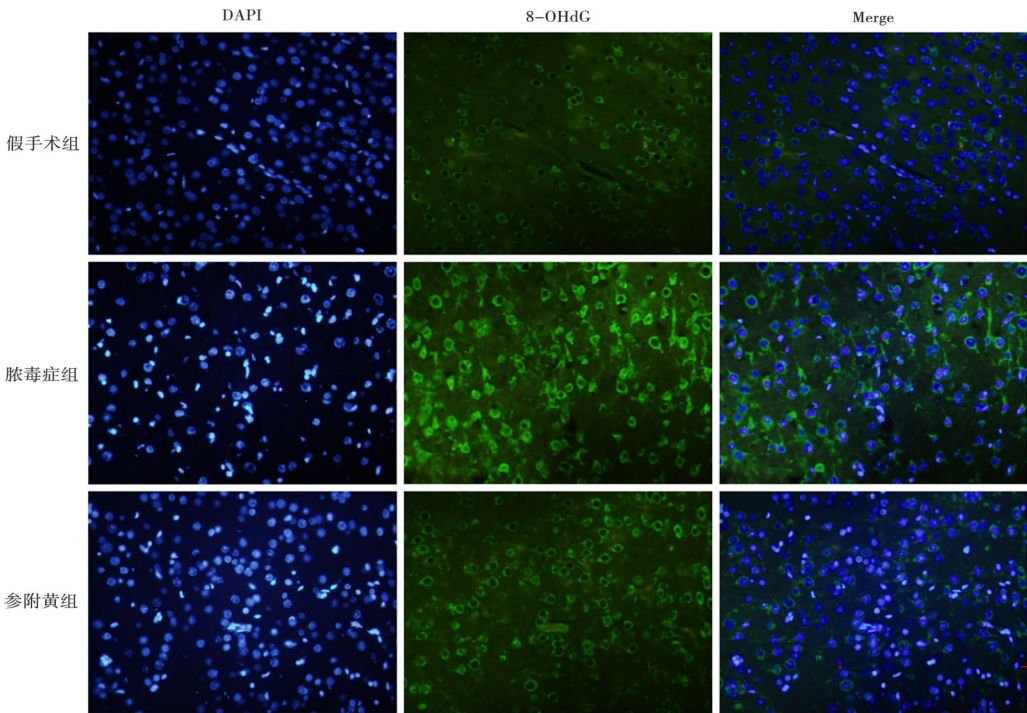


图 1 各组小鼠前额叶皮层活性氧情况（DHE 染色，×200）
Figure 1 Reactive oxygen species in prefrontal cortex of mice in each group



注：蓝色为 DAPI，绿色为 8-羟基脱氧鸟苷阳性。
图 2 各组小鼠前额叶皮层氧化 DNA 损伤的变化（免疫荧光染色，×200）
Figure 2 Changes of oxidative DNA damage in the prefrontal cortex of mice in each group

比, 参附黄组小鼠前额叶皮层 8-OHdG 含量显著减少 ($P<0.05$)。

3 讨论

脓毒症通常会引发急性或者长期的认知和情感障碍, 并导致脓毒症患者的死亡率增加和预后不佳^[2]。目前越来越多的证据表明, 氧化还原稳态的破坏在脓毒症相关脑功能障碍的发病机制中起着至关重要的作用^[12]。脓毒症期间代谢和生物能量需求可能导致氧化应激和线粒体功能障碍, 而脓症患者出现的长期认知功能不全与脓毒症早期的氧化应激相关^[6]。根据临床症状, 中医学把脓毒症脑病归于“神昏”的范畴。本研究团队长期从事脓毒症研究, 从临床实际出发, 结合西医病理认识, 提出该病以虚实夹杂为病性特点, 毒邪贯穿病程始终, 而虚、毒、瘀是其病机关键, 故以补虚通阳化瘀、解毒通行脑络为治法。以人参为君药, 大补元气, 气行血行则络通, 同时扶助外脱之气; 附子和大黄同为臣药, 附子助人参气化以扶阳通络, 大黄荡涤络脉中毒邪瘀滞, 推陈致新, 三药寒温并用, 共奏补气通阳、通络解毒之效^[13]。

人类前额叶皮层提供与行为的社会、情感和动机方面相关的关键认知功能; 前额叶病变会造成严重的认知缺陷, 影响其记忆功能和对未来的计划^[14]。前额叶被认为是神经整合的最高阶段, 神经元是其执行功能的物质基础^[15]。本课题组既往研究^[5]通过评价小动物认知功能的“金标准”Morris 水迷宫实验, 结合旷场实验表明, 参附黄配方可以显著提高脓毒症小鼠的空间学习记忆能力、探索能力, 改善焦虑状态。在本研究中, 我们通过统计前额叶皮层神经元数量的差异, 评价参附黄配方对脓毒症认知功能障碍改善作用的物质基础的变化。通过分离小鼠前额叶皮层组织结果发现, 与假手术组小鼠相比, 脓毒症组小鼠神经元明显凋亡; 与脓毒症组相比, 参附黄组治疗后浓染的细胞核比例减少, 细胞凋亡得到抑制, 参附黄配方可以显著抑制脓毒症小鼠前额叶皮层神经元数量的下调, 表明该治疗可改善额叶皮质组织的凋亡。

维持氧化还原稳态对于神经元的存活和功能至关重要, ROS 的过度生成、线粒体功能障碍和抗氧化防御系统的损害是导致脓毒症诱导的认知障碍的核心因素^[16]。在正常的代谢过程中, 作为自由基的 ROS 被细胞和组织中的内源性抗氧化剂中和, 以维持氧化还原稳态^[17]。这种氧化还原稳态在某

些病理生理条件下被破坏, 例如细菌内毒素、细胞因子和促炎因子水平升高、血管内皮功能障碍等^[18], 引起氧化应激反应, 这是脓毒性脑病的发病机制之一。尤其与其他器官相比, 中枢神经系统的神经细胞自由基丰富且抗氧化防御相对较弱, 因此特别容易受到损伤^[19]。氧化应激反应增加会破坏细胞膜, 改变蛋白质结构和功能, 并导致 DNA 损伤^[20]。此外, 氧化应激引起线粒体功能障碍, 无法满足神经元细胞正常生化和生理功能的高能量需求, 从而导致神经元细胞死亡^[21]。8-OHdG 是活性氧自由基诱导 DNA 分子中的鸟嘌呤碱基氧化病变的主要形式之一, 这是测量内源性氧化损伤对 DNA 的影响的关键标志物, 8-OHdG 水平越高表明氧化应激损伤越严重, 该指标目前被广泛用于评价多种脑病氧化应激水平的进展^[21-23]。多项研究^[24-26]表明, 对小鼠 CLP 术前应用抗氧化剂改善脑组织的氧化应激状态, 能够减轻脓毒症引起的认知功能损伤。例如提前予自由基清除剂处理后的 CLP 小鼠, 以及提前使用吸入氢气和输入富含氢的生理盐水的 CLP 小鼠, 其海马区的 DNA 氧化损伤指标下降且血脑屏障通透性和神经元变性得到改善, 减轻了脓毒症引起的认知功能损伤和神经元的凋亡^[26]。在本研究中, 我们通过测量活性氧含量的变化及氧化性 DNA 损伤标志物 8-OHdG 等表达的变化为表征, 进一步解释参附黄配方作用后脓毒症小鼠神经元氧化应激标志物的变化: 与假手术组小鼠相比, 脓毒症组小鼠 8-OHdG 表达明显增多, 细胞膜因为氧化应激的增加而破坏; 与脓毒症组相比, 参附黄组治疗后 8-OHdG 表达明显减少, 氧化应激得到抑制, 细胞膜蛋白结构的破坏得到抑制。结果表明, 参附黄配方可阻止脓毒症小鼠额叶 8-OHdG 水平升高及 ROS 含量升高, 从而改善额叶皮质组织的氧化损伤, 改善对神经元细胞膜的破坏, 进一步减少细胞凋亡。

综上, 参附黄配方具有抗前额叶皮层氧化损伤、抗神经元细胞凋亡的能力, 其机制可能是通过抗氧化 DNA 损伤→抗氧化应激水平提高→抗细胞膜损伤→抗细胞凋亡→保护神经元的关系线来实现的, 而这可能与脓毒症小鼠认知功能障碍的有效改善相关。然而脓毒症相关脑功能障碍的病理机制复杂, 但本研究仅涉及对抗氧化损伤的神经保护研究, 而参附黄配方的对脓毒症小鼠对认知改善作用可能还涉及其他机制, 有待未来进一步研究。

参考文献

- [1] SHANKAR-HARI M, PHILLIPS GS, LEVY ML, et al. Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3) [J]. JAMA, 2016, 315(8): 775-787.
- [2] FLEISCHMANN C, SCHERAG A, ADHIKARI NK, et al. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2016, 193(3): 259-272.
- [3] 刘清泉. 对脓毒症中医病机特点及治法的认识 [J]. 北京中医, 2007, 26(4): 198-200.
- [4] 王雪蕊, 郭玉红, 赵京霞, 等. 参附黄配方对脓毒症小鼠认知功能和突触可塑性的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(11): 935-940.
- [5] WANG Y, LIU X, WANG Q, et al. Roles of the pyroptosis signaling pathway in a sepsis-associated encephalopathy cell model [J]. J Int Med Res, 2020, 48(8): 0300060520949767.
- [6] 白洪梅, 杨秀芬. 脓毒症相关性脑病发病机制的研究进展 [J]. 河北医科大学学报, 2023, 44(1): 115-119.
- [7] ANNANE D, SHARSHAR T. Cognitive decline after sepsis [J]. Lancet Respir Med, 2015, 3(1): 61-69.
- [8] CARLÉN M. What constitutes the prefrontal cortex? [J]. Science, 2017, 358(6362): 478-482.
- [9] RITTIRSCH D, HUBER-LANG MS, FLIERL MA, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture [J]. Nat Protoc, 2009, 4(1): 31-36.
- [10] 徐霄龙, 郭玉红, 赵京霞, 等. 参附黄方对斑马鱼炎症, 巨噬细胞吞噬功能的影响 [J]. 中医杂志, 2020, 61(23): 2092-2097.
- [11] 王雪蕊, 徐霄龙, 白云静, 等. 强心一号复方对脓毒症小鼠心脏的保护作用及机制 [J]. 中医杂志, 2019, 60(24): 2133-2137.
- [12] GOFTON TE, YOUNG GB. Sepsis-associated encephalopathy [J]. Nat Rev Neurol, 2012, 8(10): 557-566.
- [13] 黄坡, 赵京霞, 苏芮, 等. 刘清泉教授对脓毒症相关性脑病的认识及其中医研究思路探讨 [J]. 世界中医药, 2018, 13(10): 2390-2392, 2395.
- [14] JONES DT, GRAFF-RADFORD J. Executive dysfunction and the prefrontal cortex [J]. Continuum (Minneapolis), 2021, 27(6): 1586-1601.
- [15] LE MERRE P, ÄHRLUND-RICHTER S, CARLÉN M. The mouse prefrontal cortex: unity in diversity [J]. Neuron, 2021, 109(12): 1925-1944.
- [16] HERNANDES MS, D'AVILA JC, JOANA C, et al. The role of Nox2-derived ROS in the development of cognitive impairment after sepsis [J]. J Neuroinflammation, 2014, 11: 36. doi: 10.1186/1742-2094-11-36.
- [17] ASHOK A, ANDRABI SS, MANSOOR S, et al. Antioxidant therapy in oxidative stress-induced neurodegenerative diseases: role of nanoparticle-based drug delivery systems in clinical translation [J]. Antioxidants, 2022, 11(2): 408-445.
- [18] MICHELS M, DANIELSKI LG, DAL-PIZZOL F, et al. Neuroinflammation: microglial activation during sepsis [J]. Curr Neurovasc Res, 2014, 11(3): 262-270.
- [19] COBLEY JN, FIORELLO ML, BAILEY DM. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress [J]. Redox Biol, 2018, 15: 490-503. doi: 10.1016/j.redox.2018.01.008.
- [20] LI B, JIANG J, ASSARAF YG, et al. Surmounting cancer drug resistance: new insights from the perspective of N6-methyladenosine RNA modification [J]. Drug Resist Updat, 2020, 53: 100720. doi: 10.1016/j.drug.2020.100720.
- [21] LIGUORI I, RUSSO G, CURCIO F, et al. Oxidative stress, aging, and diseases [J]. Clin Interv Aging, 2018, 13: 757-772. doi: 10.2147/CIA.S158513.
- [22] 于晨, 董超然, 张照辉, 等. 8-羟基脱氧鸟嘌呤作为 DNA 氧化损伤标志物的研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(13): 1267-1270.
- [23] O'KEEFFE GC, MICHELL AW, BARKER RA. Biomarkers in Huntington's and Parkinson's disease [J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1180(1): 97-110.
- [24] ZHANG N, ZHAO W, HU Z, et al. Protective effects and mechanisms of high-dose vitamin C on sepsis-associated cognitive impairment in rats [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 14511.
- [25] SHI B, CHEN M, XIA Z, et al. Genistein attenuates neuroinflammation and oxidative stress and improves cognitive impairment in a rat model of sepsis-associated encephalopathy: potential role of the Nrf2 signaling pathway [J]. Metab Brain Dis, 2023, 38(1): 339-347.
- [26] LIU L, XIE K, CHEN H, et al. Inhalation of hydrogen gas attenuates brain injury in mice with cecal ligation and puncture via inhibiting neuroinflammation, oxidative stress and neuronal apoptosis [J]. Brain Res, 2014, 1589: 78-92. doi: 10.1016/j.brainres.2014.09.030.

(下转第 1584 页)