

郭小丽,杨昌明,王婵,等. 基于 Sirt1/FoxO1 通路探讨瑞马唑仑减轻脓毒症小鼠脑损伤的机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 82-90.

Guo XL, Yang CM, Wang C, et al. Mechanism of remazolam in reducing brain injury in sepsis mice based on Sirt1/FoxO1 pathway [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 82-90.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.01.010

基于 Sirt1/FoxO1 通路探讨瑞马唑仑减轻脓毒症小鼠脑损伤的机制研究

郭小丽¹,杨昌明¹,王婵¹,王先圆²,刘荣莉^{1*}

(1. 荆门市第一人民医院 麻醉科,湖北 荆门 448001; 2. 荆门市第一人民医院 重症医学科,湖北 荆门 448001)

【摘要】 目的 探究瑞马唑仑对脓毒症引起的脑损伤的影响及机制。**方法** 雄性 C57BL/6J 小鼠,采用随机数字表法分为假手术组、模型组、瑞马唑仑组(8 mg/kg)、瑞马唑仑+Sirt1 抑制剂(EX527)组(8 mg/kg 瑞马唑仑+5 mg/kg EX527)、EX527 组,每组 38 只。采用盲肠结扎穿孔法(CLP)制备脓毒症相关性脑病(SAE)小鼠模型。给予相应的干预后,观察并记录术后 7 d 内小鼠存活率,采用 Morris 水迷宫检测小鼠逃避潜伏期和穿越平台次数;手术后 24 h,通过伊文斯蓝(EB)渗漏量评估血脑屏障(BBB)通透性,酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测脑组织白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、IL-1 β 水平,化学比色法检测脑组织丙二醛(MDA)水平和超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性,HE 染色观察海马组织病理学变化,TUNEL 法检测神经元凋亡,蛋白免疫印迹(Western Blot)检测海马组织沉默信息调节因子 1(Sirt1)/叉头框蛋白 O1(FoxO1)通路相关蛋白表达。**结果** 与假手术组相比,模型组小鼠的存活率、穿越平台次数、SOD 和 CAT 活性、Sirt1 和胞质 NF- κ B p65 蛋白水平显著下降,逃避潜伏期、脑组织 EB 含量、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 和 MDA 水平、海马神经元凋亡指数、乙酰化 FoxO1(Ac-FoxO1)/FoxO1 比值和乙酰化核因子- κ B p65(Ac-NF- κ B p65)、胞核 NF- κ B p65 蛋白水平显著升高(均 $P < 0.05$);与模型组相比,瑞马唑仑组小鼠的存活率、穿越平台次数、SOD 和 CAT 活性、Sirt1 和胞质 NF- κ B p65 蛋白水平显著升高,逃避潜伏期、脑组织 EB 含量、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 和 MDA 水平、海马神经元凋亡指数、Ac-FoxO1/FoxO1 比值和 Ac-NF- κ B p65、胞核 NF- κ B p65 蛋白水平显著降低(均 $P < 0.05$);EX527 可抑制 Sirt1 表达,显著减弱瑞马唑仑对 SAE 小鼠的上述保护作用(均 $P < 0.05$)。**结论** 瑞马唑仑可提高脓毒症小鼠存活率,通过维持 BBB 完整性、抑制神经炎症和氧化应激,减少神经元凋亡,减轻脓毒症引起的脑损伤;其作用机制可能与激活 Sirt1/FoxO1 通路,抑制 NF- κ B 活化有关。

【关键词】 瑞马唑仑;脓毒症相关性脑病;神经炎症;氧化应激;沉默信息调节因子 1;叉头框蛋白 O1

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2023) 01-0082-09

Mechanism of remazolam in reducing brain injury in sepsis mice based on Sirt1/FoxO1 pathway

GUO Xiaoli¹, YANG Changming¹, WANG Chan¹, WANG Xianyuan², LIU Rongli^{1*}

(1. Department of Anesthesiology, Jingmen First People's Hospital, Jinmen 448001, China. 2. Department of Critical Care Medicine, Jingmen First People's Hospital, Jinmen 448001)
Corresponding author: LIU Rongli. E-mail: r15072894595@163.com

【Abstract】 Objective To explore the effect and action of remazolam on brain injury caused by sepsis. **Methods** Male C57BL/6J mice were randomly separated into sham operation, model, remazolam (8 mg/kg), remazolam + Sirt1

【基金项目】 中国健康促进基金会鄂皖科研基金(202008-202208)。
Funded by the Hubei Anhui Scientific Research Fund of China Health Promotion Foundation (202008-202208).
【作者简介】 郭小丽(1988—),女,本科,主治医师,研究方向:老年患者麻醉。Email:gx188work@163.com
【通信作者】 刘荣莉(1981—),女,本科,副主任医师,研究方向:术后应激反应。Email:r15072894595@163.com

inhibitor (EX527) (8 mg/kg remazolam + 5 mg/kg EX527), and EX527 groups by the random number table method, with 38 rats in each group. A sepsis-associated encephalopathy (SAE) mouse model was established by cecal ligation and puncture. After the corresponding intervention was given, the survival rates of mice within seven days after the operation were observed and recorded, and a Morris water maze was used to detect the mice's escape latency and number of times crossing the platform. Twenty-four hours after surgery, blood-brain barrier (BBB) permeability was assessed by Evans blue (EB) leakage; the levels of interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF)- α , and IL-1 β in brain tissue were detected by enzyme-linked immunosorbent assay; the levels of malondialdehyde (MDA) and activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in brain tissue were detected by chemical colorimetry. Histopathological changes to the hippocampus were observed by HE staining, and neuronal apoptosis was detected using the TUNEL method. Western Blot was used to detect the expression of silent information regulator 1 (Sirt1)/forkhead box O1 (FoxO1) pathway-related proteins in the hippocampus. **Results** Compared with the sham group, mice in the model group had a significantly decreased survival rate, platform crossing time, SOD and CAT activities, and Sirt1 and cytoplasmic NF- κ B p65 protein levels and significantly increased brain tissue EB content; IL-6, TNF- α , IL-1 β , and MDA levels; hippocampal neuron apoptosis index; acetylated FoxO1 (Ac-FoxO1)/FoxO1 ratio; and acetylated nuclear factor- κ B p65 (Ac-NF- κ B p65) and nuclear NF- κ B p65 protein levels (all $P < 0.05$). Compared with the model group, mice in the remazolam group had a significantly increased survival rate, platform crossing time, SOD and CAT activities, and Sirt1 and cytoplasmic NF- κ B p65 protein levels, and significantly decreased escape latency; brain tissue EB content; IL-6, TNF- α , IL-1 β , and MDA levels; hippocampal neuron apoptosis index; Ac-FoxO1/FoxO1 ratio; and Ac-NF- κ B p65 and nuclear NF- κ B p65 protein levels (all $P < 0.05$). EX527 inhibited the expression of Sirt1 and substantially attenuated the above protective effects of remazolam in SAE mice (all $P < 0.05$). **Conclusions** Remazolam improved the survival rate of mice with sepsis and reduced neuronal apoptosis and brain damage caused by sepsis by maintaining BBB integrity and inhibiting neuroinflammation and oxidative stress. Its mechanism of action may be related to the activation of the Sirt1/FoxO1 pathway and inhibition of NF- κ B activation.

【Keywords】 remazolam; sepsis-associated encephalopathy; neuroinflammation; oxidative stress; sirtuin 1; forkhead box O1

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

脓毒症是一种全身性炎症性疾病,与多种器官功能障碍的发展有关,包括脑功能障碍^[1]。脓毒症可增强血脑屏障(blood brain barrier, BBB)通透性,促进神经毒性物质进入和神经炎症^[2]。研究表明,脓毒症后的炎症和氧化应激是脓毒症相关性脑病(sepsis-associated encephalopathy, SAE)的主要原因^[3]。最近,沉默信息调节因子 1(sirtuin 1, Sirt1)在脓毒症中的作用受到越来越多的关注。Sirt1 激活可以通过使组蛋白和非组蛋白如叉头框蛋白 O1(forkhead box O1, FoxO1)、核因子- κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)去乙酰化来抑制炎症、减少氧化应激,减轻 SAE^[4-5]。

全身麻醉药,如丙泊酚^[6]、七氟醚^[7]和右美托咪定^[8],已被报道对 SAE 有保护作用。瑞马唑仑是一种新型苯二氮卓类镇静药物,具有诱导和维持全身麻醉作用,常用于重症监护室(ICU)的重症患者(尤其是脓毒症患者)^[9]。据报道,瑞马唑仑具有显著的神经保护作用,能有效改善大鼠脑缺血再灌注损伤后的神经功能障碍^[10],还可减轻小鼠丘脑出血

性脑损伤^[11]。重要的是,瑞马唑仑可通过抑制炎症反应提高脓毒症小鼠的存活率^[9],并减轻脓毒症相关的急性肝损伤^[12]。此外,Sirt1 通路是全身麻醉药丙泊酚^[13]、七氟醚^[7]和右美托咪定^[14]发挥有益作用的关键。然而,瑞马唑仑是否减轻脓毒症相关脑损伤仍不清楚。因此,本研究旨在探讨瑞马唑仑对脓毒症引起的脑损伤的影响,并分析其潜在机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

190 只,雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2019-0004】,体重(25 ~ 30)g,9 ~ 10 周龄,饲养在温度(22 ± 2)℃、湿度(60 ± 5)%和光照/黑暗循环为 12 h 的受控条件下,饲养于湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SYXK(湘)2019-0017】。本研究经荆门市第一人民医院动物伦理委员会审核同意(2021-0168),并符合伦理规范要求。

1.1.2 主要试剂与仪器

瑞马唑仑(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 200814AK), EX527 (Sirt1 抑制剂, 美国 ApexBio, A4181); 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) (A001-3-2)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) (A007-1-1)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) (A003-1-2) 试剂盒(南京建成生物工程研究所); 小鼠白细胞介素 (interleukin, IL)-6 (ml063159)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α (ml002095-J)、IL-1 β (ml301814) ELISA 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司); 苏木精-伊红 (HE) 染色试剂盒 (Solarbio, G1120); TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (绿色荧光, 碧云天生物科技公司, C1088); 兔源一抗 Sirt1 (#9475)、FoxO1 (#2880) (美国 Cell Signaling Technology 公司); 乙酰化 FoxO1 (Ac-FoxO1) (PA5-104560)、NF- κ B p65 (PA1-186) (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 乙酰化 NF- κ B p65 (Ac-NF- κ B p65) (Q04206) (上海优宁维生物科技股份有限公司)。iMark680 多功能酶标仪(美国 Bio-Rad 公司); BX61 电动显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 SAE 模型建立

共分假手术组 (sham)、模型组 (model)、瑞马唑仑组 (8 mg/kg, remazolam)^[9]、瑞马唑仑+Sirt1 抑制剂 (EX527) 组 (8 mg/kg 瑞马唑仑+5 mg/kg EX527, remazdam+EX527)^[15]、EX527 组 (EX527), 每组 38 只。采用盲肠结扎穿孔法 (CLP) 建立小鼠 SAE 模型^[16]。用 40 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠。将动物仰卧放在干净的工作台上, 脱去腹部毛发并使用 70% 乙醇溶液对腹部皮肤进行消毒, 沿腹中线做一个约 1 cm 的切口, 小心暴露盲肠, 以免损伤肠系膜血管。然后用 3/0 丝线在回盲瓣下方盲肠近端 1/2 处结扎盲肠, 并在结扎的盲肠中点处使用 20 号针头穿刺两次。挤出少量粪便以确保穿刺部位的通畅。将盲肠放回正常的腹内位置, 缝合腹部切口。术后腹腔注射 1 mL 预热 (37℃) 生理盐水, 以补充手术过程中损失的热量和水分。假手术组小鼠除未进行 CLP 外, 其余操作程序与模型组完全相同。术前 30 min、手术后 1 h 和 6 h, 瑞马唑仑组小鼠腹腔注射 8 mg/kg 的瑞马唑仑; 瑞马唑仑+EX527 组小鼠在腹腔注射 8 mg/kg 瑞马唑仑的同时腹腔注射 5 mg/kg EX527; EX527 组小鼠腹腔注射 5 mg/kg EX527; 假手术组、模型组腹腔注射等量生理盐水。

1.2.2 小鼠存活率

干预结束后, 每组随机选择 10 只小鼠, 常规饲养, 观察并记录术后 7 d 内小鼠的死亡率。

1.2.3 Morris 水迷宫

每组随机取 10 只小鼠, 分别于手术前 1 d、CLP 术后 3、5、7 d 进行测试。水池共分为 I、II、III、IV 等四个象限且均等, 圆形隐藏平台置于第 IV 象限中央。倒入墨水后随机将小鼠面朝池壁放入水中。其中定位航行中, 从各象限起始点放入小鼠, 并记录起点至目的点时间 (逃避潜伏期); 超过 120 s 内未找到, 则记 120 s。然后将其引导至平台并停留 30 s。每天训练 4 次, 每次间隔 30 min, 记录逃避潜伏期并取平均值。CLP 术后第 8 天, 撤平台后将小鼠由第 I 象限放入并记录 120 s 内穿过平台次数。若小鼠时间越短, 次数越多, 提示记忆能力越强。

1.2.4 BBB 通透性测量

通过伊文斯蓝 (EB) 染料测试 BBB 通透性。每组随机取 6 只小鼠, 手术后 24 h 通过尾静脉注射 EB (2%, 5 mL/kg), 60 min 后对小鼠进行深度麻醉, 并用生理盐水经心脏灌注以去除血管内染料。收获每只小鼠的海马体并分别称重。海马在 1 mL 50% 三氯乙酸中均质化, 在 4℃ 下孵育过夜, 并在 13 000 r/min 下离心 30 min。通过分光光度计在 620 nm 处定量上清液中 EB 含量。结果表示为每克海马组织重量的 EB 量 (μ g)。

1.2.5 脑组织炎症因子和氧化应激水平检测

术后 24 h, 每组取 6 只小鼠右侧海马组织, 并制备组织匀浆液 (10%)。保持离心 3000 r/min, 15 min, 收集上清液, 炎症细胞因子 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平采用酶联免疫吸附 (ELISA) 测定。化学比色法检测脑组织氧化应激指标 MDA 水平和 SOD、CAT 活性。

1.2.6 HE 染色观察海马组织病理学变化

将每组 6 只小鼠左侧海马组织用 4% 多聚甲醛固定, 并包埋在石蜡中, 行冠状切片 (4 μ m)。脱蜡、水合后, 苏木精染色 3 ~ 5 min, 在 1% 盐酸酒精中分化处理。在自来水中清洗切片 15 min 后, 用伊红染色 1 ~ 4 min。在光学显微镜下观察海马 CA1 区神经元形态学变化。

1.2.7 TUNEL 法检测神经元凋亡

取脑海马组织石蜡切片, 脱蜡后用 0.1% (v/v) Triton X-100 在 37℃ 下密封 15 min。PBS 洗涤, 在黑暗中用 TUNEL 溶液在 37℃ 下孵育 1 h。PBS 再次

洗涤后,将切片与 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)在 37℃下孵育 15 min。封片后,在 Olympus FV1000 共聚焦显微镜下观察 TUNEL 阳性神经元。每张切片随机选取海马 CA1 区 3 个视野计数 TUNEL 阳性神经元,计算凋亡指数。凋亡指数=(TUNEL 阳性神经元数/DAPI 阳性神经元总数)×100%。

1.2.8 蛋白免疫印迹(Western Blot)检测海马组织 Sirt1/FoxO1 通路相关蛋白表达

每组剩余 6 只小鼠在术后 24 h 处死,取脑后分离海马组织。组织在 RIPA 裂解液中于冰上进行匀浆。以 12 000 r/min 离心匀浆液 5 min(4℃),收集上清液并提取核蛋白。电泳分离后将蛋白质转至 PVDF 膜,与 5%脱脂牛奶(室温)一起振摇 1 h。将膜与以下一抗在 4℃下孵育过夜。一抗:Sirt1、Ac-FoxO1、FoxO1,1:1 000 稀释;Ac-NF-κB p65、NF-κB p65,1:500 稀释;GAPDH、Histone H3,1:5 000 稀释。随后,将膜与辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗一起孵育 1 h,增强化学发光试剂(ECL)进行可视化,Image J 软件分析蛋白质条带的灰度值。内参蛋白分别为 GAPDH(细胞质),Histone H3(细胞核),计算灰度比的目的蛋白的相对表达量。

1.3 统计学分析

实验所得数据以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行分析,单因素方差进行多组间比较,SNK-*q* 两两进一步比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

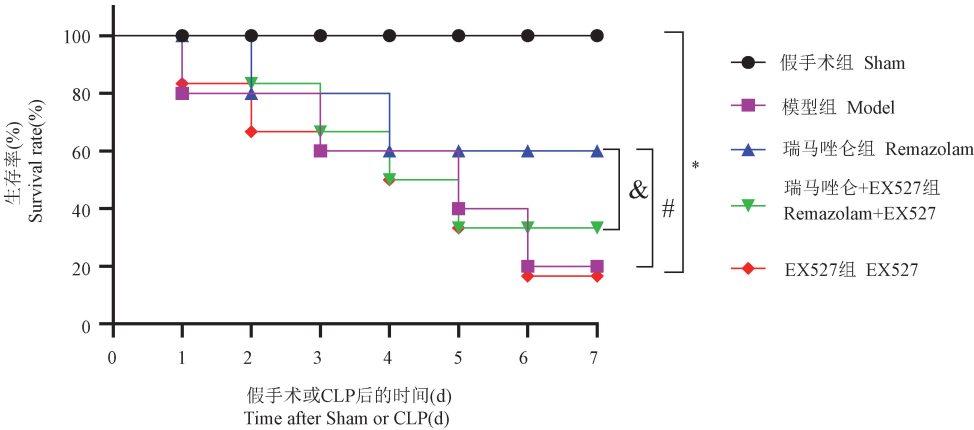
2 结果

2.1 瑞马唑仑对脓毒症小鼠存活率的影响

如图 1 所示,观察 7 d 后,假手术组小鼠全部存活(100%);与假手术组相比,模型组和 EX527 组小鼠手术后 7 d 的存活率(20%)显著下降($P < 0.05$);与模型组相比,瑞马唑仑组小鼠的存活率显著升高($P < 0.05$);与瑞马唑仑组相比,瑞马唑仑+EX527 组小鼠的存活率显著下降($P < 0.05$)。

2.2 瑞马唑仑对脓毒症小鼠认知功能的影响

模型组相对于假手术组,逃避潜伏期延长,穿越平台次数显著减少($P < 0.05$);瑞马唑仑组则逃避潜伏期相对模型组显著缩短,次数显著增多($P < 0.05$),EX527 组呈相反趋势($P < 0.05$);与瑞马唑仑组相比,瑞马唑仑+EX527 组显著延长逃避潜伏期,减少次数($P < 0.05$)。见表 1。



注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$;与瑞马唑仑组比较,& $P < 0.05$ 。(下表同)

图 1 各组小鼠的存活率

Note. Compared with sham group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$. Compared with remazolam group, & $P < 0.05$. (The same in the following tables)

Figure 1 Survival rate of mice in each group

2.3 瑞马唑仑对脓毒症小鼠 BBB 通透性的影响

与假手术组相比,模型组小鼠脑组织 EB 含量显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,瑞马唑仑组脑组织 EB 含量显著降低($P < 0.05$),EX527 组小鼠脑组织 EB 含量显著升高($P < 0.05$);与瑞马唑仑组相比,瑞马唑仑+EX527 组小鼠脑组织 EB 含量显著升高($P < 0.05$)。见表 2。

2.4 瑞马唑仑对脓毒症小鼠脑组织 IL-6、TNF-α、IL-1β 水平的影响

对比各组 IL-6、TNF-α、IL-1β 水平,模型组高于假手术组($P < 0.05$);瑞马唑仑组较模型组显著降低($P < 0.05$),EX527 组则显著升高($P < 0.05$);相对于瑞马唑仑组,瑞马唑仑+EX527 组小鼠显著升高($P < 0.05$)。见表 3。

表 1 各组小鼠逃避潜伏期和穿越平台次数比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Comparison of escape latency and platform crossing times of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别 Groups	逃避潜伏期 (s) Escape latency (s)				穿越平台次数(次) Number of crossing platforms (times)
	CLP 前 Before CLP	3 d	5 d	7 d	
假手术组 Sham	21.80 ± 2.43	23.04 ± 2.59	22.18 ± 2.32	20.60 ± 2.27	10.60 ± 1.55
模型组 Model	23.19 ± 2.52	84.82 ± 10.31 *	75.76 ± 9.24 *	61.35 ± 7.48 *	2.57 ± 0.30 *
瑞马唑仑组 Remazolam	24.47 ± 2.61	52.39 ± 5.74 *#	43.20 ± 4.58 *#	32.41 ± 3.75 *#	5.86 ± 0.64 *#
瑞马唑仑+EX527 组 Remazolam+EX527	22.56 ± 2.48	76.50 ± 8.12 * &Δ	68.15 ± 7.19 * &Δ	55.06 ± 6.48 * &Δ	3.01 ± 0.39 * &Δ
EX527 组 EX527	23.95 ± 2.70	95.47 ± 9.85 *#&	87.42 ± 8.65 *#&	79.57 ± 8.25 *#&	1.39 ± 0.20 *#&

注:与 EX527 组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。(下表同)
Note. Compared with EX527 group, $^{\Delta}P < 0.05$. (The same in the following tables)

表 2 各组小鼠脑组织 EB 含量比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Comparison of EB content in brain tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Groups	EB(μg/g)
假手术组 Sham	1.91 ± 0.28
模型组 Model	5.40 ± 0.63 *
瑞马唑仑组 Remazolam	3.56 ± 0.41 *#
瑞马唑仑+EX527 组 Remazolam+EX527	5.17 ± 0.59 * &Δ
EX527 组 EX527	6.82 ± 0.70 *#&

2.5 瑞马唑仑对脓毒症小鼠脑组织 MDA 水平和 SOD、CAT 活性的影响

与假手术组相比,模型组小鼠脑组织 MDA 水平显著升高, SOD 和 CAT 活性显著降低 ($P < 0.05$);与模型组相比,瑞马唑仑组脑组织 MDA 水平显著降低, SOD 和 CAT 活性显著升高 ($P < 0.05$), EX527 组小鼠脑组织 MDA 水平显著升高, SOD 和 CAT 活性显著降低 ($P < 0.05$);与瑞马唑仑组相比,瑞马唑仑+EX527 组小鼠脑组织 MDA 水平显著升高, SOD 和 CAT 活性显著降低 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 3 各组小鼠脑组织 IL-6、TNF-α 和 IL-1β 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Comparison of the levels of IL-6, TNF-α and IL-1β in the brain tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Groups	IL-6 (pg/mg)	TNF-α (pg/mg)	IL-1β (pg/mg)
假手术组 Sham	4.53 ± 0.62	80.65 ± 11.43	21.32 ± 2.75
模型组 Model	11.78 ± 1.14 *	231.49 ± 25.17 *	67.94 ± 7.40 *
瑞马唑仑组 Remazolam	6.90 ± 0.83 *#	125.30 ± 16.25 *#	35.08 ± 4.13 *#
瑞马唑仑+EX527 组 Remazolam+EX527	10.65 ± 0.96 * &Δ	204.78 ± 23.19 * &Δ	59.52 ± 6.29 * &Δ
EX527 组 EX527	15.12 ± 1.07 *#&	269.24 ± 28.16 *#&	80.47 ± 8.11 *#&

表 4 各组小鼠脑组织 MDA 水平和 SOD、CAT 活性比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Comparison of levels of MDA and activities of SOD and CAT in brain tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Groups	MDA (nmol/mg)	SOD (U/mg)	CAT (U/mg)
假手术组 Sham	12.50 ± 1.71	130.44 ± 12.06	25.30 ± 2.14
模型组 Model	39.43 ± 3.24 *	48.25 ± 6.37 *	8.49 ± 1.08 *
瑞马唑仑组 Remazolam	20.89 ± 2.55 *#	106.36 ± 10.84 *#	19.52 ± 1.77 *#
瑞马唑仑+EX527 组 Remazolam+EX527	34.25 ± 3.76 * &Δ	59.07 ± 7.12 * &Δ	10.16 ± 1.35 * &Δ
EX527 组 EX527	50.18 ± 4.59 *#&	32.15 ± 5.60 *#&	5.27 ± 0.82 *#&

2.6 瑞马唑仑对脓毒症小鼠脑组织海马神经元病理损伤的影响

假手术组可见小鼠脑组织海马 CA1 区的神经元形态排列规则且紧密,细胞结构完整,细胞膜和

细胞核清晰,无明显肿胀和坏死;与假手术组比,模型组和 EX527 组小鼠脑组织海马 CA1 区神经元排列稀疏,大小、形状不规则,数量减少,细胞结构模糊,可见较多的神经元变性和核固缩,大量炎症细

胞浸润;与模型组比,瑞马唑仑组脑组织海马 CA1 区神经元数量增加,变性神经元数量和炎症细胞浸润减少;与瑞马唑仑组相比,瑞马唑仑+EX527 组小鼠脑组织海马 CA1 区神经元数量减少,炎症细胞浸润增加。见图 2。

2.7 瑞马唑仑对脓毒症小鼠脑组织海马神经元凋亡的影响

模型组小鼠脑组织海马 CA1 区相对于假手术组,TUNEL 阳性神经元数量增加,凋亡指数显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,瑞马唑仑组脑组织海马 CA1 区 TUNEL 阳性神经元数量减少,凋亡指数显著降低($P < 0.05$),EX527 组小鼠脑组织海马 CA1 区 TUNEL 阳性神经元数量增加,凋亡指数显著升高($P < 0.05$);与瑞马唑仑组相比,瑞马唑仑+EX527 组小鼠脑组织海马 CA1 区 TUNEL 阳性神经元数量增加,凋亡指数显著升高($P < 0.05$)(图 3、表 5)。

2.8 瑞马唑仑对脓毒症小鼠海马组织 Sirt1/FoxO1 通路相关蛋白表达的影响

与假手术组相比,模型组小鼠海马组织 Sirt1 和胞质 NF- κ B p65 蛋白水平显著降低,Ac-FoxO1/FoxO1 比值和 Ac-NF- κ B p65、胞核 NF- κ B p65 蛋白水平显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,瑞马唑仑组海马组织 Sirt1 和胞质 NF- κ B p65 蛋白水平显著升高,Ac-FoxO1/FoxO1 比值和 Ac-NF- κ B p65、胞核 NF- κ B p65 蛋白水平显著降低($P < 0.05$),EX527 组小鼠海马组织 Sirt1 和胞质 NF- κ B p65 蛋白水平显著降低,Ac-FoxO1/FoxO1 比值和 Ac-NF- κ B p65、胞核 NF- κ B p65 蛋白水平显著升高($P < 0.05$);与瑞马唑仑组相比,瑞马唑仑+EX527 组小鼠海马组织 Sirt1 和胞质 NF- κ B p65 蛋白水平显著降低,Ac-FoxO1/FoxO1 比值和 Ac-NF- κ B p65、胞核 NF- κ B p65 蛋白水平显著升高($P < 0.05$)。见图 4、表 6。

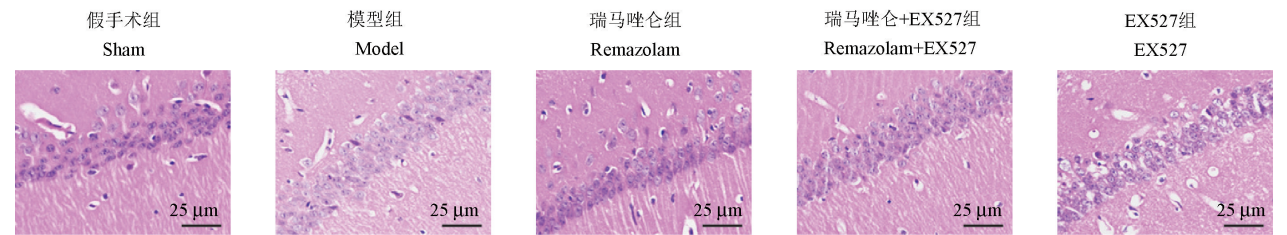


图 2 各组小鼠海马 CA1 区神经元的病理变化
Figure 2 Pathological changes of neurons in hippocampal CA1 area of mice in each group

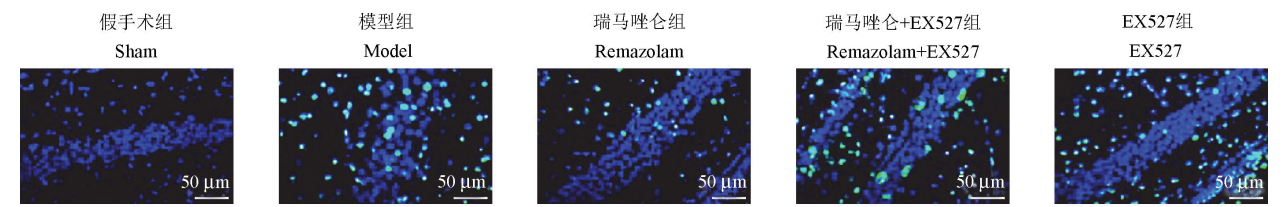


图 3 各组小鼠脑组织海马 CA1 区神经元凋亡
Figure 3 Apoptosis of neurons in hippocampal CA1 area of mouse brain in each group

表 5 各组小鼠脑组织海马 CA1 区神经元凋亡指数比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Comparison of apoptosis index of neurons in hippocampal CA1 area of mouse brain in each group($\bar{x} \pm s, n = 6$)	
组别 Groups	凋亡指数 (%) Apoptosis index (%)
假手术组 Sham	2.39 ± 0.28
模型组 Model	24.17 ± 2.65 *
瑞马唑仑组 Remazolam	10.52 ± 1.49 **
瑞马唑仑+EX527 组 Remazolam+EX527	20.58 ± 2.30 *Δ
EX527 组 EX527	31.41 ± 2.75 *#&

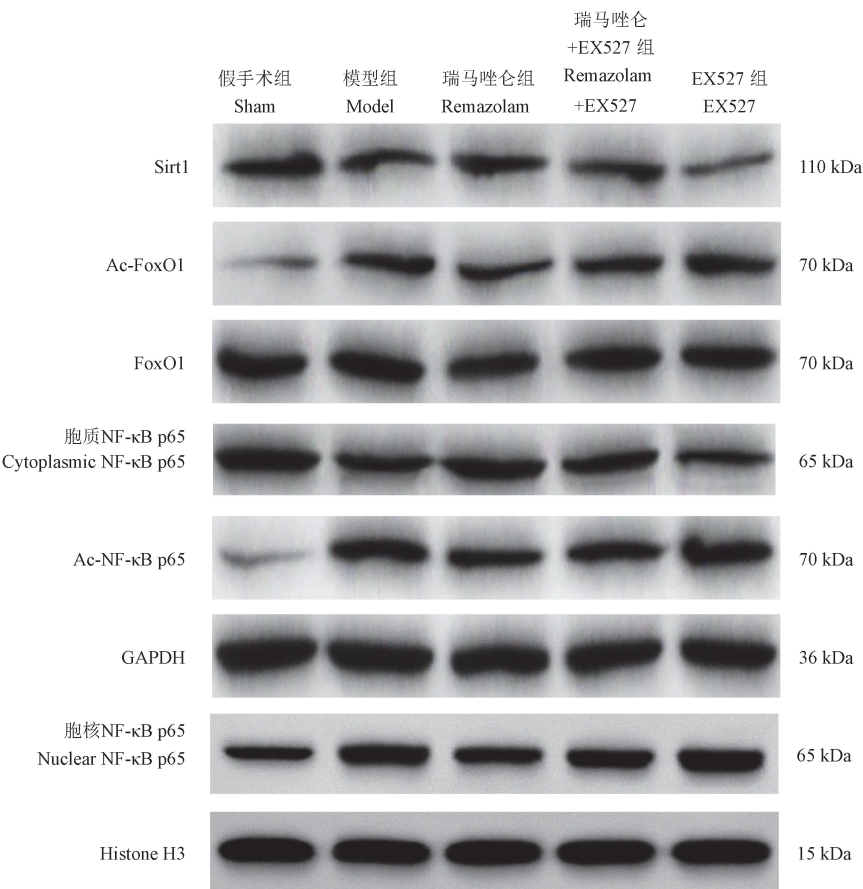


图 4 各组小鼠海马组织 Sirt1/FoxO1 通路相关蛋白表达

Figure 4 Expression of Sirt1/FoxO1 pathway-related proteins in the hippocampus of mice in each group

表 6 各组小鼠海马组织蛋白水平比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 6 Comparison of protein levels in hippocampus of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	Sirt1	Ac-FoxO1/FoxO1	Ac-NF-κB p65	胞质 NF-κB p65 Cytoplasmic NF-κB p65	胞核 NF-κB p65 Nuclear NF-κB p65
假手术组 Sham	0.73 ± 0.08	0.18 ± 0.03	0.10 ± 0.02	0.84 ± 0.09	0.25 ± 0.04
模型组 Model	0.24 ± 0.04 *	0.56 ± 0.07 *	0.70 ± 0.08 *	0.21 ± 0.03 *	0.76 ± 0.08 *
瑞马唑仑组 Remazolam	0.58 ± 0.07 *#	0.32 ± 0.05 *#	0.38 ± 0.05 *#	0.53 ± 0.06 *#	0.40 ± 0.05 *#
瑞马唑仑+EX527 组 Remazolam+EX527	0.30 ± 0.05 *&Δ	0.49 ± 0.06 *&Δ	0.59 ± 0.07 *&Δ	0.25 ± 0.04 *&Δ	0.72 ± 0.08 *&Δ
EX527 组 EX527	0.13 ± 0.02 *#&	0.70 ± 0.08 *#&	0.84 ± 0.09 *#&	0.12 ± 0.02 *#&	0.89 ± 0.09 *#&

3 讨论

SAE 是脓毒症器官功能障碍的主要表现之一。越来越多的证据表明,过度炎症、氧化应激、BBB 破坏为脓毒症诱导的脑损伤的潜在机制^[2-3]。脓毒症会导致患者出现认知功能障碍,海马区是学习和记忆形成的重要位置,与认知功能密切相关。缺氧和缺血引起的脑损伤会增强炎症介质的合成和氧化应激;这些过程引发神经元炎症和氧化损伤,刺激神经元凋亡,导致海马损伤。因此,本研究评估了

瑞马唑仑对脓毒症引起的脑损伤小鼠认知功能、海马神经元炎症、氧化应激和细胞凋亡的影响。

瑞马唑仑是一种新型苯二氮卓类激动剂,它可以在提供快速麻醉和唤醒的同时稳定血流动力学,并且对呼吸产生较小的抑制作用;同时,长时间输注或更高剂量的瑞马唑仑不会积累和延长效果,代谢物没有任何药理作用^[17]。由于这些优势,瑞马唑仑的应用前景广阔。自 2020 年 12 月在中国获得国家药监局批准使用以来,瑞马唑仑广泛应用于包括脓毒症患者在内的成人全身麻醉和 ICU 镇静。据

报道,瑞马唑仑可显著抑制 LPS 诱导的炎症介质(如 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β)的释放,提高脓毒症小鼠的存活率,减轻肺和肝等多器官损伤^[9,12]。在本研究中,瑞马唑仑通过提高 CLP 术后 7 d 小鼠的存活率,挽救了脓毒症所致的死亡,并通过维持 BBB 完整性、抑制神经元凋亡,改善了小鼠的认知功能,减轻了小鼠 CLP 后脓毒症性脑损伤。此外,氧化应激和炎症都是在脓毒症期间触发神经细胞凋亡和坏死从而导致神经元丢失和脑损伤的重要因素^[18]。与之前的研究一致,CLP 手术显著促进了小鼠脑组织中的炎症反应和氧化应激。瑞马唑仑可减少脑海马组织中促炎细胞因子(TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β)的产生,降低 MDA 水平,升高 SOD 和 CAT 活性,抑制神经元炎症和氧化应激。表明瑞马唑仑对脓毒症具有潜在的治疗益处。

Sirt1 是一种重要的 NAD⁺ 依赖性脱乙酰酶,可调节氧化应激反应、炎症、凋亡和细胞衰老,其激活可保护神经系统疾病^[19]。研究表明 Sirt1 的激活可以减轻脓毒症引起的多器官损伤,包括脑^[4]、肾^[20]和肝^[21]。据报道,Sirt1 相关蛋白 FoxO1 可促进 SOD、CAT 合成,而 Sirt1 直接去乙酰化 FoxO1 后可刺激保护细胞基因表达^[22]。激活 NF- κ B 可增强 IL-6、IL-1 β 等促炎因子转录,并影响脓毒症进展。Sirt1 去乙酰化 NF- κ B 并激活,继而发挥保护神经作用^[23]。在本研究中,瑞马唑仑明显上调了 Sirt1 表达,降低了 Ac-FoxO1、Ac-NF- κ B p65 水平,并减少了细胞质 NF- κ B p65 向细胞核的迁移,显著减轻 CLP 诱导脓毒症小鼠脑组织氧化应激和炎症因子水平上调,及神经元凋亡。EX527 是一种 Sirt1 抑制剂,因此,本研究还探索了 EX527 诱导的变化。结果表明,EX527 的干预抑制了 Sirt1 表达,下调了海马中细胞质 NF- κ B p65 的表达,上调了 Ac-NF- κ B p65 和核 NF- κ B p65 表达,部分消除了瑞马唑仑对 SAE 小鼠的保护作用。提示,Sirt1 的激活和下游信号(FoxO1、NF- κ B)的调节与瑞马唑仑的神经保护作用有关。

综上所述,瑞马唑仑可提高脓毒症小鼠存活率,通过维持 BBB 完整性、抑制神经炎症和氧化应激,减少神经元凋亡,减轻脓毒症引起的脑损伤;其作用机制可能与激活 Sirt1/FoxO1 通路,抑制 NF- κ B 活化有关。然而,瑞马唑仑是否具有抗菌作用,以及能否作为一种抗生素用于脓毒症感染相关的辅助治疗,仍有待研究。此外,由于瑞马唑仑为短效

的苯二氮卓类药物,需要进一步研究以准确确定瑞马唑仑的最佳给药剂量和给药方式。

参 考 文 献(References)

- [1] Tauber SC, Djukic M, Gossner J, et al. Sepsis-associated encephalopathy and septic encephalitis: an update [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2021, 19(2): 215-231.
- [2] 邱名耀, 吴梅秋, 张玮芳, 等. 绞股蓝总皂苷经 PI3K/Akt/Bax 信号通路对脓毒症大鼠脑损伤的改善作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(3): 23-29.
Qiu MY, Wu MQ, Zhang WF, et al. Gypenosides alleviate brain injury in septic rats via the PI3K/Akt/Bax signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(3): 23-29.
- [3] Catarina AV, Branchini G, Bettoni L, et al. Sepsis-associated encephalopathy: from pathophysiology to progress in experimental studies [J]. Mol Neurobiol, 2021, 58(6): 2770-2779.
- [4] Huang L, Chen J, Li X, et al. Polydatin improves sepsis-associated encephalopathy by activating Sirt1 and reducing p38 phosphorylation [J]. J Surg Res, 2022, 276(1): 379-393.
- [5] 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, 2019, 363(1): 34-46.
- [6] 罗涛, 付湘云, 黄蕊, 等. 丙泊酚通过激活 Nrf2/HO-1 减轻脓毒症小鼠脑损伤 [J]. 武汉大学学报(医学版), 2022, 43(5): 721-726.
Luo T, Fu XY, Huang R, et al. Propofol attenuates brain injury in mice with sepsis by activating Nrf2/HO-1 [J]. Med J Wuhan Univ, 2022, 43(5): 721-726.
- [7] Chen H, Peng Y, Wang L, et al. Sevoflurane attenuates cognitive dysfunction and NLRP3-dependent caspase-1/11-GSDMD pathway-mediated pyroptosis in the hippocampus via upregulation of SIRT1 in a sepsis model [J]. Arch Physiol Biochem, 2020, 1(1): 1-8.
- [8] Sun YB, Zhao H, Mu DL, et al. Dexmedetomidine inhibits astrocyte pyroptosis and subsequently protects the brain in in vitro and in vivo models of sepsis [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(3): 167-179.
- [9] Liu X, Lin S, Zhong Y, et al. Remimazolam protects against LPS-induced endotoxicity improving survival of endotoxemia mice [J]. Front Pharmacol, 2021, 12(1): 739603-739614.
- [10] Shi M, Chen J, Liu T, et al. Protective effects of Remimazolam on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting of NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis [J]. Drug Des Devel Ther, 2022, 16(1): 413-423.
- [11] 张震, 黄锦秀, 李长生, 等. 瑞马唑仑预先给药对小鼠丘脑出血性脑损伤的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2021, 41(12): 1518-1522.
Zhang Z, Huang JX, Li CS, et al. Effects of pre-administration of remazolam on thalamic hemorrhagic brain injury in mice [J]. Chin J Anaesthesiol, 2021, 41(12): 1518-1522.
- [12] Fang H, Zhang Y, Wang J, et al. Remimazolam reduces sepsis-

associated acute liver injury by activation of peripheral benzodiazepine receptors and p38 inhibition of macrophages [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 101: 108331.

[13] Liu XB, Xia H, Wang G, et al. Propofol relieves oxidative stress response of cerebral ischemiareperfusion injury through SIRT1 signaling pathway [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2020, 34(3): 435-443.

[14] Wang R, Xie Y, Qiu J, et al. The effects of dexmedetomidine in a rat model of sepsis-induced lung injury are mediated through the adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/silent information regulator 1 (SIRT1) pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26(1): 919213-919221.

[15] Li L, Liu X, Li S, et al. Tetrahydrocurcumin protects against sepsis-induced acute kidney injury via the SIRT1 pathway [J]. *Ren Fail*, 2021, 43(1): 1028-1040.

[16] 郑李娜, 汪智玮, 王瑶琪, 等. 富氢液对脓毒症相关性脑病小鼠海马线粒体生物合成和动力学的影响 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2022, 42(3): 333-337.

Zheng LN, Wang ZW, Wang YQ, et al. Effects of hydrogen-rich solution on mitochondrial biosynthesis and dynamics in the hippocampus of mice with sepsis-associated encephalopathy [J]. *Chin J Anaesthesiol*, 2022, 42(3): 333-337.

[17] Wesolowski AM, Zaccagnino MP, Malapero RJ, et al. Remimazolam: pharmacologic considerations and clinical role in anesthesiology [J]. *Pharmacotherapy*, 2016, 36(9): 1021-1027.

[18] Gu M, Mei XL, Zhao YN. Sepsis and cerebral dysfunction: BBB damage, neuroinflammation, oxidative stress, apoptosis and autophagy as key mediators and the potential therapeutic approaches [J]. *Neurotox Res*, 2021, 39(2): 489-503.

[19] 古春青, 张运克, 杨广华, 等. 虾青素预处理通过调控 Sirt1/miR-134 信号通路改善脑缺血再灌注大鼠认知功能 [J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37(9): 1620-1627.

Gu CQ, Zhang YK, Yang GH, et al. Astaxanthin preconditioning improves cognitive function in rats with cerebral ischemia-reperfusion by regulating Sirt1/miR-134 signaling pathway [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2021, 37(9): 1620-1627.

[20] Deng Z, Sun M, Wu J, et al. SIRT1 attenuates sepsis-induced acute kidney injury via Beclin1 deacetylation-mediated autophagy activation [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(2): 217-289.

[21] Su H, Ma Z, Guo A, et al. Salvianolic acid B protects against sepsis-induced liver injury via activation of SIRT1/PGC-1 α signaling [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(3): 2675-2683.

[22] 朱仁英, 郎玉玲, 王久英, 等. 羟基红花黄色素 A 通过调控 Sirt1/FOXO1 信号通路减轻大鼠肝缺血再灌注损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37(6): 1099-1106.

Zhu RY, Lang YL, Wang JY, et al. Hydroxysafflor yellow A attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury in rats by regulating Sirt1/FOXO1 signaling pathway [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2021, 37(6): 1099-1106.

[23] Pan S, Wu Y, Pei L, et al. BML-111 reduces neuroinflammation and cognitive impairment in mice with sepsis via the SIRT1/NF- κ B signaling pathway [J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12(1): 267-282.

[收稿日期] 2022-09-07

《中国实验动物学报》刊期变更通知

为缩短出版周期,及时反映本学科最新科技动态,应广大读者、作者要求,本刊向主管部门及北京市新闻出版局提出申请变更刊期。经批准《中国实验动物学报》自 2022 年 8 月份起由双月刊变更为月刊。从 2023 年期起全年共 12 期。

欢迎读者积极订阅! 欢迎各位学者踊跃投稿!