

# $\alpha 7$ 亚基烟碱乙酰胆碱受体在右美托咪定防治内毒素血症小鼠谵妄中的作用

张雪艳 李志峰 孙晓晨 靳凤 刘俊廷 李建国

430071 湖北武汉, 武汉大学中南医院重症医学科

通讯作者: 李建国, Email: drljg1817@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.02.009

**【摘要】目的** 观察  $\alpha 7$  亚基烟碱乙酰胆碱受体 ( $\alpha 7nAChR$ ) 在右美托咪定 (DEX) 防治内毒素血症谵妄发生中的作用, 并探讨其作用机制。**方法** 将 100 只雄性 C57BL/6 小鼠按随机数字表法分为生理盐水对照组 (NS 组)、DEX 对照组、脂多糖 (LPS) 诱导内毒素血症模型组 (LPS 组)、DEX 保护组 (DEX+LPS 组)、 $\alpha$ -银环蛇毒素拮抗组 ( $\alpha$ -BGT+DEX+LPS 组), 每组 20 只。采用腹腔注射 LPS 20 mg/kg 制备内毒素血症模型, NS 组和 DEX 对照组给予等量生理盐水。DEX 对照组、DEX+LPS 组和  $\alpha$ -BGT+DEX+LPS 组小鼠于制模前 15 min 腹腔注射 DEX 40  $\mu$ g/kg,  $\alpha$ -BGT+DEX+LPS 组于注射 DEX 前 15 min 腹腔注射  $\alpha 7nAChR$  抑制剂  $\alpha$ -BGT 1  $\mu$ g/kg; NS 组给予等量生理盐水。制模前及制模后 24 h 每组取 10 只小鼠进行旷场实验, 实验结束后处死小鼠留取标本, 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测血清肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 水平, 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测海马组织胆碱乙酰转移酶 (ChAT) 及乙酰胆碱酯酶 (AChE) 表达量。另取 10 只小鼠行新物体识别实验, 观察训练阶段探究总时间及制模后 3 h 和 24 h 的偏好指数。**结果** NS 组和 DEX 对照组各项指标比较差异均无统计学意义。① 旷场实验结果显示, 制模前各组旷场实验观察指标均无差异。制模后 24 h, 与 NS 组比较, LPS 组小鼠表现为对新环境的认知、学习和记忆能力均下降, 紧张度增加; DEX 可明显改善小鼠的上述变化; 而  $\alpha$ -BGT 可部分拮抗 DEX 对谵妄小鼠的保护作用。② 新物体识别实验结果显示, 与 NS 组比较, LPS 组小鼠探究新事物的能力下降; DEX 可改善小鼠的探究能力; 而  $\alpha$ -BGT 可拮抗 DEX 的保护作用。③ ELISA 结果显示, LPS 组血清 TNF- $\alpha$  和 NSE 水平较 NS 组明显升高, DEX 可抑制 LPS 诱导的血清 TNF- $\alpha$  和 NSE 水平升高, 而  $\alpha$ -BGT 可拮抗 DEX 的保护作用 [NS 组、LPS 组、DEX+LPS 组、 $\alpha$ -BGT+DEX+LPS 组 TNF- $\alpha$  (ng/L) 分别为  $23.72 \pm 3.13$ 、 $808.78 \pm 87.86$ 、 $192.96 \pm 31.47$ 、 $829.99 \pm 80.98$ , NSE ( $\mu$ g/L) 分别为  $8.70 \pm 0.74$ 、 $25.90 \pm 3.03$ 、 $18.10 \pm 2.14$ 、 $23.12 \pm 2.21$ , 均  $P < 0.01$ ]。④ Western Blot 结果显示, 与 NS 组比较, LPS 组海马组织 ChAT 表达明显下降, AChE 表达明显升高, DEX 可逆转 ChAT 和 AChE 的表达变化, 而  $\alpha$ -BGT 可拮抗 DEX 的保护作用 [NS 组、LPS 组、DEX+LPS 组、 $\alpha$ -BGT+DEX+LPS 组 ChAT (灰度值) 分别为  $1.536 \pm 0.150$ 、 $0.381 \pm 0.138$ 、 $0.914 \pm 0.173$ 、 $0.628 \pm 0.088$ , AChE (灰度值) 分别为  $0.382 \pm 0.201$ 、 $1.843 \pm 0.325$ 、 $0.898 \pm 0.155$ 、 $1.470 \pm 0.220$ ,  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ]。**结论** 内毒素血症小鼠可发生谵妄等认知功能障碍; DEX 可通过调节脑内神经递质 AChE 和 ChAT 的表达量而改善谵妄症状, 从而起到脑保护作用, 其机制可能与  $\alpha 7nAChR$  有关。

**【关键词】** 内毒素血症; 谵妄; 右美托咪定; 乙酰胆碱;  $\alpha 7$  亚基烟碱乙酰胆碱受体

**基金项目:** 国家自然科学基金 (30972852)

**Role of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor in attenuation of endotoxin induced delirium with dexmedetomidine in mice** Zhang Xueyan, Li Zhifeng, Sun Xiaochen, Jin Feng, Liu Junting, Li Jianguo

Department of Critical Care Medicine, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China

Corresponding author: Li Jianguo, Email: drljg1817@163.com

**【Abstract】Objective** To observe the role of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor ( $\alpha 7nAChR$ ) in the protection against delirium by the use of dexmedetomidine (DEX) in endotoxin derived delirium and its mechanism. **Methods** 100 male adult C57BL/6 mice were randomly divided into normal saline control group (NS group), DEX control group, lipopolysaccharide (LPS) induced endotoxemia model group (LPS group), DEX protection group (DEX+LPS group), and  $\alpha$ -bungarotoxin antagonism group ( $\alpha$ -BGT+DEX+LPS group), with 20 mice in each group. A model of endotoxemia was reproduced by intraperitoneal injection of LPS 20 mg/kg, and the mice in NS group and DEX control group were given equivalent sterile normal saline. The mice in DEX control group, DEX+LPS group,

and  $\alpha$ -BGT+DEX+LPS group were intraperitoneally injected with DEX 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  15 minutes before LPS injection. The mice in  $\alpha$ -BGT+DEX+LPS group were intraperitoneally injected with  $\alpha$ 7nAChR inhibitor  $\alpha$ -BGT 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  15 minutes before DEX injection. The mice in NS group were given equivalent sterile normal saline. Ten mice in each group were assigned for open field test before and 24 hours after model reproduction, and the mice were then sacrificed to obtain the specimens. The levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and neuron-specific enolase (NSE) in serum were determined by enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA). Western Blot method was used to determine the expression of choline acetyltransferase (ChAT) and acetylcholinesterase (AChE) in hippocampus. Another 10 mice were subjected to new object recognition test to observe the total exploration time during training period and preference index at 3 hours and 24 hours after LPS challenge. **Results** There were no significant differences in all parameters between NS group and DEX control group. ① It was shown by the open field test results that there were no significant differences in all parameters of open field test before model reproduction among all the groups. Twenty-four hours after model reproduction, when compared with NS group, the mice in LPS group showed that they had the ability of cognition of new environment, but learning and memory abilities were lowered, and tension was increased. DEX could significantly attenuate the degree of delirium, however, the protection of DEX from the delirious syndrome was antagonized partly by  $\alpha$ -BGT. ② The new object recognition test results showed that compared with NS group, the ability of exploring new object was decreased in LPS group. DEX could significantly improve the exploration ability. However, DEX failed to control the delirious syndrome in  $\alpha$ -BGT+DEX+LPS group. ③ The results of ELISA showed that the levels of TNF- $\alpha$  and NSE in serum were significantly increased in LPS groups as compared with that in NS group, and the levels of TNF- $\alpha$  and NSE were significantly decreased in DEX+LPS group. However,  $\alpha$ -BGT could antagonise the protective effect of DEX [TNF- $\alpha$  (ng/L) in NS, LPS, DEX+LPS and  $\alpha$ -BGT+DEX+LPS groups was  $23.72 \pm 3.13$ ,  $808.78 \pm 87.86$ ,  $192.96 \pm 31.47$ ,  $829.99 \pm 80.98$ , respectively, and NSE ( $\mu\text{g}/\text{L}$ ) was  $8.70 \pm 0.74$ ,  $25.90 \pm 3.03$ ,  $18.10 \pm 2.14$ , and  $23.12 \pm 2.21$ , respectively, all  $P < 0.01$ ]. ④ The results of Western Blot showed that compared with NS group, the protein expression of ChAT in LPS group was significantly declined, and the protein expression of AChE was significantly increased. DEX could reverse the expressions of ChAT and AChE, however,  $\alpha$ -BGT could reverse the protective effect of DEX [ChAT (gray value) in NS, LPS, DEX+LPS and  $\alpha$ -BGT+DEX+LPS groups was  $1.536 \pm 0.150$ ,  $0.381 \pm 0.138$ ,  $0.914 \pm 0.173$ ,  $0.628 \pm 0.088$ , respectively, and AChE (gray value) was  $0.382 \pm 0.201$ ,  $1.843 \pm 0.325$ ,  $0.898 \pm 0.155$ , and  $1.470 \pm 0.220$ , respectively,  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ]. **Conclusions** Delirium syndrome may occur in mice with endotoxemia. DEX could attenuate endotoxemia-associated delirium syndrome through transforming central neurotransmitter, and its mechanism maybe related with  $\alpha$ 7nAChR.

**【Key words】** Endotoxemia; Delirium; Dexmedetomidine; Acetylcholine;  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptor

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (30972852)

脓毒症是由各种细菌、真菌、病毒及寄生虫等病原体感染或有高度可疑的感染灶引起的全身炎症反应综合征(SIRS)<sup>[1]</sup>。谵妄在脓毒症患者中的发生率很高,是影响重症患者预后的独立危险因素<sup>[2]</sup>。但目前脓毒症导致谵妄的有关机制还未引起人们的足够重视。因此,深入探索脓毒症引起谵妄等认知功能障碍的确切发生机制和干预措施,具有非常重要的理论价值和临床意义。右美托咪定(DEX)是一种新型高选择性 $\alpha_2$ 肾上腺素能受体激动剂。研究表明 DEX 在临床应用于机械通气患者具有独特的优势<sup>[3-5]</sup>,而它潜在的大脑及神经保护作用也已成为国内外的研究热点<sup>[6-7]</sup>。近年来有研究表明,DEX 可能通过增加中枢乙酰胆碱(ACh)来防治谵妄的发生发展,而 ACh 是胆碱能抗炎通路的主要递质<sup>[8-9]</sup>。胆碱能抗炎通路是指在各种刺激因素作用下,迷走神经传出纤维的传出冲动增

加,促使其主要递质 ACh 大量释放, ACh 与巨噬细胞等多种细胞表面的  $\alpha$ 7 亚基烟碱乙酰胆碱受体( $\alpha$ 7nAChR)结合,从而拮抗全身性炎症反应<sup>[10]</sup>,且该通路主要依赖迷走神经的完整性和  $\alpha$ 7nAChR。 $\alpha$ 7nAChR 是胆碱能神经系统中的一个重要部分,其涉及中枢神经系统的认知功能,近年来越来越多的文献支持  $\alpha$ 7nAChR 在 DEX 的神经及脑保护过程中起重要作用<sup>[11-12]</sup>。本研究拟探讨  $\alpha$ 7nAChR 在 DEX 防治内毒素血症谵妄发生中的作用,为进一步完善 DEX 防治谵妄的作用机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验仪器及试剂:**旷场实验及新物体识别实验采用上海欣软信息科技有限公司的 SuperMaze 动物行为分析系统, $\alpha$ 7nAChR 特异性拮抗剂  $\alpha$ -银环蛇毒素( $\alpha$ -BGT)、脂多糖(LPS, O55:B5,美国 Sigma 公司),DEX(艾贝宁,江苏恒瑞医药股份有限

公司,批号:13120332),肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )和神经元特异性烯醇化酶(NSE)试剂盒(武汉伊莱瑞特科技有限公司),一抗3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)、乙酰胆碱酯酶(AChE)、胆碱乙酰转移酶(ChAT,英国 Abcam 公司),二抗(美国 KPL 公司)。

**1.2 实验动物及分组:**清洁级雄性 C57BL/6 小鼠 100 只,8 周龄,体质量 24~28 g,由武汉大学动物实验中心提供,许可证号:SCXK(鄂)2008-0005。动物在室温( $22\pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 45%~65% 和明暗交替(12 h/12 h)环境中饲养,自由摄食和饮水。按随机数字表法将小鼠分为生理盐水对照组(NS 组)、DEX 对照组、LPS 组、DEX+LPS 组、 $\alpha$ -BGT+DEX+LPS 组,每组 20 只。

**1.3 动物模型制备及处理:**腹腔注射 LPS 20 mg/kg 制备内毒素血症小鼠模型,NS 组和 DEX 对照组给予等量的生理盐水。DEX 对照组、DEX+LPS 组和  $\alpha$ -BGT+DEX+LPS 组于注射生理盐水或 LPS 前 15 min 腹腔注射 DEX 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,其中  $\alpha$ -BGT+DEX+LPS 组于注射 DEX 前 15 min 腹腔注射  $\alpha$ -BGT 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;NS 组给予等量生理盐水。

**1.4 伦理学:**本实验动物处置方法符合动物伦理学标准。

### 1.5 观察指标及检测方法

**1.5.1 旷场实验:**各组取 10 只小鼠,于 LPS 注射前及注射后 24 h 按文献<sup>[13]</sup>方法进行旷场实验。每日 08:00~10:00 在安静房间内进行实验,将小鼠置于 40 cm $\times$ 40 cm $\times$ 40 cm 的旷场中 5 min,同步记录小鼠活动总路程、进入中央格次数及停留时间、垂直运动次数、修饰次数及大便粒数,以观察动物对新环境的探索、习惯以及伴随的情绪变化。每只小鼠实验结束后,清洁、擦拭实验箱及箱内物体,再放入下一只实验小鼠,以避免气味干扰。实验结束后每组处死 8 只小鼠用于指标检测。

**1.5.2 新物体识别实验:**各组另取 10 只小鼠,按文献<sup>[14]</sup>方法进行新物体识别实验,以研究小鼠的工作记忆、注意力、焦虑以及对新物体偏好。分别于制模后 3 h 和 24 h 在相同放置点放入小鼠,记录 5 min 内小鼠对新、旧物体的探究时间( $T_n$ 、 $T_f$ ),并计算偏好指数 $[T_n/(T_n+T_f)]$ 。实验分 3 个阶段:第 1 天为适应期,将小鼠置于 40 cm $\times$ 40 cm $\times$ 40 cm 隔音、避光的实验箱内,不放置物体,小鼠自由活动 20 min;第 2 天为熟悉期,在实验箱内一端放入两个形状、大小、质地相同的物体,距箱壁 8 cm,将小鼠背对物体

放入箱内,熟悉 5 min;第 3 天为测试期,用一个形状、大小、质地不同的物体替换小鼠在熟悉期不偏好的物体,位置不变。每只小鼠实验结束后,清洁、擦拭实验箱及箱内物体,再放入下一只实验小鼠,以避免气味干扰。

**1.5.3 血清 TNF- $\alpha$  及 NSE 水平的测定:**各组小鼠于旷场实验结束后取眼球血,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清 TNF- $\alpha$  和 NSE 水平。

**1.5.4 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测海马组织 AChE 及 ChAT 的蛋白表达:**各组小鼠于旷场实验结束后断头取脑,分离出海马组织,提取总蛋白,采用 BCA 法进行蛋白定量。取 30  $\mu\text{g}$  蛋白质样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),经转膜、封闭、漂洗后,分别加入一抗羊抗人 AChE、ChAT 和兔抗羊二抗孵育,洗涤后用化学发光液发光。以 GAPDH 作为内参照,以 AChE、ChAT 与 GAPDH 的灰度值比值表示 AChE 和 ChAT 的表达量。

**1.6 统计学处理:**采用 SPSS 19.0 软件处理数据,所有数据进行正态性检验和方差齐性检验。计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析和  $t$  检验; $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 旷场实验结果(表 1):**制模前各组旷场实验观察指标均无明显差异(均  $P>0.05$ )。制模后 24 h,与 NS 组相比,LPS 组小鼠进入中央格次数和停留时间、垂直运动次数及大便粒数均明显增加,而总路程、修饰次数明显减少(均  $P<0.01$ ),说明小鼠对新环境的认知、学习和记忆能力下降,紧张度增加。DEX+LPS 组小鼠进入中央格次数和停留时间、垂直运动次数及大便粒数均较 LPS 组明显减少,而总路程、修饰次数较 LPS 组明显增加(均  $P<0.01$ ),说明 DEX 可改善小鼠对新环境的认知、学习、记忆能力,缓解紧张情绪; $\alpha$ -BGT+DEX+LPS 组进入中央格次数和停留时间、垂直运动次数均较 DEX+LPS 组明显增加,总路程明显减少( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),说明  $\alpha$ -BGT 能部分拮抗 DEX 对谵妄小鼠的保护作用。DEX 对照组各项旷场实验指标与 NS 组比较差异均无统计学意义(均  $P>0.05$ )。

**2.2 新物体识别实验结果(表 2):**各组小鼠训练阶段探究总时间无明显差异( $P>0.05$ )。制模后 3 h 和 24 h LPS 组小鼠偏好指数较 NS 组显著降低(均  $P<0.01$ ),说明小鼠对新事物的探究能力下降。



表1 各组小鼠 LPS 诱导内毒素血症模型前后旷场实验观察指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	总路程 (mm)		进入中央格次数 (次)		中央格停留时间 (s)	
		制模前	制模后	制模前	制模后	制模前	制模后
NS 组	10	14960.29 ± 2487.01	10627.20 ± 938.70	22.90 ± 3.73	12.40 ± 3.17	22.34 ± 3.67	13.63 ± 4.49
DEX 对照组	10	15032.45 ± 2756.22	10004.61 ± 946.54	20.30 ± 4.99	15.00 ± 2.75	21.13 ± 4.25	13.03 ± 4.05
LPS 组	10	15168.98 ± 2404.91	7511.41 ± 1095.07 <sup>ab</sup>	24.50 ± 6.75	24.00 ± 4.59 <sup>ab</sup>	24.14 ± 7.54	34.88 ± 4.62 <sup>ab</sup>
DEX+LPS 组	10	15388.07 ± 2849.15	8846.06 ± 1289.64 <sup>acd</sup>	22.80 ± 5.63	11.70 ± 2.21 <sup>d</sup>	22.88 ± 7.78	11.98 ± 3.22 <sup>d</sup>
α-BGT+DEX+LPS 组	10	15105.81 ± 2795.95	7805.73 ± 1175.08 <sup>abf</sup>	23.20 ± 8.36	20.50 ± 5.06 <sup>abeg</sup>	23.27 ± 6.16	28.96 ± 7.84 <sup>abeg</sup>

组别	动物数 (只)	垂直运动次数 (次)		修饰次数 (次)		大便粒数 (粒)	
		制模前	制模后	制模前	制模后	制模前	制模后
NS 组	10	24.20 ± 7.90	18.60 ± 4.43	6.70 ± 1.49	7.10 ± 1.20	3.20 ± 1.81	2.10 ± 1.29
DEX 对照组	10	24.90 ± 9.69	19.70 ± 3.53	5.60 ± 1.90	6.50 ± 1.84	4.00 ± 1.25	2.30 ± 1.64
LPS 组	10	26.90 ± 5.61	26.80 ± 5.01 <sup>ab</sup>	6.50 ± 1.58	3.40 ± 0.97 <sup>ab</sup>	3.70 ± 0.95	4.00 ± 1.05 <sup>ab</sup>
DEX+LPS 组	10	22.40 ± 5.91	18.00 ± 5.01 <sup>d</sup>	6.10 ± 1.66	6.20 ± 1.62 <sup>d</sup>	4.10 ± 1.29	1.70 ± 1.34 <sup>d</sup>
α-BGT+DEX+LPS 组	10	23.70 ± 7.24	22.70 ± 5.48 <sup>f</sup>	7.20 ± 2.53	5.10 ± 0.74 <sup>abcd</sup>	3.40 ± 2.22	2.90 ± 1.29

注:LPS为脂多糖,NS为生理盐水,DEX为右美托咪定,α-BGT为α-银环蛇毒素;与NS组比较,<sup>a</sup>*P*<0.01;与DEX对照组比较,<sup>b</sup>*P*<0.01,<sup>c</sup>*P*<0.05;与LPS组比较,<sup>d</sup>*P*<0.01,<sup>e</sup>*P*<0.05;与DEX+LPS组比较,<sup>f</sup>*P*<0.05,<sup>g</sup>*P*<0.01

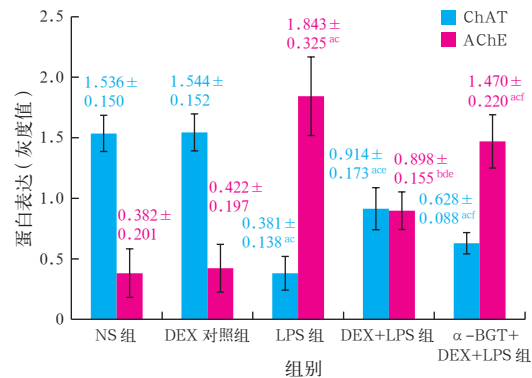
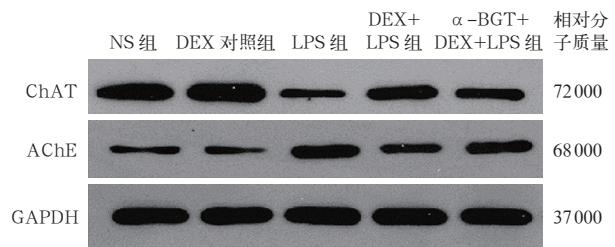
DEX+LPS 组偏好指数较 LPS 组明显升高 (均 *P*<0.01),说明 DEX 可改善谵妄小鼠对新事物的探究能力;而 α-BGT 可拮抗 DEX 的保护作用,以 24 h 作用更明显 (*P*<0.01)。DEX 对照组偏好指数与 NS 组比较无差异。

表2 各组小鼠新物体识别实验观察指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	训练阶段探究 总时间 (s)	偏好指数 (%)	
			制模 3 h	制模 24 h
NS 组	10	162.02 ± 10.84	67.0 ± 2.1	61.2 ± 2.1
DEX 对照组	10	162.62 ± 10.34	66.5 ± 2.5	60.6 ± 3.3
LPS 组	10	160.59 ± 10.74	56.5 ± 3.5 <sup>ab</sup>	50.2 ± 2.4 <sup>ab</sup>
DEX+LPS 组	10	162.19 ± 14.96	60.0 ± 2.1 <sup>abc</sup>	55.0 ± 2.2 <sup>abc</sup>
α-BGT+DEX+LPS 组	10	159.87 ± 12.91	58.0 ± 2.4 <sup>ab</sup>	52.0 ± 2.8 <sup>abd</sup>

注:NS为生理盐水,DEX为右美托咪定,LPS为脂多糖,α-BGT为α-银环蛇毒素;与NS组比较,<sup>a</sup>*P*<0.01;与DEX对照组比较,<sup>b</sup>*P*<0.01;与LPS组比较,<sup>c</sup>*P*<0.01;与DEX+LPS组比较,<sup>d</sup>*P*<0.01

**2.3 海马组织 AChE 及 ChAT 表达的比较 (图 1):** 与 NS 组比较,LPS 组海马组织 AChE 表达显著升高,ChAT 表达显著降低 (均 *P*<0.01);与 LPS 组比较,DEX+LPS 组 AChE 表达显著降低、ChAT 表达显著升高 (均 *P*<0.01),说明 DEX 可明显抑制内毒素血症时 AChE 和 ChAT 的表达;而 α-BGT 可拮抗 DEX 的保护作用 (均 *P*<0.05)。DEX 对照组两个指标与 NS 组比较均无差异。



Western Blot 为蛋白质免疫印迹试验,LPS为脂多糖,ChAT为胆碱乙酰转移酶,AChE为乙酰胆碱酯酶,NS为生理盐水,DEX为右美托咪定,α-BGT为α-银环蛇毒素,GAPDH为3-磷酸甘油醛脱氢酶;与NS组比较,<sup>a</sup>*P*<0.01,<sup>b</sup>*P*<0.05;与DEX对照组比较,<sup>c</sup>*P*<0.01,<sup>d</sup>*P*<0.05;与LPS组比较,<sup>e</sup>*P*<0.01;与DEX+LPS组比较,<sup>f</sup>*P*<0.05

图1 Western Blot 检测各组小鼠 LPS 诱导内毒素血症模型后 24 h 海马组织 ChAT 及 AChE 的表达

**2.4 血清 TNF-α、NSE 水平的比较 (表 3):** 与 NS 组比较,LPS 组血清 TNF-α、NSE 水平均显著升高 (均 *P*<0.01);DEX+LPS 组血清 TNF-α、NSE 均较 LPS 组明显降低 (均 *P*<0.01),说明 DEX 可明显抑

制内毒素血症小鼠 TNF- $\alpha$ 、NSE 升高;而  $\alpha$ -BGT 可拮抗 DEX 的保护作用(均  $P < 0.01$ )。DEX 对照组两个指标与 NS 组比较均无差异。

表 3 各组小鼠制模后 24 h 血清 TNF- $\alpha$ 、NSE 水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数(只)	TNF- $\alpha$ (ng/L)	NSE ( $\mu$ g/L)
NS 组	8	23.72 $\pm$ 3.13	8.70 $\pm$ 0.74
DEX 对照组	8	30.81 $\pm$ 3.03	8.79 $\pm$ 0.60
LPS 组	8	808.78 $\pm$ 87.86 <sup>ab</sup>	25.90 $\pm$ 3.03 <sup>ab</sup>
DEX+LPS 组	8	192.96 $\pm$ 31.47 <sup>abc</sup>	18.10 $\pm$ 2.14 <sup>abc</sup>
$\alpha$ -BGT+DEX+LPS 组	8	829.99 $\pm$ 80.98 <sup>abc</sup>	23.12 $\pm$ 2.21 <sup>abcd</sup>

注:TNF- $\alpha$  为肿瘤坏死因子- $\alpha$ ,NSE 为神经元特异性烯醇化酶,NS 为生理盐水,DEX 为右美托咪定,LPS 为脂多糖, $\alpha$ -BGT 为  $\alpha$ -银环蛇毒素;与 NS 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 DEX 对照组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与 LPS 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.01$ ;与 DEX+LPS 组比较,<sup>d</sup> $P < 0.01$

### 3 讨论

谵妄是以认知和意识等功能出现急性波动性紊乱为特征的临床状态,是重症加强治疗病房(ICU)患者死亡的主要原因之一。最新国外文献报道,ICU 中谵妄的发生率可高达 87%<sup>[15]</sup>,特别是在脓毒症患者。ICU 患者发生谵妄可导致机械通气时间、ICU 住院日及总住院日延长,病死率、住院费用及并发症发生率增加等不良后果<sup>[16]</sup>。

腹腔注射 LPS 常被用来制备内毒素血症或脓毒症模型<sup>[17]</sup>,外周或中枢给予 LPS 均可引起实验动物明显的行为学改变,LPS 对动物情绪和认知功能等方面有广泛的影响<sup>[18-19]</sup>,因此,采用 LPS 制备内毒素血症谵妄的模型被普遍认可。旷场实验及新物体识别实验既包含对认知功能的测试,又包含对精神状态的评估,常常被用来评估动物谵妄的发生及严重程度<sup>[20]</sup>。本研究这两项行为学实验结果显示,LPS 可以引起小鼠认知功能障碍、记忆力下降、焦虑情绪增加及对环境的满意度下降等明显的谵妄症状,说明内毒素血症谵妄制模成功。研究表明,炎症反应水平可以作为评估谵妄及认知功能障碍的一个重要指标<sup>[21]</sup>。NSE 血清水平已被公认为是评判脑损伤的一项特异性敏感生化指标<sup>[22]</sup>。本实验结果显示,LPS 组小鼠血清 TNF- $\alpha$  和 NSE 水平均较 NS 组明显增高,说明 LPS 可造成小鼠严重的内毒素血症及脑损伤。

DEX 是一种选择性高的新型  $\alpha_2$  肾上腺素能

受体激动剂,其中枢作用强,通过激动脑干蓝斑核(负责调节觉醒与睡眠),引发并维持自然非动眼睡眠(NREM)状态,产生催眠、镇静、易唤醒且无呼吸抑制等作用<sup>[23]</sup>。DEX 在高血压治疗、麻醉、镇静、镇痛中的辅助作用已被肯定,同时在抗心律失常及器官保护等方面也有明显疗效<sup>[24-26]</sup>。实验研究表明,低剂量 DEX 可提高脓毒症大鼠的存活率<sup>[27]</sup>;临床研究也表明,DEX 能减少 ICU 患者谵妄和躁动的发生<sup>[28-31]</sup>。一项 Meta 分析显示,DEX 可显著降低谵妄发生率<sup>[32]</sup>。本研究结果显示,DEX 本身对于正常小鼠的自发活动和探究行为并未产生影响,不会造成小鼠焦虑情绪、认知及记忆力的改变;但 DEX 可明显改善内毒素血症小鼠的谵妄症状,具有脑保护作用,支持了以往研究结果。

然而 DEX 防治谵妄的具体机制尚不十分清楚。有研究表明,大脑中胆碱能递质功能减弱会促进谵妄的发生,抗胆碱药可促进谵妄的进展,而胆碱酯酶抑制剂可改善谵妄状态<sup>[33]</sup>。胆碱能系统主要通过神经递质 ACh 发挥作用。生物学测定发现,在中枢神经内,ChAT 和 AChE 与 ACh 的分布一致,其活性或含量变化可以在一定程度上反映 ACh 的变化。本实验结果显示,DEX 不会影响正常小鼠海马组织内的 ACh 含量,而能提高内毒素血症谵妄小鼠海马组织中的 ACh 含量。ACh 增强了中枢胆碱能系统的功能活动,逆转了小鼠谵妄的发展,同时也证实了海马组织 ACh 的表达降低可能是小鼠谵妄发生的诱因之一。

有研究发现,胆碱能抗炎通路的作用依赖于迷走神经的完整性和  $\alpha 7nAChR$ <sup>[34]</sup>。 $\alpha 7nAChR$  是胆碱能神经系统中的一个重要部分,涉及中枢神经系统的认知功能。有研究者将 DEX 防治谵妄的效应归因于其类迷走神经效应,中枢系统似乎与迷走胆碱能反应之间存在联系,且 DEX 的这种保护效应依赖于胆碱能抗炎通路的完整性<sup>[35-36]</sup>。 $\alpha$ -BGT 是  $\alpha 7nAChR$  的特异性拮抗剂,本研究结果显示,DEX 防治谵妄的作用被  $\alpha$ -BGT 拮抗的同时,其增加脑内 ACh 含量的效应也被拮抗,进一步证实了 ACh 含量增加是 DEX 防治内毒素血症谵妄的重要原因。 $\alpha$ -BGT 能够部分拮抗 DEX 防治内毒素血症谵妄的效应,即  $\alpha 7nAChR$  可能参与了 DEX 防治内毒素血症谵妄的过程。而  $\alpha 7nAChR$  是胆碱能抗炎通路的关键性作用受体,是胆碱能神经与免疫之间的重要途径,由此进一步推断 DEX 防治内毒素血症谵

妄的作用可能与胆碱能抗炎通路有关。此外,本实验行为学结果显示,  $\alpha$ -BGT 并不能完全拮抗 DEX 防治谵妄的作用,说明 DEX 防治谵妄的作用不仅是通过中枢递质作用而完成,还可能需要其他的机制参与。

综上, DEX 可通过提高小鼠海马组织 ACh 含量来抑制内毒素血症谵妄的发生发展,其具体机制可能与  $\alpha$ 7nAChR 有关。DEX 防治内毒素血症谵妄的作用可能与其中枢抗交感神经活性间接刺激了迷走神经激活胆碱能抗炎通路有关,但具体是通过通路的哪个环节实现的尚不清楚,且对  $\alpha$ 7nAChR 的具体作用仍有待进一步研究。本实验为临床应用 DEX 治疗脓毒症谵妄提供了动物实验基础,为研究  $\alpha$ 7nAChR 在中枢的作用途径提供了新的思路。

### 参考文献

- [1] 王静,李熙鸿.脓毒症发病机制的研究进展[J].实用儿科临床杂志,2012,27(10):786-789. DOI: 10.3969/j.issn.1003-515X.2012.10.024.  
Wang J, Li XH. Research progress in pathogenesis of sepsis [J]. J Appl Clin Pediatr, 2012, 27(10): 786-789. DOI: 10.3969/j.issn.1003-515X.2012.10.024.
- [2] 承韶晖,潘爱军,陈晓蓉,等.重症监护病房患者谵妄发生率与识别率的现状[J].中华危重病急救医学,2012,24(8):493-494. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.08.013.  
Cheng SH, Pan AJ, Chen XR, et al. The incidence and recognition rate of delirium in intensive care unit patients [J]. Chin Crit Care Med, 2012, 24(8): 493-494. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.08.013.
- [3] Myatra S. Dexmedetomidine: Toward a paradigm shift in ICU sedation [J]. Indian J Crit Care Med, 2014, 18(5): 271-272. DOI: 10.4103/0972-5229.132465.
- [4] 徐杰,马明远,潘永,等.右美托咪定对肺挫伤机械通气患者的保护作用[J].中国中西医结合急救杂志,2014,21(3):225-228. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.03.018.  
Xu J, Ma MY, Pan Y, et al. Protective effect of dexmedetomidine on mechanically ventilated patients with pulmonary contusion [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2014, 21(3): 225-228. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.03.018.
- [5] 孔令贵,文辉,刘观斌,等.右美托咪定联合布托啡诺用于重症加强治疗病房患者镇静的临床研究[J].中国中西医结合急救杂志,2015,22(5):524-526. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.05.018.  
Kong LG, Wen H, Liu GB, et al. Clinical effect of dexmedetomidine hydrochloride injection combined with butorphanol conventional therapy on sedation of intensive care unit patients [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2015, 22(5): 524-526. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.05.018.
- [6] 储钟芳.右美托咪定对神经外科颅内占位患者围术期脑保护的护理[J].中国医药指南,2012,10(23):367-368. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8194.2012.23.277.  
Chu ZF. The cerebral protection of dexmedetomidine on the neurosurgical intracranial space-occupied patients [J]. Guide China Med, 2012, 10(23): 367-368. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8194.2012.23.277.
- [7] 纪浩聪,高晓枫,汪飞.右美托咪定对颅内动脉瘤夹闭术患者围术期的脑保护作用[J].中国实用医刊,2012,39(15):53-55. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-4756.2012.15.026.
- [8] Ji HC, Gao XF, Wang F. The cerebral protection of dexmedetomidine on Perioperative patients with intracranial aneurysm clipping [J]. Chin J Pract Med, 2012, 39(15): 53-55. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-4756.2012.15.026.
- [9] Papandreou MA, Dimakopoulou A, Linardaki ZI, et al. Effect of a polyphenol-rich wild blueberry extract on cognitive performance of mice, brain antioxidant markers and acetylcholinesterase activity [J]. Behav Brain Res, 2009, 198(2): 352-358. DOI: 10.1016/j.bbr.2008.11.013.
- [10] Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin [J]. Nature, 2000, 405(6785): 458-462. DOI: 10.1038/35013070.
- [11] 项辉,胡波,李建国.对胆碱能抗炎通路研究的新认识[J].中华危重病急救医学,2012,24(3):185-188. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.03.021.  
Xiang H, Hu B, Li JG. A new perspective of research into cholinergic anti-inflammatory pathway [J]. Chin Crit Care Med, 2012, 24(3): 185-188. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.03.021.
- [12] Bonaz B, Picq C, Sinniger V, et al. Vagus nerve stimulation: from epilepsy to the cholinergic anti-inflammatory pathway [J]. Neurogastroenterol Motil, 2013, 25(3): 208-221. DOI: 10.1111/nmo.12076.
- [13] Kutsuna S, Tsuruta R, Fujita M, et al. Cholinergic agonist physostigmine suppresses excessive superoxide anion radical generation in blood, oxidative stress, early inflammation, and endothelial injury in rats with forebrain ischemia/reperfusion [J]. Brain Res, 2010, 1313: 242-249. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.11.077.
- [14] Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review [J]. Eur J Pharmacol, 2003, 463(1-3): 3-33. DOI: 10.1016/S0014-2999(03)01272-X.
- [15] Cao X, Wang H, Mei B, et al. Inducible and selective erasure of memories in the mouse brain via chemical-genetic manipulation [J]. Neuron, 2008, 60(2): 353-366. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.08.027.
- [16] Jackson P, Khan A. Delirium in critically ill patients [J]. Crit Care Clin, 2015, 31(3): 589-603. DOI: 10.1016/j.ccc.2015.03.011.
- [17] Brummel NE, Jackson JC, Pandharipande PP, et al. Delirium in the ICU and subsequent long-term disability among survivors of mechanical ventilation [J]. Crit Care Med, 2014, 42(2): 369-377. DOI: 10.1097/CCM.0b013e3182a645bd.
- [18] 吕汪洵,秦魏婷,张锦丽,等.苦柯胺 B 对脂多糖诱导的脓毒症小鼠小肠炎症反应的抑制作用及分子机制[J].中华危重病急救医学,2015,27(2):121-126. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.02.009.  
Lyu WH, Qin WT, Zhang JL, et al. Inhibitory effects of Kukoamine B on the inflammatory response of small intestine in lipopolysaccharide-induced septic mice and its potential mechanisms [J]. Chin Crit Care Med, 2015, 27(2): 121-126. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.02.009.
- [19] Cohen H, Benjamin J, Kaplan Z, et al. Administration of high-dose ketoconazole, an inhibitor of steroid synthesis, prevents posttraumatic anxiety in an animal model [J]. Eur Neuropsychopharmacol, 2000, 10(6): 429-435. DOI: 10.1016/S0924-977X(00)00105-X.
- [20] King JA, Abend S, Edwards E. Genetic predisposition and the development of posttraumatic stress disorder in an animal model [J]. Biol Psychiatry, 2001, 50(4): 231-237. DOI: 10.1016/S0006-3223(01)01071-X.
- [21] Pan D, Sciascia A 2nd, Vorhees CV, et al. Progression of multiple behavioral deficits with various ages of onset in a murine model of Hurler syndrome [J]. Brain Res, 2008, 1188: 241-253. DOI: 10.1016/j.brainres.2007.10.036.



- [21] Ritter C, Tomasi CD, Dal-Pizzol F, et al. Inflammation biomarkers and delirium in critically ill patients [J]. Crit Care, 2014, 18 (3): R106. DOI: 10.1186/cc13887.
- [22] Woertgen C, Rothoerl RD, Brawanski A. Neuron-specific enolase serum levels after controlled cortical impact injury in the rat [J]. J Neurotrauma, 2001, 18 (5): 569-573. DOI: 10.1089/089771501300227378.
- [23] 鲍勃·杨, 熙赞·康, 斯妍娜, 等. 右美托咪定的实验研究和临床应用 [J]. 临床麻醉学杂志, 2011, 27 (10): 1034-1040.  
Yang B, Kang H, Si YN, et al. Perioperative applications of dexmedetomidine: from bench to bedside [J]. J Clin Anesthesiol, 2011, 27 (10): 1034-1040.
- [24] Kucuk A, Yaylak F, Cavunt-Bayraktar A, et al. The protective effects of dexmedetomidine on hepatic ischemia reperfusion injury [J]. Bratisl Lek Listy, 2014, 115 (11): 680-684.
- [25] Xu L, Hu Z, Shen J, et al. Does dexmedetomidine have a cardiac protective effect during non-cardiac surgery? A randomised controlled trial [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2014, 41 (11): 879-883. DOI: 10.1111/1440-1681.12296.
- [26] 杨晓旭, 王云明. 右美托咪定临床应用新进展 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2014, 21 (2): 152-154. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.02.023.  
Yang XX, Wang YM. The clinical advance in dexmedetomidine [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2014, 21 (2): 152-154. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.02.023.
- [27] 邓丽静, 王岚, 王波, 等. 右美托咪定对脓毒症大鼠炎症反应和淋巴细胞凋亡的影响 [J]. 中华危重病急救医学, 2012, 24 (9): 558-561. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.09.019.  
Deng LJ, Wang L, Wang B, et al. Effects of dexmedetomidine on sepsis-associated inflammatory response and Lymphocytic apoptosis in rats [J]. Chin Crit Care Med, 2012, 24 (9): 558-561. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.09.019.
- [28] 郭勇, 孙璐璐, 陈志峰, 等. 右美托咪定预防老年口腔肿瘤患者术后谵妄的疗效分析 [J]. 上海口腔医学, 2015, 24 (2): 236-239.  
Guo Y, Sun LL, Chen ZF, et al. Preventive effect of dexmedetomidine on postoperative delirium in elderly patients with oral cancer [J]. Shanghai J Stomatol, 2015, 24 (2): 236-239.
- [29] Yang X, Li Z, Gao C, et al. Effect of dexmedetomidine on preventing agitation and delirium after microvascular free flap surgery: a randomized, double-blind, control study [J]. J Oral Maxillofac Surg, 2015, 73 (6): 1065-1072. DOI: 10.1016/j.joms.2015.01.011.
- [30] 王志勇, 张杰, 李军. 右美托咪定在谵妄患者撤机中的作用 [J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26 (5): 355-356. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.05.016.  
Wang ZY, Zhang J, Li J. Effects of dexmedetomidine on weaning of mechanical ventilation delirious patients [J]. Chin Crit Care Med, 2014, 26 (5): 355-356. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.05.016.
- [31] 万林骏, 黄青青, 岳锦熙, 等. 右美托咪定与咪达唑仑用于外科重症监护病房术后机械通气患者镇静的比较研究 [J]. 中华危重病急救医学, 2011, 23 (9): 543-546. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.09.007.  
Wan LJ, Huang QQ, Yue JX, et al. Comparison of sedative effect of dexmedetomidine and midazolam for post-operative patients undergoing mechanical ventilation in surgical intensive care unit [J]. Chin Crit Care Med, 2011, 23 (9): 543-546. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.09.007.
- [32] Tan JA, Ho KM. Use of dexmedetomidine as a sedative and analgesic agent in critically ill adult patients: a meta-analysis [J]. Intensive Care Med, 2010, 36 (6): 926-939. DOI: 10.1007/s00134-010-1877-6.
- [33] Cerejeira J, Nogueira V, Luis P, et al. The cholinergic system and inflammation: common pathways in delirium pathophysiology [J]. J Am Geriatr Soc, 2012, 60 (4): 669-675. DOI: 10.1111/j.1532-5415.2011.03883.x.
- [34] Song XM, Li JG, Wang YL, et al. The protective effect of the cholinergic anti-inflammatory pathway against septic shock in rats [J]. Shock, 2008, 30 (4): 468-472. DOI: 10.1097/SHK.0b013e31816d5e49.
- [35] Xiang H, Hu B, Li Z, et al. Dexmedetomidine controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway [J]. Inflammation, 2014, 37 (5): 1763-1770. DOI: 10.1007/s10753-014-9906-1.
- [36] Hofer S, Steppan J, Wagner T, et al. Central sympatholytics prolong survival in experimental sepsis [J]. Crit Care, 2009, 13 (1): R11. DOI: 10.1186/cc7709.

(收稿日期: 2015-10-19)  
(本文编辑: 孙茜, 李银平)

## • 科研新闻速递 •

### 乳铁蛋白治疗严重脓毒症: 口服重组人乳铁蛋白治疗严重脓毒症的 II / III 期临床试验结果

乳铁蛋白 Talactoferrin 是一种重组人糖蛋白, 已有许多研究证明其对免疫系统影响广泛。有相关学者进行了一项多中心随机安慰剂对照的 II / III 期临床试验, 评价在标准基础上加用 Talactoferrin 或应用安慰剂对严重脓毒症患者的疗效。该研究纳入来自 10 个国家、77 个医疗中心中年龄 > 18 岁并接受抗菌药物治疗的严重脓毒症患者。干预措施为口服或经胃肠道给予重组人乳铁蛋白 Talactoferrin 1.5 g、每日 3 次, 或应用安慰剂, 疗程为 28 d 或转出重症加强治疗病房 (ICU)。该研究在纳入 305 例患者时 (153 例接受 Talactoferrin 治疗, 152 例接受安慰剂), 因为治疗无效和存在安全问题而提前终止。两组患者的年龄、性别、感染部位、严重程度评分等基线资料差异无统计学意义。与安慰剂组比较, Talactoferrin 组患者 28 d 病死率较高 (24.8% 比 17.8%), 但未体现出统计学差异 ( $P=0.117$ ); 其中 209 例休克患者两组 28 d 病死率差异显著 [Talactoferrin 组 31.4% (33/105) 比安慰剂组 20.2% (21/104),  $P=0.064$ ], 而无休克患者差异无统计学意义 [Talactoferrin 组 10.4% (5/48) 比安慰剂组 12.5% (6/48),  $P=0.806$ ]。与安慰剂组比较, Talactoferrin 组住院病死率和 3 个月病死率明显升高 [住院病死率为 28.1% (43/153) 比 17.8% (27/152),  $P=0.037$ ; 3 个月病死率为 30.1% (46/153) 比 20.4% (31/152),  $P=0.036$ ]。治疗相关的不良事件和严重不良事件的发生率在两组间是相似的。研究者得出结论: 口服重组人乳铁蛋白 Talactoferrin 并不能降低严重脓毒症患者的 28 d 病死率, 甚至可能是有害的。

喻文, 罗红敏, 编译自《Crit Care Med》, 2015, 43 (9): 1832-1838