

# 白藜芦醇改善脓毒症脑病大鼠 认知功能障碍的机制研究

刘新强 温妙云 韩永丽 丁洪光 陈胜龙 李娅 李旭声 曾红科

广东省人民医院(广东省医学科学院)急危重症医学部,广州 510080

通信作者:曾红科,Email:zenghongke@vip.163.com

**【摘要】目的** 观察白藜芦醇是否能改善脓毒症脑病(SAE)大鼠的认知功能障碍,并探讨其作用机制。**方法** 选择清洁级12周龄雄性SD大鼠,按随机数字表法分为假手术组、脓毒症模型组、白藜芦醇组,每组30只。采用尾静脉注射脂多糖(LPS)10 mg/kg复制脓毒症大鼠模型;假手术组以相同途径给予等量生理盐水。白藜芦醇组制模后腹腔注射白藜芦醇注射液 $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,每日1次,连用2 d;脓毒症模型组和假手术组以相同途径给予等量生理盐水。制模后24 h用水迷宫实验评估各组大鼠认知功能;同时测定脑组织含水量(BWC)、伊文思蓝(EB)渗漏量以评估血脑屏障(BBB)通透性;采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测脑皮质组织基质金属蛋白酶9(MMP-9)、闭合蛋白(Occludin)和封闭蛋白5(Claudin-5)的蛋白表达;采用免疫荧光双标法测定MMP-9蛋白和星形胶质细胞标志蛋白(GFAP)在脑皮质组织的共定位情况。**结果** 与假手术组相比,脓毒症模型组制模后48 h、72 h大鼠逃逸潜伏期显著延长[48 h逃逸潜伏期(s): $56.56 \pm 6.43$ 比 $36.62 \pm 3.32$ ,72 h逃逸潜伏期(s): $57.72 \pm 7.23$ 比 $26.46 \pm 4.24$ ,均 $P < 0.01$ ],BWC、EB渗漏量显著增加[BWC:( $84.56 \pm 2.03$ )%比( $76.82 \pm 2.22$ )%,EB渗漏量( $\mu\text{g/g}$ ): $17.56 \pm 2.28$ 比 $6.25 \pm 1.36$ ,均 $P < 0.01$ ],大脑皮质组织MMP-9蛋白表达水平明显升高(MMP-9/ $\beta$ -actin: $0.73 \pm 0.01$ 比 $0.24 \pm 0.01$ , $P < 0.01$ ),Occludin和Claudin-5的蛋白表达水平明显降低(Occludin/ $\beta$ -actin: $0.45 \pm 0.02$ 比 $0.86 \pm 0.04$ ,Claudin-5/ $\beta$ -actin: $0.62 \pm 0.03$ 比 $0.96 \pm 0.05$ ,均 $P < 0.01$ );同时伴随着MMP-9蛋白和脑皮质组织星形胶质细胞共定位表达增加[MMP-9荧光强度(AU): $38.66 \pm 4.26$ 比 $17.23 \pm 3.04$ ,MMP-9阳性细胞百分比:( $26.92 \pm 1.77$ )%比( $12.82 \pm 1.46$ )%,均 $P < 0.01$ ]。与脓毒症模型组相比,白藜芦醇组大鼠逃逸潜伏期显著缩短[48 h逃逸潜伏期(s): $41.42 \pm 6.27$ 比 $56.56 \pm 6.43$ ,72 h逃逸潜伏期(s): $33.46 \pm 7.17$ 比 $57.72 \pm 7.23$ ,均 $P < 0.01$ ],BWC、EB渗漏量显著减少[BWC:( $77.15 \pm 2.27$ )%比( $84.56 \pm 2.03$ )%,EB渗漏量( $\mu\text{g/g}$ ): $7.74 \pm 1.88$ 比 $17.56 \pm 2.28$ ,均 $P < 0.01$ ],而大脑皮质组织MMP-9蛋白表达明显降低(MMP-9/ $\beta$ -actin: $0.25 \pm 0.01$ 比 $0.73 \pm 0.01$ , $P < 0.01$ ),Occludin和Claudin-5的蛋白表达均明显升高(Occludin/ $\beta$ -actin: $0.82 \pm 0.03$ 比 $0.45 \pm 0.02$ ,Claudin-5/ $\beta$ -actin: $0.92 \pm 0.04$ 比 $0.62 \pm 0.03$ ,均 $P < 0.01$ ),同时伴随着MMP-9蛋白和脑皮质组织星形胶质细胞共定位表达减少[MMP-9荧光强度(AU): $19.44 \pm 4.37$ 比 $38.66 \pm 4.26$ ,MMP-9阳性细胞百分比:( $13.11 \pm 1.29$ )%比( $26.92 \pm 1.77$ )%,均 $P < 0.01$ ]。**结论** 白藜芦醇通过抑制脓毒症大鼠大脑皮质组织星形胶质细胞MMP-9的表达,减少紧密连接蛋白Occludin、Claudin-5的降解,从而降低BBB通透性,最终改善SAE的认知功能障碍。

**【关键词】** 白藜芦醇; 脓毒症脑病; 认知功能障碍; 血脑屏障

**基金项目:**国家自然科学基金(81701875);广东省医学科学技术研究基金(A2017284);广东省广州市科技计划项目(202002030338)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200720-00531

## Mechanism of resveratrol on ameliorating the cognitive dysfunction induced by sepsis associated encephalopathy in rats

Liu Xinqiang, Wen Miaoyun, Han Yongli, Ding Hongguang, Chen Shenglong, Li Ya, Li Xusheng, Zeng Hongke

Department of Emergency & Critical Care Medicine, Guangdong Provincial People's Hospital (Guangdong Academy of Medical Sciences), Guangzhou 510080, Guangdong, China

Corresponding author: Zeng Hongke, Email: zenghongke@vip.163.com

**【Abstract】Objective** To explore the mechanism of resveratrol on ameliorating the cognitive dysfunction induced by sepsis associated encephalopathy (SAE) in rats. **Methods** The 12 weeks old male Sprague-dawley (SD) male rats were randomly divided into sham group, sepsis group and resveratrol group, with 30 rats in each group. The rat model of sepsis was made by injecting LPS (10 mg/kg) into tail vein. The rats in sham group was given the same amount of normal saline (NS). After LPS injection, resveratrol ( $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) was intraperitoneally injected once daily for 2 days in the resveratrol group; the same amount of NS was given to the sepsis group and sham group. At 24 hours after model establishment, the cognitive function of the experimental rats was assessed by the Morris water maze test. The blood-brain barrier (BBB) permeability was evaluated by the brain water content (BWC) and Evans blue (EB) test. The protein expressions of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), Occludin and Claudin-5 in cortical tissue were

detected by Western Blot. Double immunofluorescence was used to verify the co-localization of MMP-9 protein and the marker protein of astrocyte GFAP in the cortical tissue of rats. **Results** Compared with the sham group, the escape latency in the sepsis group was significantly longer [48-hour escape latency (s):  $56.56 \pm 6.43$  vs.  $36.62 \pm 3.32$ , 72-hour escape latency (s):  $57.72 \pm 7.23$  vs.  $26.46 \pm 4.24$ , both  $P < 0.01$ ], the BWC and extravasation of EB were increased [BWC:  $(84.56 \pm 2.03)\%$  vs.  $(76.82 \pm 2.22)\%$ , EB ( $\mu\text{g/g}$ ):  $17.56 \pm 2.28$  vs.  $6.25 \pm 1.36$ , both  $P < 0.01$ ], the expression of MMP-9 protein was increased (MMP-9/ $\beta$ -actin:  $0.73 \pm 0.01$  vs.  $0.24 \pm 0.01$ ,  $P < 0.01$ ), the protein expressions of Occludin and Claudin-5 were decreased (Occludin/ $\beta$ -actin:  $0.45 \pm 0.02$  vs.  $0.86 \pm 0.04$ , Claudin-5/ $\beta$ -actin:  $0.62 \pm 0.03$  vs.  $0.96 \pm 0.05$ , both  $P < 0.01$ ). At the same time, the co-localization expression of MMP-9 protein and the astrocytes of the cortical were increased [MMP-9 fluorescence intensity (AU):  $38.66 \pm 4.26$  vs.  $17.23 \pm 3.04$ , MMP-9 positive cells:  $(26.92 \pm 1.77)\%$  vs.  $(12.82 \pm 1.46)\%$ , both  $P < 0.01$ ]. Compared with the sepsis group, the escape latency in resveratrol group was significantly shorter [48-hour escape latency (s):  $41.42 \pm 6.27$  vs.  $56.56 \pm 6.43$ , 72-hour escape latency (s):  $33.46 \pm 7.17$  vs.  $57.72 \pm 7.23$ , both  $P < 0.01$ ], the BWC and extravasation of EB were decreased [BWC:  $(77.15 \pm 2.27)\%$  vs.  $(84.56 \pm 2.03)\%$ , EB ( $\mu\text{g/g}$ ):  $7.74 \pm 1.88$  vs.  $17.56 \pm 2.28$ , both  $P < 0.01$ ], the expression of MMP-9 protein was decreased (MMP-9/ $\beta$ -actin:  $0.25 \pm 0.01$  vs.  $0.73 \pm 0.01$ ,  $P < 0.01$ ), the protein expressions of Occludin and Claudin-5 were increased (Occludin/ $\beta$ -actin:  $0.82 \pm 0.03$  vs.  $0.45 \pm 0.02$ , Claudin-5/ $\beta$ -actin:  $0.92 \pm 0.04$  vs.  $0.62 \pm 0.03$ , both  $P < 0.01$ ). At the same time, the co-localization expression of MMP-9 protein and the astrocytes of the cortical were decreased [MMP-9 fluorescence intensity (AU):  $19.44 \pm 4.37$  vs.  $38.66 \pm 4.26$ , MMP-9 positive cells:  $(13.11 \pm 1.29)\%$  vs.  $(26.92 \pm 1.77)\%$ , both  $P < 0.01$ ]. **Conclusion** Resveratrol can inhibit the expression of MMP-9 protein in the astrocytes of the cortical cortex of rats, and then reduce the degradation of tight junction proteins of Occludin and Claudin-5, thereby reducing BBB permeability and eventually ameliorate the cognitive dysfunction induced by SAE.

**[Key words]** Resveratrol; Sepsis associated encephalopathy; Cognitive dysfunction; Blood-brain barrier

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81701875); Medical Scientific Research Foundation of Guangdong Province of China (A2017284); Guangzhou City Science and Technology Program of Guangdong Province of China (202002030338)

DOI: 10.3760/ema.j.cn121430-20200720-00531

脓毒症脑病 (SAE) 是由感染或高度可疑感染灶引起的机体反应失调而导致的大脑急性弥散性功能障碍<sup>[1-2]</sup>。SAE 早期以急剧的意识改变为特征,可有谵妄、昏迷、癫痫发作或局灶性神经系统体征,远期亦能引起患者认知功能障碍<sup>[3-4]</sup>。在脓毒症患者中 SAE 的发病率高达 70%,且脓毒症患者一旦并发 SAE,其病死率约升高 20%<sup>[5]</sup>。目前 SAE 尚缺乏有效的特异性治疗手段,是脓毒症整体病死率居高不下的主要原因<sup>[5]</sup>。白藜芦醇是从藜芦、虎杖等多种中医药种子中分离得到的多酚类单体成分,具有抗炎、抗氧化、改善微循环、抑制血小板聚集等生物学作用<sup>[6]</sup>。目前研究显示,白藜芦醇可改善脓毒症大鼠<sup>[7]</sup>、老年大鼠术后<sup>[8]</sup>以及糖尿病大鼠<sup>[9]</sup>的认知功能障碍,但作用机制仍不明确。脓毒症时血脑屏障 (BBB) 通透性增加是 SAE 发生发展的关键环节<sup>[10]</sup>。既往研究表明,脓毒症时基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 的升高与 BBB 通透性增加密切相关<sup>[11]</sup>。本研究旨在探讨白藜芦醇是否可以通过保护 BBB 从而改善 SAE 大鼠的认知功能障碍,现报告如下。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及分组:** 选择清洁级雄性 SD 大鼠, 12 周龄, 体重 250 ~ 300 g, 购自华南理工大学动物实验中心, 动物许可证号: SYXK (粤) 2017-2018。按随机数字表法将大鼠分为假手术组、脓毒症模型

组、白藜芦醇组, 每组 30 只。

**1.2 脓毒症大鼠模型的制备及处理:** 采用腹腔注射脂多糖 (LPS, 美国 Sigma 公司) 10 mg/kg 的方法复制脓毒症大鼠模型; 假手术组以相同途径给予等量生理盐水。白藜芦醇组制模后腹腔注射白藜芦醇注射液  $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 每日 1 次, 连用 2 d; 脓毒症模型组和假手术组以相同途径给予等量生理盐水。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准, 并经广东省人民医院医学研究伦理委员会批准 (审批号: GDREC2020164A)。

## 1.3 检测指标及方法

**1.3.1 水迷宫实验评估大鼠认知功能:** 测试装置由装满温水 ( $24 \pm 2$ ) °C 的圆形池 (直径 150 cm) 和圆形逃逸平台 (直径 10 cm) 构成。逃逸平台位于第 1 象限, 并浸没在水面下 1 cm 处。水迷宫实验第 1 天, 允许大鼠在池中游泳 120 s, 以适应环境和实验; 实验第 2 ~ 4 天, 对大鼠进行水迷宫测试, 将大鼠头向上, 面对水池壁依次从测试装置的 4 个象限入水, 记录大鼠找到水下逃逸平台的时间 (逃逸潜伏期)。如果大鼠在 120 s 内不能到达平台, 研究者则引导大鼠到平台站立 60 s, 同时记录 120 s 为其逃逸潜伏期。

**1.3.2 脑组织含水量 (BWC) 测定:** 在深度麻醉下处死各组大鼠迅速取脑, 分离获取半侧大脑半球。将脑组织置于 100 °C 电热恒温箱中, 烘烤 24 ~ 48 h

至恒重(多次称量干重,需将两次干重的测量误差控制在0.2 mg内)。BWC按照以下公式进行计算:  
 $BWC(\%) = (\text{湿重} - \text{干重}) / \text{湿重} \times 100\%$

**1.3.3 大脑BBB通透性评估:**于干预结束后各组大鼠股静脉注射2 mg/kg伊文思蓝(EB)溶液;在实验终点用生理盐水于左心室进行灌注,直至经右心耳流出无色透明液体时停止灌注;分离同侧脑组织后,按1.0 mL加入甲酰胺溶液,60℃水浴抽提2 h,于酶标仪620 nm处测定吸光度(A)值,绘制标准曲线,计算脑组织EB渗漏量。

**1.3.4 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测**大脑皮质组织MMP-9、闭合蛋白(Occludin)以及封闭蛋白5(Claudin-5)的蛋白表达:取大脑皮质组织,用蛋白提取试剂盒提取蛋白,二喹啉甲酸法(BCA)检测蛋白质浓度。蛋白定量后进行电泳、转膜、封闭,分别加入鼠源抗MMP-9、Occludin及Claudin-5蛋白(均1:1 000稀释),4℃孵育过夜。次日用磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗后,于4℃孵育抗小鼠二抗(1:1 000稀释)1 h,含吐温的磷酸盐缓冲液(TBST)洗膜后在暗室中加入预混好的电化学发光(ECL)免疫荧光发光液,压片、曝光。采用Fluor Chem 8900软件分析灰度值,以目的蛋白与内参照β-肌动蛋白(β-actin)的灰度值比值表示目的蛋白的表达量。

**1.3.5 免疫荧光双标法检测**大脑皮质组织MMP-9表达:取大鼠新鲜脑皮质组织进行固定,然后切成10 μm厚度的冰冻切片,行MMP-9抗体染色以及星形胶质细胞标志蛋白(GFAP)双标染色。从每组大鼠大脑皮质组织中取4张切片,每张切片随机选取4个视野,荧光显微镜下观察MMP-9蛋白表达及GFAP在脑皮质组织的共定位情况。使用Image-pro Plus软件分析各组星形胶质细胞中MMP-9蛋白的平均荧光强度,并计算各组切片视野中MMP-9阳性细胞的百分比。

**1.4 统计学分析:**使用SPSS 20.0统计软件分析数据。正态分布的计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间均数比较采用方差分析,两两比较在方差齐性时采用LSD检验,否则采用Dunnett T3检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 各组大鼠逃逸潜伏期比较(表1):**与假手术组相比,脓毒症模型组制模后48 h、72 h大鼠逃逸潜伏期明显延长(均 $P < 0.01$ );给予白藜芦醇干预后,脓毒症大鼠逃逸潜伏期明显缩短(均 $P < 0.01$ )。

**表1 各组大鼠水迷宫实验逃逸潜伏期比较( $\bar{x} \pm s$ )**

| 组别     | 动物数(只) | 逃逸潜伏期(s)                  |                           |
|--------|--------|---------------------------|---------------------------|
|        |        | 制模后48 h                   | 制模后72 h                   |
| 假手术组   | 6      | 36.62 ± 3.32              | 26.46 ± 4.24              |
| 脓毒症模型组 | 6      | 56.56 ± 6.43 <sup>a</sup> | 57.72 ± 7.23 <sup>a</sup> |
| 白藜芦醇组  | 6      | 41.42 ± 6.27 <sup>b</sup> | 33.46 ± 7.17 <sup>b</sup> |

注:与假手术组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与脓毒症模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$

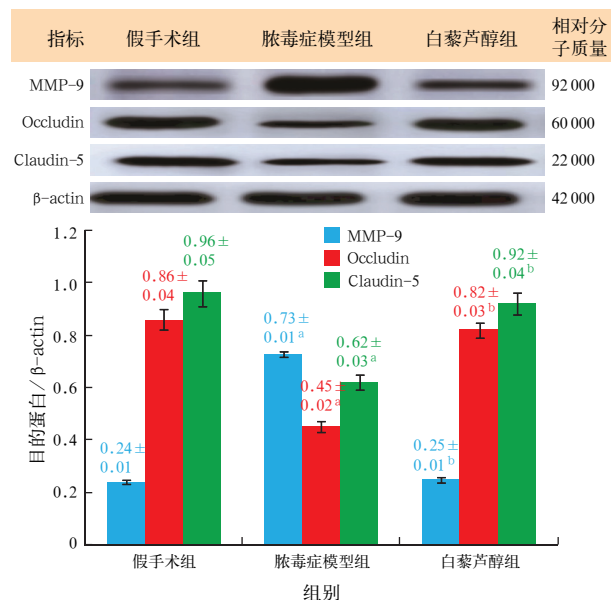
**2.2 各组大鼠BWC、EB渗漏量比较(表2):**与假手术组相比,脓毒症模型组大鼠BWC、EB渗漏量明显升高(均 $P < 0.01$ );给予白藜芦醇干预后,脓毒症大鼠BWC、EB渗漏量明显降低(均 $P < 0.01$ )。

**表2 各组大鼠BWC、EB渗漏量比较( $\bar{x} \pm s$ )**

| 组别     | 动物数(只) | BWC(%)                    | EB渗漏量(μg/g)               |
|--------|--------|---------------------------|---------------------------|
| 假手术组   | 6      | 76.82 ± 2.22              | 6.25 ± 1.36               |
| 脓毒症模型组 | 6      | 84.56 ± 2.03 <sup>a</sup> | 17.56 ± 2.28 <sup>a</sup> |
| 白藜芦醇组  | 6      | 77.15 ± 2.27 <sup>b</sup> | 7.74 ± 1.88 <sup>b</sup>  |

注:BWC为脑组织含水量,EB为伊文思蓝;与假手术组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与脓毒症模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$

**2.3 各组大鼠大脑皮质组织MMP-9、Occludin及Claudin-5的蛋白表达水平比较(图1):**与假手术组相比,脓毒症模型组大鼠大脑皮质组织MMP-9蛋白表达水平明显升高,Occludin和Claudin-5的蛋白表达水平明显降低(均 $P < 0.01$ );给予白藜芦醇干预后,脓毒症大鼠大脑皮质组织MMP-9蛋白表达水平明显降低,Occludin和Claudin-5的蛋白表达水平明显升高(均 $P < 0.01$ )。



MMP-9为基质金属蛋白酶9, Occludin为闭合蛋白, Claudin-5为封闭蛋白5, β-actin为β-肌动蛋白;与假手术组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与脓毒症模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$

**图1 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测**各组大鼠大脑皮质组织MMP-9、Occludin、Claudin-5的蛋白表达水平

2.4 各组大鼠脑皮质组织星形胶质细胞中 MMP-9 阳性表达比较(图 2; 表 3): 与假手术组相比, 脓毒症模型组大鼠 MMP-9 蛋白和脑皮质组织星形胶质细胞共定位表达明显增加(均  $P < 0.01$ ); 给予白藜芦醇干预后, 脓毒症大鼠 MMP-9 蛋白和脑皮质组织星形胶质细胞共定位表达明显减少(均  $P < 0.01$ )。

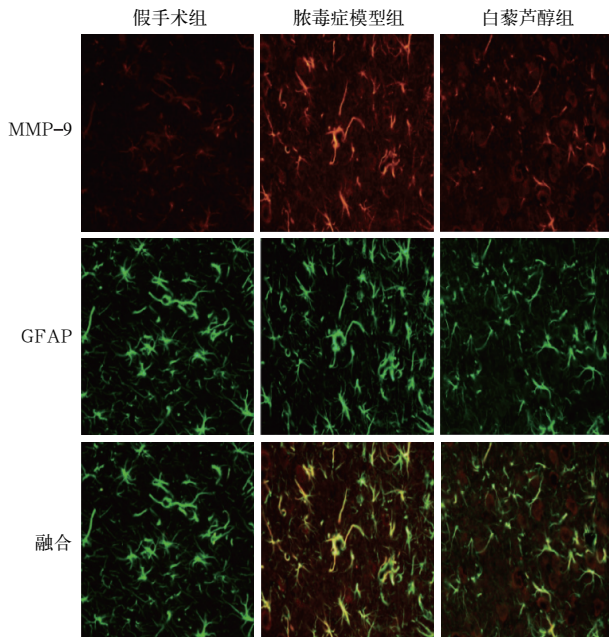


图 2 光镜下观察各组大鼠大脑皮质组织中星形胶质细胞基质金属蛋白酶 9(MMP-9) 阳性表达。红光代表 MMP-9 阳性表达, 绿光代表胶质纤维酸性蛋白(GFAP)。脓毒症模型组星形胶质细胞 MMP-9 免疫荧光强度以及阳性细胞表达显著增多; 白藜芦醇组 MMP-9 免疫荧光强度以及阳性细胞表达较脓毒症模型组减少。免疫荧光双标染色。高倍放大

表 3 各组大鼠大脑皮质组织中星形胶质细胞 MMP-9 免疫荧光强度以及阳性细胞百分比比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | 动物数 (只) | MMP-9 免疫荧光强度 (AU)         | MMP-9 阳性细胞百分比 (%)         |
|--------|---------|---------------------------|---------------------------|
| 假手术组   | 6       | 17.23 ± 3.04              | 12.82 ± 1.46              |
| 脓毒症模型组 | 6       | 38.66 ± 4.26 <sup>a</sup> | 26.92 ± 1.77 <sup>a</sup> |
| 白藜芦醇组  | 6       | 19.44 ± 4.37 <sup>b</sup> | 13.11 ± 1.29 <sup>b</sup> |

注: MMP-9 为基质金属蛋白酶 9; 与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与脓毒症模型组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$

### 3 讨论

从现代西医学角度看, SAE 是脓毒症发生时累及大脑的急性并发症, 不仅近期可以发生急性意识障碍, 远期亦会留有认知功能障碍, 严重影响患者近期预后和远期的生存质量<sup>[3-4]</sup>。中医学文献并无 SAE 的病名, 但与其相关的发病特点及临床表现却有许多记载, 并根据不同的临床表现有“昏厥”“昏愤”“昏蒙”“昏迷”“谵昏”等类似病症, 均属中医学“神昏”的范畴<sup>[12]</sup>, 从上述描述看, 与

西医有关 SAE 的定义和临床表现一致。尽管近年来 SAE 已经引起临床医师的高度重视, 但目前临床疗效仍较差。因此, 从中西医结合角度去探究 SAE 的发病机制以及治疗靶点, 并进一步寻求有效的药物去干预, 对于改善并发 SAE 的脓毒症患者预后至关重要。

近年来, 随着现代西医基础医学对 SAE 研究的深入, 研究者发现, SAE 发生时即使中枢神经系统和血液中无细菌入侵, 仍可发生脑功能弥散性障碍<sup>[13]</sup>。正常情况下, BBB 为中枢神经系统提供了安全的环境, 使其免于外界病原体、毒素、炎性因子的侵袭, 完整的 BBB 对于维持大脑正常功能至关重要<sup>[14]</sup>。进一步研究表明, 脓症患者 BBB 通透性增加, 使细菌内毒素以及炎性因子可以通过破坏的 BBB 进入大脑, 最终引起脑功能障碍<sup>[15]</sup>。从现代西医学基础研究的角度来看, 脓毒症导致的 BBB 通透性增加是 SAE 发生的关键环节。而古代文献中关于“神昏”记载最多的是《温病篇》, 以卫气营血辨证为特点。现代著名温病学家沈凤阁分析其病变机制认为有 4 类, 即邪入营血, 蒙闭心神; 邪在气分, 热盛神昏; 湿热蕴阻, 清阳蒙蔽; 正虚气脱, 心神无主。由此可见, SAE 的病性以实邪致病居多<sup>[12]</sup>。本研究显示, 与假手术组比较, 脓毒症模型组大鼠制模后 48 h、72 h 逃逸潜伏期显著延长, 说明脓毒症大鼠出现了认知功能障碍; 进一步检测其脑组织 BWC 以及 EB 渗漏量均显著增加, 说明脓毒症大鼠 BBB 通透性增加是 SAE 发生发展的关键环节。因此寻求药物减少 BBB 的通透性, 将能改善 SAE 的认知功能障碍。

从中医的病变机制来看, SAE 的病性以实邪致病居多<sup>[12]</sup>, 可以尝试辨证应用扶正祛邪的药物进行干预, 药物可选黄芪、当归、金银花、青蒿、虎杖等<sup>[16]</sup>。根据此中医辨证机制, 国内动物实验表明, 中药淫羊藿、醒脑静可以改善 SAE 大鼠的认知功能障碍<sup>[17-18]</sup>。本研究亦显示, 与脓毒症模型组比较, 白藜芦醇组大鼠术后 48 h、72 h 逃逸潜伏期显著缩短, 同时亦发现大鼠脑组织 BWC 以及 EB 渗漏量明显减少, 说明白藜芦醇可以通过降低 BBB 的通透性从而改善脓毒症大鼠的认知功能障碍。但目前白藜芦醇通过何种机制降低 BBB 的通透性仍不明确。

BBB 是由大脑微细血管内皮细胞及紧密连接蛋白(TJPs)、基膜、周细胞、神经元细胞、星形胶质细胞足突和极狭小的细胞外隙共同组成的一个细胞

复合体,而星形胶质细胞是其中最主要的组分<sup>[14]</sup>。星形胶质细胞主要通过分泌活性物、基因转录和蛋白质合成协同作用参与BBB的维持与形成<sup>[19]</sup>。既往研究显示,星形胶质细胞主要通过分泌MMP-9导致脑微血管内皮细胞之间TJPs(Occludin、Claudin-5)的破坏,从而增加BBB的通透性<sup>[20]</sup>。国内蒋毅等<sup>[11]</sup>发现,脓毒症时MMP-9的增加与BBB通透性增加密切相关。因此,在脓毒症时抑制星形胶质细胞中MMP-9的表达将能降低BBB的通透性,从而改善SAE相关的认知功能障碍。本研究结果表明,给予白藜芦醇注射液(8 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)干预后,脓毒症大鼠星形胶质细胞MMP-9表达较少,同时TJPs中Occludin、Claudin-5蛋白的降解减少。提示白藜芦醇可能通过抑制SAE大鼠大脑星形胶质细胞MMP-9的表达,从而减少Occludin、Claudin-5蛋白的降解,最终降低BBB的通透性。

综上所述,本研究显示,脓毒症大鼠大脑星形胶质细胞MMP-9表达明显上调,进而引起Occludin、Claudin-5蛋白的降解,从而增加BBB的通透性,最终导致认知功能障碍;而白藜芦醇可以降低BBB通透性,改善认知功能障碍,其脑保护作用可能是通过抑制星形胶质细胞MMP-9的表达,减少Occludin、Claudin-5蛋白降解而实现的。本研究为白藜芦醇在SAE患者中的临床应用提供了一定理论依据。但本研究也存在局限性和不足之处,本研究为动物实验,为进一步探讨其分子机制需要体外实验进一步证实;同时为进一步明确其临床使用的安全性以及有效性,需要通过临床试验去验证。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- Manzanares W, Dhaliwal R, Jiang X, et al. Antioxidant micronutrients in the critically ill: a systematic review and meta-analysis [J]. Crit Care, 2012, 16 (2): R66. DOI: 10.1186/cc11316.
- 李龙艳, 袁世炎, 尚游. 脓毒症相关性脑病的研究进展 [J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26 (10): 766-768. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.10.024.
- Li LY, Yuan SY, Shang Y. Research progress of sepsis related encephalopathy [J]. Chin Crit Care Med, 2014, 26 (10): 766-768. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.10.024.
- Lamar CD, Hurley RA, Taber KH. Sepsis-associated encephalopathy: review of the neuropsychiatric manifestations and cognitive outcome [J]. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 2011, 23 (3): 237-241. DOI: 10.1176/jnp.23.3.jnp237.
- Widmann CN, Heneka MT. Long-term cerebral consequences of sepsis [J]. Lancet Neurol, 2014, 13 (6): 630-636. DOI: 10.1016/S1474-4422(14)70017-1.
- Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, et al. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis [J]. JAMA, 2010, 304 (16): 1787-1794. DOI: 10.1001/jama.2010.1553.
- Ahmadi R, Ebrahimzadeh MA. Resveratrol: a comprehensive review of recent advances in anticancer drug design and development [J]. Eur J Med Chem, 2020, 200: 112356. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112356.
- Sui DM, Xie Q, Yi WJ, et al. Resveratrol protects against sepsis-associated encephalopathy and inhibits the NLRP3/IL-1 $\beta$  axis in microglia [J]. Mediators Inflamm, 2016, 2016: 1045657. DOI: 10.1155/2016/1045657.
- 秦起, 李芮, 曾庆繁. 白藜芦醇对老年大鼠术后认知功能的影响 [J]. 贵州医科大学学报, 2019, 44 (4): 427-430, 452. DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.04.010.
- Qin Q, Li R, Zeng QF. Effect of resveratrol on postoperative cognitive dysfunction in aged rats [J]. J Guizhou Med Univ, 2019, 44 (4): 427-430, 452. DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.04.010.
- 周玉兰, 冀俊林, 李玉旺. 白藜芦醇对糖尿病大鼠认知功能损害的改善作用 [J]. 实用医药杂志, 2019, 36 (1): 54-58. DOI: 10.14172/j.issn1671-4008.2019.01.020.
- Zhou YL, Ji JL, Li YW. The improvement effects of resveratrol on cognitive impairment in diabetic rats [J]. Pract J Med Pharm, 2019, 36 (1): 54-58. DOI: 10.14172/j.issn1671-4008.2019.01.020.
- Varatharaj A, Galea I. The blood-brain barrier in systemic inflammation [J]. Brain Behav Immun, 2017, 60: 1-12. DOI: 10.1016/j.bbi.2016.03.010.
- 蒋毅, 于洋, 王瑶琪, 等. 氢对脓毒症相关性脑病小鼠脑组织基质金属蛋白酶-9表达的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2019, 39 (5): 606-609. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1416.2019.05.025.
- Jiang Y, Yu Y, Wang YQ, et al. Effect of hydrogen on expression of matrix metalloproteinase-9 in brain tissues of mice with sepsis-associated encephalopathy [J]. Chin J Anesthesiol, 2019, 39 (5): 606-609. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1416.2019.05.025.
- 李军, 李曼菲, 谭玉萍. 脓毒症相关性脑病中西医结合治疗研究现状 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2016, 23 (3): 328-330. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.03.030.
- Li J, Li MF, Tan YP. The research status of the treatment of sepsis related encephalopathy with integrated Chinese and Western medicine [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2016, 23 (3): 328-330. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.0 16.03.030.
- Michels M, Vieira AS, Vuolo F, et al. The role of microglia activation in the development of sepsis-induced long-term cognitive impairment [J]. Brain Behav Immun, 2015, 43: 54-59. DOI: 10.1016/j.bbi.2014.07.002.
- Zhao Z, Nelson AR, Betsholtz C, et al. Establishment and dysfunction of the blood-brain barrier [J]. Cell, 2015, 163 (5): 1064-1078. DOI: 10.1016/j.cell.2015.10.067.
- Banks WA, Gray AM, Erickson MA, et al. Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit [J]. J Neuroinflammation, 2015, 12: 223. DOI: 10.1186/s12974-015-0434-1.
- 中国中西医结合学会急救医学专业委员会, 《中国中西医结合急救杂志》编辑委员会. 脓毒性休克中西医结合诊治专家共识 [J]. 中华危重病急救医学, 2019, 31 (11): 1317-1323. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.11.002.
- China Association of Integrative Medicine Emergency Medicine Committee, Editorial Committee of Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine. Expert consensus on diagnosis and treatment of septic shock with integrated traditional Chinese and Western medicine [J]. Chin Crit Care Med, 2019, 31 (11): 1317-1323. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.11.002.
- 李剑, 徐鑫, 郭慧, 等. 淫羊藿苷对脓毒症相关性脑病的作用机制研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2020, 27 (2): 157-160. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2020.02.007.
- Li J, Xu X, Guo H, et al. Mechanism of icariin on sepsis associated encephalopathy [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2020, 27 (2): 157-160. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2020.02.007.
- 祝森志, 黄伟平, 彭宇华, 等. 胆碱能抗炎效应介导醒脑静对脓毒症相关性脑病的保护作用 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2020, 27 (2): 161-164. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2020.02.008.
- Zhu SZ, Huang WP, Peng YH, et al. Cholinergic anti-inflammatory effect mediates the protective effect of Xingnaojing on sepsis associated encephalopathy [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2020, 27 (2): 161-164. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2020.02.008.
- Varatharaj A, Galea I. The blood-brain barrier in systemic inflammation [J]. Brain Behav Immun, 2017, 60: 1-12. DOI: 10.1016/j.bbi.2016.03.010.
- Rempe RG, Hartz A, Bauer B. Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: Versatile breakers and makers [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2016, 36 (9): 1481-1507. DOI: 10.1177/0271678X16655551.

(收稿日期: 2020-07-20)