

睡眠剥夺激活神经细胞糖酵解同工酶 PFKFB3 加重脓毒症大鼠认知功能损害

刘玉¹ 姚鹏¹ 宋勇波² 王星² 王雪菲²

¹ 武汉科技大学附属孝感医院重症医学科,湖北孝感 432000; ² 武汉科技大学附属孝感医院泌尿外科,湖北孝感 432000

通信作者:姚鹏, Email: yp113065@outlook.com

【摘要】 目的 评价睡眠剥夺对脓毒症大鼠认知功能的影响及与神经细胞糖酵解同工酶磷酸果糖激酶-2/果糖-2,6-二磷酸酶3(PFKFB3)的关系。**方法** 将56只清洁级健康雄性SD大鼠随机分为4组($n=14$):对照组(Con组)、脓毒症组(LPS组)、脓毒症+睡眠剥夺组(LPS+SD组)、脓毒症+睡眠剥夺+糖酵解抑制剂3-PO处理组(LPS+SD+3-PO组)。腹腔注射脂多糖(LPS)10 mg/kg建立脓毒症大鼠模型。LPS+SD组于注射LPS后24 h使用睡眠剥夺仪进行睡眠剥夺处理;LPS+SD+3-PO组注射LPS后24 h注射3-PO 50 mg/kg,随后进行睡眠剥夺处理。注射LPS后72 h进行新物体识别实验,随后收集血液、脑组织标本,用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测脑组织乳酸(Lac)、活性氧(ROS)及血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、丙酮酸含量,并计算乳酸/丙酮酸比值;比色法检测脑组织 Na^+/K^+ -ATP酶活性;苏木素-伊红(HE)染色观察海马区病理改变;蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测脑组织PFKFB3、闭锁小带蛋白1(ZO-1)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3(caspase-3)相对表达水平。**结果** 与Con组相比,LPS组新物体识别指数降低,血清NSE、TNF- α 、乳酸/丙酮酸比值及脑组织Lac、ROS、干湿重比明显升高,脑组织 Na^+/K^+ -ATP酶活性降低,脑组织PFKFB3、caspase-3表达上调,ZO-1表达下调,海马区神经细胞轻度变性。与LPS组相比,LPS+SD组新物体识别指数进一步降低[(39.4 \pm 5.3)%比(54.5 \pm 7.6)%],血清NSE、TNF- α 、乳酸/丙酮酸比值及脑组织Lac、ROS、干湿重比进一步升高[NSE($\mu\text{g/L}$):3.21 \pm 0.42比2.55 \pm 0.36, TNF- α (ng/L):139.4 \pm 19.7比92.2 \pm 13.5,乳酸丙酮酸比值:29.7 \pm 5.5比19.2 \pm 4.2, Lac($\mu\text{mol/g}$):19.51 \pm 2.33比11.34 \pm 1.52, ROS(kU/g):117.4 \pm 18.7比78.2 \pm 11.8,干湿重比:(81.3 \pm 9.2)%比(64.3 \pm 6.6)%],脑组织 Na^+/K^+ -ATP酶活性进一步降低($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$):1.88 \pm 0.34比2.91 \pm 0.39),脑组织PFKFB3、caspase-3表达进一步上调,ZO-1表达进一步下调(PFKFB3/ β -actin:0.80 \pm 0.11比0.45 \pm 0.07, caspase-3/ β -actin:0.71 \pm 0.09比0.37 \pm 0.05, ZO-1/ β -actin:0.31 \pm 0.05比0.61 \pm 0.08),差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),且海马区神经细胞变性明显增多。与LPS+SD相比,LPS+SD+3-PO组新物体识别指数升高[(50.8 \pm 5.9)%比(39.4 \pm 5.3)%],血清NSE、TNF- α 、乳酸/丙酮酸比值及脑组织Lac、ROS、干湿重比明显降低[NSE($\mu\text{g/L}$):2.60 \pm 0.33比3.21 \pm 0.42, TNF- α (ng/L):103.7 \pm 18.3比139.4 \pm 19.7,乳酸丙酮酸比值:17.4 \pm 5.1比29.7 \pm 5.5, Lac($\mu\text{mol/g}$):13.68 \pm 2.02比19.51 \pm 2.33, ROS(kU/g):86.9 \pm 14.5比117.4 \pm 18.7,干湿重比:(67.7 \pm 6.9)%比(81.3 \pm 9.2)%],脑组织 Na^+/K^+ -ATP酶活性升高($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$):2.82 \pm 0.44比1.88 \pm 0.34),脑组织PFKFB3、caspase-3表达下调,ZO-1表达上调(PFKFB3/ β -actin:0.50 \pm 0.06比0.80 \pm 0.11, caspase-3/ β -actin:0.43 \pm 0.06比0.71 \pm 0.09, ZO-1/ β -actin:0.52 \pm 0.06比0.31 \pm 0.05),差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),且海马区神经细胞变性明显减轻。**结论** 睡眠剥夺可加重脓毒症大鼠神经炎症、细胞变性和凋亡,导致血脑屏障破坏和认知损害;3-PO处理可显著减轻脓毒症大鼠海马神经细胞损伤变性,抑制神经炎症和细胞凋亡,改善认知功能障碍,该作用可能与抑制糖酵解同工酶PFKFB3有关。

【关键词】 睡眠剥夺; 糖酵解; 脓毒症; 认知损害

基金项目:湖北省孝感市自然科学基金项目(XGKJ2021010039, XGKJ2022010025)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20220705-00632

Sleep deprivation aggravates cognitive impairment in septic rats by activating neuronal glycolytic isoenzyme PFKFB3

Liu Yu¹, Yao Peng¹, Song Yongbo², Wang Xing², Wang Xuefei²

¹Department of ICU, Xiaogan Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Xiaogan 432000, Hubei, China; ²Department of Urology, Xiaogan Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Xiaogan 432000, Hubei, China

Corresponding author: Yao Peng, Email: yp113065@outlook.com

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of sleep deprivation on cognitive function in septic rats and its relationship with neuronal glycolysis isoenzyme phosphofructokinase-2/fructose-2,6-diphosphatase 3 (PFKFB3). **Methods** Fifty-six healthy male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into 4 groups ($n = 14$): control group

(Con group), sepsis group (LPS group), sepsis+sleep deprivation group (LPS+SD group), sepsis+sleep deprivation+glycolysis inhibitor 3-PO treatment group (LPS+SD+3-PO group). The sepsis model was established by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS) 10 mg/kg. Rats in LPS+SD group were treated with sleep deprivation using a sleep deprivation instrument 24 hours after LPS injection. The LPS+SD+3-PO group was intraperitoneally injected with LPS for 24 hours, and then injected with 3-PO 50 mg/kg, followed by sleep deprivation. Novel object recognition experiments were performed 72 hours after LPS injection. Subsequently, blood and brain tissue samples were collected. The contents of lactate (Lac), reactive oxygen species (ROS) and serum tumor necrosis factor- α (TNF- α), neuron-specific enolase (NSE), pyruvate in brain tissue were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Then, the lactate/pyruvate ratio was calculated. Na^+ - K^+ -ATPase activity in brain tissue was detected by colorimetry. Morphological changes in hippocampus were detected by hematoxylin-eosin (HE) staining. And the protein expression levels of PFKFB3, ZO-1 and cleaved caspase-3 were measured by Western blotting. **Results** Compared with Con group, the novel object recognition index of LPS group was decreased, the levels of NSE, TNF- α , lactate/pyruvate ratio in serum and the levels of Lac, ROS and dry-wet weight ratio in brain tissue were significantly increased, Na^+ - K^+ -ATPase activity in brain tissue was decreased, the protein expressions of PFKFB3, caspase-3 were up-regulated, ZO-1 expression was down-regulated, and the neurons in hippocampus were slightly degenerated. Compared with LPS group, the novel object recognition index of LPS+SD group was further decreased [(39.4 \pm 5.3)% vs. (54.5 \pm 7.6)%], serum NSE, TNF- α , lactate/pyruvate ratio and brain tissue Lac, ROS, dry-wet weight ratio were further increased [NSE ($\mu\text{g/L}$): 3.21 \pm 0.42 vs. 2.55 \pm 0.36, TNF- α (ng/L): 139.4 \pm 19.7 vs. 92.2 \pm 13.5, lactate/pyruvate ratio: 29.7 \pm 5.5 vs. 19.2 \pm 4.2, Lac ($\mu\text{mol/g}$): 19.51 \pm 2.33 vs. 11.34 \pm 1.52, ROS (kU/g): 117.4 \pm 18.7 vs. 78.2 \pm 11.8, dry-wet weight ratio: (81.3 \pm 9.2)% vs. (64.3 \pm 6.6)%], and Na^+ - K^+ -ATPase activity was further decreased ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$): 1.88 \pm 0.34 vs. 2.91 \pm 0.39), the protein expressions of PFKFB3, caspase-3 were further up-regulated and ZO-1 expression was further down-regulated (PFKFB3/ β -actin: 0.80 \pm 0.11 vs. 0.45 \pm 0.07, caspase-3/ β -actin: 0.71 \pm 0.09 vs. 0.37 \pm 0.05, ZO-1/ β -actin: 0.31 \pm 0.05 vs. 0.61 \pm 0.08). The differences were statistically significant (all $P < 0.05$). HE staining showed that the degeneration of neurons in hippocampus was significantly aggravated. Compared with LPS+SD group, the novel object recognition index of LPS+SD+3-PO group was increased [(50.8 \pm 5.9)% vs. (39.4 \pm 5.3)%], NSE, TNF- α , lactate/pyruvate ratio of serum and Lac, ROS, dry-wet weight ratio of brain tissue were significantly decreased [NSE ($\mu\text{g/L}$): 2.60 \pm 0.33 vs. 3.21 \pm 0.42, TNF- α (ng/L): 103.7 \pm 18.3 vs. 139.4 \pm 19.7, lactate/pyruvate ratio: 17.4 \pm 5.1 vs. 29.7 \pm 5.5, Lac ($\mu\text{mol/g}$): 13.68 \pm 2.02 vs. 19.51 \pm 2.33, ROS (kU/g): 86.9 \pm 14.5 vs. 117.4 \pm 18.7, dry-wet weight ratio: (67.7 \pm 6.9)% vs. (81.3 \pm 9.2)%], and Na^+ - K^+ -ATPase activity was increased ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$): 2.82 \pm 0.44 vs. 1.88 \pm 0.34). The protein expressions of PFKFB3, caspase-3 were down-regulated and ZO-1 expression was up-regulated (PFKFB3/ β -actin: 0.50 \pm 0.06 vs. 0.80 \pm 0.11, caspase-3/ β -actin: 0.43 \pm 0.06 vs. 0.71 \pm 0.09, ZO-1/ β -actin: 0.52 \pm 0.06 vs. 0.31 \pm 0.05). The differences were statistically significant (all $P < 0.05$). HE staining showed that the degeneration of neurons in hippocampus was significantly improved. **Conclusions** Sleep deprivation could aggravate neuroinflammation, neuronal degeneration and apoptosis in septic rats, resulting in destruction of blood-brain barrier and cognitive impairment. 3-PO treatment significantly alleviate the injury and degeneration of hippocampal neurons in septic rats, inhibit neuroinflammation and apoptosis, and improve cognitive dysfunction, which may be related to the inhibition of glycolytic isoenzyme PFKFB3.

【Key words】 Sleep deprivation; Glycolysis; Sepsis; Cognitive impairment

Fund program: Natural Science Project of Xiaogan of Hubei (XGKJ2021010039, XGKJ2022010025)

DOI: 10.3760/ema.j.cn121430-20220705-00632

脓毒症相关性脑病是一类继发于脓毒症由非颅内感染所致的可逆性神经功能障碍综合征,常合并认知障碍、意识障碍或呼吸循环衰竭而需要重症监护治疗^[1]。受心理应激、侵入性治疗或重症监护病房(intensive care unit, ICU)特殊环境因素的影响,约半数以上的重症患者伴有睡眠障碍(如睡眠剥夺、节律紊乱及碎片化睡眠等)^[2]。

临床研究表明,脓症患者存在代谢重编程现象,表现为有氧糖酵解、高乳酸血症,其水平与器官损伤程度和病死率呈正相关^[3]。糖酵解途径关键酶磷酸果糖激酶-2/果糖-2,6-二磷酸酶3(phosphofructokinase-2/fructose-2,6-bisphosphatase 3, PFKFB3)兼有磷酸酶和激酶双重活性,其可通过上调磷酸果糖激酶表达提高糖酵解速率。基础研究表明,睡眠障碍可通过抑制皮质和海马神经细

胞葡萄糖代谢、诱导神经炎症破坏阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)模型大鼠和新生小鼠血脑屏障及海马依赖性认知功能^[4-5];而抑制 PFKFB3 表达可显著改善脑缺血/再灌注损伤^[6]。本研究拟评价睡眠剥夺对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的脓毒症大鼠认知功能的影响及与神经细胞糖酵解同工酶 PFKFB3 的关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组: 清洁级健康雄性 SD 大鼠 56 只,体重 280 ~ 300 g,9 ~ 10 周龄,购于武汉赛维生物公司〔动物许可证号:SYXK(鄂)2018-0101〕,于环境温度 23 ~ 25 °C、湿度 45% ~ 60% 下适应性喂养 1 周后按随机数字表法将大鼠分为 4 组($n=14$): 对照组(Con 组)、脓毒症组(LPS 组)、脓毒症+睡眠剥夺组(LPS+SD 组)、脓毒症+睡眠剥夺+糖酵

解抑制剂 3-PO 处理组(LPS+SD+3-PO 组)。本研究方案及实验操作获武汉科技大学附属孝感医院伦理委员会审批通过(审批号: XGLY202106011)。

1.2 建模及分组处理: 适应性喂养结束后, 腹腔注射 LPS 10 mg/kg 建立脓毒症大鼠模型。LPS+SD 组大鼠于注射 LPS 后 24 h 使用睡眠剥夺仪(上海欣软公司)进行睡眠剥夺处理, 设置睡眠剥夺周期 15 min, 持续 48 h。LPS+SD+3-PO 组注射 LPS 后 24 h 注射糖酵解抑制剂 3-PO 50 mg/kg, 随后进行睡眠剥夺处理。Con 组腹腔注射等体积二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)载体溶液。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 新物体识别实验: 注射 LPS 后 72 h 进行新物体识别实验。边长 40 cm 的正方体测试盒四周使用黑色背景板遮挡, 实验时将大鼠放入无物体的测试盒中适应 3 min; 随后在盒正中放入 2 个边长为 5 cm 的亚克力正方体(间距 10 cm); 15 min 后将其中一个正方体更换为直径 5 cm、高 5 cm 的圆锥体, 观察并记录 3 min 内大鼠对新(N)、旧(F)物体的探索时间(大鼠鼻部接触物体或距离物体 < 1 cm 开始计时), 并计算识别指数以评估其短期记忆能力。识别指数 = $(N-F)/(N+F) \times 100\%$ 。每次测试完成后使用乙醇清洁物体。

1.3.2 脑组织干湿重比测定: 新物体识别实验结束后每组随机选取 4 只大鼠, 断头取脑后灌洗, 无菌滤纸吸干脑组织表面水分称湿重, 随后将脑组织置于 70 °C 恒温烘箱, 36 h 后称干重, 计算干湿重比。干湿重比 = $\text{干重} / \text{湿重} \times 100\%$ 。

1.3.3 脑组织病理学观察: 新物体识别实验结束后每组随机选取 3 只大鼠, 腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 3.5 mg/kg, 500 mL 肝素生理盐水灌洗后断头取脑, 10% 甲醛溶液固定, 石蜡包埋、切片, 行苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色, 光镜下观察海马区组织病理学改变。

1.3.4 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测海马组织乳酸(lactate, Lac)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)和血清肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)、丙酮酸含量: 每组随机取 4 只大鼠, 取海马组织, 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗干净, 按 1:9 比例加入生理盐水, 随后加入 1% 体积蛋白酶抑制, 充分匀浆后 4 000 r/min(离心半径 12 cm)离

心 10 min, 收集上清液, 比色法测定样品蛋白浓度; 每组随机取 6 只大鼠开腹取下腔静脉血, 3 000 r/min(离心半径 12 cm)离心 10 min 后收集上清, 依照 ELISA 试剂盒说明书步骤分别加入待测液和工作液; 检测组织 Lac、ROS 含量及血清 TNF- α 、NSE、丙酮酸含量, 计算血清乳酸/丙酮酸比值。

1.3.5 比色法检测 Na^+/K^+ -ATP 酶活性: 取 ELISA 步骤中组织生理盐水悬液 200 μL 于小离心管中, 按照说明书步骤用提取液稀释 10 倍, 随后依次加入酶促反应液, 37 °C 水浴 10 min, 室温下 6 000 r/min(离心半径 12 cm)离心 10 min, 收集上清液, 分别加入应用液和定磷试剂, 室温孵育 30 min 后比色法检测 Na^+/K^+ -ATP 酶活性。

1.3.6 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测 PFKFB3、闭锁小带蛋白 1(ZO-1)、裂解的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(cleaved caspase-3)表达: 新物体识别实验结束后每组随机取 3 只大鼠脑组织, 在冰盒中快速取出海马体, 加入 1.5 mL 裂解液和 1% 体积蛋白酶抑制剂, 碾磨、离心后收集上清液; 加入 1 mL 上样缓冲液后煮沸; 采用 BCA 法测定组织蛋白浓度; 配置 10% 凝胶, 每孔加样 20 μg , 常规 60 V 电泳 45 min 后转膜, 5% 牛奶低温封闭 1 h, 1:800 稀释一抗(美国 Abcam 公司), 低温孵育 12 h 后 PBS 洗涤 3 次, 再置于 1:6 000 稀释的二抗溶液中低温孵育 1 h, 使用超敏增强发光试剂(enhanced chemiluminescence, ECL)显色, ImageLab V6.0 图像处理软件曝光拍摄, β -肌动蛋白(β -actin)为内参蛋白, 以待测蛋白灰度值与内参蛋白灰度值的比值反映蛋白相对表达量。

1.4 统计学分析: 采用 SPSS 19.0 软件进行数据统计。正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组内两两比较采用 SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 睡眠剥夺增强脓毒症大鼠糖酵解、加重血脑屏障和认知损害(表 1): 与 Con 组相比, LPS 组新物体识别指数降低, 血清 NSE、TNF- α 和乳酸/丙酮酸比值明显升高(均 $P < 0.05$)。与 LPS 组相比, LPS+SD 组新物体识别指数进一步降低, 血清 NSE、TNF- α 、乳酸/丙酮酸比值进一步升高(均 $P < 0.05$)。与 LPS+SD 相比, LPS+SD+3-PO 组新物体识别指数明显升高, 血清 NSE、TNF- α 和乳酸/丙酮酸比值明显降低(均 $P < 0.05$)。

表1 各组大鼠新物物识别指数及血清NSE、TNF-α和乳酸丙酮酸比值的比较(̄x±s)

组别	动物数(只)	识别指数(%)	NSE(μg/L)	TNF-α(ng/L)	乳酸丙酮酸比值
Con组	6	66.1±8.3	1.76±0.23	34.5±6.1	8.5±2.7
LPS组	6	54.5±7.6 ^a	2.55±0.36 ^a	92.2±13.5 ^a	19.2±4.2 ^a
LPS+SD组	6	39.4±5.3 ^b	3.21±0.42 ^b	139.4±19.7 ^b	29.7±5.5 ^b
LPS+SD+3-PO组	6	50.8±5.9 ^c	2.60±0.33 ^c	103.7±18.3 ^c	17.4±5.1 ^c
F值		15.330	18.140	48.290	26.710
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:Con组为对照组,LPS组为脂多糖致脓毒症组,LPS+SD组为脓毒症+睡眠剥夺组,LPS+SD+3-PO组为脓毒症+睡眠剥夺+糖酵解抑制剂3-PO处理组;NSE为神经元特异性烯醇化酶,TNF-α为肿瘤坏死因子-α;与Con组相比,^aP<0.05;与LPS组相比,^bP<0.05;与LPS+SD组相比,^cP<0.05。

2.2 睡眠剥夺增强脓毒症大鼠脑组织糖酵解、加重脑水肿和氧化应激(表2);与Con组相比,LPS组脑组织Lac、ROS和干湿重比明显升高,Na⁺-K⁺-ATP酶活性降低(均P<0.05)。与LPS组相比,LPS+SD组脑组织Lac、ROS和干湿重比进一步升高,Na⁺-K⁺-ATP酶活性进一步降低(均P<0.05)。与LPS+SD组相比,LPS+SD+3-PO组脑组织Lac、ROS和干湿重比明显降低,Na⁺-K⁺-ATP酶活性明显升高(均P<0.05)。

表2 各组大鼠海马组织Lac、Na⁺-K⁺-ATP酶活性、ROS及干湿重比的比较(̄x±s)

组别	动物数(只)	Lac(μmol/g)	Na ⁺ -K ⁺ -ATP酶(mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹)
Con组	4	5.25±0.81	3.72±0.46
LPS组	4	11.34±1.52 ^a	2.91±0.39 ^a
LPS+SD组	4	19.51±2.33 ^b	1.88±0.34 ^b
LPS+SD+3-PO组	4	13.68±2.02 ^c	2.82±0.44 ^c
F值		44.640	11.060
P值		<0.001	0.001

组别	动物数(只)	ROS(kU/g)	干湿重比(%)
Con组	4	33.4±6.6	47.5±6.1
LPS组	4	78.2±11.8 ^a	64.3±6.6 ^a
LPS+SD组	4	117.4±18.7 ^b	81.3±9.2 ^b
LPS+SD+3-PO组	4	86.9±14.5 ^c	67.7±6.9 ^c
F值		25.970	14.440
P值		<0.001	<0.001

注:Con组为对照组,LPS组为脂多糖致脓毒症组,LPS+SD组为脓毒症+睡眠剥夺组,LPS+SD+3-PO组为脓毒症+睡眠剥夺+糖酵解抑制剂3-PO处理组;Lac为乳酸,ROS为活性氧;与Con组相比,^aP<0.05;与LPS组相比,^bP<0.05;与LPS+SD组相比,^cP<0.05。

2.3 睡眠剥夺加重脓毒症大鼠海马神经细胞变性(图1);HE染色显示,Con组海马神经细胞均质淡染、形态规则,锥体细胞排列整齐密集,胞核均匀蓝染,呈圆形,偶见中性粒细胞;LPS组胶质细胞增生,锥体细胞排列松散,部分神经元胞核深染,伴中性粒细

胞增多;LPS+SD组锥体细胞胞核固缩,形态不齐,胞质稀少,伴中性粒细胞浸润;LPS+SD+3-PO组细胞排列不整,胞质稀疏,部分细胞水肿变性、呈多边形,局部可见中性粒细胞。

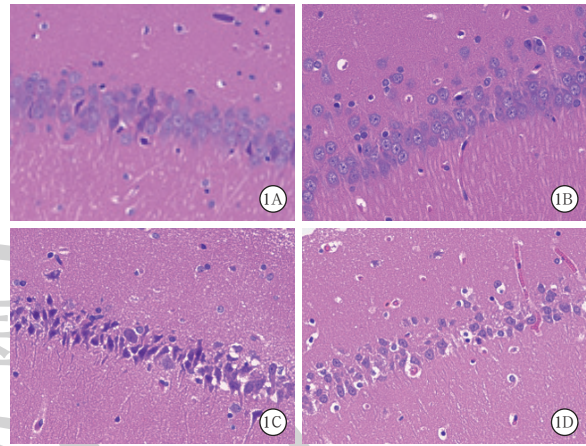
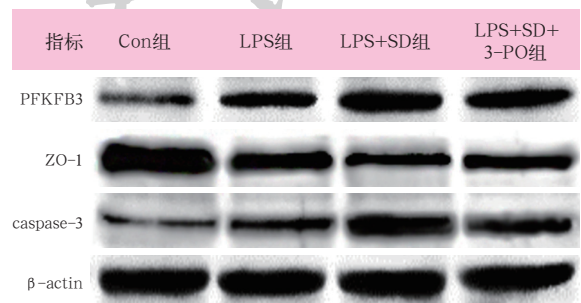


图1 光镜下观察各组大鼠海马组织病理学改变 对照组(Con组,A)海马区神经细胞均质淡染,排列整齐;脂多糖致脓毒症组(LPS组,B)海马区神经细胞排列疏松,少数锥体细胞水肿变性;脓毒症+睡眠剥夺组(LPS+SD组,C)海马区神经细胞胞核固缩、胞质深染,广泛水肿变性;脓毒症+睡眠剥夺+糖酵解抑制剂3-PO处理组(LPS+SD+3-PO组,D)海马区神经细胞排列松散,部分细胞水肿变性明显 苏木素-伊红(HE)染色 高倍放大

2.4 睡眠剥夺增强脓毒症大鼠脑组织糖酵解、加重神经细胞凋亡(图2;表3);Western blotting结果显示,与Con组相比,LPS组海马PFKFB3、caspase-3表达水平升高,ZO-1表达水平降低(均P<0.05)。与LPS组相比,LPS+SD组海马PFKFB3、caspase-3表达水平进一步升高,ZO-1表达水平进一步降低(均P<0.05)。与LPS+SD组相比,LPS+SD+3-PO组海马PFKFB3、caspase-3表达水平明显降低,ZO-1表达水平明显升高(均P<0.05)。



Con组为对照组,LPS组为脂多糖致脓毒症组,LPS+SD组为脓毒症+睡眠剥夺组,LPS+SD+3-PO组为脓毒症+睡眠剥夺+糖酵解抑制剂3-PO处理组;PFKFB3为磷酸果糖激酶-2/果糖-2,6-二磷酸酶3,ZO-1为闭锁小带蛋白1,caspase-3为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3,β-actin为β-肌动蛋白

图2 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测各组大鼠海马组织PFKFB3、ZO-1及caspase-3表达

表 3 各组大鼠海马组织 PFKFB3、ZO-1 及 caspase-3 相对表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	PFKFB3/ β -actin	ZO-1/ β -actin	caspase-3/ β -actin
Con 组	3	0.24 ± 0.04	0.84 ± 0.11	0.14 ± 0.02
LPS 组	3	0.45 ± 0.07 ^a	0.61 ± 0.08 ^a	0.37 ± 0.05 ^a
LPS+SD 组	3	0.80 ± 0.11 ^b	0.31 ± 0.05 ^b	0.71 ± 0.09 ^b
LPS+SD+3-PO 组	3	0.50 ± 0.06 ^c	0.52 ± 0.06 ^c	0.43 ± 0.06 ^c
F 值		28.340	21.670	45.170
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: Con 组为对照组, LPS 组为脂多糖致脓毒症组, LPS+SD 组为脓毒症 + 睡眠剥夺组, LPS+SD+3-PO 组为脓毒症 + 睡眠剥夺 + 糖酵解抑制剂 3-PO 处理组; PFKFB3 为磷酸果糖激酶-2/果糖-2,6-二磷酸酶 3, ZO-1 为闭锁小带蛋白 1, caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, β -actin 为 β -肌动蛋白; 与 Con 组相比, ^a $P < 0.05$; 与 LPS 组相比, ^b $P < 0.05$; 与 LPS+SD 组相比, ^c $P < 0.05$

3 讨论

脓毒症被认为是 ICU 中具有挑战性的疾病之一, 因感染致宿主免疫反应紊乱甚至失衡, 患者常合并多器官功能障碍^[7]。既往研究表明, 由于心、脑具备强大的自主调节能力, 其组织灌注在休克失代偿前仍趋于稳定, 然而脓毒症患者氧供充足的情况下却表现为糖酵解活性增强、氧化磷酸化减少^[8]。进一步研究表明, 这一代谢转变在疾病初期不仅能通过星形胶质细胞-神经元乳酸穿梭缓解应激状态下的能量相对不足, 还可显著促进中性粒细胞活化并通过磷酸戊糖途径减轻促炎细胞因子(如 TNF- α) 正反馈介导的 ROS 积累, 使氧化应激向氧化还原平衡倾斜^[9]; 但随病情迅速进展, 糖酵解途径产生的丙酮酸含量增加, 致使线粒体氧化磷酸化减少, 而乳酸积累显著增多; 此外, 乳酸介导的树突状细胞、调节性 T 细胞促炎反应过度激活, 最终导致内环境酸碱平衡紊乱、组织细胞和内皮细胞功能障碍^[10]。近期研究发现, 糖酵解中间产物丙酮酸及三羧酸循环中间产物琥珀酸、柠檬酸等积累可诱导溶酶体产生大量高迁移率族蛋白, 经乳酸化修饰后通过外泌体囊泡分泌, 进而加重晚期炎症反应^[11]。本研究参考前期研究, 经腹腔注射 10 mg/kg LPS 建立脓毒症大鼠模型^[12], 结果显示, 与 Con 组相比, LPS 组血清 NSE、TNF- α 、乳酸/丙酮酸比值和脑组织 ROS、Lac 升高, Na⁺-K⁺-ATP 酶活性及紧密连接蛋白 ZO-1 表达降低, 凋亡相关蛋白 caspase-3 表达上调, 组织干湿比升高, 提示脓毒症大鼠血清炎症因子及脑组织糖酵解水平升高、血脑屏障破坏, 脓毒症模型建立成功。

睡眠是人类不可或缺的基本生理活动之一, 对

免疫调节、学习记忆和生长发育极为重要。流行病学调查显示, 我国 30 岁以上的人群中约 23% 伴有睡眠障碍, 表现为入睡困难、睡眠周期紊乱或夜间睡眠减少^[13]。而 ICU 患者因需要机械通气、多种侵入性监测及精细护理操作, 发生睡眠障碍的比例高达 50%, 并与谵妄和远期认知损害密切相关^[2, 14]。此外, 既往研究提示 ICU 环境噪声、持续光照及护理治疗等可显著干扰患者正常睡眠节律和深度, 强化疼痛、应激诱导的焦虑情绪, 导致快动眼睡眠减少、睡眠碎片化, 被医护患三方认为是导致睡眠剥夺最主要的非治疗性影响因素, 而通过强化宣教、增加沟通探视及强化舒适环境可明显减轻 ICU 患者负性情绪积累, 改善睡眠质量^[15-16]。基础研究表明, 睡眠剥夺诱导的脑局部低灌注可损伤神经-血管单元, 致使血管内皮细胞和周细胞损伤、组织因子暴露并显著下调紧密连接蛋白表达, 进而引起血脑屏障紧密连接破坏、胶质细胞激活, 而活化的胶质细胞产生大量 ROS、促炎细胞因子可正反馈激活中枢神经系统炎症级联反应, 导致难以逆转的恶性循环^[17-18]。进一步研究发现, 睡眠剥夺与 ICU 谵妄发生率显著相关, 与非谵妄患者相比, 谵妄患者夜间睡眠觉醒增多、快动眼睡眠时间缩短, 且外周褪黑素分泌峰值降低、皮质醇峰值升高^[19]。上述研究提示, 在应激状态下, ICU 患者情绪、睡眠等易被多种因素干扰, 这些干扰因素可放大疾病诱导的炎症反应、加重睡眠障碍, 进而导致中枢炎症反应和脓毒症相关性脑病。此外, 本课题组前期研究发现, 声光或机械刺激诱导的睡眠剥夺可明显干扰睡眠结构, 影响褪黑素、皮质醇分泌, 导致胰岛素抵抗及抑郁样行为^[20]。本研究结果显示, 与 LPS 组相比, 经过睡眠剥夺处理后, LPS+SD 组血清 NSE、TNF- α 和脑组织 Lac、ROS 升高, caspase-3 表达、脑干湿重比升高, 脑组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性、ZO-1 表达及新物体识别指数明显降低, 提示睡眠剥夺可进一步放大 LPS 诱导的神经细胞变性、凋亡, 加重中枢炎症反应和 ROS 积累, 致使血脑屏障破坏, 认知功能降低。

研究证实脓毒症患者具有糖代谢重编程表现, 即能量代谢从氧化磷酸化转变为糖酵解, 该过程可显著增加单位时间内 ATP 生成速率^[3]。PFKFB3 是糖酵解途径关键限速酶之一, 主要表达于能量代谢活跃的脑、肺、肝等组织, 通过调节 2,6-二磷酸果糖合成以调控磷酸果糖激酶 1 的活性及糖酵解

速率,其表达水平与糖酵解程度密切相关^[21]。后续研究发现,传统中药黄连、犀角可通过调节糖代谢紊乱,抑制全身炎症反应,从而改善脓毒症相关性脑病^[22-23]。3-PO 是 PFKFB3 的特异性小分子抑制剂,可与果糖-6-磷酸竞争性结合进而抑制糖酵解过程^[24]。既往研究显示,3-PO 可显著抑制 2,6-二磷酸果糖及乳酸生成,减轻脓毒症相关肺损伤^[25];还能促进葡萄糖磷酸戊糖途径减轻氧化应激,改善神经元缺血/再灌注损伤^[26]。本研究参考前期研究经腹腔注射 3-PO 50 mg/kg^[21],结果显示,与 LPS+SD 组相比,经过特异性抑制剂 3-PO 处理后,LPS+SD+3-PO 组血清 NSE、TNF- α 、乳酸/丙酮酸比值及脑组织 Lac、ROS、caspase-3 表达水平及干湿重比降低,Na⁺-K⁺-ATP 酶活性、ZO-1 表达及新物体识别指数升高,神经细胞变性及血脑屏障完整性明显改善,提示睡眠剥夺可通过增强糖酵解途径加重脓毒症中枢炎症反应和氧化应激,进而导致血脑屏障破坏、认知功能损害;而抑制糖酵解通路可减缓睡眠剥夺诱导的乳酸和促炎因子升高,改善神经细胞变性、血脑屏障破坏,减轻认知损伤。

综上所述,睡眠剥夺可加重脓毒症大鼠神经炎症、细胞变性和凋亡,导致血脑屏障破坏和认知损害;3-PO 处理可显著减轻脓毒症大鼠海马神经细胞损伤变性,抑制神经炎症和细胞凋亡,改善认知功能障碍,该作用可能与抑制糖酵解同工酶 PFKFB3 有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- 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. DOI: 10.1080/14787210.2020.1812384.
- Delaney LJ, Van Haren F, Lopez V. Sleeping on a problem: the impact of sleep disturbance on intensive care patients: a clinical review [J]. *Ann Intensive Care*, 2015, 5: 3. DOI: 10.1186/s13613-015-0043-2.
- Nalos M, Parnell G, Robergs R, et al. Transcriptional reprogramming of metabolic pathways in critically ill patients [J]. *Intensive Care Med Exp*, 2016, 4 (1): 21. DOI: 10.1186/s40635-016-0094-1.
- So-Ngern A, Chirakalwasan N, Saetung S, et al. Effects of two-week sleep extension on glucose metabolism in chronically sleep-deprived individuals [J]. *J Clin Sleep Med*, 2019, 15 (5): 711-718. DOI: 10.5664/jcsm.7758.
- 徐宇彤,贾俊可,张学敏,等.烟酰胺单核苷酸对睡眠剥夺幼鼠神经发生减退的影响[J].*中华麻醉学杂志*, 2021, 41 (11): 1334-1337. DOI: 10.3760/cma.j.cn131073.20210811.01113.
- 孔亮.缺血性脑中风神经炎症调控及血脑屏障损伤保护相关研究[D].济南:山东大学,2017.
- Chiu C, Legrand M. Epidemiology of sepsis and septic shock [J]. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2021, 34 (2): 71-76. DOI: 10.1097/ACO.0000000000000958.
- Nalos M, Parnell G, Robergs R, et al. Transcriptional reprogramming of metabolic pathways in critically ill patients [J]. *Intensive Care Med Exp*, 2016, 4 (1): 21. DOI: 10.1186/s40635-016-0094-1.
- Tan CY, Gu J, Li T, et al. Inhibition of aerobic glycolysis alleviates sepsis-induced acute kidney injury by promoting lactate/Sirtuin 3/AMPK-regulated autophagy [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47 (3): 19. DOI: 10.3892/ijmm.2021.4852.
- Suetrong B, Walley KR. Lactic acidosis in sepsis: it's not all anaerobic: implications for diagnosis and management [J]. *Chest*, 2016, 149 (1): 252-261. DOI: 10.1378/chest.15-1703.
- Yang K, Fan M, Wang XH, et al. Lactate promotes macrophage HMGB1 lactylation, acetylation, and exosomal release in polymicrobial sepsis [J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29 (1): 133-146. DOI: 10.1038/s41418-021-00841-9.
- 姚鹏,陈勇,李依玲,等.海马神经细胞死亡通过 Nrf2/GPX4 信号通路导致脓毒症相关性脑病大鼠认知功能障碍[J].*中华危重病急救医学*, 2019, 31 (11): 1389-1394. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.11.015.
- 郑棒,林丽玲,余灿清,等.中国成年人睡眠时长、午睡与失眠症状的分布及关联研究[J].*中华流行病学杂志*, 2017, 38 (4): 452-456. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2017.04.008.
- Lewandowska K, Malkiewicz MA, Siemiński M, et al. The role of melatonin and melatonin receptor agonist in the prevention of sleep disturbances and delirium in intensive care unit: a clinical review [J]. *Sleep Med*, 2020, 69: 127-134. DOI: 10.1016/j.sleep.2020.01.019.
- 黄凡,王蜜芳,朱依筠,等.强化细节管理在减少 ICU 清醒患者环境压力源中的应用效果[J].*中国中西医结合急救杂志*, 2021, 28 (3): 339-342. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2021.03.019.
- Killgore WD. Effects of sleep deprivation on cognition [J]. *Prog Brain Res*, 2010, 185: 105-129. DOI: 10.1016/B978-0-444-53702-7.00007-5.
- Sun J, Wu JS, Hua FZ, et al. Sleep deprivation induces cognitive impairment by increasing blood-brain barrier permeability via CD44 [J]. *Front Neurol*, 2020, 11: 563916. DOI: 10.3389/fneur.2020.563916.
- So-Ngern A, Chirakalwasan N, Saetung S, et al. Effects of two-week sleep extension on glucose metabolism in chronically sleep-deprived individuals [J]. *J Clin Sleep Med*, 2019, 15 (5): 711-718. DOI: 10.5664/jcsm.7758.
- 孙婷,韩芳,孙运良,等.重症监护病房谵妄患者 24 h 连续睡眠监测及褪黑素动态水平变化的研究[J].*中华危重病急救医学*, 2014, 26 (10): 726-729. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.10.010.
- 何鹏,陈玲,刘玉,等.声光与机械刺激对脓毒症大鼠睡眠和血脑屏障及认知功能的影响[J].*中华危重病急救医学*, 2021, 33 (5): 529-534. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200630-00514.
- Obach M, Navarro-Sabaté A, Caro J, et al. 6-Phosphofructo-2-kinase (pfkfb3) gene promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (51): 53562-53570. DOI: 10.1074/jbc.M406096200.
- 张默,李敏珠,鲁俊,等.犀角地黄汤治疗老年脓毒症患者的临床研究[J].*中国中西医结合急救杂志*, 2017, 24 (4): 359-363. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2017.04.007.
- 陈桂荣,徐煜彬,郭松.黄连解毒汤抗脓毒症的药理学物质基础和作用机制研究可视化分析[J].*中国中西医结合急救杂志*, 2022, 29 (3): 268-273. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2022.03.003.
- Wang LN, Cao YP, Gorshkov B, et al. Ablation of endothelial Pfkfb3 protects mice from acute lung injury in LPS-induced endotoxemia [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 146: 104292. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104292.
- 龚园其.抑制糖酵解途径同工酶 PFKFB3 在脓毒症相关的急性肺损伤的作用研究[D].南昌:南昌大学,2018.
- Burmistrova O, Olias-Arjona A, Lapresa R, et al. Targeting PFKFB3 alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury in mice [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 11670. DOI: 10.1038/s41598-019-48196-z.

(收稿日期:2022-07-05)