

非瑟酮通过 Nrf2/HO-1/GPX4 通路抑制神经元铁死亡减轻脓毒症相关性脑损伤

孙饶¹ 周金瑶¹ 焦阳¹ 牛凯旋² 袁成² 邓晰明²

¹蚌埠医科大学, 安徽蚌埠 233000; ²蚌埠医科大学第一附属医院重症医学科, 安徽蚌埠 233000

通信作者: 邓晰明, Email: bbdxm@163.com

【摘要】 目的 观察非瑟酮(Fisetin)对脓毒症相关性脑损伤的保护作用,并从铁死亡的角度探讨其可能的机制。**方法** 选取6~8周龄雄性SD大鼠,并按随机数字表法分为假手术组(Sham组)、盲肠结扎穿孔术(CLP)致脓毒症模型组(CLP组)、Fisetin预处理组(CLP+Fisetin组)3组,每组18只(其中12只用于观察生存情况,6只用于指标检测)。CLP+Fisetin组于CLP前5d连续给予Fisetin溶液 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃,以二甲基亚砜(DMSO)为溶剂;Sham组和CLP组均给予等量DMSO灌胃。于最后一次灌胃后2h制模。观察各组大鼠一般情况并记录10d死亡情况,于制模后7d进行行为学测试(新物体识别实验、高架十字迷宫实验)。制模后24h进行神经反射评分,而后处死大鼠,留取脑组织,采用苏木素-伊红(HE)染色镜下观察脑组织病理学改变,采用普鲁士蓝染色镜下观察脑组织铁离子沉积;组织铁试剂盒测定脑组织铁含量;比色法测定脑组织丙二醛(MDA)含量;蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测脑组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、神经元损伤标志物S100 β 和铁死亡相关蛋白核因子E2相关因子2(Nrf2)、血红素加氧酶1(HO-1)、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)的表达。**结果** Sham组、CLP组、CLP+Fisetin组术后10d分别存活12、3、7只动物。与Sham组相比,CLP组大鼠神经反射评分明显降低,新物体辨别指数明显降低,开放臂停留时间明显缩短;HE染色可见海马区神经元细胞排列紊乱,胞质深染,核固缩多见,结构不清晰,神经元丢失,炎症细胞明显增多;普鲁士蓝染色可见脑组织铁离子沉积;脑组织铁离子、MDA含量升高,TNF- α 、S100 β 表达上调,Nrf2、HO-1、GPX4表达降低。与CLP组相比,CLP+Fisetin组大鼠神经反射评分明显升高(分: 7.33 ± 1.15 比 4.67 ± 1.53),新物体辨别指数明显升高(0.44 ± 0.02 比 0.32 ± 0.04),开放臂停留时间明显延长(min: 78.33 ± 9.29 比 41.15 ± 9.64);海马区神经元细胞排列整齐,胞质淡染,偶见核固缩、神经元丢失,炎症细胞浸润有所减少;铁离子沉积量有所减少;脑组织铁离子、MDA含量降低[铁离子($\mu\text{g/g}$): 151.27 ± 14.90 比 224.69 ± 17.64 , MDA($\mu\text{mol/g}$): 470.0 ± 44.3 比 709.3 ± 65.4],脑组织TNF- α 、S100 β 表达均明显下降(TNF- α /GAPDH: 0.651 ± 0.060 比 0.896 ± 0.022 , S100 β /GAPDH: 0.685 ± 0.032 比 0.902 ± 0.014),Nrf2、HO-1、GPX4表达明显升高(Nrf2/GAPDH: 0.708 ± 0.108 比 0.316 ± 0.112 , HO-1/GAPDH: 0.694 ± 0.022 比 0.538 ± 0.024 , GPX4/GAPDH: 0.620 ± 0.170 比 0.317 ± 0.039),差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。**结论** Fisetin预处理可能通过Nrf2/HO-1/GPX4通路抑制神经元铁死亡,进而减轻脓毒症相关性脑损伤。

【关键词】 非瑟酮; 脓毒症; 脓毒症相关性脑病; 铁死亡; 核因子E2相关因子2

基金项目: 安徽省高等学校自然科学研究重点项目(2022AH051527)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20241231-01080

Fexolone inhibits neuronal ferroptosis through the Nrf2/HO-1/GPX4 pathway to alleviates sepsis-associated brain injury

Sun Rao¹, Zhou Jinyao¹, Jiao Yang¹, Niu Kaixuan², Yuan Cheng², Deng Ximing²

¹Bengbu Medical University, Bengbu 233000, Anhui, China; ²Department of Critical Care Medicine, First Affiliated Hospital of Bengbu Medical University, Bengbu 233000, Anhui, China

Corresponding author: Deng Ximing, Email: bbdxm@163.com

【Abstract】 Objective To observe the protective effect of Fisetin on sepsis-associated brain injury and explore its possible mechanism from the perspective of ferroptosis. **Methods** Sprague-Dawley (SD) rats (6–8-week-old male) were randomly divided into three groups: sham operation group (Sham group), colonic ligation and puncture (CLP) induced sepsis model group (CLP group) and Fisetin preprocessing group (CLP+Fisetin group), with 18 rats in each group (12 for observing survival rate and 6 for indicator testing). The CLP+Fisetin group was given Fisetin solution $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ by gavage continuously for 5 days before CLP, with dimethyl sulfoxide (DMSO) as the solute, while Sham group and CLP group were given the same dose of DMSO. The model was established at 2 hours after the last gavage. The general condition of each group of rats were observed, and the 10-day mortality were record. The behavioral testing (new object recognition experiment, elevated cross maze experiment) were performed after 7 days of modeling. After 24 hours of modeling, nerve reflex scoring was performed, and then the rats were euthanized and brain tissue was collected. The pathological changes of brain tissue were observed under a microscope by hematoxylin-eosin (HE) staining, the deposition

of iron ion in brain tissue was observed by Prussian blue staining. The content of iron in brain tissue was determined by tissue iron kit, and the content of malondialdehyde (MDA) in brain tissue was determined by colorimetry. The expressions of tumor necrosis factor- α (TNF- α), neuron damage marker S100 β , nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenases-1 (HO-1) and glutathione peroxidase 4 (GPX4) were detected by Western blotting. **Results** On day 10 post-operation, 12, 3, and 7 animals survived in the Sham group, CLP group, and CLP+Fisetin group, respectively. Compared with the Sham group, rats in the CLP group showed significantly decreased nerve reflex score, new object discrimination index and open arm dwell time. HE staining showed arranged disorderly of neuronal cells, cytoplasm deep staining, nuclear condensation, unclear structures, neuron loss, and significant inflammation in the hippocampus in the hippocampus. Prussian blue staining showed iron ion deposition in the brain tissue. The contents of iron and MDA in brain tissue were elevated, and the expressions of TNF- α and S100 β were up-regulated, while the expressions of Nrf2, HO-1, and GPX4 were down-regulated. Compared with the CLP group, the CLP+Fisetin group showed significantly increased neurological reflex score (7.33 ± 1.15 vs. 4.67 ± 1.53), improved new object discrimination index (0.44 ± 0.02 vs. 0.32 ± 0.04), and longer open arm dwell time (minutes: 78.33 ± 9.29 vs. 41.15 ± 9.64). Neuronal cells in the hippocampus were more organized, with less cytoplasmic staining, nuclear condensation, reduced neuronal loss, and fewer inflammatory cells. Iron ion deposition was reduced, and the contents of iron ions and MDA in brain tissue were decreased [iron ion ($\mu\text{g/g}$): 151.27 ± 14.90 vs. 224.69 ± 17.64 , MDA ($\mu\text{mol/g}$): 470.0 ± 44.3 vs. 709.3 ± 65.4]. The expressions of TNF- α and S100 β were significantly decreased (TNF- α /GAPDH: 0.651 ± 0.060 vs. 0.896 ± 0.022 , S100 β /GAPDH: 0.685 ± 0.032 vs. 0.902 ± 0.014), while the expressions of Nrf2, HO-1, and GPX4 were significantly increased (Nrf2/GAPDH: 0.708 ± 0.108 vs. 0.316 ± 0.112 , HO-1/GAPDH: 0.694 ± 0.022 vs. 0.538 ± 0.024 , GPX4/GAPDH: 0.620 ± 0.170 vs. 0.317 ± 0.039). All differences were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** Fisetin pretreatment can inhibit ferroptosis and reduce sepsis-associated brain injury by Nrf2/HO-1/GPX4 pathway.

[Key words] Fisetin; Sepsis; Sepsis-associated encephalopathy; Ferroptosis; Nuclear factor E2-related factor 2

Fund program: Natural Science Foundation of Anhui Province of China (2022AH051527)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20241231-01080

脓毒症相关性脑病(sepsis-associated encephalopathy, SAE)是脓毒症的常见并发症之一,表现为严重的弥漫性脑功能障碍,其潜在的病理生理学机制还不完全清楚,但可能是一个涉及细胞死亡机制破坏的多因素过程^[1]。目前认为,神经元铁死亡是 SAE 的发病机制之一^[2]。

铁死亡是一种铁依赖性脂质过氧化物蓄积诱导的非凋亡性细胞死亡。目前已证实,铁死亡参与了神经毒性、急性肾衰竭、肝损伤、心脏病以及脓毒症等多种病理过程^[3-5],而通过抑制氧化应激反应可以减轻铁死亡^[6]。

研究表明,非瑟酮(Fisetin)为有效的氧化反应清除剂,可预防氧化应激引起的多种疾病,如帕金森病、阿尔茨海默病等^[7]。理论上, Fisetin 可能通过对抗氧化损伤,进而抑制神经细胞铁死亡,减轻 SAE。故本研究拟评价 Fisetin 对脓毒症大鼠脑损伤的保护作用,并从氧化应激和神经元铁死亡的角度阐明其内在机制,以期对 SAE 的临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物: SPF 级雄性 SD 大鼠 54 只,体质量 200 ~ 220 g, 6 ~ 8 周龄,购自中国医学科学院医学生物学研究所,动物许可证号: SCXK(辽)2020-0001。大鼠恒温适应性饲养 7 d,自由进食、饮水。

1.2 药物与试剂: Fisetin、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、S100 β 购于中国 MCE 公司,丙二醛(malondialdehyde, MDA)购于南京建成生物科技有限公司,组织铁试剂盒购于同仁化学研究所,普鲁士蓝染色试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司,铁死亡相关蛋白核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)、血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)、谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)均购于美国 CST 公司,内参 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)购于上海碧云天生物技术有限公司,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔 IgG、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒购于武汉赛维生物技术有限公司,电化学发光(electrochemiluminescent immunoassay, ECL)试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒、上样缓冲液和蛋白 Marker 均购于上海雅酶生物医药科技有限公司。

1.3 实验分组及处置: 按随机数字表法将 SD 大鼠分为假手术组(Sham 组)、盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture, CLP)致脓毒症模型组(CLP 组)

和 Fisetin 预处理组 (CLP+Fisetin 组) 3 组, 每组 18 只, 其中 12 只用于观察生存情况, 6 只用于指标检测。

CLP 组和 CLP+Fisetin 组均采用 CLP 制备脓毒症模型。制模前禁食 12 h, 自由饮水。用水合氯醛 40 mg/kg 麻醉大鼠, 然后取腹部正中切口 2 cm, 暴露盲肠, 用 18 号针头穿刺, 挤出少量盲肠内容物, 关腹, 并给予无菌生理盐水 24 mL/kg 进行液体复苏。Sham 组未穿刺盲肠, 其余步骤相同。

CLP+Fisetin 组于制模前 5 d 开始灌胃 Fisetin 溶液 (以 DMSO 为溶质, 浓度为 10%) $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 另两组给予等量 DMSO 混悬液灌胃。各组于最后一次灌胃后 2 h 制备脓毒症模型。

本实验中所有流程符合国际实验动物护理和使用指南建议, 并获得蚌埠医学院伦理委员会的批准 (审批号: 伦动科批字 [2023] 第 486 号)。

1.4 检测指标及方法: 制模后 24 h 进行神经反射评分, 随后处死大鼠留取脑组织标本。

1.4.1 一般情况: CLP 制模后 10 d 内密切观察大鼠精神状并记录死亡情况。

1.4.2 神经反射评分: 在 CLP 术后 24 h 观察大鼠角膜、耳廓、翻正、甩尾和逃避反射情况, 并进行客观评分, 具体而言, 角膜反射通过棉签轻触眼角膜观察大鼠能否引起眨眼或头部摇动; 耳廓反射通过轻触外耳道观察大鼠能否引起头部有力转动; 翻正反射通过观察大鼠仰卧放置后能否自动翻身成正常直立的状态; 甩尾和逃避反射通过短暂的刺激大鼠尾部观察能否引起躲避或转头来逃避伤害。每项检测正常为 2 分, 减弱为 1 分, 消失为 0 分, 总分最高 10 分。

1.4.3 行为学测试: 在制模后第 7 天进行行为学测试, 包括新物体识别实验和高架十字迷宫实验。

1.4.3.1 新物体识别实验: 利用大鼠对新物品天生的好奇心, 用新物品识别箱 (长、宽、高均为 40 cm) 判断大鼠的记忆能力。首先将行为测试房间的光线调至较暗的状态, 保持行为室整洁安静、无噪音、无气味, 温度、湿度均合适, 以免对大鼠造成刺激。将大鼠放至行为室内适应环境至少 1 h。该实验分为两个阶段: 第一阶段是熟悉期, 把两个相同的物品放在箱子底部, 物品距箱壁的距离相同, 将大鼠轻轻放在新物品识别箱内, 对两个相同物品进行探索, 10 min 后取出大鼠。第二阶段是测试期, 于熟悉期 2 h 后进行, 将物品放置在相同位置上, 其中一个物品换成形状、颜色不同的其他物品。大鼠同样在箱子内探索 10 min, 记录大鼠对新物品和旧

物品的探索时间, 计算辨别指数。辨别指数 = 新物品探索时间 / (新物品探索时间 + 旧物品探索时间)。辨别指数越大, 说明大鼠越能记住 2 h 前接触的物品, 提示大鼠记忆力越强。

1.4.3.2 高架十字迷宫实验: 利用大鼠对新鲜环境的好奇和对敞开的高空环境的恐惧, 用高架十字迷宫实验反映大鼠的焦虑情绪。高架十字迷宫有两条开放臂、两条闭合臂, 开放臂与闭合臂垂直交叉, 形成“十”字, 四条臂均长 30 cm、宽 5 cm, 正方形中央区平台的边长为 5 cm, 距离地面约 50 cm, 闭合臂的壁高 15 cm。操作前, 将行为室的光线调到柔和、比较暗的状态, 环境温度和湿度舒适, 环境整洁无异味, 安静无噪音。提前 3 h 将大鼠放进行为室适应。实验操作时, 将大鼠放置在高架十字迷宫的正中间, 自由探索 5 min, 记录大鼠在开放臂的停留时间, 即大鼠至少 80% 的躯体进入开放臂的时间。在开放臂停留的时间越长, 表明大鼠的焦虑情绪越轻。如果大鼠从高架十字迷宫上不小心掉落至地上, 给跌落的大鼠做标记, 统计数据时将跌落的大鼠剔除。

1.4.4 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察脑组织形态学变化: 术后 24 h 取海马区脑组织样本, 用 4% 多聚甲醛固定 24 h, 乙醇梯度脱水, 二甲苯石蜡包埋, 将固定的脑组织切片 (片厚 $0.5 \mu\text{m}$), HE 染色后于光镜下观察脑组织病理学改变。

1.4.5 普鲁士蓝染色观察脑组织铁离子沉积: 术后 24 h 取脑组织样本, 用 4% 多聚甲醛固定 24 h, 切片并置入普鲁士蓝染色工作液染色 15 ~ 30 min, 蒸馏水充分冲洗 5 ~ 10 min, 伊红染色液淡染背景 15 ~ 30 s, 自来水快速冲洗 2 ~ 3 s, 乙醇梯度脱水, 二甲苯石蜡包埋, 中性树脂封片, 光镜下观察脑组织铁离子沉积情况。

1.4.6 脑组织铁离子、MDA 含量测定: 取脑组织, 按 1 : 9 的比例加入生理盐水充分匀浆, 3 000 r/min (离心半径 10 cm) 离心 10 min, 取上清液, 用组织铁试剂盒测定组织铁离子含量, 用比色法测定 MDA 含量。

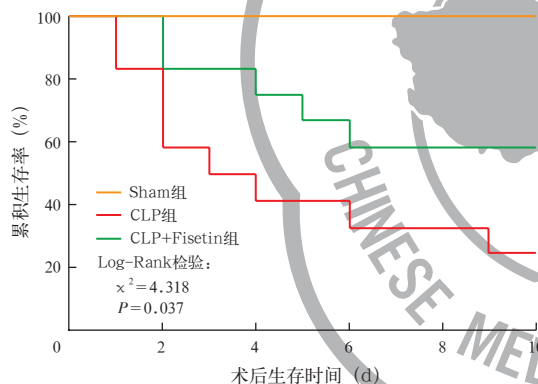
1.4.7 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测脑组织 Nrf2、HO-1、GPX4、TNF- α 、S100 β 蛋白表达: 用细胞裂解液和蛋白酶抑制剂混合液提取脑组织蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 进行 SDS-PAGE, 然后转移至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜, 牛血清白蛋白室温封闭 2 h, 含吐温 20 的 Tris 缓冲盐水 (Tris-buffered saline with Tween-20,

TBST)洗膜3次,加入稀释的一抗Nrf2、HO-1、GPX4、TNF- α 、S100 β 和内参GAPDH置于4℃冰箱中过夜,TBST洗膜3次后加入二抗稀释液摇床孵育1h,再次洗膜后加入显影液后进行曝光,以目的蛋白与内参的灰度值比值作为蛋白表达量。

1.5 统计学处理:采用GraphPad Prism 9软件进行统计处理。定量数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,并用Tukey检验进行组间比较。绘制Kaplan-Meier生存曲线,采用Log-Rank检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠存活情况(图1):Sham组12只大鼠10d均存活;CLP组12只大鼠术后10d仅存活3只;CLP+Fisetin组12只大鼠术后10d存活7只。3组术后10d累积生存率差异有统计学意义(Log-Rank检验: $\chi^2=4.318, P=0.037$)。



注:Sham组为假手术组,CLP组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组,CLP+Fisetin组为非瑟酮预处理组

图1 各组大鼠制模后10d Kaplan-Meier生存曲线

2.2 各组大鼠神经反射评分(表1):3组间神经反射评分差异有统计学意义。与Sham组相比,CLP组大鼠神经反射评分显著降低($P<0.05$)。与CLP组比较,CLP+Fisetin组大鼠神经反射评分显著升高($P<0.05$)。

表1 各组大鼠神经反射评分和行为学测试结果比较($\bar{x}\pm s$)				
组别	动物数 (只)	神经反射 评分(分)	新物体 辨别指数	开放臂停留 时间(min)
Sham组	12	8.67 $\pm$ 0.58	0.54 $\pm$ 0.01	97.67 $\pm$ 4.73
CLP组	12	4.67 $\pm$ 1.53 ^a	0.32 $\pm$ 0.04 ^a	41.15 $\pm$ 9.64 ^a
CLP+Fisetin组	12	7.33 $\pm$ 1.15 ^b	0.44 $\pm$ 0.02 ^b	78.33 $\pm$ 9.29 ^b
F值		9.33	77.43	37.03
P值		<0.05	<0.05	<0.05

注:Sham组为假手术组,CLP组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组,CLP+Fisetin组为非瑟酮预处理组;与Sham组比较,^a $P<0.05$;与CLP组比较,^b $P<0.05$

2.3 各组大鼠行为学测试结果

2.3.1 新物体识别实验(表1):3组间小鼠新物体辨别指数差异具有统计学意义。与Sham组相比,CLP组新物体辨别指数明显降低($P<0.05$)。CLP+Fisetin组新物体辨别指数较CLP组明显增高($P<0.05$)。提示脓毒症大鼠对物品的记忆能力下降,而给予Fisetin预处理可以减轻脓毒症大鼠认知能力的下降。

2.3.2 高架十字迷宫实验(表1):3组间大鼠在开放臂停留时间差异具有统计学意义。与Sham组相比,CLP组大鼠在开放臂停留时间明显缩短($P<0.05$)。CLP+Fisetin组大鼠在开放臂停留时间较CLP组明显延长($P<0.05$)。提示脓毒症大鼠出现了焦虑情绪,而给予Fisetin预处理可以改善脓毒症大鼠的焦虑情绪。

2.4 各组大鼠脑组织病理学改变(图2):HE染色显示,Sham组神经元细胞排列整齐,染色深,细胞连接紧密,偶见核固缩,无神经元丢失,炎症细胞偶见;CLP组神经元细胞排列不齐,斑块状,细胞连接紧密,核固缩多见,可见神经元丢失,炎症细胞较Sham组明显增多;CLP+Fisetin组海马区神经元细胞排列整齐,细胞连接紧密,偶见核固缩、神经元丢失、炎症细胞增多。

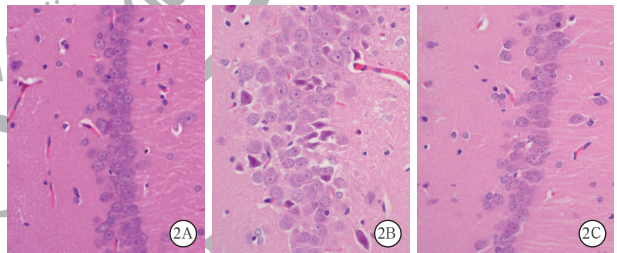


图2 光镜下观察各组大鼠脑组织病理学改变 假手术组(Sham组, A)细胞形态正常,偶见炎症细胞;盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组(CLP组, B)核固缩细胞及炎症细胞多见,神经元丢失;非瑟酮预处理组(CLP+Fisetin组, C)偶见核固缩细胞及炎症细胞 苏木素-伊红(HE)染色 高倍放大

2.5 各组大鼠脑组织铁离子沉积情况(图3):普鲁士蓝染色显示,Sham组脑组织中未观察到铁离子沉积现象。与Sham组相比,CLP组铁离子沉积增多。CLP+Fisetin组铁离子沉积较CLP组有所减少。

2.6 各组大鼠脑组织铁离子、MDA含量比较(表2):与Sham组比较,CLP组脑组织铁离子、MDA含量显著升高(均 $P<0.01$)。与CLP组比较,CLP+Fisetin组脑组织铁离子、MDA含量明显降低(均 $P<0.01$)。

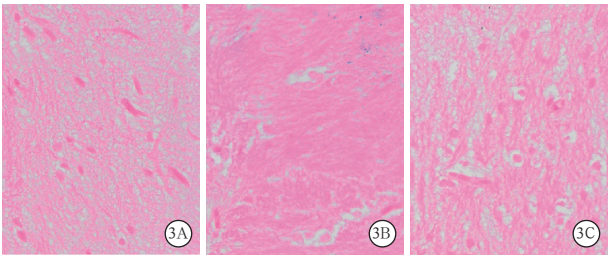


图 3 光镜下观察各组大鼠脑组织铁离子沉积情况 铁离子沉积呈蓝色。假手术组(Sham 组, A)无铁离子沉积;盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组(CLP 组, B)多见铁离子沉积;非瑟酮预处理组(CLP+Fisetin 组, C)偶见铁离子沉积 普鲁士蓝染色 低倍放大

表 2 各组大鼠脑组织铁离子、MDA 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	铁离子 ($\mu\text{g/g}$)	MDA ($\mu\text{mol/g}$)
Sham 组	6	91.64 $\pm$ 12.21	156.3 $\pm$ 15.0
CLP 组	6	224.69 $\pm$ 17.64 ^a	709.3 $\pm$ 65.4 ^a
CLP+Fisetin 组	6	151.27 $\pm$ 14.90 ^b	470.0 $\pm$ 44.3 ^b
F 值		89.26	67.03
P 值		<0.01	<0.01

注:Sham 组为假手术组,CLP 组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组,CLP+Fisetin 组为非瑟酮预处理组;MDA 为丙二醛;与 Sham 组比较,^a $P<0.01$;与 CLP 组比较,^b $P<0.01$

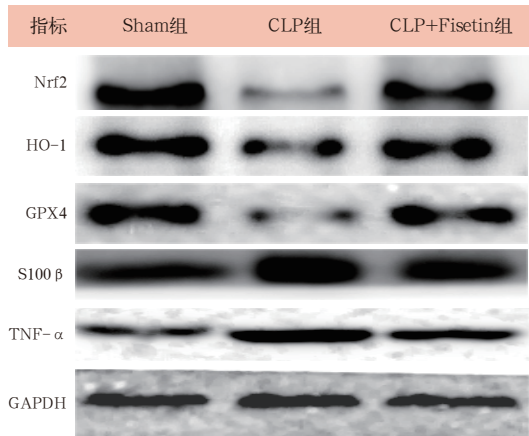
2.7 各组大鼠脑组织蛋白表达比较(表 3;图 4):与 Sham 组相比,CLP 组脑组织 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白表达水平均明显降低,TNF- α 、S100 β 蛋白表达水平均明显升高(均 $P<0.01$)。与 CLP 组比较,CLP+Fisetin 组脑组织 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白表达水平明显升高,TNF- α 、S100 β 蛋白表达水平明显降低(均 $P<0.01$)。

表 3 各组大鼠脑组织 Nrf2、HO-1、GPX4、S100 β 、TNF- α 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	Nrf2/GAPDH	GPX4/GAPDH	HO-1/GAPDH
Sham 组	6	0.875 $\pm$ 0.031	0.882 $\pm$ 0.043	0.894 $\pm$ 0.021
CLP 组	6	0.316 $\pm$ 0.112 ^a	0.317 $\pm$ 0.039 ^a	0.538 $\pm$ 0.024 ^a
CLP+Fisetin 组	6	0.708 $\pm$ 0.108 ^b	0.620 $\pm$ 0.170 ^b	0.694 $\pm$ 0.022 ^b
F 值		47.67	79.03	52.12
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

组别	动物数 (只)	S100 β /GAPDH	TNF- α /GAPDH
Sham 组	6	0.512 $\pm$ 0.037	0.488 $\pm$ 0.023
CLP 组	6	0.902 $\pm$ 0.014 ^a	0.896 $\pm$ 0.022 ^a
CLP+Fisetin 组	6	0.685 $\pm$ 0.032 ^b	0.651 $\pm$ 0.060 ^b
F 值		69.45	34.74
P 值		<0.01	<0.01

注:Sham 组为假手术组,CLP 组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组,CLP+Fisetin 组为非瑟酮预处理组;Nrf2 为核因子 E2 相关因子 2,HO-1 为血红素加氧酶 1,GPX4 为谷胱甘肽过氧化物酶 4,TNF- α 为肿瘤坏死因子- α ,GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶;与 Sham 组比较,^a $P<0.01$;与 CLP 组比较,^b $P<0.01$



Sham 组为假手术组,CLP 组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组,CLP+Fisetin 组为非瑟酮预处理组;Nrf2 为核因子 E2 相关因子 2,HO-1 为血红素加氧酶 1,GPX4 为谷胱甘肽过氧化物酶 4,TNF- α 为肿瘤坏死因子- α ,GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图 4 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测各组大鼠脑组织 Nrf2、HO-1、GPX4、S100 β 、TNF- α 蛋白表达

3 讨论

SAE 是脓毒症常见的神经系统并发症,其特征是继发于身体其他部位感染的弥漫性脑功能障碍,病死率高,预后差^[8]。研究表明,SAE 大鼠海马神经元氧化应激水平升高,铁代谢紊乱,铁离子水平升高,神经元铁死亡增加,从而导致认知功能受损^[2],说明铁死亡参与 SAE 的发病机制。因此,在脓毒症早期,通过抑制铁死亡可能会阻断 SAE 的进展。

铁死亡的生物学特性主要包括铁离子的代谢功能障碍、谷胱甘肽的消耗、铁依赖性脂质过氧化物酶的积累、GPX4 的耗竭,铁离子参与芬顿反应,产生大量活性氧自由基,对脂质双分子层造成氧化性损害,导致细胞损伤和铁相关细胞死亡^[9]。有研究者在脓毒症相关性肝损伤实验中发现,CLP 组小鼠肝脏细胞肿胀、坏死,线粒体形态明显缩短,肝组织 MDA 表达明显升高,而谷胱甘肽水平明显下降;经 Nrf2 激活剂处理后可以诱导抗氧化蛋白的表达,明显改善上述病理变化,说明铁死亡的发生与氧化应激损伤关系密切^[10]。

Nrf2/HO-1 是体内重要的抗氧化信号通路,参与调节体内氧化应激引起的 DNA 损伤^[11],其主要负责增强抗氧化应激反应,保护细胞免受氧化应激的危害。Nrf2 调控超过 250 个基因的表达^[12],在非应激条件下,Nrf2 主要通过 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1(Kelch-like ECH-associated protein 1,Keap1)介导的蛋白酶体降解来维持其稳定性。在氧化应激时,细胞内氧自由基大量生成,Nrf2 释放并进入细胞

核,启动含有抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)的基因的转录^[13-14],进而启动抗氧化应激反应。Nrf2 在 SAE 中发挥重要的抗氧化保护作用。实验研究也证明,脓毒症小鼠海马组织存在铁离子异常沉积和脂质过氧化水平升高,而使用铁离子螯合剂后可以通过上调 Nrf2、GPX4 的蛋白表达,从而减轻小鼠海马区铁离子异常堆积^[15]。

铁死亡时产生大量活性氧,其会攻击磷脂双分子层,从而破坏细胞膜正常结构及功能^[16]。膜相关 GPX4 在修复膜脂氧化损伤中发挥重要作用。当相关损伤因素诱发细胞膜上谷氨酸-胱氨酸的转运受阻,引发 GPX4 活性缺失,使其清除活性氧的能力下降,导致活性氧大量堆积,加剧铁死亡的发生^[17]。相反,GPX4 蛋白表达水平增加,可能通过清除活性氧,进而减轻或抑制铁死亡的发生。现有研究也表明,Nrf2 可促进 GPX4 的表达,继而抵抗细胞铁死亡^[18]。

Fisetin 是从天然植物中提取出来的化合物^[19],具有抗炎、抗氧化、神经保护及铁离子螯合作用^[20]。有研究表明,Fisetin 可通过 Nrf2/HO-1 途径减轻铁死亡,对阿霉素所致心脏病发挥保护作用^[21]。说明 Fisetin 通过抑制氧化应激损伤,对细胞铁死亡具有抑制作用。有研究者在 CLP 制备的脓毒症模型中也发现,Fisetin 可通过调控小胶质细胞 NOD 样受体蛋白 3 炎症小体的活化进而影响脓毒症后中枢炎症反应,缓解认知功能障碍^[22]。

本研究结果显示,相对于 Sham 组而言,CLP 组大鼠脑组织神经元排列紊乱、神经元丢失、胞质深染、存在核固缩,并可见较多炎症细胞浸润,同时 TNF- α 、S100 β 表达水平明显升高,说明 CLP 制备的脓毒症模型大鼠存在明显的脑损害;另外,CLP 组大鼠脑组织内铁沉积量增多,同时 MAD 含量明显增高,说明氧化应激损伤以及细胞铁死亡在脓毒症脑损害中发挥了一定的作用。而经过 Fisetin 预处理的脓毒症大鼠,脑组织病理学变化及铁离子沉积有所减轻,脑组织中 TNF- α 、S100 β 表达水平有所降低,说明 Fisetin 对脓毒症脑损害具有一定的保护作用;同时,与 CLP 组相比,Fisetin 预处理可上调脑组织内 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白表达水平,铁离子、MAD 含量也明显降低。

综上所述,本研究结果表明,Fisetin 可以减轻 CLP 诱导的 SAE,其内在机制可能是通过激活 Nrf2/HO-1/GPX4 通路,抑制了脓毒症导致的脑内氧化应激损伤,进而减轻了神经细胞的铁死亡。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Feng Q, Ai YH, Gong H, et al. Characterization of sepsis and sepsis-associated encephalopathy [J]. J Intensive Care Med, 2019, 34 (11-12): 938-945. DOI: 10.1177/0885066617719750.
- [2] Xie ZX, Xu M, Xie J, et al. Inhibition of ferroptosis attenuates glutamate excitotoxicity and nuclear autophagy in a CLP septic mouse model [J]. Shock, 2022, 57 (5): 694-702. DOI: 10.1097/SHK.0000000000001893.
- [3] Xiao Z, Kong B, Fang J, et al. Ferrostatin-1 alleviates lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction [J]. Bioengineered, 2021, 12 (2): 9367-9376. DOI: 10.1080/21655979.2021.2001913.
- [4] Gao MH, Monian P, Quadri N, et al. Glutaminolysis and transferrin regulate ferroptosis [J]. Mol Cell, 2015, 59 (2): 298-308. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.06.011.
- [5] Jiang XJ, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22 (4): 266-282. DOI: 10.1038/s41580-020-00324-8.
- [6] Dixon SJ, Stockwell BR. The Hallmarks of ferroptosis [J]. Annu Rev Cancer Biol, 2019, 3: 35-54. DOI: 10.1146/annurev-cancerbio-030518-055844.
- [7] Kashyap D, Garg VK, Tuli HS, et al. Fisetin and quercetin: promising flavonoids with chemopreventive potential [J]. Biomolecules, 2019, 9 (5): 174. DOI: 10.3390/biom9050174.
- [8] Ren C, Yao RQ, Zhang H, et al. Sepsis-associated encephalopathy: a vicious cycle of immunosuppression [J]. J Neuroinflammation, 2020, 17 (1): 14. DOI: 10.1186/s12974-020-1701-3.
- [9] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. Cell, 2012, 149 (5): 1060-1072. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
- [10] 钟朕, 欧阳训彦, 郭起财, 等. 核因子 E2 相关因子 2 蛋白通过调控铁死亡介导脓毒症相关性肝损伤 [J]. 中华危重病急救医学, 2024, 36 (5): 491-495. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20231105-00941.
- [11] Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism [J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73 (17): 3221-3247. DOI: 10.1007/s00018-016-2223-0.
- [12] Hayes JD, Dinkova-Kostova AT. Epigenetic control of NRF2-directed cellular antioxidant status in dictating life-death decisions [J]. Mol Cell, 2017, 68 (1): 5-7. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.09.023.
- [13] Dodson M, Castro-Portuguez R, Zhang DD. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis [J]. Redox Biol, 2019, 23: 101107. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101107.
- [14] Sun XF, Ou ZH, Chen RC, et al. Activation of the p62-Keap1-NRF2 pathway protects against ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells [J]. Hepatology, 2016, 63 (1): 173-184. DOI: 10.1002/hep.28251.
- [15] 姚鹏, 陈勇, 李依玲, 等. 海马神经细胞铁死亡通过 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.
- [16] Wang YQ, Chang SY, Wu Q, et al. The protective role of mitochondrial ferritin on erastin-induced ferroptosis [J]. Front Aging Neurosci, 2016, 8: 308. DOI: 10.3389/fnagi.2016.00308.
- [17] Zhu H, Santo A, Jia ZQ, et al. GPx4 in bacterial infection and polymicrobial sepsis: involvement of ferroptosis and pyroptosis [J]. React Oxyg Species (Apex), 2019, 7 (21): 154-160. DOI: 10.20455/ros.2019.835.
- [18] Chen JH, Wang YH, Wu JY, et al. The potential value of targeting ferroptosis in early brain injury after acute CNS disease [J]. Front Mol Neurosci, 2020, 13: 110. DOI: 10.3389/fnmol.2020.00110.
- [19] Björklund G, Dadar M, Chirumbolo S, et al. Flavonoids as detoxifying and pro-survival agents: what's new? [J]. Food Chem Toxicol, 2017, 110: 240-250. DOI: 10.1016/j.fct.2017.10.039.
- [20] Cho N, Choi JH, Yang H, et al. Neuroprotective and anti-inflammatory effects of flavonoids isolated from *Rhus verniciflua* in neuronal HT22 and microglial BV2 cell lines [J]. Food Chem Toxicol, 2012, 50 (6): 1940-1945. DOI: 10.1016/j.fct.2012.03.052.
- [21] Li DL, Liu XM, Pi WH, et al. Fisetin attenuates doxorubicin-induced cardiomyopathy *in vivo* and *in vitro* by inhibiting ferroptosis through SIRT1/Nrf2 signaling pathway activation [J]. Front Pharmacol, 2022, 12: 808480. DOI: 10.3389/fphar.2021.808480.
- [22] 廖忠, 廖伟健, 赖国利, 等. 漆黄素抑制小胶质细胞 NLRP3 炎症小体活化缓解脓毒症后认知功能损害的研究 [J]. 天津医药, 2024, 52 (10): 1025-1030. DOI: 10.11958/20240619.

(收稿日期: 2024-12-31)
(责任编辑: 保健媛 李银平)