

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

祝森志¹ 黄伟平^{2,3} 彭宇华¹ 曾伟强¹ 邝莉萍¹ 陈德雄¹

¹ 广州医科大学附属第三医院急诊科, 广东广州 510150; ² 广东省人民医院(广东省医学科学院)急重症医学部, 广东广州 510080; ³ 广东省精神卫生中心, 广东广州 510180

通信作者: 祝森志, Email: svenzhu@126.com

【摘要】 目的 探讨胆碱能抗炎效应是否介导了醒脑静注射液对脓毒症相关性脑病(SAE)的神经保护作用。**方法** 用随机数字表法将 8 周龄雄性 Wistar 大鼠分为脓毒症组、醒脑静组及对照组, 每组 18 只。通过腹腔注射脂多糖(LPS) 10 mg/kg 制备脓毒症大鼠模型; 对照组给予等量生理盐水。醒脑静组于制模前 30 min 经腹腔注射醒脑静注射液 5 mL/kg; 对照组及脓毒症组给予等体积生理盐水。制模后 24 h, 用尼氏染色法检测海马神经元细胞损伤情况; 用原位末端缺刻标记法(TUNEL)检测细胞凋亡情况; 用免疫荧光染色分析胆碱乙酰转移酶(ChAT)及毒蕈碱型乙酰胆碱受体 M1 (CHRM1) 表达以评估胆碱能神经功能。**结果** 脓毒症组大鼠神经元细胞出现明显损伤以及细胞凋亡[凋亡率(%): 59.0 ± 10.7 比 2.3 ± 0.6 , $P < 0.01$], 并伴随着 ChAT 及 CHRM1 表达降低[ChAT(荧光强度): 0.042 ± 0.011 比 0.071 ± 0.013 , CHRM1(荧光强度): 0.018 ± 0.004 比 0.322 ± 0.067 , 均 $P < 0.01$]。醒脑静组神经元细胞损伤以及细胞凋亡程度较脓毒症组显著减轻[凋亡率(%): 31.9 ± 6.9 比 59.0 ± 10.7 , $P < 0.01$], 并伴随着 ChAT 及 CHRM1 表达增加[ChAT(荧光强度): 0.087 ± 0.016 比 0.042 ± 0.011 , CHRM1(荧光强度): 0.253 ± 0.053 比 0.018 ± 0.004 , 均 $P < 0.01$]。**结论** 脓毒症导致的神经元细胞损伤、细胞凋亡以及胆碱能神经功能异常参与了 SAE 的发病机制, 而胆碱能抗炎效应可能介导了醒脑静注射液的神经保护作用。

【关键词】 脓毒症相关性脑病; 醒脑静注射液; 胆碱能抗炎效应; 胆碱乙酰转移酶; 毒蕈碱型乙酰胆碱受体 M1

基金项目: 广东省自然科学基金(S2013010016574)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2020.02.008

Cholinergic anti-inflammatory effect mediates the protective effect of Xingnaojing on sepsis associated encephalopathy Zhu Senzhi¹, Huang Weiping^{2,3}, Peng Yuhua¹, Zeng Weiqiang¹, Kuang Liping¹, Chen Dexiong¹

¹Department of Emergency, the Third Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, Guangdong, China;

²Department of Emergency and Critical Care Medicine, Guangdong General Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, Guangdong, China; ³Guangdong Mental Health Center, Guangzhou 510180, Guangdong, China

Corresponding author: Zhu Senzhi, Email: svenzhu@126.com

【Abstract】 Objective To explore whether the cholinergic anti-inflammatory effect mediates the neuroprotective effect of Xingnaojing injection on sepsis associated encephalopathy (SAE). **Methods** The 8-week-old male Wistar rats were randomly divided into sepsis group, Xingnaojing group and control group with 18 rats in each group. Sepsis rat model was prepared by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS, 10 mg/kg), while the rats in control group were given the same amount of normal saline instead. In Xingnaojing group, Xingnaojing injection (5 mL/kg) was intraperitoneally injected 30 minutes before sepsis rat model was prepared, while the same volume of normal saline was given to rats in control group and sepsis group. At 24 hours after model establishment, injury of hippocampal neuron was evaluated by Nissl staining, and neuron apoptosis was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) method. Finally, the expression of choline acetyltransferase (ChAT) and muscarinic acetylcholine receptor M1 (CHRM1) were analyzed by immunofluorescence staining to evaluate the cholinergic function. **Results** The rats in sepsis group showed significantly severe neurons injury and apoptosis than those in control group [apoptosis rate (%) 59.0 ± 10.7 vs. 2.3 ± 0.6 , $P < 0.01$], along with expression reduction of ChAT and CHRM1 proteins [ChAT (fluorescence intensity): 0.042 ± 0.011 vs. 0.071 ± 0.013 , CHRM1 (fluorescence intensity): 0.018 ± 0.004 vs. 0.322 ± 0.067 , both $P < 0.01$]. The neuronal injury and apoptosis rate in Xingnaojing group were significantly alleviated [apoptosis rate (%): 31.9 ± 6.9 vs. 59.0 ± 10.7 , $P < 0.01$], accompanied with increased expression of ChAT and CHRM1 proteins [ChAT (fluorescence intensity): 0.087 ± 0.016 vs. 0.042 ± 0.011 , CHRM1 (fluorescence intensity): 0.253 ± 0.053 vs. 0.018 ± 0.004 , both $P < 0.01$]. **Conclusion** The Hippocampal neuron injury, apoptosis and cholinergic dysfunction caused by sepsis are involved in the pathogenesis of SAE, and the cholinergic anti-inflammatory effect might mediate the neuroprotective effect of Xingnaojing injection.

【Key words】 Sepsis associated encephalopathy; Xingnaojing injection; Cholinergic anti-inflammatory effect; Choline acetyltransferase; Muscarinic acetylcholine receptor M1

Fund program: Natural Science Foundation of Guangdong Province (S2013010016574)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2020.02.008

脓毒症是一种严重危害人类健康的感染性疾病,全球每年有超过 1800 万严重脓毒症病例,病死率高达 50%。当脓毒症诱发的全身炎症反应累及中枢神经系统时可导致患者注意力不集中、谵妄、昏迷甚至死亡,中枢神经受累严重者常常有不良预后^[1]。醒脑静注射液提取自我国经典药方安宫牛黄丸,对包括脓毒症相关性脑病(SAE)在内的多种脑病具有神经保护作用,但作用机制尚不明确。迷走神经介导的胆碱能抗炎效应是机体重要的免疫调节机制,本研究旨在分析醒脑静注射液是否通过胆碱能抗炎效应发挥神经保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组:8 周龄 SPF 级雄性 Wistar 大鼠,体质量 250~300 g,购自中山大学动物实验中心,许可证号:SYXK(粤)2012-0081。用随机数字表法将实验大鼠分为脓毒症组、醒脑静组 and 对照组,每组 18 只。

1.2 脓毒症大鼠模型制备及处理:通过腹腔注射脂多糖(LPS,美国 Sigma 公司)10 mg/kg 制备脓毒症大鼠模型;对照组则给予等量生理盐水。醒脑静组于制模前 30 min 经大鼠腹腔注射醒脑静注射液(5 mL/kg,无锡山禾药业有限公司),对照组及脓毒症组给予等量生理盐水。

1.3 伦理学: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审批(审批号:2014009A)。

1.4 检测指标及方法:制模 24 h 后用 10% 水合氯醛麻醉并处死大鼠,经左心室插管,用生理盐水冲洗干净血液成分后,冰上分离出大鼠海马组织,冰箱内保存备检。检测时用自动组织包埋机进行海马组织固定,经过透明、浸蜡、石蜡包埋等过程,制备大鼠海马组织石蜡块。

1.4.1 神经元细胞尼氏染色:将海马组织石蜡块切成 10 μ m 厚的切片,行尼氏染色,显微镜下观察各组动物神经元细胞损伤情况。

1.4.2 采用原位末端缺刻标记法(TUNEL)检测神经元细胞凋亡率:取大鼠新鲜海马组织进行固定,然后切成 10 μ m 厚度的冰冻切片,TUNEL 染色以及神经元核抗原(NeuN)双标染色,计算阳性神经元细胞占总神经元细胞的比例,评估海马神经元细胞凋亡情况。

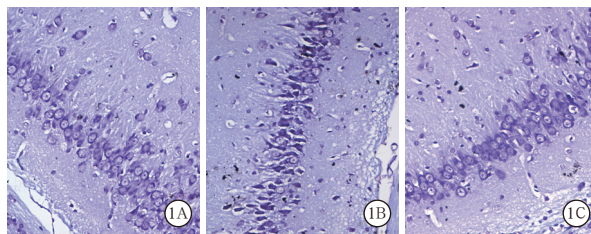
1.4.3 免疫荧光法检测脑组织胆碱乙酰转移酶(ChAT)和毒蕈碱型乙酰胆碱受体 M1 (CHRM1)表达:大鼠新鲜海马组织进行冰冻切片后进行 ChAT

抗体以及 CHRM1 抗体染色,冲洗后用荧光二抗进行孵育,荧光显微镜下观察蛋白表达,Imag J 软件分析免疫荧光强度,每张切片选取 6 个视野,计算平均荧光强度值。

1.5 统计学分析:使用 SPSS 20.0 软件分析数据。正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 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;非正态分布的数据以中位数(四分位数)[$M(Q_L, Q_U)$]表示,使用 Welch 近似方差分析比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经元细胞尼氏染色(图 1):脓毒症组海马组织中出现大量神经元细胞固缩,部分神经元细胞质内的尼氏小体颜色变浅、数目减少以及消失;而醒脑静组神经元细胞损伤得到明显改善;对照组神经元细胞无明显损伤改变。



注:对照组(1A)神经元无明显损伤改变;脓毒症组(1B)可见大量神经元固缩,部分神经元胞质内的尼氏小体颜色变浅、数目减少甚至消失;醒脑静组(1C)神经元损伤得到明显改善

图 1 镜下观察各组大鼠制模 24 h 海马神经元细胞损伤情况(Nissl 染色 高倍放大)

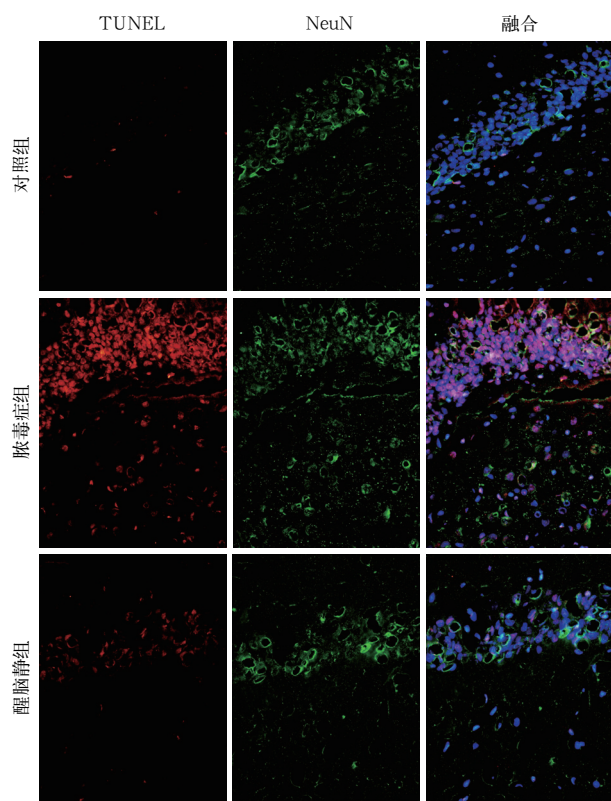
2.2 神经元细胞 TUNEL 凋亡染色(表 1,图 2):与对照组相比,脓毒症组海马组织出现明显的神经元细胞凋亡($P < 0.01$),药物治疗后可有效减轻脓毒症引起的神经元细胞的凋亡程度($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠神经元细胞凋亡以及胆碱能神经表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(例)	细胞凋亡率(%)	ChAT(荧光强度)	CHRM1(荧光强度)
对照组	6	2.3 $\pm$ 0.6	0.071 $\pm$ 0.013	0.322 $\pm$ 0.067
脓毒症组	6	59.0 $\pm$ 10.7 ^a	0.042 $\pm$ 0.011 ^a	0.018 $\pm$ 0.004 ^a
醒脑静组	6	31.9 $\pm$ 6.9 ^b	0.087 $\pm$ 0.016 ^b	0.253 $\pm$ 0.053 ^b

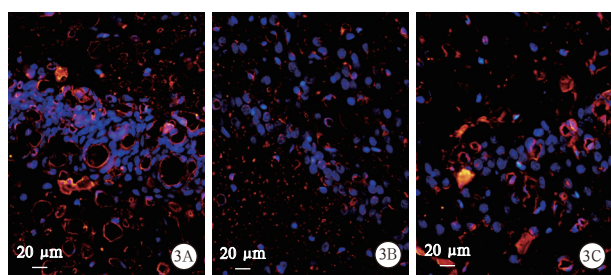
注:ChAT 为胆碱乙酰转移酶,CHRM1 为毒蕈碱型乙酰胆碱受体 M1;与对照组比较,^a $P < 0.01$;与脓毒症组比较,^b $P < 0.01$

2.3 免疫荧光染色(表 1,图 3~4):脓毒症组脑组织中 ChAT 和 CHRM1 阳性表达较对照组均明显减少(均 $P < 0.01$);而醒脑静组 ChAT 和 CHRM1 阳性表达较脓毒症组均明显增加(均 $P < 0.01$)。



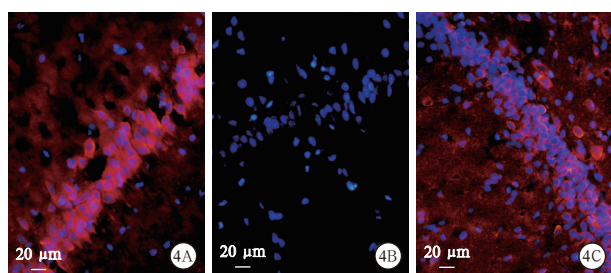
注：红光代表凋亡染色，绿光代表神经元，蓝光代表细胞核；脓毒症组出现大量的细胞凋亡，醒脑静组的细胞凋亡明显减轻

图 2 镜下观察各组大鼠海马组织神经元细胞凋亡染色情况 原位末端缺刻标记 (TUNEL) 染色 高倍放大



注：红光代表 ChAT 蛋白，蓝光代表细胞核。对照组 (3A) 海马组织 ChAT 表达水平；脓毒症组 (3B) ChAT 表达显著减少，醒脑静组 (3C) ChAT 表达增强

图 3 荧光显微镜下观察各组大鼠海马组织胆碱乙酰转移酶 (ChAT) 表达



注：红光代表 CHR1 蛋白，蓝光代表细胞核；对照组 (4A) 海马组织 CHR1 表达水平；脓毒症组 (4B) CHR1 表达显著减少；醒脑静组 (4C) CHR1 表达恢复

图 4 荧光显微镜下观察各组大鼠海马组织毒蕈碱型乙酰胆碱受体 M1 (CHR1) 蛋白表达

3 讨论

SAE 是脓毒症严重并发症，目前认为补体活化、脑循环障碍、血脑屏障损伤、炎症反应失控、神经递质失衡等多种因素共同参与了脓毒症诱发的脑功能障碍^[2-3]。脓毒症合并脑功能障碍时常预示着疾病预后不佳，随访疾病幸存者还发现大部分患者远期预后还会出现不同程度的认知以及情感功能障碍^[4]。由于疾病发生率高及预后差的特点，使 SAE 近年来受到学者们的广泛关注，但除了早期治疗感染灶外，临床上针对 SAE 的治疗手段有限。

醒脑静注射液是在我国经典药方安宫牛黄丸基础上提炼而成的针剂，主要成分为麝香、冰片、栀子、郁金，醒脑静注射液具有开窍醒神、活血凉血、清热解毒等功效，临床上已经广泛运用于治疗脑卒中、脑外伤等多种脑部疾病^[5]，对治疗急性中毒、病毒性脑炎、重症中暑和心绞痛也有较好的临床疗效^[6]。中枢神经的炎症反应失控被认为是脓毒症的核心致病机制，因而清除机体内环境中过多的炎性因子有望改善 SAE 的预后。有研究通过分析醒脑静联合连续性肾脏替代治疗 (CRRT) SAE 可改善急性生理学与慢性健康状况评分 II (APACHE II) 以及格拉斯哥昏迷评分 (GCS)，并显著缩短患者意识恢复时间^[7]。杨国军等^[8]则进一步发现醒脑静注射液可直接降低脓症患者血清中的白细胞介素-6 (IL-6)、内毒素、肿瘤坏死因子 (TNF- α)、C-反应蛋白 (CRP) 以及血乳酸水平，证实药物能抑制内毒素水平、减轻全身炎症反应并改善组织供氧，从而降低严重脓毒症的病死率。陈东等^[9]研究内毒素对脓毒症大鼠脑细胞线粒体功能的影响发现，脓毒症早期即可导致大鼠脑细胞线粒体膜电位降低，胞质水肿，丙二醛 (MDA)、一氧化氮 (NO)、一氧化氮合酶 (NOS) 含量升高，超氧化物歧化酶 (SOD) 活性降低；而醒脑静治疗后可恢复脑细胞线粒体膜电位，改善机体抗氧化能力，降低氧化应激水平，从而保护线粒体结构和功能的完整性。

研究证实胆碱能神经系统广泛参与了大脑觉醒与睡眠、学习记忆、感觉运动以及植物神经中枢活动等多种生理功能，近年来还发现由迷走神经介导的胆碱能抗炎通路是体液免疫之外机体重要的免疫调节机制^[10]。ChAT 是合成神经递质乙酰胆碱的重要生物合成酶，该酶在神经元胞体上合成后主要通过轴质流动方式被转移到神经突触末端，通过将乙酰辅酶 A 转移到胆碱上，从而合成神经递质。目前发现胆碱能神经受体共有 5 种亚型，CHR1 是其

中之一,该受体广泛介导了中枢神经系统的胆碱能神经活动。本研究通过检测 ChAT 和 CHRM1 的表达评估中枢胆碱能神经系统在脓毒症组以及醒脑静组中的变化情况,发现胆碱能神经系统组分 ChAT 以及 CHRM1 在脓毒症大鼠海马组织中表达下降,提示胆碱能神经的功能异常可能参与了脑病的发病过程,与 Semmler 等^[11]的实验结论一致。

醒脑静注射液可显著促进 ChAT 以及 CHRM1 的表达,推测药物除了拮抗内毒素诱发的炎症反应外,还可能通过恢复中枢神经递质以及胆碱能抗炎效应而发挥神经保护作用。本研究结果提示,脓毒症导致的神经元细胞损伤、细胞凋亡以及胆碱能神经功能异常共同参与了 SAE 的发病机制,而胆碱能抗炎效应可能介导了醒脑静注射液的神经保护作用。然而本研究只检测了 ChAT 以及 CHRM1 的表达情况,尚未能全面评估脓毒症时中枢胆碱能神经系统的变化,也有学者指出醒脑静注射液作为复合制剂对脓毒症脑神经的保护作用需要进一步明确是有效成分^[9],因此醒脑静注射液对 SAE 的保护作用还需要更深入的研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Eidelman LA, Putterman D, Putterman C, et al. The spectrum of septic encephalopathy. Definitions, etiologies, and mortalities [J]. JAMA, 1996, 275 (6): 470-473. DOI: 10.1001/jama.275.6.470.
- [2] Ebersoldt M, Sharshar T, Annane D. Sepsis-associated delirium [J]. Intensive Care Med, 2007, 33 (6): 941-950. DOI: 10.1007/s00134-007-0622-2.
- [3] 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, 16 (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.

- [4] Hopkins RO, Weaver LK, Chan KJ, et al. Quality of life, emotional, and cognitive function following acute respiratory distress syndrome [J]. J Int Neuropsychol Soc, 2004, 10 (7): 1005-1017. DOI: 10.1017/s135561770410711x.
- [5] 中国研究型医院学会卫生应急学专业委员会, 中国中西医结合学会灾害医学专业委员会. 急危重病(症)救治中醒脑静注射液临床应用专家共识[J]. 中华卫生应急电子杂志, 2019, 5 (2): 65-70. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-9133.2019.02.001.
- Professional Committee of Health Emergency Medicine of China Research Hospital Association, Disaster Medicine Professional Committee of Chinese Society of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine. Expert consensus on the clinical application of Xingnaojing injection in the treatment of critical and severe diseases [J]. Chin J Hygiene Rescue (Electronic Edition), 2019, 5 (2): 65-70. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-9133.2019.02.001.
- [6] 过海东,郝春梅,邱英茹. 醒脑静注射液临床应用概况 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2002, 9 (1): 60-61.
- Guo HD, Hao CM, Qiu YR. Clinical application of Xingnaojing injection [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2002, 9 (1): 60-61.
- [7] 梁道业,谢娟娟,林正佳,等. 醒脑静联合连续肾脏替代治疗脓毒症脑病的临床观察 [J]. 世界中西医结合杂志, 2016, 11 (2): 214-215,220. DOI: 10.13935/j.cnki.sjzx.160219.
- Liang DY, Xie JJ, Lin ZJ, et al. Clinical observation of sepsis encephalopathy treated with Xingnaojing and continuous renal replacement therapy [J]. World J Integr Tradit West Med, 2016, 11 (2): 214-215,220. DOI: 10.13935/j.cnki.sjzx.160219.
- [8] 杨国军,曹敏,邵绍巍,等. 醒脑静对严重脓毒症疗效的观察 [J]. 医学研究杂志, 2015, 44 (8): 88-91. DOI: 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.08.027.
- Yang GJ, Cao M, Shao SK, et al. Observation on curative effect of injection Xingnaojing in severe sepsis [J]. J Med Res, 2015, 44 (8): 88-91. DOI: 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.08.027.
- [9] 陈东,王金华,车嶂,等. 醒脑静注射液对内毒素诱导脓毒症大鼠脑线粒体氧化应激的影响 [J]. 医学研究生学报, 2017, 30 (7): 715-718. DOI: 10.16571/j.cnki.1008-8199.2017.07.008.
- Chen D, Wang JH, Che D, et al. Xingnaojing injection improves brain mitochondrial oxidative stress in rats with lipopolysaccharide-induced sepsis [J]. J Med Postgrad, 2017, 30 (7): 715-718. DOI: 10.16571/j.cnki.1008-8199.2017.07.008.
- [10] Rosas-Ballina M, Tracey KJ. Cholinergic control of inflammation [J]. J Intern Med, 2009, 265 (6): 663-679. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2009.02098.x.
- [11] Semmler A, Frisch C, Debeir T, et al. Long-term cognitive impairment, neuronal loss and reduced cortical cholinergic innervation after recovery from sepsis in a rodent model [J]. Exp Neurol, 2007, 204 (2): 733-740. DOI: 10.1016/j.expneurol.2007.01.003.

(收稿日期: 2019-11-10)

• 读者 • 作者 • 编者 •

本刊常用不需要标注中文的缩略语

新型冠状病毒肺炎

(corona virus disease 2019, COVID-19)

新型冠状病毒 (2019 novel coronavirus, 2019-nCoV)

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)

总胆汁酸 (total bile acid, TBA)

血液灌流 (hemoperfusion, HP)

降钙素原 (procalcitonin, PCT)

总胆固醇 (total cholesterol, TC)

内皮细胞 (endothelial cells, EC)

血浆置换 (plasma exchange, PE)

血小板计数 (platelet count, PLT)

细胞凋亡指数 (apoptosis index, AI)

白细胞介素 -8 (interleukin-8, IL-8)

凝血酶原时间 (prothrombin time, PT)

急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI)

平均动脉压 (mean artery pressure, MAP)

乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)

中心静脉压 (central venous pressure, CVP)

白细胞计数 (white blood cell count, WBC)

淋巴细胞计数 (lymphocyte count, LYM)

精氨酸加压素 (arginine vasopressin, AVP)

肺炎严重指数 (pneumonia severity index, PSI)

心肌肌钙蛋白 I (myocardial troponin I, cTnI)

丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)

间断短时血液滤过

(intermittent short veno-venous hemofiltration, ISVVH)