

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.07.004

重组人脑利钠肽对脓毒症相关性脑病小鼠神经细胞凋亡的治疗作用*

李楠^{1,2} 张二飞¹ 张静² 阴弯弯¹ 张莉¹ 闫如虎¹ 金红旭²
高燕² 侯立朝^{1,3,Δ}

(1 空军军医大学西京医院麻醉与围术期医学科 陕西 西安 710032; 2 北部战区总医院急诊医学科 辽宁 沈阳 110016;

3 厦门大学医学院附属翔安医院麻醉科 福建 厦门 361101)

摘要 目的:探讨重组人脑利钠肽(recombinant human brain natriuretic peptide, rhBNP)对脓毒症小鼠脑病理损伤和认知功能障碍的治疗效应,明确其脑保护作用机制。**方法:**采用盲肠结扎穿孔法(Cecal ligation and puncture, CLP)建立脓毒症小鼠模型。在 CLP 手术后 6 小时皮下注射 rhBNP,相同容积的生理盐水被作为对照,连续 14 天,每日一次。通过旷场实验,评价动物基础运动状态、探索能力和焦虑情绪;采用条件相关恐惧实验,检测动物情景相关记忆能力变化。TUNEL 染色检测动物海马 CA1 区神经细胞凋亡变化;蛋白质免疫印迹法(Western blot, WB)检测动物海马组织 TNF- α 、Caspase-8 和 Caspase-3 蛋白表达水平变化。**结果:**在旷场实验中,与 Sham+Veh 组小鼠相比较,CLP+Veh 组小鼠表现出平均运动速度($P<0.0001$)、5 分钟穿格次数($P<0.0001$)和中央区域运动时间明显下降($P<0.0001$)。与 CLP+Veh 组小鼠相比较,CLP+rhBNP 组小鼠旷场中平均运动速度($P=0.35$)和 5 分钟穿格次数($P=0.064$)无显著变化,中央区域运动时间明显增加($P=0.0005$)。在条件相关恐惧测试中,与 Sham+Veh 组小鼠相比较,CLP+Veh 组小鼠表现为僵直时间比例明显减少($P<0.0001$)。与 CLP+Veh 组小鼠相比较,CLP+rhBNP 组小鼠表现为僵直时间比例显著增加($P=0.0014$)。CLP 诱导的脓毒症小鼠表现出海马 CA1 区神经细胞凋亡。rhBNP 治疗可以明显的减轻脑病理变化,并且通过抑制 Caspase-3 上游信号通路 TNF- α -Caspase-8 减轻神经细胞凋亡。**结论:**rhBNP 对 SAE 具有治疗作用,其机制可能与抑制神经细胞凋亡有关。

关键词:脓毒症相关性脑病;认知功能障碍;重组人脑利钠肽;炎症反应;凋亡

中图分类号:R-33;R631.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)07-1217-07

Therapeutic Effects of Recombinant Human Brain Natriuretic Peptide on Neuronal Apoptosis of Mice with Sepsis-associated Encephalopathy*

LI Nan^{1,2}, ZHANG Er-fei¹, ZHANG Jing², YIN Wan-wan¹, ZHANG Li¹, YAN Ru-hu¹, JIN Hong-xu², GAO Yan², HOU Li-chao^{1,3,Δ}

(1 Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi,

710032, China; 2 Department of Emergency Medicine, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang, Liaoning, 110016,

China; 3 Department of Anesthesiology, Xiang'an Hospital of Xiamen University, School of Medicine, Xiamen University, Xiamen,

Fujian, 361101, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the therapeutic effect of recombinant human brain natriuretic peptide on pathological brain injury and cognitive dysfunction in septic mice, and to clarify its mechanism of brain protection. **Methods:** The cecum ligation puncture method (CLP) septic mice model was established. rhBNP was injected subcutaneously 6 hours after CLP surgery, and the same volume of saline was used as a control for 14 days, once daily. The basic motion state, exploration ability and anxiety of animals were evaluated by open-field experiment. The conditional fear test was used to detect the changes in the contextual memory of animals. TUNEL staining was used to detect the apoptosis of nerve cells in CA1 region of hippocampus. Western blotting was used to detect the expression levels of TNF- α , caspase-8 and caspase-3 in hippocampal tissues. **Results:** In the open-field test, the mice in the CLP+Veh group had a significant decrease in average movement speed($P<0.0001$), the number of line crossing within 5 min($P<0.0001$), and the movement time in the central region ($P<0.0001$) when compared with that in the Sham+Veh group. There were no statistically significant differences in average movement speed ($P=0.35$) and the number of line crossing within 5 min ($P=0.064$) after rhBNP treatment in the CLP+rhBNP group, but the movement time in the central region was significantly increased ($P=0.0005$) when compared with that in the CLP+Veh group. In the condition-related fear test, the percentage of freezing time of mice in the CLP+Veh group was significantly reduced when compared with

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81171839);陕西省科学技术研究发展计划项目(2016YFJH2-04)

作者简介:李楠(1981-),女,博士研究生,主治医师,主要从事严重创伤及重症感染相关研究,

电话:15002456667, E-mail: nanzhiwu@163.com

Δ 通讯作者:侯立朝,男,博士,博士研究生导师,教授,主任医师,主要研究方向:脓毒症发病机制及治疗研究,

E-mail: lchou@xah.xmu.edu.cn

(收稿日期:2019-11-23 接受日期:2019-12-18)

that in the Sham+Veh group ($P<0.0001$). The percentage of freezing time of mice in the CLP+rhBNP group was significantly increased when compared with that in mice from CLP+Veh group ($P=0.0014$). CLP-induced septic mice showed neuronal apoptosis of hippocampal CA1 region. rhBNP therapy can significantly reduce brain pathological changes and reduce neuronal apoptosis by inhibiting the TNF- α -caspase-8 signaling pathway upstream of caspase-3. **Conclusions:** Therefore, The mechanism of rhBNP treatment for SAE may be related to inhibition of neuronal apoptosis.

Key words: Sepsis-associated encephalopathy; Cognitive dysfunction; Recombinant human brain natriuretic peptide; Inflammatory response; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R631.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)07-1217-07

前言

脓毒症相关性脑病(Sepsis-associated encephalopathy, SAE)是指在脓毒症背景下出现的急性神经功能障碍,以注意力缺陷、谵妄甚至是昏迷为主要临床特征。现有的临床治疗指南几乎没有关于 SAE 的治疗策略信息^[1,2],因此,急需寻求一种有效的 SAE 防治药物。利钠肽(NPs)是一组内源性激素,通过诱导尿钠排泄,利尿,血管舒张和降低血压来调节体液稳态^[3]。已证实 NPs 及其受体在人和动物大脑中广泛分布,参与神经血管和血脑屏障完整性,神经炎症,神经凋亡,突触传递和脑液体内稳态的调节^[4,5],预示着 NPs 可能是脑损伤内源性保护机制的一部分。重组人脑利钠肽 (recombinant human brain natriuretic peptide, rhBNP),一种利用基因工程技术合成的与人 BNP 完全相同的重组产物,广泛应用于临床治疗失代偿性心力衰竭^[6,7]。前期我们课题组研究结果表明 rhBNP 50 $\mu\text{g/kg}$ 对脓毒症动物心脏、肺、肾和肠道损伤具有保护作用^[8-10]。然而, rhBNP 是否对脓毒症导致的认知功能障碍及脑的病理损伤具有治疗作用,尚未见报道。

因此,本研究拟评价 rhBNP 对脓毒症小鼠脑病理性损伤和认知功能障碍的治疗效应,明确其脑保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验所用动物是成年雄性 C57 小鼠,8-10 周龄,体重在 20~24 g 之间,为健康 SPF 级实验用动物,由自北京维通利华实验动物技术有限公司提供。标准饲养条件(室温 20~24 $^{\circ}\text{C}$,自然昼夜光线照明),标准饲料喂养 1 周。本实验符合空军军医大学实验动物饲养规范,遵守动物伦理学要求各项规定,以创伤性实验操作对队伍伤害最小化为基本原则。

1.2 动物模型制备

采用 CLP 法建立小鼠脓毒症模型^[11,12]:术前禁食 12 小时,手术开始时,小鼠给予 2%(氧流量 1 L/min)异氟醚吸入诱导麻醉,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 加热板上,固定四肢。异氟醚麻醉维持浓度为 1.2-1.4%(氧流量 1 L/min,即小鼠 1 MAC)。无菌条件下,在小鼠中线开腹约 1.5-2 cm 的切口,暴露盲肠,不要破坏肠系膜血管,距离盲肠末端约 50%处用 5-0 丝线结扎。用 22 G 注射针头在结扎和盲肠顶端之间贯通穿刺一次,避免刺破血管,轻轻挤压盲肠使其内的少量粪渣流出,以确保两侧针孔通畅。然后尽量将盲肠还纳至腹腔原位,不要将盲肠内的粪便扩散到腹壁伤口边缘。最后用 5-0 丝线逐层缝合切口。假手术动物同样开腹,

盲肠也要被执行同样操作,除结扎和穿刺操作外。术后用安尔碘涂抹手术区域;切口局部注射 0.1 mL 4%罗哌卡因,并涂抹利多卡因软膏。所有手术动物皮下注射预热的生理盐水(5 mL/100 g),术后 6 小时腹腔注射厄他培南 75 mg/kg^[13],每日一次,直至术后 3 天。术后三日内腹部切口处涂抹利多卡因软膏,充分镇痛。

1.3 给药处理

根据人与动物药物换算公式^[14]、rhBNP 临床使用剂量^[7]和既往动物研究剂量^[8]设定 50 $\mu\text{g/kg}$ 为本研究药物治疗剂量。Sham+rhBNP 组和 CLP+rhBNP 组动物在手术后 6 小时颈部皮下注射 rhBNP,Sham+Veh 组和 CLP+Veh 组动物给予同等体积的溶剂为生理盐水,每日一次,连续治疗 14 天。

1.4 实验设计

实验 1. 观察不同剂量 rhBNP 对脓毒症小鼠 14 天存活率影响。将 80 只 C57 小鼠按随机数字表法分为 4 组,每组 20 只,分为假手术+溶剂组(Sham+Veh)、假手术+rhBNP 50 $\mu\text{g/kg}$ 组(Sham+rhBNP 50 $\mu\text{g/kg}$)、脓毒症+溶剂组(CLP+Veh)和脓毒症+rhBNP 50 $\mu\text{g/kg}$ 组(CLP+rhBNP 50 $\mu\text{g/kg}$)。

实验 2. 检测 rhBNP 对脓毒症小鼠认知行为学变化的影响。所有接受行为学测试的动物均为假手术或 CLP 手术后 14 天存活动物(每组 10 只),动物分组同实验 1。

实验 3. 观察 rhBNP 对脓毒症小鼠脑海马 CA1 区神经细胞凋亡的作用。各组动物经行为学检测后,每组 3 只小鼠脑组织通过 TUNEL 染色,观察各组小鼠脑海马 CA1 区神经细胞凋亡情况。每组 4 只小鼠脑组织检测海马 TNF- α 、Caspase-8 和 Caspase-3 蛋白表达水平变化。动物分组同实验 1。

1.5 动物存活率

手术后动物自由进食水,每日记录死亡数量,连续观察 14 天。制作动物生存曲线,并进行分析。

1.6 行为学检测

1.6.1 旷场实验(Open Field Test) 实验前 24 小时,将小鼠置于昏暗的行为学实验室内进行环境适应。实验当天将 40 cm $\times$ 40 cm 不透明无盖旷场,平均划分为 25 个小方格。实验时将小鼠轻放于中央方格内,允许小鼠在旷场内自由活动 10 分钟。记录视频并分析后 5 分钟小鼠运动速度、穿梭次数和在中央区活动时间指标^[15]。实验后,用 70%酒精清洗实验平台和目标箱,以消除气味对下一只动物的导向作用。

1.6.2 情景相关条件恐惧实验 (Contextual Phased Memory) 在旷场实验结束后的 24 小时,进行情景相关恐惧实验。实验第 1 天将小鼠轻放于恐惧箱内,使小鼠适应新的环境,予自由活

动 10 分钟。第 2 天,将小鼠轻放于恐惧箱中 2 分钟,观察其运动状态作为 Freezing 基础值。在不伴有声音、光照、气味等关联性刺激条件下,于实验 2 分 10 秒(刺激内容:电击:0.7 mA,2 秒;间隔:35~60 秒)开始给予连续 5 次非条件刺激,每次电击前 10 秒内的运动状态用于测量非条件刺激间 Freezing 情况。最后一次电击后的 30 秒结束训练。第 3 天,在非条件恐惧训练的 24 小时后进行记忆提取,再次将小鼠轻放于同一恐惧箱内,视频记录并分析测试时 Freezing 行为时间占总测试时间比例(Freezing time ratio)反映小鼠信号关联的恐惧记忆能力^[16]。在恐惧训练和记忆提取过程中,每只动物测试后,清洁恐惧箱,并用 70 %酒精反复擦拭,去除残留气味。全部实验结束后,将动物放回饲养房。

1.7 TUNEL 法

收集脑组织方法同前,取全脑并在 4 %多聚甲醛中后固定 6 小时,常规石蜡包埋,连续全海马组织冠状切片,片厚 5 μm ,直接贴于载玻片,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。TUNEL 染色时,将切片在 0.1 M PBS 中冲洗,并在 0.1 % TritonX-100 孵育 30 min。随后,用含有 0.03 % TritonX-100、5 %山羊血清的 0.1 M PBS 将切片封闭 1 h。按照 TUNEL 试剂盒说明避光配置 rTdT 孵育缓冲液,每张切片 50 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育箱内避光孵育 1 小时,PBS 洗 3 遍 $\times$ 5 min。避光条件下,加入 DAPI (1:8000),每张切片 50 μL ,室温下 5 min,PBS 洗 3 遍 $\times$ 5 min。甘油封片,在 Olympus BH60 显微镜下观察。

1.8 Western blot

总蛋白提取使用组织蛋白提取试剂盒 (Invent 公司 Sc-003),提取方法参照说明书。通过使用 BCA 蛋白质测定试剂盒(Well-bio,China)定量蛋白质。30 μg 等量蛋白在 10 %丙酰胺凝胶分离,并转移到 0.22 μm PVDF 膜上,5 %的脱脂奶粉溶于含有 0.1 % Tween20 的 TBST 溶液,室温封闭 1 小时。按试剂说明书配置一抗 TNF- α (武汉 Proteintech 公司 60291-1-Ig)、Caspase-8(Abcam 公司 ab25901)和 Caspase-3(Abcam 公司 ab13847),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。使用 GAPDH(Abcam 公司 ab8245)作为内参。TBST 洗 3 遍 $\times$ 5 min,二抗辣根过氧化物酶山羊抗兔 IgG、HRP 山羊抗鼠 IgG (1:10000,美国 Abcam 公司)室温下孵育 2 小时,TBST 洗 3 遍 $\times$ 5 min,使用 ECL 底物化学发光显影。应用 Gelcap 软件分析吸光度(A)值,以目的条带与内参 GAPDH 的 A 值比值反映目的蛋白的表达水平。每个样品重复三次,结果取平均值。

1.9 统计学方法

利用 Graphpad prism6.0 软件绘制生存曲线及分析。生存率以百分比表示,进行 Log-rank (Mantel-Cox)检验。

旷场实验数据分析:统计了所有需要测试认知行为学小鼠的基础运动状态及焦虑状态,采用旷场实验观察了实验小鼠的运动速度,穿格次数(Number of line crossings),在中央区运动时间(Time in the center);

恐惧记忆行为学的数据分析:统计了每组 10 只小鼠在训练及检测时 Freezing 时间比例 (% Freezing time ratio)=(Freezing time/ 测试时间) $\times$ 100 %;

采用 GraphPad Prism 6.0 软件处理并分析数据,所有计量资料均采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm \text{SEM}$)表示,组间比较采用单因

素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 每日皮下注射 rhBNP 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 显著提高脓毒症小鼠 14 天存活率

Sham+Veh 和 Sham+rhBNP 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组动物在观察期间全部存活(图 1)。CLP+Veh 和 CLP+rhBNP 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组动物存活率明显下降。每日皮下注射 rhBNP 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 CLP 小鼠存活率由 25 %提高到 55 % (CLP+rhBNP 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组, $P < 0.0471$)。因此,我们观察到 rhBNP 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 治疗可以提高中-重度脓毒症小鼠存活率,为动物提供保护作用。

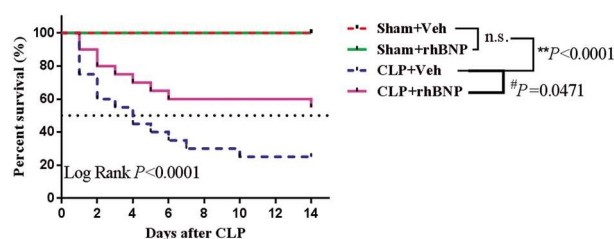


图 1 rhBNP 治疗提高脓毒症小鼠 14 天生存率

生存率以百分数表示,每组动物 $n=20$ 只,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,表示与 Sham+Veh 组比较;# $P < 0.05$,表示与 CLP+Veh 组比较。

Fig.1 rhBNP treatment improved the 14-day survival rate of septic mice. Values are expressed as survival percentage ($n=20$ in each group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, versus Sham+Veh group. # $P < 0.05$, versus CLP+Veh group.

2.2 rhBNP 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 治疗可改善脓毒症小鼠认知功能损害

为了验证采用 CLP 手术建立的脓毒症小鼠模型是否成功诱导出 SAE 及相关的认知功能障碍,我们应用多种反映动物不同学习和记忆能力模式的行为学范式进行检测,并进一步评价 rhBNP 对脓毒症相关认知功能障碍的治疗作用。首先,利用旷场实验观察不同处理组小鼠基础运动能力、焦虑状态及探索能力差异。在旷场实验中,对比 Sham+Veh 组与 Sham+rhBNP 组小鼠平均运动速度无明显差异,无统计学意义(Sham+Veh 组:50.50 $\pm$ 4.55 mm/s vs. Sham+rhBNP 组:51.00 $\pm$ 6.41 mm/s, $P=0.94$)。与 Sham+Veh 组相比,CLP+Veh 组 (Sham+Veh 组:50.50 $\pm$ 4.55 mm/s vs. CLP+Veh 组:20.60 $\pm$ 2.70 mm/s, $P < 0.0001$) 和 CLP+rhBNP 组 (Sham+Veh 组:50.50 $\pm$ 4.55 mm/s vs. CLP+rhBNP 组:25.80 $\pm$ 2.91 mm/s, $P=0.0002$) 小鼠平均运动速度均显著降低,具有统计学意义,然而 CLP+Veh 组和 CLP+rhBNP 组小鼠相比,平均运动速度却未见明显差异 (CLP+Veh 组:20.60 $\pm$ 2.70 mm/s vs. CLP+rhBNP 组:25.80 $\pm$ 2.91 mm/s, $P=0.35$),无统计学意义。观察 5 分钟穿格次数,Sham+Veh 组与 Sham+rhBNP 组小鼠无统计学意义(Sham+Veh 组:264.3 $\pm$ 19.76 vs. Sham+rhBNP 组:265.1 $\pm$ 32.52, $P=0.98$),与 Sham+Veh 组相比,CLP+Veh 组 5 分钟穿格次数减少 (Sham+Veh 组:264.3 $\pm$ 19.76 vs. CLP+Veh 组:111.3 $\pm$ 14.19, $P < 0.0001$),具有显著统计学意义。而给予 rhBNP 治疗后,与 CLP+Veh 组相比,CLP+rhBNP 组小鼠 5 分钟穿格次数增加 (CLP+Veh 组:111.3 $\pm$ 14.19 vs. CLP+rhBNP 组:164.2 $\pm$ 15.75, $P=0.064$),但不具有统计学意义。给予 rhBNP 治疗后,CLP+rhBNP 组小鼠 5 分钟穿格次数与 Sham+Veh 组小鼠相比

(Sham+Veh 组: 264.3 ± 19.76 vs. CLP+rhBNP 组: 164.2 ± 15.75 , $P=0.0017$), 具有显著统计学意义。

检测各组小鼠在旷场中央区运动时间, Sham+Veh 组和 Sham+rhBNP 组小鼠无明显差异 (Sham+Veh 组: 93.39 ± 9.47 s vs. Sham+rhBNP 组: 71.55 ± 6.11 s, $P=0.11$), 无统计学意义。与 Sham+Veh 组相比, CLP+Veh 组小鼠旷场中央区运动时间明显减少 (Sham+Veh 组: 93.39 ± 9.47 s vs. CLP+Veh 组: 32.92 ± 7.39 s, $P<0.0001$), 具有显著统计学意义。而给予 rhBNP 治疗后观察小

鼠在旷场中央区运动时间明显增加 (CLP+Veh 组: 32.92 ± 7.39 s vs. CLP+rhBNP 组: 79.29 ± 10.89 s, $P=0.0005$), 具有显著统计学意义。Sham+Veh 和 CLP+rhBNP 组小鼠旷场中央区运动时间, 无统计学差异。该结果表明, rhBNP 50 μ g/kg 对于假手术组小鼠的探索能力无损害, 与假手术组小鼠相比, 严重脓毒症本身会导致小鼠更易发生基础运动状态差、焦虑水平升高及探索能力缺陷。而皮下给予 rhBNP 50 μ g/kg 进行治疗, 脓毒症小鼠的焦虑水平下降及探索能力障碍有所改善。

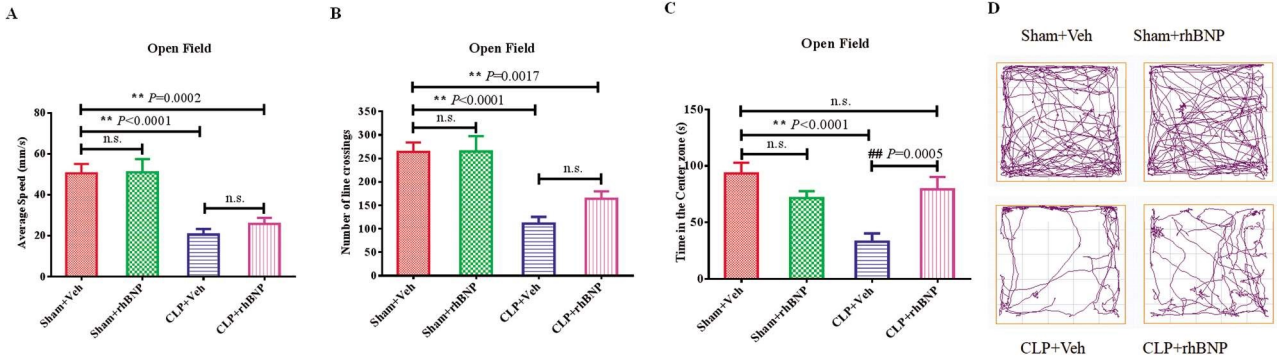


图2 rhBNP对脓毒症小鼠基础运动能力和焦虑样行为的作用

(A)平均速度, (B)穿格次数, (C)中央区运动时间, (D)旷场内运动轨迹图, 每组 $n=10$ 只。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 表示与假手术组比较; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, 表示与 CLP+Veh 组比较。

Fig.2 Effects of rhBNP on basic locomotor activity and anxiety-like behaviour in septic mice

(A) Average speed, (B) number of line crossings, (C) time in the centre zone, (D) motion trajectory map in the open field. ($n=10$ in each group).

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with the Sham+Veh group. # $P<0.05$, ## $P<0.01$ compared with the CLP+Veh group.

条件恐惧记忆测试可以反映海马相关的长期学习和记忆能力, 因此我们通过这一行为学范式观察了不同处理组小鼠情景相关联的恐惧记忆能力差异, 结果如 3A 所示, 假手术组和 CLP 手术组动物在接受足底电击这种非条件刺激后均出现了僵直行为, 对于电击刺激的反应即僵直时间比例随训练次数的增加而升高, 在第 5 次足底电击后, 与 Sham+Veh 组和 CLP+rhBNP 组相比较, CLP+Veh 组动物表现出僵直时间比例明显缩短, 具有显著统计学差异。在训练结束的 24 小时后进行记忆提取结果显示, 与 Sham+Veh 组相比, Sham+rhBNP 组小鼠的僵直时间比例无统计学差异 (Sham+Veh 组: $28.45 \pm 3.62\%$ vs. Sham+rhBNP 组: $26.27 \pm 3.73\%$, $P=0.61$), CLP+Veh 组小鼠僵直时间比例明显缩短, 具有显著统计学意义 (Sham+Veh 组: $28.45 \pm 3.62\%$ vs. CLP+Veh 组: $8.61 \pm 1.63\%$, $P<0.0001$)。将 CLP+Veh 组与 CLP+rhBNP 组小鼠进行比较, CLP+rhBNP 组小鼠的僵直时间百分比明显增加, 有显著统计学意义 (CLP+Veh 组: $8.61 \pm 1.63\%$ vs. CLP+rhBNP 组: $23.36 \pm 2.57\%$, $P=0.0014$), 基本恢复至与 Sham+Veh 组相似 (Sham+Veh 组: $28.45 \pm 3.62\%$ vs. CLP+rhBNP 组: $23.36 \pm 2.57\%$, $P=0.24$) (图 3B)。该结果提示, rhBNP 50 μ g/kg 对小鼠的长期记忆能力无不良影响, 小鼠在发生脓毒症后损害了海马相关的长期记忆能力, 而接受 rhBNP 治疗后, 脓毒症小鼠长期的情景相关记忆能力得到明显改善。

2.3 rhBNP 抑制 CLP 诱导的脓毒症小鼠的脑海马组织神经细胞凋亡水平

通过 TUNEL 染色检测各组小鼠脑海马组织细胞凋亡水平变化。如图 4, 以 dUTP 与细胞核 DAPI 共定位系数进行半定

量分析显示: 与 Sham+Veh 组相比较, CLP+Veh 组和 CLP+rhBNP 组小鼠脑海马组织神经细胞凋亡水平升高 (Sham+Veh: 0.33 ± 0.02 vs. CLP+Veh: 0.76 ± 0.01 , $P<0.0001$, Sham+Veh: 0.33 ± 0.02 vs. CLP+rhBNP: 0.49 ± 0.03 , $P<0.0001$), 具有显著统计学意义。CLP+rhBNP 组小鼠脑海马组织中神经细胞凋亡数量明显要低于 CLP+Veh 组小鼠 (CLP+Veh: 0.76 ± 0.01 vs. CLP+rhBNP: 0.49 ± 0.03 , $P<0.0001$), 具有显著统计学意义, 但

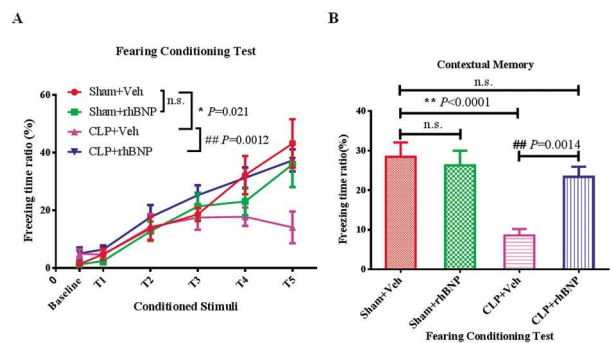


图 3 rhBNP 对脓毒症小鼠情景相关恐惧记忆能力的治疗作用

(A) 5 轮足底刺激后僵直时间百分比 (无条件刺激); (B) 情景相关恐惧记忆僵直时间百分比; 每组 $n=10$ 只。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 表示与假手术组比较; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, 表示与 CLP+Veh 组比较。

Fig.3 Changes in the contextual fearing memory ability of sepsis mice after rhBNP treatment

(A) Freezing time ratio after receiving a foot shock five times (unconditioned stimulation). (B) Freezing time ratio in contextual fearing memory test. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with Sham+Veh group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, compared with CLP+Veh group.

较 Sham+Veh 组增高 (Sham+Veh: 0.33 ± 0.02 vs. CLP+rhBNP: 0.49 ± 0.03 , $P=0.0019$), 未恢复至正常水平, 具有显著统计学意义。而 Sham+Veh 组和 Sham+rhBNP 组两组小鼠脑组织海马神经细胞凋亡水平无明显差异 (Sham+Veh: 0.33 ± 0.02 vs. Sham+rhBNP: 0.31 ± 0.01 , $P>0.10$), 无统计学意义。结果提示, rhBNP 50 $\mu\text{g/kg}$ 治疗可以减轻 CLP 诱导的脓毒症小鼠海马组织神经细胞凋亡这一病理性变化。

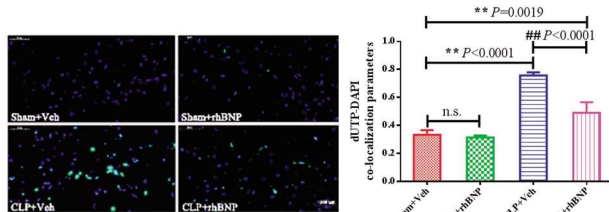


图4 rhBNP 治疗可减轻脓毒症小鼠海马 CA1 区神经细胞凋亡 绿色荧光定位于凋亡神经细胞核;DAPI 染全部神经细胞核,呈蓝色荧光。每组 $n=3$ 只, $*P<0.05$, $**P<0.01$, 表示与假手术组比较; $\#P<0.05$, $\#\#P<0.01$, 表示与 CLP+Veh 组比较, Scale bar=100 μm 。

Fig. 4 rhBNP 50 $\mu\text{g/kg}$ mitigated apoptosis in the hippocampal CA1 region in septic mice as indicated by TUNEL

Apoptotic cells were stained green in the nuclei. DNA in all cells was stained blue with DAPI ($n=3$ in each group). $*P<0.05$, $**P<0.01$, compared with the Sham+Veh group. $\#P<0.05$, $\#\#P<0.01$, compared with the CLP+Veh group.

2.4 rhBNP 降低脓毒症小鼠海马组织 TNF- α 、Caspase-8 和 Caspase-3 蛋白表达水平

基于上述现象,我们接下来对脓毒症造成神经细胞凋亡的相关机制进行深入的研究。与 Sham+Veh 组动物相比较, CLP+Veh 组动物海马组织 TNF- α (Sham+Veh: 0.28 ± 0.07 vs. CLP+Veh: 0.86 ± 0.16 , $P=0.0033$) (图 5A), 活化 Caspase-3 (Sham+Veh: 0.24 ± 0.03 vs. CLP+Veh: 0.95 ± 0.168 , $P=0.0009$) (图 5B) 和 Caspase-8 蛋白 (Sham+Veh: 0.25 ± 0.03 vs. CLP+Veh: 1.33 ± 0.15 , $P<0.0001$) (图 5C) 表达水平存在不同程度的增加, 差异存在统计学意义。给予 rhBNP 治疗后, CLP+rhBNP 组动物海马组织 TNF- α (CLP+Veh: 0.86 ± 0.16 vs. CLP+rhBNP: 0.40 ± 0.05 , $P=0.01$) (图 5A), 活化 Caspase-3 (CLP+Veh: 0.95 ± 0.16 vs. CLP+rhBNP: 0.37 ± 0.05 , $P=0.0031$) (图 5B) 和 Caspase-8 蛋白 (CLP+Veh: 1.33 ± 0.15 vs. CLP+rhBNP: 0.51 ± 0.13 , $P=0.0004$) (图 5C) 表达受到明显的抑制, 差异具有统计学意义。Sham+rhBNP 组和 Sham+Veh 组动物海马组织 TNF- α (Sham+Veh: 0.28 ± 0.07 vs. Sham+rhBNP: 0.30 ± 0.08 , $P=0.89$), 活化 Caspase-3 (Sham+Veh: 0.24 ± 0.03 vs. Sham+rhBNP: 0.28 ± 0.07 , $P=0.81$) 和 Caspase-8 蛋白表达水平 (Sham+Veh: 0.25 ± 0.03 vs. Sham+rhBNP: 0.31 ± 0.05 , $P=0.67$) 未见明显差异。结果提示, 脓毒症发生后, 引起海马组织神经细胞凋亡等病理性损害, 其机制与激活了 Caspase-3 上游分子 TNF- α 和 Caspase-8 蛋白有关。然而, rhBNP 可以通过抑制 Caspase-3 上游 TNF- α -Caspase-8 信号通路, 减低 Caspase-3 蛋白表达水平, 降低脓毒症小鼠海马组织神经细胞的凋亡水平。

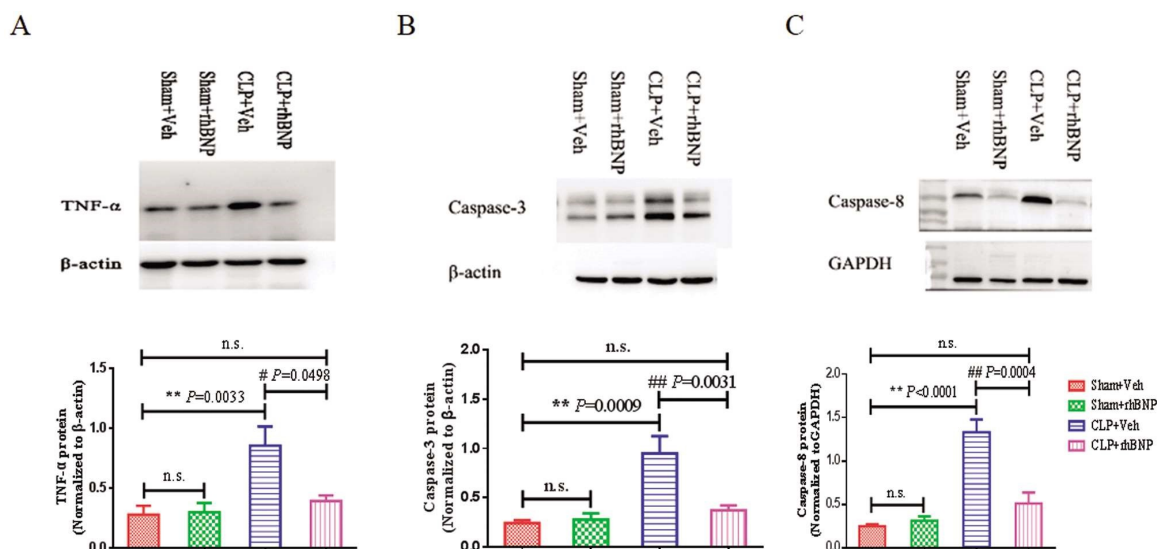


图5 rhBNP 对脓毒症小鼠 TNF- α 、activated Caspase-3 和 Caspase-8 蛋白的影响

Western blot 检测 (A) TNF- α 、(B) Caspase-3 和 (C) Caspase-8 蛋白表达水平变化。数据以均数 $\pm$ 标准误表示, 每组 $n=4$ 只, $*P<0.05$, $**P<0.01$, 表示与假手术组比较; $\#P<0.05$, $\#\#P<0.01$, 表示与 CLP+Veh 组比较。

Fig.5 The effects of rhBNP on the expression of TNF- α , activated Caspase-3 and Caspase-8 protein in septic animals

The expression levels of (A) TNF- α , (B) Caspase-3, and (C) Caspase-8 protein were determined by Western blot. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of 4 animals per group. There was a significant difference between *, ** compared with sham operation group ($P<0.05$, $P<0.01$). #, ## showed a significant difference compared to the CLP group ($P<0.05$, $P<0.01$).

3 讨论

在全世界范围内, 估计每年有 1,940 万患者诊断脓毒症, 住院死亡率从 2000 年 35% 降至 2014 年的 18%, 约 1,400 万

患者存活至出院^[17]。SAE 是脓毒症严重的神经系统并发症, 8-70% 脓毒症存活患者会出现长期的认知功能障碍、心理健康受损和创伤后应激障碍^[18,19], 可以造成比脓毒症及其诱发的多器官功能衰竭更为复杂的情况。因为 SAE 发病机制并不完全

清楚,所以临床无有效治疗方法。

盲肠结扎穿刺动物模型被认为是脓毒症研究的“金标准”。研究表明,动物存活率低于 50 % 的重度 CLP 脓毒症模型,在造模 10 天后便可出现多重神经认知功能损害,如新物体识别、空间学习记忆和抑制性回避等,持续长达 30 天,在 60 天内逐渐消退^[19]。在本研究中,我们发现脓毒症模型组动物的存活率为 25 %,提示重度 CLP 脓毒症模型制备成功。CLP 术后 14 天开始旷场实验,脓毒症模型动物出现基础运动状态差、焦虑状态加重和空间认知能力受到损害。小鼠条件恐惧实验的结果表明脓毒症可损伤小鼠海马相关的长期记忆能力,条件相关的恐惧记忆能力下降。rhBNP 治疗不仅可以显著提高脓毒症小鼠 14 天存活率至 55 %,还可以明显改善脓毒症小鼠海马相关的记忆能力缺陷。我们首次报道,rhBNP 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 可以显著提高脓毒症小鼠 14 天存活率,改善脓毒症小鼠焦虑情绪和认知功能障碍。

海马体损伤可以解释脓毒症脑病患者的认知功能障碍,因为这一区域与学习和记忆密切相关。研究发现,细胞凋亡在许多形式的脑损伤中均有发生^[20],例如脑缺血再灌注损伤^[21],阿尔茨海默病^[22]和创伤性脑损伤^[23],同也参与脓毒症诱导的脑病理损害和认知功能障碍的发病过程之中。通过 TUNEL 染色我们观察到 CLP 诱导脓毒症小鼠海马 CA1 区出现大量神经细胞凋亡,与假手术组动物相比,CLP+Veh 组动物在脓毒症发病后的 14 天仍存在明显的差异。

一些研究已经为 BNP 的神经保护作用提供了证据。BNP 在大脑皮层,下丘脑和小脑的小鼠星形胶质细胞的原代培养物表达,且无区域差异性。与 ANP 相比,BNP 能更大程度诱导星形胶质细胞 cGMP 的产生^[24,25]。Chisato 等,首次证实,BNP 在缺氧条件下通过 C-Src 的活化从人星形细胞瘤细胞系 U373MG 上调和释放,并且 BNP 的抑制加剧了缺氧诱导的细胞凋亡,外源性给予 BNP 减少了缺氧诱导的细胞凋亡^[26]。BNP 可通过延长 cGMP 水平的升高时间,抑制 PC12 细胞中 DNA 的断裂,提高细胞存活率^[27]。在小鼠脑外伤模型中,静脉给予 BNP 可增加脑血流,降低炎症标志物(TNF- α 和 IL-6)和神经元变性^[28]。BNP 预处理的减少大脑中动脉闭塞大鼠 24 小时梗死体积,促进第 7 天和第 14 天神经功能恢复^[29]。在脑室内施用 BNP (32.5 ng-6.5 μg) 后对大鼠施加应激刺激,BNP 基础分泌没有改变,但以剂量依赖性方式抑制应激诱导的血浆皮质酮升高,证实 BNP 参与 HPA 系统调节的观点^[30]。上述结果表明 BNP 在神经血管和血脑屏障完整性,神经炎症,神经凋亡,突触传递和脑液体内稳态调节等多个环节中发挥神经保护作用。然而 rhBNP 能否治疗脓毒症诱导的脑病理损伤尚未见研究报道,需要我们进一步的研究。

我们的研究首次证实,连续 14 天皮下给予 rhBNP 治疗,可改善脓毒症动物海马神经细胞凋亡这一病理性损伤的现象,随后我们又对这一现象背后的机制进行了探索。细胞凋亡是程序性细胞死亡的一种形式,在胚胎发生和许多成体组织的正常发育和维持过程中起着重要作用。已经鉴定了几个调节细胞凋亡的分子和基因家族。在脑组织细胞中鉴定出两种凋亡激活途径^[31]:一种通过与肿瘤坏死因子(TNF)和半胱天冬酶-8 相关的细胞表面受体激活,另一种是更复杂的涉及线粒体的途径。在

与学习记忆有关的脑区中,海马作为一个关键的学习和认知区域,高表达炎症因子受体,例如, TNF- α 受体和其它模式识别受体,这可以解释海马为什么很容易受到促炎因子的影响。TNF- α 是研究最为广泛的促炎症因子之一。由脑内神经元级联产生的 TNF- α 可能参与发生感染和炎症过程中复杂的自主神经、神经内分泌、代谢和行为改变^[31]。TNF 通过与其细胞表面受体(TNF-R)结合诱导细胞凋亡,随后发生邻近 TNF-R 分子的寡聚化,导致 Caspase-3 蛋白上游的凋亡相关蛋白 Caspase-8 活化。

我们的研究检测了凋亡相关分子 TNF- α 、Caspase-8 和 Caspase-3 蛋白表达变化。脓毒症继发全身炎症反应,海马组织 TNF- α 增加,可激活 Caspase3 上游通路,引起神经细胞凋亡。我们的研究表明,给予 rhBNP 可减轻脓毒症小鼠海马 TNF- α 等促炎症因子水平,同时也说明 rhBNP 的抗神经细胞凋亡作用靶点是 Caspase3 上游通路的 TNF- α 分子。已证实,在大鼠局灶性中风后脑组织中 Caspase-8 持续表达。另外,proCaspase-8 表达在大多数皮质神经元中是可检测的。Messaris 等,报道了在脓毒症和假手术动物中 Caspase-8 的恒定表达,但是在脓毒症损伤的低动力期 Caspase-8 的表达显著降低^[32]。然而,本研究观察到,在 CLP 手术后 14 天,脓毒症动物海马组织 Caspase-8 蛋白表达显著高于假手术组动物,但是在本实验中未涉及脓毒症动物血流动力学变化相关研究,因此无法确定 CLP 手术后 14 天动物血流动力学变化。与脓毒症动物相比较,在给予 rhBNP 治疗后,CLP+rhBNP 组动物海马组织 TNF- α 和 Caspase-8 蛋白表达水平显著下降,提示 rhBNP 减轻脓毒症小鼠脑神经细胞凋亡,与抑制 TNF- α -Caspase-8-Caspase-3 信号通路活化有关。

综上所述,rhBNP 对脓毒症小鼠认知功能障碍及脑病理损伤的治疗作用与抑制 TNF- α -Caspase-8-Caspase-3 信号通路活化,减轻海马区神经细胞凋亡有关。接下来我们将更深层次的在分子信号水平进行机制研究,为 rhBNP 应用于临床治疗脓毒症及发挥脑保护作用,提供理论基础。

参考文献(References)

- [1] Prescott HC, Angus DC. Enhancing Recovery From Sepsis[J]. JAMA, 2018, 319(1): 62
- [2] Reinhart K, Daniels R, Kissoon N, et al. Recognizing Sepsis as a Global Health Priority - A WHO Resolution[J]. N Engl J Med, 2017, 377(5): 414-417
- [3] Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides[J]. N Engl J Med, 1998, 339(5): 321-328
- [4] Mahinrad S, de Craen A, Yasar S, et al. Natriuretic peptides in the central nervous system: Novel targets for cognitive impairment [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2016, 68: 148-156
- [5] Hodes A, Lichtstein D. Natriuretic hormones in brain function [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2014, 5: 201
- [6] Rubattu S, Volpe M. Natriuretic Peptides in the Cardiovascular System: Multifaceted Roles in Physiology, Pathology and Therapeutics [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(16)
- [7] McKie PM, Schirger JA, Benike SL, et al. Chronic subcutaneous brain natriuretic peptide therapy in asymptomatic systolic heart failure[J]. Eur J Heart Fail, 2016, 18(4): 433-441
- [8] Yang H, Song Z, Jin H, et al. Protective effect of rhBNP on intestinal

- injury in the canine models of sepsis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 19(2): 262-266
- [9] Li N, Jin HX, Song Z, et al. Protective effect of recombinant human brain natriuretic peptide on acute renal injury induced by endotoxin in canines[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 70(2): 1317-24
- [10] Song Z, Cui Y, Ding MZ, et al. Protective effects of recombinant human brain natriuretic peptide against LPS-Induced acute lung injury in dogs[J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 17(3): 508-512
- [11] Gong W, Wen H. Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1960: 249-255
- [12] Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture[J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 31-36
- [13] Hernandez MS, D'Avila JC, Trevelin SC, et al. The role of Nox2-derived ROS in the development of cognitive impairment after sepsis[J]. *J Neuroinflammation*, 2014, 11: 36
- [14] Blanchard OL, Smoliga JM. Translating dosages from animal models to human clinical trials--revisiting body surface area scaling [J]. *FASEB J*, 2015, 29(5): 1629-1634
- [15] Tuon L, Comim CM, Petronilho F, et al. Time-dependent behavioral recovery after sepsis in rats [J]. *Intensive Care Med*, 2008, 34(9): 1724-1731
- [16] Titus DJ, Johnstone T, Johnson NH, et al. Positive allosteric modulation of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a treatment for cognitive deficits after traumatic brain injury [J]. *PLoS One*, 2019, 14(10): e0223180
- [17] Cecconi M, Evans L, Levy M, et al. Sepsis and septic shock [J]. *Lancet*, 2018, 392(10141): 75-87
- [18] 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
- [19] Annane D, Sharshar T. Cognitive decline after sepsis [J]. *Lancet Respir Med*, 2015, 3(1): 61-69
- [20] Fricker M, Tolkovsky AM, Borutaite V, et al. Neuronal Cell Death [J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(2): 813-880
- [21] Xie W, Zhou P, Sun Y, et al. Protective Effects and Target Network Analysis of Ginsenoside Rg1 in Cerebral Ischemia and Reperfusion Injury: A Comprehensive Overview of Experimental Studies[J]. *Cells*, 2018, 7(12)
- [22] Obulesu M, Lakshmi MJ. Apoptosis in Alzheimer's disease: an understanding of the physiology, pathology and therapeutic avenues [J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(12): 2301-2312
- [23] Zhou Z, Austin GL, Young L, et al. Mitochondrial Metabolism in Major Neurological Diseases[J]. *Cells*, 2018, 7(12)
- [24] Ngai CW, Ng SL, Cockram CS, et al. Interaction of natriuretic peptides and cGMP production via the same receptor in mouse astrocytes [J]. *Brain Res*, 1992, 589(2): 275-278
- [25] Yeung VT, Ho SK, Leung DH, et al. Binding of atrial and brain natriuretic peptides to cultured mouse astrocytes from different brain regions and effect on cyclic GMP production [J]. *Glia*, 1993, 9(4): 243-247
- [26] Katoh C, Osanai T, Tomita H, et al. Brain natriuretic peptide is released from human astrocytoma cell line U373MG under hypoxia: a possible role in anti-apoptosis[J]. *J Endocrinol*, 2011, 208(1): 51-57
- [27] Fiscus RR, Tu AW, Chew SB. Natriuretic peptides inhibit apoptosis and prolong the survival of serum-deprived PC12 cells [J]. *Neuroreport*, 2001, 12(2): 185-189
- [28] James ML, Wang H, Venkatraman T, et al. Brain natriuretic peptide improves long-term functional recovery after acute CNS injury in mice[J]. *J Neurotrauma*, 2010, 27(1): 217-228
- [29] Fernandez-Susavila H, Rodriguez-Yanez M, Dopico-Lopez A, et al. Heads and Tails of Natriuretic Peptides: Neuroprotective Role of Brain Natriuretic Peptide[J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(12)
- [30] Telegdy G, Adamik A, Glover V. The action of isatin (2,3-dioxindole) an endogenous indole on brain natriuretic and C-type natriuretic peptide-induced facilitation of memory consolidation in passive-avoidance learning in rats [J]. *Brain Res Bull*, 2000, 53(3): 367-370
- [31] Dantzer R. Neuroimmune Interactions: From the Brain to the Immune System and Vice Versa[J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(1): 477-504
- [32] Messaris E, Memos N, Chatzigianni E, et al. Time-dependent mitochondrial-mediated programmed neuronal cell death prolongs survival in sepsis[J]. *Crit Care Med*, 2004, 32(8): 1764-1770