

## · 实验研究 ·

# 海马 $\beta_2$ 肾上腺素能受体激活对脓毒症相关性脑病焦虑样行为的影响

宗曼曼 纪木火 魏华 周志强 杨建军

**【摘要】 目的** 探讨海马  $\beta_2$  肾上腺素能受体激活对脓毒症相关性脑病焦虑样行为的影响。**方法** 成年雄性 C57BL/6 小鼠 76 只,随机分为四组:sham+生理盐水组(A组,  $n=13$ )、sham+克伦特罗组(B组,  $n=13$ )、盲肠结扎穿孔(CLP)+生理盐水组(C组,  $n=25$ )、CLP+克伦特罗组(D组,  $n=25$ )。所有小鼠在术后即刻至术后 15 d 腹腔注射克伦特罗 0.5 mg/kg 或等容量的生理盐水。每组各取 3 只小鼠于术后第 12 h 处死取海马组织,检测小鼠海马内 CD11b、IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 BDNF 蛋白含量。每组剩余小鼠于术后第 13、14 天分别行旷场、高架十字迷宫实验。**结果** 与 A、B 组比较,C 组进入开放臂的时间缩短,次数减少;海马 CD11b、IL-1 $\beta$ 、IL-6 蛋白含量明显增加,BDNF 含量明显减少( $P < 0.05$ );与 C 组比较,D 组小鼠进入开放臂的时间明显延长、次数明显增加;海马 CD11b、IL-1 $\beta$ 、IL-6 蛋白含量明显减少,BDNF 含量明显增加( $P < 0.05$ )。**结论** 激活  $\beta_2$  肾上腺素能受体可以改善脓毒症相关性脑病小鼠的焦虑样行为,这可能与抑制小胶质细胞的激活,减少炎症因子的释放,增加 BDNF 的含量有关。

**【关键词】** 脓毒症;焦虑样行为; $\beta_2$  肾上腺素能受体;炎症

**Effect of activation of hippocampal  $\beta_2$ -adrenergic receptor on anxiety-like behavior induced by sepsis associated encephalopathy** ZONG Manman, JI Muhuo, WEI Hua, ZHOU Zhiqiang, YANG Jianjun. Department of Anesthesiology, Jinling Hospital, School of Medicine, Nanjing University, Nanjing 210002, China

Corresponding author: WEI Hua, Email: weihuazhu@163.com

**【Abstract】 Objective** To observe the effects of  $\beta_2$ -adrenergic receptor activation on the anxiety-like behavior induced by sepsis associated encephalopathy. **Methods** Seventy-six adult male mice were divided randomly into four groups: sham operation with saline group (group A,  $n=13$ ), sham operation with clenbuterol group (group B,  $n=13$ ), cecal ligation and puncture with saline (group C,  $n=25$ ), and cecal ligation and puncture with clenbuterol group (group D,  $n=25$ ). Animals were subjected to an administration of clenbuterol 0.5 mg/kg or isochoric saline via intraperitoneal injection once daily until 15 day after surgery. Some mice in each group were sacrificed at 12 h post-surgery and the protein levels of microglial marker CD11b, inflammatory factors IL-1 $\beta$ , IL-6 and neurotrophic factor BDNF were detected by Western blot. The other mice were subjected to the open field test and elevated maze test on the day 13 and day 14 after surgery. **Results** Compared with groups A and B, the time spent in the open arms and the number of entries into open arms were significantly decreased, the protein levels of CD11b, IL-1 $\beta$ , IL-6 were increased, and BDNF was reduced in group C ( $P < 0.05$ ). Compared with group C, the time spent in the open arms and the number of entries into open arms were significantly increased, the protein levels of CD11b, IL-1 $\beta$ , IL-6 were decreased, and BDNF was increased in the group D ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The activation of hippocampal  $\beta_2$ -adrenergic receptor can relieve the anxiety-like behavior induced by SAE, which is related to its ability to reverse the neuroinflammation and promote the production of neurotrophic factors.

**【Key words】** Sepsis; Anxiety-like behavior;  $\beta_2$ -adrenergic receptor; Inflammation

脓毒症相关性脑病(sepsis associated encephalopathy, SAE)是一种常见的脓毒症相关中枢神经系

统并发症,其发生率比较高<sup>[1]</sup>,主要表现为精神状态的急剧恶化,如情绪紊乱、认知障碍等。约 10%~60%的脓毒症患者表现出不同程度的焦虑症状<sup>[2]</sup>,严重影响患者的生活质量,但其具体的发生机制目前尚不清楚。 $\beta_2$ 肾上腺素能受体( $\beta_2$ -adrenergic receptor,  $\beta_2$ -AR)是一种 G 蛋白偶联受体,在觉醒、情感和认知的调节中发挥重要作用,该受体功能的异

DOI: 10.12089/jca.2019.05.017

基金项目:国家自然科学基金(81571083,81471105)

作者单位:210002 南京大学医学院临床学院 东部战区总医院麻醉科(宗曼曼、周志强);东南大学附属中大医院麻醉科(纪木火);郑州大学第一附属医院麻醉科(魏华、杨建军)

通信作者:魏华,Email:weihuazhu@163.com

常与多种神经退行性疾病密切相关<sup>[3]</sup>。有研究显示在阿尔兹海默症中, $\beta$ -淀粉样蛋白(amyloid  $\beta$ -protein, A $\beta$ )可引起  $\beta_2$ -AR 内吞和下调,而激活  $\beta_2$ -AR 则可以阻止 A $\beta$  对长时程增强的损害作用<sup>[4]</sup>。但有关  $\beta_2$ -AR 在 SAE 中的作用却鲜有报道,本研究旨在观察  $\beta_2$ -AR 的激活对脓毒症相关性脑病的焦虑样行为的影响,并探讨其可能的机制。

### 材料与方法

**实验动物与分组** 雄性 C57BL/6 小鼠 76 只,3~4 月龄,体重 22~26 g,采用随机数字法分为四组: sham+生理盐水组(A 组,  $n=13$ )、sham+克伦特罗组(B 组,  $n=13$ )、CLP+生理盐水组(C 组,  $n=25$ )、CLP+克伦特罗组(D 组,  $n=25$ )。B、D 组小鼠在术后立即腹腔注射克伦特罗 0.5 mg/kg,每天 1 次,每隔 5 天停 2 d<sup>[5]</sup>,直至术后 15 d 处死,A、C 组小鼠注射相应的等容量的生理盐水。

**SAE 模型的建立**<sup>[6]</sup> 采用盲肠结扎穿孔的方法(cecal ligation and puncture, CLP)建立 SAE 模型。腹腔注射 2%戊巴比妥 60 mg/kg 麻醉小鼠,在其腹部正中线上剪开 1 cm 的切口,暴露出盲肠,紧贴盲肠根部结扎,并用 22 号注射针头穿刺 2 次,轻轻挤出少许粪便,然后将盲肠送回腹腔,随后缝合肌肉和皮肤。sham 组只做剖腹、分离肠段和关腹手术。术后立刻腹腔注射 30 ml/kg 的生理盐水做液体复苏。

**旷场实验** 术后第 13 天做旷场实验,以观察小鼠的运动和探索行为。敞箱由白色无顶不透明塑料板组成(40 cm  $\times$  60 cm  $\times$  50 cm)。将小鼠轻放在敞箱中心,让其自由探索环境 5 min,并用图像自动检测系统(XR-XZ301)记录小鼠的探索路程及在中央格停留时间。每只小鼠实验结束后立刻用 75%酒精擦拭敞箱。

**高架十字迷宫** 术后第 14 天进行高架十字迷宫实验检测小鼠的焦虑样行为。高架十字迷宫由一个平台区(10 cm  $\times$  10 cm)、两个开放臂(35 cm  $\times$  5 cm)和两个闭合臂(35 cm  $\times$  5 cm  $\times$  15 cm)组成。每只小鼠面向开放臂放于十字迷宫中心,让其自由探索迷宫 5 min,并用图像自动检测系统(XR-XZ301)记录小鼠进入迷宫的开放臂的探索时间以及次数。实验结束以后用 75%酒精擦拭场地。

**小胶质细胞标志物和炎症因子检测** 术后第 12 小时,每组随机取 3 只小鼠处死,取海马组织进行 Western blot 检测。海马组织加入 RIPA 裂解液,

用玻璃匀浆器研磨后于冰上裂解 30 min,4  $^{\circ}$ C 离心(12 000 r/min, 10 min)取上清液,Bradford 法测定蛋白质浓度后煮沸 10 min。凝胶电泳分离、转膜,5%脱脂牛奶室温封闭 1 h。加入一抗: CD11b(1:1 000), IL-1 $\beta$ (1:500), IL-6(1:200), BDNF(1:500), 4  $^{\circ}$ C 过夜,次日用 TBST 漂洗 3 次后加入二抗,室温孵育 1 h 后漂洗、底物显色反应、显影。用 Image J 软件分析 CD11b、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 BDNF 蛋白含量。

**统计分析** 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用双因素方差分析,两两比较用 Tukey 法;生存率比较采用 Kaplan-Meier 法分析。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

**生存率分析** 造模后第 15 天,A 组、B 组生存率均为 100%,C 组生存率为 45%,D 组生存率为 55%。与 A 组和 B 组比较,C 组和 D 组生存率明显降低( $P<0.05$ ),C 组和 D 组生存率差异无统计学意义。

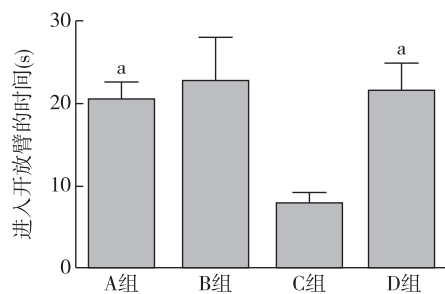
**旷场试验** 四组在旷场中的总探索路程及进入旷场中心区域的时间差异无统计学意义(表 1)。

表 1 四组小鼠探索总路程及进入中心区域时间的比较( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别  | 只数 | 探索总路程<br>(cm)       | 进入中心区域时间<br>(s) |
|-----|----|---------------------|-----------------|
| A 组 | 10 | 2 870.4 $\pm$ 629.7 | 12.4 $\pm$ 5.4  |
| B 组 | 10 | 2 611.7 $\pm$ 415.4 | 12.3 $\pm$ 5.0  |
| C 组 | 10 | 2 719.3 $\pm$ 494.9 | 11.0 $\pm$ 6.1  |
| D 组 | 10 | 2 768.8 $\pm$ 317.9 | 11.9 $\pm$ 3.4  |

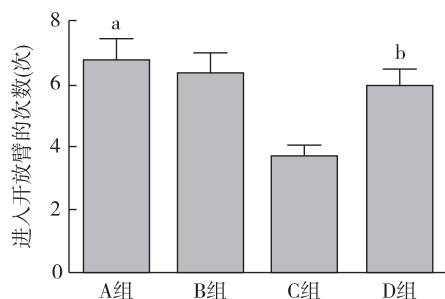
**高架十字迷宫实验** 与 A 组比较,C 组进入开放臂的时间明显缩短( $P<0.05$ ),次数明显减少( $P<0.01$ );与 C 组比较,D 组进入开放臂的时间明显延长,次数明显增加( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )(图 1—2)。

**小胶质细胞的标记物及炎症因子的改变** 与 A 组比较,术后 12 h C 组海马小胶质细胞标记物 CD11b 蛋白含量明显增加( $P<0.05$ );与 C 组比较,D 组海马中 CD11b 蛋白含量明显减少( $P<0.05$ )。与 A 组比较,术后 12 h C 鼠海马中炎症因子 IL-1 $\beta$  和 IL-6 蛋白含量明显增加( $P<0.05$  或  $P<0.01$ );与



注:与 C 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$

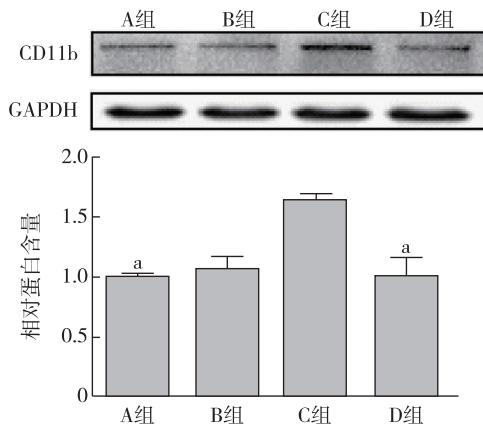
图 1 四组小鼠进入开放臂时间的比较



注:与 C 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$

图 2 四组小鼠进入开放臂次数的比较

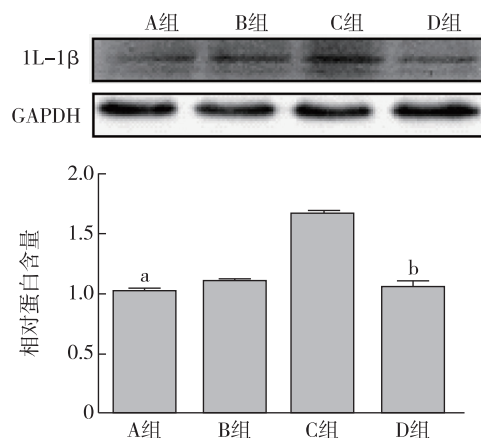
C 组比较, D 组海马 IL-1 $\beta$  和 IL-6 蛋白含量明显减少( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )(图 3—5)。



注: C 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$

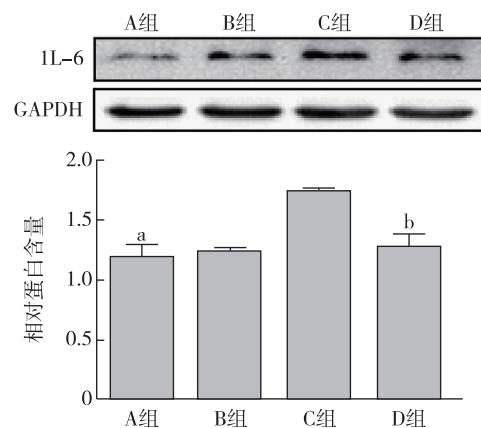
图 3 四组小鼠海马 CD11b 蛋白含量的比较

BDNF 的改变 与 A 组比较, 术后 12 h C 组海马神经生长因子 BDNF 表达明显减少( $P < 0.05$ ); 与 C 组比较, D 组小鼠海马中 BDNF 表达明显增加( $P < 0.05$ )(图 6)。



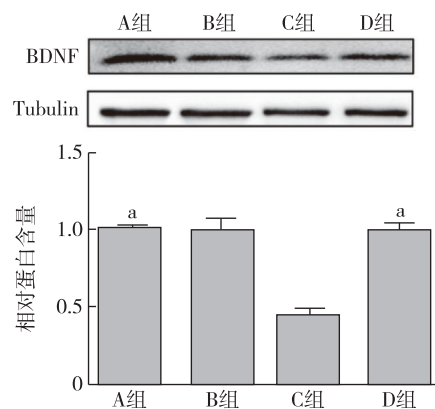
注:与 C 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$

图 4 四组小鼠海马 IL-1 $\beta$  蛋白含量的比较



注:与 C 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$

图 5 四组小鼠海马 IL-6 蛋白含量的比较



注:与 C 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$

图 6 四组小鼠海马内 BDNF 蛋白含量的比较

## 讨 论

本实验发现,使用 CLP 建立 SAE 动物模型 14 d 后,小鼠产生焦虑样行为。虽然激活  $\beta_2$ -AR 未改善

SAE 小鼠的生存率,但可以减轻 SAE 小鼠的焦虑样行为。同时,在 SAE 急性期 SAE 小鼠海马中小胶质细胞明显激活,炎症因子明显增多,而 BDNF 含量减少,而激活  $\beta_2$ -AR 可以逆转上述改变。说明激活  $\beta_2$ -AR 可能通过抑制小胶质细胞的激活,减轻炎症因子的释放,增加神经营养因子 BDNF 的产生,进而改善 SAE 小鼠的焦虑样行为。

SAE 是由于外周感染引起的一种急性弥漫性的脑功能紊乱,具体的发生机制尚不清楚,目前认为可能与内皮细胞激活、血脑屏障受损、氧化应激损伤、神经递质紊乱、神经元凋亡等相关。小胶质细胞的激活以及随后产生的神经炎症也在 SAE 的发生发展中发挥重要作用。有研究显示焦虑与中枢和外周系统中的炎症因子水平呈正相关,即患者血清中炎症因子水平越高,焦虑的症状越重<sup>[7]</sup>。大量研究显示在脓毒症发生后,海马内 IL-1 $\beta$  以及其他炎症因子明显增加<sup>[8]</sup>。Moraes 等<sup>[8]</sup>研究表明 CLP 模型小鼠海马内 IL-1 $\beta$  在脓毒症发生后 24 h 持续增加,一直到建模后 30 d 才回到基线水平。本研究显示,早在 CLP 建模后 12 h,就可以在脓毒症小鼠海马内检测到小胶质细胞的激活和炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 增加,这可能是导致脓毒症小鼠产生焦虑样行为的原因之一。

BDNF 是一种脑源性的神经营养因子,可影响神经元的存活、突触形成以及突触可塑性,在神经干细胞的增殖分化、神经元损伤后的修复以及减少神经细胞的退行性变等方面发挥重要作用<sup>[9]</sup>。Tong 等<sup>[10]</sup>研究表明 IL-1 $\beta$  通过激活 p38 丝裂原激活蛋白激酶信号通路损害 BDNF 及其下游的对于突触可塑性的形成具有重要作用的相关分子进而抑制 BDNF 依赖的长时程增强。本研究结果显示,CLP 可能通过激活小胶质细胞,促进炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 释放和下调 BDNF 进而导致 SAE 的发生。

$\beta_2$ -AR 是在脑内广泛分布的一种 G 蛋白偶联受体,对于长时程增强和学习记忆的巩固发挥重要作用。有研究表明在阿尔兹海默病中,激活  $\beta_2$ -AR 可以阻止 A $\beta$  对长时程增强的抑制作用,进而改善阿尔兹海默病引起的认知损害<sup>[11]</sup>。此外,有研究显示激活  $\beta_2$ -AR 可以抑制神经炎症反应<sup>[12]</sup>。Markus 等<sup>[13]</sup>报道,激活  $\beta_2$ -AR 可以通过抑制外周炎症反应而减轻 LPS 引起的急性肺损伤。但关于激活  $\beta_2$ -AR 能否通过类似的抗炎作用而改善 CLP 引起的 SAE,目前尚无文献报道。本研究结果显示, $\beta_2$ -AR 激动剂克伦特罗的确可以通过抑制 SAE 小鼠海马内小

胶质细胞的激活,减少炎症因子的释放,增加 BDNF 的产生从而减轻 SAE 小鼠焦虑样行为。

综上所述,激活  $\beta_2$ -AR 可以减轻 SAE 小鼠的焦虑样行为,其机制可能与其能够抑制小胶质细胞的激活,减少炎症因子的释放,增加神经营养因子 BDNF 有关。

## 参 考 文 献

- [1] Anderson ST, Commins S, Moynagh PN, et al. Lipopolysaccharide-induced sepsis induces long-lasting affective changes in the mouse. *Brain Behav Immun*, 2015, 43: 98-109.
- [2] Streck EL, Comim CM, Barichello T, et al. The septic brain. *Neurochem Res*, 2008, 33(11): 2171-2177.
- [3] Hagena H, Hansen N, Manahan-Vaughan D.  $\beta$ -adrenergic control of hippocampal function: subserving the choreography of synaptic information storage and memory. *Cereb Cortex*, 2016, 26(4): 1349-1364.
- [4] Takahashi J, Shibata T, Sasaki M, et al. Detection of changes in the locus coeruleus in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: high-resolution fast spin-echo T1-weighted imaging. *Geriatr Gerontol Int*, 2015, 15(3): 334-340.
- [5] Dong JH, Wang YJ, Cui M, et al. Adaptive activation of a stress response pathway improves learning and memory through  $\beta$ -arrestin-1-regulated lactate metabolism. *Biol Psychiatry*, 2017, 81(8): 654-670.
- [6] 谢泽敏, 徐宁, 王星明, 等. 丰富环境对脓毒症相关性脑病小鼠认知功能的影响及 NPAS4/BDNF 相关机制. *临床麻醉学杂志*, 2016, 32(3): 280-283.
- [7] Reichenberg A, Yirmiya R, Schuld A, et al. Cytokine associated emotional and cognitive disturbances in humans. *Arch Gen Psychiatry*, 2001, 58(5): 445-452.
- [8] Moraes CA, Santos G, de Sampaio e Spohr TC, et al. Activated microglia-induced deficits in excitatory synapses through IL-1 $\beta$ : implications for cognitive impairment in sepsis. *Mol Neurobiol*, 2015, 52(1): 653-663.
- [9] 王雪飞, 周坤鹏, 岳源, 等. BDNF 对脓毒症相关性脑病大鼠学习记忆功能的改善作用. *皖南医学院学报*, 2017, 36(4): 311-313, 321.
- [10] Tong L, Prieto GA, Kramár EA, et al. Brain-derived neurotrophic factor-dependent synaptic plasticity is suppressed by interleukin-1 $\beta$  via p38 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci*, 2012, 32(49): 17714-17724.
- [11] Li S, Jin M, Zhang D, et al. Environmental novelty activates  $\beta_2$ -adrenergic signaling to prevent the impairment of hippocampal LTP by A $\beta$  Oligomers. *Neuron*, 2013, 77(5): 929-941.
- [12] Bacou E, Haurigné K, Allard M, et al.  $\beta_2$ -adrenoreceptor stimulation dampens the LPS-induced M1 polarization in pig macrophages. *Dev Comp Immunol*, 2017, 76: 169-176.
- [13] Bosmann M, Grailer JJ, Zhu K, et al. Anti-inflammatory effects of  $\beta_2$  adrenergic receptor agonists in experimental acute lung injury. *FASEB J*, 2012, 26(5): 2137-2144.

(收稿日期:2018-11-29)