

· 实验研究 ·

不同环境条件对脓毒症相关性脑病小鼠 认知功能的影响

毛明杰 张玲 杨建军 周志强

【摘要】 目的 研究不同环境条件对脓毒症相关性脑病 (sepsis-associated encephalopathy, SAE) 认知功能的影响和机制。方法 成年雄性 C57BL/6 小鼠 96 只, 3~4 月龄。采用腹腔注射脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 建立脓毒症相关性脑病模型, 分为生理盐水+标准环境 (SE) 组 (NS 组)、生理盐水+丰富环境 (EE) 组 (NE 组)、生理盐水+恶劣环境 (IE) 组 (NI 组)、LPS+SE 组 (LS 组)、LPS+EE 组 (LE 组) 和 LPS+IE 组 (LI 组)。应用旷场实验检测小鼠运动总距离和中央格停留时间, 应用条件恐惧实验检测小鼠场景性僵直时间和条件性僵直时间。检测前额叶皮质和海马炎症因子 (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10) 浓度, 脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 含量。结果 NI 组和 LS 组场景性僵直时间明显短于 NS 组 ($P < 0.05$); LE 组场景性僵直时间明显长于 LS 组 ($P < 0.05$); LI 组场景性僵直时间明显短于 NI 组、LS 组和 LE 组 ($P < 0.05$)。NI 组和 LS 组海马 IL-6 浓度明显高于 NS 组 ($P < 0.05$), 海马 BDNF 含量明显低于 NS 组 ($P < 0.05$)。结论 恶劣环境可增加脓毒症脑病海马炎症因子的水平, 加重认知损伤, 而丰富环境可降低炎症因子的水平, 改善脓毒症脑病的认知损伤。

【关键词】 脓毒症; 环境条件; 炎症反应; 认知功能

Effects of different environmental conditions on cognitive function in mice with sepsis-associated encephalopathy MAO Mingjie, ZHANG Ling, YANG Jianjun, ZHOU Zhiqiang. Department of Anesthesiology, Medical School of Nanjing University, Nanjing General Hospital, Nanjing 210002, China
Corresponding author: ZHOU Zhiqiang, Email: zq_zhou@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects and mechanisms of different environmental conditions on cognitive function in mice with sepsis-associated encephalopathy (SAE). **Methods** Ninety-six male C57BL/6 mice, aged 3 - 4 months, were established into a model of sepsis-associated encephalopathy by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS). They were divided into saline + standard environment (SE) group (group NS), saline + rich environment (EE) group (group NE), saline + harsh environment (IE) group (group NI), LPS + SE group (group LS), LPS + EE group (group LE) and LPS + IE group (group LI). Total distance and time in center were measured by open field test. Freezing to contest and Freezing to cue were detected by fear conditioning test. The levels of inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10) in the prefrontal cortex and hippocampus and the content of brain derived neurotrophic factor (BDNF) were detected. **Results** The freezing time of NI and LS groups was significantly shorter than that of group NS ($P < 0.05$). The freezing time of group LE was significantly longer than that of group LS ($P < 0.05$). The freezing time of the group LI was significantly shorter than that of the group NI, group LS and group LE ($P < 0.05$). The concentration of IL-6 in hippocampus of group NI and group LS was significantly higher than that of group NS ($P < 0.05$). The content of BDNF in hippocampus was significantly lower than that in group NS ($P < 0.05$). **Conclusion** IE can increase the hippocampus inflammatory level in SAE, deteriorate the impairment of cognition, while EE can decrease the inflammatory level, improve the impairment of cognition induced by SAE.

【Key words】 Sepsis; Environmental conditions; Inflammatory response; Cognitive function

脓毒症引起的中枢神经系统损伤是 ICU 患者

常见的脑病之一, 可降低患者远期认知功能与生活质量, 甚至增加死亡率^[1]。研究表明, 环境条件对认知功能具有重要作用, 丰富环境 (enriched environment, EE) 可增强学习与记忆功能^[2], 恶劣环境 (impoverished environment, IE) 则起相反作用^[3]。ICU 患者常暴露于不良环境之中, 可能对其认知产

DOI: 10.12089/jca.2019.07.015

基金项目: 国家自然科学基金 (81571083)

作者单位: 210002 南京大学医学院附属金陵医院 东部战区总医院麻醉科 (毛明杰、周志强); 东南大学医学院附属中大医院麻醉科 (张玲); 郑州大学第一附属医院麻醉科 (杨建军)

通信作者: 周志强, Email: zq_zhou@163.com

生负面影响^[4]。然而,目前少有研究探讨环境条件与脓毒症相关认知功能损伤之间的关系。本研究通过建立脓毒症相关性脑病(sepsis-associated encephalopathy, SAE)动物模型,观察不同环境条件对 SAE 的影响及其机制,以期为临床有效防治 SAE 提供一定的理论依据。

材料与方 法

实验动物与分组 成年雄性 C57BL/6 小鼠 96 只,3~4 月龄,购于动物中心。建模后随机分为六组:生理盐水+标准环境组(NS 组)、生理盐水+EE 组(NE 组)、生理盐水+IE 组(NI 组)、LPS+标准环境组(LS 组)、LPS+EE 组(LE 组)和 LPS+IE 组(LI 组)。参照文献[5],采用腹腔注射 LPS 法建立 SAE 动物模型。LS 组、LE 组和 LI 组腹腔注射 LPS (5 mg/kg),NS 组、NE 组和 NI 组给予等量生理盐水。

环境设置 NS 组和 LS 组小鼠置于中号笼(45 cm×30 cm×20 cm)中,每笼 4~6 只。NE 组和 LE 组置于大号笼(60 cm×40 cm×20 cm)中,每笼 4~6 只,内有不同形状、颜色、材质的玩具(隔一天换一次)。NI 组和 LI 组置于小号笼中单笼饲养(30 cm×20 cm×15 cm)。小鼠在不同环境条件下饲养 3 周。

行为学测试 建模后第 22 天行旷场试验,将小鼠放入试验箱(50 cm×50 cm×40 cm)中探索 5 min,记录运动总距离和中央格停留时间。第 27~28 天行条件恐惧实验,训练阶段将小鼠放入测试箱(32 cm×25 cm×25 cm)探索 180 s,接着给予 30 s 声音刺激(70 dB,3 000 Hz),在声音的最后 2 s 给予电刺激(0.75 mA),再记录 30 s 的僵直行为。场景性条件恐惧测试在训练后 24 h 进行,将小鼠置于原试验箱内监测 180 s 的僵直行为。2 h 后开始声音条件性测试,先在新环境中适应 180 s,再给予 180 s 相同的声刺激并监测僵直行为,记录小鼠场景性僵直时间和条件性僵直时间。

海马和前额叶皮质炎症因子检测 建模后第 29 天处死小鼠取海马和前额叶皮质备用。按照试剂盒说明书检测海马和前额叶皮质 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-10 等炎症因子浓度。取海马和前额叶皮质包被后加样,室温孵育 1 h,洗涤。加酶标抗体,室温孵育 1 h,洗涤。加底物溶液显色,检测炎症因子浓度。

海马脑源性神经营养因子检测 取海马组织,加裂解缓冲液,冰上裂解,4 ℃离心,取上清液,BCA

法测定蛋白浓度,加上样缓冲液煮沸 5 min 变性,经 SDS 凝胶电泳,转至 PVDF 膜。用 5%脱脂乳在 Tris 缓冲液中封闭 1 h,加一抗在 4 ℃房间孵育过夜。充分洗膜,加二抗室温孵育 1 h。电化学发光(ECL)显影后,用 Image J 软件分析灰度值,测定海马脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)含量。

统计分析 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Tukey 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

NS 组、NE 组和 NI 组均未出现死亡(存活率 100%)。LS 组死亡 1 只(存活率 93.7%),LE 组和 LI 组各死亡 2 只(存活率 87.5%)(图 1)。

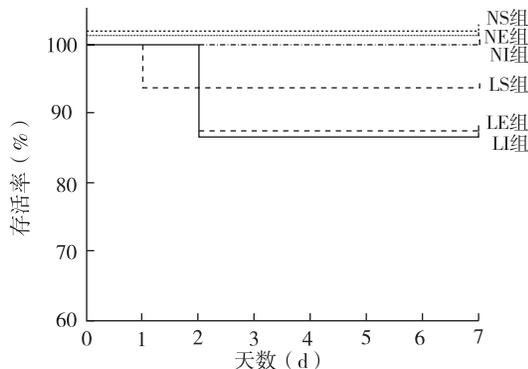
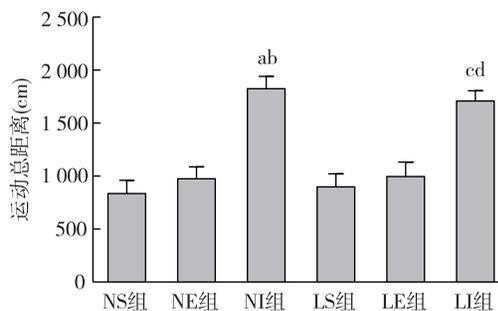


图 1 六组小鼠存活率情况

旷场试验中,NI 组运动总距离明显长于 NS 组和 NE 组($P < 0.05$);LI 组运动总距离明显长于 LS 组和 LE 组($P < 0.05$)(图 2)。



注:与 NS 组比较,^a $P < 0.05$;与 NE 组比较,^b $P < 0.05$;与 LS 组比较,^c $P < 0.05$;与 LE 组比较,^d $P < 0.05$

图 2 六组小鼠运动总距离的比较

六组小鼠中央格停留时间差异无统计学意义(图 3)。

条件恐惧实验中,NI 组和 LS 组场景性僵直时间明显短于 NS 组($P < 0.05$);LE 组场景性僵直时间明显长于 LS 组($P < 0.05$);LI 组场景性僵直时间明显短于 NI 组、LS 组和 LE 组($P < 0.05$)(图 4)。

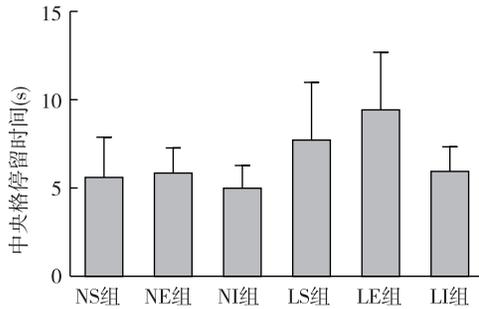
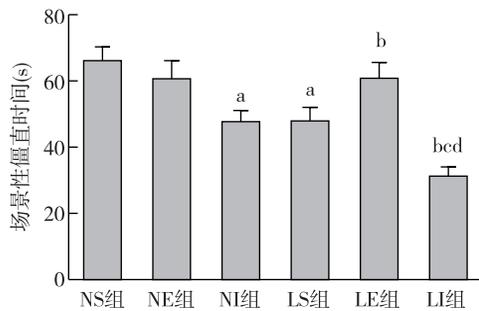


图 3 六组小鼠中央格停留时间的比较



注:与 NS 组比较,^a $P < 0.05$;与 LS 组比较,^b $P < 0.05$;与 NI 组比较,^c $P < 0.05$;与 LE 组比较,^d $P < 0.05$

图 4 六组小鼠场景性僵直时间的比较

六组小鼠条件性僵直时间差异无统计学意义(图 5)。

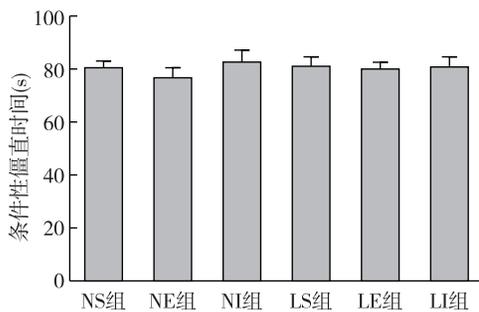
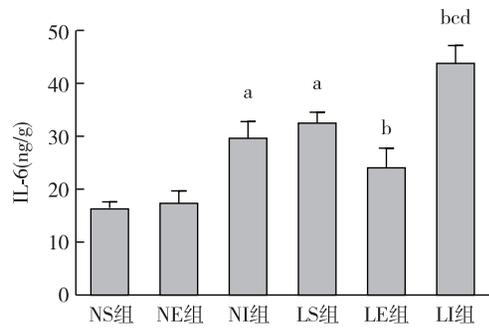


图 5 六组小鼠条件性僵直时间的比较

六组小鼠前额叶皮质 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 等炎症因子浓度差异无统计学意义。

NI 组和 LS 组海马 IL-6 浓度明显高于 NS 组($P < 0.05$);LI 组 IL-6 浓度明显高于 NI 组、LS 组和 LE 组($P < 0.05$)。LE 组 IL-6 浓度明显低于 LS 组($P < 0.05$)(图 6)。六组小鼠海马 TNF- α 、IL-1 β 、IL-

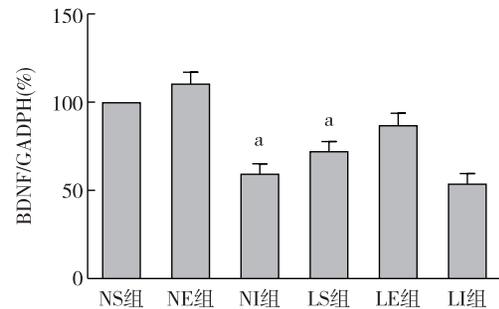
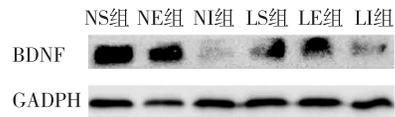
10 浓度差异无统计学意义。



注:与 NS 组比较,^a $P < 0.05$;与 LS 组比较,^b $P < 0.05$;与 NI 组比较,^c $P < 0.05$;与 LE 组比较,^d $P < 0.05$

图 6 六组小鼠海马炎症因子 IL-6 浓度的比较

NI 组和 LS 组海马 BDNF 含量明显低于 NS 组($P < 0.05$)。LE 组和 LI 组海马 BDNF 含量与 LS 组差异无统计学意义,仅表现为升高或降低的趋势(图 7)。



注:与 NS 组比较,^a $P < 0.05$

图 7 六组小鼠海马 BDNF 相对含量的比较

讨论

SAE 是脓毒症患者严重的中枢神经系统并发症,可表现为觉醒,认知和行为等的改变。研究表明 SAE 可延长患者住院时间,增加致残率和死亡率^[1]。然而,SAE 的发病机制尚未清楚。本实验通过腹腔注射 LPS 制备 SAE 动物模型,结果显示,LPS 处理后,小鼠场景性僵直时间明显减少,提示其学习、记忆能力下降,显示 SAE 动物模型制备成功。越来越多的研究表明,环境对许多疾病的发生发展具有重要作用。丰富环境可以改善大鼠抑郁症状^[6]。暴露于慢性应激环境常常会引起学习和认知能力的下降^[7]。本研究在 SAE 动物模型基础上

分别暴露于不同环境中,结果表明 EE 可逆转 LPS 引起的认知损伤,而 IE 则进一步恶化损伤,提示不同的环境对 SAE 认知功能的重要作用。

动物实验认为,脓毒症诱导的认知功能损伤与中枢炎症反应,神经递质改变等有关^[5]。EE 可预防小胶质细胞引起的炎症反应^[8]。然而慢性应激增加促炎细胞因子 IL-6、TNF- α 的表达^[9],加重认知功能损伤。本实验结果显示,注射 LPS 的小鼠生活在 IE 中海马 IL-6 浓度最高,场景性僵直时间最短,而注射 LPS 的小鼠生活在 EE 中可逆转 IL-6 浓度的升高以及场景性僵直时间的缩短。这可能是 IE 小鼠处于慢性应激状态,促炎细胞因子表达增多合并 LPS 的损伤作用使得认知功能进一步降低,而 EE 减少小鼠海马炎性因子的释放,对认知损伤起到改善作用。上述结果表明炎性因子在认知功能损伤中起到重要作用。

BDNF 是神经营养因子家族的成员之一,在维持神经元存活,保持突触可塑性方面具有重要作用。先前的研究提示 SAE 引起学习和记忆能力下降,并伴随海马 BDNF 表达的下调^[10]。EE 可以增加 BDNF 的表达,对提高突触可塑性和认知功能方面有重要作用^[11]。应激引起的糖皮质激素升高可以通过糖皮质激素受体结合到 BDNF 基因调节序列上从而下调 BDNF 的表达^[12],进而影响突触可塑性。本实验中,单纯注射 LPS 或单纯生活在 IE 中均可引起小鼠海马 BDNF 含量的降低以及场景性僵直时间的缩短,这表明 LPS 和 IE 均可引起 BDNF 降低,影响认知功能。然而,注射 LPS 的小鼠生活在 IE 中其海马 BDNF 含量仅表现为进一步降低的趋势,差异无统计学意义。可能的解释是反复应激引起海马 BDNF 降低的同时激活体内某些机制来对抗 BDNF 的下调,比如环磷酸腺苷效应元件结合蛋白表达的增加。此外,注射 LPS 的小鼠生活在 EE 中其海马 BDNF 含量并无明显增加,这可能与 EE 作用时间较短有关。

综上所述,不同环境条件对脓毒症诱导的认知功能损伤具有明显的影响,恶劣环境可加重脓毒症引起的认知功能损伤,而丰富环境具有改善作用,其机制可能与炎症反应和神经营养因子有关。

参 考 文 献

[1] Zhang LN, Wang XH, Wu L, et al. Diagnostic and predictive

levels of calcium-binding protein a8 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 in sepsis-associated encephalopathy: a prospective observational study. *Chin Med J (Engl)*, 2016, 129 (14): 1674-1681.

- [2] Grimberg-Henrici CG, Vermaak P, Bolhuis JE, et al. Effects of environmental enrichment on cognitive performance of pigs in a spatial holeboard discrimination task. *Anim Cogn*, 2016, 19(2): 271-283.
- [3] Shen J, Li Y, Qu C, et al. The enriched environment ameliorates chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behaviors and cognitive impairment by activating the SIRT1/miR-134 signaling pathway in hippocampus. *J Affect Disord*, 2019, 248: 81-90.
- [4] de Azevedo JR, Montenegro WS, Rodrigues DP, et al. Long-term cognitive outcomes among unselected ventilated and non-ventilated icu patients. *J Intensive Care*, 2017, 5: 18.
- [5] 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.
- [6] Liu C, Gu JY, Han JH, et al. Enriched environment combined with fluoxetine ameliorates depression-like behaviors and hippocampal syp expression in a rat cus model. *Brain Res Bull*, 2017, 135: 33-39.
- [7] Moradi-Kor N, Ghanbari A, Rashidipour H, et al. Beneficial effects of spirulina platensis, voluntary exercise and environmental enrichment against adolescent stress induced deficits in cognitive functions, hippocampal BDNF and morphological remodeling in adult female rats. *Horm Behav*, 2019, 112: 20-31.
- [8] Xu H, Rajsombath MM, Weikop P, et al. Enriched environment enhances beta-adrenergic signaling to prevent microglia inflammation by amyloid-beta. *EMBO Mol Med*, 2018, 10(9), pii: e8931.
- [9] 沈军, 刘越, 邓敏, 等. 当归提取物对慢性不可预知性应激抑郁模型大鼠抑郁行为及脑内炎性因子的影响. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2016, 25(3): 215-219.
- [10] 孙凡, 鲍红光, 斯妍娜, 等. HMGBI 乙酰化在脓毒症相关性脑病中的作用. *临床麻醉学杂志*, 2017, 33(4): 382-385.
- [11] Burgos H, Hernández A, Constandil L, et al. Early postnatal environmental enrichment restores neurochemical and functional plasticities of the cerebral cortex and improves learning performance in hidden-prenatally-malnourished young-adult rats. *Behav Brain Res*, 2019, 363: 182-190.
- [12] Chen H, Lombès M, Le Menuet D. Glucocorticoid receptor represses brain-derived neurotrophic factor expression in neuron-like cells. *Mol Brain*, 2017, 10(1): 12.

(收稿日期:2018-08-28)