

丙泊酚对脓毒症小鼠血脑屏障损伤的影响

罗涛,刘永芳,刘方燕,付湘云,刘志刚

摘要 目的:探究丙泊酚对脓毒症小鼠血脑屏障(BBB)损伤的影响及可能的作用机制。**方法:**30只雄性SPF级C56BL/6小鼠随机分为对照(Con)组、脓毒症(LPS)组和丙泊酚(PF)组,每组10只。LPS组和PF组小鼠采用腹腔注射脂多糖(LPS)(10 mg/kg)制备脓毒症小鼠模型,注射LPS后的即刻和6 h后给PF组小鼠腹腔注射丙泊酚(50 mg/kg),给LPS组小鼠腹腔注射等体积的生理盐水;Con组仅给予腹腔注射等体积的生理盐水。造模24 h后,采用神经行为学评分观察小鼠行为学变化;ELISA法检测小鼠血清神经元特异性烯醇化酶(NSE)和S100 β 水平;伊文氏蓝(EB)法和干湿比重法检测小鼠脑组织BBB通透性和含水量;Western blot法检测脑组织闭合蛋白(Occludin)、密封蛋白(Claudin)-5和基质金属蛋白酶(MMP)-9蛋白表达量。**结果:**与Con组相比,LPS组小鼠神经行为学评分降低,血清NSE和S100 β 、脑组织含水量和EB含量明显升高,Occludin和Claudin-5表达减少,MMP-9表达增加($P<0.05$);与LPS组相比,PF组小鼠神经行为学评分增高,血清NSE和S100 β 、脑组织含水量和EB含量明显减少,Occludin和Claudin-5明显增加,MMP-9表达降低($P<0.05$)。**结论:**丙泊酚可减轻脓毒症小鼠BBB损伤,降低血脑屏障通透性,其机制可能与抑制MMP-9表达有关。

关键词 脓毒症;丙泊酚;血脑屏障;基质金属蛋白酶

中图分类号 R741;R741.02;R742 文献标识码 A DOI 10.16780/j.cnki.sjssgncj.20211070

本文引用格式:罗涛,刘永芳,刘方燕,付湘云,刘志刚.丙泊酚对脓毒症小鼠血脑屏障损伤的影响[J].神经损伤与功能重建,2022,17(4):187-190.

作者单位

武汉大学人民医院
麻醉科

武汉 430060

收稿日期

2021-12-17

通讯作者

付湘云

276394975@

qq.com

刘志刚

liuzhigang_wh@

163.com

注:罗涛和刘永芳
为并列第一作者

Effect of Propofol on Blood-Brain Barrier Damage in Septic Mice LUO Tao, LIU Yong-fang, LIU Fang-yan, FU Xiang-yun, LIU Zhi-gang. Department of Anesthesiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Abstract Objective: To observe the effects of propofol on blood-brain barrier (BBB) disruption in septic mice and explore its possible mechanisms. **Methods:** Thirty male SPF C56BL/6 mice were randomly divided into three groups ($n=10$): control group (Con), sepsis group (LPS), and propofol-treated group (PF). A sepsis mouse model was established in LPS and PF group mice through intraperitoneal injections of 10 mg/kg lipopolysaccharide (LPS). Immediately and 6 hours after modeling, the PF group mice were given intraperitoneal injections of 50 mg/kg propofol, and the LPS group mice were given equal volume injections of saline. Mice in the Con group were intraperitoneally injected with saline only. Twenty-four hours later, the behavioral changes of mice in the different groups were evaluated by neuroreflex scoring. Serum levels of NSE and S100 β were measured by ELISA kits. The permeability of BBB and water content of brains were determined by Evans blue extravasation and the wet/dry ratio of brain tissue. The protein expression of Occludin, claudin-5, and MMP-9 were detected by Western blot to assess BBB integrity. **Results:** Compared with the Con group, the LPS group showed higher levels of serum NSE and S100 β , water content and EB content in brain tissues, and MMP-9 protein expression and lower neuroreflex scores and decreased Occluding and Claudin-5 expression ($P<0.05$). Compared with that of the LPS group, the serum NSE and S100 β levels, brain tissue water and EB content, and MMP-9 protein expression in the PF group were decreased, while the neuroreflex scores and Occluding and Claudin-5 expression were significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion:** Propofol can alleviate BBB damage and decrease its permeability in septic mice, and the mechanism may involve the inhibition of MMP-9 expression.

Key words sepsis; propofol; blood-brain barrier; matrix metalloproteinases

脓毒症是由宿主对感染反应失调引起的威胁生命的疾病。脓毒症相关脑病(sepsis associated encephalopathy, SAE)是脓毒症常见但研究较少的神经系统并发症,其临床表现可能从谵妄到认知障碍或深度昏迷等^[1]。研究表明,脓毒症期间系统性产生

的内毒素和促炎细胞因子可导致小胶质细胞和脑内皮细胞活化、紧密连接蛋白下调和白细胞募集增加,由此产生的神经炎症和血脑屏障(blood brain barrier, BBB)损伤可加重脓毒症引起的脑功能障碍^[2]。丙泊酚是临床最常用的静脉麻醉药,除镇静、催眠作用

外,还具有抗炎、抗凋亡和抗氧化等作用。有报道丙泊酚可通过抑制肝脏氧化应激、脂质过氧化和炎症反应,改善脓毒症引起的肝功能障碍^[3]。但丙泊酚对脓毒症引起的BBB损伤是否有保护作用,目前尚不清楚。本实验拟探究丙泊酚对脓毒症小鼠BBB损伤的影响及可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

1.1.1 实验动物 雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠[实验动物质量合格证 SCXK(鄂)2017-0012]30 只,6~8 周龄,体质量 18~20 g,由武汉大学人民医院动物实验中心提供。饲养温度 22℃~25℃,湿度 50%~60%,昼夜交替光照,小鼠自由食水。本实验经武汉大学人民医院动物实验伦理委员会审核批准(编号:WDRM20191004)。

1.1.2 主要试剂 脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS) O111:B4(批号 L2630)购于美国 Sigma 公司;丙泊酚注射液(批号 RJ816)购于英国 AstraZenec 公司;小鼠神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)(ml063810)和小鼠 S100 β ELISA 试剂盒(ml037988)购于上海酶联生物科技公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒(P0012)购于上海碧云天生物科技公司;兔源闭合蛋白(Occludin)一抗、兔源密封蛋白(Claudin)-5 一抗(A10207)、兔源基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-9 一抗(A2607)和 HRP 标记的山羊抗兔二抗(AS014)购于武汉 ABclonal 公司;兔源 β -actin 一抗, RIPA 裂解液购于武汉 Servicebio 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组和模型制备 将小鼠按体质量编号,采用随机数字法将其分为对照(Con)组、脓毒症(LPS)组和丙泊酚(propofol, PF)组。LPS 组和 PF 组小鼠采用腹腔注射 LPS(10 mg/kg)制备脓毒症小鼠模型,注射 LPS 后的即刻和 6 h 后给 PF 组小鼠腹腔注射丙泊酚(50 mg/kg),给 LPS 组小鼠腹腔注射等体积的生理盐水;Con 组仅给予腹腔注射等体积的生理盐水。给药后放入笼中观察小鼠精神及活动状态。

1.2.2 小鼠神经行为学评分 各组完成给药 24 h 后观察小鼠行为学变化,参考文献^[4],分别采用耳廓反射、握尾反射、角膜反射、逃避反射、翻正反射对小鼠进行神经行为学评分:每项正常为 2 分,反射减弱(5 s<间隔时间 $\leq$ 10 s)为 1 分,反射丧失(间隔时间>10 s)为 0 分;评分最高为 10 分,分数越低说明神经系统损伤越严重。

1.2.3 血生化指标检测 各组完成给药 24 h 后,每组

随机选取 4 只小鼠,麻醉状态下于心尖部取血约 0.5~1.0 mL,常温下 3500 r/min 离心 10 min,吸取上清液。采用 ELISA 法检测血清 NSE 和 S100 β 水平,严格按照试剂盒说明书操作。

1.2.4 脑组织含水量和 BBB 通透性测定 各组完成给药 24 h 后,每组随机选取 4 只小鼠,尾静脉注射 2% 伊文氏蓝(Evans blue, EB)(3 mL/kg)。2 h 后麻醉小鼠,于左心室灌注 0.9% 生理盐水取脑,分离左侧脑组织并称重,放入盛有甲酰胺的离心管中,于 37℃ 水浴 48 h,3000 r/min 离心 15 min 后取上清液,采用酶标仪于波长 632 nm 处检测其吸光度。根据标准曲线计算脑组织 EB 含量。分离右侧脑组织,滤纸吸干多余水分和血液,称量湿重,置于 80℃ 烤箱内烘烤 48 h 至恒重,取出后称干重,脑组织含水量(%)=(湿重-干重)/湿重 $\times$ 100%。

1.2.3 脑组织 Occludin、Claudin-5 和 MMP-9 蛋白表达水平 将各组完成取血进行生化检测的小鼠处死后,剥离并称取适量大脑皮质,提取总蛋白,BCA 法检测样品蛋白浓度;常规电泳、转膜、封闭,加入一抗兔抗 Occludin、Claudin-5、MMP-9(1:1000 稀释),4℃ 孵育过夜;TBST 缓冲液洗 3 次,加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗(1:5000 稀释),室温孵育 1 h;TBST 缓冲液洗 3 次后,使用 ECL 显影液显影。采用 Image J 软件分析光密度值,以目的蛋白光密度值与内参蛋白 β -actin 光密度值的比值反映目的蛋白表达水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 26.0 软件处理数据。符合正态分布以及方差齐性的计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验;若方差不齐则使用 Tamhane's T₂ 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠神经行为学评分

给药 24 h 后,小鼠出现竖毛、呼吸急促、眼角脓性分泌物、厌食和反应迟钝等表现。Con 组、LPS 组和 PF 组小鼠的神经行为学评分分别为(9.42 $\pm$ 0.67)分、(5.75 $\pm$ 1.06)分和(7.17 $\pm$ 0.83)分,LPS 组和 PF 组均低于 Con 组(均 $P<0.05$);PF 组高于 LPS 组($P<0.05$)。

2.2 各组小鼠血清 NSE 和 S100 β 水平

与 Con 组相比,LPS 组血清 NSE 和 S100 β 明显升高($P<0.05$);与 LPS 组比较,PF 组血清 NSE 和 S100 β 明显降低($P<0.05$),见表 1。

2.3 各组小鼠脑含水量和BBB通透性

与Con组比较,LPS组小鼠脑含水量和EB含量明显增加($P<0.05$);与LPS组比较,PF组小鼠脑含水量和EB含量明显减少($P<0.05$),见表2。

2.4 各组小鼠脑组织 Occludin、Claudin-5 和 MMP-9 蛋白表达水平

与Con组比较,LPS组小鼠MMP-9表达增加,Occludin和Claudin-5明显减少($P<0.05$);与LPS组比较,PF组MMP-9明显下调,Occludin和Claudin-5表达增加($P<0.05$),见图1。

3 讨论

脓毒症发生时,全身感染诱导不受控制的炎症反应,导致全身多器官功能障碍,大脑是最早受到影响的器官之一。NSE和S100β是神经系统损伤的特异性血清标志物,临床研究表明,脓毒症合并脑功能障碍患者血清NSE和S100β浓度增加^[5]。本研究参照文献,采用腹腔注射LPS制备脓毒症脑损伤小鼠模型^[6]。给药24 h后,小鼠出现竖毛、呼吸急促、眼角脓性分泌物、厌食和反应迟钝等表现,神经行为学评分减低,血清NSE和S100β明显升高,表明脓毒症脑损伤模型制备成功。参照文献^[7],给予脓毒症小鼠丙泊酚后,小鼠活动增加、呼吸减慢、脓性分泌物减少、摄食饮水增多,神经行为学评分增高,血清NSE和S100β降低,表明丙泊酚可减轻脓毒症小鼠脑损伤^[7]。

BBB是脑内具有高度选择性的神经血管单元,由脑内皮细胞、周细胞、星形胶质细胞和小胶质细胞等构成,能限制血液和大脑之间的离子和液体运动,为大脑提供必需的营养素,排出代谢废物,有助于维持大脑微环境的内环境平衡^[8]。其中,血管内皮细胞之间的紧密连接是限制物质转运的物理结构基础,Occludin和Claudin-5作为组成紧密连接复合体的关键跨膜蛋白,其结构和功能的改变可导致紧密连接解离,引起细胞间隙和血管通透性增加^[9]。本研究采用干湿比重法和EB法检测脓毒症小鼠BBB的通透性,并检测紧密连接蛋白Occludin和Claudin-5表达量。EB是一种与血清白蛋白结合的碱性染料,正常情况下无法通过血管。当BBB破坏时,EB可渗透进入脑组织,其在脑内的含量可反映BBB的通透性。本研究结果显示,脓毒症小鼠BBB通透性增加,Occludin和Claudin-5表达降低,而丙泊酚能降低脓毒症小鼠BBB通透性,增加紧密连接蛋白Occludin和Claudin-5表达量。

目前关于脓毒症导致BBB损伤的机制尚不完全

表1 各组小鼠血清NSE和S100β水平比较($\bar{x}\pm s$)

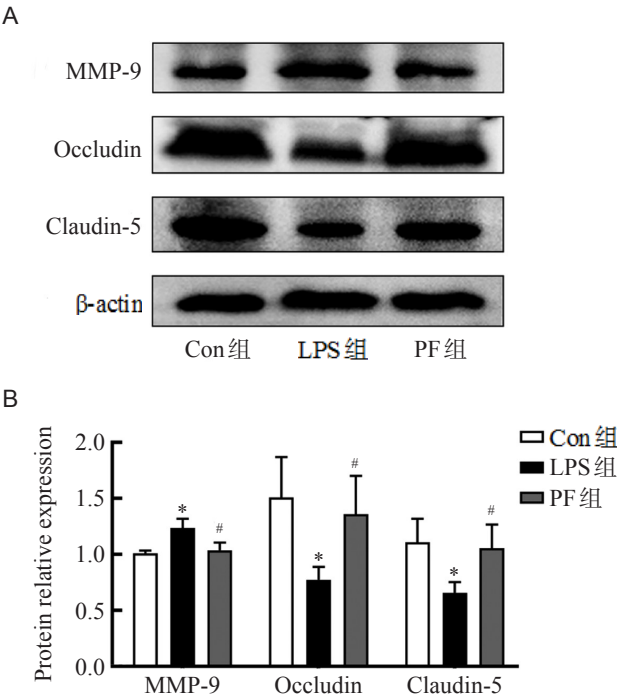
组别	只数	NSE/(ng/mL)	S100β/(pg/mL)
Con组	4	1.01±0.03	65.70±5.51
LPS组	4	5.20±0.13 ^①	167.07±5.68 ^①
PF组	4	3.22±0.09 ^{①②}	114.57±5.66 ^{①②}
F值		1952.00	325.80
P值		$P<0.01$	$P<0.01$

注:与Con组比较,^① $P<0.05$;与LPS组比较,^② $P<0.05$

表2 各组小鼠脑含水量和EB含量($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	含水量/%	EB含量/(μg/mL)
Con组	4	75.76±1.25	2.08±0.08
LPS组	4	78.92±0.98 ^①	5.92±0.23 ^①
PF组	4	76.32±0.43 ^②	3.63±0.24 ^{①②}
F值		12.66	374.00
P值		$P<0.01$	$P<0.01$

注:与Con组比较,^① $P<0.05$;与LPS组比较,^② $P<0.05$



注:与Con组相比,* $P<0.05$;与LPS组相比,# $P<0.05$

图1 各组小鼠脑组织Occludin、Claudin-5和MMP-9蛋白表达量

清楚。有研究报道,脓毒症时免疫细胞激活,分泌大量TNF-α、IL-1β和IL-6等炎症介质,破坏内皮细胞间的紧密连接,导致微血管渗漏和组织水肿^[10]。内毒素LPS可能通过增强Caspase-3/7和Bax活性,抑制Bcl-2和内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitricoxide synthase, eNOS),促进内皮细胞凋亡从而损害BBB功能^[11]。另外,动力相关蛋白1(dynamin-related protein 1, Drp1)介导的线粒体功能障碍也是BBB损伤的重要机制之一。Drp1抑制剂P110可减轻脓毒症诱导的氧化应激反应并提高线粒体膜电位,保护BBB完整性^[12]。MMPs

是一类锌依赖的蛋白水解酶,MMP-9作为主要的效应分子,可降解细胞外基质中IV胶原,损伤BBB。已有研究证实脓毒症大鼠BBB通透性的增加与脑微血管中高水平的MMP-9有关,特异性抑制MMP-9可降低BBB通透性,改善认知功能障碍^[13]。

丙泊酚作为最常用的静脉麻醉剂之一,具有起效快、作用时间短、消除快,且副作用少等优点,广泛用于手术患者的麻醉和重症监护病房患者的镇静。除镇静作用外,据报道丙泊酚能通过激活GABA_A受体和诱导Nrf2的核移位,在M1型巨噬细胞极化期间抑制IL-6和IL-1 β 表达,减轻炎症反应^[14]。此外,丙泊酚可以下调TLR4/NF- κ B信号,同时抑制诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)表达,减轻亚硝化应激诱导的细胞凋亡^[15]。Xie等^[16]发现,丙泊酚能抑制MMP-9和NF- κ B表达,上调Occludin和Claudin-5,维持缺血再灌注后血脊髓屏障的完整性。但丙泊酚能否通过调节MMP-9而减轻脓毒症诱导的BBB损伤,尚未见相关报道。本实验结果显示,脓毒症小鼠脑组织MMP-9上调,BBB通透性增加,而丙泊酚能降低MMP-9蛋白水平,保护BBB完整性,提示丙泊酚可能通过抑制MMP-9表达进而减轻脓毒症诱导的BBB损伤。丙泊酚对血脑屏障的保护作用有望为临床上脓毒症脑损伤患者的治疗提供新的思路,未来仍需大量研究以进一步分析其具体的作用机制。

综上所述,丙泊酚可改善脓毒症小鼠血脑屏障损伤,降低血脑屏障通透性,其机制可能与抑制MMP-9表达有关。

参考文献

- [1] Chung HY, Wickel J, Brunkhorst FM, et al. Sepsis-Associated Encephalopathy: From Delirium to Dementia[J]? J Clin Med, 2020, 9: 703.
- [2] Ren C, Yao RQ, Zhang H, et al. Sepsis-associated encephalopathy: a

vicious cycle of immunosuppression[J]. J Neuroinflammation, 2020, 17: 14.

[3] Wu GJ, Lin YW, Tsai HC, et al. Sepsis-induced liver dysfunction was ameliorated by propofol via suppressing hepatic lipid peroxidation, inflammation, and drug interactions[J]. Life Sci, 2018, 213: 279-286.

[4] 蓝欣, 肖书, 张家玮, 等. 脓毒症相关性脑病小鼠模型的建立及其认知功能障碍的初步研究[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35: 851-857.

[5] Ehler J, Saller T, Wittstock M, et al. Diagnostic value of NT-proCNP compared to NSE and S100B in cerebrospinal fluid and plasma of patients with sepsis-associated encephalopathy[J]. Neurosci Lett, 2019, 692: 167-173.

[6] You M, Miao Z, Pan Y, et al. Trans-10-hydroxy-2-decenoic acid alleviates LPS-induced blood-brain barrier dysfunction by activating the AMPK/PI3K/AKT pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2019, 865: 172736.

[7] 黄蕊, 罗涛, 刘永芳, 等. 丙泊酚对脂多糖诱导的脓毒血症小鼠抑郁样行为和海马炎症反应的影响[J]. 神经损伤与功能重建, 2020, 15: 325-328.

[8] Liebnner S, Dijkhuizen RM, Reiss Y, et al. Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease[J]. Acta Neuropathol, 2018, 135: 311-336.

[9] Sanchez-Cano F, Hernandez-Kelly L C, Ortega A. The Blood-Brain Barrier: Much More Than a Selective Access to the Brain[J]. Neurotox Res, 2021, 39: 2154-2174.

[10] Smyth L, Rustenhoven J, Park T I, et al. Unique and shared inflammatory profiles of human brain endothelia and pericytes[J]. J Neuroinflammation, 2018, 15: 138.

[11] Liu L, Zhang H, Shi Y, et al. Prostaglandin E1 Improves Cerebral Microcirculation Through Activation of Endothelial NOS and GRPCH1[J]. J Mol Neurosci, 2020, 70: 2041-2048.

[12] Haileselassie B, Joshi AU, Minhas PS, et al. Mitochondrial dysfunction mediated through dynamin-related protein 1 (Drp1) propagates impairment in blood brain barrier in septic encephalopathy[J]. J Neuroinflammation, 2020, 17: 36.

[13] Dal-Pizzol F, Rojas HA, dos Santos EM, et al. Matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 activities are associated with blood-brain barrier dysfunction in an animal model of severe sepsis[J]. Mol Neurobiol, 2013, 48: 62-70.

[14] Kochiyama T, Li X, Nakayama H, et al. Effect of Propofol on the Production of Inflammatory Cytokines by Human Polarized Macrophages[J]. Mediators Inflamm, 2019, 2019: 1919538.

[15] Wu GJ, Lin YW, Chuang CY, et al. Liver nitrosation and inflammation in septic rats were suppressed by propofol via downregulating TLR4/NF- κ B-mediated iNOS and IL-6 gene expressions[J]. Life Sci, 2018, 195: 25-32.

[16] Xie LJ, Huang JX, Yang J, et al. Propofol protects against blood-spinal cord barrier disruption induced by ischemia/reperfusion injury[J]. Neural Regen Res, 2017, 12: 125-132.

(本文编辑:唐颖馨)