

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.14.004

地黄苷 A 对 CLP 诱导的脓毒症大鼠脑功能障碍和 Nrf2/GPX4 介导的铁死亡通路的影响*

许静¹ 霍康² 郭秦乐³ 白立曦¹ 李娜⁴ 杜俊凯^{1Δ}

(西安交通大学第一附属医院 1 急诊中心; 2 神经内科; 3 重症医学科; 4 检验科 陕西 西安 710061)

摘要 目的:探究地黄苷 A(ReA)对盲肠结扎穿孔(CLP)诱导的脓毒症大鼠脑功能障碍的影响及机制。**方法:**将 56 只 CLP 诱导的脓毒症 SD 大鼠随机分为 CLP 组(n=12)、CLP+20ReA 组(n=11)、CLP+40ReA 组(n=11)、CLP+80ReA 组(n=11)和 GPX4-IN-3 组(n=11), 将只进行假手术的 10 只 SD 大鼠作为 Sham 组。Sham 组和 CLP 组大鼠灌胃 1 mL 1%二甲基亚砜。CLP+20ReA 组、CLP+40ReA 组、CLP+80ReA 组大鼠分别灌胃 1 mL 剂量为 20、40 和 80 mg/kg/d 的地黄苷 A。GPX4-IN-3 组大鼠同时灌胃 0.5 mL 剂量为 80 mg/kg/d 的地黄苷 A 和 0.5 mL 剂量为 15 mg/kg/d 的铁死亡选择性诱导剂 GPX4-IN-3。各组大鼠均给药 3 d。通过神经功能评分和 Morris 水迷宫实验评价大鼠脑功能;采用 ELISA 法检测大鼠神经元特异性烯醇化酶(NSE)和 S100β 水平;采用称重法检测大鼠脑组织含水量;采用 HE 染色和尼氏染色评价大鼠脑损伤情况;采用微量法检测大鼠脑组织还原型谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)水平和 Fe²⁺ 含量;采用 ELISA 法检测大鼠脑组织白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平;采用 Western blot 检测大鼠脑组织核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)、Kelch 样 ECH 相关蛋白 1(Keap1)和谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)蛋白水平。**结果:**与 CLP 组比较,CLP+20ReA 组、CLP+40ReA 组和 CLP+80ReA 组大鼠的神经功能评分和逃避潜伏期降低(P<0.05), 穿越平台次数升高(P<0.05), 神经元损伤减轻, 血清 NSE 和 S100β 水平降低(P<0.05), 脑组织 GSH 水平升高(P<0.05), 脑组织含水量、MDA、IL-6 和 TNF-α 水平以及 Fe²⁺ 含量均降低(P<0.05), 脑组织 Nrf2(细胞核)和 GPX4 的蛋白表达水平升高(P<0.05), Keap1 的蛋白表达水平降低(P<0.05)。与 CLP+80ReA 组比较,GPX4-IN-3 组大鼠的脑功能障碍加重,Nrf2/GPX4 通路被抑制(P<0.05)。**结论:**地黄苷 A 通过激活 Nrf2/GPX4 通路抑制铁死亡,从而减轻 CLP 诱导的脓毒症大鼠脑功能障碍。

关键词:脓毒症相关脑病;地黄苷 A;铁死亡;核因子 E2 相关因子 2;谷胱甘肽过氧化物酶 4;脑功能障碍

中图分类号:R-33;R632.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2024)14-2619-07

Effects of Rehmannioside A on Brain Dysfunction and Nrf2/GPX4-mediated Ferroptosis Pathway in CLP-induced Sepsis Rats*

XU Jing¹, HUO Kang², GUO Qin-le³, BAI Li-xi¹, LI Na⁴, DU Jun-ka^{1Δ}

(1 Department of Emergency; 2 Department of Neurology; 3 Department of Critical Care Medicine; 4 Department of Laboratory, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect and mechanism of Rehmannioside A (ReA) on brain dysfunction in cecal ligation and perforation (CLP)-induced sepsis rats. **Methods:** 56 CLP-induced sepsis rats were randomly divided into CLP group (n=12), CLP+20ReA group (n=11), CLP+40ReA group (n=11), CLP+80ReA group (n=11), and GPX4-IN-3 group (n=11). Ten rats underwent Sham operation as sham group. Rats in Sham group and CLP group were given 1 mL dimethyl sulfoxide (DMSO). Rats in CLP+20ReA group, CLP+40ReA group and CLP+80ReA group were given 1 mL of 20, 40 and 80 mg/kg/d Rehmannioside A, respectively. Rats in GPX4-IN-3 group were simultaneously administrated with 0.5 mL 80 mg/kg/d of Rehmannioside A and 0.5 mL 15 mg/kg/d of the selective inducer of ferroptosis GPX4-IN-3. Each group was given the drug for 3 days. Neural function score and Morris water maze test were used to evaluate brain function. Neuron-specific enolase (NSE) and S100β levels were detected by ELISA. The water content of brain tissue was measured by weighing method. Brain injury was evaluated by HE staining and Nissl staining. The levels of reduced glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) in brain tissue were detected by micromethods. The levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) were measured by ELISA. The content of Fe²⁺ in brain tissue was determined by micromethod. The levels of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2), Kelch-like ECH related protein 1 (Keap1) and glutathione peroxidase 4 (GPX4) protein in brain tissue were detected by Western blot. **Results:** Compared with CLP group, the neural function scores and escape latency of CLP+20ReA group,

* 基金项目:陕西省自然科学基金-面上项目(2023-JC-YB-736);陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2018JM7152);

陕西省重点研发计划(2024SF-YBXM-525)

作者简介:许静(1977-),女,博士研究生,副主任医师,美国 Weil 急诊与危重症研究所访问学者,研究方向:缺血再灌注损伤脏器保护,循环性休克,E-mail: xlee1977@126.com

Δ 通讯作者:杜俊凯,男,博士研究生,硕士生导师,主任医师,主要研究方向:创伤、急诊感染及缺血再灌注脏器保护机制,

E-mail: 68631784@qq.com

(收稿日期:2023-12-26 接受日期:2024-01-23)

CLP+40ReA group and CLP+80ReA group decreased ($P<0.05$), the number of crossing platforms increased ($P<0.05$), the neuronal damage reduced, the levels of serum NSE and S100 β decreased ($P<0.05$), the level of GSH in brain tissue increased ($P<0.05$). The water content of brain tissue and levels of MDA, IL-6, TNF- α and the content of Fe²⁺ in brain tissue decreased ($P<0.05$), the protein expressions of Nrf2 (nucleus) and GPX4 in brain tissue increased ($P<0.05$), and the protein expression of Keap1 decreased ($P<0.05$). Compared with CLP+80ReA group, the brain dysfunction of GPX4-IN-3 group was aggravated, and the Nrf2/GPX4 pathway was inhibited ($P<0.05$). **Conclusion:** Rehmannioside A inhibits ferroptosis by activating Nrf2/GPX4 pathway, thereby alleviating brain dysfunction in CLP-induced sepsis rats.

Key words: Sepsis related encephalopathy; Rehmannioside A; Ferroptosis; Nuclear factor E2 related factor 2; Glutathione peroxidase 4; Brain dysfunction

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R632.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)14-2619-07

前言

脓毒症是一种感染引起的全身炎症反应综合征,可引起多器官衰竭。在脓毒症的初始阶段,外周释放的促炎细胞因子会引起血脑屏障的改变,如通透性增加,导致促炎细胞因子大量进入大脑,从而引起脓毒症相关脑病(Sepsis associated encephalopathy, SAE)^[1]。SAE的发生机制复杂,目前,许多研究发现铁死亡(Ferroptosis)和脓毒症相关器官损伤之间存在联系^[2-4]。最新研究表明,铁死亡在SAE小鼠模型中被激活,抑制铁死亡显著改善了小鼠的认知功能、神经功能、血脑屏障完整性,抑制了神经炎症^[5],因此,抑制铁死亡可能是防治SAE发生的新策略。尽管抗生素治疗和重症监护技术取得了进步,但高达70%的脓毒症患者可能发展为SAE^[6],但目前临床上尚无针对SAE的有效药物^[7]。地黄是中国最常见和最重要的药用植物之一,其药物制剂广泛用于治疗卒中、老年痴呆等脑部疾病^[8,9]。地黄苷A(Rehmannioside A, ReA, C₂₁H₃₂O₁₅)是一种从地黄中提取的环烯醚萜双糖苷化合物,最近的研究表明,地黄苷A可以减少血管性痴呆大鼠氧化应激和炎症,抑制神经元细胞凋亡,改善认知障碍^[10]。地黄苷A通过激活核因子E2相关因子2(Nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2)和谷胱甘肽过氧化物酶4(Glutathione peroxidase 4, GPX4)改善大脑中动脉闭塞再灌注(Middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠认知障碍并抑制铁死亡^[11]。我们推测地黄苷A可能通过抑制铁死亡通路对SAE具有治疗作用;基于此,本研究探讨了地黄苷A对盲肠结扎穿孔(Cecal ligation and perforation, CLP)诱导的脓毒症大鼠脑功能障碍的影响,并分析了其对铁死亡通路的影响,旨在为SAE相关治疗药物研发提供候选材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SD大鼠(SPF级,7周龄,体质量250~280g)由西安交通大学实验动物中心提供。将大鼠饲养在温度(23±2℃)、湿度(55±5%)和光照(12h/12h光暗循环)恒定的动物房中,并给予自由进食和饮水。

1.1.2 实验试剂 地黄苷A(货号A1128)购自上海雅吉生物科技有限公司。二甲基亚砜(DMSO,货号D8371)、神经元特异性烯醇化酶(Neuron-specific enolase, NSE)ELISA试剂盒(货号SEKR-0093)、苏木素-伊红(HE)染液(货号G1120)、尼氏

(Nissl)染液(货号G1430)、还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH)测试盒(货号BC1175)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)测试盒(货号BC0025)、白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)ELISA试剂盒(货号SEKR-0005)、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)ELISA试剂盒(货号SEKR-0009)、亚铁离子含量检测试剂盒(货号BC5415)购自北京索莱宝科技有限公司。S100 β ELISA试剂盒(货号FY-A014735)购自上海富雨生物科技有限公司。Nrf2一抗(AF0639)、Kelch样ECH相关蛋白1(Kelch-like ECH related protein 1, Keap1)一抗(货号AF5266)、GPX4一抗(货号DF6701)、Lamin B1一抗(AF5161)、 β -actin一抗(货号AF7018)、IgG(H+L)HRP二抗(货号S0001)购自美国Affinity公司。

1.1.3 实验仪器 DB001型Morris水迷宫购自北京智鼠多宝生物科技有限责任公司。SpectraMax iD3型酶标仪购自美国Molecular Devices公司。AJ210A型匀浆器购自海口市其林贝尔仪器制造有限公司。MA752型切片机购自英国Campden公司。

1.2 方法

1.2.1 盲肠结扎穿孔(CLP)诱导脓毒症大鼠模型 参考文献^[12]方法,麻醉大鼠后,腹部正中切开皮肤和肌肉层,结扎盲肠根部 and 盲肠远端1~1.5 cm处,用18号针头在结扎的盲肠远端中央穿刺,将盲肠内容物轻轻按压挤出,再将盲肠重新定位到腹腔内,避免将粪便扩散到切口处,最后缝合肌层和皮肤。进行假手术的大鼠仅切片腹部皮肤,然后缝合伤口,不进行CLP操作。60只大鼠进行CLP手术,建模24h后,有4只大鼠因手术操作不当,建模失败,共有56只建模成功,成功率为93.33%。

1.2.2 动物分组及治疗 将56只CLP诱导的脓毒症大鼠随机分为CLP组(n=12)、CLP+20ReA组(n=11)、CLP+40ReA组(n=11)、CLP+80ReA组(n=11)、GPX4-IN-3组(n=11)。将进行假手术的10只大鼠作为Sham组。Sham组和CLP组大鼠灌胃1 mL的1% DMSO。CLP+20ReA组、CLP+40ReA组、CLP+80ReA组都是分别灌胃1 mL剂量为20、40和80 mg/kg/d的地黄苷A(溶于1% DMSO)^[11]。GPX4-IN-3组大鼠同时灌胃0.5 mL剂量为80 mg/kg/d的地黄苷A和0.5 mL剂量为15 mg/kg/d的GPX4-IN-3^[13]。各组大鼠均给药处理3 d。

1.2.3 大鼠神经功能评分 采用改良神经功能缺损评分法^[14]进行大鼠神经功能评分。分值为0~18分,0分为无损伤,1-6分为轻度损伤,7-12分为中度损伤,13-18分为重度损伤。

1.2.4 大鼠 Morris 水迷宫实验 各组大鼠从术前 5 d 开始连续进行 Morris 水迷宫训练^[5]。Morris 水迷宫设备为直径 150 cm、高 60 cm 的圆形水池,水深 50 cm,水池被等分为 4 个象限,在第一象限中心放置直径 12 cm 的站台,站台上表面距水面 2 cm。实验过程中水温保持 30℃。训练结束后立即进行手术,术后 3 d 进行水迷宫测试。测试内容包括以下 2 个方面:(1)定位航行实验:将大鼠在同一地点入水,记录大鼠从入水到找到站台的时间,记录为逃避潜伏期。如果 120 秒内找不到站台,则引导大鼠至站台并停留 10 s。每天重复训练 4 次。(2)空间探索实验:定位航行实验后,撤去站台,将大鼠面向池壁入水,记录 1 min 内穿越平台的次数。

1.2.5 大鼠血清脑功能障碍标志物测定 给药处理完成后,各组大鼠腹主动脉采血 1 mL,离心取血清,采用 ELISA 法检测 NSE 和 S100β 水平。

1.2.6 大鼠脑组织含水量的测定 给药处理完成后,处死各组大鼠并开颅取脑,除去表面杂质,吸干水分,称量湿重。95℃ 烘烤 48 h 后称量干重。脑组织含水量 = (湿重 - 干重) / 湿重 × 100%。

1.2.7 大鼠脑组织学染色 将各组大鼠脑组织常规石蜡包埋并制作切片,将脑组织切片在 4%多聚甲醛中固定 24 h,常规石蜡包埋后切片(5 μm)。按照 HE 染色试剂盒说明进行 HE 染色和尼氏染色。

1.2.8 脑组织氧化应激指标和炎症因子测定 分离各组大鼠海马组织,与生理盐水混合并用匀浆器匀浆,离心收集上清。采用微量法检测氧化应激指标 GSH 和 MDA 水平,采用 ELISA 法检测炎症因子 IL-6 和 TNF-α 水平。

1.2.9 脑组织 Fe²⁺ 含量测量 按照亚铁离子含量检测试剂盒说明书,采用微量法测定脑组织 Fe²⁺ 含量,使用酶标仪检测 593 nm OD 值并根据标准曲线计算 Fe²⁺ 含量。

1.2.10 Western blot 检测 Nrf2、Keap1 和 GPX4 的表达 取各组大鼠海马组织,用 RIPA 裂解提取蛋白并用 BCA 法定量。用 10% SDS-PAGE 对 60 μg 总蛋白进行电泳,并将其转移到 PVDF 膜。然后用 5%脱脂牛奶封闭膜 2 h,并与 1:1000 稀释的 Nrf2、Keap1、GPX4、Lamin B1 和 β-actin 一抗孵育过夜。用含 Tween 20 的 Tris 缓冲盐水洗涤 3 次,与 1:1000 稀释的 IgG (H+L) HRP 二抗在室温下孵育 1 h,用 ECL 显影反应条带。Lamin B1 和 β-actin 分别作为核蛋白和总蛋白的参考,用 ImageJ 软件对条带进行灰度值分析。

1.3 统计学分析

使用 SPSS21.0 软件分析数据,采用单因素方差分析和 LSD-t 检验比较组间差异,显著水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 地黄苷 A 对 CLP 诱导的脓毒症大鼠脑功能障碍的影响

与 Sham 组比较,CLP 组神经功能评分升高 ($P < 0.05$),逃避潜伏期升高 ($P < 0.05$),穿越平台次数降低 ($P < 0.05$)。与 CLP 组比较,CLP+20ReA 组、CLP+40ReA 组和 CLP+80ReA 组神经功能评分降低 ($P < 0.05$),逃避潜伏期降低 ($P < 0.05$),穿越平台次数升高 ($P < 0.05$)。与 CLP+80ReA 组比较,GPX4-IN-3 组神经功能评分升高 ($P < 0.05$),逃避潜伏期升高 ($P < 0.05$),穿越平台次数降低 ($P < 0.05$)。见图 1 和图 2。

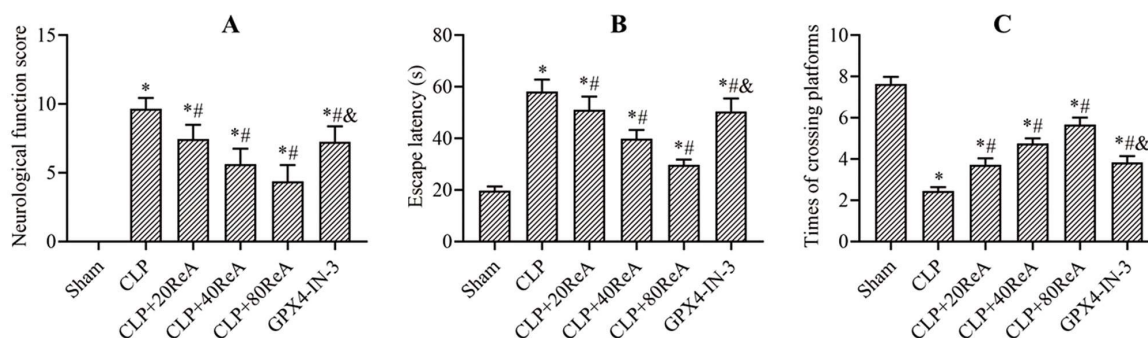


图 1 地黄苷 A 对 CLP 诱导的脓毒症大鼠认知功能的影响

Fig.1 Effect of Rehmannioside A on cognitive function in CLP-induced sepsis rats

Note: A: Neural function score; B: Escape latency; C: Number of platform crossing in rats; Compared with Sham group, * $P < 0.05$; Compared with CLP group, # $P < 0.05$; Compared with CLP+80ReA group, & $P < 0.05$.

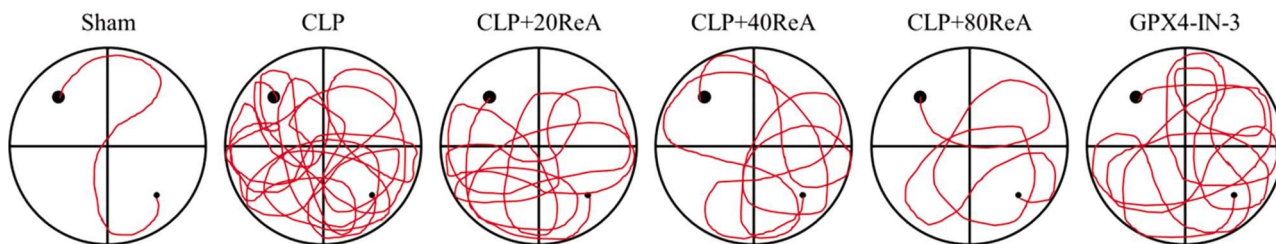


图 2 Morris 水迷宫实验中大鼠的游泳路径

Fig.2 Swimming paths of rats in Morris water maze experiment

2.2 地黄苷 A 对 CLP 诱导的脓毒症大鼠脑损伤的影响

HE 染色和尼氏染色显示,Sham 组大鼠海马区神经元排列

规则,核仁清晰,核膜完整,尼氏小体较多。CLP 组大鼠海马区神经元排列杂乱,数量减少,核皱缩,神经元深染,尼氏小体减少。与 CLP 组比较,CLP+20ReA 组、CLP+40ReA 组和 CLP+80ReA 组大鼠的神经元损伤减轻。与 CLP+80ReA 组比较,GPX4-IN-3 组大鼠的神经元损伤加重。见图 3。

与 Sham 组比较,CLP 组大鼠血清 NSE 和 S100 β 水平以

及脑组织含水量升高 ($P<0.05$)。与 CLP 组比较,CLP+20ReA 组、CLP+40ReA 组和 CLP+80ReA 组大鼠血清 NSE 和 S100 β 水平以及脑组织含水量降低 ($P<0.05$)。与 CLP+80ReA 组比较,GPX4-IN-3 组大鼠血清 NSE 和 S100 β 水平以及脑组织含水量升高 ($P<0.05$)。见图 4。

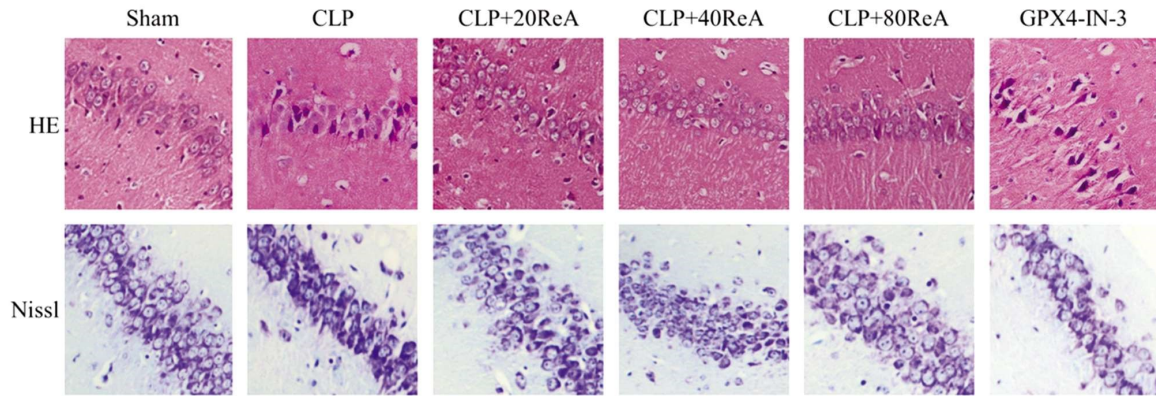


图 3 大鼠海马区 HE 和尼氏染色 ($\times 400$)

Fig.3 HE and Niss staining of rat hippocampus ($\times 400$)

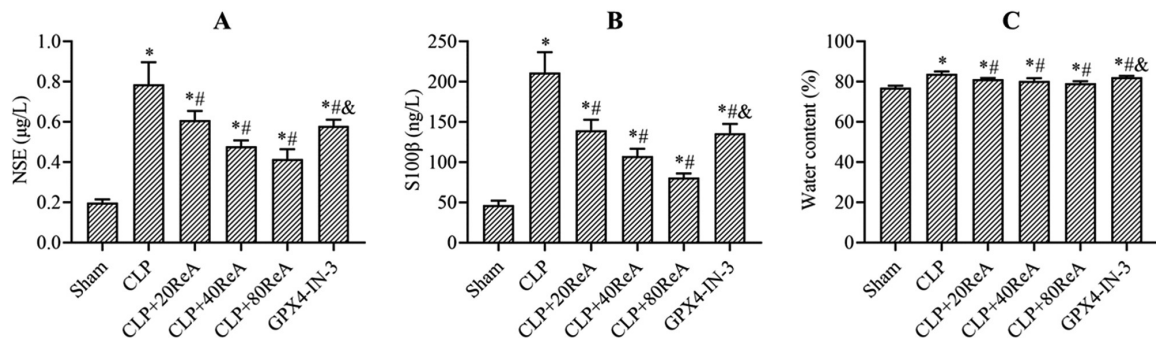


图 4 地黄苷 A 对 CLP 诱导的脓毒症大鼠脑损伤的影响

Fig.4 Effect of Rehmansioside A on brain damage in CLP-induced sepsis rats

Note: A and B: Serum NSE and S100 β levels; B: Brain tissue water content in rats; Compared with Sham group, * $P<0.05$;

Compared with CLP group, # $P<0.05$; Compared with CLP+80ReA group, & $P<0.05$.

2.3 地黄苷 A 对 CLP 诱导的脓毒症大鼠脑组织氧化应激和炎症的影响

与 Sham 组比较,CLP 组大鼠脑组织 GSH 水平降低 ($P<0.05$), MDA、IL-6 和 TNF- α 水平升高 ($P<0.05$)。与 CLP 组比较,CLP+20ReA 组、CLP+40ReA 组和 CLP+80ReA 组大鼠脑组

织 GSH 水平升高 ($P<0.05$),MDA、IL-6 和 TNF- α 水平降低 ($P<0.05$)。与 CLP+80ReA 组比较,GPX4-IN-3 组大鼠脑组织 GSH 水平降低 ($P<0.05$),MDA、IL-6 和 TNF- α 水平升高 ($P<0.05$)。见图 5。

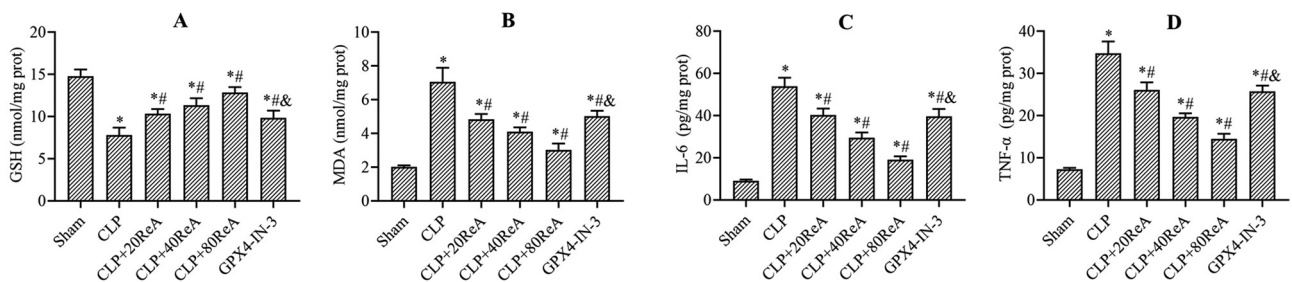


图 5 地黄苷 A 对 CLP 诱导的脓毒症大鼠脑组织氧化应激和炎症的影响

Fig.5 Effects of Rehmansioside A on oxidative stress and inflammation in brain tissue of CLP-induced sepsis rats

Note: A and B: Levels of oxidative stress indexes GSH and MDA in rat brain; C and D: Levels of inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α in rat brain tissue; Compared with Sham group, * $P<0.05$; Compared with CLP group, # $P<0.05$; Compared with CLP+80ReA group, & $P<0.05$.

2.4 地黄苷 A 对 CLP 诱导的脓毒症大鼠脑组织 Fe²⁺ 含量的影响

与 Sham 组比较,CLP 组大鼠脑组织 Fe²⁺ 含量升高($P<0.05$)。与 CLP 组比较,CLP+20ReA 组、CLP+40ReA 组和

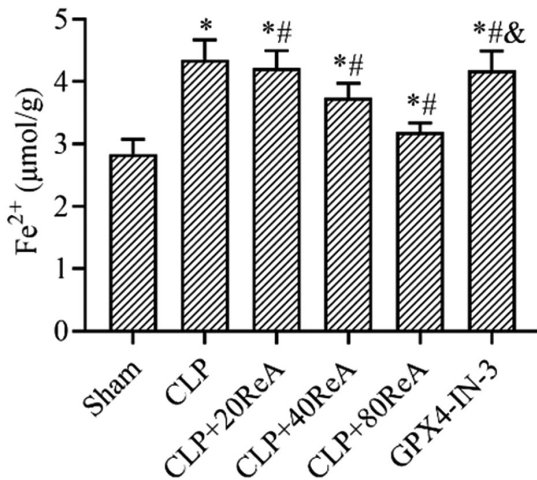


图 6 大鼠的脑组织 Fe²⁺ 含量

Fig.6 Fe²⁺ content in brain tissue of rats

Note: Compared with Sham group, * $P<0.05$; Compared with CLP group, # $P<0.05$; Compared with CLP+80ReA group, & $P<0.05$.

CLP+80ReA 组大鼠脑组织 Fe²⁺ 含量降低 ($P<0.05$)。与 CLP+80ReA 组比较,GPX4-IN-3 组大鼠脑组织 Fe²⁺ 含量升高 ($P<0.05$)。见图 6。

2.5 地黄苷 A 对 CLP 诱导的脓毒症大鼠脑组织 Nrf2/GPX4 介导的铁死亡通路的影响

与 Sham 组比较,CLP 组大鼠脑组织中细胞核 Nrf2 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$),GPX4 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$),Keap1 蛋白表达水平升高 ($P<0.05$)。与 CLP 组比较,CLP+20ReA 组、CLP+40ReA 组和 CLP+80ReA 组细胞核 Nrf2 蛋白表达水平升高 ($P<0.05$),GPX4 蛋白表达水平升高 ($P<0.05$),Keap1 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$)。与 CLP+80ReA 组比较,GPX4-IN-3 组细胞核 Nrf2 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$),GPX4 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$),Keap1 蛋白表达水平升高 ($P<0.05$)。见图 7。

3 讨论

SAE 是脓毒症的常见并发症,脓毒症患者的 SAE 患病率高达 70%,尤其是老年人、新生儿和慢性病患者^[6]。临床研究表明,50%幸存的脓症患者表现出永久性认知功能障碍,尤其是记忆力和学习能力降低^[7]。早期控制感染,纠正器官功能障碍和代谢改变对于 SAE 至关重要,但不幸的是,临床上尚无针

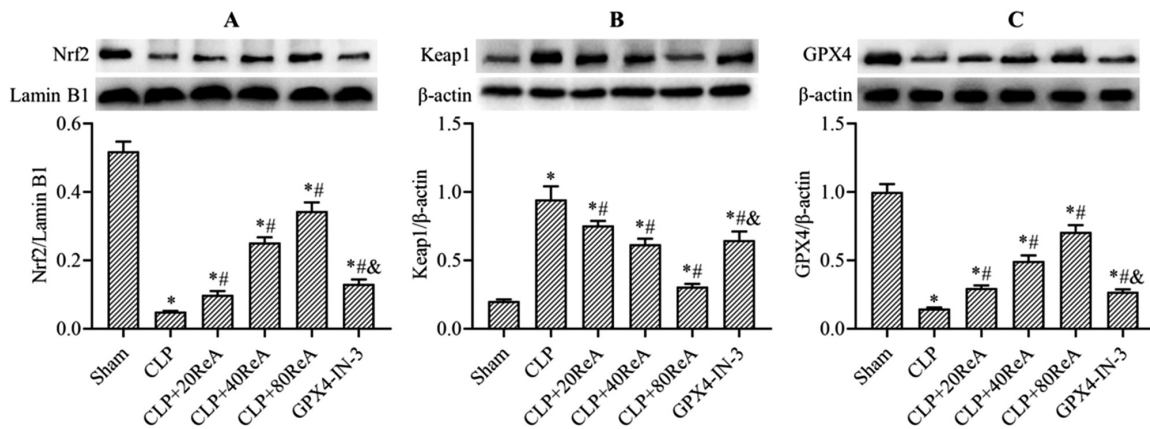


图 7 地黄苷 A 对 CLP 诱导的脓毒症大鼠脑组织 Nrf2/GPX4 介导的铁死亡通路的影响

Fig.7 Effect of Rehmnnioside A on Nrf2/ GPX4-mediated ferroptosis pathway in CLP-induced sepsis rats

Note: A-C: Protein expression levels of Nrf2 (nucleus), Keap1 and GPX4 in brain tissue of rats; Compared with Sham group, * $P<0.05$; Compared with CLP group, # $P<0.05$; Compared with CLP+80ReA group, & $P<0.05$.

对 SAE 的有效药物^[7]。最近的研究表明,地黄苷 A 在血管性痴呆^[10]和 MCAO 大鼠^[11]模型中表现出了良好的改善脑功能障碍的作用。本研究考察了对 CLP 诱导的脓毒症大鼠脑功能障碍的影响。CLP 诱导脓毒症是普遍的 SAE 建模方法,已被多项文献证实^[18,19]。本研究中神经功能评分和 Morris 水迷宫实验结果证实 CLP 诱导了大鼠脑功能障碍,地黄苷 A 则剂量依赖性地减轻了大鼠脑功能障碍。组织学染色结果证实,地黄苷 A 减少了 CLP 诱导的脓毒症大鼠脑损伤,降低了脑组织含水量,并且降低了血清 NSE 和 S100β 水平。NSE 和 S100β 是脑功能障碍生物标志物,NSE 主要存在于神经元中,S100β 主要存在于神经胶质细胞和雪旺细胞中,神经元受损后,NSE 和 S100β 从神经元、神经胶质细胞和雪旺细胞中释放并入血。据报道,脓症患者血清 NSE 和 S100β 水平均增高,并与认知功能障碍正相

关^[20,21]。总之,这些结果说明地黄苷 A 有效减轻了 CLP 诱导的脓毒症大鼠脑功能障碍。

SAE 的机制十分复杂,其病理生理过程主要包括炎症介质级联、微循环和线粒体功能障碍,其中炎症反应发挥着关键作用^[22]。感染可激活外周和中枢免疫系统,刺激炎症因子释放,外周血炎症因子通过血脑屏障进入中枢神经系统,激活小胶质细胞并产生炎症级联反应,引起脑代谢改变,减少脑源性神经营养因子的生成,导致脑功能障碍等多种并发症^[23]。氧化应激是 SAE 的另一种机制,脑组织具有高耗氧率和低水平的抗氧化防御特性,因此在脓毒症期间特别容易受到氧化应激损害^[24]。大量临床研究表明,脓毒症与 ROS 产生增加、抗氧化剂消耗和氧化应激标志物的积累有关^[25]。本研究发现地黄苷 A 有效减轻了 CLP 诱导的脓毒症大鼠脑组织氧化应激和炎症。其他文献报

道,腹腔注射 80 mg/kg 的地黄苷 A 有效抑制了脊髓损伤大鼠小胶质细胞中促炎介质的释放,并改善了神经功能^[26]。地黄苷 A 可以减少血管性痴呆大鼠氧化应激和炎症,改善认知障碍^[10]。因此,地黄苷 A 对脑功能的保护作用与抑制氧化应激和炎症密切相关。

铁死亡是一种相对新颖的程序性细胞死亡类型,具有铁依赖性,并且铁死亡过程中通常存在脂质过氧化^[27]。铁死亡与许多疾病的病理生理过程有关,也是认知缺陷的重要诱因^[28]。研究表明,铁死亡是与 SAE 发生发展有关的新机制,抑制铁死亡途径可有效减轻 SAE^[5,29,30]。铁元素虽然是人体必需的金属元素,过量的铁则有生物毒性,会损伤细胞,主要原因是 Fe²⁺ 参与 Fenton 反应^[31]产生大量的 ROS,引起细胞氧化损伤^[32]。本研究发现地黄苷 A 有效降低了 CLP 诱导的脓毒症大鼠脑组织 Fe²⁺ 含量。GPX4 是铁死亡的负调节因子^[33],通过催化 GSH 发挥抑制铁死亡和抗氧化作用,GPX4 的缺失或耗竭可降低 GSH 水平,诱导铁死亡^[34]。Nrf2 是广泛研究的抗氧化转录因子,并且通过调节铁储存和运输蛋白调节铁代谢^[35,36],GPX4 也是 Nrf2 的转录靶标^[37,38],通过激活 Nrf2/GPX4 通路可有效抑制铁死亡,减轻 SAE^[30]。本研究发现地黄苷 A 有效激活了 CLP 诱导的脓毒症大鼠脑组织 Nrf2/GPX4 通路。

为了验证地黄苷 A 是否通过 Nrf2/GPX4 介导的铁死亡通路减轻 SAE,本研究使用地黄苷 A 和铁死亡诱导剂 GPX4-IN-3 同时处理 CLP 诱导的脓毒症大鼠,研究表明,GPX4-IN-3 减弱地黄苷 A 对脑功能障碍的缓解作用,证实了该推论。其他学者报道,对 MCAO 大鼠腹腔注射 80 mg/kg 的地黄苷 A 或者使用 80 μM 处理 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞 24 h,有效改善了大鼠认知功能和神经功能,减少了脑梗死,增加了 SH-SY5Y 细胞活力,并通过激活 Nrf2 和 GPX4 抑制了铁死亡^[11]。

综上所述,地黄苷 A 通过激活 Nrf2/GPX4 通路抑制铁死亡,从而减轻 CLP 诱导的脓毒症大鼠脑功能障碍。因此,地黄苷 A 可能是防治 SAE 的候选天然药物。

参考文献(References)

[1] Danielski LG, Giustina AD, Badawy M, et al. Brain barrier breakdown as a cause and consequence of neuroinflammation in sepsis [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(2): 1045-1053.

[2] He R, Liu B, Xiong R, et al. Itaconate inhibits ferroptosis of macrophage via Nrf2 pathways against sepsis-induced acute lung injury[J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 43.

[3] Li N, Wang W, Zhou H, et al. Ferritinophagy-mediated ferroptosis is involved in sepsis-induced cardiac injury [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 160: 303-318.

[4] Xi L, Gy Z, R G, et al. Ferroptosis in sepsis: The mechanism, the role and the therapeutic potential[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 956361.

[5] Wang J, Yang S, Jing G, et al. Inhibition of ferroptosis protects sepsis-associated encephalopathy[J]. *Cytokine*, 2023, 161: 156078.

[6] Tauber SC, Djukic M, Gossner J, et al. Sepsis-associated encephalopathy and septic encephalitis: an update[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2021, 19(2): 215-231.

[7] Chung HY, Wickel J, Brunkhorst FM, et al. Sepsis-associated encephalopathy: from delirium to dementia?[J]. *J Clin Med*, 2020, 9 (3): 703.

[8] 孙羿邈, 顾超, 马静毅, 等. 地黄益智方治疗卒中后认知障碍非痴呆肾精亏虚证的临床研究 [J]. *北京中医药大学学报*, 2022, 45(7): 663-669.

[9] 易健, 刘柏炎, 蔡光先. 超微一味地黄汤对老年痴呆大鼠认知功能和脑组织碱性成纤维生长因子表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(21): 139-142.

[10] Sun M, Shen X, Ma Y. Rehmannioside A attenuates cognitive deficits in rats with vascular dementia (VD) through suppressing oxidative stress, inflammation and apoptosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120: 109492.

[11] Fu C, Wu Y, Liu S, et al. Rehmannioside A improves cognitive impairment and alleviates ferroptosis via activating PI3K/AKT/Nrf2 and SLC7A11/GPX4 signaling pathway after ischemia [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 289: 115021.

[12] 康柳枝, 张雅兰, 陈彩云, 等. β-榄香烯对 CLP 诱导的脓毒症大鼠肝损伤的保护作用[J]. *中国免疫学杂志*, 2022, 38(11): 1311-1316.

[13] Xu C, Xiao Z, Wang J, et al. Discovery of a potent glutathione peroxidase 4 inhibitor as a selective ferroptosis inducer [J]. *J Med Chem*, 2021, 64(18): 13312-13326.

[14] 张辉, 杨林, 陈培莉, 等. 过表达 B 细胞淋巴瘤 / 白血病 -2 对重度创伤性脑损伤大鼠的治疗作用及其机制 [J]. *中华实验外科杂志*, 2021, 38(1): 92-95.

[15] 刘恒, 孙凡, 徐倩倩, 等. 黄芩苷对脑小血管病模型大鼠认知功能及脑内血管内皮生长因子和内皮抑素表达水平的影响[J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2019, 45(5): 1080-1085.

[16] Gao Q, Hernandez MS. Sepsis-associated encephalopathy and blood-brain barrier dysfunction [J]. *Inflammation*, 2021, 44 (6): 2143-2150.

[17] 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): 1787-1794.

[18] 张丽娜, 艾宇航, 郭曲练, 等. 脓毒症相关性脑病大鼠动物模型的建立[J]. *中华急诊医学杂志*, 2013, 22(7): 731-736.

[19] 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(5): 851-857.

[20] 冯清, 吴龙, 艾宇航, 等. 神经元特异性烯醇化酶、中枢神经特异蛋白与白细胞介素 -6 在脓毒症相关性脑病中的诊断价值[J]. *中华内科杂志*, 2017, 56(10): 747-751.

[21] Anderson BJ, Reilly JP, Shashaty MGS, et al. Admission plasma levels of the neuronal injury marker neuron-specific enolase are associated with mortality and delirium in sepsis[J]. *J Crit Care*, 2016, 36: 18-23.

[22] Gofton TE, Young GB. Sepsis-associated encephalopathy[J]. *Nat Rev Neurol*, 2012, 8(10): 557-566.

[23] Ren C, Yao RQ, Zhang H, et al. Sepsis-associated encephalopathy: a vicious cycle of immunosuppression [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 14.

[24] d'Avila JC, Santiago AP, Amancio RT, et al. Sepsis induces brain mitochondrial dysfunction [J]. *Crit Care Med*, 2008, 36 (6): 1925-1932.

[25] Dal-Pizzol F, Ritter C, Cassol OJ, Jr., et al. Oxidative mechanisms of brain dysfunction during sepsis [J]. *Neurochem Res*, 2010, 35 (1):

- 1-12.
- [26] Xiao S, Wang C, Yang Q, et al. Rea regulates microglial polarization and attenuates neuronal apoptosis via inhibition of the NF- κ B and MAPK signalings for spinal cord injury repair [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(3): 1371-1382.
- [27] 姚鹏, 陈勇, 李依玲, 等. 海马神经细胞铁死亡通过 Nrf2/GPX4 信号通路导致脓毒症相关性脑病大鼠认知功能障碍[J]. *中华危重病急救医学*, 2019, 31(11): 1389-1394.
- [28] Chen S, Chen Y, Zhang Y, et al. Iron metabolism and ferroptosis in epilepsy[J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 601193.
- [29] Chu J, Jiang Y, Zhou W, et al. Acetaminophen alleviates ferroptosis in mice with sepsis-associated encephalopathy via the GPX4 pathway [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2022, 41: 9603271221133547.
- [30] Wang J, Zhu Q, Wang Y, et al. Irisin protects against sepsis-associated encephalopathy by suppressing ferroptosis via activation of the Nrf2/GPX4 signal axis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 187: 171-184.
- [31] Wardman P, Candeias LP. Fenton chemistry: an introduction [J]. *Radiat Res*, 1996, 145(5): 523-531.
- [32] Galaris D, Barbouti A, Pantopoulos K. Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2019, 1866(12): 118535.
- [33] Liu W, Chakraborty B, Safi R, et al. Dysregulated cholesterol homeostasis results in resistance to ferroptosis increasing tumorigenicity and metastasis in cancer [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5103.
- [34] Yang WS, Stockwell BR. Ferroptosis: death by lipid peroxidation[J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(3): 165-176.
- [35] Agyeman AS, Chaerkady R, Shaw PG, et al. Transcriptomic and proteomic profiling of KEAP1 disrupted and sulforaphane-treated human breast epithelial cells reveals common expression profiles[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 132(1): 175-187.
- [36] Harada N, Kanayama M, Maruyama A, et al. Nrf2 regulates ferroportin 1-mediated iron efflux and counteracts lipopolysaccharide-induced ferroportin 1 mRNA suppression in macrophages[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2011, 508(1): 101-109.
- [37] Osburn WO, Wakabayashi N, Misra V, et al. Nrf2 regulates an adaptive response protecting against oxidative damage following diquat-mediated formation of superoxide anion [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2006, 454(1): 7-15.
- [38] Salazar M, Rojo AI, Velasco D, et al. Glycogen synthase kinase-3beta inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2 [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(21): 14841-14851.
-
- (上接第 2612 页)
- [20] Dastmalchi N, Safaralizadeh R, Hosseinpourfeizi MA, et al. MicroRNA-424-5p enhances chemosensitivity of breast cancer cells to Taxol and regulates cell cycle, apoptosis, and proliferation[J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(2): 1345-1357.
- [21] Dastmalchi N, Hosseinpourfeizi MA, Khojasteh SMB, et al. Tumor suppressive activity of miR-424-5p in breast cancer cells through targeting PD-L1 and modulating PTEN/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Life Sci*, 2020, 259(1): 118-128.
- [22] Zhou Y, Yamamoto Y, Takeshita F, et al. Delivery of miR-424-5p via Extracellular Vesicles Promotes the Apoptosis of MDA-MB-231 TNBC Cells in the Tumor Microenvironment[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2): 844.
- [23] Pan Y, Huang Q, Peng X, et al. Circ_0015756 promotes ovarian cancer progression via the miR-145-5p/PSAT1 axis [J]. *Reprod Biol*, 2022, 22(4): 100-108.
- [24] Li H, Wu C, Chang W, et al. Overexpression of PSAT1 is Correlated with Poor Prognosis and Immune Infiltration in Non-Small Cell Lung Cancer[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2023, 28(10): 243-255.
- [25] Biyik-Sit R, Kruer T, Dougherty S, et al. Nuclear Pyruvate Kinase M2 (PKM2) Contributes to Phosphoserine Aminotransferase 1 (PSAT1)-Mediated Cell Migration in EGFR-Activated Lung Cancer Cells[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(16): 3938.