

降钙素原在大鼠脓毒症引起认知功能障碍中的关系研究

杨宇焦¹, 左友波¹, 耿媛¹, 陈昌林¹, 云德波²

(1. 川北医学院附属医院麻醉科; 2. 南充市中心医院神经外科, 四川 南充 637000)

【摘要】目的: 探讨降钙素原(PCT)在大鼠脓毒症引起认知功能障碍中的作用。**方法:** 60只成年雄性SD大鼠随机分为假手术组(C组)、脓毒症组(S组)、脓毒症+米诺环素组(SM组), 每组各20只。采用盲肠结扎穿孔(CLP)术建立脓毒症模型, 造模后观察各组大鼠7d生存率, 应用Morris水迷宫实验和条件恐惧实验检测各组大鼠认知情况, RT-PCR和Western Blot检测各组大鼠海马组织中PCT表达量。**结果:** 与C组相比, S组存活率显著降低($P < 0.001$); 与S组比较, SM组存活率增加($P < 0.05$); C组和S组存活率比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 各组大鼠7d生存率为: C组100%、S组54.5%、SM组85.0%。Morris水迷宫实验结果显示, 与C组比较, S组和SM组跨越目标象限次数减少($P < 0.01$), 平台潜伏期延长($P < 0.01$); 与S组比较, SM组平台潜伏期缩短($P < 0.01$), 跨越目标象限次数增多($P < 0.01$)。恐惧记忆测试结果显示, 在情景测试和声音测试中, 与C组比较, S组大鼠静止时间明显缩短($P < 0.01$); 与S组比较, SM组大鼠静止时间延长($P < 0.01$), C组和S组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。RT-PCR和Western Blot结果显示, 与C组比较, S组和SM组海马PCT表达明显升高($P < 0.01$); 与S组比较, SM组海马PCT表达明显下降($P < 0.05$)。**结论:** 脓毒症可引起大鼠认知功能损害, 其机制可能与脑内海马PCT表达上调引起的中枢神经系统损害有关, 有效抑制PCT可改善脓毒症引起的认知功能障碍。

【关键词】 脓毒症; 认知功能障碍; PCT

【中图分类号】 R631.2 **【文献标志码】** A

The potential role of PCT in sepsis rats with cognitive dysfunction

YANG Yu-jiao¹, ZUO You-bo¹, GENG Yuan¹, CHENG Chang-lin¹, YUN De-bo²

(1. Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College; 2. Department of Neurosurgery, Nanchong Central Hospital, the Second Clinical Institute of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To investigate the potential role of procalcitonin (PCT) in cognitive impairment by cecal ligation and puncture sepsis rats model. **Methods:** 60 SD rats aged 3 months were randomly divided into sham control (group C), sepsis (group S), and sepsis + minocycline group (group SM), 20 cases in each group. The sepsis model was established by cecal ligation and perforation (CLP). The 7-day survival rate of rats in each group was observed after modeling. The cognitive status of rats in each group was detected by Morris water maze test and conditioned fear test. The expression of PCT in hippocampus of rats in each group was detected by RT-PCR and Western blot. **Results:** Compared with group C, the survival rate of group S was significantly lower ($P < 0.001$). Meanwhile, the survival rate in group SM were increased compared with group S ($P < 0.05$), there was no significant difference in survival rate between group C and group S ($P > 0.05$). The 7-day survival rate of rats in each group was 100% in group C, 54.5% in group S and 85.0% in group SM. The results of Morris water maze experiment showed that compared with group C, the times of crossing target quadrant in group S and SM decreased ($P < 0.01$), and the latency of platform prolonged ($P < 0.01$), compared with group S, the latency of platform shortened ($P < 0.01$), and the times of crossing target quadrant increased ($P < 0.01$). Conditional fear test showed that the freezing time of group S was significantly shorter than that of group C on the second day of context and cue tone ($P < 0.01$) and these two sets of data in group SM were significantly increased when compared with group S ($P < 0.01$). There was no significant difference between group C and group S ($P > 0.05$). ELISA and Western Blot showed that the expression of PCT in hippocampus of group S, group SM were significantly increased when compared with C group ($P < 0.01$), when compared with group S, group SM was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Sepsis can cause cognitive impairment in rats, the mechanism may be related to the upregulation of PCT in the brain, effective inhibition of PCT can improve the cognitive impairment caused by sepsis.

【Key words】 Sepsis; Cognitive dysfunction; PCT

脓毒症是指因感染引起机体反应失调而导致的危及生命的器官功能障碍^[1], 全球每年脓毒症发病

人数超过 1 900 万,其中有 600 万患者死亡,病死率为 30%,而幸存的患者中有 20%~50% 的患者存在远期认知功能障碍^[2]。脓毒症相关认知功能障碍是脓毒症最重要的远期并发症,合并有远期认知功能障碍的患者其远期病死率显著增加^[3],脓毒症相关认知功能障碍患者的护理和治疗已成为全球性负担。因此,了解其发病机制,是治疗和预防该疾病的前提。降钙素原(procalcitonin, PCT)是降钙素的前提物质,是炎症反应的特异性指标,其升高的程度与疾病的严重程度相关^[4],临床上常用动态监测 PCT 来指导脓毒症的治疗,PCT 降低程度与存活率升高呈正相关,PCT 水平持续增高则提示预后不良^[5]。众所周知,在健康的个体中,PCT 是由甲状腺滤泡旁细胞分泌,但研究发现在甲状腺完全切除的严重感染患者血液 PCT 仍然是增高的,提示 PCT 不仅来源于甲状腺滤泡旁细胞^[4],更有可能有其他重要来源。因此,本研究拟探讨 PCT 在脓毒症引起远期认知功能损害中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

米诺环素(上海碧云天生物技术有限公司);BCA 蛋白定量试剂盒、ECL 发光液、预染蛋白 Marker(上海雅酶生物科技有限公司);聚偏氟乙烯(PVDF)膜(美国 Millipore 公司); β -actin 抗体、PCT 抗体(美国 Abcam 公司);逆转录试剂盒(美国 Promega 公司);PCR 扩增试剂盒(美国 Promega 公司);Morris 水迷宫(西班牙 Panlab 公司);酶标仪 I3X(MD 公司);条件恐惧实验箱(美国 MED Associates 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及处理 SPF 级成年 SD 大鼠 60 只,250~300 g,随机分为假手术组(C 组)、脓毒症组(S 组)、脓毒症+米诺环素组(CM 组),每组各 20 只。各组大鼠正常进食饮水,光照/黑暗 12 h,适应性饲养一周后采用盲肠结扎穿孔(CLP)术建立脓毒症模型,造模后观察各组大鼠 7 d 生存率,在第 8 天应用 Morris 水迷宫实验,定位航行连续训练 4 d,第 12 天行 Morris 水迷宫空间探索实验,第 13 天行条件恐惧实验。RT-PCR 和 Western Blot 检测各组大鼠海马组织中 PCT 表达含量。

1.2.2 脓毒症模型的建立 采用 CLP 法建立大鼠脓毒症模型^[6],即戊巴比妥钠麻醉后固定于手术板上,腹部消毒,取 1 cm 长腹正中切口,游离盲肠,缝线结扎盲肠,用无菌 7 号针头在已结扎盲肠远端中央处贯通穿刺,挤出少许粪便入腹腔,还纳腹腔,随

后逐层关闭腹腔,术后经皮下注射生理盐水 3 mL/100 g 补充术中丢失量。术后大鼠出现精神萎靡,毛躁,板状腹,呼吸促,总死亡率达 20% 为造模成功。假手术组只游离找出盲肠,不做缝线结扎和穿孔,其余步骤相同。

1.2.3 大鼠生存率观察 不同组别大鼠造模后放回笼中,自由进食水,术后 12 h 内每 2 h 观察 1 次,12 h 后每隔 8~12 h 观察 1 次,内容包括大鼠生存情况,精神状态、进食水量及活动情况。

1.2.4 Morris 水迷宫检测 参照 Morris 的方法^[7],各组大鼠在术后第 8 天开始进行定位航行实验,动物连续训练 4 d,每天 4 次,4 个不同象限各 1 次,游泳时间设定为 120 s,大鼠找到平台后在平台上休息 15 s,若在 120 s 内找不到平台,则由实验员将其引导上平台,在平台上休息 15 s。定位航行结束 24 h 后,撤出水下平台,进行空间探索实验,记录大鼠在 120 s 内第 1 次跨越平台时间和跨越平台次数。

1.2.5 条件恐惧实验 实验方案参照之前认知功能障碍的相关研究^[7-8],将大鼠置于 32 cm×25 cm×25 cm 的条件恐惧实验箱中适应 120 s,然后发出声音进行条件性刺激(20 s,5 000 Hz,70 db),紧接着给予电击作为非条件刺激(2 s,0.5 mA),电击后继续停留 120 s 再重复声音和电刺激一次,训练结束后让大鼠在测试箱内停留 120 s 后取出。

1.2.6 恐惧记忆测试 在条件恐惧实验结束后第 2 天,首先进行情景测试,将大鼠置于箱体内,适应 3 min 后,记录接下来 3 min 的僵直时间,继续停留 1 min 后将大鼠取出。情景测试结束后 2 h 进行声音测试,将大鼠放入箱体 3 min 后,播放声音,记录声音刺激时大鼠的僵直时间,僵直时间判断标准,除呼吸相关运动以外,大鼠所处静止状态的时间,它表明大鼠对条件性恐惧刺激的记忆程度。

1.2.7 RT-PCR 检测大鼠脑组织海马区 PCT 据 NCB GenBank 公布的大鼠 PCT 及 GAPDH 基因序列,使用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,Rat-PCT 上游引物:5'-tggagcaggaggaggaaacagg 下游引物:5'-gagggacctagttgcaaaat; GAPDH 上游引物:5'-accacagtcacatgccatcac-3' 下游引物:5'-tcaccacctgttctgtga-3'。提取大脑海马总 RNA,使用紫外分光光度仪测定 RNA 样品在 260 nm 和 280 nm 处的 OD 值,通过 OD260/OD280 比值鉴定其纯度和质量,提好的 RNA 按逆转录试剂盒说明书进行逆转录反应,对反应产物进行 PCR 扩增。扩增采用 SYBR Green,其中 20 μ L 的反应体系为 4 μ LcDNA、0.4 μ L 上游引物、0.4 μ L 下游引物,5.2 μ L 无核酸酶水、10uL SYBR Green Q-PCR SuPermixon。反应条件为:95 $^{\circ}$ C

5 min, 95 °C 15 s, 65 °C 1 min, 72 °C 30 s, 40 个循环, 每个样品 3 个复孔, 在实时荧光定量仪 CFX96 上进行。以 $2^{-\Delta\Delta t}$ 为计算方式, GAPDH 基因作为内参基因。

1.2.8 Western Blot 检测大鼠脑组织海马区 PCT 取大鼠海马组织, RIPA 细胞裂解液匀浆, 4 °C 12 000 rpm 离心 15 min, 吸取上清液, 测定蛋白浓度, 加入蛋白上样缓冲液后 95 °C 15 min 让蛋白充分变性。于 SDS-PAGE 胶加孔上样, 电泳—转膜—封闭—洗膜—孵育—抗—洗膜—孵育二抗—洗膜—ECL 发光试剂盒检测 PCT 蛋白表达含量, 采用 Image J 分析软件进行分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析, 计量资料 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 进行 *t* 检验, 计数资料以 [*n* (%)] 表示, 进行 χ^2 检验, Morris 水迷宫采用重复测量的单因素方差分析, 两组间比较采用 LSD-*t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠生存率比较

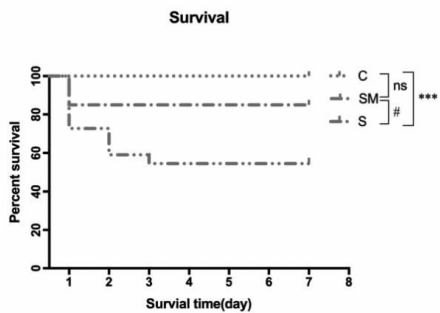


图 1 各组大鼠生存率比较

C: 对照组, S: 脓毒症组, SM: 脓毒症+米诺环素组
****P* < 0.001, 与 C 组比较; #*P* < 0.05, 与 S 组比较。

与 C 组相比, S 组存活率显著降低 (*P* < 0.001); 与 S 组比较, SM 组存活率增加 (*P* < 0.05); C 组和 S 组存活率比较差异无统计学意义 (*P* > 0.05); 各组大鼠 7 d 生存率为: C 组 100%、S 组 54.5%、SM 组 85.0%。见图 1。

2.2 各组大鼠 Morris 水迷宫实验结果

与 C 组比较, S 和 SM 组跨越目标象限次数减少 (*P* < 0.01), 平台潜伏期延长 (*P* < 0.01), 与 S 组比较, SM 组平台潜伏期缩短 (*P* < 0.01), 跨越目标象限次数增多 (*P* < 0.01)。见图 2。

2.3 恐惧记忆测试结果

在情景测试和声音测试中, 与 C 组比较, S 组大鼠静止时间明显缩短 (*P* < 0.01), 与 S 组比较, SM 组静止时间延长 (*P* < 0.01), C 组与 SM 比较无统计学差异 (*P* > 0.05)。见图 3。

2.4 大鼠海马 PCT 在基因和蛋白水平的表达结果

RT-PCR 和 Western Blot 结果相一致, 与 C 组比较, S 组和 SM 海马 PCT 表达明显升高 (*P* < 0.01), 与 S 组比较, SM 组 PCT 含量明显下降 (*P* < 0.05)。见图 4、图 5。

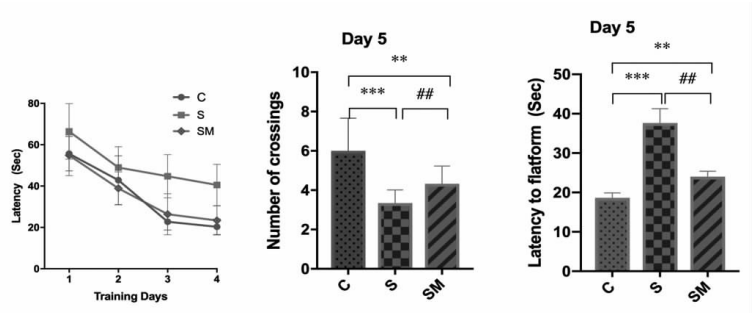


图 2 Morris 水迷宫实验结果

C: 对照组, S: 脓毒症组, SM: 脓毒症+米诺环素组
***P* < 0.01, 与 C 组比较; ##*P* < 0.01, 与 S 组比较。

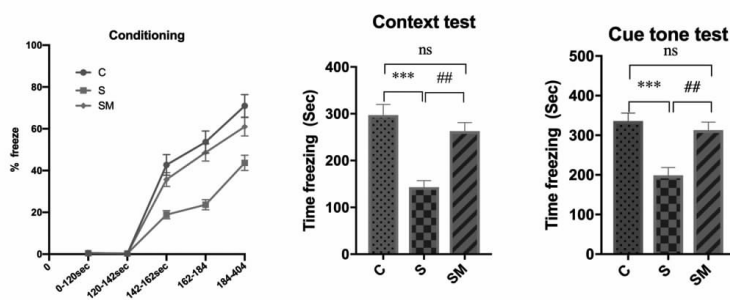


图 3 条件恐惧实验结果

C: 对照组, S: 脓毒症组, SM: 脓毒症+米诺环素组
****P* < 0.001, 与 C 组比较; ##*P* < 0.01, 与 S 组比较。

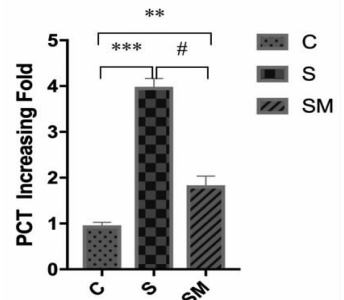


图 4 各组 RT-PCR 结果

P* < 0.01, *P* < 0.001, 与 C 组比较; #*P* < 0.05, 与 S 组比较; C: 对照组, S: 脓毒症组, SM: 脓毒症+米诺环素组。

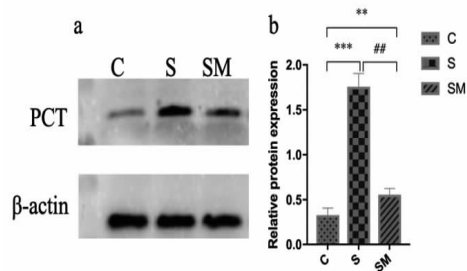


图5 A:电泳条带;B: Western blot 结果分析

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与 C 组比较;## $P < 0.01$, 与 S 组比较;

C: 对照组, S: 脓毒症组, SM: 脓毒症+米诺环素组。

3 讨论

临床研究^[9]显示,脓症患者应用米诺环素后血清中 PCT 降低,能有效改善其预后,但 PCT 的具体作用还不清楚。本实验通过构建 CLP 大鼠脓毒症模型,探讨了脓毒症对大鼠认知功能损害的影响,并通过检测大鼠海马区的炎症因子 PCT 的表达情况来探索认知功能障碍发生的机制,发现脓毒症引起认知损害的大鼠海马区 PCT 的表达量增加,而米诺环素干预后海马区 PCT 的表达量下降,认知损害得到改善。已知小胶质细胞是中枢神经系统中第一道也是最重要的一道免疫防线^[10],当其受到外来刺激物刺激时,则会由静止状态转变为阿米巴样的活化状态,吞噬外来颗粒同时释放炎症介质^[10-11],米诺环素是小胶质细胞特异性抑制剂^[12],可抑制小胶质细胞的活化,进而抑制炎症因子的分泌。因此,本研究猜想使用米诺环素后 PCT 减少是通过小胶质细胞介导的。之所以选择 PCT 作为检测指标,是因为 PCT 对细菌感染具有高度的特异性,在临床上被当作是脓毒血症等细菌感染的诊断标志物^[13],值得一提的是,目前认为 PCT 主要表达于甲状腺 C 细胞,其功能是调节体内钙稳态。近期研究^[14]表明,PCT 与中枢神经系统疾病如缺血性脑卒中和缺氧性脑病的不良预后相关,本研究结果显示,脓毒症组脑内海马 PCT 的表达量较对照组和干预组显著升高,表明脑内 PCT 的升高会导致严重不良预后,即认知功能障碍,应用药物使脑内 PCT 降低,其远期认知损害的发生率也随着下降,说明 PCT 在脓毒症相关认知损害的发病机制中占主要地位。目前,关于 PCT 在中枢神经系统中的作用还研究较少,主要研究集中在 PCT 用于脓毒症的早期诊断和判断预后方面^[13-14],但其如何产生,如何作用于机体还研究甚少,由于研究条件限制,本次研究也只在海马发现

了 PCT 表达的异常,其具体机制还有待后续研究。

参考文献

- [1] Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, *et al.* Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) [J]. *JAMA*, 2016, 315(8):762-774.
- [2] Levy MM, Evans LE, Rhodes A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle:2018 update [J]. *Intensive Care Med*, 2018, 44(6):925-928.
- [3] Schlapbach LJ, Aebischer M, Adams M, *et al.* Impact of sepsis on neurodevelopmental outcome in a Swiss National Cohort of extremely premature infants [J]. *Pediatrics*, 2011, 128(2):e348-e357.
- [4] Shirali AS, Wu JX, Zhu CY, *et al.* The role of serum procalcitonin in predicting bacterial sepsis inpatients with hypothyroidism [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2019, 104(12):5915-5922.
- [5] Crivellari M, Bobillo-Perez S, Sole-Ribalta A, *et al.* Procalcitonin to stop antibiotics aftercardiovascular surgery in a pediatric intensive care unit-The PROSACAB study [J]. *Plos One*, 2019, 14(9):e0220686.
- [6] Barnhart CD, Yang D, Lein PJ. Using the Morris water maze to assess spatial learning and memory in weanling mice [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4):e0124521.
- [7] Blaesse P, Airaksinen MS, Rivera C, *et al.* Cation-chloride cotransporters and neuronal function [J]. *Neuron*, 2009, 61(6):820-838.
- [8] Giovanoli S, Engler H, Engler A, *et al.* Preventive effects of minocycline in a neurodevelopmental two-hit model with relevance to schizophrenia [J]. *Transl Psychiatry*, 2016, 6(4):e772.
- [9] 安旭灿. 米诺环素与头孢哌酮-舒巴坦联用对重症肺炎患者的疗效及其对 IL-6、CRP 和 PCT 水平改善的影响 [J]. *抗感染药*, 2020, 17(1):117-119.
- [10] Tunç T, Polat A, Özdemir R, *et al.* Assessment of novel biomarkers: sTREM-1, pentraxin-3 and pro-adrenomedullin in the early diagnosis of neonatal early onset sepsis [J]. *J Neonatal Perinatal Med*, 2020, 13(1):47-54.
- [11] Lan KM, Tien LT, Pang Y, *et al.* IL-1 receptor antagonist attenuates neonatal lipopolysaccharide-induced long-lasting learning impairment and hippocampal injury in adult rats [J]. *Toxicol Lett*, 2015, 234(1):30-39.
- [12] Henry CJ, Huang Y, Wynne AM, *et al.* Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1beta and anti-inflammatory IL-10 cytokines [J]. *Brain Behav Immun*, 2009, 23(3):309-317.
- [13] De Oro N, Gauthreaux ME, Lamoureux J, *et al.* The Use of Procalcitonin as a Sepsis Marker in a Community Hospital [J]. *J Appl Lab Med*, 2019, 3(4):545-552.
- [14] Sridharan P, Chamberlain RS. The efficacy of procalcitonin as a biomarker in the management of sepsis: slaying dragons or tilting at windmills [J]. *Surg Infect (Larchmt)*, 2013, 14(6):489-511.

(收稿日期:2020-01-29)

学术编辑:刘露)