

网络出版时间: 2023-09-19 16:24:20 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20230918.1413.019>

瑞马唑仑对脓毒症小鼠认知功能的保护作用及机制

蔡雯¹ 邱高林² 赵园园¹ 周静文¹ 李元海^{1,2} 夏晓琼¹

摘要 目的 探究瑞马唑仑对脓毒症小鼠认知功能的保护作用及其机制。方法 将54只C57BL/6小鼠随机分为生理盐水组(NS组)、单纯瑞马唑仑组(RM组)、脓毒症模型组[脂多糖(LPS)组]、不同剂量瑞马唑仑脓毒症组(RM₁₀、RM₁₅、RM₂₀组),每组9只。通过腹腔注射1 mg/kg LPS建立脓毒症模型;RM组腹腔注射15 mg/kg瑞马唑仑溶液;RM₁₀、RM₁₅、RM₂₀组在注射LPS前30 min分别腹腔注射10、15、20 mg/kg瑞马唑仑溶液。记录Morris水迷宫实验中各组小鼠穿越平台次数和停留第一象限时间百分比;ELISA法检测外周血和脑海马肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)水平;化学比色法检测脑海马丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)水平和超氧化物歧化酶(SOD)活性;HE染色观察海马CA1区神经元病理变化。结果 LPS组小鼠穿越平台次数、第一象限停留时间百分比、GSH水平、SOD活性明显下降,TNF- α 、IL-1 β 和MDA水平明显升高。HE染色可见海马CA1区神经元数量减少、排列紊乱、细胞质染色加深伴细胞核固缩深染。与LPS组比较,不同剂量瑞马唑仑组小鼠穿越平台次数、第一象限停留时间百分比、GSH水平、SOD活性增加,TNF- α 、IL-1 β 和MDA水平降低,海马CA1区变性神经元减少。不同剂量瑞马唑仑组之间比较, RM₂₀组小鼠改善脓毒症小鼠认知功能障碍和炎症氧化应激的程度均低于RM₁₀组和RM₁₅组。结论 瑞马唑仑对脓毒症小鼠认知功能障碍具有一定的保护作用,其机制可能与其结合转位蛋白(TSPO)抑制巨噬细胞极化,从而减轻神经炎症和氧化应激损伤有关,其中10、15 mg/kg瑞马唑仑比20 mg/kg瑞马唑仑的保护效果更明显。

关键词 瑞马唑仑;脓毒症;认知功能

中图分类号 R 631

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)10-1719-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.10.019

脓毒症是由宿主对细菌、病毒或真菌感染反应失调引起的危及生命的器官功能障碍^[1]。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰阴性杆菌胞壁的主

要组成成分,是推动临床脓毒症发生发展的关键因素^[2]。脓毒症时严重感染可进一步导致脓毒症神经系统并发症——脓毒症相关脑病(sepsis-associated encephalopathy, SAE),主要表现为认知功能障碍,出现学习和记忆能力减低甚至是谵妄、昏迷等一系列症状^[3]。SAE患者中枢神经系统往往无明显感染,脓毒症期间产生的大量外周炎症因子通过多种途径穿透血脑屏障,导致中枢神经胶质细胞激活、炎症介质过度释放和氧化应激^[4],最终发展为SAE,严重影响着患者的预后和生存。

新型苯二氮草类镇静药瑞马唑仑具有起效快、代谢快、对呼吸、循环抑制轻、不易体内蓄积和不依赖于器官代谢等多个优点,是目前最接近于理想的麻醉镇静药物^[5],已被广泛应用于麻醉诱导、无痛内镜检查和重症监护镇静^[6]。除镇静作用外,据报道^[7]瑞马唑仑还能抑制炎症反应,改善缺血再灌注损伤,具有潜在的器官保护作用。目前瑞马唑仑对SAE认知功能障碍的影响和相关机制尚不清楚。因此,该研究旨在初步探讨瑞马唑仑对LPS诱导的脓毒症小鼠认知功能障碍的保护作用和相关机制,以为脓毒症患者镇静和麻醉的临床适应证提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 54只C57BL/6小鼠,雄性,SPF级,8周龄,体质量(23±2)g,购自安徽医科大学动物实验中心。所有小鼠在12 h照明与12 h黑暗交替的环境下适应性喂养1周后进行行为学训练。所有动物项目均由安徽医科大学机构动物保护与使用委员会审查和批准(伦理编号:KYXM-202212-006)。

1.2 试剂与仪器 注射用甲苯磺酸瑞马唑仑(批号:221004AU,江苏恒瑞医药股份有限公司);肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA试剂盒、白细胞介素-1 β (interleukin, IL-1 β) ELISA试剂盒、LPS(货号:abs552204-96T、abs552201-96T、abs42020800,上海优宁维生物科技股份有限公司);BCA蛋白定量试剂盒(货号:abs9232,爱必信生物科技股份有限公司);丙二醛(malondialdehyde, MDA)、

2023-05-09 接收

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(编号:82101349)

作者单位:¹安徽医科大学附属巢湖医院麻醉科,合肥 238000

²安徽医科大学第一附属医院麻醉科,合肥 230022

作者简介:蔡雯,女,硕士研究生;

李元海,男,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:

liyuanhai-1@163.com

还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒 (货号: A003-1-2、A006-2、A001-3, 南京建成生物工程研究所); 低速冷冻离心机 (型号: KDC-2046, 安徽中科中佳科学仪器有限公司); 全自动化学发光酶标仪 (型号: Tethys 145, 深圳爱康生物科技股份有限公司); 生物显微镜 (型号: DM2500, 德国 Leica 公司)。

1.3 方法

1.3.1 分组 将 54 只小鼠随机分成 6 组, 每组 9 只, 生理盐水组 (NS 组); 单纯瑞马唑仑组 (RM 组); 脓毒症模型组 (LPS 组); 不同剂量瑞马唑仑组 (RM₁₀、RM₁₅、RM₂₀ 组)。LPS 组和 RM₁₀、RM₁₅、RM₂₀ 组采用腹腔注射 1 mg/kg LPS 建造脓毒症模型, 小鼠精神萎靡, 活动减少, 毛发凌乱, 蜷缩抱团, 排泄稀水样便提示造模成功^[8]。NS 组仅腹腔注射等量生理盐水; RM 组腹腔注射 15 mg/kg 瑞马唑仑溶液; LPS 组腹腔注射 1 mg/kg LPS; RM₁₀、RM₁₅、RM₂₀ 组分别腹腔注射 10、15、20 mg/kg 瑞马唑仑溶液 30 min 后腹腔注射 1 mg/kg LPS。

1.3.2 行为学实验 通过 Morris 水迷宫行为学实验分析小鼠认知功能, 评价小鼠的空间记忆能力, 实验分为定位航行和空间探索两部分。水迷宫为一圆形池, 直径 100 cm、高度 30 cm。池内注入水和牛奶使池水呈白色, 保持水温 (24 ± 1) °C。迷宫 4 个方向分别标有 4 个形状不同的指示标志物, 迷宫按顺序四等分为 4 个象限, 直径 10 cm 的平台放置于第一象限, 低于水面 1 cm, 实验期间平台位置及迷宫外标志物保持不变。定位航行期间小鼠连续接受为期 5 d 的训练, 每天 4 次, 将小鼠面朝池壁分别从 4 个不同象限入水点入水, 训练小鼠对平台及指示标记物的空间记忆并记录小鼠进入水迷宫后 60 s 内寻找并爬上平台的逃避潜伏期。第 5 天训练结束后将平台撤除, 注射 LPS 10 h 后进行空间探索实验, 从平台的对侧象限将小鼠面向池壁放入水中, 记录 60 s 内穿越平台次数、第一象限停留时间百分比作为行为学数据, 并进行统计分析。

1.3.3 外周血与脑海马炎症因子检测 LPS 注射 12 h 后各组随机选取 6 只小鼠摘除眼球取血, 处死后在冰上剥离海马组织, 血液样本于室温下静置 2 h 后以 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液与海马组织存放于 -80 °C 冰箱待测。将冻存血清和海马组织在室温下解冻, 海马组织冲洗干净后称重, 与预冷生理盐水按 1 : 9 比例混合后冰水浴下研磨制备海马组织匀浆, 4 °C 3 000 r/min 离心 10 min 后取上清

液, 采用 ELISA 法检测血清和海马组织上清液 TNF- α 、IL-1 β 水平, 严格参照说明书进行具体操作。

1.3.4 脑海马氧化应激检测 采用 BCA 法检测海马组织上清液蛋白浓度, 化学比色法检测海马组织上清液中 MDA、GSH、SOD 的吸光度值, 并按照试剂盒说明书计算 MDA、GSH 水平和 SOD 活性。

1.3.5 HE 染色海马组织病理变化观察 每组剩余 3 只小鼠的新鲜海马组织经 4% 多聚甲醛浸泡固定过夜, 脱水及石蜡包埋后切成 3 μ m 厚的组织切片, 脱蜡至水后 HE 染色。于光学显微镜下观察各组海马 CA1 区神经元病理变化情况。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析, GraphPad Prism 8.30 软件作图, 数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间数据比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 瑞马唑仑对脓毒症小鼠空间记忆功能的影响

Morris 水迷宫定位航行试验中随着训练天数增加, 各组小鼠逃避潜伏期逐渐下降, 训练期间组间差异均无统计学意义 (P > 0.05)。空间探索试验期间, 与 NS 组比较, LPS 组小鼠穿越平台次数和第一象限停留时间百分比减少 (P < 0.01)。与 LPS 组比较, 不同剂量瑞马唑仑组小鼠穿越平台次数和第一象限停留时间百分比均明显增加 (P < 0.05)。不同剂量瑞马唑仑组组间比较, RM₁₀ 与 RM₁₅ 两组小鼠穿越平台次数和第一象限停留时间百分比差异均无统计学意义 (P > 0.05), RM₂₀ 组的穿越平台次数和第一象限停留时间百分比比较 RM₁₀ 组和 RM₁₅ 组显著减少 (P < 0.01, P < 0.05)。此外 RM 组穿越平台次数和第一象限停留时间百分比与 NS 组比较均减少, 但差异无统计学意义 (P > 0.05)。见图 1。

2.2 瑞马唑仑对脓毒症小鼠外周血和脑海马 TNF- α 、IL-1 β 水平的影响 与 NS 组比较, LPS 组血清和脑海马中的 TNF- α 、IL-1 β 水平显著升高 (P < 0.01)。RM₁₀、RM₁₅、RM₂₀ 组的瑞马唑仑干预减轻了 LPS 诱导的炎症反应, 血清和脑海马中 TNF- α 、IL-1 β 水平明显下降 (P < 0.05)。与 RM₁₀ 和 RM₁₅ 组比较, RM₂₀ 组血清和脑海马中 TNF- α 和 IL-1 β 水平升高 (P < 0.05), 而 RM₁₀ 组与 RM₁₅ 组之间的炎症因子水平差异无统计学意义 (P > 0.05)。同时, 与 NS 组比较, RM 组小鼠外周和中枢炎症因子水平差异无统计学意义 (P > 0.05)。见表 1。

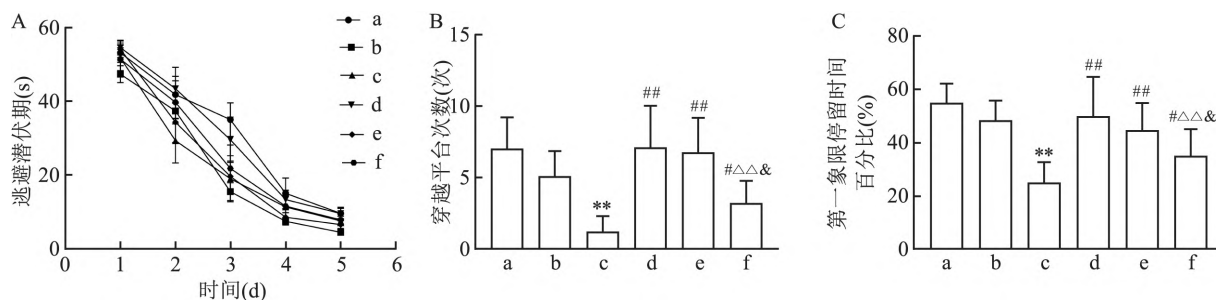


图1 瑞马唑仑对脓毒症小鼠空间记忆功能的影响

A: 各组定位航行实验中的逃避潜伏期; B: 各组空间探索试验期间穿越平台次数比较; C: 各组空间探索试验期间第一象限停留时间百分比比较; a: NS组; b: RM组; c: LPS组; d: RM₁₀组; e: RM₁₅组; f: RM₂₀组; 与NS组比较: ** $P < 0.01$; 与LPS组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与RM₁₀组比较: △△ $P < 0.01$; 与RM₁₅组比较: & $P < 0.05$

表1 各组小鼠外周血和脑海马中 TNF-α、IL-1β 水平比较 (n = 6 $\bar{x} \pm s$ μg/ml)

组别	TNF-α		IL-1β	
	外周血	脑海马	外周血	脑海马
NS	33.06 ± 9.31	22.99 ± 8.04	24.34 ± 4.86	17.79 ± 3.50
RM	35.75 ± 7.41	21.07 ± 8.65	31.54 ± 6.96	24.95 ± 6.16
LPS	150.28 ± 25.65**	88.50 ± 21.90**	62.81 ± 10.01**	90.86 ± 14.14**
RM ₁₀	71.76 ± 16.70##	47.71 ± 13.30##	36.73 ± 6.35##	50.11 ± 10.85##
RM ₁₅	74.16 ± 19.25##	48.59 ± 9.42##	38.30 ± 7.20##	55.02 ± 17.98##
RM ₂₀	98.61 ± 18.52##△△&	71.10 ± 18.57#△△&	50.38 ± 10.39##△△&	73.71 ± 15.16#△△&
F值	38.186	20.505	18.480	30.448
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与NS组比较: ** $P < 0.01$; 与LPS组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与RM₁₀组比较: △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与RM₁₅组比较: & $P < 0.05$

2.3 瑞马唑仑对脑海马 MDA、GSH 水平和 SOD

活性的影响 与NS组比较, LPS组海马组织MDA水平明显升高 ($P < 0.01$)、GSH水平和SOD活性明显降低 ($P < 0.01$)。与LPS组比较, 不同剂量瑞马唑仑组MDA水平降低、GSH水平和SOD活性升高 ($P < 0.05$), 其中与RM₁₀和RM₁₅组比较, RM₂₀组MDA水平升高、GSH水平和SOD活性降低 ($P < 0.05$), 而RM₁₀与RM₁₅组海马氧化应激标记物水平差异无统计意义 ($P > 0.05$)。此外, RM组海马内MDA、GSH水平和SOD活性与NS组比较差异无统计意义 ($P > 0.05$)。见表2。

2.4 瑞马唑仑对海马 CA1 区神经元病理变化的影响

NS组和RM组小鼠海马CA1区椎体神经元排列整齐, 形态完整, 细胞质染色均匀, 细胞核结构清晰; LPS组小鼠神经元数量减少, 排列紊乱, 形态不规则, 大量神经元固缩深染, 细胞质与细胞核分界不清; 不同剂量瑞马唑仑组小鼠的海马CA1区神经元病理变化均较LPS组减轻, 可见神经元排列稍紊乱, 部分神经元细胞变性; 与RM₁₀和RM₁₅组比较, RM₂₀组海马CA1区变性神经元数量增多。见图2。

表2 各组小鼠脑海马 MDA、GSH 水平和 SOD

组别	活力比较 (n = 6 $\bar{x} \pm s$)		
	MDA (nmol/mgprot)	GSH (μmol/gprot)	SOD (U/mgprot)
NS	4.64 ± 1.58	29.44 ± 8.61	128.97 ± 38.99
RM	5.88 ± 1.54	25.44 ± 5.05	114.28 ± 29.30
LPS	15.12 ± 5.03**	10.39 ± 3.39**	49.11 ± 12.23**
RM ₁₀	6.87 ± 2.52##	24.48 ± 5.38##	109.79 ± 16.37##
RM ₁₅	7.19 ± 1.66##	25.07 ± 6.97##	106.09 ± 17.18##
RM ₂₀	10.85 ± 3.04#△△&	17.42 ± 4.16#△△&	77.79 ± 18.61#△△&
F值	11.187	8.853	8.337
P值	<0.001	<0.001	<0.001

与NS组比较: ** $P < 0.01$; 与LPS组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与RM₁₀组比较: △ $P < 0.05$; 与RM₁₅组比较: & $P < 0.05$

3 讨论

SAE是脓毒症的常见神经系统并发症, SAE的发生会增加脓毒症患者重症监护室的住院时间和病死率, 而并发SAE的脓毒症存活者往往会存在长期慢性认知功能缺陷。腹腔注射LPS可诱导继发性神经炎症、脑海马损伤和行为学改变^[9], 因此本研究采用LPS建立脓毒症相关脑损伤小鼠模型, 并

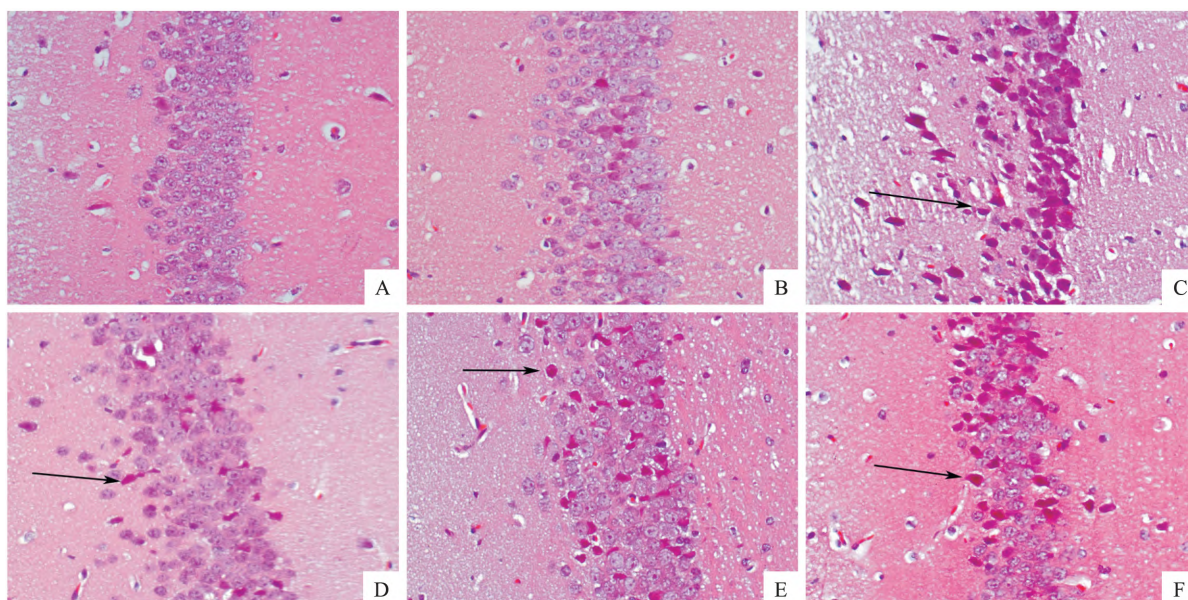


图2 各组小鼠海马CA1区神经元改变 HE ×400

A: NS组; B: RM组; C: LPS组; D: RM₁₀组; E: RM₁₅组; F: RM₂₀组; 黑色箭头: 变性神经元

采用 Morris 水迷宫行为学测试评估小鼠认知功能。Morris 水迷宫实验是最常用的一种评估啮齿动物空间学习和记忆功能的测试,空间探索期间小鼠穿过平台次数越多,第一象限停留时间百分比越高,说明小鼠空间记忆能力越强。本研究结果显示与 NS 组比较,LPS 组小鼠穿越平台次数和第一象限停留时间百分比减低,说明脓毒症模型小鼠发生了不同程度认知功能降低。

瑞马唑仑主要作用于中枢神经系统 γ -氨基丁酸受体,促进抑制性神经递质释放,产生镇静、催眠和抗焦虑作用,同时可对认知功能产生明显的影响。Liu et al^[10] 研究发现,长期使用瑞马唑仑镇静可延缓衰老大鼠认知功能衰退,发挥记忆保护作用。本研究中不同剂量瑞马唑仑均增加了脓毒症小鼠穿越平台次数和第一象限停留时间百分比,证明瑞马唑仑改善了 LPS 诱导的脓毒症小鼠认知功能降低,具有一定的认知功能保护作用。此外有临床研究^[11] 表明,长期使用苯二氮草类药物会导致患者认知功能损伤,因此本研究设置了单纯瑞马唑仑组观察瑞马唑仑对小鼠认知功能的作用,结果显示单次注射瑞马唑仑在短期(10 h)内并没有对小鼠的认知功能产生明显影响。

此外,瑞马唑仑还可通过多种途径发挥潜在的抗炎保护作用。据报道^[10] 瑞马唑仑可抑制 LPS 刺激的巨噬细胞免疫应答,降低炎症细胞因子(TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β)表达,提高脓毒症小鼠的存活率。

Fang et al^[7] 研究表明瑞马唑仑可促进 LPS 处理的巨噬细胞向抑炎型转变,减少促炎细胞因子(TNF- α 和 IL-6)释放,减轻 LPS 诱导的 GSH、过氧化氢酶水平和 SOD 活性下降,发挥抗炎、抗氧化应激作用,并且这种作用可被转位蛋白(translocator protein,TSPO)特异性配体拮抗,提示 TSPO 是瑞马唑仑对抗脓毒症过度炎症的潜在代偿机制。TSPO 过去被称为外周苯二氮草类受体,主要存在于线粒体外膜和多种免疫调节细胞(如小胶质细胞、巨噬细胞等),参与调节髓体生成、免疫应答、细胞凋亡和炎症损伤等多种病理生理改变^[12]。作为 TSPO 配体,瑞马唑仑能否通过 TSPO 来发挥对 LPS 诱导的脓毒症相关脑损伤的保护作用目前仍不清楚。本研究中 LPS 组小鼠血清和海马 TNF- α 和 IL-1 β 水平升高,脑 MDA 水平升高、GSH 水平和 SOD 活性降低,同时伴有海马 CA1 区大量神经元变性,说明脓毒症相关脑损伤小鼠模型建立成功。不同剂量瑞马唑仑干预均抑制了脓毒症诱导的炎症反应和脑氧化应激改变,由于促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 是巨噬细胞向促炎型极化的特征性标志物^[13],因此瑞马唑仑可能是通过结合 TSPO 抑制巨噬细胞向促炎型转变,从而减轻 LPS 诱导的继发性神经炎症和氧化应激损伤,发挥脑保护作用。本研究中,10 mg/kg 瑞马唑仑预处理组的行为学表现、炎症因子和氧化应激标志物的改变与 15 mg/kg 瑞马唑仑预处理组无显著差异,其原因可能是由于瑞马唑仑超短效代谢的特性。Zhou et

al^[14] 研究表明,重复腹腔注射高剂量瑞马唑仑可显著诱导中枢小胶质细胞激活并减少少突胶质细胞数量,导致认知功能损伤,而本研究结果显示,20 mg/kg 瑞马唑仑的保护作用明显低于 10、15 mg/kg 瑞马唑仑组,推测可能是由于高剂量瑞马唑仑通过其他途径对中枢神经系统产生了影响,导致其对脓毒症小鼠认知功能的保护作用减弱。

本研究首次探讨了不同剂量瑞马唑仑对脓毒症小鼠模型认知功能的保护作用和相关机制,结果显示 10、15 和 20 mg/kg 瑞马唑仑可抑制脓毒症小鼠外周炎症反应,进而减轻神经炎症、脑氧化应激和神经元损伤,对脓毒症小鼠认知功能障碍具有一定的保护作用,并且 10、15 mg/kg 瑞马唑仑的保护效果比 20 mg/kg 瑞马唑仑更加明显,初步推测该作用可能和瑞马唑仑结合巨噬细胞 TSP0 有关。本研究仅探讨了腹腔注射不同剂量瑞马唑仑短时间内对脓毒症小鼠认知功能的影响,而瑞马唑仑的长期作用仍有待于进一步研究。此外,由于 TSP0 调节炎症相关病理改变的机制十分复杂,后续仍需深入研究以确认 TSP0 在巨噬细胞中的具体表达情况和作用机制。

参考文献

- [1] Chiu C, Legrand M. Epidemiology of sepsis and septic shock [J]. *Curr Opin Anaesthesiol* 2021, 34(2): 71–6.
- [2] Burnap S A, Mayr U, Shankar-Hari M, et al. A proteomics-based assessment of inflammation signatures in endotoxemia [J]. *Mol Cell Proteomics* 2021, 20: 100021.
- [3] Pan S, Lv Z, Wang R, et al. Sepsis-induced brain dysfunction: pathogenesis, diagnosis, and treatment [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 1328729.
- [4] Chung H Y, Wickel J, Brunkhorst F M, et al. Sepsis-associated encephalopathy: from delirium to dementia [J]. *J Clin Med* 2020, 9(3): 703.
- [5] Antonik L J, Goldwater D R, Kilpatrick G J, et al. A placebo- and midazolam-controlled phase I single ascending-dose study evaluating the safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of remimazolam (CNS 7056): Part I. Safety, efficacy, and basic pharmacokinetics [J]. *Anesth Analg* 2012, 115(2): 274–83.
- [6] Choi H R, Song I A. Review of remimazolam and sedatives in the intensive care unit [J]. *Acute Crit Care* 2022, 37(2): 151–8.
- [7] Fang H, Zhang Y, Wang J, et al. Remimazolam reduces sepsis-associated acute liver injury by activation of peripheral benzodiazepine receptors and p38 inhibition of macrophages [J]. *Int Immunopharmacol* 2021, 101(Pt B): 108331.
- [8] 孙加晓, 郑娟娟, 谢文钦. 瑞马唑仑诱导对脓毒症小鼠免疫和肾上腺皮质功能的影响 [J]. *福建医科大学学报* 2021, 55(4): 300–4.
- [9] Kirk R A, Kesner R P, Wang L M, et al. Lipopolysaccharide exposure in a rat sepsis model results in hippocampal amyloid-beta plaque and phosphorylated tau deposition and corresponding behavioral deficits [J]. *Geroscience* 2019, 41(4): 467–81.
- [10] Liu X, Lin S, Zhong Y, et al. Remimazolam protects against LPS-induced endotoxicity improving survival of endotoxemia mice [J]. *Front Pharmacol* 2021, 12: 739603.
- [11] Crowe S F, Stranks E K. The residual medium and long-term cognitive effects of benzodiazepine use: an updated meta-analysis [J]. *Arch Clin Neuropsychol* 2018, 33(7): 901–11.
- [12] El Chemali L, Akwa Y, Massaad-Massade L. The mitochondrial translocator protein (TSP0): a key multifunctional molecule in the nervous system [J]. *Biochem J* 2022, 479(13): 1455–66.
- [13] 胡细佑, 陈波, 陈泽林. 巨噬细胞极化在脓毒症发生发展中的作用 [J]. *中华危重病急救医学* 2022, 34(6): 661–5.
- [14] Zhou X H, Zhang C C, Wang L, et al. Remimazolam induced cognitive dysfunction in mice *via* glutamate excitotoxicity [J]. *Transl Neurosci* 2022, 13(1): 104–15.

Protective effect and mechanisms of remimazolam on cognitive function in septic mice

Cai Wen¹, Qiu Gaolin², Zhao Yuanyuan¹, Zhou Jingwen¹, Li Yuanhai^{1,2}, Xia Xiaoqiong¹
(¹Dept of Anesthesiology, Chaohu Hospital of Anhui Medical University, Hefei 238000; ²Dept of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To study the protective effect and mechanism of remimazolam on cognitive function in septic mice. **Methods** Fifty-four C57BL/6 mice were randomly divided into saline group (NS group), simple remimazolam group (RM group), sepsis model group [lipopolysaccharide (LPS) group] and sepsis groups with different doses of remimazolam injection (RM₁₀, RM₁₅ and RM₂₀ groups). The sepsis model was established by intraperitoneal injection of 1 mg/kg LPS; the RM group was injected intraperitoneally with 15 mg/kg remimazolam solution; the RM₁₀, RM₁₅ and RM₂₀ groups were respectively injected with 10, 15 and 20 mg/kg remimazolam solution 30 mins before LPS injection. The number of times the mice crossed the platform and the percentage of time they stayed in the first quadrant were recorded in the Morris water maze experiment; the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α)

(下转第 1730 页)

Terpinen-4-ol regulates SIRT1/Nrf2 signaling to inhibit vascular oxidative stress injury in chronic kidney disease

Tu Mengxin^{1,2}, Shang Xueyi^{1,2}, Zhang Yanqi², Chen Hongyu^{1,2}, Li Jinjin²,
He Li², Wen Bo², Shen Xiangchun², Zhang Yanyan²

(¹School of Pharmacy, ²Key Laboratory of Optimal Utilization
of Natural Medicine Resources, Guizhou Medical University, Guiyang 550025)

Abstract Objective To investigate the effect and signaling mechanism of terpinen-4-ol (T4O) on vascular oxidative stress injury in mice with chronic kidney disease (CKD). **Methods** A CKD mice model was prepared using high phosphorus diet combined with adenine, and the normal group was given an equal volume of saline gavage. The CKD model with low expression of SIRT1 in vivo was established by tail vein injection of lentiviral SIRT1 RNAi for the study of signaling mechanism. The administration groups were given T4O at low and high doses (10 mg/kg and 20 mg/kg) for 6 weeks by continuous gavage. Serum was collected to detect urea nitrogen (BUN) and creatinine (CRE) levels, and HE staining was used to observe the morphology of blood vessels in the thoracic aorta of mice expression. **Results** T4O reduced serum BUN and CRE levels in CKD mice to improve renal function, improved kidney and thoracic aortic vascular morphology, reduced vascular tissue MDA content, increased SOD content, and reduced ROS levels; T4O intervention promoted Nrf2 nuclear translocation and upregulated HO-1, NQO-1 and SIRT1 protein expression; LV-SIRT1 RNAi + T4O group was able to inhibit the effect of T4O on CKD-induced MDA and SOD levels, partially counteracting the effect of T4O in upregulating Nrf2 nuclear translocation and the protein expression levels of SIRT1, HO-1 and NQO-1. **Conclusion** T4O has a protective effect against oxidative stress injury in the thoracic aorta of CKD mice, and its molecular signaling mechanism may be related to the level of drug-regulated SIRT1/Nrf2 cascade signaling.

Key words terpinen-4-ol; chronic kidney disease; oxidative stress; sirtuin-1; nuclear factor E2 related factor 2; Nrf2/HO-1/NQO-1

(上接第 1723 页)

and interleukin-1 β (IL-1 β) in peripheral blood and hippocampus were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); the levels of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD) activity in hippocampus were measured by chemical colorimetric assay; and the pathological changes of neurons in CA1 area of hippocampus were observed by Hematoxylin-eosin (HE) staining. **Results** In the LPS group, the number of platform crossing times, the percentage of staying time in the first quadrant, GSH level and SOD activity significantly decreased, and TNF- α , IL-1 β and MDA levels significantly increased. In addition, the arrangement of neurons in CA1 area of hippocampus was disturbed; cytoplasmic staining was deepened; and the nucleus was solidly stained. Comparing RM₁₀, RM₁₅ and RM₂₀ groups with the LPS group, the number of platform crossing times, the staying time in the first quadrant, GSH level and SOD activity increased, and the levels of TNF- α , IL-1 β and MDA decreased. And the results of hippocampal staining showed a decrease in degenerated neuronal cells. When it came to the comparison in the groups with different doses of remimazolam injection, septic mice in the RM₂₀ group showed less improvement in cognitive dysfunction and inflammatory oxidative stress than the RM₁₀ and RM₁₅ groups. **Conclusion** Remimazolam has a protective effect on cognitive dysfunction in septic mice, and its mechanism may be related to its binding of translocator protein (TSPO) to inhibit macrophage polarization and thus reduce neuroinflammation and oxidative stress damage. It also reflects that dose of 10 mg/kg and 15 mg/kg has more significant protective effect than that of 20 mg/kg.

Key words remimazolam; sepsis; cognitive function