

松油烯-4-醇调节 SIRT1/Nrf2 信号抑制 慢性肾病血管氧化应激损伤

涂梦欣^{1,2}, 尚雪祎^{1,2}, 张彦琦², 陈虹雨^{1,2}, 李金锦², 何丽², 文波², 沈祥春², 张彦燕²

摘要 目的 探讨松油烯-4-醇(T4O)对慢性肾脏疾病(CKD)模型小鼠血管氧化应激损伤的作用及信号机制。方法 采用高磷饲料联合腺嘌呤制备CKD小鼠模型,正常对照组给予等体积生理盐水灌胃。通过尾静脉注射慢病毒SIRT1 RNAi,建立SIRT1体内低表达的CKD小鼠模型用于信号机制研究。给药组以T4O低、高剂量(10 mg/kg和20 mg/kg)连续灌胃给药6周。收集小鼠血清检测尿素氮(BUN)和肌酐(CRE)水平,采用HE染色观察小鼠胸主动脉和肾脏组织形态,试剂盒检测血管组织丙二醛(MDA)及超氧化物歧化酶(SOD)含量,免疫荧光检测血管组织ROS水平;Western blot法检测Nrf2、HO-1、NQO-1及SIRT1的表达。结果 T4O可降低CKD小鼠血清BUN和CRE水平,改善肾脏病理损伤和主动脉血管形态结构,降低血管组织MDA含量,增加SOD含量,降低ROS水平;T4O干预能够促进Nrf2核易位及上调HO-1、NQO-1以及SIRT1的蛋白表达。分子机制研究表明,LV-SIRT1 RNAi+T4O+CKD组能够抑制T4O对CKD诱导的MDA和SOD含量的影响,部分抵消T4O上调Nrf2核易位以及SIRT1、HO-1、NQO-1的蛋白表达水平的作用。结论 T4O对CKD小鼠胸主动脉氧化应激损伤具有保护作用,其分子信号机制可能与调节SIRT1/Nrf2级联信号有关。

关键词 松油烯-4-醇;慢性肾脏疾病;氧化应激;沉默调节蛋白1;核转录因子E2相关因子2;Nrf2/HO-1/NQO-1

中图分类号 R 962.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)10-1724-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.10.020

慢性肾脏疾病(chronic kidney disease,CKD)为全球性公共卫生问题,心血管并发症是CKD患者致

死、致残的主要危险因素之一^[1]。氧化应激损伤为CKD心血管并发症的基础病理学过程,表现为靶组织活性氧自由基(reactive oxygenic species,ROS)积聚及氧化/抗氧化系统失衡,核转录因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2,Nrf2)激活受损^[2-3],进一步介导其下游抗氧化酶-血红素加氧酶1(heme oxygenase-1,HO-1)和NADPH醌氧化还原酶1(NADPH quinone oxidoreductase-1,NQO-1)的表达抑制,故Nrf2/HO-1/NQO-1是抗氧化损伤重要的防御分子信号^[4-5]。NAD⁺依赖性脱乙酰基酶沉默调节蛋白1(sirtuin-1,SIRT1)在氧化应激、细胞代谢和基因转录等过程中发挥重要作用,研究^[6]表明SIRT1可调节Nrf2的表达抑制氧化应激。

松油烯-4-醇(terpinen-4-ol,T4O)是一种单萜类化合物,具有抗炎、抗菌和抗肿瘤等药理活性^[7-9]。课题组前期发现T4O具有良好的血管药理活性^[10-11],但对CKD血管氧化应激损伤的作用尚不明确。因此,该研究拟探讨T4O对CKD小鼠血管氧化应激损伤的作用及分子信号机制,为临床防治CKD血管并发症提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 56只7周龄SPF级C57BL/6J雄性小鼠,体质量16~18g,所有操作均严格遵循实验动物使用规范和要求。实验动物在标准SPF级动物房中进行饲养,小鼠自由进食进水,适应性喂养1周后进行实验。

1.1.2 药品与主要试剂 腺嘌呤购自美国Sigma公司;T4O,质量分数≥98%,购自山东西亚化学工业有限公司;丙二醛(malondialdehyde,MDA)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)活性检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;β-actin、Nrf2抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司;NQO-1抗体购自美国Abcam公司;HO-1、SIRT1抗体购自美国Cell Sig-

2023-04-29 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82060775、82260827);贵州省科技支撑计划(编号[2020]4Y093);贵州省科学技术基金(编号[2020]1Z069)

作者单位:贵州医科大学¹药学院、²天然药物资源优效利用重点实验室,贵阳 550025

作者简介:涂梦欣,女,硕士研究生;

张彦燕,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:chi-nazy201@163.com;

沈祥春,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:shenxiangchun@126.com

naling Technology 公司; 核蛋白和浆蛋白提取试剂盒购自上海贝博生物科技有限公司; ROS 染液和抗荧光淬灭封片剂购自湖北赛维尔生物科技有限公司; SIRT1 RNAi 和携带绿色荧光蛋白 (green fluorescence protein, GFP) 的阴性对照基因 (LV-NC) 的慢病毒, 由上海吉玛制药有限公司设计合成, LV-NC 序列为 5'-TTCTCCGAAACGTGTACAGT-3', LV-SIRT1 RNAi 序列为 5'-GCACCGATCTCGAACAATTC-3'。

1.2 方法

1.2.1 CKD 小鼠模型的建立与药物干预 采用健康 C57BL/6J 雄性小鼠, 适应性喂养 1 周后, 按随机数字表法分为正常对照 (Control) 组和 CKD 组。依据 Huang et al^[12] 的实验方法, Control 组小鼠给予正常饲料, 并给予等量生理盐水灌胃; CKD 组小鼠给予 1.2% 高磷饲料, 并联合 0.2% 的腺嘌呤灌胃 4 周建立 CKD 动物模型。通过检测 CKD 组小鼠血清尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 和肌酐 (creatinine, CRE) 等肾功能相关指标^[11], 确定 CKD 动物模型建立成功, 应用于后续研究。

CKD 小鼠造模成功后, 实验分为 Control 组、CKD 组 (CKD, 0.2% 腺嘌呤)、T4O 低剂量组 (T4O-L, T4O 10 mg/kg + 0.2% 腺嘌呤) 和 T4O 高剂量组 (T4O-H, T4O 20 mg/kg + 0.2% 腺嘌呤), 每组 8 只。给药组取 CKD 小鼠采用不同剂量的 T4O 灌胃 6 周, 其余组给予等量生理盐水灌胃, 实验结束后每组随机选取 6 个样本进行实验。

1.2.2 基于 SIRT1 信号分析 T4O 对 CKD 小鼠血管氧化应激的作用机制 ① 构建 SIRT1 基因体内慢病毒转染模型: 以 5×10^7 U 的滴度尾静脉注射含 SIRT1 敲低基因 (LV-SIRT1 RNAi) 或携带 GFP 的阴性对照基因 (LV-NC) 的慢病毒, 分别通过尾静脉注射 LV-SIRT1 RNAi 和 LV-NC 2 周后, 小鼠血管组织显著表达绿色荧光 GFP^[11], 取各组小鼠血管组织进行 Western blot 验证 SIRT1 基因体内慢病毒是否转染成功; ② 研究 T4O 抑制 CKD 小鼠血管氧化应激的分子机制: 实验分为 Control 组、CKD 组 (CKD, 0.2% 腺嘌呤)、LV-SIRT1 RNAi + CKD 组 (LV-SIRT1 RNAi, LV-SIRT1 RNAi + 0.2% 腺嘌呤)、T4O-H + CKD 组 (T4O-H, T4O 20 mg/kg + 0.2% 腺嘌呤) 和 LV-SIRT1 RNAi + T4O-H + CKD 组 (LV-SIRT1 RNAi + T4O-H, LV-SIRT1 RNAi + T4O 20 mg/kg + 0.2% 腺嘌呤), 每组 8 只。给药组采用 20 mg/kg T4O 灌胃 6 周, 其余组给予等量生理盐水灌胃。

1.2.3 肾功能指标检测 药物干预 6 周后, 禁食

12 h, 小鼠以腹腔注射 150 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉诱导死亡, 各组小鼠眼球取血, 血样常温静置 2 h, 3 000 r/min 离心 15 min, 收集血清, 采用全自动生化分析仪检测学 BUN 和 CRE 含量。

1.2.4 HE 染色观察胸主动脉血管和肾脏组织形态 采用 HE 染色分析各实验组胸主动脉血管和肾脏组织形态, 依次经石蜡包埋、切片、脱蜡、脱水、苏木精染色、1% 盐酸乙醇分化、伊红染色、脱水、透明及中性树胶封片, 显微镜下采集图像观察组织形态变化。

1.2.5 血管组织 MDA 含量和 SOD 活性测定 主动脉血管组织取出后用生理盐水冲洗干净, 滤纸擦干, 取适量组织根据试剂盒说明书操作步骤测定组织 SOD 活性和 MDA 含量。

1.2.6 免疫荧光检测胸主动脉 ROS 表达水平 冰冻切片室温控干水分, 组化笔画圈, 圈内滴加 ROS 染液, 37 °C 避光孵育 30 min; 玻片用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 抗荧光淬灭剂封片; 荧光显微镜下采集图像。

1.2.7 Western blot 检测相关蛋白表达水平 取各组血管加入适量裂解液提取总蛋白或组织核蛋白与浆蛋白; 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 采用 SDS-PAGE 凝胶电泳对蛋白进行等量分离, 电泳后将蛋白转移到 PVDF 膜上; 5% 牛血清白蛋白室温封闭 2 h, 4 °C 与相应一抗孵育过夜; 将膜与 HRP 缀合的二抗室温孵育 2 h; 将膜与 ECL 显色液孵育适当时间并置于暗室显影。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 T4O 对 CKD 小鼠肾功能的影响 与 Control 组比较, CKD 组小鼠血清 BUN 和 CRE 水平均显著升高 (均 *P* < 0.01); 与 CKD 组比较, T4O 高、低剂量组小鼠血清中 BUN 和 CRE 水平均呈不同程度的降低 (*P* < 0.01、*P* < 0.05)。结果提示 T4O 对高磷联合腺嘌呤致小鼠肾功能损害具有一定的保护作用。见表 1。

2.2 T4O 对 CKD 小鼠肾脏病理情况的影响 肾脏病理 HE 染色结果见图 1, Control 组肾小球及肾小管结构完整清晰; CKD 组小鼠肾脏肾小球部分萎缩, 肾小囊轻微扩张 (红色箭头), 可见较大范围肾

表 1 各组小鼠肾功能情况 ($\bar{x} \pm s$ $n=6$)

组别	BUN(mg/dl)	CRE(μ mol/L)
Control	24.162 \pm 2.235	29.23 \pm 3.18
CKD	55.194 \pm 6.817**	93.92 \pm 17.35**
T4O-L	45.261 \pm 4.184#	58.72 \pm 6.54#
T4O-H	31.616 \pm 4.371##	38.37 \pm 5.44##

与 Control 组比较: ** $P < 0.01$; 与 CKD 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

小管损伤、数量减少(黄色箭头),肾间质小灶慢性炎症细胞浸润(绿色箭头);T4O 干预后肾小球、肾小管病变程度有所改善。

2.3 T4O 对 CKD 小鼠胸主动脉形态的影响 HE 染色结果显示 CKD 组小鼠胸主动脉血管组织内膜粗糙、增厚、有隆起,中膜弹力纤维排列紊乱,中膜呈病理性增厚的典型特征。与 CKD 组比较,高、低剂量的 T4O 给药后对血管组织形态均有不同程度的改善,高剂量组作用更明显。见图 2。

2.4 T4O 对 CKD 小鼠胸主动脉 MDA 含量及 SOD 活性的影响 与 Control 组比较,CKD 组小鼠胸主动脉 MDA 相对含量升高,SOD 相对含量降低(均 $P < 0.01$);与 CKD 组比较,T4O 高、低剂量组 MDA 水平降低,SOD 含量升高($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)。见图 3。

2.5 T4O 对 CKD 小鼠胸主动脉 ROS 水平的影响 组织免疫荧光染色结果见图 4,与 Control 组比较,CKD 组小鼠胸主动脉 ROS 产生和堆积增加,可见红色荧光信号度增强($P < 0.01$);与 CKD 组比较,T4O 高、低剂量组均可抑制血管组织 ROS 水平($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)。

2.6 T4O 对 CKD 小鼠胸主动脉 Nrf2/HO-1/NQO-1 信号轴及 SIRT1 蛋白表达的影响 血管组织经核、浆蛋白分离,结果显示与 Control 组比较,CKD 组 Nrf2 胞浆、胞核表达水平均降低(均 $P < 0.01$),T4O 高、低剂量处理后上调胞核 Nrf2 表达水

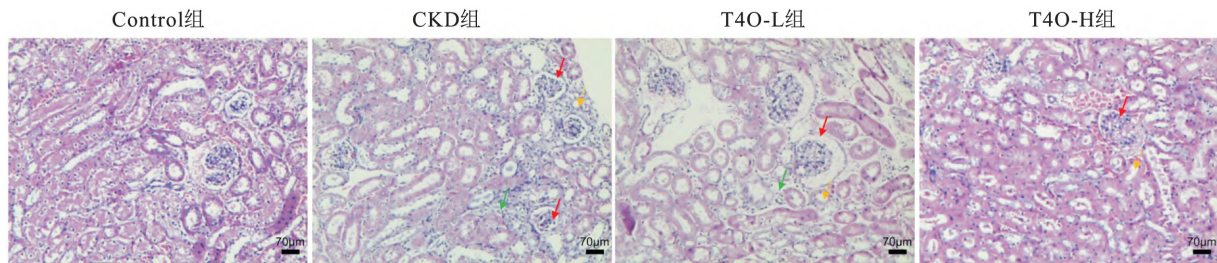


图 1 各组小鼠肾脏 HE 染色 $\times 100$

红色箭头示肾脏肾小球部分萎缩,肾小囊轻微扩张;黄色箭头示较大范围肾小管损伤,数量减少;绿色箭头示肾间质小灶慢性炎症细胞浸润

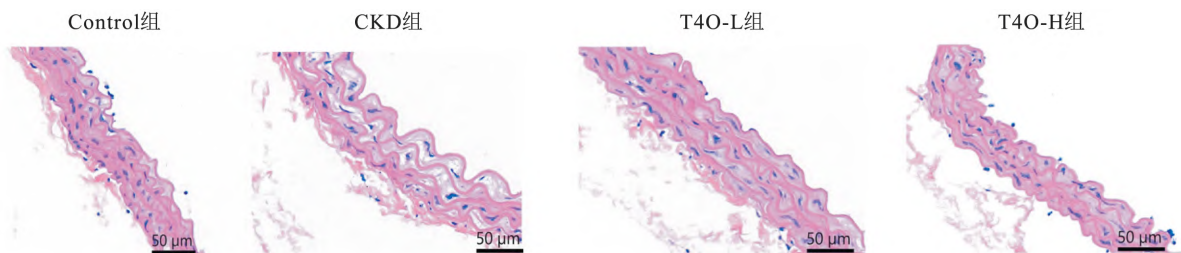


图 2 各组小鼠胸主动脉 HE 染色 $\times 350$

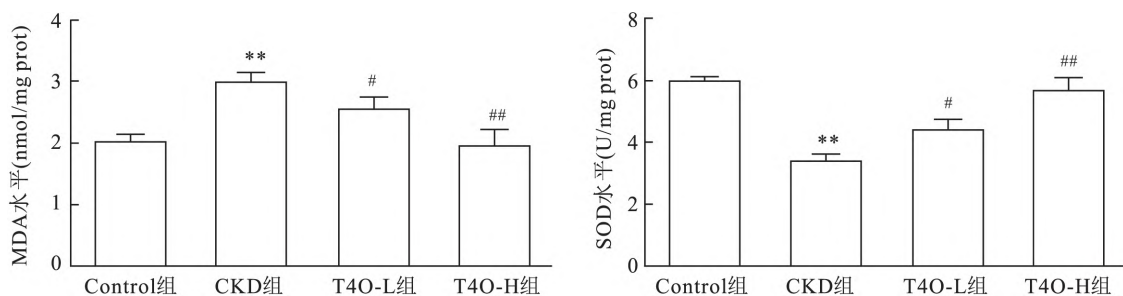


图 3 各组小鼠胸主动脉 MDA 及 SOD 水平比较

与 Control 组比较: ** $P < 0.01$; 与 CKD 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

平($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$) ,而对胞浆 Nrf2 无影响; 与 Control 组比较 ,CKD 组 SIRT1、HO-1、NQO-1 蛋白表达水平均降低(均 $P < 0.01$) ,T4O 不同剂量处理后能够上调 SIRT1 及 Nrf2 下游信号 HO-1、NQO-1 的表达水平(均 $P < 0.05$) 。见图 5。

2.7 敲低 SIRT1 及 T4O 对 CKD 小鼠血管氧化应激损伤的影响 图 6A 结果显示 ,与 LV-NC 组比较 ,

LV-SIRT1 RNAi 组 SIRT1 蛋白表达下调 ($P < 0.01$) ,敲低效率为 50% ,证明慢病毒转染实现 SIRT1 的敲低表达。图 6B 结果显示 ,与 CKD 组比较 ,LV-SIRT1 RNAi + CKD 组 MDA 水平进一步上调 ($P < 0.01$) ,SOD 活性进一步受到抑制($P < 0.05$) 。图 6C、D 结果显示 ,与 CKD 组比较 ,LV-SIRT1 RNAi + CKD 组胞浆和胞核内 Nrf2 表达水平均下调(均 P

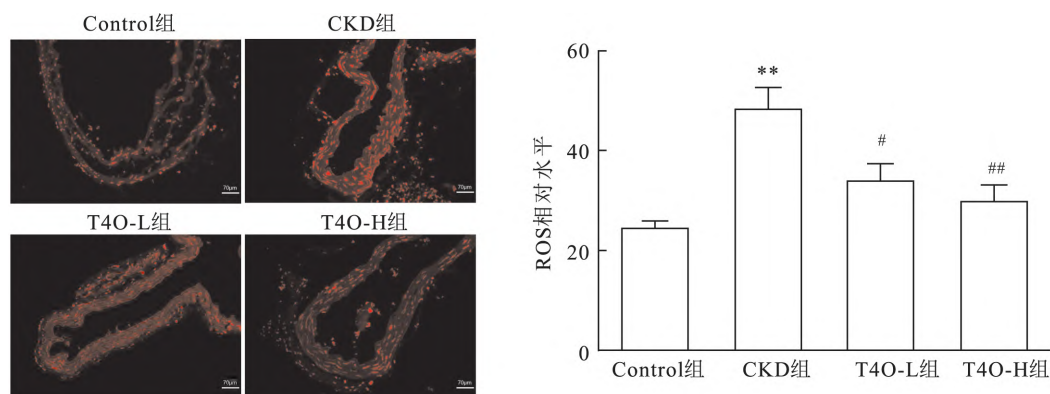


图 4 各组小鼠胸主动脉 ROS 水平 $\times 100$
与 Control 组比较: ** $P < 0.01$; 与 CKD 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

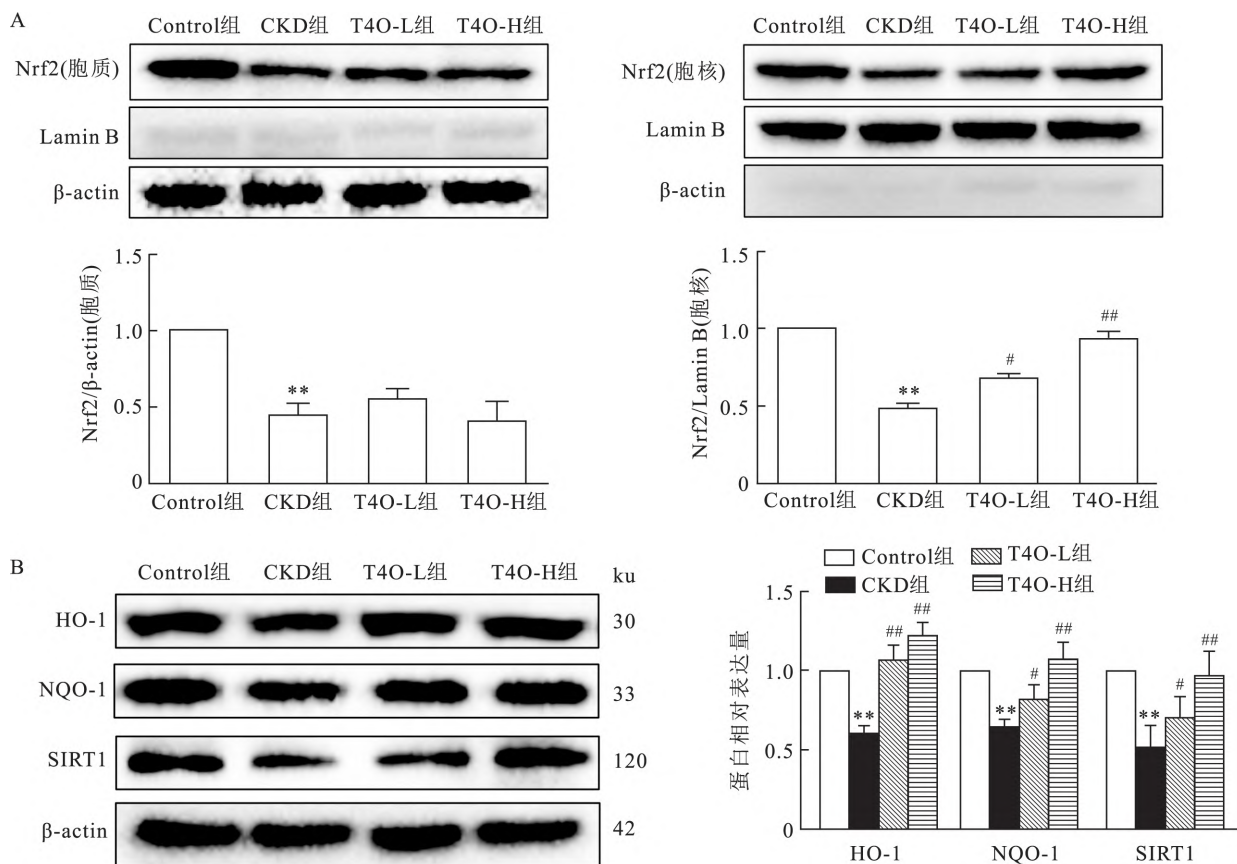


图 5 各组小鼠胸主动脉 Nrf2/HO-1/NQO-1 信号轴及 SIRT1 蛋白表达情况

A: Western blot 检测 Nrf2 胞质和胞核内蛋白表达量; B: Western blot 检测 HO-1、NQO-1 和 SIRT1 蛋白表达量; 与 Control 组比较: ** $P < 0.01$; 与 CKD 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

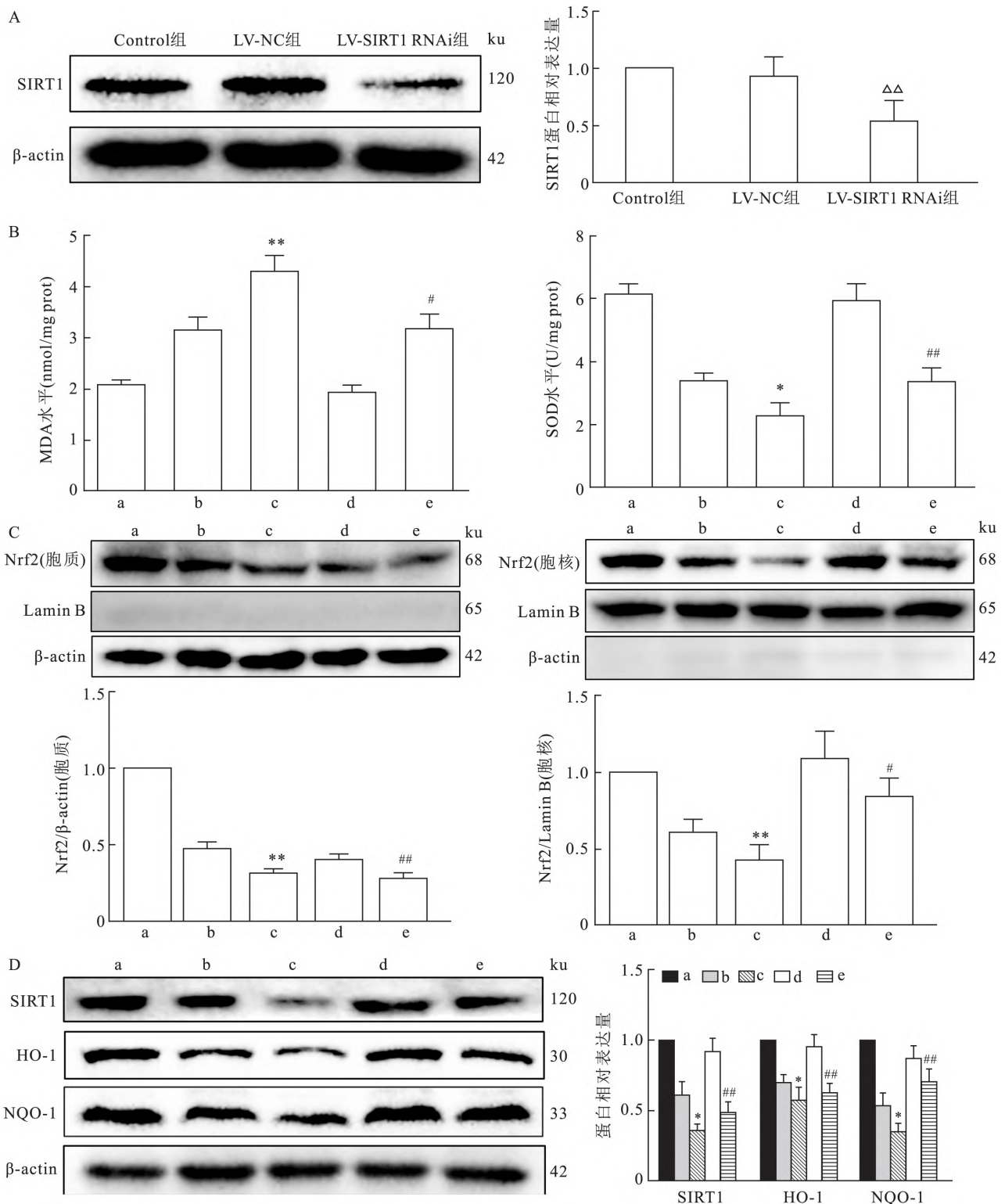


图6 敲低 SIRT1 及 T40 对 CKD 小鼠血管氧化应激损伤的影响

A: Westernblot 检测 SIRT1 蛋白表达量,与 LV-NC 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; B: 试剂盒检测血管组织中 MDA 和 SOD 水平; C: Westernblot 检测胞核和胞浆内 Nrf2 蛋白表达量; D: Westernblot 检测 SIRT1、HO-1 和 NQO-1 蛋白表达量; a: Control 组; b: CKD 组; c: LV-SIRT1 RNAi + CKD 组; d: T40-H + CKD 组; e: LV-SIRT1 RNAi + T40-H + CKD 组; 与 CKD 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 T40-H + CKD 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

< 0.01),同时 SIRT1、HO-1、NQO-1 蛋白表达亦下调(均 $P < 0.05$)。与 T40-H + CKD 组比较, LV-

SIRT1 RNAi + T40-H + CKD 组血管组织 SOD 水平、胞核内 Nrf2、SIRT1、HO-1 及 NQO-1 的蛋白表达水

平均有所降低。

3 讨论

心血管疾病是 CKD 患者病死率升高的主要原因之一,血管中 ROS 的过量堆积引起组织器官氧化应激失衡,参与 CKD 心血管并发症的发生、发展过程始终,严重影响 CKD 的转归与预后^[5,13]。因此,抑制血管氧化应激损伤是防治 CKD 及其并发症的重要策略。Nrf2 作为经典抗氧化关键转录因子,生理状态下其与 Keap-1 结合定位于细胞浆中,当氧化还原失衡时 Nrf2 迅速与 Keap-1 解离转移到细胞核,并与抗氧化反应元件结合,进而促进其下游抗氧化酶和 II 相解毒酶 HO-1 及 NQO-1 的表达,发挥抗氧化作用^[14]。SIRT1 是研究最广泛的组蛋白脱乙酰基转移酶,研究^[15]显示,SIRT1 可作为 Nrf2 的上游调节因子,增强 Nrf2 的核易位发挥抗氧化作用。以上研究提示,血管氧化应激与 CKD 发生发展密切相关,SIRT1-Nrf2/HO-1/NQO-1 信号轴可作为调节抗氧化应激体系的重要分子信号,并有可能成为新的药物靶点。

本研究通过建立 CKD 小鼠模型,以血管氧化应激损伤为研究切入点,探讨 T4O 对 CKD 小鼠胸主动脉氧化应激损伤的作用及机制。本研究表明 T4O 能够改善 CKD 小鼠肾损伤和胸主动脉形态结构,减少血管 MDA 水平和 ROS 的聚集,增加 SOD 水平,上调 Nrf2 在胞核的表达,激活 Nrf2-HO-1/NQO-1 信号轴的水平,证实其抑制 CKD 血管氧化应激损伤的确切药理学活性。为进一步探讨 SIRT1 信号调节 Nrf2/HO-1/NQO-1 途径的潜在分子信号,本研究采用尾静脉注射慢病毒实现 SIRT1 在血管组织中的沉默进行研究。结果表明,敲低 SIRT1 的表达能够加剧 CKD 小鼠血管组织氧化应激损伤,同时抑制 Nrf2 核易位及下游信号 HO-1 和 NQO-1 的表达,表明 SIRT1 作为上游信号调节 Nrf2/HO-1/NQO-1 信号轴介导 CKD 血管氧化应激损伤。研究证实敲低 SIRT1 表达能够部分阻断 T4O 对 Nrf2/HO-1/NQO-1 信号轴的激活,抑制其对血管氧化应激损伤的作用,提示 T4O 抑制血管氧化应激损伤可能与其调节 SIRT1 的表达,上调 Nrf2/HO-1/NQO-1 信号轴有关,但其精密调节机制有待深入研究。

综上所述,本研究证实 T4O 能够抑制 CKD 小鼠血管氧化应激损伤,其信号机制可能与 T4O 调节 SIRT1 的表达,促进 Nrf2 核易位,激活 Nrf2/HO-1/NQO-1 信号通路有关。本研究为 CKD 血管并发症

的临床防治提供了新思路,但其精密分子信号调控机制还有待深入研究。

参考文献

- [1] Düsing P, Zietzer A, Goody P R, et al. Vascular pathologies in chronic kidney disease: pathophysiological mechanisms and novel therapeutic approaches[J]. *J Mol Med (Berl)* 2021 99(3): 335-48.
- [2] 牟俊杰,冯静,张文松,等.淫羊藿苷介导 Nrf2/HO-1 信号通路减轻大鼠肾缺血再灌注损伤和氧化应激[J]. *安徽医科大学学报* 2021 56(3): 449-53 457.
- [3] Fang Y, Xing C, Wang X, et al. Activation of the ROS/HO-1/NQO1 signaling pathway contributes to the copper-induced oxidative stress and autophagy in duck renal tubular epithelial cells[J]. *Sci Total Environ* 2021 757: 143753.
- [4] Yao H, Sun J, Wei J, et al. Kaempferol protects blood vessels from damage induced by oxidative stress and inflammation in association with the Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. *Front Pharmacol* 2020 11: 1118.
- [5] He F, Ru X L, Wen T. NRF2, a transcription factor for stress response and beyond[J]. *Int J Mol Sci* 2020 21(13): 4777.
- [6] Mc Dougald D S, Dine K E, Zezulin A U, et al. SIRT1 and NRF2 gene transfer mediate distinct neuroprotective effects upon retinal ganglion cell survival and function in experimental optic neuritis[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018 59(3): 1212-20.
- [7] Banjerpongchai R, Khaw-On P. Terpinen-4-ol induces autophagic and apoptotic cell death in human leukemic HL-60 cells[J]. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013 14(12): 7537-42.
- [8] Ning J, Xu L, Zhao Q, et al. The protective effects of terpinen-4-ol on LPS-induced acute lung injury via activating PPAR- γ [J]. *Inflammation* 2018 41(6): 2012-7.
- [9] Chen D, Wang J Y, Sullivan D A, et al. Effects of terpinen-4-ol on meibomian gland epithelial cells *in vitro*[J]. *Cornea* 2020 39(12): 1541-6.
- [10] 何丽,黄梅,杨彩琴,等.松油烯-4-醇干预 KLF4 信号改善高糖诱导 VSMCs 氧化应激损伤的实验研究[J]. *中国药理学通报* 2020 36(6): 839-44.
- [11] Zhang Y Y, He L, Tu M X, et al. The ameliorative effect of terpinen-4-ol on ER stress-induced vascular calcification depends on SIRT1-mediated regulation of PERK acetylation[J]. *Pharmacol Res* 2021 170: 105629.
- [12] Huang L H, Liu H, Chen J Y, et al. Seaweed porphyra yezoensis polysaccharides with different molecular weights inhibit hydroxyapatite damage and osteoblast differentiation of A7R5 cells[J]. *Food Funct* 2020 11(4): 3393-409.
- [13] Duni A, Liakopoulos V, Roumeliotis S, et al. Oxidative stress in the pathogenesis and evolution of chronic kidney disease: untangling ariadne's thread[J]. *Int J Mol Sci* 2019 20(15): 3711-31.
- [14] Zhang X, Yu Y, Lei H, et al. The Nrf-2/HO-1 signaling axis: a ray of hope in cardiovascular diseases[J]. *Cardiol Res Pract* 2020 2020: 1-9.
- [15] Zhang B, Zhai M E, Li B Y, et al. Honokiol ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in type 1 diabetic rats by reducing oxidative stress and apoptosis through activating the SIRT1-Nrf2 Signaling pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev* 2018 2018: 3159801.

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