

咖啡因经 Nrf2 通路调节支气管肺发育不良 新生大鼠肺氧化应激损伤

王欣^{1,2} 张敏^{2,3} 丁圣刚^{1,2}

摘要 目的 探讨咖啡因对高氧诱导的新生 SD 大鼠支气管肺发育不良(BPD)氧化应激损伤的保护作用及相关机制。方法 幼鼠分为空气对照组(N组)、咖啡因空气对照组(NC组)、模型组(H组)、咖啡因干预组(HC组)。采用高氧诱导法建立 BPD 模型。各组于第 3、7、14、21 天分别取 6 只大鼠收集血液和肺组织标本。各组按 4 个日龄分为 4 个亚组 A 组的 21 天亚组测量体质量。各组右肺上叶测定湿干重比值(W/D);右肺下叶石蜡包埋后切片进行 HE 染色观察形态学改变并行辐射状肺泡计数(RAC);检测血、肺组织丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)含量评估幼鼠机体氧化和抗氧化稳态失衡情况;RT-qPCR 检测肺组织转录因子 NF-E2 相关因子 2(Nrf2) mRNA 相对表达量。结果 ① H 组第 3 天后渐出现活动度下降,第 14 天后体质量增长呈上升趋势;② H 组 W/D 值第 14 天达高峰,HC 组变化趋势与 H 组相近;③ H 组肺组织结构不规则,RAC 值第 7 天达高峰后显著下降,HC 组和 H 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);④ H 组 MDA 值第 7 天时呈上升趋势,第 14 天后渐下降,SOD 活性第 7 天时明显降低,H 组和 HC 组于第 14、21 天比较差异有统计学意义($P < 0.05$);⑤ H 组 Nrf2 mRNA 在第 7 天时表达显著增强,第 14 天时趋于平稳,H 组和 HC 组于第 3、7、14 天比较差异有统计学意义($P < 0.05$);⑥ Nrf2 mRNA 相对表达量与 MDA 呈正相关,与 SOD 呈负相关。结论 咖啡因可经 Nrf2 通路调节氧化应激反应,减轻高氧诱导的新生大鼠 BPD 肺氧化应激损伤。

关键词 支气管肺发育不良;咖啡因;高氧肺损伤;氧化应激中图分类号 R 722.19

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)10-1731-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.10.021

2023-05-29 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:9021364204);安徽省重点研究和开发计划项目(编号:201904a07020042)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院¹ 儿科、³ 新生儿科,合肥 230022

² 首都医科大学附属北京儿童医院,国家呼吸系统疾病临床研究中心,北京 100045

作者简介:王欣,女,硕士研究生;

张敏,女,副主任医师,责任作者,E-mail: 18326099877@163.com;

丁圣刚,男,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: dingsg@ahmu.edu.cn

围产技术的进步使得极早早产儿存活率显著提高,随之而来是支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)发病率的明显上升^[1]。多项多中心研究^[1-2]表明,BPD 患儿病死率、并发症发生率、远期神经系统不良预后发生率、健康资源消耗率等远高于一般早产儿。因此深入了解 BPD 发病机制,指导临床有效救治至关重要。研究^[3]证实高氧暴露引起机体氧化应激反应为 BPD 肺损伤关键环节。转录因子 NF-E2 相关因子 2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 是抗氧化调控的关键因子。在氧化应激源作用下,Nrf2 可启动抗氧化反应元件,从而介导肺组织氧化还原稳态调控^[4]。咖啡因为甲基黄嘌呤类药物,具有抗氧化应激活性^[5],其对 BPD 患儿肺保护性作用已被多项临床研究证实^[6-7]。然而咖啡因肺保护具体机制及其抗氧化应激活性相关分子通路至今未明。该研究拟通过高氧诱导建立新生 SD 大鼠 BPD 模型,探讨咖啡因干预后 Nrf2 通路变化,深入研究其肺保护作用机制,以期 BPD 临床诊疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物 15 只健康 6~7 周清洁级 SD 大鼠(雌性 10 只,雄性 5 只),由安徽医科大学实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(皖)2017-001。按照 1:2 雄雌比例进行交配繁殖,饲养条件为室温,待产子后新生 SD 大鼠作为实验对象。

1.2 试剂与仪器 丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒购自兰杰柯(Biosharp)科技有限公司,HE 染色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。测氧仪购自杭州艾普仪器设备有限公司,氧气罐购自临沂永安钢瓶有限公司,石蜡切片机、徕卡正置显微镜购自德国莱卡仪器有限公司,酶标仪购自美国 Perkin Elmer 公司,PCR 仪购自美国赛默飞世尔科技有限公司。

1.3 动物模型建立与动物分组 选取状态良好的新生幼鼠,随机分为 4 组,空气对照组(N组:空气 +

生理盐水)、咖啡因空气对照组(NC组:空气+咖啡因)、模型组(H组:高氧模型+生理盐水)、咖啡因干预组(HC组:高氧模型+咖啡因),每组24只,各组按日龄时间点再随机分为4个亚组,分别为第3、7、14、21天。N组和NC组氧气条件为空气浓度即空气组,置于室内常压空气中喂养(氧气浓度21%)。H组和HC组为高氧组,分娩后6h内置于相同条件室内常压高氧氧箱中喂养,调整氧气流量,保持氧箱氧浓度80%,测氧仪维持氧箱浓度恒定,钠石灰吸收CO₂,无水氯化钙、干燥硅胶吸水去湿,温度22~26℃,湿度40%~60%。高氧组母鼠每24h移出氧箱2h。H组和HC组在14d后转至室内常压空气中继续喂养至21d。

1.4 标本采集 NC组和HC组于新生大鼠第1天腹腔注射咖啡因(20 mg/kg,枸橼酸咖啡因)每日1次持续至21d,N组和H组注射等量生理盐水。各组新生大鼠分别于第3、7、14、21天,每组各取6只鼠处死取材,收集血液标本和肺组织标本。4组的21d亚组测量体质量。

每组幼鼠的4个亚组各取6只腹腔注射10%水合氯醛(0.33 ml/100 g),麻醉后经眼眶取血,血液标本置于离心管,迅速打开胸腔,充分暴露胸腺和心肺组织,结扎主支气管,剪开右心耳,挤压右心耳流出血液,仔细剥离其肺组织,剔除心脏及大血管。血液标本离心后分离,放入液氮快速冷却后置于-80℃冰箱保存。右肺上叶用于测量肺湿干重比值(wet/dry, W/D),右肺下叶固定于4%多聚甲醛中,余右肺和左肺置于冻存管,放入液氮快速冷却后-80℃冰箱保存。

1.5 W/D值 取新鲜右肺上叶称重记为湿重,电热恒温干燥箱80℃持续干燥48h后称重记为干重,二者比值为W/D值。

1.6 HE染色 取4%多聚甲醛固定的右肺下叶,脱水,石蜡包埋,行肺组织切片,切片常规脱蜡、复水,进行HE染色,于光学显微镜下观察每组肺组织各时间点的形态改变,并拍摄组织图片。

1.7 肺组织形态学分析 每组的4个亚组分别随机抽取6张HE染色的肺组织切片,置于100倍光学显微镜下观察,每张切片随机取5个视野,从呼吸性细支气管的中心部位至最近的纤维隔或胸膜做垂直连线,即辐射状肺泡计数(radial alveolar counts, RAC),计算RAC平均值,作为肺泡化程度的指标。

1.8 MDA含量测定 采用MDA检测试剂盒,通过比色法,使用酶标仪在532 nm测定吸光度,血液

标本通过测定吸光度获得MDA含量,冰浴条件下匀浆后的肺组织标本通过BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白含量来计算肺组织内MDA含量。

1.9 SOD活性测定 采用总SOD活性检测试剂盒,通过比色法,使用酶标仪在560 nm测定吸光度,冰浴条件下匀浆后的肺组织标本通过BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白量来计算SOD酶活力。

1.10 RT-qPCR测定Nrf2 mRNA表达水平 从肺组织标本提取RNA,配制DNA消化体系将RNA中基因组DNA消化,配制RT反应液进行反转录反应,引物设计完成,配制PCR反应液,RT-qPCR反应后分析产物。采用相对定量法,以 β -actin基因作为内参照。

1.11 统计学处理 应用SPSS 25.0软件对数据进行统计学分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,Nrf2的表达结果以内参基因 β -actin作为参照;两组间比较采用独立样本 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较用LSD- t 检验;组间相关分析采用Pearson相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况比较 N组、NC组幼鼠体质量呈线性增长,活动度良好,生长发育正常。H组幼鼠生后3d内觅食正常,其后渐出现自主活动减少,该组幼鼠体质量增长速率较N组、NC组明显下降,第14天后幼鼠体质量增长呈追赶上升趋势。HC组幼鼠生后7d内体质量增长缓慢,其生长速率与H组相近,之后实现追赶生长,幼鼠活动度增加。各组幼鼠体质量变化见图1。

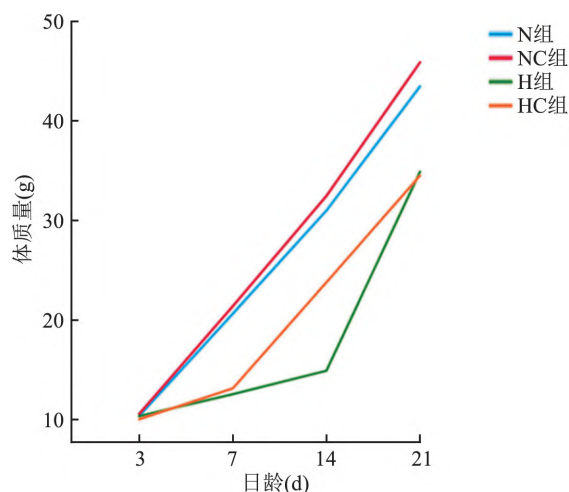


图1 不同日龄各组体质量

2.2 W/D值比较 W/D值反映肺水肿程度,N组

与 NC 组的各日龄亚组 W/D 值间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 各组日龄 3 d 亚组幼鼠 W/D 值组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 N 组和 NC 组比较, H 组 W/D 值第 7 天时明显升高, 第 14 天达高峰, 第 21 天呈下降趋势, 组间差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。HC 组 W/D 值变化趋势与 H 组相近, 但上升幅度较 H 组减慢, 第 7 天时两组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 第 14 天时组间差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 第 21 天时明显降低 ($P < 0.001$)。HC 组第 14 天时与 N 组、NC 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 第 21 天时与 N 组、NC 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2。

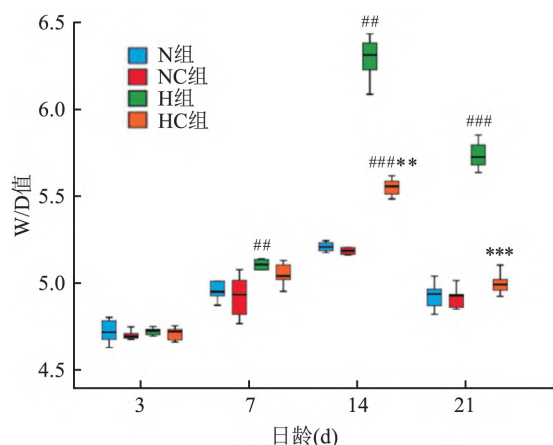


图2 不同日龄各组 W/D 值

与 N、NC 组比较: # $P < 0.01$, ## $P < 0.001$; 与 H 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.3 肺组织形态学改变 第 3 天时 N 组、H 组、HC 组间无明显差异, 肺组织切片可见肺泡腔形态规则, 肺泡大小均匀, 结构规整, 肺泡壁较光滑, 未见炎症

渗出。第 7 天时, 与 N 组、HC 组比较, H 组肺间质见轻微渗出, 肺泡结构总体规整; N 组肺泡形态较第 3 天无明显变化, HC 组可见有肺泡腔略扩大, 肺泡结构较第 3 天无明显变化。第 14 天时, H 组肺组织结构紊乱, 肺泡间隙变薄, 肺泡数量减少, 结构简化; N 组肺泡结构形态较第 7 天无明显差异, 肺泡数量可见增多; HC 组肺泡结构形态清楚, 肺泡数目较 H 组增多, 肺间质未见明显增厚。第 21 天时, H 组肺组织发育情况仍差于 N 组、HC 组, 其肺泡大小不均匀, 肺泡间隔轻微增厚; HC 组较 H 组肺泡发育不规则程度轻, 未见明显的炎症渗出; N 组肺泡数量随着时间延长逐渐增多。各时间点 NC 组和 N 组未见明显差异。见图 3。

RAC 代表终末性呼吸单位包含的肺泡数目, 反映肺泡化的程度。N 组和 NC 组 RAC 随日龄增加而渐增。日龄 3 d 时 4 组 RAC 值组间比较差异无统计学意义。H 组在日龄 7 d 时 RAC 达峰值, 其后明显降低, 第 21 天时降幅减缓。咖啡因干预后, HC 组 RAC 值呈缓慢上升趋势, 较 N 组、NC 组仍明显减少 ($P < 0.001$), 第 14、21 天与 H 组比较组间差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。见表 1。

2.4 BPD 幼鼠氧化应激损伤情况 血及肺组织 MDA、SOD 用于反映 BPD 幼鼠机体氧化应激情况。H 组肺 MDA 自第 3 天起逐渐上升, 第 14 天达高峰, 其后呈下降趋势, 各日龄段与 N 组、NC 组比较组间差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。咖啡因干预后, HC 组肺组织 MDA 上升幅度较 H 组明显减缓, 第 14 天达高峰后逐渐降低, 第 14、21 天时与 H 组亚组比较组间差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。见图 4。

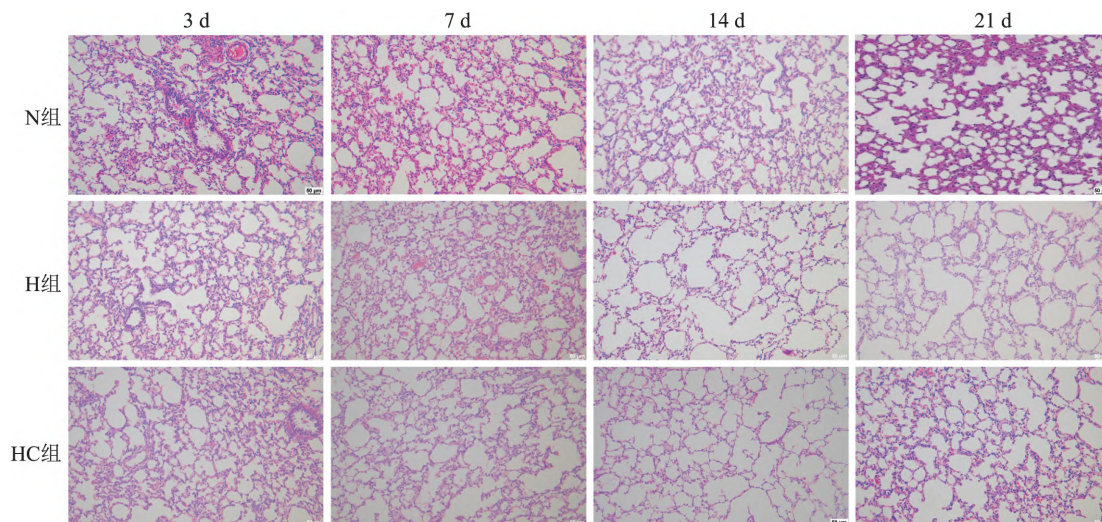


图3 不同日龄各组肺组织切片 HE 染色 $\times 100$

表1 不同日龄各组 RAC 比较($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	3 d	7 d	14 d	21 d
N 组	4.18 ± 0.25	8.08 ± 0.18	9.07 ± 0.28	9.42 ± 0.33
NC 组	4.11 ± 0.18	7.96 ± 0.31	9.27 ± 0.33	9.28 ± 0.31
H 组	4.09 ± 0.36	6.21 ± 0.40 ^{###}	5.34 ± 0.34 ^{###}	5.38 ± 0.30 ^{###}
HC 组	4.25 ± 0.33	6.67 ± 0.51 ^{###*}	7.24 ± 0.44 ^{###***}	7.90 ± 0.40 ^{###***}
F 值	0.386	38.526	165.605	182.757
P 值	>0.05	<0.001	<0.001	<0.001

与 N、NC 组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与 H 组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

血 MDA 显示日龄第 3 天时各组间差异无统计学意义,第 7 天时 H 组、HC 组血 MDA 较 N 组、NC 组均显著上升,但两组间比较差异无统计学意义。H 组于第 14 天时达峰值,其后渐下降。咖啡因干预后 HC 组血 MDA 增长趋势减慢,第 14 天达高峰后逐渐降低,第 14、21 天时两组组间差异有统计学意义($P < 0.001$)。见图 4。

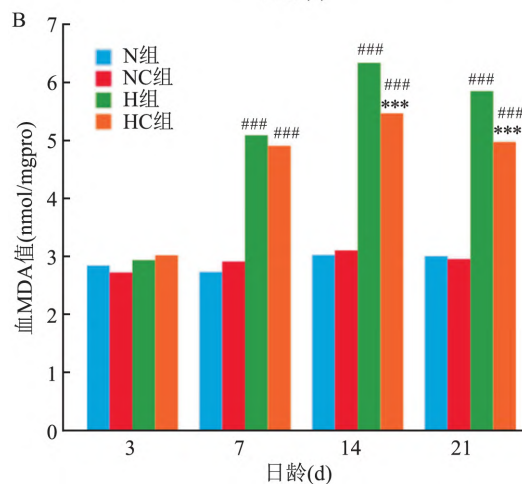
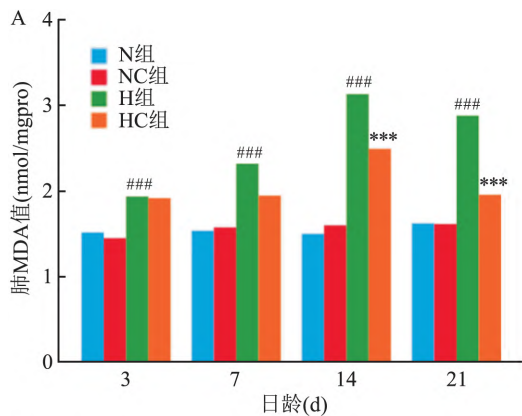


图4 不同日龄各组肺和血 MDA 比较

A: 肺 MDA 比较; B: 血 MDA 比较; 与 N、NC 组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与 H 组比较: ^{***} $P < 0.001$

N 组、NC 组肺 SOD 随日龄增加无明显改变, H 组 SOD 活性自第 7 天起明显降低,第 14 天达最低,

咖啡因干预后 HC 组 SOD 活性降幅减缓,第 21 天时有回升趋势。第 7、14、21 天 H 组和 HC 组、H 组和 N 组、HC 组和 N 组组间差异均有统计学意义。见图 5。

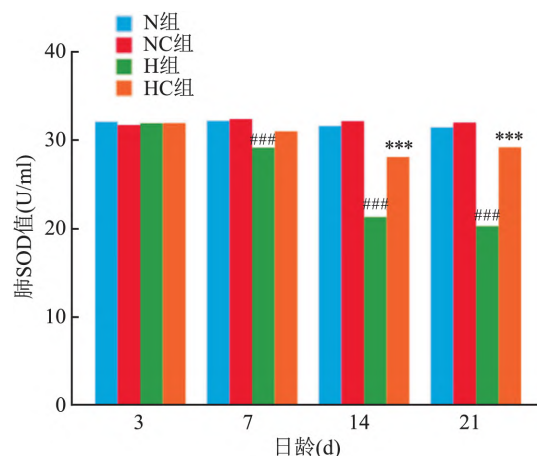


图5 不同日龄各组肺 SOD 比较

与 N、NC 组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与 H 组比较: ^{***} $P < 0.001$

2.5 Nrf2 mRNA 相对表达量 N 组和 NC 组肺组织的 Nrf2 mRNA 相对表达量在第 7 天下降至低值,第 14 天呈缓慢上升,第 21 天平稳。H 组的变化趋势与 N 组、NC 组相反,在第 7 天时显著增强,第 14 天趋于稳定,第 21 天表达减弱。HC 组整体趋于平稳,第 3、7、14 天低于 H 组。第 3 天时 H 组和 HC 组差异有统计学意义($P < 0.05$),第 7、14 天 H 组和 HC 组统计学差异明显($P < 0.001$),第 21 天时组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。第 7、14 天时 H 组与 N 组、NC 组比较组间统计学差异明显($P < 0.001$),第 21 天 H 组与 N 组、NC 组比较组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 6。

2.6 Nrf2 mRNA 相对表达量和 MDA、SOD 的相关性分析 将幼鼠肺组织的 Nrf2 mRNA 相对表达量与 MDA、SOD 作相关分析,结果表明肺组织的 Nrf2 相对表达量与 MDA 呈显著的正相关($P < 0.01$),Nrf2 相对表达量与 SOD 呈显著的负相关($P < 0.01$)。见图 7。

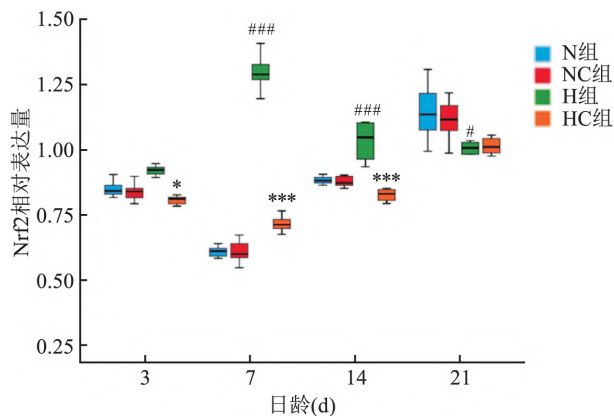


图6 不同日龄各组 Nrf2 相对表达量比较

与 N、NC 组比较: # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$; 与 H 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$

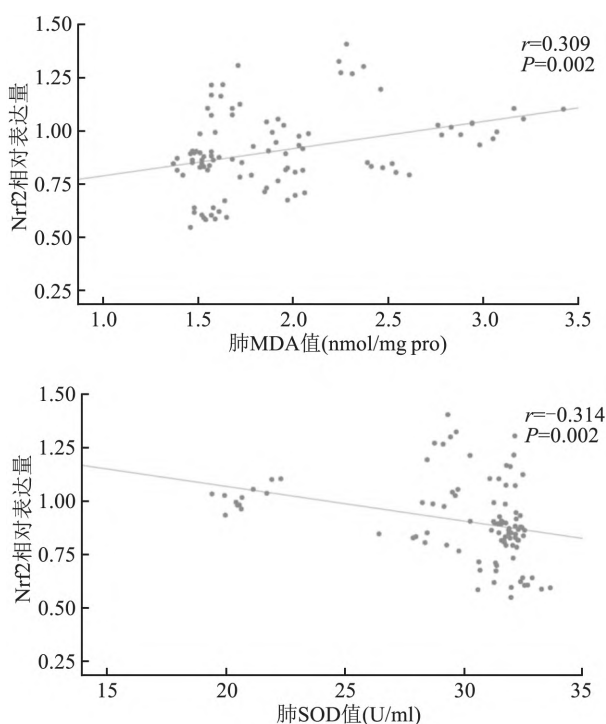


图7 肺组织 Nrf2 mRNA 与 MDA、SOD 的相关分析

3 讨论

BPD 是造成早产儿呼吸系统和神经系统远期不良预后的主要病因之一^[8-9]。暴露于高氧环境可带来新生儿肺部生长发育异常,引起肺泡简化和肺血管畸形等变化^[10]。研究^[11]表明,氧化应激为 BPD 肺损伤重要环节,且咖啡因具有对抗氧化应激的作用。Nrf2/Keap1 通路在抗氧化和抗炎中发挥重要作用。Nrf2 正常生理状态下位于胞质,无生物学活性,氧化应激时 Nrf2 与特异性抑制受体解偶联

入核,启动抗氧化反应元件^[12]。研究高氧诱导的氧化应激肺损伤的发病机制,降低 BPD 引起的致死率及致残率是儿科领域需要解决的重要问题。

新型 BPD 特征为肺泡和肺血管发育不良,肺泡数量减少,肺泡结构简化,纤维化较轻。本研究采用 80% 氧气环境构建 BPD 模型,实验结果发现高氧诱导组幼鼠因高氧肺损伤导致体质量增长缓慢。W/D 结果显示随时间延长,咖啡因改善 BPD 幼鼠模型肺水肿程度。HE 染色镜下观察和 RAC 值结果显示 H 组肺组织结构紊乱,肺泡结构简化,有炎症渗出,发育情况较差,与新型 BPD 患儿肺部病理改变一致^[13]。在 Wu et al^[14]的研究中,新生 SD 大鼠暴露于高氧建立 BPD 模型,高氧组肺泡结构明显简化,肺泡数目减少,与本研究的实验相类似。

MDA 是脂质氧化的产物,其值可作为脂质氧化的指标。SOD 能催化超氧化物阴离子发生歧化作用,是生物体内重要的抗氧化酶。本研究 MDA 检测显示 H 组 MDA 增高,SOD 活性降低,机体氧化和抗氧化失衡,氧化应激水平升高,与既往研究相一致^[14]。MDA 和 SOD 的变化提示随着高氧暴露时间的增加,MDA 在显示咖啡因缓解 BPD 氧化应激的组织损伤上可能较 SOD 更敏感,更早出现氧化和抗氧化失衡的缓解。正常鼠肺处于常氧环境,故咖啡因干预后无明显变化。

Nrf2 介导的信号通路在减轻氧化应激导致的肺损伤中发挥重要作用^[15]。Ma et al^[12]的研究中高氧组 Nrf2 mRNA 的表达水平高于对照组,高氧暴露条件下 Nrf2 表达显著增加,与本研究结果一致。而本研究 Nrf2 在 N 组及 NC 组呈现先降后升变化,可能与新生鼠由宫内缺氧环境向宫外富氧环境过渡至稳态自身调节有关,有待 Nrf2 通路上下游元件进一步研究探讨。本研究表明 H 组 MDA、SOD 的变化与 Nrf2 的高峰期不一致,考虑 Nrf2 在 3 d 时可能已处于氧化应激通路的激活期;咖啡因干预的 HC 组结果显示,MDA 降低,SOD 增高,Nrf2 变化趋势先降后升,提示咖啡因对于高氧暴露下肺组织 Nrf2 mRNA 的表达有一定的抑制,咖啡因通过 Nrf2 通路相关因子的调控影响 Nrf2 的表达,缓解氧化和抗氧化稳态失衡;Nrf2 相对表达量与 MDA 呈正相关,与 SOD 呈负相关,也表明了咖啡因通过 Nrf2 相关通路调节氧化应激。

综上所述,本研究通过高氧诱导建立新生 SD 大鼠 BPD 模型,证实氧化及抗氧化稳态失衡为 BPD 肺损伤关键环节。高氧暴露经相关通路致 Nrf2 活

化 咖啡因干预后肺组织 Nrf2 mRNA 的表达抑制, 推测咖啡因可经 Nrf2 通路减轻 BPD 幼鼠肺氧化应激损伤。后续拟进一步研究该通路上下游因子变化, 探讨咖啡因肺保护性作用机制及靶点, 进一步指导临床应用。

参考文献

- [1] Bonadies L, Zaramella P, Porzionato A, et al. Present and future of bronchopulmonary dysplasia [J]. *J Clin Med* 2020, 9(5): 1539.
- [2] Gilfillan M, Bhandari A, Bhandari V. Diagnosis and management of bronchopulmonary dysplasia [J]. *BMJ* 2021, 375: n1974.
- [3] Capasso L, Vento G, Loddo C, et al. Oxidative stress and bronchopulmonary dysplasia: evidences from microbiomics, metabolomics, and proteomics [J]. *Front Pediatr* 2019, 7: 30.
- [4] Ulasov A V, Rosenkranz A A, Georgiev G P, et al. Nrf2/Keap1/ARE signaling: towards specific regulation [J]. *Life Sci*, 2022, 291: 120111.
- [5] Jensen E A. What is bronchopulmonary dysplasia and does caffeine prevent it [J]. *Semin Fetal Neonatal Med* 2020, 25(6): 101176.
- [6] Mandell E W, Kratimenos P, Abman S H, et al. Drugs for the prevention and treatment of bronchopulmonary dysplasia [J]. *Clin Perinatol* 2019, 46(2): 291–310.
- [7] Yuan Y, Yang Y, Lei X, et al. Caffeine and bronchopulmonary dysplasia: clinical benefits and the mechanisms involved [J]. *Pediatr*

- Pulmonol* 2022, 57(6): 1392–400.
- [8] Cannavò L, Perrone S, Viola V, et al. Oxidative stress and respiratory diseases in preterm newborns [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(22): 12504.
- [9] Shukla V V, Ambalavanan N. Recent advances in bronchopulmonary dysplasia [J]. *Indian J Pediatr* 2021, 88(7): 690–5.
- [10] Giusto K, Wanczyk H, Jensen T, et al. Hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia: better models for better therapies [J]. *Dis Model Mech* 2021, 14(2): dmm047753.
- [11] Barcelos R P, Lima F D, Carvalho N R, et al. Caffeine effects on systemic metabolism, oxidative-inflammatory pathways, and exercise performance [J]. *Nutr Res* 2020, 80: 1–17.
- [12] Ma D, Gao W, Liu J, et al. Mechanism of oxidative stress and Keap1/Nrf2 signaling pathway in bronchopulmonary dysplasia [J]. *Medicine (Baltimore)* 2020, 99(26): e20433.
- [13] Dumpa V, Nielsen L, Wang H, et al. Caffeine is associated with improved alveolarization and angiogenesis in male mice following hyperoxia induced lung injury [J]. *BMC Pulm Med* 2019, 19(1): 138.
- [14] Wu Q, Chong L, Shao Y, et al. Lipoxin A4 reduces hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats through PINK1 signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol* 2019, 73: 414–23.
- [15] 段蓉蓉, 鲁利群. 氧化应激与 Nrf2 在支气管肺发育不良中的机制研究 [J]. *安徽医学* 2022, 43(8): 972–5.

Caffeine regulates lung oxidative stress injury through Nrf2 pathway in neonatal rats with bronchopulmonary dysplasia

Wang Xin^{1,2}, Zhang Min^{2,3}, Ding Shenggang^{1,2}

(¹Dept of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022; ²Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, China National Clinical Research Center of Respiratory Diseases, Beijing 100045; ³Dept of Neonatology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the protective effect of caffeine on oxidative stress injury induced by hyperoxia in neonatal SD rats with bronchopulmonary dysplasia (BPD) and its related mechanism. **Methods** Neonatal SD rats were randomly divided into air control group (N group), caffeine air control group (NC group), model group (H group) and caffeine intervention group (HC group). The high oxygen induction method was used to establish the BPD model. Blood and lung tissue of six samples were collected from each group on day 3, 7, 14 and 21. Each group was divided into four subgroups according to four days of age. The 21-day panel of four groups measured their body weights. The upper lobe of the right lung was used to measure wet-dry weight ratio (W/D) of lung tissue in each group; the lower lobe of the right lung was sliced after paraffin embedding and stained with hematoxylin-eosin (HE) to observe morphological changes and calculate radial alveolar count (RAC) values; the levels of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in blood and lung tissues were determined to evaluate the imbalance of oxidative and antioxidant homeostasis in neonatal rats; real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the relative expression level of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) mRNA in lung tissues. **Results** ① H group showed a gradual decline in activity after 3 days and an increasing trend in body weight after 14 days. ② W/D value of H group reached its peak at day

网络出版时间: 2023-09-19 16:21:47 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20230918.1413.022>

急性睡眠剥夺调控 AMPK-自噬信号致小鼠抑郁样行为机制

杜宏梅, 崔杨凤, 陈明

摘要 目的 研究急性睡眠剥夺(SD)对小鼠焦虑和抑郁样行为的影响,并探讨其可能的分子机制。方法 随机将33只雄性8周龄C57BL/6小鼠分为环境对照(EC)组和SD组。采用旷场实验和十字高架实验评估小鼠自主行为和焦虑行为;采用强迫游泳实验和悬尾实验检测小鼠抑郁行为。Western blot法检测小鼠海马区神经炎症蛋白和自噬相关蛋白水平的表达。结果 与EC组比较,在旷场实验中SD组小鼠总运动距离显著增加($P < 0.01$),穿线次数和中央区域时间未表现出显著差异;在强迫游泳实验中SD组小鼠不动时间显著增加($P < 0.01$),但悬尾实验和十字高架实验中各指标均无显著差异。Western blot结果显示:与EC组比较,SD组小鼠海马区NLRP1、TNF- α 、IL-1 β 、IL-18和自噬蛋白p62水平显著升高,Atg5、Atg7水平显著降低,AMPK磷酸化水平也显著降低。结论 SD可能通过抑制小鼠海马区AMPK-自噬信号,上调神经炎症水平,导致小鼠出现抑郁样行为。
关键词 急性睡眠剥夺;抑郁样行为;自噬;神经炎症;p-AMPK

中图分类号 R 749.42

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)10-1737-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.10.022

睡眠障碍是我国乃至全世界一个重要的健康问题,与年龄增长有密切关系,我国预估有超过3亿人

2023-04-27 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81801064)

作者单位:安徽医科大学基础医学院药理学教研室,合肥 230032

作者简介:杜宏梅,女,硕士研究生;

陈明,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: chenming@ahmu.edu.cn

存在睡眠障碍。长期睡眠不足会增加老年人患心脑血管疾病、抑郁症、糖尿病和肥胖的风险,损害认知功能、记忆功能和免疫系统^[1]。研究^[2-3]发现,长期失眠会引发焦虑不安、抑郁等精神异常,而焦虑、抑郁又反过来进一步加重睡眠紊乱,形成恶性循环。抑郁症是现代最为常见的精神疾病之一,抑郁症患者临床上主要表现为情绪持续低落,并伴有失眠、食欲减退,部分患者出现焦虑、运动性激越及幻觉,甚至产生自杀行为。虽然睡眠障碍和情绪障碍之间关系密切,但具体机制尚不清楚,目前也缺乏有效的防治措施。该研究通过建立小鼠急性睡眠剥夺(sleep deprivation, SD)模型,研究其与小鼠焦虑和抑郁样行为之间的联系,探讨其可能的机制,并寻找相应靶点,从而为临床上睡眠障碍导致的抑郁症治疗提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 33只SPF级别雄性C57BL/6小鼠,体质量(20±1)g,购自于斯贝福(北京)生物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2019-0010。

1.1.2 试剂 Western blot所使用的一抗NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白(NOD-like receptor thermal protein structural domain-associated protein, NLRP1)、NLRP3购自美国Abcam公司,白细胞介素(interleukin, IL)-18、IL-1 β 、泛素结合蛋白(ubiquitin-

14, and the trend of HC group was similar to that of H group. ③ The lung tissue structure of H group was irregular, RAC value of which decreased significantly after 7 days of peak, and the difference between H group and HC group was statistically significant ($P < 0.01$). ④ The MDA value of H group increased on day 7 and gradually decreased on day 14, while the SOD activity decreased obviously on day 7, and there were significant differences in MDA and SOD activity between H group and HC group at 14 days and 21 days ($P < 0.05$). ⑤ The expression of Nrf2 mRNA in H group was significantly enhanced at day 7 and stabilized at day 14, and there were statistically significant differences between H and HC groups at day 3, day 7 and day 14 ($P < 0.05$). ⑥ The relative expression level of Nrf2 mRNA was positively correlated with MDA and negatively correlated with SOD. **Conclusion** Caffeine can regulate oxidative stress response through Nrf2 pathway and alleviate lung oxidative stress injury induced by hyperoxia in neonatal rats with BPD.

Key words bronchopulmonary dysplasia; caffeine; hyperoxia-induced lung injury; oxidative stress