

• 实验研究 •

利多卡因调控 Apelin/APJ 系统对脓毒症相关性脑病大鼠的脑保护作用

张雯, 张宇轩, 李瑞轩, 徐桂萍*

新疆维吾尔自治区人民医院 新疆麻醉管理临床医学研究中心, 新疆 乌鲁木齐 830000

摘要: **目的** 探究利多卡因对脓毒症相关性脑病模型大鼠的脑保护作用及机制。**方法** 将 40 只大鼠按随机数字表法分为对照组、模型组、利多卡因组、利多卡因+血管紧张素受体 AT1 相关的受体蛋白拮抗剂 Apelin13 (F13A) 组, 每组 10 只。除对照组外, 其余 3 组大鼠均构建脓毒症相关性脑病模型, 利多卡因组和利多卡因+F13A 组造模后即刻给予利多卡因 10 mg/kg 负荷剂量, 随后尾 iv 利多卡因 10 mg/kg 并持续 3 h, 利多卡因+F13A 组同时 ip APJ 拮抗剂 F13A 100 μg/kg。24 h 后, Morris 水迷宫实验检测各组大鼠认知功能, 酶联免疫吸附 (ELISA) 法检测各组大鼠血清白细胞介素 (IL)-6、IL-10、肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 水平, 苏木精-伊红 (HE) 染色观察各组大鼠脑组织病理变化, TdT 介导的 dUTP 缺口末端标记法 (TUNEL) 和神经元特异核蛋白 (NeuN) 双免疫荧光染色检测各组大鼠脑组织皮质内神经元凋亡, 免疫荧光双染法观察各组大鼠脑组织皮质内 Apelin 与 APJ 表达, 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (RT-qPCR) 检测各组大鼠脑组织 Apelin 和 APJ 的 mRNA 表达, 蛋白质免疫印迹 (Western blotting) 法检测各组大鼠脑组织 Apelin 和 APJ 的蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 利多卡因组大鼠逃避潜伏期缩短, 通过目标象限次数增加 ($P < 0.05$), 血清 IL-6、TNF-α 水平降低而 IL-10 水平显著升高 ($P < 0.05$), 海马区神经元损伤明显减轻, 形态和分布均趋于正常, 脑组织皮质内凋亡神经元数目减少 ($P < 0.05$); Apelin 与 APJ 荧光染色表达均明显增强, 脑组织内 Apelin、APJ 的 mRNA 与蛋白相对表达量均显著上调 ($P < 0.05$); 与利多卡因组比较, 利多卡因+F13A 组大鼠逃避潜伏期延长, 通过目标象限次数减少 ($P < 0.05$), 血清 IL-6、TNF-α 水平升高, 血清 IL-10 水平显著降低 ($P < 0.05$), 海马区神经元损伤加重, 有大量细胞肿胀与细胞核固缩, 脑组织皮质内凋亡神经元数目增加 ($P < 0.05$)。同时, Apelin 与 APJ 荧光染色表达均明显减弱, 脑组织内 Apelin、APJ 的 mRNA 与蛋白相对表达量均显著下调 ($P < 0.05$)。**结论** 利多卡因能够改善脓毒症相关性脑病模型大鼠脑损伤, 抑制炎症反应, 并减少神经元凋亡, 其机制可能与激活 Apelin/APJ 系统有关。

关键词: 脓毒症相关性脑病; 利多卡因; 神经元; 炎症因子; Apelin/APJ 系统

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)02-0249-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.02.001

Brain protection of lidocaine on rats with sepsis associated encephalopathy by regulating Apelin/APJ system

ZHANG Wen, ZHANG Yu-xuan, LI Rui-xuan, XU Gui-ping

People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Xinjiang Clinical Research Center for Anesthesia Management, Urumqi 830000, China

Abstract: Objective To investigate the protective effects and mechanism of lidocaine on sepsis-associated encephalopathy model rats. **Methods** Forty rats were randomly divided into control group, model group, lidocaine group, and lidocaine + F13A group, with 10 rats in each group. Except the control group, the other three groups of rats were constructed sepsis-associated encephalopathy model, lidocaine group and lidocaine + F13A group were given a loading dose of 10 mg/kg lidocaine immediately after modeling, after that, lidocaine 10 mg/kg was injected intravenously for 3 h, APJ antagonist F13A 100 μg/kg was injected intraperitoneally in lidocaine + F13A group. 24 h later, the Morris water maze test detected the cognitive function of each group, enzyme-linked immunosorbent assay

收稿日期: 2022-12-09

基金项目: 新疆维吾尔自治区卫生健康青年医学科技人才专项科研项目 (WJWY-202203)

作者简介: 张雯, 女, 硕士研究生, 研究方向为麻醉学。E-mail: wileenn2017@163.com

*通信作者: 徐桂萍, 女, 主任医师, 博士, 研究方向为麻醉学。E-mail: 445089234@qq.com

(ELISA) was used to detect the levels of serum interleukin(IL)-6, IL-10, and tumor necrosis factor- α (TNF- α), hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe pathological changes in brain tissue of rats in each groups, TdT mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) and neuron-specific nuclear protein (NeuN) double immunofluorescence staining was used to detect neuronal apoptosis in the cerebral cortex of each group, the expressions of Apelin and APJ in the cerebral cortex of rats in each group were observed by immunofluorescence double staining, real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the mRNA expressions of Apelin and APJ in the brain tissues of rats in each group, Western blotting was used to detect the protein expressions of Apelin and APJ in the brain tissues of rats in each group. **Results** Compared with model group, the escape latency of rats in lidocaine group was shortened, the number of target quadrant was increased ($P < 0.05$), the levels of IL-6 and TNF- α in serum were decreased while the level of IL-10 was increased ($P < 0.05$), the damage of neurons in hippocampus was significantly reduced, and the morphology and distribution of neurons tended to be normal, the number of apoptotic neurons in the cerebral cortex was decreased ($P < 0.05$), the expression of Apelin and APJ fluorescence staining were significantly increased, the mRNA and protein relative expression levels of Apelin and APJ in the cerebral tissue were also significantly up-regulated ($P < 0.05$). Compared with lidocaine group, the escape latency of rats in lidocaine + F13A group was prolonged, the number of passage through the target quadrant was reduced ($P < 0.05$), the levels of IL-6 and TNF- α in serum were increased, and the level of IL-10 in serum were decreased ($P < 0.05$), the neuronal damage in hippocampus was aggravated, there was a large number of cell swelling and nuclear pyretosis, the number of apoptotic neurons in the cerebral cortex was increased ($P < 0.05$). Meanwhile, the expression of Apelin and APJ fluorescence staining were significantly decreased, and the mRNA and protein relative expression levels of Apelin and APJ in the cerebral tissue were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** lidocaine can improve brain injury, inhibit inflammation and reduce neuronal apoptosis in sepsis-associated encephalopathy model rats, and the mechanism may be related to the activation of Apelin/APJ system.

Key words: sepsis associated encephalopathy; lidocaine; neurons; inflammatory factors; Apelin/APJ system

脓毒症是一种复杂的、危及生命的综合征，累及机体多个器官系统，大约 70% 的脓毒症患者会发生脓毒症相关性脑病^[1]。脓毒症相关性脑病为脓毒症后感染引起全身炎性反应继而导致的弥漫性脑部疾病，临床表现为长期认知障碍以及心理障碍，脓毒症相关性脑病也是脓毒症患者死亡率增加和预后不良的一大原因^[2]。目前，其发病机制尚不明确，既往报道表明，脑血管功能障碍、氧化应激、炎症损伤以及线粒体功能障碍均在脓毒症相关性脑病的发生发展中起着关键作用^[3-4]。

利多卡因作为临床上唯一获批静脉给药的局部麻醉剂，可缓解神经性疼痛、痛觉过敏和复杂局部疼痛综合征。此外，利多卡因还通过参与多种细胞信号转导过程发挥抗心律失常、抗炎、抗癌药增敏、免疫调节等作用^[5-6]，因其良好的抗炎效果也使得在脓毒症治疗研究中广泛应用^[7]，现有研究表明，利多卡因能够缓解脓毒症诱导的肺损伤与心肌损伤^[8-9]，并有效减少创伤性脑损伤后脑血管痉挛，从而发挥脑保护作用^[10]。但关于利多卡因对脓毒症并发症脓毒症相关性脑病的作用效果及机制尚鲜有研究。基于此，本研究通过构建脓毒症相关性脑病大鼠模型，观察利多卡因对脓毒症相关性脑病大鼠脑损伤的影响，以期揭示其在脓毒症相关性脑病的作用及相关机制。

1 主要材料与试剂

1.1 实验动物

健康 SPF 级 SD 大鼠，雄性，10 周龄，体质量 220~250 g，由新疆医科大学实验动物中心提供，动物批号：SYXK(新)2018-0003。饲养于温度 18~25 °C、相对湿度 50%~70% 以及给予 12 h 昼/夜循环照明环境中，常规饲料与自来水喂养，饲养 1 周适应环境后进行造模。本实验经医院伦理委员会批准后实施，伦理批号：K20210322086。

1.2 主要试剂

利多卡因注射液（济川药业集团，国药准字 H10960194，批号 J211215），APJ 拮抗剂（F13A，美国 Phoenix Pharmaceuticals 公司，批号 SAF13A-IG），脂多糖（LPS，美国 Sigma 公司，批号 L2880），ELISA 测定的 IL-6（批号 KGEHC007-1）、IL-10（批号 KGERC004-1）、TNF- α （批号 KGERC102a）试剂盒均购自江苏凯基生物公司，苏木精-伊红(HE)染色试剂盒（北京索莱宝科技公司，批号 G1120-100），蛋白酶 K（美国 Worthington 公司，批号 EKC40623），TUNEL 检测液（批号 YT135-OYL）、DAPI 染料（批号 YT891-QFC）均购自北京百奥博莱科技公司，新型 RNA 提取试剂盒（北京康为世纪，批号 CW0581），反转录试剂盒（批号 RR047A）、荧光定量测定试剂盒（批号 DRR820A）均购自大连

Takara 公司,总蛋白提取试剂盒(批号 P0033)、BCA 蛋白测定试剂盒(批号 P0012S)、BeyoECL Plus 试剂盒(批号 P0018M)均购自上海碧云天生物研究所, NeuN 抗体(货号 ab177487)、Apelin 抗体(货号 ab133624)、APJ 抗体(货号 ab141012)、GAPDH 抗体(货号 ab181602)、TRITC 荧光标记山羊抗兔抗体(货号 ab6718)、FITC 荧光标记山羊抗兔抗体(货号 ab6717)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 抗体(货号 ab6721)均购自英国 Abcam 公司。

1.3 方法

1.3.1 动物分组、造模及处理 将 40 只大鼠按随机数字表法分为 4 组,包括对照组、模型组、利多卡因组、利多卡因+F13A 组,每组 10 只。除对照组外的其余 3 组大鼠参照文献方法建立脓毒症相关性脑病模型^[1],大鼠 ip 2%戊巴比妥钠麻醉后固定,再 ip 15 mg/kg LPS, 1 次/d,持续 3 d。利多卡因的给药参考文献中的方法与剂量^[2],利多卡因组大鼠造模后即刻给予利多卡因 10 mg/kg 负荷剂量,随后尾 iv 利多卡因 10 mg/kg,持续 3 h;而利多卡因+F13A 组在利多卡因组处理的基础上,同时 ip 100 μg/kg F13A;对照组与模型组的大鼠同时给予等量生理盐水处理。

1.3.2 Morris 水迷宫实验检测大鼠认知功能 给药结束后,组装 Morris 水迷宫检测系统,采用监视器进行记录,定位航行实验检测大鼠逃避潜伏期,空间探索试验测定大鼠在 60 s 内通过目标象限次数。

1.3.3 ELISA 法测定血清 IL-6、IL-10、TNF-α 的水平 给药结束 24 h 后,采集大鼠尾静脉血 1 mL,以 3 000 r/min 常规离心 20 min 后,收集血清,ELISA 法检测 IL-6、IL-10、TNF-α 水平。

1.3.4 HE 染色观察大鼠脑组织病理变化 采血结束后处死各组大鼠取脑组织,生理盐水清洗后用滤纸吸干表面水分,浸入 4%多聚甲醛固定过夜,石蜡包埋,制成厚度为 5 μm 的石蜡切片。进行 HE 染色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,最后采用中性树脂胶密封,在光学显微镜下观察脑组织海马区病理变化情况并获取图像。

1.3.5 TUNEL 和 NeuN 双免疫荧光染色检测大鼠脑组织内神经元凋亡 取脑组织石蜡切片,经脱蜡与脱水后,滴加 20 mg/L 蛋白酶 K(不含 DNase)室温孵育 10 min, PBS 浸洗,滴加 50 μL FITC 标记 TUNEL 检测液室温避光孵育 1 h, PBS 浸洗,以 10%山羊血清室温封闭 30 min,滴加 NeuN 抗体(1:

500)室温继续孵育 2 h, PBS 再次浸洗,滴加 TRITC 荧光标记山羊抗兔抗体(1:500)室温再孵育 1 h。PBS 浸洗后,采用含抗荧光淬灭剂的封片液密封,在荧光显微镜下观察脑组织皮质染色情况并获取图像,每个样本观察 3 个切片,每个切片随机选 5 个不重叠的视野,计数每个视野下调亡神经元(TUNEL 阳性神经元)比例。

1.3.6 免疫荧光双染法观察大鼠脑组织内 Apelin 与 APJ 共定位表达 将脑组织切片浸入 0.3% TritonX-100 透膜 15 min,再滴加山羊血清室温封闭 1 h。切片上滴加 Apelin 抗体(1:100)与 APJ 抗体(1:100)进行双标记,置于 4 °C 孵育过夜。室温下复温, PBS 浸洗,滴加足量对应的 FITC 荧光标记山羊抗兔抗体(1:500),置于 37 °C 孵育 1 h。PBS 浸洗后,使用 DAPI 进行细胞核染色,滴加含抗荧光淬灭剂的封片液密封,在激光扫描共聚焦显微镜下观察脑组织皮质染色情况并获取图像。每个样本观察 3 个切片,每个切片随机选 5 个不重叠的视野,采用 LEICAQWin 图像处理系统分析蛋白着色荧光强度。

1.3.7 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 测定大鼠脑组织中 Apelin、APJ 的 mRNA 表达水平 取大鼠脑组织在无菌环境下剪碎,加入液氮充分研磨,采用 RNA 提取试剂盒提取组织中 RNA,1%凝胶电泳检测样本质量,紫外分光光度计测定 RNA 浓度。反转录得到 cDNA,置于-20 °C 保存备用。RT-qPCR 扩增测定 Apelin、APJ 的 mRNA 表达水平,根据试剂盒说明书配制 20 μL PCR 反应体系,通过定量检测系统上进行扩增检测反应,反应程序为:95 °C、10 min 预变性,循环 1 次;95 °C、10 s,60 °C、30 s,循环 40 次。引物序列为:GAPDH 正向 5'-GAGTCAACGGATTTGGTTCGT-3',反向 5'-GACAAGCTTCCCCTTCTCAG-3';Apelin 正向 5'-GCTGC TCTGGCTCTCCT-3',反向 5'-TTCCTCCGACCT CCCT-3';APJ 正向 5'-CCGCAAGGAACGCATCG-3',反向 5'-GTGGTAGGGCATCCAGCACA-3'。扩增结束后,溶解曲线分析,读取 Ct 值,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算各基因的 mRNA 相对表达量。

1.3.8 Western blotting 法测定大鼠脑组织中 Apelin、APJ 蛋白表达水平 通过总蛋白提取试剂盒提取大鼠脑组织总蛋白,脑组织超声破碎后,以 12 000 r/min 常规离心 20 min 后,取上清,BCA 法测量蛋白浓度。将蛋白样品在 100 °C 下加热 5 min,

安装电泳装置, 制备 10% SDS-PAGE 凝胶, 将加热变性后的等量蛋白样品依次上样至凝胶孔内, 电泳分离并转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭。4 °C 下将膜分别与 Apelin 抗体 (1 : 1 000)、APJ 抗体 (1 : 1 000) 和 GADPH 抗体 (1 : 1 000) 孵育过夜。TBST 浸洗, 室温下将膜与辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG (H+L) 抗体 (1 : 5 000) 孵育 2 h, TBST 再次浸洗。滴加 BeyoECL Plus 溶液显影, 采用成像系统采集图像, 并分析目的蛋白相对 GADPH 内参蛋白的表达量。

1.3.9 统计学分析 GraphPad Prism 8.30 统计软件进行本实验数据的统计学处理分析, 结果绘制统计图, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间进行单因素方差分析, 组间两两比较进行 LSD-*t* 检验。

2 结果

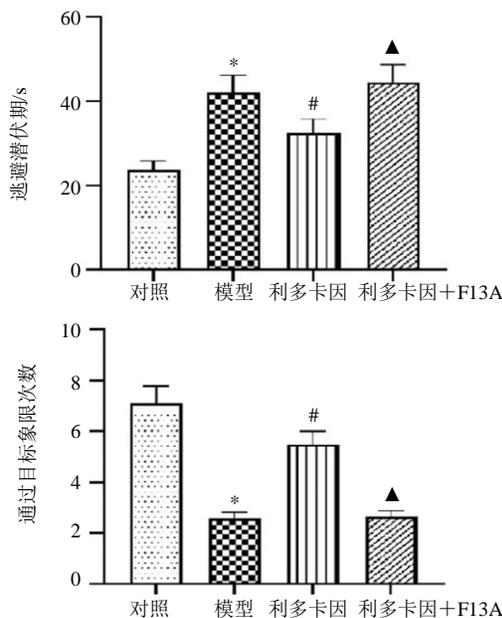
2.1 利多卡因对脓毒症相关性脑病大鼠认知功能的影响

Morris 水迷宫分析结果显示, 与对照组比较, 模型组大鼠逃避潜伏期显著延长, 通过目标象限次数显著减少 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 利多卡因组大鼠逃避潜伏期显著缩短, 通过目标象限次数显著增加 ($P < 0.05$); 而相较于利多卡因组, 利多卡因+F13A 组大鼠逃避潜伏期显著延长, 通过目标象限次数显著减少 ($P < 0.05$), 见图 1。

2.2 利多卡因对脓毒症相关性脑病大鼠血清炎症因子水平的影响

ELISA 测定结果显示, 与对照组比较, 模型组

大鼠血清 IL-6、IL-10、TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 利多卡因组大鼠血清 IL-6、TNF- α 水平显著降低, 而 IL-10 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与利多卡因组比较, 利多卡因+F13A 组大鼠血清 IL-6、TNF- α 水平显著升高, 而 IL-10 水平显著降低 ($P < 0.05$), 见表 1。



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与利多卡因组比较: ▲ $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ vs lidocaine group

图 1 利多卡因对脓毒症相关性脑病大鼠认知功能的影响 ($n = 10$)

Fig. 1 Effects of lidocaine on cognitive function in sepsis associated encephalopathy rats ($n = 10$)

表 1 各组大鼠血清 IL-6、IL-10、TNF- α 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Comparison of serum levels of IL-6, IL-10 and TNF- α in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	IL-10/(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)
对照	—	43.25 ± 4.19	67.65 ± 6.21	37.21 ± 3.44
模型	—	86.54 ± 8.38*	88.91 ± 8.36*	112.49 ± 10.18*
利多卡因	10	60.07 ± 5.74#	127.60 ± 10.17#	50.21 ± 4.67#
利多卡因+F13A	10+0.1	89.46 ± 8.32▲	90.23 ± 8.75▲	99.56 ± 9.36▲

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与利多卡因组比较: ▲ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ vs lidocaine group

2.3 利多卡因对脓毒症相关性脑病大鼠脑组织病理损伤的影响

通过 HE 染色观察到对照组大鼠海马区神经元结构完整, 大小均匀, 未见明显病变, 而模型组大鼠海马区神经元变性, 出现细胞肿胀、细胞核固缩、间隙增宽等现象, 排列紊乱; 与模型组比较, 利多卡因组大鼠海马区神经元形态和分布趋于正常, 损

伤明显减轻; 与利多卡因组比较, 利多卡因+F13A 组大鼠海马区神经元又呈现明显损伤, 出现大量细胞肿胀及细胞核固缩, 见图 2。

2.4 利多卡因对脓毒症相关性脑病大鼠脑内神经元凋亡的影响

免疫荧光染色分析结果显示, 模型组大鼠脑组织皮质内凋亡神经元 (TUNEL 阳性细胞) 数目较

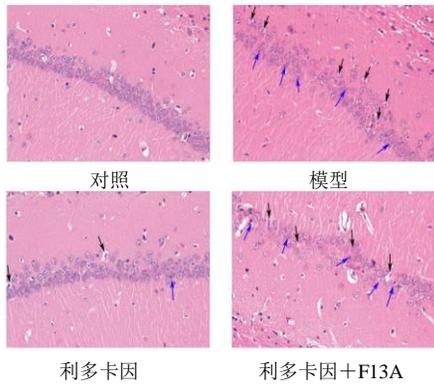


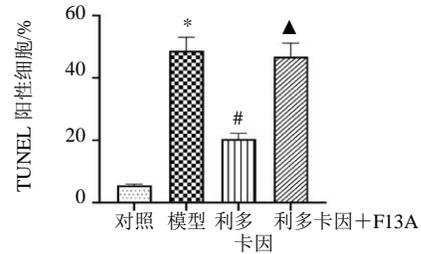
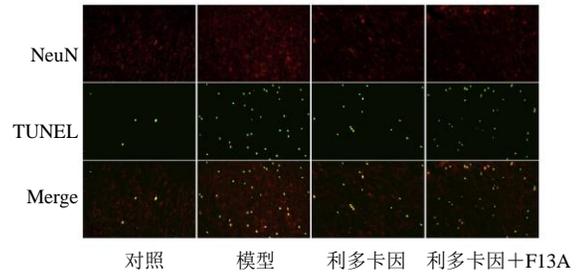
图 2 利多卡因对脓毒症相关性脑病大鼠脑组织病理损伤的影响 (HE 染色, $\times 100$)

Fig. 2 Effect of lidocaine on pathological injury of brain tissue in sepsis associated encephalopathy rats (HE staining, $\times 100$)

对照组显著增加 ($P < 0.05$); 利多卡因组大鼠脑组织皮质内凋亡神经元 (TUNEL 阳性细胞) 数目较模型组显著减少 ($P < 0.05$); 与利多卡因组比较, 利多卡因 + F13A 组大鼠脑组织皮质内凋亡神经元 (TUNEL 阳性细胞) 数目增加 ($P < 0.05$), 见图 3。

2.5 利多卡因对脓毒症相关性脑病大鼠脑组织 Apelin/APJ 系统表达变化的影响

由图 4 可见, 与对照组比较, 模型组大鼠脑组



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与利多卡因组比较: ▲ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ vs lidocaine group

图 3 利多卡因对脓毒症相关性脑病大鼠脑内神经元凋亡的影响 (TUNEL 和 NeuN 双免疫荧光染色, $\times 100$)

Fig. 3 Effects of lidocaine on neuronal apoptosis in sepsis associated encephalopathy rats (TUNEL and NeuN double immunofluorescence staining, $\times 100$)

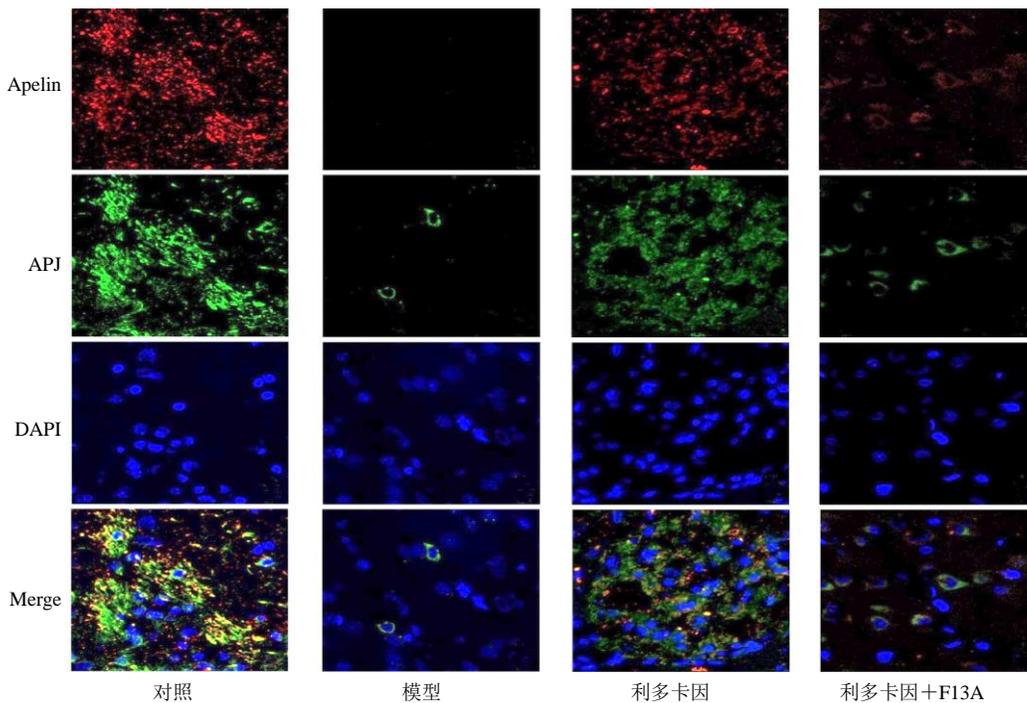


图 4 利多卡因对脓毒症相关性脑病大鼠脑组织 Apelin 与 APJ 表达的影响 (免疫荧光双染法, $\times 200$)

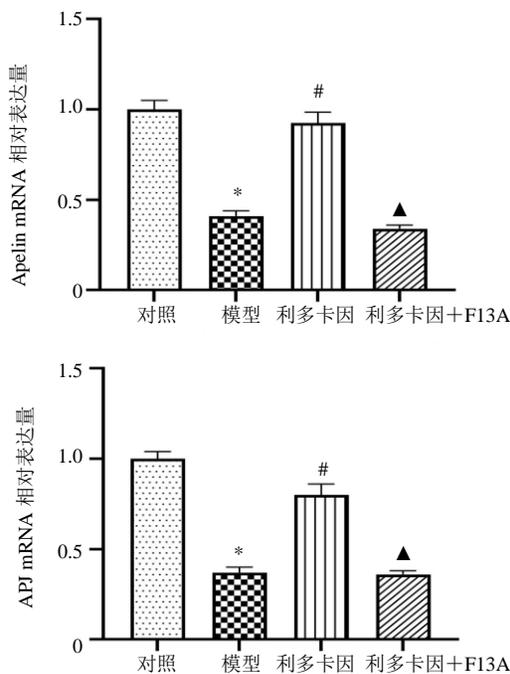
Fig. 4 Effect of lidocaine on Apelin and APJ expression in sepsis associated encephalopathy rat brain tissue (immunofluorescence double staining, $\times 200$)

织皮质内的红色荧光 (Apelin 阳性表达) 与绿色荧光 (APJ 阳性表达) 均明显减弱; 与模型组比较, 利多卡因组大鼠脑组织皮质内的红色荧光 (Apelin 阳性表达) 与绿色荧光 (APJ 阳性表达) 均明显增强, 与利多卡因组比较, 利多卡因+F13A 组大鼠脑组织皮质内红色荧光 (Apelin 阳性表达) 与绿色荧光 (APJ 阳性表达) 明显减弱。

RT-qPCR 与 Western blotting 测定结果显示, 与对照组比较, 模型组大鼠脑组织内 Apelin、APJ 的 mRNA 与蛋白相对表达量均显著下调 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 利多卡因组大鼠脑组织内 Apelin、APJ 的 mRNA 相对表达量与蛋白相对表达量显著上调 ($P < 0.05$); 与利多卡因组比较, 利多卡因+F13A 组大鼠脑组织内 Apelin、APJ 的 mRNA 与蛋白相对表达量均显著下调 ($P < 0.05$), 见图 5、6。

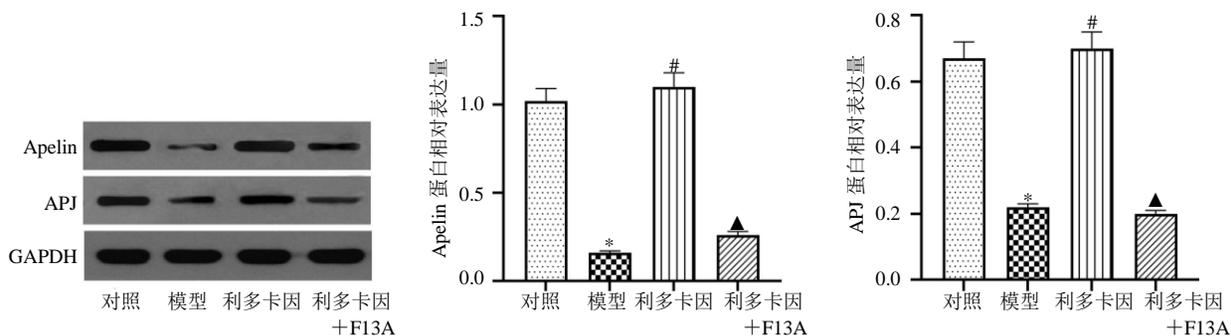
3 讨论

在没有中枢神经系统感染的情况下, 脓毒症可能导致弥漫性脑功能障碍而导致脓毒症相关性脑病发生。脓毒症相关性脑病临床症状可能从认知功能障碍、谵妄到深度昏迷不等, 其存在与重症监护室治疗时间较长和死亡率较高有关^[13]。尽管与脓毒症相关性脑病相关的死亡人数不断升高, 但仍然缺乏针对脓毒症相关性脑病的有效治疗措施, 因此, 深入探究其病理机制及寻找新型治疗方法对于脓



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与利多卡因组比较: ▲ $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ vs lidocaine group

图 5 利多卡因对脓毒症相关性脑病大鼠脑组织内 Apelin 与 APJ 的 mRNA 表达水平影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Fig. 5 Effect of lidocaine on Apelin and APJ mRNA expression levels in sepsis associated encephalopathy rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与利多卡因组比较: ▲ $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ vs lidocaine group

图 6 利多卡因对脓毒症相关性脑病大鼠脑组织内 Apelin 与 APJ 的蛋白表达水平影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Fig. 6 Effect of lidocaine on Apelin and APJ protein expression levels in sepsis associated encephalopathy rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

毒症相关性脑病患者来说至关重要。作为革兰阴性细菌细胞壁的主要成分, LPS 可诱导神经元毒性、脑功能障碍和记忆障碍。注射 LPS 是一种广泛使用且易于复制的脓毒症相关性脑病建模方法, 该模型诱导先天免疫系统的压倒性激活, 这与脓毒症相关性脑病过程有许多相似之处^[14]。本研究通过给予大

鼠 ip LPS 后, Morris 水迷宫实验评估该模型大鼠认知功能, 结果显示模型大鼠逃避潜伏期延长, 通过目标象限次数减少, 说明 LPS 给药导致大鼠认知功能障碍, 脓毒症相关性脑病模型制备成功。

越来越多的研究证据表明, 利多卡因在多种疾病中起着重要的调节作用。如 Johnson 等^[15]研究表

明利多卡因通过抑制乳腺肿瘤细胞的生长和转移来提高移植瘤裸鼠切除肿瘤后的无肿瘤生存期和总生存期；Zhang 等^[16]研究指出完全弗氏佐剂诱导的疼痛大鼠模型中的炎症反应，发挥镇痛疼痛作用，该机制与调控丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）/细胞外信号调节激酶（ERK）/核因子- κ B（NF- κ B）途径相关；Yin 等^[17]研究发现使用利多卡因对银屑病患者的硬膜外和咪喹莫特诱导的银屑病大鼠模型进行注射后显示出良好的治疗效果，其可以抑制发炎皮肤中过度的感觉神经生长和树突状细胞中降钙素基因相关肽介导的 IL-23 产生。此外，已有研究揭示了利多卡因在脓毒症中的治疗作用，其能够通过提高抗氧化能力减轻脓毒症心肌损伤^[9]，并且能有效减少炎症因子释放和改善肺血管通透性，从而减轻脓毒症肺损伤^[12]。本研究检测结果显示，经利多卡因治疗后能够减轻脓毒症相关性脑病大鼠海马区神经元损伤，抑制神经元凋亡，对脓毒症相关性脑病大鼠脑组织发挥保护作用。

炎症反应在脓毒症的发病机制中起着至关重要的作用。细菌本身及其代谢物均可引发过度炎症反应，导致炎症介质如 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的大量释放，而过度释放的促炎因子对脓毒症的发展产生积极影响，通过激活启动炎症级联反应及损伤相关分子模式，进一步诱导器官功能障碍和多细胞发生死亡^[18-19]。脓毒症相关性脑病是由于全身炎症反应作用于脑组织而发病，因此，抑制炎症反应是减轻该病情的关键环节。已知利多卡因调控炎症反应过程，能够抑制多种炎症介质的释放，本研究经检测发现，经利多卡因治疗后的脓毒症相关性脑病大鼠血清中促炎因子 IL-6、TNF- α 水平降低而抑炎因子 IL-10 水平升高，这一结果提示利多卡因抑制脓毒症相关性脑病大鼠中促炎因子表达来减轻炎症反应，从而改善脑损伤。

Apelin 是一种含有 77 个氨基酸的内源性神经肽，已被确定为 G 蛋白偶联受体 APJ 的同源配体，在人类和动物的全身重要器官及外周组织中均有表达。Apelin 通过与其受体 APJ 结合后发挥广泛的生物活性，包括抗氧化应激、抗细胞凋亡、抗炎症等^[20]，因此，Apelin/APJ 系统参与多种生理和病理过程的调节。Xu 等^[21]研究表明 Apelin-13 通过激活 APJ 可以减少内质网应激介导的氧化应激和神经炎症，来减轻蛛网膜下腔出血后的早期脑损伤；Angelopoulou 等^[22]研究揭示 Apelin/APJ 系统可能

通过抑制细胞凋亡和多巴胺能神经元丢失、增强自噬和抗氧化作用、抑制内质网应激以及改善纹状体突触失调，从而对帕金森疾病起到治疗作用；而 Dai 等^[23]研究指出 Apelin-13 通过改善下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴和海马糖皮质激素受体功能障碍、上调脑源性神经营养因子对抗慢性应激诱导的抑郁样表型。由此推测，Apelin/APJ 系统可能是精神病及神经性疾病的潜在治疗靶点。本研究检测结果显示，脓毒症相关性脑病大鼠脑组织内 Apelin 与 APJ 表达水平下调，经利多卡因治疗后脑组织内 Apelin 与 APJ 表达水平明显上调；此外，为了进一步明确激活 Apelin/APJ 系统在脓毒症相关性脑病中的作用，在利多卡因治疗的同时使用 APJ 拮抗剂 F13A 处理大鼠后，脑组织损伤未见明显改善，血清中促炎因子 IL-6 与 TNF- α 水平升高、抑炎因子 IL-10 水平降低，神经元凋亡数目增加。由此说明，利多卡因可能通过激活 Apelin/APJ 信号系统从而保护脓毒症相关性脑病大鼠脑损伤。

综上，本研究表明利多卡因能够改善脓毒症相关性脑病大鼠认知功能障碍，抑制炎症反应，减少神经元损伤与凋亡，从而对脓毒症相关性脑病大鼠发挥保护作用，该作用可能是通过激活 Apelin/APJ 系统实现的。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Mazeraud A, Righy C, Bouchereau E, et al. Septic-associated encephalopathy: A comprehensive review [J]. *Neurotherapeutics*, 2020, 17(2): 392-403.
- [2] Catarina A V, Branchini G, Bettoni L, et al. Sepsis-associated encephalopathy: From pathophysiology to progress in experimental studies [J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(6): 2770-2779.
- [3] Yang K, Chen J, Wang T, et al. Pathogenesis of sepsis-associated encephalopathy: More than blood-brain barrier dysfunction [J]. *Mol Biol Rep*, 2022, 49(10): 10091-10099.
- [4] Zhao L, Gao Y, Guo S, et al. Sepsis-associated encephalopathy: Insight into injury and pathogenesis [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2021, 20(2): 112-124.
- [5] Soto G, Naranjo González M, Calero F. Intravenous lidocaine infusion [J]. *Rev Esp Anesthesiol Reanim (Engl Ed)*, 2018, 65(5): 269-274.
- [6] Foo I, Macfarlane A J R, Srivastava D, et al. The use of intravenous lidocaine for postoperative pain and recovery: International consensus statement on efficacy and safety [J]. *Anaesthesia*, 2021, 76(2): 238-250.

- [7] 杨强, 常玉林, 姚忠岩, 等. 利多卡因对脓毒症大鼠预后后的影响 [J]. 河北医药, 2015, 37(6): 836-839.
- [8] Zheng B, Yang H, Zhang J, *et al.* Lidocaine alleviates sepsis-induced acute lung injury in mice by suppressing tissue factor and matrix metalloproteinase-2/9 [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 3827501.
- [9] 程梅, 董晓筠, 朱彬. 利多卡因对脓毒症大鼠心肌损伤及 Nrf2/HO-1 通路的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(4): 634-639.
- [10] Moghadam A D, Hasanzadeh H, Moghadam F D. Evaluation of the effect of intranasal lidocaine in the treatment of spasticity in patients with traumatic brain injury [J]. *Anesth Pain Med*, 2021, 11(4): e115849.
- [11] 郭慧, 李旭蕊, 曲珍珍, 等. 高压氧调控 TLR4/NF- κ B 通路对脓毒症大鼠海马区细胞凋亡的影响 [J]. 河北医学, 2022, 28(1): 1-6.
- [12] 徐桂萍, 麦丽帕特·伊力艾克拜尔, 张宇轩, 等. 利多卡因对脓毒症大鼠肺损伤的影响 [J]. 临床麻醉学杂志, 2021, 37(12): 1293-1296.
- [13] Atterton B, Paulino M C, Povoia P, *et al.* Sepsis associated delirium [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2020, 56(5): 240.
- [14] Peng X, Luo Z, He S, *et al.* Blood-brain barrier disruption by lipopolysaccharide and sepsis-associated encephalopathy [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 768108.
- [15] Johnson M Z, Crowley P D, Foley A G, *et al.* Effect of perioperative lidocaine on metastasis after sevoflurane or ketamine-xylazine anaesthesia for breast tumour resection in a murine model [J]. *Br J Anaesth*, 2018, 121(1): 76-85.
- [16] Zhang S, Li Y, Tu Y. Lidocaine attenuates CFA-induced inflammatory pain in rats by regulating the MAPK/ERK/ NF- κ B signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(3): 211.
- [17] Yin Q, Sun L, Cai X, *et al.* Lidocaine ameliorates psoriasis by obstructing pathogenic CGRP signaling mediated sensory neuron?dendritic cell communication [J]. *J Invest Dermatol*, 2022, 142(8): 2173-2183.
- [18] Boeddha N P, Bycroft T, Nadel S, *et al.* The inflammatory and hemostatic response in sepsis and meningococemia [J]. *Crit Care Clin*, 2020, 36(2): 391-399.
- [19] Kaukonen K M, Bailey M, Pilcher D, *et al.* Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(17): 1629-1638.
- [20] Ilaghi M, Soltanizadeh A, Amiri S, *et al.* The apelin/APJ signaling system and cytoprotection: Role of its cross-talk with kappa opioid receptor [J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 936: 175353.
- [21] Xu W, Li T, Gao L, *et al.* Apelin-13/APJ system attenuates early brain injury via suppression of endoplasmic reticulum stress-associated TXNIP/NLRP3 inflammasome activation and oxidative stress in a AMPK-dependent manner after subarachnoid hemorrhage in rats [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 247.
- [22] Angelopoulou E, Paudel Y N, Bougea A, *et al.* Impact of the apelin/APJ axis in the pathogenesis of Parkinson's disease with therapeutic potential [J]. *J Neurosci Res*, 2021, 99(9): 2117-2133.
- [23] Dai T T, Wang B, Xiao Z Y, *et al.* Apelin-13 upregulates BDNF against chronic stress-induced depression-like phenotypes by ameliorating HPA axis and hippocampal glucocorticoid receptor dysfunctions [J]. *Neuroscience*, 2018, 390: 151-159.

[责任编辑 高源]