

氟西汀对脓毒症小鼠认知功能的影响

周翠华 王菲 姚跃 吴子一 姚昊

【摘要】目的 探讨氟西汀对脓毒症小鼠认知功能障碍和神经炎症的影响。**方法** SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 69 只, 3~4 月龄, 体重 20~30 g。采用随机数字表法将小鼠分为三组: 生理盐水组 (NS 组)、脓毒症组 (S 组) 和脓毒症+氟西汀组 (SF 组), 每组 23 只。在小鼠右侧海马组织 CA1 区植入 8-通道线性硅探针记录局部场电位 (LFP), 研究 γ 震荡强度变化, 并根据“两次打击”学说制备脓毒症小鼠模型。S 组和 SF 组腹腔注射脂多糖 (LPS) 3 mg/kg, NS 组在相同时点腹腔注射等体积生理盐水。注射 1 d 后, S 组和 SF 组每日暴露在 4 种随机压力源之下, 持续 21 d; SF 组于注射 LPS 1 周后每日予氟西汀 20 mg/kg, 持续至行为学测试结束。压力源暴露结束后, 所有小鼠进行行为学测试, 测试项目包括旷场实验、Y-迷宫、新奇事物识别实验和糖水偏好实验, 分别记录中央区域停留时间和运动距离、Y-迷宫交替率、辨别指数和 γ 震荡强度、糖水偏好率。糖水偏好试验结束后即刻处死小鼠获得脑组织, 采用 MSD 法检测 IL-6、IL-1、IL-10 浓度。**结果** 与 NS 组比较, S 组运动距离明显延长 ($P < 0.05$), Y-迷宫交替率、辨别指数、糖水偏好率明显降低 ($P < 0.05$), γ 震荡强度明显减弱 ($P < 0.05$), 海马组织 IL-6 浓度明显升高 ($P < 0.05$)。与 S 组比较, SF 组运动距离明显缩短 ($P < 0.05$), Y-迷宫交替率、辨别指数、糖水偏好率明显升高 ($P < 0.05$), γ 震荡强度明显增强 ($P < 0.05$), 海马组织 IL-6 浓度明显降低 ($P < 0.05$)。三组海马组织 IL-1 和 IL-10 浓度差异无统计学意义。NS 组和 SF 组各项指标差异均无统计学意义。**结论** 氟西汀可以改善小鼠行为, 降低海马组织促炎因子浓度, 改善脓毒症小鼠认知功能。

【关键词】 氟西汀; 脓毒症; 认知障碍; 神经网络

Effect of fluoxetine on cognitive function in septic mice ZHOU Cuihua, WANG Fei, YAO Yue, WU Ziyi, YAO Hao. Cardiovascular Center of the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210009, China

Corresponding author: YAO Hao, Email: yaohao@njmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of fluoxetine on cognitive dysfunction and neuroinflammation in sepsis mice. **Methods** Sixty-nine SPF male C57BL/6 mice, aged 3–4 months and weighing 20–30 g, were divided into 3 groups using random number table: saline group (group NS), sepsis group (group S) and sepsis plus fluoxetine group (group SF), 23 mice in each group. An 8-channel linear in silico probe recording local field potential (LFP) was implanted in the CA1 region of the right hippocampal tissue to investigate changes in γ shock intensity, and a mouse model of sepsis was prepared according to the “two hits” theory. Sepsis mouse model was established according to the theory of “two-hits”. Lipopolysaccharide (LPS) 3 mg/kg was injected intraperitoneally in groups S and SF, while group NS was injected with equal volume saline at the same time. One day later, groups S and SF were then randomly exposed to four stressors for 21 consecutive days. One week after LPS injection, group SF was given fluoxetine 20 mg/kg till the end of the behavioral tests. After the completion of the stress exposure, all mice were subjected to behavioral testing, and the test items included absenteeism experiment, Y-maze, novelty identification experiment, and sugar water preference experiment, the central region stay time and motion distance, Y-maze alternating rate, recognition index (RI) and γ shock intensity, sugar water preference rate were recorded. Mice were executed immediately after the sugar water preference test to obtain brain tissue. The concentrations of the IL-6, IL-1, IL-10 were detected by MSD. **Results** Compared with the group NS, the travel distance was significantly increased in group S ($P < 0.05$), the Y-maze alternation rate, RI, sugar-water preference rate and γ shock intensity in group S were significantly decreased ($P < 0.05$), the level of IL-6

DOI: 10.12089/jca.2022.03.014

基金项目: 江苏省社会发展重点研发专项 (BE2021748, BE2021749)

作者单位: 210009 南京医科大学第二附属医院心血管中心 (周翠华、姚跃、吴子一、姚昊), 麻醉科 (王菲)

通信作者: 姚昊, Email: yaohao@njmu.edu.cn

in the hippocampus was significantly increased in group S ($P < 0.05$). Compared with the group S, the travel distance was significantly decreased in group SF ($P < 0.05$), the Y-maze alternation rate, RI, sugar-water preference rate and γ shock intensity in group SF were significantly increased ($P < 0.05$), the level of IL-6 in the hippocampus was significantly decreased in group SF ($P < 0.05$). There were no significant differences in the level of IL-6 and IL-10 in the hippocampus among the three groups. There were no significant differences between groups NS and SF. **Conclusion** Fluoxetine improves mouse behavior, reduces the expression of proinflammatory factors in hippocampal tissue and improves cognitive function in sepsis mice.

【Key words】 Fluoxetine; Sepsis; Cognitive impairment; Neural network

宿主对感染的反应失调会引发脓毒症,是一种危及生命的器官障碍综合征^[1]。除心脏原因外,脓毒症是 ICU 收治的危重患者中最常见的病因^[2]。近年来,脓毒症发病率不断升高,且 ICU 脓毒症患者的生存率也随医疗技术的进步明显改善^[2-3]。虽然目前缺乏对抗脓毒症的特效药,但随着医疗技术的发展,脓毒症患者的生存率明显升高^[2]。ICU 脓毒症转出患者长期存在精神认知障碍,影响康复进程^[1-2]。氟西汀是一种选择性五羟色胺(5-hydroxy tryptamine, 5-HT)再摄取抑制药,可以提高脑组织 5-HT 浓度,抑制促炎因子表达,是临床治疗抑郁症和焦虑症的一线用药^[4]。本研究拟观察氟西汀对脓毒症小鼠认知功能的影响,探讨可能的作用机制。

材料与方 法

实验动物 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 69 只, 3~4 月龄,体重 20~30 g,由南京大学金陵医院动物中心提供,经实验动物福利和应用委员会批准(ZD20190825),12/12 h 昼夜交替,温度为 22~26 °C,湿度为 45%~65%,自由饮水,标准饮食。

脓毒症小鼠模型制备^[5] 采用“两次打击”学说制备脓毒症小鼠模型,腹腔注射脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)3 mg/kg 作为“第一次打击”;每日暴露在 4 种随机压力源之下,持续 21 d(慢性不可预测应激),作为“第二次打击”,压力源包括:6 h 的身体束缚、倾斜鼠笼 45° 过夜、夜间水或食物被随机剥夺、夜间气味、夜间床上用品潮湿、白天强制照明 3 h、夜间噪音、夜间照明。小鼠出现焦虑、抑郁和认知功能障碍,提示脓毒症小鼠模型制备成功。为了保证模型的稳定,制备模型初期每组预备 23 只小鼠。脓毒症小鼠模型制备结束后,S 组小鼠存活 18 只,SF 组存活 17 只,死亡率为 20%。

实验分组与处理 采用随机数字表法将小鼠分为三组:生理盐水组(NS 组)、脓毒症组(S 组)和脓毒症+氟西汀组(SF 组)。S 组和 SF 组腹腔注射 LPS 3 mg/kg 后每日暴露在 4 种随机压力源之下,

持续 21 d,NS 组在相同时点腹腔注射等体积生理盐水。SF 组于注射 LPS 1 周后每日予氟西汀 20 mg/kg,持续至行为学测试结束。

行为学测试 完成“两次打击”后,每组随机选择 12 只小鼠进行行为学测试。行为学试验开始前 1 h 所有小鼠提前适应环境,行为学测试顺序为旷场实验、Y-迷宫、新奇事物识别实验、糖水偏好实验,每天进行一项测试,所有行为学测试均于上午 9:00—12:00 进行。

旷场实验 采用长×宽×高为 50 cm×50 cm×40 cm 的非密闭箱子,首先将小鼠放于箱子正中央,然后让其自由活动 5 min,并实时记录其运动轨迹。由计算机视频跟踪软件计算中央区域停留时间和运动距离。每只小鼠测试前使用 75% 酒精充分清洗箱子,去除之前小鼠遗留下来的味道和排泄物。

Y-迷宫 将小鼠放在含有 3 个手臂的有机玻璃中(长×宽×高为 30 cm×14 cm×15 cm),彼此呈 120°,分别标记为 A、B、C。将小鼠面朝 A 放在 Y-迷宫的中央区域,并且允许小鼠自由活动 8 min,记录进入每个臂的次数和顺序。若小鼠连续进入 3 个手臂而不重复进入之前访问过的臂时,将这种现象称为交替。Y-迷宫交替率=交替次数/(进臂总次数-2)×100%。

新奇事物识别实验 在长×宽×高为 40 cm×60 cm×50 cm 的开放场地中放置三个物体,其中的两个物体是相似的,第三个物体则是明显区别于前两个物体的。首先小鼠被连续两天放置在空旷的测试场地中 10 min,第 3 天让小鼠暴露在放置有两个相似物体的测试场地中 10 min。1 h 后将其中一个物体被另一个颜色和形状都不同的物体替换,再让小鼠进入测试场地测试 10 min。视频跟踪系统记录小鼠对新对象和熟悉对象的探索时间。辨别指数=与新对象接触时间/(与新对象接触时间+与熟悉对象接触时间)×100%。

糖水偏好实验 给小鼠同时提供两瓶饮用水,一瓶为含有 1% 的蔗糖溶液,另一瓶为无添加物的

自来水。小鼠自由饮水 12 h 后, 调换两瓶水的位置, 调换 12 h 后, 对两个瓶子分别进行称重。糖水偏好率 = 糖水消耗量 / (糖水消耗量 + 自来水消耗量) × 100%。

体内电生理学测试 制备脓毒症小鼠模型前 7 d 行电生理电极植入术。静脉注射苯巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉小鼠后, 将其放置在带有精密微操纵器的立体定向框架, 依次去除颅骨和硬脑膜之后, 根据小鼠脑图谱确定海马组织右侧 CA1 区域, 将 8-通道线性硅探针植入预定区域。在小鼠进行新奇物体识别实验同时, 记录局部场电位 (local field potential, LFP)。信号以 0.3 ~ 300 Hz 的通带进行滤波, 并在 2 000 Hz 下进一步放大和数字化。记录的 LFP 被一个 50 Hz 的缺口滤波器过滤, 以消除电源线伪影。对于 LFP 分析, 宽带记录在 1 000 Hz 下采样。采用 Neuro Explorer 软件分析数据, 获得 γ 震荡数据。将 NS 组 γ 震荡强度设定为 100%, S 组和 SF 组分别与 NS 组比较, 测得相对强度。

MSD 法 行为学测试结束后, 每组随机选择 6 只小鼠, 处死并分离出海马组织, 加入 PBS 缓冲液和蛋白酶抑制剂, 超声波细胞粉碎机裂解匀浆, 离心后取上清液并稀释。按照标准, 将稀释后的蛋白质提取物移入 96 孔板中, 每孔装 50 μ l。然后将 96 孔板密封, 在室温下孵化 2 h, 然后用 PBS 清洗三次。加入检测抗体后, 再孵育 2 h, 用 PBS 清洗三次后加入读取溶液, 采用 MSD 板读取器立即读取 IL-6、IL-1、IL-10 浓度。

统计分析 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据分析。正态分布计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

行为学测试 与 NS 组比较, S 组运动距离明显延长, Y-迷宫交替率、辨别指数、糖水偏好率明显降

低 (P < 0.05)。与 S 组比较, SF 组运动距离明显缩短, Y-迷宫交替率、辨别指数、糖水偏好率明显升高 (P < 0.05)。NS 组和 SF 组上述指标差异均无统计学意义。三组中央区域停留时间差异无统计学意义 (表 1)。

震荡强度 S 组 γ 震荡强度明显弱于 NS 组 (P < 0.05), SF 组 γ 震荡强度明显强于 S 组 (P < 0.05), NS 组和 SF 组 γ 震荡强度差异无统计学意义 (图 1)。

促炎因子浓度 S 组海马组织 IL-6 浓度明显高于 NS 组 (P < 0.05), SF 组海马组织 IL-6 浓度明显低于 S 组 (P < 0.05), NS 组和 SF 组海马组织 IL-6 浓度差异无统计学意义, 三组海马组织 IL-1 和 IL-10 浓度差异无统计学意义 (表 2)。

讨 论

脓毒症是一种由感染引起的涉及生理、病理和生化异常的综合征, ICU 入住率高^[3]。住院患者脓毒症发病率为 1% ~ 2%, 近年来有升高趋势^[3,6]。随着医疗护理康复专业的共同发展, ICU 脓毒症转出患者人数不断增加, 但身体机能下降和认知障碍是出院患者的长期后遗症^[2], 具有重大的健康和社会经济影响。研究^[2,7]表明, 约 50% ICU 脓毒症转出患者表现出抑郁焦虑样行为, 外界环境对认知功能的影响可能更大。

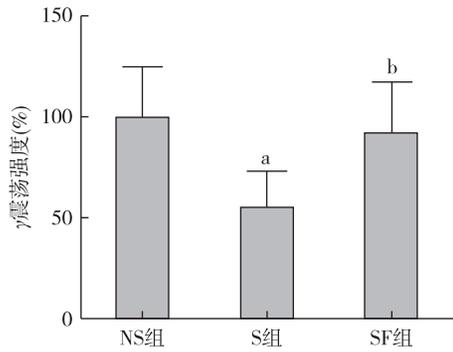
传统脓毒症模型仅考虑 LPS 对机体的影响^[8], 但外界环境对精神症状的影响更大, 传统脓毒症模型并不能真实模拟脓毒症 ICU 转出患者的认知功能。因此, 本研究选用“二次打击”脓毒症模型来研究 ICU 脓毒症转出患者认知功能障碍的病理基础。本研究结果显示脓毒症小鼠死亡率约 20%, 海马组织促炎细胞因子 IL-6 浓度升高, 并且出现抑郁焦虑症状与认知功能损害, 表明脓毒症模型建模成功。

慢性不可预测应激可引起神经炎症的激活和促炎因子的积累, 导致多种精神疾病发生^[9]。研究^[10-13]表明, IL-6、IL-1 等促炎细胞因子高表达与重

表 1 三组小鼠行为学测试的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	中央区域时间 (min)	运动距离 (cm)	Y-迷宫交替率 (%)	辨别指数 (%)	糖水偏好率 (%)
NS 组	12	22.6 \pm 13.3	28.8 \pm 8.5	66.8 \pm 8.4	65.1 \pm 3.0	84.3 \pm 6.0
S 组	12	14.7 \pm 8.8	44.4 \pm 6.2 ^a	53.6 \pm 9.1 ^a	50.1 \pm 4.2 ^a	68.5 \pm 18.6 ^a
SF 组	12	22.6 \pm 9.4	21.6 \pm 12.1 ^b	64.7 \pm 7.3 ^b	63.0 \pm 2.9 ^b	83.8 \pm 8.0 ^b

注: 与 NS 组比较, ^aP < 0.05; 与 S 组比较, ^bP < 0.05



注:与 NS 组比较,^a $P < 0.05$;与 S 组比较,^b $P < 0.05$

图 1 三组小鼠 γ 震荡强度的比较

表 2 三组小鼠海马组织促炎因子浓度的比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	IL-6	IL-1	IL-10
NS 组	6	0.21±0.04	0.10±0.08	0.11±0.01
S 组	6	0.35±0.11 ^a	0.11±0.00	0.10±0.02
SF 组	6	0.21±0.09 ^b	0.11±0.01	0.10±0.03

注:与 NS 组比较,^a $P < 0.05$;与 S 组比较,^b $P < 0.05$

度抑郁症和创伤后应激障碍密切相关。其中高浓度 IL-6 破坏长时程增强效应,可以损害海马组织的学习和记忆功能^[10]。 γ 震荡 (30~120 Hz) 是大脑神经网络活动的一个标志,控制局部增益,促进神经元组件之间的传输^[10]。 γ 震荡的产生依赖于 γ -氨基丁酸 (gamma-aminobutyric acid, GABA) 能神经元的完整^[10],慢性应激可以破坏海马组织 GABA 能神经元完整性,打破神经网络协调,是抑郁症和精神分裂症发生发展的关键因素^[10,14-15]。氟西汀作为临床治疗抑郁症的一线用药,可迅速吸收至中枢神经系统,升高脑组织 5-HT 浓度,降低脑组织促炎因子浓度,改善抑郁症状^[4]。氟西汀临床起效时间为 2~3 周,因此,本实验研究参考临床用药指南设计氟西汀干预时间^[16]。Khodanovich 等^[17]研究表明,氟西汀还可以促进脑缺血大鼠海马组织神经的增殖,促进神经网络恢复。本实验研究结果显示,脓毒症小鼠有明显的行为学改变,并且 γ 震荡强度明显减弱、海马组织 IL-6 浓度明显升高。使用氟西汀后小鼠行为学得到改善, γ 震荡强度增强、海马组织 IL-6 浓度降低,提示氟西汀可以改善脓毒症小鼠的神经炎症和行为学异常。

持续性神经炎症被认为是几乎所有神经退行性疾病的主要病理组成部分。慢性持续应激导致中枢神经系统小胶质细胞被激活,引起促炎细胞因子 IL-6 堆积^[10]。高浓度的 IL-6 可诱导兴奋性毒性级联反

应^[8]。其中 IL-6 在胶质细胞中特异性的过表达降低海马组织 GABA 阳性和微清蛋白 (parvalbumin, PV) 阳性的神经元的数量和活性^[9]。GABA 能信号传导的丢失会降低中枢神经系统对过度谷氨酸能信号传导的耐受性,从而进一步促进神经炎症,抑制 PV 神经元,导致神经网络功能的失调,最终引起抑郁焦虑样行为和认知功能障碍。

本实验研究的不足之处:本实验未设置单纯慢性不可预测应激组,后期会进一步改善。慢性不可预测应激时长是否对抑郁焦虑和认知功能障碍程度有影响,以及不同剂量氟西汀是否影响治疗效果,有待进一步研究。

综上所述,LPS 联合慢性不可预测应激模拟脓毒症会导致小鼠产生焦虑抑郁样行为和认知功能障碍,小鼠 γ 震荡强度减弱、海马组织 IL-6 浓度升高。氟西汀可以改善小鼠行为,降低海马组织促炎因子浓度,改善脓毒症小鼠认知功能。

参 考 文 献

- [1] Tom van der Poll, Frank L van de Veerdonk, Brendon P Scieluna, et al. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(7): 407-420.
- [2] Mao M, Li S, Zong M, et al. Two-hit model of postintensive care syndrome induced by lipopolysaccharide challenge and subsequent chronic unpredictable stress in mice. *Int Immunopharmacol*, 2019, 70: 446-458.
- [3] 江伟, 杜斌. 中国脓毒症流行病学现状. *医学研究生学报*, 2019, 32(1): 5-8.
- [4] Huggins EL, Bloom SL, Stollings JL, et al. A clinic model: post-intensive care syndrome and post-intensive care syndrome-family. *AACN Adv Crit Care*, 2016, 27(2): 204-211.
- [5] Mao M, Li S, Zong M, et al. Two-hit model of postintensive care syndrome induced by lipopolysaccharide challenge and subsequent chronic unpredictable stress in mice. *Int Immunopharmacol*, 2019, 70: 446-458.
- [6] Min Huang, Shaoli Cai, Jingqian Su. The pathogenesis of sepsis and potential therapeutic targets. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(21): 5376.
- [7] Seán T Anderson, Seán Commins, Paul N Moynagh. Lipopolysaccharide-induced sepsis induces long-lasting affective changes in the mouse. *Brain Behav Immun*, 2015, 43: 98-109.
- [8] Anderson ST, Commins S, Moynagh PN, et al. Lipopolysaccharide-induced sepsis induces long-lasting affective changes in the mouse. *Brain Behav Immun*, 2015, 43: 98-109.
- [9] Crowley T, Cryan JF, Downer EJ, et al. Inhibiting neuroinflammation: the role and therapeutic potential of GABA in neuro-immune interactions. *Brain Behav Immun*, 2016, 54: 260-277.
- [10] Deng SL, Chen JG, Wang F. Microglia: a central player in depression. *Curr Med Sci*, 2020, 40(3): 391-400.

[11] Goldsmith DR, Haroon E, Woolwine BJ, et al. Inflammatory markers are associated with decreased psychomotor speed in patients with major depressive disorder. *Brain Behav Immun*, 2016, 56: 281-288.

[12] Mendoza C, Barreto GE, Ávila-Rodríguez M, et al. Role of neuroinflammation and sex hormones in war-related PTSD. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 434: 266-277.

[13] 谢泽敏, 徐世霞, 徐宁, 等. 神经病理性疼痛致抑郁大鼠海马促炎细胞因子含量的变化. *临床麻醉学杂志*, 2017, 33(8): 797-800.

[14] Fitzgerald PJ, Watson BO. Gamma oscillations as a biomarker for major depression: an emerging topic. *Transl Psychiatry*, 2018, 8(1): 177.

[15] Singh F, Shu IW, Hsu SH, et al. Modulation of frontal gamma oscillations improves working memory in schizophrenia. *Neuroimage Clin*, 2020, 27: 102339.

[16] 刘燕, 高哲石. 选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂的系统回顾与用药指南. *国外医药*, 2000, 21(2): 83-86.

[17] Khodanovich M, Kisel A, Kudabaeva M, et al. Effects of fluoxetine on hippocampal neurogenesis and neuroprotection in the model of global cerebral ischemia in rats. *Int. J Mol Sci*, 2018, 19(1): 162.

(收稿日期:2021-04-24)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《临床麻醉学杂志》可直接使用缩略语的词汇

美国麻醉医师学会 (ASA)	聚合酶链反应 (PCR)	美国纽约心脏病协会 (NYHA)
酶联免疫吸附试验 (ELISA)	N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA)	吸入氧浓度 (FiO ₂)
γ-氨基丁酸 (GABA)	血浆靶浓度 (C _p)	白细胞介素 (IL)
效应室靶浓度 (C _e)	肿瘤坏死因子 (TNF)	心率 (HR)
血红蛋白 (Hb)	血压 (BP)	血小板 (Plt)
收缩压 (SBP)	红细胞压积 (Hct)	舒张压 (DBP)
红细胞计数 (RBC)	心率与收缩压乘积 (RPP)	白细胞计数 (WBC)
平均动脉压 (MAP)	体重指数 (BMI)	中心静脉压 (CVP)
心肺转流 (CPB)	脉搏血氧饱和度 (SpO ₂)	靶控输注 (TCI)
潮气量 (V _T)	患者自控静脉镇痛 (PCIA)	呼吸频率 (RR)
患者自控硬膜外镇痛 (PCEA)	呼气末二氧化碳分压 (P _{ET} CO ₂)	患者自控镇痛 (PCA)
动脉血二氧化碳分压 (PaCO ₂)	呼气末正压 (PEEP)	动脉血氧分压 (PaO ₂)
间歇正压通气 (IPPV)	静脉血氧分压 (PvO ₂)	最低肺泡有效浓度 (MAC)
静脉血二氧化碳分压 (PvCO ₂)	脑电双频指数 (BIS)	视觉模拟评分法 (VAS)
听觉诱发电位指数 (AAI)	重症监护病房 (ICU)	麻醉后恢复室 (PACU)
四个成串刺激 (TOF)	天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)	心电图 (ECG)
丙氨酸氨基转移酶 (ALT)	警觉/镇静状态评定 (OAA/S)	核因子 (NF)
磁共振成像 (MRI)	羟乙基淀粉 (HES)	计算机断层扫描 (CT)
伊红染色 (HE)	术后认知功能障碍 (POCD)	急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)