

灯盏花素对宫内炎症致早产大鼠脑损伤的保护作用及其机制探讨

王思思¹ 谢双双¹ 孟玥秀¹ 张翔云¹ 刘云春¹ 王玲玲² 王艳飞²

(河北北方学院附属第一医院 1.妇产科; 2.新生儿科, 河北张家口 075000)

[摘要] **目的** 探讨灯盏花素对宫内炎症致早产大鼠脑损伤的保护作用及其机制。**方法** 向孕鼠腹腔内注射脂多糖制备宫内炎症致早产大鼠脑损伤模型, 孕鼠和仔鼠分别随机分为对照组、模型组、灯盏花素低剂量(45 mg/kg)组、灯盏花素高剂量(90 mg/kg)组、灯盏花素高剂量(90 mg/kg)+ML385[核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)抑制剂, 30 mg/kg]组($n=10$)。测定各组孕鼠产出的仔鼠存活数和体重; 苏木精-伊红染色法观察各组孕鼠子宫、胎盘病理形态及仔鼠脑组织病理形态; 免疫荧光染色法检测各组仔鼠脑皮质离子钙接头蛋白分子-1(ionized calcium-binding adaptor molecule-1, IBA-1)与核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3)共表达情况; 酶联免疫吸附法检测各组仔鼠脑组织中白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-8、IL-1 β 水平; 免疫印迹法检测各组仔鼠脑组织中Nrf2通路相关蛋白表达。**结果** 与对照组相比, 模型组孕鼠子宫、胎盘组织及仔鼠脑组织产生病理损伤, 仔鼠脑皮质产生严重小胶质细胞焦亡, 仔鼠存活数和体重、脑组织中Nrf2及血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)蛋白表达水平降低($P<0.05$), 仔鼠脑组织中IBA-1和NLRP3共表达相对荧光强度、炎性因子IL-6、IL-8及IL-1 β 水平、NLRP3及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(caspase-1)蛋白表达均升高($P<0.05$); 与模型组相比, 灯盏花素低、高剂量组孕鼠子宫、胎盘组织及仔鼠脑组织病理损伤均减轻, 仔鼠存活数和体重、Nrf2及HO-1蛋白表达水平均升高($P<0.05$), 仔鼠脑组织中IBA-1和NLRP3共表达相对荧光强度、炎性因子IL-6、IL-8及IL-1 β 水平、脑组织中NLRP3及caspase-1蛋白表达均降低($P<0.05$); 且灯盏花素高剂量组效果优于灯盏花素低剂量组, 差异有统计学意义($P<0.05$); ML385可显著抑制灯盏花素高剂量组的干预效果($P<0.05$)。**结论** 灯盏花素可通过激活Nrf2通路而抑制宫内炎症致早产大鼠脑组织炎症反应, 抑制小胶质细胞焦亡, 减轻早产大鼠脑损伤。

[中国当代儿科杂志, 2023, 25(2): 193-201]

[关键词] 宫内炎症; 灯盏花素; 脑损伤; 小胶质细胞焦亡; 核因子E2相关因子2; 早产大鼠

Protective effect of breviscapine against brain injury induced by intrauterine inflammation in preterm rats and its mechanism

WANG Si-Si, XIE Shuang-Shuang, MENG Yue-Xiu, ZHANG Xiang-Yun, LIU Yun-Chun, WANG Ling-Ling, WANG Yan-Fei. Department of Obstetrics and Gynecology, First Hospital Affiliated to Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China (Email: wangsisi927@163.com)

Abstract: Objective To study the protective effect of breviscapine against brain injury induced by intrauterine inflammation in preterm rats and its mechanism. **Methods** A preterm rat model of brain injury caused by intrauterine inflammation was prepared by intraperitoneal injections of lipopolysaccharide in pregnant rats. The pregnant rats and preterm rats were respectively randomly divided into 5 groups: control, model, low-dose breviscapine (45 mg/kg), high-dose breviscapine (90 mg/kg), and high-dose breviscapine (90 mg/kg)+ML385 [a nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) inhibitor, 30 mg/kg] ($n=10$ each). The number and body weight of the live offspring rats were measured for each group. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the pathological morphology of the uterus and placenta

[收稿日期] 2022-08-02; **[接受日期]** 2022-12-20

[基金项目] 河北省医学科学研究重点课题计划项目(20180851)。

[作者简介] 王思思, 女, 硕士, 主治医师。Email: wangsisi927@163.com。

of pregnant rats and the pathological morphology of the brain tissue of offspring rats. Immunofluorescent staining was used to measure the co-expression of ionized calcium binding adaptor molecule-1 (IBA-1) and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) in the cerebral cortex of offspring rats. ELISA was used to measure the levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), and interleukin-1 β (IL-1 β) in the brain tissue of offspring rats. Western blotting was used to measure the expression of Nrf2 pathway-related proteins in the brain tissue of offspring rats. **Results** Pathological injury was found in the uterus, and placenta tissue of the pregnant rats and the brain tissue of the offspring rats, and severe microglia pyroptosis occurred in the cerebral cortex of the offspring rats in the model group. Compared with the control group, the model group had significant reductions in the number and body weight of the live offspring rats and the protein expression levels of Nrf2 and heme oxygenase-1 (HO-1) in the brain tissue of the offspring rats ($P<0.05$), but significant increases in the relative fluorescence intensity of the co-expression of IBA-1 and NLRP3, the levels of the inflammatory factors IL-6, IL-8, and IL-1 β , and the protein expression levels of NLRP3 and caspase-1 in the brain tissue of the offspring rats ($P<0.05$). Compared with the model group, the breviscapine administration groups showed alleviated pathological injury of the uterus and placenta tissue of the pregnant rats and the brain tissue of the offspring rats, significant increases in the number and body weight of the live offspring rats and the protein expression levels of Nrf2 and HO-1 in the brain tissue of the offspring rats ($P<0.05$), and significant reductions in the relative fluorescence intensity of the co-expression of IBA-1 and NLRP3, the levels of the inflammatory factors IL-6, IL-8, and IL-1 β , and the protein expression levels of NLRP3 and caspase-1 in the brain tissue of the offspring rats ($P<0.05$). The high-dose breviscapine group had a significantly better effect than the low-dose breviscapine ($P<0.05$). ML385 significantly inhibited the intervention effect of high-dose breviscapine ($P<0.05$). **Conclusions** Breviscapine can inhibit inflammatory response in brain tissue of preterm rats caused by intrauterine inflammation by activating the Nrf2 pathway, and it can also inhibit microglial pyroptosis and alleviate brain injury.

[Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2023, 25(2): 193-201]

Key words: Intrauterine inflammation; Breviscapine; Brain injury; Microglial pyroptosis; Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; Preterm rat

宫内炎症是引起早产儿脑损伤的主要致病因素，可导致脑室周围白质软化坏死、神经元凋亡等病理现象，造成早产儿脑性瘫痪、视听及语言障碍、认知能力下降等神经系统后遗症^[1-2]。小胶质细胞激活引发的炎症级联反应和细胞焦亡是宫内感染造成早产儿脑损伤的主要机制，控制宫内感染引发的炎症和小胶质细胞焦亡是防治早产儿脑损伤的关键^[3-4]。核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)是机体主要的抗氧化分子，在各种脑损伤疾病的发生机制中起到重要调控作用，上调Nrf2可通过减轻神经炎症而抑制神经元死亡^[5]，还可抵抗脂多糖诱导的母婴炎症，防治宫内炎症引起的早产和围生期脑损伤^[6]，由此可知，Nrf2是防治宫内炎症所致早产脑损伤的重要靶点。

灯盏花素是从灯盏花中提取的一类总黄酮，有抗菌消炎、抗血栓、抗氧化、清除自由基的作用，在临床常用于脑梗死、冠心病等心脑血管疾病的治疗，可明显减轻腹腔镜全子宫切除术患者围术期应激反应及炎症反应，促进患者术后恢复^[7]。灯盏花素还可通过激活Nrf2信号通路下调炎症因子白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6水平，从而抑制大鼠液压冲击脑损伤后脑组织炎性损伤^[8]。由此推测灯盏花素可能通过激活Nrf2

信号通路而抑制宫内炎症所致早产大鼠脑损伤与小胶质细胞焦亡。

本文以灯盏花素处理宫内炎症致早产脑损伤模型大鼠，探究灯盏花素是否可通过其抗炎作用减轻宫内炎症所致早产大鼠脑损伤，以Nrf2抑制剂(ML385)和灯盏花素联合处理宫内炎症致早产脑损伤模型大鼠，检测ML385是否可逆转灯盏花素对宫内炎症致早产大鼠脑损伤的保护作用，进而探究灯盏花素对宫内炎症致早产大鼠脑损伤的保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级Sprague-Dawley大鼠购自山西医科大学实验动物中心，生产许可证号SCXK(晋)2019-0007。雄性28只，约7周龄，体重240~270 g；雌性56只，约7周龄，体重190~220 g，均在本院屏障环境动物房中心适应饲养，1周后用于实验，饲养环境温度为(24 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C，湿度为44% $\pm$ 5%，昼夜时长12 h:12 h。

1.2 主要药物、试剂及仪器

注射用灯盏花素购自湖南恒生制药股份有限公司，ML385、脂多糖、兔源抗大鼠血红素加氧酶

-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 一抗购自北京索莱宝科技有限公司, 苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色试剂盒、免疫荧光染色试剂盒-Alexa Fluor 488 标记的抗小鼠二抗、免疫荧光染色试剂盒-Alexa Fluor 555 标记的抗兔二抗、大鼠 IL-1 β 酶联免疫吸附 (ELISA) 试剂盒、RIPA 裂解液、山羊抗兔二抗、兔源抗大鼠核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 一抗、兔源抗大鼠 Nrf2 一抗、兔源抗大鼠 β -肌动蛋白 (β -actin) 一抗购自上海碧云天生物技术有限公司, 兔源抗大鼠半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (caspase-1) 一抗、小鼠源抗大鼠离子钙接头蛋白分子-1 (ionized calcium binding adaptor molecule-1, IBA-1) 一抗、兔源抗大鼠 NLRP3 一抗购自美国 Abcam 公司, BCA 法总蛋白定量测定试剂盒、IL-6 ELISA 试剂盒、IL-8 ELISA 试剂盒购自南京建成生物工程研究所, MF-53N 型倒置荧光显微镜购自苏州阿尔法生物实验器材有限公司, FlexA-200 型全波长酶标仪购自杭州奥盛仪器有限公司, E-Gel Imager 型凝胶成像系统购自广州道一科学技术有限公司。

1.3 宫内炎症致早产脑损伤仔鼠模型建立及分组给药

制备宫内炎症致早产脑损伤大鼠模型^[9]: 将雌雄大鼠以 1:2 的比例合笼, 检查阴栓选出受孕成功的雌鼠, 记为妊娠第 1 天, 于孕鼠妊娠第 16 天腹腔内注射 350 μ g/kg 脂多糖, 连续注射 2 d 至妊娠第 17 天结束, 孕期 $\leq$ 21 d 表明早产造模成功^[9]。将早产造模成功的孕鼠随机分为模型组、灯盏花素低剂量 (45 mg/kg) 组、灯盏花素高剂量 (90 mg/kg) 组^[8]、灯盏花素高剂量 (90 mg/kg) +ML385 (30 mg/kg) 组^[10], 每组 10 只孕鼠; 再随机选取 10 只孕鼠腹腔内注射等量 0.9% 氯化钠溶液作为对照组。

用 0.9% 氯化钠溶液将灯盏花素和 ML385 配制成浓度为 4.5、9 mg/mL 的灯盏花素溶液, 9 mg/mL 的灯盏花素和 3 mg/mL 的 ML385 混合药液, 各组孕鼠于妊娠第 17 天给药 (注射脂多糖后)。灯盏花素低剂量组、灯盏花素高剂量组孕鼠分别以 10 mL/kg 的剂量腹腔内注射 4.5、9 mg/mL 的灯盏花素, 使灯盏花素的剂量分别为 45 mg/kg、90 mg/kg^[8]; 灯盏花素高剂量+ML385 组孕鼠以 10 mL/kg 的剂量腹腔内注射 9 mg/mL 的灯盏花素和 3 mg/mL 的 ML385 混

合药液, 使灯盏花素和 ML385^[10] 的剂量分别为 90 mg/kg、30 mg/kg; 模型组和对照组孕鼠以 10 mL/kg 的剂量腹腔内注射 0.9% 氯化钠溶液, 每天早上 9:00 注射 1 次, 共注射 2 d。

每组的 10 只孕鼠生产后, 随机自每组所有存活仔鼠中各选出 10 只, 于出生后给药 (每天给药后送回母鼠旁喂养)。灯盏花素低剂量组、灯盏花素高剂量组仔鼠分别腹腔内注射 45 mg/kg、90 mg/kg 的灯盏花素; 灯盏花素高剂量+ML385 组仔鼠腹腔内注射 90 mg/kg 灯盏花素和 30 mg/kg 的 ML385; 模型组和对照组仔鼠以 10 mL/kg 的剂量腹腔内注射 0.9% 氯化钠溶液, 每天早上 9:00 注射 1 次, 共注射 7 d。

1.4 测定各组孕鼠产出的仔鼠存活数和体重及标本收集

各组孕鼠生产后, 计数每只孕鼠产出的仔鼠存活数, 称量每只仔鼠体重, 每组取平均值。异氟醚吸入麻醉产后的孕鼠, 分离取出子宫和胎盘, 清洗后浸没入冷冻切片所需的包埋剂中, 以液氮迅速冷冻成块后, 经专业技术人员切片得到厚为 4 μ m 的子宫和胎盘组织切片备用。

1.5 HE 染色检测各组孕鼠子宫、胎盘病理形态及仔鼠脑组织病理形态

各组仔鼠于 7 d 给药结束后 24 h, 异氟醚吸入麻醉后脱颈椎处死, 解剖分离出仔鼠大脑, 剪下 0.4 g 左脑组织加入 1 mL 0.9% 氯化钠溶液研磨匀浆, 取离心后的上清置于 -80 $^{\circ}$ C 备用; 再次剪下 0.4 g 左脑组织加入 1 mL RIPA 裂解液研磨匀浆, 100 $^{\circ}$ C 加热变性, 以 BCA 法测定离心后上清中总蛋白浓度, 置于 -80 $^{\circ}$ C 备用; 剩余左脑组织清洗后浸没入冷冻切片包埋剂中, 以液氮迅速冷冻成块后切片, 得到厚为 4 μ m 的脑组织切片, 与 1.4 中子宫和胎盘组织切片一起在室温下静置复温, 5 min 后孵育冰丙酮固定 15 min 后取出, 每只大鼠取子宫和胎盘组织切片 3 张, 同时取具有脑室周围白质结构的脑组织切片 3 张, 参照 HE 染色试剂盒说明进行, 蒸馏水洗涤后在正常光下用显微镜观察并拍照。

1.6 免疫荧光染色法检测各组仔鼠脑皮质小胶质细胞焦亡情况

取出 1.4 中各组仔鼠脑组织切片, 室温下静置复温, 5 min 后孵育冰丙酮固定, 分别孵育 3% 双氧水 5 min 后取出, 3% 牛血清白蛋白孵育 2 h 后取出, 孵育 IBA-1 和 NLRP3 一抗 (均 1:200 稀释) 过夜

后洗涤，孵育 Alexa Fluor 488 标记的抗小鼠二抗（1：100）和 Alexa Fluor 555 标记的抗兔二抗（1：100）2 h，参照免疫荧光染色试剂盒说明书进行免疫荧光染色，避光洗涤后在荧光显微镜激发光下观察 IBA-1 与 NLRP3 共表达情况并拍照。Image J 软件定量分析 IBA-1 与 NLRP3 共表达荧光强度，计算 IBA-1 与 NLRP3 共表达相对荧光强度=实验组 IBA-1 与 NLRP3 共表达荧光强度/对照组 IBA-1 与 NLRP3 共表达荧光强度。

1.7 ELISA 法检测各组仔鼠脑组织炎症细胞因子 IL-6、IL-8、IL-1 β 水平

将 1.4 中各组仔鼠脑组织样品液取出置于 4℃ 解冻，取 0.2 mL 参照 ELISA 试剂盒说明测量其中 IL-6、IL-8、IL-1 β 含量。

1.8 免疫印迹法检测各组仔鼠脑组织中 Nrf2 通路相关蛋白表达

将 1.5 中测出总蛋白浓度的各组仔鼠脑组织样品液取出，置于 4℃ 解冻后每组取出 20 μ g 总蛋白，加入适量上样缓冲液并置于 100℃ 水浴变性，通过跑电泳后湿转，将其按分子量大小分离转移至硝酸纤维素膜，根据目的蛋白分子量将其自膜上剪下后都浸入 3% 牛血清白蛋白溶液中，室温孵育 2 h 封闭蛋白非特异位点，然后分别孵育相应的 NLRP3、caspase-1、Nrf2、HO-1、 β -actin 一抗（分别按 1：1 000、1：3 000、1：2 000、1：2 000、1：2 000 稀释）、山羊抗兔二抗（1：1 500），化学发光法显影后扫描出蛋白条带图片，运用图像处理软件 Image J 分析各蛋白灰度值，以 β -actin 为内参，计算目的蛋白相对表达量。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 25.0 统计软件对数据进行统计学分析，计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示；多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 SNK- q 检验， $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 灯盏花素对仔鼠存活数和体重的影响

与对照组相比，模型组仔鼠存活数和体重降低 ($P < 0.05$)；与模型组相比，灯盏花素低、高剂量组仔鼠存活数和体重均升高 ($P < 0.05$)；与灯盏花素低剂量组相比，灯盏花素高剂量组仔鼠存活数和体重均升高 ($P < 0.05$)。与灯盏花素高剂量组相比，灯盏花素高剂量+ML385 组仔鼠存活数和体

重降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组仔鼠存活数和体重 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	仔鼠存活数 (只)	仔鼠体重 (g)
对照组	11.2 $\pm$ 1.7	7.6 $\pm$ 0.7
模型组	5.9 $\pm$ 0.6 ^a	5.1 $\pm$ 0.4 ^a
灯盏花素低剂量组	8.3 $\pm$ 0.9 ^b	6.2 $\pm$ 0.4 ^b
灯盏花素高剂量组	10.7 $\pm$ 1.1 ^{b,c}	7.4 $\pm$ 0.5 ^{b,c}
灯盏花素高剂量+ML385 组	6.1 $\pm$ 0.5 ^d	5.4 $\pm$ 0.4 ^d
<i>F</i> 值	55.870	54.735
<i>P</i> 值	<0.001	<0.000

注：a 示与对照组比较， $P < 0.05$ ；b 示与模型组比较， $P < 0.05$ ；c 示与灯盏花素低剂量组比较， $P < 0.05$ ；d 示与灯盏花素高剂量组比较， $P < 0.05$ 。

2.2 灯盏花素对孕鼠子宫、胎盘及仔鼠脑组织病理形态的影响

对照组孕鼠子宫及胎盘形态完好正常；仔鼠脑室周围白质结构完好清晰，神经纤维排列致密且走向整齐，整体形态正常无损伤。模型组孕鼠子宫及胎盘组织产生病理损伤，子宫壁和胎盘组织中有大量中性粒细胞浸润且血管充血；仔鼠脑组织产生病理损伤，脑室旁白质结构稀疏并出现软化灶，神经纤维紊乱、呈网状或条索状排列，神经元数目变少。与模型组相比，灯盏花素低、高剂量组孕鼠子宫、胎盘及仔鼠脑组织病理损伤均减轻；与灯盏花素低剂量组相比，灯盏花素高剂量组孕鼠子宫、胎盘及仔鼠脑组织病理损伤进一步减轻；与灯盏花素高剂量组相比，灯盏花素高剂量+ML385 组孕鼠子宫、胎盘及仔鼠脑组织病理损伤加重。见图 1~2。

2.3 灯盏花素对仔鼠脑皮质小胶质细胞焦亡的影响

对照组、模型组、灯盏花素低剂量组、灯盏花素高剂量组、灯盏花素高剂量+ML385 组 IBA-1 与 NLRP3 共表达相对荧光强度分别为 1.00 $\pm$ 0、3.12 $\pm$ 0.30、2.06 $\pm$ 0.33、1.29 $\pm$ 0.32、2.91 $\pm$ 0.35，组间比较差异有统计学意义 ($F=105.041$, $P < 0.001$)。与对照组相比，模型组仔鼠脑皮质产生严重小胶质细胞焦亡，IBA-1 和 NLRP3 共表达相对荧光强度升高 ($P < 0.05$)；与模型组相比，灯盏花素低、高剂量组仔鼠脑皮质小胶质细胞焦亡均减轻，IBA-1 和 NLRP3 共表达相对荧光强度降低 ($P < 0.05$)；与灯盏花素低剂量组相比，灯盏花素高剂量组仔鼠脑皮质小胶质细胞焦亡减轻，IBA-1 和

NLRP3 共表达相对荧光强度降低 ($P<0.05$); 与灯盏花素高剂量组相比, 灯盏花素高剂量+ML385 组仔鼠脑皮质小胶质细胞焦亡加重, IBA-1 和 NLRP3 共表达相对荧光强度升高 ($P<0.05$)。见图 3。

2.4 灯盏花素对仔鼠脑组织中 IL-6、IL-8 及 IL-1 β 水平的影响

与对照组相比, 模型组仔鼠脑组织中 IL-6、

IL-8 及 IL-1 β 水平升高 ($P<0.05$); 与模型组相比, 灯盏花素低、高剂量组仔鼠脑组织中 IL-6、IL-8 及 IL-1 β 水平均降低 ($P<0.05$); 与灯盏花素低剂量组相比, 灯盏花素高剂量组仔鼠脑组织中 IL-6、IL-8 及 IL-1 β 水平降低 ($P<0.05$); 与灯盏花素高剂量组相比, 灯盏花素高剂量+ML385 组仔鼠脑组织中 IL-6、IL-8 及 IL-1 β 水平升高 ($P<0.05$)。见表 2。

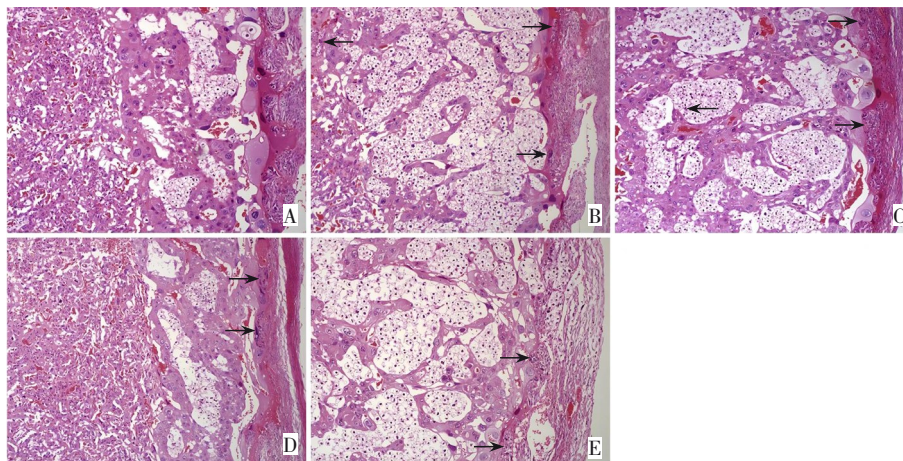


图 1 各组孕鼠子宫及胎盘病理形态 (苏木精-伊红染色, $\times 200$) A: 对照组; B: 模型组; C: 灯盏花素低剂量组; D: 灯盏花素高剂量组; E: 灯盏花素高剂量+ML385 组。对照组孕鼠子宫及胎盘形态完好正常; 模型组子宫壁和胎盘组织有大量中性粒细胞浸润且血管充血; 灯盏花素低剂量组子宫壁和胎盘组织有少量中性粒细胞浸润, 血管充血轻微; 灯盏花素高剂量组子宫壁和胎盘组织有极少中性粒细胞浸润, 血管几乎不充血; 灯盏花素高剂量+ML385 组子宫壁和胎盘组织有大量中性粒细胞浸润且血管充血。箭头所指为炎性浸润。

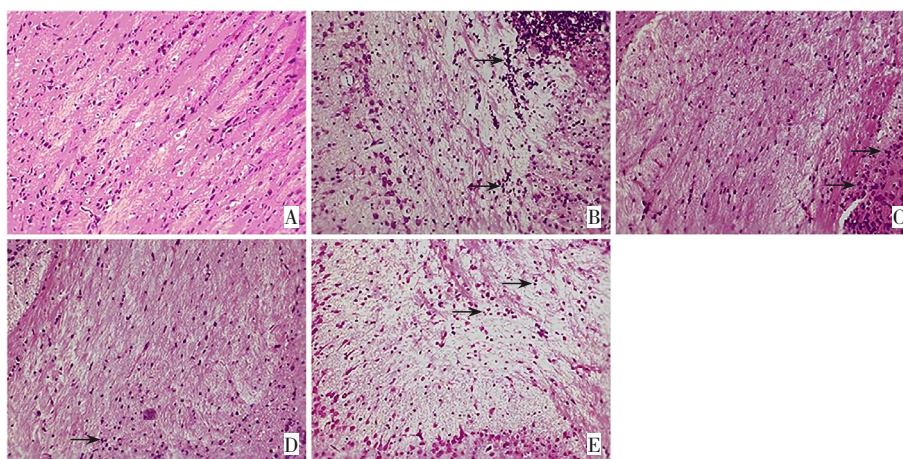


图 2 各组仔鼠脑组织病理形态 (苏木精-伊红染色, $\times 200$) A: 对照组; B: 模型组; C: 灯盏花素低剂量组; D: 灯盏花素高剂量组; E: 灯盏花素高剂量+ML385 组。对照组脑室旁白质结构完好清晰, 神经纤维排列致密且走向整齐, 整体形态正常; 模型组脑室旁白质结构稀疏并出现软化灶, 神经纤维紊乱、呈网状或条索状排列, 神经元数目变少; 灯盏花素低剂量组脑室旁白质结构稀疏程度减轻, 软化灶减少, 神经纤维紊乱减轻, 神经元数目增多; 灯盏花素高剂量组脑室旁白质结构变得紧密, 软化灶大大减少, 神经纤维致密且走向整齐, 神经元数目增多; 灯盏花素高剂量+ML385 组脑室旁白质结构稀疏并出现软化灶, 神经纤维紊乱、呈网状或条索状排列, 神经元数目变少。箭头所指为炎性浸润。

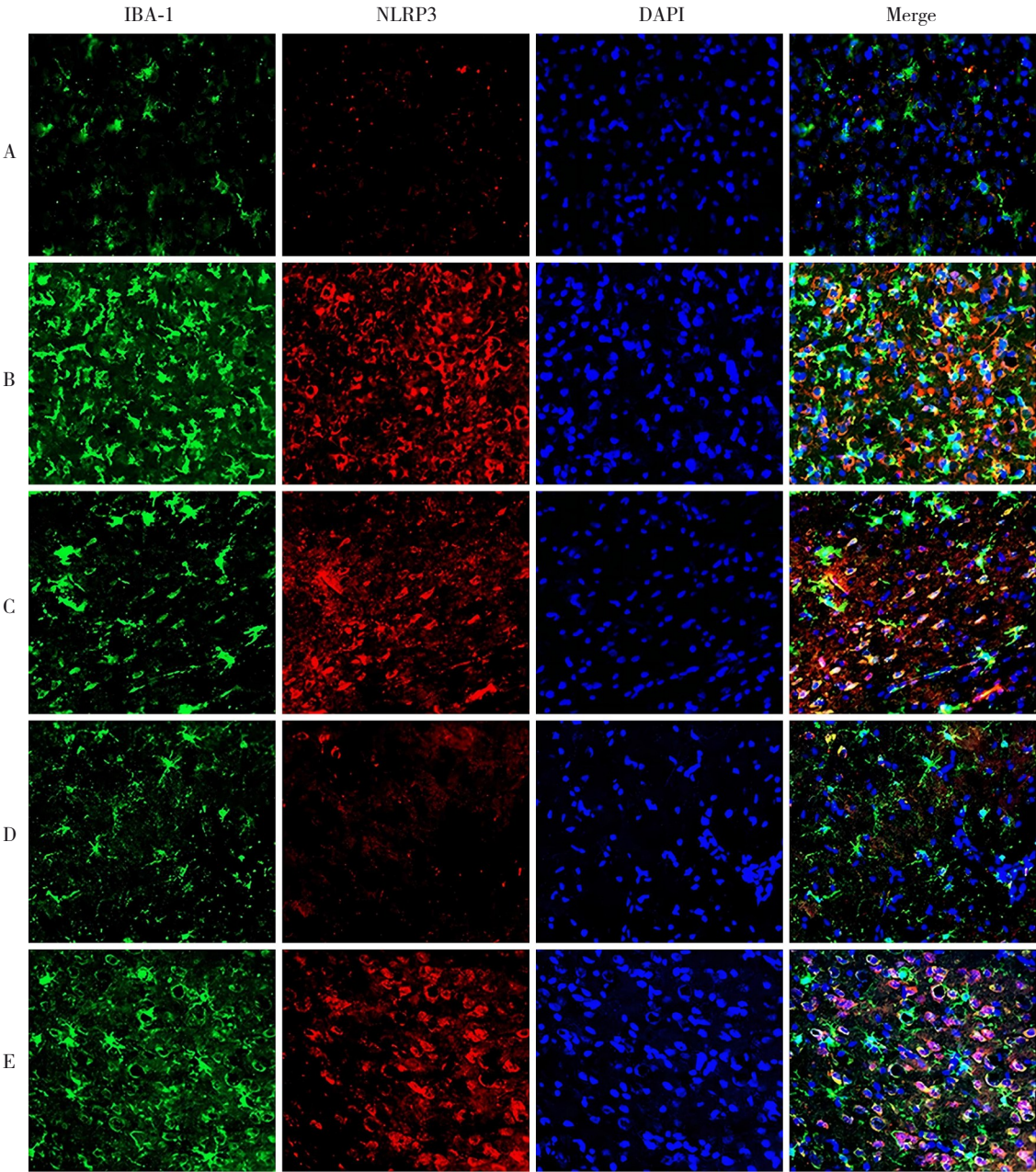


图3 各组仔鼠脑皮质中 IBA-1 和 NLRP3 共表达情况（免疫荧光染色，×200） A：对照组；B：模型组；C：灯盏花素低剂量组；D：灯盏花素高剂量组；E：灯盏花素高剂量+ML385 组。IBA-1 在仔鼠脑皮质中呈现明亮的绿色荧光；NLRP3 在仔鼠脑皮质中呈现明亮的红色荧光；DAPI 标记仔鼠脑皮质细胞核染色，呈现蓝色荧光；Merge 为各组 IBA-1、NLRP3 和 DAPI 三者合成图，IBA-1 和 NLRP3 共表达相对荧光强度越低，表明仔鼠脑皮质小胶质细胞焦亡越轻。

表2 各组仔鼠脑组织中 IL-6、IL-8 及 IL-1β 水平比较 (x̄ ± s, n=10)

组别	IL-6 (pg/g)	IL-8 (ng/g)	IL-1β (ng/g)
对照组	74 ± 10	215 ± 34	197 ± 32
模型组	253 ± 38 ^a	976 ± 91 ^a	835 ± 87 ^a
灯盏花素低剂量组	178 ± 20 ^b	628 ± 51 ^b	526 ± 50 ^b
灯盏花素高剂量组	82 ± 12 ^{b,c}	232 ± 31 ^{b,c}	214 ± 46 ^{b,c}
灯盏花素高剂量+ML385 组	241 ± 40 ^d	960 ± 91 ^d	815 ± 81 ^d
F 值	97.085	326.333	242.669
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

注：[IL-6] 白细胞介素-6；[IL-8] 白细胞介素-8；[IL-1β] 白细胞介素-1β。a 示与对照组比较，P<0.05；b 示与模型组比较，P<0.05；c 示与灯盏花素低剂量组比较，P<0.05；d 示与灯盏花素高剂量组比较，P<0.05。

2.5 灯盏花素对仔鼠脑组织中 NLPR3、caspase-1、Nrf2、HO-1 蛋白表达的影响

与对照组相比,模型组仔鼠脑组织中 NLPR3、caspase-1 蛋白表达升高 ($P<0.05$), Nrf2、HO-1 蛋白表达降低 ($P<0.05$);与模型组相比,灯盏花素低、高剂量组仔鼠脑组织中 NLPR3、caspase-1 蛋白表达降低 ($P<0.05$), Nrf2、HO-1 蛋白表达升高

($P<0.05$);与灯盏花素低剂量组相比,灯盏花素高剂量组仔鼠脑组织中 NLPR3、caspase-1 蛋白表达降低 ($P<0.05$), Nrf2、HO-1 蛋白表达升高 ($P<0.05$);与灯盏花素高剂量组相比,灯盏花素高剂量+ML385 组仔鼠脑组织中 NLPR3、caspase-1 蛋白表达升高 ($P<0.05$), Nrf2、HO-1 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。见图 4、表 3。

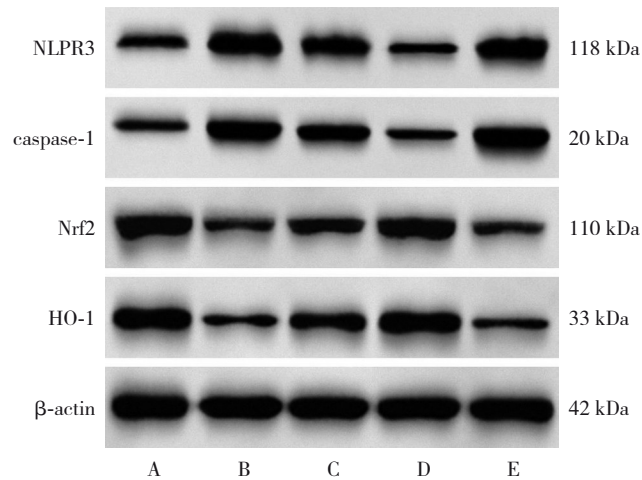


图 4 各组仔鼠脑组织中 NLPR3、caspase-1、Nrf2、HO-1 蛋白表达条带图 A: 对照组; B: 模型组; C: 灯盏花素低剂量组; D: 灯盏花素高剂量组; E: 灯盏花素高剂量+ML385 组。

表 3 各组仔鼠脑组织中 NLPR3、caspase-1、Nrf2、HO-1 蛋白相对表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	NLPR3	caspase-1	Nrf2	HO-1
对照组	0.19 ± 0.04	0.11 ± 0.02	0.90 ± 0.16	1.01 ± 0.22
模型组	0.89 ± 0.11^a	0.84 ± 0.13^a	0.32 ± 0.05^a	0.24 ± 0.04^a
灯盏花素低剂量组	0.58 ± 0.07^b	0.47 ± 0.07^b	0.53 ± 0.09^b	0.57 ± 0.08^b
灯盏花素高剂量组	$0.22 \pm 0.05^{b,c}$	$0.15 \pm 0.04^{b,c}$	$0.85 \pm 0.11^{b,c}$	$0.96 \pm 0.16^{b,c}$
灯盏花素高剂量+ML385 组	0.86 ± 0.09^d	0.81 ± 0.10^d	0.36 ± 0.06^d	0.29 ± 0.05^d
F 值	193.099	179.112	70.588	77.414
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: [NLPR3] 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3; [caspase-1] 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1; [Nrf2] 核因子 E2 相关因子 2; [HO-1] 血红素加氧酶-1。a 示与对照组比较, $P<0.05$; b 示与模型组比较, $P<0.05$; c 示与灯盏花素低剂量组比较, $P<0.05$; d 示与灯盏花素高剂量组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

宫内炎症会导致早产儿脑损伤, 不及时治疗可遗留运动、智力、精神等方面的神经系统症状, 采取积极有效措施减轻因早产导致的脑损伤可减少小儿伤残的发生, 有益于优生优育的实行^[11-12]。小胶质细胞激活引起的细胞焦亡是神经炎症导致脑损伤的主要病理基础, NLRP3 炎症小体激活是其中的关键事件, 减轻 NLRP3 诱导的小胶质细胞焦亡, 可减轻炎症反应导致的脑神经损伤^[13],

IBA-1 是小胶质细胞的标记物, 检测 NLRP3 和 IBA-1 的共表达情况可评测小胶质细胞激活引发的细胞焦亡水平^[13-14]。本研究于妊娠第 16 天、第 17 天向孕鼠腹腔内注射 350 $\mu\text{g/kg}$ 脂多糖构建宫内炎症致早产大鼠模型, 结果显示脂多糖可增强促炎性细胞因子 IL-6、IL-8 及 IL-1 β 表达, 引发孕鼠宫内炎症及子宫、胎盘组织损伤, 最终导致仔鼠脑组织产生病理损伤, 造成仔鼠存活数和体重降低, 揭示宫内炎症可造成孕鼠早产及仔鼠脑损伤。早产仔鼠脑皮质 IBA-1 和 NLRP3 共表达增强, 脑组织中

NLPR3、caspase-1蛋白表达水平升高,表明宫内炎症可导致仔鼠脑部小胶质细胞焦亡。

宫内感染能触发母婴炎症,并可诱导仔鼠神经系统炎症,造成早产大鼠髓鞘发育不良、神经元减少等脑室周围白质损伤^[15]。控制并减轻宫内炎症是防治早产小鼠脑损伤的有效手段^[16]。灯盏花素是具有显著抗炎作用的总黄酮类活性物质,临床中常用其注射液治疗颅脑损伤、脑梗死等神经系统疾病,灯盏花素联合吡拉西坦可有效降低血清炎症因子,改善中型颅脑损伤患者神经功能^[17],还可联合阿加曲班减轻急性脑梗死患者神经功能缺损^[18],抑制腹腔镜全子宫切除术患者围术期炎症及应激反应^[7],本研究以灯盏花素处理孕鼠和仔鼠,可降低仔鼠脑组织中IL-6、IL-8、IL-1 β 水平及NLPR3、caspase-1蛋白表达,升高仔鼠存活数和体重,减弱仔鼠脑皮质IBA-1和NLRP3共表达,并减轻孕鼠子宫、胎盘组织及仔鼠脑组织病理损伤,表明灯盏花素可下调促炎因子表达,抑制孕鼠宫内及仔鼠脑组织炎症发生,减轻仔鼠脑组织病理损伤及小胶质细胞焦亡,促使仔鼠发育,改善孕鼠早产现象,最终对早产大鼠发挥脑保护作用。

Nrf2可通过调控活性氧自由基和炎性因子生成介导脑部神经炎症,激活Nrf2信号可显著抑制活性氧介导的炎症和神经元细胞凋亡,减轻缺血性卒中后脑损伤^[19],还可促进抗氧化反应,下调促炎细胞因子表达,通过抗氧化和抗炎作用减轻氧自由基介导的早产儿脑损伤,对发育中大脑发挥神经保护作用^[20]。另有研究显示灯盏花素可通过上调Nrf2通路减轻液压冲击所致脑部炎症损伤^[8],因而推测激活Nrf2信号可能是灯盏花素抑制宫内炎症所致早产脑损伤大鼠小胶质细胞焦亡的作用机制。本研究结果显示,灯盏花素可提高宫内炎症致早产大鼠脑组织中Nrf2及HO-1蛋白表达,且高剂量灯盏花素作用更强,表明Nrf2信号参与灯盏花素对宫内炎症致早产大鼠脑损伤的保护作用。以灯盏花素高剂量和ML385联合处理孕鼠和仔鼠,相比灯盏花素高剂量单独处理,可降低仔鼠存活数和体重、仔鼠脑组织中Nrf2及HO-1蛋白表达水平,升高仔鼠脑组织中IL-6、IL-8、IL-1 β 水平及NLPR3、caspase-1蛋白表达水平,并增强仔鼠脑皮质IBA-1和NLRP3共表达,加重孕鼠子宫、胎盘组织及仔鼠脑组织病理损伤,表明ML385可减弱灯盏花素的抗炎作用,降低其对宫内炎症致早产大

鼠脑组织炎症反应和小胶质细胞焦亡的抑制作用,最终逆转灯盏花素的脑保护作用,揭示灯盏花素抑制宫内炎症所致早产脑损伤大鼠小胶质细胞焦亡是通过激活Nrf2信号实现的。

综上所述,本研究表明灯盏花素可通过激活Nrf2信号而减轻宫内炎症,促使胎鼠存活,并抑制早产大鼠脑组织小胶质细胞焦亡和炎症反应,缓解脑损伤,促使Nrf2信号通路传导是其作用机制之一,本研究为宫内炎症致早产儿脑损伤的防治药物选择提供了实验依据和新思路。

[参 考 文 献]

- [1] von Chamier M, Reyes L, Hayward LF, et al. Nicotine induces maternal and fetal inflammatory responses which predispose intrauterine infection risk in a rat model[J]. *Nicotine Tob Res*, 2021, 23(10): 1763-1770. PMID: 33894055. PMCID: PMC8403242. DOI: 10.1093/ntr/ntab080.
- [2] Reiss JD, Peterson LS, Nesamoney SN, et al. Perinatal infection, inflammation, preterm birth, and brain injury: a review with proposals for future investigations[J]. *Exp Neurol*, 2022, 351: 113988. PMID: 35081400. DOI: 10.1016/j.expneurol.2022.113988.
- [3] 赵雪梅, 鲁利群. 宫内炎症及宫内感染机制的研究进展[J]. *生命的化学*, 2021, 41(6): 1282-1287. DOI: 10.13488/j.smhx.20200565.
- [4] Wu X, Wang B, Ma Q, et al. Mechanism of erythropoietin-induced M2 microglia polarization via Akt/mTOR/P70S6k signaling pathway in the treatment of brain injury in premature mice and its effect on biofilm[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(5): 13021-13032. PMID: 35611764. PMCID: PMC9276024. DOI: 10.1080/21655979.2022.2073000.
- [5] Xie S, Jiang X, Doycheva DM, et al. Activation of GPR39 with TC-G 1008 attenuates neuroinflammation via SIRT1/PGC-1 α /Nrf2 pathway post-neonatal hypoxic-ischemic injury in rats[J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 226. PMID: 34645465. PMCID: PMC8513331. DOI: 10.1186/s12974-021-02289-7.
- [6] Lee JY, Song H, Dash O, et al. Administration of melatonin for prevention of preterm birth and fetal brain injury associated with premature birth in a mouse model[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2019, 82(3): e13151. PMID: 31131935. DOI: 10.1111/aji.13151.
- [7] 张代玲, 王珊珊. 灯盏花素注射液对腹腔镜全子宫切除术患者围术期应激反应及炎症反应的影响[J]. *中成药*, 2018, 40(9): 2114-2116. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2018.09.054.
- [8] 胡庆山, 孙博宇, 刘金戈, 等. 灯盏花素上调核因子相关因子-2通路抑制液压冲击脑损伤炎症反应[J]. *中华实验外科杂志*, 2020, 37(5): 884-886. DOI: 10.3760/cma.j.cn421213-20190715-01003.
- [9] 张晰, 马丙祥, 张建奎, 等. 蒲金口服液对宫内感染/炎症致早产脑损伤大鼠脑组织NgR、p75NTR表达的影响[J]. *中成药*, 2021, 43(6): 1602-1608.

- DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.06.041.
- [10] 陈玄, 闫一敏, 魏璐璐. 巴曲酶对缺血性眩晕大鼠及其脑组织 Nrf2/HO-1 信号通路的影响[J]. 现代药物与临床, 2021, 36(8): 1549-1555. DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.08.001.
- [11] Liu H, Zhang M, Han X. Therapeutic effect of erythropoietin on brain injury in premature mice with intrauterine infection[J]. Saudi J Biol Sci, 2020, 27(8): 2129-2133. PMID: 32714039. PMCID: PMC7376126. DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.05.040.
- [12] 赵雪琼, 贺艺, 艾鑫, 等. 产妇产内感染影响因素及其与新生儿脑损伤的关系[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31(18): 2816-2820. DOI: 10.11816/cn.ni.2021-203806.
- [13] Chang Y, Zhu J, Wang D, et al. NLRP3 inflammasome-mediated microglial pyroptosis is critically involved in the development of post-cardiac arrest brain injury[J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 219. PMID: 32703306. PMCID: PMC7376727. DOI: 10.1186/s12974-020-01879-1.
- [14] Costa T, Fernandez-Villalba E, Izura V, et al. Combined 1-deoxynojirimycin and ibuprofen treatment decreases microglial activation, phagocytosis and dopaminergic degeneration in MPTP-treated mice[J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2021, 16(2): 390-402. PMID: 32564332. DOI: 10.1007/s11481-020-09925-8.
- [15] Ying YQ, Yan XQ, Jin SJ, et al. Inhibitory effect of LPS on the proliferation of oligodendrocyte precursor cells through the Notch signaling pathway in intrauterine infection-induced rats [J]. Curr Med Sci, 2018, 38(5): 840-846. PMID: 30341518. DOI: 10.1007/s11596-018-1951-9.
- [16] Suff N, Karda R, Diaz JA, et al. Ascending vaginal infection using bioluminescent bacteria evokes intrauterine inflammation, preterm birth, and neonatal brain injury in pregnant mice[J]. Am J Pathol, 2018, 188(10): 2164-2176. PMID: 30036519. PMCID: PMC6168615. DOI: 10.1016/j.ajpath.2018.06.016.
- [17] 谢晓勇, 殷正明, 翟寿春, 等. 灯盏花素联合吡拉西坦治疗中型颅脑损伤疗效观察[J]. 湖北中医药大学学报, 2022, 24(2): 53-55. DOI: 10.3969/j.issn.1008-987x.2022.02.13.
- [18] 鄂瑞芳, 赵琨, 赵日光, 等. 灯盏花素注射液联合阿加曲班治疗急性脑梗死的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2021, 36(10): 2136-2140. DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.10.029.
- [19] Amin N, Du X, Chen S, et al. Therapeutic impact of thymoquinone to alleviate ischemic brain injury via Nrf2/HO-1 pathway[J]. Expert Opin Ther Targets, 2021, 25(7): 597-612. PMID: 34236288. DOI: 10.1080/14728222.2021.1952986.
- [20] Endesfelder S, Weichelt U, Strauß E, et al. Neuroprotection by caffeine in hyperoxia-induced neonatal brain injury[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(1): 187. PMID: 28106777. PMCID: PMC5297819. DOI: 10.3390/ijms18010187.
- (本文编辑: 杨丹)