

声光与机械刺激对脓毒症大鼠睡眠和血脑屏障及认知功能的影响

何鹏 陈玲 刘玉 刘天 吴克艳 杨珉 姚鹏

武汉科技大学附属孝感医院(孝感市中心医院)重症医学科,湖北孝感 432000

通信作者:姚鹏, Email: yp113065@outlook.com

【摘要】 目的 探讨噪声、强光及机械刺激对脓毒症大鼠睡眠、血脑屏障和认知功能的影响。**方法** 选择 40 只雄性 SD 大鼠,均经腹腔注射 10 mg/kg 脂多糖(LPS)制备脓毒症模型,并分别给予 0、30、45、60、75 dB 噪声刺激或 0、50、100、200、400 Lux 光照刺激(均 $n=4$),96 h 后通过测定血清皮质醇、褪黑素及脑组织伊文思蓝(EB)含量等指标筛选后续实验条件。然后另外选择 40 只雄性 SD 大鼠,按随机数字表法分为对照组(Con 组)、LPS 组、噪声干预组(LPS+60 dB 组)、200 Lux 光照干预组(LPS+200 Lux 组)及机械刺激组(LPS+MS 组),每组 8 只。分别予以相应刺激 96 h 后,通过旷场实验及条件性恐惧实验评估大鼠探索行为和认知功能;用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测脑组织白细胞介素-6(IL-6)含量和血清皮质醇、褪黑素水平以评估大鼠睡眠质量、中枢炎症及应激反应;通过 EB 渗透实验评估血脑屏障完整性;用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测海马组织紧密连接蛋白 1(ZO-1)、封闭蛋白 5(Claudin-5)、裂解的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)蛋白表达以评估大鼠海马区血脑屏障完整性和神经元凋亡情况。**结果** 与 0 dB 噪声组或 0 Lux 光照组相比,60 dB 噪声组及 200 Lux 光照组血清褪黑素水平即明显降低,血清皮质醇及脑组织 EB 含量即明显升高,故选取 60 dB 噪声、200 Lux 光照作为后续实验条件。与 Con 组相比,LPS 组旷场实验水平分数、垂直分数明显降低,僵直时间占比、脑组织 EB 和 IL-6 含量、血清褪黑素和皮质醇水平以及海马区 ZO-1、Claudin-5、caspase-3 蛋白表达差异均无统计学意义。与 LPS 组相比,LPS+60 dB、LPS+200 Lux、LPS+MS 组大鼠水平分数、垂直分数及僵直时间占比明显降低[水平分数(分): 73.8 ± 9.7 、 80.3 ± 9.4 、 64.5 ± 8.3 比 103.6 ± 15.5 ,垂直分数(分): 9.4 ± 1.7 、 11.2 ± 1.9 、 6.8 ± 0.9 比 15.9 ± 2.8 ,僵直时间占比:(45.3 ± 4.7)%、(53.3 ± 5.8)%、(42.1 ± 5.1)% 比 (66.1 ± 6.3)%],血清褪黑素水平明显降低(ng/L: 53.62 ± 6.20 、 44.25 ± 6.41 、 45.33 ± 5.84 比 74.39 ± 7.54),血清皮质醇水平明显升高(nmol/L: 818.34 ± 95.53 、 710.04 ± 65.41 、 989.73 ± 91.63 比 398.82 ± 72.59),脑组织 EB、IL-6 含量明显升高[EB($\mu\text{g/g}$): 2.80 ± 0.35 、 2.38 ± 0.31 、 3.24 ± 0.42 比 1.59 ± 0.26 ,IL-6(ng/g): 31.56 ± 4.11 、 26.69 ± 3.75 、 37.47 ± 4.56 比 16.28 ± 2.69],海马组织 ZO-1、Claudin-5 蛋白表达明显降低(ZO-1/ β -actin: 0.37 ± 0.04 、 0.32 ± 0.05 、 0.24 ± 0.04 比 0.80 ± 0.09 ,Claudin-5/ β -actin: 0.62 ± 0.08 、 0.47 ± 0.06 、 0.35 ± 0.05 比 0.97 ± 0.20),caspase-3 蛋白表达明显升高(caspase-3/ β -actin: 0.56 ± 0.06 、 0.39 ± 0.04 、 0.72 ± 0.12 比 0.20 ± 0.03),差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。**结论** 60 dB 噪声、200 Lux 光照或机械刺激 96 h 可显著抑制脓毒症大鼠血清褪黑素分泌、促进皮质醇分泌,激活中枢炎症反应,促使海马区神经元凋亡、血脑屏障通透性升高,进而导致睡眠障碍和认知功能损害。

【关键词】 噪声; 强光; 机械刺激; 脓毒症; 血脑屏障; 认知功能

基金项目: 湖北省卫生健康科研基金(WJ2021M078);湖北省孝感市自然科学基金(XGKJ2020010017)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200630-00514

Effects of noise, bright light and mechanical stimulation on sleep, blood-brain barrier and cognitive function in septic rats

He Peng, Chen Ling, Liu Yu, Liu Tian, Wu Keyan, Yang Min, Yao Peng

Department of Critical Care Medicine, Xiaogan Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology (Xiaogan Central Hospital), Xiaogan 432000, Hubei, China

Corresponding author: Yao Peng, Email: yp113065@outlook.com

【Abstract】 Objective To evaluate the effects of noise, bright light and mechanical stimulation on sleep, blood-brain barrier and cognitive function in septic rats. **Methods** Forty male Sprague-Dawley (SD) rats were selected and intraperitoneal injection of 10 mg/kg lipopolysaccharide (LPS) was used to establish sepsis model. 0, 30, 45, 60, 75 dB noise stimulation or 0, 50, 100, 200, 400 Lux light stimulation were given to rats (all $n=4$). The serum levels of cortisol and melatonin, and the cerebral content of Evans blue (EB) were measured 96 hours after the stimulation to determine the optimal intensity of intervention. The other 40 SD rats were randomly divided into control group (Con group), LPS group, noise intervention group (LPS+60 dB group), 200 Lux light intervention group (LPS+200 Lux group) and mechanical stimulation group (LPS+MS group), with 8 rats in each group. The open fields test and fear conditioning test were used to evaluate the exploratory behavior and cognitive function 96 hours after corresponding

stimulation. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect cerebral level of interleukin-6 (IL-6) and serum levels of cortisol and melatonin. The blood-brain barrier integrity was assessed by EB staining. The protein levels of ZO-1, Claudin-5 and caspase-3 in the hippocampus were detected by Western blotting to assess the blood-brain barrier integrity and neuronal apoptosis. **Results** Compared with 0 dB group or 0 Lux group, the serum melatonin concentration in 60 dB group and 200 Lux group were significantly reduced, while the serum cortisol concentration and cerebral EB content were significantly increased. Therefore, 60 dB noise and 200 Lux light were selected in the subsequent experiments. Compared with Con group, the horizontal score and vertical score in the open field test in LPS group were significantly decreased. There were no significant differences in the proportion of freezing time, the cerebral contents of EB and IL-6, the serum levels of melatonin and cortisol, and the hippocampal expressions of ZO-1, Claudin-5 and caspase-3. Compared with LPS group, the horizontal score, vertical score and the percentage of freezing time in LPS+60 dB group, LPS+200 Lux group and LPS+MS group were significantly reduced [horizontal score: 73.8 ± 9.7 , 80.3 ± 9.4 , 64.5 ± 8.3 vs. 103.6 ± 15.5 ; vertical score: 9.4 ± 1.7 , 11.2 ± 1.9 , 6.8 ± 0.9 vs. 15.9 ± 2.8 ; the percentage of freezing time: $(45.3 \pm 4.7)\%$, $(53.3 \pm 5.8)\%$, $(42.1 \pm 5.1)\%$ vs. $(66.1 \pm 6.3)\%$], the serum level of melatonin was significantly decreased (ng/L: 53.62 ± 6.20 , 44.25 ± 6.41 , 45.33 ± 5.84 vs. 74.39 ± 7.54), the serum level of cortisol was significantly increased (nmol/L: 818.34 ± 95.53 , 710.04 ± 65.41 , 989.73 ± 91.63 vs. 398.82 ± 72.59), the levels of EB, IL-6 in the brain tissue were significantly increased [EB ($\mu\text{g/g}$): 2.80 ± 0.35 , 2.38 ± 0.31 , 3.24 ± 0.42 vs. 1.59 ± 0.26 ; IL-6 (ng/g): 31.56 ± 4.11 , 26.69 ± 3.75 , 37.47 ± 4.56 vs. 16.28 ± 2.69], the expressions of ZO-1 and Claudin-5 were significantly decreased (ZO-1/ β -actin: 0.37 ± 0.04 , 0.32 ± 0.05 , 0.24 ± 0.04 vs. 0.80 ± 0.09 ; Claudin-5/ β -actin: 0.62 ± 0.08 , 0.47 ± 0.06 , 0.35 ± 0.05 vs. 0.97 ± 0.20), and the expression of cleaved caspase-3 was significantly increased (caspase-3/ β -actin: 0.56 ± 0.06 , 0.39 ± 0.04 , 0.72 ± 0.12 vs. 0.20 ± 0.03), with statistically significant differences (all $P < 0.05$). **Conclusion** 60 dB noise, 200 Lux light or mechanical stimulation for 96 hours could inhibit the secretion of serum melatonin, promote the secretion of cortisol, and activate neuroinflammation in septic rats, and lead to neuronal apoptosis in hippocampus and hyper-permeability of blood-brain barrier, which in turn could cause sleep disturbance and cognitive impairment.

【Key words】 Noise; Bright light; Mechanical stimulation; Sepsis; Blood-brain barrier; Cognitive function

Fund program: Health Commission of Hubei Province Scientific Research Project of China (WJ2021M078); Xiaogan Natural Science Foundation Project of Hubei Province of China (XGKJ2020010017)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200630-00514

睡眠作为人类最基本的生理需求之一,对细胞修复和记忆形成至关重要^[1]。有研究表明,受重症监护病房(intensive care unit, ICU)特殊环境、患者自身疾病及治疗性干预措施等因素的影响,约 70% 的 ICU 患者存在睡眠障碍,且睡眠障碍与住院病死率及认知障碍发生率密切相关^[2]。同时,噪声、强光和机械刺激被认为是导致重症患者睡眠障碍最主要的非治疗性因素,这些刺激因素可导致患者褪黑素、皮质醇等激素分泌紊乱,致使机体应激水平升高、睡眠节律异常^[2-3],然而其对脓毒症患者睡眠、血脑屏障和认知功能的影响程度及作用机制尚不完全清楚。因此,本研究拟通过腹腔注射脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)构建脓毒症大鼠模型,并分别予以噪声、强光及机械刺激,检测大鼠行为学、血脑屏障功能、血清褪黑素和皮质醇等激素以及炎症因子水平,以期在动物实验基础上探讨声光、机械刺激对脓毒症患者睡眠、血脑屏障以及认知功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物: 10~12 周龄雄性 SD 大鼠,体质量 240~260 g,购于湖南斯莱克景达实验动物公司,许可证号: SCXK(湘)2016-0002。

1.1.1 条件筛选实验: 采用随机数字表法将 40 只大鼠分为噪声处理组和光照处理组。所有大鼠均经腹腔注射 LPS 10 mg/kg 制备脓毒症模型^[4-5]。噪声处理组大鼠分别予以强度为 0、30、45、60、75 dB (均 $n=4$) 的监护仪报警模拟声刺激,声源距大鼠 1 m,噪声刺激间隔时间 15 min;余下脓毒症大鼠分别予以强度为 0、50、100、200、400 Lux (均 $n=4$) 的日光灯(荷兰飞利浦公司)照射,色温 2 600 k,频闪 100 次/min,大鼠被光源环绕,光照强度以大鼠视线水平为标准。噪声或强光刺激 96 h 后立即经尾静脉采血并行血脑屏障功能检测。

1.1.2 条件干预实验: 另外选择 40 只 SD 大鼠,按随机数字表法分为对照组(Con 组)、LPS 组、60 dB 噪声干预组(LPS+60 dB 组)、200 Lux 光照干预组(LPS+200 Lux 组)及机械刺激组(LPS+MS 组),每组 8 只。声光刺激方法同条件筛选实验。LPS+MS 组无声光刺激,使用睡眠剥夺仪(上海欣软公司)对大鼠进行机械刺激,仪器内底部有周期性往复滚动的滑杆,滑动间隔时间为 15 min,持续 96 h。

1.2 伦理学: 本研究中动物实验方法及手术操作均严格遵守动物伦理学标准,并通过医院医学伦理委员会审批(审批号: XGLY2020-07-08)。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 旷场实验: 各组刺激完成后,将各组大鼠置于箱体中央,记录 240 s 内右前肢跨越方格数(水平分数)以及后肢站立次数(垂直分数),以此评估大鼠对新环境的探索行为。

1.3.2 条件性恐惧实验: ① 恐惧记忆建立:将各组大鼠置于斯金纳实验箱(上海欣软公司),5 min 后调节箱底金属板以 0.75 mA 电流放电 5 s,同时以 60 dB 白噪声刺激 10 s,结束后休息 1 min,重复操作 20 次。② 恐惧记忆洗脱:次日将各组大鼠置于斯金纳箱并以 60 dB 的白噪声刺激 10 s,重复操作 20 次。③ 恐惧记忆回忆:24 h 后再将大鼠置于箱体,5 min 后以 60 dB 白噪声刺激 10 s,记录白噪声刺激期间大鼠僵直时间占比(除呼吸外无其他肢体活动),重复操作 10 次。

1.3.3 伊文思蓝(Evans blue, EB)渗透实验: 通过 EB 渗透实验评估大鼠血脑屏障完整性。采血完成后将大鼠尾部浸于 50 °C 温水 3 min,经尾静脉注入 2% EB 溶液 5 mL/kg。6 h 后麻醉大鼠开胸,用肝素生理盐水灌洗直至流出液清亮,随后取出全脑,剪碎后称取 100 mg 置于 2 mL 甲酰胺溶液中 50 °C 孵育 24 h,1 500 r/min(离心半径 12 cm)离心 15 min 后取上清液。用酶标仪测定波长 632 nm 处吸光度(absorbance, A)值,随后根据标准曲线计算 EB 含量。

1.3.4 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA): 取大鼠尾静脉血及脑组织匀浆液,离心后取上清液。按照操作说明稀释标本和标准液,随后依次加入生物素抗体、亲和链霉素、底物及终止液,用酶标仪测定波长 450 nm 处 A 值,根据标准曲线计算血清褪黑素、皮质醇和脑组织白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)含量。

1.3.5 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting): 条件性恐惧实验结束后麻醉处死大鼠并取海马组织,加入 2 mL 蛋白裂解液充分匀浆,3 000 r/min(离心半径 12 cm)离心 10 min 取上清液。BCA 法测定蛋白浓度。12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,每孔加 20 μg 蛋白,随后以 60 V 电泳 45 min、120 V 电泳至指示带分离,260 mA 电转印至聚偏二氟乙烯膜,5% 脱脂牛奶封闭 1 h,用密闭小带蛋白 1(zonula occludens 1, ZO-1)、封闭蛋白 5(Claudin-5)、裂解的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)、β-肌动蛋白(β-actin)抗体 4 °C 孵育过夜。次日漂洗后用辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 2 h,发光

试剂显色后拍照,以目的蛋白与内参 β-actin 的灰度值比值作为蛋白表达量。

1.4 统计学处理: 采用 Graphpad 8.0 和 SPSS 18.0 软件对数据进行统计分析。定量资料均符合正态分布,以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 条件筛选实验

2.1.1 不同强度噪声刺激 96 h 对脑组织 EB 含量及血清褪黑素、皮质醇水平的影响(表 1): 脓毒症大鼠血清褪黑素水平随噪声强度增加逐渐降低,血清皮质醇及脑组织 EB 含量随噪声强度增加逐渐升高(均 $P < 0.01$)。与 0 dB 噪声组相比,60 dB 噪声组大鼠血清褪黑素降低、血清皮质醇及脑组织 EB 含量升高差异即有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

组别	动物数 (只)	EB (μg/g)	褪黑素 (ng/L)	皮质醇 (nmol/L)
0 dB 噪声组	4	1.33 ± 0.33	71.54 ± 8.03	362.11 ± 71.76
30 dB 噪声组	4	1.43 ± 0.26	65.17 ± 7.31	455.95 ± 92.18
45 dB 噪声组	4	1.96 ± 0.30 ^a	58.85 ± 6.11	682.27 ± 111.23 ^a
60 dB 噪声组	4	2.69 ± 0.34 ^a	51.34 ± 7.25 ^a	858.08 ± 117.58 ^a
75 dB 噪声组	4	3.21 ± 0.55 ^a	48.78 ± 6.83 ^a	960.76 ± 133.30 ^a
F 值		19.270	7.042	22.610
P 值		<0.001	0.002	<0.001

注: EB 为伊文思蓝;与 0 dB 噪声组比较,^a $P < 0.05$

2.1.2 不同强度光照刺激 96 h 对脑组织 EB 含量及血清褪黑素、皮质醇水平的影响(表 2): 脓毒症大鼠血清褪黑素水平随光照强度增加逐渐降低,血清皮质醇及脑组织 EB 含量随光照强度增加逐渐升高(均 $P < 0.01$)。与 0 Lux 光照组相比,200 Lux 光照组大鼠血清褪黑素降低、血清皮质醇及脑组织 EB 含量升高差异即有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

组别	动物数 (只)	EB (μg/g)	褪黑素 (ng/L)	皮质醇 (nmol/L)
0 Lux 光照组	4	1.68 ± 0.25	68.92 ± 8.85	401.86 ± 75.62
50 Lux 光照组	4	1.56 ± 0.28	63.21 ± 7.17	369.01 ± 94.12
100 Lux 光照组	4	2.13 ± 0.37 ^a	55.33 ± 6.62 ^a	548.14 ± 97.99
200 Lux 光照组	4	2.31 ± 0.28 ^a	46.60 ± 5.17 ^a	665.99 ± 81.70 ^a
400 Lux 光照组	4	2.90 ± 0.36 ^a	43.25 ± 6.84 ^a	759.56 ± 133.03 ^a
F 值		11.850	9.488	11.540
P 值		<0.001	0.001	<0.001

注: EB 为伊文思蓝;与 0 Lux 光照组比较,^a $P < 0.05$

2.2 条件干预实验

2.2.1 噪声、强光和机械刺激对大鼠行为学功能的影响(表 3): 依据条件筛选实验结果,选取 60 dB 噪声及 200 Lux 光照作为后续实验条件。与 Con 组相比, LPS 组大鼠水平分数、垂直分数均明显降低(均 $P < 0.05$),僵直时间占比无明显变化。与 LPS 组相比, LPS+60 dB 组、LPS+200 Lux 组及 LPS+MS 组大鼠水平分数、垂直分数及僵直时间占比明显降低(均 $P < 0.05$)。与 LPS+60 dB 组相比, LPS+MS 组垂直分数及僵直时间占比明显降低(均 $P < 0.05$),水平分数无明显差异;而与 LPS+200 Lux 组相比, LPS+MS 组垂直分数明显降低($P < 0.05$),水平分数和僵直时间占比无明显差异。

表 3 各组大鼠旷场实验和条件性恐惧实验结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	水平分数 (分)	垂直分数 (分)	僵直时间 占比(%)
Con 组	8	128.3 ± 19.7	19.7 ± 3.6	73.4 ± 8.5
LPS 组	8	103.6 ± 15.5 ^a	15.9 ± 2.8 ^a	66.1 ± 6.3
LPS+60 dB 组	8	73.8 ± 9.7 ^{ab}	9.4 ± 1.7 ^{ab}	45.3 ± 4.7 ^{ab}
LPS+200 Lux 组	8	80.3 ± 9.4 ^{ab}	11.2 ± 1.9 ^{ab}	53.3 ± 5.8 ^{ab}
LPS+MS 组	8	64.5 ± 8.3 ^{ab}	6.8 ± 0.9 ^{abcd}	42.1 ± 5.1 ^{abc}
F 值		30.220	38.110	37.160
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: Con 组为对照组, LPS 组为脂多糖致脓毒症组, LPS+60 dB 组为 60 dB 噪声干预组, LPS+200 Lux 组为 200 Lux 光照干预组, LPS+MS 组为机械刺激组;与 Con 组比较, ^a $P < 0.05$;与 LPS 组比较, ^b $P < 0.05$;与 LPS+60 dB 组比较, ^c $P < 0.05$;与 LPS+200 Lux 组比较, ^d $P < 0.05$

2.2.2 噪声、强光和机械刺激对大鼠脑组织 EB、IL-6 含量及血清褪黑素、皮质醇水平的影响(表 4~5): 与 Con 组相比, LPS 组脑组织 EB、IL-6 含量及血清褪黑素、皮质醇水平差异均无统计学意义。与 LPS 组相比, LPS+60 dB 组、LPS+200 Lux 组和 LPS+MS 组血清褪黑素水平明显降低,脑组织 EB、IL-6 含量及血清皮质醇水平明显升高(均 $P < 0.05$)。与 LPS+60 dB 组相比, LPS+200 Lux 组、LPS+MS 组上述指标差异无统计学意义;而与 LPS+200 Lux 组相比, LPS+MS 组血清皮质醇及脑组织 EB、IL-6 含量明显升高(均 $P < 0.05$),血清褪黑素水平差异无统计学意义。

2.2.3 噪声、强光和机械刺激对大鼠海马区 ZO-1、Claudin-5 及 caspase-3 蛋白表达的影响(图 1;表 6): 与 Con 组相比, LPS 组大鼠海马区 ZO-1、Claudin-5 及 caspase-3 的蛋白表达差异均无统计学意义。

表 4 各组大鼠脑组织 EB、IL-6 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	EB(μg/g)	IL-6(ng/g)
Con 组	4	1.31 ± 0.27	13.71 ± 2.24
LPS 组	4	1.59 ± 0.26	16.28 ± 2.69
LPS+60 dB 组	4	2.80 ± 0.35 ^{ab}	31.56 ± 4.11 ^{ab}
LPS+200 Lux 组	4	2.38 ± 0.31 ^{ab}	26.69 ± 3.75 ^{ab}
LPS+MS 组	4	3.24 ± 0.42 ^{abc}	37.47 ± 4.56 ^{abc}
F 值		24.440	31.620
P 值		<0.001	<0.001

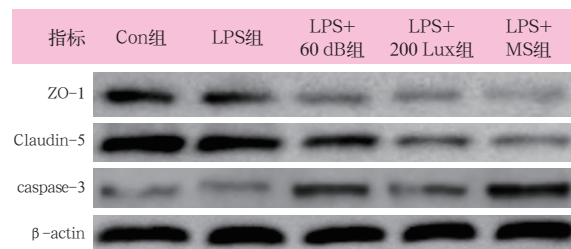
注: Con 组为对照组, LPS 组为脂多糖致脓毒症组, LPS+60 dB 组为 60 dB 噪声干预组, LPS+200 Lux 组为 200 Lux 光照干预组, LPS+MS 组为机械刺激组;EB 为伊文思蓝, IL-6 为白细胞介素-6;与 Con 组比较, ^a $P < 0.05$;与 LPS 组比较, ^b $P < 0.05$;与 LPS+200 Lux 组比较, ^c $P < 0.05$

表 5 各组大鼠血清褪黑素及皮质醇水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	褪黑素 (ng/L)	皮质醇 (nmol/L)
Con 组	8	80.12 ± 9.75	310.78 ± 69.28
LPS 组	8	74.39 ± 7.54	398.82 ± 72.59
LPS+60 dB 组	8	53.62 ± 6.20 ^{ab}	818.34 ± 95.53 ^{ab}
LPS+200 Lux 组	8	44.25 ± 6.41 ^{ab}	710.04 ± 65.41 ^{ab}
LPS+MS 组	8	45.33 ± 5.84 ^{ab}	989.73 ± 91.63 ^{abc}
F 值		41.980	102.100
P 值		<0.001	<0.001

注: Con 组为对照组, LPS 组为脂多糖致脓毒症组, LPS+60 dB 组为 60 dB 噪声干预组, LPS+200 Lux 组为 200 Lux 光照干预组, LPS+MS 组为机械刺激组;与 Con 组比较, ^a $P < 0.05$;与 LPS 组比较, ^b $P < 0.05$;与 LPS+200 Lux 组比较, ^c $P < 0.05$

与 LPS 组相比, LPS+60 dB 组、LPS+200 Lux 组及 LPS+MS 组海马区 ZO-1、Claudin-5 蛋白表达均明显降低, caspase-3 蛋白表达明显升高(均 $P < 0.05$)。与 LPS+60 dB 组相比, LPS+MS 组 ZO-1、Claudin-5 表达均明显降低, caspase-3 蛋白表达明显升高(均 $P < 0.05$)。而与 LPS+200 Lux 组相比, LPS+MS 组 caspase-3 蛋白表达明显升高($P < 0.05$), ZO-1、Claudin-5 蛋白表达差异无统计学意义。



Con 组为对照组, LPS 组为脂多糖致脓毒症组, LPS+60 dB 组为 60 dB 噪声干预组, LPS+200 Lux 组为 200 Lux 光照干预组, LPS+MS 组为机械刺激组;ZO-1 为紧密连接蛋白 1, Claudin-5 为紧密连接蛋白 5, caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, β-actin 为 β-肌动蛋白

图 1 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测各组大鼠海马区 ZO-1、Claudin-5 及 caspase-3 蛋白表达

表 6 各组大鼠海马区 ZO-1、Claudin-5 及 caspase-3 的蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	ZO-1/ β -actin	Claudin-5/ β -actin	caspase-3/ β -actin
Con 组	4	0.98 ± 0.11	1.12 ± 0.17	0.11 ± 0.02
LPS 组	4	0.80 ± 0.09	0.97 ± 0.20	0.20 ± 0.03
LPS+60 dB 组	4	0.37 ± 0.04 ^{ab}	0.62 ± 0.08 ^{ab}	0.56 ± 0.06 ^{ab}
LPS+200 Lux 组	4	0.32 ± 0.05 ^{ab}	0.47 ± 0.06 ^{ab}	0.39 ± 0.04 ^{abc}
LPS+MS 组	4	0.24 ± 0.04 ^{abc}	0.35 ± 0.05 ^{abc}	0.72 ± 0.12 ^{abcd}
F 值		86.360	26.470	60.320
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: Con 组为对照组, LPS 组为脂多糖致脓毒症组, LPS+60 dB 组为 60 dB 噪声干预组, LPS+200 Lux 组为 200 Lux 光照干预组, LPS+MS 组为机械刺激组; ZO-1 为紧密小带蛋白 1, Claudin-5 为封闭蛋白 5, caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, β -actin 为 β -肌动蛋白; 与 Con 组比较, ^a P <0.05; 与 LPS 组比较, ^b P <0.05; 与 LPS+60 dB 组比较, ^c P <0.05; 与 LPS+200 Lux 组比较, ^d P <0.05

3 讨论

随着对重症患者睡眠障碍认识的不断加深,越来越多的非药物性干预措施被应用于睡眠集束化治疗中,然而,并非所有重症医护人员都对此有充分的认知,导致辅助睡眠措施往往执行的不彻底。根据 2006 年我国 ICU 建设与管理指南建议,ICU 日间声音应低于 45 dB,夜间低于 20 dB,而对光照强度未予明确界定,仅要求具备良好的采光条件^[6]。既往临床研究表明,ICU 日间光照强度普遍超过 800 Lux,最高达 6 000 Lux,夜间为 100 ~ 500 Lux^[7];而日间噪声也远高于推荐水平,为 55 ~ 60 dB,甚至超过 75 dB^[8]。基础研究表明,褪黑素水平与睡眠质量密切相关,光照强度超过 100 Lux 即可影响褪黑素分泌引起睡眠障碍,超过 300 Lux 可导致昼夜节律紊乱^[9];噪声可影响正常睡眠周期,尤其是夜间噪声,可促使皮质醇分泌异常和睡眠碎片化,导致机体应激水平显著升高,并显著上调 ICU 重症患者的谵妄发生率^[10-11]。本研究通过不同强度噪声、光照刺激 LPS 诱导的脓毒症大鼠,结果显示,60 dB 噪声、200 Lux 光照 96 h 可明显上调脓毒症大鼠血清皮质醇水平,抑制血清褪黑素水平,并导致睡眠障碍、血脑屏障通透性升高,故选取 60 dB 噪声及 200 Lux 光照作为后续实验条件。

血脑屏障是由星形胶质细胞、血管内皮细胞、周细胞及细胞外基质等部分通过紧密连接(包括紧密连接蛋白、闭锁蛋白等)组成,对维持中枢神经系统内环境稳定至关重要。由于中枢神经系统极为活跃,当遭受缺血缺氧、炎症反应过度激活或氧化应激时,线粒体能量代谢受阻、细胞间紧密连接破坏,

进而引起神经元信号转导功能障碍、血脑屏障破坏^[12]。既往研究表明,间断非快动眼睡眠剥夺 48 h 可引起血浆和脑脊液 5-羟色胺、皮质醇释放增多,皮质、海马等功能区血脑屏障功能受损,机体氧化应激水平升高,觉醒时间明显延长,认知障碍发生率升高;而在睡眠剥夺后的睡眠阶段,活性氧生成速率降低,抗氧化物含量显著增加^[13-14]。后续研究也证实,ICU 患者预后与睡眠评分、认知功能、血清皮质醇及 5-羟色胺等水平高度相关^[15-16]。此外,基础研究表明,慢性应激诱导的睡眠障碍可导致紧密连接蛋白表达降低,中枢神经系统炎症因子和细胞毒性递质含量增高,功能区神经元丢失^[17],进而导致神经细胞信号转导及代谢功能障碍。这些研究提示,ICU 环境因素诱导的睡眠障碍、血脑屏障破坏等可能与应激反应过度激活有关,进而影响脓毒症病情转归和预后。本实验中通过测定噪声、光照及机械刺激等环境因素对脓毒症大鼠睡眠生物标志物褪黑素、中枢炎症细胞因子及血脑屏障功能等指标显示,与 LPS 组相比, LPS+60 dB 组、LPS+200 Lux 组及 LPS+MS 组大鼠脑组织 EB、IL-6 含量明显升高,海马区 ZO-1、Claudin-5 表达降低, caspase-3 表达明显升高,表明 60 dB 噪声、200 Lux 光照或机械刺激均可诱导脓毒症大鼠应激反应和中枢炎症因子表达升高,导致血脑屏障破坏、海马区神经元凋亡。

依据马斯洛层次需求理论,睡眠与食物和水一样,属于人类第一层次需求。ICU 患者因病情危重、多合并器官功能障碍,往往需要机械通气及多种持续性有创监测,复杂的治疗环境极易干扰患者睡眠正常节律,但却时常被忽略^[18]。有研究报道,超过 50% 的 ICU 患者主观认为睡眠质量差或睡眠被严重干扰,而强光、噪声及机械刺激被医护患三方认为是最为突出的非治疗性影响因素^[3,8]。临床研究表明,声光等环境因素可激活下丘脑-垂体-肾上腺轴,促进肾上腺素、胰高血糖素及皮质醇等分泌并抑制褪黑素分泌,致使机体应激水平升高,加重焦虑、恐惧等负性情绪积累,最终导致睡眠障碍或代谢紊乱^[19-20];另有研究表明,与 ICU 非谵妄患者相比,谵妄患者睡眠过程中觉醒次数增多、快动眼睡眠减少,褪黑素分泌峰值降低、节律紊乱,中枢炎症反应水平明显升高^[21]。这些研究提示,除疾病本身的影响外,ICU 患者易受到诸多非治疗性刺激的影响,这类刺激可能扰乱或加重病理状态下的睡眠节律,引起褪黑素、皮质醇等分泌紊乱,导致中枢炎

症反应。后续动物研究显示,急性睡眠剥夺大鼠皮质和海马区炎症反应增强,神经元长时程增强效应减弱,空间记忆及被动回避记忆能力显著降低,但是抑制中枢炎症反应并不能完全改善认知功能降低^[22-23]。本研究结果显示,相比 LPS 组, LPS+60 dB 组、LPS+200 Lux 组及 LPS+MS 组大鼠水平分数、垂直分数及僵直时间占比明显降低,血清皮质醇水平升高,血清褪黑素水平降低,血脑屏障通透性升高,凋亡蛋白表达升高。这些数据表明 60 dB 噪声、200 Lux 光照或机械刺激 96 h 引起的脓毒症大鼠探索行为减少、海马依赖性记忆功能降低可能与睡眠障碍有关,即噪声、强光及机械刺激等强应激原诱导的睡眠障碍导致机体应激反应和中枢炎症反应增强,进而引起神经细胞凋亡增多、血脑屏障受损,随后外周炎症因子或细胞毒性物质自由进入中枢神经系统,进一步加重神经细胞损伤、内环境紊乱,最终导致认知功能损害。

综上所述, 60 dB 噪声、200 Lux 光照或机械刺激 96 h 可显著抑制脓毒症大鼠血清褪黑素分泌、促进皮质醇分泌,诱导中枢炎症反应,引起海马区神经元凋亡、血脑屏障通透性升高,导致睡眠障碍和认知功能损害。本研究从动物水平探讨了声光及机械刺激对脓毒症大鼠睡眠、血脑屏障及认知功能的影响,但更深层次的分子机制仍有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Killgore WD. Effects of sleep deprivation on cognition [J]. *Prog Brain Res*, 2010, 185: 105-129. DOI: 10.1016/B978-0-444-53702-7.00007-5.
- [2] Delaney LJ, Van Haren F, Lopez V. Sleeping on a problem: the impact of sleep disturbance on intensive care patients: a clinical review [J]. *Ann Intensive Care*, 2015, 5: 3. DOI: 10.1186/s13613-015-0043-2.
- [3] Hu RF, Jiang XY, Hegadoren KM, et al. Effects of earplugs and eye masks combined with relaxing music on sleep, melatonin and cortisol levels in ICU patients: a randomized controlled trial [J]. *Crit Care*, 2015, 19 (1): 115. DOI: 10.1186/s13054-015-0855-3.
- [4] 姚鹏,陈勇,李依玲,等.海马神经细胞铁死亡通过 Nrf2/GPX4 信号通路导致脓毒症相关性脑病大鼠认知功能障碍 [J]. *中华危重病急救医学*, 2019, 31 (11): 1389-1394. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.11.015.
- [5] Machado RB, Tufik S, Suchecki D. Chronic stress during paradoxical sleep deprivation increases paradoxical sleep rebound: association with prolactin plasma levels and brain serotonin content [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2008, 33 (9): 1211-1224. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2008.06.007.
- [6] 中华医学会重症医学分会.《中国重症加强治疗病房 (ICU) 建设与管理指南》(2006) [J]. *中华危重病急救医学*, 2006, 18 (7): 387-388. DOI: 10.3760/j.issn:1003-0603.2006.07.003.
- [7] Simons KS, Laheij RJ, van den Boogaard M, et al. Dynamic light application therapy to reduce the incidence and duration of delirium in intensive-care patients: a randomised controlled trial [J]. *Lancet Respir Med*, 2016, 4 (3): 194-202. DOI: 10.1016/S2213-2600(16)00025-4.
- [8] Simons KS, Verweij E, Lemmens PMC, et al. Noise in the intensive care unit and its influence on sleep quality: a multicenter observational study in Dutch intensive care units [J]. *Crit Care*, 2018, 22 (1): 250. DOI: 10.1186/s13054-018-2182-y.
- [9] Cajochen C. Alerting effects of light [J]. *Sleep Med Rev*, 2007, 11 (6): 453-464. DOI: 10.1016/j.smrv.2007.07.009.
- [10] Naqvi F, Haider S, Batool Z, et al. Sub-chronic exposure to noise affects locomotor activity and produces anxiogenic and depressive like behavior in rats [J]. *Pharmacol Rep*, 2012, 64 (1): 64-69. DOI: 10.1016/s1734-1140(12)70731-4.
- [11] 崔岚,刘海艳,陈美,等. ICU 夜间噪声管理对患者谵妄发生率的影响 [J]. *中华现代护理杂志*, 2018, 24 (31): 3804-3806. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-2907.2018.31.020.
- [12] Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, et al. Structure and function of the blood-brain barrier [J]. *Neurobiol Dis*, 2010, 37 (1): 13-25. DOI: 10.1016/j.nbd.2009.07.030.
- [13] 苗雯蓉,厚玉姣,石晓静,等.睡眠剥夺对机体认知功能的影响及其简要机制 [J]. *世界睡眠医学杂志*, 2020, 7 (5): 927-930. DOI: 10.3969/j.issn.2095-7130.2020.05.074.
- [14] Miao WR, Hou YJ, Shi XJ, et al. The effect of sleep deprivation on cognitive function and its mechanism [J]. *World J Sleep Med*, 2020, 7 (5): 927-930. DOI: 10.3969/j.issn.2095-7130.2020.05.074.
- [15] Sharma A, Muresanu DF, Lafuente JV, et al. Sleep deprivation-induced blood-brain barrier breakdown and brain dysfunction are exacerbated by size-related exposure to Ag and Cu nanoparticles. Neuroprotective effects of a 5-HT3 receptor antagonist ondansetron [J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 52 (2): 867-881. DOI: 10.1007/s12035-015-9236-9.
- [16] 姚莉,张晓庆,赵晶晶,等.重症加强治疗病房患者血 5-羟色胺水平与预后关系的研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2015, 27 (3): 229-231. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.03.016.
- [17] Yao L, Zhang XQ, Zhao JJ, et al. Association between blood serotonin levels and outcome in intensive care unit patients [J]. *Chin Crit Care Med*, 2015, 27 (3): 229-231. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.03.016.
- [18] 郭越训. 5-羟色胺与脓毒症患者预后的相关性研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2020.
- [19] Guo YX. Study on the correlation between serotonin and the prognosis of patients with sepsis [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2020.
- [20] He J, Hsueh H, He Y, et al. Sleep restriction impairs blood-brain barrier function [J]. *J Neurosci*, 2014, 34 (44): 14697-14706. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2111-14.2014.
- [21] Tardini F, Pincioli R, Berra L. The intensive care unit: how to make this unfriendly environment geriatric-friendly [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2020, 46 (3): 379-382. DOI: 10.1016/j.ejso.2019.12.022.
- [22] Minkel J, Moreta M, Muto J, et al. Sleep deprivation potentiates HPA axis stress reactivity in healthy adults [J]. *Health Psychol*, 2014, 33 (11): 1430-1434. DOI: 10.1037/a0034219.
- [23] Vargas I, Lopez-Duran N. Investigating the effect of acute sleep deprivation on hypothalamic-pituitary-adrenal-axis response to a psychosocial stressor [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2017, 79: 1-8. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2017.01.030.
- [24] 孙婷,韩芳,孙运良,等.重症监护病房谵妄患者 24 h 连续睡眠监测及褪黑素动态水平变化的研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26 (10): 726-729. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.10.010.
- [25] Sun T, Han F, Sun YL, et al. Research of 24-hour dynamic sleep monitoring and melatonin changes in patients with delirium in intensive care unit [J]. *Chin Crit Care Med*, 2014, 26 (10): 726-729. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.10.010.
- [26] Montes-Rodríguez CJ, Rueda-Orozco PE, Prospéro-García O. Total sleep deprivation impairs fear memory retrieval by decreasing the basolateral amygdala activity [J]. *Brain Res*, 2019, 1719: 17-23. DOI: 10.1016/j.brainres.2019.05.030.
- [27] Kröller-Schön S, Daiber A, Steven S, et al. Crucial role for Nox2 and sleep deprivation in aircraft noise-induced vascular and cerebral oxidative stress, inflammation, and gene regulation [J]. *Eur Heart J*, 2018, 39 (38): 3528-3539. DOI: 10.1093/eurheartj/ehy333.

(收稿日期: 2020-06-30)