论著·“神经外科疾病诊疗新进展”重点号

瑞马唑仑调控巨噬细胞M2极化修复紧密连接蛋白而减轻创伤性颅脑损伤小鼠肠道屏障功能障碍及代谢紊乱

蔡欣蓉,李维超,张 琛,佘 汉,毛庆祥 陆军军医大学(第三军医大学)大坪医院麻醉科,重庆

[摘要] **目的** 创伤性颅脑损伤(traumatic brain injury,TBI)可导致肠道屏障损伤及代谢紊乱。瑞马唑仑(remimazolam,Remi)具有一定的抗炎和器官保护作用。本研究拟观察Remi对TBI小鼠肠道屏障及肠道代谢的影响,并探索其可能的保护机制。**方法** 120只8~12周龄雄性C57BL/6小鼠(体质量18~20 g)采用随机数字法分为Sham组(仅行开颅术)、TBI组(采用控制性皮质撞击法造模)和TBI+Remi组(于造模前2 h腹腔注射瑞马唑仑10 mg/kg),每组40只,造模后24 h取材。HE染色检测回肠组织病理形态学改变,采用Chiu评分标准对回肠组织损伤程度进行半定量评价,透射电子显微镜观察回肠上皮细胞超微结构,伊文思蓝(evans blue,EB)染色检测肠道通透性,Western blotting检测紧密连接蛋白[闭锁蛋白(Occludin)、闭锁小带蛋白-1(zonula occludens-1,ZO-1)]的表达水平,ELISA检测回肠组织屏障功能及黏膜免疫相关指标[二胺氧化酶(diamine oxidase,DAO)、D-乳酸脱氢酶(D-lactate dehydrogenase,D-LDH)、分泌型免疫球蛋白A(secretory immunoglobulin A,sIgA)]的水平;Western blotting和免疫荧光检测诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase,iNOS)和甘露糖受体(cluster of differentiation 206,CD206)表达。采用非靶向代谢组学分析肠道代谢变化,并进行差异代谢物筛选及KEGG通路富集分析。**结果** 与Sham组相比,TBI组回肠黏膜及超微结构明显受损,Chiu评分、肠道通透性及DAO、D-LDH、sIgA水平升高,Occludin和ZO-1表达降低($P<0.05$);与TBI组相比,TBI+Remi组上述改变均明显改善($P<0.05$)。与Sham组相比,TBI组iNOS表达升高、CD206表达降低;与TBI组相比,TBI+Remi组iNOS表达下降、CD206表达升高($P<0.05$)。非靶向代谢组学共鉴定2 567种代谢物,与Sham组相比,TBI组筛选出851种差异代谢物,其中260种上调、591种下调,主要涉及氨基酸代谢、不饱和脂肪酸及胆汁酸代谢、糖代谢和核苷酸代谢等通路;TBI组瓜氨酸和酪氨酸相对丰度降低,5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid,5-ALA)和内源性前列腺素E2代谢物(15-Keto-prostaglandin E2,15-Keto-PGE2)升高;与TBI组相比,TBI+Remi组瓜氨酸和酪氨酸相对丰度升高,而5-ALA和15-Keto-PGE2相对丰度降低($P<0.05$)。**结论** 瑞马唑仑可减轻TBI小鼠肠黏膜及上皮超微结构损伤,增强紧密连接蛋白表达并降低肠道通透性,同时部分改善TBI所致的肠道代谢紊乱。

[关键词] 瑞马唑仑;创伤性颅脑损伤;肠道屏障功能;肠道代谢
[中图法分类号] R333.3;R651.15;R971.2 [文献标志码] A

Remimazolam attenuates intestinal barrier dysfunction and metabolic disorder in mice with traumatic brain injury by regulating macrophage M2 polarization and restoring tight junction proteins

Cai Xinrong, Li Weichao, Zhang Chen, She Han, Mao Qingxiang Department of Anesthesiology, Daping Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, China

[**Abstract**] **Objective** Traumatic brain injury (TBI) can lead to intestinal barrier disruption and

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82671675);重庆市自然科学基金重点项目(2024NSCQ-KJFZZDX0047);重庆英才创新领军人才项目(CSTC2024Y-CJH-BGZXM0011);重庆市科卫联合医学科研项目(2025MSXM042)

[通信作者] 毛庆祥,E-mail:qxmao@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2026, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议 (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:蔡欣蓉,李维超,张琛,等. 瑞马唑仑调控巨噬细胞M2极化修复紧密连接蛋白而减轻创伤性颅脑损伤小鼠肠道屏障功能障碍及代谢紊乱[J]. 陆军军医大学学报,2026,48(17):2428-2439. DOI:10.16016/j.2097-0927.202607047.

Citation:Cai X R,Li W C,Zhang C,*et al*. Remimazolam attenuates intestinal barrier dysfunction and metabolic disorder in mice with traumatic brain injury by regulating macrophage M2 polarization and restoring tight junction proteins[J]. J Army Med Univ,2026,48(17):2428-2439. DOI:10.16016/j.2097-0927.202607047.

metabolic disorder. Remimazolam (Remi) possesses certain anti-inflammatory and organ-protective effects. This study aims to determine the effects of Remi on intestinal barrier function and intestinal metabolism in TBI mice and explore its potential protective mechanisms. **Methods** A total of 120 male C57BL/6 mice (8 to 12 weeks old, weighing 18 to 20 g) were randomly divided into the Sham group (craniotomy only), the TBI group (established using controlled cortical impact), and the TBI+Remi group (intraperitoneal administration of 10 mg/kg Remi 2 h before modelling), with 40 mice in each group. Intestinal tissue samples were collected 24 h after modeling. Histopathological changes in ileal tissues were observed by HE staining, and the degree of ileal injury was semi-quantitatively assessed using the Chiu's scoring system. Transmission electron microscopy was used to observe the ultrastructure of ileal epithelial cells, and Evans blue (EB) staining was employed to assess intestinal permeability. Western blotting was performed to detect the expression levels of tight junction proteins [Occludin and zonula occludens-1 (ZO-1)]. ELISA was applied to measure the levels of intestinal barrier function-related and mucosal immune-related indicators, including diamine oxidase (DAO), D-lactate dehydrogenase (D-LDH), and secretory immunoglobulin A (sIgA). The expression levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cluster of differentiation 206 (CD206) were detected by Western blotting and immunofluorescence assay. Untargeted metabolomics was conducted to analyze intestinal metabolic changes, followed by differential metabolite screening and KEGG pathway enrichment analysis. **Results** Compared with the Sham group, the TBI group showed significantly damaged ileal mucosa and ultrastructure, with increased Chiu's score, intestinal permeability, and levels of DAO, D-LDH, and sIgA, as well as decreased expression of Occludin and ZO-1 ($P<0.05$). Remi treatment resulted in significant improvements in all the above changes compared with the condition in the TBI group ($P<0.05$). Increased iNOS expression and decreased CD206 expression were observed in the TBI group compared to the Sham group, while Remi treatment reversed the changes induced by TBI modeling ($P<0.05$). Untargeted metabolomics identified 2 567 metabolites, and compared with the Sham group, 851 differential metabolites were found in the TBI group, including 260 upregulated and 591 downregulated metabolites, mainly involved in amino acid metabolism, unsaturated fatty acid and bile acid metabolism, glucose metabolism, and nucleotide metabolism pathways. The relative abundance of citrulline and tyrosine was decreased in the TBI group, whereas 5-aminolevulinic acid (5-ALA) and the endogenous prostaglandin E2 metabolite 15-keto-prostaglandin E2 (15-keto-PGE2) were increased. Compared with the TBI group, the TBI+Remi group showed increased relative abundance of citrulline and tyrosine and decreased relative abundance of 5-ALA and 15-keto-PGE2 ($P<0.05$). **Conclusion** Remi alleviates intestinal mucosal and epithelial ultrastructural damage, enhances tight junction protein expression, and reduces intestinal permeability in TBI mice, and partially ameliorates TBI-induced intestinal metabolic disturbances.

[**Key words**] remimazolam; traumatic brain injury; intestinal barrier function; intestinal metabolism

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82671675), the Key Project of Natural Science Foundation of Chongqing (2024NSCQ-KJFZZDX0047), the Project for Innovative Leading Talents of Chongqing Talent Program (CSTC2024Y-CJH-BGZXM0011), and the Chongqing medical scientific research project (Joint project of Chongqing Health Commission and Science and Technology Bureau) (2025MSXM042).
Corresponding author: Mao Qingxiang, E-mail: qxmao@tmmu.edu.cn

创伤性颅脑损伤(traumatic brain injury,TBI)具有高发病率、高病死率以及高致残率的特点,是影响全球健康的主要因素之一[1]。仅2021年全球就记录超过2 000万例TBI相关病例,且研究表明,TBI所致的长期功能残疾严重影响患者生活质量与社会再整合能力[2]。TBI引发的"炎症风暴"导致的多器官功能障碍是引起患者死亡以及不良预后的重要因素之一[3]。在众多器官中,由于肠-脑轴(gut-brain axis,GBA)在TBI病理中的核心作用,调节胃肠道功能已成为改善TBI预后的关键干预靶点[4-6]。GBA亦被称为微生物群-肠-脑轴,是肠道微生物群与中枢神经系统之间复杂的双向信号通路,通过神经、内分泌、免疫和代谢途径实现沟通[6]。TBI后常出现肠道屏障受损、通透性增加、菌群失调及细菌/内毒素易位等改变,进而激活全身炎症,并通过GBA这一双向通路,进一步加剧中枢神经系统的炎症反应与脑水肿,形成恶性循环[4,7-8]。

肠道巨噬细胞是维持黏膜免疫稳态、调节局部炎症反应及促进屏障修复的重要细胞群[9-10]。已有研究表明,TBI后肠道巨噬细胞相关信号改变可能参与肠道功能障碍[11]。巨噬细胞功能表型与其代谢状态密切相关,不同功能状态伴随糖酵解、三羧酸循环、氧化磷酸化以及脂质和氨基酸代谢等程序的重塑[12-13]。

这些研究提示,TBI后肠道局部免疫状态和代谢环境均可能发生改变,但目前尚不能简单建立二者之间的直接联系。

瑞马唑仑(remimazolam,Remi)是一种新型超短效苯二氮䓬类药物,具有代谢不依赖肝肾(经组织酯酶水解)、无蓄积、循环和呼吸抑制作用较轻、可控性强等优势,尤其适用于需要长期镇静的TBI患者[14-15]。除镇静作用外,已有研究表明其在脓毒症及缺血再灌注损伤等模型中具有一定的抗炎及器官保护作用[16-20]。然而,其在TBI所致肠道屏障损伤中的作用仍缺乏直接证据。

基于上述背景,本研究采用组织病理学、超微结构观察、紧密连接蛋白检测及肠道通透性评价等多种方法,首先明确Remi对TBI小鼠肠道屏障损伤的影响;进一步检测肠组织诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase,iNOS)和甘露糖受体(cluster of differentiation 206,CD206)表达,以探索Remi干预后肠道局部巨噬细胞极化相关标志物的变化;此外,采用非靶向代谢组学分析TBI及Remi干预后肠道代谢谱变化,并筛选具有代表性的Remi缓解型代谢物。上述指标分别从屏障功能、免疫相关表型和整体代谢状态3个层面评价Remi的肠道保护效应。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 120只成年雄性SPF级C57BL/6小鼠(8~12周龄,体质量18~20 g)由陆军军医大学大坪医院实验动物中心提供。动物饲养环境为SPF等级,饲养期间自由饮水和摄食。昼夜节律采用12 h明暗交替精准调控,温度维持在(22±1)℃,湿度控制在40%~70%。所有动物实验按照相关指南执行,并获得陆军军医大学实验动物福利伦理委员会批准(AMUWEC20267079)。

1.1.2 主要试剂与仪器 注射用苯磺酸瑞马唑仑购自人福医药集团股份有限公司;β-肌动蛋白(β-actin)、紧密连接蛋白[闭锁蛋白(Occludin)、闭锁小带蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1)]、山羊抗鼠二抗、山羊抗兔二抗购自美国Boster公司;伊文思蓝(Evans blue,EB)、iNOS抗体、CD206抗体购自美国Abcam公司;二胺氧化酶(diamine oxidase,DAO)、分泌型免疫球蛋白A(secretory immunoglobulin A,sIgA)ELISA试剂盒购自中国Elabscience公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒、D-乳酸脱氢酶(D-lactate dehydrogenase,D-LDH)ELISA试剂盒购自中国碧云天生物技术公司。主要仪器包括:控制性皮质撞击仪(Leica Impact One,德国Leica公司);透射电子显微镜(JEM-1400PLUS,日本JEOL公司);超高效液相色谱仪(Vanquish,美国Thermo Fisher Scientific公司);高分辨质谱仪(Orbitrap Exploris 120,美国Thermo Fisher Scientific公司);激光共聚焦显微镜及化学发光成像系统等。

1.2 实验分组及TBI模型的构建

将120只C57BL/6小鼠采用随机数字法分为Sham组、TBI组和TBI+Remi组,每组40只。Sham组仅行开颅手术不实施撞击;TBI组行控制性皮质撞击(controlled cortical impact,CCI)建立损伤模型;TBI+Remi组在造模前2 h腹腔注射苯磺酸瑞马唑仑(10 mg/kg)。所有小鼠术前禁食12 h,自由饮水。采用2.5%三溴乙醇(312 mg/kg)进行腹腔注射麻醉,采用CCI制作TBI模型[21-22]:在颅骨正上方纵向切开头皮充分暴露颅骨,然后行直径3.5 mm的开颅手术,中心位于右半球中线外侧2.0 mm;然后使用电动皮质挫伤冲击器,配备直径3 mm的尖端,冲击速度为3.5 m/s,冲击深度为2 mm,停留时间为500 ms。术后小鼠置于保温垫上复苏,待完全清醒后返回笼内饲养。造模24 h后,腹腔注射三溴乙醇达到深度麻醉,采用颈椎脱臼法将小鼠安乐死,取回肠末端组织进行后续实验。

1.3 HE染色检测小鼠回肠组织病理学改变

取回肠末端约0.5 cm长的组织,用PBS冲洗后置于4%多聚甲醛中固定24 h。经常规脱水、透明、石蜡包埋后切片,进行HE染色,在光学显微镜下观察肠黏膜结构及病理改变。采用Chiu评分标准对小肠黏膜组织损伤程度进行半定量评价,评分为0~5分(0分:绒毛正常;1分:顶端出现上皮下间隙;2分:间隙扩大,上皮与固有层分离;3分:上皮广泛抬起并部分脱落;4分:上皮广泛脱落,固有层暴露;5分:固有层崩解,伴出血和溃疡)[23]。

1.4 透射电子显微镜观察小鼠回肠上皮细胞超微结构

取回肠末端组织,以2.5%戊二醛在4 ℃固定过夜,经PBS洗涤后再采用1%四氧化锇室温后固定2 h,随后进行梯度乙醇(30%、50%、70%、80%、90%、95%及100%)脱水、醋酸铀/柠檬酸铅染色及环氧树脂包埋。超薄切片后采用透射电子显微镜观察肠上皮细胞紧密连接结构变化。

1.5 EB染色检测小鼠回肠组织通透性改变

取长约6 cm回肠段,以PBS冲洗干净后结扎一端形成盲囊,注入200 μL 1.5%EB溶液,37 ℃孵育30 min。PBS冲洗后将组织烘干称量,置于甲酰胺中37 ℃孵育

24 h提取染料,8 000×*g*离心10 min后取上清,于650 nm处测定吸光度$OD_{(650)}$,以$OD_{(650)}$/组织质量(g)的比值表示肠通透性。

1.6 Western blotting检测小鼠回肠组织紧密连接蛋白及巨噬细胞极化相关蛋白表达

取回肠末端组织,液氮研磨后加入RIPA裂解液(含蛋白酶及磷酸酶抑制剂),冰上裂解30 min后,将研磨液以4 ℃、12 000×*g*离心20 min后取上清。采用BCA法测定蛋白浓度并统一各样本上样量,加入蛋白上样缓冲液后煮沸变性。取等量蛋白经SDS-PAGE电泳分离后转移至PVDF膜,封闭后分别加入Occludin、ZO-1、iNOS、CD206及β-actin一抗,4 ℃孵育过夜;洗膜后加入相应HRP标记二抗孵育。采用化学发光法显影并采集条带图像,使用Image J软件进行灰度分析,以β-actin作为内参,计算各目的蛋白的相对表达水平。

1.7 ELISA检测小鼠回肠组织DAO、D-LDH及sIgA水平

取回肠末端组织,PBS冲洗后液氮研磨,加PBS匀浆并离心取上清。采用ELISA试剂盒检测D-LDH、DAO及sIgA水平。其中,D-LDH主要反映肠道D-乳酸代谢及菌群代谢状态,DAO主要反映肠绒毛上皮细胞损伤和黏膜结构完整性,sIgA则反映肠黏膜局部免疫应答及黏膜防御功能。按照说明书加入标准品及样本,完成抗体孵育、洗涤、显色及终止反应后,于450 nm处测定吸光度$OD_{(450)}$,并依据标准曲线计算各指标含量,以评估肠屏障损伤及黏膜免疫功能状态。

1.8 免疫荧光分析小鼠回肠组织iNOS和CD206表达

取回肠末端组织,4%多聚甲醛固定后OCT包埋,-80 ℃保存。制备8 μm冷冻切片后进行固定、透膜及封闭处理,分别加入iNOS(M1相关标志物)及CD206(M2相关标志物)一抗(1∶400),4 ℃孵育过夜。次日加入荧光二抗(1∶300),DAPI复染细胞核。封片后采用激光共聚焦显微镜观察并使用Image J进行荧光强度分析。

1.9 小鼠粪便非靶向代谢组学检测及生物信息学分析

造模24 h后收集新鲜小鼠粪便(50~100 mg),避免污染,2 min内液氮速冻后转入-80 ℃保存。称取约25 mg样本,加入500 μL预冷至-40 ℃的含内标甲醇-乙腈-水提取液(体积比为2∶2∶1),经匀浆、冰水浴超声及低温静置后过滤。采用超高效液相色谱仪-高分辨质谱系统进行检测,分别在正、负离子模式下采集一级和二级质谱数据。色谱柱为Waters ACQUITY UPLC BEH Amide柱(2.1 mm×50 mm,1.7 μm),进样量为2 μL。

所有样本等体积混合制备质量控制样本,用于评价检测稳定性和数据重复性。原始数据经ProteoWizard软件(V3.0.24054)转换为mzXML格式,并使用R程序和自建数据库,根据保留时间、母离子质荷比及二级质谱信息进行代谢物鉴定。数据经异常值过滤、缺失值处理及总离子流归一化后,采用SIMCA 18.0.1进行主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least square discriminant analysis, OPLS-DA),OPLS-DA模型通过7折交叉验证及200次置换检验评价稳定性。差异代谢物筛选标准为VIP>1且$P<0.05$。

将差异代谢物映射至KEGG数据库,采用Fisher检验进行通路富集分析,并结合富集因子(rich factor)评价通路富集程度。首先筛选TBI组与Sham组差异代谢物,进一步比较TBI+Remi组与TBI组,将TBI后发生异常且经Remi干预后变化方向与TBI所致变化方向相反的代谢物定义为"Remi缓解型代谢物",并进行KEGG富集分析及代表性代谢物分析。

1.10 统计学分析

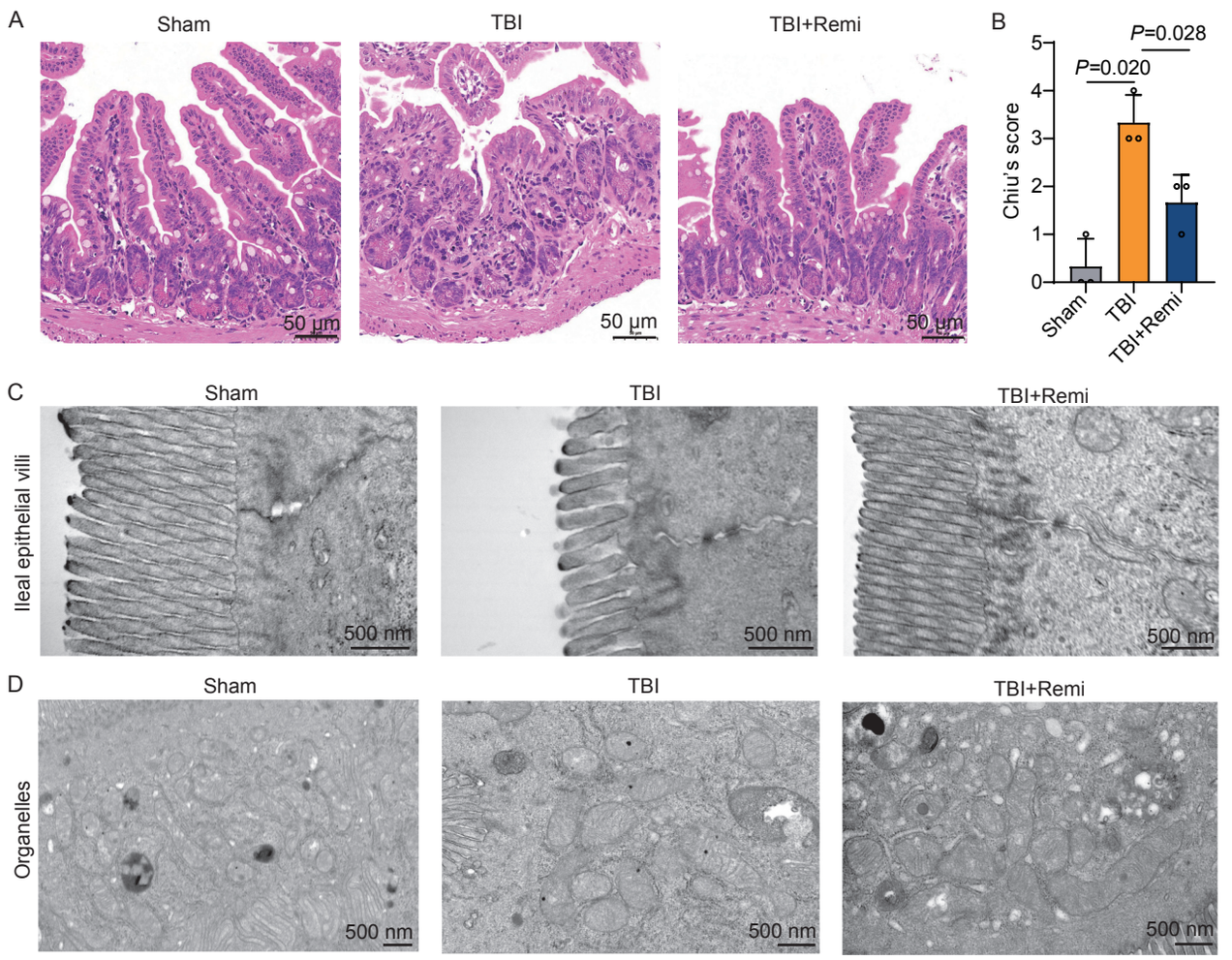
采用GraphPad Prism 9.5统计软件进行分析,实验数据以$\bar{x}\pm s$表示,多组间比较采用单因素方差分析;代谢组学数据采用相应多元统计分析方法进行处理。$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Remi对TBI小鼠肠道屏障功能的保护作用

2.1.1 Remi可减轻TBI小鼠回肠黏膜及上皮超微结构损伤 HE染色结果显示,Sham组肠黏膜结构完整,绒毛排列整齐,上皮和隐窝结构清晰;TBI组绒毛缩短、排列紊乱,部分绒毛断裂或脱落,间质疏松并伴水肿,局部可见上皮连续性中断及基底膜裸露;TBI+Remi组上述损伤有所减轻(图1A),Chiu评分明显降低($P<0.05$,图1B)。透射电子显微镜观察结果显示,TBI组微绒毛缩短、排列紊乱,紧密连接结构模糊,TBI+Remi组微绒毛及紧密连接结构有所改善(图1C);此外,TBI组可见线粒体肿胀、嵴排列紊乱及胞质空泡样改变,TBI+Remi组细胞器损伤减轻(图1D)。

2.1.2 Remi上调Occludin和ZO-1表达并降低TBI小鼠肠道通透性 Western blotting结果显示,与Sham组相比,TBI组小鼠肠道组织紧密连接蛋白Occludin及ZO-1表达明显降低;与TBI组相比,TBI+Remi组小鼠Occludin及ZO-1的表达显著上升($P<0.05$,图2A)。EB染色结果显示,Sham组肠道组织中仅观察到少量



A: Representative images of HE staining showing histopathological changes in the mouse ileal tissues across groups; B: Statistical analysis of Chiu's score of the mouse ileal tissues across groups; C and D: Representative images of transmission electron microscopy of ultrastructural changes in ileal epithelial villi (C) and organelles (D) across 3 groups

图1 Remi对TBI小鼠肠道上皮形态学的影响(n=3,$\bar{x}\pm s$)

Figure 1 Effects of remimazolam (Remi) on intestinal epithelial morphology in traumatic brain injury (TBI) mice (n=3,$\bar{x}\pm s$)

EB残留,TBI组小鼠肠道通透性明显增高,冲洗后残留于肠道组织的EB含量增加,TBI+Remi组吸光度较TBI组显著降低(P<0.05,图2B)。

进一步采用ELISA检测肠道屏障功能及黏膜免疫相关指标。结果显示,与Sham组相比,TBI组肠道DAO、D-LDH和sIgA水平均明显升高;而与TBI组相比,TBI+Remi组肠道DAO、D-LDH和sIgA水平均降低(P<0.05,图2C~E)。

2.2 Remi改善TBI小鼠回肠组织iNOS和CD206表达异常

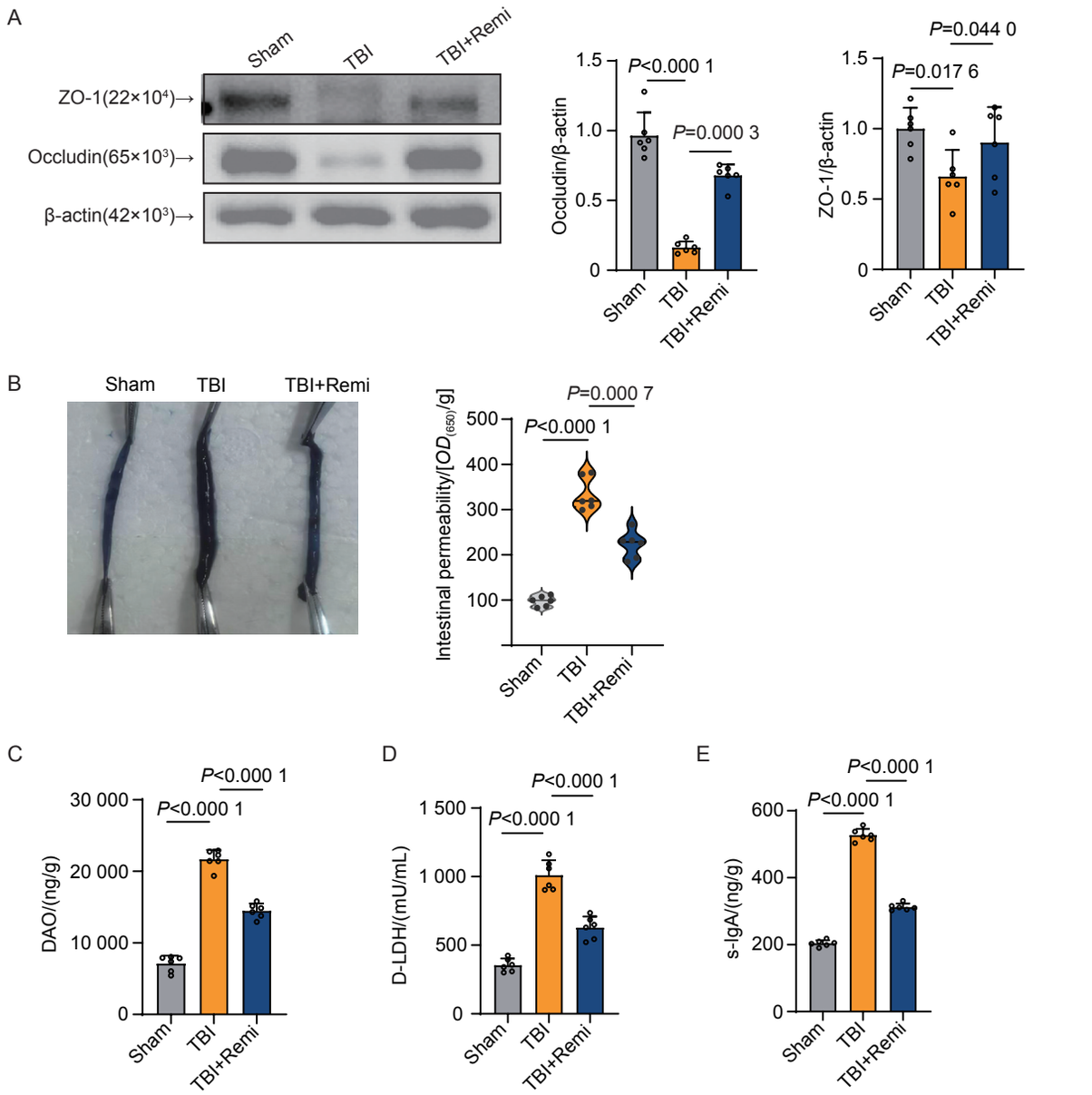
Western blotting结果显示,与Sham组相比,TBI组小鼠肠组织iNOS表达明显升高,CD206表达明显降低;与TBI组相比,TBI+Remi组小鼠iNOS表达下降,CD206表达回升(P<0.05,图3A)。免疫荧光结果显示,与Sham组相比,TBI组肠组织iNOS荧光信号增强、CD206荧光信号减弱;与TBI组相比,TBI+Remi组iNOS信号降低、CD206信号增强,相对荧光强度比较差异具有统计学意义(P<0.05,图3B)。

2.3 Remi对TBI小鼠肠道代谢的影响

2.3.1 代谢组学数据质量与模型评价

非靶向代谢组学共纳入9份粪便样本,每组3份。原始数据经峰提取后共获得72 101个代谢特征,经异常值过滤、缺失值处理及总离子流归一化后保留72 074个特征,并鉴定获得2 567种具有二级质谱信息的代谢物。PCA分析显示,全部样本均位于95%CI内,未发现明显离群样本(图4A)。

进一步采用OPLS-DA模型评价组间代谢谱差异。TBI组与Sham组比较,Q^2回归线截距为-0.24,提示模型



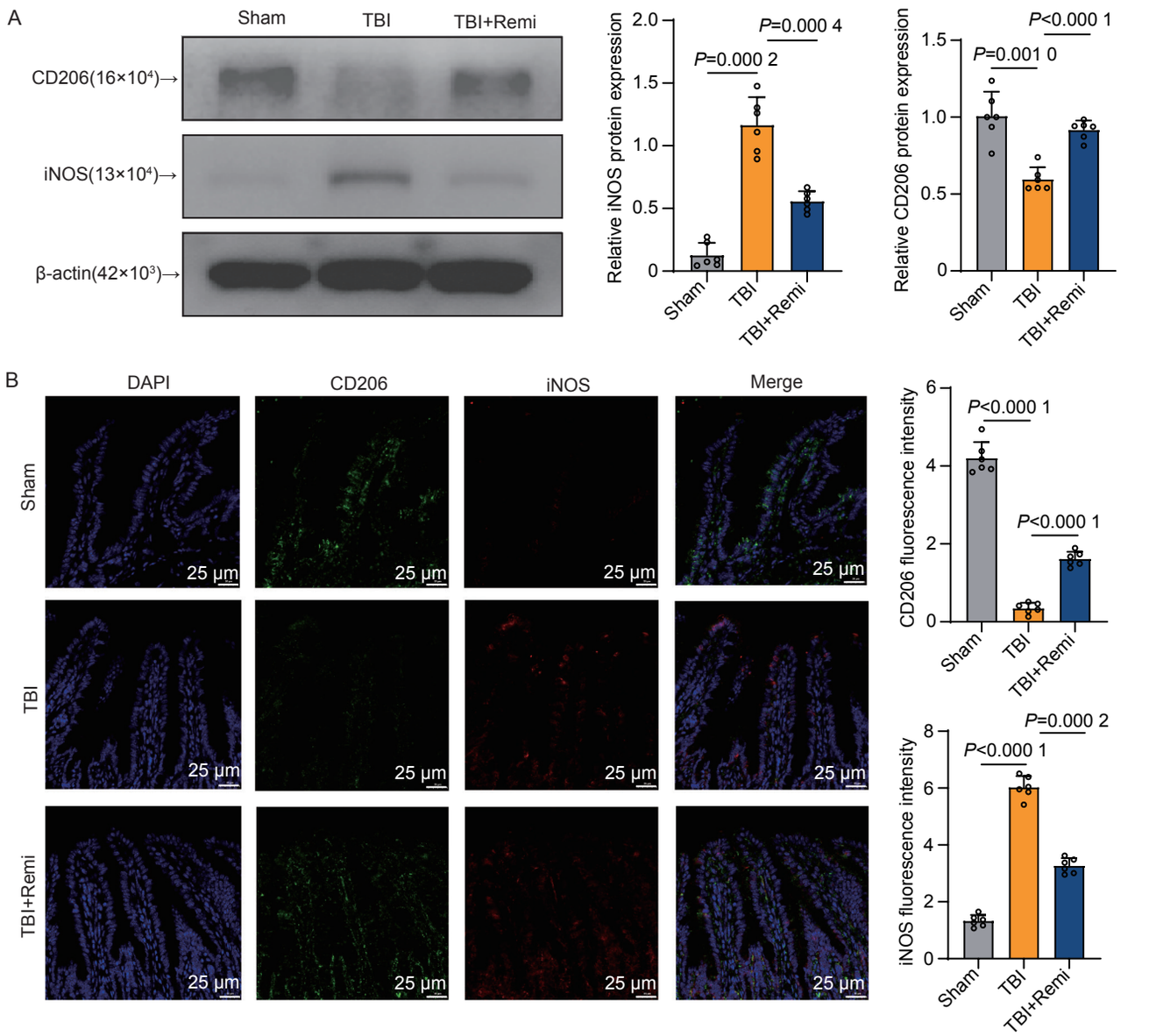
A: Expression levels of Occludin and ZO-1 by Western blotting and statistical analysis in the ileal tissues across groups; B: Representative images of Evans blue (EB) leakage levels and quantitative analysis of EB content in the ileal tissues across groups; C to E: Statistical analysis of DAO (C), D-LDH (D), and sIgA (E) contents in the ileal tissues across groups

图2　Remi对TBI小鼠肠道屏障功能的影响(n=6,$\bar{x}\pm s$)

Figure 2　Effects of Remi on intestinal barrier function in TBI mice (n=6,$\bar{x}\pm s$)

未显示明显过拟合(图4B)。TBI组与TBI+Remi组比较,Q^2回归线截距为0.30(图4C),提示模型预测稳定性相对有限,因此后续差异代谢物筛选未单独依赖OPLS-DA模型,而是结合VIP>1及单变量统计分析P<0.05进行综合判定,并对相关代谢差异结果进行谨慎解释。

2.3.2　TBI诱导以氨基酸和脂质代谢异常为主要特征的肠道代谢紊乱　　非靶向代谢组学分析显示,与Sham组相比,TBI组共筛选出851种差异代谢物,其中260种上调、591种下调,提示TBI可引起明显的肠道相关代谢改变(图5A)。KEGG富集分析显示,与Sham组相比,TBI组的差异代谢物主要涉及氨基酸代谢、不饱和脂肪酸及胆汁酸代谢、糖代谢和核苷酸代谢等通路(图5B)。差异丰度评分分析进一步表明,与Sham组相比,TBI组多数氨基酸、脂质和胆汁酸相关通路中的差异代谢物整体以下调为主,而淀粉和蔗糖代谢相关代谢物呈上调趋势(图5C)。

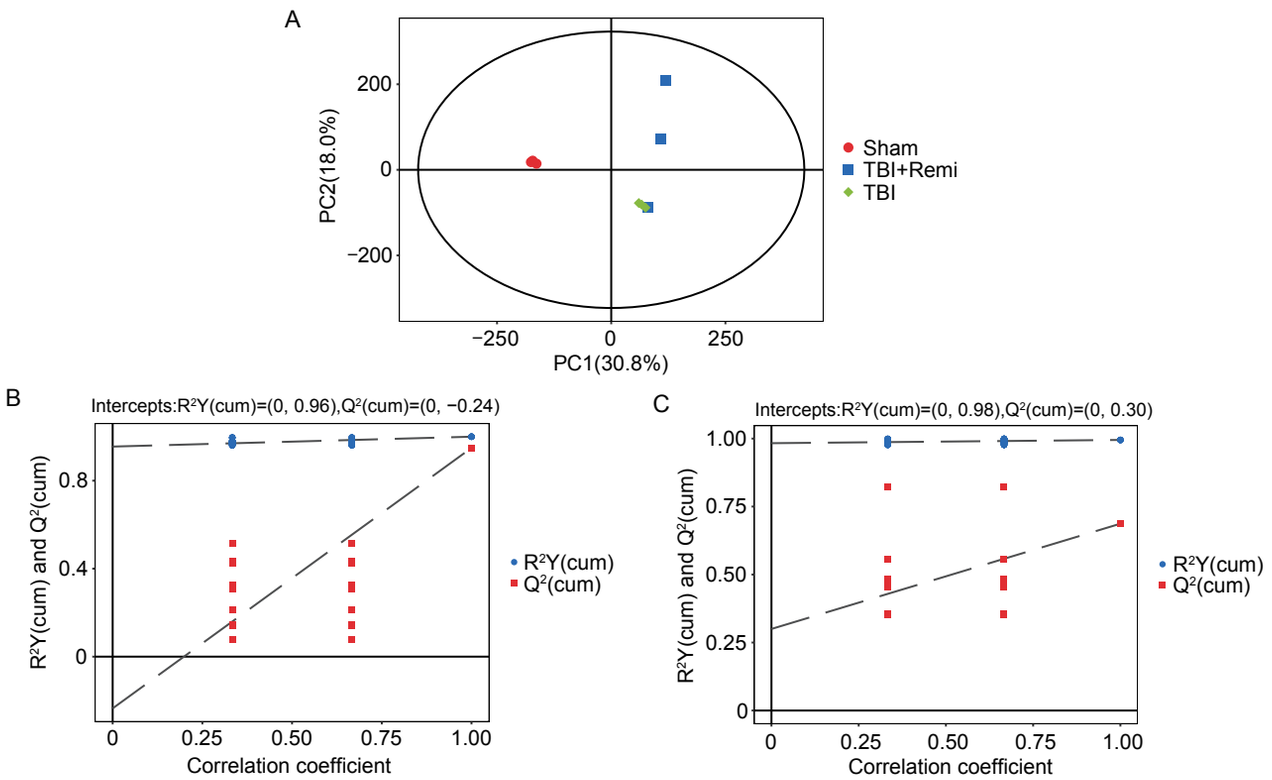


A: Expression levels of iNOS and CD206 by Western blotting and statistical analysis in the ileal tissues across groups; B: Representative images of immunofluorescence assay and quantitative analysis of iNOS and CD206 in the intestinal tissues across groups

图3 Remi对TBI小鼠肠道组织iNOS和CD206表达的影响(n=6,$\bar{x}\pm s$)

Figure 3 Effects of Remi on iNOS and CD206 expression in intestinal tissues of TBI mice (n=6,$\bar{x}\pm s$)

2.3.3 Remi可部分逆转TBI诱导的氨基酸及能量底物相关代谢异常 鉴于TBI组与TBI+Remi组的OPLS-DA模型稳定性相对有限,本研究进一步以探索性分析方式筛选Remi缓解型代谢物。热图显示,部分代谢物在TBI后明显升高或降低,而Remi干预后其相对丰度向Sham组水平回调,如Sphingosine等代谢物呈现明显回调趋势(图6A)。KEGG富集分析显示,Remi缓解型代谢物主要涉及氨基酸生物合成、2-氧羧酸代谢、支链氨基酸合成与降解、芳香族氨基酸生物合成、甘氨酸/丝氨酸/苏氨酸代谢以及辅因子和核苷酸代谢等过程(图6B)。代表性代谢物分析进一步显示,与Sham组相比,TBI组瓜氨酸和酪氨酸相对丰度降低,5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid,5-ALA)和内源性前列腺素E2代谢物(15-Keto-prostaglandin E2,15-Keto-PGE2)相对丰度升高;与TBI组相比,TBI+Remi组瓜氨酸和酪氨酸相对丰度明显回升,5-ALA和15-Keto-PGE2明显下降(图6C)。



A: Scatter plot of principal component analysis (PCA) score of all samples from untargeted metabolomics; B: Permutation test results of the OPLS-DA model between the TBI group and the Sham group; C: Permutation test results of the OPLS-DA model between the TBI group and the TBI+Remi group

图4 非靶向代谢组学样本分布及OPLS-DA模型评价(n=3)

Figure 4 Sample distribution and OPLS-DA model evaluation in untargeted metabolomics(n=3)

3 讨论

本研究证实,Remi预处理能够改善TBI小鼠肠道黏膜结构、紧密连接蛋白表达及屏障通透性,表明其对TBI相关肠道屏障损伤具有保护作用。与此同时,Remi干预后肠组织iNOS表达降低、CD206表达升高,并部分改善TBI引起的肠道代谢异常。上述结果提示Remi可能通过调节局部炎症状态及代谢环境参与肠道保护过程,但其具体作用机制仍需进一步研究。

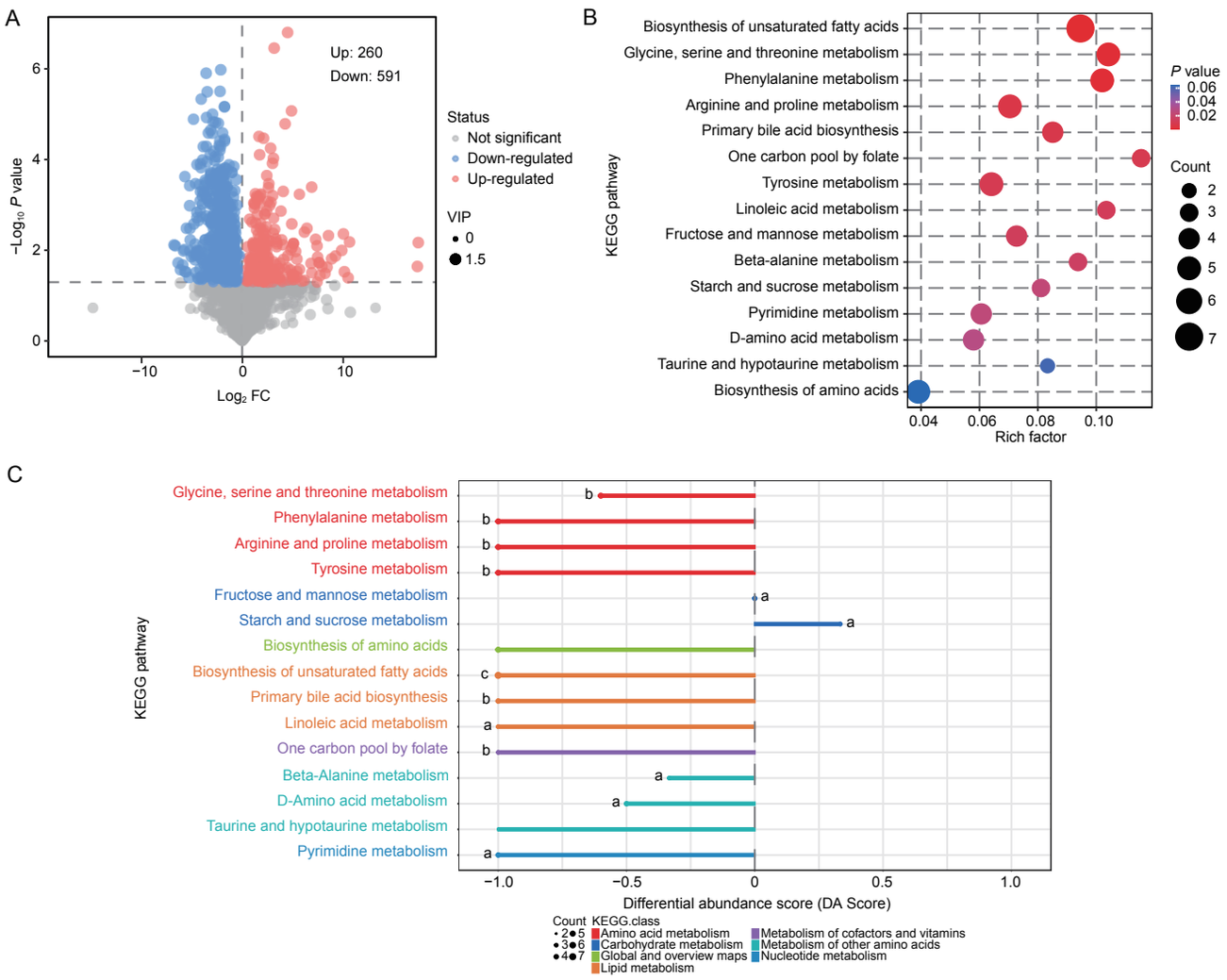
3.1 Remi可减轻TBI小鼠肠道屏障损伤

TBI后机体可发生明显的全身炎症反应和多器官功能紊乱,其中肠道屏障破坏被认为是影响疾病进展的重要因素之一。本研究发现,Remi干预后肠道屏障相关指标得到改善。需要注意的是,DAO和D-LDH主要用于反映肠上皮损伤及屏障功能变化,而sIgA主要反映肠黏膜免疫状态,其变化应结合其他屏障指标综合评价。既往研究在盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture,CLP)脓毒症模型中发现,Remi可改善脓毒症小鼠生存结局并减轻肠道通透性增加[24]。本研究进一步验证了Remi在TBI相关肠道损伤中的保护作用。Remi作为一种新型超短效苯二氮䓬类镇静药,具有起效快、代谢迅速、作用时间短及可控性较好的特点,并具有氟马西尼特异性拮抗作用[14]。在明确Remi具有肠道保护作用的基础上,本研究进一步观察其干预后肠道组织iNOS和CD206等免疫相关标志物的变化。

需要注意的是,Remi首先是一种作用于中枢神经系统的苯二氮䓬类镇静药,而TBI后的肠道功能障碍受到GBA、神经内分泌反应、全身炎症及局部免疫等多种因素共同影响[4-5,7-8]。因此,Remi对肠道屏障的保护作用可能涉及中枢神经系统状态、GBA及外周炎症反应等多个环节。基于炎症反应在TBI相关肠道损伤中的重要作用,本研究进一步观察了Remi干预后肠道炎症相关免疫表型的变化。

3.2 Remi促进TBI后肠组织巨噬细胞极化相关标志物向抗炎和组织修复方向转变

巨噬细胞参与肠道黏膜炎症调节和组织修复[9-10]。本研究发现,TBI后肠组织iNOS表达升高、CD206表



A: Volcano plot of differential metabolites between the TBI group and the Sham group; B: KEGG pathway enrichment analysis of differential metabolites between the TBI group and the Sham group; C: KEGG pathway differential abundance scores of differential metabolites between the TBI group and the Sham group. a:P<0.05; b:P<0.01; c:P<0.001

图5 TBI对小鼠肠道代谢功能的影响(n=3)

Figure 5 Effects of TBI on intestinal metabolic function in mice (n=3)

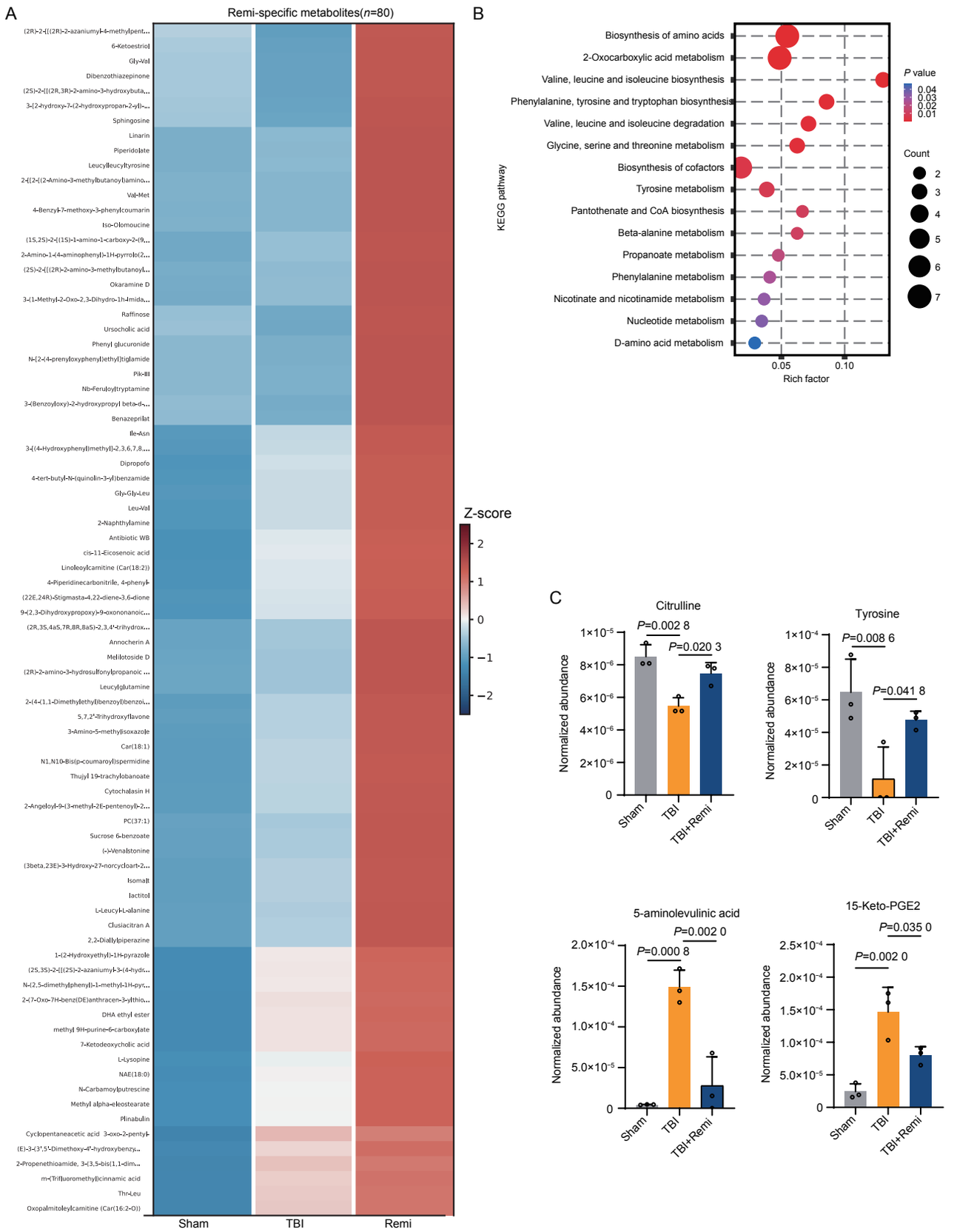
达降低,而Remi干预后iNOS表达降低、CD206表达回升,表明Remi可改善TBI后巨噬细胞极化相关标志物的表达模式,使其向抗炎和组织修复相关方向转变。

既往研究表明,Remi具有一定的抗炎作用,并可影响巨噬细胞炎症反应[18,20]。然而,本研究结果仅反映整体肠组织中iNOS和CD206表达变化,尚不能明确其是否代表巨噬细胞功能状态的实际转变。因此,Remi调节巨噬细胞相关表型在肠道保护中的具体作用仍需进一步验证。

3.3 Remi可部分恢复TBI诱导的肠道代谢异常

本研究非靶向代谢组学显示,TBI后小鼠肠道代谢谱明显改变,主要涉及氨基酸、脂质、胆汁酸、糖及核苷酸代谢。既往研究也发现,TBI可引起肠道菌群及相关代谢物广泛变化[25]。本研究进一步发现,Remi干预可使部分异常代谢物恢复至接近Sham组水平,提示Remi可能参与调节TBI后的肠道代谢稳态。

进一步分析发现,瓜氨酸、酪氨酸、5-ALA和15-Keto-PGE2等代表性代谢物在TBI后发生明显变化,并在Remi干预后呈现恢复趋势。瓜氨酸主要与小肠上皮细胞代谢有关,循环瓜氨酸水平常用于反映小肠功能性上皮细胞数量及肠道功能状态[26]。本研究中粪便瓜氨酸变化与肠屏障改善方向一致,但由于检测样本来源不同,不能直接将其作为肠上皮损伤程度的评价指标。酪氨酸属于芳香族氨基酸,其肠道代谢受宿



A: Cluster heatmap analysis of Remi-specific metabolites; B: KEGG pathway enrichment analysis of Remi-alleviated metabolites; C: Comparison of relative abundance of representative Remi-alleviated metabolites across groups

图6 Remi对TBI小鼠肠道代谢功能的影响($\bar{x}\pm s$, n=3)

Figure 6 Effects of Remi on intestinal metabolic function in TBI mice($\bar{x}\pm s$, n=3)

主营养吸收和肠道菌群共同影响[27]。TBI后酪氨酸降低、Remi干预后回升,提示TBI可能影响芳香族氨基酸相关代谢过程,而Remi可能对该异常变化具有一定调节作用。

5-ALA是血红素合成的重要前体,与线粒体及能量代谢密切相关[28]。本研究中其变化提示TBI后卟啉合成及相关能量代谢过程可能受到影响,而不能简单解释为5-ALA本身具有致损作用。15-Keto-PGE2是PGE2的下游代谢产物之一,已有研究显示其具有一定的炎症调节作用[29]。因此,TBI后15-Keto-PGE2升高更可能反映TBI后前列腺素相关脂质代谢及炎症调节过程的改变。

总体而言,瓜氨酸、酪氨酸、5-ALA和15-Keto-PGE2均在TBI后发生明显变化,并经Remi干预后向Sham组方向恢复,提示上述代谢物可能反映TBI相关肠道代谢紊乱及Remi干预后的代谢调节效应。但由于缺乏靶向定量及独立验证,目前仍不能将其定义为特异性生物标志物。

本研究仍存在一定局限性。首先,本研究根据既往文献提出巨噬细胞极化相关变化可能影响肠道局部代谢环境,并观察到Remi干预后iNOS、CD206及肠道代谢谱均发生改善。然而,研究未采用巨噬细胞清除、极化阻断或特异性基因干预等方法,因此不能确定巨噬细胞表型变化是否位于代谢变化上游。其次,本研究采用粪便非靶向代谢组学,反映的是整体肠道代谢特征,无法区分代谢物来源于巨噬细胞、肠上皮细胞、肠道菌群还是药物代谢过程。再次,研究未对巨噬细胞极化指标和关键代谢物进行个体水平相关性分析,也未通过靶向代谢组学或代谢物补充实验验证关键代谢通路。最后,本研究仅观察24 h单一时间点,且主要聚焦巨噬细胞极化,对其他肠屏障相关细胞未作进一步分析。

后续可首先通过巨噬细胞清除或极化阻断实验,观察在Remi干预条件下肠道代谢谱改善是否消失或减弱;随后针对筛选出的关键代谢物进行靶向定量和补充或抑制实验,以验证"巨噬细胞极化相关表型改善-肠道代谢环境恢复-肠道屏障保护"的可能作用顺序。此外,可在多个时间点动态观察Remi的肠保护效应,并拓展至肠道上皮干细胞、树突状细胞、神经胶质细胞等肠屏障相关细胞,以全方位揭示其作用机制。

综上所述,Remi能够减轻TBI小鼠肠黏膜结构损伤,改善紧密连接蛋白表达并降低肠道通透性,表明其对TBI相关肠道屏障损伤具有保护作用。同时,Remi干预后肠组织iNOS和CD206表达异常及部分肠道代谢异常得到改善。现有结果主要表明上述变化与Remi的肠道保护作用同时出现,尚不能确定巨噬细胞表型变化在其中是否具有介导作用,也不能建立其与肠道代谢变化之间的直接因果联系。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] Dewan M C, Rattani A, Gupta S, *et al*. Estimating the global incidence of traumatic brain injury[J]. J Neurosurg, 2019, 130(4): 1080-1097. DOI:10.3171/2017.10.JNS17352.

[2] Gu L, Zhang L H, Li C, *et al*. Global, regional, and national burden of traumatic brain injury, 1990—2021: a systematic analysis for the global burden of disease study 2021[J]. J Neurotrauma, 2025, 42(19-20): 1805-1815. DOI:10.1089/neu.2025.0039.

[3] Anthony D C, Couch Y, Losey P, *et al*. The systemic response to brain injury and disease[J]. Brain Behav Immun, 2012, 26(4): 534-540. DOI:10.1016/j.bbi.2011.10.011.

[4] Hanscom M, Loane D J, Shea-Donohue T. Brain-gut axis dysfunction in the pathogenesis of traumatic brain injury[J]. J Clin Investig, 2021, 131(12): e143777. DOI: 10.1172/jci143777.

[5] Sundman M H, Chen N K, Subbian V, *et al*. The bidirectional gut-brain-microbiota axis as a potential nexus between traumatic brain injury, inflammation, and disease[J]. Brain Behav Immun, 2017, 66: 31-44. DOI:10.1016/j.bbi.2017.05.009.

[6] Arneth B M. Gut-brain axis biochemical signalling from the gastrointestinal tract to the central nervous system: gut dysbiosis and altered brain function[J]. Postgrad Med J, 2018, 94(1114): 446-452. DOI: 10.1136/postgradmedj-2017-135424.

[7] Lin Y S, Hou C S, Wang C, *et al*. Research progress on digestive disorders following traumatic brain injury[J]. Front Immunol, 2024, 15: 1524495. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1524495.

[8] Bansal V, Costantini T, Kroll L, *et al*. Traumatic brain injury and intestinal dysfunction: uncovering the neuro-enteric axis[J]. J Neurotrauma, 2009, 26(8): 1353-1359. DOI:10.1089/neu.2008.0858.

[9] Delfini M, Stakenborg N, Viola M F, *et al*. Macrophages in the gut: masters in multitasking[J]. Immunity, 2022, 55(9): 1530-1548. DOI:10.1016/j.immuni.2022.08.005.

[10] Meng E X, Verne G N, Zhou Q Q. Macrophages and gut barrier function: guardians of gastrointestinal health in post-inflammatory and post-infection responses[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(17): 9422. DOI:10.3390/ijms25179422.

[11] Wei C Z, Zhu F, Yu J T, *et al*. Tongqiao Huoxue Decoction ameliorates traumatic brain injury-induced gastrointestinal dysfunction by regulating CD36/15-LO/NR4A1 signaling, which fails when CD36 and CX3CR1 are deficient[J]. CNS Neurosci Ther, 2023, 29(Suppl 1): 161-184. DOI: 10.1111/cns.14247.

[12] Jha A K, Huang S C, Sergushichev A, *et al*. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization[J]. Immunity, 2015, 42(3): 419-430. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.02.005.

[13] Van den Bossche J, O'Neill L A, Menon D. Macrophage immunometabolism: where are we (going)[J]. Trends Immunol, 2017, 38(6): 395-406. DOI: 10.1016/j.it.2017.03.001.

[14] Lee A, Shirley M. Remimazolam: a review in procedural sedation[J]. Drugs, 2021, 81(10): 1193-1201. DOI: 10.1007/s40265-021-01544-8.

[15] Kilpatrick G J, McIntyre M S, Cox R F, *et al*. CNS 7056: a novel ultra-short-acting benzodiazepine[J]. Anesthesiology, 2007, 107(1): 60-66. DOI: 10.1097/01.anes.0000267503.85085.c0.

[16] Sun C, Zhang Y, Wang J H, *et al*. Remimazolam attenuates traumatic brain injury-induced acute lung injury by suppressing pulmonary epithelial pyroptosis[J]. J Neuroinflammation, 2025, 23(1): 16. DOI: 10.1186/s12974-025-03653-7.

[17] Shi Y H, Deng H S, Zhang Z M, *et al*. Remimazolam protects the liver from ischemia-reperfusion injury by inhibiting the MAPK/ERK pathway[J]. BMC Anesthesiol, 2024, 24(1): 251. DOI: 10.1186/s12871-024-02641-3.

[18] Matsuura N, Sendai Y, Hasegawa M, *et al*. Remimazolam attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in macrophages[J]. Bull Tokyo Dent Coll, 2026, 67(1): 1-10. DOI: 10.2209/tdcpublication.2025-0003.

[19] Liu X L, Lin S P, Zhong Y Y, *et al*. Remimazolam protects against LPS-induced endotoxicity improving survival of endotoxemia mice[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 739603. DOI: 10.3389/fphar.2021.739603.

[20] Fang H H, Zhang Y D, Wang J C, *et al*. Remimazolam reduces sepsis-associated acute liver injury by activation of peripheral benzodiazepine receptors and p38 inhibition of macrophages[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 101: 108331. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.108331.

[21] Lighthall J W. Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model[J]. J Neurotrauma, 1988, 5(1): 1-15. DOI: 10.1089/neu.1988.5.1.

[22] Siebold L, Obenaus A, Goyal R. Criteria to define mild, moderate, and severe traumatic brain injury in the mouse controlled cortical impact model[J]. Exp Neurol, 2018, 310: 48-57. DOI: 10.1016/j.expneurol.2018.07.004.

[23] Chiu C J, McArdle A H, Brown R, *et al*. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal[J]. Arch Surg, 1970, 101(4): 478-483. DOI: 10.1001/archsurg.1970.01340280030009.

[24] Wang W F, Deng H Y, Du Y X, *et al*. Protective effect of remimazolam on intestinal barrier function in septic mice[J]. J Army Med Univ, 2025, 47(15): 1806-1814. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202504115.

[25] Wang S H, Zhu K X, Hou X X, *et al*. The association of traumatic brain injury, gut microbiota and the corresponding metabolites in mice[J]. Brain Res, 2021, 1762: 147450. DOI: 10.1016/j.brainres.2021.147450.

[26] Maric S, Restin T, Muff J L, *et al*. Citrulline, biomarker of enterocyte functional mass and dietary supplement. metabolism, transport, and current evidence for clinical use[J]. Nutrients, 2021, 13(8): 2794. DOI: 10.3390/nu13082794.

[27] Dodd D, Spitzer M H, Van Treuren W, *et al*. A gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites[J]. Nature, 2017, 551(7682): 648-652. DOI: 10.1038/nature24661.

[28] Kuryata O, Akimov O, Riabushko M, *et al*. Therapeutic potential of 5-aminolevulinic acid in metabolic disorders: Current insights and future directions[J]. iScience, 2024, 27(12): 111477. DOI: 10.1016/j.isci.2024.111477.

[29] Yao L, Chen W N, Song K, *et al*. 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) prevents lipopolysaccharide (LPS)-induced acute liver injury[J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0176106. DOI: 10.1371/journal.pone.0176106.

(收稿:2026-07-13;修回:2026-08-30)

(编辑 刘秋池)