紫草素对脓毒症相关性脑病大鼠神经炎症的影响及机制研究Δ

冯大磊[1*]，王　兆[1#]，杨颖颖[2]，杨　蕾[3]（1.遵义市第一人民医院重症医学科，贵州 遵义　563000；2.遵义市第一人民医院肿瘤科，贵州 遵义　563000；3.遵义市第一人民医院儿童重症医学科，贵州 遵义　563000）

中图分类号　R285.5　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）21-2640-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.21.11

摘　要　目的　探讨紫草素调节环磷酸鸟苷-腺苷酸合成酶（cGAS）-干扰素基因刺激因子（STING）信号通路对脓毒症相关性脑病（SAE）大鼠神经炎症的影响及可能机制。**方法**　将大鼠随机分为SAE组，紫草素低、中、高剂量组（1.33、2.66、5.32 mg/kg），紫草素高剂量+Roc A组（5.32 mg/kg紫草素+0.67 mg/kg cGAS-STING信号通路激活剂Roc A）和对照组，每组12只。除对照组外，其余各组大鼠均构建SAE模型，造模成功后开始给药，每天1次，持续14 d。给药结束后，通过Y迷宫实验、旷场实验分别评估大鼠的学习记忆能力、焦虑状态；观察其海马齿状回（DG）区神经元的病理变化；检测其海马DG区脑组织中CD86、CD206阳性细胞数以及白细胞介素1β（IL-1β）、肿瘤坏死因子α（TNF-α）、IL-4、IL-10水平和cGAS、STING蛋白表达水平。**结果**　与SAE组相比，紫草素低、中、高剂量组大鼠神经元损伤得到改善，“新臂”内活动距离百分比、中心区域停留时间、行走距离以及海马DG区脑组织中完整神经元数目、CD206阳性细胞数和IL-4、IL-10水平均显著增加/升高/延长（$P<0.05$），海马DG区脑组织中CD86阳性细胞数以及IL-1β、TNF-α水平和cGAS、STING蛋白表达均显著减少/降低/下调（$P<0.05$），且紫草素的作用呈剂量依赖性（$P<0.05$）。Roc A可显著逆转高剂量紫草素对SAE大鼠神经炎症的改善作用（$P<0.05$）。**结论**　紫草素可能通过抑制cGAS-STING信号通路活性来改善SAE大鼠神经炎症。

关键词　紫草素；脓毒症相关性脑病；cGAS-STING信号通路；神经炎症

Effects and mechanism of shikonin on neuroinflammation in sepsis-associated encephalopathy rats

FENG Dalei[1], WANG Zhao[1], YANG Yingying[2], YANG Lei[3]（1. Dept. of Critical Care Medicine, the First People's Hospital of Zunyi, Guizhou Zunyi 563000, China; 2. Dept. of Oncology, the First People's Hospital of Zunyi, Guizhou Zunyi 563000, China; 3. Dept. of Pediatric Intensive Care Medicine, the First People's Hospital of Zunyi, Guizhou Zunyi 563000, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the effect and possible mechanism of shikonin on neuroinflammation in sepsis-associated encephalopathy (SAE) rats by regulating the cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate synthase (cGAS)-stimulator of interferon gene (STING) signaling pathway. **METHODS** Rats were randomly separated into SAE group, shikonin low-dose, medium-dose and high-dose groups (1.33, 2.66, 5.32 mg/kg), high dose of shikonin+Roc A group (5.32 mg/kg shikonin+0.67 mg/kg cGAS-STING signaling pathway activator Roc A), and control group, with 12 rats in each group. Except for the control group, SAE models were constructed in all other groups. After successful modeling, administration began once a day for 14 days. After administration, the Y-maze experiment and open-field experiment were applied to evaluate the learning and memory ability and anxiety state of rats, respectively. The pathological changes of neurons in the dentate gyrus (DG) of the hippocampus were observed. The number of CD86 and CD206 positive cells, the levels of interleukin-1β (IL-1β), tumor necrosis factor-α (TNF-α), IL-4 and IL-10, and the protein expressions of cGAS and STING were detected in the brain tissue of the hippocampus DG region. **RESULTS** Compared with the SAE group, the neuronal damage of rats in shikonin low-dose, medium-dose and high-dose groups were improved; the percentage of activity distance in the "new arm", the duration of stay in the central area, walking distance, the number of intact neurons and CD206 positive cells in the brain tissue of the hippocampal DG area, and the levels of IL-4 and IL-10 increased/rised/prolonged significantly ($P<0.05$); the number of CD86 positive cells in the brain tissue of the hippocampal DG region, the levels of IL-1β and TNF-α, and protein expressions of cGAS and STING were significantly reduced/decreased/down-regulated ($P<0.05$), and the effect of shikonin was dose-dependent ($P<0.05$). Roc A could significantly reverse the improvement effect of high-dose shikonin on neuroinflammation in SAE rats ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Shikonin can improve neuroinflammation in SAE rats by inhibiting cGAS-STING signaling pathway.

KEYWORDS shikonin; sepsis-associated encephalopathy; cGAS-STING signaling pathway; neuroinflammation

Δ **基金项目** 遵义市第一人民医院研究与试验发展项目（No.院科字〔2020〕13号）

＊ **第一作者** 主治医师。研究方向：重症呼吸疾病。E-mail：djvnn9@163.com

通信作者 副主任医师。研究方向：呼吸疾病。E-mail：r28gej@163.com

脓毒症相关性脑病（sepsis-associated encephalopathy，SAE）是脓毒症最常见的并发症之一，其主要临床特征包括运动能力减弱、注意力减退、定向障碍、谵妄或昏迷等[1]。SAE是导致患者死亡率增加和长期后遗症发生的重要原因，给患者、家属和整个社会带来了巨大的经济和精神负担[2]。目前，临床尚无SAE确定性疗法。研究表明，神经炎症参与了SAE的发病机制[3]。因此，开发抑制神经炎症的药物对于SAE的治疗具有重要意义。

紫草素是从紫草中提取的活性物质之一，具有抗炎、镇痛等作用[4]。已有研究报道，紫草素可缓解神经精神性系统性红斑狼疮小鼠的神经炎症[5]，抑制帕金森病大鼠神经炎症[6]，减轻脑缺血/再灌注损伤大鼠小胶质细胞促炎极化介导的神经炎症[7]，减轻脓毒症并发症——急性肺损伤大鼠的全身炎症和肺细胞凋亡[8]。以上研究提示，紫草素可能具有改善神经炎症的作用。此外，相关研究阐明，阻断环磷酸鸟苷-腺苷酸合成酶（cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate synthase，cGAS）-干扰素基因刺激因子（stimulator of interferon gene，STING）信号通路的转导可减轻蛛网膜下腔出血诱导的脑损伤大鼠的神经炎症[9]。有研究显示，抑制cGAS可显著恢复SAE小鼠的认知功能障碍，而激活cGAS会促进SAE的疾病进展[10]。但紫草素能否通过调节cGAS-STING信号通路影响SAE大鼠神经炎症尚不可知。基于此，本研究拟通过构建SAE大鼠模型，观察紫草素对SAE大鼠神经炎症的影响，并从cGAS-STING信号通路出发探究其可能机制，以期为紫草素治疗SAE提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有YH-AVTAS型自动视频跟踪系统（武汉一鸿科技有限公司）、DFM-90C型荧光显微镜（上海蔡康光学仪器有限公司）、GelDoc XR+型凝胶成像系统（美国Bio-Bad公司）、High-Speed Centrifuge CR22N型离心机（德国Eppendorf公司）、KD-3398型组织切片机（浙江省金华市科迪仪器设备有限公司）等。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用的主要药品与试剂有紫草素原料药、cGAS-STING信号通路激活剂Roc A对照品（美国MCE公司，批号分别为HY-N0822、HY-19356，纯度分别为99.53%、98.61%），兔源CD86、CD206一抗（美国CST公司，批号分别为91882、59414），兔源cGAS、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）、STING一抗及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗（美国Thermo Fisher Scientific公司，批号分别为PA5-121188、PA1-987、PA5-116052、31460），大鼠白细胞介素1β（interleukin-1β，IL-1β）、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、IL-4、IL-10酶联免疫吸附测定（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒（上海通蔚生物科技有限公司，批号分别为220306、230102、221205、220910），尼氏染色液（北京兰杰柯科技有限公司，批号BL1039A）。

1.3 动物

本研究所用动物为SPF级雄性SD大鼠，共72只，8周龄，体重300～310 g，均购自贵州医科大学实验动物中心，生产许可证号为SCXK（贵）2023-0002。本实验遵循实验动物的伦理和使用准则，并经熠品（贵阳）质量科技有限公司动物实验中心医学伦理委员会审核通过（伦理批号为202303012）。

2 方法

2.1 SAE大鼠模型的构建

腹腔注射40 mg/kg戊巴比妥钠麻醉大鼠，暴露并结扎盲肠。用注射器针头刺穿盲肠2次，挤压粪渣使其流入腹膜，将盲肠复位并缝合伤口。术后24 h若大鼠表现出翻正、角膜反射、甩尾、耳郭反射等行为，表明SAE大鼠模型构建成功[11]。

2.2 分组与给药

将大鼠随机分为SAE组，紫草素低、中、高剂量组，紫草素高剂量+Roc A组和对照组，每组12只。对照组大鼠不进行结扎与刺穿盲肠处理；其余各组均按“2.1”项下操作建立SAE大鼠模型，造模成功率为100%。造模成功后，紫草素低、中、高剂量组大鼠分别腹腔注射1.33、2.66、5.32 mg/kg紫草素[12]；紫草素高剂量+Roc A组大鼠腹腔注射5.32 mg/kg紫草素和0.67 mg/kg Roc A[13]；SAE组、对照组大鼠分别腹腔注射等体积的生理盐水；每天给药1次，持续14 d。

2.3 大鼠学习记忆能力的测定

末次给药结束后24 h，选取所有大鼠进行Y迷宫实验，以评估大鼠的学习记忆能力。Y迷宫由3个白色不透明的“臂”组成，每个“臂”的尺寸为30 cm×5 cm×20 cm，每个“臂”之间的夹角为120°。在实验中，3个“臂”依次命名为“开始臂”“新臂”“旧臂”。首先进行训练，即大鼠首先被放置在“开始臂”中，挡板挡住“新臂”，大鼠被允许在“开始臂”“旧臂”之间自由探索15 min；1 h后开始测试，大鼠被放在“开始臂”，除去挡板，“新臂”被激活，大鼠有5 min的时间在3个“臂”内进行自由探索。记录大鼠在每个“臂”内移动的距离，并计算“新臂”内活动距离百分比。“新臂”内活动距离百分比（%）=“新臂”内活动距离/活动总距离×100%。

2.4 大鼠焦虑行为的观察

“2.3”项下实验完成后，选取全部大鼠进行旷场实验，以评估大鼠的焦虑行为。实验装置是一个不透明的白色立方体，尺寸为50 cm×50 cm×40 cm。将每只大鼠分别置于箱中，背对箱壁一侧，允许其自由探索5 min。使用自动视频跟踪系统记录大鼠5 min内在中心区域的停留时间及行走距离。

2.5 大鼠海马齿状回区神经元病理变化的检测

“2.4”项下实验结束后24 h，每组随机选取6只大鼠，处死并收集海马齿状回（dentate gyrus，DG）区脑组织适量，在4%多聚甲醛溶液中固定24 h，经石蜡包埋后切片（厚约5 μm）。将切片置于尼氏染色液中染色5 min，观察海马DG区神经元的病理变化。采用Image J软件计数完整神经元数目。

2.6 大鼠海马DG区脑组织中小胶质细胞极化标志物的检测

取“2.5”项下各组大鼠海马DG区脑组织切片，用0.3% Triton X-100处理后用5%牛血清白蛋白在37 ℃下阻断1 h；随后，将切片用一抗CD86（稀释比例1∶600）、CD206（稀释比例1∶500）在4 ℃的潮湿条件下孵育过夜，然后与二抗（稀释比例1∶800）在室温下孵育1 h；经磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤后，用DAPI复染细胞核10 min。通过荧光显微镜捕获图像，并统计CD86（呈绿色）、CD206（呈红色）阳性细胞数。

2.7 大鼠海马DG区脑组织中IL-1β、TNF-α、IL-4、IL-10水平的检测

取各组剩余的6只大鼠，处死并收集海马DG区脑组织。将脑组织与匀浆液以1∶5的比例混合进行匀浆，按照ELISA试剂盒说明书检测大鼠海马DG区脑组织中IL-1β、TNF-α、IL-4、IL-10水平。

2.8 大鼠海马DG区脑组织中cGAS、STING蛋白表达的检测

取“2.7”项下的海马DG区脑组织，以RIPA裂解缓冲液提取脑组织总蛋白。BCA法测定组织中总蛋白质浓度后，电泳分离45 μg蛋白样品，然后转移到聚偏二氟乙烯（PVDF）膜上，在室温下用5%脱脂牛奶封闭2 h；加入cGAS（稀释比例1∶3 000）、STING（稀释比例1∶1 000）一抗、GAPDH（稀释比例1∶4 000），在4 ℃下孵育过夜；用PBS冲洗后，将PVDF膜与二抗（稀释比例1∶3 000）在室温下孵育1 h；最后，使用ECL试剂和凝胶成像系统对印迹进行可视化。使用Image J软件分析条带灰度值，以cGAS、STING蛋白与GAPDH（内参）蛋白的条带灰度值比值表示cGAS、STING蛋白的相对表达水平。

2.9 统计学方法

使用SPSS 25.0软件进行数据分析。数据均以$\bar{x}\pm s$表示，采用单因素方差分析及SNK-q检验进行组间比较。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 紫草素对大鼠学习记忆能力、焦虑行为的影响

与对照组相比，SAE组大鼠“新臂”内活动距离百分比、中心区域停留时间及行走距离均显著降低/缩短（$P<0.05$）；与SAE组相比，紫草素低、中、高剂量组大鼠“新臂”内活动距离百分比、中心区域停留时间及行走距离均显著升高/延长（$P<0.05$），且呈剂量依赖性（$P<0.05$）；与紫草素高剂量组相比，紫草素高剂量+Roc A组大鼠“新臂”内活动距离百分比、中心区域停留时间及行走距离均显著降低/缩短（$P<0.05$）。结果见表1。

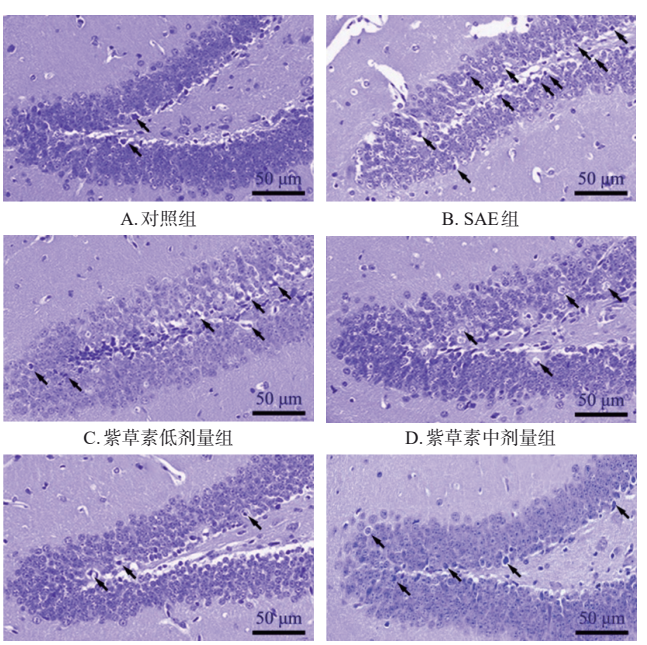
表1 各组大鼠Y迷宫实验和旷场实验结果比较（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

组别	“新臂”内活动距离百分比/%	中心区域停留时间/s	行走距离/cm
对照组	75.54±3.19	18.54±0.41	936.77±39.55
SAE组	43.68±2.01[a]	5.88±0.19[a]	723.34±21.15[a]
紫草素低剂量组	50.52±2.11[b]	8.37±0.32[b]	778.83±20.67[b]
紫草素中剂量组	57.62±2.34[bc]	11.52±0.40[bc]	830.64±28.68[bc]
紫草素高剂量组	66.43±2.98[bcd]	15.34±0.43[bcd]	901.12±30.03[bcd]
紫草素高剂量+Roc A组	54.88±2.37[e]	10.68±0.41[e]	813.77±25.53[e]

a：与对照组相比，$P<0.05$；b：与SAE组相比，$P<0.05$；c：与紫草素低剂量组相比，$P<0.05$；d：与紫草素中剂量组相比，$P<0.05$；e：与紫草素高剂量组相比，$P<0.05$。

3.2 紫草素对大鼠海马DG区神经元病理的影响

对照组大鼠神经元排列整齐、致密，细胞呈圆形。SAE组大鼠神经元呈空泡状，排列松散，形态不规则。与SAE组相比，紫草素低、中、高剂量组大鼠神经元损伤得到改善；与紫草素高剂量组相比，紫草素高剂量+Roc A组大鼠神经元损伤严重，详见图1。与对照组相比，SAE组大鼠海马DG区脑组织中完整神经元数目显著减少（$P<0.05$）；与SAE组相比，紫草素低、中、高剂量组大鼠海马DG区脑组织中完整神经元数目显著增加（$P<0.05$），且呈剂量依赖性（$P<0.05$）；与紫草素高剂量组相比，紫草素高剂量+Roc A组大鼠海马DG区脑组织中完整神经元数目显著减少（$P<0.05$）。结果见表2。



A. 对照组　B. SAE组　C. 紫草素低剂量组　D. 紫草素中剂量组　E. 紫草素高剂量组　F. 紫草素高剂量+Roc A组

注：箭头指向空泡化变性神经元。

图1 大鼠海马DG区神经元病理的显微图（尼氏染色）

表2　各组大鼠海马DG区脑组织中完整神经元数目及CD86、CD206阳性细胞数比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$，个）

组别	完整神经元数目	CD86阳性细胞数	CD206阳性细胞数
对照组	89.64±5.36	2.13±0.11	43.36±2.12
SAE组	15.36±2.14[a]	8.69±0.26[a]	12.23±0.43[a]
紫草素低剂量组	28.74±3.25[b]	7.14±0.29[b]	17.75±0.64[b]
紫草素中剂量组	42.31±3.98[bc]	6.01±0.24[bc]	23.39±0.95[bc]
紫草素高剂量组	60.13±4.46[bcd]	4.15±0.18[bcd]	35.78±1.52[bcd]
紫草素高剂量+Roc A组	39.68±3.67[e]	6.36±0.25[e]	20.55±0.83[e]

a：与对照组相比，$P<0.05$；b：与SAE组相比，$P<0.05$；c：与紫草素低剂量组相比，$P<0.05$；d：与紫草素中剂量组相比，$P<0.05$；e：与紫草素高剂量组相比，$P<0.05$。

3.3　紫草素对大鼠海马DG区脑组织中小胶质细胞极化的影响

与对照组相比，SAE组大鼠海马DG区脑组织中CD86阳性细胞数显著增加（$P<0.05$），CD206阳性细胞数显著减少（$P<0.05$）；与SAE组相比，紫草素低、中、高剂量组大鼠海马DG区脑组织中CD86阳性细胞数均显著减少（$P<0.05$），CD206阳性细胞数均显著增加（$P<0.05$），且呈剂量依赖性（$P<0.05$）；与紫草素高剂量组相比，紫草素高剂量+Roc A组大鼠海马DG区脑组织中CD86阳性细胞数显著增加（$P<0.05$），CD206阳性细胞数显著减少（$P<0.05$）。结果见表2、图2。

3.4　紫草素对大鼠海马DG区脑组织中IL-1β、TNF-α、IL-4、IL-10水平的影响

与对照组相比，SAE组大鼠海马DG区脑组织中IL-1β、TNF-α水平均显著升高（$P<0.05$），IL-4、IL-10水平均显著降低（$P<0.05$）；与SAE组相比，紫草素低、中、高剂量组大鼠海马DG区脑组织中IL-1β、TNF-α水平均显著降低（$P<0.05$），IL-4、IL-10水平均显著升高（$P<0.05$），且呈剂量依赖性（$P<0.05$）；与紫草素高剂量组相比，紫草素高剂量+Roc A组大鼠海马DG区脑组织中IL-1β、TNF-α水平均显著升高（$P<0.05$），IL-4、IL-10水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见表3。

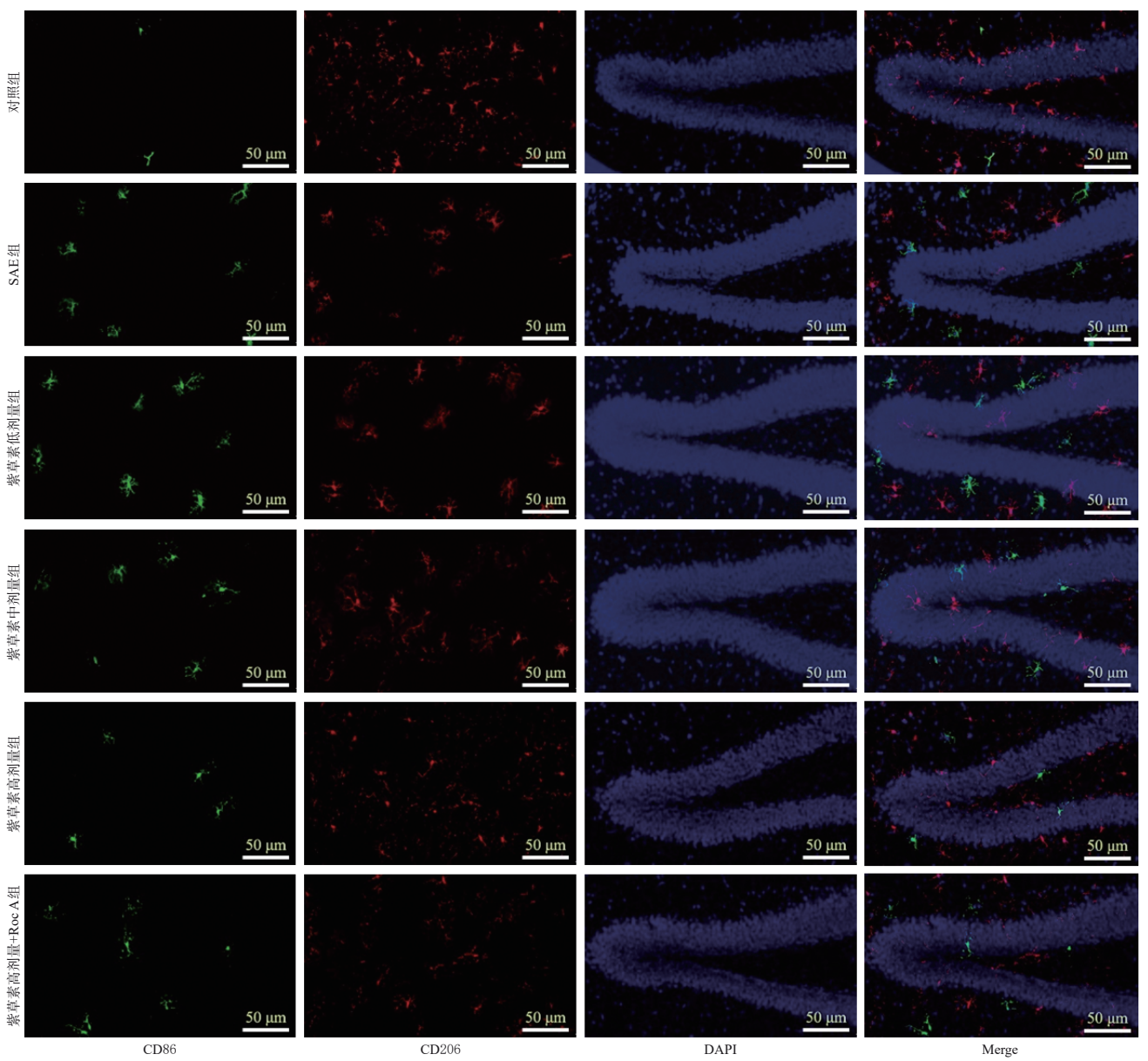


图2　各组大鼠海马DG区脑组织中CD86、CD206表达的免疫荧光染色图

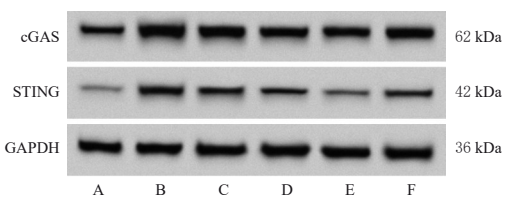
表3　各组大鼠海马DG区脑组织中IL-1β、TNF-α、IL-4、IL-10水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$，pg/mL）

组别	IL-1β	TNF-α	IL-4	IL-10
对照组	103.36±4.55	12.15±0.46	65.54±2.82	86.62±3.91
SAE组	179.66±7.38[a]	28.58±1.23[a]	30.33±1.41[a]	26.78±1.05[a]
紫草素低剂量组	159.43±5.12[b]	24.66±1.02[b]	36.88±1.53[b]	37.11±1.40[b]
紫草素中剂量组	140.06±4.36[bc]	20.01±0.73[bc]	44.66±2.01[bc]	49.82±2.06[bc]
紫草素高剂量组	121.33±4.25[bcd]	14.93±0.51[bcd]	56.69±2.13[bcd]	73.34±3.15[bcd]
紫草素高剂量+Roc A组	143.64±4.51[e]	21.13±0.72[e]	38.88±1.55[e]	43.39±1.96[e]

a：与对照组相比，$P<0.05$；b：与SAE组相比，$P<0.05$；c：与紫草素低剂量组相比，$P<0.05$；d：与紫草素中剂量组相比，$P<0.05$；e：与紫草素高剂量组相比，$P<0.05$。

3.5　紫草素对大鼠海马DG区脑组织中cGAS、STING蛋白表达的影响

与对照组相比，SAE组大鼠海马DG区脑组织中cGAS、STING蛋白的表达均显著上调（$P<0.05$）；与SAE组相比，紫草素低、中、高剂量组大鼠海马DG区脑组织中cGAS、STING蛋白的表达均显著下调（$P<0.05$），且呈剂量依赖性（$P<0.05$）；与紫草素高剂量组相比，紫草素高剂量+Roc A组大鼠海马DG区脑组织中cGAS、STING蛋白的表达均显著上调（$P<0.05$）。结果见图3、表4。



A：对照组；B：SAE组；C：紫草素低剂量组；D：紫草素中剂量组；E：紫草素高剂量组；F：紫草素高剂量+Roc A组。

图3　各组大鼠海马DG区脑组织中cGAS、STING蛋白检测印迹图

表4　各组大鼠海马DG区脑组织中cGAS、STING蛋白相对表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	cGAS/GAPDH	STING/GAPDH
对照组	0.86±0.07	0.34±0.03
SAE组	1.79±0.14[a]	0.86±0.07[a]
紫草素低剂量组	1.56±0.12[b]	0.71±0.05[b]
紫草素中剂量组	1.34±0.10[bc]	0.59±0.04[bc]
紫草素高剂量组	1.01±0.08[bcd]	0.41±0.03[bcd]
紫草素高剂量+Roc A组	1.41±0.12[e]	0.62±0.05[e]

a：与对照组相比，$P<0.05$；b：与SAE组相比，$P<0.05$；c：与紫草素低剂量组相比，$P<0.05$；d：与紫草素中剂量组相比，$P<0.05$；e：与紫草素高剂量组相比，$P<0.05$。

4　讨论

临床SAE的发病机制为精神状态改变，并伴有广泛的神经系统病变，包括认知能力和意识受损、注意力不集中和焦虑等[14]。既往研究显示，Y迷宫实验和旷场实验主要用来评价动物的学习记忆能力以及焦虑行为，是检测动物认知障碍的常用行为测试方法[15]。本研究构建了SAE大鼠模型，结果显示，与对照组相比，SAE组大鼠“新臂”内活动距离百分比、中心区域停留时间及行走距离显著降低/缩短，表明SAE大鼠存在认知障碍、焦虑行为；病理染色结果显示，海马DG区神经元呈空泡状、排列松散、形态不规则，表明SAE大鼠出现神经元损伤，符合SAE的特征，提示SAE造模成功。而低、中、高剂量紫草素均能够通过调节学习记忆能力、缓解焦虑来改善SAE大鼠的认知障碍，这提示紫草素可能成为治疗SAE的潜在有效药物之一。

有研究表明，SAE期间的小胶质细胞激活也与焦虑和认知障碍密切相关[16]。小胶质细胞是最常见的中枢神经系统驻留免疫细胞，其活化状态可分为2种主要表型——M1型和M2型。M1型小胶质细胞产生促炎细胞因子（如IL-1β和TNF-α）参与神经炎症，而M2型小胶质细胞产生抗炎细胞因子（如IL-4和IL-10）促进组织和神经修复[17]。此外，不受控制的神经炎症是SAE的主要特征[18]。因此，小胶质细胞表型之间的平衡被认为在调控SAE神经炎症中起着至关重要的作用。另有研究指出，CD86、CD206分别为M1、M2型小胶质细胞的标志物[19]。本研究检测了大鼠海马DG区脑组织中CD86、CD206阳性表达情况及IL-1β、TNF-α、IL-4、IL-10水平的变化情况，结果发现，与对照组相比，SAE组大鼠海马DG区脑组织中CD86阳性细胞数及IL-1β、TNF-α水平均显著增加/升高，CD206阳性细胞数及IL-4、IL-10水平均显著减少/降低，表明SAE大鼠海马DG区脑组织中M1型小胶质细胞活化增加以及M2型小胶质细胞活化的减少加剧了SAE大鼠神经炎症的发生。可见，促进小胶质细胞由M1型向M2型转化可能是改善SAE大鼠神经炎症的有效方式之一。进一步经低、中、高剂量紫草素干预后发现，大鼠海马DG区脑组织中CD86阳性细胞数减少，CD206阳性细胞数增加，提示紫草素可促进小胶质细胞由M1型向M2型转化，进而改善SAE大鼠神经炎症。

cGAS是一种重要的细胞质DNA受体，可结合并激活STING，后者可进一步激活炎症通路来介导炎症因子的产生，最终加剧炎症反应[20]。据报道，抑制cGAS-STING信号通路可减轻鱼藤酮诱导的帕金森病模型小鼠神经炎症[21]；可促进脑出血小鼠小胶质细胞由M1型向M2型转化，并改善其神经炎症[22]。本研究结果显示，低、中、高剂量紫草素均可抑制SAE大鼠海马DG区脑组织中cGAS、STING蛋白的表达，且该抑制作用具有剂量依赖性，故本课题组推测紫草素改善SAE大鼠神经炎症的机制可能与抑制cGAS-STING信号通路有关。为了证明上述推测的合理性，本研究用cGAS-STING信号通路激活剂Roc A进行了回复实验，结果发现，Roc A可显著逆转高剂量紫草素对SAE大鼠神经炎症的改善作用，表明紫草素抑制SAE大鼠神经炎症的作用可能是通过抑制cGAS-STING信号通路实现的。

综上所述，紫草素可能通过抑制cGAS-STING信号通路活性来改善SAE大鼠神经炎症，该研究结果可为紫草素用于SAE的治疗提供新的参考依据。

参考文献

[1] HUANG L, CHEN J W, LI X J, et al. Polydatin improves sepsis-associated encephalopathy by activating Sirt1 and reducing p38 phosphorylation[J]. J Surg Res, 2022, 276: 379-393.

[2] LIU Y Q, YANG H, LUO N B, et al. An Fgr kinase inhibitor attenuates sepsis-associated encephalopathy by ameliorating mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and neuroinflammation via the SIRT1/PGC-1α signaling pathway[J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 486.

[3] ZHENG X Y, LI W Y, XIANG Q, et al. Memantine attenuates cognitive and emotional dysfunction in mice with sepsis-associated encephalopathy[J]. ACS Omega, 2023, 8(43): 40934-40943.

[4] GUO Y M, ZHOU M M, MU Z Z, et al. Recent advances in shikonin for the treatment of immune-related diseases: anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms [J]. Biomedicine Pharmacother, 2023, 165: 115138.

[5] NI J L, LIU X, ZHANG R W, et al. Systemic administration of shikonin ameliorates cognitive impairment and neuron damage in NPSLE mice[J]. J Neuroimmunol, 2023, 382: 578166.

[6] GUO L, LI Y Y, LI W N, et al. Shikonin ameliorates oxidative stress and neuroinflammation via the Akt/ERK/JNK/NF-κB signalling pathways in a model of Parkinson's disease[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2022, 49(11): 1221-1231.

[7] YANG Y, FEI Y X, XU X J, et al. Shikonin attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury via inhibiting NOD2/RIP2/NF-κB-mediated microglia polarization and neuroinflammation[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2024, 33(6): 107689.

[8] ZHANG Y Y, LIU X, ZHANG X J, et al. Shikonin improve sepsis-induced lung injury via regulation of miRNA-140-5p/TLR4: a *vitro* and *vivo* study[J]. J Cell Biochem, 2020, 121(3): 2103-2117

[9] SHAO J, MENG Y X, YUAN K K, et al. RU.521 mitigates subarachnoid hemorrhage-induced brain injury via regulating microglial polarization and neuroinflammation mediated by the cGAS/STING/NF-κB pathway[J]. Cell Commun Signal, 2023, 21(1): 264.

[10] TAN C M, XU F, XIE Q, et al. Deficiency of cGAS signaling protects against sepsis-associated encephalopathy [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 577: 38-44.

[11] 孟文勤, 郝颖楠, 王蓉, 等. MAF1在脓毒症相关性脑病大鼠模型中的作用及其对NLRP3炎症小体的影响[J]. 卒中与神经疾病, 2023, 30(4): 361-366.
MENG W Q, HAO Y N, WANG R, et al. Effect of MAF1 on the inflammatory bodies of NLRP3 in a rat model of sepsis associated encephalopathy[J]. Stroke Nerv Dis, 2023, 30(4): 361-366.

[12] YUAN L J, WANG Y, CHEN Y L, et al. Shikonin inhibits immune checkpoint PD-L1 expression on macrophage in sepsis by modulating PKM2[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 121: 110401.

[13] 张士伟, 程慎令, 邢启峰. 茯苓酸通过抑制cGAS-STING信号通路减轻溃疡性结肠炎大鼠结肠上皮细胞损伤[J]. 免疫学杂志, 2023, 39(8): 672-680.
ZHANG S W, CHENG S L, XING Q F. Pachymic acid alleviates colonic epithelial cell damage in ulcerative colitis rats by inhibiting cGAS-STING signaling pathway[J]. Immunol J, 2023, 39(8): 672-680.

[14] GUO J, KONG Z, YANG S, et al. Therapeutic effects of orexin-A in sepsis-associated encephalopathy in mice[J]. J Neuroinflammation, 2024, 21(1): 131.

[15] ZHENG L L, JIA J Q, CHEN Y, et al. Pentoxifylline alleviates ischemic white matter injury through up-regulating Mertk-mediated myelin clearance[J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 128.

[16] HE C J, AZIGULI A, ZHEN J L, et al. miRNA-494 specifically inhibits SIRT3-mediated microglia activation in sepsis-associated encephalopathy[J]. Transl Cancer Res, 2022, 11(7): 2299-2309.

[17] QIU F, LIU Y M, LIU Y, et al. CD137L inhibition ameliorates hippocampal neuroinflammation and behavioral deficits in a mouse model of sepsis-associated encephalopathy [J]. Neuromolecular Med, 2023, 25(4): 616-631.

[18] DUMBUYA J S, LI S Q, LIANG L L, et al. Effects of hydrogen-rich saline in neuroinflammation and mitochondrial dysfunction in rat model of sepsis-associated encephalopathy[J]. J Transl Med, 2022, 20(1): 546.

[19] BAI J, GENG B, WANG X W, et al. Exercise facilitates the M1-to-M2 polarization of microglia by enhancing autophagy via the BDNF/AKT/mTOR pathway in neuropathic pain[J]. Pain Physician, 2022, 25(7): E1137-E1151.

[20] DING R, LI H Y, LIU Y Q, et al. Activating cGAS-STING axis contributes to neuroinflammation in CVST mouse model and induces inflammasome activation and microglia pyroptosis[J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 137.

[21] LIU Y Q, DUAN R N, LI P Z, et al. 3-N-butylphthalide attenuates neuroinflammation in rotenone-induced Parkinson's disease models via the cGAS-STING pathway[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2024, 38: 394632024122-9041.

[22] YANG G Q, KANTAPAN J, MAZHAR M, et al. Pretreated MSCs with IronQ transplantation attenuate microglia neuroinflammation via the cGAS-STING signaling pathway[J]. J Inflamm Res, 2024, 17: 1643-1658.

（收稿日期：2024-06-25　修回日期：2024-09-18）
（编辑：林　静）