

· 实验研究 ·

促红细胞生成素在七氟醚麻醉诱发老龄大鼠 海马神经细胞凋亡中的作用

任峰 魏海婷 刘琳琳 郭继峰 陈永清 卜少卿 谢薇薇

【摘要】 目的 探讨促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)减轻七氟醚麻醉诱发老龄大鼠海马神经细胞凋亡的作用以及与 Toll 样受体 4(toll like receptor 4, TLR4)的关系。方法 雄性 SD 大鼠, 20 月龄, 体重 550~750 g, 根据随机数字表法将大鼠分为三组($n=9$): 对照组(C组), 七氟醚处理组(S组)和 EPO+七氟醚处理组(ES组)。S 及 ES 组大鼠吸入 4%七氟醚 6 h; C 组仅吸入空气-氧气混合气体; ES 组大鼠在七氟醚处理后 24、48 和 72 h 行尾缘静脉注射 EPO(5 000 U/kg), C 组和 S 组仅注射等量生理盐水。采用 Morris 水迷宫实验评价大鼠的认知能力, 采用 TUNEL 法评价大鼠海马神经细胞凋亡率, 采用 RT-PCR 法测定海马组织中 TLR4 mRNA 表达, 采用 JC-1 免疫荧光染色法检测海马神经细胞线粒体膜电位水平; 采用免疫蛋白印迹法测定海马组织中淀粉样前体蛋白(APP)和 β -淀粉样肽($A\beta$)蛋白表达。结果 与 C 组比较, S 组逃避潜伏期明显延长, 穿越平台次数差异无统计学意义, 神经细胞凋亡率明显增加, TLR4 mRNA 表达明显下降, 海马神经细胞线粒体膜电位水平明显下降, APP 和 $A\beta$ 表达明显增加($P<0.05$); 与 S 组比较, ES 组逃避潜伏期明显缩短, 穿越平台次数差异无统计学意义, 神经细胞凋亡率明显下降, TLR4 mRNA 表达明显升高, 海马神经细胞线粒体膜电位水平上升, APP 和 $A\beta$ 表达明显减少($P<0.05$)。结论 促红细胞生成素能够减轻七氟醚诱发老龄大鼠海马区神经细胞的凋亡, 其机制可能与抑制 TLR4 mRNA 表达, 改善线粒体膜电位水平和抑制 APP 和 $A\beta$ 蛋白活化相关。

【关键词】 Toll 样受体; 七氟醚; 海马; 细胞凋亡; 神经毒性

Effect of erythropoietin attenuating apoptosis in old rat hippocampal neuronal cells exposed to sevoflurane: role of toll like receptor 4 REN Feng, WEI Haiting, LIU Linlin, GUO Jifeng, CHEN Yongqing, BU Shaoqing, XIE Weiwei. Department of Anesthesiology, The First Hospital of Baoding, Baoding 071200, China

Corresponding author: REN Feng, Email: 13103129088@163.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of erythropoietin (EPO) attenuating apoptosis in old rat hippocampal neuronal cells exposed to sevoflurane and the role of toll like receptor 4. **Methods** Twenty months old SD rats, male, 550-750 g, in accordance with the random number table, were divided into 3 groups ($n=9$): control group (group C), sevoflurane treatment (group S), and sevoflurane plus EPO treatment (group ES). The rats in group S and ES were subjected to inhale 4% sevoflurane for 6 h, but the rats in group C were inhaled air-oxygen only. The rats in group ES were injected with EPO into caudal vein at 24 h, 48 h, and 72 h after sevoflurane exposure. The cognitive ability was assessed by Morris water maze test; the effects of hippocampal apoptosis were assessed by TUNEL assays; the expressions of TLR4 mRNA was measured by RT-PCR assay; mitochondrial membrane potential (MMP) was assessed by JC-1 fluorescence; the expressions of APP and $A\beta$ were assessed by western blot. **Results** Compared with group C, there were significant increases of escape latency period, neuronal apoptosis, TLR4 mRNA, and APP and $A\beta$ expression, but a decrease of MMP in group S ($P<0.05$). Compared with group S, there were significant decreases of escape latency period, neuronal apoptosis, TLR4 mRNA, and APP and $A\beta$ expression, but a increase of MMP in group ES ($P<0.05$). **Conclusion** The attenuation of rat hippocampal neuronal apoptosis induced by EPO could be associated with inhibition of TLR4, improvement of MMP, as well as inhibition of APP and $A\beta$ activity.

作者单位: 071200 保定市, 河北省安国市医院麻醉科(任峰), 检验科(谢薇薇); 保定市第一医院麻醉科(魏海婷、郭继峰); 解放军 252 医院麻醉科(刘琳琳); 定州市妇幼保健院麻醉科(陈永清); 定州市人民医院麻醉科(卜少卿)

通信作者: 任峰, Email: 13103129088@163.com

【Key words】 Toll like receptor; Sevoflurane; Hippocampus; Apoptosis; Neurotoxicity

随着对吸入性麻醉药物药理作用研究的逐步深入,认识到吸入性麻醉药物具有神经保护作用的同时,吸入浓度的增加和麻醉时间的延长使其神经毒性作用也逐渐增加^[1]。Toll 样受体 4(toll like receptor 4, TLR4)在认知功能障碍等相关疾病的进展中发挥着重要作用,如 TLR4 可促进淀粉样前体蛋白(APP)和 β -淀粉样肽(A β)活化,线粒体功能退化,诱发神经细胞凋亡^[2,3]。已有研究表明,促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)能够减轻七氟醚致神经细胞的凋亡,但机制未明^[4]。本研究拟观察 EPO 减轻七氟醚诱发老龄大鼠麻醉后海马区神经细胞凋亡的作用以及对 TLR4 信号通路的影响,探讨 EPO 对七氟醚神经毒性保护作用的机制,为临床研究提供理论依据。

材料与方 法

实验动物与分组 SPF 级健康雄性 SD 大鼠,20 月龄,体重 550~750 g,采用随机数字表法分为三组($n=9$):对照组(C 组),七氟醚处理组(S 组),EPO+七氟醚处理组(ES 组)。

七氟醚麻醉 腹腔注射戊巴比妥钠 50 mg/kg,待麻醉满意后,将大鼠置于加温毯并固定,建立心电图监护和体温监测,体温维持在(37±1)℃。对大鼠实行气管插管术,连接气管导管和呼吸机,实施容量控制通气 5 ml/kg。吸入 4%七氟醚(批号:H20160148)和 30%氧气的混合气体 6 h,氧流量为 3 L/min, C 组仅吸入空气-氧气混合气体。通过气体监测仪测定呼出的麻醉药气体浓度及 CO₂ 浓度,通过调整呼吸频率,使 P_{ET}CO₂ 维持在 30~35 mm Hg。ES 组在七氟醚麻醉后 24、48、72 h 后行尾缘静脉注射 EPO 5 000 U/kg^[5], C 组和 S 组仅注射等量生理盐水。

Morris 水迷宫实验 每组取 3 只大鼠,7 d 后行 Morris 水迷宫实验,包括定位航行实验和空间探索实验。XR-XM101 型水迷宫测试仪为直径 122 cm、高 50 cm 的圆形水池,池周围覆盖着蓝色的窗帘。池壁上有东、西、南、北 4 个人水点,将水池分四个象限。池中透明圆形平台直径 10 cm,低于水面 1 cm,平台固定在某一象限。池内水温保持 20℃,并以二氧化钛漂白。定位航行实验:随机从四个象限面向池壁将大鼠放入水中,并允许 60s 内找到隐藏的平台,保持 15 s,记录自入水至找到平

台所需的时间为逃避潜伏期,当大鼠没有在 60 s 内找到平台,将其引导至平台,并允许在平台上停留 15 s。4 个人水点各实验 1 次,每次间隔 20 min,取 4 次测定结果的平均值,连续 4 d。定位航行实验结束后 1 d,将平台从池中移除,行空间探索实验,将大鼠放置在与隐蔽平台相反的象限,记录大鼠 120 s 内游过平台区域的次数为穿越平台次数。于七氟醚麻醉后 7、8、9 和 10 d 进行 Morris 水迷宫实验,并记录大鼠逃避潜伏期和游泳距离。

组织病理学检查 Morris 水迷宫实验完成后,每组取 3 只大鼠,腹腔注射戊巴比妥钠麻醉后,用生理盐水经左心室-主动脉灌注,待右心耳流出的液体清亮后,迅速灌注 4%多聚甲醛,直至动物呈僵硬状。取出脑组织后放入 4%多聚甲醛中后固定 48 h,用于组织病理学检查。脑组织石蜡切片水化后,根据 TUNEL 试剂盒说明书,行 TUNEL 染色,参照试剂盒说明书进行操作,碘化丙啶(PI)标记细胞核。荧光显微镜下进行观察,计算 TUNEL 染色阳性细胞占总细胞的百分比,计数 5 个高倍视野,取其平均值,即为神经细胞凋亡率。

TLR4 mRNA 检测 每组取 3 只大鼠,七氟醚麻醉 7 d 后,经生理盐水灌注后取出海马组织,参照文献[6],采用 PCR 法测定神经元 TLR4 mRNA 的表达水平:参照 Gene bank 所公布的基因序列合成相对定量采用比较法,即以目的基因 TLR4 mRNA Ct 值和内参基因 GADPH mRNA 值的比值反映表达水平。TLR4 引物:上游:5'-GCTTTCAGCTTTGCCTTCAT-3',下游:5'-TACACCAACGGCTCTGGATA-3';GADPH(内参)引物:上游:5'-CCCCAATGTATCCGTTGTG-3',下游:5'-TAGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'。

线粒体膜电位水平检测 每组取 3 只大鼠,七氟醚麻醉 7 d 后,按照线粒体提取试剂盒进行操作提取线粒体。线粒体的含量以所含的蛋白量表示,将提取的线粒体用 GENMED Bradford 蛋白浓度定量试剂盒进行定量。向分离出的线粒体悬液中加入 JC-1,终浓度为 10 μ g/ml,在 37℃的含有 5% CO₂ 培养箱中孵育 15 min, PBS 缓冲液洗涤 2 次,将标记 JC-1 和未被标记 JC-1 的线粒体悬液加入 96 孔板,荧光强度设定为红色荧光激发波长 550 nm,发射波长 600 nm,绿色荧光激发波长 485 nm,发

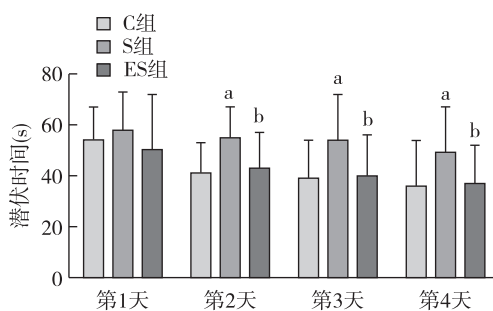
射波长 535 nm, 在荧光分光光度计下读取荧光强度, 以荧光指数(荧光指数=红色荧光强度/绿色荧光强度)反应线粒体膜电位水平。

蛋白免疫印记检测 每组取 3 只大鼠, 七氟醚麻醉 7 d 后, 加入细胞裂解液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂, 三者比例 100:1:1。充分研磨使组织细胞裂解。4℃ 下 12 000×g 离心 30 min, 取上清液。采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定总蛋白浓度。50 μg 蛋白质上样后 6% SDS-PAGE 中电流恒定进行电泳, 电压恒定湿转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后, TBST 洗膜, 加入兔抗鼠 APP 以及 Aβ 多克隆抗体(1:500), 4℃ 过夜孵育, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 山羊抗兔二抗(1:1 000) 25℃ 1 h 孵育, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, ECL 发光, 以 β-actin 作为内参照。

统计分析 采用 SPSS 11.5 进行统计分析, 正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

与 C 组比较, S 组逃避潜伏期明显延长(P<0.05), 穿越平台次数差异无统计学意义;与 S 组比较, ES 组逃避潜伏期明显缩短(P<0.05), 穿越平台次数差异无统计学意义(图 1,2)。



注:与 C 组比较,^aP<0.05;与 S 组比较,^bP<0.05

图 1 三组大鼠逃避潜伏期的比较

与 C 组比较, S 组神经细胞凋亡率明显升高(P<0.05), TLR4 mRNA 表达明显下降(P<0.05), 海马神经细胞线粒体膜电位水平明显下降(P<0.05);与 S 组比较, ES 组神经细胞凋亡率明显下降(P<0.05), TLR4 mRNA 表达明显升高(P<0.05), 海马神经细胞线粒体膜电位水平明显上升(P<0.05)(图 3~5)。

与 C 组比较, S 组 APP 和 Aβ 表达明显增加(P

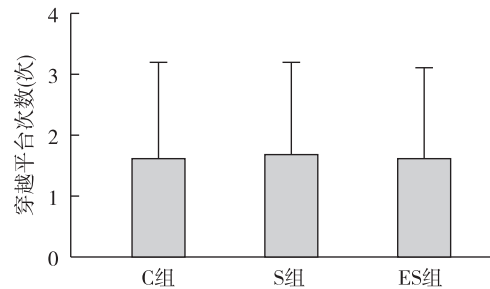
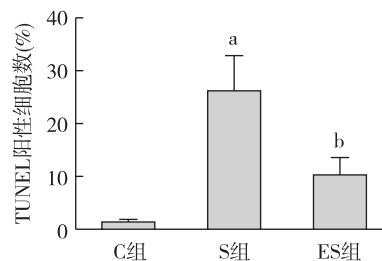
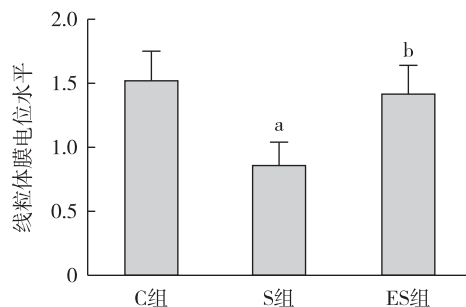


图 2 三组大鼠穿越平台次数的比较



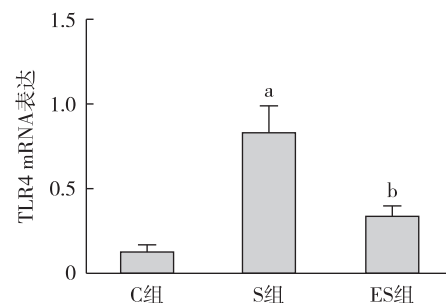
注:与 C 组比较,^aP<0.05;与 S 组比较,^bP<0.05

图 3 三组大鼠 TUNEL 阳性细胞率的比较



注:与 C 组比较,^aP<0.05;与 S 组比较,^bP<0.05

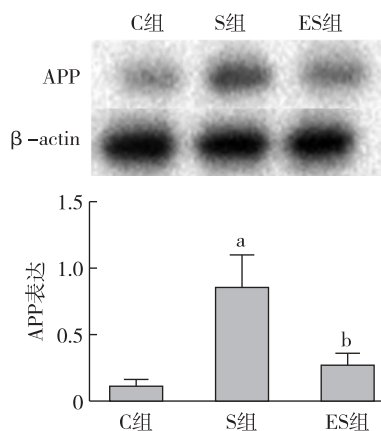
图 4 三组大鼠线粒体膜电位水平的比较



注:与 C 组比较,^aP<0.05;与 S 组比较,^bP<0.05

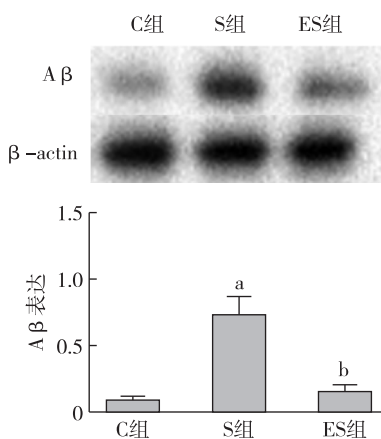
图 5 三组大鼠 TLR4 mRNA 表达的比较

<0.05);与 S 组比较, ES 组 APP 和 Aβ 表达明显下降(P<0.05)(图 6,7)。



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

图 6 三组大鼠海马中 APP 表达的比较



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

图 7 三组大鼠海马中 Aβ 表达的比较

讨 论

已有研究报道,七氟醚单次吸入 6 h 以上和重复吸入 2 h 以上均能造成大鼠神经细胞的凋亡^[7],本研究参照文献^[8],使用 4%七氟醚处理 6 h 诱发老龄大鼠麻醉后认知功能障碍。

Morris 水迷宫实验是评估大鼠学习记忆能力的常用行为学实验手段,其中,逃避潜伏期可反映学习功能,穿越平台次数可反映记忆功能^[9]。本研究结果显示七氟醚麻醉能够促使老龄大鼠逃避潜伏期延长,而 EPO 注射能够明显缩短七氟醚麻醉后老龄大鼠逃避潜伏期。以上结果表明 EPO 对能够改善七氟醚对老龄大鼠学习能力的影响。另外,本实验研究还显示,各组老龄大鼠的穿越平台次数无明显差异,表明七氟醚麻醉可能仅导致大鼠发生学习能力的相关改变,而对记忆能力

无明显影响,具体机制尚不明确,还需要进一步的研究与探索。

海马是啮齿类动物学习记忆功能的重要神经中枢,对缺血-再灌注损伤以及神经毒性药物敏感,因此本研究以海马取材进行观察^[10]。TUNEL 法检测凋亡细胞的原理是在末端脱氧核苷酸转移酶的催化下,程序化断裂 DNA 的 3'-OH 能够与含有荧光素标记的 dUTP 结合从而显像^[11]。线粒体膜电位水平是衡量细胞线粒体功能完整性的重要指标^[12]。认知功能障碍的患者海马组织中的 APP 以及 Aβ 含量明显高于正常水平,下调 APP 以及 Aβ 能够明显降低阿尔兹海默症患者的学习记忆能力^[13]。本研究结果显示,接受 4%七氟醚吸入麻醉 6 h 的老龄大鼠逃避潜伏期延长,海马区神经细胞凋亡增加,线粒体膜电位水平降低,APP 以及 Aβ 表达升高。以上结果显示,高浓度和长时间的七氟醚麻醉诱发老龄大鼠认知功能障碍的机制,可能与海马神经元线粒体膜电位水平降低,APP 以及 Aβ 表达升高后,诱发神经细胞凋亡相关。

最新研究表明,EPO 能够明显改善七氟醚对神经细胞的毒性作用,减少七氟醚麻醉造成的神经细胞凋亡,在 EPO 注射 24 h 后即可产生抗凋亡作用^[14]。本研究结果表明,EPO 注射能够明显缩短七氟醚麻醉后老龄大鼠逃避潜伏期明显缩短,神经细胞凋亡减少,线粒体膜电位水平升高,APP 以及 Aβ 表达下降,表明 EPO 减轻七氟醚神经毒性的机制可能与增加线粒体膜电位水平,减少 APP 以及 Aβ 表达相关。

EPO 可通过抑制 TLR4/NF-κB 信号通路的表达和激活,减少一氧化碳的神经毒性^[15];在肝脏细胞中,EPO 能够通过抑制在肝脏细胞中 TLR4 mRNA 的表达,改善葡萄糖耐受不良,减少肝细胞损伤^[16]。已有研究表明抑制 TLR4 信号通路的激活能够减轻阿尔兹海默症大鼠的学习记忆能力的退化,其机制可能与改善线粒体功能,减少 APP 以及 Aβ 表达相关^[17, 18]。本研究结果显示,七氟醚能够增加老龄大鼠海马组织中 TLR4 mRNA 的表达;接受 EPO 注射后,海马组织中 TLR4 mRNA 的表达明显下降。以上结果提示,EPO 的对老龄大鼠七氟醚神经毒性的保护作用可能与抑制 TLR4 mRNA 表达后,提高线粒体膜电位水平,减少 APP 以及 Aβ 表达相关。

综上所述,EPO 减轻七氟醚诱发老龄大鼠认

知功能障碍的机制与抑制 TLR4 mRNA 表达,减轻线粒体功能受损,抑制 APP 以及 A β 表达相关。

参 考 文 献

- [1] 孙文波, 张立民, 赵晓春, 等. 不同浓度七氟醚对大鼠原代皮质神经元的影响. 临床麻醉学杂志, 2016, 32(5): 480-483.
- [2] Agalave NM, Larsson M, Abdelmoaty S, et al. Spinal HMGB1 induces TLR4-mediated long-lasting hypersensitivity and glial activation and regulates pain-like behavior in experimental arthritis. *Pain*, 2014, 155(9): 1802-1813.
- [3] Badshah H, Ali T, Kim MO. Osmotin attenuates LPS-induced neuroinflammation and memory impairments via the TLR4/NF κ B signaling pathway. *Sci Rep*, 2016, 6: 24493.
- [4] Pellegrini L, Bennis Y, Velly L, et al. Erythropoietin protects newborn rat against sevoflurane-induced neurotoxicity. *Paediatr Anaesth*, 2014, 24(7): 749-759.
- [5] Moallem SA, Mohamadpour AH, Abnous K, et al. Erythropoietin in the treatment of carbon monoxide neurotoxicity in rat. *Food Chem Toxicol*, 2015, 86(1): 56-64.
- [6] 陈永红, 赵林霞, 范冰冰, 等. 藜本内酯抑制星形胶质细胞中 NF- κ B 依赖的细胞因子的表达. 临床麻醉学杂志, 2014, 30(11): 1121-1124.
- [7] Zheng H, Dong Y, Xu Z, et al. Sevoflurane anesthesia in pregnant mice induces neurotoxicity in fetal and offspring mice. *Anesthesiology*, 2013, 118(3): 516-526.
- [8] Zhang DX, Zhang LM, Zhao XC, et al. Neuroprotective effects of erythropoietin against sevoflurane-induced neuronal apoptosis in primary rat cortical neurons involving the EPOR-Erk1/2-Nrf2/Bach1 signal pathway. *Biomed Pharmacother*, 2017, 87: 332-341.
- [9] 肖华平, 肖金仿, 陶涛, 等. 丙泊酚对新生鼠神经干细胞增殖及学习记忆的影响. 临床麻醉学杂志, 2011, 27(6): 584-586.
- [10] Amrock LG, Starner ML, Murphy KL, et al. Long-term effects of single or multiple neonatal sevoflurane exposures on rat hippocampal ultrastructure. *Anesthesiology*, 2015, 122(1): 87-95.
- [11] Qiu L, Zhu C, Bodogan T, et al. Acute and long-term effects of brief sevoflurane anesthesia during the early postnatal period in rats. *Toxicol Sci*, 2016, 149(1): 121-133.
- [12] Martinez-Reyes I, Diebold LP, Kong H, et al. TCA cycle and mitochondrial membrane potential are necessary for diverse biological functions. *Mol Cell*, 2016, 61(2): 199-209.
- [13] Henriques AG, Oliveira JM, Carvalho LP, et al. A β influences cytoskeletal signaling cascades with consequences to alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*, 2015, 52(3): 1391-1407.
- [14] Li R, Zhang LM, Sun WB. Erythropoietin rescues primary rat cortical neurons from pyroptosis and apoptosis via Erk1/2-Nrf2/Bach1 signal pathway. *Brain Res Bull*, 2017, 130: 236-244.
- [15] Pang L, Zhang N, Dong N, et al. Erythropoietin protects rat brain injury from carbon monoxide poisoning by inhibiting Toll-Like receptor 4/NF-kappa B-Dependent inflammatory responses. *Inflammation*, 2016, 39(2): 561-568.
- [16] Meng R, Zhu D, Bi Y, et al. Erythropoietin inhibits gluconeogenesis and inflammation in the liver and improves glucose intolerance in high-fat diet-fed mice. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53557.
- [17] Go M, Kou J, Lim JE, et al. Microglial response to LPS increases in wild-type mice during aging but diminishes in an Alzheimer's mouse model; implication of TLR4 signaling in disease progression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 479(2): 331-337.
- [18] Ulbrich F, Lerach T, Biermann J, et al. Argon mediates protection by interleukin-8 suppression via a TLR2/TLR4/STAT3/NF- κ B pathway in a model of apoptosis in neuroblastoma cells in vitro and following ischemia-reperfusion injury in rat retina in vivo. *J Neurochem*, 2016, 138(6): 859-873.

(收稿日期: 2017-03-20)