

· 实验研究 ·

κ 阿片受体激动剂对心肺转流大鼠术后认知功能及 $\alpha 7nAChR$ 表达的影响

刘冬 郑翔 孙莹杰 张铁铮

【摘要】 目的 探讨 κ 阿片受体 (kappa opioid receptors, KORs) 激动剂 U50488H 对心肺转流 (CPB) 后大鼠认知功能及 $\alpha 7nAChR$ 表达的影响。方法 成年雄性 SD 大鼠 32 只, 体重 400~450 g, 随机分为四组: Sham 组 (S 组)、CPB 组 (C 组)、CPB+U50488H 组 (K 组)、CPB+KORs 拮抗剂 Nor-BNI+U50488H 组 (N 组), 每组 8 只。四组大鼠于术前 5 d 开始进行水迷宫训练, 每天 4 次。S 组不建模, 动静脉穿刺后进行机械通气 60 min, 其余三组 CPB 60 min。术后 1 d 进行 Morris 水迷宫实验, 随后处死大鼠, 采集血清, 取海马组织。采用 ELISA 法检测血清 IL-1 β 、TNF- α 、S100 β 浓度、海马 ACh 含量及 ChAT 和 AchE 活性; 采用 Western blot 法检测海马 $\alpha 7nAChR$ 蛋白含量。结果 与 S 组比较, C、K 和 N 组逃避潜伏期明显延长, 穿越平台次数明显减少, 目标象限游泳距离和停留时间明显缩短 ($P < 0.05$); 血清 IL-1 β 、TNF- α 和 S100 β 浓度明显升高, 海马 $\alpha 7nAChR$ 蛋白含量明显降低 ($P < 0.05$)。与 C 组比较, K 组逃避潜伏期明显缩短, 穿越平台次数明显增多, 目标象限游泳距离和停留时间明显延长 ($P < 0.05$); 血清 IL-1 β 、TNF- α 和 S100 β 浓度明显降低, 海马 $\alpha 7nAChR$ 蛋白含量明显升高 ($P < 0.05$)。与 S 组比较, C 组、N 组海马 Ach 含量及 ChAT 活性明显降低, AchE 活性明显升高。与 C 组比较, K 组海马 Ach 含量及 ChAT 活性明显升高, AchE 活性明显降低 ($P < 0.05$)。结论 KORs 激动剂激活胆碱能抗炎通路, 上调 $\alpha 7nAChR$ 的表达, 减轻炎症反应, 从而改善 CPB 后大鼠认知功能。

【关键词】 κ -阿片受体激动剂; 认知功能; 心肺转流; $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体; 水迷宫

Protective effects of kappa opioid receptor agonist on postoperative cognitive function and the expression of $\alpha 7nAChR$ induced by cardiopulmonary bypass in rats LIU Dong, ZHENG Xiang, SUN Yingjie, ZHANG Tiezheng. Department of Anesthesiology, General Hospital of Shenyang Military Command, Shenyang 110016, China

Corresponding author: SUN Yingjie, Email: sunyingjie9@hotmail.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the protective effect of κ -opioid receptor (KORs) agonist U50488H on postoperative cognitive function in rats after cardiopulmonary bypass (CPB) and the relationship with the cholinergic anti-inflammatory pathway (CAP). **Methods** Thirty-two adult male SD rats, weighing 400 - 450 g, were randomly divided into 4 groups: sham group (group S), CPB group (group C), CPB + U50488H group (group K) and CPB + KORs antagonists Nor-BNI + U50488H group (group N), 8 rats in each group. The rats of the four groups were trained in water maze for five days, four times once a day before operation. In group S, the model was not established and mechanical ventilation was performed for 60 min after puncture. CPB was maintained for 60 min in the remaining three groups. The rats of each group were tested the cognitive function by the Morris water maze experiment one day after CPB, then the plasma samples and hippocampus were collected. The levels of plasma IL-1 β , TNF- α and S100 β , hippocampus ACh levels and ChAT, AchE activities were detected by ELISA; the levels of hippocampus $\alpha 7nAChR$ was detected by Western blot. **Results** Compared with group S, the average latency were significantly increased, the average number of cross platform were significantly decreased, the distance and time of rats swimming in the target quadrant were significantly shortened, the levels of plasma IL-1 β , TNF- α and S100 β were increased, the levels of hippocampus $\alpha 7nAChR$ was decreased in groups C, K and N ($P < 0.05$).

DOI: 10.12089/jca.2018.10.014

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81471121)

作者单位: 110016 沈阳军区总医院麻醉科 (刘冬、孙莹杰、张铁铮); 武汉市中心医院麻醉科 (郑翔)

通信作者: 孙莹杰, Email: sunyingjie9@hotmail.com

Compared with group C, the average latency were significantly decreased, the average number of cross platform were significantly increased, the distance and time of rats swimming in the target quadrant were significantly extended, the levels of plasma IL-1 β , TNF- α and S100 β were decreased, the levels of hippocampus α 7nAChR was increased in group K ($P < 0.05$). Compared with group S, the levels of ACh and activities of ChAT were descended, AchE activity was enhanced in groups C and K ($P < 0.05$). Compared with group C, the levels of ACh and activities of ChAT were enhanced, AchE activity was descended in group K ($P < 0.05$). There was no significantly difference neither between groups K and S nor groups N and C. **Conclusion** KORs agonist activation CAP raises the expression of α 7nAChR, relieves inflammation of the rats after CPB, then improves the postoperative cognitive function.

【Key words】 Kappa opioid receptors agonist; Cognitive function; Cardiopulmonary bypass; α 7 Nicotinic acetylcholine receptors; Water maze

胆碱能抗炎通路(cholinergic anti-inflammatory pathway, CAP)在中枢神经系统与免疫、抗炎系统之间有着密切联系,激活 CAP 可减少机体 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子的释放,有效抑制局部及全身的炎症反应^[1]。研究表明, α 7 烟碱型乙酰胆碱受体(α 7nAChR)是介导胆碱能抗炎通路所必须的受体。 κ 阿片受体(kappa opioid receptors, KORs)在全身和局部脑缺血动物模型中均具有减轻脑组织损伤以及提高功能恢复的作用。本研究拟探讨 KORs 激动剂 U50488H 对心肺转流(CPB)后大鼠认知功能的影响及其机制,为 KORs 临床应用提供实验依据。

材料与方 法

实验动物与分组 清洁级雄性健康成年 SD 大鼠,2 月龄,体重 400~450 g,由沈阳军区总医院动物实验科供应和饲养,饲养期间动物自由饮水、自由摄食。对于所有入组大鼠首先利用水迷宫进行定位航行试验,剔除智能低下或不会游泳者,同时确保在开始实验前所有组别大鼠的认知功能无统计学差异。用 SUPER MAZE 小动物行为记录分析系统记录每组大鼠每次训练轨迹和运动数据。选出符合上述条件的大鼠 32 只,随机分为四组:Sham 组(S 组)、CPB 组(C 组)、CPB + U50488H 组(K 组)、CPB + KORs 拮抗剂 Nor-BNI + U50488H 组(N 组),每组 8 只。S 组只进行麻醉诱导及置管操作;C 组建立心肺转流并持续 60 min;K 组 CPB 前 30 min 静脉注射 U50488H 1.5 mg/kg;N 组 CPB 前 1 h 静脉注射 Nor-BNI 2 mg/kg,CPB 前 30 min 静脉注射 U50488H 1.5 mg/kg。

CPB 模型的制备 术前禁食 6 h,不禁水。麻醉后插管连接小动物呼吸机行机械通气,RR 70 次/分, V_T 2 ml/100 g,维持大鼠 PCO_2 35~40

mmHg, I:E 1:1.25, P_{peak} 3.75~11.25 mmHg。持续血氧饱和度、体温、心电监测。右股静脉置 24 G 套管针,建立静脉补液通路;左股动脉置 24 G 套管针用于监测动脉压和血气分析;尾动脉穿刺置 22 G 套管针,右颈静脉置管 18 G 套管针(有侧孔)用于建立 CPB^[2]。CPB 期间动态监测血气分析、纠正内环境紊乱,60 min 后开始机械通气,缓慢停止转流,鱼精蛋白 1:1 中和肝素,右颈静脉监测中心静脉压指导液体复苏,并进行复温治疗。待内环境恢复正常、循环稳定后,拔除动静脉管道,结扎血管,缝合切口。侧卧位等待苏醒,恢复自主呼吸后吸痰拔出气管导管。术后吸氧,及时补充饮水,升高室温。

水迷宫实验 分为隐藏平台测试及空间探索测试。(1)获取实验(定位航行实验):为使大鼠形成记忆,故进行连续 5 d 的水迷宫训练,一组训练包括四个象限。一旦大鼠找到平台后,计时器立即停止,所需时间即为逃避潜伏期。若大鼠在各象限游泳时间达 60 s 仍未找到平台,则终止计时,并引诱大鼠游到平台附近、休息 30 s 后继续换另一象限实验,潜伏期为 60 s。记录大鼠平均游泳速度、平均潜伏期及运动轨迹,以此判断大鼠的自主学习能力。(2)记忆保留实验(空间探索实验):经过隐藏平台训练形成记忆后撤掉平台,将大鼠随机依次从四个象限入水点面对池壁释放入水,60 s 后停止实验,取出大鼠并休息 60 s。SUPER MAZE 软件记录 Right Top 象限释放大鼠后穿越原平台的次数、目标象限游泳距离及停留时间,以此判断大鼠记忆再现的能力。进行第 5 天水迷宫训练时应用 SUPER MAZE 软件系统自动采集轨迹图像及数据作为术前标准值,可与术后采集的数据进行对照分析。

标本采集 于 CPB 术后第 1 天进行水迷宫测试,随后麻醉下去除大鼠眼球放血处死,采集的血标本在常温下静置 10 min 后,于离心机中以 3 000

r/min 转速离心 10 min, 取上部血清, 置于 -80 °C 环境中保存待测。生理盐水灌注后组织剪离断颅骨, 游离并取出全脑。在冰袋上迅速将脑组织沿正中矢状线对称切开, 用显微器械游离出右侧海马区脑组织, 置于 -80 °C 冰箱保存待用。

观察指标 采用 ELISA 法检测血清 IL-1、TNF- α 和 S100 β 浓度、海马 Ach 含量及 ChAT 和 AchE 活性; 采用 Western blot 法检测海马 α 7nAChR 蛋白含量。

统计分析 采用 SPSS 19.0 软件进行分析。正态分布计量资料以均数 \pm 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

定位航行实验 与 S 组比较, C、K 和 N 组逃避潜伏期明显延长 (P < 0.05); 与 C 组比较, K 组逃避潜伏期明显缩短 (P < 0.05); 与 K 组比较, N 组逃避潜伏期明显延长 (P < 0.05); N 组与 C 组逃避潜伏期差异无统计学意义。四组游泳速度差异无统计学意义 (表 1)。

表 1 四组大鼠定位航行实验的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	逃避潜伏期(s)	游泳速度(cm/s)
S 组	8	21.6 \pm 0.5	21.7 \pm 0.3
C 组	8	46.8 \pm 0.4 ^a	19.9 \pm 0.6
K 组	8	25.3 \pm 0.8 ^{ab}	22.3 \pm 0.4
N 组	8	48.9 \pm 0.6 ^{ac}	20.1 \pm 0.8

注: 与 S 组比较, ^aP < 0.05; 与 C 组比较, ^bP < 0.05; 与 K 组比较, ^cP < 0.05

空间探索实验 与 S 组比较, C、K 和 N 组穿越平台次数明显减少, 目标象限游泳距离和停留时间明显缩短 (P < 0.05); 与 C 组比较, K 组穿越平台次数明显增多, 目标象限游泳距离和停留时间明显延长 (P < 0.05); 与 K 组比较, N 组大鼠穿越平台次

数明显减少, 目标象限游泳距离和停留时间明显缩短 (P < 0.05); N 组与 C 组差异无统计学意义 (表 2, 图 1)。

表 2 四组大鼠空间探索实验的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	穿越平台次数(次)	游泳距离 (cm)	停留时间 (s)
S 组	8	3.8 \pm 0.3	615.7 \pm 5.2	37.8 \pm 0.3
C 组	8	1.5 \pm 0.7 ^a	387.1 \pm 6.5 ^a	18.4 \pm 0.8 ^a
K 组	8	4.2 \pm 0.5 ^{ab}	596.4 \pm 4.3 ^{ab}	32.7 \pm 0.5 ^{ab}
N 组	8	1.4 \pm 0.4 ^{ac}	402.3 \pm 7.3 ^{ac}	21.5 \pm 0.3 ^{ac}

注: 与 S 组比较, ^aP < 0.05; 与 C 组比较, ^bP < 0.05; 与 K 组比较, ^cP < 0.05

血清 IL-1 β 、TNF- α 和 S100 β 浓度 与 S 组比较, C、K 和 N 组血清 IL-1 β 、TNF- α 和 S100 β 浓度明显升高 (P < 0.05); 与 C 组比较, K 组血清 IL-1 β 、TNF- α 和 S100 β 浓度明显降低 (P < 0.05); 与 K 组比较, N 组血清 IL-1 β 、TNF- α 和 S100 β 浓度明显升高 (P < 0.05), N 组和 C 组差异无统计学意义 (表 3)。

海马 Ach 含量及 ChAT、AchE 活性 与 S 组比较, C 组和 N 组海马 Ach 含量、ChAT 活性明显降低, AchE 活性明显升高 (P < 0.05)。与 C 组比较, K 组海马 Ach 含量、ChAT 活性明显升高, AchE 活性明显降低 (P < 0.05)。与 K 组比较, N 组海马 Ach 含量、ChAT 活性明显降低, AchE 活性明显升高 (P < 0.05), K 组和 S 组海马 Ach 含量及 ChAT、AchE 活性差异无统计学意义, N 组和 C 组海马 Ach 含量及 ChAT、AchE 活性差异无统计学意义 (表 4)。

海马 α 7nAChR 蛋白含量 C、K 和 N 组海马 α 7nAChR 蛋白含量明显高于 S 组 (P < 0.05); K 组 α 7nAChR 蛋白含量明显高于 C 组 (P < 0.05); N 组 α 7nAChR 蛋白含量明显低于 K 组 (P < 0.05); N 组和 C 组 α 7nAChR 蛋白含量差异无统计学意义 (图 2)。

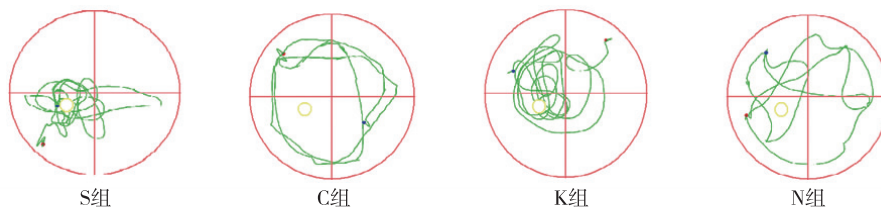


图 1 四组大鼠游泳轨迹

表 3 四组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 和 S100 β 浓度的比较 ($\bar{x} \pm s$)

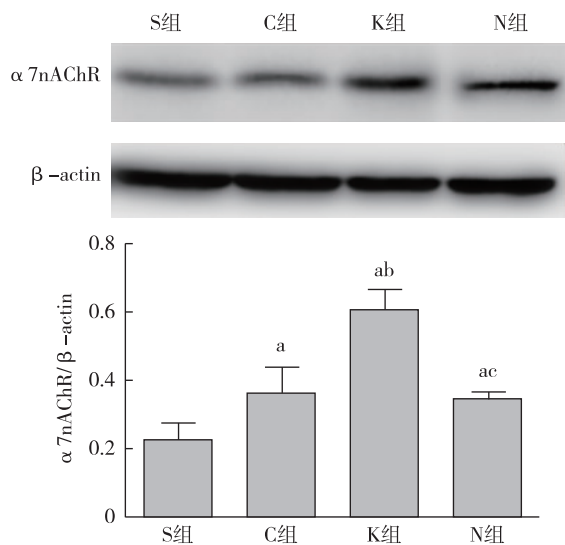
组别	只数	IL-1 β (pg/L)	TNF- α (μ g/L)	S100 β (ng/L)
S 组	8	8.3 \pm 1.2	2.1 \pm 0.5	6.8 \pm 0.9
C 组	8	32.4 \pm 0.9 ^a	6.3 \pm 0.7 ^a	17.1 \pm 1.2 ^a
K 组	8	26.7 \pm 1.1 ^{ab}	4.8 \pm 0.6 ^{ab}	12.5 \pm 1.0 ^{ab}
N 组	8	33.6 \pm 1.3 ^{ac}	6.9 \pm 0.5 ^{ac}	15.6 \pm 1.1 ^{ac}

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

表 4 四组大鼠海马 ACh 含量及 ChAT、AChE 活性的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	Ach (ng/g)	ChAT (U/g)	AchE (U/mg)
S 组	8	48.36 \pm 10.95	285.23 \pm 26.74	0.21 \pm 0.03
C 组	8	33.62 \pm 8.87 ^a	220.93 \pm 23.61 ^a	0.35 \pm 0.01 ^a
K 组	8	46.54 \pm 7.69 ^b	298.16 \pm 19.36 ^b	0.20 \pm 0.13 ^b
N 组	8	32.68 \pm 11.08 ^{ac}	216.82 \pm 17.98 ^{ac}	0.32 \pm 0.18 ^{ac}

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



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

图 2 四组大鼠海马 $\alpha 7nAChR$ 蛋白含量的比较

讨 论

CPB 产生的大量炎性因子主要包括 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等,可直接影响神经系统功能,甚至引起神经系统损伤,从而导致 POCD 发生^[3-4]。Kosour 等^[5]报道,CPB 术后 COPD 患者血清的炎性因子浓度显著升高。可见 POCD 是典型的中枢神经系统功能障碍,其发生、发展及转归显然与炎性反应密切相关。S100 β 是脑损伤特异性标志物,脑脊液 S100 β 比血清 S100 β 更好地评估心肺转流术后脑损伤。但由于大鼠脑脊液非常有限,因此可选择血清 S100 β 作为大鼠脑损伤研究的指标。本实验 CPB 组血清炎性因子及脑损伤标志物含量较 S 组明显升高,水迷宫测试也发现 CPB 术后大鼠的学习记忆能力确实受到影响,产生 POCD,证实大鼠 CPB 后认知功能及脑损伤的改变与炎症反应密切相关。

KORs 在前额叶皮层和其他大脑区域表达丰富,能调节情绪和认知功能。研究表明,U50488H 通过特异性激活海马神经细胞上的 κ 阿片受体,产生神经保护作用,改善认知功能。应用 U50488H 干预由缺血引起的海马神经损伤研究发现,该激动剂可明显降低认知障碍。本实验结果显示,应用 U50488H 后,与心肺转流组比较,KORs 组大鼠水迷宫的逃避潜伏期明显缩短,目标象限游泳距离和停留时间明显延长,穿越原平台的次数明显增多,提示 KORs 能够减轻 CPB 术后产生的 POCD;K 组脑损伤标志物、血清炎性因子等的表达显著低于 C 组,给予特异性 KORs 阻断剂后炎症反应及脑损伤程度又明显加重,且水迷宫实验又显示出认知障碍的表现,提示 KORs 激动剂可减轻 CPB 后的炎症反应,该作用可被 KORs 特异性拮抗剂 Nor-BNI 阻断。

在众多的抗炎机制中,胆碱能抗炎通路有着独特的优势,它通过迷走神经及其递质乙酰胆碱与免疫系统相互作用,产生抗炎作用^[1]。在生物体内胆碱在 ChAT 作用下生成 Ach,发挥生物学效应,Ach 又被 AchE 水解生成胆碱。ChAT 和 AchE 分别作为 Ach 的合成酶及水解酶,是衡量中枢神经系统胆碱能神经元活性的重要指标。三者之间的动态平衡失调将导致各种神经精神症状,例如海马 ChAT 活性降低、AchE 活性增高,使 Ach 含量显著减少,

将导致阿尔茨海默(AD)病的发生,早期表现以记忆障碍为主。本实验结果显示,与 S 组比较,C 组和 N 组 AchE 活性升高、ACh 含量及 ChAT 活性降低,炎症因子及脑损伤标志物表达增加,提示认知功能障碍的发生与胆碱能神经元系统功能失调、CPB 后炎症反应及脑损伤改变相关。

当机体受某种免疫刺激后,激活迷走神经传出纤维,使外周神经末梢释放乙酰胆碱,与免疫细胞上 $\alpha 7nAChR$ 结合,通过细胞内信号传导途径抑制促炎因子的释放,调控炎症反应。 $\alpha 7nAChR$ 是胆碱能抗炎通路中的关键部分。 $\alpha 7nAChR$ 不仅存在于外周免疫细胞上,大脑的小胶质细胞也有 $\alpha 7nAChR$ 分布,激活 $\alpha 7nAChR$ 不仅可以减轻 AD 患者的精神症状,对精神分裂症及唐氏综合症患者的认知功能也有改善作用^[1,6]。 $\alpha 7nAChR$ 激动剂也可以降低小胶质细胞释放 TNF- α ,加强认知功能例如注意力和记忆等方面^[7]。有研究发现,在心肺转流模型中,给予 $\alpha 7nAChR$ 激动剂后可减轻 CPB 致大鼠肠屏障及大脑的损伤,其机制可能与抑制全身炎症反应及海马神经元凋亡有关^[8-11]。

本研究结果显示,通过 Western blot 法检测海马组织 $\alpha 7nAChR$ 亚单位蛋白水平结果表明,与 C 组比较,K 组 $\alpha 7nAChR$ 亚单位蛋白水平增加,而加入阻断剂后逆转上述表达情况,提示 κ 阿片受体激动剂抑制 CPB 致炎症反应的作用机制与激活 $\alpha 7nAChR$ 有关。从而调控炎症反应,减轻脑损伤程度。

综上所述, κ 阿片受体激动剂通过激活 CAP 上调体内 $\alpha 7nAChR$ 的表达,抑制 CPB 导致的炎症反应,减轻脑损伤程度,进而对中枢神经系统起到保护,发挥改善认知功能的作用。然而, κ 阿片受体激动剂对体外循环术后认知功能保护的确切机制尚有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Han B, Li X, Hao J. The cholinergic anti-inflammatory pathway: an innovative treatment strategy for neurological diseases. *Neurosci Biobehav Rev*, 2017, 77: 358-368.
- [2] 段铭杰, 孙莹杰, 郑翔, 等. 改良穿刺法建立大鼠无血预充非停跳体外循环后认知功能障碍模型. *中国体外循环杂志*, 2017, 15(3): 179-184.
- [3] 陈怡霏, 段晓霞, 张官鹏, 等. 体外循环术 POCD 患者血清 GDNF、S100 β 和 A β 含量检测对病情评估的价值. *临床和实验医学杂志*, 2017, 16(1): 47-49.
- [4] Pağowska-Klimek I, Świerżko AS, Michalski M, et al. Activation of the lectin pathway of complement by cardiopulmonary bypass contributes to the development of systemic inflammatory response syndrome after paediatric cardiac surgery. *Clin Exp Immunol*, 2016, 184(2): 257-263.
- [5] Kosour C, Dragosavac D, Antunes N, et al. Effect of ultrafiltration on pulmonary function and interleukins in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2016, 30(4): 884-890.
- [6] Cheng Q, Yakel JL. Activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors increases intracellular cAMP levels via activation of AC1 in hippocampal neurons. *Neuropharmacology*, 2015, 95: 405-414.
- [7] Komal P, Estakhr J, Kamran M, et al. cAMP-dependent protein kinase inhibits $\alpha 7$ nicotinic receptor activity in layer 1 cortical interneurons through activation of D1/D5 dopamine receptors. *J Physiol*, 2015, 593(16): 3513-3532.
- [8] 伊小婷, 陈克研, 周锦, 等. 肠神经胶质细胞与体外循环致肠损伤相关性的研究进展. *现代生物医学进展*, 2017, 17(16): 3191-3194.
- [9] 王梅, 孙莹杰, 张铁铮. $\alpha 7nAChR$ 激动剂对体外循环致大鼠脑损伤的影响. *中华麻醉学杂志*, 2016, 36(8): 930-933.
- [10] 计流, 孙莹杰, 张铁铮. $\alpha 7$ 烟碱型胆碱能受体激动剂对体外循环致大鼠脑损伤及核转录因子- κB -p65 蛋白表达的影响. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2017, 38(8): 673-676, 694.
- [11] Chen K, Sun Y, Diao Y, et al. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonist inhibits the damage of rat hippocampal neurons by TLR4/Myd88/NF- κB signaling pathway during cardiopulmonary bypass. *Mol Med Rep*, 2017, 16(4): 4770-4776.

(收稿日期:2018-01-14)