

海马程序性坏死在心肺转流诱发大鼠认知功能障碍中的作用

张琦 石磊 刘扬 陈岩 刘祥 谢永达 李亚南

【摘要】 目的 探讨海马程序性坏死在心肺转流 (CPB) 诱发大鼠认知功能障碍中的作用。方法 选取健康雄性 SD 大鼠 45 只, 6 月龄, 体重 400~450 g, 采用随机数字表法将大鼠分为三组: 对照组 (C 组)、CPB 组和 CPB+程序性坏死抑制剂 Nec-1 组 (N 组), 每组 15 只。建立 CPB 模型前, N 组腹腔注射 Nec-1 6.25 mg/kg, C 组和 CPB 组腹腔注射等容量生理盐水。CPB 组和 N 组建立无血预充心脏不停跳 CPB 模型 60 min。于 CPB 结束后 2 d 采用旷场试验评估自主运动能力。于 CPB 结束后 3 d 采用 Morris 水迷宫实验评估认知功能。水迷宫实验结束后处死大鼠, 分离海马组织, 采用流式细胞术检测海马神经元程序性坏死数量, 采用 Western blot 法检测 p-RIP1、p-RIP3 和 p-MLKL 蛋白含量, 通过透射电镜观察海马神经元的超微结构。**结果** 三组旷场试验运动速度、路程及中心停留时间差异无统计学意义。与 C 组比较, CPB 组和 N 组逃避潜伏期明显延长, 穿越原平台次数明显减少, 原平台象限停留时间明显缩短, 海马神经元程序性坏死率明显升高, p-RIP1、p-RIP3 和 p-MLKL 蛋白含量明显升高 ($P < 0.05$), 海马神经元细胞器肿胀, 溶酶体破裂, 部分细胞核发生染色质溶解。与 CPB 组比较, N 组逃避潜伏期明显缩短, 穿越原平台次数明显增多, 原平台象限停留时间明显延长 ($P < 0.05$), 海马神经元程序性坏死率明显降低 ($P < 0.05$), p-RIP1、p-RIP3 和 p-MLKL 蛋白含量明显降低 ($P < 0.05$), 海马神经元细胞器肿胀程度、溶酶体破裂程度及细胞核染色质溶解程度明显减轻。**结论** 心肺转流可能通过增加海马程序性坏死程度诱发大鼠认知功能障碍。

【关键词】 海马; 程序性坏死; 心肺转流; 认知功能障碍

Role of hippocampal necroptosis in cardiopulmonary bypass induced cognitive impairment in rats

ZHANG Qi, SHI Lei, LIU Yang, CHEN Yan, LIU Xiang, XIE Yongda, LI Yanan. Department of Anesthesiology, Hebei Children's Hospital, Shijiazhuang 050051, China

Corresponding author: LI Yanan, Email: liyanan0403@163.com

【Abstract】 **Objective** To evaluate the role of hippocampal necroptosis in cardiopulmonary bypass (CPB) induced cognitive impairment in rats. **Methods** Forty-five healthy male SD rats, aged 6 months, weighing 400–450 g, were randomly divided into three groups ($n = 15$ in each group): control group (group C), group CPB and CPB + necroptosis inhibitor Nec-1 group (group N). Group N were injected with Nec-1 6.25 mg/kg intraperitoneally and the other two groups were injected with the same amount of normal saline intraperitoneally. Then, CPB model of beating heart without blood priming for 60 minutes was established in groups CPB and N immediately. The open field test was used to detect the autonomic movement ability of rats on the second day after CPB, and the Morris water maze test was used to detect the cognitive function of rats on the third day after CPB. After the water maze, the rats were sacrificed, the brain was taken and the hippocampal tissue was separated. Then, the hippocampal necroptosis rate was detected using flow cytometry, and the protein expressions of p-RIP1, p-RIP3 and p-MLKL were detected by Western blot, the ultrastructure of hippocampal neurons was observed under transmission electron microscope. **Results** There were no significant difference in movement speed, distance and central residence time among the three groups. Compared with group C, the escape latency was prolonged, the number of crossing the original platform was reduced, the residence time in the original platform quadrant was shortened, the hippocampal necroptosis rate was increased, the expressions of p-RIP1, p-RIP3 and p-MLKL were up-regulated ($P < 0.05$), the organelles of hippocampal neurons swelled, lysosomes broke, and some chromatin in nuclei dissolved in group CPB and group N. Compared with group CPB, the escape latency

DOI: 10.12089/jca.2023.02.013

基金项目: 河北省医学科学研究课题 (20220712)

作者单位: 050051 石家庄市, 河北省儿童医院麻醉科 (张琦、石磊、刘扬、陈岩、刘祥、谢永达); 河北医科大学第三医院麻醉科 (李亚南)

通信作者: 李亚南, Email: liyanan0403@163.com

was shortened, the number of crossing the original platform was deduced, the residence time in the original platform quadrant was prolonged, the hippocampal necroptosis rate was decreased, the expressions of p-RIP1, p-RIP3 and p-MLKL were down-regulated, the degree of organelles swelling, lysosome rupture and nuclear chromatin dissolution in hippocampal neurons were significantly alleviated in group N ($P < 0.05$).

Conclusion The mechanism of cognitive dysfunction induced by CPB in rats may be related to the increase of the level of hippocampal necroptosis.

【Key words】 Hippocampus; Necrosis; Cardiopulmonary bypass; Cognition disorders

认知功能障碍是接受心肺转流 (cardiopulmonary bypass, CPB) 患者术后常见的并发症之一, 表现为精神错乱、记忆受损, 严重影响患者的术后生活质量, 增加额外的医疗费用, 致病机制尚未阐明^[1-2]。程序性坏死是一种非凋亡性细胞死亡方式, 在神经退行性疾病的发生发展中发挥重要作用^[3]。目前, 海马程序性坏死是否参与 CPB 诱发认知功能障碍的过程尚未明确。本研究通过探讨海马程序性坏死在 CPB 诱发大鼠认知功能障碍中的作用, 为 CPB 患者术后脑保护策略提供参考。

材料与方法

实验动物 本研究经医院动物实验伦理委员会批准 (科 2021-006-1), 操作人员均具备实验动物从业人员资质证书, 相关操作严格按照实验动物操作规范进行。选择清洁级健康成年雄性 SD 大鼠 45 只, 6 月龄, 体重 400~450 g, 购自河北医科大学动物实验动物中心 [许可证编号: SCXK(冀) 2020-1-003]。

实验分组与处理 采用随机数字表法将大鼠分为三组: 对照组 (C 组)、CPB 组和 CPB+程序性坏死抑制剂 Nec-1 组 (N 组), 每组 15 只。参考本课题组前期研究^[5], N 组于模型制备前 1 h 腹腔注射 Nec-1 (批号: ab1410536) 25 mg/kg。C 组和 CPB 组腹腔注射等容量的生理盐水。CPB 组和 N 组建立无血预充心脏不停跳 CPB 模型 60 min; C 组仅接受气管插管及动静脉穿刺置管操作, 不建立 CPB。

CPB 模型制备 根据文献^[4]的方法制备大鼠 CPB 模型。CPB 前所有大鼠禁食 6 h, 不禁饮。腹腔注射 10% 水合氯醛 300 mg/kg 进行深麻醉处理。采用透光法对大鼠进行气管插管后连接小动物呼吸机, 设定 V_T 3 ml/100 g, RR 75 次/分, I : E 1 : 1。间断给予水合氯醛和 1% 罗库溴铵用于术中的麻醉维持。穿刺部位备皮, 碘伏消毒, 左股动脉穿刺置管连接动脉压力转换器监测动脉血压和血气, 右股静脉穿刺置管用于给药和补液。右颈内静脉置管于右心房水平作为引流端, 尾动脉置管为灌注端, 连接大鼠专用膜式氧合器和恒流蠕动泵建立 CPB。

静脉注射肝素 200 IU/kg 进行全身肝素化, 待激活全血凝固时间 (activated clotting time of whole blood, ACT) 达 400 ~ 500 s 时, 进行无血预充, CPB 即刻采用膜式氧合器供氧并停止机械通气。CPB 期间将大鼠置于温毯上, 维持直肠温度 36.5 ~ 37.5 °C; 酌情进行补液和给予血管活性药物, 维持 MAP > 60 mmHg, 灌注量 40 ml · kg⁻¹ · min⁻¹。于 CPB 50 min 时逐渐减少转流灌注量, 并恢复机械通气。CPB 60 min 时停止转流, 依次拔除各血管内置管、结扎, 局麻下缝合。待大鼠自主脱管, 将其单独放入笼中观察饲养。

旷场试验 于 CPB 结束后 2 d 时, 采用旷场实验评估大鼠自发活动能力。九宫格旷场箱 80 cm × 80 cm × 40 cm, 旷场箱底部及四壁均为黑色, 在安静弱光环境中进行检测。在旷场箱中央放入大鼠, 任其自由活动, 采集活动轨迹 5 min, 采用视频分析系统记录运动速度、路程及中心停留时间。每只大鼠测试结束后, 用 75% 酒精擦拭旷场箱, 以避免行为踪迹和气味对其他大鼠造成影响。

Morris 水迷宫实验 采用 Morris 水迷宫评估大鼠认知功能。参考文献^[5]的方法, 于 CPB 前 5 d 开始对大鼠进行 5 d 适应性训练。Morris 水迷宫实验装置为一圆形水池, 池壁上以 4 个等距点将水池平均分为四个象限: I、II、III 和 IV, 在第 IV 象限中央放置一圆形隐藏平台。水池周围设有参照物且保持不变, 水池及平台为黑色, 在水中倒入墨水, 使平台在肉眼下不可见。维持水温 21 ~ 23 °C, 房间内光照恒定。每次将大鼠从不同象限 (除平台放置象限) 面向池壁放入池中, 如果 120 s 内未找到平台, 则将其引导至平台上停留 15 s。每天训练 4 次, 在每个训练日结束后, 清洗水迷宫以消除嗅觉提示。于 CPB 结束后第 3 天, 首先进行定位航行实验: 将大鼠面向池壁放入池中, 记录其登上平台的时间, 即逃避潜伏期。再进行空间探索实验: 撤除平台, 于第 II 象限中点将大鼠面向池壁放入池中, 记录大鼠 60 s 内穿越原平台次数及原平台象限停留时间。

流式细胞术 Morris 水迷宫实验结束后每组随机取大鼠 10 只, 腹腔注射 10% 水合氯醛 2 ml/kg 深

麻醉下处死大鼠,断头取脑,冰上分离海马组织。称取海马组织约 1 g,置于 100 目铜网上剪碎并用镊子轻搓过滤,300 目尼龙网过滤细胞悬液除去大的团块,收集细胞悬液,1 310×g 离心 5 min,弃上清,加入 500 μl 1× Binding Buffer 制备浓度为 1×10⁵ ~ 5×10⁵ 个/L 单细胞悬液,5 μl Annexin V 和 10 μl PI 标记,避光孵育 5 min,应用 Epics2XL II 型流式细胞仪测定海马神经元程序性坏死数量,并计算程度性坏死率(神经元程序性坏死数量/神经元总数量×100%)。

Western blot 法 采用 Western blot 法检测大鼠海马组织磷酸化受体相互作用蛋白激酶 1(phosphorylated receptor interacting protein kinase 1, p-RIPK1)、磷酸化受体相互作用蛋白激酶 3(phosphorylated receptor interacting protein kinase 3, p-RIPK3)和磷酸化混合系列蛋白激酶样结构域(phosphorylated mixed series protein kinase like domain, p-MLKL)的含量。取海马组织约 100 mg,加入单去污剂蛋白质裂解缓冲液 300 ml 匀浆,4 ℃下 1 310×g 离心 30 min,取上清液,获得细胞总蛋白。制备 15%的 SDS-聚丙烯凝胶,加样(蛋白 80 μg)电泳分离,电转移至 PVDF 膜。印迹膜封闭 1 h 后,分别加入 5%脱脂奶粉稀释的鼠抗小鼠 p-RIP1、p-RIP3、p-MLKL 抗体(稀释度:1:1 000)4 ℃孵育过夜。次日复温 30 min 后,TBS 洗膜 3 次,每次 10 min,分别加入相应的山羊抗兔二抗工作液(稀释度 1:500),室温避光缓慢摇动 60 min。TBS 洗膜 3 次,暗室内加入显色发光液曝光、扫描,以 β-actin 为内参。采用 ImageJ 图像分析软件进行分析,以目的蛋白条带灰度值与 β-actin 条带灰度值的比值反映目的蛋白的相对含量。

透射电子显微镜法 取每组剩余大鼠 5 只,腹腔注射 10%水合氯醛 4 ml/kg 充分麻醉后,固定于操作台上,将灌注针快速插入左心室,剪开右心耳,快速灌注 4 ℃ PBS 至肝脏变成白色,再灌注电镜固定液(2.5%戊二醛与 2%多聚甲醛混合液)100 ml,待灌注结束后,取海马组织,在电镜固定液中固定 2 h,室温下丙酮包埋 4 h,制备超薄切片,常温下醋酸双氧肼和柠檬酸双染 30 min,每个网状铜片随机选择 15 个视野,JEM-1200X 透射电镜下观察海马神经元的超微结构。

统计分析 采用 SPSS 23.0 软件进行分析。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

运动速度、路程及中心停留时间 三组旷场实验运动速度、路程及中心停留时间差异无统计学意义(表 1)。

表 1 三组大鼠旷场实验结果的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	运动速度 (mm/s)	运动路程 (mm)	中心停留时间 (s)
C 组	15	15.44±3.83	3 984.65±331.21	15.65±3.37
CPB 组	15	15.06±3.54	4 027.34±313.55	16.20±3.68
N 组	15	16.13±3.75	4 199.25±299.45	15.94±3.95

逃避潜伏期、穿越原平台次数及原平台象限停留时间 与 C 组比较,CPB 组和 N 组逃避潜伏期明显延长,穿越原平台次数明显减少,原平台象限停留时间明显缩短($P < 0.05$)。与 CPB 组比较,N 组逃避潜伏期明显缩短,穿越原平台次数明显增多,原平台象限停留时间明显延长($P < 0.05$)。三组游泳速度差异无统计学意义(表 2)。

表 2 三组大鼠 Morris 水迷宫实验结果的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	逃避潜伏期 (s)	穿越原平台 次数(次)	原平台象限 停留时间(s)	游泳速度 (mm/s)
C 组	15	11.35±4.14	3.9±1.0	26.74±6.26	16.39±3.76
CPB 组	15	27.79±6.47 ^a	1.3±0.6 ^a	10.25±4.27 ^a	17.03±3.89
N 组	15	18.84±5.03 ^{ab}	2.4±0.8 ^{ab}	18.81±5.33 ^{ab}	16.55±3.84

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

海马神经元程序性坏死率 C 组、CPB 组和 N 组海马神经元程序性坏死率分别为(2.17±0.61)%、(10.25±2.97)%和(6.20±1.75)%。与 C 组比较,CPB 组和 N 组海马神经元程序性坏死率明显升高($P < 0.05$)。与 CPB 组比较,N 组海马神经元程序性坏死率明显降低($P < 0.05$)(图 1)。

海马组织 p-RIP1、p-RIP3 和 p-MLKL 蛋白含量 与 C 组比较,CPB 组和 N 组海马组织 p-RIP1、p-RIP3 和 p-MLKL 蛋白含量明显升高($P < 0.05$)。与 CPB 组比较,N 组海马组织 p-RIP1、p-RIP3 和 p-MLKL 蛋白含量明显降低($P < 0.05$)(图 2—4)。

海马神经元超微结构 C 组海马神经元细胞无明显改变。CPB 组和 N 组海马神经元细胞器肿胀,溶酶体破裂,部分细胞核发生染色质溶解。与 CPB

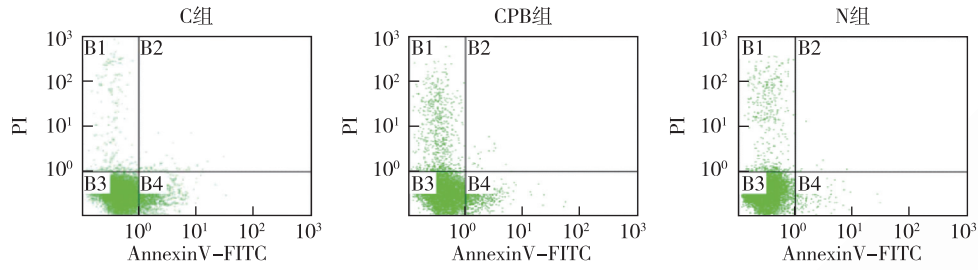
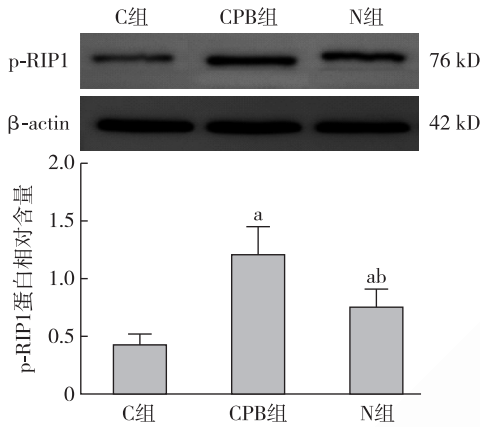
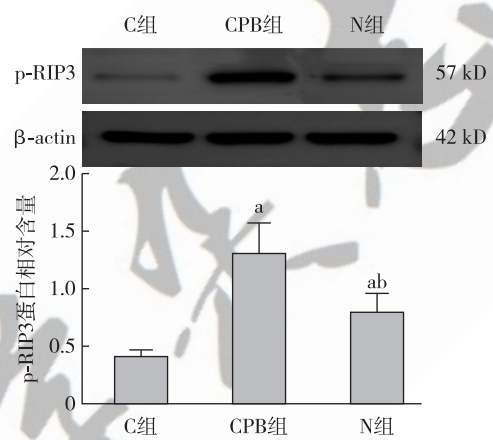


图 1 三组大鼠海马神经元程序性坏死率的比较



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

图 2 三组大鼠海马组织 p-RIP1 蛋白含量的比较



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

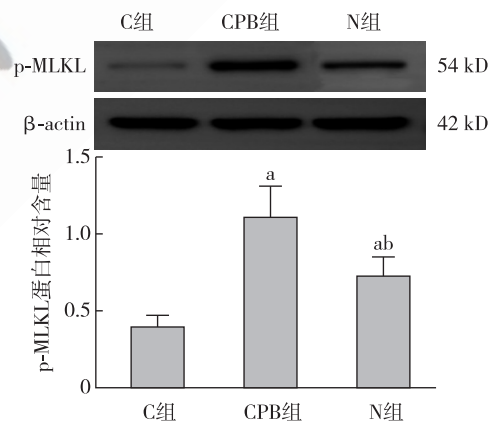
图 3 三组大鼠海马组织 p-RIP3 蛋白含量的比较

组比较,N 组海马神经元细胞器肿胀程度、溶酶体破裂程度及细胞核染色质溶解程度有所减轻(图 5)。

讨 论

认知功能障碍是 CPB 后常见的中枢神经并发症之一,但具体机制尚未阐明。本实验研究结果显示,大鼠接受 CPB 后认知功能显著降低,同时伴有海马程序性坏死率的升高及程序性坏死特异性蛋白表达水平的上调;应用程序性坏死抑制剂 Nec-1 后可明显降低海马程序性坏死程度,并改善 CPB 后的认知功能障碍。

本研究参照文献[4]的方法制备大鼠 CPB 后认知功能障碍模型。旷场实验是评价实验动物自发运动功能的经典方法,简单易行,结果可靠^[6]。Morris 水迷宫实验是评价啮齿类动物空间认知功能的经典方法,分为定位航行实验和空间探索实验。定位航行实验反映动物的空间学习能力,空间探索实验反映动物的空间记忆能力^[7]。本研究旷场试验结果显示,大鼠运动速度、路程及中心停留时间无差异,因此可排除 CPB 对大鼠运动能力的影响。Morris 水迷宫实验结果显示,接受 CPB 的大鼠逃避

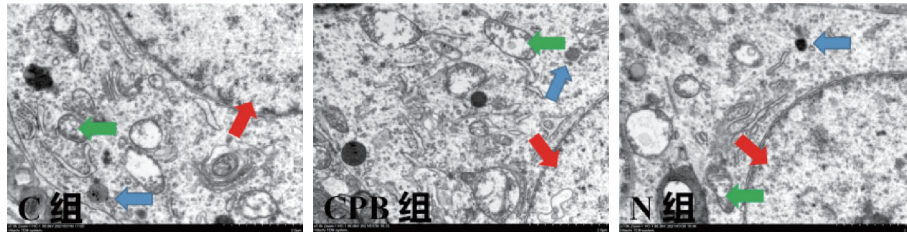


注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 CPB 组比较,^b $P < 0.05$

图 4 三组大鼠海马组织 p-MLKL 蛋白含量的比较

潜伏期延长,穿越原平台次数减少,原平台象限停留缩短,提示大鼠认知功能障碍模型制备成功。

程序性坏死是一种非凋亡性细胞死亡的新途径,受到基因的严格控制和调节。程序性坏死依赖于 RIPK1 和 RIPK3,二者结合称为死亡小体,当神经元受到刺激时,RIPK1 和 RIPK3 发生磷酸化并激活下游分子 MLKL,无活性的 MLKL 被激活后发生磷酸化,与细胞膜和细胞器上的膜磷酸肌醇和心磷



注:红色箭头,细胞核;绿色箭头,线粒体;蓝色箭头,溶酶体

图 5 三组大鼠海马神经元超微结构的醋酸双氧铀-柠檬酸染色图 (×7 000)

脂结合,形成通透性孔道,最终诱导神经元程序性坏死的发生^[8-9]。Nec-1 是程序性坏死的特异性抑制剂,能够通过抑制 RIPK1 的表达,阻止坏死小体的形成,减少程序性坏死的发生^[10-11]。海马是大脑在学习、记忆巩固以及情感行为调节中必不可少的一部分,但海马神经元程序性坏死是否参与 CPB 导致认知功能障碍的过程目前鲜有研究。本实验研究结果显示,CPB 后大鼠海马程序性坏死率明显升高,p-RIPK1、p-RIPK3 和 p-MLKL 蛋白含量明显升高。应用 Nec-1 后,大鼠海马程序性坏死率显著降低,p-RIPK1、p-RIPK3 和 p-MLKL 蛋白含量明显降低,提示海马程序性坏死可能参与 CPB 所致认知功能障碍的形成。

本实验研究尚存在以下不足:本研究仅初步探讨程序性坏死在 CPB 诱发大鼠认知功能障碍中的作用,具体的保护性机制有待进一步探索。

综上所述,CPB 可能是通过增加海马神经元程序性坏死从而诱发大鼠发生认知功能障碍。

参 考 文 献

[1] Augoustides JG. Commentary: neurocognitive dysfunction after cardiopulmonary bypass: multiple modalities to rescue the microglia. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2020, 160(4): e190-e191.
 [2] Zheng J, Min S, Hu B, et al. Nrdp1 is involved in hippocampus apoptosis in cardiopulmonary bypass-induced cognitive dysfunction via the regulation of ErbB3 protein levels. *Int J Mol Med*, 2019, 43(4): 1747-1757.

[3] Shao L, Yu S, Ji W, et al. The contribution of necroptosis in neurodegenerative diseases. *Neurochem Res*, 2017, 42(8): 2117-2126.
 [4] Qin J, Ma Q, Ma D. Low-dose sevoflurane attenuates cardiopulmonary bypass (CPB)-induced postoperative cognitive dysfunction (POCD) by regulating hippocampus apoptosis via PI3K/AKT pathway. *Curr Neurovasc Res*, 2020, 17(3): 232-240.
 [5] Yin C, Zhang Q, Zhao J, et al. Necrostatin-1 against sevoflurane-induced cognitive dysfunction involves activation of BDNF/TrkB pathway and inhibition of necroptosis in aged rats. *Neurochem Res*, 2022, 47(4): 1060-1072.
 [6] Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior. *Methods Mol Biol*, 2019, 1916: 99-103.
 [7] Lissner LJ, Wartchow KM, Toniazzo AP, et al. Object recognition and Morris water maze to detect cognitive impairment from mild hippocampal damage in rats: a reflection based on the literature and experience. *Pharmacol Biochem Behav*, 2021, 210: 173273.
 [8] Yuan J, Amin P, Ofengeim D. Necroptosis and RIPK1-mediated neuroinflammation in CNS diseases. *Nat Rev Neurosci*, 2019, 20(1): 19-33.
 [9] Chen S, Lv X, Hu B, et al. RIPK1/RIPK3/MLKL-mediated necroptosis contributes to compression-induced rat nucleus pulposus cells death. *Apoptosis*, 2017, 22(5): 626-638.
 [10] Jinawong K, Apaijai N, Wongsuchai S, et al. Necrostatin-1 mitigates cognitive dysfunction in prediabetic rats with No alteration in insulin sensitivity. *Diabetes*, 2020, 69(7): 1411-1423.
 [11] 王楠楠, 梁映霞, 张蕊, 等. 细胞程序性坏死抑制剂 Nec-1 可减轻神经病理性痛大鼠的痛觉过敏. *临床麻醉学杂志*, 2019, 35(7): 697-700.

(收稿日期:2022-04-26)