doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2020.03.036

❖论著❖

右美托咪定预防大鼠全麻后认知功能障碍机制的探讨

刘东亚[1],李海英[2],韩快娟[2],崔艳田[1]
(1.汉中市人民医院麻醉科,陕西 汉中 723000;2.西安高新医院麻醉科,陕西 西安 710075)

【摘要】**目的**:研究右美托咪定对大鼠全麻后认知功能障碍的预防作用,并探讨其可能的作用机制。**方法**:将 60 只 SPF 级大鼠随机分为空白对照组、认知功能障碍模型组、右美托咪定预防 1 组(25 μg/kg)、右美托咪定预防 2 组(50 μg/kg),每组各 15 只。其中模型组和两预防组采用异氟醚诱导构建大鼠认知功能障碍模型。采用 Morris 水迷宫定向航行测试和空间探索测试评价大鼠的学习和记忆功能;采用黄嘌呤氧化酶法和硫代巴比妥酸法测定大鼠脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)的水平变化;通过 RT-PCR 法检测海马组织 TNF-α、IL-6 基因水平的表达;应用免疫印迹 Western blot 检测 CREB、pCREB 蛋白表达水平变化。**结果**:水迷宫测试表明右美托咪定可缩短大鼠逃避潜伏期时间及游泳距离,提高穿越平台次数;SOD 及 MDA 检测结果表明,右美托咪定对提高脑组织中 SOD 水平、降低 MDA 水平有促进作用;RT-PCR 及 Western Blot 分析表明,模型建立后,TNF-α、IL-6 表达升高,CREB、pCREB 表达降低;右美托咪定提前给药预防后,可下调 TNF-α、IL-6 水平及上调 CREB、pCREB 水平,与模型组相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论**:右美托咪定可通过缓解氧化应激、抑制炎症因子的表达和上调记忆蛋白水平等多个途径,达到预防异氟醚诱导的大鼠认知功能障碍的目的。

【关键词】右美托咪定;氧化应激;炎性反应;记忆蛋白;认知功能障碍
【中图分类号】R575.1 【文献标志码】A

Study of the preventive mechanism of dexmedetomidine on cognitive dysfunction after general anesthesia in rats

LIU Dong-ya[1], LI Hai-ying[2], HAN Kuai-juan[2], CUI Yan-tian[1]
(*Department of Anesthesiology*, 1. *Hanzhong People's Hospital*, *Hanzhong* 723000; 2. *Xi'an Gaoxin Hospital*, *Xi'an* 710075, *Shaanxi*, *China*)

【**Abstract**】**Objective**: To investigate the preventive effect of dexmedetomidine on cognitive dysfunction after general anesthesia in rats and its possible mechanism. **Methods**: 60 SPF rats were randomly divided into the blank control group, the cognitive dysfunction model group, the dexmedetomidine prevention group 1 (25ug/kg), and the dexmedetomidine prevention group 2 (50ug/kg), 15 cases in each group. The model group and the two prevention groups were induced to construct rat models of cognitive dysfunction. Morris water maze oriented navigation test and space exploration test were used to evaluate the learning and memory function of rats. The activity of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in brain tissues of rats was determined by xanthine oxidase method and thiobarbital acid method. The expression of TNF-α and IL-6 gene in hippocampus was detected by RT-PCR. Western blot was used to detect the expression levels of CREB and pCREB. **Results**: The water maze test showed that dexmedetomidine could shorten the escape latency time and swimming distance of the rats, and increase the number of crossing the platform. The results of SOD and MDA tests showed that dexmedetomidine could promote the level of SOD and decrease the level of MDA in brain tissue. RT-PCR and Western Blot analysis showed that the expression of TNF-α and IL-6 increased, but the expression of CREB and pCREB decreased after the establishment of the model. After dexmedetomidine was given in advance for prevention, the levels of TNF-α and IL-6 were down-regulated and the levels of CREB and pCREB were up-regulated, which had statistically significant differences when compared with the results of the model group ($P<0.05$). **Conclusion**: Dexmedetomidine can prevent the cognitive dysfunction induced by isoflurane in rats through relieving oxidative stress, inhibiting the expression of inflammatory factors and up-regulating the level of memory proteins.

【**Key words**】Dexmedetomidine; Oxidative stress; Inflammatory response; Memory proteins; Cognitive dysfunction

手术过程中麻醉剂的使用可大大减轻患者的生理痛苦,但是大量研究表明,围术期患者全麻后由于脑功能的损害在一定程度上会发生术后认知功能障碍,影响患者生活质量[1-2]。异氟醚作为临床全身麻醉中应用最广泛的药物之一,有一定的神经毒性,可诱导脑神经细胞凋亡、神经发育阻滞,并造成一定

作者简介:刘东亚(1985-),男,主治医生。E-mail:mazui125_11@163.com
通讯作者:崔艳田。E-mail:mazui125@163.com

程度的学习记忆功能障碍[3-4]。如何降低围术期因麻醉药物使用而导致的认知功能障碍已经成为当前的研究热点[5]。右美托咪定(Dexmedetomidine, Dex)是一种高选择性的 α_2 肾上腺素受体激动药,起效快,作用时间短,有镇静、镇痛等作用,可以通过激活 a_2 受体、减少自由基和抑制兴奋性氨基酸的释放来保护组织细胞[6]。右美托咪定在手术中用作麻醉佐剂,具有良好的围手术期血流动力学稳定性和术中麻醉效果,且对于心脏、肝脏、大脑和肾脏等多个器官的缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)具有公认的保护作用,可通过抑制缺氧损伤后 NF-kB 和 ICAM-1 的表达,来抑制氧化应激和炎症反应,同时对全麻后认知功能障碍有一定的改善作用,但是其作用机制并不明确[7]。基于此,本研究针对右美托咪定对异氟醚诱导的认知功能障碍的预防作用及其可能机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年 SPF 级 Wistar 大鼠,体重 250~300 g,雌雄各半,购自于北京维通利华有限责任公司。自由饮食,自然光照射。

1.2 方法

1.2.1 异氟醚诱导大鼠认知功能障碍模型的建立及实验分组 采用异氟醚诱导法构建大鼠认知功能障碍模型。将 60 只 SD 大鼠随机分为空白对照组、异氟醚诱导模型组、右美托咪定预防 1 组(低剂量,25 μg/kg)、右美托咪定预防 2 组(高剂量,50 μg/kg),每组 15 只。对照组不给予任何处理,于正常环境中培养;右美托咪定预防组于建模开始前半小时给予预定剂量的右美托咪定腹腔注射;随后预防组和异氟醚诱导模型组均置于有机玻璃麻醉箱内,调整氧浓度为 30%,异氟醚浓度为 2.4%, 暴露 2 h,构建大鼠认知功能障碍模型。

1.2.2 水迷宫实验 以 Morris 水迷宫定向航行测试(PNT)和空间探索测试(SPT)为标准,评价各组大鼠学习和记忆能力。定位航行测试:训练连续进行 5 d,每天进行 4 轮训练(每个入水点各一次),每次 2 min,训练间隔 >30 min,记录大鼠在水迷宫内寻找平台的时间。将大鼠面向池壁分别于 4 个入水点放入水中,记录大鼠从入水到找到平台并站立其上的时间(逃避潜伏期,s)和在此期间的游泳活动轨迹(即游泳距离)。统计并计算平均成绩。空间探索测试:定位导航测试结束后,休息一晚测试大鼠的空间位置记忆能力。去除水下平台,选择距离平台最远的入水点将大鼠放入水池中,记录其在 120 s 内跨过原平台所在位置的次数。

1.2.3 大鼠脑组织超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平测定 断头处死大鼠并取出脑组织后,冰水浴操作制作脑组织匀浆液(浓度为 10%),离心取上清液。严格按照试剂盒说明,分别采用黄嘌呤氧化酶法和硫代巴比妥酸法测定各组大鼠脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)的水平。每组重复检测 3 次。

1.2.4 RT-PCR 法检测右美托咪定对异氟醚诱导的认知功能障碍大鼠 TNF-α、IL-6 基因表达的影响 采用聚合酶链式反应(RT-PCR)方法检测 TNF-α、IL-6 水平。PCR 扩增条件为:94 ℃预变性 2.5 min,93 ℃变性 30 s,60 ℃退火 25 s,70 ℃延伸 30 s,循环 35 次,最后 71 ℃延伸 60 s。取 10 μL 扩增产物和 6 μL的 Maker 同时上样,于 3.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离(120 V,40 min),银染色,紫外凝胶成像系统分析扩增结果并拍照。TNF-α、IL-6 以及 GAPDH 引物设计见表 1。

表 1 PCR 过程中引物序列设计

引物名称	前引	后引	长度(bp)
TNF-α	5′-GGAAGAGCTTCGACCAGCTG-3′	5′-GAGCCTTGTTAGTTTACAG-3′	132
IL-6	5′-AACCGAGCTTAGGCCAGCTG-3′	5′-AAGCCTTGACGCGTTTACAG-3′	128
GAPDH	5′-CAGCATTGGAAGTGCTATGG-3′	5′-TAGAGCGAGTATGCATGACA-3′	138

1.2.5 Western blot 分析 CREB、pCREB 蛋白表达水平变化 蛋白电泳后转 PVDF 膜后分别加入稀释后的蛋白抗体(1 抗体)。4 ℃过夜后洗涤 4 次×5 min,加入 HRP 标记的 2 抗体,37 ℃孵育 2 h,洗涤 4 次×5 min。阴性对照组第一抗体为 GAPDH,第二抗体为 HRP 标记的 IgG。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计分析软件进行处理,计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

麻醉过程中每隔 30 min 观察大鼠呼吸幅度:大鼠可自主呼吸,呼吸及心率均减慢,无缺氧及二氧化碳蓄积、无大鼠死亡情况出现。麻醉后各组大鼠均可自由进食,行动灵活,证明大鼠异氟醚诱导认知功能障碍模型建立成功。

2.2 右美托咪定对异氟醚诱导的认知功能障碍大鼠学习及记忆能力的影响

与对照组相比,模型组大鼠逃避潜伏期延长,游

泳距离增加,穿越平台次数降低,差异有统计学意义($P<0.05$);右美托咪定预防后,大鼠逃避潜伏期时间及游泳距离缩短,穿越平台次数有所增加,与模型组相比差异有统计学意义($P<0.05$);随着预防给药量的增加,大鼠学习及记忆能力改善更为明显($P<0.05$)。见表2。

表2　右美托咪定对异氟醚诱导的认知功能障碍大鼠学习及记忆能力的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	逃避潜伏期(s)	游泳距离(cm)	穿越平台次数(次)
对照组($n=15$)	8.8±2.0	107.0±8.7	6±1
模型组($n=15$)	19.4±3.2*	259.1±21.7*	1±0*
预防1组($n=15$)	14.6±2.1*#	170.2±17.5*#	3±0*#
预防2组($n=15$)	10.0±1.2*#△	122.1±16.1*#△	5±1*#△

*$P<0.05$,与对照组相比;#$P<0.05$,与模型组相比;△$P<0.05$,与预防1组相比。

2.3　右美托咪定对异氟醚诱导的认知功能障碍大鼠脑组织MDA及SOD水平的影响

与对照组相比,模型组大鼠脑组织中MDA水平升高,SOD水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。右美托咪定预防后,预防组脑组织中MDA水平降低,SOD水平升高,随着预防注射量的增加,MDA与SOD水平变化更为明显,与模型组相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

表3　右美托咪定对异氟醚诱导的认知功能障碍大鼠MDA及SOD活性的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	MDA(nmol/mgprot)	SOD(U/mgprot)
对照组($n=15$)	3.25±0.71	120.26±4.79
模型组($n=15$)	8.49±1.48*	72.27±6.48*
预防1组($n=15$)	5.26±1.42*#	87.87±4.23*#
预防2组($n=15$)	4.37±1.20*#△	106.52±6.41*#△

*$P<0.05$,与对照组相比;#$P<0.05$,与模型组相比;△$P<0.05$,与预防1组相比。

2.4　右美托咪定对异氟醚诱导的认知功能障碍大鼠TNF-α、IL-6基因表达的影响

与对照组相比,模型组大鼠TNF-α、IL-6表达水平升高,差异有统计学意义($P<0.05$);预防组与模型组相比,TNF-α、IL-6表达均降低,预防2组低于预防1组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表4。

表4　RT-PCR检测TNF-α、IL-6基因表达情况($\bar{x}\pm s$)

组别	TNF-α(灰度值)	IL-6(灰度值)
对照组($n=15$)	1.06±0.06	1.05±0.12
模型组($n=15$)	3.24±0.40*	3.74±0.32*
预防1组($n=15$)	2.36±0.41*#	2.59±0.52*#
预防2组($n=15$)	1.87±0.11*#△	1.74±0.20*#△

*$P<0.05$,与对照组相比;#$P<0.05$,与模型组相比;△$P<0.05$,与预防1组相比。

2.5　右美托咪定对异氟醚诱导的认知功能障碍大鼠CREB、pCREB蛋白表达水平的影响

与对照组相比,模型组大鼠记忆蛋白CREB、pCREB表达水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。预防组与模型组相比,CREB、pCREB表达均上调,且预防2组高于预防1组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表5、图1。

表5　右美托咪定对异氟醚诱导的认知功能障碍大鼠CREB、pCREB表达水平影响($\bar{x}\pm s$)

组别	CREB	pCREB
对照组($n=15$)	4.23±0.21	4.79±0.52
模型组($n=15$)	1.06±0.06*	1.10±0.08*
预防1组($n=15$)	1.98±0.27*#	1.95±0.23*#
预防2组($n=15$)	2.74±0.70*#△	2.95±0.72*#△

*$P<0.05$,与对照组相比;#$P<0.05$,与模型组相比;△$P<0.05$,与预防1组相比。

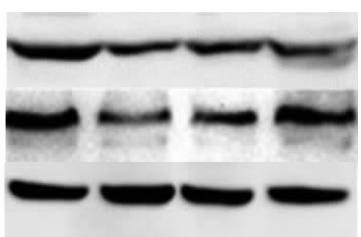

图1　右美托咪定对异氟醚诱导的认知功能障碍大鼠CREB、pCREB表达水平

3　讨论

术后认知功能障碍(POCD)与功能恢复不良、住院时间延长、住院费用、长期康复需求和死亡率相关,有效地预防患者发生POCD是非常重要的。预防POCD影响的一种方法是识别和避免其危险因素,目前推测氧化应激、炎性反应和记忆蛋白变性是全麻后认知功能障碍的重要诱因。麻醉剂可引起海马神经细胞广泛变性,破坏海马多突触网络,导致神经突触连接减少,引起认知功能障碍[8-9]。研究[10]表明,右美托咪定可通过抑制炎症反应在一定程度上改善患者全身麻醉后认知功能障碍,但是其作用机制并不清楚。

SOD是一种重要的氧自由基清除剂,其活性强弱可作为衡量清除基体氧自由基能力的关键指标;MDA是脂质过氧化反应过程中产生的有生物毒性的中间产物,其水平高低可用来衡量机体氧化应激反应的程度[11]。TNF-α是肿瘤坏死因子家族中的一员,作为一种重要的促炎细胞因子,在认知功能障

碍的激发过程中发挥着重要作用[12-13]。IL-6为B细胞刺激因子,对细胞的生长和分化有一定的调节作用,是重要的促炎细胞因子[14-15]。cAMP反应元件结合蛋白(CREB)及其磷酸化蛋白质(pCREB)作为最重要的记忆蛋白,是海马发挥学习记忆功能的重要分子基础[16],参与认知功能障碍的发生发展的全过程。但目前右美托咪定对全麻后认知功能障碍的作用机制仍不明确,这对于其临床药物应用及药效的发挥有很大的限制。鉴于此,本研究在对大鼠进行右美托咪定给药后,采用异氟醚麻醉诱导构建大鼠认知功能障碍模型。大鼠一般状况表明,异氟醚诱导的大鼠认知障碍模型构建成功,右美托咪定对大鼠认知功能障碍有一定的预防作用;Morris水迷宫测试表明,异氟醚诱导组大鼠逃避潜伏期延长,游泳距离增加,穿越平台次数降低;右美托咪定提前给药干预后,大鼠逃避潜伏期时间及游泳距离缩短,穿越平台次数有所增加,即右美托咪定对大鼠学习及记忆能力有一定的改善作用。为了进一步探究右美托咪定对预防异氟醚诱导的大鼠认知功能障碍的可能机制,本研究测定了预防给药前后脑组织中氧化应激指标SOD和MDA水平变化,并采用RT-PCR及Western Blot法检测TNF-α、IL-6、CREB、pCREB表达水平的变化。SOD和MDA检测结果显示,右美托咪定可提高脑组织中SOD水平,降低MDA水平,即通过有效清除过量氧自由基,降低氧化应激反应,达到保护脑组织的目的。RT-PCR及Western Blot分析表明,模型组建立后,TNF-α、IL-6的表达升高,CREB、pCREB的表达下降;右美托咪定提前干预后,抑制TNF-α、IL-6的表达,上调了CREB、pCREB的表达。结果提示,右美托咪定可通过缓解氧化应激、抑制炎症因子的表达和上调记忆蛋白水平等多个途径,达到改善异氟醚诱导的大鼠认知功能障碍的目的。

综上所述,右美托咪定对大鼠认知功能障碍有一定的预防作用,其作用机制可能与降低氧化应激反应、抑制炎症因子表达及提高记忆蛋白水平有关。这对认知功能障碍的预防有十分重要的意义,同时也为右美托咪定作为脑神经元保健药物的临床应用提供了一定的数据和理论支持。但是其具体的作用机制尚不清楚,还需要进一步的深入研究。

参考文献

[1] 孙海燕,纪金芬,钱敏. BIS指导下针刺联合全麻对老年胃癌根治术患者术后早期认知功能的影响[J]. 临床麻醉学杂志,2018,34(6):599-601.

[2] 高文蔚,陈榕,刘恋,等. 右美托咪定对老年患者全麻术后认知功能障碍的Meta分析[J]. 海南医学,2016,27(14):2379-2381.

[3] Erasso DM, Camporesi EM, Mangar D, *et al*. Effects of isoflurane or propofol on postnatal hippocampal neurogenesis in young and aged rats[J]. Brain Res,2013,1530(9):1-12.

[4] Li SY, Xia LX, Zhao YL, *et al*. Minocycline mitigates isoflurane-induced cognitive impairment in aged rats[J]. Brain Res, 2013, 1496(2):84-93.

[5] Xia T, Cui Y, Chu S, *et al*. Melatonin pretreatment prevents isoflurane-induced cognitive dysfunction by modulating sleep-wake rhythm in mice[J]. Brain Res,2016,1634(3):12-20.

[6] 王勇,蒋玲玲,程洁,等. 右美托咪定对腹腔镜全子宫切除术患者氧化应激反应的影响[J]. 安徽医药,2015,19(6):1171-1174.

[7] 张玉辉,高亚坤,肖连波,等. 右美托咪啶对体外循环下心脏瓣膜置换术患者心肌缺血再灌注损伤的影响[J]. 临床心血管病杂志,2015,31(11):1195-1197.

[8] Kuo MC, Leung LS. Disruption of Hippocampal Multisynaptic Networks by General Anesthetics | Anesthesiology | ASA Publications[J]. Anesthesiology,2017,127(5):838-851.

[9] 李长生. 海马神经元PSD-95 PDZ在幼期异氟醚麻醉致长期认知功能损害中的作用[D]. 郑州:郑州大学,2014.

[10] 翁嫣初,林梅,苏惠斌,等. 右美托咪定对老年患者全身麻醉术后认知功能障碍及炎症反应的影响[J]. 国际麻醉学与复苏杂志,2017,38(2):114-117.

[11] 郭培培,吴会生,严虹,等. 右美托咪定对大鼠全脑缺血再灌注时氧化应激反应的影响[J]. 中华麻醉学杂志,2015,35(3):377-379.

[12] Degaspari S, Tzanno-Martins CB, Fujihara CK, *et al*. Altered KLOTHO and NF-κB-TNF-α Signaling Are Correlated with Nephrectomy-Induced Cognitive Impairment in Rats[J]. Plos One, 2015,10(5): 223-231.

[13] Li L, Xu S, Liu L, *et al*. Multifunctional Compound AD-35 Improves Cognitive Impairment and Attenuates the Production of TNF-α and IL-1β in an Aβ25-35-induced Rat Model of Alzheimer's Disease[J]. J Alzheimers Dis,2017,56(4):1403-1417.

[14] Saiki P, Nakajima Y, Van Griensven LJLD, *et al*. Real-time monitoring of IL-6 and IL-10 reporter expression for anti-inflammation activity in live RAW 264.7 cells[J]. Bio Biophysic ResCommunica,2018,505(3): 885-890.

[15] Wang J, Yan X, Nesengani LT, *et al*. LPS-induces IL-6 and IL-8 gene expression in bovine endometrial cells "through DNA methylation"[J]. Gene,2018,677(11):266-272.

[16] 王坤,张玉莲,周震,等. 齐墩果酸对快速老化小鼠学习记忆能力突触形态及环磷腺苷效应元件结合蛋白表达的影响[J]. 中华行为医学与脑科学杂志,2015,24(6):493-496.

(收稿日期:2020-01-11 学术编辑:杨小霖)