

文章编号 1006-8147(2020)05-0418-04

论著

$\alpha 7$ nAChR-HDAC6 通路在右美托咪啶降低幼鼠七氟烷神经毒性中的作用

朱敏,于洪丽,孙英,杜洪印,喻文立

(南开大学附属天津市第一中心医院麻醉科,天津 300192)

摘要 目的:探讨 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体($\alpha 7$ nAChR)-组蛋白去乙酰化酶 6(Histone deacetylase 6, HDAC6)通路在右美托咪啶降低幼鼠七氟烷神经毒性的作用。方法:7 d 龄 Sprague-Dawley(SD)大鼠随机分为 5 组($n=40$):空白对照组(C 组),七氟烷麻醉组(S 组),右美托咪啶对照组(D 组),七氟烷+右美托咪啶组(SD 组),七氟烷+右美托咪啶+抑制剂 MLA 组(M 组)。将幼鼠置于 3% 七氟烷培养箱 2 h,连续 3 d 构建七氟烷模型。ELISA 法检测幼鼠脑组织促炎因子(TNF- α 、IL1 β 和 IL-6)和脑损伤标志物(S-100 β 和 NSE);尼式染色检测海马神经元 CA1 区存活情况;Western 印迹检测海马 $\alpha 7$ nAChR 和 HDAC6 蛋白表达;Y 迷宫实验检测幼鼠认知水平。结果:S 组幼鼠 TNF- α 、IL1 β 、IL-6 和 S-100 β 、NSE 表达增加, $\alpha 7$ nAChR 降低,HDAC6 增加,海马 CA1 区神经元存活降低,认知功能下降;右美托咪啶预处理降低七氟烷毒性;MLA 可逆转右美托咪啶保护作用。结论:右美托咪啶降低七氟烷麻醉幼鼠神经毒性,其机制与 $\alpha 7$ nAChR-HDAC6 通路有关。

关键词 右美托咪啶;七氟烷; $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体;组蛋白去乙酰化酶 6

中图分类号 R614

文献标志码 A

Dexmedetomidine ameliorates sevoflurane-induced neurotoxicity in neonatal mice via the pathway of $\alpha 7$ nAChR-HDAC6

ZHU Min, YU Hong-li, SUN Ying, DU Hong-yin, YU Wen-li

(Department of Anesthesiology, Tianjin First Central Hospital Affiliated to Nankai University, Tianjin, 300192, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effect of dexmedetomidine on sevoflurane-induced neurotoxicity in neonatal mice via the pathway of $\alpha 7$ nAChR-HDAC6. **Methods:** Postnatal day 7 Sprague-Dawley (male) rats were randomly divided into 5 groups ($n=40$): blank control group (Group C), sevoflurane anesthesia group (Group S), right metoclopramide control group (Group D), sevoflurane and right metoclopramide group (Group SD), sevoflurane and right metoclopramide with inhibitor MLA group (group M). Neonatal mice were exposed to 3% sevoflurane 2 hours for 3 days with or without 25 μ g/kg dexmedetomidine intraperitoneal injection. The inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-18 and IL-10) and brain injury factors (S-100 β and NSE) were determined by ELISA. Nissl staining was performed to survey the number of survival neurons in hippocampal CA1 area. The expression of $\alpha 7$ nAChR and HDAC6 protein was analyzed by Western blot. The cognitive behavioral data of rats were collected at P41 (the beginning of the adult stage) using Y-maze experiment. **Results:** There were statistically increased of TNF- α , IL1 β , IL-6, S-100 β , NSE, and HDAC6 protein expression, decreased of the number of surviving neurons in hippocampal CA1 area, expression of $\alpha 7$ nAChR and cognitive function in group S ($P<0.05$). Dexmedetomidine provided the neuroprotectives from sevoflurane injury. Moreover, the inhibitor MLA significantly eliminated the protective effect of dexmedetomidine on sevoflurane injury. **Conclusion:** Dexmedetomidine provide neuroprotection in a rat model of sevoflurane-induced neurotoxicity, which is related to $\alpha 7$ nAChR-HDAC6 signaling pathway.

Key words dexmedetomidine; sevoflurane; $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor; histone deacetylase 6

婴幼儿接受麻醉,特别是生长发育爆发期(3个月~2岁),神经系统容易遭到外界刺激伤害,导致成年后相关神经系统并发症^[1-2]。研究发现,新生大鼠七氟烷暴露可导致幼鼠前额叶皮层 NMDA 受体

亚基组成发生变化,引起神经元退行性变以及成年后学习记忆受损^[3]。右美托咪啶作为特异性更强的 α_2 受体激动剂,具有独特镇静、镇痛及“交感切除”特点,广泛应用临床^[4]。Dahmani 等^[5]发现,右美托咪啶减少神经元死亡及凋亡效应器 caspase-3 表达,可能与激活 α_2 受体,促进灶性黏附激酶表达相关。课题前期发现右美托咪啶能够降低七氟烷麻醉小儿术后谵妄发生率及术后恶心、呕吐,但具体机制并未清楚。Wang 等^[7]发现幼鼠七氟烷暴露导致血清中

基金项目 天津市自然科学基金面上项目(18JCYBJC27500、17JCY-BJC28000);天津市临床重点学科(麻醉学科)建设项目;天津市卫生计生委科技攻关项目(16KG101);天津市麻醉学会恩华基金项目(2017)作者简介 朱敏(1987-),男,住院医师,硕士,研究方向:脑保护;通信作者:喻文立,E-mail:yzxyuwenli@163.com。

炎症因子表达显著增加^[6]。α7 烟碱型乙酰胆碱受体(α7nicotinic acetylcholine receptor, α7nAChR)为基础的“胆碱能抗炎通路”可作用于免疫细胞,抑制炎症因子释放;Hui 等^[8]发现右美托咪啶预处理能够增加神经迷走系统活性,而切断迷走神经以及应用 α7nAChR 受体拮抗剂可降低右美托咪啶抑制炎症反应。因此本研究旨在探讨 α7nAChR 相关胆碱能通路在右美托咪啶降低小儿七氟烷暴露神经损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 7 d 龄 Sprague-Dawley (SD) 幼鼠(中国人民解放军军事医学科学院提供),采取随机数字表法分为 5 组($n=40$):空白对照组(C 组),七氟烷麻醉组(S 组),右美托咪啶对照组(D 组),七氟烷+右美托咪啶组(SD 组),七氟烷+右美托咪啶+抑制剂 MLA 组(M 组)。

1.2 动物模型的构建 将幼鼠置于 3%七氟烷,以 100%氧气为载体,气体流量 4 L/min 的培养箱 2 h,连续 3 d 构建七氟烷模型。C 组幼鼠置入培养箱前腹腔注射等体积生理盐水;D 组、SD 组和 M 组腹腔注射 25 μg/kg 右美托咪啶;M 组提前 30 min 注射 3 mg/kg MLA,其余同前。麻醉过程中采用气体监测仪(Drager, Lubeck, Germany)检测麻醉箱内氧气、二氧化碳、以及七氟烷浓度。

1.3 ELISA 法检测促炎因子和脑损伤标志物 灌注后断头取脑加入生理盐水,4℃匀浆离心,收取上清液,采用 ELISA 试剂盒检测脑组织促炎因子 TNF-α、IL1β 和 IL-6,脑损伤标志物 S-100β 和 NSE 水平。具体实验步骤参见说明书,最后计算出相应因子浓度。

1.4 尼式染色检测神经元存活情况 灌注后断头取脑,制备海马区冠状石蜡切片,厚度约 10 μm,加温脱蜡后无水乙醇浸泡,滴加尼式染色液,蒸馏水洗涤后脱水封片。采用 BX-51 光学显微镜观察并照相,随机选取 CA1 区连续不重叠视野,Image Pro Plus 6.0 图像分析软件对神经元计数,取 5 个视野的

平均值做统计分析。

1.5 Western 印迹法检测 α7nAChR 和 HDAC6 蛋白表达 断头取脑,游离幼鼠海马组织,预冷组织蛋白裂解液匀浆,4℃ 12 000 r/min 离心 10 min,取上清为组织蛋白。成功提取蛋白进行定量检测,将等量蛋白煮沸变性,经转膜封闭洗涤等步骤后分别加入一抗 α7nAChR 和 HDAC6 抗体和 β-actin 抗体,4℃过夜清洗,二抗室温孵育,曝光,扫描,采用 Gene Tools 图像分析软件测定条带灰度值,以目的条带灰度值与 β-actin 灰度值反映目的蛋白的表达情况。

1.6 Y 迷宫实验检测幼鼠认知水平 41 d 幼鼠进行 Y 迷宫实验,Y 迷宫随机分为起始臂(S 臂),新异臂(N 臂)和其他臂(O 臂),N 臂内壁贴上不同图形以作区别。采用 Any-maze 视频软件追踪分析系统,记录此时间段内大鼠在各臂的穿梭次数和停留时间,计算大鼠在 N 臂停留时间的比例,评价幼鼠空间识别记忆能力。

1.7 统计学分析 采用 SPSS20.0 统计软件包进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 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。

2 结果

2.1 各组促炎因子和脑损伤因子表达水平 与 C 组相比,S 组、SD 组和 M 组脑组织促炎因子 TNF-α、IL1β、IL-6 和脑损伤因子 S-100β、NSE 表达明显增加(均 $P < 0.05$);与 S 组相比,SD 组和 M 组相关因子表达降低(均 $P < 0.05$);与 SD 组相比,M 组相关指标增加(均 $P < 0.05$),见表 1。

2.2 各组幼鼠海马 CA1 区神经元存活情况 与 C 组相比,S 组、SD 组和 M 组幼鼠海马 CA1 区神经元排列稀疏,存活神经元数目明显降低,差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$);与 S 组相比,SD 组和 M 组幼鼠海马 CA1 区神经元排列稀疏程度改善,存活神经元数目明显增加(均 $P < 0.05$);与 SD 组相比,M 组幼鼠海马 CA1 区神经元排列稀疏程度降低,存活神经元数目明显降低($P < 0.05$),见图 1 和表 2。

表 1 各组幼鼠炎症因子和脑损伤因子表达情况统计($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Expression of inflammatory cytokines and brain injury factors in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	TNF-α(pg/mL)	IL-6(pg/mL)	IL-1β(pg/mL)	S-100β(ng/L)	NSE(ng/L)
C 组	113.5±4.8	21.8±3.5	35.0±2.5	1.06±0.25	12.25±1.15
S 组	152.4±3.5*	59.2±4.8*	63.0±3.1*	2.54±0.32*	25.32±1.26*
SD 组	138.2±4.7**	46.5±4.2**	46.0±3.5**	1.86±0.31**	18.26±1.48**
D 组	112.6±5.4	22.1±3.7	35.0±1.8	1.05±0.18	12.35±1.37
M 组	146.5±4.6** ^Δ	53.7±5.1** ^Δ	54.0±2.6** ^Δ	2.24±0.23** ^Δ	22.26±1.35** ^Δ

注:C 组:空白对照组;S 组:七氟烷麻醉组;SD 组:七氟烷+右美托咪啶组;D 组:右美托咪啶对照组;M 组:七氟烷+右美托咪啶+抑制剂 MLA 组;与 C 组相比,* $P < 0.05$;与 S 组相比,** $P < 0.05$;与 SD 组相比,^Δ $P < 0.05$

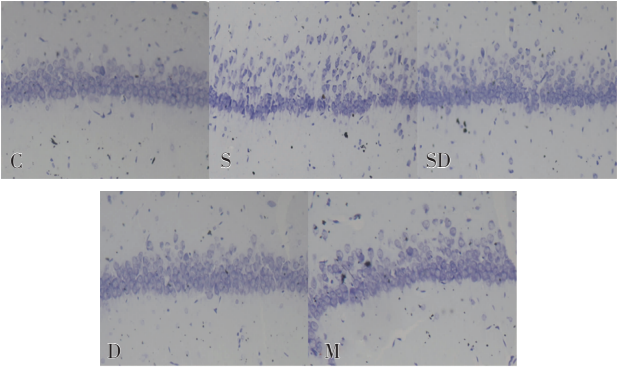


图 1 各组幼鼠海马 CA1 区神经元尼氏染色镜下存活情况(400×)
Fig 1 Survival neurons in hippocampal CA1 area with Nissl staining of each group (400×)

表 2 各组幼鼠海马 CA1 区神经元存活情况比较($\bar{x}\pm s$)
Tab 2 Comparison of survival neurons in hippocampal CA1 area of each group($\bar{x}\pm s$)

组别	数量
C 组	205.0±5.6
S 组	168.0±4.8*
SD 组	182.0±5.7* [#]
D 组	204.0±3.8
M 组	175.0±4.2* ^{##}

注:C 组:空白对照组;S 组:七氟烷麻醉组;SD 组:七氟烷+右美托咪啶组;D 组:右美托咪啶对照组;M 组:七氟烷+右美托咪啶+抑制剂 MLA 组;与 C 组相比,* $P<0.05$;与 S 组相比,[#] $P<0.05$;与 SD 组相比,^{##} $P<0.05$

2.3 各组幼鼠海马组织 $\alpha 7nAChR$ 和 HDAC6 蛋白表达情况比较 与 C 组相比,S 组、SD 组和 M 组幼鼠海马组织 $\alpha 7nACh$ 表达降低,HDAC6 增加(均 $P<0.05$);与 S 组相比,SD 组和 M 组 $\alpha 7nAChR$ 表达增加,HDAC6 减少(均 $P<0.05$);与 SD 组相比,M 组 $\alpha 7nAChR$ 表达降低,HDAC6 增加(均 $P<0.05$),见图 2 和表 3。

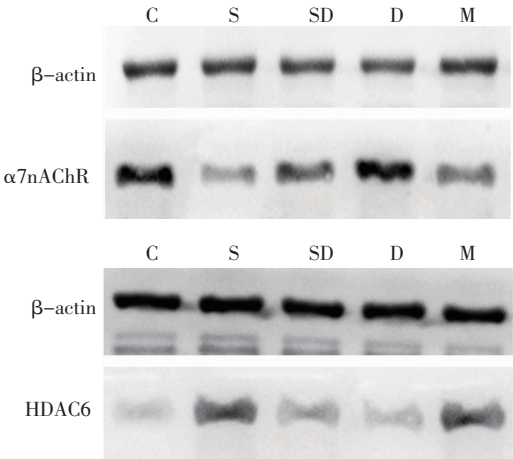


图 2 各组幼鼠海马组织 $\alpha 7nAChR$ 和 HDAC6 蛋白表达
Fig 2 Expression of $\alpha 7nAChR$ and HDAC6 in hippocampus of each group

表 3 各组幼鼠海马组织 $\alpha 7nAChR$ 和 HDAC6 蛋白(% con 组)表达统计($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Expression of $\alpha 7nAChR$ and HDAC6 (% con group) in hippocampus of each group($\bar{x}\pm s$)

组别	$\alpha 7nAChR$ (% con 组)	HDAC6(% con 组)
C 组	100	100
S 组	56.0±5.6*	546.0±12.6*
SD 组	89.0±6.3* [#]	227.0±13.5* [#]
D 组	98.0±1.3	97.0±2.2
M 组	76.0±4.3* ^{##}	384.0±12.8* ^{##}

注:C 组:空白对照组;S 组:七氟烷麻醉组;SD 组:七氟烷+右美托咪啶组;D 组:右美托咪啶对照组;M 组:七氟烷+右美托咪啶+抑制剂 MLA 组;与 C 组相比,* $P<0.05$;与 S 组相比,[#] $P<0.05$;与 SD 组相比,^{##} $P<0.05$

2.4 各组幼鼠新异臂停留时间比较 与 C 组相比,S 组、SD 组和 M 组幼鼠新异臂停留时间比例明显降低,差异具有统计学意义(均 $P<0.05$);与 S 组相比,SD 组和 M 组幼鼠新异臂停留时间比例显著增加(均 $P<0.05$);与 D 组相比,M 组幼鼠新异臂停留时间降低($P<0.05$),见表 4。

表 4 各组幼鼠新异臂停留时间比较($\bar{x}\pm s$)
Tab 4 Comparison of time in N arm(% of 60 s)in each group($\bar{x}\pm s$)

组别	新异臂停留时间(% of 60 s)
C 组	58.4±2.6
S 组	36.5±2.1*
SD 组	47.3±1.8* [#]
D 组	58.5±2.2
M 组	40.3±2.5* ^{##}

注:C 组:空白对照组;S 组:七氟烷麻醉组;SD 组:七氟烷+右美托咪啶组;D 组:右美托咪啶对照组;M 组:七氟烷+右美托咪啶+抑制剂 MLA 组;与 C 组相比,* $P<0.05$;与 S 组相比,[#] $P<0.05$;与 SD 组相比,^{##} $P<0.05$

3 讨论

婴幼儿处于大脑神经网络系统形成的关键时期^[1],特别是处于生长发育爆发期时,更容易遭受外界如手术麻醉等刺激伤害,进而导致成年相关神经系统并发症。Wilder 等^[2]临床研究表明,年龄小于 3 岁、接受多次麻醉暴露或者麻醉时间超过 3 h 的患儿,其在成年后学习能力明显低于正常年龄段小儿。七氟烷因其血气分配系数低,呼吸道刺激弱,便于快速诱导和苏醒,广泛应用于小儿临床麻醉^[10]。研究发现学龄前儿童实施七氟烷麻醉可显著增加术后谵妄的发生率^[11]。动物实验发现七氟烷暴露导致幼鼠神经元细胞发生内质网应激、线粒体功能障碍、神经炎症以及神经突触发生障碍等相关变化,可能导致远期认知障碍,但具体机制并未完全清楚^[12]。因

此,探究幼鼠七氟烷麻醉暴露所致神经损伤及远期认知功能障碍的机制以及保护措施具有重要的意义。

神经炎症在幼鼠七氟烷麻醉暴露所致神经损伤中扮演着重要作用。Wang等^[7]发现幼鼠暴露于4.1%七氟烷6h可激活NF- κ B通路增加血清IL-6和TNF- α 表达。C57出生6d小鼠暴露3%七氟烷2h,连续3d导致其远期认知功能水平下降,其机制与神经炎症性相关^[3]。本研究发现幼鼠七氟烷暴露可导致脑组织促炎因子TNF- α 、IL-1 β 和IL-6和脑损伤因子表达显著增加。研究表明, $\alpha 7$ nAChR介导的胆碱能抗炎通路是神经免疫细胞发挥抗炎作用的重要机制^[4]。右美托咪啶作为特异性 $\alpha 2$ 受体激动剂能够增加迷走神经活性,改善内毒素动物炎性模型愈后。本研究发现七氟烷暴露导致 $\alpha 7$ nAChR表达下降,而右美托咪啶处理可显著增加 $\alpha 7$ nAChR表达,提升迷走神经活性,抑制促炎因子释放,发挥抗炎保护作用。

HDAC6是唯一催化多种胞浆蛋白而非组蛋白的去乙酰化酶,主要表达于神经元胞浆,参与神经系统轴突运输、突触传递、神经炎症等生物学反应^[15]。Akimova等^[16]发现抑制HDAC6表达可增加Foxp3表达及乙酰化水平,促进Treg细胞抑制炎症反应。神经发育期幼鼠多次七氟烷暴露可导致HDAC6表达及活性增加,并介导神经突触限制性发育及影响成年大鼠认知行为能力^[17]。而 $\alpha 7$ nAChR蛋白激活可显著抑制HDAC6表达及生物活性,有效改善神经突触可塑性及认知水平^[18]。本研究结果表明七氟烷暴露可增加幼鼠海马组织HDAC6蛋白表达,而右美托咪啶可以显著降低HDAC6表达;同时 $\alpha 7$ nAChR受体拮抗剂MLA可有效逆转右美托咪啶介导的HDAC6抑制作用,降低抗炎作用。

综上所述,右美托咪啶降低七氟烷麻醉暴露所致胆碱能抑制作用,增加胆碱能受体 $\alpha 7$ nAChR表达,抑制组蛋白去乙酰化酶HDAC6表达,进而抑制七氟烷神经炎症毒性反应及神经发育障碍作用,发挥神经保护。

参考文献:

- [1] Stratmann G. Effect of hypercarbia and isoflurane on brain cell death and neurocognitive dysfunction in 7-day-old rats[J]. *Anesthesiology*, 2009, 110(4):849
- [2] Andropoulos D B, Grerne M F. Anesthesia and developing brains—implications of the FDA warning[J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(10):905
- [3] Zhang X, Shen F, Xu D, et al. A lasting effect of postnatal sevoflurane anesthesia on the composition of NMDA receptor subunits in rat prefrontal cortex[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2016, 54: 62
- [4] Khan Z P, Ferguson C N, Jones R M. Alpha-2 and imidazoline receptor agonists: their pharmacology and herapeutic role[J]. *Anesthesia*, 1999, 54(2): 146
- [5] Dahmani S, Rouelle D, Gressens P, et al. Effects of dexmedetomidine on hippocampal focal adhesion kinase tyrosine phosphorylation in physiologic and ischemia conditions[J]. *Anesthesiology*, 2005, 103(5):969
- [6] Min Z, Wang H Y, Ai Z, et al. Meta-analysis of dexmedetomidine on emergence agitation and recovery profiles in children after sevoflurane anesthesia:different administration and different dosage[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0123728
- [7] Wang Q X, Zhao Y P, Sun M, et al. 2-Deoxy-d-glucose attenuates sevoflurane-induced neuroinflammation through nuclear factor-kappa B pathway *in vitro* [J]. *Toxicol In Vitro*, 2014, 28(7): 1183
- [8] Hui X, Bo H, Li Z F, et al. Dexmedetomidine controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway[J]. *Inflammation*, 2014, 37(5): 1763
- [9] Wilder R T, Flick R P, Sprung J, et al. Early exposure to anesthesia and learning disabilities in a population-based birth cohort[J]. *Anesthesiology*, 2009, 110(4): 796
- [10] Davidson A J, Disma N, De Graaff J C, et al. Neurodevelopmental outcome at 2 years of age general anaesthesia and awake-regional in infancy (GAS):an international multicentre,randomized controlled trial[J]. *Lancet*, 2016, 387(10015): 239
- [11] Cohen I T, Finkel J C, Hannallah R S, et al. Rapid emergence dose not explain agitation following sevoflurane anaesthesia in infants and children: a comparison with propofol[J]. *Paediatr Anaesth*, 2003, 13(1): 63
- [12] Wang X, Dong Y, Zhang Y, et al. Sevoflurane induces cognitive impairment in young mice via autophagy[J]. *PLoS One*, 2019, 14(5): e0216372
- [13] Ji M H, Qiu L L, Yang J J, et al. Pre-administration of curcumin prevents neonatal sevoflurane exposure-induced neurobehavioral abnormalities in mice[J]. *Neurotoxicology*, 2015, 46: 155
- [14] Macpherson A, Zoheir N, Awang R A, et al. The alpha 7 nicotinic receptor agonist PHA-543613 hydrochloride inhibits Porphyromonas gingivalis-induced expression of interleukin-8 by oral keratinocytes[J]. *Inflamm Res*, 2014, 63(7): 557
- [15] Reddy R G, Surineni G, Bhattacharya D, et al. Crafting carbazole-based vorinostst and Tubastatin-A-like histone deacetylase(HDAC) inhibitors with potent *in vitro* and *in vivo* neuroactive functions[J]. *ACS Omega*, 2019, 4(17): 17279
- [16] Akimova T, Ge G, Golovina T, et al. Histone/protein deacetylase inhibitors increase suppressive functions of human FOXP3 Tregs[J]. *Clin Immunol*, 2010, 136(3):348
- [17] Li G, Du J, Wang L, et al. Developmental neurotoxicity in the context of multiple sevoflurane exposures: potential role of histone deacetylase 6[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2019, 74:106813
- [18] ArunSundar M, Shanmuqarajan T S, Ravocjamdoram V, et al. 3,4-Dihydroxyphenylethanol assuages cognitive impulsivity in Alzheimer's disease by attuning HPA-axis via differential crosstalk of $\alpha 7$ nAChR with microRNA-124 and HDAC6[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2018, 9(12): 2904

(2020-03-30 收稿)