DOI:10.16016/j.1000-5404.202011228

右美托咪定对七氟醚麻醉诱导新生大鼠海马内质网应激的影响

白鹏祖,张利亮,张海盛,姚泽宇 810000 西宁,青海红十字医院麻醉科

[摘要] **目的** 探讨右美托咪定(dexmedetomidine,DEX)在七氟醚(sevoflurane, SEVO)诱导新生大鼠海马神经元损伤中的作用机制。**方法** 采用暴露于2.5%七氟醚6 h的40只雄性SD幼鼠(无特定病原体等级,7 d龄,体质量10~15 g)为动物模型,并在暴露前将DEX按5 μg·kg^{-1}的剂量或等量的生理盐水腹膜内注射SEVO暴露组和对照组幼鼠体内。分离大鼠海马组织,采用流式细胞术分析细胞凋亡,免疫荧光染色分析内质网(endoplasmic reticulum,ER)应激标记物(PERK、Caspase-12)的表达,Western blot分析MAPK(ERK、JNK和P38)信号通路表达。**结果** 联合给予SEVO和DEX大鼠的海马细胞凋亡程度比单独暴露SEVO的大鼠降低[(24.27±4.52) *vs* (43.90±10.94),$P<0.05$],并且PERK及Caspase-12表达的升高程度低于仅用SEVO处理的大鼠($P<0.05$)。与对照组相比,单独暴露于SEVO大鼠的p-ERK、p-JNK和p-P38表达均增加($P<0.05$)。联合给予SEVO和DEX大鼠的p-ERK、p-JNK和p-P38表达低于仅用SEVO处理的大鼠($P<0.05$)。**结论** 右美托咪定可能通过抑制MAPK信号通路减轻ER应激,改善七氟醚引起的神经毒性。

[关键词] 右美托咪定;MAPK通路;七氟醚;大鼠;海马;内质网应激
[中图法分类号] R742; R971.2; R971.3 [文献标志码] A

Effect of dexmedetomidine on sevoflurane-induced endoplasmic reticulum stress in hippocampus of neonatal rats

BAI Pengzu, ZHANG Liliang, ZHANG Haisheng, YAO Zeyu Department of Anesthesiology, Qinghai Red Cross Hospital, Xining, Qinghai Province, 810000, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the mechanism of dexmedetomidine (DEX) in sevoflurane (SEVO) induced hippocampal neuron injury in neonatal rats. **Methods** Forty male Sprague-Dawley (SD) rats (7-day-old, 10~15 g) were given i.p. injections of saline or DEX (μg·kg^{-1}), and then exposed for 6 h to 2.5% SEVO. After rat hippocampal tissue was collected and separated, flow cytometry, immunofluorescence staining and Western blotting were used respectively to detect cell apoptosis, expression of endoplasmic reticulum (ER) stress markers PERK and Caspase-12, and expression of MAPK signal pathway-related proteins (ERK, JNK and P38). **Results** The apoptotic rate of hippocampal cells was significantly lower (24.27±4.52 *vs* 43.90±10.94, $P<0.05$), and the expression of PERK and Caspase-12 was also obviously decreased in the rats after co-administration of SEVO and DEX than those exposed to SEVO alone ($P<0.05$). The expression levels of p-ERK, p-JNK and p-P38 were significantly increased in the rats after SEVO exposure than the control rats ($P<0.05$), and the levels were lowest in the rats after co-administration ($P<0.05$). **Conclusion** DEX alleviates ER stress probably by inhibiting the MAPK signaling pathway, and then improves neurotoxicity induced by SEVO.

[基金项目] 青海省自然科学基金项目(2019-ZJ-7085)
[通信作者] 白鹏祖,E-mail:wyjzcc1980@163.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

[**Key words**] dexmedetomidine; MAPK pathway; sevoflurane; rats; hippocampus; endoplasmic reticulum stress

Supported by the Natural Science Foundation of Qinghai Province (2019-ZJ-7085). Corresponding author: BAI Pengzu, E-mail: wyjzcc1980@163.com

研究已证实七氟醚(sevoflurane,SEVO)具有神经毒性,导致发育中的大脑神经元死亡[1]。由于SEVO在儿童麻醉中广泛应用,因此有必要进一步探讨SEVO神经毒性的机制。内质网(endoplasmic reticulum, ER)应激是细胞对内质网蛋白积累的一种适应性反应;然而,一旦ER应激严重或持续,会损害细胞,引起细胞代谢紊乱和凋亡[2]。越来越多的研究表明ER应激在介导SEVO暴露诱导的发育性神经毒性中起着至关重要的作用[3-4]。最近的研究表明,右美托咪定(dexmedetomidine,DEX)减轻脑外伤后ER应激诱导的细胞凋亡以及改善神经元[5-6]。然而,DEX对SEVO神经毒性的影响尚不完全清楚。本研究采用暴露于2.5%七氟醚6 h的7 d龄幼鼠为动物模型,观察暴露前DEX预处理对幼鼠神经元损伤保护作用,并探讨DEX的生物学机制是否与减轻ER应激有关。

1 材料与方法

1.1 动物分组

从北京斯贝福生物技术有限公司[许可证号:SCXK-(京)2016-0002]购买雄性40只SD幼鼠(无特定病原体等级,7 d龄,体质量10~15g),分为SEVO-0+DEX-0组、SEVO-0+DEX-5组、SEVO-2.5+DEX-0组和SEVO-2.5+DEX-5组,每组10只。将幼鼠放在动物重症监护舱(美国SHINOVA公司)中,暴露于含有2.5% SEVO(日本Maruishi公司)的30%氧气(平衡N_2)或30%氧气(对照)中持续6 h,监护舱内地板温度保持在37 ℃。在放入监护舱之前(0 h),将DEX(美国Sandoz公司)按5 μg·kg^{-1}的剂量或等量的生理盐水腹膜内注射SEVO暴露组和对照组幼鼠体内,然后立即放入麻醉室。在麻醉暴露6 h后,立即对各组大鼠行开胸手术。

1.2 流式细胞术检测

每组取5只大鼠经心灌流0.9%肝素化生理盐水(1 U·mL^{-1})3 min,然后从颅骨中取出大脑,立即在冰上分离海马组织用于流式细胞术分析和蛋白质提取。用剪刀将海马组织切碎,加入PBS。然后用200目尼龙网过滤样品。此后,将细胞悬浮液在4 ℃下离心5 min,与PBS混合,在300目尼龙网中过滤,并再次离心。最后,获得纯化细胞。采用PE-Texas Red-A/FITC-A凋亡检测试剂盒(美国Sigma公司)检测细胞凋亡。

1.3 Western blot分析

采用RIPA裂解缓冲液(北京Solarbio公司)从海马组织中提取蛋白质。将含有20 μg蛋白质的样品在10%的SDS-PAGE凝胶上分离并转移到PVDF膜上。然后在室温下用含5%脱脂奶粉的TBST缓冲液(150 mmol/L NaCl,20 mmol/L Tris HCl和0.05%吐温20)中封闭2 h,用相应的主要抗体:p-ERK(1∶1 000)、ERK(1∶1 000)、p-JNK(1∶1 000)、JNK(1∶1 000)、p-p38(1∶1 000)、p38(1∶2 000)和GAPDH(1∶5 000,均购自美国Cell Signaling Technology公司)在4 ℃下培养过夜。最后用HRP结合的二级抗体(1∶5 000稀释)孵育2 h,用ECL试剂显影。

1.4 组织学和免疫荧光染色分析

每组取5只大鼠经心灌流0.9%肝素化生理盐水(1 U·mL^{-1})3 min,然后灌流4%多聚甲醛/PBS溶液5 min,并在4 ℃下过夜。从颅骨中取出大脑,放入30%蔗糖中,直到它们沉入溶液中,然后嵌入石蜡中。在CM1950切片机上(德国Leica公司)切下海马的冠状切片(10 mm),HE染色后行组织学观察。为进行免疫荧光染色,将切片在10 mmol/L柠檬酸盐缓冲液(pH=6.0)中高压灭菌5 min(105 ℃)以回收抗原,并在封闭溶液(含5%正常山羊血清和0.2% Triton X-100的PBS)中在室温下孵育1 h,然后将切片与一抗(PERK,1∶100和Caspase-12,1∶100)在4 ℃孵育过夜。在黑暗的房间里,在室温下加入第二抗体(1∶200,美国Invitrogen公司)孵育2 h,将切片用PBS洗涤3次。然后,在黑暗的小室中用3 mg/mL的碘化丙啶对脑切片的细胞核进行染色1 min。使用LSM 510激光共聚焦显微镜(德国Zeiss公司)观察荧光强度。荧光强度测定显示海马CA1区蛋白表达水平。采用平均荧光强度代表蛋白表达水平。

1.5 统计学分析

数据分析是在SPSS18.0统计软件进行。使用Wilk-Shapiro检验对数据进行正态性检验。使用单向方差分析(ANOVA)和Dunnett的事后检验进行组间比较。检验水准$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 DEX 减轻 SEVO 所致大鼠海马神经元损伤

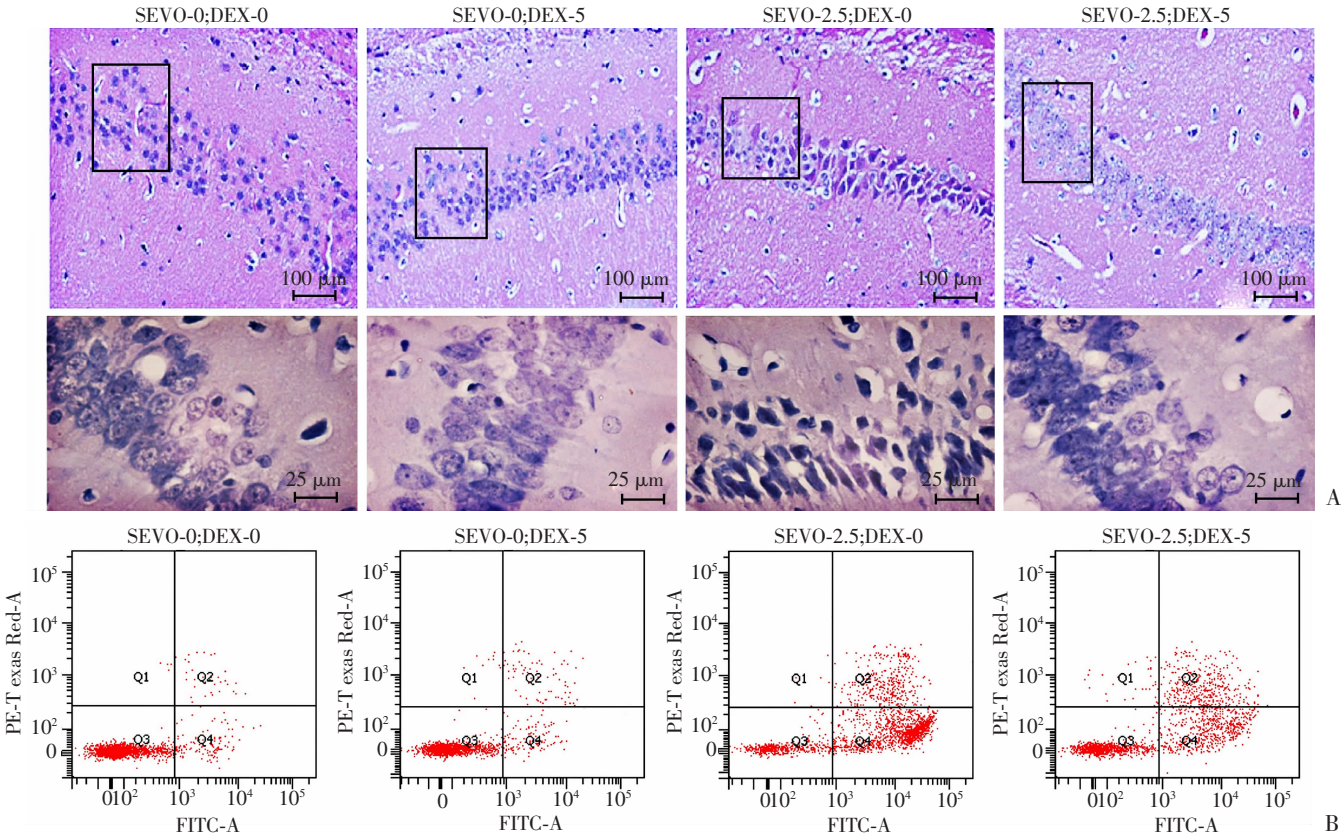
HE 染色结果显示,对照组和仅用 DEX 处理的大鼠海马正常锥体细胞排列紧密,形态规则;单独暴露 SEVO 大鼠的海马锥体细胞排列紊乱和细胞核缩小。联合给予 DEX 可减轻 SEVO 诱导的神经元损伤(图 1A)。流式细胞术分析结果显示,与对照组(6.93±2.18)相比,暴露于 SEVO 的所有大鼠的海马细胞凋亡程度升高。此外,联合给予 SEVO 和 DEX 大鼠的海马细胞凋亡程度比单独暴露 SEVO 的大鼠低[(24.27±4.52) *vs* (43.90±10.94),$P<0.05$]。相比之下,对照组和仅用 DEX 处理的大鼠之间的海马细胞凋亡程度没有差异[(6.93±2.18) *vs* (10.20±2.36),$P>0.05$,图 1B]。

2.2 DEX 减轻 SEVO 暴露增加海马 ER 应激

为了考察暴露于 SEVO 和 DEX 对 ER 应激的影响,我们分析了大鼠海马中 ER 应激标记物的表达(图 2A)。结果显示,与对照组相比,暴露于 SEVO 的所有大鼠的 PERK 及其下游促凋亡蛋白 Caspase-12 表达均升高($P<0.05$),并且联合给予 SEVO 和 DEX 大鼠的 PERK 及 Caspase-12 表达的升高程度低于仅用 SEVO 处理的大鼠($P<0.05$)。相比之下,对照组和仅用 DEX 处理的大鼠之间的 PERK 及 Caspase-12 表达没有差异(图 2B)。

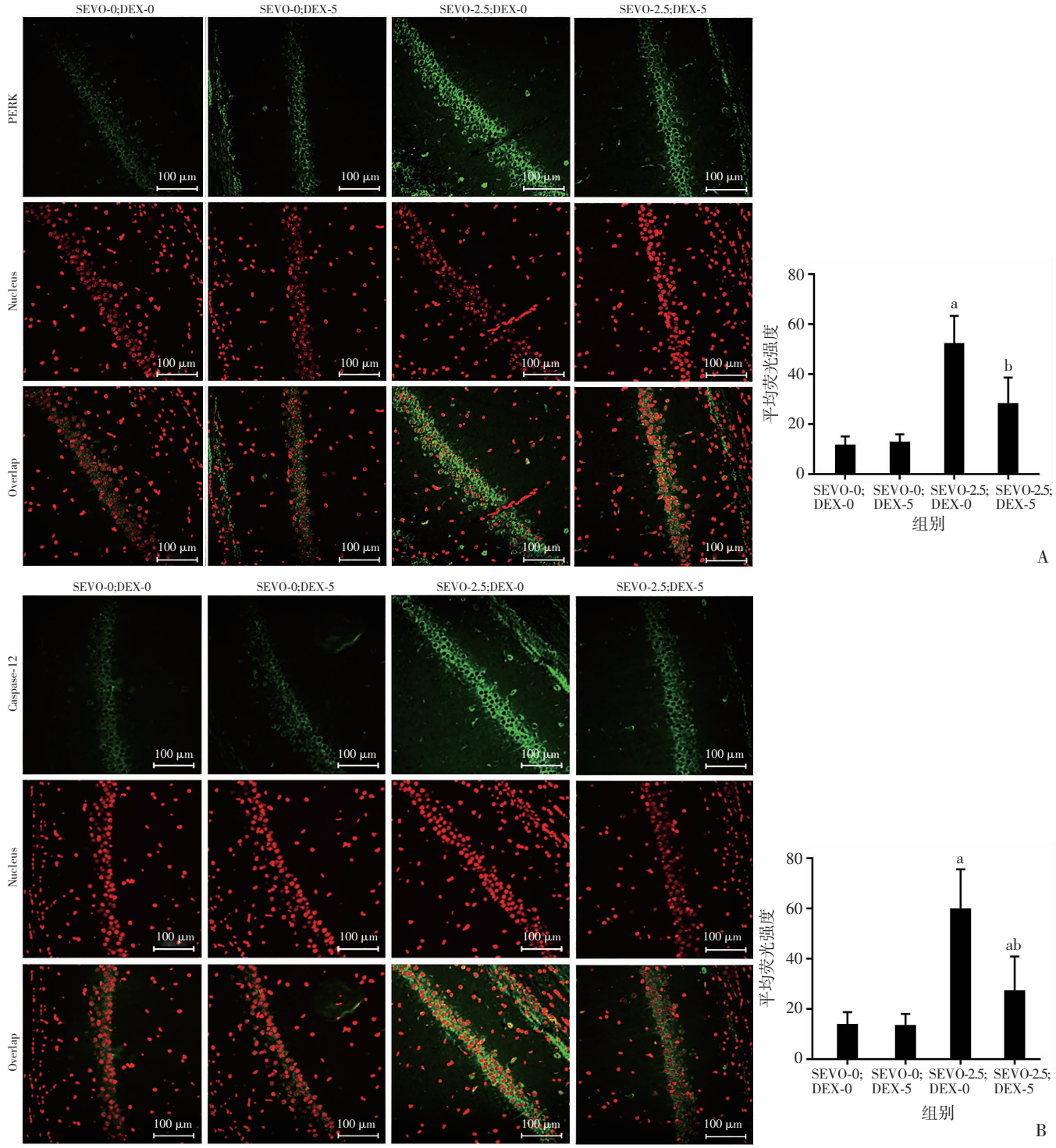
2.3 DEX 通过 ERK/MAPK 信号通路减轻 SEVO 暴露增加海马 ER 应激

为了探讨 DEX 减轻 ER 应激的机制,我们分析了 DEX 对海马组织中 MAPK 信号通路的影响。如图 3 所示,与对照组相比,单独暴露于 SEVO 大鼠的 p-ERK、p-JNK 和 p-P38 表达均增加($P<0.05$)。联合给予 SEVO 和 DEX 大鼠的 p-ERK、p-JNK 和 p-P38 表达低于仅用 SEVO 处理的大鼠($P<0.05$)。



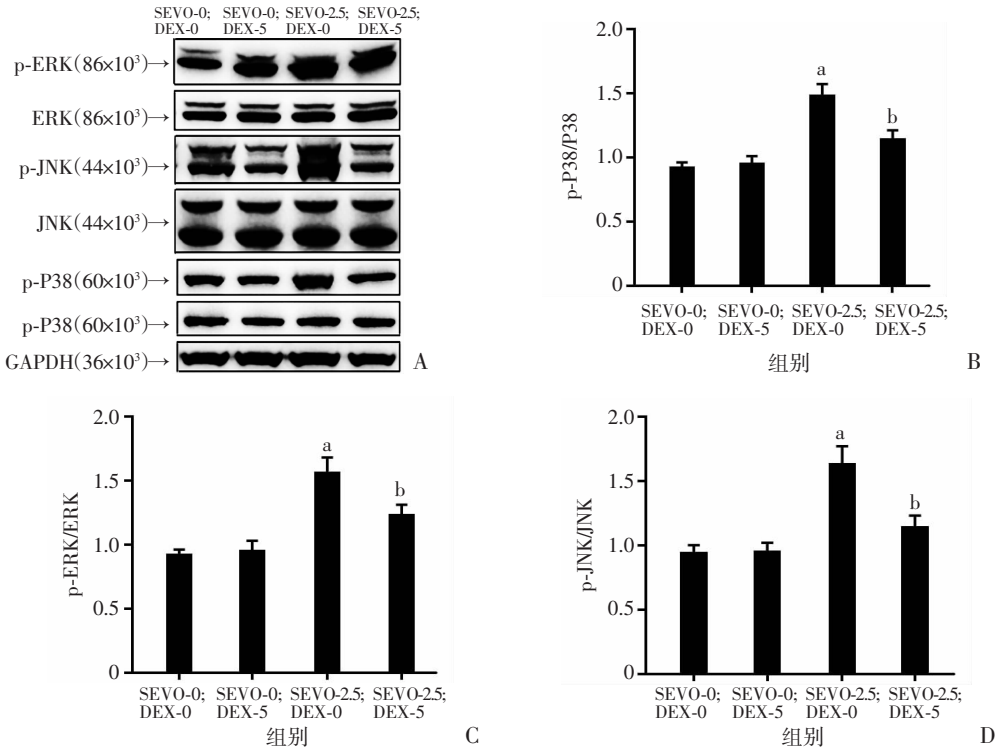
A:HE 染色检测新生大鼠海马神经元形态变化;B:流式细胞术检测新生大鼠海马细胞凋亡的情况

图 1 DEX 减轻 SEVO 所致大鼠海马神经元损伤



A:免疫荧光染色显示 PERK 阳性细胞及平均荧光强度(绿色表示锥体神经元细胞质中 PERK 的表达,红色表示细胞核);B:免疫荧光染色显示 Caspase-12 阳性细胞及平均荧光强度(绿色表示锥体神经元细胞质中 Caspase-12 的表达,红色表示细胞核);a:$P<0.05$,与 SEVO-0;DEX-0 组比较;b:$P<0.05$,与 SEVO-2.5;DEX-0 组比较

图 2 DEX 减轻 SEVO 暴露增加海马 ER 应激($n=5$, $\bar{x}\pm s$)



A:Western blot 检测结果;B~D:半定量分析($n=5$,$\bar{x}\pm s$) a:$P<0.05$,与 SEVO-0; DEX-0 组比较;b:$P<0.05$,与 SEVO-2.5; DEX-0 组比较

图 3 DEX 通过 ERK/MAPK 信号通路减轻 SEVO 暴露增加海马 ER 应激

3 讨论

挥发性麻醉药引起的神经毒性是由复杂的相互作用机制驱动的,这些机制导致神经细胞凋亡、神经炎症和发育中大脑突触可塑性的破坏[7-12]。ER 应激通常存在于一些神经退行性疾病,如阿尔茨海默病和帕金森病。过度或持续的 ER 应激可能会导致神经元凋亡[4]。本研究发现,SEVO 暴露引起了幼鼠海马中 ER 应激标记物(传感器 PERK 及其下游促凋亡蛋白 Caspase-12)的表达增加,DEX 和 SEVO 联合应用有效降低了 PERK 和 Caspase-12 的表达。先前研究证明了 PERK 主要定位于细胞质 ER 的表面,是细胞内酪氨酸特异性磷酸酶之一,参与多种细胞信号网络的调节[13]。此外,许多 ER 驻留蛋白需要 Ca^{2+} 来维持其功能,然而 ER 超微结构的破坏可能会导致 ER 储存区过量的 Ca^{2+} 外流,从而引起一些内质网 PERK 的表达变化[3]。本研究发现 SEVO 暴露后 PERK 表达的增加促进了神经细胞凋亡,这是发育中大脑对 ER 应激的不适应反应。DEX 通过抑制 ER 应激对 SEVO 引起的神经毒性提供保护作用。

MAPK(ERK、JNK 和 p38)信号通路参与细胞生长和死亡,对这些信号通路的严格调控对决定细胞命运至关重要[14]。许多研究表明 MAPK 通路激活可以促进 ER 应激的发生[15]。我们的研究发现 SEVO 暴露可以激活 MAPK 信号通路,而 DEX 和 SEVO 联合应用有效降低了该通路的激活,表明 DEX 可能通过抑制 MAPK 信号通路减轻发育中大脑的 ER 应激。先前研究表明,DEX 通过抑制 ERK1/2 磷酸化诱导小胶质细胞向 M2 表型分化,从而在 BV2 细胞中发挥抗炎作用[15]。此外,还有研究表明 DEX 抑制 ERK、JNK 和 p38 信号的激活,降低 Caspase-3 的表达,提高抗凋亡因子 Bcl-2 表达,以抵抗利多卡因诱导的细胞凋亡[16]。这些结果证实了先前的结论[17]。然而,在 DEX 诱导的 ER 应激抗性中也可能有其他信号参与,MAPK 信号可能起主导作用。此外,MAPK 信号转导如何降低 ER 应激还不清楚,这一点还需要进一步的研究。

综上,SEVO 暴露对发育中的大鼠大脑产生神经毒性,导致海马区神经细胞损伤,这些过程可能由 ER 应激反应介导。DEX 可能通过抑制 MAPK 信号通路减轻 ER 应激,改善 SEVO 引起的神经毒性。

参考文献:

[1] 杨秋悦, 贾俊可, 黄怡, 等. 自噬在七氟醚麻醉致老龄小鼠认知功能减退中的作用: 与神经发生的关系[J]. 中华麻醉学杂志, 2019, 39(7): 809-812. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1416.2019.07.011.
YANG Q Y, JIA J K, HUANG Y, *et al*. Role of autophagy

in cognitive decline caused bysevoflurane anesthesia in aged mice: the relationship with neurogenesis[J]. Chin J Anesthesiol, 2019, 39(7): 809-812. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1416.2019.07.011.

[2] YUAN Y, YANG J L, CHEN J, *et al*. Alpha-lipoic acid protects against cadmium-induced neuronal injury by inhibiting the endoplasmic reticulum stress eIF2α-ATF4 pathway in rat cortical neurons *in vitro* and *in vivo*[J]. Toxicology, 2019, 414: 1-13. DOI: 10.1016/j.tox.2018.12.005.

[3] LIU B, XIA J M, CHEN Y L, *et al*. Sevoflurane-induced endoplasmic reticulum stress contributes to neuroapoptosis and BACE-1 expression in the developing brain: the role of eIF2α[J]. Neurotox Res, 2017, 31(2): 218-229. DOI: 10.1007/s12640-016-9671-z.

[4] SHEN F Y, SONG Y C, GUO F, *et al*. Cognitive impairment and endoplasmic reticulum stress induced by repeated short-term sevoflurane exposure in early life of rats[J]. Front Psychiatry, 2018, 9: 332. DOI: 10.3389/fpsyt.2018.00332.

[5] 陈佳林, 周丽芳, 韦祎, 等. 右美托咪定对丙泊酚诱导新生大鼠大脑发育的远期影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2018, 34(2): 163-166. DOI: 10.12089/jca.2018.02.015.
CHEN J L, ZHOU L F, WEI Y, *et al*. Long-term effects of dexmedetomidine on the brain development in propofol-induced neonatal rats[J]. J Clin Anesthesiol, 2018, 34(2): 163-166. DOI: 10.12089/jca.2018.02.015.

[6] SUN DD, WANG J H, LIU X L, *et al*. Dexmedetomidine attenuates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and improves neuronal function after traumatic brain injury in mice[J]. Brain Res, 2020, 1732: 146682. DOI: 10.1016/j.brainres.2020.146682.

[7] DARLING N J, COOK S J. The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843(10): 2150-2163. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.01.009.

[8] 李红霞, 翁亦齐, 喻文立, 等. 麻醉因素对亲体肝移植术患儿肾损伤的影响: 七氟醚复合麻醉与丙泊酚复合麻醉的比较[J]. 中华麻醉学杂志, 2019, 39(3): 340-342. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1416.2019.03.022.
LI H X, WENG Y Q, YU W L, *et al*. Effect of anesthesia factor on kidney injury in pediatric patients undergoing living donor liver trans-plantation: a comparison ofsevoflurane-versus propofol-based anesthesia[J]. Chin J Anesthesiol, 2019, 39(3): 340-342. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1416.2019.03.022.

[9] QIN J H, ZHANG X R, HE L, *et al*. Effect of sevoflurane and halothane anesthesia on cognitive function and immune function in young rats[J]. Saudi J Biol Sci, 2018, 25(1): 47-51. DOI: 10.1016/j.sjbs.2016.08.002.

[10] 罗晶晶, 梁笑, 皮龙辉, 等. 右美托咪定联合七氟醚吸入对单肺通气患者肺损伤的影响[J]. 重庆医学 2019, 48(11), 1844-1847, 1851. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8348.2019.11.011.
LUO J J, LIANG X, PI L H, *et al*. Effect of dexmedetomidine combined with sevoflurane inhalation on lung injury in patients with one lung ventilation [J]. Chongqing Med, 2019, 48 (11): 1844-1847, 1851. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8348.2019.11.011.

[11] LIAO Z X, CAO D X, HAN X, *et al*. Both JNK and P38 MAPK pathways participate in the protection bydexmedetomidine against isoflurane-induced neuroapoptosis in the hippocampus of neonatal rats[J]. Brain Res Bull, 2014, 107: 69-78. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2014.07.001.

[12] Huang B Y, Huang H B , Zhang Z J , *et al*. Cell cycle activation contributes to isoflurane-induced neurotoxicity in the developing brain and the protective effect of CR8[J]. CNS Neurosci Ther, 2019, 25(5): 612-620. DOI: 10.1111/cns.13090.

[13] LEBEAU J, SAUNDERS J M, MORAES V W R, *et al*. The PERK arm of the unfolded protein response regulates mitochondrial morphology during acute endoplasmic reticulum stress[J]. Cell Rep, 2018, 22(11): 2827-2836. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.02.055.

[14] 郭润民, 刘畅, 吴子君, 等. p38MAPK 通路激活内质网应激参与高糖诱导血管平滑肌细胞钙化[J]. 广东医学院学报, 2016, 34(3): 225-229. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4057.2016.03.002.
GUO R M, LIU C, WU Z J, *et al*. Involvement of p38 MAPK-activated endoplasmic reticulum stress in high glucose-induced calcification of vascular smooth muscular cells [J]. J Guangdong MedColl, 2016, 34(3): 225-229. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4057.2016.03.002.

[15] QIU Z G, LU P, WANG K, *et al*. Dexmedetomidine inhibits neuroinflammation by altering microglial M1/M2 polarization through MAPK/ERK pathway[J]. Neurochem Res, 2020, 45(2): 345-353. DOI: 10.1007/s11064-019-02922-1.

[16] WANG Q, TAN Y H, ZHANG N, *et al*. Dexmedetomidine inhibits activation of the MAPK pathway and protects PC12 and NG108-15 cells from lidocaine-induced cytotoxicity at its maximum safe dose[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 91: 162-166. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.04.084.

[17] KANG F C, WANG S C, CHANG MM, *et al*. Midazolam activates caspase, MAPKs and endoplasmic reticulum stress pathways, and inhibits cell cycle and Akt pathway, to induce apoptosis in TM3 mouse Leydig progenitor cells[J]. Oncotargets Ther, 2018, 11: 1475-1490. DOI: 10.2147/OTT.S154442.

(**收稿**:2020-11-24;**修回**:2021-03-07)

(编辑 王 红)