

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.08.1023

• 论 著 •

R- α -甲基组胺改善异氟烷导致的发育期大鼠神经元凋亡及记忆损害

滕清宇, 蔡林林, 李玮伟, 袁红斌, 徐海涛*

第二军医大学长征医院麻醉科, 上海 200003

[摘要] **目的** 探讨 R- α -甲基组胺(RAMH)对异氟烷导致的发育期大鼠神经元凋亡及记忆损害的保护作用。

方法 将 28 只 6~7 d SD 大鼠随机均分为 4 组:对照(CON)组腹腔注射 5%葡萄糖(0.1 mL/10 g);异氟烷暴露模型(ISO)组腹腔注射 5%葡萄糖(0.1 mL/10 g)后,吸入 1.6%的异氟烷持续 6 h;RAMH 组腹腔注射 RAMH(10 mg/kg);异氟烷暴露联合 RAMH 处理(RAMH+ISO)组,腹腔注射 RAMH(10 mg/kg)30 min 后吸入 1.6%的异氟烷持续 6 h。应用水迷宫实验观察大鼠学习记忆能力,免疫荧光技术检测大鼠海马神经细胞凋亡,蛋白质印迹法检测大鼠海马中 p53 蛋白表达。**结果** 在水迷宫实验中,ISO 组大鼠在目标象限的时间短于 CON 组($n=7, P<0.01$);RAMH+ISO 组大鼠在目标象限的时间长于 ISO 组($n=7, P<0.05$)。与 CON 组相比,ISO 组大鼠海马神经细胞凋亡增加($n=5, P<0.01$);而 RAMH+ISO 组凋亡细胞数量少于 ISO 组($n=5, P<0.01$)。与 CON 组相比,ISO 组大鼠海马中 p53 蛋白表达增加($n=6, P<0.01$);而 RAMH+ISO 组 p53 蛋白表达低于 ISO 组($n=6, P<0.01$)。**结论** RAMH 可减轻异氟烷引起的发育期大鼠海马神经元凋亡及记忆损害。

[关键词] 异氟烷;R- α -甲基组胺;生长和发育;细胞凋亡;记忆障碍

[中图分类号] R 741.02 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)08-1023-05

R-(α)-methylhistamine ameliorates isoflurane-induced neuronal apoptosis and memory impairment in developing rats

TENG Qing-yu, CAI Lin-lin, LI Wei-wei, YUAN Hong-bin, XU Hai-tao*

Department of Anesthesiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To explore the effect of R-(α)-methylhistamine (RAMH) on the isoflurane exposure induced neuronal apoptosis and memory impairment in the developing rats. **Methods** Twenty-eight 6-7 days SD rats were randomly divided into four groups: control (CON) group (intraperitoneal injection of 5% glucose [0.1 mL/10 g], isoflurane (ISO) group (intraperitoneal injection of 5% glucose [0.1 mL/10 g] and then exposure to 1.6% ISO for 6 hours), RAMH group (intraperitoneal injection of RAMH [10 mg/kg], and RAMH+ISO group (after intraperitoneal injection of RAMH [10 mg/kg] for 30 min, then exposure to 1.6% ISO for 6 hours). Morris water maze test was employed to investigate the learning and memory ability. Immunofluorescence and Western blotting were employed to determine the neuronal apoptosis and p53 expression in the hippocampus of rats, respectively. **Results** Morris water maze test showed that the time in the target quadrant of ISO group was significantly shorter than that of CON group ($n=7, P<0.01$), while the time of RAMH+ISO group was significantly longer than the ISO group ($n=7, P<0.05$). The number of apoptotic neurons in hippocampus in the ISO group was significantly increased compared with either the CON group or the RAMH+ISO group ($n=5$, both $P<0.01$). Compared with the CON group, the expression of p53 protein in hippocampus was significantly increased in the ISO group ($n=6, P<0.01$), while p53 expression in the RAMH+ISO group was significantly lower than that in the ISO group ($n=6, P<0.01$). **Conclusion** RAMH can ameliorate ISO exposure induced neuronal apoptosis and memory impairment in the developing rat.

[Key words] isoflurane; R-(α)-methylhistamine; growth and development; apoptosis; memory disorders

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(8): 1023-1027]

[收稿日期] 2017-03-23 **[接受日期]** 2017-06-24

[基金项目] 国家自然科学基金(81400895). Supported by National Natural Science Foundation of China (81400895).

[作者简介] 滕清宇, 硕士生. E-mail: 984301371@qq.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81885265, E-mail: xuht1968@sohu.com

临床常用的吸入麻醉药异氟烷长时间暴露可引起发育期大鼠或小鼠的海马、大脑皮质、杏仁核等区域神经细胞广泛凋亡^[1-2],并可损害大鼠成年后学习记忆等认知功能^[3]。在中枢神经系统,*R*- α -甲基组胺[*R*-($-$)- α -methylhistamine, RAMH]可通过激活组胺 H3 受体调节组胺、 γ -氨基丁酸(GABA)等递质释放^[4]。有研究表明 RAMH 可减轻或消除谷氨酸和甲基苯丙胺引起的发育期大鼠认知损害^[5-6]。但 RAMH 是否能减轻异氟烷引起的发育期大鼠神经元凋亡及记忆损害仍不清楚。本研究通过行为学实验和免疫荧光技术等探讨 RAMH 是否对大鼠海马神经元细胞凋亡及记忆损害有保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验对象与分组

SD 孕鼠购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,按照第二军医大学实验动物管理规范饲养和照料。根据研究目的将 28 只 6~7 d SD 大鼠随机均分为 4 组:对照(CON)组腹腔注射 5% 葡萄糖(0.1 mL/10 g);异氟烷暴露模型(ISO)组腹腔注射 5% 葡萄糖(0.1 mL/10 g)后,吸入 1.6% 的异氟烷持续 6 h;RAMH 组腹腔注射 RAMH(10 mg/kg);异氟烷暴露联合 RAMH 处理(RAMH+ISO)组腹腔注射 RAMH(10 mg/kg) 30 min 后,吸入 1.6% 的异氟烷持续 6 h。整个实验过程使用水浴锅保温。处理 28 d 后通过水迷宫实验观察大鼠学习记忆能力。然后对 CON、ISO 和 RAMH+ISO 组大鼠海马神经元凋亡、p53 蛋白的表达进行检测。

1.2 水迷宫实验观察大鼠学习记忆能力

使用经典的 Morris 水迷宫装置(上海吉量公司),将其随机分为 4 个象限,其中一个象限放置平台。训练时将大鼠根据训练计划分别放置于非平台象限,让大鼠自由寻找平台,以大鼠在平台上保持 10 s 不再下水为完成一次测试。如果大鼠 60 s 内找不到平台则引导上台,并站立 10 s。每天 12:00~17:00 训练 2 轮,持续训练 5 d,第 6 天撤除平台,将大鼠放置于非目标象限的固定位置,让其自由寻找平台,视频记录其 60 s 内的整个过程。用分析软件分析大鼠的路线和潜伏期。测试大鼠的空间学习和记忆能力。

1.3 免疫荧光观察大鼠海马神经元凋亡情况

冰冻切片室温放置 30 min 后加 10% 驴血清,室温孵育

90 min。加入小鼠抗神经元特异性核蛋白(NeuN, 1:300,美国 Millipore 公司,ABN78)、兔抗活化型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(activated caspase 3, AC3;1:300,美国 CST 公司,9664),4 ℃ 孵育过夜;第 2 天室温放置 30 min 后,缓冲液冲洗 5 min \times 3 次。然后加入荧光二抗 Alexa Fluor[®] 594 驴抗兔 IgG(1:500,美国 Invitrogen 公司, A21207)和 Alexa Fluor[®] 488 驴抗小鼠 IgG(1:500,美国 Invitrogen 公司, R37114)室温避光孵育 2 h(以上抗体都用 10% 驴血清稀释)。缓冲液冲洗 5 min \times 3 次后封片。使用奥林巴斯 BX51 荧光显微镜拍照、计数,用 Image-Pro Plus 6.0 软件算出各区面积,以获得单位面积的阳性细胞数。

1.4 蛋白质印迹法检测大鼠海马 p53 蛋白表达

大鼠麻醉后灌流生理盐水 3 mL 后断头取脑,冰上剥离海马组织加入 RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司),磁珠振荡后 12 000 \times g 离心 5 min,取上清液。BCA 法测定总蛋白浓度(Thermo Scientific Pierce[®] BCA 定量试剂盒)。SDS-PAGE 分离蛋白后转移至硝酸纤维素膜上,室温封闭 2 h。加入小鼠抗 p53(1:500,美国 CST 公司,9284)和抗 β -actin(1:5 000,美国 CST 公司,3700),4 ℃ 孵育过夜。缓冲液洗膜 5 min \times 3 次后加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗,室温放置 2 h 后洗膜 5 min \times 3 次。最后使用 DAB 显色试剂显影,ImageJ 软件分析条带灰度值。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 19.0 软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 RAMH 处理能够改善异氟烷所致的幼年大鼠记忆损害

在水迷宫实验中,通过 5 d 的训练,大鼠到达平台的潜伏期均少于 10 s,表明大鼠的训练有效。各组大鼠在 5 d 的训练中到达平台的潜伏期差异均无统计学意义(图 1A)。在记忆测试中,ISO 组大鼠在目标象限的时间短于 CON 组,距离目标点的平均距离长于 CON 组($P < 0.01$);RAMH+ISO 组大鼠在目标象限的时间长于 ISO 组($P < 0.05$),距离目标点的平均距离短于 ISO 组($P < 0.01$),见图 1B~1D。

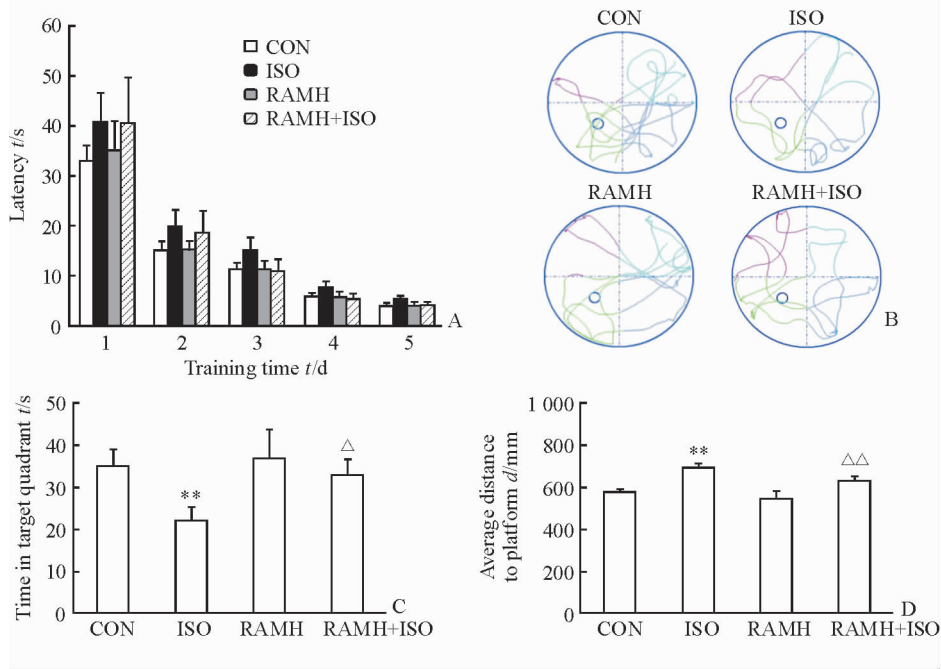


图 1 RAMH 处理能够改善异氟烷所致的幼年大鼠记忆损害

Fig 1 RAMH ameliorates isoflurane (ISO) exposure induced memory impairment in developing rats

A: Bar histogram showing the latency during the spatial navigation learning; B: Representative tracking for each group from a single training session; C, D: Bar histograms showing the time spent in the target quadrant (C) and the average distance to the target site (D). CON; Control; RAMH; *R*-($-$)- α -methylhistamine. ** $P < 0.01$ vs CON group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs ISO group. $n = 7$, $\bar{x} \pm s$

2.2 RAMH 处理可改善异氟烷引起的幼年大鼠海马神经元凋亡情况 本实验采用免疫荧光技术检测大鼠海马区 AC3 观察细胞凋亡情况。由图 2 可见, CON 组大鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区几乎没有 AC3 阳性细胞。ISO 组大鼠海马 CA1、CA3 和 DG

区见大量 AC3 阳性细胞, 且与 CON 组差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 表明 ISO 可使大鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区发生细胞凋亡。与 ISO 组相比, RAMH+ISO 组大鼠 CA1、CA3 和 DG 区 AC3 阳性细胞均减少 ($P < 0.01$)。

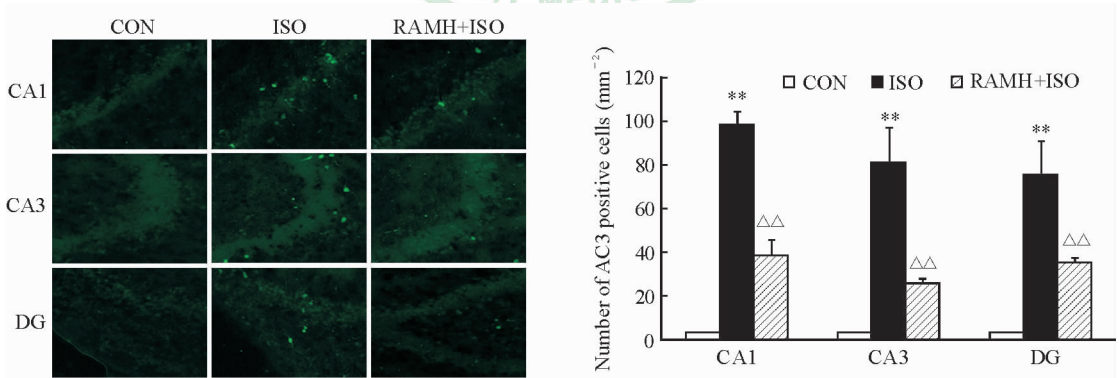


图 2 RAMH 处理改善异氟烷引起的幼年大鼠海马神经元凋亡

Fig 2 RAMH ameliorates isoflurane (ISO) exposure induced neuronal apoptosis in hippocampus of developing rats

AC3; Activated caspase 3; CA1/3; Cornu ammonis 1/3; DG; Dentate gyrus; CON; Control; RAMH; *R*-($-$)- α -methylhistamine. Original magnification: $\times 10$. ** $P < 0.01$ vs CON group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs ISO group. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$

2.3 RAMH 及异氟烷处理后幼年大鼠海马 p53 蛋白的表达 与 CON 组相比, ISO 组大鼠海马中 p53 蛋白表达增加 ($P < 0.01$)。RAMH 处理后

(RAMH+ISO 组) 大鼠海马 p53 蛋白表达较 ISO 组降低 ($P < 0.01$)。见图 3。

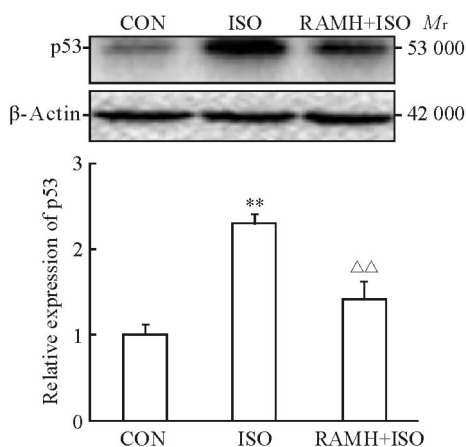


图3 蛋白质印迹法检测 RAMH 对异氟烷暴露大鼠海马 p53 表达的影响

Fig 3 Effect of RAMH on expression of p53 protein in rats' hippocampus after isoflurane (ISO) exposure by Western blotting

CON; Control; RAMH: R-(−)-α-methylhistamine. ** $P < 0.01$ vs CON group, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs ISO group. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

本研究利用 1.6% 异氟烷暴露 6 h 引起的大鼠发育神经毒性模型, 观察 RAMH 对大鼠学习记忆能力的影响, 结果显示 RAMH 可改善异氟烷暴露引起的记忆能力损害, 减少异氟烷暴露引起的大鼠海马区神经元凋亡和 p53 表达增加。表明 RAMH 可改善异氟烷暴露引起的神经元凋亡及记忆能力损害。

RAMH 减轻异氟烷暴露引起的神经元凋亡和记忆损害可能与其调节递质释放和影响凋亡信号通路有关。有研究表明异氟烷可激活未成熟的发育期神经元上 GABA 受体, 使神经元发生去极化^[7-8], 从而导致神经元内钙异常增加^[9], 胞内钙浓度异常升高可激活 caspase-3 等介导的凋亡途径。因此, 调节 GABA 神经系统可能是干预异氟烷发育期神经毒性的途径之一。在中枢神经系统中, 组胺 H3 受体是一种自身调节性受体, 发挥稳定神经递质系统平衡的作用, 主要表达于突触前, 通过作用于电压依赖性钙通道引起的钙内流调节突触前递质释放^[4,10]。这些递质包括组胺以及 GABA、乙酰胆碱、多巴胺、去甲肾上腺素等神经递质^[4]。我们前期研究发现 RAMH 可抑制成年大鼠海马 CA1 区 GABA 能突触传递, 在未成年大鼠 RAMH 也可能通过类似的

作用减弱异氟烷增强 GABA 能的作用, 从而改善神经元凋亡和记忆损害^[3]。除了调节递质释放, RAMH 也可影响凋亡相关的信号通路。例如, 在皮质神经元中, RAMH 可激活 MAPK 及 Akt-GSK3 β 通路, 从而抑制促凋亡蛋白 caspase-3 活性, 增加抑制凋亡蛋白 bcl-2 的表达^[6]。

异氟烷(1.6%)暴露 6 h 是研究全麻药发育神经毒性的最常用模型之一^[11]。在本实验中, 大鼠异氟烷(1.6%)暴露 6 h 后, 海马以及其他脑区均发生明显凋亡。该结果与以往研究结果基本一致。不仅在动物实验中发现幼年动物全麻药暴露可导致学习记忆能力的损害, 在回顾性临床研究中还发现 3 岁前接受手术的患儿在 10 岁时发生语言和推理能力缺陷的风险显著高于未手术患儿^[12]。因此, 本研究中选择出生后 7 d 的 SD 大鼠接受麻醉药暴露, 5 周龄时应用水迷宫实验检测学习记忆能力。该时间点与临床研究的时间点相似。尽管有研究表明 RAMH 可增强成年大鼠的学习记忆能力^[13], 但是在本实验中由于给药时间不同, RAMH 对正常幼年大鼠的记忆无明显影响, 但可减轻异氟烷暴露对幼年大鼠的记忆损害。该结果表明 RAMH 减轻异氟烷记忆损害的作用不是简单的相互抵消, 而是可能与其减轻神经元细胞凋亡或阻断发育神经毒性的发生机制有关。

p53 蛋白是一种肿瘤抑制蛋白, 但是也表达于正常中枢神经组织中。其激活可使细胞增殖停止, DNA 损伤和凋亡^[10]。研究表明 p53 信号通路是介导细胞凋亡的重要通路之一^[14]。本实验结果显示, ISO 组大鼠海马 p53 蛋白表达增加, 表明异氟烷暴露后发育中神经元可能发生了 DNA 损伤, 从而凋亡。而 RAMH 处理后 p53 表达低于 ISO 组。该结果提示抑制 p53 的表达可能是 RAMH 减轻异氟烷暴露引起的发育中神经元细胞凋亡的可能途径之一。本实验中仅初步观察了 RAMH 对 p53 表达的影响, 但是 RAMH 如何抑制 p53 的表达以及对 p53 下游的信号通路的影响仍需进一步研究。

尽管有研究发现一些药物(如氯化锂、氙气)和方法(如异氟烷预处理、异丙酚预处理)可减轻全麻药对发育中神经元的促凋亡作用^[15-16], 但这些药物和方法对认知功能的影响仍不清楚, 并且存在使用不便、机制不明等不足。本研究从神经元细胞凋亡

和记忆行为 2 个方面考察了 RAMH 的保护作用,发现 RAMH 是全麻药发育神经毒性的有效干预方法,但是其具体的作用机制仍需进一步研究。

[参考文献]

- [1] DENG M, HOFACER R D, JIANG C, JOSEPH B, HUGHES E A, JIA B, et al. Brain regional vulnerability to anaesthesia-induced neuroapoptosis shifts with age at exposure and extends into adulthood for some regions[J]. *Br J Anaesth*, 2014, 113: 443-451.
- [2] SATOMOTO M, SATOH Y, TERUI K, MIYAO H, TAKISHIMA K, ITO M, et al. Neonatal exposure to sevoflurane induces abnormal social behaviors and deficits in fear conditioning in mice [J]. *Anesthesiology*, 2009, 110: 628-637.
- [3] LI W W, CHENG L Z, ZOU Z, TIAN M L, ZHANG H, RAYA A D, et al. (*R*)- α -methylhistamine suppresses inhibitory neurotransmission in hippocampal CA1 pyramidal neurons counteracting propofol-induced amnesia in rats[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2014, 20: 851-859.
- [4] GEMKOW M J, DAVENPORT A J, HARICH S, ELLENBROEK B A, CESURA A, HALLETT D. The histamine H₃ receptor as a therapeutic drug target for CNS disorders [J]. *Drug Discov Today*, 2009, 14 (9/10): 509-515.
- [5] RABER J. Histamine receptor-mediated signaling during development and brain function in adulthood [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64: 735-741.
- [6] MARIOTTINI C, SCARTABELLI T, BONGERS G, ARRIGUCCI S, NOSI D, LEURS R, et al. Activation of the histaminergic H₃ receptor induces phosphorylation of the Akt/GSK-3 β pathway in cultured cortical neurons and protects against neurotoxic insults[J]. *J Neurochem*, 2009, 110: 1469-1478.
- [7] PERROT-SINAL T S, AUGER A P, McCARTHY M M. Excitatory actions of GABA in developing brain are mediated by *L*-type Ca²⁺ channels and dependent on age, sex, and brain region[J]. *Neuroscience*, 2003, 116: 995-1003.
- [8] ZHAO Y L, XIANG Q, SHI Q Y, LI S Y, TAN L, WANG J T, et al. GABAergic excitotoxicity injury of the immature hippocampal pyramidal neurons' exposure to isoflurane[J]. *Anesth Analg*, 2011, 113: 1152-1160.
- [9] KINDLER C H, EILERS H, DONOHOE P, OZER S, BICKLER P E. Volatile anesthetics increase intracellular calcium in cerebrocortical and hippocampal neurons[J]. *Anesthesiology*, 1999, 90: 1137-1145.
- [10] LI L H, TU Q Y, DENG X H, XIA J, HOU D R, GUO K, et al. Mutant presenilin 2 promotes apoptosis through the p53/miR-34a axis in neuronal cells[J]. *Brain Res*, 2017, 1662: 57-64.
- [11] ZHANG Y, XIE Z. Anesthetics isoflurane and desflurane differently affect mitochondrial function, learning, and memory[J/OL]. *Ann Neurol*, 2012, 72: 630. doi: 10.1002/ana.23683.
- [12] ING C, DIMAGGIO C, WHITEHOUSE A, HEGARTY M K, BRADY J, VON UNGERN-STERNBERG B S, et al. Long-term differences in language and cognitive function after childhood exposure to anesthesia [J/OL]. *Pediatrics*, 2012, 130: e476-e485. doi:10.1542/peds.2011-3822.
- [13] RUBIO S, BEGEGA A, SANTIN L J, ARIAS J L. Improvement of spatial memory by (*R*)- α -methylhistamine, a histamine H₃-receptor agonist, on the Morris water-maze in rat [J]. *Behav Brain Res*, 2002, 129(1/2): 77-82.
- [14] ENOMOTO A, YAMADA J, MORITA A, MIYAGAWA K. Bisdemethoxycurcumin enhances X-ray-induced apoptosis possibly through p53/Bcl-2 pathway[J]. *Mutat Res*, 2017, 815: 1-5.
- [15] MA D, WILLIAMSON P, JANUSZEWSKI A, NOGARO M C, HOSSAIN M, ONG L P, et al. Xenon mitigates isoflurane-induced neuronal apoptosis in the developing rodent brain [J]. *Anesthesiology*, 2007, 106: 746-753.
- [16] WEI H, LIANG G, YANG H. Isoflurane preconditioning inhibited isoflurane-induced neurotoxicity[J]. *Neurosci Lett*, 2007, 425: 59-62.

[本文编辑] 杨亚红