

· 实验研究 ·

术后认知功能障碍老年小鼠海马内 NogoA-NgR1 通路的变化

唐小慧 宗曼曼 唐会 贾敏 杨建军

【摘要】 目的 观察术后认知功能障碍老年小鼠海马内神经生长抑制因子 NogoA 及其受体 NgR1 表达的变化,并探讨其可能机制。**方法** 采用异氟醚麻醉+腹腔探查术建立 POCD 模型。老年雄性 C57BL/6 小鼠 40 只,随机分为四组:O₂+Saline 组(OS 组)、O₂+NEP1-40 组(ON 组)、异氟醚麻醉+腹腔探查术+Saline 组(SS 组)及异氟醚麻醉+腹腔探查术+NEP1-40 组(SN 组),每组 10 只。麻醉前 7 d 行右侧脑室置管;麻醉前 2 h 至行为学测试前 2 h 每天侧脑室注射 NEP1-40(20 μg/2 μl)或等容的无菌生理盐水,连续注射 8 d。术后第 5 天行旷场实验,第 6、7 天分别行场景性和条件性恐惧实验训练和测试。行为学测试后 2 h,取小鼠海马组织,采用 Western blot 法检测 NogoA、NgR1、RhoA、ROCK2 和 GAP43 含量变化;Golgi 染色检测海马 CA1 区神经元树突棘数量改变。**结果** 与 OS 和 ON 组比较,SS 组在场景性恐惧实验测试中僵直反应百分比明显降低,海马内 NogoA、NgR1、RhoA 和 ROCK2 含量明显升高,GAP43 含量和总的、新生的和成熟的树突棘数量明显减少($P<0.05$);与 SS 组比较,SN 组在场景性恐惧实验测试中僵直反应百分比明显升高,海马内 RhoA 和 ROCK2 含量明显降低,GAP43 含量和总的、新生的和成熟的树突棘数量明显增多($P<0.05$)。**结论** 麻醉手术致老年小鼠认知功能损害与其海马内 NogoA-NgR1 通路过度激活有关。

【关键词】 术后认知功能障碍;老年小鼠;海马;神经生长抑制因子 A;Nogo 受体 1

Changes of hippocampal NogoA-NgR1 signaling in aged mice with postoperative cognitive dysfunction

TANG Xiaohui, ZONG Manman, TANG Hui, JIA Min, YANG Jianjun. Department of Anesthesiology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region, PLA, Nanjing 210002, China

Corresponding author: JIA Min, Email: jiamin0320@126.com

【Abstract】 Objective To observe the changes of hippocampal NogoA-NgR1 signaling on post-operative cognitive function (POCD) in aged mice, and explore the potential underlying mechanism. **Methods** Isoflurane anesthesia and laparotomy were applied to establish the POCD model. Forty aged male C57BL/6 mice were randomly divided into the following four groups ($n=10$): group O₂+saline (group OS), group O₂+NEP1-40 (group ON), group isoflurane anesthesia+laparotomy surgery+saline (group SS), and group isoflurane anesthesia+laparotomy surgery+NEP1-40 (group SN). Cannula placement was performed into lateral ventricle 7 days before the surgery. Animals were subjected to an administration of NEP1-40 (20 μg/2 μl) or isochoric saline via intracerebroventricular injection once daily for 8 consecutive days, injection was given from 2 h before isoflurane anesthesia to the last behavioral test. Open field test was performed at 5th d after operation. Contextual and cued fear conditioning training and testing were exhibited at 6th and 7th d after operation, respectively. The hippocampus was harvested 2 h after the behavioral test. Western blot was used to detect the expressions of NogoA, NgR1, RhoA, ROCK2 and GAP43. Golgi staining was applied to measure the changes of dendritic spines in hippocampal CA1 area. **Results** Compared with the groups OS and ON, the freezing time in the contextual fear conditioning test was significantly decreased, the contents of NogoA, NgR1, RhoA and ROCK2 were significantly increased, the content of GAP43 and the number of dendritic spine were significantly decreased in group SS ($P<0.05$). Compared with the group SS, the freezing time in the contextual fear conditioning test was significantly increased, the contents of RhoA and ROCK2 were significantly decreased, the content of GAP43 and the number of dendritic spine were significantly increased in group SN ($P<0.05$). **Conclusion** Over-activated of hippocampal NogoA-NgR1 signaling participated in the pathogenesis of POCD in aged mice.

基金项目:国家自然科学基金(81471105)

作者单位:210002 南京大学医学院临床学院 南京军区南京总医院麻醉科(唐小慧、宗曼曼、唐会、贾敏);东南大学附属中大医院麻醉科(杨建军)

通信作者:贾敏,Email:jiamin0320@126.com

【Key words】 Postoperative cognitive dysfunction; Aged mice; Hippocampus; NogoA; Nogo receptor 1

术后认知功能障碍 (postoperative cognitive dysfunction, POCD) 是患者手术麻醉后出现的一种中枢神经系统并发症, 主要临床表现为患者术后出现学习、记忆、判断力、注意力等下降^[1]。其中高龄是发生 POCD 的独立危险因素^[1]。目前, POCD 的发病机制尚不清楚且缺乏有效防治措施。先前研究表明, 神经生长抑制因子 A (neurite outgrowth inhibitory protein A, NogoA)-Nogo 受体 1 (Nogo receptor 1, NgR1) 通路过度活化抑制海马突触重塑且 NgR1 参与负向调控长期记忆形成^[2, 3]; 阻断 NogoA-NgR1 通路可增加突触可塑性, 引起长时程增强进而提高认知功能^[4]。然而, 尚不清楚 NogoA-NgR1 通路的激活是否参与 POCD 的发生。本实验观察 POCD 老年小鼠海马内 NogoA-NgR1 通路的变化并探讨其可能机制。

材料与方法

动物选择与分组 老年雄性 C57BL/6 小鼠 40 只, 18 月龄, 重量 34~42 g (由常州卡文斯实验动物有限公司提供), 采用随机数字表法分为四组: O₂ + Saline 组 (OS 组)、O₂ + NEP1-40 组 (ON 组)、异氟醚麻醉 + 腹腔探查术 + Saline 组 (SS 组) 及异氟醚麻醉 + 腹腔探查术 + NEP1-40 组 (SN 组), 每组 10 只。

侧脑室置管 POCD 模型建立前 7 d, 行右侧脑室置管^[5]。2% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉小鼠, 将小鼠头部水平固定在脑立体定位仪上。2% 碘酒及 75% 酒精棉球作头部皮肤消毒, 沿矢状缝作一切口约 1.5 cm, 分离皮下组织。温生理盐水清洁颅骨表面的筋膜及肌肉并剥离, 推开骨膜, 清晰暴露前囟、人字缝及矢状缝。设定颅骨冠状缝与矢状缝会合处 (即前囟) 为起始零点, 根据小鼠脑立体定位图谱提供的参数来定位右侧脑室 (AP: -0.45 mm, ML: +1.0 mm, DV: -2.50 mm), 置入不锈钢导管, 头钉及牙科水泥固定。通过微处理器控制的微量注射器以 1 μ l/min 速度缓慢注射 2 μ l NEP1-40 或等体积无菌 PBS, 注射完成后留针 2 min。缝合皮肤, 将小鼠置于恒温台上复苏。

POCD 模型建立 采用异氟醚麻醉 + 腹腔探查术建立 POCD 模型^[5]。将 SS 和 SN 组置于透明半封闭呼吸回路麻醉箱中, 箱内装有 CO₂ 吸附剂。放

入箱内前预充 1.5% 异氟醚 + 100% O₂。待小鼠翻正反射消失后, 取右侧卧位, 保持呼吸道通畅, 防止误吸, 维持麻醉 30 min。麻醉箱中气体浓度由持续监测多参数麻醉气体监护仪 (Vamos) 进行连续监测。手术组小鼠在麻醉后迅速移入预充相同浓度吸入麻醉药及气体的小鼠面罩内进行手术。消毒, 剪去小鼠腹部毛发, 消毒后取腹正中切口约 1.5 cm 进行腹腔探查术, 按顺序依次缓慢探查肠道、肝、脾、肾等脏器, 手术时间约 5 min。探查结束后分别用 5-0 和 4-0 的无菌丝线缝合肌肉筋膜及皮肤。术后伤口涂抹硫链丝霉素预防感染; 皮下注射温生理盐水 30 ml/kg, 补充术中液体丢失; 术中及术后保温处理。术后将小鼠放入通有纯氧的笼中直至意识恢复。预实验血气分析证实小鼠麻醉手术过程中无缺氧、酸中毒等并发症。OS 和 ON 组除持续吸入相同时间纯氧外不进行任何处理。

旷场实验 术后第 5 天行旷场实验。实验采用白色无顶塑料箱 (40 cm × 40 cm × 40 cm), 箱底用红线分为 16 等份小方格。将小鼠从中央区域放入观察箱内, 行探索活动 5 min, 由图像自动监视系统 (XR-XZ301) 追踪其探索路程及在中央区域停留时间。每次实验结束后用 75% 酒精擦拭场地, 充分晾干。

场景性和条件性恐惧实验 将实验分为训练和测试阶段。术后第 6 天行场景性和条件性恐惧实验训练。将小鼠放入实验箱 (32 cm × 32 cm × 45 cm) 中适应 180 s, 随后接受声音 (30 s, 70 dB, 3 000 Hz) 和足底电击刺激 (2 s, 0.75 mA, 在声音结束前 2 s 开始电激), 继续停留 30 s 后放回饲养笼。训练结束后 24 h 行场景性条件性恐惧实验测试。将小鼠放回原实验箱内, 不给予任何刺激, 记录小鼠 5 min 内僵直反应 (除呼吸运动外无其他任何行为活动的不动状态) 时间。场景性恐惧测试后 2 h, 行改变环境 (实验箱底部放入分隔板, 四壁粘贴不同形状、颜色塑料板等) 的条件性恐惧测试, 记录小鼠 6 min (无声音, 180 s; 声音, 180 s, 70 dB, 3 000 Hz) 内的僵直反应时间。测试阶段由图像自动监视系统 (XR-XC404) 追踪小鼠的活动。每次实验结束后用 75% 酒精擦拭场地, 充分晾干。

海马中 NogoA、NgR1、Ras 同源物基因家族成员 A (Ras homolog gene family member A, RhoA)、Rho

相关蛋白激酶 2 (Rho-associated protein kinase 2, ROCK2) 及生长相关蛋白 43 (growth-associated protein 43, GAP43) 检测 行为学测试后 2 h, 随机取 3 只小鼠, 断头处死, 冰上取海马组织, 加入裂解缓冲液, 粉碎组织, 4℃ 离心 (12 000 r/min, 10 min), 取上清液, 分装 -80℃ 冻存。裂解缓冲液稀释样本, 上样定量, 95℃ 加热 5 min 使蛋白变性, 凝胶电泳分离。转膜后, 室温下脱色、摇动封闭 2 h。加入一抗 4℃ 过夜, PBS 洗涤 3×5 min。二抗室温下孵育 2 h 后, PBS 洗涤 3×5 min, 底物显色反应、显影。采用 Image J 软件检测 NogoA、NgR1、RhoA、ROCK2 及 GAP43 的含量。一抗及二抗批号如下: NogoA (sc-25660)、NgR1 (1440-NG)、RhoA (ab187027)、ROCK2 (ab71598)、GAP43 (ab75810)、 β III-tubulin (ab18207)、GAPDH (60004-1-Ig)、 β -actin (sc-47778) 及 HRP 二抗 (sc-2031、sc-2004)。

海马 CA1 区锥体神经元树突棘数量检测 采用 FD 快速高尔基染色试剂盒。行为学测试后 2 h, 腹腔注射戊巴比妥钠 60 mg/kg 先后麻醉 3 只小鼠, 断头取全脑。miliQ 水快速冲掉大脑表面的血渍。将大脑浸泡在浸渍液 (10 ml 溶液 A+10 ml 溶液 B 等体积混合) 中, 24 h 后更换 1 次新的 AB 液后, 室温避光保存 24 d。随后转移至溶液 C (15 ml) 中浸泡, 24 h 后更换 1 次新的溶液 C 后, 室温避光保存 7 d。振动切片机切片 (150 μ m)。miliQ 水洗涤 2×4 min。将脑片置于混合液 (5 ml 溶液 D+5 ml 溶液 E+10 ml 双蒸水) 中浸泡 10 min。miliQ 水洗涤 2×4 min。脑片复染 (硫堇), miliQ 水洗涤 2×4 min。先后分别使用 50%、75% 和 95% 乙醇对脑片进行梯度脱水 (各 4 min)。随后, 无水乙醇脱水 4×4 min。二甲苯透明 3×4 min, 封片剂封片, 晾干。Olympus 显微镜拍摄 (10×100 倍) 海马 CA1 区神经元树突棘。使用 Image J 图像分析软件统计分析大鼠海马 CA1 区神经元树突棘的数目。

统计分析 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。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, 两两比较采用 Tukey 法。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

旷场实验测试中, 四组探索路程和中央区停留时间差异无统计学意义 (图 1, 2)。

场景性和条件性恐惧实验训练阶段, 刺激前后四组小鼠僵直反应百分比差异无统计学意义 (图 3)。

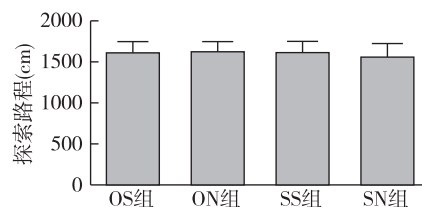


图 1 四组小鼠旷场实验测试阶段探索路程的比较

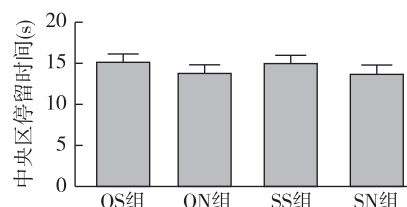


图 2 四组小鼠旷场实验测试阶段中央区停留时间的比较

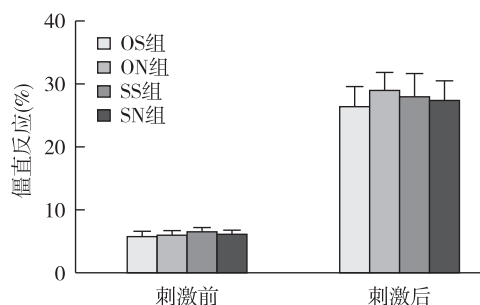


图 3 四组小鼠场景性和条件性恐惧实验训练阶段僵直反应百分比的比较

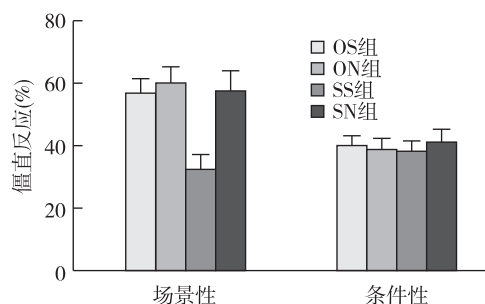
场景性恐惧实验测试阶段, SS 组僵直反应百分比明显低于 OS 组和 ON 组 ($P<0.05$); SN 组僵直反应百分比明显高于 SS 组 ($P<0.05$); OS、ON 和 SN 组僵直反应百分比差异无统计学意义。条件性恐惧实验测试阶段, 四组僵直反应百分比差异无统计学意义 (图 4)。

SS 组海马内 NogoA 和 NgR1 含量明显高于 OS 组和 ON 组 ($P<0.05$); SS 组与 SN 组海马内 NogoA 和 NgR1 含量差异无统计学意义 (图 5)。

SS 组海马内 RhoA 含量明显高于 OS 组和 ON 组 ($P<0.05$); SN 组海马内 RhoA 含量明显低于 SS 组 ($P<0.05$) (图 6)。

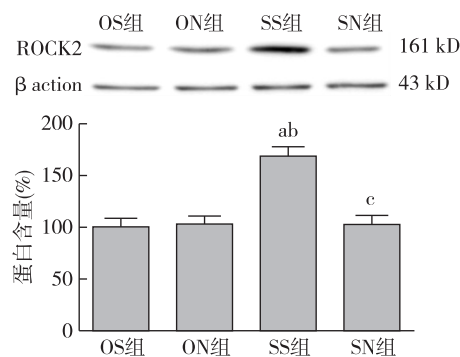
SS 组海马内 ROCK2 含量明显高于 OS 组和 ON 组 ($P<0.05$); SN 组海马内 ROCK2 含量明显低于 SS 组 ($P<0.05$) (图 7)。

SS 组海马内 GAP43 含量明显低于 OS 组和



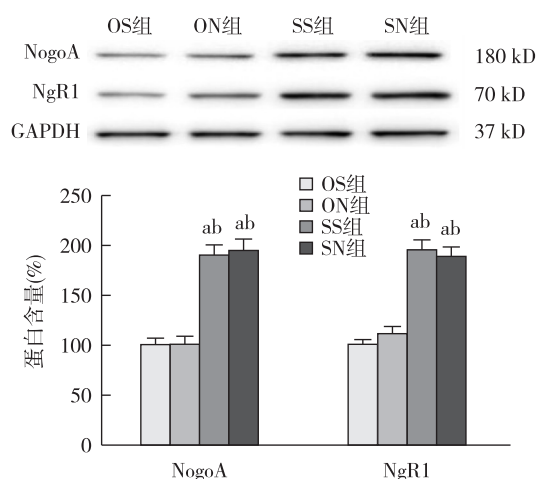
注:与 OS 组比较,^a $P<0.05$;与 ON 组比较,^b $P<0.05$;与 SS 组比较,^c $P<0.05$

图 4 四组小鼠场景性和条件性恐惧实验测试阶段僵直反应百分比的比较



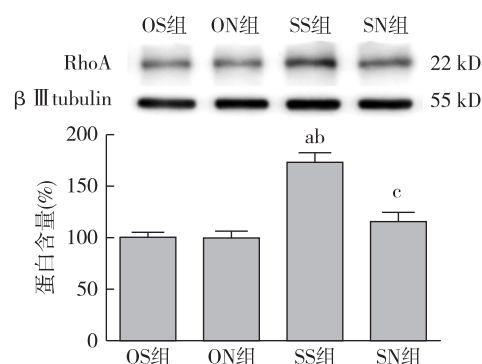
注:与 OS 组比较,^a $P<0.05$;与 ON 组比较,^b $P<0.05$;与 SS 组比较,^c $P<0.05$

图 7 四组小鼠海马内 ROCK2 含量的比较



注:与 OS 组比较,^a $P<0.05$;与 ON 组比较,^b $P<0.05$

图 5 四组小鼠海马内 NogoA 和 NgR1 含量的比较

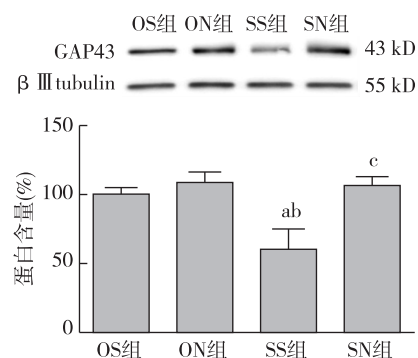


注:与 OS 组比较,^a $P<0.05$;与 ON 组比较,^b $P<0.05$;与 SS 组比较,^c $P<0.05$

图 6 四组小鼠海马内 RhoA 含量的比较

ON 组($P<0.05$);SN 组海马内 GAP43 含量明显高于 SS 组($P<0.05$)(图 8)。

SS 组海马 CA1 区总的、新生和成熟的树突棘



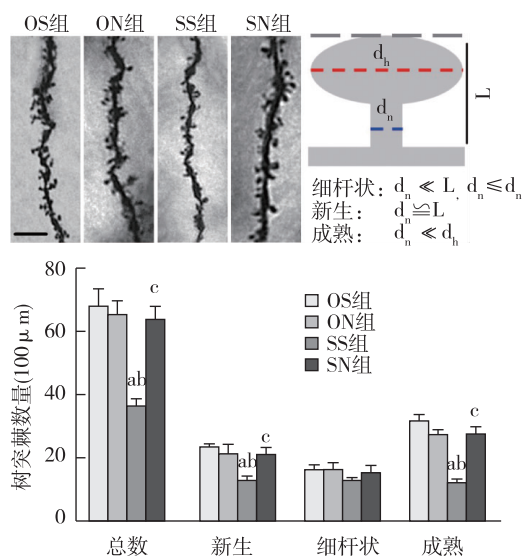
注:与 OS 组比较,^a $P<0.05$;与 ON 组比较,^b $P<0.05$;与 SS 组比较,^c $P<0.05$

图 8 四组小鼠海马内 GAP43 含量的比较

数量明显少于 OS 组和 ON 组($P<0.05$);SN 组海马 CA1 区总的、新生和成熟的树突棘数量明显多于 SS 组;四组小鼠海马 CA1 区细杆状树突棘数量差异无统计学意义($P<0.05$)(图 9)。

讨论

本研究结果显示:异氟醚麻醉+腹腔探查术可致老年小鼠场景性恐惧实验测试的僵直反应百分比明显降低,提示损害海马依赖性记忆;而条件性恐惧实验测试的僵直反应百分比差异无统计学意义,提示不影响老年小鼠非海马(杏仁核等)依赖性记忆;同时 POCD 老年小鼠海马内 NogoA、NgR1、RhoA 及 ROCK2 含量明显升高,GAP43 水平和海马 CA1 区树突棘数目明显减少;而 NogoA 结构域 Nogo66 拮抗性多肽 NEP1-40 可使 RhoA 及 ROCK2 含量明显降低,GAP43 含量和海马 CA1 区树突棘数目明显增多,僵直反应百分比明显升高,说明 NEP1-40 通过 NogoA-NgR1 通路改善 POCD



注:与 OS 组比较, $^a P < 0.05$;与 ON 组比较, $^b P < 0.05$;与 SS 组比较, $^c P < 0.05$

图 9 四组小鼠海马 CA1 区树突棘数量的比较

老年小鼠的认知功能。

目前已经确认的中枢神经系统髓鞘来源的神经抑制因子主要有 3 种: NogoA、髓鞘相关性糖蛋白和少突胶质细胞髓鞘糖蛋白, 其中 NogoA 是作用最强的神经生长抑制因子。NogoA 是由 RTN4 基因(又称为 Nogo 基因)编码的蛋白质。RTN4 基因共编码 3 种蛋白质: NogoA、NogoB 和 NogoC, 其中 NogoA 是 Nogo 蛋白在大脑中的最主要表达形式。NogoA 主要通过其两个结构域, 即 Nogo66 和 Amino-Nogo, 分别与它们的相应受体 NgR1 和 Amino-Nogo-R 结合而发挥神经生长抑制作用。此外, 3 种重要的神经生长抑制因子 NogoA、髓鞘相关性糖蛋白和少突胶质细胞髓鞘糖蛋白均通过与 Nogo66 的受体 NgR1 的结合, 激活下游 RhoA-ROCK2 发挥抑制神经再生作用^[6]。脑创伤动物研究显示: 与野生型小鼠比较, NgR1 敲除小鼠脑损伤面积减小, 伴随更多的新成熟神经元以及降低认知功能损害^[7]。本实验结果与先前研究结果相似, POCD 老年小鼠恐惧记忆损害同时伴 NogoA-NgR1 通路过度激活, 进而活化下游的 RhoA-ROCK2, 引起突触可塑性损害; 而脑室内注射 Nogo66 多肽 NEP1-40 绑定 NgR1 后, 可降低 NogoA-NgR1 通路的过度激活, 抑制下游 RhoA-ROCK2 的表达, 进而增加突触可塑性, 改善认知功能。这说明 NogoA-NgR1 通路过度激活在 POCD 老年小鼠恐惧记忆下降中起着重要作用。

GAP43 在维持神经元生长、发育、轴突再生以及神经递质释放等方面起重要作用, 是神经元发育和轴突再生的一个内在决定性因素^[8]。NogoA-NgR1 通路活化介导的 RhoA-ROCK2 增加, 一方面可使海马内细胞骨架蛋白 F-actin 解聚为 G-actin, 减少长时程增强, 降低突触稳定性^[9]; 另一方面, 可使神经调素 GAP43 的表达降低, 抑制突触发生^[10]。本研究结果显示, POCD 老年小鼠 NogoA-NgR1 通路活化介导 RhoA-ROCK2 增加, 使 GAP43 表达降低, 进而导致突触再生障碍; 而使用 NEP1-40 后可降低 RhoA-ROCK2 的活化, 增加 GAP43 的表达, 增加突触可塑性。

综上所述, 老年小鼠的认知功能损害与其海马内 NogoA-NgR1 通路的过度激活有关。

参 考 文 献

- [1] 张真真, 纪木火, 杨建军. 术后认知功能障碍生物标记物的研究进展. 临床麻醉学杂志, 2016, 32(6): 616-620.
- [2] Delekate A, Zagrebelsky M, Kramer S, et al. NogoA restricts synaptic plasticity in the adult hippocampus on a fast time scale. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(6): 2569-2574.
- [3] Karlén A, Karlsson TE, Mattsson A, et al. Nogo receptor 1 regulates formation of lasting memories. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(48): 20476-20481.
- [4] Zemmar A, Weinmann O, Kellner Y, et al. Neutralization of Nogo-A enhances synaptic plasticity in the rodent motor cortex and improves motor learning in vivo. J Neurosci, 2014, 34(26): 8685-8698.
- [5] Jia M, Liu WX, Sun HL, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, attenuates postoperative cognitive dysfunction in aging mice. Front Mol Neurosci, 2015, 8: 52.
- [6] Karlsson TE, Smedfors G, Brodin AT, et al. NgR1: a tunable sensor regulating memory formation, synaptic, and dendritic plasticity. Cereb Cortex, 2016, 26(4): 1804-1817.
- [7] Tong J, Liu W, Wang X, et al. Inhibition of Nogo-66 receptor 1 enhances recovery of cognitive function after traumatic brain injury in mice. J Neurotrauma, 2013, 30(4): 247-258.
- [8] Grasselli G, Strata P. Structural plasticity of climbing fibers and the growth-associated protein GAP-43. Front Neural Circuits, 2013, 7: 25.
- [9] Iobbi C, Korte M, Zagrebelsky M. Nogo-66 restricts synaptic strengthening via Lingo1 and the ROCK2-Cofilin pathway to control actin dynamics. Cereb Cortex, 2016, pii: bhwt22.
- [10] Koch JC, Tönges L, Michel U, et al. Viral vector-mediated down-regulation of RhoA increases survival and axonal regeneration of retinal ganglion cells. Front Cell Neurosci, 2014, 8: 273.

(收稿日期: 2017-03-31)