

· 实验研究 ·

金刚烷胺减轻海马炎症反应和细胞凋亡在小鼠术后认知功能障碍中的治疗作用

孙啸云 邱丽丽 徐建国 沈锦春

【摘要】 目的 探讨非竞争性 N-甲基-M-天冬氨酸受体拮抗剂金刚烷胺对术后认知功能障碍 (POCD) 的治疗作用及可能机制。方法 雄性 C57BL/6 小鼠 54 只, 16 月龄, 体重 35~40 g, 随机分为三组, 每组 18 只: 对照组 (CV 组)、七氟醚麻醉+剖腹探查+溶剂组 (PV 组)、七氟醚麻醉+剖腹探查+金刚烷胺组 (PA 组)。采用七氟醚麻醉+剖腹探查术建立 POCD 动物模型。PA 组于麻醉前腹腔注射金刚烷胺 25 mg/kg, 之后每日注射一次直到术后第 2 天; 另外两组注射等容量溶剂。术后第 6 天行旷场实验, 第 7 天行条件性恐惧实验训练, 第 8 天行条件性恐惧测试。术后第 1 天采用 Western blot 检测海马组织白细胞介素-1 β (IL-1 β) 和活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved caspase-3) 含量, 免疫荧光染色结合图像分析技术检测神经核抗原 (NeuN) 阳性细胞数量。结果 三组总探索路程和中央格停留时间差异无统计学意义。与 CV 组比较, PV 组僵直时间明显缩短, IL-1 β 、cleaved caspase-3 含量明显升高, NeuN 阳性细胞数量明显减少 ($P < 0.05$)。与 PV 组比较, PA 组僵直时间明显延长, IL-1 β 、cleaved caspase-3 含量明显降低, NeuN 阳性细胞数量明显增多 ($P < 0.05$)。结论 金刚烷胺可能通过减少海马炎症反应和细胞凋亡来改善 POCD。

【关键词】 术后认知功能障碍; 金刚烷胺; 海马; 炎症; 凋亡

Role of amantadine alleviating hippocampal inflammation and apoptosis in postoperative cognitive dysfunction in mice SUN Xiaoyun, QIU Lili, XU Jianguo, SHEN Jinchun. Department of Anesthesiology, Jinling Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210002, China
Corresponding author: SHEN Jinchun, Email: yyshen0203@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the therapeutic effect and possible mechanisms of non-competitive N-methyl-M-aspartate receptor antagonist amantadine on postoperative cognitive dysfunction (POCD). **Methods** Fifty-four male C57BL/6 mice, aged 16 months, weighing 30–40 g, were randomly divided into three groups ($n = 18$): control group (group CV), sevoflurane anesthesia+surgery+vehicle group (group PV), sevoflurane anesthesia+surgery+amantadine group (group PA). POCD animal model was established by sevoflurane anesthesia and exploratory laparotomy. In group PA, mice were intraperitoneally injected with amantadine 25 mg/kg before anesthesia, and then injected once a day till the second day after surgery. The mice in the other two groups were injected with an equal volume of vehicle. Open field was performed on the 6th day after surgery, the training of fear conditioning was performed on the 7th day, and the contextual fear conditioning test was performed on the 8th day. The hippocampus tissues of some mice were collected on the first day after surgery. The expressions of interleukin-1 β (IL-1 β) and cleaved caspase-3 were detected by Western blot. The number of NeuN positive cells was detected by using immunofluorescence staining combined image analysis technique. **Results** No significant difference was observed in the total travel distance and the time spent in the center of the area between the three groups. Compared with group CV, the freezing time to context was significantly decreased while the expressions of IL-1 β and cleaved caspase-3 were significantly increased and the number of NeuN positive cells decreased in the hippocampus in group PV ($P < 0.05$). Compared with group PV, the freezing time to context was significantly increased while the expressions of IL-1 β and cleaved caspase-3 were significantly decreased and the number of NeuN positive cells increased in the hippocampus in group PA ($P < 0.05$). **Conclusion** AMA may improve the cognitive impairment by alleviating hippocampal inflammation and apoptosis.

【Key words】 Postoperative cognitive dysfunction; Amantadine; Hippocampus; Inflammation; Apoptosis

DOI: 10.12089/jca.2019.10.017

基金项目: 国家自然科学基金 (81600950)

作者单位: 210002 南京大学医学院附属金陵医院麻醉科 (孙啸云、徐建国、沈锦春); 东南大学附属中大医院麻醉科 (邱丽丽)

通信作者: 沈锦春, Email: yyshen0203@163.com

术后认知功能障碍(postoperative cognitive dysfunction, POCD)是麻醉手术后常见的神经系统并发症,主要表现为认知功能下降、人格、社交能力等的改变^[1-2]。最近,国际该领域的专家讨论将 POCD 更名为围术期神经认知障碍(perioperative neurocognitive disorders, PND),建议用 PND 描述术前与术后 12 个月内发生的,包含术后谵妄在内的所有围术期认知功能改变^[3]。本实验研究中只研究术后出现的以学习和记忆能力下降为主要表现的神经认知障碍,故仍用 POCD。POCD 增加术后并发症和死亡率,降低生活质量,延长住院时间,给患者家庭及社会带来沉重负担,而 POCD 的发病机制目前尚不明确^[4]。

近来有研究表明,手术或麻醉引起的神经炎症和细胞凋亡是 POCD 发生的主要原因^[5-7]。金刚烷胺(AMA)是非竞争性 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体拮抗剂,具有多巴胺能和去甲肾上腺素能作用,最初被用作抗病毒药物,现其临床应用已扩展到很多领域,如帕金森病和外伤性脑损伤,可改善患者预后^[8-11]。近年来,大量研究表明,AMA 具有明显的神经保护作用^[7-11]。Zhang 等^[7]已证实 AMA 对 POCD 具有显著改善作用,其机制可能与抑制海马小胶质细胞活化和神经炎症反应相关。本研究以该篇文章为基础,检测关键炎症因子 IL-1 β ,同时进一步探讨 AMA 是否可通过缓解细胞凋亡来改善 POCD,为临床应用提供依据。

材料与方法

实验动物与分组 雄性 C57BL/6 小鼠 54 只,16 月龄,体重 35~40 g,由东部战区总医院比较医学科提供,随机分为三组:对照组(CV 组)、七氟醚麻醉+剖腹探查+溶剂组(PV 组)、七氟醚麻醉+剖腹探查+AMA 组(PA 组)。PA 组于麻醉前腹腔注射 AMA 25 mg/kg,之后每日注射一次直到术后第 2 天;另外两组注射等容量的溶剂。

POCD 模型建立 采用七氟醚麻醉+剖腹探查建立 POCD 模型,参考本课题组前期实验^[4]。用 3%七氟醚(批号:18101831)+100% O₂ 预充透明半封闭麻醉箱 30 min,然后将 PV 和 PA 组小鼠放入箱内,维持麻醉 30 min。麻醉后进行手术消毒,取腹正中线约 1.5 cm 切口,开始腹腔探查,手术约持续 10 min。最后用无菌丝线缝合肌肉筋膜及皮肤。CV 组持续吸入 100% O₂,除注射溶剂外不进行任何处理。通过后期行为学测试发现模型组小鼠整体认知表现下降,表明 POCD 模型制备成功。

旷场实验 每组取 12 只小鼠,术后第 6 天做旷场实验,观察小鼠的运动和探索行为。实验在安静的环境下进行。将小鼠放入白色无顶不透明塑料箱(40 cm×40 cm×40 cm)的中部,同时进行摄像和计时,观察时间为 5 min,记录其总探索路程和中央格停留时间。计算三组中央格停留时间占总观察时间的比例。每次实验结束后清洗场地。

条件性恐惧实验 分训练和测试两阶段。术后第 7 天上述小鼠做条件性恐惧实验训练。采用底部为铜条栅栏可通电的斯金纳箱(30 cm×30 cm×45 cm),将小鼠放入其中适应 3 min,给予 30 s 的声音刺激(70 dB,3 000 Hz),刺激的最后 2 s 给予足底电击(0.75 mA),后继续停留 30 s 后放回饲养笼。

24 h 后(术后第 8 d)做场景性条件恐惧测试:将小鼠再次放入箱内,不予刺激,观察 5 min 内僵直反应时间。计算三组僵直反应时间占总观察时间的比例。每次实验结束后清洗场地。

Western blot 检测 术后第 1 天取每组剩余 6 只小鼠海马组织。加裂解液,冰上裂解 30 min,4 ℃离心(12 000 r/min,15 min),取上清,Braford 法测蛋白浓度后煮 5 min。凝胶电泳分离,转膜,室温摇动封闭 1 h。加一抗 4 ℃过夜,TBST 漂洗三次后加二抗,室温孵育 1 h,漂洗、底物显色反应、显影。采用 Image J 软件检测海马组织白细胞介素-1 β (IL-1 β)活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cleaved caspase-3)含量。IL-1 β 抗体购于美国 Abcam 公司,cleaved caspase-3 抗体购于美国 CST 公司。

免疫荧光染色和图像处理 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液修复神经核抗原(NeuN)20 min,10%羊血清封闭后滴加一抗(NeuN 抗体,兔抗,1:500),将上述行 Western blot 检测的小鼠脑片置于湿盒中 4 ℃孵育过夜。0.01 mol/L PBS 洗涤后滴加二抗(山羊抗兔,1:500),室温孵育 2 h,0.01 mol/L PBS 洗涤,DAPI 封片。用荧光显微镜拍摄,NeuN 阳性细胞呈现绿色荧光。采用 Image J 软件分析相对 CV 组的 NeuN 阳性细胞数量的变化。NeuN 抗体购于 Proteintech 公司。

统计分析 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。正态分布计量资料以均数 \pm 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

旷场试验 三组总探索路程及中央格停留时间差异无统计学意义(图 1—2)。

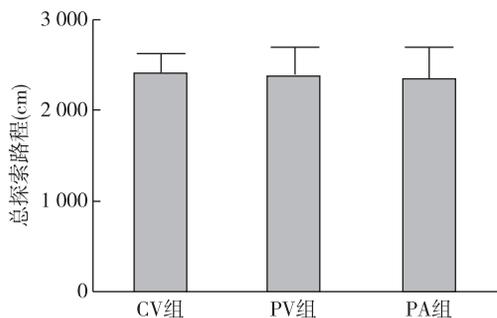


图 1 三组小鼠总探索路程的比较

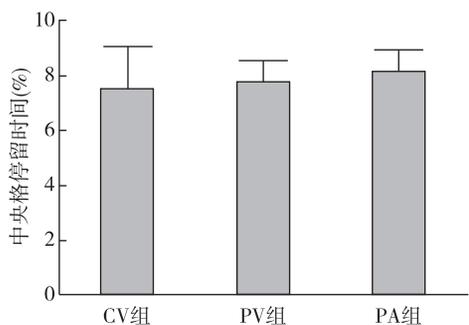
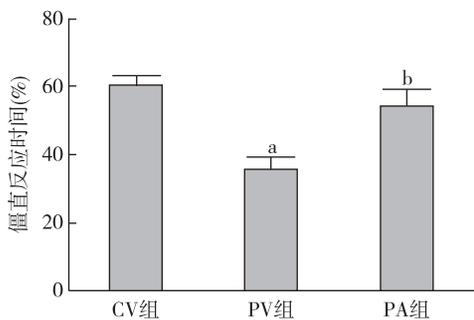


图 2 三组小鼠中央格停留时间的比较

条件性恐惧实验 与 CV 组比较, PV 组僵直反应时间明显缩短 ($P < 0.05$)。与 PV 组比较, PA 组僵直反应时间明显延长 ($P < 0.05$) (图 3)。

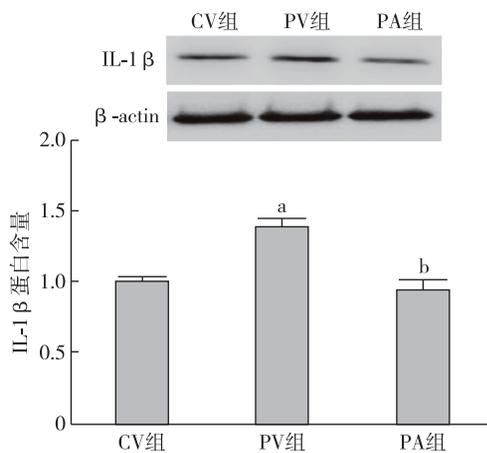


注:与 CV 组比较,^a $P < 0.05$;与 PV 组比较,^b $P < 0.05$

图 3 三组小鼠僵直反应时间的比较

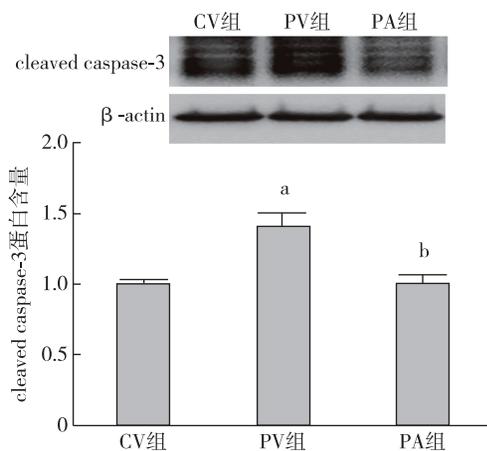
Western blot 检测 与 CV 组比较, PV 组海马组织 IL-1 β 、cleaved caspase-3 含量明显升高 ($P < 0.05$)。与 PV 组比较, PA 组海马组织 IL-1 β 、cleaved caspase-3 含量明显降低 ($P < 0.05$)。CV 组和 PA 组海马组织 IL-1 β 、cleaved caspase-3 含量差异无统计学意义 (图 4—5)。

免疫荧光染色和图像处理 与 CV 组比较, PV 组海马组织 NeuN 阳性细胞数量明显减少 ($P < 0.05$)。与 PV 组比较, PA 组海马组织 NeuN 阳性



注:与 CV 组比较,^a $P < 0.05$;与 PV 组比较,^b $P < 0.05$

图 4 三组小鼠海马组织 IL-1 β 含量的比较



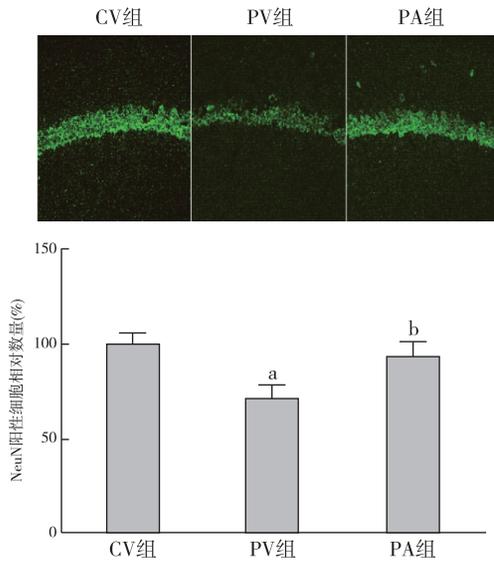
注:与 CV 组比较,^a $P < 0.05$;与 PV 组比较,^b $P < 0.05$

图 5 三组小鼠海马组织 cleaved caspase-3 含量的比较

细胞数量明显增多 ($P < 0.05$)。CV 组和 PA 组海马组织 NeuN 阳性细胞数量差异无统计学意义 (图 6)。

讨 论

本研究结果显示,麻醉手术后第 1 天小鼠海马组织 IL-1 β 、cleaved caspase-3 含量明显升高, NeuN 阳性细胞数量减少,提示麻醉手术会增加海马炎症反应和细胞凋亡,并减少神经元的数量。麻醉手术后第 8 天小鼠条件性恐惧实验中僵直反应时间明显缩短,表明损害海马依赖性记忆。但是给予 AMA 治疗后 IL-1 β 、cleaved caspase-3 含量明显降低, NeuN 阳性细胞数量增多,小鼠场景性条件恐惧实验中僵直反应时间明显延长,说明 AMA 可能通过抑制海马内炎症反应和细胞凋亡,发挥保护神经元



注:与 CV 组比较,^a $P < 0.05$;与 PV 组比较,^b $P < 0.05$

图 6 三组小鼠海马组织 NeuN 阳性细胞数量的比较

的作用,进而改善术后认知功能损伤。AMA 可减轻麻醉手术引起的学习和记忆障碍,这一发现是 AMA 可用于 POCD 治疗的初步证据。

AMA 是一种三环癸烷氨基衍生物,最早主要用于流行性感的治疗和预防,后来发现其具有治疗帕金森病的作用,其可能的机制是促进纹状体内多巴胺能神经末梢释放多巴胺(dopamine, DA);另外,AMA 还是非竞争性 NMDA 受体拮抗剂,并具有去甲肾上腺素能作用^[8-9]。AMA 具有神经保护作用,早期的研究发现它可通过拮抗 NMDA 受体对神经元产生影响^[10-11]。之后有研究表明,在小胶质细胞培养或小鼠中,AMA 可减轻脂多糖引起的神经炎症反应^[12-13]。先前已有研究表明,神经炎症和细胞凋亡可能是术后认知功能障碍的重要机制之一^[14-15],因此,本研究在验证这一机制的同时提出假设,AMA 是否可通过抗炎抗凋亡来减轻 POCD。与先前研究一致,麻醉手术增加了小鼠海马组织炎症因子 IL-1 β 和凋亡因子 cleaved caspase-3 的水平,减少了 NeuN 阳性细胞数量。

关于 AMA 如何减轻神经炎症和减少细胞凋亡,知之甚少。有文献报道,AMA 可诱导胶质细胞源性生长因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)的产生,GDNF 可能是 AMA 抗神经炎症作用的一种可能介质,GDNF 降低脂多糖诱导的 p65 核易位和 IL-1 β 的产生,p65 是核转录因子 κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 的组成部分,当与 kappa B 抑制分子(inhibitor-kappa B, I κ B) 结合时,

NF- κ B 的成分通常在胞质中,当 NF- κ B 的成分与 I κ B 分离时,它就会被激活并转移到细胞核中来上调各种炎症介质的表达,造成认知功能损伤^[7]。同时也有研究表明,持续表达的 IL-1 β 还可促进 T 细胞和 B 细胞活化,诱导 TNF- α 、IL-6 等炎症因子的产生,激活炎症级联反应,引起脑水肿和神经元坏死,并且 IL-1 β 也是一种促凋亡的因子,IL-1 β 可通过线粒体途径促进人退行性髓核细胞凋亡,小鼠的矽肺模型细胞凋亡由 IL-1 β 通过 NO 途径来介导^[16]。GDNF 在 AMA 抗神经炎症和细胞凋亡中的作用有待更多的研究予以证实。对于检测炎症和凋亡反应,本实验参照以往大部分研究^[7,16] 只选取了术后第 1 天这一代表性的时间点,主要因为术后第 1 天炎症和凋亡反应较为严重。

本研究也存在一些局限性。首先,因为 POCD 发病机制尚未完全清楚,从目前研究水平来看,建立 POCD 模型缺乏金标准,但国内外学者倾向于通过动物组间行为学差异来判断认知功能的改变^[17]。POCD 常用到的动物模型包括剖腹探查术、胫骨平台骨折术、颈动脉暴露术等。因本课题组一直沿用剖腹探查术作为 POCD 动物模型,造模技术已经较为成熟和稳定,所以本研究继续应用该模型。此外,本研究中使用雄性动物以避免雌激素和孕酮对雌性小鼠学习和记忆的潜在影响,因此 AMA 对麻醉手术后雌性小鼠认知功能的影响尚不清楚。其次,本研究中炎症反应和细胞凋亡的分析指标较少,因已有实验表明在术后 6、24 h,AMA 可阻断 POCD 模型大鼠海马 IL-1 β 和 IL-6 表达增加^[7],而且中枢炎症细胞因子 IL-1 β 在接受各种应激后含量明显增多,与神经元损伤密切相关,所以本研究选取 IL-1 β 这一关键性的炎症因子予以验证。目前认为 caspase-3 在细胞凋亡中的作用非常关键,它在生理状态下以缺乏活性的酶原形式存在,其活化是细胞凋亡的必经之路^[18],因此可通过检测 caspase-3 的活性判断细胞是否凋亡。同时,本研究应用免疫荧光检测 NeuN,发现 POCD 模型组海马组织 NeuN 数量明显减少,加上 caspase-3 表达的增强,可间接表明麻醉手术后神经元的凋亡增加^[19]。而给予 AMA 后可明显改善上述变化,这也再一次验证 AMA 的神经保护作用。最后,本研究未探讨 AMA 减轻海马神经炎症以及细胞凋亡的具体通路,需未来更多研究进一步证实。

综上所述,本研究观察到雄性小鼠在剖腹探查术后出现学习和记忆障碍,AMA 可通过抑制海马神

经炎症反应和细胞凋亡,进而改善海马依赖性记忆,这可能为研究 POCD 的发病机制及其防治提供新的参考。

参 考 文 献

- [1] Skvarc DR, Berk M, Byrne LK, et al. Post-operative cognitive dysfunction: an exploration of the inflammatory hypothesis and novel therapies. *Neurosci Biobehav Rev*, 2018, 84: 116-133.
- [2] Leslie M. The post-op brain. *Science*, 2017, 356 (6341): 898-900.
- [3] Evered L, Silbert B, Knopman DS, et al. Recommendations for the nomenclature of cognitive change associated with anaesthesia and surgery-2018. *Anesthesiology*, 2018, 129(5): 872-879.
- [4] 邱丽丽, 纪木火, 张慧, 等. NADPH 氧化酶下调海马内微清蛋白表达在老年小鼠术后认知功能障碍中的作用. *临床麻醉学杂志*, 2015, 31(5): 481-484.
- [5] Qiu LL, Ji MH, Zhang H, et al. NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species in the hippocampus might contribute to microglial activation in postoperative cognitive dysfunction in aged mice. *Brain Behav Immun*, 2016, 51: 109-118.
- [6] Safavynia SA, Goldstein PA. The role of neuroinflammation in postoperative cognitive dysfunction: moving from hypothesis to treatment. *Front Psychiatry*, 2018, 9: 752.
- [7] Zhang J, Tan H, Jiang W, et al. Amantadine alleviates postoperative cognitive dysfunction possibly by increasing glial cell line-derived neurotrophic factor in rats. *Anesthesiology*, 2014, 121(4): 773-785.
- [8] Raupp-Barcaro IF, Vital MA, Galduróz JC, et al. Potential antidepressant effect of amantadine: a review of preclinical studies and clinical trials. *Braz J Psychiatry*, 2018, 40(4): 449-458.
- [9] Yu M, Zhang Y, Chen X, et al. Antidepressant-like effects and possible mechanisms of amantadine on cognitive and synaptic deficits in a rat model of chronic stress. *Stress*, 2016, 19(1): 104-113.
- [10] Blanpied TA, Clarke RJ, Johnson JW. Amantadine inhibits NMDA receptors by accelerating channel closure during channel block. *J Neurosci*, 2005, 25(13): 3312-3322.
- [11] Giacino JT, Whyte J, Bagiella E, et al. Placebo-controlled trial of amantadine for severe traumatic brain injury. *N Engl J Med*, 2012, 366(9): 819-826.
- [12] Kim JH, Lee HW, Hwang J, et al. Microglia-inhibiting activity of Parkinson's disease drug amantadine. *Neurobiol Aging*, 2012, 33(9): 2145-2159.
- [13] Ossola B, Schendzielorz N, Chen SH, et al. Amantadine protects dopamine neurons by a dual action: reducing activation of microglia and inducing expression of GDNF in astroglia [corrected]. *Neuropharmacology*, 2011, 61(4): 574-582.
- [14] Zhang J, Dong Y, Zhou C, et al. Anesthetic sevoflurane reduces levels of hippocalcin and postsynaptic density protein 95. *Mol Neurobiol*, 2015, 51(3): 853-863.
- [15] Glushakov AO, Glushakova OY, Korol TY, et al. Chronic upregulation of cleaved-caspase-3 associated with chronic myelin pathology and microvascular reorganization in the thalamus after traumatic brain injury in rats. *IntJ Mol Sci*, 2018, 19(10): E3151.
- [16] 郝海珍, 郭铁, 余丹. 脂肪间充质干细胞来源外泌体对 MCAO 大鼠神经元凋亡及炎症因子影响. *第三军医大学学报*, 2019, 41(17): 1656-1665.
- [17] 曹剑, 李鹏, 易斌, 等. 老年和成年大鼠术后认知功能障碍模型的建立与比较. *重庆医学*, 2010, 39(17): 2292-2296.
- [18] 何玉婷, 杨雯, 王改琴, 等. 细胞凋亡主要检测方法及其应用. *医学综述*, 2019, 25(4): 774-778.
- [19] 龙建飞, 张弛, 张秋霞, 等. 黄连解毒汤有效部位对脑缺血大鼠半暗带神经元 NeuN、Caspase-3、PARP 表达的影响. *北京中医药大学学报*, 2014, 37(2): 90-93.

(收稿日期:2019-01-15)