

· 基础研究 ·

姜黄素通过激活海马神经元自噬抑制
七氟醚诱导的小鼠记忆提取障碍黄 健[△] 雍 俊 王冬婷 余玉琦 周 菁 高 鸿

摘要 目的 观察姜黄素通过激活海马神经元自噬在七氟醚诱导成年小鼠记忆提取障碍中的作用。**方法** 将 120 只成年昆明小鼠随机分为对照组(Con 组)、七氟醚组(Sev 组)及七氟醚+姜黄素组(Cur 组),每组 40 只。Cur 组小鼠腹腔注射姜黄素 300 mg/(kg·d),连续 6 d,Con 组和 Sev 组注射等容积二甲基亚砜和生理盐水混合液,之后 Sev 组、Cur 组吸入 3.3% 七氟醚 2 h,Con 组吸入 40% O₂ 2 h。三组小鼠于停止吸入后 12、24、48、72 h 采用 Western Blot 法检测海马自噬相关蛋白 P62、LC3-I 和 LC3-II 表达,计算 LC3-II/LC3-I 比值。**结果** 与 Con 组比较,Sev 组吸入七氟醚后 12、24 h P62 表达上调,LC3-II 表达下调,吸入七氟醚后 12、24、48 h LC3-II/LC3-I 比值降低($P < 0.05$)。与 Sev 组比较,Cur 组吸入七氟醚后 12、24 h P62 表达下调,LC3-II 表达上调,吸入七氟醚后 12、24、48 h LC3-II/LC3-I 比值升高($P < 0.05$)。**结论** 姜黄素可改善七氟醚诱导的成年小鼠记忆提取障碍,其机制可能与激活海马神经元自噬有关。

关键词 姜黄素;七氟醚;记忆提取;自噬;成年小鼠

Curcumin Inhibits Memory Retrieval Dysfunction in Adult Mice Induced by Sevoflurane via Activation of Autophagy in Hippocampal Neurons HUANG Jian, YONG Jun, WANG Dong-ting, SHE Yu-qi, ZHOU Jing, and GAO Hong School of Anesthesia, Guizhou Medical University, Guiyang(550004)

ABSTRACT Objective To study the effect of curcumin on memory retrieval dysfunction in adult mice induced by sevoflurane through the activation of autophagy in hippocampal neurons. **Methods** Totally 120 adult KM mice were randomly divided into three groups: the control group (group Con), the sevoflurane group (group Sev) and the sevoflurane and curcumin group (group Cur), 40 in each group. Mice in group Cur received curcumin (300 mg·kg⁻¹·d⁻¹) by intraperitoneal injection for six consecutive days, while mice in group Con and Sev received mixed isometric liquids of dimethyl sulfoxide and normal saline, then mice in group Sev and group Cur were exposed to 3.3% sevoflurane for 2 h, and mice in group Con inhaled 40% O₂ for 2 h. At 12 h, 24 h, 48 h, 72 h after inhalation, Western Blot was used to determine the expression of autophagy related proteins P62, LC3-I and LC3-II in hippocampus, and the ratio of LC3-II/LC3-I was calculated. **Results** Compared with group Con at 12 h and 24 h after inhalation, the expression of P62 was up-regulated, while the expression of LC3-II was down-regulated, and then at 12 h, 24 h and 48 h, the ratio of LC3-II/LC3-I in group Sev was decreased ($P < 0.05$). Compared with group Sev at 12 h and 24 h after the inhalation of sevoflurane, the expression of P62 was down-regulated, and the expression of LC3-II was up-regulated, and at 12 h, 24 h and 48 h the ratio of LC3-II/LC3-I was increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Pre-administration of curcumin can improve sevoflurane-induced short-term memory retrieval dysfunction of adult mice, which may be related to the activation of autophagy in hippocampal neurons.

KEYWORDS curcumin; sevoflurane; memory retrieval; autophagy; adult mice

基金项目:贵州省中医药管理局基金资助项目(No. QZYY2017-032);贵州省教育厅自然科学基金资助项目[No. 黔教科(2011)038号]

作者单位:贵州医科大学麻醉学院(贵阳 550004)

通讯作者:高 鸿, Tel: 0851-84851637, E-mail: 2169617@qq.com

[△]现在贵州省第三人民医院麻醉科(贵阳 550008)

DOI: 10.7661/j.cjim.20190321.003

七氟醚与其他吸入麻醉药相比具有众多优点,被广泛应用于全麻诱导和维持,但有研究表明七氟醚可导致成年小鼠短期学习记忆能力受损,表现为记忆提取障碍^[1,2]。记忆是产生认知的基础,记忆分为编码、储存和提取,记忆提取过程与海马神经元自噬功能有密切相关性^[3]。抑制自噬可引起七氟醚诱导老年大鼠的神经细胞凋亡及认知功能损伤^[4],而激活自噬和 AMPK 信号通路可减弱神经细胞凋亡,从而改善学习记忆能力下降^[5]。姜黄素(Curcumin)是一种小分子植物酸性多酚,易透过血脑屏障进入中枢神经系统,具有激活自噬、抑制细胞凋亡、抗炎和抗氧化等多种药理学特性^[6]。本课题组前期研究已证实,姜黄素可改善七氟醚对成年小鼠记忆提取能力的影响,但具体机制尚不清楚^[7],本研究探讨姜黄素是否可以通过激活自噬改善七氟醚引起成年小鼠记忆提取障碍。

材料与方法

1 动物 健康清洁级昆明小鼠 120 只,2~3 月龄,雌雄各半,体质量(33.0 ± 1.8)g,由贵州医科大学实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(黔)2012-0001。适应性饲养 3 日,实验室温度维持(24 ± 1)℃,湿度 60%~80%,每笼 6 只,分笼饲养,饲料为标准固体鼠粮,自由饮水。每日 17:00-19:00 在隔音环境中进行避暗实验。本实验通过贵州医科大学动物实验中心伦理审查(No. 1607016),实验过程遵守实验动物福利伦理原则。

2 药物 姜黄素,天津思朗科技发展有限公司生产,货号:C7090,纯度 $\geq 95\%$,由植物姜黄根茎提取。

3 试剂及仪器 七氟醚(艾伯维医药贸易有限公司生产,货号:H20080681),兔抗鼠 LC3-I/II 抗体(货号:bs11731R)、兔抗鼠 P62 抗体(货号:bs2951R)购自北京博奥森生物技术有限公司,BCA 蛋白分析盒(美国 Thermo 公司)。PAT-8M 避暗仪(成都泰盟科技有限公司生产),Watoex65 麻醉机(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司生产),麻醉气体浓度分析仪(德国 Drager 公司),Bene ViewT8 脉搏氧饱和度监测仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司生产)。

4 动物分组及干预方法 将 120 只小鼠按随机数字表法分为对照组(Con 组)、七氟醚组(Sev 组)和七氟醚加姜黄素组(Cur 组),每组 40 只。吸入麻醉前 6 日,Cur 组小鼠腹腔注射姜黄素 $300 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,连续 6 日;Con 组和 Sev 组注射等容积二甲基亚砜和生理盐水混合液^[8]。麻醉方法:自制麻醉箱(长 45 cm ×

宽 30 cm × 高 30 cm),箱底铺薄层钙石灰,箱内持续输送 5% 七氟醚,载气为 40% O_2 ,流量为 2 L/min,当测得出气口七氟醚浓度为 3.3%,箱内浓度平衡后,迅速将实验小鼠置入箱内,维持 3.3% 七氟醚麻醉 2 h,同时监测心率、呼吸频率及脉搏氧饱和度,观察小鼠口唇及趾端颜色^[9]。麻醉结束后,小鼠在麻醉箱中继续供氧 30 min 翻正反射恢复后取出。Con 组小鼠在自制麻醉箱中持续吸入 40% O_2 2 h。

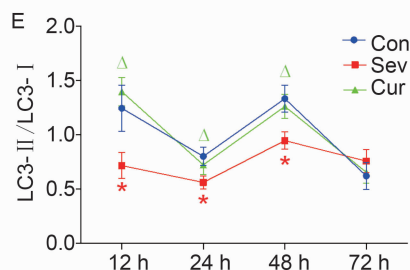
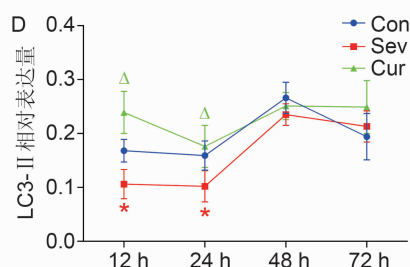
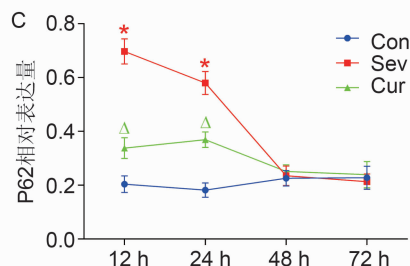
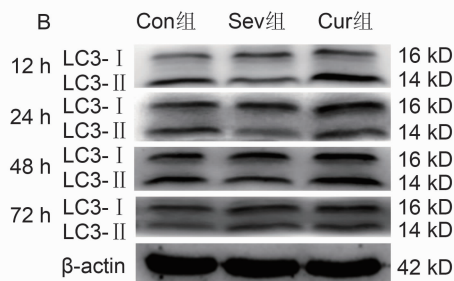
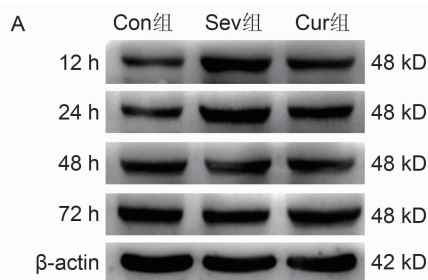
5 检测指标及方法 三组小鼠于停止吸入七氟醚后 12、24、48、72 h,采用 Western Blot 检测海马自噬相关蛋白 LC3-I、LC3-II 及 P62 表达。将小鼠以颈椎脱臼法处死,在冰上迅速开颅取脑,分离海马组织,称重后加入裂解酶和蛋白裂解液。海马组织匀浆,4℃ 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,采用 BCA 法蛋白定量。加入上样缓冲液,95℃ 煮沸 5 min,用 10% 丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白后转移至 PVDF 膜上,室温封闭 1 h。分别加入 LC3-I 抗(稀释度 1:1 000)、P62 一抗(稀释度 1:1 000)和 β -actin(稀释度 1:1 000),4℃ 孵育过夜。TBST 洗膜 10 min × 3 次后,加入辣根酶标记的二抗(稀释度 1:10 000),室温下摇床上孵育 1 h,反应后用胶片显影。用 Image J 软件扫描测定条带吸光度值。以目的蛋白条带灰度值与内参 β -actin 条带灰度值的比值反映 LC3-I、LC3-II 和 P62 的表达水平,并计算 LC3-II/LC3-I 比值。

6 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,检验方差齐性后($P > 0.1$),组间比较采用单因素方差分析,组内不同时点比较采用重复测量方差分析,两两比较采用 LSD 法; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组一般情况比较 各组小鼠在干预和检测期间均未见异常,精神状态良好、灵敏好动、毛发光泽、体重逐渐增加、粪便呈褐色干燥球状。所有实验小鼠经趋暗训练后,步入潜伏期均 $< 60 \text{ s}$,电击后 24 h 测步入潜伏期均 $> 120 \text{ s}$,成功建立避暗记忆。Sev 组、Cur 组吸入七氟醚过程中无小鼠死亡,避暗实验过程中 Con 组 12 h 和 Cur 组 48 h 各有 2 只小鼠死亡,均为雄鼠,身体可见多处咬伤痕迹,疑似外伤致死。

2 各组 P62、LC3-I 和 LC3-II 蛋白表达比较(图 1) 与 Con 组比较,Sev 组吸入七氟醚后 12、24 h P62 表达上调,LC3-II 表达下调,吸入七氟醚后 12、24、48 h LC3-II/LC3-I 比值降低($P < 0.05$)。与 Sev 组比较,Cur 组吸入七氟醚后 12、24 h P62 表



注:A 为各组 P62 蛋白印迹图;B 为各组 LC3-I、LC3-II 蛋白印迹图;C、D、E 为各组不同时点 P62、LC3-I 和 LC3-II 表达的定量分析;与 Con 组比较, * $P < 0.05$;与 Sev 组比较, $\Delta P < 0.05$

图1 各组小鼠自噬相关性蛋白 P62、LC3-I 和 LC3-II 表达比较

达下调, LC3-II 表达上调,吸入七氟醚后 12、24、48 h LC3-II/LC3-I 比值升高($P < 0.05$)。

讨 论

学习记忆是脑的高级认知功能,因创伤、疾病或麻醉药物导致的逆行性遗忘一直备受关注。麻醉后的患者对过往事件的回忆,正是处于记忆提取阶段,记忆提取过程是形成稳定记忆的关键,研究麻醉药物对已储存记忆再提取的影响极其重要^[10]。

海马是与啮齿类动物记忆密切相关的记忆中枢,损害海马及其相关结构会引起短期记忆受损,因此本研究以海马取材进行观察^[9]。LC3 和 P62 蛋白是目前公认的自噬标志性蛋白,其中 LC3 是哺乳动物细胞中常见的自噬小体标记蛋白,LC3 存在于细胞内的两种形式为 LC3-I 和 LC3-II;而 P62 是一种在胞质中合成位于细胞核的蛋白,作为自噬的特定底物,当自噬被激活时,LC3-II 的表达增多,LC3-II/LC3-I 比值升高, P62 的表达降低;相反,当自噬功能受损或缺失,其蛋白表达也相应变化,因此,LC3 和 P62 的表达可以反映自噬的活性^[11]。

本研究结果显示,3.3%七氟醚麻醉 2 h 使海马自噬 LC3-II 的表达下调、LC3-II/LC3-I 比值降低及 P62 的表达上调,证明了七氟醚诱导海马自噬功能,从而抑制小鼠记忆提取过程。有研究表明,七氟醚可通过激活 mTOR 通路,促进老龄和新生鼠海马神经元凋亡,抑制海马神经元自噬的功能,从而引起空间学习记忆能力受损和随后的认知功能下降;还可降低海马神经发生和神经元存活率、增加神经毒性,导致短暂记忆能力下降^[5,12]。因此,七氟醚诱导成年小鼠记忆提取障碍的机制可能与海马神经元自噬功能减弱有关。

临床研究显示姜黄素具有活性高、安全剂量范围大、不良反应小等特点,广泛用于神经退行性疾病和老年痴呆的防治^[13]。动物研究已表明姜黄素对中枢神经系统疾病具有神经保护作用,不仅能激活自噬,抑制细胞凋亡,减弱癫痫持续状态引起成年大鼠海马神经元损伤;还能下调 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,激活自噬,减轻海马神经元损害,从而改善 AD 模型大鼠的学习记忆能力^[14,15]。本研究给予姜黄素处理能够使小鼠海马自噬 LC3-II 的表达上调,LC3-II/LC3-I 比值升高及 P62 的表达下调,即激活海马神经元自噬,从而改善小鼠记忆提取能力。也有研究报道,姜黄素激活自噬,抑制 mTOR 信号通路,不仅可减弱乙醇引起大鼠神经毒性的发生发展,还可缓解吗啡诱导的记忆

障碍^[16,17]。因此,姜黄素激活自噬减弱七氟醚诱导小鼠记忆能力受损,其是否与下调 PI3K/Akt/mTOR 信号通路有关,有待进一步研究。本研究尚存在不足之处,如没有对自噬形态学观察,以及不同浓度的姜黄素、不同的给药途径和持续时间对成年小鼠记忆提取能力是否也有相同的影响,还需证实。

综上所述,姜黄素能够改善七氟醚诱导成年小鼠记忆提取障碍,其作用机制可能与激活海马神经元自噬有关。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] 王冬婷,高鸿,任益民,等.七氟醚对小鼠记忆提取的影响:海马 PSD95 和 AMPA 受体在其中的作用[J].中华麻醉学杂志,2018,38(2):150-154.
- [2] Xie H, She GM, Wang C, et al. The gender difference in effect of sevoflurane exposure on cognitive function and hippocampus neuronal apoptosis in rats[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(4): 647-657.
- [3] Roy DS, Arons A, Mitchell TI, et al. Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer's disease[J]. Nature, 2016, 531(7595): 508-512.
- [4] Zhang XM, Zhou YF, Xu MM, et al. Autophagy is involved in the sevoflurane anesthesia-induced cognitive dysfunction of aged rats[J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0153505.
- [5] Huang L, Huang KJ, Ning H. Autophagy induction by hispidulin provides protection against sevoflurane-induced neuronal apoptosis in aged rats[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 98: 460-468.
- [6] Lopresti AL. Curcumin for neuropsychiatric disorders: a review of *in vitro*, animal and human studies[J]. J Psychopharmacol, 2017, 31(3): 287-302.
- [7] 黄健,雍俊,宋庆迎,等.姜黄素预处理改善七氟醚引起的成年小鼠记忆提取障碍[J].贵州医科大学学报,2018,43(5):527-537.

- [8] 耿晓英,张爱香,骞健,等.姜黄素和脑源性神经营养因子对阿尔茨海默病记忆的改善作用[J].西安交通大学学报(医学版),2016,37(2):273-278.
- [9] Zhang J, Dong Y, Zhou C, et al. Anesthetic sevoflurane reduces levels of hippocampal calcineurin and postsynaptic density protein 95[J]. Mol Neurobiol, 2015, 51(3): 853-863.
- [10] Thomas SA. Neuromodulatory signaling in hippocampus-dependent memory retrieval[J]. Hippocampus, 2015, 25(4): 415-431.
- [11] Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) [J]. Autophagy, 2016, 12(1): 1-222.
- [12] Chen G, Gong M, Yan M, et al. Sevoflurane induces endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis in hippocampal neurons of aging rats[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57870.
- [13] Kocaadam B, Sanlier N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2017, 57(13): 2889-2895.
- [14] Wang J, Liu Y, Li X H, et al. Curcumin protects neuronal cells against status-epilepticus-induced hippocampal damage through induction of autophagy and inhibition of necroptosis[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2017, 95(5): 501-509.
- [15] Wang C, Zhang X, Teng Z, et al. Downregulation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in curcumin-induced autophagy in APP/PS1 double transgenic mice[J]. Eur J Pharmacol, 2014, 740: 312-320.
- [16] Chen G, Ke Z, Xu M, et al. Autophagy is a protective response to ethanol neurotoxicity[J]. Autophagy, 2012, 8(11): 1577-1589.
- [17] Pan J, He L, Li XP, et al. Activating autophagy in hippocampal cells alleviates the morphine-induced memory impairment [J]. Mol Neurobiol, 2016, 54(3): 1710-1724.

(收稿:2018-07-19 在线:2019-05-07)

责任编辑:赵芳芳