

盐酸纳美芬对七氟烷麻醉新生大鼠 MAPK/ERK/CREB 通路及海马神经元凋亡的影响

杨世宝 马金玉 (邵阳学院附属第二医院麻醉科 湖南邵阳 422000)

摘要 目的: 观察盐酸纳美芬(Nal)对七氟烷(Sev)麻醉新生大鼠学习能力及神经元凋亡的影响,并探究其对海马中丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)/细胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2)/cAMP反应元件结合蛋白(CREB)通路蛋白表达的影响。方法: 将新生大鼠随机分组为对照组、Sev组、Sev+Nal低剂量组、Sev+Nal高剂量组,每组18只。出生后第6、7、8天,Sev组予每天吸入1次2%七氟烷+60%氧气2h,每次麻醉前60min腹腔注射2ml·kg⁻¹生理盐水;Sev+Nal低剂量组和Sev+Nal高剂量组每天吸入1次2%七氟烷+60%氧气2h,每次麻醉前60min腹腔注射25和100μg·kg⁻¹纳美芬;对照组每天吸入1次60%氧气2h,每次麻醉前60min腹腔注射2ml·kg⁻¹生理盐水。出生第9天,每组随机选12只取海马组织,行HE、TUNEL、免疫荧光染色分析及Western blot检测。余下大鼠于出生后第30天行莫里斯水迷宫实验检测学习记忆能力。结果: 对照组海马神经元结构清晰;Sev组海马中出现较多萎缩和肿胀的神经元;Sev+Nal低剂量组和Sev+Nal高剂量组神经元形态较Sev组改善。与对照组相比,Sev组d₃₁~d₃₅潜伏期延长,d₃₆穿平台次数减少,突触素(SYN)、突触后致密物95(PSD95)、p-ERK1/2/ERK1/2、p-CREB/CREB、脑源性神经营养因子(BDNF)蛋白水平降低(P<0.05),凋亡神经元比例增加(P<0.05)。与Sev组相比,Sev+Nal低剂量组和Sev+Nal高剂量组d₃₁~d₃₅潜伏期均缩短,d₃₆穿平台次数增多,SYN、PSD95、p-ERK1/2/ERK1/2、p-CREB/CREB、BDNF蛋白水平增高(P<0.05),凋亡神经元比例降低(P<0.05)。Nal两个剂量组间各项指标差异无统计学意义(P>0.05)。结论: Nal可能通过激活MAPK/ERK/CREB通路,促进BDNF表达,改善Sev麻醉大鼠的神经元凋亡及突触可塑性,提高学习认知能力。

关键词 盐酸纳美芬;七氟烷;神经元凋亡;突触可塑性;细胞外信号调节激酶1/2;cAMP反应元件结合蛋白

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-049X(2021)09-1652-06

DOI: 10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2021.09.112

Effects of Nalmefene Hydrochloride on MAPK/ERK/CREB Pathway and Hippocampal Neuron Apoptosis in Neonatal Rats Anesthetized by Sevoflurane

Yang Shibao, Ma Jinyu (Department of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital of Shaoyang University, Hunan Shaoyang 422000, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effects of nalmefene hydrochloride (Nal) on learning ability and neuronal apoptosis in newborn rats anesthetized by sevoflurane (Sev), and to explore its effect on mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)/cAMP response element binding protein (CREB) pathway protein expression in hippocampus. **Methods:** Newborn rats were randomly divided into control group, Sev group, Sev+Nal low-dose group and Sev+Nal high-dose group with eighteen rats in each group. On the 6th, 7th, and 8th day after birth, Sev group received 2% sevoflurane+60% oxygen inhalation once a day for 2 hours, and intraperitoneally injected 2 ml·kg⁻¹ normal saline 60 minutes before each anesthesia; Sev+Nal low-dose group and Sev+Nal high-dose group inhaled 2% sevoflurane+60% oxygen once a day for 2 hours, and intraperitoneally injected 25 μg·kg⁻¹ and 100 μg·kg⁻¹ Nal into the abdominal cavity 60 minutes before each anesthesia; control group inhaled 60% oxygen once a day for 2 hours, and intraperitoneally injected 2 ml·kg⁻¹ of normal saline 60 minutes before each anesthesia. On the 9th day of birth, 12 rats in each group were randomly selected to withdraw hippocampus tissue and perform HE, TUNEL, immunofluorescence staining analysis and Western blot detection. The remaining rats underwent Morris water maze test on the 30th day after birth to detect their learning and memory ability. **Results:** The structure of hippocampal neurons in control group was clear; there were more atrophy and swelling neurons in the hippocampus of Sev group; the neuron morphology of Sev+Nal low-dose group and Sev+Nal high-dose group was better than that of Sev group. Compared with those in control group, the latency on d₃₁-d₃₅ in Sev group was prolonged, the number of platform crossings on d₃₆ was reduced, the levels of synaptophysin (SYN), postsynaptic density 95 (PSD95), p-ERK1/2/ERK1/2, p-CREB/CREB and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) proteins decreased (P<0.05), and the proportion of apoptotic neurons increased (P<0.05). Compared with those in Sev group, the latency on d₃₁-d₃₅ in Sev+Nal low-dose group and Sev+Nal high-dose group were shortened, and the number of platform crossings on d₃₆ was increased, the levels of SYN, PSD95, p-ERK1/2/ERK1/2, p-CREB/CREB and BDNF proteins increased (P<0.05), and the proportion of apoptotic neurons decreased (P<0.05). There were no statistically significant differences in the above indexes between Sev+Nal low-dose group and Sev+Nal high-dose group (P>0.05). **Conclusion:** Nal may activate MAPK/ERK/CREB pathway to promote the expression of BDNF, improve neuronal apoptosis and synap-

通信作者: 马金玉 Tel: 15211932064 E-mail: mjy198605@163.com

tic plasticity in Sev anesthetized rats, and improve learning and cognitive ability.

KEY WORDS Nalmefene hydrochloride; Sevoflurane; Neuronal apoptosis; Synaptic plasticity; Extracellular signal-regulated kinase 1/2; cAMP response element binding protein

七氟烷(sevoflurane, Sev)为一种吸入式麻醉药,广泛用于儿科手术,其麻醉效果平稳,刺激性低,且患儿苏醒快。最近研究表明,在大脑快速发育的婴幼儿期接触Sev可影响大脑发育,造成学习和记忆功能障碍^[1-2],该过程涉及神经细胞凋亡、神经递质紊乱及突触可塑性改变等多种机制^[3-4]。而寻找可预防或改善Sev对婴幼儿神经毒性的药物已成为临床麻醉医师关注的课题之一。盐酸纳美芬(nalmefene, Nal)作为特异性阿片类受体拮抗药,主要用于逆转阿片类药物的毒性,且对急性脑损伤等神经功能退化性疾病具有一定治疗作用^[5]。研究显示,Nal可以改善乙醇暴露所致脑区神经炎症并减轻神经毒性^[6]。然而Nal是否可减轻Sev导致的婴幼儿神经毒性及认知功能障碍,目前尚不清楚。本研究采用Sev麻醉新生大鼠,并观察Nal预处理对其学习记忆能力、神经元细胞凋亡及突触可塑性的影响,以期为临床提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

DM1000型荧光显微镜(德国Leica公司);XR-XM101型莫里斯水迷宫仪器(上海欣软信息科技有限公司)。

七氟烷(上海恒瑞医药有限公司,吸入用,规格:125 ml,批号:190801);盐酸纳美芬(西安利君制药有限公司,规格:1 ml:0.1 mg,批号:191024);TUNEL试剂盒、BCA试剂盒及HE试剂盒(上海生工生物公司,批号:E607181、C503021、E607318);兔源突触素(synaptophysin, SYN)、胞外信号调节激酶1/2(extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)抗体、山羊抗小鼠IgG(Alexa Fluor 647)抗体(美国Abcam公司,批号:ab52636、ab184699、ab108319、ab150115);小鼠源突触后致密物95(post synaptic density 95, PSD95)抗体、山羊抗兔IgG(Alexa Fluor 488)抗体(美国Invitrogen公司,批号:MA1-046、A32731);兔源 β -actin、p-ERK1/2、cAMP反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)、p-CREB抗体、山羊抗兔IgG抗体(HRP)、马抗小鼠IgG抗体(HRP)(美国Cell Signaling Technology公司,批号:4970、4370、4820、9198、7074、7076)。

1.2 动物

SD孕鼠,SPF级,体质量(15 ± 2)g,购自河南省实验动物中心。动物质量合格证号:[2019]024号,生产许可证号:SCXK(豫)2017-0001。孕鼠在本院动物房常规饲养(昼夜各12 h,自由饮水饮食)产仔,获得新生大鼠,随后与母鼠同笼常规饲养。本研究经医院动物伦理委员会批准(伦理审批件编号:2019-005KY),实验操作均遵守3R保护原则。

1.3 方法

1.3.1 大鼠分组及模型制备 将新生大鼠随机分为对照组、Sev组、Sev+Nal低剂量组($25 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、Sev+Nal高剂量组($100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$),每组18只。Sev组予出生后第6、7、8天每天吸入1次2% Sev+60%氧气2 h^[7],每次麻醉前60 min腹腔注射 $2 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ 生理盐水;Sev+Nal低剂量组和Sev+Nal高剂量组出生后第6、7、8天每天吸入1次2% Sev+60%氧气2 h,分别将一定量的Nal^[8]溶解于生理盐水中,每次麻醉前60 min行腹腔注射 $2 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$;对照组出生后第6、7、8天每天吸入1次60%氧气2 h,每次麻醉前60 min腹腔注射 $2 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ 生理盐水。上述麻醉吸入均在自制麻醉盒中进行,通过气体检测仪对进出气孔进行检测,以保证Sev浓度维持在2%。麻醉结束后,将各组新生大鼠送回母鼠笼内。末次麻醉后第2天(出生第9天)每组随机选12只取海马组织,6只制备石蜡切片,用于HE、TUNEL、免疫荧光染色分析,6只冷冻保存,用于Western blot检测。余下新生大鼠(每组6只)均正常饲养,并于出生后第30天进行莫里斯水迷宫实验。

1.3.2 莫里斯水迷宫实验测试学习记忆能力 莫里斯水迷宫实验对大鼠进行7 d的测试。出生后第30天将所有动物置于Morris水迷宫的水池中游泳60 s,以让其熟悉水中环境。出生后第31~35天进行定位航行实验,4次/d,每次间隔20 min,共5 d。每次实验时,依次在4个象限中任一位置将大鼠面向桶壁释放入水,让其寻找水中平台。自动录像记录系统对实验过程中大鼠活动进行记录,并分析其游泳路径,记录其逃避潜伏期(即找到水中平台的时间),每次实验最多持续60 s,如果超出60 s则将大鼠手动引导至平台。出生后第36天将平台撤除,进行空间探索试验,在任选一个上述入水点将大鼠释放入水,记录其120 s内的穿平台次数。

1.3.3 HE 法观察海马神经元形态 将摘取的海马组织洗净后固定在 4% 多聚甲醛中,经不同浓度的乙醇脱水、二甲苯渗透、石蜡包埋后,在冠状面上切成厚度为 8 μm 的石蜡切片。取部分切片,采用 HE 试剂盒进行染色,在光学显微镜下观察并拍照。

1.3.4 TUNEL 法检测海马神经元凋亡 取“1.3.3”项下海马石蜡切片,采用 TUNEL 试剂盒处理切片,凋亡细胞被染成棕黄色,在光学显微镜下观察并统计,计算凋亡率(%,凋亡细胞数量/总细胞数量 $\times 100\%$),每只大鼠至少取 6 张切片,每片统计 5 个视野。

1.3.5 免疫荧光法检测海马中 SYN、PSD95 蛋白表达 取“1.3.3”项下海马石蜡切片进行脱蜡处理,加入柠檬酸盐缓冲液进行抗原修复,转入含 0.1% Triton X 磷酸缓冲液中进行通透,加入 2% 山羊血清封闭,分别加入兔源 SYN 一抗(1:500)和小鼠源 PSD95 一抗(1:500) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,避光加入山羊抗小鼠 IgG(Alexa Fluor 647)二抗(1:1000)和山羊抗兔 IgG(Alexa Fluor 488)二抗(1:1000)室温孵育 35 min。封片后置于荧光显微镜下观察 SYN、PSD95 蛋白表达,以相对荧光强度进行表示。每只大鼠至少 6 张切片,每个切片采用 Image J 软件分析 5 个视野的相对荧光强度,计算平均值。

1.3.6 Western blot 法检测海马中 MAPK/ERK/CREB/BDNF 通路蛋白表达 提取海马冷冻组织中蛋白质并经 BCA 法测定浓度。每组取 30 μg 通过 SDS-PAGE 分离蛋白质,然后转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。用 5% 脱脂牛奶封闭后,将膜与特异性一抗 ERK1/2(1:2000)、CREB(1:1000)、p-ERK1/2(1:2000)、p-CREB(1:1000)、BDNF(1:1000)、 β -actin(1:1000)在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。然后,将膜与二抗山羊抗兔或马抗小鼠 IgG(1:3000)在室温下孵育 50 min。使用增强型化学发光(ECL)试剂显示条带,用 TANON 成像系统分析条带灰度并定量蛋白质表达。 β -actin 用作内参,以标准化目的蛋白的相对表达水平。

1.4 统计学分析

数据采用 GraphPad 8.0 或 SPSS 24.0 进行分

析并以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用 One-Way ANOVA 分析,进一步两两比较采用 Bonferroni- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

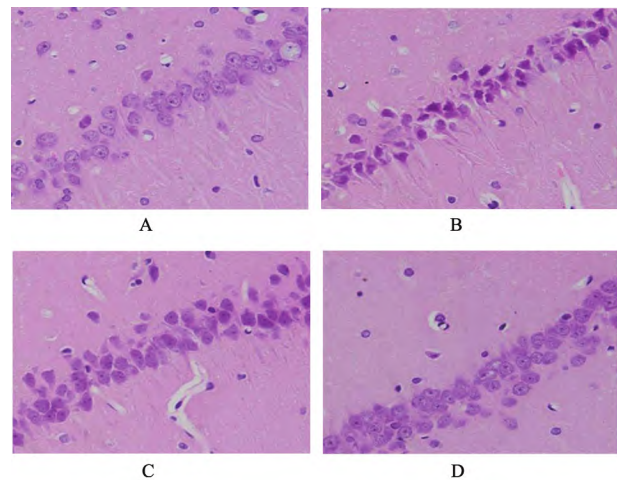
2 结果

2.1 各组大鼠学习记忆能力

与对照组相比,Sev 组 $d_{31} \sim d_{35}$ 潜伏期均延长, d_{36} 穿平台次数减少($P < 0.05$);与 Sev 组相比,Sev+Nal 低剂量组和 Sev+Nal 高剂量组 $d_{31} \sim d_{35}$ 潜伏期均缩短, d_{36} 穿平台次数增多($P < 0.05$);Sev+Nal 低剂量组和 Sev+Nal 高剂量组各项差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 各组大鼠海马神经元形态

对照组海马神经元结构清晰,无明显萎缩和肿胀。Sev 组海马中出现较多萎缩和肿胀的神经元;Sev+Nal 低剂量组和 Sev+Nal 高剂量组神经元形态较为相近,均较 Sev 组改善。见图 1。



A. 对照组 B. Sev 组 C. Sev+Nal 低剂量组
D. Sev+Nal 高剂量组

图 1 大鼠海马 HE 染色图(400 \times)

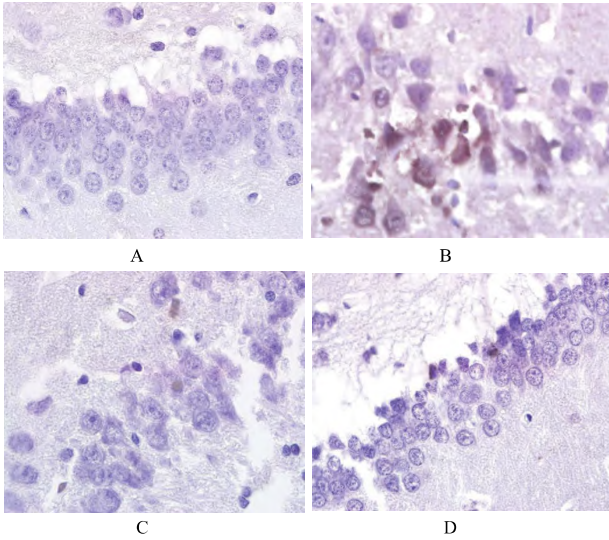
2.3 各组大鼠海马神经元凋亡情况

与对照组相比,Sev 组海马中凋亡神经元比例增加($P < 0.05$);与 Sev 组相比,Sev+Nal 低剂量组和 Sev+Nal 高剂量组海马中凋亡神经元比例降低($P < 0.05$)。Sev+Nal 低剂量组和 Sev+Nal 高剂量组差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2 和表 2。

表 1 各组大鼠学习记忆能力比较($\bar{x}\pm s$ $n=6$)

组别	剂量 ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	潜伏期(s)					d_{36} 穿平台 次数(次)
		d_{31}	d_{32}	d_{33}	d_{34}	d_{35}	
对照组	—	46.51 \pm 4.97	38.50 \pm 5.27	30.24 \pm 3.82	21.87 \pm 2.24	11.59 \pm 1.54	15.09 \pm 2.07
Sev 组	—	58.93 \pm 5.32 ^a	53.71 \pm 5.08 ^a	46.15 \pm 4.29 ^a	38.75 \pm 3.72 ^a	28.83 \pm 2.36 ^a	8.11 \pm 1.83 ^a
Sev+Nal 低剂量组	25	48.35 \pm 4.86 ^b	39.75 \pm 4.69 ^b	31.54 \pm 3.36 ^b	22.56 \pm 2.86 ^b	12.75 \pm 1.97 ^b	13.36 \pm 2.34 ^b
Sev+Nal 高剂量组	100	47.89 \pm 5.09 ^b	40.12 \pm 4.53 ^b	31.96 \pm 2.61 ^b	23.15 \pm 3.05 ^b	13.04 \pm 2.16 ^b	13.94 \pm 3.05 ^b

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 Sev 组比较,^b $P < 0.05$ 。



A. 对照组 B. Sev 组 C. Sev+Nal 低剂量组 D. Sev+Nal 高剂量组

图2 大鼠海马神经元凋亡情况(TUNEL染色 400×)

表2 各组大鼠凋亡神经元比例比较(% $\bar{x} \pm s$ $n=6$)

组别	剂量($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	凋亡神经元比例
对照组	—	1.90±0.08
Sev 组	—	21.50±4.25 ^a
Sev+Nal 低剂量组	25	7.20±1.85 ^b
Sev+Nal 高剂量组	100	8.10±1.97 ^b

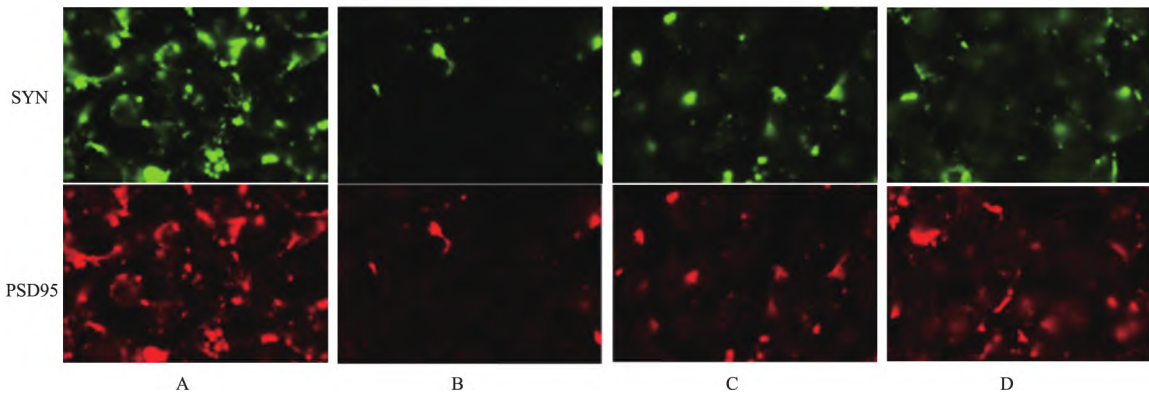
注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与Sev组比较,^b $P<0.05$ 。

2.4 各组大鼠海马突触可塑性

与对照组相比,Sev组海马中SYN、PSD95蛋白水平降低($P<0.05$);与Sev组相比,Sev+Nal低剂量组和Sev+Nal高剂量组海马中SYN、PSD95蛋白水平增高($P<0.05$)。Sev+Nal低剂量组和Sev+Nal高剂量组各项差异无统计学意义($P>0.05$)。见图3和表3。

2.5 各组大鼠MAPK/ERK/CREB/BDNF通路蛋白表达情况

与对照组相比,Sev组p-ERK1/2/ERK1/2、p-CREB/CREB、BDNF蛋白水平降低($P<0.05$);



A. 对照组 B. Sev 组 C. Sev+Nal 低剂量组 D. Sev+Nal 高剂量组

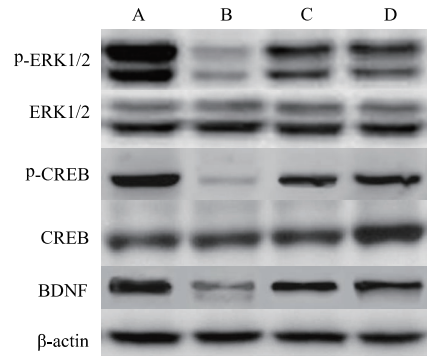
图3 大鼠海马免疫荧光图(10 000×)

表3 各组大鼠突触可塑性比较($\bar{x} \pm s$ $n=6$)

组别	剂量($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	SYN(平均荧光强度)	PSD95(平均荧光强度)
对照组	—	391.17±10.19	415.03±12.36
Sev 组	—	11.36±3.04 ^a	19.11±2.92 ^a
Sev+Nal 低剂量组	25	50.66±4.27 ^b	48.78±4.85 ^b
Sev+Nal 高剂量组	100	48.45±5.06 ^b	51.91±6.12 ^b

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与Sev组比较,^b $P<0.05$ 。

与Sev组相比,Sev+Nal低剂量组和Sev+Nal高剂量组p-ERK1/2/ERK1/2、p-CREB/CREB、BDNF蛋白水平增高($P<0.05$)。Sev+Nal低剂量组和Sev+Nal高剂量组各项差异无统计学意义($P>0.05$)。见图4和表4。



A. 对照组 B. Sev 组 C. Sev+Nal 低剂量组 D. Sev+Nal 高剂量组

图4 大鼠海马中MAPK/ERK/CREB/BDNF通路蛋白印记图

表4 各组大鼠海马中MAPK/ERK/CREB/BDNF通路蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$ $n=6$)

组别	剂量($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	p-ERK1/2/ERK1/2	p-CREB/CREB	BDNF
对照组	—	4.18±0.09	1.16±0.07	0.96±0.06
Sev 组	—	0.58±0.05 ^a	0.08±0.02 ^a	0.39±0.04 ^a
Sev+Nal 低剂量组	25	2.35±0.08 ^b	0.53±0.05 ^b	0.73±0.08 ^b
Sev+Nal 高剂量组	100	2.42±0.06 ^b	0.61±0.07 ^b	0.79±0.07 ^b

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与Sev组比较,^b $P<0.05$ 。

3 讨论

一项临床研究结果表明,儿童接触麻醉药物可损害其幼年期及成年期的学习记忆能力,是发生高度认知障碍和记忆障碍的危险因素^[9]。本研究观察到,Sev组新生大鼠 $d_{31} \sim d_{35}$ 潜伏期均延长, d_{36} 穿平台次数减少,且伴随海马神经元萎缩、肿胀和凋亡,表明Sev可引起新生大鼠海马神经元变性和凋亡,并导致幼年期学习记忆能力下降。采用Nal干预后,海马神经元凋亡比例降低,学习记忆能力增强,该结果与Li等^[10]发现的Nal具有认知功能保护作用相一致。药理分析显示,Nal可通过与阿片类受体竞争性结合,对内源性阿片肽导致的炎性、氧化等应激性损伤进行阻断,进而抑制阿片肽类物质引起的神经系统病理反应^[11,12]。提示Nal可能通过减轻炎性和氧化损伤,减少海马神经元凋亡发挥神经保护作用。

突触为神经元之间传递交换信息的关键结构,SYN的分布密度和数量可反映神经系统中突触的密度和数量,是反映突触可塑性的蛋白指标之一^[13]。PSD95为特异性突触后标记物,也可反映突触可塑性^[14]。本研究观察到Sev麻醉可引起新生大鼠海马中SYN、PSD95蛋白水平降低,损害海马突触可塑性,与潘雪莲等^[13]研究一致。而Nal干预可显著提高海马中SYN、PSD95蛋白水平,提示Nal可通过调控SYN、PSD95表达增强海马神经元突触的可塑性,进而改善Sev麻醉所致损伤。

BDNF对于神经元存活具有保护作用,且在神经元突触可塑性中发挥重要作用^[15]。BDNF的表达受到CREB等转录因子的调控,而CREB的激活依赖于MAPK/ERK通路^[16]。据报道,嗅球切除所致认知功能障碍小鼠海马中ERK/CREB/BDNF通路被抑制,增强该通路可促进其海马区神经发生,改善其认知功能^[17]。推测ERK/CREB/BDNF通路可能是治疗Sev所致脑损伤的靶点。本研究发现,与对照组相比,Sev组大鼠海马中p-ERK1/2/ERK1/2、p-CREB/CREB、BDNF蛋白水平降低,表明Sev可抑制ERK/CREB通路激活,减少BDNF蛋白表达。马敏等^[18]研究发现,提高CREB磷酸化水平,促进BDNF表达,可减轻丙泊酚引起的大鼠海马损伤,提高其认知功能。另有学者指出^[19,20],激活ERK/CREB信号通路,可提高胆碱能阻滞和 β -淀粉酶诱导的认知功能障碍小鼠海马中BDNF蛋白表达,增强其认知和记忆能力。本研究显示,Sev+Nal低剂量组和Sev+Nal高剂量组大鼠海马中p-ERK1/2/ERK1/2、p-CREB/CREB、BDNF蛋白水平均较Sev组明显增高,表明Nal可激活MAPK/ERK/CREB通

路,提示Nal可通过促进神经保护因子BDNF蛋白表达,抑制神经元凋亡并改善突触可塑性,进而发挥保护作用。

综上所述,Nal可能通过激活MAPK/ERK/CREB通路,促进BDNF表达,改善Sev麻醉新生大鼠的神经元凋亡及突触可塑性,进而改善学习认知能力。本研究的特色和创新之处在于发现Nal对Sev麻醉新生大鼠具有保护作用,且表明其可调节MAPK/ERK/CREB通路影响Sev麻醉引起的海马神经元损伤,对于儿童麻醉后脑损伤病理机制的探讨及有效药物的寻找具有一定参考价值。然而本研究仅涉及对新生大鼠30d的认知功能及海马中相关蛋白的检测,是否影响其成年后的认知功能以及Nal作用的其他机制仍有待进一步探究。

参 考 文 献

- Miao M, Xu Y, Cong X, et al. Epileptiform EEG discharges and sevoflurane in children: Protocol of a systematic review and meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(40): e17401
- Zuo Y, Chang Y, Thirupathi A, et al. Prenatal sevoflurane exposure: Effects of iron metabolic dysfunction on offspring cognition and potential mechanism[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2021, 81(1): 1-9
- Zhu X, Yao Y, Guo M, et al. Sevoflurane increases intracellular calcium to induce mitochondrial injury and neuroapoptosis[J]. *Toxicol Lett*, 2021, 336(1): 11-20
- Ju X, Cui J, Lee Y, et al. Increasing the interval between repeated anesthetic exposures reduces long-lasting synaptic changes in late post-natal mice[J]. *J Neurochem*, 2021, 156(1): 76-87
- 张运周, 刘群, 赵明娟, 等. 盐酸纳美芬治疗急性脑梗死有效性和安全性的meta分析[J]. *中国循证医学杂志*, 2019, 19(2): 51-57
- Tournier N, Pottier G, Caillé F, et al. Nalmefene alleviates the neuroimmune response to repeated binge-like ethanol exposure: A TSPO PET imaging study in adolescent rats[J]. *Addict Biol*, 2021, 26(3): e12962
- 刘光建, 魏琼, 李清, 等. 七氟醚暴露致新生大鼠未成熟脑损伤的研究[J]. *临床麻醉学杂志*, 2019, 35(5): 498-503
- 林吴用, 马宝林, 涂献坤. 靶向敲除Yes激酶相关蛋白1对纳美芬治疗急性颅脑损伤大鼠的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 313(11): 71-74
- Ing C, Sun M, Olfson M, et al. Age at exposure to surgery and anesthesia in children and association with mental disorder diagnosis[J]. *Anesth Analg*, 2017, 125(6): 1988-1998
- Li MY, Chen C, Wang ZG, et al. Effect of nalmefene on delayed neurocognitive recovery in elderly patients undergoing video-assisted thoracic surgery with one lung ventilation[J]. *Curr Med Sci*, 2020, 40(2): 380-388
- Zheng J, Li H, Guo R, et al. Neuroprotection of nalmefene for post-operative patients with spontaneous intracerebral hemorrhage[J]. *Int J Neurosci*, 2015, 125(12): 918-923
- 马煜东, 祖国友, 李杏娜. 盐酸纳美芬联用治疗创伤性休克患者临床效果观察[J]. *中国药师*, 2017, 20(1): 118-120
- 潘雪莲, 赵博, 肖昀, 等. 新生儿期不同时间七氟醚麻醉对大鼠远期认知功能和海马突触可塑性的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2016, 36(9): 1085-1088
- Venkatesan S, Subramaniam S, Rajeev P, et al. Differential scaling of synaptic molecules within functional zones of an excitatory synapse during homeostatic plasticity[J]. *eNeuro*, 2020, 7(2): ENEURO.0407-19.2020

冬虫夏草通过调控 MAPK 通路减轻 CCl₄ 诱导的大鼠肝脏炎症和纤维化

付晓琳¹ 肖建¹ 牛乐军² (北部战区总医院 1. 超声诊断科; 2. 感染科 沈阳 110016)

摘要 目的: 探究中药冬虫夏草改善肝脏纤维化的调控机制。方法: 基于转录组二代高通量测序(RNA-seq)的数据结果分析肝纤维化大鼠与正常大鼠的差异表达基因并找出差异基因的富集通路。大鼠随机分为对照组、模型组(四氯化碳诱导肝纤维化模型)、冬虫夏草(1 500 mg·kg⁻¹·d⁻¹)组。经过6周的灌胃治疗,取大鼠的眼眶血用于肝功能测定,提取肝脏中RNA用于分子生物学研究。结果: 转录组数据结果分析肝纤维化大鼠差异基因富集于丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路。与对照组相比,模型组ALT、AST含量和MAPK、生长因子β1(TGF-β1)、α平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、人I型胶原(COL-I)、白细胞介素6(IL-6)mRNA表达明显升高(P<0.05),白蛋白(Alb)含量明显降低(P<0.05);与模型组相比,冬虫夏草组ALT、AST含量和MAPK、TGF-β、α-SMA、COL-I、IL-6 mRNA表达明显降低(P<0.05),Alb含量明显升高(P<0.05)。结论: 冬虫夏草通过调控TGF-β/MAPK通路减轻四氯化碳诱导的大鼠肝脏炎症和纤维化。

关键词 RNA-seq; 冬虫夏草; 肝脏纤维化; 生长因子β1/丝裂原活化蛋白激酶

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1008-049X(2021)09-1657-08

DOI: 10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2021.09.013

Cordyceps Sinensis Alleviating CCl₄-induced Liver Inflammation and Fibrosis in Rats by Regulating MAPK Pathway

Fu Xiaolin¹, Xiao Jian¹, Niu Lejun² (1. Department of Ultrasound Diagnosis; 2. Department of Infectious Diseases, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT Objective: To explore the regulatory mechanism of Cordyceps sinensis in improving liver fibrosis. **Methods:** The differentially expressed genes of liver fibrosis rats and normal rats were analyzed based on the data of RNA SEQ, and the enrichment pathway of differentially expressed genes was found. The rats were randomly divided into control group, model group (CCl₄-induced liver fibrosis model) and Cordyceps sinensis group (1 500 mg·kg⁻¹·d⁻¹). After 6 weeks of intragastric treatment, blood from rat's orbit was used for liver function determination, and RNA from liver was extracted for molecular biology research. **Results:** Transcriptome analysis showed that the differentially expressed genes were enriched in MAPK pathway. Compared with those in the control group, the contents of ALT and AST, and mRNA expressions of MAPK, TGF-β, α-SMA, COL-I and IL-6 in the model group were significantly increased (P<0.05), and the content of ALB was significantly reduced (P<0.05). Compared with those in the model group, the contents of ALT and AST, and mRNA expressions of MAPK, TGF-β, α-SMA, COL-I and IL-6 in Cordyceps sinensis group were significantly decreased (P<0.05), and the content of ALB was significantly increased (P<0.05). **Conclusion:** Cordyceps sinensis can regulate the expression of TGF-β/MAPK pathway and attenuate CCl₄-induced liver inflammation and fibrosis in rats.

KEY WORDS RNA-seq; Cordyceps sinensis; Liver fibrosis; TGF-β/MAPK

肝病在我国乃至全世界已是十分常见的疾病。其中肝纤维化与病毒感染尤其是慢性乙型及丙型肝炎、代谢紊乱、药物、胆汁淤积性疾病、酗酒或免疫攻

击引起的长期慢性肝脏疾病有关^[1] 其代表了巨大的全球健康负担^[2]。持续的肝损伤会导致进行性纤维化,最终导致肝硬化和肝细胞癌。肝纤维化的特征在

通信作者: 牛乐军 Tel: 13309886323 E-mail: nlj1968@sina.com

15 De Vincenti AP, Ríos AS, Paratcha G, et al. Mechanisms that modulate and diversify BDNF functions: implications for hippocampal synaptic plasticity[J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13(1): 135

16 Zou X, Wu Y, Chen J, et al. Activation of sodium channel by a novel α-scorpion toxin, BmK NT2, stimulates ERK1/2 and CREB phosphorylation through a Ca²⁺ dependent pathway in neocortical neurons[J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 104(Pt A): 70-77

17 Takahashi K, Kurokawa K, Miyagawa K, et al. Antidementia effects of *Enterococcus faecalis* 2001 are associated with enhancement of hippocampal neurogenesis via the ERK-CREB-BDNF pathway in olfactory bulbectomized mice[J]. *Physiol Behav*, 2020, 223(1): 112997

18 马敏, 咸淑悦, 曹玥, 等. 银杏提取物缓解丙泊酚麻醉大鼠海马组织损伤的机制研究[J]. *中国药师*, 2019, 22(6): 1047-1052

19 Bae HJ, Kim J, Kim J, et al. The effect of maslinic acid on cognitive dysfunction induced by cholinergic blockade in mice[J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177(14): 3197-3209

20 Ko YH, Shim KY, Kim SK, et al. *Lespedeza bicolor* extract improves amyloid beta25-35-induced memory impairments by upregulating BDNF and activating Akt, ERK, and CREB signaling in mice[J]. *Planta Med*, 2019, 85(17): 1363-1373

(2021-03-23 收稿 2021-05-25 修回)