

## 【药效学评价】

## 自噬在丙泊酚麻醉致老年大鼠术后认知功能障碍中的作用

杨宁, 李伦旭, 刘涛涛, 韩登阳, 李正迁, 倪诚, 徐懋, 郭向阳\*

北京大学第三医院麻醉科, 北京 100191

**摘要:** **目的** 探讨丙泊酚麻醉对老年大鼠术后认知功能的影响及自噬在其中的作用。**方法** 将老年大鼠 72 只, 随机分为 4 组: 对照组、丙泊酚组、雷帕霉素组、丙泊酚+雷帕霉素组。雷帕霉素组及丙泊酚+雷帕霉素组于麻醉前 5 d ip 雷帕霉素 10 mg/kg, 每天 1 次, 麻醉当日为麻醉前 1 h 注射, 共 6 d。丙泊酚组及丙泊酚+雷帕霉素组以 20 mg/kg 丙泊酚诱导麻醉, 并以 54 mg/kg/h 维持 4 h。采用 Morris 水迷宫评测大鼠学习与记忆功能; Western Blotting 技术及免疫荧光观察麻醉后 24 h、6 d 海马区自噬相关蛋白的表达。**结果** 与对照组比较, 丙泊酚组第 1~3 天逃避潜伏期显著延长 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 目标象限探索时间明显缩短, 穿平台次数明显减少 ( $P < 0.05$ ); 麻醉后 24 h、6 d 海马区自噬相关蛋白 LC3B、Beclin-1 蛋白表达明显减少, p62 蛋白表达明显增多 ( $P < 0.05$ )。与丙泊酚组比较, 丙泊酚+雷帕霉素组第 1~3 天逃避潜伏期缩短, 目标象限探索时间显著延长, 穿平台次数明显增加 ( $P < 0.05$ ); 麻醉后 24 h、6 d 海马区自噬相关蛋白 LC3B、Beclin-1 表达明显增多, p62 表达明显减少 ( $P < 0.05$ )。**结论** 丙泊酚连续麻醉 4 h 可导致老年大鼠空间学习记忆能力损伤, 其机制可能与抑制海马区自噬有关。

**关键词:** 自噬; 丙泊酚; 术后认知功能障碍; 海马; 老年大鼠; 雷帕霉素

**中图分类号:** R962.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2018) 05- 0761 - 06

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.05.008

## Role of autophagy in postoperative cognitive dysfunction of aged rats induced by propofol anesthesia

YANG Ning, LI Lunxu, LIU Taotao, HAN Dengyang, LI Zhengqian, NI Cheng, GUO Xiangyang

Department of Anesthesiology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

**Abstract: Objective** To investigate the influence of propofol on learning and memory, and to identify the potential role of hippocampal autophagy in propofol-induced cognitive alterations in aged rats. **Methods** Totally 72 rats were randomly divided into four groups as follow: control group, propofol group (PRO), rapamycin group (RAP), and propofol + rapamycin group (PRO+RAP). Rats in RAP and PRO+RAP groups were ip injected with 10 mg/kg rapamycin beginning five days before propofol exposure. On the sixth day, rapamycin was administered 1 h before propofol anesthesia. Rats in both the PRO and PRO+RAP groups received 20 mg/kg propofol to induce anesthesia and then 54 mg/kg/h propofol to maintain anesthesia for 4 h. The test of learning and memory was performed by Morris water maze. Autophagy-related proteins in hippocampal region were determined by Western blotting and immunofluorescent staining at 24 h and 6 d after anesthesia. **Results** Compared with the CON group, the escape latency significantly prolonged from 1-3 day, the probe time was significantly decreased, and the time of staying at the original platform quadrant was significantly shorter ( $P < 0.05$  and  $0.01$ ) in the PRO group. Autophagy-related proteins LC3B and Beclin-1 expression were significantly decreased and p62 expression was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the PRO group, the escape latency significantly shortened from 1-3 day, the probe time was significantly increased, and the time of staying at the original platform quadrant was significantly longer in the PRO+RAP group ( $P < 0.05$ ), and autophagy-related proteins LC3B and Beclin-1 expression were significantly increased and p62 expression was significantly decreased ( $P < 0.05$ ) in the PRO+RAP group. **Conclusions** Our in vivo study indicates that 4 h propofol anesthesia could induce cognitive impairment in aged rats and this may be caused by the inhibitory effects of autophagy in the hippocampus.

**Key words:** autophagy; propofol; postoperative cognitive dysfunction (POCD); hippocampus; aged rat; rapamycin

收稿日期: 2018-01-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81571036); 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81600933)

第一作者: 杨宁 (1985-), 男, 博士研究生, 麻醉学专业

\*通信作者: 郭向阳 (1963-), 男, 教授, 主要从事围术期脑功能障碍的基础与临床研究及全麻机制研究 E-mail: guoxiangyangmzk@163.com

术后认知功能障碍 (POCD) 是老龄患者术后最常见的并发症, 显著增加老龄患者致残和致死率, 增加医疗成本并降低患者生存质量<sup>[1]</sup>。POCD 机制尚未明了, 目前研究主要集中在神经炎症反应、血脑屏障结构及功能完整性失调、Abeta 代谢障碍、胆碱能系统功能障碍等<sup>[2]</sup>; 自噬 (autophagy) 是由溶酶体介导的胞质蛋白和细胞器降解过程, 基础水平的自噬在维持细胞内代谢平衡中发挥着重要作用, 病理水平的自噬起损害作用<sup>[3]</sup>。有关 POCD 与自噬关系的研究相对较少, 研究发现, 老龄大鼠接受 2% 异氟醚麻醉 4 h 后, 海马区自噬先短暂激活后呈显著抑制状态<sup>[4]</sup>。Zhang 等<sup>[5]</sup>研究发现, 20 月龄的 SD 大鼠接受 2% 的七氟烷麻醉 5 h, 可导致 POCD, 并且与七氟烷麻醉导致的老年大鼠海马自噬抑制、凋亡增加有关, 而自噬诱导剂雷帕霉素可缓解七氟烷麻醉导致的老年大鼠 POCD。

丙泊酚是临床最常用的静脉麻醉药, 丙泊酚进入人体后能够抑制海马 CA1 区细胞突触的长时程增强 (LTP), 而 LTP 恰恰是学习和记忆的基础, 因而患者在应用丙泊酚后有可能出现 POCD。关于丙泊酚对老年大鼠术后认知的影响目前研究较少<sup>[6-8]</sup>, 自噬在其中的作用目前尚无相关研究。本实验拟探讨丙泊酚麻醉对老龄大鼠术后认知功能的影响, 并评价海马自噬水平变化在其中的作用, 为可能的治疗方案提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

本研究已通过北京大学生物医学伦理委员会实验动物福利伦理分会的批准 (伦理批复文件 LA 2014-13)。老龄 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 72 只, 20 月龄, 体质量 500~550 g, 由长沙市开福区东创实验动物科技服务部提供, 生产许可证号 SCXK (湘) 2014-0011。转运至北京大学医学部实验动物科学部, SPF 级标准化饲养: 每笼 2 只, 实验前 1 周适应环境, 实验室温度 (24±2) °C, 湿度 55%±5%, 避免强光、噪音等刺激, 维持光照: 黑暗 (12 h: 12 h) 交替的生活节律, 自由摄食和饮水, 所有动物在纳入实验研究前适应性饲养至少 1 周。

### 1.2 药物及主要试剂

丙泊酚 (力蒙欣, 西安力邦制药有限公司, 规格 20 mL:200 mg); LC3、Beclin-1、p62、 $\beta$ -actin 抗体 (Abcam 公司); 雷帕霉素 (Sigma 公司); 10% 浓度的脂肪乳 (华瑞制药有限公司)。

### 1.3 主要仪器

电子天平, 美国双杰兄弟公司; Morris 水迷宫测试仪, 北京硕林苑科技公司; 低温离心机, 德国 Eppendorf 公司; -20 °C 恒温冰箱, 海尔公司; -80 °C 恒温冰箱, 德国 NUAIR; 高速离心机, 美国 Nalgene 公司; 摇床, 江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司; 磁力搅拌器, 金坛市荣华仪器制造有限公司; 电泳仪, 美国 Bio-rad 公司; 转膜仪, 美国 Bio-rad 公司; Leica 共聚焦荧光成像仪器设备系统, TCS SP8 X, 德国 Leica 公司。

## 2 方法

### 2.1 动物分组、给药及去取材

大鼠随机分为对照组、丙泊酚组、雷帕霉素组、丙泊酚+雷帕霉素组。雷帕霉素先溶解在 DMSO 中, 质量浓度 25 mg/mL, 进一步以聚乙二醇 400 和 5% 聚山梨酯 80 稀释成 10 mg/mL 的溶液。雷帕霉素与丙泊酚+雷帕霉素组于麻醉前 ip 10 mg/kg 雷帕霉素, 每天 1 次, 连续 5 d, 麻醉当天为麻醉前 1 h ip 给药, 对照组与丙泊酚组 ip 等质量浓度空白溶剂。丙泊酚组与丙泊酚+雷帕霉素组以 19 mg/kg 丙泊酚 ip 诱导麻醉, 老龄大鼠的翻正反射在数分钟内消失, 继以尾静脉置管以 54 mg/(kg·h)<sup>[9]</sup> 持续滴注 4 h。麻醉期间各组成年大鼠鼻唇、趾端肤色保持红润, 无紫绀等缺氧表现。因为临床上所用的丙泊酚均为丙泊酚纯药与脂肪乳的复合物, 因此, 对照组与雷帕霉素组以 54 mg/kg ip 10% 脂肪乳剂, 1 次/h, 连续 4 次。所有动物呼吸节律正常, 无紫绀等缺氧表现。

麻醉结束后 24 h, 每组处死大鼠 6 只, 海马取材, Western Blotting 检测自噬相关蛋白 LC3B、Beclin-1、p62 表达。每组剩余 12 只行 Morris 水迷宫评测大鼠学习记忆功能, 连续 6 d, 行为学测试结束后立即处死大鼠取材, Western Blotting 检测自噬相关蛋白 LC3B、Beclin-1、p62 表达, 免疫荧光检测海马区 LC3 蛋白表达。

### 2.2 行为学测试

Morris 水迷宫测试分为定位航行实验和空间探索实验两部分, 于丙泊酚麻醉后 24 h 开始, 每日训练 4 次, 连续 5 d, 将平台置于西南象限正中, 训练开始时, 将大鼠随机从 4 个实验起始点 (东南、东北、西南、西北) 面向池壁放入水池, 大鼠将在水池内游泳直到找到隐藏在水面下的平台为止, 如果大鼠在 120 s 内没有找到平台, 则实验者帮助其找

到平台（潜伏期记为 120 s）。之后允许大鼠在平台上休息 15 s，两次训练间隔 30 s，通过自动摄像及活动记录系统记录大鼠找到平台的游泳时间（逃避潜伏期），取 4 次成绩的平均值反映大鼠当日的学习记忆能力。最后 1 次训练 24 h 后，去除平台后进行空间探索实验，从西北象限起始点将大鼠放入水迷宫池，通过自动摄像系统记录大鼠 120 s 内的原平台象限的探索时间。

### 2.3 Western blotting 实验<sup>[4]</sup>

RIPA 液提取组织蛋白，BCA 法测定样本总蛋白浓度，上 50 μg 蛋白于胶孔中，并用 1×SDS Loading buffer 配平上样量体积。于加样孔两侧孔加入预染的蛋白质分子量 Marker。进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶（SDS-PAGE）电泳，其中分离胶浓度 10%，浓缩胶浓度 5%。恒压 130 V 电泳至分离胶底部；恒流 300 mA，1.5 h 转移到硝酸纤维素膜上。用 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h 后，加入 1：1 000 稀释的鼠抗人 LC3、Beclin-1、p62、β-actin 抗体工作液，摇床上轻摇过夜，TBST 漂洗；再加入 1：10 000 稀释的羊抗鼠荧光二抗，摇床上避光振摇 1 h，TBST 洗涤 3 次，每次 10 min。漂洗完后的 PVDF 膜平铺到蛋白印迹扫描仪上，Odyssey 软件进行扫描并保存实验结果。

### 2.4 免疫荧光检测 LC3B 蛋白表达<sup>[4]</sup>

动物处死后大脑取材，随机将一侧大脑半球于 4% 多聚甲醛固定 24 h，30% 蔗糖溶液脱水 24 h，剥离出海马组织，OCT 包埋。冰冻切片机切片制备，片厚 10 μm，置于 4 °C 丙酮固定 10 min，PBS 洗 3 次，每次 5 min；3% BSA 封闭液室温下封闭 30 min；0.1% Triton X-100 室温孵育 5 min；3% BSA 稀释一抗 anti-LC3B（兔抗大鼠 1：100），4 °C 孵育过夜；去掉一抗，选用 FITC 标记的荧光二抗（羊抗兔 IgG；1：200）室温孵育 1 h；去掉二抗，暗盒内 PBS 洗 3 次，每次 5 min；采用含 DAPI 的防猝灭封片剂封片，盖上盖玻片；Leica DM3000 荧光显微镜拍片。

### 2.5 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件分析数据，数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示，Western blotting 数据采用单因素方差分析，组间多重比较采用 LSD 检验；水迷宫行为学定位航行实验数据组间的总体比较采用重复测量数据的方差分析，空间探索实验数据的组间比较采用单因素方差分析，组间多重比较采用 LSD 检验。

## 3 结果

### 3.1 各组大鼠行为学表现

如图 1 所示，4 组大鼠的游泳速度无明显差异。

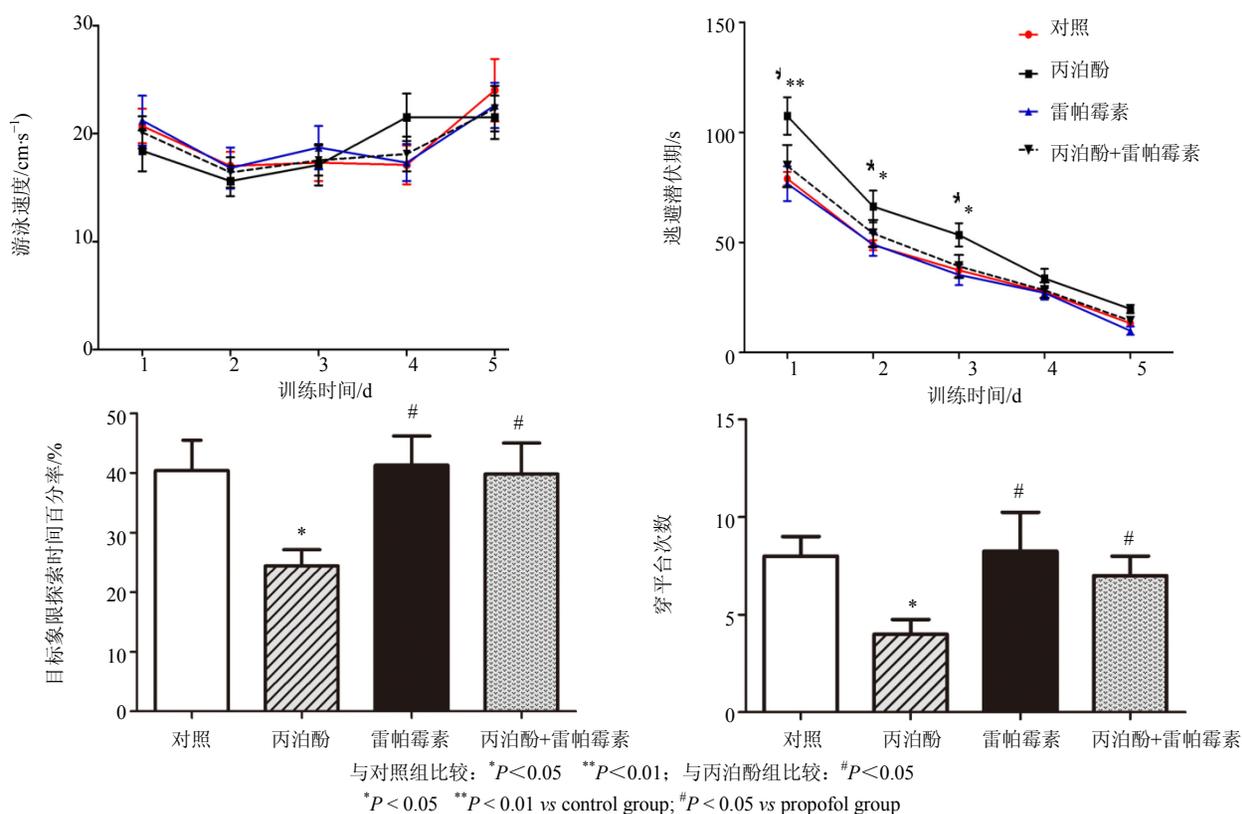


图 1 Morris 水迷宫实验神经行为学检测结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Fig. 1 Neurocognitive testing using orris water maze ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

与对照组比较, 丙泊酚组大鼠定位航行实验中第 1~3 天逃避潜伏期显著延长 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 空间探索实验中目标象限探索时间显著缩短 ( $P < 0.05$ ), 穿平台次数显著减少 ( $P < 0.05$ )。与丙泊酚组比较, 丙泊酚+雷帕霉素组大鼠第 1~3 天逃避潜伏期缩短, 目标象限探索时间显著延长 ( $P < 0.05$ ), 穿平台次数显著增加 ( $P < 0.05$ )。对照组、雷帕霉素组、丙泊酚+雷帕霉素组 3 组间逃避潜伏期、目标象限探索时间、穿平台次数比较无明显差异。结果提示, 与对照组比较, 丙泊酚组大鼠空间学习记忆能力明显减退, 4 d 后恢复正常; 与丙泊酚组比较, 丙泊酚+雷帕霉素组大鼠空间学习记忆能力明显改善。

### 3.2 各组大鼠海马自噬相关蛋白的表达

丙泊酚麻醉后 24 h 与 6 d, 与对照组比较, 丙泊酚组海马 LC3B-II/LC3B-I、Beclin-1 表达明显降低, p62 表达明显增高 ( $P < 0.05$ ); 与丙泊酚组比较, 丙泊酚+雷帕霉素组海马 LC3B-II/LC3B-I、Beclin-1 表达明显升高, p62 表达明显降低 ( $P < 0.05$ )。结果见图 2。

### 3.3 免疫荧光检测海马区 LC3B 蛋白表达

丙泊酚麻醉后 6 d, 免疫荧光染色显示, 与对照组比较, 丙泊酚组绿色荧光明显减少, 说明 LC3B 蛋白表达明显减少; 与丙泊酚组比较, 丙泊酚+雷帕霉素组海马 LC3B 蛋白表达明显增多。结果见图 3。

### 4 讨论

POCD 病理生理改变十分复杂, 目前多种学说并存, 但均无定论, 老龄是目前唯一确定的诱发因素。丙泊酚是目前临床最常用的静脉麻醉药物, 具有起效迅速、苏醒迅速、持续输注后无蓄积等优点, 因而普遍用于临床麻醉诱导与维持, ICU 镇静。目前关于丙泊酚对认知功能影响的研究主要集中在发育期“脆弱大脑”, 而其对于老年“脆弱大脑”作用的基础研究相对稀少。研究发现<sup>[6-8]</sup>, 20 月龄老年大鼠在 100 mg/kg 剂量诱导并以 50 mg/kg 维持 3 h 的丙泊酚麻醉后 1~2 周仍存在空间记忆能力的损害, 即存在早期认知功能障碍, 而这可能与丙泊酚麻醉后导致海马突触可塑性结构和功能改变、能量代谢障碍及肌动蛋白聚合异常有关。本研究发现,

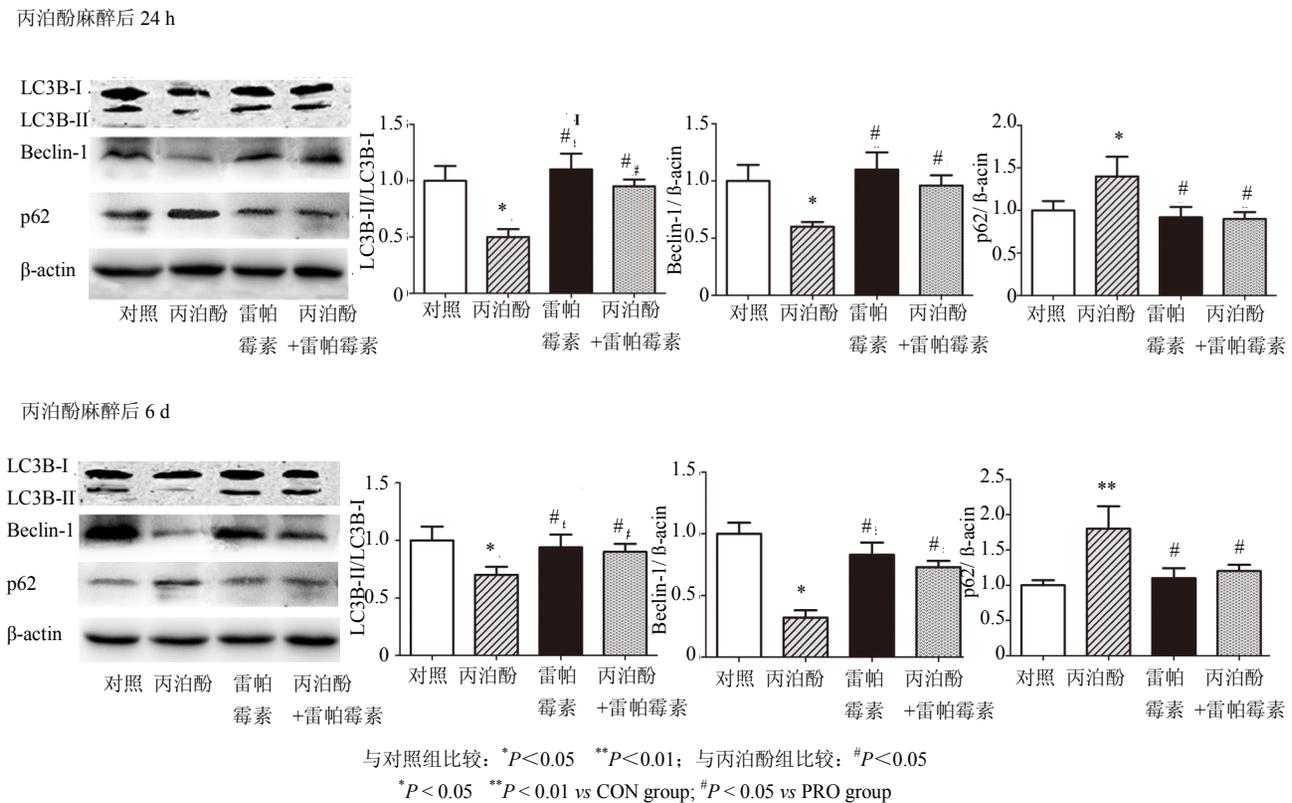


图 2 丙泊酚麻醉结束后 24 h、6 d 大鼠海马自噬相关蛋白表达情况 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 2 Effects of propofol exposure on protein levels of autophagy markers in hippocampus of aged rats at 24 h and 6 d post-anesthesia ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

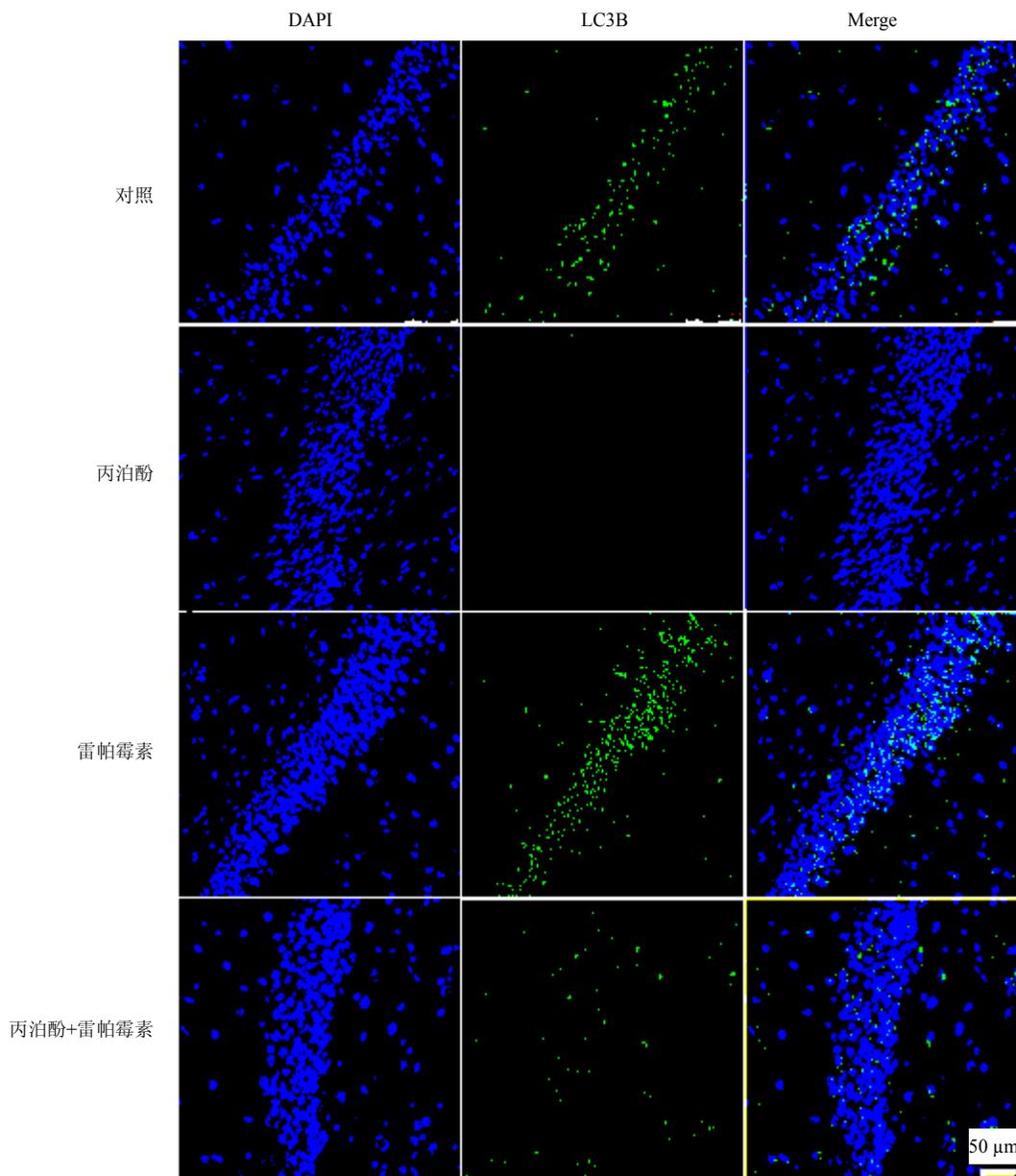


图3 免疫荧光共聚焦检测丙泊酚麻醉后6 d大鼠海马LC3B表达情况

Fig. 3 Representative confocal images of LC3B expression in hippocampus at 6 d post-anesthesia

20月龄年大鼠在接受19 mg/kg剂量诱导并以54 mg/(kg·h)维持4 h的丙泊酚麻醉后6 d,存在的空间记忆损害与海马自噬功能抑制有关。

海马是人与其他哺乳类动物学习与记忆的重要功能区<sup>[10]</sup>,水迷宫是研究海马依赖性空间学习记忆能力的经典行为学手段<sup>[11]</sup>。Morris水迷宫结果表明,与对照组比较,丙泊酚组大鼠第1~3天时逃避潜伏期延长,目标象限探索时间缩短,穿平台次数减少,表明大鼠丙泊酚麻醉后出现了认知功能障碍。参照文献中的方法<sup>[5]</sup>,本研究在选择麻醉前5 d起 ip 10

mg/kg雷帕霉素,连续5 d,麻醉当天为术前1 h ip给药,共6 d,并观察其对术后认知的保护效应。Morris水迷宫结果表明,雷帕霉素组较对照组在各个时间点逃避潜伏期、目标象限探索时间及穿平台次数均无差异,提示自噬诱导剂雷帕霉素预先给药对老年大鼠认知功能无影响。与丙泊酚组比较,丙泊酚+雷帕霉素组老年大鼠逃避潜伏期缩短,目标象限探索时间延长,穿平台次数增加,提示雷帕霉素预给药可以有效改善丙泊酚麻醉引起的老年大鼠空间学习记忆能力损害。各组大鼠寻找平台的游

泳速度没有差异,从而排除了运动功能异常对大鼠寻找平台潜伏期和游泳路径的影响。

自噬是一个多步骤过程,包括起始、延长、成熟和终止<sup>[12]</sup>。在延长阶段,微管相关蛋白轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)在一系列酶促作用下形成胞质可溶形式的LC3-I, LC3-I又在一系列酶促作用下形成膜结合形式的LC3-II, LC3-II存在于自噬体的内膜和外膜,且LC3-II数量的多少与自噬泡的数量成正比,所以LC3-II通常被称为哺乳动物自噬体膜的标记蛋白, LC3-II/LC3-I比值可作为自噬体形成数量多少的指标<sup>[13]</sup>。Beclin-1是自噬重要的正调节因子,与III型磷脂酰肌醇三磷酸激酶(PI3K)结合后可促进自噬的发生<sup>[14]</sup>。p62由原癌基因c-myc编码,胞质中合成。自噬发生时,胞质中的p62经过一系列酶促反应,在自噬溶酶体中降解,所以,自噬发生时,p62水平下降,自噬抑制时,p62累积<sup>[15]</sup>。本研究蛋白电泳结果表明,丙泊酚麻醉后1 d,与对照组比较,丙泊酚组大鼠海马LC3-II/LC3-I比值及Beclin-1表达均显著降低,p62表达显著增高,提示丙泊酚麻醉显著抑制了大鼠海马自噬功能,并且这种作用可持续到术后6 d。与丙泊酚组比较,丙泊酚+雷帕霉素组LC3-II/LC3-I比值及Beclin-1表达均显著增高,p62表达显著降低,并且这种作用仍可持续到术后6 d,结合行为学结果,提示自噬诱导剂雷帕霉素可显著改善老年大鼠丙泊酚麻醉后的认知功能,其机制与改善老年大鼠海马自噬功能有关。

综上所述,本研究表明,老年大鼠丙泊酚麻醉后可导致空间学习记忆能力的损害,而且这种损伤作用与海马自噬功能抑制有关,提高海马自噬水平可显著改善老年大鼠麻醉后的学习记忆功能。本研究为POCD的预防和治疗,提供了新的基础理论方向。然而,本研究也有一些不足,比如没有研究丙泊酚麻醉对老年大鼠其他行为学的影响,如旷场实验、条件恐惧实验等;另外,没有研究手术因素对老年大鼠学习记忆能力的影响,这些都是我们下一步的研究内容。

#### 参考文献

[1] Monk T G, Weldon B C, Garvan C W, et al. Predictors of cognitive dysfunction after major noncardiac surgery [J].

Anesthesiology, 2008, 108(1): 18-30.

- [2] Vutskits L, Xie Z. Lasting impact of general anaesthesia on the brain: mechanisms and relevance [J]. Nat Rev Neurosci, 2016, 17(11): 705-717.
- [3] Hara T, Nakamura K, Matsui M, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice [J]. Nature, 2006, 441(7095): 885-789.
- [4] Li ZQ, Li LX, Mo N, et al. Duration-dependent regulation of autophagy by isoflurane exposure in aged rats [J]. Neurosci Bull, 2015, 31(4): 505-513.
- [5] Zhang X, Zhou Y, Xu M, et al. Autophagy is involved in the sevoflurane anesthesia-induced cognitive dysfunction of aged rats [J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0153505.
- [6] Li M, Zhang X, Wu A, et al. Propofol-induced age-different hippocampal long-term potentiation is associated with F-actin polymerization in rats [J]. Cell Biochem Biophys, 2015, 71(2): 1059-1066.
- [7] Zhang X, Yang S, Yue Y, et al. Profiling of the soluble proteome in rat hippocampus post propofol anesthesia [J]. Neurochem Res, 2013, 38(12): 2661-2667.
- [8] Zhang X, Liu Y, Feng C, et al. Proteomic profiling of the insoluble fractions in the rat hippocampus post-propofol anesthesia [J]. Neurosci Lett, 2009, 465(2): 165-170.
- [9] Zhang J, Tan H, Jiang W, et al. The choice of general anesthetics may not affect neuroinflammation and impairment of learning and memory after surgery in elderly rats [J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2015, 10(1): 179-189.
- [10] Whitlock J R, Heynen A J, Shuler M G, et al. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus [J]. Science, 2006, 313(5790): 1093-1097.
- [11] Li Z Q, Rong X Y, Liu Y J, et al. Activation of the canonical nuclear factor-kappaB pathway is involved in isoflurane-induced hippocampal interleukin-1beta elevation and the resultant cognitive deficits in aged rats [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 438(4): 628-634.
- [12] Booth L A, Tavallai S, Hamed H A, et al. The role of cell signalling in the crosstalk between autophagy and apoptosis [J]. Cell Signal, 2014, 26(3): 549-555.
- [13] Tanida I. Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy [J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 14(11): 2201-2214.
- [14] Sinha S, Colbert C L, Becker N, et al. Molecular basis of the regulation of Beclin 1-dependent autophagy by the gamma-herpesvirus 68 Bcl-2 homolog M11 [J]. Autophagy, 2008, 4(8): 989-997.
- [15] Bjorkoy G, Lamark T, Johansen T. p62/SQSTM1: a missing link between protein aggregates and the autophagy machinery [J]. Autophagy, 2006, 2(2): 138-139.