

突触和自噬功能受损参与七氟烷引起的 APP/PS1 小鼠认知障碍

耿鹏程, 张继千, 谭其莲, 程丹, 戴伟, 刘学胜

摘要 目的 探讨七氟烷对 APP/PS1 小鼠认知功能和阿尔茨海默病(AD)病理影响的相关分子机制。方法 32 只 APP/PS1 转基因小鼠随机分为对照组和七氟烷组,分别吸入 60% 氧气和 3% 七氟烷 4 h,24 h 后使用 Morris 水迷宫实验检测小鼠行为学变化,使用 Western blot 检测海马内 β 淀粉样蛋白($A\beta$)、突触和自噬功能相关蛋白表达水平,免疫荧光观察 $A\beta$ 和溶酶体共定位。结果 与对照组比较,七氟烷组小鼠空间学习记忆能力减退,同时引起海马中突触后密度蛋白 95(PSD95)减少, $A\beta$ 、微管相关蛋白轻链 3(LC3)和 p62 蛋白表达增加, $A\beta$ 与溶酶体相关膜蛋白 1(LAMP1)存在共定位。结论 七氟烷损伤 APP/PS1 小鼠认知功能,增加细胞内 $A\beta$ 沉积,可能与突触和自噬功能受损有关。

关键词 阿尔兹海默病; PSD-95; 七氟烷; 自噬

中图分类号 R 749.16

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)10-1522-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.10.008

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是老年痴呆的主要病因,以进行性认知功能减退为主要临床特征^[1]。研究^[2]表明自噬功能受损参与 AD 病理过程,AD 大脑中突触功能受损可能是 AD 学习记忆障碍的原因^[3]。术后认知功能障碍(postoperative cognitive dysfunction, POCD)是一种常见的手术麻醉后的中枢神经系统并发症,主要表现为焦虑、精神错乱以及学习记忆功能下降等^[4]。POCD 与 AD 都有学习记忆功能障碍,并且大量实验室研究^[5]表明麻醉后大脑中 AD 病理标志物 β 淀粉样蛋白(β amyloid, $A\beta$)产生增多;已经出现 AD 病理变化的大脑在麻醉后会出现怎样的变化,通过前期研究^[6]显示 AD 模型小鼠吸入七氟烷后的确出现认知功能进一步减退,但是其具体机制还不清楚,该实验主要探讨七氟烷麻醉后 AD 小鼠海马中 $A\beta$ 表达、突触和自噬功能

的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 32 只、6~7 月龄、雄性、SPF 级、APP^{swe}/PSEN1dE9(APP/PS1)双转基因 AD 模型小鼠购自南京大学动物模式中心,体质量 35~43 (39.6 $\pm$ 2.5) g。所有小鼠饲养在温度、湿度、灯光受调控的房间,食物和水充足。

1.1.2 主要试剂及来源 $A\beta$ 抗体(免疫印迹 1:1 000,免疫荧光 1:100, ab11132)、p62 抗体(1:1 000, ab56416)、Alexa Fluor 568 (1:500, ab175473) 和 Alexa Fluor 488 (1:500, ab150077) 购自英国 Abcam 公司;突触后密度蛋白 95(postsynaptic density protein 95, PSD95) 抗体(1:1 000, 3409S) 购自美国 CST 公司;LC-3 抗体(荧光 1:2 000,免疫印迹 1:200, NB100-2220) 购自美国 Novus Biologicals 公司;溶酶体相关膜蛋白 1(lysosomal associated membrane protein 1, LAMP1) (1:100, sc20011) 购自美国 Santa Cruz 公司;BCA 试剂盒(P0010S) 购自上海碧云天生物公司。

1.1.3 主要仪器 Olympus BX53 荧光显微镜(奥林巴斯公司);Amersham Imager 600 凝胶成像仪(美国通用公司);Allegra64R 离心机(美国贝克曼库尔特公司);Zeiss LSM710 共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司);Morris 水迷宫系统(上海吉量软件科技公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及麻醉药物处理 APP/PS1 小鼠随机分为两组:对照组($n=16$)和七氟烷组($n=16$)。小鼠置于 20 cm $\times$ 8 cm $\times$ 8 cm 透明自制麻醉箱内,盒两端各有一小孔,一端接七氟烷麻醉挥发罐输入 60% 空氧混合气(60% 氧气、40% 氮气)和七氟烷(日本 Maruishi Pharmaceutica 公司),另一端接麻醉气体监测仪(Ohmeda, 美国 Detax 公司)监测麻醉气体和氧气浓度。七氟烷组吸入 3% 七氟烷 4 h,载气为 60% 空氧混合气,流量 3 L/min,结束后载气洗脱 15 min。麻醉过程中,麻醉箱外包裹加热毯,温度

2018-05-22 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81571039);安徽省高校省级自然科学研究项目(编号:KJ2017A193)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院麻醉科,合肥 230022

作者简介: 耿鹏程,男,硕士研究生;

刘学胜,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: liuxuesheng@ahmu.edu.cn

探头检测小鼠直肠温度,维持温度 37 ~ 38 °C,维持小鼠自主呼吸。对照组置于麻醉箱内,不吸入七氟烷,只吸入 60% 空气混合气 4 h,流量为 3 L/min。

1.2.2 Morris 水迷宫实验 吸入七氟烷或氧气后 24 h,各组随机取 10 只小鼠,进行水迷宫实验。Morris 水迷宫为圆形水池直径为 120 cm,高 60 cm,平台高度 50 cm,直径 10 cm,平台低于水面 1 cm,池壁放置参照物,平台屏蔽剂为白色二氧化钛。水槽等分为 4 个象限,水槽中心上方放置摄像头计时跟踪小鼠游泳轨迹。实验期间参照物保持不变,保持安静,水温 20 ~ 22 °C。水迷宫实验共需 5 d,第 1 ~ 4 天为训练期,第 5 天为空间探索实验。训练期每只小鼠进行水迷宫训练,4 次/d,每次间隔 10 min 让小鼠休息,记录小鼠分别从 4 个象限找到平台所需的时间。若 90 s 内小鼠未找到平台,引导小鼠找到平台,时间计为 90 s。取 4 次找到平台所需时间的平均值作为潜伏期(escape latency)。空间探索实验:去除平台,将小鼠从平台对侧象限面向池壁放入水中,记录 90 s 内小鼠在原平台所在象限的停留时间(target quadrant time)和穿台次数(platform crossing times),计算平台所在原象限停留时间百分比(目标象限停留时间 ÷ 90 × 100%)。

1.2.3 Western blot 吸入氧气或者七氟烷后 24 h,每组 5 只小鼠采用腹腔注射戊巴比妥钠 100 mg/kg 麻醉后断头取脑,冰上分离出海马组织,置于冷冻管中放入液氮速冻保存。将取出的海马加入裂解液中裂解,冰上玻璃匀浆器匀浆 1 min,离心后取上清液,分装,加入样品缓冲液并煮沸 10 min,通过 BCA 法定量。使用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离样品蛋白,将电泳后的凝胶与 NC 膜叠在一起,在 350 mA 条件下转移至膜上,将膜置于 5% 脱脂牛奶中封闭 1 h,之后加入一抗 4 °C 过夜,次日在摇床上用 TBST 洗膜 3 次,之后加入二抗 37 °C 孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次后,将 ECL 显色液加入膜上并在凝胶成像仪下显影。

1.2.4 免疫荧光 经左心室注入 PBS 缓冲液,剪开右心耳使血液流出,灌注 PBS 30 ml 后注入 4% 多聚甲醛,随后完整取出大脑,放入 4% 多聚甲醛中固定 4 h,之后 30% 蔗糖脱水过夜,在冰冻切片机(SLEE,德国)下切取 8 μm 冠状面大脑切片,PBS 浸洗 10 min 后再用 0.1% TritonX-100 透膜 7 min,TBST 洗 3 次后,用 2% BSA(牛血清蛋白)封闭 1 h,加入一抗 4 °C 条件下孵育过夜,次日 TBST 洗 3 次,后加入二抗,在 37 °C 孵育 1 h,TBST 洗 3 次后使用 DAPI 染核 7 min,TBST 洗 3 次后,80% 甘油封片,通

过共聚焦显微镜观察。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,水迷宫实验中平均逃避潜伏期通过重复测量数据的双因素方差分析进行统计分析,然后进行 Bonferroni 事后检验(Post hoc test),穿台次数因为不是正态分布采用曼惠特尼检验(Mann-Whitney test),两两比较采用 student-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 七氟烷影响 APP/PS1 小鼠认知能力 APP/PS1 小鼠进行连续 5 d 水迷宫实验,前 4 天为训练期,经过重复测量数据的双因素方差分析,对照组和七氟烷组的平均逃避潜伏期在组间(对照组 vs 七氟烷组)和时间上的交互作用差异具有统计学意义($F = 6.84, P < 0.01$),事后检验表明训练第 3 天和第 4 天平均逃避潜伏期差异具有统计学意义(第 3 天: $44.9 \pm 10.1 \text{ s}$ vs $69.7 \pm 11.5 \text{ s}, P < 0.001$; 第 4 天: $38.2 \pm 11.9 \text{ s}$ vs $60.8 \pm 13.7 \text{ s}, P < 0.001$),七氟烷组表现为更长的潜伏期;见图 1A。两组小鼠在游泳速度上差异无统计学意义($0.167 \text{ m/s} \pm 0.035 \text{ m/s}$ vs $0.163 \text{ m/s} \pm 0.036 \text{ m/s}, P > 0.05$),排除运动能力对实验的影响,见图 1B。第 5 天为探索实验,对照组和七氟烷组小鼠目标象限停留时间百分比($25.8\% \pm 5.93\%$ vs $17.8 \pm 4.75\%, P < 0.05$)和穿台次数($1.8 \pm 1.03 \text{ 次}$ vs $0.8 \pm 0.63 \text{ 次}, P < 0.05$)差异均有统计学意义,七氟烷组目标象限停留时间和穿台次数更少,见图 1C、1D。

2.2 七氟烷影响 APP/PS1 小鼠海马 PSD95 表达 PSD95 是维持突触后部功能的一个重要的蛋白,Western blot 结果表明对照组与七氟烷组 APP/PS1 小鼠海马中 PSD95 水平差异具有统计学意义($P < 0.05$),对照组小鼠海马中 PSD95 明显高于七氟烷组,见图 2。

2.3 七氟烷影响 APP/PS1 小鼠海马细胞内 A β 表达 淀粉样蛋白前体通过 β 和 γ 淀粉酶剪切形成大量 A β 沉积是 AD 病理特征之一,Western blot 表明对照组和七氟烷组 APP/PS1 小鼠海马中 A β 水平差异具有统计学意义($P < 0.01$),七氟烷明显增加 A β 水平,见图 3。

2.4 七氟烷对 APP/PS1 小鼠海马自噬水平影响 微管相关蛋白轻链 3(microtubule related protein light chain 3,LC3)是自噬体的标志物,当自噬过程被激活,LC3 I 被剪切行成分子量较小的 LC3 II,并

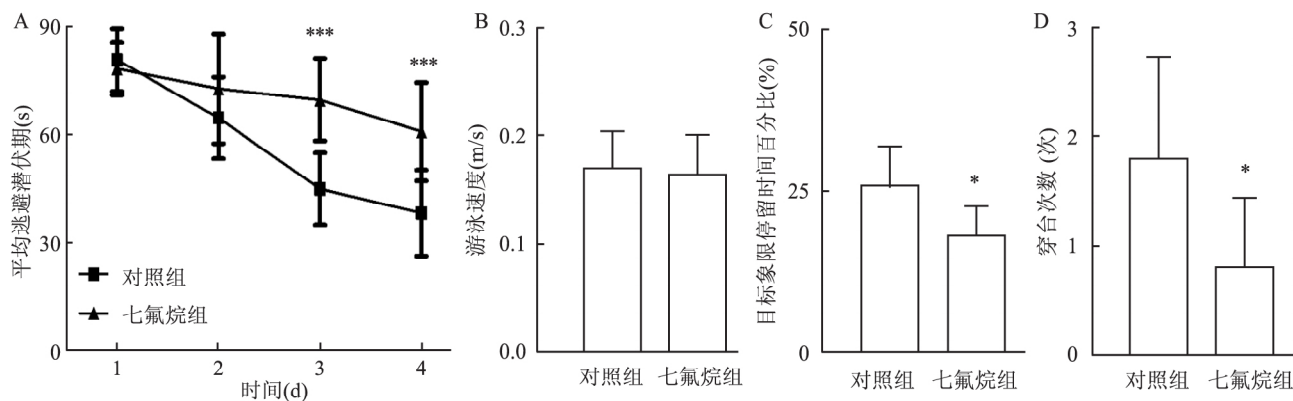


图1 3%七氟烷麻醉4 h对APP/PS1小鼠空间学习记忆能力影响

A: 两组小鼠连续4 d训练期平均逃避潜伏期; B: 两组小鼠游泳速度; C: 第5天的探索实验中两组小鼠在90 s内目标象限停留时间百分比; D: 探索实验中两组小鼠90 s内穿过原平台所在区域次数; 与对照组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

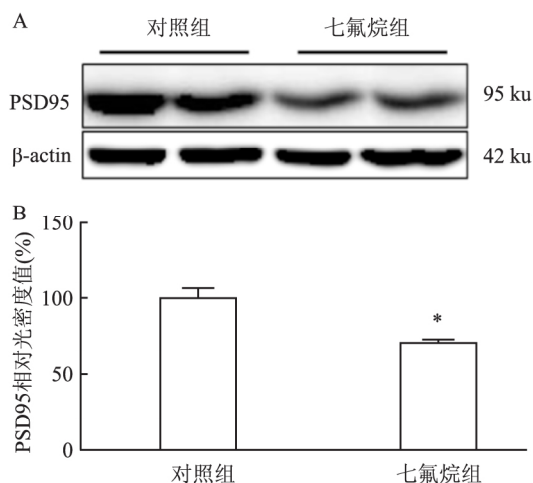


图2 60%氧气或3%七氟烷麻醉4 h后APP/PS1小鼠海马中PSD95表达

A: PSD95和β-actin的免疫印迹条带; B: PSD95光密度值标准化后的统计结果; 与对照组比较: * $P < 0.05$

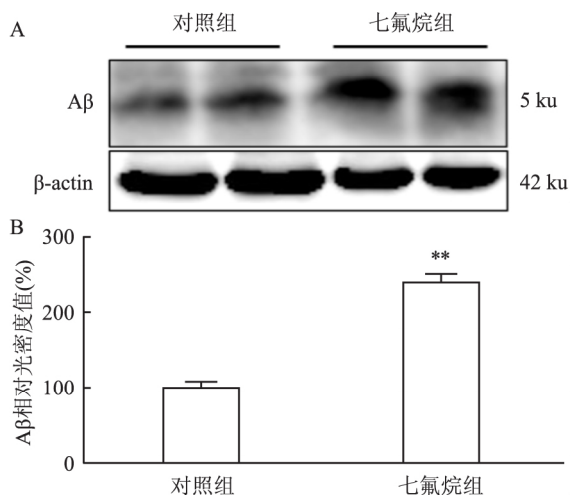


图3 两组小鼠海马中Aβ表达

A: Aβ和β-actin免疫印迹条带; B: Aβ光密度值标准化后的统计结果; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

且聚集到自噬体膜表面,进而包裹待降解物形成完整的自噬体。Western blot结果表明,对照组和七氟烷组APP/PS1小鼠海马中LC3 II蛋白水平($P < 0.01$)差异具有统计学意义,七氟烷组LC3 II水平明显增多,见图4。

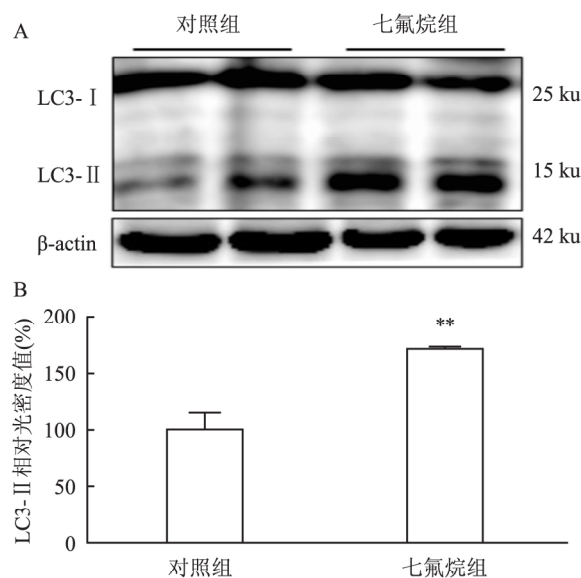


图4 两组小鼠海马中LC3表达水平

A: LC3 II、LC3 I及β-actin免疫印迹条带; B: LC3 II光密度值标准化后的统计结果; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.5 七氟烷影响溶酶体功能 p62是自噬的底物蛋白,LAMP1是溶酶体膜的标志蛋白,通过免疫荧光染色及共聚焦显微镜观察Aβ和LAMP1的位置,结果显示两种蛋白存在共定位(橙色荧光),说明Aβ存在溶酶体中,见图5A。通过Western blot检测对照组和七氟烷组小鼠海马中p62水平,两组

差异具有统计学意义($P < 0.05$),七氟烷组 p62 明显增多,见图 5B、5C。

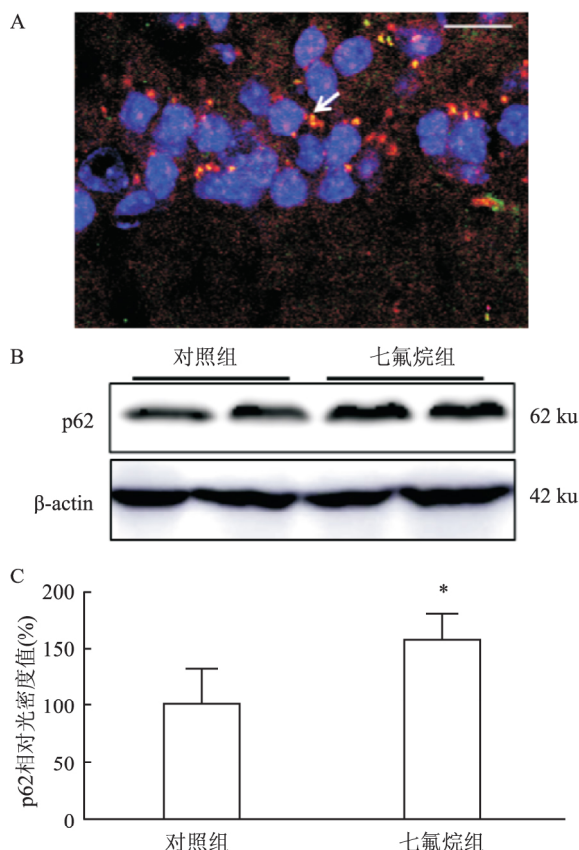


图5 Aβ与溶酶体共定位情况及两组小鼠海马中 p62 表达

A: 共聚焦显微镜观察 Aβ 和溶酶体共定位 $\times 400$; 蓝色荧光: 细胞核; 红色: Aβ; 绿色: LAMP1; 橙色: Aβ 和 LAMP1 共定位(白色箭头); B: p62 及 β-actin 的免疫印迹条带; C: p62 光密度值标准化后的统计结果; 与对照组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

全身麻醉对大脑功能的影响一直是麻醉领域研究的热点,由于患者的年龄、合并症、手术类型、围术期用药以及对 POCD 诊断标准的不同等等,这些混淆因素都使得全身麻醉药物与 POCD 的关联充满了不确定性。动物研究^[1]表明存在神经退行性疾病的大脑更容易受到麻醉药物的影响。七氟烷是目前临床上最常用的吸入麻醉药之一,有研究^[2]表明 POCD 可能与临床麻醉中应用七氟烷有关。APP/PS1 小鼠是一种 APP 和 PS1 突变基因共同表达的 AD 模型小鼠,在 6~7 月时大脑开始出现 Aβ 斑块沉积,7 月出现轻度认知功能障碍,可用来模拟 AD 的发病过程^[3],该实验证明了 3% 七氟烷全身麻醉可以加重 APP/PS1 小鼠认知功能障碍,说明存在

AD 风险的患者在七氟烷全麻后可能会加重或者加速 AD 的进程。

突触在学习记忆的形过程中具有重要作用,PSD95 是神经元的支架蛋白,存在多个结构域,参与了细胞内蛋白和蛋白之间的连接,PSD 的厚度以及相变可能是突触可塑性形成的基础^[4]。早在 1998 年就有研究^[5]表明突变的 PSD95 可以损伤小鼠 LTP 和学习记忆能力。该研究表明七氟烷引起 APP/PS1 小鼠 PSD95 减少,可能是其认知损伤的原因。在 AD 发展过程中,突触功能受损与认知功能障碍形成密切相关,老年斑的主要构成成分 Aβ 可能具有突触毒性,AD 患者和 AD 模型动物大脑中越靠近老年斑的突触丢失越严重^[6]。结合上述结果七氟烷引起海马中 Aβ 增多可能是 PSD95 减少的原因。

自噬是真核细胞中非常重要的生物学过程,与人类的生理学和病理学过程密切相关,正常的自噬功能通过消化降解错误折叠蛋白、损坏的细胞器及病原等物质维持细胞功能以及抵御不利因素的伤害。胞质中存在的均匀分布的 LC3 I,在自噬体起始复合物开始形成后与磷脂酰乙醇胺(PE)偶联形成 LC3 II,泛素化的蛋白通过 LC3 II 结合到自噬体上使自噬体延长,LC3 II 蛋白的积累变化是反映自噬流的常用方法^[7]。p62 可以作为自噬的底物,p62 蛋白通过 LC3 结合基团连接 LC3,并随着自噬体在自噬溶酶体中降解,抑制自噬功能引起 p62 增多^[8]。该实验显示七氟烷麻醉的 APP/PS1 小鼠海马中 LC3 和 p62 蛋白水平相比氧气组小鼠明显增多,说明七氟烷使自噬受损。在 AD 大脑中自噬功能受损导致 Aβ 降解受阻,细胞内 Aβ 增多^[9]。电针刺改善 AD 大脑中自噬功能有助于 Aβ 的降解,而阻断自噬则削弱其作用^[10]。3% 七氟烷损伤自噬功能可能是七氟烷引起 Aβ 增多的原因。

综上所述,该实验结果显示 3% 七氟烷引起 APP/PS1 小鼠空间学习记忆障碍,同时引起细胞内 Aβ 升高、自噬和突触功能受损;推测自噬受损引起 Aβ 增多,进而减少 PSD95 水平损伤突触功能可能是七氟烷引起 APP/PS1 小鼠记忆损伤的分子机制,接下来需要使用一些特异性阻断剂或激活剂研究这些分子之间的关联。

参考文献

[1] LaFerla F M, Green K N, Oddo S. Intracellular amyloid-beta in

- Alzheimer's disease [1]. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8(7): 499 – 509.
- [2] Nixon R A. Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease [1]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 23): 4081 – 91.
- [3] Selkoe D J. Alzheimer's disease is a synaptic failure [1]. *Science*, 2002, 298(5594): 789 – 91.
- [4] Moller J T, Cluitmans P, Rasmussen L S, et al. Long-term post-operative cognitive dysfunction in the elderly ISPOCD1 study [1]. *Lancet*, 1998, 351(9106): 857 – 61.
- [5] Xie Z, Xu Z. General anesthetics and β -amyloid protein [1]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2013, 47: 140 – 6.
- [6] 蒋震,戴伟,耿鹏程,等. 七氟醚对阿尔茨海默病小鼠认知功能的影响 [1]. *中华麻醉学杂志*, 2017, 37(4): 423 – 5.
- [7] Lu Y, Wu X, Dong Y, et al. Anesthetic sevoflurane causes neurotoxicity differently in neonatal naive and Alzheimer disease transgenic mice [1]. *Anesthesiology*, 2010, 112(6): 1404 – 16.
- [8] Le Freche H, Brouillette J, Fernandez-Gomez F J, et al. Tau phosphorylation and sevoflurane anesthesia an association to post-operative cognitive impairment [1]. *Anesthesiology*, 2012, 116(4): 779 – 87.
- [9] Reiserer R S, Harrison F E, Syverud D C, et al. Impaired spatial learning in the APPSwe + PSEN1DeltaE9 bigenic mouse model of Alzheimer's disease [1]. *Genes Brain Behav*, 2007, 6(1): 54 – 65.
- [10] Zeng M, Shang Y, Araki Y, et al. Phase transition in postsynaptic densities underlies formation of synaptic complexes and synaptic plasticity [1]. *Cell*, 2016, 166(5): 1163 – 75.
- [11] Migaud M, Charlesworth P, Dempster M, et al. Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein [1]. *Nature*, 1998, 396(6710): 433 – 9.
- [12] Tu S, Okamoto S, Lipton S A, et al. Oligomeric $A\beta$ -induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease [1]. *Mol Neurodegener*, 2014, 9(1): 48.
- [13] Vicencio J M, Lavandero S, Szabadkai G. Ca^{2+} , autophagy and protein degradation: thrown off balance in neurodegenerative disease [1]. *Cell Calcium*, 2010, 47(2): 112 – 21.
- [14] Torisu T, Torisu K, Lee I H, et al. Autophagy regulates endothelial cell processing, maturation and secretion of von Willebrand factor [1]. *Nat Med*, 2013, 19(10): 1281 – 7.
- [15] Guo H D, Zhu J, Tian J X, et al. Electroacupuncture improves memory and protects neurons by regulation of the autophagy pathway in a rat model of Alzheimer's disease [1]. *Acupunct Med*, 2016, 34(6): 449 – 56.

Synapsis and autophagy impairment is involved in the sevoflurane-induced cognitive dysfunction in APP/PS1 mice

Geng Pengcheng, Zhang Jiqian, Tan Qilian, et al

(Dept of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the possible mechanism of sevoflurane on the cognition and Alzheimer's disease (AD) pathology change in the APP/PS1 transgenic mice. **Methods** Thirty APP/PS1 transgenic mice were divided into control group and sevoflurane group according to a random number table, the mice were treated with inhaling 60% oxygen or 3% sevoflurane for 4 h, respectively, 24 h after treatment, the Morris water maze test was used to observe the mice behavior, meanwhile the β amyloid ($A\beta$), the synapsis and autophagy related protein content in the hippocampus were detected by Western blot. Immune-fluorescence was used to observe the $A\beta$ colocalizes with lysosome. **Results** Compared with the control group, the spatial learning and memory abilities of mice in the sevoflurane group decreased, while the postsynaptic density protein 95 (PSD95) in the hippocampus decreased, and the expression of $A\beta$, microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) and p62 protein increased. $A\beta$ was co-localized with lysosome-associated membrane protein 1 (LAMP1). **Conclusion** Sevoflurane can impair the cognition of the APP/PS1 transgenic mice, increase the accumulation of $A\beta$, and these effects may be associated with the impairment of synapsis and autophagy.

Key words Alzheimer disease; PSD-95; sevoflurane; autophagy