

miR-138 通过靶向 LCN2 在七氟醚诱导的大鼠认知障碍中的作用及机制*

郑育秀 刘丽丽 黄泽波 王涛 刘莉芳

(海南医学院第二附属医院麻醉科, 海南海口 570311)

【摘要】 目的 探讨 miR-138 通过靶向 LCN2 在七氟醚诱导的大鼠认知障碍中的作用及机制。方法 将 90 只 7 周龄 SD 大鼠随机分为对照组 ($n=20$)、七氟醚组 ($n=20$)、七氟醚+NC mimic 组 ($n=20$)、七氟醚+miR-138 mimic 组 ($n=20$)、七氟醚+miR-138 mimic 组+vector 组 ($n=5$)、七氟醚+miR-138 mimic+pcDNA-LCN2 组 ($n=5$)。构建七氟醚诱导的大鼠认知障碍模型,七氟醚诱导的大鼠分别注射 10 μ L miR-138 mimic、NC mimic 慢病毒悬液。采用 Morris 水迷宫实验分析潜伏期、跨台时间和游泳速度;HE 染色检测海马神经元的病理变化;TUNEL 染色检测海马神经元凋亡情况;实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测 miR-138、脂质运载蛋白 2(LCN2)的 mRNA 水平表达;双荧光素酶报告基因系统用于检测 miR-138 和 LCN2 之间的关系;Western blotting 检测海马组织中 LCN2、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9、Bax、Bcl-2、p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白水平;ELISA 实验检测海马组织中 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 。结果 与对照组比较,七氟醚组中 miR-138 表达水平显著降低($P<0.05$);大鼠逃避潜伏期显著增加,穿越平台次数显著减少,海马神经元损伤,海马神经元凋亡数量显著增加,cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 和 Bax 蛋白水平显著升高,Bcl-2 显著降低,IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 水平升高,p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白水平降低(均 $P<0.05$)。与七氟醚+NC mimic 组比较,七氟醚+miR-138 mimic 组中大鼠逃避潜伏期减少,穿越平台次数增加,神经元病理损伤减轻,海马神经元凋亡数量显著减少,cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 和 Bax 蛋白水平降低,Bcl-2 水平升高,IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 水平降低,p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白水平升高(均 $P<0.05$)。双荧光素酶报告基因结果显示 LCN2 是 miR-138 的靶基因,过表达 LCN2 可显著逆转 miR-138 对七氟醚诱导的认知障碍大鼠凋亡的作用($P<0.05$)。结论 miR-138 靶向 LCN2 通过 JAK2/STAT3 通路对七氟醚诱导的认知障碍具有神经保护作用。

【关键词】 七氟醚;认知障碍;miR-138;LCN2;JAK2/STAT3 通路

【中图分类号】 R614 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 10. 008

The role and mechanism of miR-138 in sevoflurane-induced cognitive impairment in rats by targeting LCN2

ZHENG Yuxiu, LIU Lili, HUANG Zebo, WANG Tao, LIU Lifang

(Department of Anesthesiology, The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570311, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the neuroprotective effect of miR-138 on cognitive impairment induced by sevoflurane anesthesia. **Methods** 7-week-old SD rats were randomly divided into control group, sevoflurane group, sevoflurane+NC mimic group, sevoflurane+miR-138 mimic group, sevoflurane+miR-138 mimic vector group, sevoflurane+miR-138 mimic+pcDNA-LCN2 group. A rat model of cognitive impairment induced by sevoflurane was constructed. The rats induced by sevoflurane were injected with 10 μ L miR-138 mimic and NC mimic lentivirus suspensions. Morris water maze experiment was used to analyze the incubation period, cross-stage time and swimming speed. HE staining was used to detect the pathological changes of hippocampal neurons. TUNEL staining was used to detect the apoptosis of hippocampal neurons. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect miR-138 and lipocalin 2 (LCN2) mRNA level expression. The dual luciferase reporter gene system was used to detect the relationship between miR-138 and LCN2. Western blotting was used to detect LCN2, cleaved caspase-3, cleaved caspase-9, Bax, Bcl-

基金项目:国家自然科学基金委员会资助项目(81660195);海南省卫生健康行业科研项目(20A200379)

引用本文:郑育秀,刘丽丽,黄泽波,等. miR-138 通过靶向 LCN2 在七氟醚诱导的大鼠认知障碍中的作用及机制[J]. 西部医学,2022,34(10):

1442-1449. DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 10. 008

2, p-JAK2 and p-STAT3 protein levels. ELISA test was used to detect IL-6, TNF- α , IL-1 β in hippocampus. **Results** Sevoflurane group compared with control group, miR-138 expression level was significantly reduced ($P < 0.05$). The number of hippocampal neuronal damage and apoptosis were significantly increased, the protein levels of cleaved caspase-3, cleaved caspase-9 and Bax were significantly increased, and the protein levels of Bcl-2 were significantly decreased. IL beta, TNF-1 alpha, IL-6 levels, p-JAK2 and p-STAT3 protein levels ($P < 0.05$). Compared with sevoflurane+miR-138 mimic group, the escape latency of rats in sevoflurane+miR-138 mimic group was decreased, The Times of crossing platform was increased, neuronal pathological damage was attenuated, and the number of hippocampal neuronal apoptosis was significantly decreased. Cleaved caspase 3, cleaved caspase 9 and Bax protein levels are low, the Bcl-2 levels, IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6 levels drop, p-JAK2 and p-STAT3 protein levels (both $P < 0.05$). Dual luciferase reporter gene showed LCN2 is miR-138 target genes, overexpression of LCN2 can significantly reversed miR-138 for cognitive impairment induced by sevoflurane apoptosis in rats ($P < 0.05$). **Conclusion** miR-138 targeting LCN2 has a neuroprotective effect on sevoflurane-induced cognitive impairment through JAK2/STAT3 pathway.

【Key words】 Sevoflurane; Cognitive impairment; miR-138; LCN2; JAK2/STAT3 pathway

术后认知功能障碍(Postoperative cognitive dysfunction, POCD)是一种神经变性疾病,以长期 POCD 综合征为特征^[1]。手术和麻醉是导致认知障碍的主要原因,七氟醚麻醉可减少海马区的神经发生和神经元存活^[2]。此外,七氟醚麻醉可引起神经毒性和 POCD^[3]。因此,有必要探索一种针对七氟醚麻醉诱导的 POCD 的有效神经保护方法。越来越多的证据^[4]表明,手术麻醉诱导的认知障碍与大脑发育相关的多种基因表达的改变有关。近年来,微小核糖核酸(miRNAs, miRNAs)的失调与麻醉相关的 POCD 有关^[5]。MiRNAs 是一种小的非编码 RNA,通过抑制转录本的翻译或诱导靶 mRNA 的降解负向调控基因表达。此外,越来越多的 miRNAs 已被证明与麻醉剂诱导的海马细胞凋亡有关^[6-7]。由于 miRNAs 在细胞死亡和分化的调节中具有重要作用,鉴定参与麻醉剂暴露引起认知障碍的 miRNAs 并了解其功能分子机制至关重要。有一项研究^[8]筛选了七氟醚暴露后差异表达的 miRNAs,研究表明七氟醚治疗后,miR-138 是显著下调的 miRNAs 之一。然而 miR-138 在七氟醚麻醉诱导中的功能性分子机制仍未知。Janus 激酶 2/信号转导和转录激活因子 3(Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3, JAK2/STAT3)信号通路参与了许多生理过程,包括炎症、增殖、分化和发育,它可能有助于驱动神经元对细胞因子的生存反应^[9]。此外, JAK2/STAT3 是 POCD 发展的潜在机制。李等^[10]证明 Kappa 阿片受体激动剂对大鼠 POCD 具有神经保护作用,部分是通过抑制 JAK2/STAT3 通路介导的。在阿尔茨海默氏症的动物模型中,激活 JAK2/STAT3 通路改善空间学习和记忆^[11]。总之,这表明 miR-138 可能通过 JAK2/STAT3 信号通路参与七氟醚麻醉诱导的 POCD。因此,本研究通过七氟醚治疗建立认知障碍

大鼠模型,进一步探讨 miR-138 在七氟醚麻醉诱导认知障碍中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 7 周龄 SD 大鼠(240 ± 10) g 90 只,将其饲养在标准条件的实验室中[温度(22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度(60 ± 5)%、光照/黑暗周期为 12 h]。大鼠可随意获得水和食物。所有实验均经我院伦理委员会批准,并遵循国家卫生研究院关于动物护理和使用的指南进行。

1.2 主要试剂及仪器 七氟醚(上海恒瑞制药有限公司); miR-138 mimic、NC mimic、pcDNA-LCN2 腺病毒载体合成[汉恒生物科技(上海)有限公司];苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);逆转录系统、SYBR Premix Ex Taq II、双荧光素酶报告基因检测试剂盒[普洛麦格(北京)生物技术有限公司];ELISA 试剂盒(Abcam 公司);BCA 试剂盒(武汉博士德生物有限公司);脂质运载蛋白 2(Lipopalin-2, LCN2)、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9、Bax、Bcl-2、JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、GAPDH (Abcam 公司)。Morris 水迷宫视频分析系统(上海玉研科学仪器有限公司);分光光度计(Thermo Fisher Scientific 公司);多功能酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司];显微镜(Leica 公司);凝胶成像分析系统(Bio-Rad 公司)。

1.3 方法

1.3.1 动物分组及七氟醚麻醉 将 SD 大鼠随机分为对照组(20 只)、七氟醚组、七氟醚+NC mimic 组、七氟醚+miR-138 mimic 组、七氟醚+miR-138 mimic+Vector 组、七氟醚+miR-138 mimic+pcDNA-LCN2 组。选用 70 只大鼠构建七氟醚麻醉诱导的认知障碍大鼠模型,将大鼠置于一个以 5 L/min 的速率供应 2.5% 的七氟醚和空气-氧气混合物(吸入氧气分数为 40%)的麻醉室内,持续吸入 6 h。实验过程中用麻醉

气体监测仪连续监测七氟醚和氧气的浓度,并测量直肠温度维持在 37℃ 左右。其中,20 只大鼠为七氟醚组,剩余 50 只七氟醚诱导的大鼠侧脑室分别注射 10 μL NC mimic、miR-138 mimic 以及共注射 miR-138 mimic+Vector 和 miR-138 mimic+pcDNA-LCN2 腺病毒悬液,记为七氟醚+NC mimic 组(20 只)、七氟醚+miR-138 mimic 组(20 只)、七氟醚+miR-138 mimic+Vector 组(5 只)、七氟醚+miR-138 mimic+pcDNA-LCN2 组(5 只)。对照组大鼠:吸入空气-氧气混合物 6 h,共 20 只。

1.3.2 Morris 水迷宫实验 通过实验评估暴露于七氟醚和常规空气中大鼠的学习和记忆能力。每组大鼠被训练在圆形水池中游泳 5 天。水池中放置一个直径约 10 cm、距水面 2 cm 的隐藏圆形平台。将大鼠从不同位置(北、南、东、西)放入水中,实验要求大鼠在 60 s 内游泳并找到平台,当大鼠在规定时间内无法找到隐藏的平台时,则将大鼠引导到平台上,休息 10 s 再进行下一次实验。采用 ANY-maze 动物行为视频跟踪系统记录第 5 d 每只大鼠找到平台的时间(逃避潜伏期)、穿越平台次数。

1.3.3 HE 染色 HE 染色检测大鼠海马神经元的病理变化。各组大鼠深度麻醉后,逐层解剖暴露心脏,先灌注 0.9%生理盐水,再灌注 4%多聚甲醛。灌注成功后解剖脑组织,固定后用石蜡包埋并切片。根据苏木精-伊红(HE)染色试剂盒说明书进行染色,苏木精染色细胞核,伊红染色细胞质。最后,在显微镜下观察海马神经元的形态并拍照。

1.3.4 实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR) Morris 水迷宫实验结束后,通过断头处死大鼠。在冰上快速解剖海马组织,使用研钵将组织磨成粉末。分别用 Trizol 试剂从海马组织中提取总 RNA。使用分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度。使用反转录试剂盒将 1 μg 的总 RNA 逆转录为 cDNA。用 SYBR Premix Ex Taq II 检测 miR-138 和 LCN2 的表达水平。GAPDH 和 U6 分别用作 LCN2 和 miR-138 的内部对照,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算目的基因的相对表达量。基因引物列表,见表 1。

1.3.5 Western blotting 大鼠海马组织在含有 1% 苯甲磺酰氟的 RIPA 裂解缓冲液中匀浆。离心后收集上清液。采用 BCA 蛋白测定法测定蛋白浓度。蛋白质样品经 15% SDS-PAGE 分离。随后,蛋白质被转移到 PVDF 膜上。在室温下,将膜在 5%脱脂牛奶封闭 1 h,随后与一抗在 4℃ 孵育过夜,然后与相应的二抗在 37℃ 孵育 1 h。GAPDH 作为内参。用化学发光试剂显现条带,并在 Bio-Rad 凝胶成像系统下观察。利用 Image J 软件分析目标条带的灰度值。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

名称	引物序列
miR-138	F:5'-ACACTCCAGCTGGGAGCTGGTGTG-3' R:5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
U6	F:5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3' R:5'-AACGCTTACGAATTTGCGT-3'
LCN2	F:5'-CTGATCAGTGTGCCCTGCAG-3' R:5'-GGAGCTTGAACGAATGTTCTG-3'
GAPDH	F:5'-ACACCCACTCCTCCACCTT-3' R:5'-TTACTCCTTGGAGGCCATGT-3'

1.3.6 酶联免疫吸附实验(ELISA) 将每组大鼠的冷冻海马标本与适量生理盐水混合。充分匀浆后,在 4℃ 下以 8000 g 的速度离心 10 min。收集上清,根据试剂盒说明书使用 ELISA 试剂盒测定海马组织中 IL-6、TNF-α 和 IL-1β 的表达水平。

1.3.7 末端脱氧核糖核酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL 法) 使用 TUNEL 染色试剂盒检测大鼠海马神经元凋亡。取 TUNEL 试剂盒中试剂 1(TdT)和试剂 2(dUTP)按 1:9 混合,覆盖切片。TUNEL 标记后,用 4-6-二氨基-2-苯基吡啶(DAPI)作为荧光示踪剂复染海马神经元以检测细胞核。脑凋亡细胞均为 TUNEL 阳性,荧光显微镜下为绿色荧光标记。

1.3.8 双荧光素酶报告基因 将 LCN2 的野生型(WT-LCN2)和突变型(MUT-LCN2)3'UTR 构建到 pMIR-REPORT 萤火虫荧光素酶载体中,该载体包含 miR-138 的预测结合位点。将 293T 细胞以 1000 个细胞/孔的密度接种到 96 孔板中。然后使用 Lipofectamine 2000 共转染 100 nM miR-138 mimic 或 NC mimic。转染 48 h 后,使用双荧光素酶报告分析试剂盒测定荧光素酶活性,并用肾素荧光素酶活性标准化。实验重复 3 次。基因序列:miR-138 序列为 GCC GGACUAAGUGUUGUGGUCGA; WT-LCN2 序列为 AUCACCUGGCUGCCCCACCAGCC; MUT-LCN2 序列为 AUCACCUGGCUGCCCACAAGAAC。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件统计分析。所有数据使用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组之间比较采用 *t* 检验。所有实验重复 3 次。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-138 在七氟醚诱导的大鼠海马中的表达水平 与对照组比较,七氟醚组和七氟醚+NC mimic 组大鼠海马中 miR-138 的表达均显著降低($P < 0.05$);与七氟醚组、七氟醚+NC mimic 组比较,七氟醚+miR-138 mimic 组大鼠海马中 miR-138 的表达显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

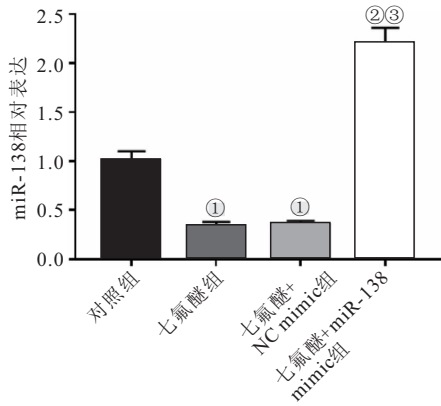


图 1 各组大鼠海马中 miR-138 的表达水平

Figure 1 The expression level of miR-138 in the hippocampus of each group of rats

注:与对照组比较,① $P < 0.05$;与七氟醚组比较,② $P < 0.05$;与七氟醚+NC mimic 组比较,③ $P < 0.05$

2.2 miR-138 改善七氟醚诱导的大鼠空间认知能力

Morris 水迷宫实验结果显示,与对照组比较,七氟醚组和七氟醚+NC mimic 组大鼠逃避潜伏期均显著增加,穿越平台次数均显著减少($P < 0.05$);与七氟醚组、七氟醚+NC mimic 组比较,七氟醚+miR-138 mimic 组大鼠逃避潜伏期显著减少,穿越平台次数显著增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 miR-138 减轻七氟醚诱导的大鼠海马神经元病理损伤

HE 染色结果显示,对照组海马组织排列规则,未见明显的病理损伤;七氟醚组和七氟醚+NC mimic 组大鼠海马神经元细胞形态不完整,核浓缩,排列紊乱松散,体积小;而七氟醚+miR-138 mimic 组大

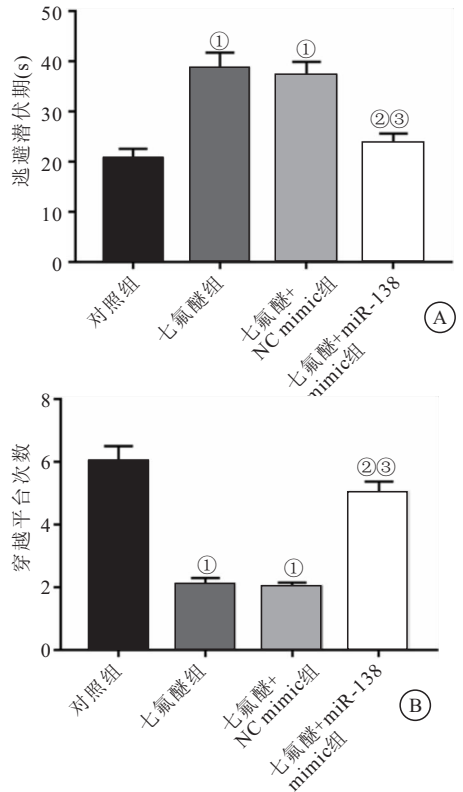


图 2 miR-138 改善七氟醚诱导的大鼠空间认知能力

Figure 2 miR-138 improves rat spatial cognition induced by sevoflurane
注:A. 各组大鼠逃避潜伏期的比较;B. 各组大鼠穿越平台次数的比较。与对照组比较,① $P < 0.05$;与七氟醚组比较,② $P < 0.05$;与七氟醚+NC mimic 组比较,③ $P < 0.05$

鼠海马神经元的病理损伤一定程度上得到了改善,病理损伤减轻。见图 3。

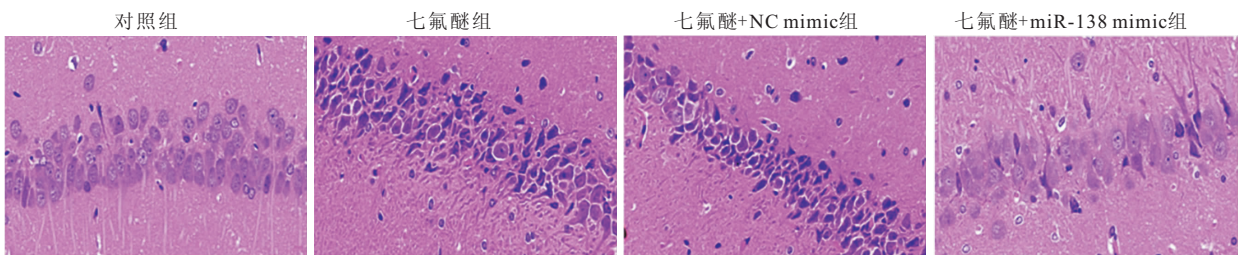


图 3 HE 染色检测各组大鼠海马神经元病理损伤(400×)

Figure 3 HE staining to detect the pathological damage of hippocampal neurons in each group of rats

2.4 miR-138 抑制七氟醚诱导的大鼠海马神经元凋亡

Western blotting 结果显示,与对照组比较,七氟醚组和七氟醚+NC mimic 组大鼠海马神经元凋亡数量均显著增加,cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 和 Bax 蛋白水平均显著升高,Bcl-2 显著降低(均 $P < 0.05$);与七氟醚组、七氟醚+NC mimic 组比较,七氟醚+miR-138 mimic 组大鼠海马神经元凋亡数量显著减少,cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 和 Bax 蛋白水平降低,Bcl-2 升高,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图 4。

2.5 miR-138 抑制七氟醚诱导的大鼠海马神经元炎症反应

ELISA 实验结果显示,与对照组比较,七氟醚组和七氟醚+NC mimic 组大鼠中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 水平均显著增加(均 $P < 0.05$);与七氟醚组、七氟醚+NC mimic 组比较,七氟醚+miR-138 mimic 组中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 水平降低,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图 5。

2.6 LCN2 是 miR-138 的靶基因

双荧光素酶报告实验显示,与 LCN2-MUT 和 miR-138 mimic 共转染

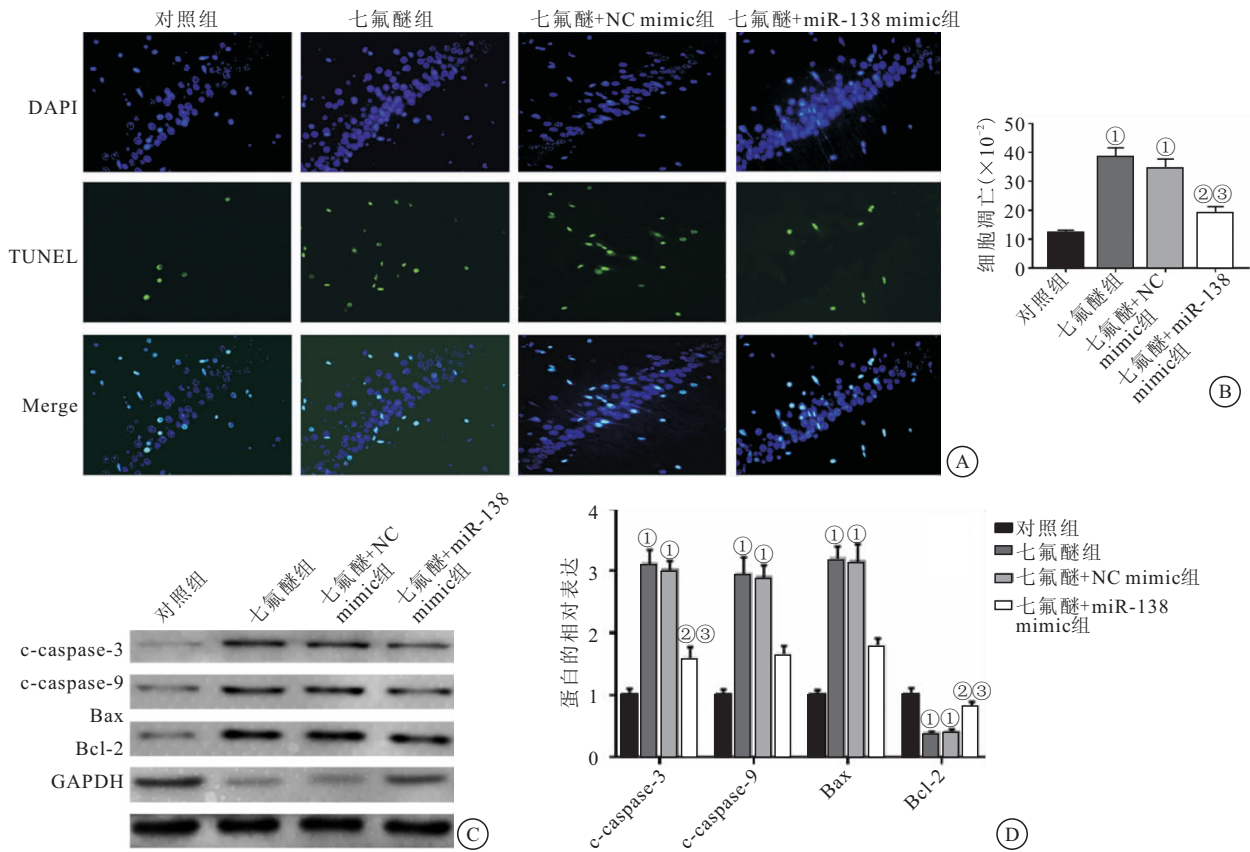


图 4 miR-138 抑制七氟醚诱导的大鼠海马神经元凋亡

Figure 4 miR-138 inhibits sevoflurane-induced apoptosis of rat hippocampal neurons

注: A、B. TUNEL 染色检测海马神经元凋亡; C、D. Western blotting 检测大鼠海马中凋亡蛋白的表达。与对照组比较, ①P<0.05; 与七氟醚组比较, ②P<0.05; 与七氟醚+NC mimic 组比较, ③P<0.05

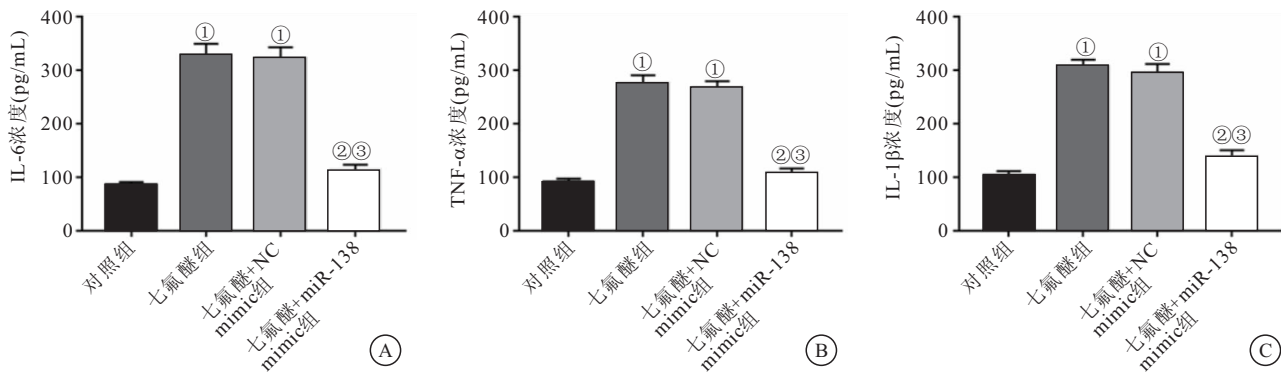


图 5 miR-138 抑制七氟醚诱导的大鼠海马神经元炎症反应

Figure 5 miR-138 inhibits sevoflurane-induced inflammatory response in rat hippocampal neurons

注: A~C. ELISA 检测大鼠海马中 IL-1β、TNF-α、IL-6 水平的表达。与对照组比较, ①P<0.05; 与七氟醚组比较, ②P<0.05; 与七氟醚+NC mimic 组比较, ③P<0.05

的细胞相比, miR-138 mimic 与 LCN2-MUT 共转染的细胞相对荧光素酶活性显著降低 (P<0.05)。此外, RT-qPCR 和 Western blotting 结果显示, 与对照组比较, 七氟醚组和七氟醚+NC mimic 组中 LCN2 水平均显著升高, 而七氟醚+miR-138 mimic 组 LCN2 水平较七氟醚组、七氟醚+NC mimic 组显著降低(均

P<0.05)。见图 6。

2.7 miR-138 靶向 LCN2 对七氟醚诱导的海马中 JAK2/STAT3 通路蛋白及凋亡蛋白的影响 与七氟醚+NC mimic 组比较, 七氟醚+miR-138 mimic 组中 cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 和 Bax 蛋白水平降低, Bcl-2 水平升高, p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白水平

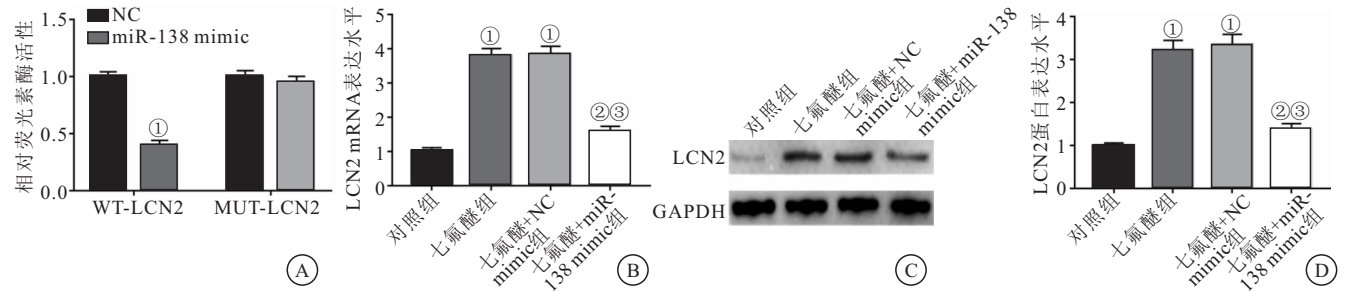


图 6 LCN2 是 miR-138 的靶基因

Figure 6 LCN2 is the target gene of miR-138

注: A. 各组相对荧光素酶活性水平; B. 各组大鼠 LCN2 mRNA 水平的表达; C、D. 各组大鼠 LCN2 蛋白水平的表达。与对照组比较, ① $P < 0.05$; 与七氟醚组比较, ② $P < 0.05$; 与七氟醚+NC mimic 组比较, ③ $P < 0.05$

升高(均 $P < 0.05$); 与七氟醚+miR-138 mimic 组、七氟醚+miR-138 mimic+Vector 组比较, 七氟醚+miR-138 mimic+pcDNA-LCN2 组中 cleaved caspase-3、

cleaved caspase-9 和 Bax 蛋白水平均显著升高, Bcl-2 水平降低, p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白水平均显著降低, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图 7。

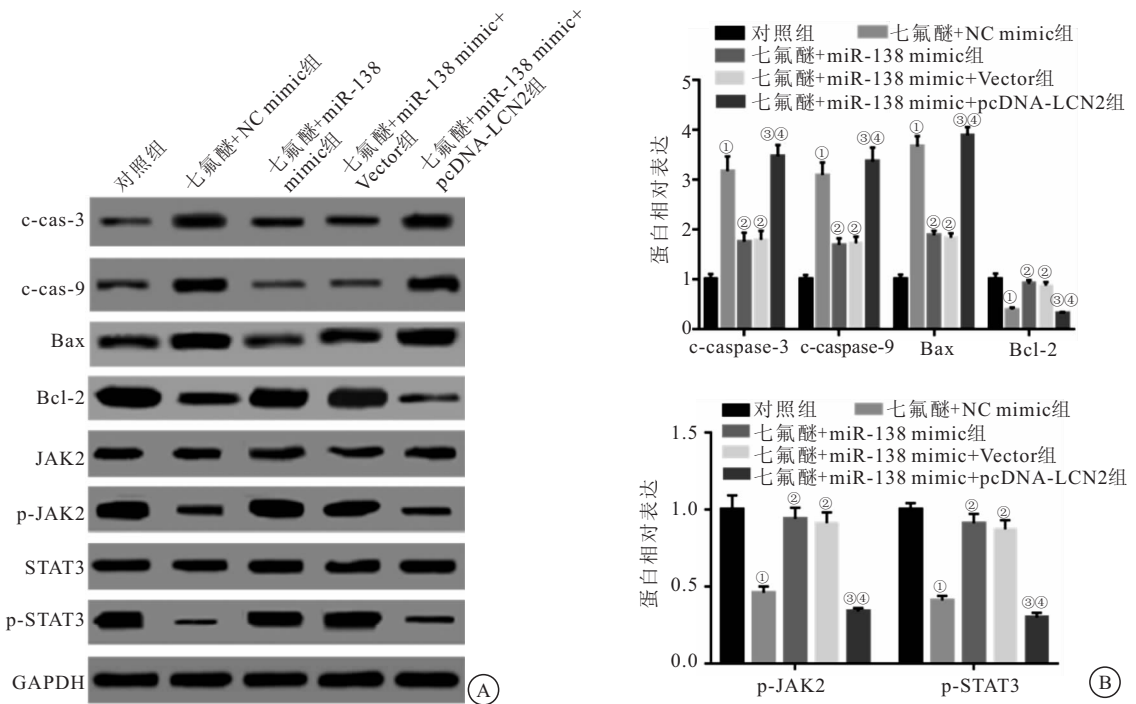


图 7 各组大鼠 JAK2/STAT3 通路蛋白及凋亡蛋白的表达

Figure 7 Expression of JAK2/STAT3 pathway protein and apoptosis protein in each group of rats

注: A、B. Western blotting 检测大鼠海马中 JAK2/STAT3 通路蛋白及凋亡蛋白表达。与对照组比较, ① $P < 0.05$; 与七氟醚+NC mimic 组比较, ② $P < 0.05$; 与七氟醚+miR-138 mimic 组比较, ③ $P < 0.05$; 与七氟醚+miR-138 mimic+Vector 组比较, ④ $P < 0.05$

3 讨论

POCD 发病机制复杂, 由麻醉和手术及多种因素引起的神经功能衰退, 包括中枢神经系统的炎症反应和凋亡。七氟醚是一种常用的吸入麻醉剂, 引起的 POCD 的机制与神经炎症和细胞凋亡密切相关^[12]。因此, 深入了解七氟醚诱发 POCD 的机制, 寻找合适的靶点和机制来减少甚至消除 POCD 的发生是研究的重点。

据报道, 许多 miRNAs 与麻醉诱导的 POCD 有关。其中, 在七氟醚治疗后, miR-96 被证明可促进海马神经元凋亡, 加重七氟醚对海马神经元和认知功能的影响^[13]。此外, miR-34a 可促进七氟醚诱导的海马细胞凋亡^[14]。然而, 一些 miRNA 对七氟醚介导的细胞凋亡具有神经保护作用。研究发现 miR-665 抑制七氟醚诱导的细胞凋亡, 提示具有潜在的神经保护作用。有研究^[8]报道, miR-138 是七氟醚暴露后下调最显著的 miRNA 之一。本研究结果表明, 与对照组大鼠相比, 接受七氟醚治疗的大鼠海马组织中 miR-138

水平降低。

海马体是学习、记忆以及其他基本认知能力的关键大脑区域^[15]。因此,本实验重点研究海马体。七氟醚暴露可导致空间学习和记忆损伤^[16]。本研究建立了七氟醚诱导的动物模型,通过 Morris 水迷宫实验评估认知能力,结果发现暴露在七氟醚中会导致空间学习和记忆的缺失,表现为逃避潜伏期显著增加,穿越平台次数显著减少;此外,七氟醚暴露导致海马神经元严重损伤,这与之前的报道^[17]关于麻醉药引起的认知障碍是一致的。miR-138 可以减少潜伏期时间,增加穿越平台次数,海马神经元的病理损伤减轻,这些结果表明 miR-138 可能在七氟醚麻醉诱导的大鼠认知障碍中具有重要作用。

研究^[18]表明,七氟醚麻醉引起的大脑结构和神经 POCD 的变化是由激活的 caspase-3 的表达变化和神经细胞凋亡诱导引起的。Bcl-2 家族的蛋白质,如 Bax 和 Bcl-2 被发现是调节线粒体膜对细胞色素 C 的通透性的分子,而 Caspase-9 被发现在细胞死亡中起核心作用^[19]。抗凋亡蛋白 Bcl-2 在神经退行性疾病、缺血、氧化应激和创伤等多种逆境下调节神经元凋亡中发挥着关键作用,促凋亡 Bax 是许多神经细胞群体中诱导凋亡和坏死的重要因素^[20-21]。而 miR-138 治疗则改善七氟醚诱导的神经元凋亡,这可以通过 TUNEL 染色以及凋亡蛋白 cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 和 Bax 水平的降低以及 Bcl-2 蛋白水平的升高来证明,提示 miR-138 通过抑制中枢神经细胞凋亡发挥神经保护作用。然而,POCD 病的发病机制非常复杂,可能包括吸入麻醉药的直接作用、手术创伤的后果以及炎症反应。针对炎症因子分布,有证据^[22]表明,海马中促炎症因子和抗炎因子水平的变化与七氟醚诱导的 POCD 有关。此外,我们还证明了 miR-138 对炎症的抑制作用,包括降低 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 的水平。虽然 miRNA 在七氟醚诱导的神经元凋亡和炎症中发挥不同的作用,但 miRNA 的表达与七氟醚诱导的神经元进展密切相关。这些结果表明 miR-138 可以作为海马凋亡和炎症的抑制因子,减轻七氟醚麻醉诱导的认知障碍。

为了进一步确定 miR-138 在七氟醚诱导的认知障碍中的作用机制,本研究证明了 miR-138 可以与 LCN2 的 3'-UTR 结合并负调控其水平。在其他疾病中,miR-138-5p 和 LCN2 表现出与我们的结果一致的调节关系。如 miR-138 可以负调控 LCN2 的表达,从而抑制缺氧诱导的心肌细胞凋亡^[23]。LCN2 是分泌型脂蛋白家族的成员,参与先天免疫、细胞凋亡和肾脏发育等多种细胞过程^[24]。既往研究^[25]还表明

LCN2 缺失会减弱海马神经元死亡和认知能力下降。此外,脑室内注射重组 LCN2 蛋白引起 CA1 神经元死亡和 POCD。据报道^[26] LCN2 通过 JAK2/STAT3 通路抑制神经炎症损伤,在脑缺血中发挥了强大的治疗作用。研究^[27]发现 JAK2/STAT3 通路和认知功能有关,如右美托咪定通过 JAK2/STAT3 途径减轻异氟醚诱导的认知障碍;山参处理通过激活 JAK2/STAT3 显著减轻了通常由三甲基素引起的认知障碍^[28]。目前的研究发现,异氟醚麻醉不仅增加了 Bax 的表达,降低了 Bcl-2 的表达,而且还增加了 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白的水平。这些结果表明七氟醚诱导的大鼠海马神经元凋亡与 JAK2/STAT3 通路的激活有关。此外,miR-138 治疗抑制了神经元的凋亡,并且 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白的水平降低,而 LCN2 过表达又一次逆转这一结果,表明 miR-138 靶向 LCN2 通过 JAK2/STAT3 通路抑制七氟醚麻醉诱导的海马神经元凋亡。

4 结论

本研究结果提示,miR-138 靶向 LCN2 通过 JAK2/STAT3 信号通路对七氟醚麻醉诱导的大鼠 POCD 具有神经保护作用,为七氟醚麻醉诱导的认知障碍治疗提供了新的靶点。然而,miR-138 在七氟醚麻醉诱导的认知障碍中的分子机制要进一步阐明,仍需进一步深入研究。

【参考文献】

- [1] 蒋素芳,李旭泽,黄立宁,等. 老龄大鼠术后早期认知功能障碍与神经调节蛋白 1 β 的关系[J]. 中华麻醉学杂志,2020,40(2):164-167.
- [2] 林晓婉,马丽,刘贝贝,等. 孕酮减轻七氟醚诱导原代海马神经元损伤[J]. 临床麻醉学杂志,2020,36(7):691-695.
- [3] 李红旗,连洋洋,刘瑞杰,等. 川陈皮素对七氟醚致术后认知功能障碍大鼠的神经保护作用[J]. 中华行为医学与脑科学杂志,2021,30(2):104-111.
- [4] GE X, ZHANG Y, ZUO Y, *et al.* Transcriptomic analysis reveals the molecular mechanism of Alzheimer-related neuropathology induced by sevoflurane in mice[J]. J Cell Biochem, 2019,120(10):17555-17565.
- [5] 刘伟,王雄,曹建军,等. 微小 RNA-146a 和微小 RNA-572 在右美托咪定预防老年术后认知功能障碍中的作用研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志,2018,20(12):1258-1261.
- [6] XIONG J, WANG H, MU F, *et al.* MiR-125b-5p Inhibitor Might Protect Against Sevoflurane-induced Cognitive Impairments by Targeting LIMK1[J]. Curr Neurovasc Res, 2019,16(4):382-391.
- [7] LV X, YAN J, JIANG J, *et al.* MicroRNA-27a-3p suppression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ contributes to cognitive impairments resulting from sevoflurane treatment[J]. J Neurochem, 2017,143(3):306-319.

- [8] YE J, ZHANG Z, WANG Y, *et al.* Altered hippocampal microRNA expression profiles in neonatal rats caused by sevoflurane anesthesia: MicroRNA profiling and bioinformatics target analysis[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(3):1299-1310.
- [9] 王洪海, 周颖臻, 刘利娟, 等. JAK2/STAT3 信号通路对大鼠脑缺血-再灌注后神经功能及凋亡蛋白的影响[J]. *江苏医药*, 2021, 47(4):325-328.
- [10] LI X, SUN Y, JIN Q, *et al.* Kappa opioid receptor agonists improve postoperative cognitive dysfunction in rats via the JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(5):1866-1876.
- [11] GUILLEMAUD O, CEYZÉRIAT K, SAINT-GEORGES T, *et al.* Complex roles for reactive astrocytes in the triple transgenic mouse model of Alzheimer disease[J]. *Neurobiol Aging*, 2020, 90:135-146.
- [12] 余高峰, 李会仁, 金尚怡. PD-1/PD-L1 通路在七氟醚致大鼠术后认知功能障碍中的作用[J]. *新医学*, 2018, 49(7):507-510.
- [13] XU C, NIU J J, ZHOU J F, *et al.* MicroRNA-96 is responsible for sevoflurane-induced cognitive dysfunction in neonatal rats via inhibiting IGF1R[J]. *Brain Res Bull*, 2019, 144:140-148.
- [14] ZHAO X, SUN Y, DING Y, *et al.* miR-34a Inhibitor May Effectively Protect against Sevoflurane-Induced Hippocampal Apoptosis through the Wnt/ β -Catenin Pathway by Targeting Wnt1[J]. *Yonsei Med J*, 2018, 59(10):1205-1213.
- [15] 陈艳林, 徐琳, 徐盛嘉. 身体活动对海马体可塑性和认知功能的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(5):773-779.
- [16] 沈亚南, 杜佳月, 潘彩龙, 等. 七氟醚激活海马线粒体自噬诱导老年小鼠认知功能损伤[J]. *临床麻醉学杂志*, 2021, 37(2):180-185.
- [17] 魏海婷, 任峰, 刘琳琳, 等. TLR4-p38MAPK-NF- κ B 信号通路在七氟醚降低老年大鼠认知功能中的作用[J]. *中华麻醉学杂志*, 2019, 39(5):561-564.
- [18] WANG Y, YIN C P, TAI Y L, *et al.* Apoptosis inhibition is involved in improvement of sevoflurane-induced cognitive impairment following normobaric hyperoxia preconditioning in aged rats[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(3):203.
- [19] QIN X Y, WANG Y N, LIU H F, *et al.* Anti-cancer activities of metal-based complexes by regulating the VEGF/VEGFR2 signaling pathway and apoptosis-related factors Bcl-2, Bax, and caspase-9 to inhibit angiogenesis and induce apoptosis[J]. *Metallomics*, 2020, 12(1):92-103.
- [20] 阎雯, 齐薛浩. 白藜芦醇对新生大鼠神经元缺血缺氧时 SDF-1/CXCR4 通路抗凋亡作用的调控机制[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(7):1177-1182.
- [21] 方园, 贺中正, 张世荣, 等. 抑制 TNFR/RIPK 信号通路对神经细胞凋亡的影响及机制研究[J]. *西部医学*, 2019, 31(6):840-847.
- [22] YE J S, CHEN L, LU Y Y, *et al.* Honokiol-Mediated Mitophagy Ameliorates Postoperative Cognitive Impairment Induced by Surgery/Sevoflurane via Inhibiting the Activation of NLRP3 Inflammasome in the Hippocampus[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019:1-13.
- [23] XIONG H, LUO T, HE W, *et al.* Up-regulation of miR-138 inhibits hypoxia-induced cardiomyocyte apoptosis via down-regulating lipocalin-2 expression[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2016, 241(1):25-30.
- [24] LU F, INOUE K, KATO J, *et al.* Functions and regulation of lipocalin-2 in gut-origin sepsis: a narrative review[J]. *Crit Care*, 2019, 23(1):269.
- [25] KIM J H, KO P W, LEE H W, *et al.* Astrocyte-derived lipocalin-2 mediates hippocampal damage and cognitive deficits in experimental models of vascular dementia[J]. *Glia*, 2017, 65(9):1471-1490.
- [26] ZHANG Y, LIU J, YANG B, *et al.* Ginkgo biloba Extract Inhibits Astrocytic Lipocalin-2 Expression and Alleviates Neuroinflammatory Injury via the JAK2/STAT3 Pathway After Ischemic Brain Stroke[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9:518.
- [27] SI Y, ZHANG Y, HAN L, *et al.* Dexmedetomidine Acts via the JAK2/STAT3 Pathway to Attenuate Isoflurane-Induced Neurocognitive Deficits in Senile Mice[J]. *PLoS One*, 2016, 11(10):e0164763.
- [28] TU T T, SHARMA N, SHIN E J, *et al.* Treatment with Mountain-Cultivated Ginseng Alleviates Trimethyltin-Induced Cognitive Impairments in Mice via IL-6-Dependent JAK2/STAT3/ERK Signaling [J]. *Planta Med*, 2017, 83(17):1342-1350.

(收稿日期:2021-08-21;修回日期:2022-02-29;编辑:王小菊)