

七氟醚通过海马 PICK1/ERK1/2/GSK3 β 信号抑制记忆巩固的研究

钱少杰¹, 王文元², 骆晓攀², 王震², 金孝炬¹, 胡双飞^{2*} (1.皖南医学院, 安徽 芜湖 241002; 2.杭州医学院附属人民医院, 杭州 310014)

摘要:目的 研究七氟醚对记忆巩固的影响,并探讨 PICK1/ERK1/2/GSK3 β 信号通路在其中的作用。方法 采用 C57BL/6J PICK1 基因敲除小鼠进行七氟醚处理(2%, 3 h),提取动物海马组织蛋白,采用 Western blot 检测 PICK1、ERK1/2、p-ERK1/2、GSK3 β 及 p-GSK3 β 蛋白表达变化。采用原代海马神经细胞,加入 ERK1/2 磷酸化激动剂 Honokiol 和/或 PICK1 抑制剂 FSC231,再进行七氟醚处理(2%, 3 h),检测 p-GSK3 β 蛋白表达变化。通过旷场试验检测动物运动能力变化,抑制性逃避试验检测动物记忆巩固的变化。结果 在体实验中,单独进行七氟醚处理或敲除 PICK1 基因均可明显降低 PICK1、p-ERK1/2 及 p-GSK3 β 的蛋白表达水平。与七氟醚组相比,PICK1 基因敲除+七氟醚处理组,p-ERK1/2 及 p-GSK3 β 的蛋白表达水平进一步降低。离体实验中,七氟醚可降低 p-GSK3 β 蛋白表达水平,加入 Honokiol 可使 p-GSK3 β 蛋白表达增加,而再加入 FSC231 则可逆转由 Honokiol 引起的 p-GSK3 β 蛋白变化。行为学结果显示,七氟醚处理或 PICK1 基因敲除动物运动能力无明显变化,而七氟醚可抑制记忆巩固; PICK1 基因敲除小鼠进行七氟醚处理,则可加重抑制记忆巩固。结论 七氟醚可抑制记忆巩固过程,其机制可能与 PICK1/ERK1/2/GSK3 β 信号通路受抑制相关。

关键词: 七氟醚; 记忆巩固; PICK1; ERK1/2; GSK3 β

中图分类号: R964 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)13-1617-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.13.004

引用本文: 钱少杰, 王文元, 骆晓攀, 等. 七氟醚通过海马 PICK1/ERK1/2/GSK3 β 信号抑制记忆巩固的研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(13): 1617-1621.

Research on Sevoflurane Inhibits Hippocampal Memory Consolidation Through PICK1/ERK1/2/GSK3 β Signaling

QIAN Shaojie¹, WANG Wenyuan², LUO Xiaopan², WANG Zhen², JIN Xiaoju¹, HU Shuangfei^{2*} (1.Wannan Medical College, Wuhu 241002, China; 2.People's Hospital of Hangzhou Medical College, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effects of sevoflurane on memory consolidation, and the role of PICK1/ERK1/2/GSK3 β signaling pathway. **METHODS** C57BL/6J PICK1 knock-out mice were exposed to 2% sevoflurane for 3 h. The hippocampal tissues were collected for detecting the protein expressions of PICK1, ERK1/2, P-ERK1/2, GSK3 β and P-GSK3 β by Western blot. Primary hippocampal neurons were treated with phospho-ERK1/2 activator Honokiol or/and PICK1 inhibitor FSC231 before sevoflurane(2%, 3 h) exposure. Neurons were harvested for detection of p-GSK3 β protein level. The open-field test and inhibitory avoidance task were enrolled for evaluation of motor activity and memory consolidation respectively. **RESULTS** The protein levels of PICK1, p-ERK1/2 and p-GSK3 β were depressed in sevoflurane or PICK1 knock-out group. Compared with sevoflurane group, the expressions of p-ERK1/2 and p-GSK3 β were further decreased in sevoflurane plus PICK1 knock-out group. The expression of p-GSK3 β was inhibited by sevoflurane exposure, which could be improved by application of Honokiol. Moreover, the improvement of p-GSK3 β by Honokiol could be reversed by further addition of FSC231. Finally, analysis of behaviour study showed that sevoflurane treatment or PICK1 knock-out did not alter the motor activity. However, sevoflurane administration inhibited memory consolidation. For the knock-out mice, the memory consolidation was further suppressed by sevoflurane exposure. **CONCLUSION** Sevoflurane can inhibit the memory consolidation process, and the mechanism may be related to inhibition of the PICK1/ERK1/2/GSK3 β signaling pathway.

KEYWORDS: sevoflurane; memory consolidation; PICK1; ERK1/2; GSK3 β

全身麻醉药可引起学习、记忆等术后认知功能障碍,但其机制尚不明确。近年来研究显示,GSK3 β 在七氟醚引起的记忆巩固中起重要作用^[1],

但其上游受何信号调控仍有待进一步研究。

PICK1 是一种含有 PSD-95/Dlg/ZO1(PDZ)结构域的转运蛋白。研究表明 PICK1 蛋白可通过其

基金项目: 国家自然科学基金项目(81302858); 浙江省自然科学基金项目(LY18H310007, LY16H310007); 浙江省卫计委一般项目(2013KYA015); 浙江省医学会临床科研基金项目(2012ZYC-A02)

作者简介: 钱少杰, 男, 硕士生 Tel: (0571)85893300 E-mail: jjeletter@126.com *通信作者: 胡双飞, 女, 主任医师 Tel: (0571)85893300 E-mail: Neuro-anesth@hotmail.com

PDZ 结构域调控下游 ERK1/2 磷酸化水平,并且这一调控机制与学习记忆的形成及巩固密切相关^[2]。课题组前期研究发现,七氟醚可抑制 ERK1/2 磷酸化水平^[3]。由此推测 PICK1 可能通过 ERK1/2 影响 GSK3 β , 进而导致学习记忆功能改变。本研究应用基因敲除动物(PICK1^{-/-})为研究对象,进一步探究七氟醚对记忆巩固的影响。

1 材料与方法

1.1 仪器

Datex-Ohmeda S/5 气体浓度检测仪(美国 GE); GS-6R 超速离心机(美国 Beckman); BD115 细胞培养箱(德国 Binder); 165-8003 免疫印迹电泳仪、170-3940 凝胶电转仪均来自美国 Bio-Rad; 扫描仪(美国 Hewlett-Packard); 七氟醚处理装置(自制)。

1.2 试剂

七氟醚(中国 Baxter, 批号: 17041131; 纯度 >98%); anti-GAPDH(批号: D16H11)、anti-ERK1/2(批号: 137F5)、anti-p-ERK1/2(批号: 4370S)、anti-GSK3 β (批号: 12456S)、anti-p-GSK3 β (批号: 5558S)均购自美国 Cell Signaling Technology; anti-PICK1(美国 Sigma-Aldrich, 批号: SAB4200463); Honokiol(美国 MedChemExpress, 批号: NSC293100); FSC231(美国 Merck Millipore, 批号: 529531)。

1.3 动物

C57BL/6J 野生型小鼠 60 只, δ , PICK1 基因敲除型小鼠 30 只, δ , 体质量(23~26)g, 月龄 14~15 月。实验动物饲养在 12 h 照明和 12 h 黑暗的安静环境, 温度(23 \pm 1) $^{\circ}$ C, 湿度(50 \pm 5)%。SD 大鼠孕龄 18 d 10 只, 实验动物均来自南京大学南京生物医药研究院, 动物许可证号: SCXK(苏)2015-0001; 动物质量合格证号: 201803581。饲养等级为 SPF 级。

1.4 细胞培养

取孕 18 d SD 大鼠, 乙醚麻醉后打开腹腔取胎鼠。将胎鼠置于 HBSS 培养皿内解剖胎鼠取海马组织。加入 0.125%胰酶置入细胞培养箱消化 10 min。超速离心机(800 r \cdot min⁻¹, 4 $^{\circ}$ C)离心 8 min。弃上清, 加入 DMEM 缓慢摇匀, 并计数细胞。将细胞以 4 \times 10⁵ mL⁻¹ 浓度接种于 6 cm 培养皿上。每隔 2~3 d 半量换液, 体外培养至 14 d 时进行七氟醚处理。

1.5 药物处理

本研究所采用的七氟醚处理装置为本课题组

自制装置, 已获得专利授权(专利号: ZL 201420643966.2), 并且已经在研究者前期实验中得到验证^[1-2]。先将细胞取出置于自制的七氟醚处理装置内密闭, 再将混合气体(93% O₂、5% CO₂ 及 2%七氟醚混合气体)接入。在体实验采用的混合气体浓度为: 50% O₂、48% N₂ 及 2%七氟醚。密闭装置内的混合气体由气体检测仪持续检测, 混合气体流速为 2 L \cdot min⁻¹, 处理 3 h 后将细胞取出进行后续试验。离体试验试剂浓度: ERK1/2 磷酸化激动剂 Honokiol(10 μ mol \cdot L⁻¹)、PICK1 抑制剂 FSC231(50 μ mol \cdot L⁻¹)。

1.6 Western blot 试验

收集七氟醚处理后的神经细胞或动物海马组织加入细胞裂解液, 置于 4 $^{\circ}$ C 环境裂解 10 min。超速离心(12 000 r \cdot min⁻¹, 10 min)后弃掉细胞残渣, 取蛋白进行定量。加入上样缓冲液置于 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min。配制 12%凝胶, 上样 20 μ g 行电泳。取凝胶叠于 PVDF 膜上进行电转(1.5 mA \cdot cm⁻² 恒流转膜 90 min)。取出 PVDF 膜加入一定浓度的一抗 4 $^{\circ}$ C 环境孵育过夜。PBS 洗涤, 加入二抗抗体室温孵育 1 h。PBS 洗涤, 均匀加入 ECL 检测液, 叠放 X 胶片避光显影。扫描 X 胶片进行灰度值分析。

1.7 动物行为学

1.7.1 旷场试验 采用旷场试验检测动物的运动能力。使动物在边长为 1 m 的正方形旷场内自由运动, 记录动物在 10 min 内自由运动的距离。

1.7.2 抑制性逃避试验 采用抑制性逃避试验检测实验动物记忆巩固的变化。实验箱长 48 cm \times 宽 27 cm \times 高 30 cm。实验箱中间由隔板将其分隔为明室和暗室。隔板中间有一高 7 cm \times 宽 7 cm 能自动开关的小门。实验第 1 天让小鼠熟悉实验环境, 将小鼠轻放入箱子适应 2 min, 隔板小门处于打开状态, 小鼠可自由穿梭于两边。每只小鼠实验结束后用酒精擦拭箱子以消除气味影响。第 2 天, 将小鼠放入明室, 待小鼠钻入暗室后自动门关闭, 立即给予电击(0.5 mA, 持续 3 s), 让小鼠获取恐惧记忆。记忆获取训练结束后进行七氟醚处理。第 3 天进行测试阶段, 方法同上, 只是暗室不给电击, 记录小鼠在明室的停留时间作为潜伏期。

1.8 统计学方法

采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学处理。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 *t* 检验; 多组间比较采用 one-way ANOVA 进行统计

学分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 七氟醚处理抑制 PICK1 蛋白表达

将 C57BL/6J 小鼠进行七氟醚处理(2%, 3 h)后, 取海马组织采用 Western blot 检测 PICK1 蛋白表达。结果发现, 七氟醚明显抑制 PICK1 蛋白表达($P < 0.05$), 结果见图 1。

为进一步研究 PICK1 基因对七氟醚引起学习记忆的影响, 采用 PICK1 基因敲除的 C57BL/6J 小鼠进行后续实验。PICK1 基因敲除后取海马组织应用 Western blot 验证, 结果见图 1。

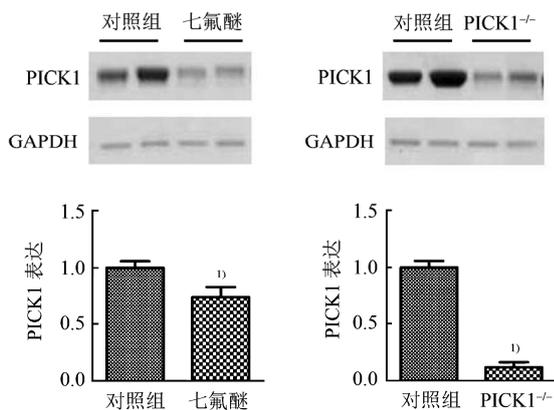


图 1 七氟醚处理抑制 PICK1 蛋白表达
与对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$ 。

Fig. 1 Sevoflurane treatment inhibits PICK1 expression
Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$.

2.2 七氟醚处理抑制 ERK1/2/GSK3 β 信号

将 C57BL/6J 小鼠进行七氟醚处理(2%, 3 h), 提取海马组织, 采用 Western blot 检测 ERK1/2/GSK3 β 信号变化。结果显示, 七氟醚处理明显抑制磷酸化 ERK1/2 及磷酸化 GSK3 β 蛋白表达($P < 0.05$), 结果见图 2。

将 PICK1 基因敲除小鼠海马组织粉碎, 离心提取蛋白, 应用 Western blot 检测磷酸化 ERK1/2 及 GSK3 β 蛋白表达。结果显示, 与对照组相比, PICK1 基因敲除小鼠的磷酸化 ERK1/2 及磷酸化 GSK3 β 表达明显降低($P < 0.05$), 结果见图 2。

为了探究抑制 PICK1 对 ERK1/2/GSK3 β 信号的影响, 将 PICK1 基因敲除小鼠进行七氟醚处理(2%, 3 h), 再进行 Western blot 检测。结果显示, 七氟醚处理后磷酸化 ERK1/2 及磷酸化 GSK3 β 表达进一步降低($P < 0.05$), 结果见图 2。

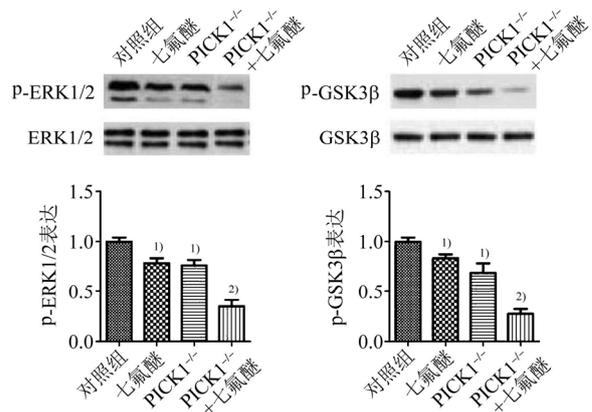


图 2 七氟醚处理抑制 ERK1/2/GSK3 β 信号

与对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$; 与七氟醚组相比, ²⁾ $P < 0.05$ 。

Fig. 2 Sevoflurane exposure inhibits ERK1/2/GSK3 β signaling
Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with sevoflurane group, ²⁾ $P < 0.05$.

2.3 七氟醚抑制 PICK1/ERK1/2/GSK3 β 信号

为了进一步验证七氟醚对 PICK1/ERK1/2/GSK3 β 信号的影响, 将离体培养的原代海马神经细胞进行七氟醚处理(2%, 3 h)。收集细胞进行 Western blot 检测, 发现七氟醚处理明显抑制磷酸化 GSK3 β 的蛋白表达($P < 0.05$), 结果见图 3。

假设 PICK1/ERK1/2 是 GSK3 β 的上游信号分子, 那么干预 PICK1/ERK1/2 则可能影响 GSK3 β 的表达。先加入 ERK1/2 磷酸化激动剂 Honokiol (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 再进行七氟醚处理, 结果显示磷酸化 GSK3 β 的表达明显增加($P < 0.05$), 结果见图 3。

在此基础上, 加入 PICK1 抑制剂 FSC231 (50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)再进行七氟醚处理。Western blot 结果显示, Honokiol 对磷酸化 GSK3 β 的作用可被 PICK1 抑制剂 FSC231 逆转($P < 0.05$)。结果见图 3。提示七氟醚可抑制 PICK1/ERK1/2/GSK3 β 信号。

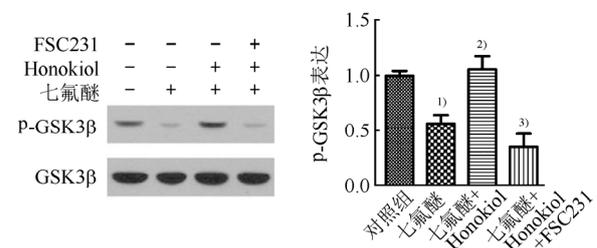


图 3 七氟醚抑制 PICK1/ERK1/2/GSK3 β 信号

与对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$; 与七氟醚组相比, ²⁾ $P < 0.05$; 与七氟醚+Honokiol 组相比, ³⁾ $P < 0.05$ 。

Fig. 3 Sevoflurane inhibits PICK1/ERK1/2/GSK3 β signaling
Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with sevoflurane group, ²⁾ $P < 0.05$; compared with sevoflurane+Honokiol group, ³⁾ $P < 0.05$.

2.4 七氟醚处理对记忆巩固的影响

旷场试验结果显示, 各组动物的行走距离并无明显统计学差异, 提示七氟醚处理或 PICK1 基因敲除均未影响动物的运动能力。抑制性逃避试验结果显示, 所有动物在训练阶段的潜伏期并未呈现出明显的统计学差异。在记忆巩固的测试阶段, 七氟醚组较对照组的潜伏期明显缩短 ($P<0.05$)。而 PICK1 基因敲除+七氟醚组较单纯七氟醚处理组潜伏期明显缩短 ($P<0.05$)。行为学结果提示, 七氟醚可抑制记忆巩固过程; 干预 PICK1 基因表达可进一步加重七氟醚对记忆巩固的抑制作用。结果见图 4。

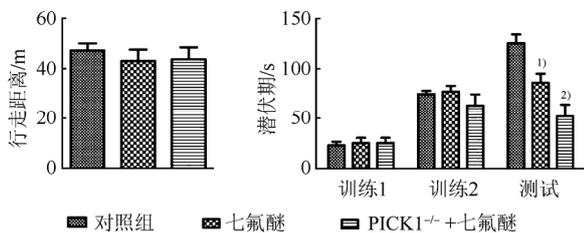


图 4 七氟醚对记忆巩固的影响

与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与七氟醚组相比, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 4 Effects of sevoflurane on memory consolidation
Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with sevoflurane group, ²⁾ $P<0.05$.

3 讨论

全身麻醉可短暂或阶段性地阻断学习记忆过程, 使患者可在无意识状态下接受复杂的外科手术操作, 因此全身麻醉药一直被认为是良性或可逆性的中枢神经系统抑制剂。然而近年来的研究发现, 临床中常用的全身麻醉药可引起术后谵妄、学习记忆等认知功能障碍^[4]。由于全身麻醉药作用机制广泛, 可作用于神经细胞膜蛋白、离子通道及胞内蛋白、信号分子等各个环节^[5], 因此全身麻醉药引起术后认知功能障碍的确切机制尚不明确。本研究以目前临床麻醉中常用的吸入性全麻药七氟醚为例, 研究了其对记忆巩固的影响及可能机制。研究发现七氟醚可影响记忆的巩固过程, 其机制可能由 PICK1/ERK1/2/GSK3 β 信号介导。

PICK1 可通过其 PDZ 结构域调控磷酸化 ERK1/2 水平。本研究发现七氟醚处理可抑制 PICK1 蛋白表达; 而 PICK1 基因敲除的动物则表现出磷酸化 ERK1/2 水平降低, 提示七氟醚可通过 PICK1 蛋白抑制磷酸化 ERK1/2 水平进而介导后续

反应(GSK3 β)。

GSK3 β 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 受胞内多种信号调控, 参与包括学习记忆在内的多种生物学机能^[6]。研究表明^[7], 磷酸化的 ERK1/2 能够激活 GSK3 β 的磷酸化。在本研究中, 七氟醚可抑制磷酸化 GSK3 β 水平, ERK1/2 激动剂 Honokiol 可缓解七氟醚对磷酸化 GSK3 β 的抑制水平, 提示 ERK1/2 是 GSK3 β 的上游信号分子。在 PICK1 抑制剂 FSC231 存在的情况下, Honokiol 对磷酸化 GSK3 β 的缓解作用则不能发生, 这些结果表明七氟醚可能通过 PICK1/ERK1/2 对下游 GSK3 β 信号产生抑制效应。

磷酸化 GSK3 β 水平与全身麻醉药引起的记忆巩固变化密切相关。研究表明^[1], 应用氯化锂增强磷酸化 GSK3 β 水平可明显改善七氟醚对记忆巩固的影响。因此, 就行为学结果而言, 笔者认为七氟醚对记忆巩固的影响主要是由于抑制了 PICK1/ERK1/2/GSK3 β 信号通路所致。然而 PICK1 蛋白本身的表达变化及 PDZ 结构域结合能力也可影响神经细胞可塑性, 进而影响学习记忆功能的变化。例如, PDZ 结构域可与 GluA2 相互作用影响神经细胞可塑性^[8]。此外, 磷酸化 ERK1/2 表达水平也参与学习记忆的形成及巩固过程。

七氟醚对记忆巩固的影响与给药浓度相关。有研究显示浓度为 0.11% 的七氟醚可增强学习记忆功能^[9]; 而浓度为 0.25% 的七氟醚可明显影响情绪记忆功能^[10]。本研究中应用了浓度为 2% 的七氟醚进行麻醉处理。该七氟醚浓度近似于人类肺泡气最低有效浓度, 为临床麻醉中普遍的应用浓度范围, 因此更具代表性和临床参考性。本研究发现 2% 七氟醚可明显抑制记忆巩固过程, 与以往报道相一致^[1]。

此外, 全身麻醉药对学习记忆等认知功能的影响还受年龄的影响。研究显示, 老年患者更易发生术后认知功能障碍^[11]。鉴于此, 本研究应用了老年鼠作为研究对象。

综上所述, 本研究发现吸入性全身麻醉药七氟醚可抑制老年鼠记忆巩固过程, 其机制可能与七氟醚抑制 PICK1/ERK1/2/GSK3 β 信号通路相关。

REFERENCES

[1] LIU X S, XUE Q S, ZENG Q W, et al. Sevoflurane impairs

- memory consolidation in rats, possibly through inhibiting phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β in the hippocampus [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2010, 94(4): 461-467.
- [2] GONZALEZ DE VALDIVIA E, BROSELID S, KAHN R, et al. G protein-coupled estrogen receptor 1(GPER1)/GPR30 increases ERK1/2 activity through PDZ motif-dependent and -independent mechanisms [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(24): 9932-9943.
- [3] YANG S Y, CHEN W H, JIN H Z, et al. Dexmedetomidine prevents sevoflurane neurotoxicity via ERK1/2 MAPK signaling in the developing brain [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2014, 31(5): 523-528.
- [4] NEEDHAM M J, WEBB C E, BRYDEN D C. Postoperative cognitive dysfunction and dementia: what we need to know and do [J]. *Br J Anaesth*, 2017, 119(Suppl 1): i115-i125.
- [5] VUTSKITS L, XIE Z C. Lasting impact of general anaesthesia on the brain: mechanisms and relevance [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2016, 17(11): 705-717.
- [6] XING B, HAN G N, WANG M J, et al. Juvenile treatment with mGluR2/3 agonist prevents schizophrenia-like phenotypes in adult by acting through GSK3 β [J]. *Neuropharmacology*, 2018(137): 359-371.
- [7] NAGARAJAN D, MELO T, DENG Z Y, et al. ERK/GSK3 β /Snail signaling mediates radiation-induced alveolar epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52(6): 983-992.
- [8] LIN E Y S, SILVIAN L F, MARCOTTE D J, et al. Potent PDZ-domain PICK1 inhibitors that modulate amyloid beta-mediated synaptic dysfunction [J]. *Sci Rep*, 2018(8): 13438.
- [9] ALKIRE M T, NATHAN S V, MCREYNOLDS J R. Memory enhancing effect of low-dose sevoflurane does not occur in basolateral amygdala-lesioned rats [J]. *Anesthesiology*, 2005, 103(6): 1167-1173.
- [10] ALKIRE M T, GRUVER R, MILLER J, et al. Neuroimaging analysis of an anesthetic gas that blocks human emotional memory [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(5): 1722-1727.
- [11] XU Z, DONG Y, WANG H, et al. Age-dependent postoperative cognitive impairment and Alzheimer-related neuropathology in mice [J]. *Sci Rep*, 2014(4): 3766.
- 收稿日期: 2018-10-07
(本文责编: 沈倩)