

纳美芬通过调控 Sirt1/TLR4/NF- κ B 通路改善老年大鼠术后认知功能障碍

张琳, 唐富东, 刘跃丹, 耿红芳* (河南省人民医院 麻醉与围术期医学科, 郑州大学人民医院, 河南大学人民医院, 郑州 450003)

摘要:目的 探究纳美芬对老年大鼠术后认知功能障碍(postoperative cognitive dysfunction, POCD)的影响及其分子机制。**方法** 将17月龄的SD大鼠适应饲养一周后,随机分成对照(Control)组、模型(Model)组、模型+纳美芬(Model+Nal)组、模型+纳美芬+EX527(Model+Nal+EX527)组,每组8只。除Control组外,使用七氟烷麻醉和剖腹探查术建立POCD模型。Model+Nal组大鼠在麻醉诱导前30 min皮下注射 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 盐酸纳美芬;Model+Nal+EX527组大鼠在麻醉诱导前30 min皮下注射 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 盐酸纳美芬,并腹腔注射 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ EX527 [沉默信息调节因子1(Sirt1)抑制剂]。Morris水迷宫实验评估大鼠认知能力。术后第3天处死大鼠,苏木素-伊红(HE)染色观察海马组织病理学改变,Tunel染色分析神经元凋亡,酶联免疫吸附测定(ELISA)方法分析肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素6(IL-6)含量,蛋白质免疫印迹(Western blot)法检测B-细胞淋巴瘤因子2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、Sirt1、Toll样受体4(TLR4)和核因子 κ B亚基p65(NF- κ B p65)蛋白表达水平。**结果** 与Control组相比,Model组大鼠出现认知障碍,海马DG区神经元出现损伤,DG区神经元凋亡比例增多,TNF- α 和IL-6含量增加,Bax、TLR4和NF- κ B p65蛋白表达增加,Bcl-2和Sirt1表达降低($P < 0.001$);与Model组相比,Model+Nal组大鼠认知能力增强,海马DG区神经元损伤减轻,DG区神经元凋亡比例减少,TNF- α 和IL-6含量降低,Bax、TLR4和NF- κ B p65蛋白表达减少,Bcl-2和Sirt1表达增加($P < 0.001$);与Model+Nal组相比,Model+Nal+EX527组大鼠认知能力减弱,海马DG区神经元损伤增加,DG区神经元凋亡比例增多,TNF- α 和IL-6含量增加,Bax、TLR4和NF- κ B p65蛋白表达增加,Bcl-2和Sirt1表达降低($P < 0.001$)。**结论** 纳美芬可通过Sirt1/TLR4/NF- κ B通路减轻POCD老年大鼠神经炎症和神经元损伤,改善认知功能障碍。

关键词:纳美芬;老年大鼠;术后认知功能障碍;沉默信息调节因子1;Toll样受体4/核因子 κ B

doi:10.11669/cpj.2025.06.006 中图分类号:R965.1 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2025)06-0604-08

Nalmefene Alleviates Postoperative Cognitive Dysfunction in Aged Rats via the Sirt1/TLR4/NF- κ B Pathway

ZHANG Lin, TANG Fudong, LIU Yuedan, GENG Hongfang* (Department of Anesthesiology and Perioperative Medicine, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou University People's Hospital, Henan University People's Hospital, Zhengzhou 450003, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effect and molecular mechanism of nalmefene on postoperative cognitive dysfunction (POCD) in aged rats. **METHODS** Seventeen-month-old SD rats were randomly divided into control group (Control), model group (Model), model + nalmefene group (Model + Nal), model + nalmefene + EX527 group (Model + Nal + EX527) with 8 rats in each group after one week of acclimatization. The POCD animal models (excluding the Control group) were established by sevoflurane anesthesia and exploratory laparotomy. The rats in Model + Nal group were subcutaneously injected with $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ nalmefene hydrochloride 30 min before anesthesia induction. The rats in Model + Nal + EX527 group were injected subcutaneously with $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ nalmefene hydrochloride and intraperitoneally with $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ EX527 (Sirt1 inhibitor) 30 min before anesthesia induction. Morris water maze experiment was conducted to analyze the cognitive abilities of rats. Hippocampal tissues were collected 3 d after surgery. The pathological changes of the hippocampus were observed by HE staining. Neuron apoptosis was analyzed by Tunel staining. ELISA method was used to detect the contents of TNF- α and IL-6. The protein expression levels of Bax, Bcl-2, Sirt1, TLR4 and NF- κ B p65 were determined by Western blot. **RESULTS** Compared with the Control group, the cognitive dysfunction was seen, neuronal damage and the proportion of apoptotic neurons in hippocampal DG region were increased, TNF- α and IL-6 contents as well as the expression of Bax, TLR4 and NF- κ B p65 were elevated, while the expression of Bcl-2 and Sirt1 was decreased in the Model group ($P < 0.001$). Compared with the Model group, the cognitive ability was enhanced, neuronal damage and the proportion of apoptotic neurons in hippocampal DG region were decreased, TNF- α and IL-6 contents as well as the expression of Bax, TLR4 and NF- κ B p65 were reduced, whereas the expression of Bcl-2 and Sirt1 was elevated in the Model + Nal group ($P < 0.001$). Compared with the Model + Nal group, the

基金项目:河南省医学科技攻关联合共建项目资助(LHGJ20220065)

作者简介:张琳,女,硕士,副主任医师 研究方向:小儿麻醉基础与临床 * **通讯作者:**耿红芳,女,硕士,副主任医师 研究方向:麻醉基础及临床 Tel:(0371)65580445

cognitive ability was suppressed, neuronal damage and the proportion of apoptotic neurons in hippocampal DG region were increased, TNF- α and IL-6 contents as well as the expression of Bax, TLR4 and NF- κ B p65 were elevated, while the expression of Bcl-2 and Sirt1 was decreased in the Model + Nal + EX527 group ($P < 0.001$). **CONCLUSION** Nalmefene can reduce neuroinflammation and neuronal damage, and improve cognitive dysfunction in aged POCD rats through regulating Sirt1/TLR4/NF- κ B pathway.

KEY WORDS: nalmefene; aged rat; postoperative cognitive dysfunction; Sirt1; TLR4/NF- κ B

术后认知功能障碍(postoperative cognitive dysfunction, POCD)是手术之后常见的神经系统并发症,主要表现为认知能力显著下降,包括记忆、注意力、协调性、空间定向、语言流畅性和执行能力等方面的障碍^[1]。研究^[2]发现 POCD 在患者术后的发病率为 17%~43%,且其在老年患者中的发病率要高于年轻患者^[3]。研究表明,POCD 可持续数周至数年,影响患者康复,延长住院时间,并可能导致额外的身体和精神疾病,增加死亡率,给患者及其家属带来沉重的负担^[1]。随着人口老龄化,老年患者的手术需求逐渐增多,POCD 的发生率也逐渐增加,这给当前的医疗卫生体系提出了巨大的挑战^[4]。POCD 是一个涉及多种致病因素的复杂病理过程,其发病机制尚不清楚。目前对于 POCD 的治疗和预防还处于探索阶段^[5]。

纳美芬是一种特异性阿片类受体拮抗剂,常用于逆转阿片类药物的毒性。越来越多的研究^[6-8]发现纳美芬具有一定的神经保护作用。例如,纳美芬可保护重型颅脑损伤患者的神经系统^[6],还可抑制酒精诱导的神经炎症和大脑损伤^[8]。体外研究^[7]发现纳美芬可逆转高浓度阿片类药物羟考酮对大鼠神经干细胞增殖的抑制作用,以及对凋亡和分化的促进作用,提示纳美芬可改善神经发育障碍。临床研究^[9]发现纳美芬可改善行单肺通气的电视辅助胸腔镜手术的老年患者术后认知功能,减少神经认知恢复延迟的发生率。但是目前关于纳美芬与 POCD 关系的研究甚少,且纳美芬改善 POCD 的作用机制尚不明确。沉默信息调节因子 1(Sirt1)在 POCD 模型动物中表达降低,它的激活剂 SRT1720 通过抑制 Toll 样受体 4(TLR4)/核因子 κ B(NF- κ B)通路改善小鼠 POCD 症状^[10]。有研究^[11]发现纳美芬可通过调节 Sirt1 减轻大鼠肺缺血再灌注损伤。因此,本研究使用七氟烷麻醉和剖腹探查术建立老年大鼠 POCD 模型^[12-13],探究纳美芬改善 POCD 的作用,并探究其作用是否与 Sirt1/TLR4/NF- κ B 通路有关。

1 材料

1.1 实验动物

32 只 SPF 级 SD 雄性大鼠[17 月龄,体质量

470~530 g,北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SYXK(京)2022-0052];所有大鼠于郑州大学实验动物中心 SPF 级环境下适应饲养一周[温度 20~26 $^{\circ}$ C,湿度 40%~70%,12 h 光/暗循环]。本实验经河南省人民医院动物实验伦理委员会批准(批件号:HNSRMY2023-019)。

1.2 主要试剂

七氟烷(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号:22090631);盐酸纳美芬(西安利君制药有限责任公司,批号:230401,规格:1 mL:0.1 mg);Sirt1 抑制剂 EX527(南京沃博生物科技有限公司,货号:IEP1062);原位末端转移酶标记技术(Tunel)细胞凋亡检测试剂盒(显色法)(上海碧云天生物科技有限公司,货号:C1098);肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素 6(IL-6)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海酶联生物公司,货号:ml002953、ml102828);放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液、二喹啉甲酸法(BCA)蛋白浓度测定试剂盒、增强型化学发光(ECL)Plus 超敏发光液、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)小鼠单克隆抗体(北京索莱宝科技有限公司,货号:R0010、PC0020、PE0010、K200057M);B-细胞淋巴瘤因子 2(Bcl-2)兔多克隆抗体(美国 Abcam 公司,批号:ab196495);Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)兔单克隆抗体、Sirt1 兔单克隆抗体和 NF- κ B p65 兔单克隆抗体(美国 Cell signaling technology 公司,批号:#14796、#9475、#8242);TLR4 小鼠单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号:sc-293072);辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗和山羊抗兔 IgG 二抗(武汉博士德生物工程有限公司,货号:BA1050、BA1050)。

2 方法

2.1 POCD 模型建立

参考文献[12-13]建立 POCD 大鼠模型:使用体积分数 5%七氟烷麻醉诱导,5 min 后改成体积分数 2%七氟烷维持,并进行剖腹探查术(腹部消毒后,沿腹部中线做一个约 3 cm 的切口,然后依次检查肠、肝、脾、肾等脏器),手术时间大约 15 min,确定

没有出血后,用无菌手术线缝合伤口。缝合伤口后,立即通过腹腔注射 60 000 U 青霉素,连续注射 3 d,每天 1 次,防止术后感染。将大鼠放置在电热毯上防止其体温过低,待苏醒后放回笼子中。

2.2 动物分组与给药

大鼠随机分成以下 4 组,每组 8 只:对照(Control)组、模型(Model)组、模型+纳美芬(Model+Nal)组、模型+纳美芬+EX527(Model+Nal+EX527)组。其中 Control 组不进行麻醉和手术,另外三组均按照“2.1”项下方法建立 POCD 模型。纳美芬的注射方式和剂量参考文献^[14]和前期的预实验结果,发现皮下注射纳美芬高于 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 对大鼠认知功能的改变与 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 纳美芬效果差别不显著,因此,纳美芬的浓度选择 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。Model+Nal 组大鼠在麻醉诱导前 30 min 通过皮下注射 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 盐酸纳美芬。EX527 的注射方式和剂量参考文献^[15-16]。EX527 的配制过程如下:50 mg EX527 冻干粉加入 1 mL DMSO,配置成 $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液,然后用生理盐水将其稀释成 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的工作液。Model+Nal+EX527 组大鼠在麻醉诱导前 30 min 通过皮下注射 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 盐酸纳美芬,并通过腹腔注射 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ EX527。其他组给予等量体积分数 5% 二甲基亚砜(DMSO)溶剂。

2.3 Morris 水迷宫实验

在术前 5 d 和术后第 1、3 天进行 Morris 水迷宫实验,包括定位航行实验和空间探索实验,来检测大鼠的空间学习和记忆能力。本实验在一个圆形的黑色壁水池中(直径 120 cm,深度 50 cm)进行,平均分成 4 个象限(I、II、III 和 IV)。在第 IV 象限的中央位置放置一个圆形平台,淹没在水下约 1.5 cm 处。大鼠在术前第 5 天开始训练,连续训练 4 d,每天 4 次。在每个训练日,将大鼠分别从 4 个象限中的一个放入水中,记录它们找到平台的时间(即为大鼠的逃避潜伏期),如果在 60 s 内没有找到平台,则引导其至平台,并在平台上停留 10 s。于术前 1 d 和术后第 1、3 天按照上述方法测试每组大鼠的逃避潜伏期。在术后第 3 天测试过逃避潜伏期 6 h 后,移除平台,将大鼠从第 II 象限放入水中,记录 60 s 内大鼠游过原平台区域的次数(穿越平台次数)以及在原平台所在象限停留时间。

2.4 样本收集

术后第 3 天进行行为学测试之后,将大鼠用体积分数 7% 七氟烷麻醉,颈椎脱臼法处死。迅速从大脑中剥离海马组织,每只大鼠有两个海马组织,磷

酸盐缓冲液(PBS)清洗干净后,将每只大鼠的单体海马组织(共 32 个)用液氮速冻,置于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存,用于细胞因子和蛋白质检测,将每只大鼠的另一侧海马组织(共 32 个)放入质量分数 4% 多聚甲醛中固定,用于病理学检测。

2.5 ELISA 检测

将冰冻的组织样本解冻后加入适量生理盐水,在冰上用匀浆器充分匀浆之后, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,收集上清。然后根据 ELISA 试剂盒说明书操作,检测海马组织中的 TNF- α 和 IL-6 含量。

2.6 苏木素-伊红(HE)染色

海马组织在质量分数 4% 多聚甲醛中固定 48 h,进行石蜡包埋,制备成 $5 \text{ }\mu\text{m}$ 厚度的石蜡切片。二甲苯脱蜡,逐级乙醇复水后,进行 HE 染色,脱水透明,中性树脂封片后,用显微镜观察。

2.7 Tunel 染色

根据 Tunel 试剂盒说明书操作检测海马组织中神经元凋亡情况。步骤如下:将 $5 \text{ }\mu\text{m}$ 的石蜡切片充分脱蜡和水化后,滴加 $20 \text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 不含脱氧核糖核酸酶(DNase)的蛋白酶 K 处理 20 min;PBS 彻底清洗蛋白酶 K,使用质量分数 3% H_2O_2 将切片中的内源性过氧化物酶灭活,加入新鲜配制的 $50 \text{ }\mu\text{L}$ Tunel 反应混合物避光孵育 1 h。滴加 $50 \text{ }\mu\text{L}$ 辣根过氧化物酶标记链霉亲和素(Streptavidin-HRP)工作液,室温孵育 30 min 后加 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色 10 min。苏木素对细胞核进行复染之后,显微镜下观察。正常海马神经元细胞核呈蓝色,凋亡细胞核呈棕褐色(Tunel 阳性)。计算凋亡细胞占总细胞数的百分比。

2.8 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测

冻存的海马组织解冻后,在 RIPA 裂解液中匀浆提取组织中的蛋白质。用 BCA 试剂盒测定浓度之后,每组取等量蛋白质用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离。然后将胶上分离的蛋白转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,质量分数 5% 脱脂奶粉室温封闭膜 2 h,加特异性一抗 Bax(1:1 000)、Bcl-2(1:800)、Sirt1(1:1 000)、TLR4(1:500)、NF- κB p65(1:1 000)、GAPDH(1:3 000) 4°C 孵育过夜。清洗掉一抗后,加相应的 HRP 标记山羊抗兔或者小鼠二抗(稀释度均为 1:5 000)室温孵育 45 min,使用 ECL 发光液观察蛋白条带。Image J 软件分析条带灰度值来对蛋白表达进行定量。

2.9 统计学分析

数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 GraphPad

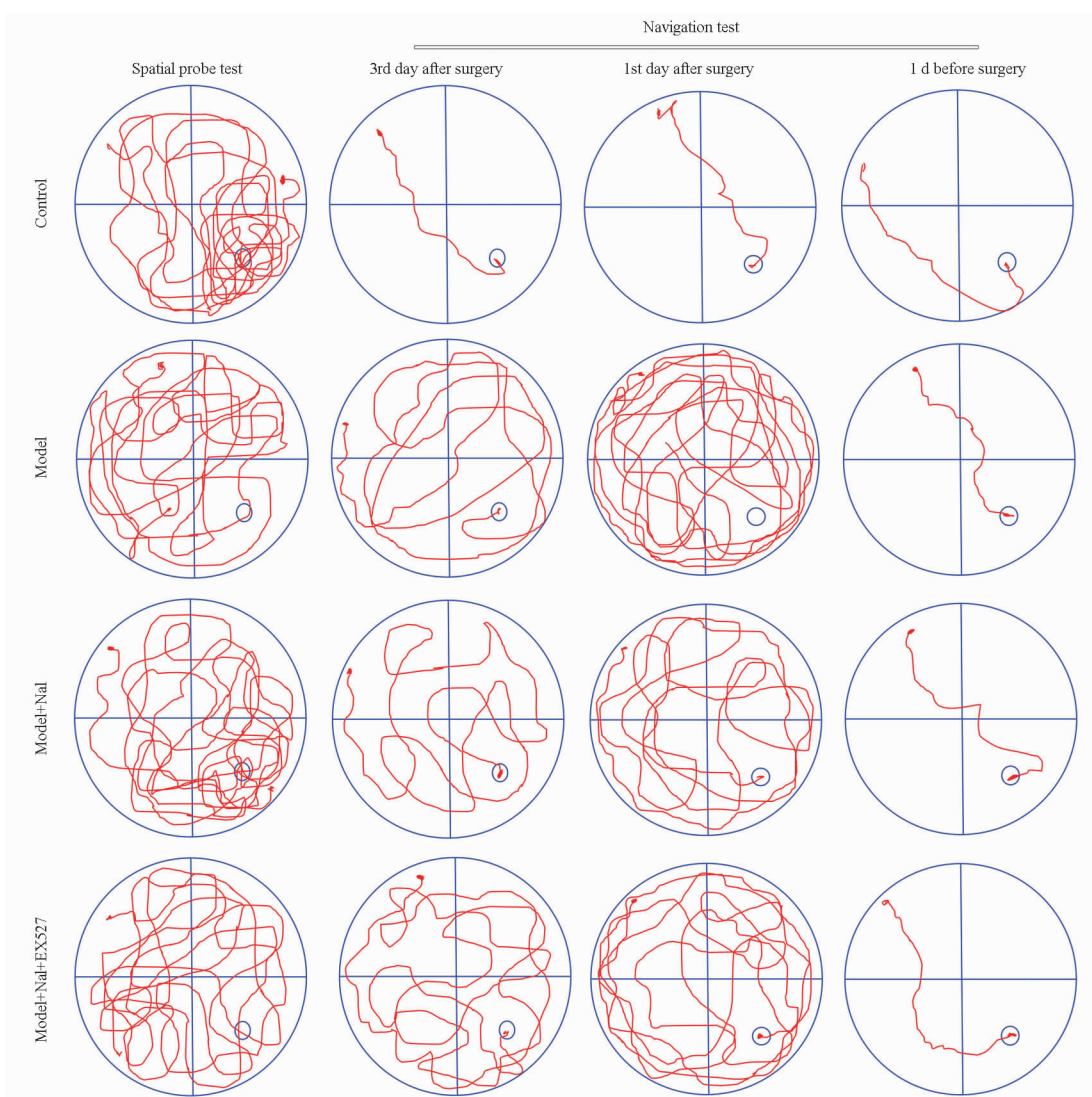
Prism8.0 软件进行分析。多组间差异比较采用单因素方差分析, 两两比较使用 Bonferroni 检验。 $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠学习和记忆能力比较

术前 1 d, 四组大鼠的逃避潜伏期无显著差异 ($P > 0.05$)。但是术后第 1 天和第 3 天, 与 Control 组相比, Model 组逃避潜伏期延长 ($P < 0.001$); 与 Model 组相比, Model + Nal 组逃避潜伏期显著缩短

($P < 0.001$); 与 Model + Nal 组相比, Model + Nal + EX527 组逃避潜伏期显著延长 ($P < 0.001$)。此外, 与 Control 组相比, Model 组大鼠穿越平台次数和在原平台所在象限停留时间均显著减少 ($P < 0.001$); 与 Model 组相比, Model + Nal 组大鼠穿越平台次数和在原平台所在象限停留时间均显著延长 ($P < 0.001$); 与 Model + Nal 组相比, Model + Nal + EX527 组大鼠穿越平台次数和在原平台所在象限停留时间均显著减少 ($P < 0.001$)。见图 1 和表 1。



Nal - 纳美芬; EX527 - 沉默信息调节因子 1 (Sirt1) 抑制剂。

Nal - nalmefene; EX527 - Sirt1 inhibitor.

图 1 各组大鼠定位航行实验和空间探索实验中游泳轨迹的变化。n = 8

Fig. 1 Changes in swimming trajectories of rats in each group during the navigation test and spatial probe test. n = 8

3.2 大鼠海马 DG 区神经元病理变化

HE 染色结果见图 2。Control 组中大鼠的 DG 区神经元结构清晰, 排列整齐; Model 组 DG 区神经

元排列紊乱, 神经元细胞核固缩; 与 Model 组相比, Model + Nal 组大鼠 DG 区神经元排列整齐, 核固缩减少; 与 Model + Nal 组相比, Model + Nal + EX527

表1 Morris 水迷宫实验分析各组大鼠学习和记忆能力。n = 8, $\bar{x} \pm s$

Tab. 1 Morris water maze experiment assay for the learning and memory abilities of rats. n = 8, $\bar{x} \pm s$

Group	Escape latency/s			Platform crossing times	Time spent in target quadrant/s
	1 d before surgery	1st day after surgery	3rd day after surgery		
Control	13.88 ± 2.85	12.12 ± 2.90	10.87 ± 3.48	7.12 ± 1.13	46.75 ± 4.06
Model	13.62 ± 2.45	52.87 ± 4.58 ¹⁾	42.50 ± 4.75 ¹⁾	1.75 ± 1.03 ¹⁾	24.75 ± 5.34 ¹⁾
Model + Nal	13.25 ± 2.82	40.12 ± 5.22 ²⁾	31.25 ± 3.54 ²⁾	5.37 ± 0.92 ²⁾	42.25 ± 4.17 ²⁾
Model + Nal + EX527	14.12 ± 2.17	50.75 ± 5.57 ³⁾	40.12 ± 3.68 ³⁾	2.37 ± 1.06 ³⁾	31.50 ± 4.04 ³⁾

注:与对照组比较,¹⁾P < 0.001;与模型组比较,²⁾P < 0.001;与模型 + 纳美芬组比较,³⁾P < 0.001。

Note: ¹⁾P < 0.001, compared with control group; ²⁾P < 0.001, compared with model group; ³⁾P < 0.001, compared with model + Nal group.

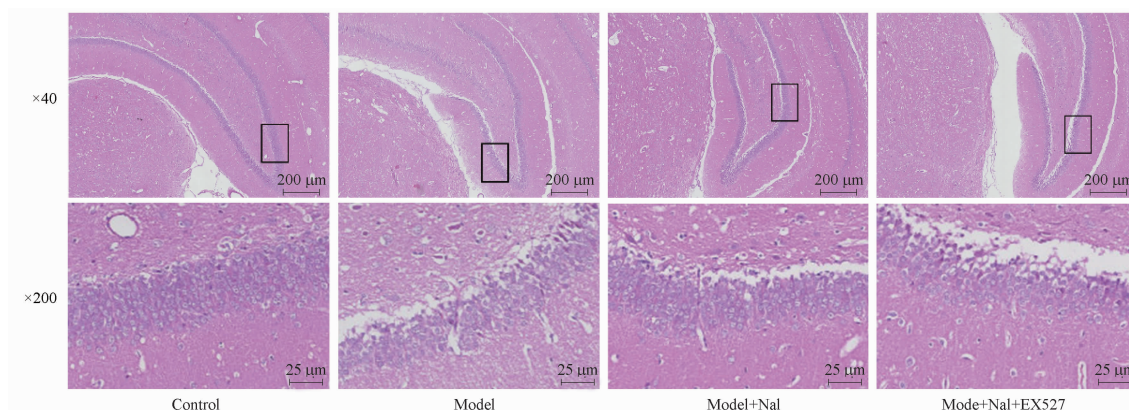


图2 苏木素-伊红(HE)染色检测大鼠海马齿状回(DG)区神经元病理变化(×40和×200)

Fig. 2 Pathological changes of neurons in the hippocampal DG regions of rats were detected by HE staining(×40 and ×200)

组大鼠 DG 区神经元排列紊乱,核固缩增多。

3.3 大鼠海马 DG 区神经元凋亡情况

Tunel 染色观察各组大鼠海马神经元凋亡情况,200 倍和 400 倍视野下结果见图 3A。与 Control 组相比,Model 组大鼠海马 DG 区凋亡神经元比例显著增加($P < 0.001$);与 Model 组相比,Model + Nal 组大鼠海马 DG 区凋亡神经元比例显著减少($P < 0.001$);与 Model + Nal 组相比,Model + Nal + EX527 组大鼠海马 DG 区凋亡神经元比例显著增加($P < 0.001$)(图 3B)。

Western blot 检测海马中凋亡相关蛋白表达,结果见图 3C ~ E:与 Control 组相比,Model 组 Bax 表达上调,Bcl-2 表达下调($P < 0.001$);与 Model 组相比,Model + Nal 组 Bax 表达下调,Bcl-2 表达上调($P < 0.001$);与 Model + Nal 组相比,Model + Nal + EX527 组 Bax 表达上调,Bcl-2 表达下调($P < 0.001$)。

3.4 海马组织中炎症因子表达情况

ELISA 检测海马组织 TNF- α 和 IL-6 表达情况,结果见图 4。与 Control 组相比,Model 组这些炎症因子在海马中表达均上调($P < 0.001$);与 Model 组相比,Model + Nal 组这些炎症因子在海马中表达均

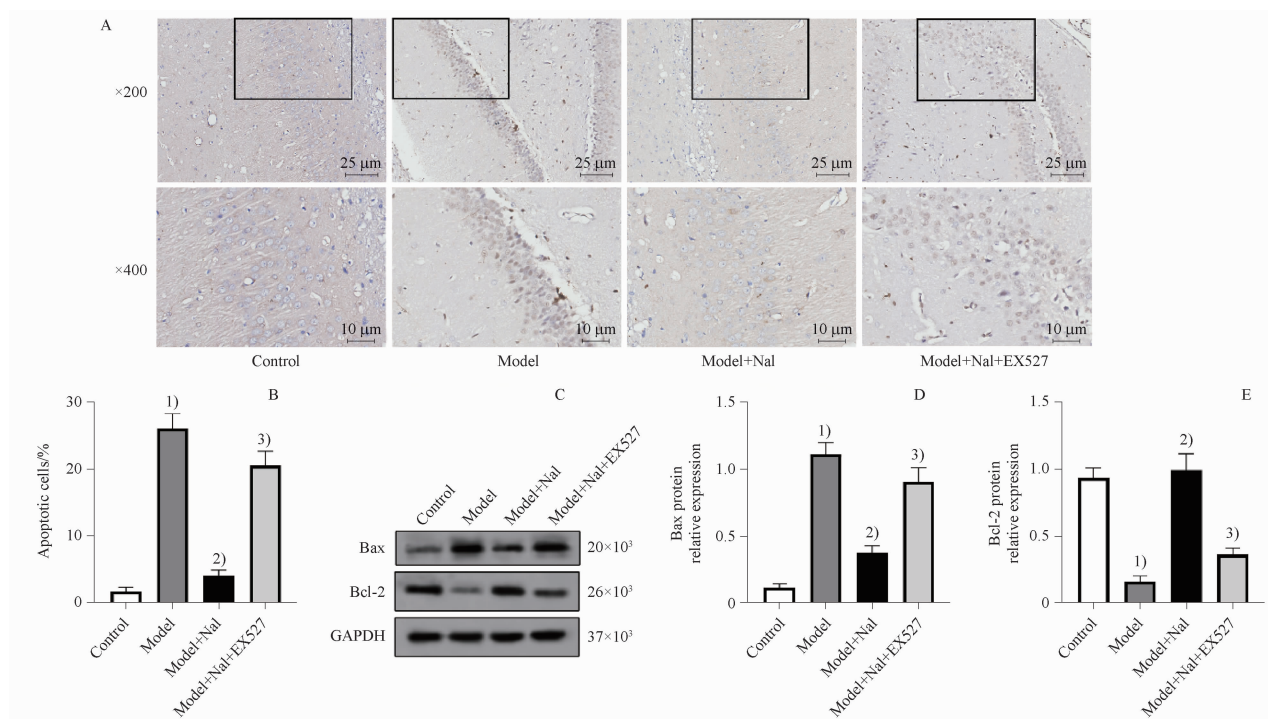
下调($P < 0.001$);与 Model + Nal 组相比,Model + Nal + EX527 组这些炎症因子在海马中表达均增加($P < 0.001$)。

3.5 大鼠海马区 Sirt1/TLR4/NF- κ B 通路相关蛋白表达情况

Western blot 检测海马中 Sirt1、TLR4 和 NF- κ B p65 表达,结果见图 5:与 Control 组相比,Model 组 Sirt1 表达降低,TLR4 和 NF- κ B p65 表达升高($P < 0.05$);与 Model 组相比,Model + Nal 组 Sirt1 表达增加,TLR4 和 NF- κ B p65 表达降低($P < 0.05$);与 Model + Nal 组相比,Model + Nal + EX527 组 Sirt1 表达降低,TLR4 和 NF- κ B p65 表达升高($P < 0.05$)。

4 讨论

POCD 是老年患者术后常见的神经系统并发症。近些年的研究^[1,4,17]指出海马神经元凋亡和神经炎症与 POCD 的发生密切相关。七氟烷是临床常用的吸入性麻醉剂,具有起效迅速、苏醒快、麻醉深度易于调节等特点,在老年人中应用广泛。有研究^[12,18]发现,七氟烷可诱导老年大鼠海马神经元凋亡和神经炎症,造成认知功能障碍。因此,本研究使用了不进行麻醉和手术的大鼠做对照,而没有使用

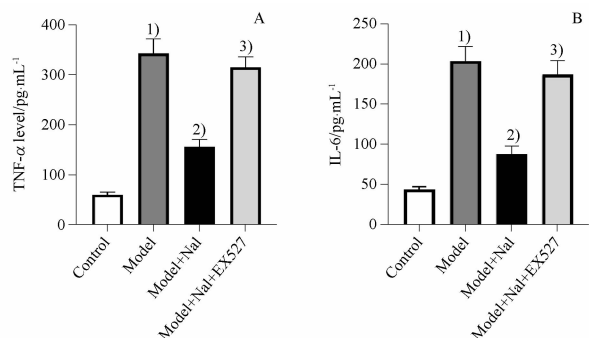


A - 海马 DG 区神经元 TUNEL 染色 ($\times 200$ 和 $\times 400$); B - 海马 DG 区神经元凋亡率统计; C - Western blot 检测海马组织中 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达情况; D - Bax 蛋白表达量的统计分析; E - Bcl-2 蛋白表达量的统计分析; 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.001$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.001$; 与模型 + 纳美芬组比较, ³⁾ $P < 0.001$ 。

A - TUNEL staining for hippocampal neurons ($\times 200$ and $\times 400$); B - apoptotic rate of neurons in hippocampal DG region; C - Western blot assay for the protein levels of Bax and Bcl-2 in hippocampal tissues; D - statistical analysis for Bax protein relative expression; E - statistical analysis for Bcl-2 protein relative expression; ¹⁾ $P < 0.001$, compared with control group; ²⁾ $P < 0.001$, compared with model group; ³⁾ $P < 0.001$, compared with model + Nal group.

图 3 各组大鼠海马 DG 区神经元凋亡情况比较。 $n = 4, \bar{x} \pm s$

Fig. 3 Comparison of neuronal apoptosis in the hippocampal DG regions of rats in different groups. $n = 4, \bar{x} \pm s$



A - ELISA 检测 TNF- α 表达; B - ELISA 检测 IL-6 表达; 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.001$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.001$; 与模型 + 纳美芬组比较, ³⁾ $P < 0.001$ 。

A - ELISA analysis for TNF- α levels; B - ELISA analysis for IL-6 levels; ¹⁾ $P < 0.001$, compared with control group; ²⁾ $P < 0.001$, compared with model group; ³⁾ $P < 0.001$, compared with model + Nal group.

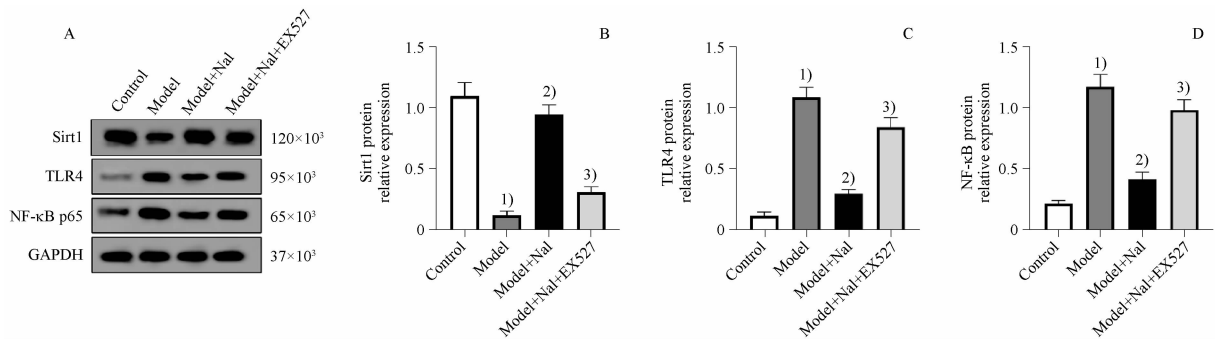
图 4 ELISA 检测各组大鼠海马组织中肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和白细胞介素 6 (IL-6) 表达。 $n = 4, \bar{x} \pm s$

Fig. 4 ELISA assay for TNF- α and IL-6 levels in hippocampal tissues of rats in different groups. $n = 4, \bar{x} \pm s$

假手术组做对照。本研究用七氟烷和剖腹探查术诱导的 POCD 模型大鼠出现认知障碍, 海马 DG 区神

经元发生病理学损伤、凋亡增加, 海马组织中炎性因子表达显著增加。这表明本研究中 POCD 模型成功诱导。

纳美芬是 μ -阿片受体和 δ -阿片受体的强效拮抗剂, 但也是 κ -阿片受体的部分激动剂^[19]。Li 等^[20]的研究发现, κ -阿片受体激动剂可通过抑制 Janus 激酶 2 (JAK2)/信号传导和转录激活因子 3 (STAT3) 通路改善大鼠 POCD。Fan 等^[21]的研究也显示 κ -阿片受体激动剂 U50488H 可通过 PI3K/AKT/Nrf2/HO-1 通路缓解心肺流转变大鼠的 POCD 症状, 减少大脑损伤。临床上纳美芬不仅能够缩短全麻患者术后苏醒时间^[22], 也能够改善老年胸腔镜手术患者的认知能力^[9]。本研究结果发现纳美芬改善了老年大鼠术后认知能力, 减轻了神经元损伤。凋亡在 POCD 的发病机制中发挥着重要作用。研究发现促凋亡蛋白 Bax 在手术和麻醉诱导的 POCD 模型动物中表达显著上调, 而抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达显著下调^[23-24]。本研究通过 TUNEL 染色发现纳美芬可减少 POCD 模型大鼠海马 DG 区神经元凋亡, 通过 Western blot 实验检测凋亡相关蛋白表达发现在



A - Western blot 检测 Sirt1、TLR4 和 NF- κ B p65 蛋白表达情况; B - Sirt1 蛋白表达量的统计分析; C - TLR4 蛋白表达量的统计分析; D - NF- κ B p65 蛋白表达量的统计分析; 与对照组比较,¹⁾ $P < 0.001$; 与模型组比较,²⁾ $P < 0.001$; 与模型 + 纳美芬组比较,³⁾ $P < 0.001$ 。

A - Western blot assay for the protein levels of Sirt1, TLR4, and NF- κ B p65; B - statistical analysis for Sirt1 protein relative expression; C - statistical analysis for TLR4 protein relative expression; D - statistical analysis for NF- κ B p65 protein relative expression; ¹⁾ $P < 0.001$, compared with control group; ²⁾ $P < 0.001$, compared with model group; ³⁾ $P < 0.001$, compared with model + Nal group.

图 5 各组大鼠海马组织中沉默信息调节因子 1 (Sirt1)、Toll 样受体 4 (TLR4) 和核因子 κ B 亚基 p65 (NF- κ B p65) 蛋白表达比较。 $n = 4, \bar{x} \pm s$

Fig. 5 Comparison of Sirt1, TLR4, and NF- κ B p65 protein levels in hippocampal tissues of rats in each group. $n = 4, \bar{x} \pm s$

POCD 模型大鼠中, 纳美芬可降低 Bax 表达, 增加 Bcl-2 的表达。神经炎症在 POCD 的发生中发挥着关键作用^[5], 炎症因子 TNF- α 和 IL-6 在 POCD 模型动物的海马组织中表达明显增加^[25]。本研究结果发现纳美芬可减少海马组织中 TNF- α 和 IL-6 表达。TLR4/NF- κ B 通路是介导炎症反应的重要信号通路, POCD 的发生与海马组织中此信号通路的活化密切相关^[26]。同样, 本研究中手术和七氟烷麻醉诱导的 POCD 模型大鼠中 TLR4 和 NF- κ B p65 表达均增加, 证实了 TLR4/NF- κ B 通路发生活化。在大鼠肺缺血再灌注损伤模型中纳美芬可抑制 TLR4/NF- κ B 通路的活化^[27]。本研究中发现纳美芬在 POCD 大鼠中也可抑制 TLR4/NF- κ B 通路活化。

Sirt1 是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD⁺) 依赖的组蛋白去乙酰化酶, 广泛存在于大脑中。它通过调节包括 NF- κ B 在内的多个通路来调控多种细胞过程。Sirt1 被认为具有神经保护作用^[13], 可抑制 TLR4/NF- κ B 通路活化改善大鼠认知障碍和海马神经炎症^[28]。有研究发现纳美芬通过调节 Sirt1 减轻大鼠肺缺血再灌注损伤^[11], 本研究发现纳美芬处理 POCD 模型大鼠后 Sirt1 表达增加。使用 Sirt1 抑制剂 EX527 进一步探究了纳美芬是否通过调节 Sirt1 表达在 POCD 中发挥神经保护作用。结果发现, 与 Model + Nal 组相比, Model + Nal + EX527 组大鼠认知能力减弱, 海马 DG 区神经元损伤增多, 凋亡和炎症因子表达增多, TLR4/NF- κ B 通路活化增强。这表明纳美芬是通过上调 Sirt1 表达发挥神经

保护作用的。

综上所述, 本研究结果发现纳美芬通过 Sirt1/TLR4/NF- κ B 通路改善大鼠 POCD 的分子机制, 为临床上纳美芬用于 POCD 的治疗和预防提供了理论基础。当然, 纳美芬是否通过其他信号通路发挥改善 POCD 的作用尚需进一步探究。

REFERENCES

- [1] ZHAO Q, WAN H, PAN H, *et al.* Postoperative cognitive dysfunction-current research progress [J]. *Front Behav Neurosci*, 2024, 18: 1328790. DOI: 10.3389/fnbeh.2024.1328790.
- [2] SURAARUNSUMRIT P, SRINONPRASERT V, KONGMALAI T, *et al.* Outcomes associated with postoperative cognitive dysfunction: a systematic review and meta-analysis [J]. *Age Ageing*, 2024, 53(7): afae160. DOI: 10.1093/ageing/afae160.
- [3] 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.
- [4] LI Z, ZHU Y, KANG Y, *et al.* Neuroinflammation as the Underlying Mechanism of Postoperative Cognitive Dysfunction and Therapeutic Strategies [J]. *Front Cell Neurosci*, 2022, 16: 843069. DOI: 10.3389/fncel.2022.843069.
- [5] LIU Y, YANG W, XUE J, *et al.* Neuroinflammation: The central enabler of postoperative cognitive dysfunction [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 167: 115582. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115582.
- [6] DEWITT D S, PROUGH D S, UCHIDA T, *et al.* Effects of nalmefene, CG3703, tirilazad, or dopamine on cerebral blood flow, oxygen delivery, and electroencephalographic activity after traumatic brain injury and hemorrhage [J]. *J Neurotrauma*, 1997, 14(12): 931-941.
- [7] WU G, ZHAO X, WANG F, *et al.* Short term exposure to oxycedone alters the survival, proliferation and differentiation of rat embryonic neural stem cell in vitro [J]. *Brain Res Bull*, 2018, 143: 66-72.
- [8] MONTESINOS J, GIL A, GUERRI C. Nalmefene prevents alcohol-induced neuroinflammation and alcohol drinking preference in

- adolescent female mice; Role of TLR4 [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2017, 41(7): 1257-1270.
- [9] LI M Y, CHEN C, WANG Z G, *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.
- [10] SHI J, ZOU X, JIANG K, *et al.* SIRT1 mediates improvement of cardiac surgery-induced postoperative cognitive dysfunction via the TLR4/NF-kappaB pathway [J]. *World J Biol Psychiatry*, 2020, 21(10): 757-765.
- [11] XU B L M, WANG J W, LI W H, GAO R, HU H L. Post-ischemic treatment of nalmefene hydrochloride attenuated lung ischemia-reperfusion injury in rats via the Sirt1/Nrf2/HO-1 pathway with inhibition of ferroptosis [J]. *Chin J Tuberc Respir Dis (中华结核和呼吸杂志)*, 2023, 46(10): 993-1001.
- [12] ZHANG Q, LI Y, BAO Y, *et al.* Pretreatment with nimodipine reduces incidence of POCD by decreasing calcineurin mediated hippocampal neuroapoptosis in aged rats [J]. *BMC Anesthesiol*, 2018, 18(1): 42. DOI: 10. 1186/s12871-018-0501-0.
- [13] SUN Y, WANG Y, YE F, *et al.* SIRT1 activation attenuates microglia-mediated synaptic engulfment in postoperative cognitive dysfunction [J]. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14: 943842. DOI: 10. 3389/fnagi. 2022. 943842.
- [14] CALLEJA-CONDE J, ECHEVERRY-ALZATE V, GINE E, *et al.* Nalmefene is effective at reducing alcohol seeking, treating alcohol-cocaine interactions and reducing alcohol-induced histone deacetylases gene expression in blood [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(16): 2490-2505.
- [15] XIE S, JIANG X, DOYCHEVA D M, *et al.* Activation of GPR39 with TC-G 1008 attenuates neuroinflammation via SIRT1/PGC-1alpha/Nrf2 pathway post-neonatal hypoxic-ischemic injury in rats [J]. *J Neuroinflamm*, 2021, 18(1): 226. DOI: 10. 1186/s12974-021-02289-7.
- [16] TAN W W L Z, YANG C X. Effect of total saponin of *Aralia taibaiensis* on cognitive dysfunction in mice with traumatic brain injury by mediating SIRT1/FoxO1/PGC-1 α pathway [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2024, 59(1): 39-44.
- [17] XIE X, SHEN Z, HU C, *et al.* Dexmedetomidine ameliorates postoperative cognitive dysfunction in aged mice [J]. *Neurochem Res*, 2021, 46(9): 2415-2426.
- [18] YANG N S, ZHONG W J, SHA H X, *et al.* mtDNA-cGAS-STING axis-dependent NLRP3 inflammasome activation contributes to postoperative cognitive dysfunction induced by sevoflurane in mice [J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(5): 1927-1946.
- [19] KOGA M, INADA K, YAMADA A, *et al.* Nalmefene, an opioid receptor modulator, aggravates atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E knockout mice by enhancing oxidized low-density lipoprotein uptake in macrophages [J]. *Biochem Biophys Res*, 2024, 38: 101688. DOI: 10. 1016/j. bbrep. 2024. 101688.
- [20] 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.
- [21] FAN J, LI L, QU P, *et al.* kappa-opioid receptor agonist U50488H attenuates postoperative cognitive dysfunction of cardiopulmonary bypass rats through the PI3K/AKT/Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(4): 293. DOI: 10. 3892/mmr. 2021. 11933.
- [22] MA X, LIU J, TANG Y, *et al.* The efficacy of nalmefene on anesthetic recovery of patients: a study protocol for a multicenter randomized controlled trial [J]. *Trials*, 2023, 24(1): 156. DOI: 10. 1186/s13063-023-07169-4.
- [23] WEI L, YAO M, ZHAO Z, *et al.* High-fat diet aggravates postoperative cognitive dysfunction in aged mice [J]. *BMC Anesthesiol*, 2018, 18(1): 20. DOI: 10. 1186/s12871-018-0482-z.
- [24] XU Y, LU Y, XU R, *et al.* Gastrodin ameliorates postoperative cognitive dysfunction in aged mice by promoting nuclear translocation of Nrf2 through activation of AMPK [J]. *Brain Res*, 2024, 1822: 148607. DOI: 10. 1016/j. brainres. 2023. 148607.
- [25] XU H J, LI X P, HAN L Y. Role and mechanism of esketamine in improving postoperative cognitive dysfunction in aged mice through the TLR4/MyD88/p38 MAPK pathway [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2024, 40(1): 63-73.
- [26] YU K, ZHANG X K, XIONG H C, *et al.* Stellate ganglion block alleviates postoperative cognitive dysfunction via inhibiting TLR4/NF-kappaB signaling pathway [J]. *Neurosci Lett*, 2023, 807: 137259. DOI: 10. 1016/j. neulet. 2023. 137259.
- [27] ZHANG N L, WANG H Q, YANG J, *et al.* Effects of nalmefene hydrochloride on TLR4 signaling pathway in rats with lung ischemia-reperfusion injury [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(1): 461-468.
- [28] WU J, HAO Z, WANG Y, *et al.* Melatonin alleviates BDE-209-induced cognitive impairment and hippocampal neuroinflammation by modulating microglia polarization via SIRT1-mediated HMGB1/TLR4/NF-kappaB pathway [J]. *Food Chem Toxicol*, 2023, 172: 113561. DOI: 10. 1016/j. fct. 2022. 113561.

(收稿日期:2024-11-14)