

nNOS-PSD-95 解偶联在红车轴草抑制七氟醚诱导小鼠记忆提取障碍中的作用

余晓旭¹ 高鸿²

1 攀枝花市中心医院, 四川省攀枝花市, 617000;

2 贵州医科大学附院麻醉科, 贵州贵阳, 550004;

摘要: [目的] 研究 nNOS-PSD-95 解偶联效应在红车轴草调控七氟醚介导的成年小鼠记忆提取功能损害中的分子机制。[方法] 选取 16 只 SPF 级昆明种小鼠 (雌雄各半, 月龄 2-3 月, 体质量 30-35g) 采用随机数字表法分为对照组 (C 组, n=8) 和实验组 (T 组, n=8)。T 组连续 7 天经口灌胃红车轴草混悬液 (400 mg · d⁻¹), C 组给予等体积生理盐水干预。药物干预后, T 组暴露于 3.3% 七氟醚混合气体 (载气 40% O₂) 2 小时 C 组同步接受 40% O₂ 处理。暴露后 12 小时进行改良避暗实验, 定量分析暗室进入潜伏期 (STL)、5 分钟错误次数 (ETs) 及 Δ 潜伏期等行为学参数; 同步采用免疫共沉淀技术检测海马组织 PSD-95 与 nNOS 的蛋白互作水平。[结果] 行为学检测显示, 与 C 组相比, T 组 STL 显著延长 (Δ=82.3±9.6s vs 41.2±7.8s, P<0.05), Δ 潜伏期负值降低 (-15.4±3.2s vs -48.7±5.1s, P<0.05), ETs 减少 (1.2±0.3 vs 3.8±0.5, P<0.05)。分子生物学分析表明, T 组海马 PSD-95-nNOS 复合体结合效率较 C 组降低 32.7% (P<0.05)。[结论] 红车轴草可通过调控 nNOS-PSD-95 蛋白复合体解偶联机制, 有效改善七氟醚诱导的成年小鼠记忆提取功能障碍, 为临床防治吸入麻醉相关认知并发症提供新策略。

关键词: 红车轴草; 七氟醚; 记忆提取障碍; 被动回避实验; 突触后致密蛋白 95; 神经元型一氧化氮合酶

DOI:10.69979/3029-2808.24.12.001

七氟醚作为临床常用吸入麻醉剂, 其术后认知功能障碍 (POCD) 发生机制亟待阐明。前期研究表明, 七氟醚麻醉可显著损害啮齿类动物短期记忆提取功能, 其病理生理过程可能与突触后 nNOS-PSD-95 蛋白复合体的异常耦联相关^[1]。值得注意的是, nNOS-PSD-95 信号轴解偶联剂 ZL006 已被证实可有效改善消退记忆提取障碍^[2]。最新药理学研究发现红车轴草提取物具有特异性抑制 nNOS-PSD-95 耦联的生物活性^[3], 但其对七氟醚所致记忆损害的保护效应尚未明确。本研究通过构建七氟醚诱导的记忆提取障碍模型, 系统评价红车轴草的神经保护作用及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验对象与分组

SPF 级昆明种小鼠 16 只 (雌雄各半, 体质量 30-35g, 月龄 2-3 月) 由贵州医科大学实验动物中心提供 (生产许可证: SCXK(黔)2012-0001; 使用许可证: SYXK(黔)2012-0001)。实验前适应性饲养 3 天, 维持环境温度 25±1℃, 相对湿度 50±5%, 12h 昼夜节律, 自由摄食饮水。采用完全随机设计分为: 对照组 (C 组, n=8) 和

车轴草干预组 (T 组, n=8)。

1.2 主要仪器与试剂

吸入用七氟醚 (上海恒瑞医药 批号: 16022931)。PA T-8M 避暗仪 (成都泰盟), 麻醉机 (Mindray watoex65 深圳迈瑞), 麻醉气体浓度分析仪 (Dräger 德尔格), 脉搏氧饱和度监测仪 (Mindray Bene ViewT8, 深圳迈瑞), 裂解酶和蛋白裂解液 (碧云天, P0013B); 兔抗 nNOS 单抗 (Abcam, 1:1000); 兔抗 PSD-95 单抗 (Abcam, 1:1000), 山羊抗兔二抗 (北京中杉金桥, 1:2000)。

1.3 实验方法

1.3.1 药物干预与麻醉处理

T 组连续 7 天灌胃红车轴草提取物 (400 mg · d⁻¹), C 组同步给予等体积生理盐水。麻醉诱导采用定制化有机玻璃箱 (45×30×30cm), 载气为 40% O₂ (流量 2 L · min⁻¹), 维持七氟醚浓度 3.3% 达 2 小时。麻醉全程监测生命体征 (HR 320±25 bpm, SpO₂ 98±1%), 术后持续氧疗 15 分钟。

1.3.2 改良避暗实验方案

记忆训练：连续 2 日进行 3 次/日趋暗行为强化，记录基础步入潜伏期（STL baseline）。记忆巩固 24 小时后实施足底电击（32V 交流电压，6s）。记忆测试分别在麻醉前（STL pre）和暴露后 12h（STL post）进行，计算 Δ 潜伏期（ Δ STL=STLpost - STLpre）。纳入标准：参照文献^[4,5]，STL baseline>120s，确定产生遗忘的标准为：STL pre<30s。

1.3.3 免疫共沉淀分析

快速分离海马组织后，采用裂解酶和蛋白酶裂解液制备组织匀浆。取 500 μ g 总蛋白与 nNOS 抗体（1:50）4℃共孵育 16h，Protein G 磁珠捕获免疫复合物，PBS T 洗 5 次后加入 60 μ L 蛋白缓冲液，100℃煮沸 10 min，洗脱结合蛋白，用于免疫印迹分析。Western blot 检测 PSD-95 表达（10% SDS-PAGE，100V 转膜 2h），Image J 定量条带灰度值。

表 1 七氟醚对小鼠避暗实验中潜伏期和错误次数的影响（ $\bar{x} \pm s$, n=8）

组别	基础成绩		记忆成绩	
	潜伏期/s	错误次数/次	潜伏期/s	错误次数/次
C 组	251.834±45.28	0.4±0.8	17.884±25.415	2.7±2.5
T 组	261.641±59.67	0.3±0.8	240.873±68.711	0.0±0.0

注：与对照组比较，P<0.05

2.2 蛋白质免疫印迹和免疫共沉淀结果

与 C 组比较，Z 组小鼠海马中 nNOS-PSD95 相互作用减弱，P<0.05，差异有统计学意义。（见图 2）

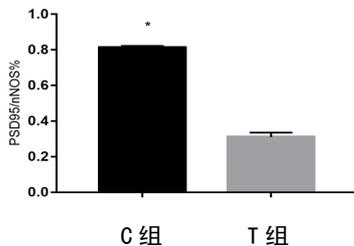


图 2: nNOS-PSD95 免疫共沉淀分析

与对照组比较 P<0.05

3 讨论

本研究发现红车轴草预处理可显著改善七氟醚暴露后记忆提取功能，其机制涉及 nNOS-PSD-95 复合体的解耦联调控。分子层面，PSD-95 通过 PDZ 结构域锚定 nNOS 至 NMDAR 信号复合体，介导 NO 过量生成引发突触可塑性损伤^[4]。七氟醚可能通过增强 PSD-95-nNOS 耦联加剧该病理过程，而红车轴草所含异黄酮成分（如鹰嘴豆素 A）可竞争性结合 PDZ 结构域，发挥类 ZL006 的解耦联效应^[5]。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 22.0 进行数据分析，计量资料以（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，组间比较采用成组设计资料的 t 检验，P<0.05 判定差异具有统计学意义。

2 结果

所有参加避暗实验的小鼠经趋暗训练后，步入潜伏期均<60s，无小鼠被淘汰，电击后 24h，测试步入潜伏期均>120s，即全部成功建立避暗记忆，没有小鼠被淘汰，没有小鼠在吸入七氟醚过程中死亡，在训练时参加避暗实验的 C 组有 1 只雄性小鼠因受伤而死亡。

2.1 行为学评估

T 组麻醉后 12h STLpost 显著延长， Δ STL 负值减小，ETs 降低（P<0.05）。结果见表 1。

国际前沿研究表明，抑制神经元型一氧化氮合酶（nNOS）与突触后致密蛋白 95（PSD-95）的跨蛋白相互作用可有效增强消退记忆的再提取效能^[11]，证实该蛋白复合体的构象稳定性对记忆检索通路具有关键调控价值。本课题组既往实验数据显示，3.3%七氟醚持续暴露 2h 可显著损伤成年小鼠前额叶-海马环路介导的短期记忆功能，其病理进程与 PSD-95 介导的突触信号转导异常密切相关^[1]。值得注意的是，药效动力学分析揭示七氟醚诱导的记忆损伤存在明确时间窗效应：麻醉后 12h 呈现认知损害峰值，至 24h 神经行为学参数逐渐恢复基线水平。通过应用特异性 nNOS-PSD95 解耦联剂 ZL006 进行干预，发现其可逆转临床浓度七氟醚（1.3MAC）暴露引发的记忆检索抑制现象，提示 nNOS-PSD95 复合体的异常聚集可能是七氟醚神经毒性的关键分子机制。基于此，本研究提出假说：红车轴草所含活性成分可能通过模拟 ZL006 的药理效应，干扰 nNOS-PSD95 蛋白互作网络，进而拮抗七氟醚诱导的认知功能障碍。

在实验设计中采用改良型避暗测试，该模型通过量化可精确评估记忆编码、巩固及提取等神经过程^[10]。本方案参照临床麻醉时长标准，构建七氟醚（3.3%，2h）暴露模型，并通过预实验验证行为学指标的检测灵敏度。

实验组小鼠接受红车轴草提取物(400 mg·d⁻¹)预处理7天后,其潜伏期较对照组延长,错误反应次数(error responses)下降,证明该干预可显著改善七氟醚引发的记忆提取缺陷。

从分子机制层面分析,PSD-95作为细胞脚手架蛋白,通过PDZ结构域与NMDAR的NR2B亚基形成稳定复合物,进而募集胞质nNOS至突触后膜,形成NMDAR-PSD95-nNOS信号转导模块^[11]。最新蛋白互作研究表明,nNOS-PSD95复合物过度激活会引发突触可塑性损伤,而特异性解偶联剂(如ZL006)可竞争性结合PDZ结构域,使复合物解离^[3]。本实验通过免疫共沉淀定量检测发现,红车轴草干预组海马组织nNOS-PSD95结合效率较对照组降低,这与行为学改善效应呈显著正相关。

红车轴草(*Trifolium pratense* L.)作为豆科药用植物,其化学成分谱分析显示富含异黄酮类化合物(如鹰嘴豆芽素A、染料木素等),这些成分具有多靶点神经保护特性^[6]。药理学研究证实,鹰嘴豆芽素A可剂量依赖性上调海马CA1区BDNF表达,同时通过抑制nNOS-PSD95耦联降低NO神经毒性^[8]。值得注意的是,何洪亮团队采用分子对接技术证实,红车轴草提取物中特定异黄酮成分与ZL006具有相似的PDZ结构域结合模式,这为其解偶联活性提供了结构生物学依据^[2]。上述发现提示,红车轴草可能通过调控神经发生(促进齿状回颗粒细胞增殖)和抑制神经炎症(TNF- α 下降)等多重机制发挥认知保护作用。

综上,红车轴草改善认知的机制具有多靶点特性:其异黄酮成分可上调BDNF表达,促进海马神经发生^[6];同时通过抑制nNOS-PSD-95耦联减少NO神经毒性,双重机制协同保护突触功能。本研究首次建立红车轴草-七氟醚-记忆提取的三元作用模型,为开发新型麻醉辅助药物提供实验依据。后续研究需进一步明确其活性成分的药代动力学特征及长期用药安全性。

参考文献

[1]王冬婷,高鸿,任益民,等.七氟醚对小鼠记忆提取的影响:海马PSD95和AMPA受体在其中的作用[J].中华麻醉学杂志,2018,38(2):150-154.
[2]Li J, Han Z, Cao B, et al. Disrupting nNOS-PSD-95 coupling in the hippocampal dentate gyr

us promotes extinction memory retrieval[J]. *Biophysical & Biophysical Research Communications*, 2017, 493(1):862.

[3]何宏亮,潘林丽,顾小丽,等.红车轴草中nNOS-PSD-95解偶联剂的高效发现和快速筛选[J].中国中药杂志,2018(4):748-754.

[4]Xie H, She G M, Wang C, et al. The gender difference in effect of sevoflurane exposure on cognitive function and hippocampus neuronal apoptosis in rats. [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(4):647-657.

[5]方强,张焰,李国君,等.不同浓度七氟烷对老年大鼠认知功能的影响[J].中华麻醉学杂志,2009,29(1):44-46

[6]Kilicaslan A, Belviranli M, Okudan N, et al. Single and repeated sevoflurane or desflurane exposure does not impair spatial memory performance of young adult mice[J]. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 2013, 27(6):641-649.

[7]Sattler R, Xiong Z, Lu W Y, et al. Specific Coupling of NMDA Receptor Activation to Nitric Oxide Neurotoxicity by PSD-95 Protein[J]. *Science*, 1999, 284(5421):1845.

[8]徐艳春,魏璐雪,周玉新,等.红车轴草中异黄酮的指纹图谱研究[J].中国中药杂志,2002,27(3):196-198.

[9]余高明,谢红,张力元,等.七氟烷对成年大鼠行为学的影响[J].江苏医药2011 37(14):1637-1639.

[10]汤建文,李蕊,范郑丽,等.小鼠逆行性遗忘动物模型的建立[J].中华神经医学杂志,2010,9(6):598-601.

[11]张艳秋.运动训练和红车轴草与芒柄花素磺酸钠对高脂膳食大鼠肾组织影响的实验研究[D].陕西师范大学,2007.

作者简介:余晓旭(出生年月:19940902),性别:女,民族:汉族,籍贯(四川省乐山市)人,职务/职称:住院医师,学历:硕士,单位(攀枝花市中心医院),研究方向:麻醉与认知功能。