

右美托咪定调节Nrf2/ARE信号通路对小鼠 股骨骨折术后认知功能的影响

贾宁¹ 李正阳¹ 肖秀英¹ 刘鹏宇² 詹玮玮^{1*}

(¹国药葛洲坝中心医院麻醉科, 宜昌 442000; ²国药葛洲坝中心医院骨科, 宜昌 442000)

摘要 该文旨在探讨右美托咪定(Dex)调节核因子E2相关因子2(Nrf2)/抗氧化反应元件(ARE)信号通路对小鼠股骨骨折术后认知功能的影响。取雄性C57BL/6J小鼠, 麻醉后制备股骨骨折模型, 通过随机数表法将制备的模型小鼠随机分为模型组、Dex组(25 µg/kg)、鸦胆子苦醇(Bru)组(Nrf2抑制剂, 1.4 mg/kg)、Dex(25 µg/kg)+Bru(1.4 mg/kg)组, 每组10只, 另取10只C57BL/6J小鼠设为假手术组。以新异臂探索实验、跳台实验检测小鼠认知功能; 透射电镜观察小鼠海马神经元超微结构; TUNEL染色检测小鼠海马神经元凋亡率; 试剂盒检测小鼠血清活性氧(ROS)、IL-1β、IL-8、IL-6水平与脑组织谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性; Western blot检测小鼠脑组织中Nrf2/ARE通路相关蛋白表达水平。模型组小鼠海马神经元超微结构明显损伤, 新异臂探索次数、探索路程与探索时间比、GSH-Px活性、SOD与CAT活性、Nrf2蛋白表达水平、NQO1与HO-1蛋白表达水平相比假手术组显著降低($P<0.05$), 探索时间、跳台潜伏期相比假手术组显著缩短($P<0.05$), 跳台犯错误次数, 海马神经元凋亡率, 血清ROS、IL-1β、IL-8、IL-6水平以及Keap1蛋白表达水平相比假手术组显著升高($P<0.05$)。Dex组小鼠海马神经元超微结构损伤减轻, 新异臂探索次数、探索路程与探索时间比、GSH-Px活性、SOD与CAT活性、Nrf2蛋白表达水平、NQO1与HO-1蛋白表达水平相比模型组升高($P<0.05$), 探索时间、跳台潜伏期相比模型组延长($P<0.05$), 跳台犯错误次数、海马神经元凋亡率, 血清ROS、IL-1β、IL-8、IL-6水平以及Keap1蛋白表达水平相比模型组降低($P<0.05$); Bru组小鼠各指标变化趋势与Dex组相反($P<0.05$)。Dex+Bru组小鼠海马神经元超微结构损伤加重, 新异臂探索次数、探索路程与探索时间比、GSH-Px活性、SOD与CAT活性、Nrf2蛋白表达水平、NQO1与HO-1蛋白表达水平相比Dex组降低($P<0.05$), 探索时间、跳台潜伏期相比Dex组缩短($P<0.05$), 跳台犯错误次数、海马神经元凋亡率, 血清ROS、IL-1β、IL-8、IL-6水平以及Keap1蛋白表达水平相比Dex组升高($P<0.05$)。Dex可通过激活Nrf2/ARE信号而减轻小鼠股骨骨折术后神经炎症与氧化应激, 进而改善其认知功能。

关键词 右美托咪定; Nrf2/ARE; 股骨骨折; 认知功能

Effect of Dexmedetomidine on Postoperative Cognitive Function of Mice with Femoral Fracture by Modulating Nrf2/ARE Signaling Pathway

JIA Ning¹, LI Zhengyang¹, XIAO Xiuying¹, LIU Pengyu², ZHAN Weiwei^{1*}

(¹Department of Anesthesiology, Sinopharm Gezhouba Central Hospital, Yichang 442000, China;

²Department of Orthopaedics, Sinopharm Gezhouba Central Hospital, Yichang 442000, China)

Abstract This study aims to investigate the effect of Dex (dexmedetomidine) on postoperative cognitive function of mice with femoral fracture by modulating Nrf2 (nuclear factor erythroid-2 related factor 2)/ARE (anti-

收稿日期: 2025-03-19

接受日期: 2025-06-24

*通信作者。Tel: 0717-6727479, E-mail: 504461407@qq.com

Received: March 19, 2025

Accepted: June 24, 2025

*Corresponding author. Tel: +86-717-6727479, E-mail: 504461407@qq.com

oxidant response element) signaling pathway. The male C57BL/6J mice were collected, and were anesthetized to prepare a femoral fracture model, and were randomly grouped into model group, Dex group (25 $\mu\text{g/kg}$), Bru (brusatol) group (Nrf2 inhibitor, 1.4 mg/kg), Dex (25 $\mu\text{g/kg}$)+Bru (1.4 mg/kg) group, with 10 mice in each group. Another 10 C57BL/6J mice were set as sham group. Then the cognitive function of mice was detected by new alien arm exploration experiment and platform jumping experiment. Transmission electron microscopy was used to observe the ultrastructure of mouse hippocampal neurons. TUNEL staining was used to detect the apoptosis rate of mouse hippocampal neurons. The levels of ROS (reactive oxygen species), IL-1 β , IL-8 and IL-6 in serum, and the activities of GSH-Px (glutathione peroxidase), SOD (superoxide dismutase) and CAT (catalase) in brain tissues were detected by kits. Western blot was used to detect the expression levels of Nrf2/ARE pathway related proteins in mouse brain tissue. The ultrastructure of hippocampal neurons in the model group was obviously damaged, exploration frequency, exploration distance and exploration time ratio of the new alien arm, the activities of GSH-Px, SOD and CAT, and the expression of Nrf2, NQO1 and HO-1 proteins in brain tissue were obviously lower than the sham group ($P<0.05$), the exploration time and the latency period of platform jumping were significantly shorter than the sham group ($P<0.05$), the number of jumping errors, hippocampal neuron apoptosis rate, the levels of serum ROS, IL-1 β , IL-8 and IL-6, the expression of Keap1 protein were obviously higher ($P<0.05$). The ultrastructural damage of hippocampal neurons in the Dex group was reduced, exploration frequency, exploration distance and exploration time ratio of the new alien arm, the activities of GSH-Px, SOD and CAT, and the expression of Nrf2, NQO1 and HO-1 proteins in brain tissue were obviously higher than model group ($P<0.05$), the exploration time and the latency period of platform jumping were obviously longer than model group ($P<0.05$), the number of jumping errors, hippocampal neuron apoptosis rate, the levels of serum ROS, IL-1 β , IL-8 and IL-6, the expression of Keap1 protein were obviously lower ($P<0.05$); in addition, the trend of the indexes in the Bru group was opposite with that in the Dex group ($P<0.05$). The ultrastructural damage of hippocampal neurons in the Dex+Bru group was aggravated, exploration frequency, exploration distance and exploration time ratio of the new alien arm, the activities of GSH-Px, SOD and CAT, and the expression of Nrf2, NQO1 and HO-1 proteins in brain tissue were obviously lower than the Dex group ($P<0.05$), the exploration time and the latency period of platform jumping were obviously shorter than the Dex group ($P<0.05$), the number of jumping errors, hippocampal neuron apoptosis rate, the levels of serum ROS, IL-1 β , IL-8 and IL-6, the expression of Keap1 protein were obviously higher ($P<0.05$). Dex can alleviate postoperative neuroinflammation and oxidative stress in mice with femoral fractures by activating the Nrf2/ARE signal, thereby improving their cognitive function.

Keywords dexmedetomidine; Nrf2/ARE; femoral fractures; cognitive function

术后认知功能障碍(postoperative cognitive dysfunction, POCD)是心脏、骨折等手术后出现的一种脑部并发症,记忆力减退、智力降低是其主要表现,常见于老年人群,可持续数周或数月,甚至进展为永久性认知障碍,会对患者身心造成极大伤害,并给其家庭造成沉重负担^[1-2]。POCD发病机制尚未被完全研究清楚,很多研究显示中枢炎症、氧化应激与POCD发生的关系极为密切,是POCD发生、进展的主要病理基础,因而对中枢炎症与氧化应激进行抑制是防治POCD的有效策略^[3-4]。核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid-2 related fac-

tor 2, Nrf2)/抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)是机体主要的抗氧化信号,可通过调控线粒体功能、神经元可塑性来介导认知障碍的发生发展^[5],激活Nrf2/ARE信号可减轻POCD老年大鼠神经炎症与氧化应激,减少术后神经元的丢失,进而有效预防POCD的发生^[6],因此Nrf2/ARE可能是药物干预治疗POCD的重要靶点。右美托咪定(dexmedetomidine, Dex)是常用于临床麻醉及镇静的一种镇定剂,可促进Nrf2通路相关蛋白表达,进而通过抗氧化应激和抗炎机制来缓解脂多糖诱导的小鼠认知缺陷^[7],这说明Dex可激活Nrf2/ARE,而

前人研究表明Nrf2/ARE介导POCD的发生发展, 另外Dex联合乌司他丁一起应用可有效预防全髋关节置换术后老年患者POCD的发生^[8], 提示Dex可能通过激活Nrf2/ARE信号来防治POCD。本文通过制备股骨骨折POCD小鼠模型, 探究Dex调节Nrf2/ARE信号通路对其术后认知功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 雄性C57BL/6J小鼠, SPF级, 18月龄, 体质量为(20.9±1.0) g, 购自山东博安生物技术股份有限公司, 生产许可证号为SCXK(鲁) 2020-0006, 饲养在SPF级环境, 室温24~26 °C, 室内湿度45%~60%, 昼夜节律, 12 h光照, 维持充足的饲料和纯净水供应, 手术前禁食禁水12 h。本实验经国药葛洲坝中心医院动物伦理委员会审批通过(批号: 2023-0025)。

1.1.2 主要试剂及仪器 盐酸右美托咪定注射液(江苏恩华药业股份有限公司, 国药准字H20110085, 规格为2 mL:0.2 mg); 鸦胆子苦醇(brusatol, Bru)(美国Selleck公司, 批号: S7956, 纯度: 99.96%); 活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(货号: JL-T3037)、小鼠IL-1 β 与IL-6 ELISA试剂盒(货号: JL18442、JL20268, 上海江莱生物科技有限公司); 小鼠IL-8 ELISA试剂盒(货号: XZK-8082, 上海轩泽康生物有限公司); 兔源抗小鼠anti-Nrf2、anti- β -actin、anti-Keap1、anti-NQO1与anti-HO-1一抗(货号: ab313825、ab5694、ab226997、ab80588、ab189491)、脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)染色试剂盒(货号: ab66108)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)与过氧化氢酶(catalase, CAT)活性检测试剂盒(货号: ab102530、ab65354、ab83464)、驴抗兔二抗(货号: ab6885)(英国Abcam公司)等。

小鼠跳台记录仪(型号: BW-YLS-3TB, 上海软隆科技发展有限公司); Y迷宫实验与视频分析系统(型号: ZH-MGY, 安徽正华生物仪器设备有限公司); 透射电镜(型号: HT7700, 日本HITACHI公司); 冰冻切片机(型号: Cryotome, 美国ThermoFisher Scientific公司); 生物显微镜(型号: BA400, 麦克奥迪实业集团公司); 电泳仪、全自动酶标仪、半干转仪(型号: Mini

Protean 3Cell、iMark、Trans-Blot Turbo, 美国Bio-Rad公司)等。

1.2 方法

1.2.1 制备股骨骨折小鼠模型并分组干预 取C57BL/6J小鼠制备股骨骨折模型, 具体参考文献[9]中方法: 提前禁食禁水12 h的小鼠用三溴乙醇麻醉(13 μ L/g, 腹腔注射)后仰卧固定, 对右下肢处消毒后于其髌旁内侧做一3 mm切口, 分离肌肉组织后找到髌骨, 使其脱位来暴露股骨髁间, 用不锈钢导针插入股骨髁间进入股骨髓腔, 直至股骨粗隆部, 然后于骨折模型架的冲撞台上, 用质量为350 g的重物自6 cm高度打击带有不锈钢导针的小鼠大腿, 来制造闭合性股骨骨折, 将26 G不锈钢针通过导针插入骨折股骨的骨髓腔进行髓内固定, 剪断钢针柄并向内推进至尾部与股骨髁关节面平齐, 即完成造模。造模42只, 成功40只(成功率为95%), 将其用随机数表法分为模型组、Dex组、Bru组、Dex+Bru组, 每组10只, 另取10只小鼠只做切口不进行其他操作设为假手术组。

Dex组小鼠静脉注射25 μ g/kg的Dex(以无菌生理盐水稀释)^[10], 同时腹腔注射5 μ L/g无菌生理盐水; Bru组小鼠静脉注射5 μ L/g无菌生理盐水, 同时腹腔注射1.4 mg/kg的Bru(以无菌生理盐水溶解配制)^[11]; Dex+Bru组小鼠静脉注射25 μ g/kg的Dex, 同时腹腔注射1.4 mg/kg的Bru, 各组小鼠均于股骨骨折手术后30 min干预1次。

1.2.2 小鼠认知功能检测 于股骨骨折手术后48 h采用新异臂探索实验、跳台实验检测小鼠认知功能。

新异臂探索实验: 实验分2步进行。第1步: 关闭Y迷宫的1个臂作为新异臂, 将小鼠放入Y迷宫中, 让其在另2个相同的臂中探索, 用时10 min来加深小鼠记忆。45 min后进行第2步: 打开新异臂, 使小鼠在3个臂中自由探索5 min, 记录小鼠在新异臂中的探索次数、探索时间、探索路程, 并对小鼠在每个臂中的探索时间计时后算出新异臂探索时间比。新异臂探索时间比=[新异臂探索时间/3个臂探索总时间] $\times$ 100%, 以此衡量小鼠认知功能。

跳台实验: 各组小鼠于跳台记录仪中适应环境, 打开仪器对电网地板上小鼠进行电击, 此时训练小鼠跳到平台上躲避, 训练5 min加深小鼠记忆, 然后于30 min后进行测试, 记录从打开仪器到小鼠第1次受到电击的用时作为跳台潜伏期, 同时记录

5 min内小鼠受到电击的次数作为跳台犯错次数, 以此衡量小鼠认知功能。

1.2.3 小鼠海马神经元超微结构观察以及标本采集 认知功能检测后麻醉各组小鼠, 眼眶采血后离心(1 500 r/min、10 min、4 °C), 取离心管上部血清保存于-20 °C冰箱备检。

颈椎脱臼处死小鼠后剪下头颅, 取出大脑后在冰上迅速分离海马, 剪取约1 mm×1 mm×2 mm的海马。4 °C下以2.5%戊二醛固定2 h, 25 °C下以1%锇酸固定1 h, 室温下用0.1 mol/L磷酸漂洗液漂洗(3次, 15 min/次), 梯度乙醇(50%、70%、80%、90%和100%)脱水, 包埋、固化后切为厚约70 nm的超薄切片, 用3%醋酸铀酰与硝酸铅双染后在透射电镜下观察神经元超微结构。

剩余海马用最优化切割温度化合物(OCT)包埋、液氮冰冻后切为厚约5 μm的冰冻切片备检; 剪取约320 mg小鼠大脑组织, 冰水浴中与预冷RIPA裂解液一起高速研磨匀浆, 离心(5 000 r/min、15 min、4 °C)后取离心管上部组织样品液, 用BCA法定量其中蛋白浓度, 保存于-20 °C备检。

1.2.4 小鼠海马神经元凋亡率检测 室温下对各组小鼠海马组织冰冻切片进行复温, 5 min后在冰丙酮中固定10 min, 取出行TUNEL染色, 具体方法参照TUNEL染色试剂盒说明书。生物显微镜下拍照并以ImageJ软件量化各组海马神经元凋亡率, 神经元凋亡率=(凋亡细胞数/总细胞数)×100%。

1.2.5 小鼠血清ROS、炎症因子水平与脑组织抗氧化酶活性检测 4 °C下解冻各组小鼠血清, 以酶标仪检测各组血清中ROS、IL-1β、IL-8、IL-6水平; 4 °C下解冻各组小鼠脑组织样品液, 采用酶标仪检测脑组织样品液中GSH-Px、SOD、CAT活性, 具体方法参照各试剂盒说明书。

1.2.6 小鼠脑组织Nrf2/ARE通路相关蛋白表达水平检测 各组小鼠脑组织样品液中蛋白于沸水浴中变性后每组取20 μg, 于120 V恒压下电泳后进行半干转印, 用5%牛血清白蛋白于37 °C封闭2 h后依次孵育相应抗体(一抗于4 °C下孵育15 h, 二抗于37 °C下孵育2 h), 抗体稀释比为anti-β-actin(1:1 000)、anti-Nrf2(1:2 000)、anti-Keap1(1:1 000)、anti-NQO1(1:2 000)、anti-HO-1(1:1 000)、二抗(1:2 000), 显色, 拍照, 以β-actin作内参对照并用ImageJ软件量化各组Nrf2、HO-1蛋白相对表达水平。

1.3 统计学分析

本实验数据采用SPSS 26.0软件进行分析, 计量资料采用Shapiro-Wilk检验方法进行正态性检验, 服从正态分布的采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用单因素方差分析比较多组间差异, 方差齐则采用SNK-*q*检验比较组间差异, 方差不齐则采用Kruskal-Wallis非参数检验比较组间差异, 检验水平 $\alpha=0.05$ 。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠认知功能

模型组小鼠新异臂探索次数、探索路程与探索时间相比假手术组显著降低($P<0.05$), 探索时间、跳台潜伏期相比假手术组显著缩短($P<0.05$), 跳台犯错次数相比假手术组显著升高($P<0.05$)。Dex组小鼠新异臂探索次数、探索路程与探索时间相比模型组升高($P<0.05$), 探索时间、跳台潜伏期相比模型组延长($P<0.05$), 跳台犯错次数相比模型组降低($P<0.05$); Bru组小鼠新异臂探索次数、探索路程与探索时间相比模型组降低($P<0.05$), 探索时间、跳台潜伏期相比模型组缩短($P<0.05$), 跳台犯错次数相比模型组升高($P<0.05$)。Dex+Bru组小鼠新异臂探索次数、探索路程与探索时间相比Dex组降低($P<0.05$), 探索时间、跳台潜伏期相比Dex组缩短($P<0.05$), 跳台犯错次数相比Dex组升高($P<0.05$)。见图1和表1。

2.2 各组小鼠海马神经元超微结构

假手术组小鼠海马神经元超微结构完整清晰, 完好无损伤; 模型组小鼠海马神经元超微结构发生明显损伤: 细胞整体结构破损, 线粒体基质溶解、嵴结构断裂或紊乱, 核膜粗糙, 粗面内质网局部破损, 核内染色质聚集成絮状或块状; Dex组小鼠海马神经元整体结构基本完好、线粒体结构大致正常、嵴结构清晰可见, 核膜、粗面内质网与核内染色质形态正常, 超微结构损伤相比模型组减轻, Bru组小鼠海马神经元整体破损严重, 线粒体结构模糊、嵴结构断裂或消失, 核膜与粗面内质网破损加重, 核内染色质进一步聚集成块, 超微结构损伤相比模型组加重; Dex+Bru组小鼠海马神经元超微结构与模型组相似, 其损伤程度相比Dex组加重(图2)。

2.3 各组小鼠海马神经元凋亡情况

模型组小鼠海马神经元凋亡率相比假手术组

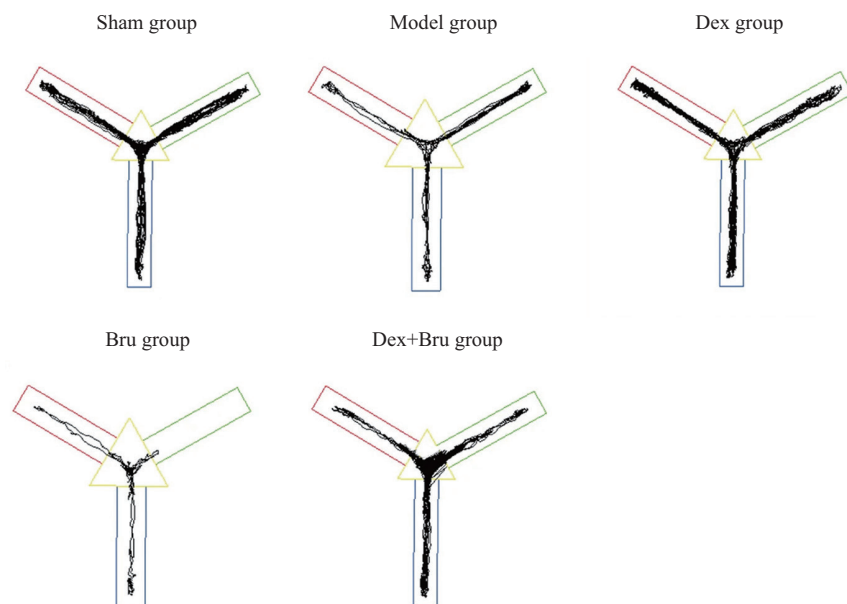


图1 各组小鼠新异臂探索实验轨迹图

Fig.1 Trajectory diagram of the exploration experiment of new alien arm of mice in each group

表1 各组小鼠新异臂探索实验与跳台实验结果

Table 1 The results of the exploration experiment of new alien arm and jumping platform experiment of mice in each group

组别	新异臂探索次数	新异臂探索时间/s	新异臂探索路程/m	新异臂探索时间比/%	跳台潜伏期/s	跳台犯错次数
Group	Exploration frequency of the new alien arm	Exploration time of the new alien arm /s	Exploration distance of the new alien arm /m	Exploration time ratio of new alien arms /%	Latency period of platform of jumping /s	Number of jumping errors
Sham group	7.60±1.21	125.20±16.25	18.12±2.35	51.73±6.20	134.80±19.42	1.90±0.52
Model group	4.20±0.63*	93.70±13.36*	10.03±1.24*	30.25±4.31*	59.10±11.23*	8.40±0.43*
Dex group	6.70±0.94 [#]	113.60±15.41 [#]	16.15±1.96 [#]	49.64±5.45 [#]	129.20±17.56 [#]	2.40±0.67 [#]
Bru group	1.30±0.76* ^{##} &	63.40±11.58* ^{##} &	3.94±0.83* ^{##} &	13.02±3.50* ^{##} &	21.20±6.51* ^{##} &	14.60±0.86* ^{##} &
Dex+Bru group	4.90±0.65* [#] &	102.50±12.17* [#] &	11.24±1.57* [#] &	32.10±5.14* [#] &	62.30±10.83* [#] &	7.90±0.52* [#] &

* $P<0.05$, 与假手术组比较; [#] $P<0.05$, 与模型组比较; & $P<0.05$, 与Dex组比较。 $n=10$, $\bar{x}\pm s$ 。

* $P<0.05$ compared with the sham group; [#] $P<0.05$ compared with the model group; & $P<0.05$ compared with the Dex group. $n=10$, $\bar{x}\pm s$.

明显升高 ($P<0.05$); Dex组小鼠海马神经元凋亡率相比模型组降低 ($P<0.05$), Bru组小鼠海马神经元凋亡率相比模型组升高 ($P<0.05$); Dex+Bru组小鼠海马神经元凋亡率相比Dex组升高 ($P<0.05$) (图3和表2)。

2.4 各组小鼠血清ROS与炎症因子水平

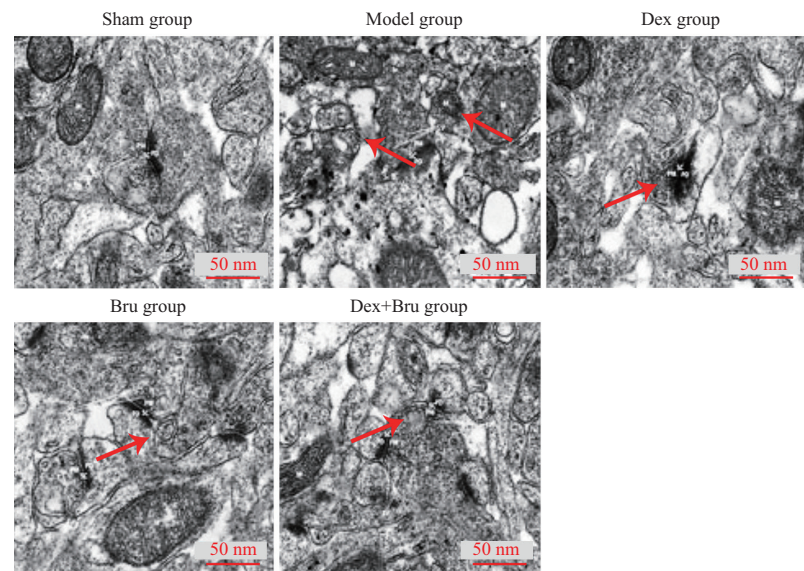
模型组小鼠血清ROS、IL-1 β 、IL-8与IL-6水平相比假手术组明显升高 ($P<0.05$); Dex组小鼠血清ROS、IL-1 β 、IL-8与IL-6水平相比模型组降低 ($P<0.05$), Bru组小鼠血清ROS、IL-1 β 、IL-8与IL-6水平相比模型组升高 ($P<0.05$); Dex+Bru组小鼠血清ROS、IL-1 β 、IL-8与IL-6水平相比Dex组升高 ($P<0.05$) (表3)。

2.5 各组小鼠脑组织抗氧化酶活性

模型组小鼠脑组织GSH-Px、SOD与CAT活性相比假手术组显著降低 ($P<0.05$); Dex组小鼠脑组织GSH-Px、SOD与CAT活性相比模型组升高 ($P<0.05$), Bru组小鼠脑组织GSH-Px、SOD与CAT活性相比模型组降低 ($P<0.05$); Dex+Bru组小鼠脑组织GSH-Px、SOD与CAT活性相比Dex组降低 ($P<0.05$) (表4)。

2.6 各组小鼠脑组织Nrf2/ARE通路相关蛋白表达情况

模型组小鼠脑组织Nrf2、NQO1与HO-1蛋白表达水平相比假手术组显著降低 ($P<0.05$), Keap1蛋白表达水平相比假手术组显著升高 ($P<0.05$)。Dex组



箭头指向损伤神经元。
The arrow points to the damaged neuron.

图2 各组小鼠海马神经元超微结构
Fig.2 Ultrastructure of hippocampal neurons of mice in each group

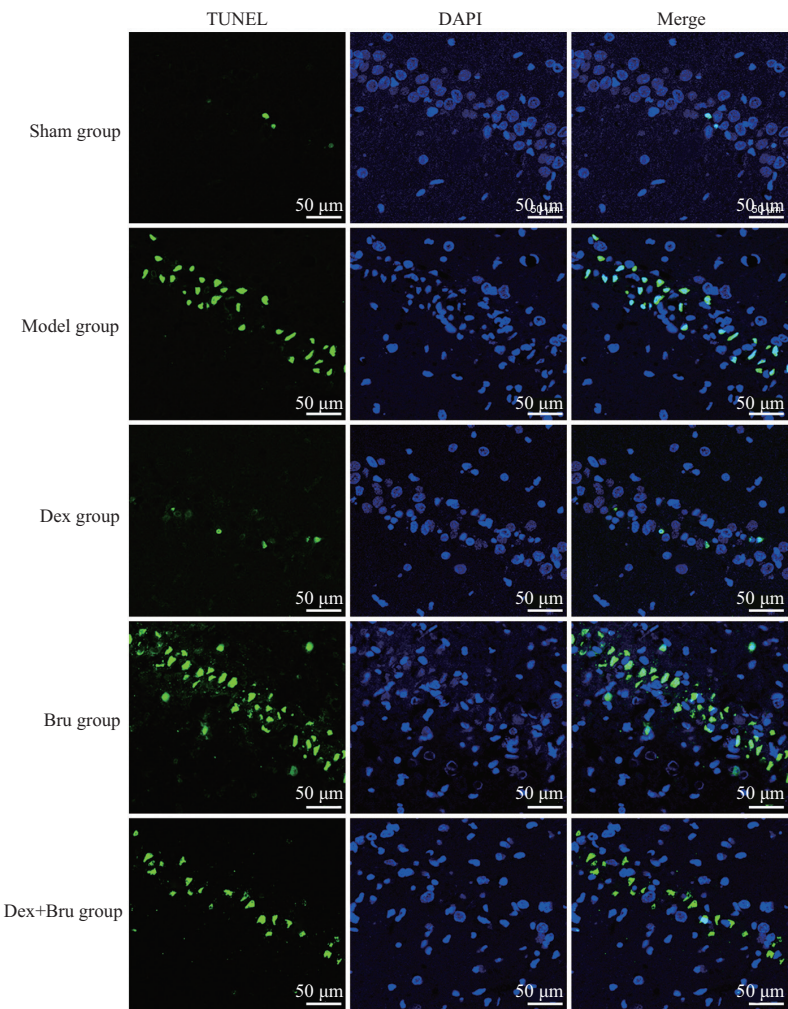


图3 各组小鼠海马神经元凋亡情况
Fig.3 Apoptosis of hippocampal neurons of mice in each group

表2 各组小鼠海马神经元凋亡率

Table 2 Apoptosis rate of hippocampal neurons of mice in each group

组别 Group	神经元凋亡率/% Neuronal apoptosis rate /%
Sham group	2.10±0.57
Model group	34.25±1.63*
Dex group	4.80±1.32 [#]
Bru group	59.13±2.20* ^{#&}
Dex+Bru group	32.84±1.75* ^{#&}

* $P<0.05$, 与假手术组比较; [#] $P<0.05$, 与模型组比较; [&] $P<0.05$, 与Dex组比较。 $n=10$, $\bar{x}\pm s$ 。

* $P<0.05$ compared with the sham group; [#] $P<0.05$ compared with the model group; [&] $P<0.05$ compared with the Dex group. $n=10$, $\bar{x}\pm s$.

表3 各组小鼠血清ROS、IL-1 β 、IL-8与IL-6水平Table 3 The levels of ROS, IL-1 β , IL-8 and IL-6 in the serum of mice in each group

组别 Group	ROS /mmol·L ⁻¹	IL-1 β /ng·L ⁻¹	IL-8 /ng·L ⁻¹	IL-6 /ng·L ⁻¹
Sham group	106.72±15.93	82.63±14.22	121.63±18.15	40.53±8.76
Model group	247.38±23.15*	293.12±22.38*	350.32±24.86*	269.32±13.54*
Dex group	114.63±17.91 [#]	90.85±15.43 [#]	133.80±20.15 [#]	45.67±9.14 [#]
Bru group	356.81±26.45* ^{#&}	416.51±23.21* ^{#&}	561.76±30.12* ^{#&}	485.27±21.03* ^{#&}
Dex+Bru group	234.90±20.59* ^{#&}	281.64±21.65* ^{#&}	338.14±27.30* ^{#&}	257.98±16.70* ^{#&}

* $P<0.05$, 与假手术组比较; [#] $P<0.05$, 与模型组比较; [&] $P<0.05$, 与Dex组比较。 $n=10$, $\bar{x}\pm s$ 。

* $P<0.05$ compared with the sham group; [#] $P<0.05$ compared with the model group; [&] $P<0.05$ compared with the Dex group. $n=10$, $\bar{x}\pm s$.

表4 各组小鼠脑组织GSH-Px、SOD与CAT活性

Table 4 GSH-Px, SOD, and CAT activities in brain tissues of mice in each group

组别 Group	GSH-Px (U/mg prot)	SOD (U/mg prot)	CAT (U/mg prot)
Sham group	20.63±1.81	15.47±1.20	12.02±0.83
Model group	11.02±0.92*	7.10±0.52*	6.05±0.46*
Dex group	19.14±1.70 [#]	14.53±1.31 [#]	11.34±0.75 [#]
Bru group	2.10±0.61* ^{#&}	1.02±0.30* ^{#&}	0.73±0.21* ^{#&}
Dex+Bru group	11.78±0.85* ^{#&}	7.64±0.72* ^{#&}	6.52±0.39* ^{#&}

* $P<0.05$, 与假手术组比较; [#] $P<0.05$, 与模型组比较; [&] $P<0.05$, 与Dex组比较。 $n=10$, $\bar{x}\pm s$ 。

* $P<0.05$ compared with the sham group; [#] $P<0.05$ compared with the model group; [&] $P<0.05$ compared with the Dex group. $n=10$, $\bar{x}\pm s$.

小鼠脑组织Nrf2、NQO1与HO-1蛋白表达水平相比模型组升高($P<0.05$), Keap1蛋白表达水平相比模型组降低($P<0.05$); Bru组小鼠脑组织Nrf2、NQO1与HO-1蛋白表达水平相比模型组降低($P<0.05$), Keap1蛋白表达水平相比模型组升高($P<0.05$)。Dex+Bru组小鼠脑组织Nrf2、NQO1与HO-1蛋白表达水平相比Dex组降低($P<0.05$), Keap1蛋白表达水平相比Dex组升高($P<0.05$)。见图4和表5。

3 讨论

随着社会老龄化的发展,我国股骨骨折的老年患者逐年增加,手术治疗能有效促使患者骨折早

日愈合并降低其病死率,但POCD并发症的出现常常导致患者预后变差,并因记忆力的下降而对患者生活质量造成极大损害,截至目前可用的治疗方法有限,因此探寻有效的防治措施有利于患者术后康复,且具有重大临床价值^[12-13]。Dex作为一种新型的 α_2 肾上腺素能受体强效激动剂,因其镇痛、抗焦虑、镇静等药理功效而广泛应用于临床,可有效减轻接受髋关节置换手术的老年患者机体炎症反应和肾功能损害,促进其术后恢复^[14]; Dex还可显著缓解股骨颈骨折患者POCD^[15],提升胫骨骨折手术所致的POCD大鼠术后认知功能^[16]。本文进一步探究了Dex对POCD的影响,结果显示,股骨骨折手术可导

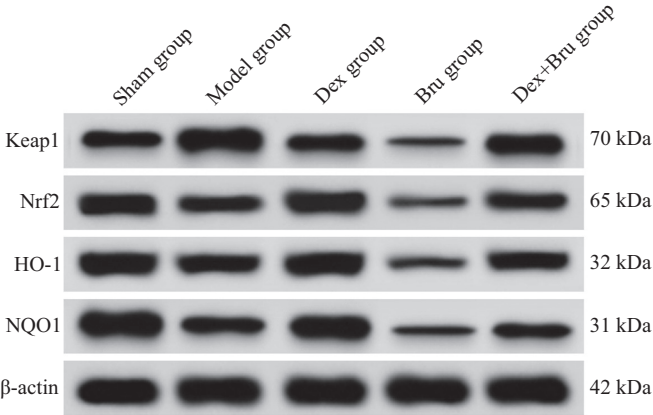


图4 Western blot检测各组小鼠脑组织Nrf2/ARE通路相关蛋白表达情况

Fig.4 Western blot detection of Nrf2/ARE pathway related protein expression in brain tissues of mice in each group

表5 各组小鼠脑组织Nrf2/ARE通路相关蛋白相对表达水平

Table 5 Relative expression of Nrf2/ARE pathway related proteins in brain tissues of mice in each group

组别 Group	Keap1	Nrf2	HO-1	NQO1
Sham group	0.47±0.04	0.78±0.06	0.85±0.08	0.94±0.09
Model group	0.89±0.06*	0.41±0.03*	0.45±0.06*	0.51±0.07*
Dex group	0.49±0.05 [#]	0.76±0.07 [#]	0.83±0.09 [#]	0.92±0.08 [#]
Bru group	1.29±0.08* ^{#&}	0.08±0.02* ^{#&}	0.10±0.03* ^{#&}	0.11±0.03* ^{#&}
Dex+Bru group	0.87±0.07* ^{&}	0.42±0.05* ^{&}	0.46±0.07* ^{&}	0.53±0.06* ^{&}

**P*<0.05, 与假手术组比较; [#]*P*<0.05, 与模型组比较; [&]*P*<0.05, 与Dex组比较。 *n*=10, $\bar{x}\pm s$ 。
**P*<0.05 compared with the sham group; [#]*P*<0.05 compared with the model group; [&]*P*<0.05 compared with the Dex group. *n*=10, $\bar{x}\pm s$.

致小鼠血清ROS、IL-1β、IL-8与IL-6水平明显升高, 引发神经炎症, 并造成海马神经元超微结构损伤, 小鼠跳台犯错次数、海马神经元凋亡率明显升高, 其新异臂探索次数、探索路程与探索时间比、脑组织GSH-Px、SOD与CAT活性明显降低, 探索时间与跳台潜伏期缩短, 提示股骨骨折手术可致使小鼠发生POCD; 以Dex干预股骨骨折模型小鼠, 可明显改善股骨骨折术后小鼠上述病理变化, 表明Dex可减少炎症因子分泌、清除ROS、增强抗氧化酶活性, 进而有效阻止神经炎症与中枢氧化应激发生发展, 抑制海马神经元损伤凋亡, 最终改善股骨骨折手术小鼠POCD, 进一步证实Dex对POCD的防治作用。

POCD病理过程复杂, 涉及致病蛋白沉积、中枢炎症、氧化还原失衡和应激反应等多种病理机制, 特别是术后炎症相关因子进入中枢, 所导致的神经炎症、海马神经元凋亡和氧化应激, 是POCD发生的主要原因, 进行抗炎与抗氧化治疗是改善POCD的有效方式^[17-18]。Nrf2作为调控机体氧化还原平衡的重要信号因子, 在POCD发生发展中发挥着关键作用, 上调

Nrf2可促进小胶质细胞从M1型向M2型转变、抑制神经炎症、促使神经发生, 进而减轻POCD老年小鼠认知功能损伤^[19-20], 激活Nrf2/ARE信号通路可显著提升胫骨骨折POCD老年小鼠模型认知能力^[11], 但激活Nrf2/ARE信号通路是否是Dex改善POCD的药理机制, 目前还不清楚。本文对此进行了探究, 结果显示股骨骨折小鼠Nrf2、NQO1与HO-1蛋白表达水平相比假手术组明显降低, Keap1蛋白表达水平相比假手术组明显升高, 以Dex干预可有效逆转以上病理变化趋势, 表明Nrf2/ARE信号通路参与介导Dex对股骨骨折手术小鼠POCD的改善作用; 以Dex和Nrf2抑制剂Bru联合干预股骨骨折模型小鼠, 可减弱Dex单独干预对小鼠的抗炎与抗氧化应激作用, 拮抗其对小鼠海马神经元损伤凋亡的抑制作用, 最终逆转其对股骨骨折手术小鼠POCD的改善作用, 揭示Dex是通过激活Nrf2来保护股骨骨折术后小鼠认知能力的。

综上所述, Dex可降低Keap1蛋白表达水平, 上调Nrf2、NQO1、HO-1蛋白表达水平, 减少ROS与炎症因子释放, 增强抗氧化酶活性, 进而减轻股骨骨

折小鼠神经炎症与中枢氧化应激,减轻其海马神经元损伤以及凋亡,保护其认知功能,避免股骨骨折手术小鼠POCD发生,促使Nrf2/ARE信号通路活化传导可能是Dex起到上述神经认知功能保护作用的药理机制,本文为Dex在POCD的临床防治中的合理应用与推广提供了新的理论依据,有益于手术后患者生命体征的积极恢复。

作者贡献

贾宁、李正阳负责研究实施、数据收集与统计学分析、论文撰写;肖秀英、刘鹏宇负责实验操作、统计学分析指导、论文修改;詹玮玮负责研究与论文指导、论文修改。

参考文献 (References)

- [1] SALTANOVA V A, KICHEROVA O A, REIKHERT L I, et al. Genetic basis of postoperative cognitive dysfunction [J]. Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova, 2024, 124(4): 43-7.
- [2] ZHENG H, CHEN Q, ZHANG J, et al. Postoperative serum CHI3L1 level is associated with postoperative cognitive dysfunction in elderly patients after hip fracture surgery: a prospective observational study [J]. Heliyon, 2023, 9(8): e18796.
- [3] ZHONG Y, ZHANG Y, ZHU Z. Research progress on the association between microRNA and postoperative cognitive dysfunction [J]. Minerva Anesthesiol, 2024, 90(3): 191-9.
- [4] WANG W, CHEN C, WANG Q, et al. Electroacupuncture pretreatment preserves telomerase reverse transcriptase function and alleviates postoperative cognitive dysfunction by suppressing oxidative stress and neuroinflammation in aged mice [J]. CNS Neurosci Ther, 2024, 30(2): e14373.
- [5] GUREEV A P, KHOROLSKAYA V G, SADOVNIKOVA I S, et al. Age-related decline in Nrf2/ARE signaling is associated with the mitochondrial dna damage and cognitive impairments [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(23): 15197.
- [6] MA Z, MA Y, CAO X, et al. Avenanthramide-C activates Nrf2/ARE pathway and inhibiting ferroptosis pathway to improve cognitive dysfunction in aging rats [J]. Neurochem Res, 2023, 48(2): 393-403.
- [7] CHEN L, YUE Z, LIU Z, et al. The impact of Nrf2 knockout on the neuroprotective effects of dexmedetomidine in a mice model of cognitive impairment [J]. Behav Brain Res, 2024, 469: 115006.
- [8] HUO Q F, ZHU L J, GUO J W, et al. Effects of ulinastatin combined with dexmedetomidine on cognitive dysfunction and emergence agitation in elderly patients who underwent total hip arthroplasty [J]. World J Psychiatry, 2024, 14(1): 26-35.
- [9] 钟彦亨, 姚景春, 孙成宏, 等. 人参固本口服液对小鼠股骨骨折术后认知功能的影响及机制探讨[J]. 中草药 (ZHONG Y H, YAO J C, SUN C H, et al. Effect and mechanism of Ginseng Guben Oral Liquid on cognitive function of mice after femoral fracture operation [J]. Chin Tradit Herb Drugs), 2022, 53(10): 3078-83.
- [10] HE G, NI H, WANG K, et al. Dexmedetomidine attenuates the neuroinflammation and cognitive dysfunction in aged mice by targeting the SNHG14/miR-340/NF- κ B axis [J]. Biomed Rep, 2023, 19(6): 100.
- [11] HE J, GAO J, ZHU H, et al. Effects of NBP on postoperative cognitive dysfunction in rats via Nrf 2/ARE pathway [J]. Aging, 2023, 15(1): 276-86.
- [12] ZHONG Y, ZHANG Y, ZHU Z. Research progress on the association between microRNA and postoperative cognitive dysfunction [J]. Minerva Anesthesiol, 2024, 90(3): 191-9.
- [13] ZHANG L, LIU Y, LUO G, et al. Upconversion-mediated optogenetics for the treatment of surgery-induced postoperative neurocognitive dysfunction [J]. ACS Nano, 2024, 18(17): 11058-69.
- [14] LI J Q, YUAN H, WANG X Q, et al. Dexmedetomidine-induced anesthesia in elderly patients undergoing hip replacement surgery [J]. World J Clin Cases, 2023, 11(16): 3756-64.
- [15] SU C, REN X, WANG H, et al. Changing pain management strategy from opioid-centric towards improve postoperative cognitive dysfunction with dexmedetomidine [J]. Curr Drug Metab, 2022, 23(1): 57-65.
- [16] 张津玮, 张小宝, 钱海涛, 等. 右美托咪定可减轻大鼠胫骨骨折手术所致的术后认知功能障碍[J]. 南方医科大学学报 (ZHANG J W, ZHANG X B, QIAN H T, et al. Dexmedetomidine alleviates cognitive dysfunction induced by tibial fracture in rats [J]. J South Med Univ), 2019, 39(3): 292-7.
- [17] LIU Y, YANG W, XUE J, et al. Neuroinflammation: the central enabler of postoperative cognitive dysfunction [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 167: 115582.
- [18] YAO Y, LIN D, CHEN Y, et al. Fluoxetine alleviates postoperative cognitive dysfunction by attenuating TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway activation in aged mice [J]. Inflamm Res, 2023, 72(6): 1161-73.
- [19] KONG X, LYU W, LIN X, et al. Itaconate alleviates anesthesia/surgery-induced cognitive impairment by activating a Nrf2-dependent anti-neuroinflammation and neurogenesis via gut-brain axis [J]. J Neuroinflammation, 2024, 21(1): 104.
- [20] WANG Y, CAI Z, ZHAN G, et al. Caffeic acid phenethyl ester suppresses oxidative stress and regulates M1/M2 microglia polarization via Sirt6/Nrf2 pathway to mitigate cognitive impairment in aged mice following anesthesia and surgery [J]. Antioxidants, 2023, 12(3): 714.