

瑞马唑仑通过HIF-1 α /HO-1信号通路对孕晚期七氟醚暴露诱导子代模型认知功能障碍的影响

沈濛濛 魏磊 倪亚平*

(南京医科大学附属苏州医院, 麻醉科, 苏州 215000)

摘要 该研究旨在探讨瑞马唑仑(Rem)对孕晚期七氟醚暴露诱导子代模型认知功能障碍的影响并分析其潜在的作用机制。采用随机数字表法将孕晚期大鼠分为对照(Con)组、单纯Rem组、模型(Mod)组、Rem组和Rem+铁死亡诱导剂(Erastin)组, 每组5只。分娩后, 每组选出15只子代大鼠进行水迷宫实验和新物体识别实验。采用HE和Nissl染色观察海马组织病理变化及神经元形态变化; 试剂盒检测海马组织中活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和Fe²⁺含量; 普鲁士蓝染色检测海马组织铁沉积情况; RT-qPCR检测海马组织中铁死亡相关基因谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)、铁蛋白重链1(FTH1)、长链酰基辅酶A合成酶4(ACSL4)的表达情况; Western blot分析检测海马组织中低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)/血红素加氧酶-1(HO-1)通路相关蛋白表达情况。结果显示与Con组和单纯Rem组相比, Mod组海马区神经元排列紊乱, 神经元呈现萎缩及坏死表现, 尼氏小体数量减少, 逃避潜伏期明显延长($P<0.05$), ROS、MDA、Fe²⁺含量和ACSL4 mRNA表达水平明显升高($P<0.05$), 铁沉积增加, 穿越平台次数、新物体识别指数明显减少($P<0.05$), SOD含量、GPX4和FTH1 mRNA以及HIF-1 α 、HO-1蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。与Mod组相比, Rem组和Rem+Erastin组海马神经元有不同程度的恢复, 尼氏小体数量增加, 逃避潜伏期明显缩短($P<0.05$), ROS、MDA、Fe²⁺含量和ACSL4 mRNA表达水平明显降低($P<0.05$), 铁沉积有不同程度减少, 穿越平台次数、新物体识别指数明显增加($P<0.05$), SOD含量、GPX4和FTH1 mRNA以及HIF-1 α 、HO-1蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)。与Rem组相比, Rem+Erastin组则逆转了上述结果($P<0.05$)。综上所述, Rem可能通过激活HIF-1 α /HO-1信号通路, 抑制铁死亡, 减轻炎症和氧化应激, 缓解孕晚期七氟醚暴露引起的子代大鼠认知功能障碍。

关键词 瑞马唑仑; HIF-1 α /HO-1信号通路; 七氟醚; 子代; 铁死亡; 认知功能障碍

Effect of Remimazolam on Cognitive Impairment in Offspring Models Resulting from Late Gestational Sevoflurane Exposure: Involvement of the HIF-1 α /HO-1 Signaling Pathway

SHEN Mengwei, WEI Lei, NI Yaping*

(Department of Anesthesiology, Suzhou Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Suzhou 215000, China)

Abstract This study aims to investigate the effects of Rem (remazolam) on cognitive dysfunction in offspring models exposed to sevoflurane during late pregnancy, and to analyse its potential mechanisms of action.

收稿日期: 2025-09-17 接受日期: 2025-12-08

江苏省卫健委卫生财务研究项目(批准号: CW2020118)资助的课题

*通信作者: Tel: 18662282791, E-mail: nyp890228@163.com

Received: September 17, 2025

Accepted: December 8, 2025

This work was supported by the Health Finance Research Project of Jiangsu Provincial Health Commission (Grant No.CW2020118)

*Corresponding author. Tel: +86-18662282791, E-mail: nyp890228@163.com

Using a random number table, late-pregnancy rats were divided into the following groups: Con (control), simple Rem, Mod (model), Rem, and Rem+Erastin (ferroptosis inducer), with five rats per group. Following delivery, 15 offspring rats per group underwent water maze and novel object recognition tests; observation of hippocampal histopathological alterations and neuronal morphological changes via HE and Nissl staining; the kit detects ROS (reactive oxygen species), MDA (malondialdehyde), SOD (superoxide dismutase), and Fe²⁺ levels in hippocampal tissue; Prussian blue staining for iron deposition in hippocampal tissue; RT-qPCR for expression of ferroptosis-related genes *GPX4* (glutathione peroxidase 4), *FTH1* (ferritin heavy chain 1), and *ACSL4* (long-chain acyl-CoA synthase 4) in hippocampal tissue; Western blot analysis was employed to detect expression of proteins associated with the HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α)/HO-1 (heme oxygenase-1) pathway in hippocampal tissue. The results showed that compared with the Con group and simple Rem group, the Mod group exhibited disorganised neuronal arrangement in the hippocampal region, with neurons showing signs of atrophy and necrosis, a reduction in Nissl bodies, and a significantly prolonged escape latency ($P<0.05$). ROS, MDA, Fe²⁺ levels, and *ACSL4* mRNA expression were markedly elevated ($P<0.05$), with increased iron deposition. Platform crossing frequency and novel object recognition index were significantly reduced ($P<0.05$), while SOD content, *GPX4* and *FTH1* mRNA expression, and HIF-1 α and HO-1 protein levels were markedly decreased ($P<0.05$). Compared with the Mod group, the Rem and Rem+Erastin groups exhibited varying degrees of recovery in hippocampal neurons, with increased Nissl body counts and significantly shortened escape latency ($P<0.05$). ROS, MDA, Fe²⁺ levels, and *ACSL4* mRNA expression were markedly reduced ($P<0.05$). Iron deposition decreased to varying degrees, while platform crossing frequency and novel object recognition index significantly increased ($P<0.05$). SOD content, *GPX4* and *FTH1* mRNA expression, along with HIF-1 α and HO-1 protein levels, were markedly elevated ($P<0.05$). Compared with Rem group, Rem+Erastin group reversed the above results ($P<0.05$). In summary, Rem may inhibit iron death by activating HIF-1 α /HO-1 signaling pathway, alleviate inflammation and oxidative stress, and alleviate cognitive dysfunction of offspring rats caused by sevoflurane exposure in the third trimester.

Keywords remimazolam; HIF-1 α /HO-1 signal pathway; sevoflurane; offspring; ferroptosis; cognitive impairment

产科麻醉中, 吸入性麻醉药七氟醚因其起效快、循环抑制程度轻等优点被广泛应用^[1]。然而, 其对子代神经发育的潜在影响日益引发关注。研究表明, 不同孕期七氟醚暴露对子代脑发育的影响存在差异: 孕早期主要干扰神经元增殖与迁移^[2], 而孕晚期作为子代脑发育关键阶段, 中枢神经系统对药物高度敏感, 更易导致远期认知功能缺陷^[3], 这赋予了孕晚期特殊且重要的研究意义, 但其背后机制复杂。铁死亡是一种铁依赖性的新型程序性细胞死亡方式, 细胞内铁离子过量蓄积会触发活性氧过度生成, 进而诱导神经元损伤或死亡, 最终导致认知功能障碍^[4]。低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)/血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)信号通路作为调控细胞应对缺氧、氧化应激的关键通路, 其下游分子HO-1可通过抑制铁死亡和氧化应

激, 改善慢性脑灌注不足小鼠认知功能障碍^[5]。然而既往关于七氟醚神经毒性与铁死亡的研究多聚焦于妊娠中期或老年模型^[6-7], 在孕晚期暴露致子代认知障碍中的作用尚不明确。

瑞马唑仑(remimazolam, Rem)作为一种新型超短效苯二氮草类镇静药, 因其起效迅速、代谢快、安全性高等优势, 在围术期应用, 尤其是在产科麻醉中展现出替代传统苯二氮草类药物的潜力^[8]。临床研究表明, Rem可通过抑制中枢神经系统炎症反应及氧化应激改善患者术后认知功能障碍^[9]。但其能否通过调控HIF-1 α /HO-1通路介导的铁死亡改善七氟醚所致子代认知障碍尚未明确。因此, 本研究通过建立孕晚期大鼠七氟醚暴露模型, 探讨Rem对其子代认知功能的影响及与HIF-1 α /HO-1通路调控铁死亡的关联, 这不仅为理解七氟醚发育神经毒性提

供了全新视角,也为临床优化产科麻醉的干预方案提供了一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

60只3~4月龄SD大鼠,雌雄各半,购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司,生产许可编号SYXK(苏)2022-0004。实验前将动物饲养于温度(22±3)℃、湿度54%~63%的环境中,明暗光照各12 h循环。雌雄大鼠分笼饲养,实验期间大鼠可自由采食和饮水。适应性饲养5天后进行实验。本研究所有动物实验经南京医科大学附属苏州医院伦理委员会审核并批准(批准号为:伦审(2023)第075号)。

1.2 主要试剂和仪器

七氟醚(批准文号:国药准字H20173156)购自河北一品制药股份有限公司;铁死亡诱导剂Erastin(批号:S7242)购自美国Selleck公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(批号:C0105S)购自上海碧云天生物科技有限公司;Nissl染色试剂盒(批号:G1434)购自北京索莱宝科技有限公司;大鼠丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD) ELISA试剂盒(批号:GOY-2492E、GOY-2493E)购自上海谷研实业有限公司;大鼠谷胱甘肽(GSH) ELISA试剂盒(批号:D751008)购自上海生工生物工程股份有限公司;Rem(批号:WKQ-0016903)购自四川维克奇生物科技有限公司;大鼠活性氧(ROS) ELISA试剂盒(批号:ZK-6636)购自上海臻科生物科技有限公司;亚铁离子比色法测试盒(批号:E-BC-K773-M)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;普鲁士蓝染液(批号:G1029)购自武汉塞维尔生物科技有限公司;HO-1、GAPDH抗体(批号:#70081、#5174)购自美国CST公司;HIF-1 α 抗体(批号:HY-P80704)购自美国MCE公司;Morris水迷宫视频分析系统V2.0和新物体识别实验系统(型号:ZH-XT)购自淮北正华生物仪器设备有限公司;光学显微镜(型号:BX53)购自日本Olympus公司;酶标仪(型号:Multiskan FC型)购自美国ThermoFisher Scientific公司;迷你垂直电泳仪(型号:BG-verMINI)购自北京百晶生物技术有限公司。

1.3 模型建立及干预

适应性喂养结束后,将所有雌雄大鼠按1:1随机配对,合笼过夜。第2天早上若雌鼠出现阴栓则表示交配成功,此时为妊娠第0天。选取25只孕晚期

(19~21天)的大鼠,采用随机数字表法将其分为Con组、单纯Rem组、Mod组、Rem组和Rem+Erastin组,每组5只。在孕鼠暴露七氟醚前3天,Rem+Erastin组连续3天腹腔注射10 mg/kg的Erastin^[10],然后在七氟醚暴露前30 min,单纯Rem组、Rem组和Rem+Erastin组腹腔注射20 mg/kg的Rem^[11]。随后Mod组、Rem组和Rem+Erastin组孕鼠以2.3%七氟醚麻醉6 h^[12],Con组和单纯Rem组吸入等体积压缩空气,腹腔注射等量生理盐水。然后将各组大鼠单独饲养,等待分娩,分娩后第28天,采用随机数字表法从每组中取15只子代大鼠(15只子代大鼠均由各组5只孕晚期大鼠提供)进行后续实验,第33天进行行为学测试。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 行为学测试 水迷宫与新物体识别实验均由经过标准化操作培训的且不知分组处理类型的同一实验者完成。实验步骤如下。

水迷宫实验,包含定位航行与空间探索两个阶段。(1)定位航行训练。将水迷宫均分为四个象限,平台随机置于某一象限中心区域,保持低于液面2 cm。子代大鼠依次从四个不同象限面朝池壁被放入水中,系统记录从入水至找到平台的耗时(即逃避潜伏期)。若子代大鼠在120 s内未成功定位平台,则引导其至平台并停留30 s,该次测试时间记为120 s。连续训练5天,每日进行2轮测试,取四个象限测试结果的平均值作为当日逃避潜伏期。(2)空间探索检测。第6天移除平台后,将子代大鼠随机放入某一象限,记录其在120 s内穿越原平台区域的次数,以此评估其空间记忆能力。

新物体识别实验:将子代大鼠置于黑色实验箱(50 cm×50 cm×40 cm)中自由活动10 min以适应环境。在实验箱对称位置放置两个相同立方体(A和B),将子代大鼠置于箱体中央,采用视频追踪系统记录5 min内子代大鼠对两物体的探索时间。24 h后移除物体B,替换为新物体C,再次记录子代大鼠5 min内对旧物体A和新物体C的探索时长。计算新物体识别指数=[(t_{新物体探索})/(t_{新物体探索}+t_{旧物体探索})]×100%。

1.4.2 样本收集 行为学测试结束后,使用戊巴比妥钠麻醉所有子代大鼠并处死,收集子代大鼠海马组织,采用随机数字表法从每组中挑选5只大鼠的海马组织,于4%多聚甲醛中常温固定24 h,用于HE染色、Nissl染色和普鲁士蓝染色;剩余10只大鼠的海

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>GPX4</i>	CTC TGG CTG TGC CTG GC	ACA CGC AAC CCC TGT ACT
<i>FTH1</i>	CGC AAG TGC GCC AGA ACT A	AGG GCC ACA TCA TCC CGG
<i>ACSL4</i>	GCT CTG TCA CGC ACT TCG AC	TCA GGA TCT CCC GGG TCC C
<i>GAPDH</i>	ACG GAT TTG GCC GTA TCG GA	TTC TCA GCC TTG ACT GTG CC

马组织置于-80℃冰箱,用于ELISA实验、RT-qPCR和Western blot分析。

1.4.3 HE染色 将子代大鼠海马组织常温固定在4%多聚甲醛24 h,经梯度乙醇脱水后进行石蜡包埋,然后将其切成厚度为5 μm的切片,脱蜡至水后,每组随机选取部分切片进行HE染色,中性树胶封片,显微镜观察子代大鼠海马组织病理变化。

1.4.4 尼氏染色 取1.6中脱蜡至水后的部分切片,甲苯胺蓝室温染色5~10 min,蒸馏水分化至尼氏体清晰。梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,于显微镜下观察尼氏小体数量变化。

1.4.5 铁死亡和氧化应激指标检测 采用随机数字表法选取各组部分海马组织加入液氮充分研磨后匀浆,于4℃、8 000 r/min条件下离心15 min,取上清。按照ELISA试剂盒厂家说明书操作,绘制标准曲线,根据标准曲线计算海马组织中ROS、MDA、SOD含量。Fe²⁺含量采用菲啰啉显色,于562 nm处测其吸光度值。根据标准曲线检测组织中Fe²⁺含量。

1.4.6 普鲁士蓝染色 取脱蜡至水的剩余切片,浸入新鲜配制的普鲁士蓝染色液(等体积的2%亚铁氰化钾溶液与2%盐酸溶液混合,现用现配)中,37℃孵育30 min,使铁离子与染色液反应生成蓝色沉淀。蒸馏水充分冲洗,再经核固红染色液染色5 min,最后脱水、透明,中性树胶封片。在显微镜下观察并拍照记录,含铁元素沉积处呈棕褐色。

1.4.7 RT-qPCR检测 使用TRIzol试剂从各组海马组织中提取总RNA。以该总RNA为模版,使用逆转试剂盒将其逆转录成cDNA。以cDNA为模板,使用特异性引物进行荧光定量PCR扩增,扩增条件:95℃预变性30 s;95℃变性15 s,60℃退火20 s,72℃延伸5 min,35个循环。以*GAPDH*作为内参,根据2^{-ΔΔCt}公式计算各目的基因表达量。引物序列见表1。

1.4.8 Western blot分析 各组取0.05 g海马组织置于离心管中,添加适量裂解液进行匀浆化处理,在

4℃、12 000 r/min条件下离心15 min后取上清。测定总蛋白浓度,将样品与上样缓冲液混合,经SDS-PAGE电泳分离目标蛋白,随后将蛋白转移至PVDF膜,常温下用5%脱脂奶粉封闭2 h。分别加入HIF-1α、HO-1、GPX4及*GAPDH*一抗(1:1 000),4℃缓慢振荡孵育过夜。次日用HRP标记二抗(1:3 000)常温下温育1 h,经ECL显影后通过化学发光系统成像,采用ImageJ软件测定条带灰度值,以*GAPDH*为内参进行分析。

1.5 统计学方法

利用SPSS 20.0软件进行统计学分析。所有结果以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用Shapiro-Wilk、Levene检验分别对各组数据进行正态性检验和方差齐性检验,若不符合正态分布或方差不齐,则采用非参数检验对多组间数据进行比较;若符合正态分布且方差齐性,则使用单因素方差分析对多组间数据进行比较,进一步组间两两比较采用LSD-*t*检验。所有检验后均进行Bonferroni校正。以*P*<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 瑞马唑仑对子代大鼠认知功能障碍的影响

从第3天开始,与Con组和单纯Rem组相比,Mod组逃避潜伏期明显延长(*P*<0.05);与Mod组相比,Rem组和Rem+Erastin组逃避潜伏期明显缩短(*P*<0.05);与Rem组相比,Rem+Erastin组逃避潜伏期明显延长(*P*<0.05)。与Con组和单纯Rem组相比,Mod组穿越平台次数和新物体识别指数明显降低(*P*<0.05);与Mod组相比,Rem组和Rem+Erastin组穿越平台次数和新物体识别指数明显增加(*P*<0.05);与Rem组相比,Rem+Erastin组穿越平台次数和新物体识别指数明显降低(*P*<0.05)。见图1、表2和表3。

2.2 瑞马唑仑对子代大鼠海马组织病理损伤的影响

HE染色结果如图2所示,Con组和单纯Rem组

海马组织整体结构正常,海马区神经元细胞数量丰富且排列整齐,未见明显萎缩、坏死等异常现象;与Con组和单纯Rem组相比,Mod组海马整体结构异常,神经元细胞排列紊乱,大量神经元呈现萎缩、核深染及坏死表现;与Mod组相比,Rem组和Rem+Erastin组海马神经元细胞形态及排列密度有不同程度的恢复。

2.3 瑞马唑仑对海马组织中神经元尼氏小体的影响

尼氏染色结果如图3所示,Con组和单纯Rem组海马神经元结构完整,细胞形态正常,核仁着色明显;与Con组和单纯Rem组相比,Mod组海马可见

皱缩细胞,尼氏小体浓缩呈深蓝色,且数量有所减少;与Mod组相比,Rem组和Rem+Erastin组神经元结构有所改善;Rem+Erastin组皱缩细胞较Rem组增加。

2.4 瑞马唑仑对海马组织中氧化应激的影响

与Con组和单纯Rem组相比,Mod组ROS、MDA、Fe²⁺含量显著增加($P<0.05$),SOD含量显著降低($P<0.05$);与Mod组相比,Rem组和Rem+Erastin组ROS、MDA、Fe²⁺含量显著降低($P<0.05$),SOD含量显著增加($P<0.05$);与Rem组相比,Rem+Erastin组ROS、MDA、Fe²⁺含量显著增加($P<0.05$),SOD含量

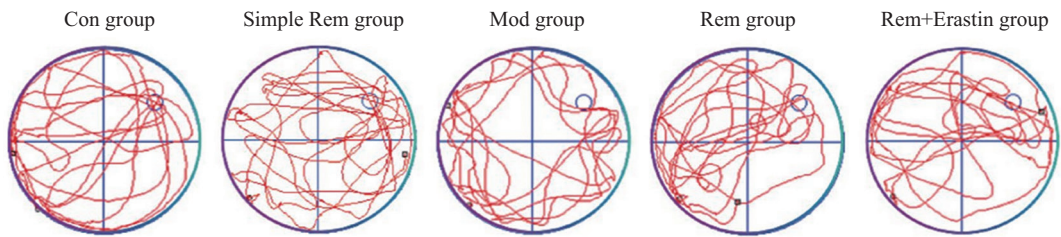


图1 各组大鼠空间探索实验代表性轨迹图

Fig.1 Representative trajectory diagrams from spatial exploration experiments for each group of rats

表2 各组大鼠水迷宫结果

Table 2 Water maze results for each group of rats

组别 Group	逃避潜伏期/s Escape incubation period /s					穿越平台次数 Number of platform crossings
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	
Con group	78.54±5.53	70.25±3.97	45.24±3.13	32.61±3.14	21.66±3.06	7.95±1.23
Simple Rem group	79.90±6.13	71.45±5.13	46.53±4.37	34.32±3.98	22.24±3.94	7.84±0.64
Mod group	79.84±5.83	73.82±5.74	64.54±4.55 [#]	53.12±4.46 [#]	39.36±4.26 [#]	3.59±0.90 [#]
Rem group	78.64±5.37	70.08±4.53	49.64±3.96 ^{&}	40.34±3.25 ^{&}	26.46±3.69 ^{&}	6.03±1.16 ^{&}
Rem+Erastin group	76.56±5.73	71.52±5.12	56.63±4.26 ^{&@}	48.35±4.63 ^{&@}	33.75±3.70 ^{&@}	5.88±1.28 ^{&@}

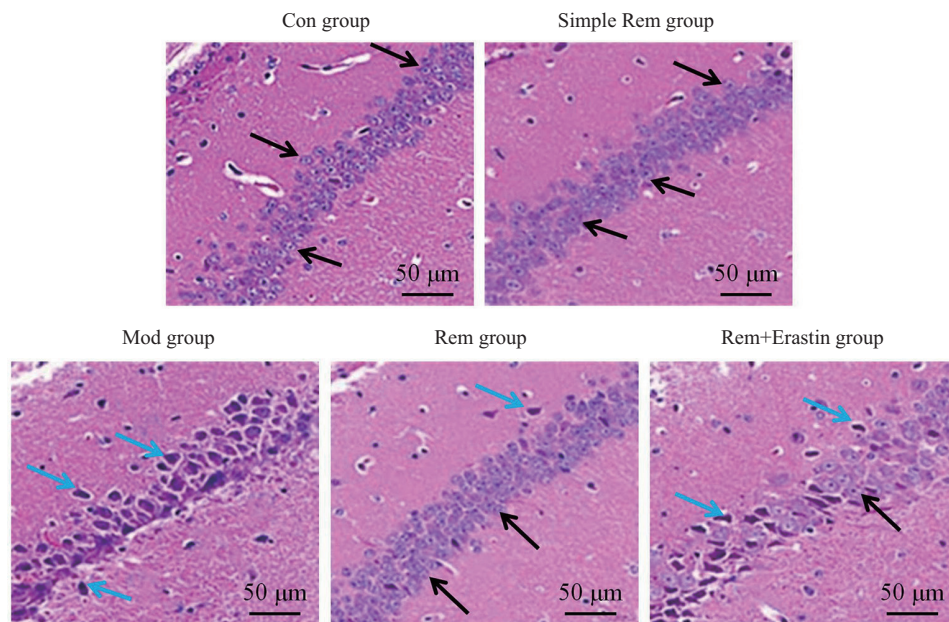
* $P<0.05$, 与Con组相比; [#] $P<0.05$, 与单纯Rem组相比; [&] $P<0.05$, 与Mod组相比; [@] $P<0.05$, 与Rem组相比。 $n=15$ 。
* $P<0.05$ compared with Con group; [#] $P<0.05$ compared with simple Rem group; [&] $P<0.05$ compared with Mod group; [@] $P<0.05$ compared with Rem group. $n=15$.

表3 各组新物体识别指数

Table 3 Object recognition index for each group

组别 Group	新物体识别指数/% New object recognition index /%
Con group	76.45±6.26
Simple Rem group	73.25±5.15
Mod group	42.36±5.63 [#]
Rem group	69.46±5.59 ^{&}
Rem+Erastin group	61.27±6.04 ^{&@}

* $P<0.05$, 与Con组相比; [#] $P<0.05$, 与单纯Rem组相比; [&] $P<0.05$, 与Mod组相比; [@] $P<0.05$, 与Rem组相比。 $n=15$ 。
* $P<0.05$ compared with Con group; [#] $P<0.05$ compared with simple Rem group; [&] $P<0.05$ compared with Mod group; [@] $P<0.05$ compared with Rem group. $n=15$.

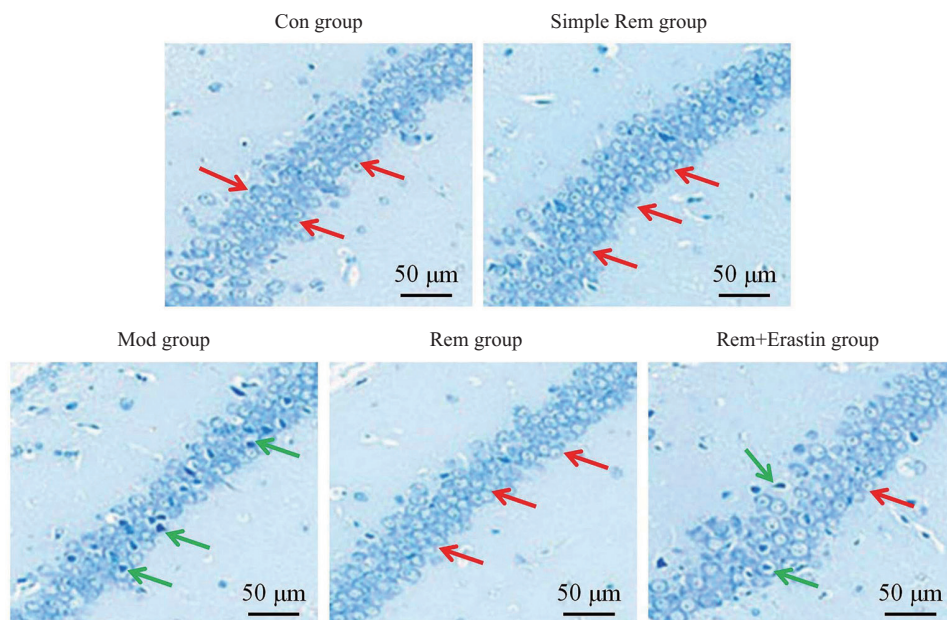


黑色箭头指向完整细胞, 蓝色箭头指向萎缩、坏死细胞。n=5。

The black arrows point to intact cells, while the blue arrows point to atrophied and necrotic cells. n=5.

图2 海马组织HE染色结果

Fig.2 HE staining results of hippocampal tissue



红色箭头指向完整神经元细胞, 绿色箭头指向皱缩神经元细胞(也为尼氏小体浓缩区域)。n=5。

The red arrow points to an intact neuron, and the green arrow points to a shrunken neuron (also the area of Nissl body condensation). n=5.

图3 海马组织尼氏染色结果

Fig.3 Nissl staining results of the hippocampal tissue

显著降低($P<0.05$)。见表4。

2.5 瑞马唑仑对海马组织中铁死亡的影响

普鲁士蓝染色结果显示, Con组和单纯Rem组海马组织细胞间未见棕褐色沉淀; 与Con组和单纯

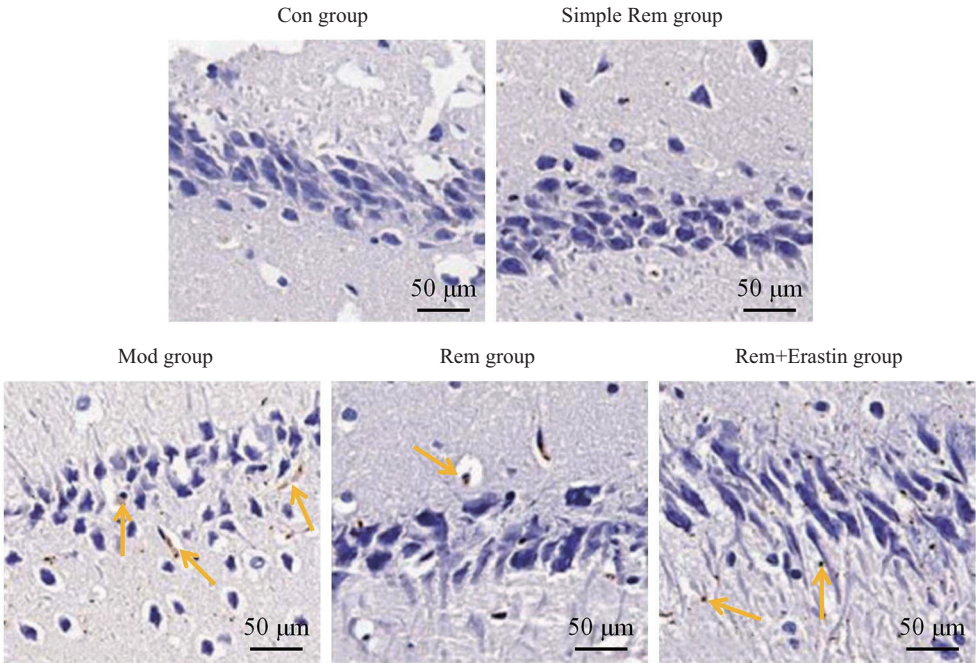
Rem组相比, Mod组细胞间棕褐色沉淀增加; 与Mod组相比, Rem组细胞间棕褐色沉淀减少; Rem+Erastin组细胞间棕褐色沉淀多于Rem组。这说明Rem可减少模型大鼠海马组织中的铁沉积。见图4。

表4 各组大鼠氧化应激指标表达结果

Table 4 Expression results of oxidative stress indicators in each group of rats

组别 Group	ROS /ng·mL ⁻¹	SOD /μg·mL ⁻¹	MDA /μg·mL ⁻¹
Con group	13.67±1.23	10.32±1.53	3.13±0.72
Simple Rem group	15.84±1.60	10.98±1.56	3.24±0.86
Mod group	42.64±2.08 ^{*#}	2.67±0.38 ^{*#}	7.53±1.82 ^{*#}
Rem group	20.38±1.79 ^{&}	8.86±0.84 ^{&}	4.38±1.45 ^{&}
Rem+Erastin group	33.26±1.46 ^{&@}	5.78±1.05 ^{&@}	6.06±1.12 ^{&@}

* $P<0.05$, 与Con组相比; # $P<0.05$, 与单纯Rem组相比; & $P<0.05$, 与Mod组相比; @ $P<0.05$, 与Rem组相比。 $n=10$ 。
* $P<0.05$ compared with Con group; # $P<0.05$ compared with simple Rem group; & $P<0.05$ compared with Mod group; @ $P<0.05$ compared with Rem group. $n=10$.



黄色箭头指向铁沉积。 $n=5$ 。
The yellow arrow points to the iron deposit. $n=5$.

图4 海马组织普鲁士蓝染色结果
Fig.4 Prussian blue staining results of hippocampal tissue

与Con组和单纯Rem组相比, Mod组Fe²⁺含量及 *ACSL4* mRNA表达水平显著升高 ($P<0.05$), *GPX4*、*FTH1* mRNA表达水平显著降低 ($P<0.05$); 与Mod组相比, Rem组和Rem+Erastin组Fe²⁺含量及 *ACSL4* mRNA表达水平显著降低 ($P<0.05$), *GPX4*、*FTH1* mRNA表达水平显著升高 ($P<0.05$); 与Rem组相比, Rem+Erastin组Fe²⁺含量及 *ACSL4* mRNA表达水平显著升高 ($P<0.05$), *GPX4*、*FTH1* mRNA表达水平显著降低 ($P<0.05$)。见表5。

2.6 瑞马唑仑对HIF-1α/HO-1通路相关蛋白表达的影响

与Con组和和单纯Rem组比较, Mod组大鼠

HIF-1α、HO-1蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$); 与Mod组相比, Rem组和Rem+Erastin组大鼠HIF-1α、HO-1蛋白水平明显升高 ($P<0.05$); 与Rem组相比, Rem+Erastin组大鼠HIF-1α、HO-1蛋白水平明显降低 ($P<0.05$)。见图5和表6。

3 讨论

孕晚期七氟醚暴露可通过干扰神经发育关键期的突触可塑性及神经元存活, 诱导子代认知功能障碍, 此类认知缺陷不仅影响学习记忆能力, 还可能增加成年后精神疾病及神经退行性疾病的易感性。研究表明, 怀孕期间暴露于七氟醚会对后代的大脑

表5 各组大鼠铁死亡指标表达结果

Table 5 Expression results of ferroptosis indicators in rats of each group

组别 Group	Fe ²⁺ /μmol·g ⁻¹	GPX4 mRNA	FTH1 mRNA	ACSL4 mRNA
Con group	0.54±0.06	1.00±0.03	1.00±0.01	1.00±0.02
Simple Rem group	0.52±0.08	0.98±0.04	1.01±0.05	1.03±0.06
Mod group	1.21±0.12 ^{*#}	0.33±0.04 ^{*#}	0.26±0.02 ^{*#}	2.34±0.26 ^{*#}
Rem group	0.65±0.07 ^{&}	0.79±0.08 ^{&}	0.85±0.10 ^{&}	1.35±0.14 ^{&}
Rem+Erastin group	0.91±0.09 ^{&@}	0.51±0.07 ^{&@}	0.56±0.07 ^{&@}	1.88±0.20 ^{&@}

**P*<0.05, 与Con组相比; #*P*<0.05, 与单纯Rem组相比; &*P*<0.05, 与Mod组相比; @*P*<0.05, 与Rem组相比。 *n*=10。
**P*<0.05 compared with Con group; #*P*<0.05 compared with simple Rem group; &*P*<0.05 compared with Mod group; @*P*<0.05 compared with Rem group. *n*=10.

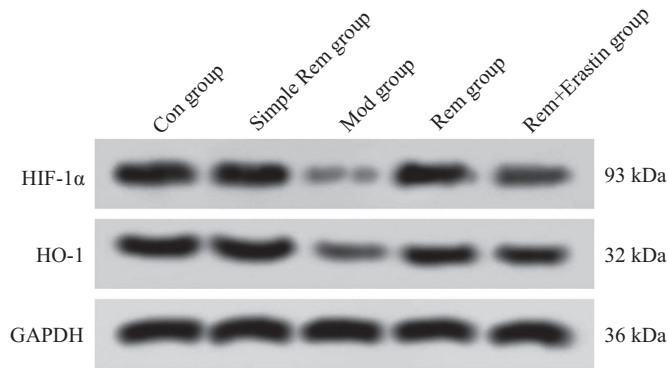


图5 HIF-1α/HO-1信号通路相关蛋白表达条带

Fig.5 Protein expression bands related to the HIF-1α/HO-1 signaling pathway

表6 HIF-1α/HO-1信号通路相关蛋白表达的比较

Table 6 Comparison of HIF-1α/HO-1 signaling pathway-related protein expression

组别 Group	HIF-1α	HO-1
Con group	0.95±0.08	0.91±0.07
Simple Rem group	0.96±0.07	0.92±0.08
Mod group	0.29±0.03 ^{*#}	0.35±0.04 ^{*#}
Rem group	0.80±0.05 ^{&}	0.81±0.06 ^{&}
Rem+Erastin group	0.59±0.06 ^{&@}	0.63±0.05 ^{&@}

**P*<0.05, 与Con组相比; #*P*<0.05, 与单纯Rem组相比; &*P*<0.05, 与Mod组相比; @*P*<0.05, 与Rem组相比。 *n*=10。
**P*<0.05 compared with Con group; #*P*<0.05 compared with simple Rem group; &*P*<0.05 compared with Mod group; @*P*<0.05 compared with Rem group. *n*=10.

发育和认知功能有显著影响^[13]。动物研究发现,大鼠在怀孕期间接触七氟醚会导致其后代的学习和记忆功能受损^[14],且以2.3%的七氟醚暴露6 h,能够明显引起大鼠认知功能障碍^[12]。因此,本研究选择该浓度进行实验,结果发现子代大鼠逃避潜伏期明显延长,穿越平台次数、新物体识别指数明显降低,且脑组织神经元萎缩、坏死,尼氏小体数目减少,提示该浓度确实能引起大鼠脑发育及认知能力受损,与

上述研究结果一致。Rem因其快速起效和代谢不依赖肝肾的特点,在围术期被广泛使用。研究证实,Rem能够通过抑制神经系统炎症减轻脂多糖诱导的大鼠脑损伤来防止认知能力下降^[15],还可补充全身麻醉减轻老年患者骨科手术后的压力和改善认知障碍^[16]。本研究结果发现,经Rem干预后子代大鼠逃避潜伏期缩短,穿越平台次数和新物体识别指数增加,海马病理损伤减轻,同时尼氏小体数量增加,提

示Rem可能通过减轻神经元损伤,改善子代大鼠认知功能障碍。

氧化应激与铁死亡是认知功能障碍的关键病理环节。七氟醚暴露可直接诱导子代大鼠海马神经元产生大量ROS,其超过SOD等抗氧化酶的清除能力,就会引发MDA等脂质过氧化产物蓄积,造成氧化损伤^[17]。这一过程不仅能诱导神经元凋亡,还可加快铁死亡进程,而Fe²⁺过量蓄积又能催化更多ROS生成,进一步导致认知功能衰退^[18]。过量的铁储存在铁蛋白中,其中FTH1作为铁蛋白重链,通过储存细胞内游离铁,抑制芬顿反应的发生,从而阻断脂质过氧化和铁死亡^[19]。GPX4是铁死亡的核心抑制因子,通过还原脂质过氧化物来维持细胞膜稳定性。当GPX4失活时,脂质过氧化物累积直接引发铁死亡。ACSL4则通过催化多不饱和脂肪酸酯化,为脂质过氧化提供特异性底物,加剧铁死亡^[20]。在阿尔茨海默病模型中,抑制氧化应激和铁死亡途径可有效缓解认知缺陷^[21]。ZHANG等^[22]研究表明,七氟醚给药后,新生小鼠海马组织中铁积累,ROS水平及ACSL4蛋白表达水平升高,GPX4、FTH1蛋白表达水平降低,从而导致认知缺陷。同样,本研究结果也显示,Mod组海马组织中ROS、MDA、Fe²⁺水平和ACSL4表达水平明显升高,SOD水平和GPX4、FTH1表达水平降低,且普鲁士蓝染色发现其铁沉积增加,经Rem干预后这些指标均得到明显逆转,提示Rem可能通过抑制氧化应激和铁死亡,改善孕晚期七氟醚暴露所致的子代大鼠认知功能障碍。

HIF-1 α /HO-1通路是细胞应对缺氧与氧化应激的重要防御机制。七氟醚暴露诱导的神经元缺氧状态可稳定HIF-1 α ,促进其入核启动HO-1转录。HO-1可通过催化血红素生成具有抗氧化活性的胆红素,增强关键铁死亡抑制蛋白GPX4的活性^[23],从而协同抑制氧化应激和铁死亡。若HIF-1 α /HO-1通路功能失调,GPX4活性下降将导致脂质过氧化物积累,引发铁死亡,加剧神经元损伤与认知功能障碍^[24]。研究发现,激活HO-1可减轻脑缺血模型中的脑损伤和认知障碍^[25]。HAN等^[26]研究表明,激活HIF-1 α /HO-1通路可减轻氧化应激,并通过上调GPX4/FTH1和下调ACSL4来抑制铁死亡,从而减轻大鼠肾损伤。而Rem能够通过上调HO-1表达,逆转脓毒症引起的脑功能障碍大鼠认知功能障碍^[27]。本研究结果发现,Rem干预后,子代大鼠海马组织中HIF-1 α 、HO-1蛋

白水平明显升高,提示Rem可激活HIF-1 α /HO-1通路。进一步使用铁死亡诱导剂Erastin,发现其可部分逆转Rem对七氟醚暴露引起认知功能障碍子代大鼠的神经保护作用,提示Rem可能通过激活HIF-1 α /HO-1通路,进而抑制氧化应激与铁死亡,改善孕晚期七氟醚暴露诱导的子代大鼠认知功能障碍。

综上所述,Rem可能通过激活HIF-1 α /HO-1信号通路,抑制铁死亡,减轻氧化应激,缓解孕晚期七氟醚暴露引起的子代大鼠认知功能障碍。

参考文献 (References)

- [1] 陈岱莉,蔡宇晶. 孕期吸入麻醉暴露对子代神经发育与认知影响的研究进展[J]. 岭南急诊医学杂志(CHEN D L, CAI Y J. Research progress on the effects of prenatal exposure to inhalation anesthetics on offspring neurodevelopment and cognition [J]. Lingnan Journal of Emergency Medicine), 2024, 29(1): 77-9.
- [2] ZHU Y, LÜ C, LIU J, et al. Effects of sevoflurane general anesthesia during early pregnancy on AIM2 expression in the hippocampus and parietal cortex of sprague-dawley offspring rats [J]. Exp Ther Med, 2021, 21(5): 469.
- [3] YU Z, WANG J, WANG H, et al. Effects of sevoflurane exposure during late pregnancy on brain development and beneficial effects of enriched environment on offspring cognition [J]. Cell Mol Neurobiol, 2020, 40(8): 1339-52.
- [4] GAO W, LI Z, YANG C, et al. Silencing of activating transcription factor 3 alleviates oxidative stress and inflammation and improves cognitive dysfunction in vascular dementia rats by repressing ferroptosis [J]. Int Immunopharmacol, 2025, 158: 114730.
- [5] WANG J, SHI J, XIAO Y, et al. Fo-Shou-San ameliorates chronic cerebral hypoperfusion-induced cognitive impairment in mice by regulating NRF2/HO-1 pathway against ferroptosis [J]. J Integr Neurosci, 2023, 22(2): 41.
- [6] JIANG Q, WANG C, GAO Q, et al. Multiple sevoflurane exposures during mid-trimester induce neurotoxicity in the developing brain initiated by 15LO2-mediated ferroptosis [J]. CNS Neurosci Ther, 2023, 29(10): 2972-85.
- [7] ZHAO L, GONG H, HUANG H, et al. Participation of mind Bomb-2 in sevoflurane anesthesia induces cognitive impairment in aged mice via modulating ferroptosis [J]. ACS Chem Neurosci, 2021, 12(13): 2399-408.
- [8] KO E, CHOI SU, LEE J, et al. Exploring the Utility of remimazolam in cesarean sections under general anesthesia: A preliminary retrospective analysis and implications for future study [J]. Heliyon, 2024, 10(7): e28485.
- [9] 蓝金辛, 李森, 杨铎, 等. 瑞马唑仑在围术期改善认知功能作用的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志(LAN J X, LI S, YANG D, et al. Research status of the role of remimazolam in improving cognitive function during the perioperative period [J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology), 2024, 40(5): 773-7.
- [10] HUO H Z, ZHOU Z Y, QIN J, et al. Erastin disrupts mitochondrial permeability transition pore (mPTP) and induces apoptotic death of colorectal cancer cells [J]. PLoS One, 2016, 11(5):

- e0154605.
- [11] 田秀文, 梁启恒. 瑞马唑仑通过调控miR-155/JAK2/STAT3信号通路对缺氧缺血性脑损伤大鼠神经功能的保护作用[J]. 中国老年学杂志(TIAN X W, LIANG Q H. Remimazolam protects neurological function in rats with hypoxic-ischemic brain injury by regulating the miR-155/JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2025, 45(5): 1209-13.
- [12] 苏娟, 张振忠, 张友佳. 七氟醚基于BDNF/TrkB信号通路对孕晚期大鼠子代树突棘发育的影响[J]. 河北医学(SU J, ZHANG Z Z, ZHANG Y J. Effect of sevoflurane based on BDNF/TrkB signaling pathway on dendritic spine development in rat offspring during late pregnancy [J]. Hebei Medicine, 2022, 28(4): 567-71.
- [13] YU Z, WANG J, ZHANG P, et al. Enriched environment improves sevoflurane-induced cognitive impairment during late-pregnancy via hippocampal histone acetylation [J]. Braz J Med Biol Res, 2020, 53(10): e9861.
- [14] FENG Y, QIN J, LU Y, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid attenuates cognitive impairment in offspring caused by maternal surgery during mid-pregnancy [J]. PLoS One, 2024, 19(3): e0295096.
- [15] WANG W, UCHIDA Y, MORIMOTO Y. Remimazolam and dexmedetomidine prevent cognitive decline by affecting lipopolysaccharide-induced brain injury in mice: possible involvement of the vagus nerve pathway [J]. Biomed Res, 2025, 46(4): 177-87.
- [16] SUN Y, ZHANG J, FENG S. Remimazolam supplemented to general anesthesia alleviates stress and cognitive impairment in elder patients after hip surgery [J]. Psychiatry Investig, 2023, 20(5): 481.
- [17] HUANG Y, XIE H, LIU L, et al. Bioactive ROS-responsive nanotherapeutics attenuate intermittent hypoxia-induced cognitive impairment via NRF2/KEAP1/HO-1 signaling [J]. Neurochem Int, 2025, 188: 105997.
- [18] ZENG L, HU P, WANG X, et al. Sirtuin-3 activation by honokiol attenuated anesthesia/surgery-induced cognitive impairment and neuronal ferroptosis via inhibiting mitochondrial GPX4 acetylation [J]. J Nanobiotechnology, 2025, 23(1): 414.
- [19] CHEN Y, ZHANG P, CHEN W, et al. Ferroptosis mediated DSS-induced ulcerative colitis associated with Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. Immunol Lett, 2020, 225: 9-15.
- [20] ZENG X, JIANG W, WU T, et al. Neonatal liver-derived FTH1-enriched extracellular vesicles attenuate ferroptosis and ameliorate MASLD pathogenesis [J]. Free Radic Biol Med, 2025, 240: 693-703.
- [21] SHAO L, DONG C, GENG D, et al. Ginkgolide B protects against cognitive impairment in senescence-accelerated P8 mice by mitigating oxidative stress, inflammation and ferroptosis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 572: 7-14.
- [22] ZHANG P, CHEN Y, ZHANG S, et al. Mitochondria-related ferroptosis drives cognitive deficits in neonatal mice following sevoflurane administration [J]. Front Med (Lausanne), 2022, 9: 887062.
- [23] JIA S, ZHANG H, LI L, et al. Shogaol potentiates sevoflurane mediated neuroprotection against ischemia/reperfusion-induced brain injury via regulating apoptotic proteins and PI3K/Akt/mTOR/s6K signalling and HIF-1 α /HO-1 expression [J]. Saudi J Biol Sci, 2021, 28(9): 5002-10.
- [24] XIANG M, LIN X, CHEN H. Luteolin inhibits ferroptosis of HUVEC by regulating the Sirt1/Nrf2 pathway [J]. Cell Biochem Biophys, 2025, 83(4): 5127-40.
- [25] QIAN H, ZHOU S, QIAN R, et al. KLF6 silencing attenuates MCAO-induced brain injury and cognitive dysfunction via targeting ferroptosis and activating the Nrf2/HO-1 pathway [J]. Hum Exp Toxicol, 2024, doi: 10.1177/09603271241304372.
- [26] HAN F, SHOU J, WANG Y, et al. Exploring the mechanism of Qingre Yishen Xiaozheng formula in treating diabetic kidney disease via the HIF-1 α /HO-1 signaling pathway: an integrated network pharmacology and experimental study [J]. Front Pharmacol, 2025, doi: 10.3389/fphar.2025.1661050.
- [27] ZHOU Z, YANG Y, WEI Y, et al. Remimazolam attenuates LPS-derived cognitive dysfunction via subdiaphragmatic vagus nerve target α 7nAChR-Mediated Nrf2/HO-1 signal pathway [J]. Neurochem Res, 2024, 49(5): 1306-21.