论著·神经科学

麝香酮通过调节PPARγ抑制TLR4/NF-κB/NLRP3通路介导的神经炎症改善老年小鼠术后认知功能障碍

杨治华[1],郭 璐[1],赵 翼[1],刘亚娟[1],梁瑗辰[1],马 艳[1],王 浩[2],吕兴华[1,2] [1]兰州大学第一临床医学院,甘肃兰州;[2]兰州大学第一医院日间手术中心,甘肃兰州

[摘要] **目的** 术后认知功能障碍(postoperative cognitive dysfunction,POCD)与围术期神经炎症、小胶质细胞促炎活化及海马神经元损伤密切相关。麝香酮(muscone,Mus)虽具有抗炎和神经保护作用,但其能否改善麻醉手术诱导的POCD及相关机制尚未明确。本研究旨在探讨Mus是否通过调节PPARγ相关信号,抑制TLR4/NF-κB/NLRP3通路介导的炎症反应,从而改善POCD。**方法** ①通过SwissTargetPrediction、PharmMapper、SuperPred和TargetNet数据库预测Mus作用靶点,通过GeneCards、DisGeNET和OMIM数据库收集POCD相关靶点,筛选Mus干预POCD的潜在作用靶点,构建蛋白质-蛋白质相互作用网络并筛选核心靶点,进行GO功能注释和KEGG通路富集分析;采用分子对接评价Mus与核心靶点蛋白的潜在结合能力。②将32只12月龄老年雄性C57BL/6小鼠按随机数字表法分为(n=8):NC组、POCD组、Mus组和Mus+GW9662组,其中6只纳入行为学分析。除NC组外,其余各组采用异氟烷麻醉联合胫骨骨折内固定术建立POCD模型。Mus组给予Mus 10 mg/kg腹腔注射,Mus+GW9662组在Mus给药前给予PPARγ抑制剂GW9662 1 mg/kg。术后第3天进行新物体识别实验,术后第3~8天进行Morris水迷宫实验,评价小鼠识别记忆及空间学习记忆功能。行为学实验结束后,HE和NS染色观察海马CA1区神经元损伤;采用RT-qPCR和Western blot检测小鼠的海马组织炎症因子、炎症表型相关分子及PPARγ/TLR4/NF-κB/NLRP3相关分子的表达。③采用脂多糖诱导BV2小胶质细胞建立炎症模型,分为NC组、LPS组、LPS+Mus组和LPS+Mus+GW9662组。CCK-8法评价Mus对细胞活力的影响并确定体外干预浓度,通过Griess法、流式细胞术、RT-qPCR和Western blot检测NO释放、CD86/CD206表型、炎症因子及PPARγ/TLR4/NF-κB/NLRP3相关分子的表达。进一步收集各组BV2细胞条件培养基处理HT22细胞,采用CCK-8法和流式细胞术检测HT22细胞活力及凋亡。**结果** ①Mus干预POCD的潜在靶点主要富集于炎症反应、免疫调节及神经损伤相关过程,PPARG是其潜在作用靶点之一;分子对接结果提示Mus与PPARγ具有潜在结合趋势。②行为学结果显示,与NC组相比,POCD组小鼠Morris水迷宫穿越原平台次数减少[(1.33±1.03) *vs* (5.83±1.72),P=0.000 3],目标象限停留时间缩短[(22.11±2.94) *vs* (44.13±6.95) s,P<0.000 1],新奇偏爱指数降低[(0.37±0.11) *vs* (0.72±0.05),P<0.000 1],认知指数下降[(−0.26±0.23) *vs* (0.43±0.11),P<0.000 1]。与POCD组相比,Mus干预后小鼠穿越原平台次数增加[(5.83±0.75) *vs* (1.33±1.03),P<0.000 1],目标象限停留时间延长[(42.98±7.06) *vs* (22.11±2.94) s,P<0.000 1],新奇偏爱指数和认知指数升高(均P<0.01);GW9662可部分削弱Mus的上述改善作用。组织学结果显示,POCD组小鼠海马CA1区神经元排列紊乱、NS减弱,Mus干预后神经元损伤减轻,而GW9662处理后其保护作用减弱。分子检测结果显示,Mus可降低POCD小鼠海马组织促炎因子及iNOS表达,上调IL-10、Arg1和PPARγ表达,并下调TLR4、NF-κB p65和NLRP3表

[基金项目] 甘肃省重点研发计划——社会发展领域项目(26YFFA006);甘肃省卫生健康重点人才项目(2026SWJWRC003);甘肃省联合科研基金一般项目(24JRRA914)

[通信作者] 吕兴华,E-mail:ldyylxh18@163.com

2097-0927/Copyright © 2026,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:杨治华,郭璐,赵翼,等. 麝香酮通过调节PPARγ抑制TLR4/NF-κB/NLRP3通路介导的神经炎症改善老年小鼠术后认知功能障碍[J]. 陆军军医大学学报,2026,48(18):2604-2621. DOI:10.16016/j.2097-0927.202605079.

Citation:Yang Z H,Guo L,Zhao Y,*et al*. Muscone ameliorates postoperative cognitive dysfunction in aged mice by modulating PPARγ to suppress TLR4/NF-κB/NLRP3 pathway-mediated neuroinflammation[J]. J Army Med Univ,2026,48(18):2604-2621. DOI:10.16016/j.2097-0927.202605079.

达;GW9662可部分逆转上述效应。③CCK-8结果显示,10 μmol/L Mus处理24 h对BV2和HT22细胞活力无明显抑制作用。分子检测结果显示,Mus可降低LPS诱导的BV2细胞NO释放和促炎因子表达,减轻CD86阳性促炎表型偏移,并下调TLR4、NF-κB p65和NLRP3相关分子表达。BV2细胞条件培养基共培养实验显示,LPS诱导的炎症性条件培养基可降低HT22细胞活力并增加细胞凋亡,Mus干预后的条件培养基可减轻HT22细胞损伤,GW9662可部分削弱该作用。**结论** Mus可改善异氟烷麻醉联合手术诱导的老年小鼠POCD,其作用可能与调节PPARγ相关信号、减轻TLR4/NF-κB/NLRP3通路介导的神经炎症,以及改善小胶质细胞炎症状态并减轻炎症微环境介导的神经元继发性损伤有关。

[**关键词**] 麝香酮;术后认知并发症;神经炎症;小胶质细胞;过氧化物酶体增殖物激活受体γ
[**中图法分类号**] R285.5;R741.05;R745.44 [**文献标志码**] A

Muscone ameliorates postoperative cognitive dysfunction in aged mice by modulating PPARγ to suppress TLR4/NF-κB/NLRP3 pathway-mediated neuroinflammation

Yang Zhihua[1], Guo Lu[1], Zhao Yi[1], Liu Yajuan[1], Liang Aichen[1], Ma Yan[1], Wang Hao[2], Lü Xinghua[1,2] [1]First Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu; [2]Day Surgery Center, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu, China

[**Abstract**] **Objective** Postoperative cognitive dysfunction (POCD) is closely associated with perioperative neuroinflammation, proinflammatory activation of microglia, and hippocampal neuronal injury. Muscone (Mus) exerts anti-inflammatory and neuroprotective effects, yet whether it can ameliorate anesthesia- and surgery-induced POCD and the underlying mechanisms remain unclear. This study aims to investigate whether Mus ameliorates POCD by modulating PPARγ-related signaling and suppressing inflammatory responses mediated by the TLR4/NF-κB/NLRP3 pathway. **Methods** ① Network pharmacology: Mus target prediction was performed using SwissTargetPrediction, PharmMapper, SuperPred, and TargetNet databases. POCD-related targets were collected from GeneCards, DisGeNET, and OMIM databases. Potential targets through which Mus may act against POCD were screened, a protein-protein interaction (PPI) network was constructed, and core targets were selected. GO functional annotation and KEGG pathway enrichment analyses were subsequently performed. Molecular docking was used to evaluate the potential binding affinity of Mus with the core target proteins. ② Animal experiments: 32 aged male C57BL/6 mice (12 months old) were randomly divided into an NC group, a POCD group, a Mus group, and a Mus+GW9662 group, with 8 mice in each group initially and 6 mice per group finally included in behavioral analysis. Except for the NC group, all other groups underwent isoflurane anesthesia combined with tibial fracture internal fixation to establish a POCD model. The Mus group received an intraperitoneal injection of 10 mg/kg Mus, whereas the Mus+GW9662 group received PPARγ inhibitor, GW9662 at 1 mg/kg before Mus administration. Novel object recognition test was carried out on postoperative day 3, and Morris water maze test was conducted from postoperative days 3 to 8 to assess recognition memory and spatial learning and memory. After behavioral tests, 3 mice from each group were subjected to HE and Nissl staining to evaluate neuronal injury in the hippocampal CA1 region. RT-qPCR and Western blot were used to detect the expression of inflammatory factors, inflammation phenotype-related molecules, and PPARγ/TLR4/NF-κB/NLRP3-related molecules in hippocampal tissues. ③ Cell experiments: An inflammatory model was established in BV2 microglial cells induced by lipopolysaccharide (LPS), and then the cells were divided into NC, LPS, LPS+Mus, and LPS+Mus+GW9662 groups. CCK-8 assay was used to evaluate the effect of Mus on cell viability and determine the *in vitro* intervention concentration. Griess assay, flow cytometry, RT-qPCR, and Western blot were used to detect NO release, CD86/CD206 phenotypes, inflammatory factors, and expression of PPARγ/TLR4/NF-κB/NLRP3-

related molecules. Conditioned media from the 4 groups of BV2 cells were subsequently collected to treat HT22 cells, and CCK-8 assay and flow cytometry were carried out to detect cell viability and apoptosis of HT22 cells, respectively. **Results** ① Potential targets of Mus intervention in POCD were mainly enriched in biological processes related to inflammatory responses, immune regulation and neural injury, and PPARG was identified as a potential target. Molecular docking suggested a potential binding interaction between Mus and PPARγ. ② The results of behavioral tests showed that, compared with the NC group, the POCD group exhibited fewer crossing number in Morris water maze test (1.33±1.03 *vs* 5.83±1.72, *P*=0.000 3), a shorter duration in the target quadrant (22.11±2.94 s *vs* 44.13±6.95 s, *P*<0.000 1), a lower novelty preference index (0.37±0.11 *vs* 0.72±0.05, *P*<0.000 1), and a decreased cognitive index (−0.26±0.23 *vs* 0.43±0.11, *P*<0.000 1). Compared with the POCD group, Mus treatment increased crossing number (5.83±0.75 *vs* 1.33±1.03, *P*<0.000 1), prolonged time spent in the target quadrant (42.98±7.06 s *vs* 22.11±2.94 s, *P*<0.000 1), and increased both the novelty preference index and cognitive index (both *P*<0.01). GW9662 partially attenuated the above improvements induced by Mus. Histological examination showed disorganized neuronal arrangement and reduced Nissl staining in the hippocampal CA1 region of the POCD mice. Mus treatment alleviated neuronal injury, whereas GW9662 weakened this protective effect. Molecular analysis showed that Mus reduced the expression of proinflammatory cytokines and iNOS, increased the expression of IL-10, Arg1, and PPARγ, and decreased the expression of TLR4, NF-κB p65, and NLRP3 in the hippocampus of POCD mice. GW9662 partially reversed the above effects. ③ CCK-8 assay showed that treatment of 10 μmol/L Mus for 24 h had no significant inhibitory effect on viability of BV2 or HT22 cells. Molecular analysis demonstrated that Mus reduced LPS-induced NO release and proinflammatory cytokine expression in BV2 cells, attenuated the shift toward a CD86-positive proinflammatory phenotype, and downregulated the TLR4/NF-κB/NLRP3 pathway-related molecules. The BV2 cell-conditioned medium co-culture experiment showed that LPS-induced inflammatory conditioned medium reduced the viability and increased the apoptosis of HT22 cells, whereas the conditioned medium from Mus-treated BV2 cells attenuated HT22 cell injury, and GW9662 partially attenuated this effect. **Conclusion** Mus ameliorates POCD induced by isoflurane anesthesia combined with surgery in aged mice. Its effects may be associated with regulation of PPARγ-related signaling, alleviating TLR4/NF-κB/NLRP3 pathway-mediated neuroinflammation, improving inflammatory status of microglial cells, and alleviating inflammatory microenvironment-mediated secondary neuronal injury.

[**Key words**] muscone; postoperative cognitive complications; neuroinflammation; microglia; peroxisome proliferator-activated receptor gamma

Supported by the Social Development Project of Key Research and Development Program of Gansu Province (26YFFA006), the Key Health Talent Program of Gansu Province (2026SWJWRC003), and the General Project of Joint Research Fund of Gansu Province (24JRRA914). Corresponding author: Lü Xinghua, E-mail: ldyylxh18@163.com

术后认知功能障碍(postoperative cognitive dysfunction,POCD)是麻醉和手术后常见的中枢神经系统并发症之一,主要表现为学习与记忆能力减弱、注意力和执行功能出现不同程度下降[1]。老年患者是POCD的高危人群,既往前瞻性研究显示,老年患者在非心脏大手术后出院时及术后3个月仍可出现认知功能下降,提示POCD的防治具有重要临床意义[2]。POCD的发生并非由单一因素介导,而是与手术创伤、麻醉暴露、围术期应激、炎症反应及神经免疫失衡等多种因素密切相关[3-5]。小胶质细胞是中枢神经系统固有免疫细胞,围术期炎症刺激可诱导小胶质细胞由稳态向促炎活化状态转变,促进IL-1β、IL-6、TNF-α、NO、iNOS等炎症介质释放,并激活TLR4/NF-κB、NLRP3/Caspase-1等炎症信号通路[3-6]。持续的炎症刺激可破坏血脑屏障完整性,促进外周炎症信号向中枢传递,进一步诱导小胶质细胞和星形胶质细胞活化,加重海马等认知相关脑区神经炎症、突触功能异常及神经元损伤[3-6]。因此,抑制围术期炎症反应、调节小胶质细胞炎症状态、维持血脑屏障完整性、减轻中枢神经炎症损伤,是防治POCD的重要干预策略[5-6]。

麝香酮(muscone,Mus)是天然麝香中的主要活性成分之一,属于脂溶性大环酮类化合物,具有潜在的中枢递送优势[7-8]。既往研究表明,Mus具有抗炎、抗氧化、抗凋亡及神经保护等多种药理作用[7]。Mus已在阿尔茨海默病、抑郁样行为和脑缺血再灌注损伤等中枢神经系统疾病模型中显示出一定的神经保护效应[9-12]。鉴于神经炎症和氧化应激在POCD发生发展中发挥重要作用,Mus的药理作用提示其可能具有防治POCD的潜在价值,但具体分子机制尚未明确。网络药理学能够从多靶点、多通路和整体调控层面预测天然产物的潜在作用机制,为后续机制研究提供方向[13-14]。基于此,本研究采用网络药理学和分子对接技术筛选Mus干预POCD的潜在作用靶点及相关通路,并结合体内外实验对其作用及可能机制进行验证,旨在为Mus防治POCD的机制研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 网络药理学分析与分子对接

1.1.1 Mus作用靶点及POCD相关靶点收集 从PubChem数据库(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)获取Mus(CAS:10403-00-6)的标准化结构信息,包括SMILES号及三维结构文件。将其分别导入SwissTargetPrediction(http://www.swisstargetprediction.ch)、PharmMapper(http://lilab-ecust.cn/pharmmapper/)、SuperPred(https://prediction.charite.de/subpages/target_prediction.php)以及TargetNet(http://targetnet.scbdd.com)数据库进行潜在作用靶点预测。以“postoperative cognitive dysfunction”为关键词,在GeneCards(https://www.genecards.org)、DisGeNET(https://www.disgenet.org)以及OMIM(https://www.omim.org/)数据库中检索POCD相关疾病靶点。

1.1.2 交集靶点筛选、PPI网络构建及核心靶点分析 利用R语言对Mus候选靶点与POCD疾病靶点进行交集分析,获得Mus干预POCD的潜在作用靶点,并绘制Venn图。将交集靶点导入STRING12.0数据库(https://cn.string-db.org),物种限定为“Homo sapiens”,最低互作置信度设置为high confidence(0.700),并去除孤立节点后获得蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction,PPI)网络。将STRING数据导入Cytoscape 3.7.1软件进行网络可视化,并采用CytoNCA插件进行分析。根据度值(degree centrality,DC)、介数中心性(betweenness centrality,BC)、接近中心性(closeness centrality,CC)、特征向量中心性(eigenvector centrality,EC)及局部平均连接度(local average connectivity,LAC)等参数筛选核心靶点。

1.1.3 GO功能注释与KEGG通路富集分析 将筛选获得的潜在作用靶点导入DAVID数据库(https://david.ncifcrf.gov/)进行GO功能注释和KEGG通路富集分析。以$P<0.05$为筛选标准,根据富集显著性对结果进行排序。分别选取生物过程(biological process,BP)、细胞组成(cellular component,CC)和分子功能(molecular function,MF)富集结果前10项绘制GO柱状图,选取KEGG富集结果前35条通路绘制气泡图。

1.1.4 分子对接 从RCSB PDB数据库(https://www.rcsb.org/)下载核心靶点蛋白过氧化物酶体增殖激活受体γ(peroxisome prolifer ator-activated receptor gamma,PPARG,PDB ID:2Q59)、STAT3(PDB ID:6TLC)、AR(PDB ID:1XOW)和TLR4(PDB ID:2Z62)的晶体结构。采用PyMOL软件去除蛋白结构中的水分子及原配体,并对受体蛋白进行预处理。Mus三维结构经Chem3D软件进行构象优化。随后,使用AutoDock Tools将受体蛋白和配体分别转换为pdbqt格式,并设置对接口袋及网格参数。最后,采用AutoDock Vina计算Mus与核心靶点蛋白的结合能,并利用PyMOL软件对分子对接结果进行可视化分析。

1.2 材料

1.2.1 实验动物与细胞 选取中国农业科学院兰州兽医研究所提供的SPF级健康12月龄老年雄性C57BL/6小鼠32只,体质量30~35 g,实验动物生产许可证号为SCXK(甘)2020-0002。小鼠饲养于兰州大学动物实验中心SPF级动物房,饲养环境维持12 h光/暗循环,温度为(22±2)℃,相对湿度为(55±10)%,自由摄食饮水,并于实验前适应性饲养7 d。本研究动物实验方案经兰州大学第一医院伦理委员会审核批准(LDYYLL2026-662)。

小鼠小胶质细胞系BV2细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司,小鼠神经元细胞HT22细胞系购自上海赛百慷生物技术股份有限公司。BV2细胞和HT22细胞均在含10%胎牛血清和1%青-链霉素的DMEM培养基中培养,使用0.25%胰蛋白酶消化。细胞融合度达到80%~90%时,采用0.25%胰蛋白酶消化,待细胞脱落后加入完全培养基终止消化并重悬,按照1∶3的传代比例将细胞悬液等量接种于3个新的培养容器中。细胞置于37 ℃、5% CO_2及饱和湿度条件下培养。

1.2.2 主要实验药物及试剂 Mus购自美国Selleck公司;PPARG抑制剂GW9662购自美国MedChemExpress公司;高糖DMEM培养基、青-链霉素双抗及0.25%胰蛋白酶购自武汉普诺赛生命科技有

限公司;胎牛血清购自上海诺娃医药科技有限公司;LPS(L8880)和DMSO(D8371)购自北京索莱宝科技有限公司;反转录及实时荧光定量PCR相关试剂购自北京全式金生物技术有限公司;NO含量测定试剂盒购自江苏碧云天生物技术有限公司;细胞凋亡检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司;qPCR引物由擎科生物科技有限公司设计并合成;PPARγ抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司,P65、iNOS、ARG1抗体购自杭州华安生物技术有限公司,NLRP3、TLR4抗体购自英国Abcam公司;流式细胞术抗体CD86(Lot:4025390)和CD206(Lot:4220362)购自美国BD Biosciences公司;异氟烷购自深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司。

1.3 *动物实验*

1.3.1 老年小鼠POCD模型建立及Mus/GW9662干预 将32只雄性C57BL/6小鼠按随机数字表法分为(n=8):空白对照组(NC组)、POCD组、Mus组和Mus+GW9662组。Mus和GW9662均先用DMSO溶解,再以5%DMSO、40% PEG300、5%Tween-80和50%无菌水配制成工作液。Mus组小鼠腹腔注射Mus 10 mg/kg[15],1次/d,连续给药至术前1 d;Mus+GW9662组小鼠于Mus给药前30 min腹腔注射GW9662 1 mg/kg[16],随后腹腔注射Mus10 mg/kg;NC组和Model组给予等体积PBS。

除NC组外,其余各组均采用异氟烷麻醉联合胫骨骨折内固定术建立POCD模型[17],具体如下:小鼠吸入4%异氟烷混合于4 L/min空气中诱导麻醉约3 min,随后吸入1.5%~2.0%异氟烷混合于1 L/min空气中维持麻醉。待针刺反射消失后,将小鼠置于恒温手术板上,给予2%利多卡因局部浸润麻醉。常规备皮、消毒后,于左侧胫骨上端附近作约0.5 cm纵行切口,逐层分离软组织并暴露胫骨,于胫骨中下段行横行截骨,插入0.4 mm无菌钝针固定骨折端。术毕以无菌生理盐水冲洗创面,缝合切口并再次消毒,单只小鼠手术时间约30 min。术后将小鼠置于清洁、温暖垫料上观察,待其苏醒后放回原笼饲养。术后3 d内于切口处涂抹奥布卡因乳膏镇痛,2次/d。

1.3.2 新物体识别实验评价识别记忆功能 术后第3天每组初始纳入8只小鼠,造模及术后恢复过程中,个别动物因术中/术后死亡、术后恢复不良或未能完成行为学测试等原因未纳入最终行为学统计分析,最终每组完成行为学检测并纳入统计分析的小鼠数为6只。将小鼠置于行为学实验室适应环境。实验分为适应期、熟悉期和测试期。适应期将小鼠放入空箱中自由活动5 min;熟悉期在箱内放置2个相同物体,使小鼠自由探索5 min;测试期将其中一个熟悉物体替换为新物体,再次让小鼠自由探索5 min。记录小鼠探索新物体和熟悉物体的时间。探索行为定义为小鼠鼻尖靠近物体并主动嗅探或接触物体,爬上物体或从物体旁经过不计入探索时间。每只小鼠实验结束后,用75%乙醇擦拭实验箱和物体,以去除气味干扰。新奇偏爱指数、认知指数降低提示小鼠识别记忆能力下降。行为学分析由不知晓分组的实验人员完成。辨别指数计算公式为:认知指数=(新物体探索时间−熟悉物体探索时间)/(新物体探索时间+熟悉物体探索时间)×100%。新奇偏爱指数计算公式为:新奇偏爱指数=新物体探索时间/(新物体探索时间+熟悉物体探索时间)×100%。

1.3.3 Morris水迷宫实验评价空间学习记忆功能 于术后第3天开始进行隐藏平台训练,连续5 d。实验期间水温保持在(25.0±1.0)℃,水池分为4个象限,隐藏平台固定于左下象限中央,并低于水面2~3 cm。向水中加入白色无毒染色剂,使小鼠无法直接看到平台。隐藏平台训练期间,每只小鼠每日训练2次,上午和下午各1次,间隔不少于4 h。每次实验从不同象限将小鼠面向池壁放入水中,记录其找到平台所需时间,即逃避潜伏期。单次训练最长为60 s;若60 s内未找到平台,则记录为60 s,并将小鼠引导至平台停留15 s。实验过程由视频追踪系统记录并分析小鼠运动轨迹、逃避潜伏期、游泳距离和游泳速度。术后第8天进行空间探索实验。移除平台后,将小鼠从平台对侧象限放入水中,自由游泳60 s。记录小鼠在目标象限的停留时间、游泳距离及穿越原平台位置次数,用于评价其空间记忆保持能力。

1.3.4 HE和NS染色观察小鼠海马CA1区神经元损伤 小鼠处死后迅速取出全脑组织,每组随机挑选3只并置于4%多聚甲醛中固定48 h,随后进行常规石蜡包埋。取冠状位脑组织制备5 μm厚石蜡切片,按照HE染色试剂盒说明书进行染色,并在光学显微镜下观察脑组织病理形态变化。将HE制片后的其余切片脱蜡至水后,置于NS染色液中采用甲苯胺蓝法染色,50 ℃孵育30 min。随后按照染色试剂盒说明书进行操作。封片后在光学显微镜下观察海马神经元形态并采集图像。

1.3.5 RT-qPCR检测小鼠海马组织炎症因子及PPARγ/TLR4/NF-κB/NLRP3相关分子mRNA表达 各组随机取3只小鼠海马组织,加入Trizol试剂提取总RNA,并按照反转录试剂盒说明书将RNA反转录为cDNA。随后配置RT-qPCR反应体系并进行扩增检测。每个动物样本作为独立生物学重复,技术重复取平均值后进行分析。以*GAPDH*作为内参基因,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计

算目的基因的相对表达水平,引物序列见表1。

表1 RT-qPCR引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-qPCR

Gene	Sequences(5′→3′)
Gapdh	Forward:ATGACCACAGTCCATGCCATC
	Reverse:GAGCTTCCCGTTCAGCTCTG
iNOS	Forward:GGGCTGTCACGGAGATCAATG
	Reverse:GCCCGGTACTCATTCTGCATG
IL-1β	Forward:TTTGAAGTTGACGGACCCCAA
	Reverse:CACAGCTTCTCCACAGCCACA
IL-6	Forward:TTCTTGGGACTGATGCTGGTG
	Reverse:CACAACTCTTTTCTCATTTCCACGA
TNF-α	Forward:ATGTCTCAGCCTCTTCTCATTC
	Reverse:GCTTGTCACTCGAATTTTGAGA
COX-2	Forward:GCCAGCAAAGCCTAGAGCAA
	Reverse:GCCTTCTGCAGTCCAGGTTC
Arg1	Forward:GTACATTGGCTTGCGAGACG
	Reverse:ATCGGCCTTTTCTTCCTTCCC
IL-10	Forward:TTACCTGGTAGAAGTGATGCCC
	Reverse:GACACCTTGGTCTTGGAGCTTA
PPARγ	Forward:ACCTCTGCTGGAGGATCTGAA
	Reverse:GGAATGCGAGTGGTCTCCCA
TLR4	Forward:ATGGCATGGCTTACACCACC
	Reverse:GAGGCCAATTTTGTCTCCACA
p65	Forward:TGTGGAGATCATCGAACAGCCG
	Reverse:TTCCTGGTCCTGTGTAGCCATTGAT
NLRP3	Forward:TGGTCAAGGAGCATCCAAGCA
	Reverse:AAGTGTTCATCCTCAGGCTCAAA

1.3.6 Western blot检测小鼠海马组织炎症表型及PPARγ/TLR4/NF-κB/NLRP3相关蛋白表达 各组随机取3只小鼠海马组织,加入RIPA裂解液充分裂解,冰上静置后离心收集上清,采用BCA法测定蛋白浓度。取等量蛋白样品加入上样缓冲液,煮沸变性后进行SDS-PAGE电泳分离,并转移至PVDF膜。转膜结束后,采用5%脱脂奶粉室温封闭1 h,随后加入相应一抗,于4 ℃孵育过夜。次日用TBST洗膜后,加入HRP标记二抗室温孵育1 h。再次洗膜后,采用ECL化学发光法显影,并使用凝胶成像系统采集图像。以β-actin作为内参,采用ImageJ软件分析目的蛋白相对表达水平。

1.4 细胞实验

1.4.1 LPS诱导BV2小胶质细胞炎症模型建立及Mus/GW9662干预 BV2细胞实验分为4组:空白对照组(NC组)、LPS组、LPS+Mus组和LPS+Mus+GW9662组。前期采用CCK-8法检测Mus对BV2细胞活力的影响,并确定其安全作用浓度为10 μmol/L。LPS和GW9662的作用浓度参考既往文献确定,其中LPS终浓度为1 μg/mL,GW9662终浓度为10 μmol/L[18-19]。根据不同实验目的接种BV2细胞:CCK-8检测时按4×10^3个/孔接种于96孔板;NO含量测定时按10×10^3个/孔接种于96孔板;用于RT-qPCR、Western blot时,按4×10^5个/孔接种于6孔板。待细胞贴壁后(8~12 h)进行分组处理。NC组给予等体积培养基;LPS组加入LPS处理;LPS+Mus组先用Mus预处理2 h,随后加入LPS继续培养24 h;LPS+Mus+GW9662组先用GW9662预处理30 min,再加入Mus预处理2 h,随后加入LPS继续培养24 h。处理结束后收集细胞或培养上清,用于后续检测。

为观察BV2细胞炎症状态对神经元样细胞的影响,采用BV2细胞条件培养基处理HT22细胞。将HT22细胞分别接种于96孔板和6孔板,接种密度分别为5×10^3个/孔和6×10^5个/孔。待细胞完全贴壁后,弃去原培养基,用PBS冲洗后,加入上述4组BV2细胞处理后的条件培养基继续培养24 h。随后进行CCK-8细胞活力检测及细胞凋亡检测。

1.4.2 CCK-8实验检测细胞活力 将BV2细胞接种于96孔板,培养12 h贴壁后,分别加入1.0、2.5、5.0、7.5、10.0、15.0、20.0 μmol/L Mus处理24、48和72 h。HT22细胞按实际接种密度接种于96孔板,贴壁后分别加入1.0、2.5、5.0、7.5、10.0、15.0和20.0 μmol/L Mus处理24、48和72 h。另将HT22细胞接种于96孔板,贴壁后加入不同处理组BV2细胞条件培养基干预24 h。处理结束后,每孔加入含10% CCK-8试剂的新鲜培养基,避光孵育1 h,采用酶标仪检测450 nm处吸光度值。细胞存活率按以下公式计算:细胞存活率(%)=[$OD(450)_{实验孔}-OD(450)_{空白孔}$)/($OD(450)_{对照孔}-OD(450)_{空白孔}$)×100%。前期采用CCK-8法检测不同浓度Mus在24、48和72 h对BV2细胞活力的影响。综合细胞活力结果、后续LPS炎症模型处理时间及避免长时间培养带来的非特异性影响,本研究选择10 μmol/L Mus作为后续体外实验干预浓度,并以24 h作为主要观察时间点。

1.4.3 BV2细胞NO测定 各组BV2细胞处理结束后,收集细胞培养上清,采用NO检测试剂盒检测NO含量。按照试剂盒说明书,以$NaNO_2$配制不同浓度标准品,建立标准曲线。取标准品及各组培养上清加入96孔板,依次加入Griess Reagent Ⅰ和Griess Reagent Ⅱ,避光反应后于540 nm波长处检测吸光度$OD(540)$值,根据标准曲线计算各组NO含量。

1.4.4　流式细胞术检测BV2细胞CD86和CD206的表达　采用流式细胞术检测BV2细胞表面CD86和CD206的表达。各组BV2细胞处理结束后，弃去培养基，PBS清洗2次，收集细胞并制备单细胞悬液。取适量细胞悬液（1×10^6个/mL）离心后弃上清，用100 μL PBS重悬细胞，分别加入荧光标记的抗鼠CD86和CD206抗体各1 μL，4 ℃避光孵育30 min。孵育结束后，用PBS洗涤细胞，于4 ℃ 300 ×*g*离心5 min、弃上清，并重悬于300 μL PBS中。随后采用流式细胞仪检测，分析各组BV2细胞中CD86和CD206的阳性表达比例。

1.4.5　RT-qPCR和Western blot检测BV2细胞炎症因子及PPARγ/TLR4/NF-κB/NLRP3相关分子表达　各组BV2细胞处理结束后，弃去6孔板中的培养基，用PBS轻轻清洗细胞2次。用于RNA检测的细胞加入Trizol试剂充分裂解，随后进行总RNA提取、反转录及RT-qPCR检测；用于蛋白检测的细胞加入RIPA裂解液，于冰上充分裂解后收集细胞裂解液，于4 ℃、12 000 ×*g*离心15 min取上清，进行蛋白定量、SDS-PAGE电泳、转膜、抗体孵育及显影分析。相关操作步骤同海马组织样本。

1.4.6　流式细胞术检测BV2条件培养基、处理后HT22细胞凋亡　HT22细胞经各组BV2条件培养基处理24 h后，收集细胞。细胞经PBS清洗后，采用不含EDTA的胰蛋白酶消化，于4 ℃ 300 ×*g*离心5 min、弃上清，并用预冷PBS清洗2次。随后按照细胞凋亡检测试剂盒说明书操作，室温避光孵育5 min后，采用流式细胞仪检测HT22细胞凋亡情况，并分析各组细胞总凋亡率。

1.5　统计学分析

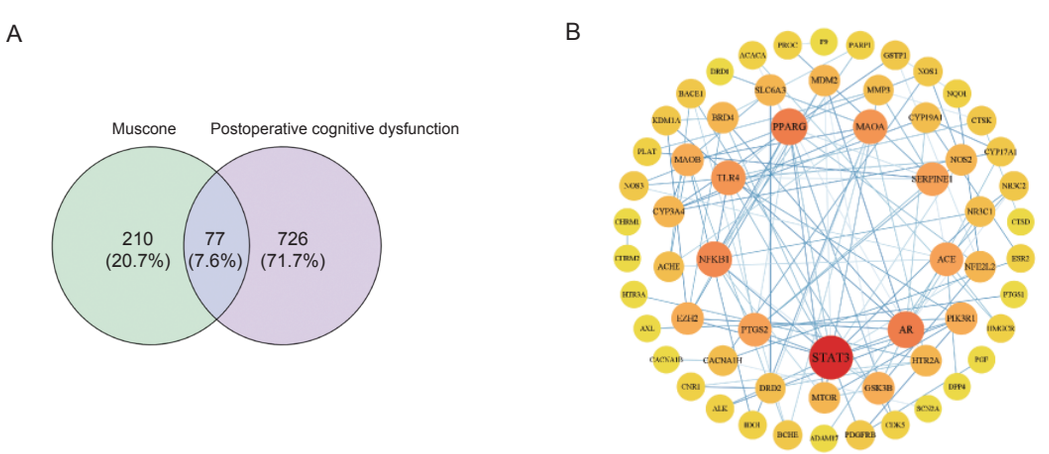
采用GraphPad Prism 10软件进行统计学分析和图表绘制。数据以$\bar{x}\pm s$表示。对数据进行正态性和方差齐性检验；符合正态分布且方差齐的多组间比较采用单因素方差分析（one-way ANOVA）；当方差不齐时，采用Brown-Forsythe和Welch ANOVA，并采用Dunnett T3法进行多重比较。$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　网络药理学分析与分子对接

2.1.1　网络药理学　将SwissTargetPrediction、PharmMapper和SuperPred数据库预测结果进行合并、去重，并统一转换为标准基因名称，共获得286个Mus潜在作用靶点；将GeneCards、DisGeNET和OMIM数据库检索获得的POCD相关靶点进行整合、去重及基因名称标准化，共获得803个POCD相关靶点。二者取交集后获得77个Mus干预POCD的潜在作用靶点（图1A）。将上述交集靶点导入STRING数据库构建PPI网络，并利用Cytoscape 3.7.1软件进行网络可视化与拓扑分析。采用CytoNCA插件计算各靶点的BC、CC、DC、EC和LAC等参数，并以相应参数中位数的2倍作为筛选标准，最终获得4个核心靶点，即PPARG（PDB：2Q59）、STAT3（PDB：6TLC）、AR（PDB：1XOW）和TLR4（PDB：2Z62）（图1B）。

2.1.2　GO富集分析及KEGG富集分析　GO富集分析显示，Mus治疗POCD的潜在靶点主要涉及BP、CC和MF三类条目。BP主要富集于缺氧反应、脂多糖反应、细菌来源分子反应、小分子代谢调控及钙离子



A：Venn diagram of common targets between Mus and postoperative cognitive dysfunction；B：Protein-protein interaction network of common targets between Mus and postoperative cognitive dysfunction

图1　Mus干预术后认知功能障碍的潜在作用靶点及蛋白质-蛋白质相互作用网络分析

Figure 1　Analysis of potential targets and protein-protein interaction network of Mus in postoperative cognitive dysfunction

转运等过程;CC主要富集于膜筏、膜微区及突触相关结构;MF主要涉及核受体活性、神经递质受体活性、血红素结合及氧化还原酶活性(图2A~C);KEGG富集分析共获得40条相关信号通路,结合核心靶点筛选结果及现有研究,PI3K-Akt、TNF、Toll样受体及NF-κB信号通路可能是Mus干预POCD的重要相关通路(图2D、E)。

2.1.3 分子对接 分子对接结果显示,Mus与筛选所得核心靶点均表现出一定的预测结合活性,其中与PPARG的结合能较低,提示PPARG可能是Mus干预POCD的潜在作用靶点之一(表2)。可视化结果显示,Mus与PPARG、AR及TLR4均可形成氢键等相互作用,支持其与靶点之间可能存在较稳定的空间结合(图3)。STAT3虽具有一定结合能力,但未观察到明显氢键连接,因此未进行氢键相互作用可视化展示。上述结果提示,PPARG可能是Mus发挥干预POCD作用的重要潜在靶点。

2.2 体内实验结果

2.2.1 Mus改善POCD小鼠识别记忆和空间学习记忆能力 Morris水迷宫空间探索实验结果显示,与NC组相比,POCD组小鼠穿越原平台次数减少,目标象限停留时间缩短,差异均有统计学意义,提示POCD模型小鼠空间学习记忆能力受损。与POCD组相比,Mus干预后小鼠穿越原平台次数增加,目标象限停留时间延长,差异均有统计学意义。加入PPARγ抑制剂GW9662后,小鼠穿越原平台次数较Mus组减少,目标象限停留时间缩短,提示GW9662可削弱Mus对POCD小鼠空间记忆损伤的改善作用(表3)。

新物体识别实验结果显示,与NC组相比,POCD组小鼠新奇偏爱指数和认知指数均降低,差异有统计学意义,提示POCD模型小鼠识别记忆能力受损。与POCD组相比,Mus干预后小鼠新奇偏爱指数和认知指数均升高,差异有统计学意义。加入GW9662后,小鼠新奇偏爱指数和认知指数较Mus组降低,提示PPARγ抑制剂可部分逆转Mus对POCD小鼠识别记忆功能的保护作用(表4)。

2.2.2 Mus减轻POCD小鼠海马CA1区神经元病理损伤 HE染色显示,NC组小鼠海马结构清晰,CA1区细胞层连续,排列较规则;POCD组海马CA1区细胞

表2 Mus与核心靶点的分子对接结果

Table 2 Molecular docking results of Mus with the core targets

Core targets	Binding energy/(kcal/mol)	Docking center(x, y, z)	Docking box size(x, y, z)	Hydrogen-bonding amino acid residues
PPARG	−8.4	−20.153, 0.953, −25.552	40, 40, 40	ARG-288;GLU-295
STAT3	−7.2	0.231, 32.470, 33.516	40, 40, 40	—
AR	−6.1	21.932, 5.344, 10.888	40, 40, 40	ASN-756;THR-755
TLR4	−5.9	13.988, 0.115, 8.276	40, 40, 40	ASN-137;ALA-139

A lower binding energy indicates a potentially stronger predicted binding affinity; "—" indicates that no definite hydrogen-bond interaction

表3 Mus对POCD小鼠Morris水迷宫实验结果的影响 (n=6, $\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effect of Mus on behavioral performance in POCD mice by Morris water maze test (n=6, $\bar{x}\pm s$)

Group	Number of platform crossings	P	Time spent in the target quadrant/s	P
NC	5.83±1.72		44.13±6.95	
POCD	1.33±1.03	0.000 3[a]	22.11±2.94	<0.000 1[a]
POCD+Mus	5.83±0.75	<0.000 1[b]	42.98±7.06	<0.000 1[b]
POCD+Mus+GW9662	2.33±1.37	0.000 3[c]	25.27±3.56	0.000 3[c]

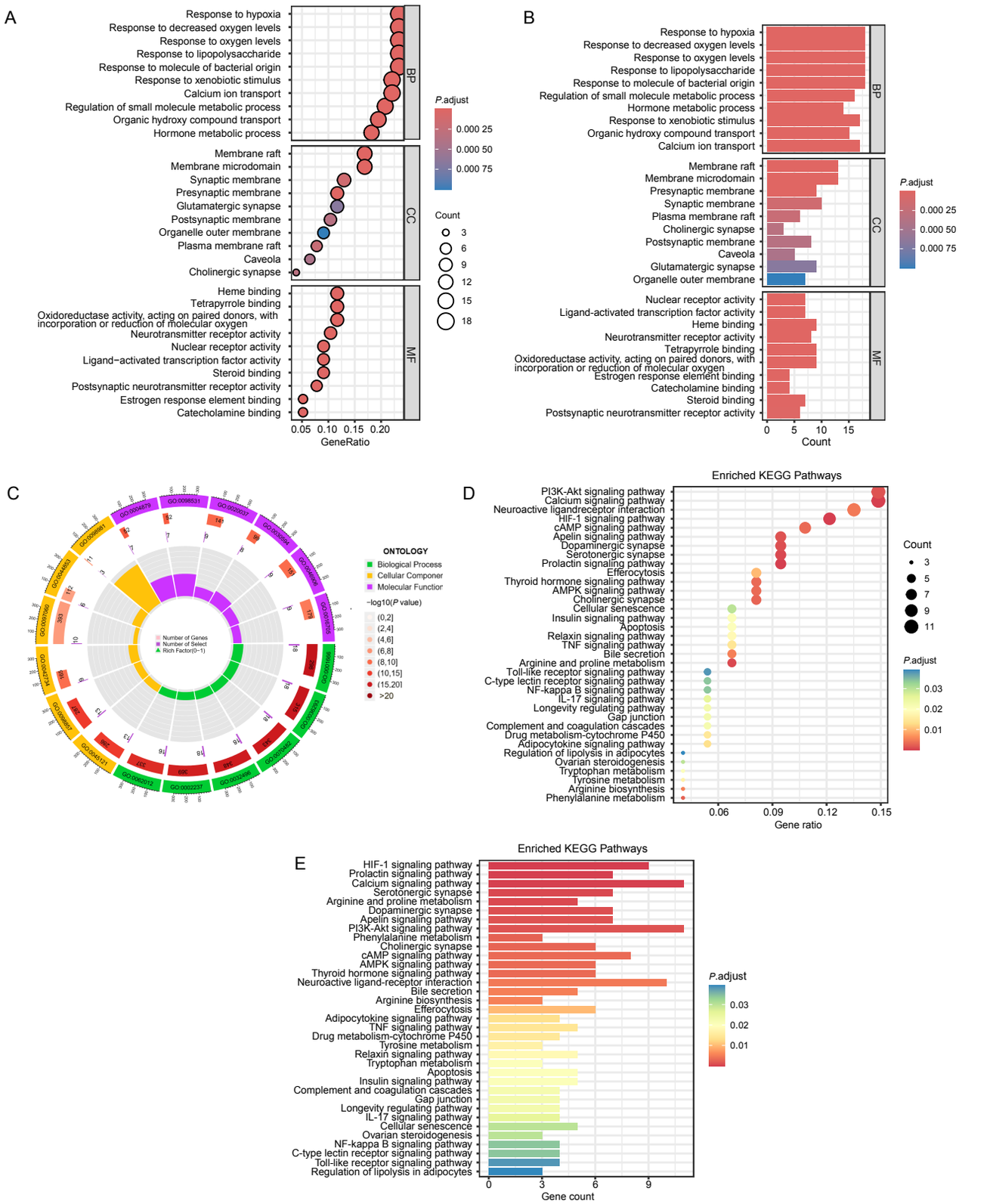
a: Compared with the NC group; b: Compared with the POCD group; c: Compared with the POCD+Mus group

表4 Mus对POCD小鼠新物体识别实验结果的影响 (n=6, $\bar{x}\pm s$)

Table 4 Effect of Mus on behavioral performance in POCD mice by novel object recognition test (n=6, $\bar{x}\pm s$)

Group	Novel object preference index	P	Recognition index	P
NC	0.72±0.05		0.43±0.11	
POCD	0.37±0.11	<0.000 1[a]	−0.26±0.23	<0.000 1[a]
POCD+Mus	0.71±0.14	0.000 8[b]	0.43±0.28	0.000 8[b]
POCD+Mus+GW9662	0.41±0.10	0.001 8[c]	−0.17±0.21	0.001 8[c]

a: Compared with the NC group; b: Compared with the POCD group; c: Compared with the POCD+Mus group



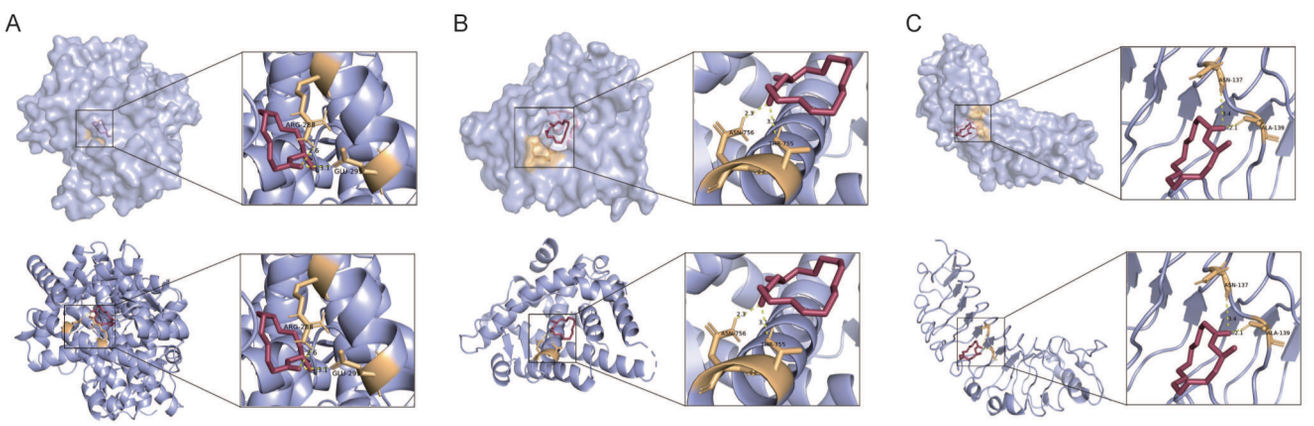
A: Bubble plot of GO functional annotation analysis; B: Bar plot of GO functional annotation analysis; C: Circle plot of GO functional annotation analysis; D: Bubble plot of KEGG pathway enrichment analysis; E: Bar plot of KEGG pathway enrichment analysis

图2 Mus干预术后认知功能障碍潜在靶点的GO功能与KEGG通路富集分析

Figure 2 GO functional annotation and KEGG pathway enrichment analyses of the potential targets of Mus in postoperative cognitive dysfunction

层排列欠整齐,局部结构疏松。与POCD组相比,Mus干预后海马CA1区细胞层结构相对完整,排列紊乱及组织疏松程度减轻;加入PPARγ抑制剂后,Mus对海马组织结构的保护作用减弱,CA1区细胞排列欠规则及结构疏松趋势再次加重(图4A~D)。NS染色结果显示,NC组海马CA1区神经元层清晰,NS染色较深;POCD组CA1区NS染色减弱,神经元排列疏松;Mus干预后,CA1区NS染色增强,神经元层连续性及排列状态较模型组改善;而PPARγ抑制剂处理后,NS染色减弱,神经元损伤改善程度降低(图4E~H)。上述结果提示,Mus可减轻POCD小鼠海马CA1区病理损伤和神经元损伤,其作用可能与PPARγ介导的保护效应有关。

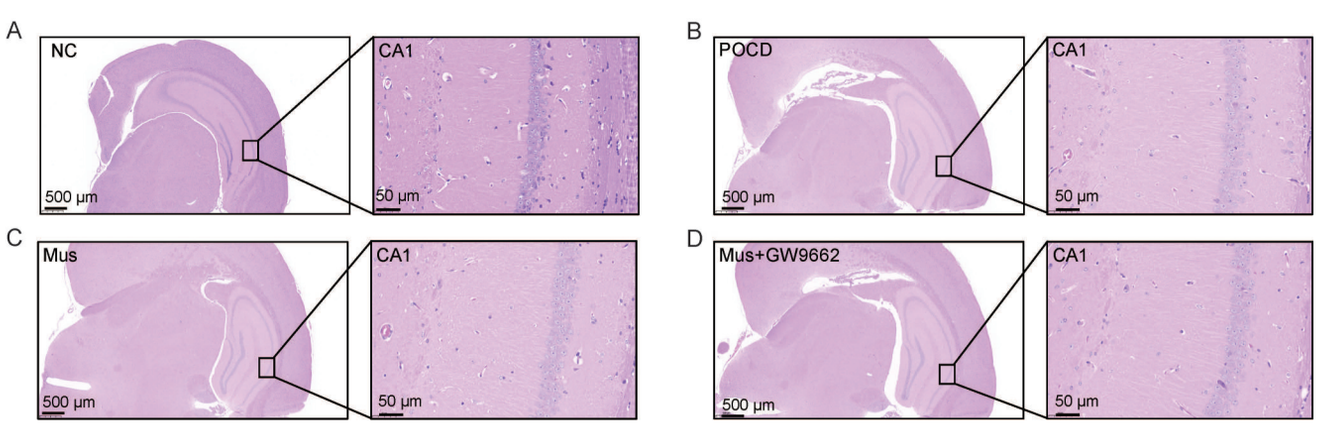
2.2.3　Mus降低POCD小鼠海马促炎因子表达并上调抗炎/修复相关指标　　RT-qPCR结果显示,与NC组相比,POCD组小鼠海马组织中IL-1β、IL-6和TNF-α mRNA表达升高,经Mus干预后,IL-1β和IL-6 mRNA表达降低,TNF-α表达呈下降趋势。同时,Mus可上调IL-10和Arg1 mRNA表达。加入GW9662后,Mus对炎症因子的调节作用减弱(图5A~E)。Western blot结果显示,POCD组iNOS蛋白表达升高,Arg1蛋白表达降低;Mus处理后,iNOS表达下降,Arg1表达升高。GW9662干预后,iNOS蛋白表达再次升高,Arg1蛋白表达降低(图5F~H)。上述结果表明,Mus可抑制POCD小鼠海马促炎反应并促进抗炎/修复相关表型,而GW9662可削弱其上述调节作用,提示PPARγ可能参与Mus对POCD小鼠海马炎症反应的调控。



A: Protein surface and secondary-structure models of Mus docked with PPARG; B: Protein surface and secondary-structure models of Mus docked with AR; C: Protein surface and secondary-structure models of Mus docked with TLR4

图3　Mus与核心靶点的分子对接结果

Figure 3　Molecular docking results of muscone with the core targets

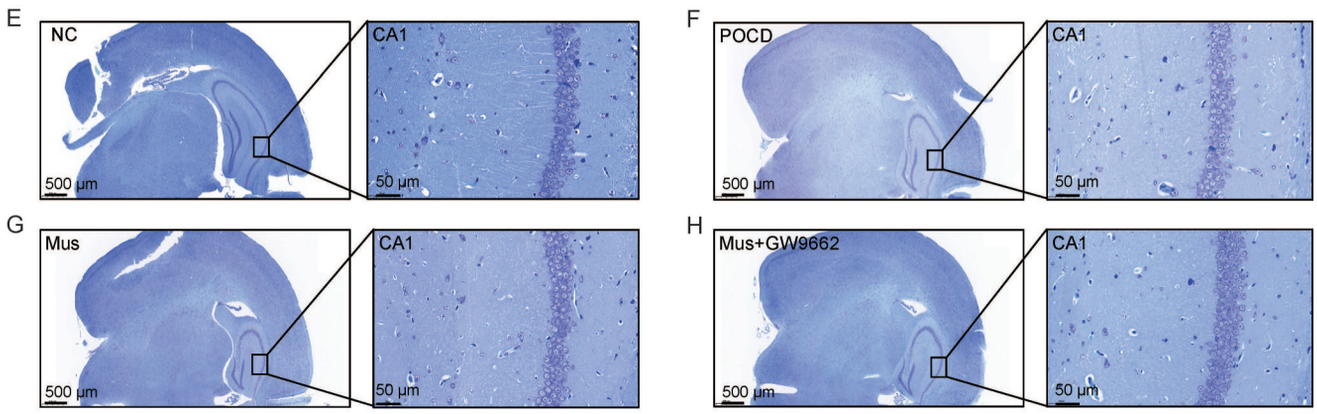


A to D: Representative images of HE staining showing the histopathological morphology of the hippocampal CA1 region across groups

图4　Mus对POCD小鼠海马CA1区组织病理形态及神经元损伤的影响 (n=3)

Figure 4　Effects of Mus on histopathological morphology and neuronal injury in the hippocampal CA1 region of POCD mice (n=3)

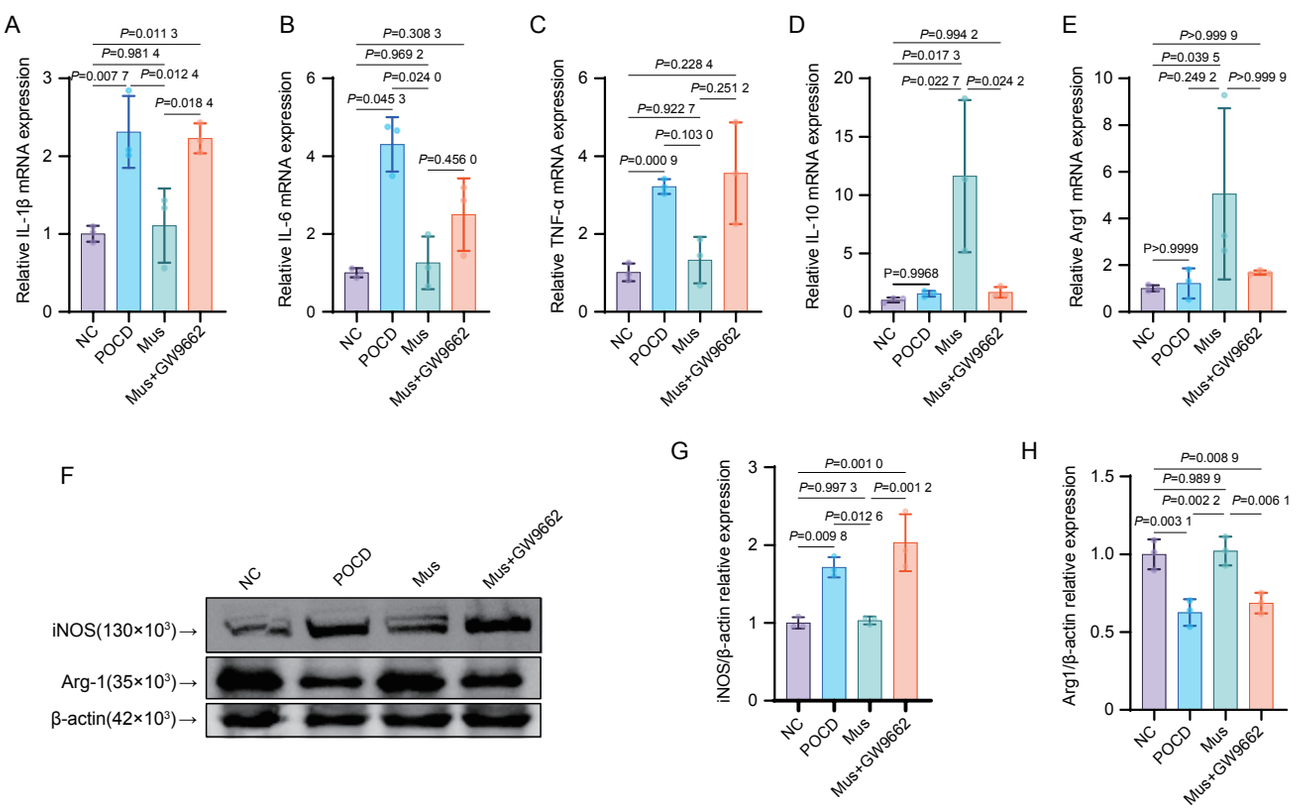
(图4E~H续下页)



E to H: Representative images of Nissl staining showing neuronal morphology and Nissl body changes in the hippocampal CA1 region across groups

续图4 Mus对POCD小鼠海马CA1区组织病理形态及神经元损伤的影响(n=3)

Figure 4(continued) Effects of Mus on histopathological morphology and neuronal injury in the hippocampal CA1 region of POCD mice (n=3)



A to E: Relative mRNA expression levels of IL-1β (A), IL-6 (B), TNF-α (C), IL-10 (D), and Arg1 (E) in the hippocampal tissues by RT-qPCR across groups; F: Protein levels of iNOS, Arg1, and β-actin in the hippocampal tissues by Western blot across groups. G and H: Semi-quantitative analyses of protein levels of iNOS (G) and Arg1 (H)

图5 Mus对POCD小鼠海马组织炎症因子及炎症表型相关分子表达的影响(n=3, $\bar{x}\pm s$)

Figure 5 Effects of Mus on the expression of inflammatory cytokines and inflammation-associated phenotypic markers in the hippocampal tissues of POCD mice (n=3, $\bar{x}\pm s$)

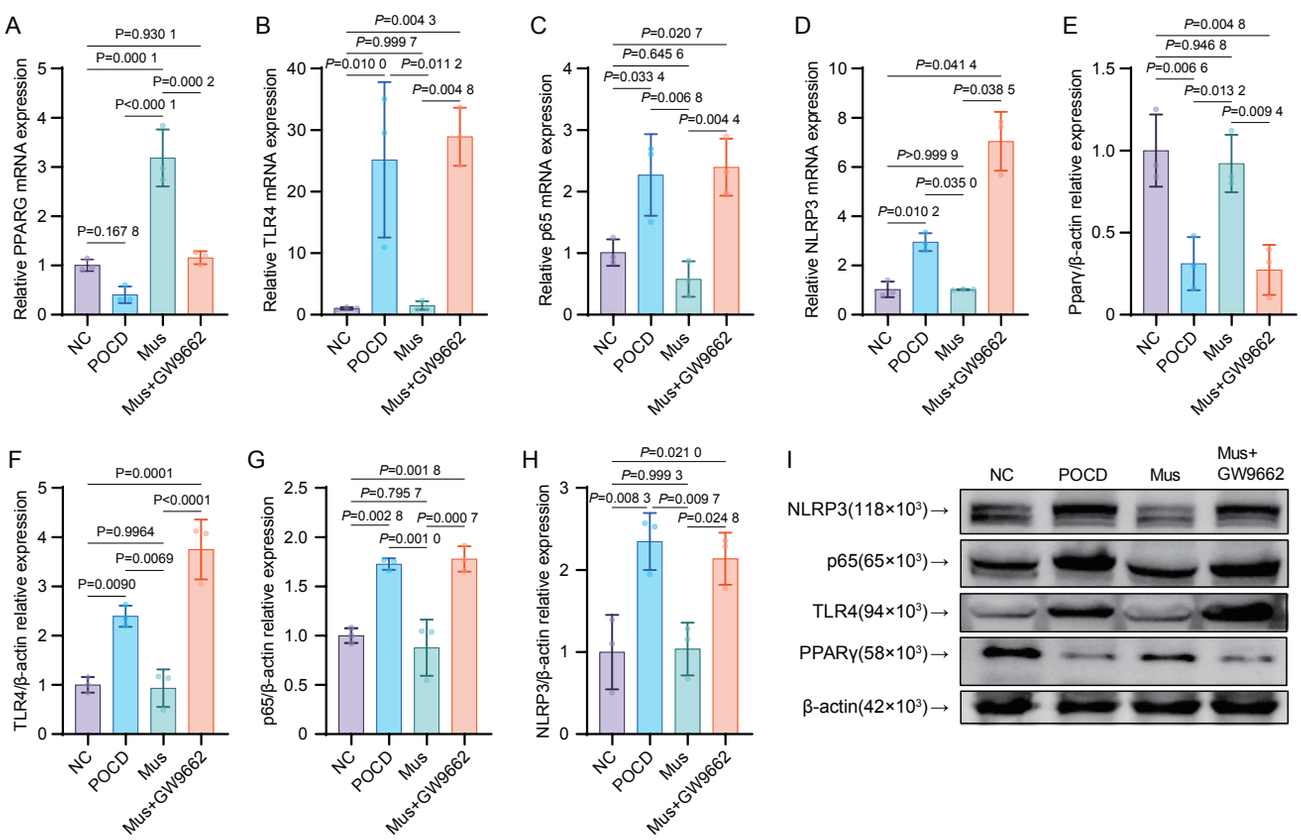
2.2.4 Mus上调PPARγ并减轻TLR4/NF-κB/NLRP3通路介导的炎症反应 RT-qPCR及Western blot结果显示,与NC组相比,POCD组TLR4、p65和NLRP3 mRNA表达及蛋白表达升高,PPARG mRNA及PPARγ蛋白表达呈下降趋势。Mus干预后,PPARG mRNA及PPARγ蛋白表达明显升高,而TLR4、p65和NLRP3

mRNA及蛋白表达降低(图6A~I)。加入GW9662后,Mus对上述指标的调节作用被部分削弱,提示Mus对TLR4/NF-κB/NLRP3通路介导炎症反应的减轻作用,可能与PPARγ相关信号上调有关。

2.3　体外实验结果

2.3.1　Mus抑制LPS诱导的BV2细胞神经炎症反应　20倍镜下观察显示,NC组BV2细胞多呈圆形或梭形,仅少数细胞可见短突起。LPS处理后,细胞胞体增大,阿米巴样细胞明显增多;Mus干预后,多数细胞呈圆形或梭形;加入PPARγ抑制剂GW9662后,细胞形态与LPS组相似(图7)。

RT-qPCR结果显示,与NC组相比,LPS处理后BV2细胞中iNOS、IL-1β、IL-6、TNF-α和COX-2 mRNA表达水平均显著升高,而Arg1和IL-10 mRNA表达水平降低。经Mus干预后,上述促炎因子mRNA表达明显下降,Arg1和IL-10 mRNA表达升高;加入GW9662后,Mus对促炎因子的抑制作用及对抗炎相关因子的上调作用均被部分或完全逆转(图8A~G)。细胞培养



A to D: Relative mRNA expression levels of PPARG (A), TLR4 (B), NF-κB p65 (C), and NLRP3 (D) in the hippocampal tissues by RT-qPCR; E to H: Relative protein levels of PPARγ (E), TLR4 (F), NF-κB p65 (G), and NLRP3 (H) in the hippocampal tissues by Western blot across groups; I: Representative images of Western blot bands of above molecules, with β-actin as reference

图6　Mus对POCD小鼠海马组织PPARγ及TLR4/NF-κB p65/NLRP3通路相关分子表达的影响 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

Figure 6　Effects of Mus on PPARγ expression and TLR4/NF-κB p65/NLRP3 pathway-related molecules in the hippocampal tissues of POCD mice (n=3, $\bar{x}\pm s$)

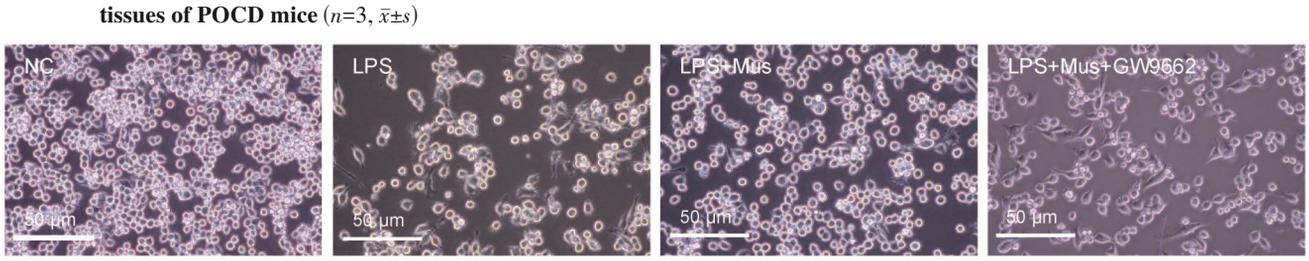


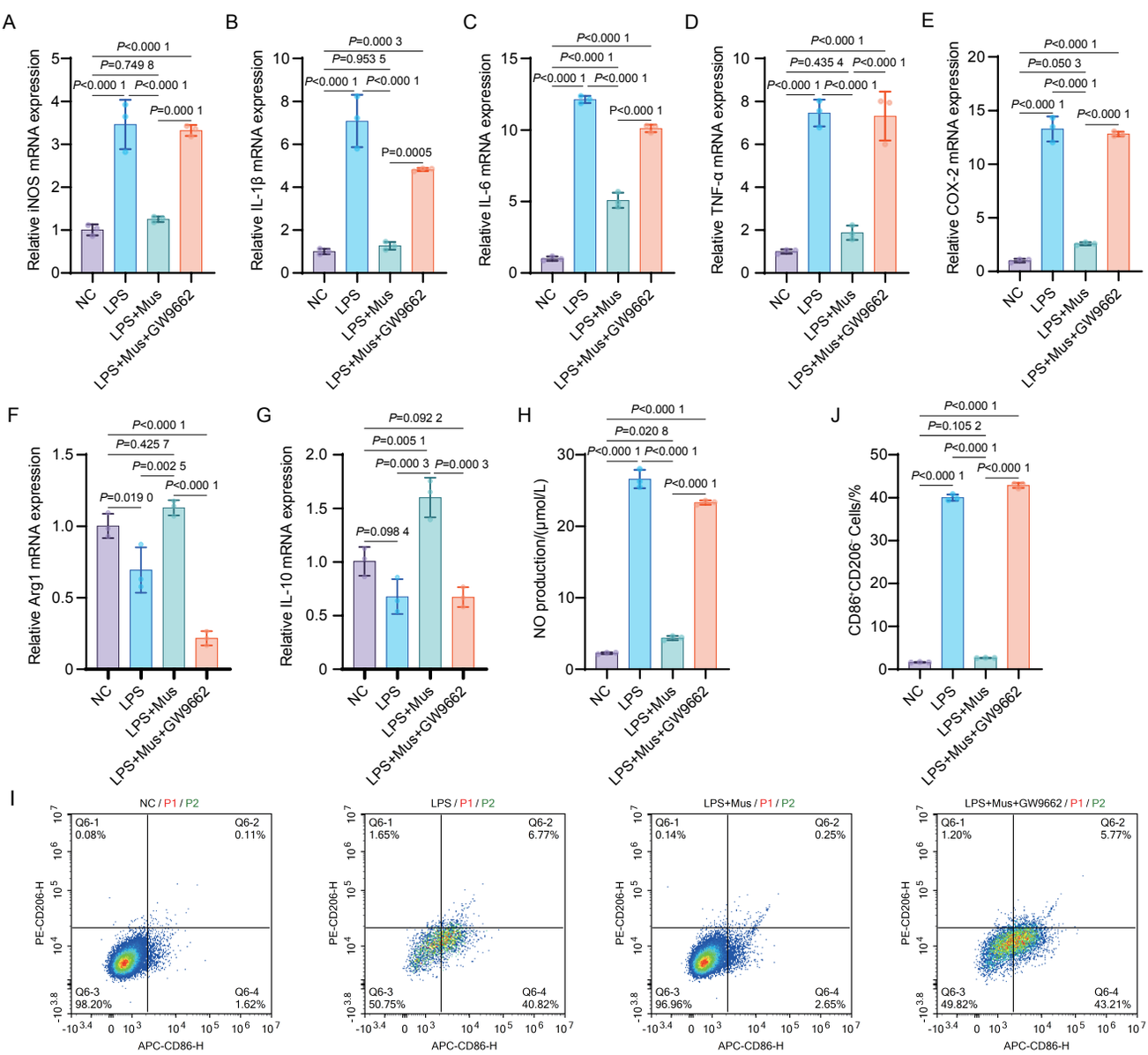
图7　Mus及GW9662对LPS诱导BV2细胞形态变化的影响

Figure 7　Effects of Mus and GW9662 on morphological changes in LPS-stimulated BV2 cells

上清中NO释放量变化趋势与促炎因子表达结果基本一致，进一步提示Mus可抑制LPS诱导的BV2细胞炎症介质释放，且该作用可能与PPARγ信号有关(图8H)。

流式细胞术结果显示，LPS处理后$CD86^+CD206^-$细胞比例显著升高，提示BV2细胞向促炎表型转化；Mus干预后$CD86^+CD206^-$细胞比例明显降低，而加入GW9662后该作用被逆转。但未观察到明确的$CD206^+$抗炎表型细胞比例增加(图8I、J)。

2.3.2　Mus下调LPS诱导的BV2细胞TLR4、p65和NLRP3相关炎症信号分子表达　RT-qPCR及Western blot结果显示，与NC组相比，LPS刺激后BV2细胞中TLR4、p65和NLRP3的mRNA及蛋白表达均明显升高，而PPARγ的mRNA及蛋白表达降低，提示LPS可诱导BV2细胞炎症相关信号分子表达升高。Mus干预后，PPARγ表达升高，TLR4、NLRP3及p65表



A to G: Relative mRNA expression levels of inflammation-associated molecules iNOS (A), IL-1β (B), IL-6 (C), TNF-α (D), COX-2 (E), Arg1 (F) and IL-10 (G) across groups of BV2 cells; H: Nitric oxide (NO) release in BV2 cell culture supernatants across groups by Griess assay; I: Representative flow cytometry plots showing CD86 and CD206 expression in BV2 cells across groups; J: Quantitative analysis of the proportion of $CD86^+CD206^-$ cells across groups

图8　Mus对LPS诱导BV2细胞炎症反应及促炎表型偏移的影响 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

Figure 8　Effects of Mus on LPS-induced inflammatory responses and proinflammatory phenotypic shift in BV2 cells (n=3, $\bar{x}\pm s$)

达降低或呈下降趋势。进一步加入GW9662后,Mus对上述指标的调节作用被部分削弱(图9A~I)。

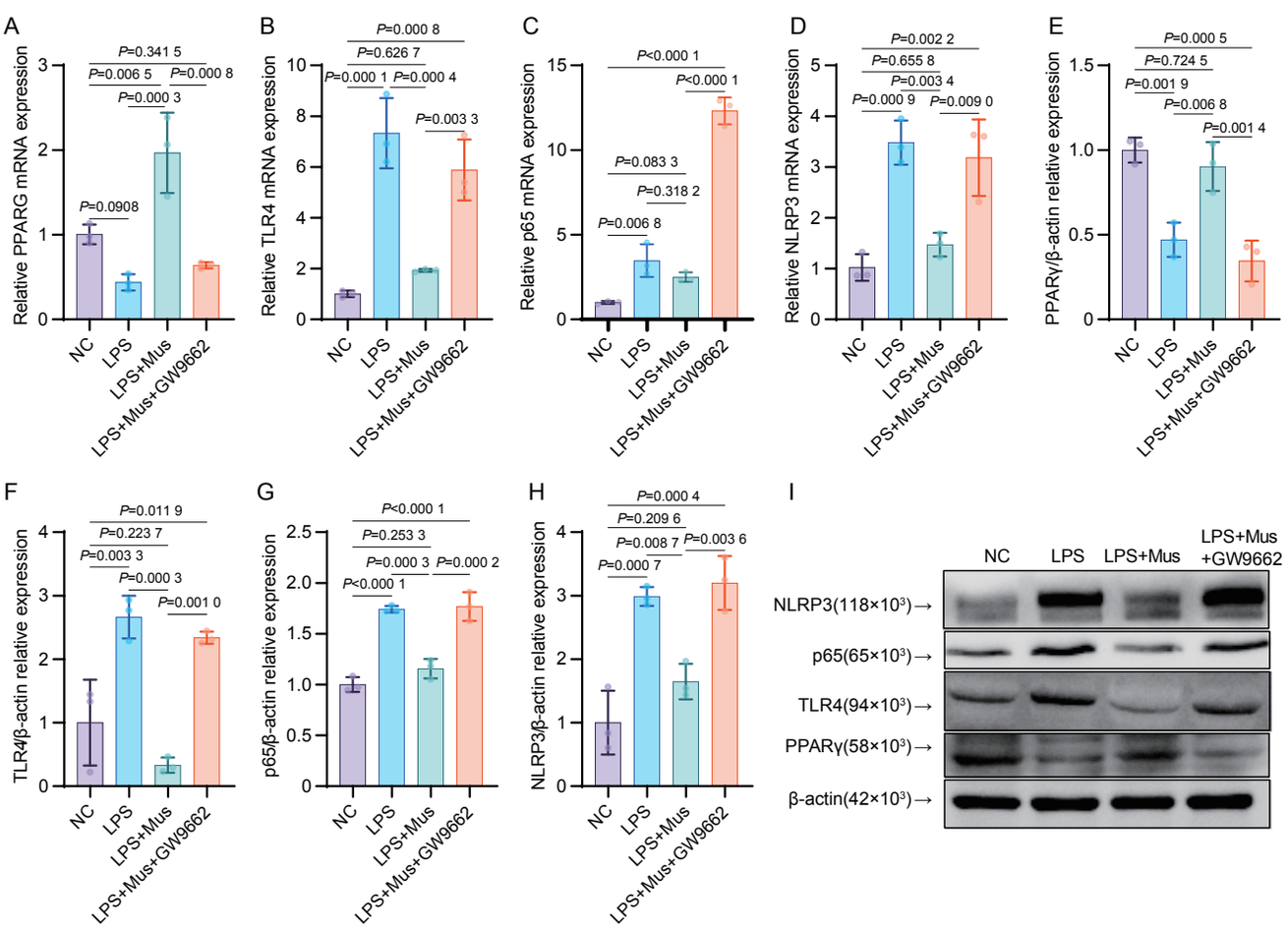
2.3.3　Mus处理的BV2细胞上清液改善HT22细胞活力并抑制细胞凋亡　　为进一步评价Mus调控BV2细胞炎症反应后对神经元细胞的影响,收集各组BV2细胞培养上清液处理HT22细胞24 h,并检测HT22细胞形态、细胞活力及凋亡情况。结果显示,与NC组相比,LPS组BV2细胞上清液处理后HT22细胞数量减少、部分细胞胞体皱缩(图10A~D),细胞活力显著下降(图10E),凋亡细胞比例明显升高(图10F、G)。Mus干预后的BV2细胞上清液可改善细胞形态(图10A~D),对HT22细胞活力基本无影响(图10E),且可降低凋亡比例(图10F、G)。加入GW9662后,Mus的保护作用被部分逆转(图10A~G)。

3　讨论

3.1　围术期神经炎症与海马损伤可能是Mus改善POCD的重要作用环节

POCD是老年患者麻醉和手术后常见的神经认知并发症,其发生涉及手术创伤、麻醉暴露、衰老相关易感性、外周炎症向中枢传递以及神经免疫稳态失衡等多种因素[1,3-5]。海马作为学习记忆的重要脑区,对围术期炎症和应激刺激较为敏感。持续或过度的神经炎症不仅可影响海马神经元存活,还可能进一步干扰突触可塑性和神经网络功能,因此被认为是连接手术应激与术后认知下降的重要病理环节[3-6]。

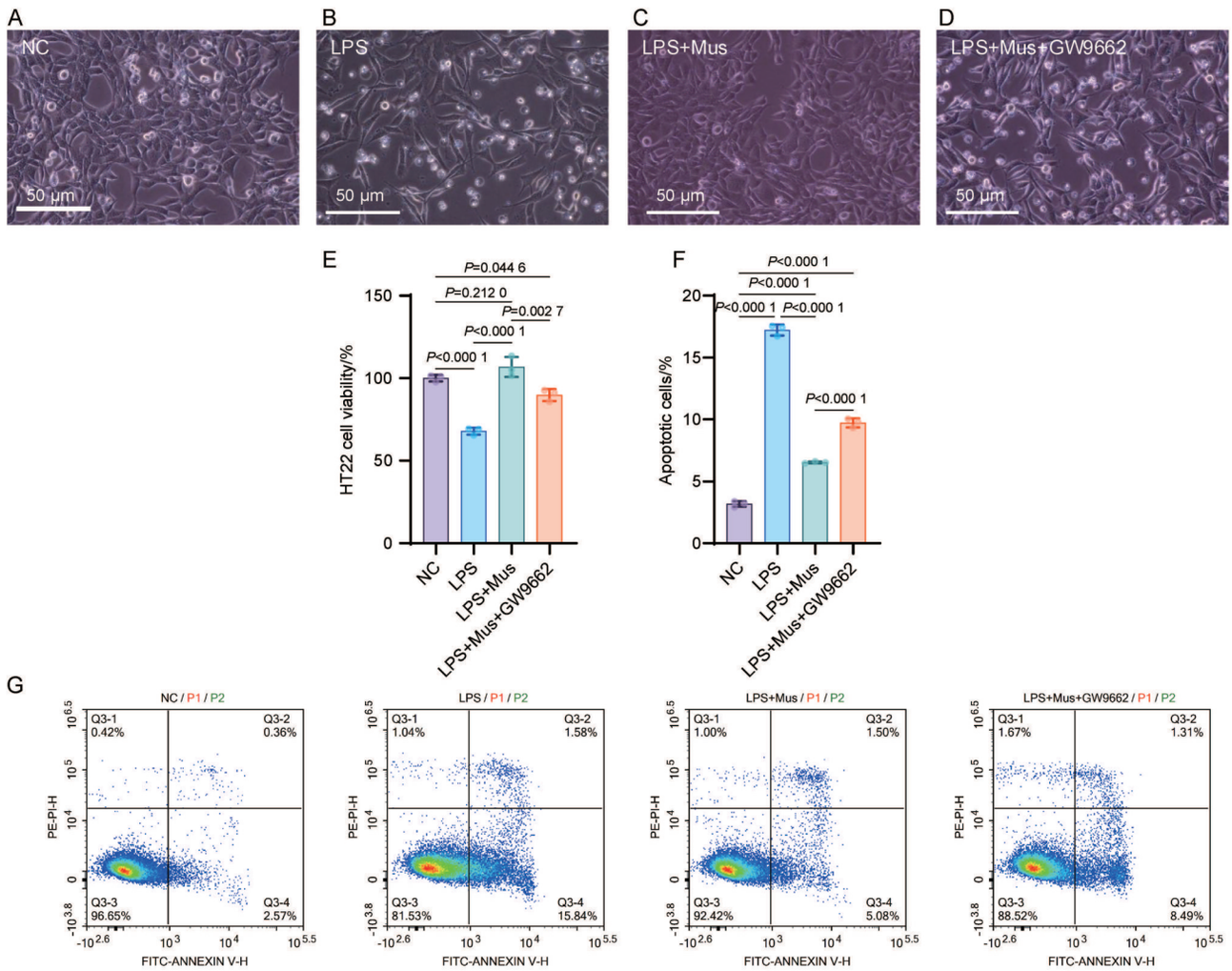
既往研究表明,Mus的神经保护作用并不局限于单一疾病模型。在APP/PS1小鼠中,Mus可改善突触功能障碍和认知缺陷[9];在慢性应激及脑缺血再灌注



A to D: Relative mRNA expression levels of PPARG (A), TLR4 (B), NF-κB p65 (C), and NLRP3 (D) across groups of BV2 cells by RT-qPCR; E to H: Relative protein levels of PPARγ (E), TLR4 (F), NF-κB p65 (G), and NLRP3 (H) across groups of BV2 cells by Western blot; I: Representative images of Western blot bands of above molecules, with β-actin as reference

图9　Mus对LPS诱导BV2细胞中PPARγ及TLR4/NF-κB p65/NLRP3通路相关分子表达的影响(n=3,$\bar{x}\pm s$)

Figure 9　Effects of Mus on PPARγ expression and TLR4/NF-κB p65/NLRP3 pathway-related molecules in LPS-stimulated BV2 cells (n=3,$\bar{x}\pm s$)



A to D: Representative morphological images of HT22 cells in 24 hours' treatment with conditioned media from the indicated BV2 cell groups, NC (A), LPS (B), LPS+Mus (C) and LPS+Mus+GW9662 (D) groups. Original magnification ×20; E: CCK-8 assay showing HT22 cell viability; F: Quantitative analysis of the total apoptosis rate of HT22 cells; G: Representative Annexin V-FITC/PI flow cytometry plots showing HT22 cell apoptosis in each group

图10 Mus干预BV2细胞后的条件培养基对HT22细胞活力及凋亡的影响(n=3,$\bar{x}\pm s$)

Figure 10 Effects of conditioned medium from Mus-treated BV2 cells on HT22 cell viability and apoptosis (n=3,$\bar{x}\pm s$)

模型中,Mus亦表现出减轻神经炎症、氧化应激和神经组织损伤的作用[10-11]。Zhou等[20]在慢性颈髓压迫模型中进一步发现,Mus能够同时减轻炎症反应和神经元损伤,并涉及Drp1依赖性线粒体分裂、NF-κB及NLRP3等炎症相关信号的调节。这些不同疾病模型所获得的结果共同提示,抑制炎症微环境及继发性神经元损伤可能是Mus发挥神经保护作用的共同机制之一。

本研究中认知功能改善与海马组织学损伤减轻同步出现,与上述研究方向具有一致性,并将Mus的潜在神经保护效应进一步延伸至麻醉和手术诱导的认知障碍背景。值得注意的是,认知功能下降并不能简单归因于神经元形态学损伤。围术期炎症还可能通过影响突触蛋白表达、树突棘结构、线粒体稳态及血脑屏障完整性等途径干扰神经网络功能[4-6]。因此,本研究所观察到的海马保护可能只是Mus改善POCD的一个组成环节,其是否进一步改善突触可塑性和神经环路功能仍需深入研究。

3.2 小胶质细胞炎症表型重塑可能是Mus发挥神经保护作用的重要细胞基础

小胶质细胞是中枢神经系统主要的固有免疫细胞,也是围术期外周炎症信号转化为中枢神经炎症的重要介质。手术刺激后,小胶质细胞可发生快速反应并释放IL-1β、IL-6、TNF-α及其他炎症介质,从而影响邻近神经元及突触微环境[3-5]。Feng等[21]在小鼠手术模型中证实,小胶质细胞参与术后海马炎症及认知功

能下降,提示其并非POCD发生过程中的简单伴随现象,而可能是连接外科创伤与中枢认知改变的重要细胞环节。

Mus对小胶质细胞炎症状态的调节已有其他神经系统疾病模型的实验支持。Liu等[12]发现,Mus可通过PPARγ相关途径促进缺血性脑卒中后小胶质细胞向修复相关表型转变,并改善神经功能;在LPS诱导的神经炎症模型中,Mus同样能够减轻炎症反应[15]。此外,Mus在慢性颈髓压迫模型中能够抑制BV2细胞炎症活化及相关炎症信号[20]。本研究同时从POCD小鼠海马组织和LPS诱导BV2细胞2个层面观察到Mus对促炎与抗炎/修复相关指标的调节,进一步提示小胶质细胞可能是其干预POCD的重要作用细胞之一。

但小胶质细胞的功能状态具有明显的连续性和异质性,传统"M1/M2"二分模式难以完全反映体内真实表型。本研究虽然观察到iNOS、CD86、Arg1等指标的变化,但$CD206^+$细胞的变化并未完全支持典型的M1向M2完整转换。因此,将本研究结果解释为Mus抑制小胶质细胞M1样促炎活化,并促进其向抗炎/修复相关状态偏移较为稳妥,而不宜据此认定发生了完整的M2极化。围术期神经炎症研究亦表明,小胶质细胞NLRP3相关炎症反应与认知障碍密切相关;Zhang等[22]发现,抑制小胶质细胞NLRP3炎症小体活化可减轻手术后炎症反应、神经元损伤并改善认知功能。未来研究应进一步明确Mus主要影响哪些小胶质细胞亚群及其动态变化。

3.3 PPARγ相关炎症调控可能是Mus干预POCD的重要分子环节

PPARγ兼具代谢调节和免疫调节功能,在小胶质细胞炎症反应及神经保护过程中具有重要作用[12,18-19]。本研究网络药理学分析将PPARG筛选为Mus干预POCD的潜在核心靶点之一,而既往实验研究为这一预测提供了较强的生物学依据。Zhang等[23]在20月龄小鼠异氟烷麻醉联合手术模型中发现,术后海马PPARγ表达下降并伴随神经炎症和认知功能受损;PPARγ激动剂吡格列酮可减轻上述改变,而PPARγ拮抗剂GW9662能够抵消其保护效应。Yang等[24]随后在另一种围术期神经认知障碍(perioperative neurocognitive disorders, PND)小鼠模型中发现,阿托伐他汀提高海马PPARγ表达并改善炎症及认知表现,而GW9662可部分削弱其作用。这些研究说明,PPARγ相关调控在POCD/PND中的作用具有一定重复性,也为本研究采用GW9662进行功能性验证提供了理论依据。

PPARγ与NF-κB及NLRP3相关炎症信号之间存在广泛交叉调控。既往细胞研究表明,PPARγ活化能够抑制炎症相关NF-κB信号及NLRP3炎症反应[18-19]。在围术期神经认知障碍模型中,NLRP3炎症小体也被认为是放大神经炎症的重要执行环节。Zhang等[22]发现,抑制小胶质细胞NLRP3炎症小体的组装和成熟可减少IL-1β释放及神经元损伤;Meng等[25]进一步在老年小鼠麻醉/手术模型中证实,NLRP3炎症小体活化与神经炎症和认知损害相伴,而抑制其上游内质网应激能够减轻上述改变。因此,本研究所观察到的PPARγ变化及TLR4、NF-κB p65、NLRP3相关改变,在既往研究框架下具有较好的机制一致性。

尤其值得关注的是,Liu等[12]已在缺血性脑卒中模型中报道Mus能够通过PPARγ相关途径调节小胶质细胞表型。本研究则将这一潜在作用机制进一步延伸至麻醉和手术诱导的神经炎症环境,并通过GW9662观察到Mus部分效应受到削弱。综合网络药理学、分子对接、体内外PPARγ表达变化及药理学阻断结果,可以认为PPARγ相关信号可能参与Mus对POCD神经炎症的调控过程。但这种证据链仍不能证明Mus直接结合并激活PPARγ。分子对接只能提供潜在结合可能,表达水平变化不能等同于受体活化,而GW9662也只能支持PPARγ参与相关功能。

3.4 小胶质细胞-神经元炎症串扰可能连接神经炎症与继发性神经元损伤

神经炎症最终能否转化为认知功能障碍,很大程度上取决于胶质细胞炎症状态如何影响神经元及神经网络。活化小胶质细胞释放的炎症因子、活性氧及其他可溶性介质能够改变局部神经元生存环境,而调节小胶质细胞炎症状态则可能间接改善神经元损伤。Zhang等[22]在围术期神经认知障碍研究中采用小胶质细胞条件培养液处理原代神经元,发现炎症状态下的小胶质细胞条件培养液可促进神经元损伤,而抑制NLRP3相关炎症后这一效应明显减轻。这一结果从细胞间作用层面支持了"小胶质细胞炎症-神经元继发性损伤"的病理联系。

本研究采用BV2细胞条件培养基作用于HT22细胞,其意义同样主要在于建立小胶质细胞炎症状态与神经元样细胞损伤之间的联系。本研究的条件培养基实验进一步支持小胶质细胞炎症状态与神经元样细胞损伤之间存在联系,并提示PPARγ相关调节可能参与Mus的间接神经保护作用。不过,Mus也可能直接作用于神经元。Ren等[26]在不依赖小胶质细胞的

HT22缺氧/复氧模型中发现,Mus能够减轻细胞凋亡、氧化应激和炎症反应,其机制涉及miR-142-5p/HMGB1/TLR4/NF-κB通路。因此,目前尚不能将Mus的神经保护作用完全归因于“小胶质细胞介导”的间接途径,其可能同时包括直接保护神经元和改善神经炎症微环境两方面作用。

从转化角度看,Mus作为天然麝香的主要活性成分,已有多种神经系统疾病模型显示其具有抗炎、抗氧化及神经保护作用[7-12],但其在POCD中的应用仍处于临床前阶段。本研究的意义主要在于为Mus干预围术期神经炎症提供新的实验依据,而非直接支持其临床应用。后续研究仍需明确其有效剂量范围、最佳围术期给药时间、脑组织暴露水平、药代动力学特征以及长期用药安全性,并在不同手术类型、不同性别和伴随基础疾病的老年动物模型中验证其稳定性和可重复性。

本研究仍存在局限。首先,网络药理学和分子对接只能提示潜在靶点和结合趋势,尚不能证明Mus与PPARγ直接结合[27],后续需采用CETSA、DARTS、SPR、ITC或MST等方法验证其结合关系和亲和力[28]。其次,本研究主要采用GW9662进行药理学阻断,仍需结合PPARG基因敲低、过表达或条件性敲除模型进一步验证因果关系。再次,本研究主要检测TLR4、NF-κB p65和NLRP3表达,尚未检测NF-κB p65核转位、磷酸化p65、NLRP3炎症小体组装、cleaved Caspase-1及成熟IL-1β、IL-18等指标[22,25]。然后,动物实验尚缺乏Iba1、TMEM119、CD68或Iba1/NeuN共染等证据,不能直接证明海马区域小胶质细胞活化及其与神经元损伤的空间关系。最后,本研究主要观察术后早期认知改变,长期认知转归、突触可塑性和血脑屏障功能仍需进一步研究。

综上所述,Mus可改善异氟烷麻醉联合手术诱导的老年小鼠POCD,并减轻海马神经元损伤和神经炎症反应。其作用可能与调节PPARγ相关信号以及下调TLR4、NF-κB p65和NLRP3等炎症相关分子表达有关。体外结果进一步提示,Mus可能通过改善小胶质细胞炎症状态,减轻炎症性微环境介导的神经元继发性损伤。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] Evered L, Silbert B, Knopman D S, *et al*. Recommendations for the nomenclature of cognitive change associated with anaesthesia and surgery-2018[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2018, 62(10): 1473-1480. DOI:10.1111/aas.13250.

[2] 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. DOI: 10.1097/01.anes.0000296071.19434.1e.

[3] Subramaniyan S, Terrando N. Neuroinflammation and perioperative neurocognitive disorders[J]. Anesth Analg, 2019, 128(4): 781-788. DOI:10.1213/ANE.0000000000004053.

[4] Li Z C, Zhu Y Z, Kang Y H, *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] Cheng C, Wan H X, Cong P L, *et al*. Targeting neuroinflammation as a preventive and therapeutic approach for perioperative neurocognitive disorders[J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 297. DOI: 10.1186/s12974-022-02656-y.

[6] Wang T, Sun G W, Tao B D. Updated insights into the NLRP3 inflammasome in postoperative cognitive dysfunction: emerging mechanisms and treatments[J]. Front Aging Neurosci, 2024, 16: 1480502. DOI: 10.3389/fnagi.2024.1480502.

[7] Wang J, Xing H, Qin X M, *et al*. Pharmacological effects and mechanisms of muscone[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 262: 113120. DOI:10.1016/j.jep.2020.113120.

[8] Wang G Y, Wang N, Liao H N. Effects of muscone on the expression of P-gp, MMP-9 on blood-brain barrier model in vitro[J]. Cell Mol Neurobiol, 2015, 35(8): 1105-1115. DOI:10.1007/s10571-015-0204-8.

[9] Liu Y, Bian H J, Xu S Y, *et al*. Muscone ameliorates synaptic dysfunction and cognitive deficits in APP/PS1 mice[J]. J Alzheimers Dis, 2020, 76(2): 491-504. DOI: 10.3233/JAD-200188.

[10] Liu H, Liu L L, Chen J, *et al*. Muscone with attenuation of neuroinflammation and oxidative stress exerts antidepressant-like effect in mouse model of chronic restraint stress[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 3322535. DOI:10.1155/2022/3322535.

[11] Zhang P, You S X, Ding X Y, *et al*. Protective effect and underlying mechanism of muscone on acute cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 308: 116287. DOI:10.1016/j.jep.2023.116287.

[12] Liu F, Cao L W, Hu S J, *et al*. Muscone promotes functional recovery by facilitating microglia polarization into M2 phenotype through PPAR-γ pathway after ischemic stroke[J]. Cell Immunol, 2023, 386: 104704. DOI: 10.1016/j.cellimm.2023.104704.

[13] Hopkins A L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery[J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(11): 682-690.

DOI:10.1038/nchembio.118.

[14] Noor F, Tahir ul Qamar M, Ali Ashfaq U, *et al*. Network pharmacology approach for medicinal plants: review and assessment[J]. Pharmaceuticals, 2022, 15(5): 572. DOI: 10.3390/ph15050572.

[15] He M C, Shi Z, Qin M, *et al*. Muscone ameliorates LPS-induced depressive-like behaviors and inhibits neuroinflammation in prefrontal cortex of mice[J]. Am J Chin Med, 2020, 48(3): 559-577. DOI: 10.1142/S0192415X20500287.

[16] Zeng Q, Zhou T T, Huang W J, *et al*. Asarinin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by activating PPARγ[J]. Sci Rep, 2023, 13: 14706. DOI: 10.1038/s41598-023-41933-5.

[17] Jiang X L, Gu X Y, Zhou X X, *et al*. Intestinal dysbacteriosis mediates the reference memory deficit induced by anaesthesia/surgery in aged mice[J]. Brain Behav Immun, 2019, 80: 605-615. DOI: 10.1016/j.bbi.2019.05.006.

[18] Rodrigues F D S, Newton W R, Tassinari I D, *et al*. Cannabidiol prevents LPS-induced inflammation by inhibiting the NLRP3 inflammasome and iNOS activity in BV2 microglia cells via CB2 receptors and PPARγ[J]. Neurochem Int, 2024, 177: 105769. DOI: 10.1016/j.neuint.2024.105769.

[19] Hou J L, Wang X Y, Zhang J, *et al*. Chuanxiong Renshen decoction inhibits Alzheimer's disease neuroinflammation by regulating PPARγ/NF-κB pathway[J]. Drug Des Devel Ther, 2024, 18: 3209-3232. DOI: 10.2147/DDDT.S462266.

[20] Zhou L Y, Yao M, Tian Z R, *et al*. Muscone suppresses inflammatory responses and neuronal damage in a rat model of cervical spondylotic myelopathy by regulating Drp1-dependent mitochondrial fission[J]. J Neurochem, 2020, 155(2): 154-176. DOI: 10.1111/jnc.15011.

[21] Feng X M, Valdearcos M, Uchida Y, *et al*. Microglia mediate postoperative hippocampal inflammation and cognitive decline in mice[J]. JCI Insight, 2017, 2(7): e91229. DOI: 10.1172/jci.insight.91229.

[22] Zhang L L, Xiao F, Zhang J, *et al*. Dexmedetomidine mitigated NLRP3-mediated neuroinflammation via the ubiquitin-autophagy pathway to improve perioperative neurocognitive disorder in mice[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 646265. DOI: 10.3389/fphar.2021.646265.

[23] Zhang Z, Yuan H, Zhao H, *et al*. PPARγ activation ameliorates postoperative cognitive decline probably through suppressing hippocampal neuroinflammation in aged mice[J]. Int Immunopharmacol, 2017, 43: 53-61. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.12.003.

[24] Yang Y, Wei C, Liu J, *et al*. Atorvastatin protects against postoperative neurocognitive disorder via a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma signaling pathway in mice[J]. J Int Med Res, 2020, 48(5): 0300060520924251. DOI: 10.1177/0300060520924251.

[25] Meng F, Song J, Huang X, *et al*. Inhibiting endoplasmic reticulum stress alleviates perioperative neurocognitive disorders by reducing neuroinflammation mediated by NLRP3 inflammasome activation[J]. CNS Neurosci Ther, 2024, 30(10): e70049. DOI: 10.1111/cns.70049.

[26] Ren W, Zhao F, Han Y, *et al*. Muscone improves hypoxia/reoxygenation (H/R)-induced neuronal injury by blocking HMGB1/TLR4/NF-κB pathway via modulating microRNA-142[J]. PeerJ, 2022, 10: e13523. DOI: 10.7717/peerj.13523.

[27] Agu P C, Afiukwa C A, Orji O U, *et al*. Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management[J]. Sci Rep, 2023, 13: 13398. DOI: 10.1038/s41598-023-40160-2.

[28] Sanchez T W, Ronzetti M H, Owens A E, *et al*. Real-time cellular thermal shift assay to monitor target engagement[J]. ACS Chem Biol, 2022, 17(9): 2471-2482. DOI: 10.1021/acschembio.2c00334.

(收稿:2026-05-27;修回:2026-08-01)

(编辑 刘秋池)