doi:10.11659/jjssx.11E021055

·基础研究·

不同剂量依达拉奉对防治七氟醚诱导术后认知功能障碍的研究

黄钰媛,韦雪梅,郑育秀,刘丽丽 (海南医学院第二附属医院麻醉科,海南 海口 570311)

[摘 要] **目的** 探究不同剂量依达拉奉对七氟醚诱导全麻术后认知功能障碍(POCD)的防治作用。**方法** 老龄雄性 Balb/c 小鼠 48 只,随机均分为对照组(Con 组)、七氟醚组(Sev 组)、七氟醚 + 依达拉奉低剂量组(Sev + Eda-L 组,6 $mg\cdot kg^{-1}$)、七氟醚 + 依达拉奉高剂量组(Sev + Eda-H 组,12 $mg\cdot kg^{-1}$)。采用多次麻醉/手术构建老龄小鼠 POCD 模型,期间给予不同剂量依达拉奉注射液。通过 Morris 水迷宫实验检测小鼠学习与记忆能力,采用相应试剂盒检测氧化/抗氧化因子、炎性细胞因子,采用免疫荧光检测海马中 Iba1 表达,采用 Western blot 检测海马组织中 TLR4/NF-κB 信号通路的蛋白表达。**结果** 与 Con 组相比,Sev 组小鼠逃避潜伏期显著较长,且穿越平台次数、在第Ⅰ象限停留的时间显著较少/短($P<0.05$)。与 Sev 组相比,Sev + Eda-L 组小鼠 Morris 水迷宫指标无明显变化($P>0.05$)。与 Sev 组相比,Sev + Eda-L 组小鼠海马中超氧歧化酶(SOD)活力及丙二醛(MDA)、Iba1、TLR4、p-NF-κB、NLRP3、IL-6、IL-1β、TNF-α 水平均无显著变化($P>0.05$)。而 Sev + Eda-H 组小鼠 Morris 水迷宫指标被显著正向调节($P<0.05$)。与 Sev 组相比,Sev + Eda-H 组小鼠海马中 SOD 活力显著增加($P<0.05$),MDA、Iba1、TLR4、p-NF-κB、NLRP3、IL-6、IL-1β、TNF-α 水平均显著降低($P<0.05$)。**结论**6 $mg\cdot kg^{-1}$依达拉奉对氧自由基的清除能力较弱,因此无法发挥防治 POCD 的作用,但当剂量达到 12 $mg\cdot kg^{-1}$时,依达拉奉能够有效清除氧自由基,抑制炎症信号通路,提高小鼠学习与记忆能力。

[关键词] 老龄;小鼠;术后认知功能障碍;依达拉奉;学习能力;记忆能力
[中图分类号] R742 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-11-10

Effects of different doses of edaravone on prevention of postoperative cognitive dysfunction induced by sevoflurane

HUANG Yu-yuan, WEI Xue-mei, ZHENG Yu-xiu, LIU Li-li (Department of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou Hainan 570311, China)

Abstract: Objective To investigate the preventive and therapeutic effects of different doses of edaravone on postoperative cognitive dysfunction (POCD) after sevoflurane induced general anesthesia. **Methods** Forty-eight aged male Balb/c mice were randomly divided into

[基金项目] 海南省基础与应用基础研究计划项目(818QN319)
[通信作者] 刘丽丽,E-mail:13307508090@163.com

[16] Bourhafour I, Benoulaid M, El Kacemi H, et al. Lumbosacral plexopathy: a rare long term complication of concomitant chemo-radiation for cervical cancer[J]. Gynecol Oncol Res Pract, 2015, 2: 12. doi: 10.1186/s40661-015-0019-9.

[17] Skourti E, Dhillon P. Cancer epigenetics: promises and pitfalls for cancer therapy[J]. FEBS J, 2022, 289(5): 1156-1159. doi: 10.1111/febs.16395.

[18] Ho PJ, Dorajoo R, Ivanković I, et al. DNA methylation and breast cancer-associated variants[J]. Breast Cancer Res Treat, 2021, 188(3): 713-727. doi: 10.1007/s10549-021-06185-9.

[19] Norollahi SE, Foumani MG, Pishkhan MK, et al. DNA methylation profiling of MYC, SMAD2/3 and DNMT3A in colorectal cancer[J]. Oman Med J, 2021, 36(6): e315. doi: 10.5001/omj.2020.93.

[20] Lin J, Zhou Y, Yin Y, et al. Methylation of RILP in lung cancer promotes tumor cell proliferation and invasion[J]. Mol Cell Biochem, 2021, 476(2): 853-861. doi: 10.1007/s11010-020-03950-0.

[21] Hoang PH, Landi MT. DNA methylation in lung cancer: mechanisms and associations with histological subtypes, molecular alterations, and major epidemiological factors[J]. Cancers (Basel), 2022, 14(4): 961. doi: 10.3390/cancers14040961.

[22] Liang R, Li X, Li W, et al. DNA methylation in lung cancer patients: opening a "window of life" under precision medicine[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 144: 112202. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112202.

[23] Paul CD, Mistriotis P, Konstantopoulos K. Cancer cell motility: lessons from migration in confined spaces[J]. Nat Rev Cancer, 2017, 17(2): 131-140. doi: 10.1038/nrc.2016.123.

[24] Mercier V, Larios J, Molinard G, et al. Endosomal membrane tension regulates ESCRT-Ⅲ-dependent intra-lumenal vesicle formation[J]. Nat Cell Biol, 2020, 22(8): 947-959. doi: 10.1038/s41556-020-0546-4.

[25] Margiotta A, Progida C, Bakke O, et al. Rab7a regulates cell migration through Rac1 and vimentin[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2017, 1864(2): 367-381. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.11.020.

[26] Ferry L, Fournier A, Tsusaka T, et al. Methylation of DNA ligase 1 by G9a/GLP recruits UHRF1 to replicating DNA and regulates DNA methylation[J]. Mol Cell, 2017, 67(4): 500-565. doi: 10.1016/j.molcel.2017.07.012.

(编辑:魏 源)

the control group (Con group), the sevoflurane group (Sev group), the sevoflurane + edaravone low-dose group (Sev + Eda-L group, 6 mg·kg^{-1}) and the sevoflurane + edaravone high-dose group (Sev + Eda-H group, 12 mg·kg^{-1}). POCD model of aged mice was established by multiple anesthesia/operations, during which edaravone injection was given in different doses. Morris water maze test was used to detect the learning and memory ability of mice; oxidative/antioxidant factors and inflammatory cytokines were detected by corresponding kits; Iba1 expression in hippocampus was detected by immunofluorescence; the protein expression of TLR4/NF-κB signaling pathway in hippocampus was detected by Western blot. **Results** Compared with the Con group, the escape latency was significantly longer in the Sev group, and the number of platforms crossing and the residence time in the first quadrant were significantly less/shorter in the Sev group ($P < 0.05$). Compared with the Sev group, there was no significant change in the Morris water maze index of the Sev + Eda-L group ($P > 0.05$). Compared with the Sev group, the superoxide dismutase (SOD) activity and malonic dialdehyde (MDA), Iba1, TLR4, p-NF-κB, NLRP3, IL-6, IL-1β, TNF-α expression levels in hippocampus of the Sev + Eda-L group had no significant change ($P > 0.05$). However, compared with the Sev group, the Morris water maze index of the Sev + Eda-H group had significantly positive regulation ($P < 0.05$). Compared with the Sev group, the SOD activity in the hippocampus of the Sev + Eda-H group was significantly increased ($P < 0.05$), while the levels of MDA, Iba1, TLR4, p-NF-κB, NLRP3, IL-6, IL-1β and TNF-α in the Sev + Eda-H group were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Edaravone of 6 mg·kg^{-1} has a weak ability to scavenge oxygen free radicals, so it cannot play the role of POCD prevention and treatment. However, when the dose of edaravone reaches 12 mg·kg^{-1}, it can effectively scavenge oxygen free radicals, inhibit the inflammatory signaling pathway, improve the learning and memory ability of mice .

Keywords: aged; mice; postoperative cognitive dysfunction; edaravone; learning ability; memory ability

随着医疗技术的进步,越来越多老龄患者倾向于手术治疗各种疾病。但部分老龄患者因存在慢性病与器官功能衰退,全麻手术常导致各种并发症。其中,术后认知功能障碍(postoperative cognitive dysfunction, POCD)是老龄患者全麻手术后常见的并发症,显著延长了患者住院时间,影响了患者生活质量,增加了患者治疗费用与病死率[1]。因此,如何防治 POCD 具有重大意义。已有研究证实,氧化应激与神经炎症在 POCD 病程进展中起重要作用[2]。在老龄大鼠海马中,全麻后腹部手术造成氧化因子水平升高,Toll 样受体 4/核因子 κB(Toll-like receptor 4/nuclear factor κB, TLR4/NF-κB)信号通路活化,炎性细胞因子释放增加,进而出现短暂的 POCD[3]。因此,如何降低全麻术后氧化应激反应与神经炎症反应是 POCD 治疗的关键。

依达拉奉(Edaravone)是一种强大的自由基清除剂。临床上,依达拉奉主要用于治疗缺血性中风。有研究报道,依达拉奉为 3 mg·kg^{-1}剂量时可以改善缺血性脑卒中大鼠的神经功能损伤[4];另一项研究显示,3 mg·kg^{-1}依达拉奉可改善脂多糖诱导的神经炎症[5],这提示依达拉奉可能对 POCD 的治疗有益。然而,临床上即使依达拉奉剂量达到 0.5 mg·kg^{-1}(对应小鼠应用剂量约为 6 mg·kg^{-1}),对 POCD 的治疗效果仍不理想[6-7]。如刘鹏飞等[8]在腹腔热灌注化疗研究中,60 例未使用依达拉奉的患者仅有 16 例出现了 POCD 症状,而对应的 60 例使用 0.5 mg·kg^{-1}依达拉奉治疗的患者仍有 10 例出现了 POCD 症状。因此,0.5 mg·kg^{-1}依达拉奉对 POCD 的防治难以获得满意结果,提高依达拉奉剂量用于 POCD 的防治是必要的。本研究拟采用先前报道的多次麻醉/手术的方式构建 POCD 模型[9-10],探究高浓度依达拉奉对 POCD 的防治作用,以期为依达拉奉的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

48 只雄性 Balb/c 小鼠,SPF 级,14 月龄 ICR 小鼠,体质量 30 ~ 40 g,由海南医学院动物实验中心提供,动物生产许可证号:SCXK(琼)2020-0007,动物使用许可证号:SYXK(琼)2022-0013。饲养环境为 12 h/12 h 昼夜循环,湿度(50 ± 10)%,温度 20 ~ 24 ℃,每笼 4 只。本实验中所有操作均按照美国国立卫生研究院颁布的《实验动物的护理和使用指南》规定执行。

1.2 实验方案

参考文献中 POCD 模型构建方案[9-10],采取多次麻醉,辅以开腹手术模拟临床上多次全麻手术过程构建。具体操作流程:将小鼠随机分为对照组(Con 组)、七氟醚组(Sev 组)、七氟醚 + 依达拉奉低剂量组(Sev + Eda-L 组,6 mg·kg^{-1})、七氟醚 + 依达拉奉高剂量组(Sev + Eda-H 组,12 mg·kg^{-1})。POCD 模型构建前,所有小鼠禁食 6 h。Con 组小鼠吸入空气—氧气混合气体。除 Con 组外,将其余各组小鼠置于麻醉箱中,通入 3% 七氟醚(厦门慧嘉生物公司,PPSJ-099064)和 30% 空气—氧气的混合气体,设置氧气流量为 3 L·min^{-1}。待小鼠完全麻醉后,从麻醉箱中取出小鼠,腹部消毒后剪开约 2 cm 的小口,游离出部分小肠

再放回,缝合小鼠腹部,再将小鼠放入麻醉箱中。整个通气过程维持 3 h 以模拟较长时间的手术操作。所有小鼠麻醉过程中使用气体检测仪监测麻醉箱中七氟醚浓度及 CO_2 浓度,避免小鼠因麻醉过量或窒息死亡。每间隔 1 周,对七氟醚各组小鼠使用七氟醚吸入麻醉,麻醉条件与第 1 次相同,但不进行开腹手术以避免后续水迷宫实验中出现伤口感染,麻醉操作共 3 次。每次麻醉结束后,依达拉奉组小鼠持续尾静脉注射不同剂量依达拉奉稀释液(南京先声东元制药有限公司,H20031342),Con 组与 Sev 组注射生理盐水。

1.3 Morris 水迷宫实验

待小鼠第 3 次麻醉结束,次日清醒后开展水迷宫实验。Morris 水迷宫(赛昂斯,江苏,型号:SA201)是用来测试突触记忆的实验方法。水迷宫是一个直径为 110 cm 的圆形水池,整个水迷宫分为 4 个象限,逃生平台位于第Ⅰ象限中央,水迷宫中注入深约 40 cm 的温水以覆盖逃生平台。水迷宫顶端设置 1 个相机,连接电脑,用于记录小鼠游泳轨迹。所有小鼠开展 4 d 的训练以帮助识别并定位逃生平台,具体内容是将小鼠自各个象限丢入水中,记录小鼠登上逃生平台的时间,记为逃避潜伏期。训练结束后,撤去逃生平台,检测小鼠突触记忆。具体内容是将小鼠自第Ⅲ象限丢入水中,记录小鼠游泳速度、在第Ⅰ象限中停留的时间以及到达逃生平台的时间。

1.4 ELISA 检测炎性细胞因子水平

选购 TNF-α(70-EK282/3-96)、IL-1β(70-EK201B/3-96)与 IL-6(70-EK206/3-96)的 ELISA 试剂盒(杭州联科生物公司)。待行为学测试结束,小鼠以 CO_2 安乐死,取新鲜脑组织,镊取出海马区样本,加入 PBS 并匀浆。超声处理 10 min,将匀浆液在 4 ℃下以 2 000 r/min 离心 15 min,取上清液。将样品分别加入试剂盒检测孔板中,37 ℃孵育 2 h。PBST 清洗,加入检测抗体,37 ℃孵育 1 h。PBST 清洗,加入链霉素-HRP 工作液,37 ℃孵育 30 min。PBST 清洗,加入 TMB 底物显色 5 min 左右,加入终止液。在 450 nm 波长处使用酶标仪检测 OD 值,绘制标准曲线,计算各个样本中 IL-6、IL-1β 与 TNF-α 的含量。

1.5 氧化因子水平检测

选择南京建成生物公司的超氧歧化酶(superoxide dismutase,SOD)活性检测试剂盒(A001-3-2)。将待测样本与试剂盒中酶工作液、酶稀释液和底物应用液混合,37 ℃孵育 20 min。450 nm 处读取酶标仪数值,根据对照孔数值获得 SOD 活力,将 SOD 活力与样本中蛋白含量相比得到结果。

选择南京建成生物公司的丙二醛(malonic dialdehyde,MDA)含量检测试剂盒(A003-1-2)。将待测样本、稀释后的标准品与试剂盒中不同试剂混合,95 ℃水浴 40 min。以 3 000 r/min 离心 10 min 后取上清,在 532 nm 处、1 cm 光径条件下测试各管吸光度值。根据标准品吸光度值/浓度曲线计算样本中 MDA 含量,将 MDA 含量与样本中蛋白含量相比得到结果。

1.6 免疫荧光检测 Iba1 表达

小鼠心脏灌流后,取脑组织,置于 4% 多聚甲醛中固定。将脑组织放入梯度蔗糖溶液中脱水,加入冷冻包埋液,冷冻后切成约 30 μm 厚的冠状切片。取切片放入含 0.01% Triton X-100 的 PBST 中洗涤,室温下用 3% 羊血清白蛋白封闭 30 min。PBST 洗净切片上的血清,将切片放入兔源单克隆 anti-rat Iba1(1∶100,美国 abcam 公司,ab178847)中,4 ℃孵育过夜。次日取出切片,PBST 洗净一抗稀释液后,浸入 Goat anti-rabbit Alexa 594 IgG(H + L)抗体(1∶500,美国 Abcam 公司,ab150080)中,室温下孵育 2 h。再以 DAPI 染液染色 15 min,滴加抗荧光猝灭剂,在荧光显微镜下拍摄海马区 Iba1 表达。

1.7 Western blot 检测 TLR4/NF-κB 信号通路蛋白表达

取小鼠海马组织,称重后加入含有 1% PMSF 的 RIPA 裂解液(上海碧云天生物公司,P0013),4 ℃匀浆形成细胞悬液,静置裂解 30 min。将总裂解物在 4 ℃下以 12 000 r/min 离心 30 min。取离心后上清液通过 BCA 蛋白定量试剂盒(P0012S,上海碧云天生物)测定蛋白浓度。在上清液中加入上样缓冲液(上海碧云天生物公司,P0280),通过 SDS-PAGE 分离等量的样品(20 μg 蛋白)。设置电泳时间 30 V/30 min,90 V/90 min,以上样缓冲液到达底端为终点。湿法转膜将凝胶上蛋白转移至 PVDF 膜(美国 Thermo 公司,88585)上,设置转膜时间 2 mA/60 min,全程冰浴。使用不同一抗孵育过夜:兔多克隆抗 NF-κB 和抗 p-NF-κB抗体(1∶1 000,北京博奥森生物公司,bs-34045R,bs-3543R),兔多克隆抗 TLR4 抗体(1∶1 000,北京博奥森生物公司,bs-20379R),兔多克隆抗NLRP3 抗体(1∶1 000,北京博奥森生物公司,bs-23722R)和兔多克隆抗 β-actin 抗体(1∶3 000,北京博奥森生物公司,bs-0061R)。使用对应羊抗鼠/兔 IgG(H + L)二抗稀释液(1∶5 000,武汉三鹰生物公司,SA00001-1、SA00001-2)孵育。取出 PVDF 膜,PBST 洗涤 3 次,膜上滴加 ECL 发光液(南京天能生物公司,180-501,180-5001),显影仪(南京天能生物,型号:1600/1600R)下显影并使用 Image J 软件分析。

1.8 统计学分析

所有实验结果采用 SPSS 22.0 统计学软件分析,

数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间数据比较采用单因素方差分析,组间数据多重比较采用 *Tukey* 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 依达拉奉对七氟醚诱导小鼠认知功能的影响

训练期间,各组小鼠逃避潜伏期都出现一定程度缩短。与 Con 组相比,Sev 组小鼠第 2 ~ 4 天逃避潜伏期显著较长($P<0.05$),Sev + Eda-L 组小鼠第 3 ~ 4 天逃避潜伏期显著较长($P<0.05$)。与 Sev 组相比,Sev + Eda-H组小鼠第 3 ~ 4 天逃避潜伏期显著较短($P<0.05$)。与 Sev + Eda-L 组相比,Sev + Eda-H 组小鼠第 4 天逃避潜伏期显著较短($P<0.05$),见表 1。

测试期间,各组小鼠在游泳速率没有差异的情况下,与 Con 组相比,Sev 组、Sev + Eda-L 组小鼠首次到达平台时间显著较长($P<0.05$),穿越平台次数、第Ⅰ象限停留时间显著较少/短($P<0.05$)。与 Sev 组相比,Sev + Eda-H 组小鼠首次到达平台时间显著较短($P<0.05$),穿越平台次数、第Ⅰ象限停留时间显著较多/长($P<0.05$)。与 Sev + Eda-L 组相比,Sev + Eda-H 组小鼠首次到达平台时间显著较短($P<0.05$),第Ⅰ象限停留时间显著较长($P<0.05$),见表 2。

表 1 各组小鼠水迷宫训练期间逃避潜伏期($\bar{x} \pm s$,$n=12$,s)

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
Con 组	80.67 ± 9.29	44.16 ± 19.21	24.03 ± 11.57	17.08 ± 5.53
Sev 组	82.02 ± 10.05	70.00 ± 15.73 *	64.55 ± 15.93 *	57.86 ± 13.94 *
Sev + Eda-L 组	80.20 ± 9.62	62.66 ± 18.68	50.39 ± 17.13 *	44.95 ± 13.10 *
Sev + Eda-H 组	79.06 ± 10.80	53.24 ± 19.98	35.15 ± 13.37#	20.31 ± 10.07#△

*:与 Con 组相比,$P<0.05$;#:与 Sev 组相比,$P<0.05$;△:与 Sev + Eda-L 组相比,$P<0.05$

表 2 各组小鼠水迷宫测试期间突触记忆功能指标($\bar{x} \pm s$,$n=12$)

组别	游泳速率/(mm · s^{-1})	首次到达平台时间/s	穿越平台次数/次	第Ⅰ象限停留时间/s
Con 组	207.08 ± 38.31	22.48 ± 7.23	6.25 ± 2.83	55.95 ± 6.83
Sev 组	203.03 ± 41.26	66.30 ± 20.57 *	1.33 ± 1.07 *	30.50 ± 11.28 *
Sev + Eda-L 组	208.06 ± 40.21	49.02 ± 18.39 *	3.33 ± 1.67 *	34.00 ± 10.32 *
Sev + Eda-H 组	206.57 ± 37.05	27.91 ± 10.91#△	5.00 ± 2.70#	49.04 ± 8.00#△

*:与 Con 组相比,$P<0.05$;#:与 Sev 组相比,$P<0.05$;△:与 Sev + Eda-L 组相比,$P<0.05$

2.2 依达拉奉对七氟醚诱导小鼠海马中氧化应激水平的影响

与 Con 组相比,Sev 组和 Sev + Eda-L 组小鼠海马中 SOD 活力显著降低($P<0.05$),MDA 水平显著升高($P<0.05$)。与 Sev 组和 Sev + Eda-L 组相比,Sev + Eda-H 组小鼠海马中 SOD 活力显著增加($P<0.05$),MDA 水平显著降低($P<0.05$),见表 3。

表 3 各组小鼠海马中 SOD 活力与 MDA 水平($\bar{x} \pm s$,$n=8$)

组别	SOD/(U · mg^{-1})	MDA/(nmol · mg^{-1})
Con 组	104.67 ± 15.62	1.60 ± 0.33
Sev 组	60.56 ± 10.46 *	3.31 ± 0.60 *
Sev + Eda-L 组	69.95 ± 8.76 *	2.70 ± 0.52 *
Sev + Eda-H 组	89.80 ± 11.81#△	1.95 ± 0.34#△

*:与 Con 组相比,$P<0.05$;#:与 Sev 组相比,$P<0.05$;△:与 Sev + Eda-L 组相比,$P<0.05$

2.3 依达拉奉对七氟醚诱导小鼠海马中 Iba1 表达的影响

与 Con 组相比,Sev 组、Sev + Eda-L 组小鼠海马中 Iba1 表达显著增加($P<0.05$);与 Sev 组相比,Sev + Eda-H 组小鼠海马中 Iba1 表达显著降低($P<0.05$),见图 1、2。

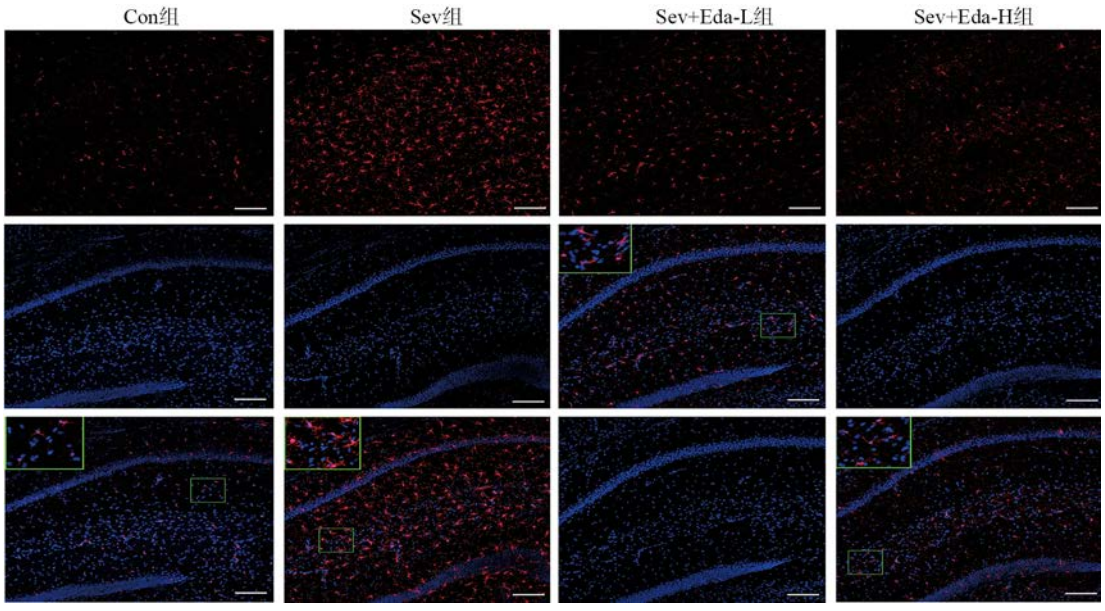
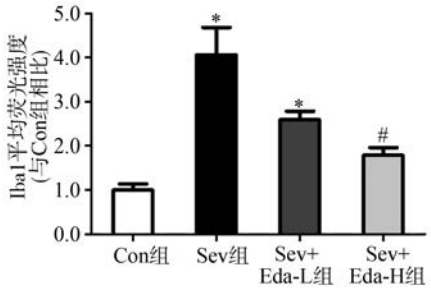
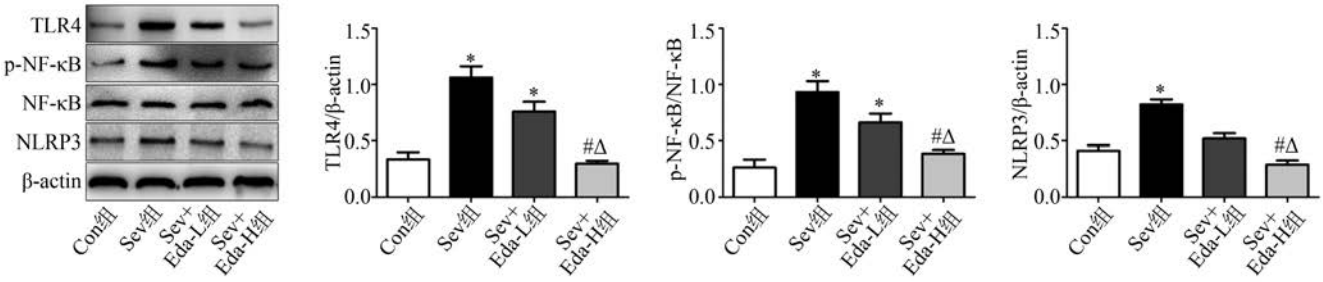


图 1 各组小鼠海马中 Iba1 染色结果(×200)



*:与 Con 组相比,$P<0.05$;#:与 Sev 组相比,$P<0.05$

图 2 各组小鼠海马中 Iba1 表达水平



*:与 Con 组相比,$P<0.05$;#:与 Sev 组相比,$P<0.05$;△:与 Sev + Eda-L 组相比,$P<0.05$

图 3 各组小鼠海马中 TLR4/NF-κB 信号通路蛋白表达与量化统计

2.4 依达拉奉对七氟醚诱导小鼠海马中 TLR4/NF-κB信号通路的影响

与 Con 组相比,Sev 组小鼠海马中 TLR4、p-NF-κB、NLRP3 表达水平显著升高($P<0.05$),Sev + Eda-L 组 TLR4、p-NF-κB 表达水平显著升高($P<0.05$);与 Sev 组和 Sev + Eda-L 相比,Sev + Eda-H 组小鼠海马中 TLR4、p-NF-κB、NLRP3 表达水平显著降低($P<0.05$),见图 3。

2.5 依达拉奉对七氟醚诱导小鼠海马中炎性细胞因子水平的影响

与 Con 组相比,Sev 组、Sev + Eda-L 组小鼠海马中 IL-6、IL-1β、TNF-α 含量显著升高($P<0.05$)。与 Sev 组和 Sev + Eda-L 组相比,Sev + Eda-H 组小鼠海马中 IL-6、IL-1β、TNF-α 含量显著降低($P<0.05$),见表 4。

表 4 各组小鼠海马中炎性细胞因子水平比较($\bar{x}\pm s$,$n=8$,pg·mg^{-1})

组别	IL-6	IL-1β	TNF-α
Con 组	52.65 ± 6.24	62.02 ± 6.59	363.39 ± 35.43
Sev 组	93.85 ± 7.54 *	97.85 ± 8.21 *	501.33 ± 33.19 *
Sev + Eda-L 组	77.68 ± 8.22 *	84.27 ± 13.65 *	425.50 ± 45.53 *
Sev + Eda-H 组	55.31 ± 9.23 #△	79.06 ± 10.79 #△	383.06 ± 38.59 #△

*:与 Con 组相比,$P<0.05$;#:与 Sev 组相比,$P<0.05$;△:与 Sev + Eda-L 组相比,$P<0.05$

3 讨论

本研究采用多次麻醉/手术的方法构建了老龄小鼠 POCD 模型,并通过 Morris 水迷宫实验判断模型构建是否成功。临床前研究中,Morris 水迷宫实验是探究啮齿类动物突触学习与记忆能力的常用方法[11]。其中,训练期间逃避潜伏期的变化可以反映小鼠的学习能力,测试期间的穿越平台次数与逃生平台象限停留时间可以反映小鼠的空间记忆能力。本研究结果显示,Sev 组小鼠逃避潜伏期较长,且穿越平台次数与平台象限停留时间较少/短,提示 Sev 组小鼠学习与记忆功能损伤,即老龄小鼠 POCD 模型构建成功。临床上治疗缺血性脑卒中常用的依达拉奉剂量为 30 ~ 60 mg·d^{-1},即为 0.5 ~ 1.0 mg·kg^{-1}·d^{-1}[12],由于小鼠与人体表面积换算约为 12.3,故小鼠尾静脉给药剂量为 6 ~ 12 mg·kg^{-1}·d^{-1}。然而本研究中,Morris 行为学结果显示,6 mg·kg^{-1}依达拉奉对小鼠学习与记忆能力改善并不明显,当依达拉奉剂量达到 12 mg·kg^{-1}时,小鼠学习与记忆能力得到显著改善。因此,临床治疗中依达拉奉剂量上调后才能发挥其对 POCD 的防治作用。

正常生理条件下,细胞呼吸会生成高反应活性的氧自由基,大量的活性氧自由基会作用于脂质发生过氧化反应,产生具有生物毒性的 MDA,造成细胞膜、线粒体、溶酶体等细胞器结构被破坏[13]。七氟醚全麻手术可诱发氧自由基释放增加,诱导氧化应激。此外,七氟醚刺激会干扰正常生理调节机制,抑制抗氧化酶活性,破坏抗氧化系统。本研究结果显示,Sev 组小鼠脑中氧化指标 MDA 水平升高,而抗氧化指标 SOD 活性降低,提示氧化应激的发生。依达拉奉作为一种高效的自由基清除剂,可经血液穿过血脑屏障,清除脑内氧自由基,抑制脂质过氧化[14]。本研究结果显示,虽然与 Sev 组相比,Sev + Eda-L 组 MDA 水平与 SOD 活力没有明显变化,提示临床等效剂量 6 mg·kg^{-1}依达拉奉对七氟醚诱导的氧化应激反应没有明显影响。只有当依达拉奉剂量达到12 mg·kg^{-1}时,MDA 水平与 SOD 活力恢复至基值,提示临床中应用 60 mg·d^{-1}剂量的依达拉奉治疗成人术后 POCD 能够明显改善认知功能。

有研究报道,POCD 中氧化应激反应往往伴随着过度激活的炎症反应[15]。氧自由基是炎症反应的效应因子,小胶质细胞过度活化是氧化应激反应的结果,其特征是 Iba1 急剧增加[16]。因此,针对氧化应激反应的治疗能够减轻炎症反应。TLR4 是位于小胶质细胞表面的模式识别受体,在氧化应激中活化并激活下游多种信号通路,导致 NF-κB 转移至细胞核内,从而促进其他炎性细胞因子释放,作用于中枢神经系统,导致认知功能障碍[17]。本研究中,6 $mg\cdot kg^{-1}$依达拉奉对 Iba1 表达没有显著影响,对 TLR4/NF-κB 信号通路和海马中 IL-6、IL-1β 及 TNF-α 含量也没有显著影响;然而,12 $mg\cdot kg^{-1}$依达拉奉治疗后,POCD 小鼠海马中 Iba1 表达明显减少,TLR4/NF-κB 信号通路明显受到抑制,且 IL-6、IL-1β 与 TNF-α 含量明显降低。该结果提示,依达拉奉对 POCD 小鼠海马中炎症反应的抑制作用存在剂量依赖性。

综上所述,因为 6 $mg\cdot kg^{-1}$依达拉奉的抗氧化作用并不显著,无法改善多次麻醉/手术造成的小鼠脑中炎性细胞因子释放,对小鼠学习与记忆能力改善并不显著。所以,临床上 0.5 $mg\cdot kg^{-1}$依达拉奉防治全麻手术患者 POCD 存在一定的局限性。同时本研究显示,对全麻手术患者 POCD 的防治作用可以通过上调依达拉奉剂量实现,在 12 $mg\cdot kg^{-1}$依达拉奉的治疗中,POCD 小鼠氧化应激反应受到明显抑制,炎症反应明显减轻,小鼠学习记忆能力明显改善。然而,由于依达拉奉给药多为静脉注射,因此针对依达拉奉剂量梯度上调的安全性探索仍待继续。

[参考文献]

[1] Xiao QX, Liu Q, Deng R, et al. Postoperative cognitive dysfunction in elderly patients undergoinghip arthroplasty[J]. Psychogeriatrics, 2020, 20(4):501 - 509. doi:10.1111/psyg.12516.

[2] Liu Q, Sun YM, Huang H, et al. Sirtuin 3 protects against anesthesia/surgery-induced cognitive decline in aged mice by suppressing hippocampal neuroinflammation[J]. J Neuroinflam, 2021, 18(1):41 - 55. doi:10.1186/s12974 - 021 - 02089 - z.

[3] Kong ZH, Chen X, Hua HP, et al. The oral pretreatment of glycyrrhizin prevents surgery-induced cognitive impairment in aged mice by reducing neuroinflammation and Alzheimer's-related pathology via HMGB1 inhibition[J]. J Mol Neurosci, 2017, 63(3):385 - 395. doi:10.1007/s12031 - 017 - 0989 - 7.

[4] Wang XX, Wang F, Mao GH, et al. NADPH is superior to NADH or edaravone in ameliorating metabolic disturbance and brain injury in ischemicstroke[J]. Acta Pharmacol Sin, 2022, 43(3):529 - 540. doi:10.1038/s41401 - 021 - 00705 - 5.

[5] Guo Z, Wu HT, Li XX, et al. Edaravone protects rat astrocytes from oxidative or neurotoxic inflammatory insults by restoring Akt/Bcl-2/Caspase-3 signaling axis[J]. IBRO Reports, 2020, 8(1):122 - 128. doi:10.1016/j.ibror.2020.04.003.

[6] Zhou Y, Wu X, Ye L, et al. Edaravone at high concentrations attenuates cognitive dysfunctions induced by abdominal surgery under general anesthesia in aged mice[J]. Metab Brain Dis, 2020, 35(2):373 - 383. doi:10.1007/s11011 - 019 - 00532 - y.

[7] Zhang NN, Sun L, Chen WT, et al. Effects of edaravone on postoperative cognitive function in elderly patients undergoing hip joint replacement surgery:a randomized controlled trial[J]. Int J Surg, 2020, 80:13 - 18. doi:10.1016/j.ijsu.2020.05.092.

[8] 刘鹏飞,王晓宁,赵斌江,等. 依达拉奉对腹腔热灌注化疗老年患者术后认知功能的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2016, 36(8):926 - 929. doi:10.3760/cma.j.issn.0254 - 1416.2016.08.005.

[9] Zhu Z, Ma L. Sevoflurane induces inflammation in primary hippocampal neurons by regulating Hoxa5/Gm5106/miR-27b-3p positive feedback loop[J]. Bioengineered, 2021, 12(2):12215 - 12226. doi:10.1080/21655979.2021.2005927.

[10] Tian Y, Guo S, Zhang Y, et al. Effects of hydrogen-rich saline on hepatetomy-induced postoperative cognitive dysfunction in old mice[J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(4):2579 - 2584. doi:10.1007/s12035 - 016 - 9825 - 2.

[11] Barry D, Commins S. A novel control condition for spatial learning in the Morris water maze[J]. J Neurosci meth, 2019, 318(1):1 - 5. doi:10.1016/j.jneumeth.2019.02.015.

[12] Yang DX, Li Y, Yu D, et al. Human urinary kallidinogenase combined with edaravone in treating acute ischemic stroke patients:a meta-analysis[J]. Brain Behav, 2021, 11(12):e2431. doi:10.1002/brb3.2431.

[13] Wang WT, Sun L, Sun CH, et al. PDIA3-regulted inflammation and oxidative stress contribute to the traumatic brain injury (TBI) in mice[J]. Biochem Bioph Res Co, 2019, 518(4):657 - 663. doi:10.1016/j.bbrc.2019.08.100.

[14] Bao Q, Hu P, Xu Y, et al. Simultaneous blood-brain barrier crossing and protection for stroke treatment based on edaravone-loaded ceria nanoparticles[J]. ACS Nano, 2018, 12(7):6794 - 6805. doi:10.1021/acsnano.8b01994.

[15] Xie X, Shen Z, Hu C, et al. Dexmedetomidine ameliorates postoperative cognitive dysfunction in aged mice[J]. Neurochem Res, 2021, 46(9):2415 - 2426. doi:10.1007/s11064 - 021 - 03386 - y.

[16] Yang Y, Kong FC, Ding QQ, et al. Bruceine D elevates Nrf2 activation to restrain Parkinson's disease in mice through suppressing oxidative stress and inflammatory response[J]. Biochem Bioph Res Co, 2020, 526(4):1013 - 1020. doi:10.1016/j.bbrc.2020.03.097.

[17] Zhang X, Dong HQ, Zhang SS, et al. Enhancement of LPS-induced microglial inflammation response via TLR4 under high glucose conditions[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(4):1571 - 1581. doi:10.1159/000373972.

(编辑:魏 源)