

二氢杨梅素对丙泊酚麻醉引起的大鼠认知功能障碍的影响及机制

张倩璐,李 祥,王 波,胡 洁,旷 昕*

(南华大学附属第一医院麻醉科,湖南 衡阳 421001)

摘 要: 二氢杨梅素(DMY)具有神经保护作用。本研究观察 DMY 对丙泊酚诱导的大鼠认知功能障碍的影响,并从小胶质细胞极化的角度探讨其机制。10 周龄 SD 大鼠先进行腹腔注射丙泊酚(100 mg/kg)一次,然后灌胃给药 DMY(每天 200 mg/kg),共 7 天。Morris 水迷宫测试发现 DMY 改善了丙泊酚诱导的认知功能障碍,Western blot 分析发现 DMY 下调了丙泊酚诱导的大鼠海马组织中 CD68 和 iNOS 的表达,而上调海马组织中 Arg1 的表达。ELISA 法检测发现 DMY 降低丙泊酚诱导的大鼠血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 和 IL-6 的水平,而增加 IL-4 和 IL-10 的水平(均 $P < 0.05$)。本研究结果阐明 DMY 改善了丙泊酚麻醉引起的大鼠认知功能障碍,其机制可能与调节小胶质细胞极化有关。

关键词: 二氢杨梅素; 丙泊酚; 认知功能障碍; 小胶质细胞极化; 一氧化氮合酶; 精氨酸酶 1

中图分类号:R614.2

文献标识码:A

Effects of dihydromyricetin on cognitive impairment induced by propofol anesthesia in rats

ZHANG Qianlu, LI Xiang, WANG Bo, HU Jie, KUANG Xin*

(Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China)

Abstract: Dihydromyricetin (DMY) has neuroprotective effect. The objective of this study is to observe the effect of dihydromyricetin (DMY) on cognitive impairment induced by propofol anesthesia in rats and explore its mechanism from microglia polarization. 10 weeks old male SD rats were administrated with propofol (100 mg/kg) by intraperitoneal injection once, then DMY (200 mg/kg per day) by gavage for 7 day. DMY improved the cognitive impairment induced by propofol through Morris water maze assay. Compared with the propofol group, expression of CD68 and iNOS in hippocampus was significantly down-regulated and expression of Arg1 in hippocampus was significantly up-regulated, the levels of serum TNF- α , IL-1 β) and IL-6 was significantly decreased and levels of IL-4 and IL-10 were significantly increased in the treatment of propofol and DMY group (all $P < 0.05$). This study elucidates that DMY improves cognitive impairment induced by propofol anesthesia in rats, which mechanism may be related with regulation of microglia polarization.

Key words: dihydromyricetin; propofol; cognitive dysfunction; microglia polarization; nitric oxide synthase; arginase 1

术后认知功能障碍(Postoperative cognitive dysfunction, POCD)是术后常见的神经系统并发症,主要临床表现有术后记忆力减退、注意力不集中和定向能力降低等,其发病机制至今尚未阐明清楚^[1]。麻醉药被认为是诱发 POCD 的主要原因。丙泊酚是

常用的静脉麻醉药,是通过激活 γ 氨基丁酸受体-氯离子复合物而起效。丙泊酚起效较快,诱导期短而平稳,苏醒较快,术后出现恶心呕吐等并发症的概率较低,常用于麻醉的诱导和维持及危重病人的镇静等^[2]。然而有研究显示丙泊酚可改变海马 Tau 蛋白磷酸化水平,而导致 POCD 的发生^[3],但是其发病机制还不清楚。研究表明中枢神经炎症在 POCD 中发挥了重要作用,而小胶质细胞是介导中

收稿日期:2018-10-24;修回日期:2018-12-20

基金项目:湖南省自然科学基金省市联合基金项目(2017JJ4049)。

* 通信作者,E-mail: kx6924@126.com.

枢神经炎症的主要功能细胞^[4-5]。二氢杨梅素(Di-hydromyricetin, DMY)是一种二氢黄酮醇类化合物,又名双氢杨梅素和福建茶素等,在杨梅科、葡萄科和柳科等植物的茎叶中也均有大量的存在^[6]。DMY具有抗炎、抗氧化和镇痛等广泛的药理作用^[7]。最近有研究表明DMY可通过上调海马中脑源性神经营养因子而改善2型糖尿病小鼠认知功能障碍^[8],具有神经保护作用。但DMY是否能改善丙泊酚麻醉诱导的大鼠认知功能障碍,其作用机制又是否与小胶质细胞介导的神经炎症有关,目前还不清楚。因此本研究通过观察DMY对丙泊酚麻醉引起的大鼠POCD的影响,并从小胶质细胞极化的角度探讨其可能机制,为POCD的防治提供新的策略和靶点。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

丙泊酚购自西安立邦制药有限公司,DMY购自成都曼斯特生物科技有限责任公司。BCA蛋白定量试剂购自美国Invitrogen公司;CD68、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)和精氨酸酶1(Arginase1, Arg1)和 β -actin抗和辣根过氧化物酶标记的二抗购自美国Santa Cruz公司。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、白介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、白介素-4(interleukin-4, IL-4)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)和白介素-10(interleukin-10, IL-10)酶联免疫吸附分析(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。Morris水迷宫实验系统购自成都泰盟科技有限公司。

1.2 实验动物

无特定病原体(Specific pathogen free, SPF)级Sprague-Dawley(S-D)大鼠,雄性,体质量为 200 ± 20 g,10周龄,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。大鼠饲养在专用动物房,室温为 22°C ,相对湿度为55%,12 h光照,大鼠能自由摄食和饮水。

1.3 实验分组

S-D大鼠随机地分为对照组、丙泊酚组、DMY组和丙泊酚组+DMY组,每组12只。丙泊酚组的大鼠通过腹腔注射100 mg/kg丙泊酚一次;DMY组大鼠灌胃给药DMY(每天200 mg/kg),共7天;丙泊酚组+DMY组大鼠预先进行腹腔注射100 mg/kg丙泊酚一次,然后灌胃给药DMY(每天200 mg/kg),灌

胃给药共7天。DMY用生理盐水溶解,对照组大鼠给予腹腔注射和灌胃等量的生理盐水。

1.4 Morris 水迷宫测试

灌胃给药结束后每组大鼠随机地分为两个亚组,一个亚组的大鼠用于Morris水迷宫测试,另一个亚组的大鼠用于取材进行Western blot分析。灌胃给药结束后进行Morris水迷宫实验,在训练的第1天将大鼠放入的水池中,进行自由游泳,以熟悉环境减少应激刺激。大鼠熟悉环境后,将大鼠引导至放置于水池第3象限的平台上,停留20 s,将大鼠推入水,待其再找到平台,训练共3天。随后进行定位航行实验,每天上午将大鼠面向池壁在标记的入水点依次放入水中,然后记录大鼠120 s内爬上平台并停留10 s所需要的时间,即逃避潜伏期,记录大鼠从入水到爬上平台的游泳距离,共进行5天。空间探索实验在定位航行实验结束后的第二天上午进行,将平台撤去,大鼠从第三象限进水,记录大鼠120 s内穿越平台区域次数和穿越平台区域的时间。

1.5 ELISA 法

尾静脉采血,1500 g,离心5 min,收集上清液。在酶标板的每个检测孔中加待测样本和酶结合物各50 μL ,空白对照孔不加, 37°C 孵育2 h。吸去液体,每孔加入100 μL 显色剂,混匀, 37°C 孵育15 min。用空白对照孔调零,设定酶标仪波长为450 nm,测定各孔的OD值。根据标准曲线,计算出血清标本中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-4和IL-10的水平。

1.6 Western Blot 检测

灌胃给药结束8天,在尾静脉采血结束后,脱颈椎处死大鼠,打开颅骨,取出脑组织,再小心取出海马。用预冷的PBS洗涤,按试剂盒说明提取海马组织总蛋白。采用BAC法测定总蛋白质浓度。取适量蛋白样本煮沸变性蛋白,再取蛋白样品10 μL ,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白。将蛋白转移到聚偏氟乙烯膜上,4%脱脂牛奶封闭聚偏氟乙烯膜2 h。加入兔抗大鼠CD68、iNOS、Arg1和 β -actin的一抗, 4°C 下孵育过夜。洗膜3次,加入二抗, 4°C 下孵育4 h。ECL试剂显影在胶片上,凝胶图像分析系统扫描胶片,并对结果进行分析处理。

1.7 统计学处理

实验中所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 18.0软件分析实验结果,采用单因素方差分析及LSD- t 检验进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 DMY 和丙泊酚对大鼠水迷宫实验中逃逸潜伏期的影响

结果如表 1 和表 2 所示:各组大鼠随着测试天数的增加,寻找平台的潜伏期均明显缩短;在定位

航行实验中的第一到第五天,丙泊酚组大鼠与对照组比较逃避潜伏期和到达平台游过的距离均显著延长(均 $P<0.05$);各组大鼠随着测试天数的增加,到达平台游过的距离均明显缩短,与丙泊酚组比较,丙泊酚+DMY 组大鼠的到达平台游过的距离均显著减小(均 $P<0.05$)。

表 1 DMY 和丙泊酚对大鼠水迷宫实验中逃逸潜伏期的影响

组别	第一天(s)	第二天(s)	第三天(s)	第四天(s)	第五天(s)
对照组	36.46±3.41	32.74±3.06	28.17±2.57	23.08±3.42	17.14±2.11
丙泊酚组	58.73±4.71 ^a	52.12±4.49 ^a	47.35±3.63 ^a	39.46±2.76 ^a	32.91±2.31 ^a
DMY 组	35.39±3.61	31.06±2.07	26.87±1.93	22.36±2.65	16.19±2.34
丙泊酚+DMY 组	41.22±3.09 ^b	36.83±3.55 ^b	31.13±2.79 ^b	27.79±2.24 ^b	19.61±2.47 ^b

与对照组比较,^a $P<0.05$;与丙泊酚组比较,^b $P<0.05$ ($n=6$)

表 2 DMY 和丙泊酚对大鼠水迷宫测试中到达平台游过的距离的影响

组别	第一天(m)	第二天(m)	第三天(m)	第四天(m)	第五天(m)
对照组	232.75±20.01	218.32±18.12	174.39±13.48	151.08±11.79	124.16±9.08
丙泊酚组	718.57±51.07 ^a	694.37±43.19 ^a	648.22±34.11 ^a	612.07±40.13 ^a	554.12±38.64 ^a
DMY 组	235.77±18.41	214.69±15.34	182.78±12.74	156.34±11.38	120.08±8.46
丙泊酚+DMY 组	342.83±28.11 ^b	308.64±27.33 ^b	233.45±23.44 ^b	186.94±14.93 ^b	153.69±13.48 ^b

与对照组比较,^a $P<0.05$;与丙泊酚组比较,^b $P<0.05$ ($n=6$)

2.2 DMY 和丙泊酚对大鼠水迷宫测试中穿越平台区域次数和时间的的影响

结果如表 3 所示:空间探索实验中,与对照组比较,丙泊酚组大鼠穿越平台区域次数明显减少,穿越平台区域时间明显缩短(均 $P<0.05$);与丙泊酚组比较,丙泊酚+DMY 组大鼠穿越平台区域次数明显增加,穿越平台区域时间明显延长(均 $P<0.05$)。

表 3 DMY 和丙泊酚对大鼠水迷宫测试中穿越平台区域次数和时间的的影响

组别	穿越平台区域次数	穿越平台区域时间(s)
对照组	8.69±0.74	38.39±5.14
丙泊酚组	3.12±0.43 ^a	17.23±1.46 ^a
DMY 组	9.14±0.76	39.81±4.54
丙泊酚+DMY 组	7.08±0.62 ^b	34.69±4.03 ^b

与对照组比较,^a $P<0.05$;与丙泊酚组比较,^b $P<0.05$ ($n=6$)

2.3 DMY 和丙泊酚对大鼠海马小胶质细胞活化的影响

采用 Western blot 检测了大鼠海马组织中小胶质细胞活化标志物 CD68 的表达,结果如图所示:与对照组比较,丙泊酚组 CD68 的表达显著上调,与丙

泊酚组比较,丙泊酚+DMY 组 CD68 的表达明显下调(均 $P<0.05$)。

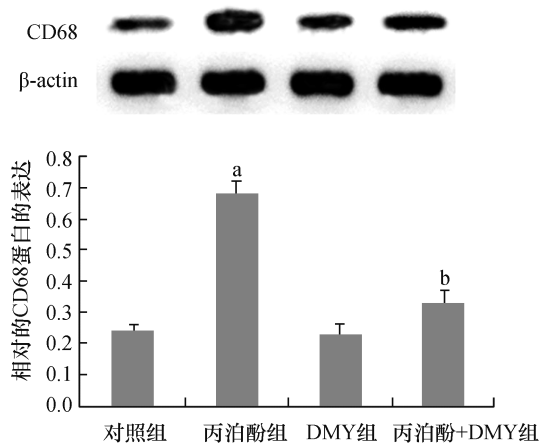


图 1 DMY 和丙泊酚对小胶质细胞活化的影响

与对照组比较,^a $P<0.05$;与丙泊酚组比较,^b $P<0.05$

2.4 DMY 和丙泊酚大鼠海马小胶质细胞极化的影响

如表 1 所示,与对照组比较,丙泊酚组血清中促炎细胞因子 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 和 IL-6 的水平显著增加,而血清中抗炎细胞因子 IL-4 和 IL-10 的水平显

著降低(均 $P < 0.05$)。与丙泊酚组比较,丙泊酚+DMY组血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的水平显著降低,而血清中 IL-4 和 IL-10 的水平显著增加(均 $P < 0.05$)。我们进一步检测了海马组织小胶质细胞 M1 型标志分子 iNOS 和 M2 型标志分子 Arg1 的蛋

白表达,结果如图 2 所示;与对照组比较,丙泊酚组海马组织中 iNOS 的表达显著性上调,而海马组织中 Arg1 显著性下调(均 $P < 0.05$)。与丙泊酚组比较,丙泊酚+DMY 组海马组织中 iNOS 的表达显著性下调,而海马组织中 Arg1 显著性上调(均 $P < 0.05$)。

表 4 DMY 和丙泊酚对大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-4 和 IL-10 水平的影响

组别	TNF- α ($\mu\text{g/L}$)	IL-1 β ($\mu\text{g/L}$)	IL-6 ($\mu\text{g/L}$)	IL-4 ($\mu\text{g/L}$)	IL-10 ($\mu\text{g/L}$)
对照组	14.81 $\pm$ 1.12	4.18 $\pm$ 0.56	16.72 $\pm$ 1.76	6.79 $\pm$ 0.81	21.73 $\pm$ 1.27
丙泊酚组	26.72 $\pm$ 2.07 ^a	8.21 $\pm$ 0.63 ^a	25.38 $\pm$ 1.54 ^a	3.57 $\pm$ 0.53 ^a	11.42 $\pm$ 1.03 ^a
DMY 组	15.30 $\pm$ 1.41	4.39 $\pm$ 0.59	14.86 $\pm$ 1.63	6.31 $\pm$ 0.74	20.03 $\pm$ 2.22
丙泊酚+DMY 组	17.83 $\pm$ 1.84 ^b	5.06 $\pm$ 0.72 ^b	18.75 $\pm$ 1.89 ^b	3.74 $\pm$ 0.46 ^b	17.29 $\pm$ 1.48 ^b

与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与丙泊酚组比较, ^b $P < 0.05$ ($n = 10$)

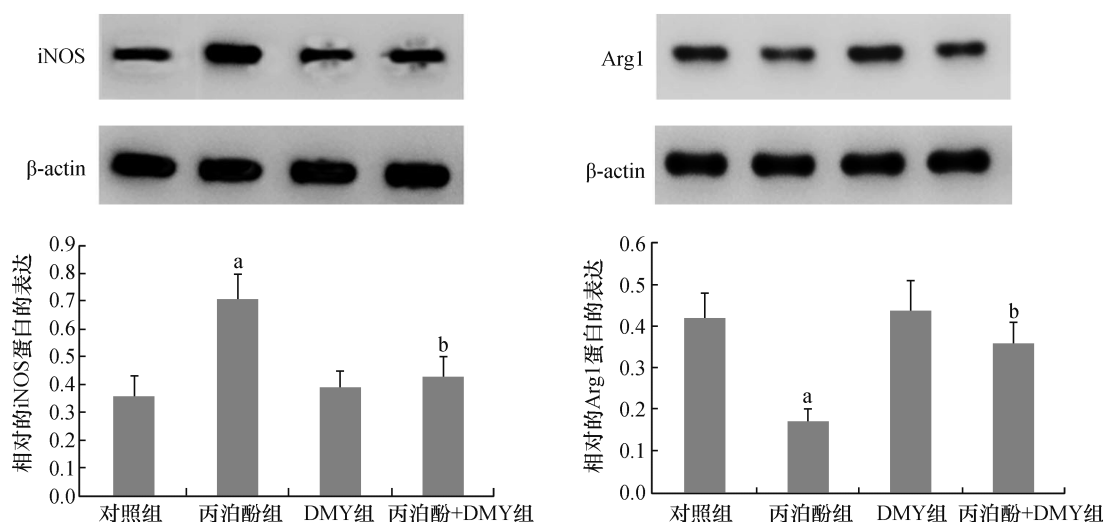


图 2 DMY 和丙泊酚对大鼠海马组织中 iNOS (A) 和 Arg1 (B) 蛋白表达的影响

与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与丙泊酚组比较, ^b $P < 0.05$

3 讨 论

POCD 是手术后常见的并发症,其临床症状主要包括记忆力减退、注意力不集中和语言理解能力降低和社会交往能力减退等,其临床症状常在手术后几天到几周内出现,可持续较长的时间。POCD 机制十分复杂,至今尚未阐明清楚,POCD 的发生可能与血脑屏障的功能紊乱、 β 淀粉样蛋白的代谢障碍、胆碱能神经系统的功能紊乱、神经炎症反应以及细胞自噬的异常等有关^[9]。丙泊酚是一种新型的静脉麻醉药物,可以抑制海马 CA1 区细胞突触的长时程增强,导致患者在应用丙泊酚麻醉后会出现 POCD。丙泊酚的起效时间短,苏醒快,而不良反应小是其主要优点。然而近年来的研究表明丙泊酚可通过增强 γ 氨基丁酸能神经元的活性,抑制谷氨酸能神经元的活性,从而干扰学习记忆相关

神经元的功能,抑制认知功能,产生顺行性和逆行性遗忘等认知障碍的表现^[10]。本实验中采用单剂量丙泊酚 (100 mg/kg) 腹腔注射给药,通过 Morris 水迷宫检测大鼠的空间记忆能力,结果显示大鼠在 Morris 水迷宫实验中的逃避潜伏期和到达平台游过的距离均显著延长,而大鼠穿越平台区域次数和时间明显减少,这些结果提示丙泊酚诱导了大鼠的认知功能障碍。

黄酮类化合物是一种具有 2-苯基色原酮结构的多酚化合物,具有抗炎、抗氧化和抗肿瘤等药理作用,近年来的研究表明黄酮类化合物对学习记忆能力和认知功能要改善作用^[11]。二氢杨梅素 (DMY) 是一种天然的二氢黄酮类化合物。最早从葡萄科蛇葡萄属植物椴叶玉葡萄的叶子中分离得到,又称为蛇葡萄素。DMY 在葡萄科、杨梅科、藤黄科和柳科等植物中均有分布,而在蛇葡萄幼嫩茎叶

中 DMY 的含量最高^[12]。DMY 的药理作用非常广泛,朱责梅等研究发现 DMY 可通过上调海马中脑源性神经营养因子而改善 2 型糖尿病小鼠认知功能障碍^[10]。本研究的结果显示 DMY (200 mg/kg/d) 灌胃给药显著抑制了丙泊酚诱导了大鼠的认知功能障碍,表现为大鼠在 Morris 水迷宫实验中的逃避潜伏期和到达平台游过的距离均显著减小,而大鼠穿越平台区域次数和时间明显增加。这些结果表明 DMY 改善了丙泊酚诱导的大鼠认知功能障碍,但其机制不清楚。

近年来神经炎症在 POCD 发病机制中作用受到了大量的关注,小胶质细胞作为中枢神经系统的主要免疫细胞,介导了神经炎症。小胶质细胞的激活有经典激活 (M1 型) 和替代激活 (M2 型) 两种形式^[13]。M1 型小胶质细胞分泌促炎细胞因子 (TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 IL-12 等) 可加剧神经炎症性损伤;相反, M2 型小胶质细胞释放抗炎细胞因子 (IL-4、IL-10 和转化生长因子 β), 可抑制神经炎症。小胶质细胞 M1 型极化和 M2 型极化的标志分子分别 iNOS 和 Arg1^[14]。认知功能是指大脑对信息的获取、储存、加工和提取的能力,也就是对事物的构成、事物的性能、该事物与他物的关系、事物的发展动力和方向及基本规律的把握能力,主要包括学习、记忆、语言、执行、计算和判断等^[15]。研究表明与空间学习和记忆等认知功能关系最密切的脑区是海马。丙泊酚诱导的大鼠认知功能障碍及 DMY 改善了丙泊酚诱导大鼠的认知功能障碍的机制是否与小胶质细胞极化介导的神经炎症有关呢? 因此我们为了检测了小胶质细胞极化的标志分子的表达及分泌的特异性细胞因子的水平。结果显示丙泊酚显著增加了大鼠海马组织中 iNOS 的表达和血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的水平,而显著性降低 Arg1 的表达和血清 IL-4 和 IL-10 的水平;与丙泊酚比较,丙泊酚+DMY 组大鼠海马组织中 iNOS 的表达和血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的水平显著降低,而 Arg1 的表达和血清 IL-4 和 IL-10 的水平显著增加。这些结果表明 DMY 改善了丙泊酚麻醉引起的大鼠认知功能障碍,其机制可能是通过抑制小胶质细胞 M1 型极化,促进 M2 型极化实现的。

总之我们的研究结果阐明 DMY 改善了丙泊酚麻醉引起的大鼠认知功能障碍,其机制可能与调节小胶质细胞极化有关。我们的研究为 POCD 的防治提供新的策略和靶点。

参考文献:

- [1] GONG GL, LIU B, WU JX, et al. Postoperative cognitive dysfunction induced by different surgical methods and its risk factors [J]. *Am Surg*, 2018, 84(9):1531-7.
- [2] 张耀之, 曾静贤, 李玉娟. 右旋美托咪定对丙泊酚抑制气管插管交感反应 EC50 的影响 [J]. *中南医学科学杂志*, 2014, 42(3):274-7.
- [3] MICHA G, TZIMAS P, ZALONIS I, et al. Propofol vs sevoflurane anaesthesia on postoperative cognitive dysfunction in the elderly. A randomized controlled trial [J]. *Acta Anaesthesiol Belg*, 2016, 67(3): 129-37.
- [4] CAO Y, LI Z, MA L, et al. Isoflurane induced postoperative cognitive dysfunction is mediated by hypoxia inducible factor 1 α dependent neuroinflammation in aged rats [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(6):7730-6.
- [5] LI Y, PAN K, CHEN L, et al. Deferoxamine regulates neuroinflammation and iron homeostasis in a mouse model of postoperative cognitive dysfunction [J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13(1): 268.
- [6] HUANG B, LI Y, YAO Y, et al. Dihydromyricetin from ampelopsis grossedentata protects against vascular neointimal formation via induction of TR3 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 838: 23-31.
- [7] LIU CM, YANG W, MA JQ, et al. Dihydromyricetin inhibits lead-induced cognitive impairments and inflammation by the adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase pathway in mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(30):7975-82.
- [8] LING H, ZHU Z, YANG J, et al. Dihydromyricetin improves type 2 diabetes-induced cognitive impairment via suppressing oxidative stress and enhancing brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroprotection in mice [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2018, 50(3): 298-306.
- [9] CAO M, FANG J, WANG X, et al. Activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) aggravated postoperative cognitive dysfunction and pathogenesis in aged rats [J]. *Brain Res*, 2018, 1684: 21-9.
- [10] 刘馨烛, 陈斌, 朱莎莎. 丙泊酚麻醉对患者短期记忆的影响 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2011, 27(1): 52-4.
- [11] SPENCER JP. The impact of fruit flavonoids on memory and cognition [J]. *Br J Nutr*, 2010, 104(3): 40-7.
- [12] LI H, LI Q, LIU Z, et al. The versatile effects of dihydromyricetin in health [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 1053617.
- [13] 张紫莹, 田绍文, 游咏. 神经炎症在神经退行性疾病和精神疾病中的病理生理作用 [J]. *中南医学科学杂志*, 2017, 45(3):312-4.
- [14] PAN MX, TANG JC, LIU R, et al. Effects of estrogen receptor GPR30 agonist G1 on neuronal apoptosis and microglia polarization in traumatic brain injury rats [J]. *Chin J Traumatol*, 2018, 21(4): 224-8.
- [15] 符岛, 符裕, 林德厚. 慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者认知状况的影响因素探讨 [J]. *中南医学科学杂志*, 2016, 44(2):162-5.

(本文编辑:秦旭平)