

白藜芦醇对老年大鼠术后认知功能的影响*

秦 起^{1**}, 李 芮¹, 曾庆繁^{2***}

(1. 贵州医科大学 麻醉学院, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学附院, 贵州 贵阳 550004)

[摘 要] 目的: 探讨白藜芦醇对老年雄性大鼠术后认知功能的影响。方法: 健康雄性老年 SD 大鼠 36 只, 采用随机数字表法随机均分成对照组、麻醉手术组和白藜芦醇 + 麻醉手术组, 白藜芦醇 + 麻醉手术组麻醉手术前连续 7 d 白藜芦醇 100 mg/kg 灌胃, 另两组给等容量的 1% 羟甲基纤维素钠溶液灌胃; 术后 24 h, 各组随机取 6 只大鼠行 Morris 水迷宫实验测试认知功能, 定向航行试验测逃避潜伏期, 空间探索实验测目标象限活动时间, 另 6 只大鼠水合氯醛麻醉后断头、冰上迅速剥离海马组织, 检测海马组织活性氧 (ROS)、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 及白细胞介素 1 β (IL-1 β) 含量。结果: 与对照组比较, 麻醉手术组的 ROS、MDA、TNF- α 、IL-1 β 含量明显升高, SOD 含量明显下降, 大鼠术后 Morris 水迷宫实验结果显示逃避潜伏期明显延长, 目标象限活动时间明显缩短, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与麻醉手术组比较, 白藜芦醇 + 麻醉手术组的 ROS、MDA、TNF- α 、IL-1 β 含量明显下降, SOD 含量明显升高; 大鼠术后 Morris 水迷宫实验结果显示逃避潜伏期缩短, 目标象限活动时间明显延长, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 白藜芦醇可明显降低老年大鼠术后海马组织的氧化应激和炎症反应水平, 改善老年大鼠术后认知功能障碍。

[关键词] 植物药疗法; 白藜芦醇; 大鼠; 氧化性应激; 术后认知功能障碍

[中图分类号] R614.4; R338.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)04-0427-04

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.04.010

Effect of Resveratrol on Postoperative Cognitive Dysfunction in Aged Rats

QIN Qi¹, LI Rui¹, ZENG Qinfan²

(1. Department of Anesthesiology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;

2. Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of resveratrol on postoperative cognitive dysfunction (POCD) in aged rats. **Methods:** 36 healthy male SD aged rats were randomly divided into 3 groups ($n = 12$): control group, anesthesia surgery group and resveratrol anesthesia surgery group. sevoflurane anesthesia group was given a gavage of resveratrol (100 mg/kg) for 7 consecutive days before surgery, other groups were given an equal volume of 1% sodium carboxymethylcellulose solution. 24 hours after operation, 6 rats were randomly selected from each group. The Morris water maze test was adapted to test the cognitive function, navigation test was chosen to test escape latency, space exploration test was chosen to test quadrant activity time. The other 6 rats were decapitated after chloral hydrate anesthesia. The hippocampus was quickly exfoliated on ice to detect ROS, MDA, SOD, TNF- α and IL-1 β content. **Results:** Compared with control group, the contents of ROS, MDA, TNF- α and IL-1 β in anesthesia surgery group were significantly increased, SOD content was significantly decreased, the Morris escape period was prolonged, quadrant activity time was significantly reduced, difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with anesthesia surgery group, ROS,

*[基金项目] 贵州省科技厅项目 (TN2014-75)

** 贵州医科大学 2016 级硕士研究生

*** 通信作者 E-mail: 445483296@qq.com

MDA, TNF- α and IL-1 β content in resveratrol anesthesia group were significantly decreased, SOD was significantly increased; the cruising period of the maze test was shortened, and quadrant activity time was obviously prolonged, difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Resveratrol can significantly reduce the oxidative stress and inflammatory response in hippocampus of aged rats after surgery and improve postoperative cognitive dysfunction in aged rats.

[**Key words**] plant drug therapy; resveratrol; rats; oxidative stress; postoperative cognitive dysfunction

术后认知功能障碍(POCD)是老年患者麻醉手术后严重的并发症之一,主要表现为精神异常、人格改变及学习记忆能力减退,严重影响了患者预后、降低患者生活质量。POCD发生的机制目前尚不清楚,研究认为麻醉及手术诱发的中枢神经系统的氧化应激及炎症反应是引起POCD的重要原因^[1-2]。随着人口老龄化及医疗技术的进步,大量的老年人接受麻醉手术,临床POCD的发生率明显增加,POCD的预防和治疗显得尤为重要。白藜芦醇是从植物中提取的天然化学物质,具有抗炎作用,其改善认知功能的作用日益受到重视^[3-4]。本研究拟通过观察白藜芦醇对老年大鼠七氟醚麻醉加剖腹探查术后认知功能及海马组织氧化应激、炎症反应的影响,为临床POCD的预防和治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

七氟醚(批号79111,美国艾伯维公司),白藜芦醇(北京索莱宝科技有限公司),丙二醛(MDA)试剂盒,超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(南京建成生物工程研究所),活性氧(ROS)试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),TNF- α 和IL-1 β ELISA试剂盒(上海欣博盛科技有限公司)。麻醉呼吸机及麻醉气体监护仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司),Morris水迷宫仪(贵州医科大学分子生物学实验室提供)

1.2 实验动物分组与处理

16~18月龄的健康雄性SD大鼠36只,体重550~600 g[贵州医科大学动物中心提供和饲养,许可证号为SCXK(黔)2018-0001],采用随机数字表法随机分成对照组、麻醉手术组和白藜芦醇+麻醉手术组,每组12只。白藜芦醇+麻醉手术组麻醉手术前连续7 d给予白藜芦醇100 mg/kg灌胃,对照组及麻醉手术组给予等容量的1%羟甲基纤维素钠溶液灌胃。

1.3 动物麻醉及手术

将需要麻醉的麻醉手术组及白藜芦醇+麻醉手术组老年大鼠置于透明的密闭塑料麻醉箱(50 cm×30 cm×30 cm),箱底铺一层钠石灰,将取暖器置于箱旁60 cm,维持鼠体温36~37℃,麻醉机调整为手控模式,从进气口吸入3%的七氟醚和2 L/min的氧气,出气口接麻醉气体监测仪和废气回收罐^[5-6]。检测出气口七氟醚及CO₂浓度,麻醉箱七氟醚浓度稳定在3%后放入手术大鼠,待大鼠翻正反射消失后将大鼠置入连接麻醉箱的麻醉面罩内继续麻醉并进行剖腹探查手术;固定大鼠四肢,剪除腹部手术区毛发,碘伏消毒3遍,布比卡因局部浸润麻醉后正中切开皮肤,切口长约4~5 cm,暴露腹白线,沿着腹白线用剪刀把腹膜剪开进入腹腔,用镊子依次探查腹腔脏器,探查完成后用手术缝合线缝合腹膜和皮肤,手术结束后使用利多乳膏涂抹手术伤口镇痛,术后把大鼠放回麻醉箱继续麻醉。整个麻醉手术时间为2 h,麻醉过程中保持自主呼吸,密切观察监护仪的血氧饱和度及鼠皮肤颜色及呼吸幅度,麻醉结束后待大鼠自然清醒后放回鼠笼中。对照组大鼠不予麻醉和手术,仅吸入2 L/min的氧气2 h。

1.4 观察指标

1.4.1 海马组织ROS的测定 将大鼠腹腔注射水合氯醛麻醉后断头处死,迅速在冰上剥离海马组织,制成单细胞悬液,收集细胞后BCA法测定蛋白浓度;将收集的细胞加入含有10 μ mol/L的DCFH-DA无血清培养液中,37℃细胞培养箱抚育20 min,采用荧光酶标仪检测各组大鼠海马组织ROS的荧光强度,结果以1 mg蛋白的荧光强度(RFU)来表示。

1.4.2 海马组织MDA、SOD含量的测定 采用TBA法测MDA的含量,WST-1法测SOD的含量。于-80℃冰箱取出新鲜海马组织标本,剪碎后加适量PBS(100 mg组织加0.9 mL),超声破碎仪破碎海马组织,12 000 r/min离心10 min,取上清BCA法测定蛋白浓度,分别置于96孔板,用酶标

仪检测,通过稀释倍数和组织的蛋白浓度计算海马 MDA、SOD 含量。

1.4.3 海马组织 TNF-α、IL-1β 的含量 取蛋白定量后的海马组织匀浆上清,用 ELISA 试剂盒测定大鼠海马 TNF-α 和 IL-1β 含量。用酶标仪测定标准品和样品的吸光度值,根据标准品的浓度和吸光度值绘制标准曲线,计算样品中 TNF-α、IL-1β 的浓度,根据稀释倍数和组织的蛋白浓度计算海马 TNF-α、IL-1β 的含量。

1.4.4 大鼠认知功能 Morris 水迷宫试验 术后第 1 天开始定向航行试验测逃避潜伏期,每组各取 6 只大鼠,每天训练 1 次(包括 4 个象限),每个象限 60 s,连续 5 d。潜伏平台放在第 IV 象限内,训练时依次从 4 个象限的同一点将大鼠放入水中,大鼠从入水到找到潜伏平台时间为本次逃逸潜伏期(escape latency),大鼠找到潜伏平台后让其在上面停留 15 s,如果大鼠在 60 s 内未找到潜伏平台则人为将其引导上潜伏平台停留 15 s,每天 4 个象限逃逸潜伏期平均值作为当天逃逸潜伏期,连续测试 5 d。在术后第 6 天开始空间探索实验测试目标象限活动时间,将潜伏平台移开,选定第 II 象限同一点为入水点,记录大鼠 60 s 内穿过目标象限活动

时间。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较、方差齐性采用 SNK 法检验,方差不齐采用 *dunnett T3* 进行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 海马组织 ROS、MDA 及 SOD 含量

与对照组比较,麻醉手术组 ROS、MDA 含量显著增加,SOD 含量显著下降;与麻醉手术组比较,白藜芦醇 + 麻醉手术组 ROS、MDA 的含量显著下降,SOD 含量显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.2 海马组织 TNF-α 及 IL-1β 的含量

与对照组比较,麻醉手术组 TNF-α、IL-1β 的含量显著增加;与麻醉手术组比较,白藜芦醇 + 麻醉手术组 TNF-α、IL-1β 的含量显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 3 组大鼠海马组织 ROS、MDA、SOD 及 TNF-a 及 IL-1β 含量($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 The content of ROS,MDA,SOD ,TNF-a, IL-1β in the brain tissue of rats in each groups

指标	对照组	麻醉手术组	白藜芦醇 + 麻醉手术组
ROS(RFU)	50.75 ± 7.36	80.00 ± 11.91 ⁽¹⁾	64.50 ± 4.79 ⁽²⁾
SOD(U/mg)	153.12 ± 4.53	115.84 ± 14.19 ⁽¹⁾	134.54 ± 4.67 ⁽²⁾
MDA(μmol/g)	2.15 ± 0.06	2.68 ± 0.03 ⁽¹⁾	2.36 ± 0.11 ⁽²⁾
TNF-a(ng/g)	248.52 ± 8.81	380.91 ± 43.68 ⁽¹⁾	314.10 ± 15.04 ⁽²⁾
IL-1β(ng/g)	206.34 ± 27.54	329.41 ± 16.85 ⁽¹⁾	289.11 ± 13.18 ⁽²⁾

⁽¹⁾ 与对照组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与麻醉手术组比较, $P < 0.05$

2.3 大鼠认知功能测试

与对照组比较,麻醉手术组 3 ~ 5 d 时逃避潜伏期明显延长,目标象限活动时间明显缩短;与麻醉手术组比较,白藜芦醇 + 麻醉手术组 3 ~ 5 d 时逃避潜伏期明显缩短,目标象限活动时间明显延长,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

3 讨论

七氟醚对人体的呼吸及循环系统影响较小,麻醉给药起效快、术中维持良好、术后苏醒快,常用于老年患者麻醉的诱导及维持,但是近年来关于七氟醚麻醉可能引起术后 POCD 的研究越来越引起重

表 2 3 组大鼠 Morris 水迷宫测试结果($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Tab.2 Comparison of Morris water maze test in each group

指标	对照组	麻醉手术组	白藜芦醇 + 麻醉手术组
逃避潜伏期(s)			
第 1 天	59.7 ± 0.4	59.5 ± 0.8	58.9 ± 1.1
第 2 天	42.5 ± 7.0	52.5 ± 3.4	45.2 ± 7.9
第 3 天	33.4 ± 2.5	46.7 ± 2.9 ⁽¹⁾	40.1 ± 1.3 ⁽²⁾
第 4 天	21.4 ± 6.0	39.7 ± 2.3 ⁽¹⁾	31.5 ± 2.5 ⁽²⁾
第 5 天	14.9 ± 1.3	29.7 ± 3.6 ⁽¹⁾	22.5 ± 4.4 ⁽²⁾
目标象限活动时间(s)	44.7 ± 3.1	26.0 ± 5.3 ⁽¹⁾	35.7 ± 4.0 ⁽²⁾

⁽¹⁾ 与对照组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与麻醉手术组比较, $P < 0.05$

视^[7-8]。POCD 在临床主要表现为精神异常、人格改变及学习记忆能力减退等,研究表明 POCD 的发生与患者年龄、麻醉、手术、术前合并症、基础认知能力、良好教育及基因差异等多种因素有关,常发生在腹部、心脏等大手术术后^[9-10]。本试验以老年大鼠为研究对象,采用七氟醚麻醉加剖腹探查术来模拟临床老年患者麻醉手术过程,术后 24 h 后通过 Morris 水迷宫试验检测评价处理因素对大鼠认知功能的影响。试验结果显示与比对照组相比,麻醉手术组老年大鼠术后第 3~5 天的逃避潜伏期明显延长,目标象限活动时间明显缩短,实验结果说明老年大鼠七氟醚麻醉加剖腹探查术后出现了早期认知功能障碍。文献报道白藜芦醇 100 mg/kg 灌胃可以缓解小鼠异氟醚麻醉后的认知减退^[11]。本次试验采用此试验方案,每天给予 100 mg/kg 的白藜芦醇,连续灌胃 7 d,结果显示,与麻醉手术组相比,白藜芦醇 + 麻醉手术组老年大鼠第 3~5 天时逃避潜伏期明显缩短,探索时间延长,说明上述试验剂量的白藜芦醇灌胃对老年大鼠七氟醚麻醉加剖腹探查术 POCD 产生了保护作用。

POCD 发生的确切机制目前尚不清楚,大量的研究认为是在中枢神经系统衰老的基础上由麻醉和手术刺激诱发,多种因素综合作用的结果,而氧化应激及炎症反应在其中扮演重要作用^[12]。海马是学习记忆的关键部位,麻醉和手术诱发的强烈而持续的氧化应激及炎症反应会造成海马损伤,影响学习记忆能力,从而诱发 POCD^[13]。在试验中,麻醉手术组老年大鼠海马组织的 ROS、MDA、TNF- α 、IL-1 β 含量明显增加,SOD 含量明显下降,说明氧化应激及炎症反应在诱发 POCD 的作用中确实起着重要作用,与上述的研究结论一致。进一步的研究表明,麻醉后脾切除的大鼠发生 POCD 与促炎介质的合成增多有关,减轻促炎介质的释放是防治术后 POCD 的关键^[14]。白藜芦醇广泛存在于自然界的植物中,具有抗氧化应激、抗感染、调节糖脂代谢、神经保护、延缓衰老等多种作用。李浩等^[15]研究表明白藜芦醇对肥胖大鼠异氟醚麻醉后的认知功能有明显保护作用。有研究认为术前单次给予白藜芦醇并没有保护作用,而给予载有白藜芦醇的纳米乳剂可降低手术后 TNF- α 、IL-1 β 含量,改善术后认知^[16]。在本实验中,经过 7 d 白藜芦醇灌胃处理后老年大鼠海马组织 ROS、MDA 含量明显降低,SOD 含量明显增加,TNF- α 、IL-1 β 含量明显降低,说明实验中的白藜芦醇剂量可以降低老年大鼠

麻醉术后海马组织的氧化应激及炎症水平,对老年大鼠的认知产生了保护作用。

综上所述,白藜芦醇灌胃后通过降低老年大鼠七氟醚麻醉加剖腹探查术后海马组织的氧化应激及炎症水平,对认知有保护作用。由于白藜芦醇来源广泛,副作用少,作用机制明确,是 SIRT1 受体最强激活剂^[17],具有有广泛的应用前景,接下来的试验有必要对白藜芦醇的安全剂量及可能的机制做更进一步研究探讨,为临床麻醉术后 POCD 的预防和治疗提供新策略。

4 参考文献

- [1] QIU L L, LUO D, ZHANG H, et al. Nox-2 mediated phenotype loss of hippocampal parvalbumin interneurons might contribute to postoperative cognitive decline in aging mice[J]. *Front Aging Neurosci*, 2016, 8(234): 1-17.
- [2] SKVARC D R, BERK M, BYRNE L K, et al. Post-Operative Cognitive Dysfunction: An exploration of the inflammatory hypothesis and novel therapies [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2018, 84: 116-133.
- [3] 张春霞, 陈刚, 李娟. 白藜芦醇的延缓衰老作用及应用前景[J]. *中国老年学*, 2015, 35(23): 6915-6918.
- [4] KEYLOR M H, MATSUURA B S, STEPHENSON C R. Chemistry and biology of resveratrol-derived natural products [J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(17): 8976-9027.
- [5] ZHANG Q, LI Y, BAO Y, et al. Pretreatment with nimodipine reduces incidence of POCD by decreasing calcineurin mediated hippocampal neuroapoptosis in aged rats [J]. *BMC Anesthesiology*, 2018, 18(1): 42-48.
- [6] 曹剑, 李鹏, 易斌, 等. 老年和成年大鼠术后认知功能障碍模型的建立与比较[J]. *重庆医学*, 2010, 39(17): 2292-2293.
- [7] 林文冬, 仓静, 方芳. 七氟醚对术后认知功能影响的研究进展[J]. *中国临床医学*, 2013, 20(5): 727-732.
- [8] 刚绍鹏, 方开云, 马熠, 等. 异氟醚和七氟醚对老年患者术后认知功能的影响[J]. *临床麻醉学杂志*, 2018, 34(2): 153-155.
- [9] ALALAWI R, YASMEEN N. Postoperative cognitive dysfunction in elderly: A review comparing the effects of desflurane and sevoflurane [J]. *Perianesth Nurs*, 2018, 33(5): 732-740.
- [10] 于璐, 马鸿雁, 石景辉. 术后认知功能障碍的影响因素[J]. *医学综述*, 2018, 24(9): 1781-1784.
- [11] 孙强, 李晓敏, 孙合亮, 等. 白藜芦醇对异氟醚吸入诱发老年小鼠认知功能障碍的影响[J]. *江苏医药*, 2013, 39(24): 2959-2961.

(下转第 452 页)