

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.03.007

红景天苷对大鼠骨折术后认知功能的改善作用及对海马大麻素2型受体表达的影响

唐保明,李钊伟,杨爱荣,王卓亚[△]

(青海大学附属医院,青海 西宁 810001)

摘要:目的 探讨红景天苷对大鼠骨折术后认知功能的改善作用及对海马大麻素2型受体(CB2R)表达的影响。方法 将60只大鼠随机均分为对照组、术后认知功能障碍(POCD)组和红景天苷组,各20只。POCD组和红景天苷组大鼠行胫骨骨折内固定术制备POCD模型,大鼠苏醒后,红景天苷组灌胃给予75 mg/kg的红景天苷,对照组和POCD组灌胃给予等量生理盐水,持续到术后第7天。于术前1 d、术后第1,7天时行旷场实验和恐惧测试。结果 3组大鼠各时点旷场实验探索总路程和声音恐惧测试僵直时间百分比比较,无明显差异($P > 0.05$)。与对照组相比,POCD组和红景天苷组大鼠术后1 d场景恐惧测试僵直时间百分比降低($P < 0.05$);与POCD组相比,红景天苷组术后7 d百分比升高($P < 0.05$)。与对照组比,POCD组和红景天苷组不同时点血清中白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)含量及海马组织中CB2R和CD11b含量均增加($P < 0.05$);与POCD组相比,红景天苷组不同时点各指标含量降低($P < 0.05$)。结论 红景天苷可改善大鼠骨折术后POCD,其机制可能通过抑制海马CB2R表达和海马小胶质细胞活化,减轻炎症反应有关。

关键词:红景天苷;大麻素2型受体;术后并发症;认知功能障碍;大鼠

中图分类号:R932;R285.5

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)03-0024-04

Improvement of Salidroside on Cognitive Function After Fracture Surgery in Rats and Its Effect on CB2R Expression in Hippocampus

TANG Baoming, LI ZhaoWei, YANG Airong, WANG Zhuoya

(Qinghai University Affiliated Hospital, Xining, Qinghai, China 810001)

Abstract: Objective To investigate the improvement of salidroside on cognitive function after fracture surgery in rats and its effect on cannabinoid 2 receptor (CB2R) expression in hippocampus. **Methods** Sixty rats were randomly divided into the control group, the post-operative cognitive dysfunction (POCD) group and the salidroside group, 20 rats in each group. POCD model was made by internal fixation of tibial fracture in the POCD group and salidroside group. The salidroside group was given 75 mg/kg salidroside by gavage after awakening, while the control group and the POCD group were given saline by gavage until 7 d after operation. Open field test and fear test were performed at 1 d before operation, 1 d after operation and 7 d after operation. **Results** There was no significant difference in the total distance of exploration and phobia test in the open field test and percentage of rigidity time in sound fear test at each time point among the three groups ($P > 0.05$). Compared with the control group, the percentage of stiffness time in scene fear test of the POCD group and the salidroside group was significantly decreased at 1 d after operation ($P < 0.05$); compared with the POCD group,

第一作者:唐保明,男,硕士研究生,副主任医师,研究方向为四肢及骨盆创伤的治疗,(电子信箱)18697126038@163.com。

[△]通信作者:王卓亚,女,博士研究生,副主任医师,副教授,研究方向为慢性高原病及老年慢性疾病的机制,(电子信箱)13997296043@163.com。

Immunology, 2015,76(2-3):95-101.

[18] 王惠琳,孟继龙,张伟伟,等. 窄谱中波紫外线治疗对寻常性银屑病患者Th17/Treg失衡的影响[J]. 实用皮肤病学杂志,2018,11(5):266-269.

[19] 李燕,曾兰瑶,王艺淳. 外周血Treg细胞与Th17细胞在寻常型银屑病中的表达及临床意义[J]. 实用预防医学,2018,25(1):93-95.

[20] OWCZARCZYK-SACZONEK A, CZERWIŃSKA J, PLACEK W, et al. The role of regulatory T cells and anti-inflammatory cytokines in psoriasis[J]. Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat, 2018,27(1):17-23.

[21] CHEN H, LIU H, LU C, et al. PSORI-CM02 Formula Increases CD4⁺ Foxp3⁺ Regulatory T Cell Frequency and Ameliorates Imiquimod-Induced Psoriasis in Mice[J]. Frontiers Immunology, 2018,8:1767.

[22] NEDOSZYTKO B, LANGE M, SOKOŁOWSKA-WOJDYŁO M, et al. The role of regulatory T cells and genes involved in their differentiation in pathogenesis of selected inflammatory and neoplastic skin diseases. Part I: Treg properties and functions[J]. Postepy Dermatol Alergol, 2017,34(4):285-294.

[23] 翟春艳,底婷婷,赵京霞,等. 解毒药与凉血药配伍对咪喹莫特诱导的银屑病样小鼠模型的干预作用[J]. 首都医科大学学报,2018,39(2):243-251.

(收稿日期:2019-05-26;修回日期:2019-08-01)

the percentage of stiffness time in scene fear test of the salidoside group was significantly increased at 7 d after operation ($P < 0.05$). Compared with the control group, the levels of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in serum and CB2R and CD11b in hippocampus of the POCD group and the salidoside group were significantly increased at different time points ($P < 0.05$); compared with the POCD group, the levels of IL-6, TNF- α and MCP-1 in serum and CB2R and CD11b in hippocampus of the salidoside group were significantly decreased at different time points ($P < 0.05$). **Conclusion** Salidoside can improve POCD in rats after fracture surgery. Its mechanism may be related to inhibiting CB2R expression in hippocampus and microglia activation in hippocampus, as well as alleviating inflammation.

Key words: salidoside; cannabinoid 2 receptor; postoperative complications; cognitive dysfunction; rats

术后认知功能障碍(POCD)被认为是大手术的常见并发症,特征是术后短期或/和长期的学习、记忆和执行能力等神经心理测试成绩较术前水平有所下降^[1]。POCD与住院时间延长、日常功能受损和死亡风险增加等不良结局有关^[2]。手术创伤引起的炎症反应过程在POCD的发生中起着关键作用,术后记忆缺失与血浆和海马组织中细胞因子水平的升高是平行的,而阻断炎症反应过程可减轻记忆功能障碍^[3-4]。在正常的静息状态下,免疫系统能分泌低水平的促炎细胞因子[如白细胞介素1(IL-1)、IL-6和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等],积极调节神经回路的重构,促进记忆巩固和神经发生。但这些促炎细胞因子过量生产会引起神经毒性反应,对记忆和神经产生直接的有害影响,最终导致POCD^[5]。大麻素2型受体(CB2R)主要存在于外周免疫系统,具有抗炎和免疫调节作用。在神经系统发生炎症时,脑内CB2R表达显著上调^[6]。CB2R在神经系统中的保护作用已在动物模型中得到证实,特别是在阿尔茨海默病和中风的动物模型中^[7]。红景天苷是红景天的主要有效成分,具有抗氧化损伤、清除自由基和提高记忆力等作用^[8]。本研究中通过制备大鼠胫骨骨折模型,给予红景天苷进行干预,观察大鼠认知功能改善情况,并探讨其潜在机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物、试剂与仪器

实验动物:选择18~20个月龄健康雄性SD大鼠60只,体质量450~500g,购自中南大学医学院动物中心,动物实验许可证号为SCXK(湘)2008-0004,动物合格证编号为2007000577866。大鼠在SPF环境中自由进食和饮水,适应性喂养1周后进行实验。所有实验均按照国家卫生研究院《实验动物护理和使用指南》进行。

试剂:红景天苷(西安飞达生物技术有限公司,纯度>95%);异氟醚(鲁南贝特制药有限公司);10%水合氯醛(上海上药新亚药业有限公司);IL-6, TNF- α 和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司);鼠抗CB2R及CD11b单克隆抗体(美国Santa Cruz公司);鼠抗GADPH单克

隆抗体和辣根过氧化物酶HRP标记山羊抗鼠IgG二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);免疫组化试剂盒(福州迈新生物技术有限公司)。

仪器:HBS-1096B型酶标仪(南京德铁实验设备有限公司);Primo R型台式冷冻离心机(德国Heraeus公司);BD垂直电泳仪(美国BD公司);EC 300型凝胶成像仪(美国UVP公司);组织脱水机、包埋机、全自动轮转切片机等病理配套设备(德国Leica公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模

将大鼠随机均分为对照组、POCD组和红景天苷组,各20只。所有大鼠均用3.0%异氟醚诱导麻醉,切开膝关节下皮肤,显露胫骨,将0.3mm针插入其髓腔内,进行固定。除对照组外,其他组大鼠在胫骨中点处截断骨头。用无菌生理盐水清洗伤口,缝合。待大鼠苏醒后回笼。大鼠苏醒后,红景天苷组给予75mg/kg红景天苷灌胃,对照组和POCD组给予等量生理盐水灌胃,持续到术后第7天。

1.2.2 旷场实验

每组选10只大鼠,于术前1d和术后1,7d分别进行旷场实验,评估大鼠自发活动能力。保持九宫格旷场箱处于弱光、安静环境,将大鼠放入旷场箱中央,任其自由行动,采集大鼠5min内活动轨迹,用SuperMaze高通量动物行为实验分析软件计算观测时间内的运动距离。

1.2.3 恐惧实验

每组选10只大鼠,于术前1d进行恐惧条件反射训练。将大鼠放入实验箱中接受声音和足底刺激,以建立长期记忆。于术后1,7d分别进行恐惧条件反射测试,记录5min内大鼠僵直时间,用DigBehv动物行为分析系统记录僵直时间百分比。

1.2.4 检测指标测定

血清中IL-6, TNF- α , MCP-1含量:旷场实验和恐惧实验结束后,对大鼠进行心脏取血,分离血清,采用ELISA法检测含量,严格按ELISA试剂盒说明书操作。

海马组织中CB2R含量:大鼠处死后分离海马组织,-80℃保存备用。海马组织(每组10只)用PIPA裂解液进行蛋白质提取,采用BCA蛋白检测试剂盒测定

上清液中总蛋白浓度。用 100 ℃ 沸水对蛋白进行预变性电泳,每孔上样 30 μg,将印迹到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,用 5% 脱脂牛奶在室温下封膜 1 h,加入鼠抗 CB2R 抗体(1:1 000)和 GADPH 抗体(1:10 000),4 ℃ 过夜,冲洗后,将膜与辣根过氧化物酶 HRP 标记山羊抗鼠 IgG 二抗(1:10 000)在室温下孵育 30 min。用电化学发光(ECL)法显色,采集图像,用图像分析软件(AlphaEaseFC 软件)分析。

海马组织中 CD11b 含量:海马组织(每组 10 只)用福尔马林固定,脱水,包埋,将蜡块切成 3 μm 厚切片,用 5% 牛血清白蛋白封闭 20 min,磷酸盐缓冲液洗涤,4 ℃ 下用鼠抗 CD11b 单克隆抗体(1:2 000)孵育过夜。冲洗后,切片用 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗(1:50)在室温下黑暗中孵育 2 h,洗涤后用荧光显微镜和成像系统对免疫染色切片进行观察。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 23.0 统计学软件分析。实验结果采用均数 ± 标准差($\bar{X} \pm s$),行单因素方差分析,组间两两比较行 SNK-q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 旷场实验探索总路程

3 组各时点旷场实验探索总路程比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见表 1。

表 1 3 组大鼠不同时点旷场实验探索总路程比较($\bar{X} \pm s, \text{cm}, n=10$)

组别	术前 1 d	术后 1 d	术后 7 d
对照组	1 765.16 ± 368.12	1 648.26 ± 328.24	1 599.34 ± 322.41
POCD 组	1 706.00 ± 125.30	1 542.59 ± 260.21	1 651.72 ± 328.14
红景天苷组	1 682.38 ± 461.28	1 597.64 ± 249.07	1 488.26 ± 347.53

2.2 恐惧测试僵直时间

与对照组相比,POCD 组和红景天苷组术后 1 d 场

景恐惧测试僵直时间百分比降低($P < 0.05$);与 POCD 组相比,红景天苷组术后 7 d 场景恐惧测试僵直时间百分比升高($P < 0.05$);3 组各时点声音恐惧测试僵直时间百分比比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见表 2。

表 2 3 组大鼠不同时点恐惧测试僵直时间比较($\bar{X} \pm s, \%, n=10$)

组别	场景恐惧测试僵直时间百分比		声音恐惧测试僵直时间百分比	
	术后 1 d	术后 7 d	术后 1 d	术后 7 d
对照组	71.26 ± 13.26	45.31 ± 8.24	53.14 ± 73.56	22.45 ± 7.16
POCD 组	49.20 ± 8.64 ^a	28.12 ± 4.68 ^a	54.91 ± 9.63	19.64 ± 9.54
红景天苷组	59.64 ± 7.62 ^{ab}	41.97 ± 5.14 ^b	50.43 ± 13.48	18.79 ± 5.32

注:与对照组相比,^a $P < 0.05$;与 POCD 组相比,^b $P < 0.05$ 。表 3 同。

2.3 各项检测指标

与对照组相比,POCD 组和红景天苷组不同时点血清中 IL-6, TNF- α , MCP-1, 以及海马组织中 CB2R 和 CD11b 含量均增加($P < 0.05$);与 POCD 组相比,红景天苷组各检测指标含量均降低($P < 0.05$)。详见表 3 及图 1 至图 3。

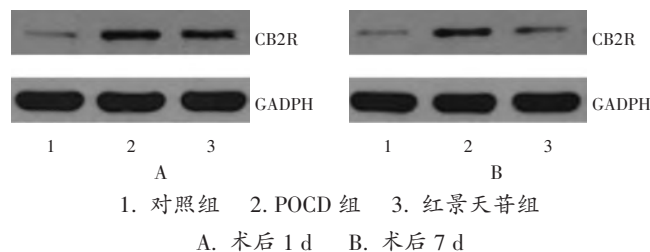


图 1 3 组大鼠不同时点海马组织中 CB2R 含量比较

3 讨论

神经炎性与认知障碍的相关性在 POCD 的机制中尤为突出^[9]。细胞因子 IL-6 和 TNF- α 被认为是与认知障碍相关的神经炎性介质^[10]。最新研究表明,POCD

表 3 3 组大鼠不同时点各检测指标含量比较($\bar{X} \pm s, n=10$)

组别	IL-6(pg/mL)		TNF- α (pg/mL)		MCP-1(pg/mL)		CB2R		CD11b	
	术后 1 d	术后 7 d	术后 1 d	术后 7 d	术后 1 d	术后 7 d	术后 1 d	术后 7 d	术后 1 d	术后 7 d
对照组	47.26 ± 13.04	57.31 ± 9.26	20.64 ± 4.52	27.07 ± 10.31	129.51 ± 8.61	147.22 ± 24.35	0.21 ± 0.03	0.23 ± 0.04	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.09
POCD 组	306.48 ± 39.26 ^a	215.26 ± 53.64 ^{ab}	81.59 ± 4.70 ^a	64.31 ± 4.32 ^{ab}	397.14 ± 34.51 ^a	293.58 ± 17.29 ^a	0.75 ± 0.09 ^a	0.65 ± 0.09 ^a	5.13 ± 0.75 ^a	3.64 ± 0.71 ^a
红景天苷组	211.79 ± 18.31 ^{ab}	122.69 ± 6.81 ^{ab}	64.39 ± 4.81 ^{ab}	39.40 ± 5.28 ^{ab}	250.94 ± 31.82 ^{ab}	194.62 ± 13.67 ^{ab}	0.51 ± 0.08 ^{ab}	0.34 ± 0.05 ^{ab}	3.12 ± 0.43 ^{ab}	2.07 ± 0.42 ^{ab}

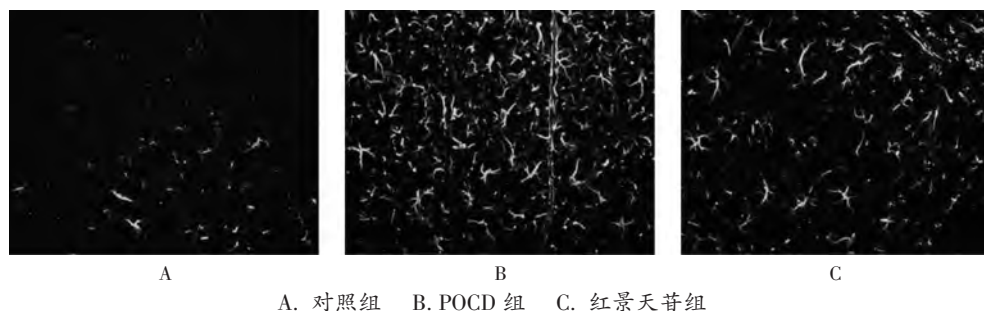


图 2 3 组大鼠术后 1 d 海马组织中 CD11b 含量比较(免疫荧光染色, ×200)

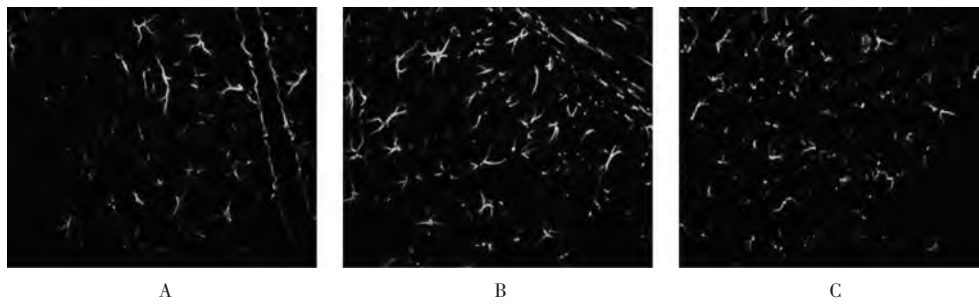


图3 3组大鼠术后7d海马组织中CD11b含量比较(免疫荧光染色, ×200)

小鼠 MCP-1 mRNA 表达增加^[11]。本研究中观察到术后大鼠血清中 IL-6, TNF- α , MCP-1 含量增加导致记忆障碍。有研究显示, 术后使用 CB2R 抑制剂 JWH133 可改善术后记忆丧失, 减轻海马和前额叶皮质炎症因子水平升高, 提示抑制 CB2R 可能对术后早期认知具有保护作用^[12]。神经病理学研究表明, CB2R 的上调是针对人中枢神经系统中不同类型慢性损伤的常见反应, 且小胶质细胞中 CB2R 的选择性存在, 强烈表明该受体在疾病相关的神经炎性过程中的重要作用^[13]。CD11b 是小胶质细胞活化的标志物, 对阿尔茨海默病的研究表明, CB2R 通过抑制 CD11b 的活化减轻中枢炎性反应^[14]。本研究结果显示, 海马依赖的认知功能在术后受损, 神经炎性反应增强。因海马依赖的学习和记忆极易受炎症影响, 只有当特定的潜在神经内通路, 如脑源性神经营养因子(BDNF)介导的通路受到显著影响时, 特定认知区域的功能障碍才会发生^[15]。可以推测, 神经炎性反应可能启动了 CB2R 的上调, 从而促进了神经炎性反应。本研究结果表明, CB2R 的神经保护作用可能是通过抑制小胶质细胞活化和促炎细胞因子产生介导。

综上所述, 术后早期抑制 CB2R 对记忆有潜在保护作用。术后用红景天苷治疗可抑制神经炎性, 增强记忆。

参考文献:

[1] 罗耀文, 徐明禹, 董心童, 等. 不同全身麻醉方式对老年术后认知功能障碍及复苏质量的影响[J]. 中国药业, 2017, 26(16):32-35.
[2] GAO ZX, RAO J, LI YH. Hyperbaric oxygen preconditioning improves postoperative cognitive dysfunction by reducing oxidant stress and inflammation[J]. Neural Regen Res, 2017, 12(2): 329-336.
[3] BI J, SHAN W, LUO A, et al. Critical role of matrix metalloproteinase 9 in postoperative cognitive dysfunction and age-dependent cognitive decline[J]. Oncotarget, 2015, 8(31):51817-51829.
[4] ZHANG Y, BAO HG, LV YL, et al. Risk factors for early postoperative cognitive dysfunction after colorectal surgery[J]. BMC Anesthesiology, 2019, 19:6-15.
[5] BELL KA, KOBAYASHI I, CHEN Y, et al. Nocturnal autonomic nervous system activity and morning proinflammatory cytokines in

young adult African Americans[J]. J Sleep Res, 2017, 26(4): 510-515.
[6] 袁清红, 刘强胜, 刘安鹏, 等. 激活大麻素 2 型受体对脓毒症小鼠急性肺损伤的影响: 自噬在其中的作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2018, 38(12):1509-1512.
[7] 李超, 史敬璞, 王立宽, 等. 大麻素 2 型受体激动剂 JWH-015 对阿尔茨海默病样小鼠认知功能的改善作用及其可能机制[J]. 国际药学研究杂志, 2017, 44(6):537-543.
[8] 黄菲菲, 李耀浙, 张婷, 等. 红景天苷通过抑制氧化应激防治大鼠低氧性肺动脉高压[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(3):500-506.
[9] SCARR D, LOVBLOM LE, CARDINEZ N, et al. Validity of a point-of-care nerve conduction device for polyneuropathy identification in older adults with diabetes: Results from the Canadian study of longevity in type 1 diabetes[J]. PLoS One, 2018, 13(4): e0196647.
[10] 朱茗, 李元海, 万宗明, 等. 全身麻醉和硬脊膜外腔阻滞麻醉对老年患者前列腺电切术后早期认知功能的影响[J]. 上海医学, 2015, 38(10):776-781.
[11] 王存金, 高巨, 周罗晶, 等. 海马单核细胞趋化因子 1 及其受体与老龄大鼠术后认知功能障碍的关系[J]. 中华麻醉学杂志, 2015, 35(4):416-418.
[12] SUN L, DONG R, XU X, et al. Activation of cannabinoid receptor type 2 attenuates surgery-induced cognitive impairment in mice through anti-inflammatory activity[J]. Journal of Neuroinflammation, 2017, 14(1):138-152.
[13] TANG J, MIAO H, JIANG B, et al. A selective CB2R agonist (JWH133) restores neuronal circuit after Germinal Matrix Hemorrhage in the preterm via CX3CR1+, microglia[J]. Neuropharmacology, 2017, 119:157-169.
[14] BISHT K, SHARMA K, TREMBLAY M. Chronic stress as a risk factor for Alzheimer's disease: Roles of microglia-mediated synaptic remodeling, inflammation, and oxidative stress[J]. Neurobiol Stress, 2018, 9:9-21.
[15] KARIHARAN T, NANAYAKKARA G, PARAMESHWARAN K, et al. Central activation of PPAR-gamma ameliorates diabetes induced cognitive dysfunction and improves BDNF expression[J]. Neurobiol Aging, 2015, 36(3):1451-1461.

(收稿日期:2019-07-08;修回日期:2019-09-05)