

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2022.07.002

❖ 基础研究 ❖

术前碳水化合物负荷对脾切除老年大鼠术后认知功能的影响

左友波, 杨秋燕, 赵蕾, 杨宇焦

(川北医学院附属医院麻醉科, 四川 南充 637000)

【摘要】目的: 探讨术前碳水化合物负荷对脾切除老年大鼠术后认知功能的影响。**方法:** 选择 20~22 月龄雄性 SD 大鼠 60 只, 按体重排序, 随机分成对照组 (C 组)、禁食禁饮组 (FAST 组) 和实验组 (CHO 组), 每组各 20 只。C 组不进行禁食和手术干预; FAST 组进行 14 h 的禁食禁饮后行脾脏切除术; CHO 组在术前 3 h 经口摄入 12 mL 碳水化合物溶液后行脾脏切除术。每组各取 10 只大鼠于术后第 2 天开始进行水迷宫训练和测试; 剩余 10 只在术后 1 d 股动脉采血检测血浆葡萄糖、胰岛素、肿瘤坏死因子 (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、IL-6 水平, 并根据所得的血浆葡萄糖、胰岛素水平, 计算血浆胰岛素抵抗指数 (IRI), 比较组间差异。**结果:** 与 C 组比较, FAST 组大鼠逃避潜伏期较长, 有较短的靶象限停留时间, 较少的平台穿越次数 ($P < 0.05$); 与 FAST 组比较, CHO 组大鼠逃避潜伏期较短, 并有较长的靶象限停留时间, 较多的平台穿越次数 ($P < 0.05$)。与 C 组比较, FAST 组大鼠血浆葡萄糖、胰岛素、IL-1 β 、IL-6 水平及 IRI 较高 ($P < 0.05$); 与 FAST 组比较, CHO 组大鼠血浆葡萄糖、胰岛素、IL-1 β 、IL-6 水平及 IRI 较低 ($P < 0.05$)。**结论:** 术前碳水化合物经口负荷可以改善脾切除引起的大鼠学习记忆功能下降, 机制可能与减轻术后胰岛素抵抗和炎症反应有关。

【关键词】 碳水化合物; 大鼠; 胰岛素抵抗; 炎症因子; 认知功能

【中图分类号】 R656.61 **【文献标志码】** A

Effects of preoperative carbohydrate loading on cognitive function in elderly rats after splenectomy

ZUO You-bo, YANG Qiu-yan, ZHAO Lei, YANG Yu-jiao

(Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To study the effect of preoperative carbohydrate loading on cognitive function in elderly rats after splenectomy. **Methods:** 60 Sprague-Dawley male rats aged 20~22 m were selected and randomly divided into three groups (20 rats in each group), including control group (C Group), fasting group (FAST group) and carbohydrate group (CHO group). Rats in group C did not receive fasting and surgical intervention. Rats in FAST group received splenectomy after fasting for 14 h, and rats in CHO group received 12 mL vitamin-riched carbohydrate beverage 3 h before operation. 10 rats of each group were selected for water maze training and test on the 2nd postoperative day. Blood were collected from remaining 10 rats in each group on the 1st postoperative day to detect the levels of plasma glucose, insulin, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6). The plasma insulin resistance index was calculated according to the obtained plasma glucose and insulin levels, and the differences among the groups were analyzed. **Results:** Compared with C group, the escape latency increased, while the residence time in target quadrant and the number of crossing platform decreased in the FAST group ($P < 0.05$). Compared with the FAST group, CHO group had a shorter escape latency, longer residence time in target quadrant and more times of crossing platform ($P < 0.05$). Compared with the C group, plasma glucose, insulin, IL-1 β , IL-6 levels and IRI in the FAST group were higher. Compared with the FAST group, these biomarkers in the CHO group were lower ($P < 0.05$). **Conclusion:** Preoperative vitamin-riched carbohydrate loading can improve the decline of postoperative learning and memory function in elderly rats, which may be related to reducing postoperative insulin resistance and inflammatory response.

【Key words】 Carbohydrate; Rats; Insulin resistance; Inflammatory factors; Cognitive function

术后认知功能障碍 (postoperative cognitive dysfunction, POCD) 是术后常见的脑部并发症, 主要表现为定向障碍、记忆障碍、注意力不集中、精神错乱、

学习和沟通能力下降等。目前随着老年人群的不断增加, 老年手术患者也不断增多, POCD 发生率并未随技术的进步而下降, 甚至呈升高趋势^[1]。POCD

使患者术后恢复延迟,术后并发症增加,致残率和死亡率增加^[2]。多学科专家命名共识工作组于 2018 年将 POCD 更名为围手术期神经认知障碍(perio-perative neurocognitive disorders, PND),临床研究方法得到改变,但基础研究方法并未改变^[3],POCD 的防治依然是当前的研究难点和热点。手术应激反应使机体产生术后胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)和促使炎症因子释放,而 IR 和炎症反应是 POCD 的重要机制。有研究^[4-6]显示,术后 IR 和炎症因子的释放与术后认知功能下降密切相关。还有研究^[7-9]显示,术前 2~4 h 口服碳水化合物可以减轻术后 IR 及炎症反应、促进术后快速康复等。然而,术前碳水化合物负荷对术后认知功能影响的研究报道甚少。本研究旨在通过对脾切除老年大鼠术前进行碳水化合物经口负荷建立动物模型,探讨术前碳水化合物负荷对术后胰岛素抵抗、炎症因子和学习记忆功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选用 20~22 月龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只,体重 500~700 g,均由川北医学院动物实验中心生产与提供,实验动物生产许可证号:scxk(川)2013-18。所有大鼠饲养于标准鼠笼,不间断供给水和正常标准饲料,控制温度(22±2)℃,湿度(50±5)%,光照周期 12/12 h 光/暗循环。实验及实验操作方法按相关伦理及指南要求进行。

1.1.2 主要仪器与试剂 体重秤,血糖仪(2310NZ 型,三诺生物传感股份有限公司),台式低速离心机(2D-5 型,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),酶标仪(KHB ST-360 型,上海科华实验系统有限公司),Morris 水迷宫及分析软件(WMT-100S 型,成都泰盟软件有限公司),胰岛素 ELISA 试剂盒(南京建成生物工程研究所);大鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、IL-6 的 ELISA 试剂盒(均购自博士德生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 所有大鼠进行适应性喂养 7 d,按体重进行排序编号,并采用随机数字表将其分为对照组(C 组)、禁食禁饮组(FAST 组)和碳水化合物组(CHO 组),每组各 20 只。C 组不进行禁食和手术干预;FAST 组大鼠先禁食禁饮 14 h,再行腹腔麻醉下脾脏切除术;CHO 组大鼠在脾切除术前 3 h 经口饮用 12 mL 碳水化合物溶液(宜昌人福药业有限责任公司,商品名:术能),包含碳水化合物 14.2 g/100 mL、维生素 B1、维生素 B6 和维生素 B12 等成分。

1.2.2 脾切除术 麻醉方法采用腹腔内注射 1% 戊巴比妥钠 35 mg/kg,待大鼠反射消失后备皮,并仰卧位固定于带有恒温加热垫的动物手术板上。消毒铺巾,靠左侧取旁正中切口,长约 2 cm。暴露肝、胃和网膜等组织。探查找出脾脏,并轻轻牵拉出腹腔。分离脾脏血管,用无菌缝线结扎各分支血管,用剪刀紧靠脾脏处离断血管和韧带,移除脾脏,观察出血点并止血。腹腔冲洗后复位腹腔内其它组织,在切口处使用抗生素粉剂预防感染。缝合腹膜后,0.25% 的布比卡因浸润切口用于术后镇痛,再逐层缝合肌层和皮肤。术后暖风保暖,苏醒后单独饲养。

1.2.3 水迷宫实验 认知功能检测使用 Morris 水迷宫(水池直径 120 cm、高 50 cm)。术后先进行定位航行实验训练,训练结束后进行空间探索实验,检测学习记忆功能。实验时池水深达平台上 2 cm,水温维持(22±2)℃。用少量黑色墨汁使池水变为黑色。池壁四周贴上不同图案作为大鼠寻找路线的参照物。平台固定放置于东、南、西、北中的一个象限的中央。定位航行实验:由固定人员从四个不同象限同一位置将大鼠沿着池壁轻轻放入池中。使用水迷宫自带摄像系统观察记录大鼠的在泳池的游动路径和潜伏期等指标。设置大鼠寻找隐匿平台(潜伏期)的最长时间为 60 s,滞留平台时间 15 s。各组大鼠各取 10 只,在术后第 2 天开始进行连续 5 d 的定位航行训练实验,4 次/d(C 组与手术大鼠同步进行实验)。定位航行实验完成后,进行空间探索实验。撤出平台,其他场景与定位航行实验相同,探索时间设置 60 s,将大鼠从原平台象限的对侧象限沿池壁轻轻放入。记录大鼠在原平台象限滞留时间和穿越原平台位置次数。

1.2.4 标本采集与检测 各组大鼠在术后第 1 天各取 10 只,腹腔内注射戊巴比妥钠(60 mg/kg)深度麻醉,待反射消失后,快速剪刀暴露一侧股动脉并放血,用肝素抗凝管采集血液标本,离心 15 min,获取上清液,用罗氏血糖仪测量血葡萄糖浓度,剩余标本用 1 mL EP 管分装,-80℃ 深低温冰箱保存。采用 ELISA 法检测血浆中胰岛素、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平。根据葡萄糖(FBG)和胰岛素(FBI)水平,计算胰岛素抵抗指数(insulin resistance index, IRI) [IRI = (FBG × FBI)/22.5 (FBG 单位为 mmol/L; FBI 单位为 mIU/L)]。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件对数据进行分析与处理。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)或最小显著差异法(LSD)或 Mann-Whitney *U* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 术前碳水化合物负荷对脾切除老年大鼠术后认知功能的影响

术后1 d,3组大鼠训练逃避潜伏期比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),但逃避潜伏期随训练天数的增加逐步缩短。术后6 d,大鼠逃避潜伏期FAST组 $>$ CHO组 $>$ C组($P < 0.05$)。见表1。空间探索实验结果显示,FAST组大鼠较C组的目标象限停留时间较短,穿越平台次数较少;与FAST组比较,CHO组大鼠目标象限停留时间较长,穿越平台次数较多($P < 0.05$)。见表2。

表1 3组大鼠定位航行实验逃避潜伏期比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 逃避潜伏期 | | | | |
|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | 术后2 d | 术后3 d | 术后4 d | 术后5 d | 术后6 d |
| C组($n=10$) | 39.8 \pm 5.9 | 23.3 \pm 10.1 | 16.7 \pm 6.5 | 16.0 \pm 11.4 | 9.0 \pm 3.7 |
| FAST组($n=10$) | 45.6 \pm 6.8 | 26.3 \pm 9.2 | 21.6 \pm 7.8 | 17.4 \pm 5.9 | 17.8 \pm 8.9* |
| CHO组($n=10$) | 41.2 \pm 8.5 | 24.3 \pm 7.9 | 15.7 \pm 7.6 | 15.1 \pm 5.9 | 10.8 \pm 3.3# |
| F值 | 1.748 | 0.249 | 1.056 | 0.214 | 4.917 |
| P值 | 0.175 | 0.861 | 0.38 | 0.886 | 0.006 |

* $P < 0.05$,与C组术后6 d相比;# $P < 0.05$,与FAST组术后6 d相比。

表2 3组大鼠空间探索实验结果的比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 目标象限停留时间(s) | 穿越平台次数(次) |
|-----------------|-----------------|----------------|
| C组($n=10$) | 36.8 \pm 7.0 | 4.1 \pm 0.9 |
| FAST组($n=10$) | 29.4 \pm 4.9* | 2.7 \pm 1.3* |
| CHO组($n=10$) | 35.6 \pm 6.0# | 4.7 \pm 2.7# |
| F值 | 4.781 | 5.227 |
| P值 | 0.007 | 0.004 |

* $P < 0.05$,与C组相比;# $P < 0.05$,与FAST组相比。

2.2 术前碳水化合物经口负荷对老年大鼠术后胰岛素抵抗的影响

术后1 d,与C组比较,FAST组大鼠血浆葡萄糖、胰岛素水平及IRI较高($P < 0.05$);与FAST组比较,CHO组大鼠血浆葡萄糖、胰岛素水平及IRI较低($P < 0.05$)。见表3。

表3 3组大鼠血浆葡萄糖、胰岛素、IRI比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 葡萄糖(mmol/L) | 胰岛素(mIU/L) | IRI |
|-----------------|------------------|--------------------|-------------------|
| C组($n=10$) | 6.70 \pm 1.27 | 24.33 \pm 9.87 | 7.24 \pm 2.45 |
| FAST组($n=10$) | 9.28 \pm 1.50* | 43.06 \pm 10.53* | 17.76 \pm 2.92* |
| CHO组($n=10$) | 6.90 \pm 1.07# | 29.02 \pm 8.68# | 8.89 \pm 1.93# |
| F值 | 4.749 | 5.649 | 7.518 |
| P值 | 0.007 | 0.003 | <0.001 |

* $P < 0.05$,与C组相比;# $P < 0.05$,与FAST组相比。

2.3 术前碳水化合物经口负荷对老年大鼠术后炎症反应的影响

术后1 d,3组大鼠血浆TNF- α 水平比较,差异

无统计学意义($P > 0.05$);与C组比较,FAST组大鼠血浆IL-1 β 和IL-6水平较高($P < 0.05$);与FAST组比较,CHO组大鼠血浆IL-1 β 和IL-6水平较低($P < 0.05$)。见表4。

表4 3组大鼠血浆TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平比较($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

| 组别 | TNF- α | IL-1 β | IL-6 |
|-----------------|-------------------|--------------------|---------------------|
| C组($n=10$) | 47.91 \pm 11.27 | 39.21 \pm 9.88 | 26.39 \pm 8.45 |
| FAST组($n=10$) | 54.79 \pm 10.56 | 59.15 \pm 10.58* | 59.43 \pm 12.96* |
| CHO组($n=10$) | 53.83 \pm 11.27 | 39.72 \pm 11.78# | 36.37 \pm 11.93** |
| F值 | 0.358 | 3.849 | 5.057 |
| P值 | 0.753 | 0.018 | 0.004 |

* $P < 0.05$,与C组相比;# $P < 0.05$,与FAST组相比。

3 讨论

学习和记忆功能是认知功能的两个核心内容,Morris水迷宫(MWM)常用于评估大鼠或小鼠空间学习和记忆能力^[10]。本研究显示,禁食禁饮组大鼠在术后第6天逃避潜伏期明显较长,空间探索实验中有较短的目标象限停留时间及较少的平台穿越次数;而术前碳水化合物经口负荷组大鼠实验结果较禁食禁饮组大鼠好($P < 0.05$),但与正常对照组大鼠比较差异无统计学意义($P > 0.05$),说明手术创伤和禁食禁饮损害了老年大鼠的学习和记忆功能,术前碳水化合物经口负荷可以预防手术和禁食带来的认知损害。

多维碳水化合物是一种含单糖、多糖和多种维生素的饮料,碳水化合物含量14.2 g/100mL。本研究碳水化合物选定的剂量为相当人体摄入50 g碳水化合物,相当于人类的标准早餐促进胰岛素释放剂量^[11]。既往综述及Meta分析^[12-13]显示,术前口服碳水化合物能减轻术后IR。另有研究^[8,14-16]发现,术前口服碳水化合物可以降低手术炎症反应,使术后TNF- α 、IL-6水平降,促进GLP-1的释放等。本研究结果也显示,腹腔麻醉下的脾切除术和长时间的禁食禁饮使大鼠产生了术后胰岛素抵抗和炎症因子水平表达的增高,而术前碳水化合物经口负荷则改善了脾切除大鼠术后胰岛素抵抗,并使术后IL-1 β 和IL-6表达水平降低。

虽然术后认知功能下降的机制未完全明确,但不少研究^[4,17-18]显示,术后认知功能的改变与术后胰岛素抵抗、炎症反应的程度等明显相关。围术期炎症反应是PND发生的重要机制,TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等炎症因子在脑组织和外周血中的表达水平均与PND的发生有着良好联系^[18]。TNF- α 和IL-1 β

水平升高可引起炎症级联反应,并使 IL-6 升高。IL-6 水平与组织损伤呈正相关,并与认知功能损伤有关。麻醉和手术可以导致炎症因子的释放和血脑屏障受损,外周血中的炎症因子进一步使血脑屏障受损并透过血脑屏障产生中枢神经系统炎症,持续和严重的炎症反应导致 PND 的发生。同时,胰岛素抵抗是认知功能障碍的重要因素,糖尿病是老年痴呆的重要原因。并且炎症因子与胰岛素抵抗互为影响,IL-6 水平与术后胰岛素抵抗存在正相关^[19]。术后胰岛素抵抗与炎症反应互为因果,导致炎症反应和胰岛素抵抗同时升高。王培培等^[20]研究显示,减轻外周血中炎症反应可以改善老年髋关节置换术患者术后神经认知障碍。本研究也显示实验大鼠术后学习记忆功能的改变与胰岛素抵抗和炎症反应的改变存在相关性。

综上,术前碳水化合物经口负荷可以预防脾切除老年大鼠认知功能的损害,可能与其改善术后胰岛素抵抗,下调炎症因子表达有关。

参考文献

- [1] Kulason K, Nouchi R, Hoshikawa Y, et al. The beneficial effects of cognitive training with simple calculation and reading aloud in an elderly postsurgical population; study protocol for a randomized controlled trial[J]. *Trials*, 2016, 17(1):334.
- [2] Evered L, Silbert B, Scott DA, et al. Cerebrospinal fluid biomarker for Alzheimer disease predicts postoperative cognitive dysfunction [J]. *Anesthesiology*, 2016, 124(2):353-361.
- [3] Evered L, Silbert B, Knopman DS, et al. Recommendations for the nomenclature of cognitive change associated with anaesthesia and surgery-2018 [J]. *Br J Anaesth*, 2018, 121(5):1005-1012.
- [4] Ma LN, Wang JY, Li Y. Insulin resistance and cognitive dysfunction [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2015, 444:18-23.
- [5] Hovens IB, Schoemaker RG, Van EA, et al. Postoperative cognitive dysfunction: Involvement of neuroinflammation and neuronal functioning [J]. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2014, 38:202-210.
- [6] Tan XX, Qiu LL, Sun J. Research progress on the role of inflammatory mechanisms in the development of postoperative cognitive dysfunction [J]. *BioMed Res Int*, 2021, 2021:3883204.
- [7] Gjessing PF, Constantin-Teodosiu D, Hagve M, et al. Preoperative carbohydrate supplementation attenuates post-surgery insulin resistance via reduced inflammatory inhibition of the insulin-mediated restraint on muscle pyruvate dehydrogenase kinase 4 expression [J]. *Clin Nutri*, 2015, 34(6):1177-1183.
- [8] Hu Z, Liu J, Wang F. Effects of preoperative carbohydrate intake on inflammatory markers and clinical outcomes in elderly patients undergoing radical prostatectomy: A single-centre, double-blind randomised controlled trial [J]. *Front Surg*, 2021, 8:744091.
- [9] Bilku DK, Dennison AR, Hall TC, et al. Role of preoperative carbohydrate loading: a systematic review [J]. *Ann R Coll Surg Engl*, 2014, 96(1):15-22.
- [10] Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(2):848-858.
- [11] Nygren J, Thorell A, Jacobsson H, et al. Preoperative gastric emptying: effects of anxiety and oral carbohydrate administration [J]. *Ann Surg*, 1995, 222(6):728-734.
- [12] Nygren J, Thorell A, Ljungqvist O. Preoperative oral carbohydrate therapy [J]. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2015, 28(3):364.
- [13] Xu D, Zhu X, Xu Y, et al. Shortened preoperative fasting for prevention of complications associated with laparoscopic cholecystectomy: a meta-analysis [J]. *J Int Med Res*, 2017, 45(1):22-37.
- [14] Vigano J, Cereda E, Caccialanza R, et al. Effects of preoperative oral carbohydrate supplementation on postoperative metabolic stress response of patients undergoing elective abdominal surgery [J]. *World J Surg*, 2012, 36(8):1738-1743.
- [15] Feng J, Xu R, Li K, et al. Effects of preoperative oral carbohydrate administration combined with postoperative early oral intake in elderly patients undergoing hepatectomy with acute-phase inflammation and subjective symptom burden: A prospective randomized controlled study [J]. *Asian J Surg*, 2021, 45(1):386-395.
- [16] 王智浩, 仲蓓, 王东升, 等. 术前口服碳水化合物对胃癌术后胰岛素抵抗的影响 [J]. *齐鲁医学杂志*, 2013, 28(4):302-304.
- [17] Nemeth E, Vig K, Racz K, et al. Influence of the postoperative inflammatory response on cognitive decline in elderly patients undergoing on-pump cardiac surgery: a controlled, prospective observational study [J]. *BMC Anesthesiology*, 2017, 17(1):113.
- [18] Yang S, Gu C, Mandeville ET, et al. Anesthesia and surgery impair blood-brain barrier and cognitive function in mice [J]. *Front Immunol*, 2017, 8(1):902.
- [19] Thorell A, Loftenius A, Andersson B, et al. Postoperative insulin resistance and circulating concentrations of stress hormones and cytokines [J]. *Clin Nutr*, 1996, 15(2):75-79.
- [20] 王培培, 赵志斌, 栾恒飞, 等. 超声引导下 FICB 阻滞对老年全髋关节置换术患者术后神经认知功能及炎症因子的影响 [J]. *川北医学院学报*, 2022, 37(2):209-212.

(收稿日期:2022-03-11

修回日期:2022-04-09)