

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2023.02.001

❖ 基础研究 ❖

芒柄花苷对小鼠脓毒症引起认知功能障碍的影响

朱敏¹, 杨思敏¹, 罗彩虹², 李明¹

(川北医学院附属医院, 1. 麻醉科; 2. 康复医学科, 四川 南充 637000)

【摘要】目的: 探讨芒柄花苷对小鼠脓毒症引起认知功能障碍的影响。**方法:** 选取 60 只 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠, 采用随机数字表法分为假手术组 (C 组)、脓毒症组 (CLP 组)、芒柄花苷 (ON 组) 和芒柄花苷 + 脓毒症组 (ON + CLP 组), 每组各 15 只。采用盲肠结扎穿孔 (CLP) 制备脓毒症模型。ON 组与 ON + CLP 组在造模前进行芒柄花苷 (30 mg/kg) 灌胃, 1 次/d, 连续 7 d; C 组与 CLP 组每日给予等剂量生理盐水。造模后比较各组小鼠 7 d 生存率; Morris 水迷宫实验检测各组小鼠认知功能, 比较各组小鼠海马组织中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、IL-6、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 水平。**结果:** 与 C 组比较, CLP 组小鼠生存率降低 ($P < 0.05$); 与 CLP 组比较, ON + CLP 组小鼠生存率增加 ($P < 0.05$)。与 C 组比较, CLP 组小鼠逃避潜伏期延长, 穿越平台次数减少, 待在平台所在象限时间缩短 (均 $P < 0.05$); 与 CLP 组比较, ON + CLP 组小鼠逃避潜伏期缩短, 穿越平台次数增多, 待在平台所在象限时间延长 (均 $P < 0.05$)。与 C 组比较, CLP 组小鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 MDA 含量升高, SOD 活性降低 (均 $P < 0.05$); 与 CLP 组比较, ON + CLP 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 MDA 含量降低, SOD 活性增加 (均 $P < 0.05$)。**结论:** 芒柄花苷可以改善小鼠脓毒症引起的认知功能障碍, 机制可能与芒柄花苷抑制海马组织的炎症反应和氧化应激反应有关。

【关键词】 脓毒症; 芒柄花苷; 认知功能; 炎症反应; 氧化应激

【中图分类号】 R631.2 **【文献标志码】** A

Effect of ononin on cognitive function in sepsis mice

ZHU Min¹, YANG Si-min¹, LUO Cai-hong², LI Ming¹

(1. Department of Anesthesiology; 2. Department of Rehabilitation Medicine, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】 Objective: To investigate the effect of ononin on the cognitive function of sepsis mice. **Methods:** 60 male C57BL/6 mice aged 8 weeks were divided into four groups (15 in each group): control group (C Group), sepsis group (CLP group), ononin group (ON group), and ononin + CLP group (ON + CLP group) by digital random table methods, 15 cases in each group. Cecal ligation and perforation (CLP) was used to establish the sepsis model. The ON group and the ON + CLP group were given ononin (30 mg/kg) once a day for 7 days before modeling, group C and CLP were given equal dose of normal saline every day. The 7-day survival rate of mice was observed after modeling. Morris water maze (MWM) test was employed to detect the cognitive function of mice in each group. The levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, SOD and MDA in hippocampus tissues of mice were compared between the groups. **Results:** Compared with C group, the survival rate of CLP group was lower ($P < 0.05$). The survival rate of ON + CLP group was increased relative to CLP group ($P < 0.05$). The escape latency was prolonged, the times of crossing the platform were reduced, and the time to staying in the quadrant of the platform was shortened in CLP group when compared with C group (all $P < 0.05$). Compared with CLP group, the escape latency was significantly shortened, the number of times of crossing the platform was enhanced, and the time of staying in the quadrant of the platform was prolonged for ON + CLP group (all $P < 0.05$). Compared with C group, the content of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and MDA in hippocampus of CLP group was remarkably increased, while the activity of SOD exhibited decreased (all $P < 0.05$). Compared with CLP group, the content of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and MDA in ON + CLP group decreased, and the activity of SOD exhibited increased (all $P < 0.05$). **Conclusion:** Ononin prophylaxis could ameliorate the cognitive decline of sepsis mice, and the underlying mechanism may be related to its anti-inflammatory and antioxidant effects.

【Key words】 Sepsis; Ononin; Cognitive function; Inflammation; Oxidative stress

脓毒症可诱发机体释放大量炎症介质和细胞因子, 造成全身性炎症反应, 病死率较高^[1-2]。脓毒症患者在住院期间认知功能障碍发生率高达约 60%, 包括学习、记忆、联想的改变^[3]。认知功能障碍影

基金项目: 国家自然科学基金(82101313); 川北医学院校级科研计划项目(CBY21-QA11)。

作者简介: 朱敏(1989-), 女, 硕士, 助教。E-mail: 978177746@qq.com

通讯作者: 李明, 博士。E-mail: mingli_1_11@163.com

响脓毒症患者的预后及生活质量,对社会和家庭造成沉重的负担^[4-5]。因此,及时有效地预防和治疗认知功能障碍对于改善脓毒症患者的生存率和提高生活质量有重大意义。芒柄花苷是中药黄芪、甘草、葛根、红芪等中药材中黄酮类化合物的主要成分,有促进皮肤生长、抑制脂质过氧化、清除氧自由基、增强免疫等多种药理活性^[6-7]。近年来研究^[8]发现,芒柄花苷可以通过抗炎及抗氧化作用改善阿尔兹海默病小鼠的认知功能障碍。本研究旨在探讨芒柄花苷对脓毒症小鼠认知功能的影响,进一步探明芒柄花苷的作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 选取 60 只 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠,体质量 22~25 g。所有小鼠饲养于标准鼠笼,可自由取食、饮水,控制室温(22.0±1.0)℃,湿度(50±10)%,12 h 光照/12 h 黑暗交替循环。在实验开始前适应性饲养 7 d。本实验通过川北医学院实验动物伦理委员会批准。

1.1.2 主要仪器及试剂 体重秤、酶标仪(I3X, MD 公司);Morris 水迷宫及分析软件(Cleversys 公司,美国);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);肿瘤坏死因子 α(TNF-α)、白细胞介素 1β(IL-1β)、IL-6 检测试剂盒(购自武汉菲恩生物科技有限公司);超氧化物歧化酶(SOD)与丙二醛(MDA)检测试剂盒(购自南京建成生物工程研究所)。

1.2 方 法

1.2.1 实验分组及处理 采用随机数字表法将实验动物分为假手术组(C 组)、脓毒症组(CLP 组)、芒柄花苷(ON 组)及芒柄花苷+脓毒症组(ON+CLP 组),每组各 15 只。ON 组与 ON+CLP 组在造模前进行芒柄花苷(Sigma 公司)30 mg/kg 灌胃^[9];C 组与 CLP 组每日给予等剂量生理盐水灌胃,1 次/d,连续 7 d。

1.2.2 脓毒症模型建立 通过盲肠结扎穿孔(CLP)制备脓毒症模型^[10]。腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉后,进行消毒,在无菌条件下行腹部 1 cm 正中切口。随后,游离出盲肠、在回盲部用 4.0 丝线结扎缝合。然后用细针轻柔的刺穿盲肠并挤压出细小的粪便到腹腔。最后,将盲肠小心地放回腹腔,用 4.0 丝线缝合切口。小鼠经皮下补充生理盐水(20 mL/kg)。造模后小鼠出现精神萎靡、烦躁、呼吸急促,总死亡率达到 20% 即为造模成功。假手术组、芒柄花苷组小鼠接受相同操作,但不进行

盲肠结扎与穿孔。

1.2.3 生存率观察 不同组别小鼠造模后放回笼子,可自由获得食物和水。术后每 24 h 观察小鼠生存率,连续观察 7 d。

1.2.4 Morris 水迷宫实验 小鼠造模成功后,观察 7 d 的生存率,第 8 天开始进行 Morris 水迷宫实验。(1)定位航行实验:4 次/d,持续进 4 d。在每天的水迷宫实验中,分别从不同象限固定位置将小鼠面向水池壁、尾部朝水池中央放入水中。让小鼠寻找平台位置(平台隐藏在水平面下 1 cm),找到平台的时间即为逃避潜伏期。若小鼠在 60 s 内没有找到平台,将其引导至平台待 20 s,则逃避潜伏期为 60 s。(2)空间探索实验:第 12 天行空间探索实验,撤除平台,从平台对侧象限将小鼠放入水中,记录下小鼠在 60 s 内穿越原平台的次数及停留在原平台所在象限的时间。

1.2.5 标本采集与检测 在小鼠完成水迷宫实验后,处死小鼠,收集海马组织待检。(1)氧化应激指标水平检测:取小鼠海马组织,制备匀浆,检测 SOD、MDA 水平;(2)组织炎症因子水平检测:取海马组织匀浆,采用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平。操作均按照试剂盒说明书进行。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件对数据进行分析与处理。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间采用成组 *t* 检验或单因素方差分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组小鼠生存率比较

与 C 组相比,CLP 组小鼠生存率降低(*P* < 0.05);与 CLP 组比较,ON+CLP 组小鼠生存率增加(*P* < 0.05);C 组与 ON 组小鼠生存率比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。各小组术后 7 d 生存率:C 组、ON 组为 100%;CLP 组为 66.7%;ON+CLP 组为 86.7%。见图 1。

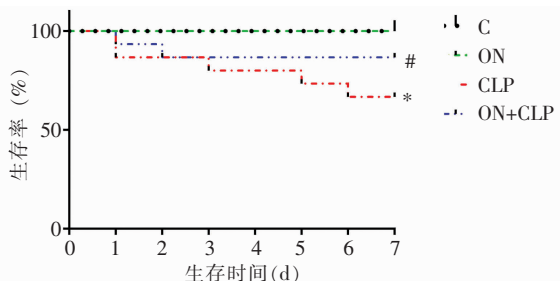


图 1 各组小鼠生存率比较

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

2.2 各组小鼠认知功能比较

与 C 组比较,CLP 组小鼠逃避潜伏期延长(*P* <

0.05),穿越平台次数减少,待在平台所在象限时间缩短(均 $P < 0.05$);与 CLP 组比较,ON + CLP 组小鼠逃避潜伏期缩短($P < 0.05$),穿越平台次数增多,

待在平台所在象限时间延长(均 $P < 0.05$);C 组与 ON 组小鼠上述指标比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2 及图 3。

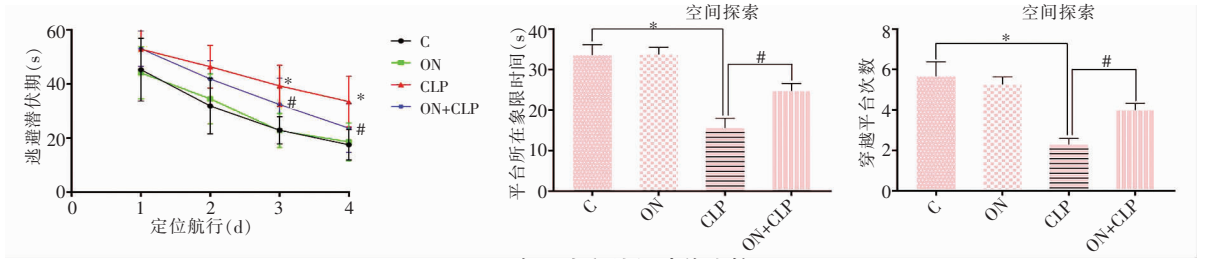


图 2 各组小鼠认知功能比较

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

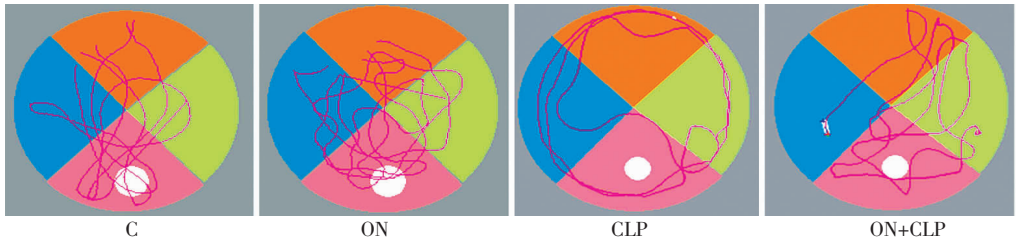


图 3 Morris 水迷宫空间探索轨迹

2.3 各组小鼠海马组织炎症因子水平比较

与 C 组比较,CLP 组小鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平升高($P < 0.05$);与 CLP 组比较,ON + CLP 组小

鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平降低($P < 0.05$)。C 组与 ON 组小鼠炎症因子水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 4。

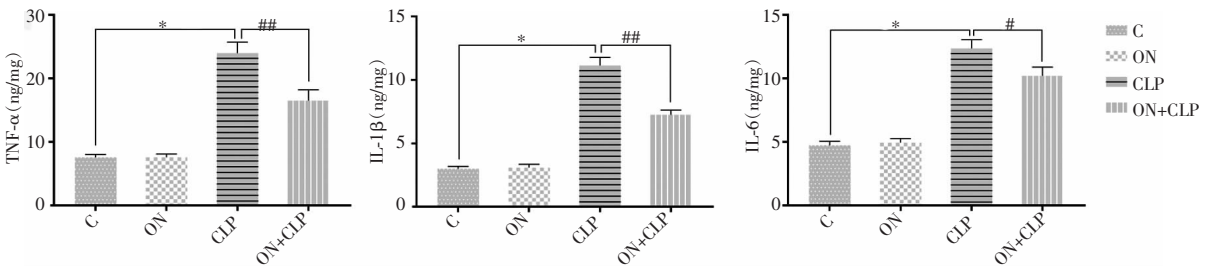


图 4 各组小鼠海马组织炎症因子水平比较

* $P < 0.05$,与 C 组相比;# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,与 CLP 组相比。

2.4 各组小鼠海马组织氧化应激指标水平比较

与 C 组比较,CLP 组小鼠海马组织 MDA 水平升高,SOD 活性降低(均 $P < 0.05$);与 CLP 组比较,ON + CLP 组小鼠海马组织中 MDA 水平降低,SOD 活性升高(均 $P < 0.05$);C 组与 ON 组小鼠上述指标差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 5。

3 讨论

近年来,越来越多的研究者关注脓毒症的认知功能障碍^[11]。学习和记忆是认知功能的两大基本内容,Morris 水迷宫是评价啮齿类动物认知功能改变的经典方法^[12]。本研究中 Morris 水迷宫实验结果显示,CLP 组逃避潜伏期延长,穿越平台次数减少,待在平台所在象限时间缩短(均 $P < 0.05$),与既往报道^[13]一致,说明脓毒症可以导致小鼠的学习与记忆能力下降。用芒柄花苷预处理的脓毒症小鼠,逃避潜伏期缩短,穿越平台次数增多,待在平台所在象限时间延长(均 $P < 0.05$),提示芒柄花苷能有效改善小鼠脓毒症认知功能损伤。

目前,在脓毒症导致认知功能障碍的研究中,Zhou 等^[14]发现炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等的升

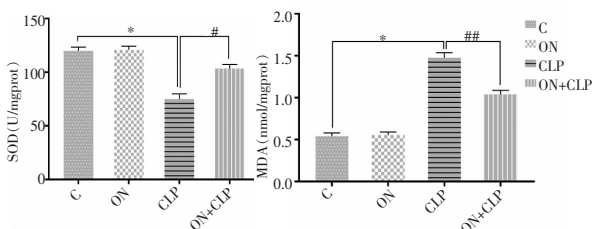


图 5 各组小鼠海马组织氧化应激因子比较

* $P < 0.01$,与 C 组相比;# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,与 CLP 组相比。

高与认知功能障碍密切相关。内源性 IL-1 β 过多会激活中枢小胶质细胞释放大炎症因子,通过抑制 IL-1 β 产生,可改善脓毒症小鼠认知功能障碍^[15]。此外,IL-6 和 TNF- α 可影响脑血管细胞膜渗透性,破坏大脑血管屏障(BBB),导致中枢炎症反应进一步加剧,促使认知功能损伤^[16]。既往研究^[7-8]显示,芒柄花苷不但有良好的抗炎、抗细胞衰老作用,还有神经保护作用。本研究发现,芒柄花苷能有效减少脓毒症小鼠海马组织中的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达($P < 0.05$),证明芒柄花苷预处理能够减轻脓毒症中枢神经系统的炎症反应。

大量研究^[17-18]显示,氧化应激反应也是导致脓毒症认知功能障碍的重要因素。在脑组织中,SOD 是重要的抗氧化酶;MDA 是细胞膜磷脂破坏后形成的氧化应激产物之一。SOD 活性与 MDA 水平是反映脑组织氧化应激水平的重要指标。SOD 活性越低,MDA 水平越高,提示氧化应激损伤程度越严重^[19]。本研究结果显示,脓毒症小鼠海马组织中的 MDA 水平升高,SOD 活性降低(均 $P < 0.05$),与 Tian 等^[19]研究结果相似。芒柄花苷有较强的自由基清除活性,可防止脂质过氧化物的形成^[6]。芒柄花苷预处理的脓毒症小鼠海马组织中 MDA 水平降低,SOD 活性升高,提示芒柄花苷可以增强机体的抗氧化能力,抑制脓毒症小鼠海马组织氧化应激反应,发挥一定的脑保护作用。

综上,芒柄花苷可以改善小鼠脓毒症引起的认知功能障碍,机制可能与芒柄花苷抑制海马组织的炎症反应和氧化应激反应相关。

参考文献

[1] 刘玉文,陈晓欢,梁佐迪,等.右美托咪定对脓毒症大鼠血脑屏障的影响[J].解剖科学进展,2019,25(3):293-295.
[2] Kristo E, Tero IA, Juha K, et al. Elevated serum S-100 β in patients with septic shock is associated with delirium[J]. Acta Anaesthesiologica Scandinavica, 2018, 63(1):69-73.
[3] Biff D, Petronilho F, Constantino L, et al. Correlation of acute phase inflammatory and oxidative markers with long-term cognitive impairment in sepsis survivors rats[J]. Shock, 2013, 40(1):45-48.
[4] Brown S, Beesley S, Stubben C, et al. Postseptic Cognitive Impairment and Expression of APOE in Peripheral Blood: The Cognition After Sepsis (CASS) Observational Pilot Study[J]. Journal of Intensive Care Medicine, 2021, 36(3):262-270.
[5] Li C, Yu T, Zhang Y, et al. Electroacupuncture Improves Cognition in Rats With Sepsis-Associated Encephalopathy[J]. Journal of

Surgical Research, 2020, 256:258-266.
[6] Wei Z, Jiang S, Qian DW, et al. The interaction between ononin and human intestinal bacteria [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2014, 49(8):1162-1168.
[7] 左方,陈诚,任茜.芒柄花苷的体外抗乳腺癌作用及机制研究[J].中国药理学杂志,2020,55(3):194-198.
[8] Chen X, Zhang M, Ahmed M, et al. Neuroprotective effects of ononin against the aluminium chloride-induced Alzheimer's disease in rats[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2021, 28(8):4232-4239.
[9] Fu S, Gu Y, Jiang J, et al. Calycosin-7-O- β -D-glucoside regulates nitric oxide/caveolin-1/matrix metalloproteinases pathway and protects blood-brain barrier integrity in experimental cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2014, 155(1):692-701.
[10] Li F, Zhang B, Duan S, et al. Small dose of L-dopa/Benserazide hydrochloride improved sepsis-induced neuroinflammation and long-term cognitive dysfunction in sepsis mice [J]. Brain Research, 2020, 1737:146780.
[11] Takashi K, Takeyoshi S. Perioperative innate immunity and its modulation[J]. Journal of Uoeh, 2011, 33(2):123-137.
[12] Zhang N, Zhao W, Hu Z, et al. Protective effects and mechanisms of high-dose vitamin C on sepsis-associated cognitive impairment in rats[J]. Scientific reports, 2021, 11(1):14511.
[13] 高红艺,申云鹏,袁佳佳,等.菊苣酸对脓毒症相关性脑病小鼠认知功能的影响[J].临床麻醉学杂志,2022,38(2):188-193.
[14] Zhou X, Liu J, Xu ZP, et al. Dexmedetomidine ameliorates postoperative cognitive dysfunction by inhibiting Toll-like receptor 4 signaling in aged mice [J]. The Kaohsiung Journal of Medical Sciences, 2020, 36(9):721-731.
[15] Zhang D, Yang YJ, Yang YX, et al. Severe inflammation in newborns induces long-term cognitive impairment by activation of IL-1 β /KCC2 signaling during early development[J]. BMC Medicine, 2022, 20(1):235.
[16] Id JE, Id AP, Wittstock M, et al. The prognostic value of neurofilament levels in patients with sepsis-associated encephalopathy-A prospective, pilot observational study [J]. PLoS ONE, 2019, 14(1):e0211184.
[17] Lin D, Lei YB, Yz B, et al. Anti-inflammatory effects of ononin on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells-ScienceDirect [J]. Molecular Immunology, 2017, 83:46-51.
[18] Xu XE, Liu L, Wang YC, et al. Caspase-1 inhibitor exerts brain-protective effects against sepsis-associated encephalopathy and cognitive impairments in a mouse model of sepsis [J]. Brain, Behavior, and Immunity, 2019, 80:859-870.
[19] Tian J, Tai Y, Shi M, et al. Atorvastatin Relieves Cognitive Disorder After Sepsis Through Reverting Inflammatory Cytokines, Oxidative Stress, and Neuronal Apoptosis in Hippocampus [J]. Cellular and Molecular Neurobiology, 2020, 40(3):521-530.

(收稿日期:2022-09-23

修回日期:2022-10-28)