

· 实验研究 ·

丙酮酸乙酯对脾切除术后老龄大鼠认知功能的影响

代 纳 李思源 毕燕琳 王玲 张蕊 王彬

【摘要】 目的 探讨丙酮酸乙酯 (ethyl pyruvate, EP) 对脾切除术后老龄大鼠认知功能的影响。**方法** 健康雄性 SD 大鼠 84 只, 18 月龄, 体重 500~600 g, 采用随机数字表法将其分为四组, 每组 21 只: 对照组 (C 组)、手术组 (S 组)、EP 溶液组 (E 组) 和溶剂组 (R 组)。S 组、E 组和 R 组行脾切除术, E 组腹腔注射 EP 40 mg/kg, R 组腹腔注射等量 EP 溶液的溶剂, S 组和 C 组腹腔注射等量生理盐水。于术前 5 d、术后 1、3、7 d 进行 Morris 水迷宫实验, 记录大鼠逃避潜伏期和游泳距离, 水迷宫实验结束后处死大鼠, 采用 Western blot 和 RT-PCR 法检测四组大鼠海马高迁移率族蛋白 1 (high mobility group box 1, HMGB1) 及晚期糖基化终末产物受体 (receptor for advanced glycation end products, RAGE) 的蛋白含量和 mRNA 表达量。**结果** 与 C 组比较, 术后 1、3 d S 组、E 组和 R 组逃避潜伏期和游泳距离明显延长, 海马 HMGB1、RAGE 蛋白含量和 mRNA 表达量明显增加 ($P < 0.05$)。与 S 组比较, 术后 1、3 d E 组逃避潜伏期和游泳距离明显缩短, 海马 HMGB1、RAGE 蛋白含量和 mRNA 表达量明显减少 ($P < 0.05$)。与术前比较, 术后 1、3 d S 组、E 组和 R 组逃避潜伏期和游泳距离明显延长 ($P < 0.05$)。**结论** 丙酮酸乙酯可能通过下调海马 HMGB1 及 RAGE 的表达改善认知功能。

【关键词】 丙酮酸乙酯; 术后认知功能障碍; HMGB1; RAGE; 海马

Impact of ethyl pyruvate on the cognitive function after splenectomy in aged rats DAI Rui, LI Siyuan, BI Yanlin, WANG Ling, ZHANG Rui, WANG Bin. Department of Anesthesiology, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266071, China

Corresponding author: WANG Bin, Email: wangbin328@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the impact of ethyl pyruvate (EP) on cognitive function and the expression of high mobility group box 1 (HMGB1) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) after splenectomy in aged rats. **Methods** Eighty-four male aged Sprague-Dawley rats, 18 months old, weighing 500-600 g, were randomly divided into 4 groups ($n=21$ each) by random number table method: control group (group C), surgery group (group S) ethyl pyruvate group (group E) and solution without EP group (group R). Morris water maze test was performed to evaluate cognitive function 5 days before surgery and 1, 3, 7 days after surgery. Group E was injected with EP 40 mg/kg intraperitoneally after splenectomy, group S and group C were injected with equivalent normal saline after splenectomy, group R was injected with equivalent solution without EP. Rats were killed after Morris water maze test, and the expression of HMGB1 and RAGE protein and mRNA in hippocampus were measured by Western blot and RT-PCR methods. **Results** Compared with group C, the escape latency and swimming distance were significantly prolonged in groups S, E and R 1 and 3 days after surgery, as well as the expression of HMGB1 and RAGE in hippocampus were significantly up-regulated ($P < 0.05$). Compared with group S, the escape latency and swimming distance were significantly decreased and the expression of HMGB1 and RAGE were down-regulated in group E 1 and 3 days after surgery ($P < 0.05$). Compared with the preoperative group, the escape latency and swimming distance were significantly prolonged in groups S, E and R 1 and 3 days after surgery ($P < 0.05$). **Conclusion** EP may improve cognitive function in aged rats by down regulating the expression of HMGB1 and RAGE in the hippocampus.

【Key words】 Ethyl pyruvate; Postoperative cognitive function; High mobility group box 1; Receptor for advanced glycation end products; Hippocampus

基金项目: 青岛市市南区科技局立项课题 (2014-14-032-YY)

作者单位: 266071 青岛市市立医院麻醉科 (代纳、毕燕琳、王玲、王彬), 普外科 (李思源); 潍坊医学院麻醉学系临床麻醉重点实验室 (张蕊)

通信作者: 王彬, Email: wangbin328@sina.com

术后认知功能障碍 (postoperative cognitive dysfunction, POCD) 发病原因尚未明确, 但其发病机制与细胞因子介导的炎症反应有关^[1]。高迁移率

族蛋白 1 (high mobility group box 1, HMGB1) 是一种高度保守的非组蛋白核蛋白^[2], 释放到胞外时, 被认为是“晚期炎性因子”, 参与脓毒症、感染和肿瘤等多种疾病的发病过程。晚期糖基化终末产物受体 (receptor for advanced glycation end products, RAGE) 可结合多种配体, 但与 HMGB1 亲和力最高。本课题组前期研究结果显示, HMGB1 和 RAGE 表达降低可以改善大鼠认知功能。丙酮酸乙酯 (ethyl pyruvate, EP) 是一种稳定的亲脂性丙酮酸衍生物, 可以抑制早期或晚期炎性因子的释放, 对局部和全身炎症反应具有保护作用^[3]。本研究拟用脾切除术制造大鼠 POCD 模型, 探讨 EP 对老龄大鼠认知功能及海马 HMGB1 和 RAGE 表达的影响。

材料与方法

实验动物及分组 健康雄性 SD 大鼠 84 只, 18 月龄, 体重 500~600 g, 购自山东鲁抗医药股份有限公司实验动物中心。在室温 25℃、相对湿度 40%、昼夜周期分别为 12 h 的环境下适应性饲养 1 周, 给予充足的水与食物, 保持大鼠垫料干燥。采用随机数字表法分为四组: 对照组 (C 组)、手术组 (S 组)、EP 溶液组 (E 组) 和溶剂组 (R 组)。EP 溶液的组成为 Na^+ 130 mmol/L、 K^+ 4 mmol/L、 Ca^{2+} 2.7 mmol/L、 Cl^- 139 mmol/L 和 EP 32 mmol/L, pH = 7.0。溶剂的组成为 Na^+ 130 mmol/L、 K^+ 4 mmol/L、 Ca^{2+} 2.7 mmol/L、 Cl^- 139 mmol/L。

Morris 水迷宫实验 测试水池直径 120 cm, 水深 60 cm; 圆柱形平台直径 10 cm, 高 40 cm, 水面高于平台 2 cm。四组大鼠于术前 5 d 进行 Morris 水迷宫训练, 每天训练 4 次, 两次训练的时间间隔至少 30 min。将大鼠置于平台上适应 30 s, 随后将大鼠从 4 个不同象限面壁放入池内, 设置游泳时限为 60 s, 电脑自动记录大鼠入水后找到平台所用的时间 (即逃避潜伏期), 登台后适应 5 s, 若 60 s 不能登台, 记录逃避潜伏期为 61 s, 引导其上台, 适应 10 s。记录大鼠从入水至找到平台游过的路线长度为总路程。如果 60 s 内未找到平台, 则以入水到 60 s 末游过的路线长度为总路程。取第 5 天测试结果的平均值作为术前结果。于术后 1、3、7 d 进行 Morris 水迷宫实验, 记录大鼠逃避潜伏期和游泳距离。

动物模型制备 Morris 水迷宫实验结束后仅 S 组、E 组和 R 组行脾切除术。用 10% 水合氯醛 0.3 ml/100 g 对大鼠进行腹腔注射麻醉, 待翻正反射消失后右侧卧位固定, 于肋缘下脊柱旁各 1 cm 处做

1.5~2.0 cm 切口, 进入腹腔游离脾脏, 依次结扎, 切除脾脏, 逐层缝合。E 组于脾切除术后 30 min 腹腔注射 EP 40 mg/kg, S 组和 C 组腹腔注射等量生理盐水, R 组腹腔注射等量 EP 溶液的溶剂。

大鼠海马 HMGB1 和 RAGE 蛋白含量的测定 Morris 水迷宫实验结束后, 于术后 1、3、7 d 随机选取 7 只大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛 0.3 ml/100 g, 冰上断头取海马组织于 EP 管中, 加入 RIPA 裂解液和 PMSF 防腐剂充分研磨, 冰上裂解 30 min 后, 4℃ 下 11 000 r/min 离心 30 min。取上清液于 95℃ 变性 5 min 后采用 Western blot 法测定海马 HMGB1 和 RAGE 蛋白含量。采用 ECL 系统曝光成像。

大鼠海马 HMGB1 和 RAGE mRNA 表达量的测定 采用 Trizol 试剂法抽提总 RNA, 用逆转录试剂盒合成 cDNA。引物序列 (5'→3'): HMGB1 正义: GAAGCCGAGAGGCAAAATGTCC, 反义: TAGCTCTGTAGGCAGCAATAC; RAGE 正义: CCGAGTCTACCAGATTCTG, 反义: TTCACGAGTGTTTCTTTGCC; β -actin 正义: GTGGGGCGCCCCAGGCACCA, 反义: CTCCTTAATGTCA-CGCACGAT。扩增产物长度分别为 470 bp、180 bp、510 bp。RT-PCR 法反应后取 PCR 扩增产物 5 μ l, 进行 2% 的琼脂糖凝胶电泳。电泳后图像扫描分析。

统计分析 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析。正态分布的计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。Image J 软件分析 RT-PCR 图像, 目的条带与 β -actin 条带的比值反映相应表达强度。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

大鼠术后逃避潜伏期和游泳距离 术后 1、3 d S 组、E 组和 R 组大鼠逃避潜伏期和游泳距离明显长于 C 组 (P<0.05), E 组逃避潜伏期和游泳距离明显短于 S 组 (P<0.05)。与术前比较, 术后 1、3 d S 组、E 组和 R 组大鼠潜伏期和游泳距离明显延长 (P<0.05)。术后 1、3、7 d S 组和 R 组大鼠逃避潜伏期和游泳距离差异无统计学意义; C 组、S 组、E 组术后 7 d 逃避潜伏期和游泳距离与术前差异无统计学意义 (表 1, 2)。

大鼠术后海马 HMGB1 和 RAGE 蛋白含量 术后 1、3 d S 组、E 组和 R 组大鼠海马 HMGB1 和

RAGE 含量明显多于 C 组 ($P < 0.05$); E 组海马 HMGB1 和 RAGE 含量明显少于 S 组 ($P < 0.05$)。S 组和 R 组大鼠术后不同时间海马 HMGB1 和 RAGE 含量差异无统计学意义 (表 3)。

表 1 四组大鼠不同时间逃避潜伏期的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	术前 ($n=21$)	术后 1 d ($n=21$)	术后 3 d ($n=14$)	术后 7 d ($n=7$)
C 组	25.5±9.8	26.6±6.0	24.8±7.9	23.9±6.1
S 组	24.2±7.0	45.2±10.6 ^{ab}	42.1±9.1 ^{ab}	24.1±10.2
E 组	23.5±5.6	40.4±9.9 ^{abc}	35.5±10.7 ^{abc}	23.2±6.3
R 组	25.3±6.3	46.7±8.7 ^{ab}	42.9±8.2 ^{ab}	23.2±9.1

注:与术前比较,^a $P < 0.05$;与 C 组比较,^b $P < 0.05$;与 S 组比较,^c $P < 0.05$

大鼠术后海马 HMGB1 和 RAGE mRNA 表达
术后 1 d、3 d S 组、E 组和 R 组大鼠海马 HMGB1 和 RAGE mRNA 表达量明显多于 C 组 ($P < 0.05$); E 组海马 HMGB1 和 RAGE mRNA 表达量明显少于 S 组 ($P < 0.05$)。S 组和 R 组大鼠术后不同时间海马 HMGB1 和 RAGE mRNA 表达量差异无统计学意义 (表 4)。

表 2 四组大鼠不同时间游泳距离的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	术前 ($n=21$)	术后 1 d ($n=21$)	术后 3 d ($n=14$)	术后 7 d ($n=7$)
C 组	380.7±146.0	406.9±162.2	399.2±126.5	375.2±159.3
S 组	376.3±118.5	717.3±161.3 ^{ab}	635.7±145.1 ^{ab}	366.8±155.2
E 组	360.9±175.9	642.8±158.1 ^{abc}	575.4±174.6 ^{abc}	365.8±139.9
R 组	382.1±113.3	737.6±153.2 ^{ab}	641.5±147.4 ^{ab}	354.9±149.2

注:与术前比较,^a $P < 0.05$;与 C 组比较,^b $P < 0.05$;与 S 组比较,^c $P < 0.05$

表 3 四组大鼠术后不同时间海马 HMGB1 和 RAGE 蛋白含量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

指标	组别	只数	术后 1 d	术后 3 d	术后 7 d
HMGB1	C 组	7	0.642±0.017	0.653±0.019	0.623±0.082
	S 组	7	0.942±0.016 ^a	0.808±0.022 ^a	0.626±0.070
	E 组	7	0.814±0.013 ^{ab}	0.741±0.012 ^{ab}	0.643±0.014
	R 组	7	0.950±0.015 ^a	0.816±0.023 ^a	0.632±0.069
RAGE	C 组	7	0.719±0.027	0.703±0.027	0.711±0.033
	S 组	7	1.154±0.042 ^a	0.936±0.021 ^a	0.714±0.021
	E 组	7	0.986±0.028 ^{ab}	0.828±0.019 ^{ab}	0.705±0.034
	R 组	7	1.166±0.031 ^a	0.942±0.020 ^a	0.731±0.020

注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 S 组比较,^b $P < 0.05$

讨 论

海马是参与认知功能的经典脑区,在学习记忆和空间定位中有着重要作用。脾切除造成中度手术创伤,使机体产生应激反应,激活外周免疫系统,导致炎症介质释放,认知功能受损^[4]。采用经背切口的改良脾切除术,既可使脾脏易暴露,又降低感染的风险,且对大鼠机体影响相对较小,术后可以如期进行水迷宫实验^[5]。本研究采用逃避潜伏期和游泳距离反映大鼠空间学习记忆能力。结果表明制备模型成功,老年大鼠在脾切除术后出现短暂的认知功能减退,且 EP 溶液的溶剂对 POCD 无明显影响。

HMGB1 普遍存在于真核细胞中,当机体处于稳态时, HMGB1 在细胞核中高度保守;当细胞受到损伤时, HMGB1 释放到胞外,成为一种细胞炎症因子和损伤信号分子。胞外 HMGB1 在炎症反应中发挥枢纽作用:一方面具有趋化作用,能使免疫细胞向损伤部位集中;另一方面,通过与其特异性受体 (如 RAGE) 结合,诱导其他炎症因子如 TNF- α 的释放或损伤靶细胞,触发级联反应^[6]。Li 等^[7]研究表明, HMGB1-RAGE 信号途径调节海马炎症反应,可能在手术诱导的认知减退中发挥重要作用。

表 4 四组大鼠术后不同时间海马 HMGB1 和 RAGE mRNA 表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

指标	组别	只数	术后 1 d	术后 3 d	术后 7 d
HMGB1 mRNA	C 组	7	0.360 ± 0.013	0.355 ± 0.019	0.352 ± 0.011
	R 组	7	0.609 ± 0.018 ^a	0.537 ± 0.014 ^a	0.386 ± 0.030
	S 组	7	0.618 ± 0.017 ^a	0.528 ± 0.013 ^a	0.389 ± 0.028
	E 组	7	0.563 ± 0.016 ^{ab}	0.451 ± 0.020 ^{ab}	0.370 ± 0.028
RAGE mRNA	C 组	7	0.291 ± 0.040	0.302 ± 0.026	0.306 ± 0.013
	R 组	7	0.563 ± 0.021 ^a	0.432 ± 0.017 ^a	0.327 ± 0.020
	S 组	7	0.555 ± 0.022 ^a	0.454 ± 0.018 ^a	0.320 ± 0.021
	E 组	7	0.466 ± 0.012 ^{ab}	0.367 ± 0.018 ^{ab}	0.322 ± 0.028

注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 S 组比较,^b $P < 0.05$

EP 是内源性代谢物丙酮酸的简单衍生物,具有抗炎作用,可以有效抑制缺血-再灌注损伤^[8],在失血性休克动物模型中显著提高生存率^[9],降低内毒素血症发生率和脓毒症小鼠体循环 HMGB1 水平。EP 治疗已被证明在多种临床前模型的危重疾病(如严重的败血症、急性胰腺炎和脑卒中)中可以提高生存率、改善器官功能^[10]。本研究结果显示,EP 可有效抑制 HMGB1 生成释放及信号通路激活,进而改善认知功能,发挥保护作用。其机制可能是:一方面,EP 抑制 HMGB1 乙酰化,阻止核内 HMGB1 释放到胞外,同时抑制 HMGB1 的转录合成^[11];另一方面,EP 抑制 NF- κ B 和 p38MAPK 激活^[3],进而抑制炎症反应的发展。但本研究结果显示,EP 可能并未完全抑制 HMGB1 的生成释放, HMGB1 的激活存在其他通路。动物实验模型与临床情况有很大差异,目前 EP 并不能广泛应用于临床,但为 POCD 的预防、治疗和后期的发生发展到一定的指导作用。

综上所述,丙酮酸乙酯可以降低脾切除术引起的老年大鼠海马区 HMGB1 和受体 RAGE 表达,改善其认知功能。

参 考 文 献

- [1] 岳云. 老年患者术后认知功能障碍的再认识. 临床麻醉学杂志, 2013, 29 (10): 1035-1038.
- [2] Yang H, Wang H, Chavan SS, et al. High mobility group box protein 1 (HMGB1): the prototypical endogenous danger molecule. Mol Med, 2015, 21 Suppl 1: S6-S12.
- [3] Ulloa L, Ochani M, Yang H, et al. Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99 (19): 12351-12356.
- [4] Cao XZ, Ma H, Wang JK, et al. Postoperative cognitive deficits and neuroinflammation in the hippocampus triggered by surgical trauma are exacerbated in aged rats. Prog Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry, 2010, 34 (8): 1426-1432.
- [5] 迟蕾, 丁明, 张迅, 等. 术前不同时长睡眠剥夺对大鼠认知功能的影响. 临床麻醉学杂志, 2015, 31 (8): 790-792.
- [6] 何慧娟. HMGB1 在老龄大鼠术后认知受损中的作用及机制研究. 长沙: 中南大学, 2013.
- [7] Li RL, Zhang ZZ, Peng M, et al. Postoperative impairment of cognitive function in old mice: a possible role for neuroinflammation mediated by HMGB1, S100B, and RAGE. J Surg Res, 2013, 185 (2): 815-824.
- [8] Fink MP. Reactive oxygen species as mediators of organ dysfunction caused by sepsis, acute respiratory distress syndrome, or hemorrhagic shock: potential benefits of resuscitation with ringer's ethyl pyruvate solution. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2002, 5 (2): 167-174.
- [9] Tawadrous ZS, Delude RL, Fink MP. Resuscitation from hemorrhagic shock with Ringer's ethyl pyruvate solution improves survival and ameliorates intestinal mucosal hyperpermeability in rats. Shock, 2002, 17 (6): 473-477.
- [10] Fink MP. Ethyl pyruvate: a novel anti-inflammatory agent. J Intern Med, 2007, 261 (4): 349-362.
- [11] 杨超, 吴传新, 孙航, 等. 丙酮酸乙酯抑制脓毒症时 HMGB1 释放的分子机制. 中山大学学报(医学科学版), 2014, 35 (2): 187-193.

(收稿日期: 2016-08-29)