

· 实验研究 ·

不同剂量丙泊酚对 2 型糖尿病大鼠认知功能的影响

梁冰 董铁立

【摘要】 目的 探讨丙泊酚对 2 型糖尿病大鼠认知功能的影响并研究其潜在机制。**方法** 健康雄性成年 SD 大鼠 50 只,其中 10 只采用普通饲料正常喂养作为空白对照组,40 只采用高脂高糖饲料喂养 8 周联合一次性注射 1% STZ 建立糖尿病模型,并分为四组:糖尿病组和低、中、高剂量丙泊酚组,糖尿病大鼠分别腹腔注射 1% 丙泊酚 10、30、75 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,连续注射 5 d。丙泊酚用药后第 1 天开始采用 Morris 水迷宫实验检测大鼠逃避潜伏期和穿越原平台次数;HE 染色观察大鼠海马组织病理变化;采用比色法检测脑组织匀浆中超氧化歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽(GSH)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)浓度;Western blot 检测大鼠脑组织中晚期糖基化终产物(AGEs)及其受体(RAGE)蛋白含量。**结果** 与空白对照组比较,糖尿病组大鼠逃避潜伏期明显延长,穿越原平台次数明显减少,神经元细胞损伤明显增加,SOD、CAT、GSH 和 GSH-PX 浓度明显降低,MDA 浓度明显升高,AGEs 和 RAGE 蛋白含量明显升高($P < 0.05$);与糖尿病组比较,低剂量丙泊酚组大鼠逃避潜伏期和穿越原平台次数差异无统计学意义,中、高剂量丙泊酚组大鼠逃避潜伏期明显延长,穿越原平台次数明显减少,SOD、CAT、GSH 和 GSH-PX 浓度明显降低,MDA 浓度明显升高,同时 AGEs 和 RAGE 蛋白含量明显升高($P < 0.05$)。**结论** 镇静和麻醉剂量的丙泊酚能够加重糖尿病大鼠的认知功能障碍,加重氧化应激反应,这可能与上调脑组织中 AGEs/RAGE 蛋白含量有关。

【关键词】 丙泊酚;糖尿病;认知功能

Effects of propofol on cognitive function in type 2 diabetic rats LIANG Bing, DONG Tieli. Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

Corresponding author: DONG Tieli, Email: dongtieli_zz@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the effects and mechanism of propofol on cognitive function of type 2 diabetic rats. **Methods** Ten of fifty adult male SD rats were fed with basic diet and allocated to control group. Another forty rats were fed with high sugar and high fat for 8 weeks and composite intraperitoneal injection of 1% streptozotocin (STZ) to establish model and then divided into four groups: diabetes group; low dose, middle dose and high dose of propofol group (diabetic rats were given intraperitoneal injection of 1% propofol 10, 30, 75 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for 5 consecutive days). The cognitive functions were examined by Morris water maze from the first day after intraperitoneal injection with propofol. The hippocampus were isolated for observing histopathologic alterations by HE staining and for the determinations of SOD, MDA, CAT, GSH and GSH-PX by colorimetry. Western blot was used to detect the expression of AGEs and RAGE. **Results** Compared to the control group, there was an obvious increased escape latent period, decreased the frequency of crossing platform, increased hippocampal neurons damage and MDA, decreased levels of SOD, CAT, GSH and GSH-PX, as well as the protein levels of AGEs and RAGE in diabetes group ($P < 0.05$). There was no significant difference between diabetes group and low dose propofol of group on behavior ability and detection index. However, middle dose and high dose of propofol group showed more serious cognitive dysfunction, aggravated hippocampal neurons cells loss, increased oxidative stress as well as enhanced expression of AGEs and RAGE ($P < 0.05$). **Conclusion** Multiple given sedative or anesthetic doses of propofol can aggravate the cognitive dysfunction and oxidative stress in type 2 diabetic rats, which may be related to increase the expression of AGEs and RAGE in brain tissue.

作者单位:450000 郑州市,河南中医药大学第一附属医院麻醉科(梁冰);郑州大学第二附属医院麻醉科(董铁立)

通信作者:董铁立,Email:dongtieli_zz@qq.com

【Key words】 Propofol; Diabetes; Cognitive function

糖尿病是当今社会最常见的慢性代谢性疾病,因常常伴发多种并发症,而给患者及其家庭、医疗机构和国家带来了巨大的挑战和经济负担^[1],接受手术治疗的糖尿病患者也日渐增多^[2]。然而由于全身麻醉药物在体内的多重靶点效应,容易引起相关神经蛋白退行性变,与中枢胆碱能受体相互作用并在特异条件下产生神经毒性物质,造成神经系统功能紊乱而影响认知功能^[3]。作为全身麻醉药物之一的丙泊酚可以通过激活 GABA 受体-氯离子复合物发挥镇静催眠作用,因为其起效迅速、药效作用时间短,持续输注不会蓄积等优点而被广泛应用于临床的诊疗中,但是也能够导致术后认知功能障碍的发生^[4],同时也已经证实丙泊酚影响高脂大鼠的认知功能^[5]。本研究观察不同剂量丙泊酚对糖尿病大鼠认知功能的影响并探索其可能机制。

材料与方法

实验试剂 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)购自美国 Sigma 公司,用 0.1 mol/L 的柠檬酸缓冲液配成 1% STZ,以 25 mg/kg 腹腔注射。超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒,批号 20110927;丙二醛(MDA)试剂盒,批号 20110915;过氧化氢酶(CAT)试剂盒,批号 20110918;谷胱甘肽(GSH)试剂盒,批号 20110922;谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)试剂盒,批号 20110922;以上试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。兔抗鼠 RAGE 抗体(SC-5563)购自美国 Santa Cruz 公司;兔抗鼠 AGEs 抗体(bs-1158R)购自北京博奥森生物科技有限公司。

动物处理与分组 清洁级健康雄性成年 SD 大鼠 50 只,体重 200~220 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,均无明显运动功能障碍和认知功能障碍。随机分为五组,每组 10 只:空白对照组,普通饲料喂养并排除糖尿病;糖尿病组,高脂高糖饲料喂养 8 周,禁食 12 h 后按照 25 mg/kg 剂量一次性注射 1% STZ,72 h 后尾静脉采血测定血糖,以血糖 ≥ 16.7 mmol/L 作为糖尿病造模成功标准;低剂量、中剂量、高剂量丙泊酚组(各组糖尿病大鼠分别连续 5 d 腹腔注射 1% 丙泊酚 10、30、75 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹)。空白对照组和糖尿病组大鼠则腹腔注射等量生理盐水。

Morris 水迷宫实验 参照 Morris 水迷宫法^[6]测试大鼠学习记忆能力,实验历时 6 d。其中前 5 d 为定位航行实验,分别将五组大鼠从 4 个象限面向池壁放入水中并开始计时,记录登上隐蔽平台所用时间,此时间间隔即为逃避潜伏期。第 6 天实验中,将隐蔽平台撤离,对大鼠进行空间探索实验。选定和原平台区域对应的象限终点为入水点,记录实验大鼠 120 s 内穿越原平台次数。

HE 染色观察海马组织病理变化 水迷宫实验结束后,处死各组大鼠并分离脑组织,置于 4% 中性福尔马林溶液中固定 24 h 后,脱水,浸蜡,包埋,连续切片(片厚 3 μ m),进行 HE 染色。光镜下观察海马 CA1 区神经细胞形态学变化。

比色法检测脑组织中氧化应激指标 水迷宫实验结束后,处死各组大鼠并分离一侧脑组织,称重。以 2 ml 生理盐水 4℃ 冰浴匀浆,3 000 r/min 离心 10 min,取上清放入-80℃ 冰箱待测。以比色法测定脑组织中 SOD、MDA、CAT、GSH 和 GSH-PX 浓度,所有操作均按照试剂盒说明书进行。

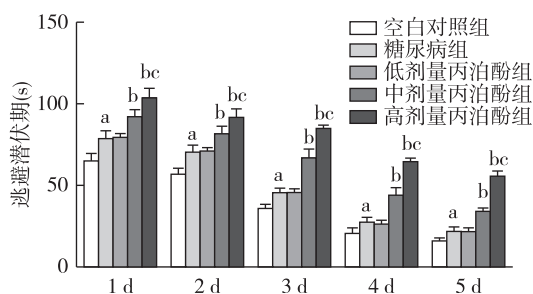
Western blot 检测脑组织中晚期糖基化终产物(AGEs)及其受体(RAGE)的蛋白含量 水迷宫实验后处死各组大鼠,分离一侧脑组织,称量 0.2 g,剪碎后加入裂解液提取蛋白,BCA 法总蛋白定量。调整上样量为 25 μ g 总蛋白/样本,上样,电泳,转膜,封闭。封闭完毕后 PBS 洗膜 5 次,分别加一抗(所用的一抗稀释比例分别为 AGEs 抗体 1:1 000、RAGE 抗体 1:1 000),37℃ 反应 1.5 h, PBS 洗膜 5 次,加辣根过氧化物酶标记二抗,37℃ 反应 1 h, PBS 洗膜 5 次。染色,曝光,采用 BIORAD GELDOC XR 凝胶成像系统依次显影、定影,Quantity One Basic 软件分析胶片蛋白条带。

统计分析 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,正态分布计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析和 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

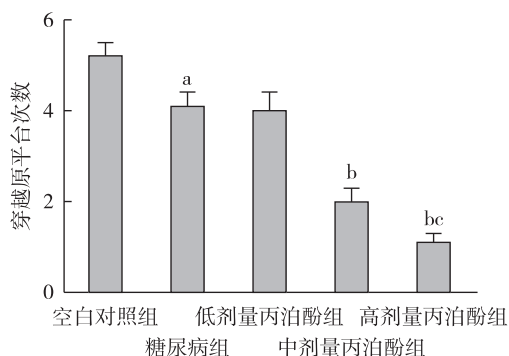
学习记忆能力 与空白对照组比较,糖尿病组大鼠逃避潜伏期明显延长,穿越原平台次数明显减少($P < 0.05$);与糖尿病组比较,低剂量丙泊酚组大鼠逃避潜伏期和穿越原平台次数差异无统计学意义,中、高剂量丙泊酚组大鼠逃避潜伏期逐渐延长,

穿越原平台次数逐渐减少($P < 0.05$),且呈现剂量依赖性(图 1,2)。



注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与糖尿病组比较,^b $P < 0.05$;与中剂量丙泊酚组比较,^c $P < 0.05$

图 1 五组大鼠逃避潜伏期的比较



注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与糖尿病组比较,^b $P < 0.05$;与中剂量丙泊酚组比较,^c $P < 0.05$

图 2 五组大鼠穿越原平台次数的比较

海马组织 HE 染色 空白对照组海马 CA1 区细胞分布均匀,排列整齐、密集,细胞染色清晰,形态正常,结构完整;糖尿病组大鼠海马 CA1 区细胞

排列紊乱,神经细胞胞体缩小,细胞核固缩、破裂,正常形态神经细胞数目减少;与糖尿病组相比,低剂量丙泊酚组大鼠海马组织中神经细胞损伤无明显增加,中、高剂量丙泊酚组大鼠海马组织中神经细胞排列更加紊乱,结构破裂更明显,细胞核固缩、碎裂明显增加(图 3)。

脑组织中氧化应激指标 与空白对照组比较,糖尿病组大鼠脑组织中 SOD、CAT、GSH 和 GSH-PX 浓度明显降低,MDA 浓度明显升高;与糖尿病组比较,低剂量丙泊酚组大鼠脑组织中各种氧化应激指标并无明显变化,中、高剂量丙泊酚组大鼠脑组织中 SOD、CAT、GSH 和 GSH-PX 浓度逐渐降低,MDA 浓度逐渐增加,且呈现剂量依赖性($P < 0.05$)(表 1)。

脑组织中 AGEs 和 RAGE 蛋白含量 与空白对照组比较,糖尿病组大鼠脑组织中 AGEs 和 RAGE 蛋白含量明显增加($P < 0.05$);与糖尿病组比较,低剂量丙泊酚大鼠脑组织中 AGEs 和 RAGE 蛋白含量差异无统计学意义,中、高剂量丙泊酚组大鼠脑组织中 AGEs 和 RAGE 蛋白含量逐渐增加,呈现剂量依赖性($P < 0.05$)(图 4)。

讨 论

糖尿病患者长期慢性糖代谢紊乱能够造成中枢神经系统受损,使大脑在结构、神经生理及神经精神等方面发生病理改变,形成以获得性认知行为缺陷为特征的糖尿病慢性并发症,称之为糖尿病脑病^[7],主要体现在空间执行功能、学习、记忆能力受损^[8]。本研究中采用高脂高糖喂养联合注射 STZ

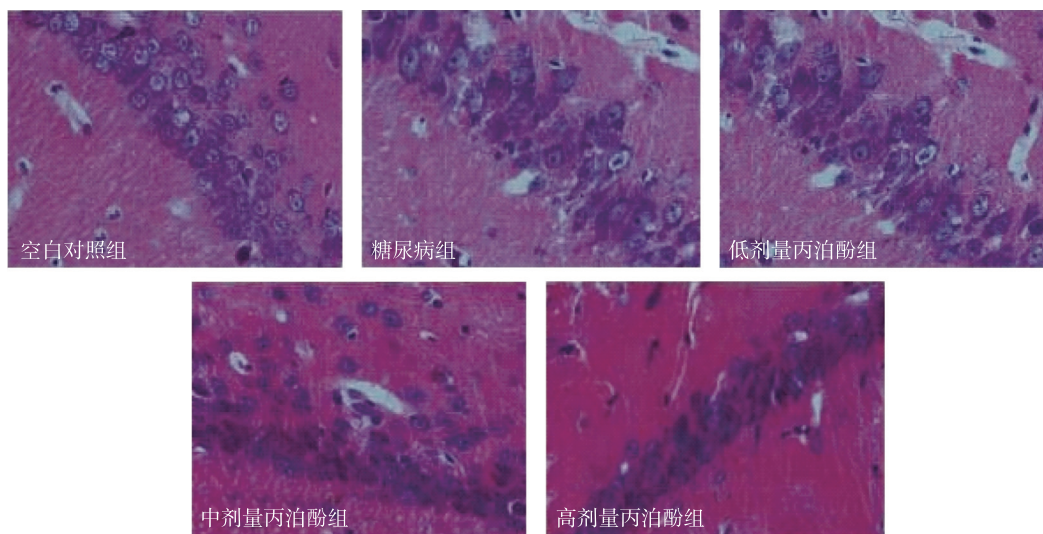
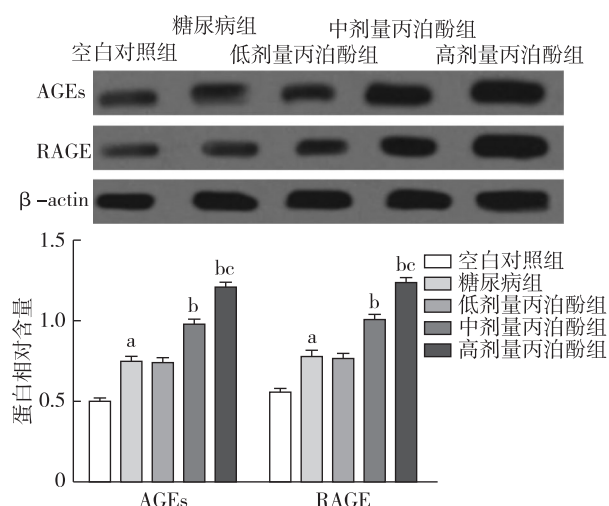


图 3 五组大鼠海马 CA1 区细胞病理变化(HE×400)

表 1 五组大鼠脑组织氧化应激指标的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	SOD (U/ml)	MDA (nmol/ml)	CAT (U/ml)	GSH (mg/L)	GSH-PX (U/ml)
空白对照组	10	26.1±4.5	1.1±0.7	26.7±2.4	1.5±0.5	426.3±10.4
糖尿病组	10	21.8±3.2 ^a	2.6±0.9 ^a	21.3±2.8 ^a	1.2±0.4 ^a	414.4±9.8 ^a
低剂量丙泊酚组	10	20.9±3.4	2.6±0.3	21.0±3.4	1.2±0.2	413.3±7.8
中剂量丙泊酚组	10	16.2±4.2 ^b	3.5±0.6 ^b	18.4±2.9 ^b	0.9±0.1 ^b	402.8±3.4 ^b
高剂量丙泊酚组	10	10.3±3.3 ^{bc}	4.3±0.4 ^{bc}	14.5±2.4 ^{bc}	0.6±0.1 ^{bc}	390.7±4.2 ^{bc}

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与糖尿病组比较,^b $P < 0.05$;与中剂量丙泊酚组比较,^c $P < 0.05$



注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与糖尿病组比较,^b $P < 0.05$;与中剂量丙泊酚组比较,^c $P < 0.05$

图 4 五组大鼠脑组织 AGEs 和 RAGE 蛋白含量的比较

诱导建立糖尿病模型大鼠,并且采用 Morris 水迷宫实验客观评价学习记忆功能,学习指标包括逃避潜伏期,代表大鼠学习能力,潜伏期越短代表学习能力越好。记忆指标为空间探索实验中大鼠穿越原平台次数,穿越平台次数越多说明记忆力越好^[9]。本研究中发现糖尿病组大鼠与空白对照组大鼠相比,平均逃避潜伏期延长、穿越原平台次数明显减少,证实糖尿病组大鼠存在认知功能障碍。

众所周知,丙泊酚因起效快、作用时间短、清醒快而完全、副作用少等优点,已成为临床上应用最为广泛的全身麻醉药物之一。尽管如此,很多研究已经报道丙泊酚麻醉后出现术后认知功能障碍^[10],同时也证实镇静麻醉剂量丙泊酚可能通过升高大鼠海马神经元 Tau 蛋白磷酸化表达水平而影响高

血脂大鼠学习记忆功能^[11]。本研究主要探索丙泊酚对糖尿病大鼠认知功能的影响以及潜在机制。Morris 实验结果显示,与糖尿病组相比,低剂量丙泊酚对大鼠学习记忆功能并没有太大影响,中、高剂量丙泊酚明显加剧糖尿病大鼠学习记忆功能障碍,并且剂量越大,影响越严重,这表明镇静麻醉剂量丙泊酚能够加重糖尿病大鼠空间学习记忆功能障碍。

海马组织神经细胞的完整性对学习记忆功能有至关重要的作用^[12]。本实验中 HE 染色结果显示,糖尿病组大鼠海马组织神经细胞排列紊乱,出现明显损伤和减少,中高剂量丙泊酚均能明显加重大鼠海马组织神经细胞的损伤和破裂。已经证实氧化应激参与糖尿病发生发展的各个环节^[13]。为了证实海马神经细胞损伤过程中是否伴随着氧化应激,本研究采用比色法检测脑组织中抗氧化系统中指标水平。本研究结果表明,糖尿病组大鼠脑组织中抗氧化酶含量明显降低,MDA 水平增加,而中高剂量丙泊酚加剧了糖尿病大鼠海马组织抗氧化酶的减少,同时诱导 MDA 水平的升高,这表明镇静麻醉剂量丙泊酚能够通过加重糖尿病模型中的氧化应激从而损伤神经细胞。

之前研究证实脑内晚期糖基化终末产物 AGEs 能够通过激活 RAGE 受体并介导 ROS 相关的转录因子 NF- κ B 和其它调控因子的激活,进而引发氧化应激和炎症反应,损害大脑皮质神经元和海马的结构和功能^[14, 15]。同时也证实 AGE 及其受体 RAGE 在糖尿病并发症的病理过程中起主要作用^[16, 17]。本研究发现,糖尿病模型大鼠脑组织中 AGEs 和 RAGE 表达量明显增加,推测 AGEs 和 RAGE 的高表达诱导脑组织中氧化应激反应,从而损伤神经

胞,影响大鼠学习记忆功能。重要的是,镇静麻醉剂量丙泊酚均能够明显诱导糖尿病模型中 AGEs 和 RAGE 表达的上调,加重氧化应激损伤。因此,推断镇静麻醉剂量丙泊酚可能通过上调 AGEs/RAGE 表达,加重糖尿病模型大鼠脑组织的氧化损伤,从而加重其认知功能障碍。

综上所述,糖尿病大鼠模型中伴随着脑组织氧化应激损伤和认知功能障碍,亚麻醉剂量丙泊酚对糖尿病认知功能障碍影响并不明显,而镇静麻醉剂量丙泊酚明显损伤糖尿病大鼠学习记忆功能,其机制可能与诱导 AGEs/RAGE 表达上调,加重氧化应激有关。

参 考 文 献

- [1] Li Y, Pan K, Chen L, et al. Deferoxamine regulates neuroinflammation and iron homeostasis in a mouse model of postoperative cognitive dysfunction. *J Neuroinflammation*, 2016, 13 (1): 268.
- [2] Emik U, Unal Y, Arslan M, et al. The effects of memantine on recovery, cognitive functions, and pain after propofol anesthesia. *Braz J Anesthesiol*, 2016, 66(5): 485-491.
- [3] Tian X, Liu Y, Ren G, et al. Resveratrol limits diabetes-associated cognitive decline in rats by preventing oxidative stress and inflammation and modulating hippocampal structural synaptic plasticity. *Brain Res*, 2016, 1650: 1-9.
- [4] Royse CF, Andrews DT, Newman SN, et al. The influence of propofol or desflurane on postoperative cognitive dysfunction in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Anaesthesia*, 2011, 66(6): 455-464.
- [5] 张亮, 陈世骄, 陈伯成, 等. 丙泊酚对高脂血症大鼠空间学习记忆功能的影响及机制. *广西医科大学学报*, 2014, 31(2): 181-185.
- [6] 刘展, 刘彦峰. 竹叶黄酮缓解异氟醚引起的老年大鼠认知功能障碍. *生物化学与生物物理进展*, 2016, 43(7): 699-705.
- [7] Sonoda N, Inoguchi T, Minami Y, et al. Evaluation of brain redox status and its association with cognitive dysfunction in diabetic animal models by redox molecular imaging (ReMI). *Yakugaku Zasshi*, 2016, 136(8): 1081-1086.
- [8] Kim JM, Park SK, Guo TJ, et al. Anti-amnesic effect of Dendropanax moribifera via JNK signaling pathway on cognitive dysfunction in high-fat diet-induced diabetic mice. *Behav Brain Res*, 2016, 312: 39-54.
- [9] Ma C, Long H. Protective effect of betulin on cognitive decline in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. *Neurotoxicology*, 2016, 57: 104-111.
- [10] Chen B, Deng X, Wang B, et al. Persistent neuronal apoptosis and synaptic loss induced by multiple but not single exposure of propofol contribute to long-term cognitive dysfunction in neonatal rats. *J Toxicol Sci*, 2016, 41 (5): 627-636.
- [11] Zhi XL, Li CY, Xue M, et al. Changes in cognitive function due to combined propofol and remifentanyl treatment are associated with phosphorylation of Tau in the hippocampus, abnormal total water and calcium contents of the brain, and elevated serum S100beta levels. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(10): 2156-2162.
- [12] Yang LY, Greig NH, Huang YN, et al. Post-traumatic administration of the p53 inactivator pifithrin-alpha oxygen analogue reduces hippocampal neuronal loss and improves cognitive deficits after experimental traumatic brain injury. *Neurobiol Dis*, 2016, 96: 216-226.
- [13] Li PC, Liu LF, Jou MJ, et al. The GLP-1 receptor agonists exendin-4 and liraglutide alleviate oxidative stress and cognitive and micturition deficits induced by middle cerebral artery occlusion in diabetic mice. *BMC Neurosci*, 2016, 17 (1): 37.
- [14] Wang SY, Liu JP, Ji WW, et al. Qifu-Yin attenuates AGEs-induced Alzheimer-like pathophysiological changes through the RAGE/NF-kappaB pathway. *Chin J Nat Med*, 2016, 12 (12): 920-928.
- [15] Lv C, Wang L, Liu X, et al. Multi-faced neuroprotective effects of geniposide depending on the RAGE-mediated signaling in an Alzheimer mouse model. *Neuropharmacology*, 2016, 89: 175-184.
- [16] Leung SS, Forbes JM, Borg DJ. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) in type 1 diabetes pathogenesis. *Curr Diab Rep*, 2016, 16(10): 100.
- [17] Kay AM, Simpson CL, Stewart JA Jr. The role of AGE/RAGE signaling in diabetes-mediated vascular calcification. *J Diabetes Res*, 2016: 6809703.

(收稿日期:2016-11-15)