

· 实验研究 ·

吡格列酮对老年大鼠术后认知功能的影响及其机制研究

刘付宁 黄浩泉 刘玲 郭明炎 杨浩杰 曹铭辉

【摘要】 目的 探讨吡格列酮对老年大鼠术后认知功能的影响及其机制。**方法** 18 月龄雄性 SD 大鼠 160 只,随机为四组:对照组(Con 组)、手术组(S 组)、吡格列酮组(P 组)及吡格列酮预处理手术组(PS 组)。手术模型完成时测定各组大鼠血糖值;手术结束 12 h 后,采用 Western blot 法检测各组大鼠海马组织高级糖基化终末产物(advanced glycation endproducts, AGEs)含量,采用 ELISA 法检测各组大鼠海马组织活性氧(ROS)及 IL-6 浓度;术后第 4 天开始应用 Morris 水迷宫方法评价各组大鼠认知功能。**结果** 四组大鼠组间组内血糖差异无统计学意义。与 Con 组比较,手术结束 12 h 后 S 组大鼠海马 AGEs、IL-6 浓度明显增加,ROS 浓度明显升高($P < 0.05$);与 S 组比较,PS 组大鼠海马 AGEs、IL-6 浓度明显减少,ROS 浓度明显降低($P < 0.05$)。与 Con 组比较,S 组大鼠术后第 8 天和第 10 天逃逸潜伏期明显延长($P < 0.05$),测试时穿越平台的次数减少($P < 0.01$);与 S 组比较,PS 组大鼠术后第 10 天逃逸潜伏期明显缩短($P < 0.05$),测试时穿越平台的次数明显增加($P < 0.05$)。**结论** 吡格列酮可能不是直接通过调节大鼠的血糖变化改善老年大鼠术后认知功能,其作用机制可能与减少 AGEs 合成、降低 ROS 及 IL-6 浓度有关。

【关键词】 吡格列酮;术后认知功能;高级糖基化终末产物;白细胞介素-6;活性氧

Effect and mechanisms of pioglitazone on post operative cognitive function induced by surgery in elderly rats LIU Funing, HUANG Haoquan, LIU Ling, GUO Mingyan, CAO Minghui. Department of Anesthesiology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China

Corresponding author: CAO Minghui, Email: caofox5188@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanisms of pioglitazone on post operative cognitive function induced by surgery in elderly rats. **Methods** Elderly SD rats, male and weighing 220-250 g, were randomly divided into control group (group Con), surgery group (group S), pioglitazone group (group P) and pioglitazone/surgery group (group PS). The level of glycemia was measured by glucometer after completing the surgical model. The expression of advanced glycation endproducts (AGEs) in hippocampal tissues was detected by western blot and reactive oxygen species (ROS) and IL-6 by ELISA 12 h after surgery. Morris water maze was used for evaluation of cognitive function 4 days after surgery. **Results** Compared with group Con, group S showed a significant increase in the expression of AGEs and IL-6 and the level of ROS ($P < 0.05$); Compared with group S, the expression of AGEs and IL-6 and the level of ROS decreased significantly in group PS ($P < 0.05$). Compared to group Con, the surgery increased the average time of escape latencies on the 8th days and 10th days after surgery and reduced the platform-crossing times in the Morris water maze test ($P < 0.05$). Compared with group S, group PS showed a significant decrease in the average time of escaping latencies on the 10th day after surgery ($P < 0.05$), and an increased platform-crossing times in the Morris water maze test ($P < 0.05$). **Conclusion** These results suggest that pioglitazone attenuates postoperative cognitive function and its mechanism may be related to the decrease of the expression of AGEs and IL-6 and the level of ROS.

【Key words】 Pioglitazone; Postoperative cognitive function; Interleukin-6; Advanced glycation endproducts; Reactive oxygen species

术后认知功能障碍 (postoperative cognitive

dysfunction, POCD) 是患者手术后出现的中枢神经系统并发症,常以精神错乱、焦虑、人格改变以及记忆受损为特点。POCD 的发生增加患者术后并发症发生率和死亡率,延长住院时间等。POCD 发病机

DOI:10.12089/jca.2018.05.016

基金项目:中山大学 2017 年度高校基本业务费(17ykjc15)

作者单位:510120 广州市,中山大学孙逸仙纪念医院麻醉科

通信作者:曹铭辉,Email: caofox5188@126.com

制目前尚未明确,研究显示糖尿病与认知功能障碍密切相关^[1],并且最近研究发现糖尿病患者的 POCD 发生率明显升高^[2],提示血糖异常可能参与了 POCD 的发生发展。糖尿病患者高级糖基化终末产物(advanced glycation endproducts, AGEs)明显升高,AGEs 具有神经毒性,可以增强氧化应激^[3]及促进炎性因子的表达^[4]等,与认知功能损害的发生密切相关。但是对于 AGEs 在 POCD 中的作用以及机制目前尚未明确。

吡格列酮是临床上常用的降糖药,可以降低糖尿病患者血糖及改善胰岛素抵抗的状况,并且研究发现其可以降低糖尿病患者的 AGEs 合成水平^[5]。那么作为临床常用的降糖药能否通过 AGEs 途径改善老年大鼠术后认知功能目前尚未清楚。本实验拟通过老年大鼠手术模型,探讨吡格列酮对老年大鼠术后认知功能的影响及其机制。

材料和方法

实验材料 18 月龄 SPF 级 SD 大鼠 160 只,雄性,体重 220~250 g,由中山大学实验动物中心提供;吡格列酮(Sigma, U S A),AGEs 多克隆抗体(Sigma, U S A);ROS 检测试剂盒;IL-6 检测试剂盒; β -actin 抗体(Sigma, U S A);复方利多卡因乳膏;异氟醚(Patterson Veterinary, U S A)。

实验动物与分组 18 月龄血糖正常的健康雄性 SD 大鼠,随机分为对照组(Con 组)、手术组(S 组)、吡格列酮组(P 组)及吡格列酮预处理手术组(PS 组),每组 40 只。

实验方法 吡格列酮的给药方式参考 Ulusoy 等^[7]的方法,先把吡格列酮溶解于 DMSO,再进行腹腔注射。P 组和 PS 组给予腹腔注射吡格列酮 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,连续 3 d, P 组在最后一次注射完吡格列酮 2 h 后吸入 100% 氧气 2 h, PS 组在最后一次注射完吡格列酮 2 h 后开始建立手术模型;Con 组和 S 组以相同的方式给予等量的 DMSO, Con 组在最后一次注射完 DMSO 2 h 后吸入 100% 氧气 2 h, S 组在最后一次注射完 DMSO 2 h 后开始建立手术模型。

动物模型制作 参照 Peng 等^[6]方法建立手术模型,具体如下:SD 老年大鼠放入自制麻醉箱中,麻醉箱通过连接管分别连接 Datex-Ohmeda 型麻醉机和 Datex-Ohmeda 监测仪。麻醉机调整为手控模式,异氟醚输出浓度为 1.4%,氧浓度为 100%,麻醉机输出流量为 1 L/min,待麻醉箱的异氟醚浓度

达到并稳定在 1.4% 后,放入手术大鼠,待大鼠翻正反射消失后将大鼠置入连接麻醉箱的麻醉面罩内继续麻醉并进行腹部探查手术,首先用胶布固定大鼠的四肢然后用剪刀将腹部手术区毛发剪除,用 75% 的酒精消毒两遍,腹部正中切口,长约 5 cm,切开皮肤,暴露腹白线,沿着腹白线用剪刀把腹膜剪开进入腹腔,用镊子依次探查腹腔脏器,探查完成后用手术缝合线缝合腹膜和皮肤,手术结束后使用利多乳膏涂抹手术伤口镇痛,手术过程大约为 15 min,手术完成后,把大鼠放回麻醉箱继续麻醉,整个过程时间为 2 h。所有大鼠于麻醉停止 15 min 左右自然苏醒。术后 2 d 内使用利多乳膏涂抹手术伤口镇痛,每 8 小时涂抹 1 次。Con 组和 P 组大鼠予置入麻醉箱吸入 100% 氧气 2 h。

Morris 水迷宫试验 Morris 水迷宫试验在术后第 4 天(Con 组和 P 组为吸入氧气后第 4 天)开始进行,每组各取 10 只大鼠,每天训练一次(包括四个象限),连续 7 天。潜伏平台放在第一象限内,训练时依次从四个象限将大鼠放入水中,大鼠从入水到找到潜伏平台时间为本次逃逸潜伏期(escape latency),大鼠找到潜伏平台后让其在上面停留 15 s,如果大鼠在 90 s 内未找到潜伏平台则人为将其引导上潜伏平台,同时逃逸潜伏期记为 90 s,每天四个象限逃逸潜伏期平均值作为当天逃逸潜伏期。在术后第 10 天(训练第 7 天)最后一次 Morris 水迷宫训练结束 2 h 后测试,测试时,将潜伏平台移开,选定与潜伏平台相对的象限为入水点,记录大鼠 90 s 内穿过原平台位置的次数。

血糖检测 在给药前和手术模型完成时(Con 组和 P 组为吸氧时),每组各取 6 只大鼠断头处死取血,用血糖仪测定各组大鼠混合静脉血血糖值。

Western bolt 法检测 AGEs 浓度 手术结束 12 h 后,每(Con 组和 P 组吸入氧气后 12 h),每组各取 12 只大鼠断头处死,取出双侧大脑组织,用预冷磷酸盐缓冲溶液(PBS)液冲去表面血迹,置于冰盘上快速分离双侧的海马组织,按 1/3 海马组织加入 200 μL 细胞裂解液的比例加入细胞裂解液,用超声粉碎匀浆,然后在冰面上静置 30 min, 14 000 r/min 离心 20 min,提取海马总蛋白,BCA 法进行蛋白定量。蛋白配平后经凝胶电泳、转膜、BSA 封闭后,加入一抗 4℃ 孵育摇床过夜。TBST 洗涤 6 次,每次 5 min,然后加入二抗,室温下孵育 1 h。TBST 洗涤 6 次,每次 5 min,洗完膜后加入 ECL 显影剂显影,用 Image J 软件进行灰度值分

析,以 β -actin 灰度值进行校正,再以 Con 组为 100%进行校正,实验重复 3 次。

ELISA 法检测活性氧(ROS)和 IL-6 浓度 手术结束 12 h 后(Con 组和 P 组吸入氧气后 12 h),每组各取 12 只大鼠断头处死,取下全脑用预冷 PBS 液冲去表面血迹,在冰上迅速分离海马组织,用 PBS 进行组织匀浆,然后 4℃ 离心,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,ELISA 法测定海马组织中 ROS 和 IL-6 浓度,检测过程严格按照试剂盒说明书操作进行。

统计分析 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,行方差齐性检验后,采用单因素方差分析进行组间比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

四组大鼠血糖基础值均在正常范围内,四组大鼠血糖基础值差异无统计意义(图 1);手术模型完成时,四组大鼠血糖差异无统计学意义(图 2)。

与 Con 组比较,术后第 8 天和第 10 天 S 组大鼠逃逸潜伏期明显延长($P < 0.05$);与 S 组比较,吡格列酮预处理后 PS 组逃逸潜伏期在术后第 10 天显著缩短($P < 0.05$),在测试时穿越平台的次数增加($P < 0.05$)(表 1)。

Con 组、S 组、P 组和 PS 组穿越次数分别为(3.6 ± 1.8)、(1.5 ± 0.9)、(3.3 ± 1.2)和(3.2 ± 1.1)次,与 Con 组比较,S 组穿越平台的次数减少($P < 0.01$),与 S 组比较,PS 组穿越平台的次数增加($P < 0.05$)。

手术结束 12 h 后,与 Con 组比较,S 组大鼠海马 AGEs 浓度明显增加($P < 0.05$);与 S 组比较,PS 组 AGEs 浓度明显减少($P < 0.05$),P 与 PS 组 AGEs 浓度差异无统计学意义(图 3)。

手术结束 12 h 后,与 Con 组比较,S 组大鼠海马 IL-6 含量明显增加($P < 0.05$);与 S 组比较,吡

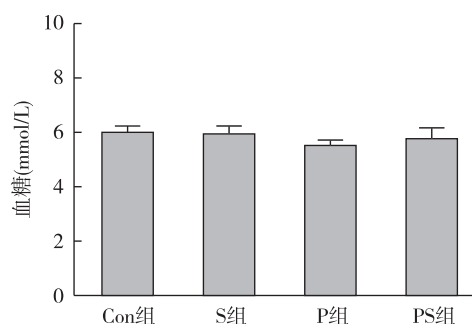


图 1 四组大鼠血糖基础值的比较

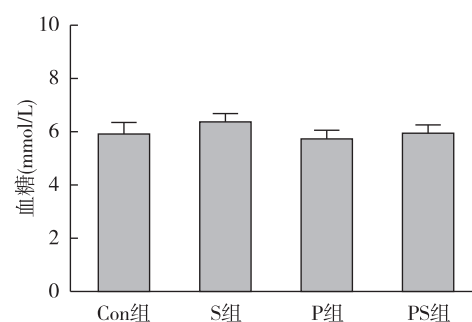


图 2 手术模型完成时四组大鼠血糖的比较

格列酮预处理后 PS 组 IL-6 含量明显减少($P < 0.05$)(图 4)。

手术结束 12 h 后,与 Con 组比较,S 组大鼠海马 ROS 水平明显升高($P < 0.05$);与 S 组比较,吡格列酮预处理后 PS 组 ROS 水平明显降低($P < 0.05$)(图 5)。

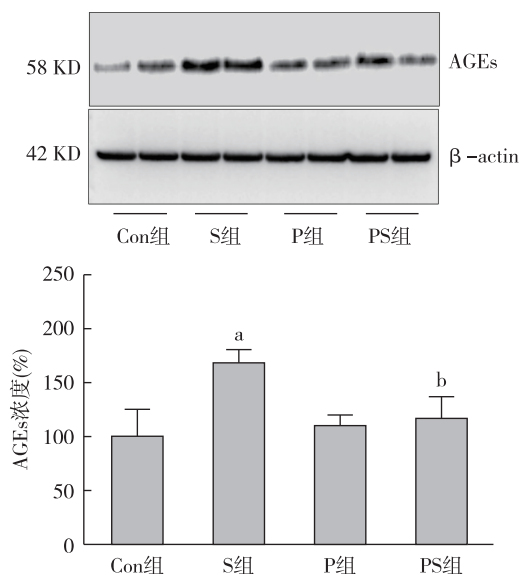
讨 论

术后认知功能障碍是一种中枢神经系统并发症,表现为术前认知功能正常的患者手术后出现精神错乱、焦虑、人格的改变以及记忆受损等中枢神经受损症状。POCD 的机制非常复杂,影响 POCD 发生的因素很多,如麻醉类型、手术大小、患者合并的基础疾病及患者的年龄等。POCD 通常发生在接受心脏、剖腹探查等大手术后,尤其常见于老年患

表 1 四组大鼠术后不同时点 Morris 水迷宫测试逃逸潜伏期的比较($\bar{x} \pm s$)

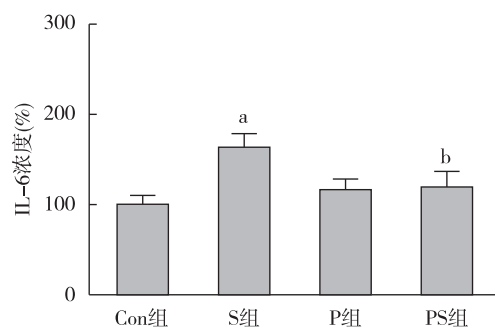
组别	只数	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天	第 8 天	第 9 天	第 10 天
Con 组	10	61.2 $\pm$ 15.8	50.7 $\pm$ 12.9	44.1 $\pm$ 20.6	42.4 $\pm$ 12.1	35.5 $\pm$ 14.9	36.8 $\pm$ 8.9	34.5 $\pm$ 11.3
S 组	10	67.1 $\pm$ 18.7	60.1 $\pm$ 13.9	53.7 $\pm$ 22.7	46.9 $\pm$ 15.6	51.9 $\pm$ 12.5 ^a	43.6 $\pm$ 9.7	48.6 $\pm$ 14.2 ^a
P 组	10	63.7 $\pm$ 14.5	52.3 $\pm$ 10.6	42.7 $\pm$ 18.9	43.5 $\pm$ 10.7	37.6 $\pm$ 13.5	35.7 $\pm$ 8.4	35.2 $\pm$ 15.1
PS 组	10	34.5 $\pm$ 11.3	54.4 $\pm$ 14.8	45.2 $\pm$ 19.0	44.6 $\pm$ 15.0	39.6 $\pm$ 13.8	36.5 $\pm$ 11.7	36.2 $\pm$ 10.4 ^c

注:与 Con 组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与 S 组比较,^c $P < 0.05$



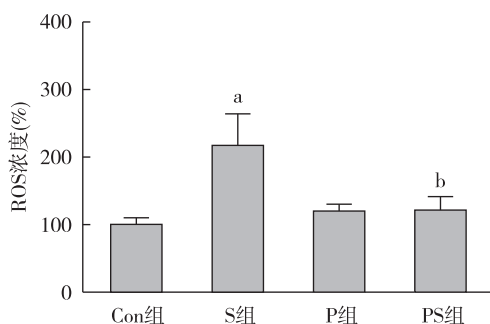
注:与 Con 组比较,^a $P < 0.05$;与 S 组比较,^b $P < 0.05$

图 3 四组大鼠术后 12 h 海马 AGEs 浓度的比较



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

图 4 四组大鼠术后 12 h 海马 IL-6 浓度的比较



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

图 5 四组大鼠术后 12 h 海马 ROS 浓度的比较

者^[8]。虽然近年来医疗水平有了不少提高,但是 POCD 的发生率并未明显降低,其致病的具体原因、发病的机制以及临床防治的策略成为目前研究的热点。

研究显示糖尿病和术后认知功能密切相关,糖尿病患者 POCD 的发生率明显升高,临床研究调查发现糖尿病是认知功能障碍的独立危险因素^[9],在阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)的发生和发展中具有重要的作用^[10]。最近研究显示糖尿病患者 POCD 的发生率明显增高^[2],提示 POCD 可能与血糖异常有关。由于老年患者对胰岛素的敏感性下降,调节血糖的能力减退,麻醉和手术创伤引起的血糖升高和胰岛素抵抗在老年患者中更为严重。吡格列酮是临床上常用的降糖药,可以降低糖尿病患者血糖及改善胰岛素抵抗的状况,作为临床常用的降糖药能否通过改善老年大鼠麻醉手术导致的血糖升高和胰岛素抵抗减轻麻醉手术导致的术后认知功能障碍?目前尚未清楚。本实验 Morris 水迷宫结果显示,术后手术组大鼠逃逸潜伏期明显延长,平台穿越次数减少,老年大鼠的学习记忆功能减退;而吡格列酮预处理后,逃逸潜伏期明显缩短,平台穿越次数增加,吡格列酮预处理可以明显改善老年大鼠术后认知功能。但是在本实验中, S 组大鼠血糖在手术模型完成时无明显升高,可能与本实验使用的动物模型有关, Xu 等^[11]的实验也证实了这一点,与对照组比较,剖腹探查术不会导致血糖明显升高。另外,与对照组比较, P 组和 PS 组大鼠血糖无明显下降,说明本实验使用的吡格列酮剂量不会产生明显副作用导致大鼠的血糖显著降低。上述结果提示在本实验模型中吡格列酮可能不是直接通过调节大鼠的血糖变化来改善老年大鼠术后认知功能。Zhang 等^[12]也证实了这一点,在实验中发现吡格列酮在脑缺血-再灌注中具有神经保护作用,但血糖无明显变化。

麻醉和手术对于机体来说是一种强烈的伤害性刺激,会引起机体强烈的应激反应。老年患者由于细胞线粒体老化和应激信号传导通路改变,脑内氧化应激水平升高,也更易产生氧化应激反应,而麻醉和手术必然会加重老年患者脑内氧化应激水平。老年患者在手术过程中过高的氧化应激反应、血糖升高以及胰岛素抵抗势必会引起 AGEs 合成增加^[13]。本实验结果也发现了这一点,老年大鼠在手术后 ROS 水平明显升高同时, AGEs 合成增加。AGEs 的受体 RAGE(the receptor of advanced glycation endproducts, RAGE)属于免疫球蛋白超家族成员,具有多配体的信号传导。AGEs 与 RAGE 结合后,一方面可以促进 ROS 生成增加^[3],而 ROS 水平升高同时诱导 AGEs 合成增多与

RAGE 表达,从而形成一个不断放大的恶性循环。另一方面 AGEs 与 RAGE 结合后还可以激活脑内的炎症反应,本实验结果显示手术后 AGEs 合成增加的同时,海马 IL-6 表达也相应增多。Serban 等^[4]的实验也证实了这一点,他们在实验中发现 AGEs 在早期的炎症反应中具有重要的作用,可以促进 IL-6 的表达,而 IL-6 表达增加、氧化还原失衡及 RAGE 活化可以进一步增强细胞中的炎症信号,从而产生炎症级联反应。此外,AGEs 还可以诱导 Tau 蛋白多个位点磷酸化^[14],高度磷酸化的 Tau 蛋白集聚在一起形成神经元纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTS),在 AD 患者中,NFT 的数量与认知功能障碍的严重程度呈正相关^[15]。而吡格列酮预处理后手术组大鼠海马 AGEs 合成减少,IL-6 表达降低,ROS 水平下降,老年大鼠的认知功能障碍改善。所以 AGEs 可能参与了 POCD 的发生和发展,其机制可能与调控氧化应激及炎症反应有关。

综上所述,本实验首次探讨了降糖药吡格列酮对老年大鼠术后认知功能的影响,结果表明吡格列酮可以在不降低血糖的情况下明显改善老年大鼠术后认知功能,减少手术后老年大鼠海马 AGEs 合成和降低 ROS 生成及 IL-6 的表达水平。这提示,吡格列酮减少 AGEs 的合成降低 ROS 生成及 IL-6 的表达水平可能是其发挥术后认知功能保护作用的机制之一。

参 考 文 献

- [1] Yan S, Du F, Wu L, et al. F1F0 ATP Synthase-Cyclophilin D Interaction Contributes to Diabetes-Induced Synaptic Dysfunction and Cognitive Decline. *Diabetes*, 2016, 65(11): 3482-3494.
- [2] Feinkohl I, Winterer G, Pischon T. Diabetes is associated with risk of postoperative cognitive dysfunction: A meta-analysis. *Diabetes Metab Res Rev*, 2017, 33(5). doi: 10.1002/dmrr.2884.
- [3] Melinda T. Coughlan, David R. Thorburn, et al. RAGE-induced cytosolic ROS promote mitochondrial superoxide generation in diabetes. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(4): 742-752.
- [4] Serban AI, Stanca L, Geicu OI, et al. AGEs-induced IL-6 synthesis precedes RAGE up-regulation in HEK 293 cells: An alternative inflammatory mechanism? *Int J Mol Sci*, 2015, 16(9): 20100-20117.
- [5] Chen C, Ma C, Zhang Y, et al. Pioglitazone inhibits advanced glycation end product-induced TNF- α and MMP-13 expression via the antagonism of NF- κ B activation in chondrocytes. *Pharmacology*, 2014, 94(5-6): 265-272.
- [6] Peng M, Zhang C, Dong Y2, et al. Battery of behavioral tests in mice to study postoperative delirium. *Sci Rep*, 2016, 6: 29874.
- [7] Ulusoy GK, Celik T, Kayir H, et al. Effects of pioglitazone and retinoic acid in a rotenone model of Parkinson's disease. *Brain Res Bull*, 2011, 85(6): 380-384.
- [8] 岳明明, 张印龙, 王胜, 等. 不同 BIS 值对全麻下老年患者腹部手术后早期认知功能及 S100 β 蛋白的影响. *临床麻醉学杂志*, 2016, 32(2): 109-113.
- [9] Profenno LA, Porsteinsson AP, Faraone SV, et al. Meta-Analysis of alzheimer's diseases risk with obesity, diabetes and related disorders. *Biol Psychiatry*, 2010, 67(6): 505-512.
- [10] Jolivald CG, Hurford R, Lee CA, et al. Type 1 diabetes exaggerates features of Alzheimer's disease in APP transgenic mice. *Exp Neurol*, 2010, 223(2): 422-431.
- [11] Xu Z, Dong Y, Wang H, et al. Age-dependent postoperative cognitive impairment and Alzheimer-related neuropathology in mice. *Sci Rep*, 2014, 4: 3766.
- [12] Zhang HL, Xu M, Wei C, et al. Neuroprotective effects of pioglitazone in a rat model of permanent focal cerebral ischemia are associated with peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated suppression of nuclear factor- κ B signaling pathway. *Neuroscience*, 2011, 176: 381-395.
- [13] Desai KM, Chang T, Wang H, et al. Oxidative stress and aging: is methylglyoxal the hidden enemy? *Can J Physiol Pharmacol*, 2010, 88(3): 273-284.
- [14] Li XH, Lv BL, Xie JZ, et al. AGEs induce Alzheimer-like tau pathology and memory deficit via RAGE-mediated GSK-3 activation. *Neurobiol Aging*, 2012, 33(7): 1400-1410.
- [15] Murayama S, Saito Y. Neuropathological diagnostic criteria for Alzheimer's disease. *Neuropathology*, 2004, 24(3): 254-260.

(收稿日期:2018-01-10)