

· 实验研究 ·

竹节参皂苷对异氟醚所致发育期大鼠神经毒性和认知功能的影响

方茜 高杰 李世勇 张杰 杨春 罗爱林

【摘要】 目的 探讨竹节参皂苷对异氟醚所致发育期大鼠海马神经毒性及认知功能的影响。**方法** 7 日龄 SD 大鼠 60 只,雌雄不限,体重 20~25 g,随机分为四组($n=15$)。对照组(Con 组):吸入对照气(空气)6 h;异氟醚组(Iso 组):吸入 1.8% 异氟醚 6 h;竹节参皂苷+异氟醚组(Iso+ChIV 组):麻醉前 30 min 腹腔注射竹节参皂苷 30 mg/kg 后吸入 1.8% 异氟醚 6 h;竹节参皂苷(ChIV 组):麻醉前 30 min 腹腔注射竹节参皂苷 30 mg/kg 后吸入对照气(空气)6 h。麻醉结束后 12 h 取海马组织检测突触后致密蛋白 95(PSD95)、突触素 I(Synapsin I)、B 淋巴细胞瘤 2 相关 X 蛋白(Bax)、B 淋巴细胞瘤 2(Bcl-2)蛋白含量,TUNEL 染色检测神经元凋亡情况,测定乳酸脱氢酶(LDH)活性。于出生后第 31~35 天采用水迷宫评估空间学习记忆能力。**结果** 与 Con 组比较,Iso 组 PSD95、Bcl-2 蛋白含量明显降低,Bax 蛋白含量明显升高,TUNEL 阳性细胞数明显增多,LDH 活性明显增强($P<0.05$);与 Iso 组比较,Iso+ChIV 组 PSD95、Bcl-2 蛋白含量明显升高,Bax 蛋白含量明显降低,TUNEL 阳性细胞数明显减少,LDH 活性明显减弱($P<0.05$)。与 Con 组比较,Iso 组第 34 和 35 天逃避潜伏路线明显延长($P<0.05$),第 33、34 和 35 天逃避潜伏期明显延长($P<0.05$),第 35 天目标象限停留时间明显缩短,平台穿越次数明显减少($P<0.05$)。与 Iso 组比较,Iso+ChIV 组第 34 和 35 天逃避潜伏路线明显缩短,逃避潜伏期明显缩短($P<0.05$),第 35 天目标象限停留时间明显延长,平台穿越次数明显增多($P<0.05$)。**结论** 竹节参皂苷可明显改善异氟醚所致发育期大鼠神经毒性和认知功能,其机制可能与抑制发育期神经凋亡有关。

【关键词】 竹节参皂苷;异氟醚;发育期;神经毒性;认知功能

Effect of chikusetsu saponin IVa on isoflurane-elicited neurotoxicity and cognitive deficits in developmental rats FANG Xi, GAO Jie, LI Shiyong, ZHANG Jie, YANG Chun, LUO Ailin. Department of Anesthesiology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: LUO Ailin, Email: alluo@tjh.tjmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of chikusetsu saponin IVa (ChIV) on isoflurane-induced hippocampal neurotoxicity and developmental cognitive deficits in developmental rats. **Methods** Sixty SD pup rats, 7 days old, weighing 20-25 g, were randomly assigned into 4 groups ($n=15$ per group): control group (group Con), isoflurane group (group Iso), ChIV+isoflurane group (group Iso+ChIV), and ChIV group (group ChIV). Rats in group Con were exposed to control gas (air) for 6 h, while rats in group Iso were exposed to 1.8% isoflurane for 6 h. ChIV 30 mg/kg was injected intraperitoneally 30 min prior to 1.8% isoflurane anesthesia in group Iso+ChIV. ChIV 30 mg/kg was injected intraperitoneally 30 min prior to control gas (air) exposure for 6 h. Hippocampal tissues of rats were harvested 12 h after the end of isoflurane anesthesia for measurement of post synaptic density-95 (PSD95), Synapsin I, B cell lymphoma associated X protein (Bax) and B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2). Hippocampal neuron apoptosis was measured by TUNEL assay. Morris water maze for evaluation of cognitive function was performed 35 after birth. **Results** Compared with group Con, the expression of PSD95 and Bcl-2 reduced significantly, the expression of Bax increased significantly, TUNEL positive cells increased significantly, the LDH activity increased significantly in group Iso ($P<0.05$). Compared with group Iso, the expression of PSD95 and Bcl-2 increased significantly, the expression of Bax reduced significantly, TUNEL positive cell decreased significantly, the LDH activity reduced significantly in group Iso+ChIV ($P<0.05$). Compared with

DOI:10.12089/jca.2018.08.016

基金项目:国家自然科学基金(81571047, 81400882, 81500931)

作者单位:430030 武汉市,华中科技大学同济医学院附属同济医院麻醉科

通信作者:罗爱林,Email: alluo@tjh.tjmu.edu.cn

group Con, the escape latency increased significantly on day 34 and 35, and the escape path length increased significantly on day 33 - 35 in group Iso ($P < 0.05$). The platform crossing and time spend in target quarter reduced significantly on day 35 in group Iso ($P < 0.05$). Compared with group Iso, the escape latency and escape path length reduced significantly on day 34 and 35, the platform crossing and time spend in target quarter increased significantly on day 35 in group Iso+ChIV ($P < 0.05$).

Conclusion Chikusetsu saponin IVa could ameliorate isoflurane-induced neurotoxicity and cognitive dysfunction in developmental rats, while the underline mechanism is likely associated with its inhibitory effects on apoptosis in developmental neurons.

【Key words】 Chikusetsu saponin IVa; Isoflurane; Developmental period; Neurotoxicity; Cognition

研究表明婴幼儿和青少年期经历异氟醚麻醉可明显增加在成年后的学习记忆及认知功能障碍发生率^[1-2]。异氟醚引起的学习记忆和认知功能障碍可能与其导致神经凋亡和突触发生障碍有关^[3-4]。目前异氟醚导致发育期神经毒性和认知功能障碍的确切机制尚不明确。竹节参皂苷(chikusetsu saponin IVa, ChIV)是一种来自于竹节参根茎部的提取物。新近研究显示竹节参皂苷在中枢神经系统、心血管系统、免疫系统和肿瘤等疾病防治中具有明显改善作用^[5-6]。在帕金森病动物模型中,竹节参皂苷能降低线粒体膜电位,产生神经保护作用^[7]。因此,推测竹节参皂苷对神经毒性和认知功能亦具有改善作用。本研究拟探讨竹节参皂苷减轻异氟醚所致发育期大鼠神经毒性和认知功能的作用及其可能机制。

材料与方法

实验动物与分组 孕 20 d SD 大鼠 7 只购自于本院实验动物中心,体重 250~270 g,幼崽出生后第 7 天,随机选取 60 只,体重 20~25 g,随机分为四组($n=15$),每组中选取 6 只进行动脉血气分析后分离海马组织进行后续检测,其余 9 只继续饲养至第 31 天进行水迷宫测试。对照组(Con 组):吸入对照气(空气)6 h;异氟醚组(Iso 组):吸入 1.8%异氟醚 6 h;竹节参皂苷加异氟醚组(Iso+ChIV 组):麻醉前 30 min 腹腔注射竹节参皂苷 30 mg/kg,吸入 1.8%异氟醚 6 h;竹节参皂苷组(ChIV 组):麻醉前 30 min 腹腔注射竹节参皂苷 30 mg/kg,吸入对照气(空气)6 h。

海马组织蛋白含量检测 大鼠接受异氟醚处理结束后 12 h,取双侧海马组织, RIPA 裂解液于 4℃裂解 30 min。4℃离心机 12 000 r/min 离心 15 min,取上清, BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白含量。每孔 40 μg 蛋白上样, 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,转移至 PVDF 膜。含 5%

BSA 的 TBST 封闭 1 h,分别加入一抗:突触后致密蛋白 95(PSD95), 1:1 000,批号: 20665-1-AP、突触素 I(Synapsin I, 1:1 000,批号: 20258-1-AP)、B 淋巴细胞瘤 2(Bcl-2, 1:500,批号: 12789-1-AP)、B 淋巴细胞瘤 2 相关 X 蛋白(Bax, 1:500,批号: 50599-2-Ig)、β-actin (1:500,批号: 23660-1-AP) 4℃孵育过夜。加入辣根过氧化物酶标记的相应二抗,室温孵育 2 h, BIO-RAD 成像系统成像,分析各条带灰度值。

神经元凋亡检测 参考文献[9],大鼠海马冰冻切片 5 μm 进行 TUNEL 染色,阳性细胞数代表细胞凋亡,染色强度用 Image-Pro plus 6.0 软件进行分析。

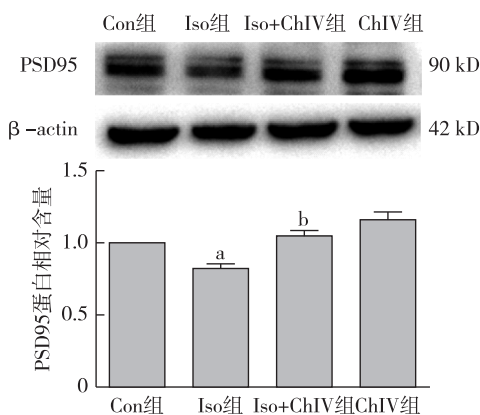
乳酸脱氢酶(LDH)活性检测 4℃生理盐水研磨海马组织,取上清后用 LDH 试剂盒测定海马组织中 LDH 活性。20 μl 上清于 37℃与烟酰胺腺嘌呤二核苷酸,丙酮酸盐,反应 15 min。NaOH 终止反应后用酶标仪 450 nm 波长测定吸光度。

神经行为学检测 大鼠吸入异氟醚或空气后继续饲养至第 31 天,参照文献[8]行水迷宫实验。于出生后第 31~35 天开始连续进行训练,每个象限内按动物编号轮流进行训练,每个象限训练间隔 20 min,每次训练时间为 120 s。以大鼠入水至爬上平台的时间为逃避潜伏期,记录每天测试平均值。若大鼠在 120 s 内未能找到并爬上平台,将逃避潜伏期记为 120 s,并将其引导至平台停留 15 s。第 35 天训练结束后 1 h,撤去水中平台,进行平台穿越测试。分别记录第 31~35 天的逃避潜伏路线和逃避潜伏期,以及第 35 天 1 min 内目标象限停留时间和平台穿越次数。

统计分析 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用重复测量数据方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

突触生发情况 与 Con 组比较, Iso 组 PSD95 蛋白含量明显降低 ($P < 0.05$); 与 Iso 组比较, Iso + ChIV 组 PSD95 蛋白含量明显升高 ($P < 0.05$)。Con 组和 ChIV 组差异无统计学意义(图 1)。



注: 与 Con 组比较, $^a P < 0.001$; 与 Iso 组比较, $^b P < 0.05$

图 1 四组大鼠海马组织中 PSD95 蛋白含量的比较

四组大鼠 Synapsin I 蛋白含量差异无统计学意义(图 2)。

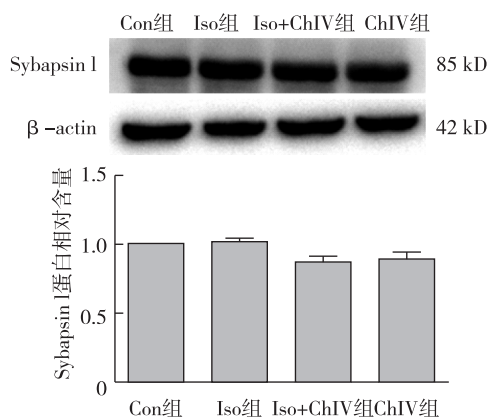
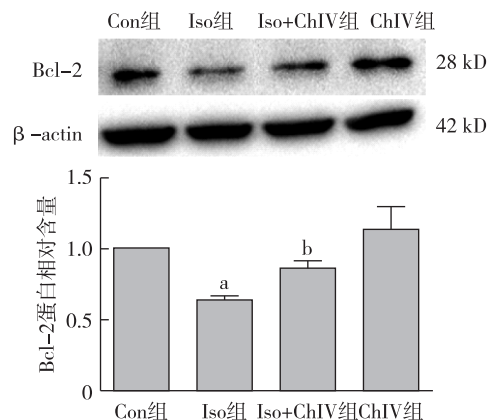


图 2 四组大鼠海马组织中 Synapsin I 蛋白含量的比较

与 Con 组比较, Iso 组 Bcl-2 蛋白含量明显降低 ($P < 0.05$); 与 Iso 组比较, Iso + ChIV 组 Bcl-2 蛋白含量明显升高 ($P < 0.05$)。Con 组和 ChIV 组差异无统计学意义(图 3)。

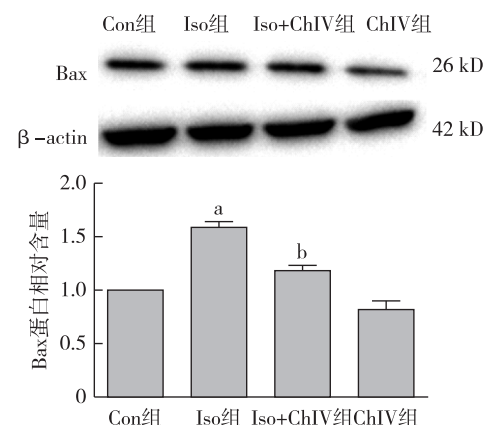
与 Con 组比较, Iso 组 Bax 蛋白含量明显升高 ($P < 0.05$); 与 Iso 组比较, Iso + ChIV 组 Bax 蛋白含量明显降低 ($P < 0.05$)。Con 组和 ChIV 组差异无统计学意义(图 4)。

神经元凋亡情况 与 Con 组比较, Iso 组海马 CA1、CA3 区 TUNEL 阳性细胞数明显增多; 与 Iso



注: 与 Con 组比较, $^a P < 0.001$; 与 Iso 组比较, $^b P < 0.05$

图 3 四组大鼠海马组织中 Bcl-2 蛋白相对含量的比较



注: 与 Con 组比较, $^a P < 0.001$; 与 Iso 组比较, $^b P < 0.05$

图 4 四组大鼠海马组织中 Bax 蛋白相对含量的比较

组比较, Iso + ChIV 组海马 CA1、CA3 区 TUNEL 阳性细胞数明显减少(图 5—6)。

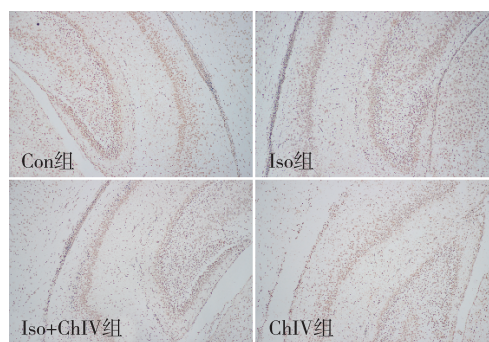


图 5 四组大鼠海马 CA1 区 TUNEL 染色($\times 200$ 倍)

与 Con 组比较, Iso 组海马组织 LDH 活性明显增强 ($P < 0.05$); 与 Iso 组比较, Iso + ChIV 组海马

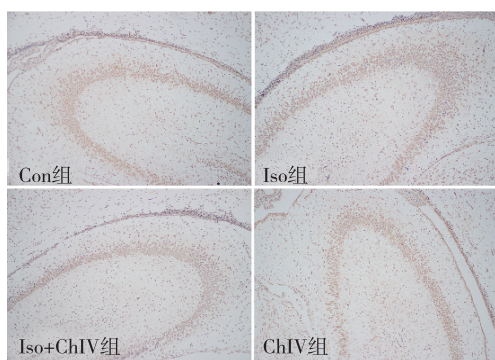
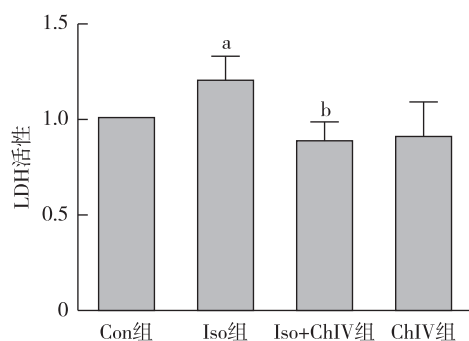


图 6 四组大鼠海马 CA3 区 TUNEL 染色 ($\times 200$ 倍)

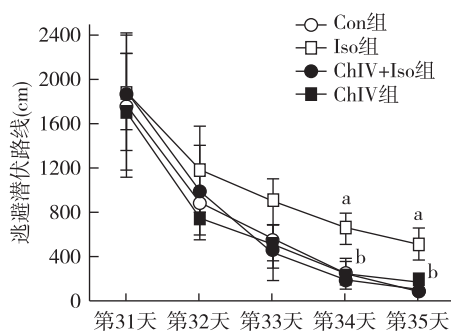
组织 LDH 活性明显减弱 ($P < 0.05$)。Con 组和 ChIV 组差异无统计学意义 (图 7)。



注:与 Con 组比较, $aP < 0.001$;与 Iso 组比较, $bP < 0.05$

图 7 四组大鼠海马组织 LDH 活性的比较

神经行为学变化 与 Con 组比较, Iso 组第 34 和 35 天逃避潜伏路线明显延长 ($P < 0.05$); 与 Iso 组比较, Iso+ChIV 组第 34 和 35 天逃避潜伏路线明显缩短 ($P < 0.05$)。Con 组和 ChIV 组差异无统计学意义 (图 8)。

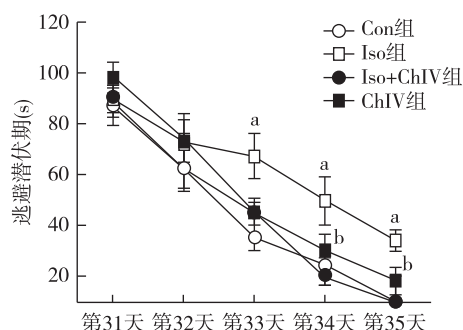


注:与 Con 组比较, $aP < 0.05$;与 Iso 组比较, $bP < 0.05$

图 8 四组大鼠不同时点逃避潜伏路线的比较

与 Con 组比较, Iso 组第 33、34 和 35 天逃避潜伏期明显延长 ($P < 0.05$); 与 Iso 组比较, Iso+ChIV 组

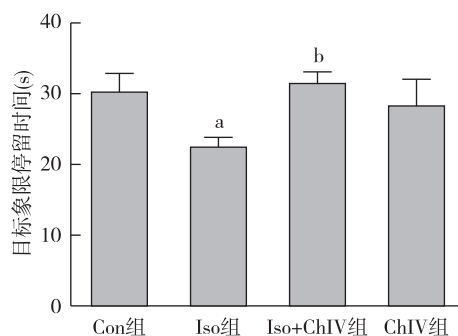
第 34、35 天逃避潜伏期明显缩短 ($P < 0.05$)。Con 组和 ChIV 组差异无统计学意义 (图 9)。



注:与 Con 组比较, $aP < 0.05$;与 Iso 组比较, $bP < 0.05$

图 9 四组大鼠不同时点逃避潜伏期的比较

与 Con 组比较, Iso 组第 35 天目标象限停留时间明显缩短 ($P < 0.05$); 与 Iso 组比较, Iso+ChIV 组第 35 天目标象限停留时间明显延长 ($P < 0.05$)。Con 组和 ChIV 组差异无统计学意义 (图 10)。



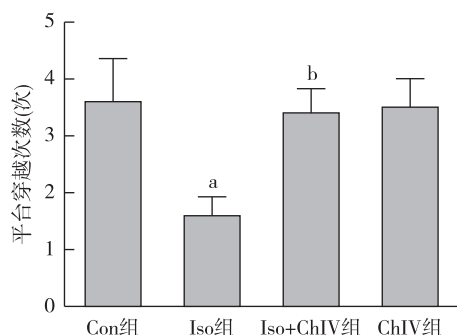
注:与 Con 组比较, $aP < 0.05$;与 Iso 组比较, $bP < 0.05$

图 10 四组大鼠第 35 天目标象限停留时间的比较

与 Con 组比较, Iso 组第 35 天平台穿越次数明显减少 ($P < 0.05$); 与 Iso 组比较, Iso+ChIV 组第 35 天平台穿越次数明显增加 ($P < 0.05$)。Con 组和 ChIV 组差异无统计学意义 (图 11)。

讨论

本研究采用 Morris 水迷宫观察大鼠的学习记忆能力, 结果显示异氟醚明显缩短大鼠靶象限活动时间, 且登台潜伏期明显延长。研究表明异氟醚会增加患儿和青少年阶段学习记忆功能障碍的风险, 这可能与异氟醚导致的海马神经元广泛凋亡和突触发生障碍有关^[8,10], 本研究结果与其一致。刘展等^[11]研究指出脑内促凋亡因子 Bax 的异常激活和/或抗凋亡因子 Bcl-2 的低表达与促进帕金森病患者



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

图 11 四组大鼠第 35 天平台穿越次数的比较

A β 异常沉积紧密相关。有研究指出异氟醚可引起神经系统炎症反应的异常激活,导致神经元凋亡和突触发生障碍^[12]。

帕金森病发病机理与脑内 τ 蛋白过度磷酸化和 A β 的异常沉积有关,凋亡的异常激活在该病的发病机制中扮演重要角色。本研究结果显示异氟醚能够引起出生 7 d 大鼠海马组织 Bax 含量明显增加, Bcl-2、PSD95 含量明显减少。异氟醚处理前海马神经元 TUNEL 染色阳性细胞数增加,显示异氟醚可导致发育期神经元凋亡和突触发生障碍。

竹节参皂苷作为一种传统植物中药,具有较强的抗炎、抗凋亡、抗血栓形成和抗氧化应激作用,并且在多种神经退行性疾病中发挥抗炎及抗氧化应激等神经保护作用^[5-6]。尽管 AD 与异氟醚所致神经毒性发病机制不同,但其均可导致 A β 的异常沉积和 Tau 蛋白的过度磷酸化^[13]。Zhu 等^[14]指出竹节参皂苷对 AD 的明显改善作用可能与其抗凋亡和促进受损神经元的再生有关。据此,竹节参皂苷对异氟醚引起发育期学习记忆功能障碍可能与其抗凋亡作用有关。本研究结果显示,新生期大鼠接受异氟醚麻醉后空间学习记忆功能受损,而在给予竹节参皂苷预处理后,能有效减少异氟醚所致海马神经元凋亡,增加突触发生相关蛋白含量。此外,竹节参皂苷预处理尚可改善异氟醚所致发育期大鼠空间学习记忆功能障碍,说明其对新生大鼠神经发育和青少年期学习记忆的形成和发展具有保护作用,且该保护性效应可能与竹节参皂苷的抗凋亡作用有关。

综上所述,竹节参皂苷能够减弱异氟醚所致发育期大鼠神经毒性,改善学习记忆能力,为临床防治异氟醚所致神经毒性提供新思路和新靶点。

参 考 文 献

- [1] Wilder RT, Flick RP, Sprung J, et al. Early exposure to anesthesia and learning disabilities in a population-based birth cohort. *Anesthesiology*, 2009, 110(4): 796-804.
- [2] Ing C, DiMaggio C, Whitehouse A, et al. Long-term differences in language and cognitive function after childhood exposure to anesthesia. *Pediatrics*, 2012, 130(3): e476-e485.
- [3] Brambrink AM, Evers AS, Avidan MS, et al. Isoflurane-induced neuroapoptosis in the neonatal rhesus macaque brain. *Anesthesiology*, 2010, 112(4): 834-841.
- [4] 滕清宇, 李玮伟, 袁红斌, 等. 全麻药发育期神经毒性机制的研究进展. *临床麻醉学杂志*, 2016, 32(9): 929-931.
- [5] Lee KM, Yun JH, Lee DH, et al. Chikusetsusaponin IVa methyl ester induces cell cycle arrest by the inhibition of nuclear translocation of beta-catenin in HCT116 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 459(4): 591-596.
- [6] Duan J, Yin Y, Wei G, et al. Chikusetsu saponin IVa confers cardioprotection via SIRT1/ERK1/2 and Homer1a pathway. *Sci Rep*, 2015, 5: 18123.
- [7] Duan J, Yin Y, Cui J, et al. Chikusetsu saponin IVa ameliorates cerebral ischemia reperfusion injury in diabetic mice via adiponectin-mediated AMPK/GSK-3 β pathway in vivo and in vitro. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(1): 728-743.
- [8] Wang W, Chen X, Zhang J, et al. Glycyrrhizin attenuates isoflurane-induced cognitive deficits in neonatal rats via its anti-inflammatory activity. *Neuroscience*, 2016, 316: 328-336.
- [9] Chen X, Wang W, Zhang J, et al. Involvement of caspase-3/PTEN signaling pathway in isoflurane-induced decrease of self-renewal capacity of hippocampal neural precursor cells. *Brain Res*, 2015, 1625: 275-286.
- [10] Simon W, Hapfelmeier G, Kochs E, et al. Isoflurane blocks synaptic plasticity in the mouse hippocampus. *Anesthesiology*, 2001, 94(6): 1058-1065.
- [11] 刘展, 刘彦锋. 白藜芦醇对七氟醚诱导神经细胞损伤的影响. *临床麻醉学杂志*, 2016, 32(6): 598-601.
- [12] 杨泽勇, 徐莹华, 费凤英, 等. 老年患者术后认知功能障碍与 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达. *临床麻醉学杂志*, 2010, 26(9): 764-766.
- [13] Tan L, Chen X, Wang W, et al. Pharmacological inhibition of PTEN attenuates cognitive deficits caused by neonatal repeated exposures to isoflurane via inhibition of NR2B-mediated tau phosphorylation in rats. *Neuropharmacology*, 2017, 114: 135-145.
- [14] Zhu WB, Tian FJ, Liu LQ. Chikusetsu (CHI) triggers mitochondria-regulated apoptosis in human prostate cancer via reactive oxygen species (ROS) production. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90: 446-454.

(收稿日期:2017-10-15)