

醒脑静抑制 Notch 信号通路减轻七氟烷引起的成年小鼠认知功能障碍

梁俊杰^{1,2}, 韩珊珊¹, 吴佳骏¹, 柴高尚¹, 赵鹏¹, 张邓新²

(1. 江南大学无锡医学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学附属无锡妇幼保健院, 江苏 无锡 214002)

摘要:目的 探究醒脑静注射液减轻七氟烷引起认知障碍的机制及 Notch 信号通路的相关作用。方法 将 36 只 8~12 周龄的 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠随机分成 3 组: 对照组、七氟烷组以及七氟烷+醒脑静组, 每组 12 只。Morris 水迷宫检测各组小鼠认知行为能力; 免疫荧光及 qPCR 技术检测各组小鼠的海马炎症水平; 免疫荧光检测各组小鼠海马神经干细胞的增殖功能; Western blot 检测 Notch 信号通路相关蛋白的表达。结果 Morris 水迷宫表明吸入 3% 浓度七氟烷 6 h 可导致成年小鼠认知功能损伤。免疫荧光实验表明吸入七氟烷后海马小胶质细胞被激活, 神经干细胞增殖功能被抑制; qPCR 及 Western blot 实验表明七氟烷能增加 M1 型促炎性细胞因子 mRNA 水平以及 Notch 信号通路相关蛋白的表达。结论 醒脑静注射液通过调节 Notch 信号通路减轻七氟烷诱导的学习记忆障碍, 提示醒脑静注射液预处理可能是预防七氟烷致成年小鼠术后认知障碍的可行措施。

关键词:醒脑静; 七氟烷; 神经炎症; 神经增殖; 术后认知障碍

中图分类号:R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-0482(2022)07-0599-08

DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2022.0599

引文格式:梁俊杰, 韩珊珊, 吴佳骏, 等. 醒脑静抑制 Notch 信号通路减轻七氟烷引起的成年小鼠认知功能障碍[J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38(7): 599-606.

XingNaoJing Alleviated Adult Mice Cognitive Dysfunction Induced by Sevoflurane through Inhibition of the Notch Signaling Pathway

LIANG Jun-jie^{1,2}, HAN Shan-shan¹, WU Jia-jun¹, CHAI Gao-shang¹, ZHAO Peng¹, ZHANG Deng-xin²

(1. Wuxi School of Medicine, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Wuxi Maternity and Child Health Care Hospital Affiliated to Jiangnan University, Wuxi 214002, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore XingNaoJing injection how to alleviated postoperative cognitive dysfunction induced by sevoflurane and the Notch signaling pathway potential effect during above process. **METHODS** 36 male C57BL/6J mice aged of 8-12 weeks were randomly divided into three groups: control (Con), Sevoflurane (Sev), and sevoflurane+XingNaoJing injection (Sev+XNJ) groups, with 12 mice in each group. The cognitive abilities of mice in each group were tested using the Morris water maze. The hippocampal inflammation level in each group were tested using the immunofluorescence and qPCR. The neural stem cells proliferation function in each group were tested using the immunofluorescence. The relative protein expression of the Notch signaling pathway in each group were tested using the Western blotting. **RESULTS** The Morris water maze results showed that 3% sevoflurane exposure for 6 hours induced cognitive dysfunction in adult mice. Immunofluorescence results showed that hippocampal microglia were activated and neural stem cells proliferation was inhibited. qPCR and Western blot analysis showed that the mRNA levels of pro-inflammatory cytokines and the expression level of the Notch signaling pathway-related proteins in the hippocampus were upregulated by sevoflurane. **CONCLUSION** XingNaoJing injection mitigated sevoflurane-induced deficits in learning and memory by modulating the Notch signaling pathway. This research raised the possibility that XingNaoJing injection pretreatment might be a feasible measure to prevent postoperative cognitive deficits in adult mice induced by sevoflurane.

KEYWORDS: XingNaoJing; sevoflurane; neuroinflammation; neural proliferation; postoperative cognitive dysfunction

七氟烷是临床上最常用的吸入麻醉药之一, 具有刺激小、诱导快、可控性好等优点^[1]。但大量研究表明, 七氟烷可引起术后认知功能障碍 (Postoperative cognitive dysfunction, POCD), 在老年患者中尤

为明显。POCD 是一种常见的术后并发症, 定义为麻醉和手术后产生的一种新的认知障碍。POCD 不仅增加其他并发症的发生率, 延长住院时间, 而且严重影响患者的生活质量^[2-3]。目前, 七氟烷引起

收稿日期: 2022-05-10

基金项目: 江苏省中医药科技发展计划项目 (YB201945)

第一作者: 梁俊杰, 男, 硕士研究生, E-mail: liang_junjie@163.com

通信作者: 张邓新, 男, 主任医师, 教授, 主要从事麻醉药物对重要脏器功能影响及其机制研究, E-mail: zhangdx3589@163.com

POCD 的机制尚不明确,其通过激活神经炎症反应从而导致 POCD,是目前认为可能的作用机制。

炎症是许多病理过程的始动阶段。海马作为大脑学习和记忆的主要区域,海马炎症反应将对认知能力产生不利影响。研究表明,七氟烷通过多种机制激活中枢神经系统炎症。如 Shao 等发现七氟烷可激活 NLRP3/Caspase-1 信号通路,导致炎性细胞因子分泌,诱发“炎性瀑布效应”,引起神经炎症,损害认知功能^[4]。Dong 等发现七氟烷通过下调海马中的 PPAR- γ 活性,增加小胶质细胞调节的神经炎症反应,从而导致认知能力下降^[5]。既往研究表明 Notch 信号通路在肿瘤的发生发展中发挥重要作用^[6-9]。但近期研究表明 Notch 信号通路的异常激活与炎症相关,如过敏性气道炎症^[10]、肾脏炎症^[11]。然而 Notch 信号通路是否参与七氟烷诱导的海马神经炎症仍不清楚。

神经发生是指神经干细胞通过增殖、迁移、分化、成熟等步骤后,成为成熟神经元并与原有神经元形成功能性突触连接的过程^[12],其主要发生在 2 个脑区:海马齿状回(DG)的颗粒下层(SGZ)和侧脑室室管膜下区(SVZ)^[13]。海马神经发生在记忆形成中起着重要作用,并与突触可塑性密切相关^[14]。神经发生的程度可以通过海马 DG 中神经前体细胞(NPCs)的数量来量化^[15-17]。神经炎症与神经发生密切相关。研究表明,神经炎症释放过多的促炎细胞因子等炎症分子,对神经发生产生负面影响^[18]。

醒脑静注射液(XNJ)是临床常用的脑保护药物,研究表明其对脑缺血再灌注损伤和脑梗死有显著作用^[19-21]。然而,它是否对七氟烷诱导的神经炎症有影响尚未清楚。本研究旨在研究醒脑静注射液减轻七氟烷引起认知障碍的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与模型

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 36 只,8~12 周龄,购自常州卡文斯实验动物有限公司,在无病原体环境中饲养。所有动物实验均经江南大学实验动物伦理委员会审核通过(伦理审批号:JN.No20201230c1401231[379])。待动物适应 1 周后,将 36 只小鼠随机分为 3 组:对照组(Con)、七氟烷(Sev)和七氟烷+醒脑静注射液(Sev+XNJ)组,每组 12 只。Sev+XNJ 组小鼠于七氟烷麻醉前 2 h 腹腔注射醒脑静($10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,给药剂量参照文献^[22]方法),然后吸入 3%七氟烷 6 h。Sev 组小鼠腹腔注射

等量生理盐水后吸入 3%七氟烷 6 h。Con 组小鼠除腹腔注射等量生理盐水外,其余均不加处理。七氟烷吸入时间和剂量参照文献[23]的方法。

1.2 主要试剂与仪器

七氟烷(批号:21050631)购自上海恒瑞医药有限公司。醒脑静注射液(批号:210311)购自无锡济民可信集团有限公司,BrdU 粉末(货号:B5002)购自 Sigma-Aldrich(上海)贸易有限公司。兔抗 Notch1 抗体(货号:Ab52627)、兔抗 activated-Notch1(NICD)抗体(货号:Ab8925)、兔抗 Hes1 抗体(货号:Ab71559)、兔抗 BrdU 抗体(货号:Ab152095)、山羊抗兔 IgG H&L(Alexa Fluor[®] 594)(货号:Ab150080)和山羊抗鼠 IgG H&L(FITC)(货号:Ab6785)购自英国 Abcam 抗体公司。兔抗 β -actin 抗体(货号:49381)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗(货号:L3012)购自美国 Signalway 抗体公司,鼠抗 Iba1 抗体(货号:GTX632426)购自美国 GeneTex 抗体公司。BCA 蛋白检测试剂盒(货号:P0012S)、RIPA 裂解缓冲液(货号:P0013B)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(货号:P0015L)购自上海碧云天生物科技有限公司。蛋白标记物(货号:WJ102)来自上海雅酶生物医药科技有限公司。高灵敏度 ECL 化学发光底物(货号:AR1172)购自武汉博士德生物科技有限公司。SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒(货号:BL522A)购自北京兰杰柯科技有限公司。Hifair[®] III 1st Stander cDNA Synthesis Super-Mix for qPCR(gDNA digester plus)反转录试剂盒(货号:11141ES60)和 Hieff[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix(No Rox)(货号:11201ES08)购自上海翌圣生物科技有限公司。所用引物由江苏 GE-NEWIZ 生物技术有限公司合成。

R620-S1 型动物全身麻醉机购于深圳市瑞沃德生物科技有限公司。WMT-100 Morris 水迷宫视频分析系统购自成都泰盟软件有限公司。CM3050S 全自动冰冻切片机购自德国徕卡生物有限公司。全自动正置荧光显微镜购自德国蔡司集团。LightCycler 480 II 自动荧光定量 PCR 系统购自罗氏集团。Tanon-2500b 化学发光成像仪购自上海天能科技有限公司。

1.3 BrdU 标记

5-溴-2'-脱氧尿苷(BrdU)粉剂溶于 37℃生理盐水中,在七氟烷麻醉前 2 d 进行腹腔注射,注射剂量为 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,每日 2 次,连续 3 d。

1.4 Morris 水迷宫测试

利用 Morris 水迷宫检测小鼠的认知行为能力。Morris 水迷宫系统由一个圆形水箱组成,水箱被平均分为 4 个象限,平台位于其中一个象限并没入水面以下 1 cm。小鼠在接受七氟烷麻醉前 5 d 进行定向航行训练,每天 4 个象限依次进行训练,连续 5 d。每次训练的最小时间间隔为 15 min。每次训练过程中,小鼠依次被置于水迷宫的 4 个不同象限,允许其在 60 s 时间内自由寻找水下隐藏平台,第 1 次踏上平台并在平台超过 10 s 的时间称之为逃避潜伏期(Escape latency),如其在 60 s 时间内仍无法寻找到平台,则人为引导其至平台处并停留 30 s 以巩固记忆。在第 6 天,小鼠在七氟烷或对照暴露后进行空间探索测试,此时撤去水下藏匿平台,让小鼠在 60 s 内寻找原平台位置,使用 WMT-100 Morris 水迷宫视频跟踪系统记录第 1 次找到原平台位置的时间(即逃避潜伏期)以及原平台穿越次数。

1.5 免疫荧光分析

将麻醉后的小鼠用生理盐水及 4%多聚甲醛心脏灌流处死后取出其大脑,置于 4%多聚甲醛中固

定 24 h,然后在含 20%蔗糖的磷酸盐缓冲液(PBS)中放置 2 d,然后转至含 30%蔗糖的 PBS 中放置 3 d 进行梯度脱水处理。脱水完毕后脑组织用冰冻切片包埋剂包埋,然后按 25 μm 厚度进行冰冻切片。将切片用含 0.5% Triton X-100 的 PBS 溶液渗透 30 min 以溶解磷脂膜,并在室温下与封闭溶液(含 5% BSA 的 PBS)孵育 1 h。随后切片与一抗(稀释比为 1:200)在 4 ℃环境中孵育过夜后,与荧光二抗(稀释比为 1:200)在室温下孵育 2 h。然后在蔡司全自动正置荧光显微镜下观察^[24]。

1.6 qPCR 反应

将小鼠断颈处死后在冰上快速取出海马组织,用 Trizol 试剂提取总 RNA,按反转录试剂盒说明书的方法,将 1 μg RNA 反转录为 cDNA。在 LightCycler 480 上用定量扩增 TNF-α、IL-6、IL-12p35 和 GAPDH 的引物。GAPDH 基因作为内参。目的基因 mRNA 表达水平呈倍数变化,并与 GAPDH 水平进行标准化。引物参照本团队前期研究^[25]所设计,引物序列如表 1 所示。

表 1 引物序列
Table 1 Primer Sequences

引物	正向 (5'-3')	反向 (5'-3')
TNF-α	TTCTCATTCCTGCTTGTTGG	ACTTGGTGGTTTGCTACG
IL-6	CCACCAAGAACGATAGTCAA	TTTCCACGATTTCACAGA
IL-12 p35	GGACCAAACCAGCACAT	CGCAGACTCTCGCCATTA
GAPDH	TGCGACTTCAACAGCAACTC	CTTGCTCAGTGTCTTGTCTG

1.7 Western blot 实验

水迷宫空间探索试验后处死小鼠。快速取出脑组织样本,在 4 ℃环境下分离海马。用 RIPA 裂解液匀浆裂解海马组织,随后在 4 ℃,12 000 r·min⁻¹条件下离心 5 min 取上清,用 BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度。将样品蛋白与 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液充分混合并 95 ℃加热 10 min,待冷却至室温后用 10%的 SDS-PAGE 分离,随后转移到硝化纤维素膜上,与 5% BSA 室温孵育 1 h 后,与 Notch1 抗体(稀释比 1:500)、NICD 抗体(稀释比 1:500)、Hes1 抗体(稀释比 1:500)和 β-actin 抗体(稀释比 1:3 000)在 4 ℃下孵育过夜,然后与辣根过氧化物酶标记的二抗在室温下孵育 1 h。最后,利用 Tanon-2500B 化学发光成像仪检测蛋白条带,然后使用 Image J 软件检测条带的灰度值并进行统计分析。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析,计数资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。重复测量的方差分析(ANOVA)并使用 Bonferroni's 事后检验水迷宫定向航行试验中所记录的逃避潜伏期的差异。各组其他实验数据比较采用单因素方差分析,两两比较采用配对 *t* 检验及 Bonferroni's 事后检验。*P* < 0.05 认为差异具有统计学意义。

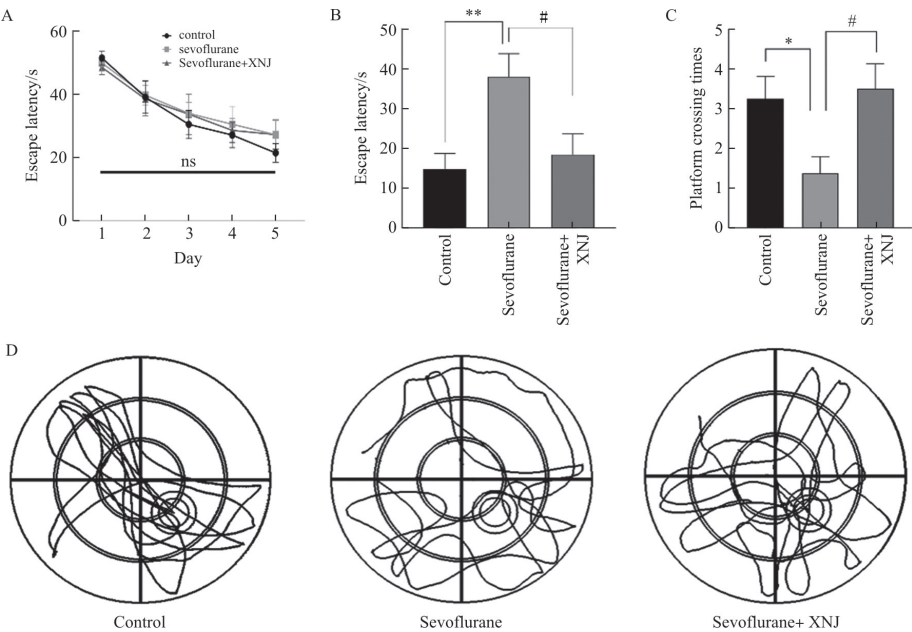
2 结果

2.1 醒脑静注射液改善七氟烷诱导的小鼠空间学习记忆障碍

在第 1~5 天的定向航行训练中,各组在任何时间点的逃避潜伏期均无显著差异(图 1A)。而空间探索试验的统计分析显示,3 组间的逃逸潜伏期和平台穿越时间存在显著差异(*P* < 0.05, *P* < 0.01)。与 Con 组相比,七氟烷组的逃逸潜伏期显著增加

($P<0.01$),但吸入七氟烷前腹腔注射醒脑静,逃逸潜伏期显著降低($P<0.05$)(图 1B)。与 Con 组相比,七氟烷组的原平台穿越次数也明显减少($P<0.05$, $P<0.01$);然而,与七氟烷组相比,Sev+XNJ 组

的平台穿越次数显著增加($P<0.05$)(图 1C)。与 Con 组相比,七氟烷组游泳轨迹极其混乱,但 Sev+XNJ 组游泳轨迹则相对集中于原平台位置附近(图 1D)。



注:A. 第 1~5 天定向航行训练各组小鼠逃避潜伏期;B. 第 6 天空间探索实验各组小鼠逃避潜伏期;C. 空间探索实验各组小鼠平台穿越次数;与对照组相比;D. 空间探索实验各组小鼠典型游泳轨迹。与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 Sev+XNJ 组相比,# $P<0.05$ 。 $\bar{x}\pm s$, $n=8$ 。

图 1 醒脑静注射液改善七氟烷诱导的小鼠空间学习记忆障碍

Fig. 1 XingNaoJing injection improved sevoflurane-induced spatial learning and memory impairment in mice

2.2 醒脑静注射液对七氟烷引起的海马炎症反应有抑制作用

小胶质细胞是中枢神经系统中的免疫细胞,其激活状态可反映炎症水平。本研究采用小胶质细胞的标志物 Iba-1 来观察小胶质细胞的激活状态。结果表明,与 Con 组相比,七氟烷组海马小胶质细胞显著被激活,具体表现为小胶质细胞的突起减少,胞体变圆。与 Sev 组相比,Sev+XNJ 组小鼠海马小胶质细胞激活被抑制(图 2A)。随后,通过 qPCR 技术检测各组海马的炎症细胞因子,结果表明,与 Con 组相比,Sev 组的海马 M1 型促炎细胞因子如 TNF- α 、IL-6 和 IL-12 p35 mRNA 水平显著上调($P<0.05$, $P<0.01$)。与 Sev 组相比,Sev+XNJ 组上述 M1 型促炎细胞因子 mRNA 水平下调($P<0.05$),差异具有

统计学意义(图 2B~2D)。

2.3 醒脑静注射液可缓解七氟烷诱导的神经干细胞增殖功能障碍

为了检测神经干细胞在海马中的增殖情况,使用核苷酸类似物 BrdU 标记神经干细胞。免疫荧光实验结果显示,七氟烷对海马 DG 区颗粒细胞下层的神经干细胞增殖有明显的抑制作用,BrdU 标记的阳性细胞数显著减少,而醒脑静注射液能缓解七氟烷对神经干细胞增殖的抑制效果,BrdU 标记的阳性细胞数增加(图 3A)。采用 ImageJ 软件对每组的 BrdU 阳性细胞进行量化。结果显示,七氟烷组 DG 区域 BrdU 阳性细胞数量明显低于其他 2 组,差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)(图 3B)。

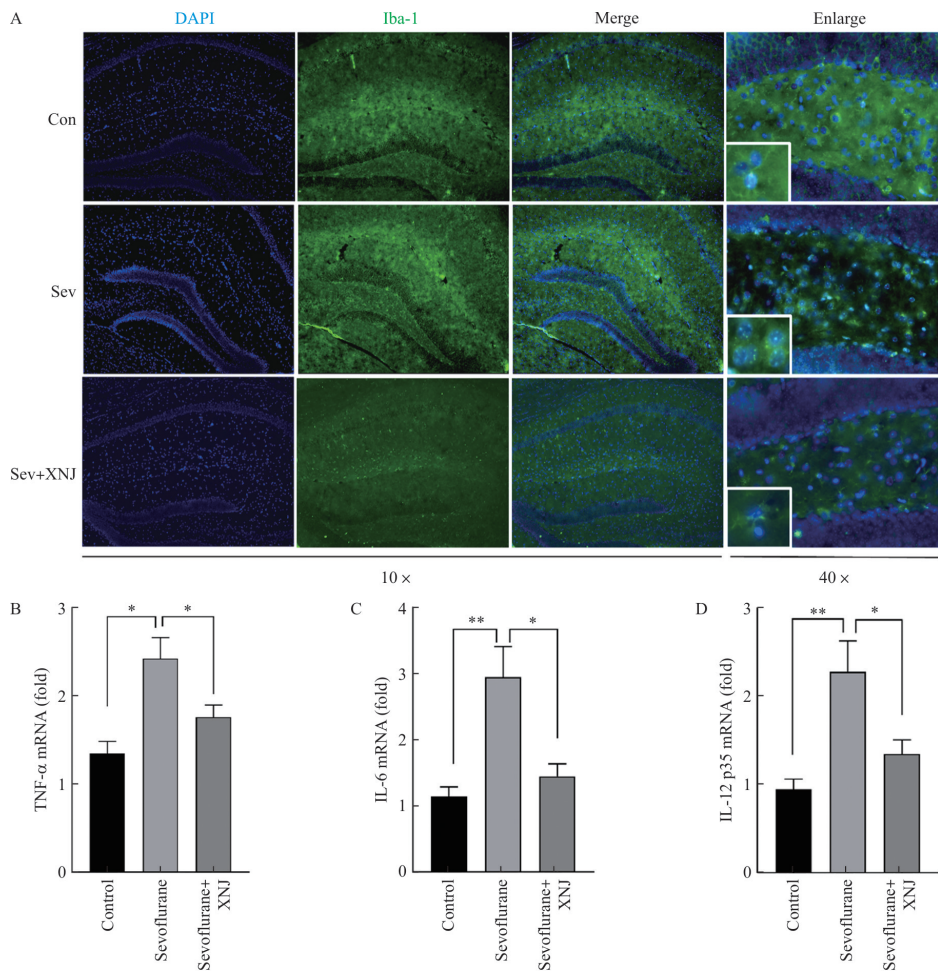


图 2 醒脑静注射液对七氟烷引起的海马炎症反应的影响

Fig. 2 The effect of XingNaoJing injection on hippocampal inflammatory reaction caused by sevoflurane

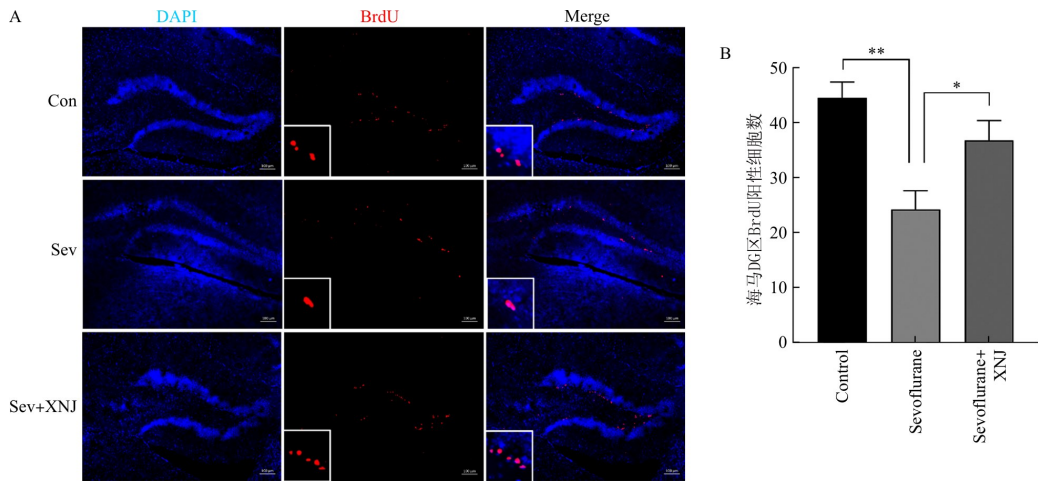


图 3 醒脑静注射液对七氟烷诱导的神经干细胞增殖功能的影响

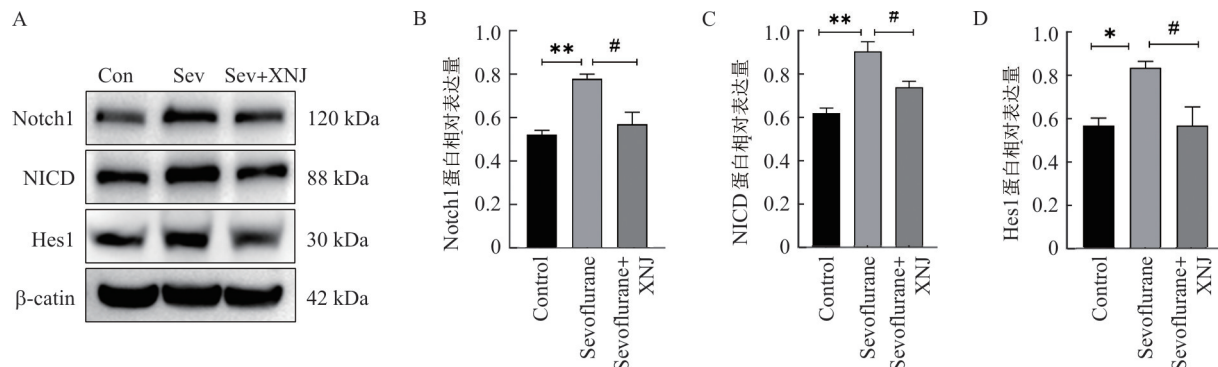
Fig. 3 The effect of XingNaoJing injection on neural stem cell proliferation function induced by sevoflurane

2.4 醒脑静注射液可抑制七氟烷诱导的 Notch/ Hes1 通路过度激活

为探讨 Notch 信号通路在七氟烷诱导的术后认知功能障碍中的作用,我们采用 Western blot 观察各

组 Notch1、NICD 和 Hes1 的表达情况。使用 Image J 软件对 Notch1、NICD 和 Hes1 的灰度值进行分析来量化蛋白的相对表达量。结果显示七氟烷组的

Notch1、NICD 和 Hes1 的蛋白相对表达量显著高于对照组和七氟烷加醒脑静组,差异具有统计学意义 ($P<0.05, P<0.01$) (图 4)。



注:与 Con 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 Sev+XNJ 组相比, # $P<0.05$ 。 $\bar{x} \pm s, n=4$ 。

图 4 醒脑静注射液抑制七氟烷诱导的 Notch/Hes1 通路过度激活

Fig. 4 XingNaoJing injection suppress sevoflurane-induced Notch/Hes1 pathway over activation

3 讨论

本研究探讨醒脑静注射液能否通过调节 Notch 信号通路,减轻七氟烷所致成年小鼠认知功能损害。正如预期的那样,我们发现 3%七氟烷暴露 6 h 可导致成年小鼠认知功能障碍。免疫荧光结果显示海马小胶质细胞被激活,神经干细胞增殖受到抑制。qPCR 和 Western blot 分析显示,七氟烷可上调海马组织中炎症细胞因子 mRNA 水平及 Notch 信号通路相关蛋白 Notch1、NICD 和 Hes1 的表达水平。醒脑静注射液预处理下调了海马 Notch1、NICD 和 Hes1 蛋白的表达,炎症细胞因子 mRNA 表达降低,抑制了小胶质细胞的激活并缓解了七氟烷引起的神经干细胞增殖障碍。Morris 水迷宫测试是检测认知功能的经典行为学实验。在 5 d 的定向航行训练中,各组间逃逸潜伏期无显著性差异,即空间探索试验的差异可以认为是由七氟烷引起的。我们的研究表明醒脑静可以改善小鼠认知功能。综上所述,醒脑静注射液通过调节 Notch 信号通路减轻七氟烷诱导的学习记忆障碍。提示醒脑静注射液预处理可能是预防七氟烷致成年小鼠术后认知障碍的可行措施。

POCD 是一种常见的术后并发症,但其确切的发病机制尚不清楚。人们普遍认为 POCD 可能是多因素的,这可能与年龄、教育水平、先前存在的心理健康状况和并发症^[26]有关。近年来,麻醉与术后认知功能障碍的关系已成为麻醉学者研究的重点。越来越多的动物研究表明,手术中广泛使用的吸入性麻醉剂七氟烷可诱发 POCD,特别是在老年小鼠中^[27-29]。但亦有研究表明,七氟烷也可引起幼龄和

成年小鼠学习记忆障碍^[23,30-32]。已有多种机制揭示了七氟烷诱导认知障碍的机制,如神经炎症^[33-35]、氧化应激^[36]、自噬^[37]和铁-葡萄糖代谢交叉功能障碍^[38]。在众多机制中,七氟烷引起神经炎症导致 POCD 是研究得最为广泛的机制之一,但七氟烷是如何引起神经炎症的尚不清楚。

海马 DG 中的神经发生在海马功能中发挥着关键作用,神经干细胞增殖分化为成熟神经元,与现有的海马回路形成突触连接,并促进海马依赖的学习和记忆过程^[39]。成人神经发生过程对病理条件高度敏感,越来越多的证据表明神经发生功能障碍可能在阿尔茨海默病^[40]和抑郁症中发挥重要作用^[41-42]。炎症作为病理过程的初始阶段,可引起一系列的级联反应,进而损害包括神经发生在内的其他功能。Tang 等发现海马成纤维细胞生长因子 2 (调节中枢神经系统细胞增殖和存活的关键分子)的蛋白表达受到神经炎症的抑制^[43]。Osman 等发现促炎小胶质细胞负向调节神经干细胞存活^[44]。然而,七氟烷诱导的神经炎症如何影响神经增殖功能仍需进一步研究。

Notch 信号是通过细胞-细胞间的交流来实现的,其中一个细胞上的跨膜配体激活相邻细胞上的跨膜受体。在 ADAM 金属蛋白酶和 γ -分泌酶复合物的帮助下,Notch 受体被切割并释放出 Notch 胞内结构域(NICD,Notch 的活化片段)。然后,NICD 易位到细胞核,与 CSL(也称为 RBP-J)相互作用,调节下游基因如 Hes 家族成员的转录^[45-46]。在生理条件下,Notch 信号通路通过促进 NSC 增殖和抑制

神经分化来维持神经系统自我更新。Notch 信号通路由于具有促进细胞增殖的作用,在肿瘤发生发展领域得到了广泛的研究。然而,最近的研究逐渐表明 Notch 信号通路也与炎症密切相关。Qian 等发现 Notch 信号通路的激活在脊髓损伤 (SCI) 后 A1 星形胶质细胞分化中起重要作用^[47]。同样,Wu 等发现 Notch 信号调节颞叶癫痫大鼠模型^[48]中的小胶质细胞激活和炎症反应。然而 Notch 信号通路是否调控七氟烷诱导的海马炎症尚不清楚。因此,我们的研究旨在确定 Notch 信号通路在七氟烷诱导的炎症中的作用。研究结果表明七氟烷暴露后 Notch 信号通路过度激活,海马小胶质细胞激活增加,炎症细胞因子 mRNA 表达上调。这些结果提示 Notch 信号通路可能是使小胶质细胞极化至 M1 状态的促炎信号分子。

醒脑静是从传统中药安宫牛黄丸中提取的水溶性注射液,主要用于神经外科患者的脑保护。部分动物研究发现醒脑静注射液通过抗炎途径对脑缺血/再灌注损伤具有保护作用^[19,49]。然而,它是否在七氟烷引起的 POCD 中发挥作用仍不清楚。本研究结果发现醒脑静注射液可以通过减轻海马神经炎症和神经干细胞增殖功能障碍来改善七氟烷所致的认知功能障碍,其机制可能与抑制七氟烷诱导的 Notch 信号通路过度激活有关。但醒脑静作为一种中成药,成分复杂,本研究未对其具体成分展开分析,后续研究应探讨何种单体成分在其中发挥具体作用。

综上所述,本研究结果发现醒脑静注射液通过抑制 Notch1/Hes1 通路,减轻了七氟烷诱导的海马神经炎症和神经干细胞增殖功能障碍,改善成年小鼠认知功能障碍。因此,该注射液有望成为临床预防七氟烷致 POCD 的一种新的治疗方法。

参考文献:

- [1] WANG CM, CHEN WC, ZHANG Y, et al. Update on the mechanism and treatment of sevoflurane-induced postoperative cognitive dysfunction[J]. *Front Aging Neurosci*, 2021, 13: 702231.
- [2] CUI RS, WANG K, WANG ZL. Sevoflurane anesthesia alters cognitive function by activating inflammation and cell death in rats[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(5): 4127-4130.
- [3] GARRONE B, DURANDO L, PRENDERVILLE J, et al. Paracetamol (acetaminophen) rescues cognitive decline, neuroinflammation and cytoskeletal alterations in a model of post-operative cognitive decline (POCD) in middle-aged rats[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 10139.
- [4] SHAO AM, FEI JP, FENG SQ, et al. Chikusetsu saponin IVa alleviated sevoflurane-induced neuroinflammation and cognitive impairment by blocking NLRP3/caspase-1 pathway[J]. *Pharmacol Rep*, 2020, 72(4): 833-845.
- [5] DONG P, ZHAO J, LI N, et al. Sevoflurane exaggerates cognitive decline in a rat model of chronic intermittent hypoxia by aggravating microglia-mediated neuroinflammation via downregulation of PPAR- γ in the hippocampus[J]. *Behav Brain Res*, 2018, 347: 325-331.
- [6] XU X, ZHAO Y, XU MZ, et al. Activation of Notch signal pathway is associated with a poorer prognosis in acute myeloid leukemia[J]. *Med Oncol*, 2011, 28(1): 483-489.
- [7] REN SG, ZHANG XM, HU YY, et al. Blocking the Notch signal transduction pathway promotes tumor growth in osteosarcoma by affecting polarization of TAM to M2 phenotype[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(17): 1057.
- [8] SUN QS, LUO M, ZHAO HM, et al. Overexpression of PKMYT1 indicates the poor prognosis and enhances proliferation and tumorigenesis in non-small cell lung cancer via activation of Notch signal pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(10): 4210-4219.
- [9] LIU ZB, TANG C, JIN X, et al. Increased expression of lncRNA SNHG12 predicts a poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma and regulates cell proliferation and metastasis by modulating Notch signal pathway[J]. *Cancer Biomark*, 2018, 23(4): 603-613.
- [10] TINDEMANS I, VAN SCHOONHOVEN A, KLEINJAN A, et al. Notch signaling licenses allergic airway inflammation by promoting Th2 cell lymph node egress[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(7): 3576-3591.
- [11] LAVOZ C, POVEDA J, MARQUEZ-EXPOSITO L, et al. Gremelin activates the Notch pathway linked to renal inflammation[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2018, 132(11): 1097-1115.
- [12] TODA T, PARYLAK SL, LINKER SB, et al. The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health and disease[J]. *Mol Psychiatry*, 2019, 24(1): 67-87.
- [13] OLABIYI BF, FLEITAS C, ZAMMOU B, et al. proNGF involvement in the adult neurogenesis dysfunction in Alzheimer's disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 10744.
- [14] TODA T, GAGE FH. Adult neurogenesis contributes to hippocampal plasticity[J]. *Cell Tissue Res*, 2018, 373(3): 693-709.
- [15] KHEIRBEK MA, HEN R. (Radio)active neurogenesis in the human *Hippocampus*[J]. *Cell*, 2013, 153(6): 1183-1184.
- [16] SANAI N, NGUYEN T, IHRIE RA, et al. Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy[J]. *Nature*, 2011, 478(7369): 382-386.
- [17] SPALDING KL, BERGMANN O, ALKASS K, et al. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans[J]. *Cell*, 2013, 153(6): 1219-1227.
- [18] VALERO J, BERNARDINO L, CARDOSO FL, et al. Impact of neuroinflammation on hippocampal neurogenesis: Relevance to aging and Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 60(S1): S161-S168.
- [19] ZHANG YM, QU XY, TAO LN, et al. XingNaoJing injection ameliorates cerebral ischaemia/reperfusion injury via SIRT1-mediated inflammatory response inhibition[J]. *Pharm Biol*, 2020, 58(1): 16-24.
- [20] ZHANG YM, QU XY, ZHAI JH, et al. Xingnaojing injection protects against cerebral ischemia reperfusion injury via PI3K/Akt-mediated eNOS phosphorylation[J]. *Evid Based Complementary Altern Med*, 2018, 2018: 2361046.
- [21] MA X, YANG YX, CHEN N, et al. Meta-analysis for clinical evaluation of Xingnaojing injection for the treatment of cerebral infarction[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 485.
- [22] 薛冰心, 张邓新, 邱丽颖, 等. 醒脑静对七氟烷麻醉小鼠海马中突触结合蛋白-I 表达的影响与学习记忆相关性[J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(6): 162-166.
- [23] XUE BX, ZHANG DX, QIU LY, et al. Effect of Xingnaojing on the expression of synaptotagmin-I in hippocampus of mice with sevoflurane anesthesia and ability of learning and memory in mice[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2016, 32(6): 162-166.
- [24] ZHANG DX, XUE BX, YOU J, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid reversed cognitive and synaptic plasticity impairments induced by sevoflurane exposure in adult mice[J]. *Neuroreport*, 2019, 30(4): 274-279.
- [25] KOTTEKAR N, SHENKAR A, NAGARAJ R. Postoperative cognitive dysfunction-current preventive strategies[J]. *Clin Interv Aging*, 2018, 13: 2267-2273.
- [26] NIE Y, WANG Z, CHAI G, et al. Dehydrocostus lactone suppresses LPS-induced acute lung injury and macrophage activation

- through NF- κ B signaling pathway mediated by p38 MAPK and Akt [J]. *Molecules*, 2019, 24(8): E1510.
- [26] JIANG M, TANG TX, LIANG XY, et al. Maternal sevoflurane exposure induces temporary defects in interkinetic nuclear migration of radial glial progenitors in the fetal cerebral cortex through the Notch signalling pathway[J]. *Cell Prolif*, 2021, 54(6): e13042.
 - [27] FEI X, WANG JX, WU Y, et al. Sevoflurane-induced cognitive decline in aged mice: Involvement of toll-like receptors 4[J]. *Brain Res Bull*, 2020, 165: 23–29.
 - [28] ZHAO LL, GONG HX, HUANG HJ, et al. Participation of mind bomb-2 in sevoflurane anesthesia induces cognitive impairment in aged mice via modulating ferroptosis[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2021, 12(13): 2399–2408.
 - [29] LIANG R, OU SS, HAN YX, et al. Plasma amyloid beta level changes in aged mice with cognitive dysfunction following sevoflurane exposure[J]. *Exp Gerontol*, 2020, 129: 110737.
 - [30] WANG XN, DONG YL, ZHANG YY, et al. Sevoflurane induces cognitive impairment in young mice via autophagy[J]. *PLoS ONE*, 2019, 14(5): e0216372.
 - [31] LIU MY, SONG SY, CHEN QC, et al. Gut microbiota mediates cognitive impairment in young mice after multiple neonatal exposures to sevoflurane[J]. *Aging*, 2021, 13(12): 16733–16748.
 - [32] TANG XL, ZHAO YL, ZHOU ZQ, et al. Resveratrol mitigates sevoflurane-induced neurotoxicity by the SIRT1-dependent regulation of BDNF expression in developing mice[J]. *Oxidative Med Cell Longev*, 2020, 2020: 9018624.
 - [33] YIN J, ZHAO X, WANG LJ, et al. Sevoflurane-induced inflammation development: Involvement of cholinergic anti-inflammatory pathway[J]. *Behav Pharmacol*, 2019, 30(8): 730–737.
 - [34] YANG ZY, YUAN CX. IL-17A promotes the neuroinflammation and cognitive function in sevoflurane anesthetized aged rats via activation of NF- κ B signaling pathway[J]. *BMC Anesthesiol*, 2018, 18(1): 147.
 - [35] LV GY, LI CG, WANG WW, et al. Silencing SP1 alleviated sevoflurane-induced POCD development via cholinergic anti-inflammatory pathway[J]. *Neurochem Res*, 2020, 45(9): 2082–2090.
 - [36] TIAN Y, GUO SB, MA L, et al. Sevoflurane aggregates cognitive dysfunction and hippocampal oxidative stress induced by β -amyloid in rats[J]. *Life Sci*, 2015, 143: 194–201.
 - [37] ZHANG XM, ZHOU YF, XU MM, et al. Autophagy is involved in the sevoflurane anesthesia-induced cognitive dysfunction of aged rats[J]. *PLoS ONE*, 2016, 11(4): e0153505.
 - [38] GE X, ZUO Y, XIE JH, et al. A new mechanism of POCD caused by sevoflurane in mice: Cognitive impairment induced by cross-dysfunction of iron and glucose metabolism[J]. *Aging*, 2021, 13(18): 22375–22389.
 - [39] HOSSAIN MM, BELKADI A, AL-HADDAD S, et al. Delta-methrin exposure inhibits adult hippocampal neurogenesis and causes deficits in learning and memory in mice[J]. *Toxicol Sci*, 2020, 178(2): 347–357.
 - [40] BABCOCK KR, PAGE JS, FALLON JR, et al. Adult hippocampal neurogenesis in aging and Alzheimer's disease[J]. *Stem Cell Rep*, 2021, 16(4): 681–693.
 - [41] KIM IB, PARK SC. The entorhinal cortex and adult neurogenesis in major depression[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21): 11725.
 - [42] PARK SC. Neurogenesis and antidepressant action[J]. *Cell Tissue Res*, 2019, 377(1): 95–106.
 - [43] TANG MM, LIN WJ, ZHANG JT, et al. Exogenous FGF₂ reverses depressive-like behaviors and restores the suppressed FGF2-ERK1/2 signaling and the impaired hippocampal neurogenesis induced by neuroinflammation[J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 66: 322–331.
 - [44] OSMAN AM, RODHE J, SHEN XL, et al. The secretome of microglia regulate neural stem cell function[J]. *Neuroscience*, 2019, 405: 92–102.
 - [45] SIEBEL C, LENDAHL U. Notch signaling in development, tissue homeostasis, and disease[J]. *Physiol Rev*, 2017, 97(4): 1235–1294.
 - [46] KOPAN R, ILAGAN MXG. The canonical Notch signaling pathway: Unfolding the activation mechanism[J]. *Cell*, 2009, 137(2): 216–233.
 - [47] QIAN DF, LI LW, RONG YL, et al. Blocking Notch signal pathway suppresses the activation of neurotoxic A1 astrocytes after spinal cord injury[J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(21): 3010–3029.
 - [48] WU L, LI YS, YU MH, et al. Notch signaling regulates microglial activation and inflammatory reactions in a rat model of temporal lobe epilepsy[J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(6): 1269–1282.
 - [49] QU XY, ZHANG YM, TAO LN, et al. XingNaoJing injections protect against cerebral ischemia/reperfusion injury and alleviate blood-brain barrier disruption in rats, through an underlying mechanism of NLRP3 inflammasomes suppression[J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(7): 498–505.

(编辑:董宇)