

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research瑞马唑仑改善术后认知功能障碍小鼠学习
记忆能力和脑损伤的研究Research of remimazolam improving learning and memory ability and brain injury
in postoperative cognitive dysfunction mice汪云飞^{1a}, 王加芳^{1a}, 丁 喆^{1b},
张 朋^{1a}, 姚万军^{1a}, 冯艳坤^{1a}(1. 武汉市第一医院, a. 麻醉科; b. 疼痛科,
湖北 武汉 430033)WANG Yun-fei^{1a},
WANG Jia-fang^{1a}, DING Zhe^{1b},
ZHANG Peng^{1a}, YAO Wan-jun^{1a},
FENG Yan-kun^{1a}(1. a. Department of Anesthesiology; b.
Department of Pain, Wuhan First
Hospital, Wuhan 430033, Hubei Province,
China)基金项目: 武汉市医学科学研究基金资助项目
(WX23B15)作者简介: 汪云飞(1985-), 男, 主治医师, 主要
从事麻醉药物镇痛机制研究、急危重
症患者的麻醉与救治、麻醉与认知功
能方面的相关研究通信作者: 王加芳, 副主任医师, 硕士生导师
MP: 13995660701
E-mail: doctorwjf66@163.com

摘要:目的 探讨瑞马唑仑通过调控 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3) 改善术后认知功能障碍(POCD)小鼠学习记忆能力和脑损伤的相关机制。**方法** 将 C57BL/6J 小鼠分为假手术组(仅暴露胫骨, 不进行截断)、模型组(截断胫骨术方法构建 POCD 模型)、对照组(建模 + 15 mg · kg⁻¹ 瑞马唑仑处理 + 尾静脉注射 60 nmol · L⁻¹ oe - NC)、过表达组(建模 + 15 mg · kg⁻¹ 瑞马唑仑处理 + 尾静脉注射 60 nmol · L⁻¹ oe - NLRP3)和低、中、高剂量组(建模后分别给予 5、10、15 mg · kg⁻¹ 瑞马唑仑腹腔注射), 每组 12 只。处理后的小鼠, 用 Morris 水迷宫和跳台实验评估学习和记忆能力, 用实时荧光定量聚合酶链反应检测 *NLRP3*、白细胞介素 1β(*IL-1β*)、*IL-10*、肿瘤坏死因子-α(*TNF-α*)的表达水平, 用 2', 7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)染色法检测活性氧(ROS)水平, 用免疫荧光法检测胶质纤维酸性蛋白(GFAP)水平。**结果** 假手术组、模型组和低、中、高剂量组的穿越平台次数分别为(4.58 ± 0.91)、(0.73 ± 0.15)、(0.92 ± 0.18)、(1.58 ± 0.31)和(2.75 ± 0.55)次, 错误次数分别为(0.50 ± 0.11)、(2.08 ± 0.41)、(1.75 ± 0.35)、(1.58 ± 0.31)和(1.25 ± 0.25)次, *NLRP3* mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15、3.51 ± 0.69、2.94 ± 0.59、2.57 ± 0.51 和 1.91 ± 0.38; 假手术组、模型组、高剂量组、对照组、过表达组的 *IL-1β* mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.17、2.72 ± 0.54、1.87 ± 0.37、1.91 ± 0.38 和 2.66 ± 0.53, *IL-10* mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.16、0.51 ± 0.10、0.78 ± 0.15、0.73 ± 0.15 和 0.56 ± 0.11, *TNF-α* mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.21、3.08 ± 0.61、1.77 ± 0.35、1.82 ± 0.36 和 2.65 ± 0.53, ROS 相对荧光强度分别为 1.00 ± 0.16、7.22 ± 1.45、3.05 ± 0.61、3.13 ± 0.63 和 6.75 ± 1.31, GFAP 相对荧光强度分别为 1.00 ± 0.18、6.71 ± 1.13、3.38 ± 0.63、3.50 ± 0.72 和 5.94 ± 1.19。假手术组的上述指标与模型组比较, 高剂量组的上述指标与模型组比较, 过表达组的上述指标与对照组比较, 在统计学上差异均有统计学意义(均 *P* < 0.05)。**结论** 瑞马唑仑可以改善小鼠的术后认知功能, 其机制可能与下调 *NLRP3* 表达来抑制神经炎症和氧化应激损伤有关。

关键词: 瑞马唑仑; NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3; 术后认知功能障碍; 活性氧; 炎症反应; 神经元

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.07.011

中图分类号: R971.2 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2025)07-0955-07

Abstract: Objective To explore the mechanism of remimazolam improving learning and memory ability and brain injury in postoperative cognitive impairment (POCD) mice by regulating NOD-like receptor heat protein domain associated protein 3 (NLRP3). **Methods** The C57BL/6J mice were divided into sham group (exposure of the tibia only

without truncation), model group (tibia amputation method to construct POCD model), oe - NC group (modeling + $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ remimazolam treatment + tail vein injection of $60 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ oe - NC), oe - NLRP3 group (modeling + $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ remimazolam treatment + tail vein injection of $60 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ oe - NLRP3), experimental - L, - M, - H groups (after modeling, 5, 10, 15 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ remimazolam was respectively given intraperitoneal injection), 12 rats per group. For the treated mice, the Morris water maze and step - down test were used to evaluate their learning and memory abilities. The expression levels of *NLRP3*, interleukin - 1β (*IL* - 1β), *IL* - 10 and tumor necrosis factor - α (*TNF* - α) were detected by quantitative real - time polymerase chain reaction (qRT - PCR). The level of reactive oxygen species (ROS) was detected by 2',7' - dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH - DA) staining, and the level of glial fibrillary acidic protein (GFAP) was detected by immunofluorescence. **Results** The platform crossing times of sham operation group, model group and experimental - L, - M, - H groups were (4.58 ± 0.91), (0.73 ± 0.15), (0.92 ± 0.18), (1.58 ± 0.31) and (2.75 ± 0.55), respectively; the error times were (0.50 ± 0.11), (2.08 ± 0.41), (1.75 ± 0.35), (1.58 ± 0.31) and (1.25 ± 0.25), respectively; the relative expression levels of *NLRP3* mRNA were 1.00 ± 0.15 , 3.51 ± 0.69 , 2.94 ± 0.59 , 2.57 ± 0.51 and 1.91 ± 0.38 , respectively; the relative expression levels of *IL* - 1β mRNA in sham operation group, model group, experimental - H group, control group and oe - NLRP3 group were 1.00 ± 0.17 , 2.72 ± 0.54 , 1.87 ± 0.37 , 1.91 ± 0.38 and 2.66 ± 0.53 , respectively; the relative expression levels of *IL* - 10 mRNA were 1.00 ± 0.16 , 0.51 ± 0.10 , 0.78 ± 0.15 , 0.73 ± 0.15 and 0.56 ± 0.11 , respectively; the relative expression levels of *TNF* - α mRNA were 1.00 ± 0.21 , 3.08 ± 0.61 , 1.77 ± 0.35 , 1.82 ± 0.36 and 2.65 ± 0.53 , respectively; the relative fluorescence intensities of ROS were 1.00 ± 0.16 , 7.22 ± 1.45 , 3.05 ± 0.61 , 3.13 ± 0.63 and 6.75 ± 1.31 , respectively; the relative fluorescence intensities of GFAP were 1.00 ± 0.18 , 6.71 ± 1.13 , 3.38 ± 0.63 , 3.50 ± 0.72 and 5.94 ± 1.19 , respectively. The above indexes in the sham operation group were compared with the model group, the above indexes in the experimental - H group were compared with the model group, the above indexes in the oe - NLRP3 group were compared with the control group, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** Remimazolam improves postoperative cognitive function in mice by a mechanism that may be related to the inhibition of neuroinflammatory and oxidative stress damage by down - regulating NLRP3 expression.

Key words: remimazolam; NOD - like receptor heat protein domain associated protein 3; postoperative cognitive dysfunction; reactive oxygen species; inflammatory response; neurons

术后认知功能障碍(postoperative cognitive dysfunction, POCD)是接受麻醉和手术治疗后常见的以注意力不集中、记忆缺陷、学习能力下降等为主要临床特征的中枢神经系统并发症之一,多发于老年人群,严重影响其日常行为能力和生活质量^[1]。目前,研究认为,POCD的病理生理机制可能与麻醉药物蓄积作用、氧化应激、神经炎症及细胞凋亡等相关^[2]。已有研究揭示,NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)炎症小体诱导的炎症级联反应会加重神经元损伤和认知功能障碍^[3]。瑞马唑仑作为一种新型麻醉镇静药物,可以通过抑制神经炎症反应来发挥神经保护作用,具有起效快、无蓄积及麻醉恢复快等特点^[4]。本研究旨在分析瑞马唑仑对POCD小鼠学习记忆能力、脑损伤及NLRP3相关信号通路的影响,以期为临床治

疗提供参考依据。

材料与方法

1 材料

动物 SPF级健康雄性C57BL/6J小鼠,体质量20~25 g,鼠龄8周,购自北京维通利华实验动物技术有限公司湖北分公司。动物生产许可证号:SCXK(鄂)2022—0030。本实验经武汉市第一医院动物伦理委员会批准(伦理批号:科伦[2024]56号)。

药品与试剂 注射用苯磺酸瑞马唑仑,规格:每支25 mg,批号:20220309,批准文号:国药准字H20200006,购自宜昌人福药业有限责任公司;罗哌卡因,规格:每瓶50 mg,纯度:99.87%,批号:78889,购自美国MCE公司。Triton X-100、逆转录试剂盒、活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒、

β -actin 抗体、NLRP3 抗体、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记山羊抗兔免疫球蛋白 G 抗体, 均购自上海碧云天生物技术股份有限公司; 尼氏 (Nissl stain, Nissl) 染色液, 购自北京索莱宝科技有限公司; 胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 抗体、荧光素酶标记的山羊抗鼠免疫球蛋白 G 抗体, 均购自美国 Thermo 公司。

仪器 QuanStudio 6 荧光定量聚合酶链反应 (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR) 仪, 美国 Thermo 公司产品; Eclipse Ti-SR 荧光显微镜, 日本尼康公司产品; DMS-2 Morris 水迷宫、DTT-2 小鼠跳台装置, 均为中国医学科学院药物研究所产品。

2 实验方法

2.1 模型构建^[5]

C57BL/6J 小鼠适应性饲养 2 周, 术前禁食水 4~6 h, 麻醉后将小鼠仰卧位固定于动物手术台, 于左侧小腿和膝关节处备皮, 碘伏消毒后铺巾, 右手持手术刀依次切开皮肤、肌肉和筋膜, 暴露胫骨, 在胫骨平台上方小孔处沿胫骨髓腔插入 24 G 留置针针芯, 长约 1 cm, 确认后在中段截断胫骨以建立 POCD 模型, 用 4-0 丝线缝合伤口和皮肤, 待小鼠于恒温毯上麻醉苏醒后将其放至原先饲养环境, 并注意每天观察切口局部有无感染。建模后以 Morris 水迷宫实验检测, 若小鼠发生记忆和学习障碍则视为造模成功。

2.2 动物分组与处置方法

将小鼠分为假手术组、模型组、对照组、过表达组和低、中、高剂量组, 共 7 组, 每组 12 只。假手术组: C57BL/6J 小鼠仅暴露胫骨, 不进行截断。模型组: 按“2.1”中造模。低、中、高剂量组: 基于模型组小鼠, 分别给予 5、10、15 mg·kg⁻¹ 瑞马唑仑腹腔注射, *qd*, 持续 7 d。过表达组: 基于瑞马唑仑高剂量组小鼠, 尾静脉注射 60 nmol·L⁻¹ oe-NC 质粒, 每周 2 次, 持续 1 周。oe-NLRP3 组: 基于瑞马唑仑高剂量组小鼠, 尾静脉注射 60 nmol·L⁻¹ oe-NLRP3 质粒, 每周 2 次, 持续 1 周。

2.3 Morris 水迷宫和跳台实验评估学习记忆能力^[6]

Morris 水迷宫 于水池内放置圆形透明平台, 保持恒温、隔音, 第 1~5 天为定位航行试验, 记录小鼠在 120 s 内找到平台的时间, 即逃避潜伏期, 并引导其站上平台且停留 15 s, 第 6 天进行空间探索试验, 撤掉平台, 测其从第三象限入水

后到第 1 次穿越平台的时间及 120 s 内穿越平台次数。

跳台实验 训练前 3 min 将小鼠放入实验箱中适应环境, 之后让小鼠遭受电刺激并跳上绝缘平台, 经过一次电刺激后, 将小鼠放置于绝缘平台上, 记录各组小鼠 300 s 内的错误潜伏期 (首次跳下平台的时间) 和跳下平台的错误次数。

2.4 qRT-PCR 检测 NLRP3 和炎症因子的表达水平^[7]

用 TRIzol 试剂从小鼠脑组织中分离总 RNA, 鉴定纯度及完整性后, 将总 RNA 反转录为互补 DNA, 进行 PCR 扩增。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达水平。

2.5 蛋白质印迹 (Western blot, WB) 法检测 NLRP3 的表达水平^[8]

取出小鼠脑组织, 加入蛋白裂解液充分震荡, 溶解蛋白后加入蛋白提取液, 再次震荡静置后离心, 收集上清液进行蛋白定量, 依次电泳、转膜、封闭, 加入 β -actin、NLRP3 一抗 (1:1 000), 4℃ 孵育过夜, 清洗后加入二抗 (1:1 500), 常温孵育 40 min, 清洗后显色, 进行条带灰度分析。

2.6 Nissl 染色法观察脑组织海马区神经元情况^[9]

将小鼠脑组织依次固定、脱水、透明、包埋、切片、脱蜡, 行常规 Nissl 染色, 封片后, 于镜下观察海马区域脑组织的病理变化。

2.7 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯 (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 染色法检测 ROS 水平^[10]

取小鼠脑组织切片置于 60℃ 干燥箱中烘干, 经二甲苯和梯度乙醇洗脱, 滴加 DCFH-DA 染色液 (5 μ mol·L⁻¹), 37℃ 水浴 30 min, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 洗涤 3 次, 每次 5 min, 在荧光显微镜下观察。

2.8 免疫荧光法检测 GFAP 的表达水平^[9]

脑组织石蜡切片脱蜡水化, 去除切片上残留的牛血清白蛋白后, 加入 GFAP 一抗 (1:200), 4℃ 孵育过夜, 去除一抗后, 荧光素酶标记的二抗 (1:200) 避光孵育 1 h, 洗涤后以 4',6-二脒基-2-苯基吲哚溶液染色, 封片后, 在光镜下观察并采集图像。

3 统计学处理

用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较用单因素方差分析, 2 组间比较用独立样本 *t* 检验。

结 果

1 瑞马唑仑对 POCD 小鼠学习记忆能力的影响

假手术组小鼠不构建模型;模型组小鼠构建 POCD 模型;低、中、高剂量组小鼠构建 POCD 模型后分别腹腔注射给予 5、10、15 mg · kg⁻¹瑞马唑仑;对照组小鼠进行建模 + 15 mg · kg⁻¹瑞马唑仑 + 尾静脉注射 60 nmol · L⁻¹oe - NC 处理;过表达组小鼠进行建模 + 15 mg · kg⁻¹瑞马唑仑 + 尾静脉注射 60 nmol · L⁻¹oe - NLRP3 处理。

Morris 水迷宫实验结果显示:模型组较假手术组的第 3、5、7 天逃避潜伏期和第 1 次穿越平台时间均显著延长,穿越平台次数均显著减少(均 $P < 0.001$);低、中、高剂量组较模型组的第 3、5、7 天逃避潜伏期和第 1 次穿越平台时间均不同程度缩短,穿越平台次数不同程度增加($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。跳台实验结果显示:模型组较假手术组的逃避潜伏期明显缩短,错误次数明显增加(均 $P < 0.001$);低、中、高剂量组较模型组的潜伏期均不同程度延长,错误次数均不同程度减少($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。结果见表 1 和表 2。

表 1 不同时间点各组小鼠学习记忆能力的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the learning memory ability of mice in various groups at different time points($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Escape latency(s)			
		1 d	3 d	5 d	7 d
Sham	12	100.73 ± 20.35	62.48 ± 12.49	31.33 ± 6.27	26.51 ± 5.31
Model	12	120.15 ± 23.78 [*]	118.72 ± 23.75 ^{***}	93.29 ± 18.65 ^{***}	73.06 ± 14.61 ^{***}
Experimental - L	12	118.40 ± 23.67	88.37 ± 17.67 ^{##}	67.04 ± 13.41 ^{###}	50.38 ± 10.75 ^{###}
Experimental - M	12	119.45 ± 23.88	81.25 ± 16.24 ^{###}	60.21 ± 12.03 ^{###}	45.15 ± 9.03 ^{###}
Experimental - H	12	117.36 ± 23.77	75.74 ± 15.15 ^{###}	54.49 ± 10.89 ^{###}	40.08 ± 8.02 ^{###}

Sham group: Normal + deionized water; Model group: Postoperative cognitive dysfunction (POCD) model + deionized water; Experimental - L group: POCD model + 5 mg · kg⁻¹ remimazolam; Experimental - M group: POCD model + 10 mg · kg⁻¹ remimazolam; Experimental - H group: POCD model + 15 mg · kg⁻¹ remimazolam; Compared with sham group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$; Compared with model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$.

表 2 各组小鼠学习记忆能力比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of learning and memory ability of mice in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	First time crossing the platform(s)	Platform crossing times (time)	Escape latency (s)	Number of errors (time)
Sham	21.82 ± 4.36	4.58 ± 0.91	211.37 ± 42.27	0.50 ± 0.11
Model	73.64 ± 14.73 ^{***}	0.73 ± 0.15 ^{***}	58.21 ± 11.65 ^{***}	2.08 ± 0.41 ^{***}
Experimental - L	61.82 ± 12.36 [#]	0.92 ± 0.18 [#]	69.71 ± 13.34 [#]	1.75 ± 0.35 [#]
Experimental - M	57.15 ± 11.43 ^{##}	1.58 ± 0.31 ^{###}	82.59 ± 16.51 ^{###}	1.58 ± 0.31 ^{##}
Experimental - H	48.30 ± 9.65 ^{###}	2.75 ± 0.55 ^{###}	103.47 ± 20.69 ^{###}	1.25 ± 0.25 ^{###}

Dose and n refer to table 1; Compared with sham group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$; Compared with model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$.

2 瑞马唑仑调控 NLRP3 的表达水平

qRT - PCR 和 WB 结果显示:假手术组、模型组和低、中、高剂量组的 *NLRP3* mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15 、 3.51 ± 0.69 、 2.94 ± 0.59 、 2.57 ± 0.51 和 1.91 ± 0.38 , *NLRP3* 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.17 、 3.23 ± 0.65 、 2.71 ± 0.54 、 2.48 ± 0.49 和 2.11 ± 0.42 。模型组较假手术组的 *NLRP3* mRNA 和蛋白相对表达水平均明显升高(均 $P < 0.001$);低、中、高剂量组较模型组的 *NLRP3* mRNA 和蛋白相对表达水平均不同程度降低,且呈现剂量效应(均 $P < 0.05$)。高剂量组中 *NLRP3* mRNA 和蛋白相对表达水平与模型组相比差异最明显,故选用高剂量的浓度进行后续实验,见图 1。

3 瑞马唑仑通过 NLRP3 影响 POCD 小鼠炎症水平

WB 结果显示:对照组和过表达组的 *NLRP3* 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.20 和 2.58 ± 0.51 ,过表达组较对照组的 *NLRP3* 蛋白相对表达水平明显升高($P < 0.001$),见图 2。qRT - PCR 结果显示:假手术组、模型组、高剂量组、对照组和过表达组的 *IL - 1 β* mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.17 、 2.72 ± 0.54 、 1.87 ± 0.37 、 1.91 ± 0.38 和 2.66 ± 0.53 , *IL - 10* mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.16 、

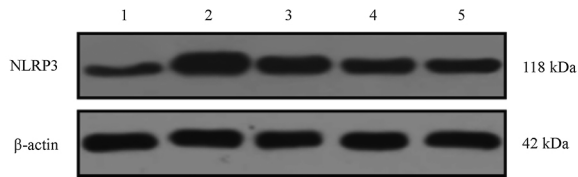


图1 用蛋白质印迹法检测各组小鼠脑组织 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3) 蛋白的表达水平

Figure 1 The expression level of NOD-like receptor heat protein domain associated protein 3 (NLRP3) in the brain tissues of mice in each group was detected by Western blotting

Group 1; Sham group; Group 2; Model group; Group 3; Experimental - L group; Group 4; Experimental - M group; Group 5; Experimental - H group

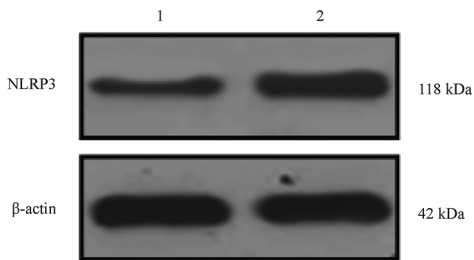


图2 用蛋白质印迹法检测各组小鼠脑组织中 NLRP3 蛋白的表达水平

Figure 2 The expression level of NOD-like receptor heat protein domain associated protein 3 (NLRP3) in the brain tissues of mice in each group was detected by Western blotting

Group 1; oe - NC group; Group 2; oe - NLRP3 group.

0.51 ± 0.10 、 0.78 ± 0.15 、 0.73 ± 0.15 和 0.56 ± 0.11 ， $TNF-\alpha$ mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.21 、 3.08 ± 0.61 、 1.77 ± 0.35 、 1.82 ± 0.36 和 2.65 ± 0.53 ，模型组较假手术组的 $IL-1\beta$ 和 $TNF-\alpha$ mRNA 相对表达水平均显著升高， $IL-10$ mRNA 相对表达水平显著降低 (均 $P < 0.001$)；高剂量组较模型组的 $IL-1\beta$ 和 $TNF-\alpha$ mRNA 相对表达水平均显著降低， $IL-10$ mRNA 相对表达水平显著升高 (均 $P < 0.001$)；对照

组较高剂量组的 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $IL-10$ mRNA 相对表达水平均无显著性差异 (均 $P > 0.05$)；过表达组较对照组的 $IL-1\beta$ 和 $TNF-\alpha$ mRNA 相对表达水平均显著升高， $IL-10$ mRNA 相对表达水平显著降低 (均 $P < 0.01$)。

4 瑞马唑仑通过 NLRP3 对 POCD 小鼠神经元的影响

Nissl 染色结果显示：假手术组中神经元细胞形态正常；模型组中神经元数量明显降低，且胞核明显固缩；高剂量组和对照组中神经元数量均明显升高；过表达组中神经元数量有降低趋势，且胞核固缩。结果见图 3。

5 瑞马唑仑通过 NLRP3 对 POCD 小鼠脑组织 ROS 水平的影响

DCFH-DA 染色结果显示：假手术组、模型组、高剂量组、对照组和过表达组的 ROS 荧光强度分别为 1.00 ± 0.16 、 7.22 ± 1.45 、 3.05 ± 0.61 、 3.13 ± 0.63 和 6.75 ± 1.31 ，模型组较假手术组的 ROS 荧光强度显著升高 ($P < 0.001$)；高剂量组较模型组的 ROS 荧光强度显著降低 ($P < 0.001$)；对照组较高剂量组的 ROS 荧光强度无显著性差异 ($P > 0.05$)；过表达组与对照组相比，ROS 荧光强度显著升高 ($P < 0.001$)。

6 瑞马唑仑通过 NLRP3 对 POCD 小鼠脑损伤的影响

免疫荧光结果显示：假手术组、模型组、高剂量组、对照组和过表达组的 GFAP 荧光强度分别为 1.00 ± 0.18 、 6.71 ± 1.13 、 3.38 ± 0.63 、 3.50 ± 0.72 和 5.94 ± 1.19 ，模型组较假手术组的 GFAP 荧光强度显著升高 ($P < 0.001$)；高剂量组较模型组的 GFAP 荧光强度显著降低 ($P < 0.001$)；对照组较高剂量组的 GFAP 荧光强度无显著性差异 ($P > 0.05$)；过表达组较对照组的 GFAP 荧光强度显著上升 ($P < 0.001$)。结果见图 4。

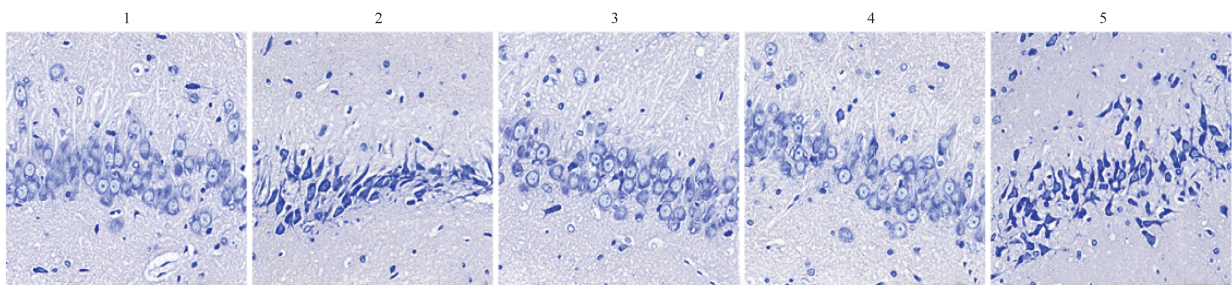


图3 用尼氏 (Nissl) 染色法检测各组小鼠脑组织海马区神经元损伤情况 ($\times 200$)

Figure 3 Nissl staining was used to detect the neuronal damage in the hippocampus of the brain tissue of mice in each group ($\times 200$)

1; Sham group; 2; Model group; 3; Experimental - H group; 4; oe - NC group; 5; oe - NLRP3 group.

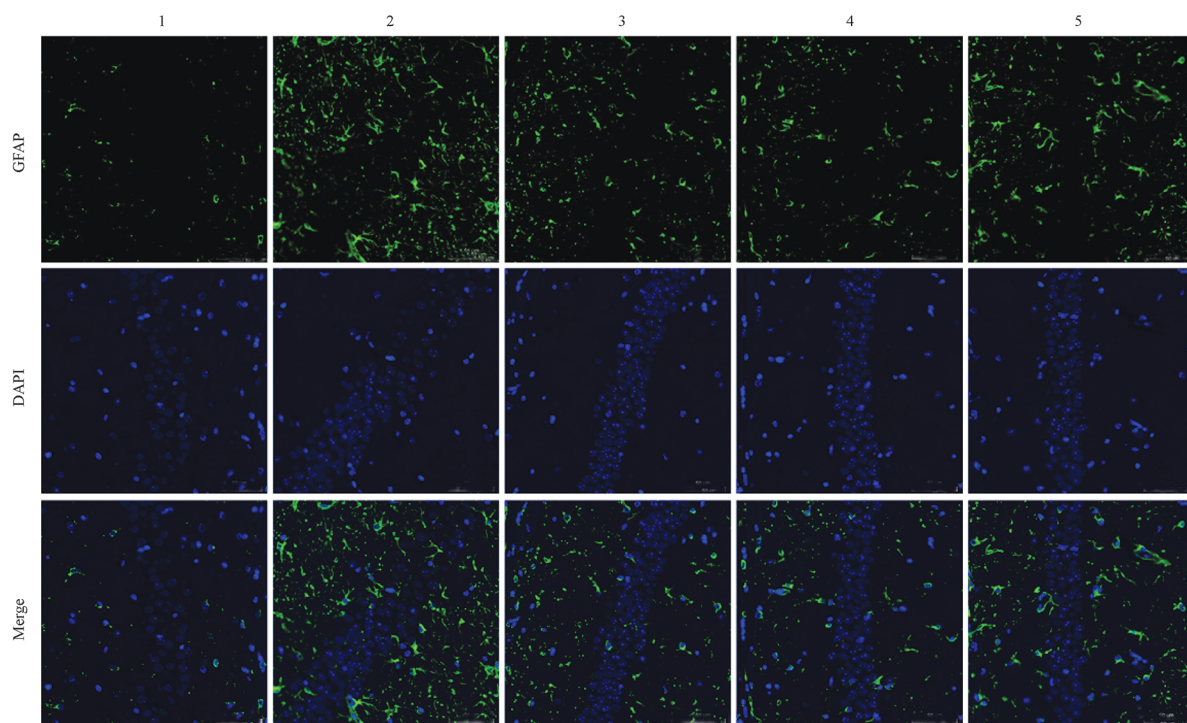


图4 用免疫荧光法检测各组小鼠组织中胶质纤维酸性蛋白(GFAP)荧光强度($\times 200$)

Figure 4 The fluorescence intensity of glial fibrillary acidic protein (GFAP) was detected by immunofluorescence method($\times 200$)

1 – 5 refer to figure 3.

讨 论

老年患者术后 POCD 的发病率达 25% ~ 40%, 手术创伤、麻醉蓄积等外源性刺激及机体自身生理功能衰退等均为危险因素, 因此, 探索更加安全有效麻醉药物的机制作用, 可能有利于降低老年患者麻醉及术后 POCD 的发生风险^[11]。瑞马唑仑可以通过增强中枢神经系统的 γ -氨基丁酸受体活性, 增加细胞膜对氯离子的通透性, 从而抑制神经冲动传递, 达到镇静效果, 同时不依赖于肝肾代谢, 可控性强, 对认知功能有保护作用^[12]。已有研究证实, 瑞马唑仑可以通过抑制脓毒症大鼠的内质网应激, 减轻神经损伤^[13], 并能够通过减轻脑应激反应来改善蛛网膜下腔出血大鼠的脑损伤^[14]。本研究发现, 构建 POCD 模型后的小鼠穿越平台次数明显降低, 错误次数明显增加, 提示以学习和记忆能力下降为主要表现的 POCD 小鼠模型构建成功, 而给予低、中、高剂量瑞马唑仑均可以逆转其变化, 且 NLRP3 相对表达水平均显著降低, 证实瑞马唑仑可剂量依赖性改善 POCD 小鼠的症状表现, 提高认知能力, 推测瑞马唑仑可以通过抑制 NLRP3 的表达来发挥保护神经元的作用, 其分子机制仍需进

一步研究。

手术创伤引发外周炎症反应, 炎症因子经迷走神经穿过血-脑屏障进入中枢神经系统, 激活星形胶质细胞及小胶质细胞, 产生神经毒素反应, 导致 POCD 的发生, 其中 IL-1 β 、IL-10 和 TNF- α 为常见的促炎细胞因子或趋化因子, 参与各种类型的炎症反应^[15]。本研究中, 高剂量瑞马唑仑可以显著抑制 POCD 小鼠脑组织中上述炎症细胞因子表达及 ROS 荧光强度, 而过表达 NLRP3 则起相反作用, 提示瑞马唑仑可以抑制 NLRP3 炎症小体通路的激活, 对此通路的调控可能是其缓解神经炎症及氧化应激损伤的潜在机制。海马结构是脑组织的重要边缘系统, 其病理损伤常表现为学习、认知功能的逐渐丧失及记忆障碍^[15]。黄菲等^[16]研究报道, 瑞马唑仑可以降低胶质纤维酸性蛋白 GFAP 的水平, 进而提高星形胶质细胞的活性, 从而保护神经细胞免受损伤。本研究亦发现, 给予瑞马唑仑可以抑制 GFAP 表达, 增加海马区神经元数量, 改善小鼠脑损伤, 证实其可以抑制 NLRP3 炎症系统的激活, 达到改善 POCD 的作用。

本研究提示: 瑞马唑仑可以改善小鼠的术后认知功能, 其机制可能与下调 NLRP3 表达、抑制神经炎症和氧化应激损伤有关。

参考文献:

- [1] 李思敏,张杰,宋晓雨,等. 石菖蒲-熟地黄对认知功能障碍模型大鼠的网络药理学作用机制及实验研究[J]. 世界中医药, 2024,19(3):299—307.
- [2] 黄钰媛,韦雪梅,郑育秀,等. 氯胺酮与七氟醚诱导老龄小鼠 POCD 的病理机制比较[J]. 西部医学, 2022,34(5):658—664.
- [3] 朱文俊,黄敏仪,袁芳君,等. 逍遥散抑制 NLRP3 炎症小体诱导神经炎症治疗抑郁症研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2024,30(10):1667—1671.
- [4] 蔡雯,邱高林,赵园园,等. 瑞马唑仑对脓毒症小鼠认知功能的保护作用及机制[J]. 安徽医科大学学报, 2023,58(10):1719—1723,1730.
- [5] 张斌森,张笑佳,秦晓宇,等. 电针预处理对小鼠麻醉/手术后认知功能障碍和铁死亡的影响[J]. 时珍国医国药, 2024,35(9):2279—2283.
- [6] 叶红霞,齐妍强,贺颖西,等. 肉苁蓉总苷与枸杞多糖配伍对不同月龄 C57BL/6J 小鼠促智作用的研究[J]. 中药材, 2023,46(1):217—221.
- [7] 赵慎非,余文婷,黄贞伟,等. 八宝丹对脑缺血再灌注损伤大鼠自噬以及 NLRP3 炎症小体活化的影响[J]. 药学研究, 2024,43(8):729—733.
- [8] 江嘉颖,王思怡,沈嘉月,等. 丹酚酸 B 调控 NLRP3/caspase-1/GSDMD 介导焦亡改善小鼠肾纤维化[J]. 广州中医药大学学报, 2024,41(10):2788—2794.
- [9] 张重阳,于森,刘文秀,等. 注射用丹参多酚酸对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2024,35(10):1562—1570.
- [10] 孟岩,王洪新,杨育红. 人参皂苷 Rg1 对小鼠慢性间歇性缺氧诱导脑损伤的减轻作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2024,50(5):1196—1204.
- [11] 赵力,杜秋. 星状神经节阻滞改善老年髋关节置换术后早期认知功能障碍的观察[J]. 宁夏医科大学学报, 2021,43(9):914—917.
- [12] 蓝金辛,李森,杨铎,等. 瑞马唑仑在围术期改善认知功能作用的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2024,40(5):773—777.
- [13] 李帆,乔辉. 瑞马唑仑对脓毒症神经损伤保护作用及机制分析[J]. 解剖学研究, 2024,46(3):221—227.
- [14] 何穆涵. 瑞马唑仑对蛛网膜下腔出血大鼠神经保护作用研究[D]. 黑龙江 佳木斯:佳木斯大学, 2022.
- [15] 胡德献,孙衍昶,冯基高,等. miR-145 通过 Notch 通路调节免疫功能及炎症反应介导创伤性脑损伤的神经保护[J]. 中国免疫学杂志, 2024,40(3):497—502.
- [16] 黄菲,陈婷婷,贺红侠,等. 右美托咪定、甲苯磺酸瑞马唑仑与丙泊酚对脑出血手术患者麻醉效果及血清神经损伤标志物和神经功能的影响[J]. 川北医学院学报, 2023,38(10):1342—1345,1374. (收稿日期 2024-10-29)

· 科学文摘 ·

Laromestrocel 异体间充质干细胞治疗轻度阿尔茨海默病的随机对照 2a 期试验

引自: RASH B G, *et al.* Allogeneic mesenchymal stem cell therapy with laromestrocel in mild Alzheimer's disease: A randomized controlled phase 2a trial [J]. *Nat Med*, 2025,31(4):1257—1266.

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 以认知功能持续衰退、严重脑萎缩及神经炎症为特征。本研究为一项随机、双盲、安慰剂对照的平行分组 2a 期临床试验,旨在评估骨髓来源异体间充质干细胞疗法 Laromestrocel 在延缓 AD 临床进展、脑萎缩及神经炎症方面的安全性与初步疗效。来自美国十家医疗中心的患者按 1:1:1:1 比例随机分至 4 个输注组,分别为安慰剂组 (每月输注 1 次, $n=12$)、低剂量单次组 (2 500 万细胞,后续 3 次为安慰剂, $n=13$)、低剂量多次组 (每月 2500 万细胞, $n=13$) 和高剂量多次组 (每月 1 亿细胞, $n=11$)。研究达成安全性主要终点,4 组在任意输注后 4 周内治疗相关严重不良事件的发生率相近,且无输注相关反应、过敏或淀粉样相关影像异常。第 39 周时, Laromestrocel 在 AD 复合评分、蒙特利尔认知评估及日常生活能力评分方面均优于安慰剂组。治疗组 (第 2~4 组) 总体脑体积下降减缓 48.4% ($P<0.01$), 左海马体积下降减缓 61.9% ($P<0.05$), 扩散张量成像显示神经炎症减轻。双侧海马萎缩程度与简易精神状态量表 (mini-mental state exam, MMSE) 评分变化呈显著相关 ($R=0.41$, $P<0.01$)。综上, Laromestrocel 单剂及多剂治疗轻度 AD 具有良好的安全性,并在减缓脑萎缩和认知功能衰退方面展现出潜在疗效,值得开展更大规模的后续临床研究。