

竹叶黄酮缓解异氟醚引起的老年大鼠认知功能障碍

刘 展^{1)*} 刘彦锋²⁾

(¹⁾河南省南阳市中心医院麻醉科一部, 南阳 473000; ²⁾河南省南阳市南阳医专一附院麻醉科, 南阳 473000)

摘要 研究竹叶黄酮对异氟醚吸入诱发老年大鼠神经细胞凋亡及认知功能障碍的影响。分离培养原代海马神经细胞, 暴露于体积分数为 2% 异氟醚 6 h 后, 分别给予 50、80 及 100 mg/L 竹叶黄酮处理, MTT 法检测细胞增殖能力, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况。大鼠经吸入 1.4% 体积的异氟醚 2 h 后, 分别于 1~5 d 连续腹腔注射 25、50、100 mg/kg 竹叶黄酮, 于第 6 天进行水迷宫实验检测大鼠空间学习记忆能力, ELISA 法检测海马组织匀浆中的 $A\beta_{1-42}$ 、TNF- α 、INF- γ 含量。结果发现, 竹叶黄酮可显著促进海马神经细胞的增殖, 并且抑制异氟醚所致的大鼠神经细胞凋亡。与异氟醚单独处理组相比较, 各浓度竹叶黄酮可显著降低大鼠逃避潜伏期并增加大鼠过台次数, ELISA 结果显示竹叶黄酮可显著抑制海马组织中 $A\beta_{1-42}$ 、TNF- α 及 INF- γ 的表达。表明竹叶黄酮可增强大鼠抗炎能力, 抑制海马组织中 $A\beta_{1-42}$ 的产生, 从而抑制异氟醚所致的老年大鼠神经损伤及认知功能障碍。

关键词 竹叶黄酮, 异氟醚, 细胞凋亡, 认知功能

学科分类号 R971.2

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0092

术后认知功能障碍 (postoperative cognitive dysfunction, POCD) 是临床手术后常见的中枢神经系统并发症, 具体表现为在手术麻醉结束后一段时间内, 患者出现记忆受损、精神错乱、内心焦虑以及短时间性格改变等症状, 在老年患者中较为常见^[1], 常会导致病死率增加、康复延迟, 重者会发展为阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD)^[2]。麻醉被认为是除年龄外对患者记忆力影响最大的风险因素^[3], 麻醉药物的细胞毒性以及对中枢神经系统的抑制作用, 可能是术后认知功能障碍的发病机制^[4-5]。如异氟醚可引起神经毒性, 并且通过促样淀粉蛋白 ($A\beta$) 聚集, 导致 POCD 的发生^[6]。异氟醚可通过诱导细胞损伤及海马体中免疫介质的过度表达最终导致大鼠认知功能障碍的发生^[7-10]。如 Fidalgo 等^[11]研究表明 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的过量释放会导致术后认知功能的产生, Li 等^[12]研究表明老年患者血清中的 IL-6 和 S-100 β 蛋白水平显著增加, 并且 IL-6 和 S-100 β 也可以作为 POCD 发生的预测参数。因此, 探明麻醉药物的细胞毒性机制以及减缓麻醉药物带来的细胞毒性及炎症反应, 保证

患者, 尤其是老年患者的麻醉安全, 是当下神经生物学及麻醉医学的研究热点。

淡竹叶是一味清热解毒药^[13-14], 其主要活性物质为竹叶黄酮 (bamboo leaf flavonoids, BLF), 具有抗脂质过氧化、清除羟自由基和调节血脂功能及抗过敏、抗炎、提高机体免疫能力、抗肿瘤、保护心血管等功能^[10-12]。有研究报道, 竹叶黄酮可能具有潜在的神经保护作用^[15], 但具体作用机制尚不清楚。因此, 本文旨在研究竹叶黄酮对异氟醚所致的大鼠神经细胞凋亡及认知功能障碍的影响。

1 材料及方法

1.1 动物

雄性 SD 大鼠, 20 月龄, 体重 (500 $\pm$ 50) g, 购于济南市金丰实验动物有限公司。

* 通讯联系人。

Tel: 0377-63200010, E-mail: huiqingguohu@163.com

收稿日期: 2016-03-22, 接受日期: 2016-05-31

1.2 试剂及其他

异氟醚购于美国 Baxter 公司; 竹叶黄酮购于宁波德康生物制品有限公司, 含量 $\geq 80\%$; 胰酶、DMEM 培养液、胎牛血清、DMSO、3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide(MTT)、兔抗小鼠 anti-NF-200 IgG、兔抗小鼠 anti-Neu-N IgG、TNF- α 和 INF- γ ELISA 试剂盒均购于 Sigma 公司; A β_{1-42} ELISA 试剂盒购于美国 R&D 公司; Ste-phan ARTEC-C 麻醉机购于德国 Drager 公司; Morris 恒温水迷宫购于北京众实迪创科技发展有限公司。

1.3 方法

动物分为离体实验组及在体实验组。a. 离体实验组先分离大鼠海马神经细胞, 然后用 2% 体积的异氟醚处理 6 h, 最后不同浓度竹叶黄酮进行处理, 分别为: 空白对照组(CK), 2% 异氟醚组(2% isoflurane), 2% 异氟醚 + 50 mg/L 竹叶黄酮(2% isoflurane + 50 mg/L BLF)组, 2% 异氟醚 + 80 mg/L 竹叶黄酮(2% isoflurane + 80 mg/L BLF)组, 2% 异氟醚 + 100 mg/L 竹叶黄酮(2% isoflurane + 100 mg/L BLF)组。每组实验均设置独立重复实验 3 次。b. 在体实验分组为(共 40 只大鼠, 每组 8 只): 空白对照组, 1.4% 异氟醚组, 竹叶黄酮(25、50、100 mg/kg)组。将异氟醚组和竹叶黄酮组动物置于麻醉诱导箱内吸入体积分数为 1.4% 的异氟醚与 O₂(2 L/min)的混合气体 2 h。于吸入异氟醚 1~7 d 连续腹腔注射 25、50、100 mg/kg 竹叶黄酮, 对照组则注射等量生理盐水溶液。不同浓度的竹叶黄酮均用生理盐水进行溶解。

1.4 海马神经细胞的分离及原代培养

将 SD 大鼠断头处死, 经 75% 酒精消毒后, 剪开皮肤, 分离颅骨, 暴露双侧大脑, 分离双侧大脑半球, 置于含 D-Hank's 液的培养皿中。分离皮层, 暴露出海马组织, 小心取出并放于含 D-Hank's 液中反复清洗 3 次, 去除脑膜和表面血管。分离血丝和脑膜, 即得海马组织。所得的海马组织用眼科剪剪成约 1 mm³ 的小块, 用 0.125% 的胰酶消化 25 min 后, 加入含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液终止消化。800 r/min 离心 10 min 后, 弃掉培养液, 用尖端已被火焰抛光的弯头吸管缓慢吹打至混匀, 静置 5 min, 所得的上液为海马神经细胞悬液。将细胞以 4×10^5 /ml 的浓度接种于 6 cm 培养皿中, 于 37℃ 5% CO₂ 的培养箱中进行培养。倒置显微镜下

观察海马神经细胞。

1.5 NeuN 免疫组化法鉴定海马神经细胞

取出培养至第 8 d 的细胞, PBS 清洗后, 加入 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min, 滴加过氧化物酶阻断液孵育 5 min, 再滴加正常山羊血清封闭液室温孵育 15 min, 吸掉多余液体, 加入鼠抗 NeuN 单克隆抗体, 4℃ 孵育过夜; PBS 清洗后, 加入生物素标记的羊抗鼠 IgG 抗体; 加入辣根酶标记的链酶卵白素, 孵育 10 min; PBS 清洗, 加入 DAB 显色液, 再经苏木素复染 10~15 s, 1% 盐酸酒精分化, 自来水冲洗, 酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。最后用 Image-Pro Plus6.0 图像分析系统进行图像分析。

1.6 MTT 法检测细胞增殖

将培养至第 7 d 的细胞接种于 96 孔板中, 然后将其放于透明聚乙烯塑料盒子中, 其一侧为进气口。再置于 37℃ 培养箱中。2% 体积的异氟醚由 Ste-phan ARTEC-C 麻醉机提供, 载气为空气 + 5% CO₂, 通过密闭管道经进气口通入装有孔板的盒子里, 处理 6 h。按照 1.3 步骤中所示各组进行竹叶黄酮处理, 分别于处理 24、48 及 72 h 后加入 20 μ l MTT 溶液(终浓度为 5 g/L), 继续培养 3 h 后, 弃掉上清培养液, 加入 200 μ l DMSO, 振荡混合后, 于酶标仪 490 nm 处检测吸光度值。

1.7 流式细胞仪检测细胞凋亡

将培养于 6 cm 培养皿中的细胞取出放于透明聚乙烯塑料盒子中, 其一侧为进气口, 再置于 37℃ 培养箱中。2% 体积的异氟醚由 Ste-phan ARTEC-C 麻醉机提供, 载气为空气 + 5% CO₂, 通过密闭管道经进气口通入装有孔板的盒子里, 处理 6 h 后, 按照 1.3 步骤所示的体外各组进行处理, 48 h 后, 先用 PBS 将细胞清洗 3 次, 加入 0.25% 胰酶轻轻吹打至悬浮状态。加入 100 μ l 缓冲液、5 μ l Annexin V-FITC 及 0.5 mg/L PI, 于 4℃ 避光放置 15 min。最后于流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.8 Morris 水迷宫实验

按照 1.3 中所述各组体内实验处理完大鼠后的第 7 d 进行水迷宫实验。训练前一天将大鼠放入无站台的池中自由游泳, 以适应环境和剔除漂浮且停留的大鼠。a. 定位航行实验测试: 将大鼠面向池壁放入水中, 从入水到找到隐蔽平台的时间记为潜伏期, 若没找到则将其引导至平台停留数秒并记潜伏期为 60 s, 总共持续 5 天, 每天分别从 4 个象限

将大鼠放入水中训练并记录时间, 取其平均潜伏期作为成绩. b. 空间探索实验: 第 6 天游泳训练需撤去平台, 记录大鼠在 60 s 内穿过平台位置的次数.

1.9 ELISA

水迷宫实验结束后, 将大鼠处死并分离海马组织. 严格按照相对应的 ELISA 试剂盒说明书检测 $A\beta_{1-42}$ 、TNF- α 、INF- γ 的含量.

1.10 统计学分析

采用 SPSS16.0 软件进行统计学分析, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$, 代表差异具有统计学意义.

2 结 果

2.1 原代海马神经细胞的鉴定

倒置显微镜下观察, 海马神经细胞生长状态良好, 胞体丰满(图 1a). NeuN 免疫组化法鉴定海马神经细胞, 细胞内有大量棕黄色阳性颗粒(图 1b), 说明海马神经细胞培养成功.

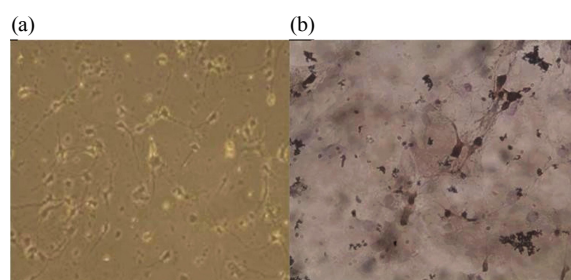


Fig. 1 The identification of hippocampal neurons

(a) The hippocampal neurons that cultured for 7 days were observed in inverted microscope ($\times 200$). (b) Hippocampal neurons was identified by NeuN immunohistochemistry ($\times 200$).

2.2 竹叶黄酮提高异氟醚作用下的海马神经细胞的生存能力

为了研究竹叶黄酮对异氟醚所致海马神经细胞增殖能力下降的影响, 将细胞先用 2% 异氟醚处理 6 h, 再经不同浓度竹叶黄酮处理后, 继续培养 24、48 以及 72 h 后, MTT 法检测了竹叶黄酮对海马神经细胞增殖的影响. 与空白组相比较, 海马神经细胞经 2% 异氟醚处理后, 其增殖能力显著下降. 与 2% 异氟醚组相比较, 不同浓度竹叶黄酮处理后, 细胞增殖能力显著上升, 尤其是 80 mg/L 竹叶黄酮作用 48 h 的效果最为显著, $P < 0.05$ (图 2).

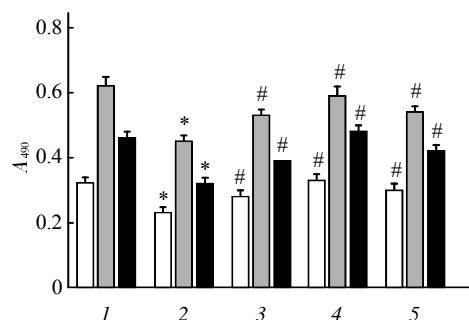


Fig. 2 The effect of bamboo leaf flavonoids(BLF) on the proliferation of hippocampal neurons that induced by isoflurane

After hippocampal neurons was treated with 1: CK; 2: 2% isoflurane; 3: 2% isoflurane+50 mg/L BLF; 4: 2% isoflurane+80 mg/L BLF; 5: 2% isoflurane+100 mg/L BLF for 24, 48 and 72 h, MTT method was used to measure the cell proliferation, respectively. * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs 2% isoflurane group. □: 24 h; ▒: 48 h; ■: 72 h;

2.3 竹叶黄酮抑制异氟醚引起的细胞凋亡

由 2.2 结果可知, 竹叶黄酮在作用 48 h 后其作用最为显著, 因此, 本步骤继续研究异氟醚及异氟醚和竹叶黄酮共同处理 48 h 后对海马神经细胞凋亡的影响. 与空白对照组相比较, 海马神经细胞经 2% 异氟醚处理后, 其凋亡率显著上升, 为 42.5%; 与异氟醚单独处理组相比较, 海马神经细胞经异氟醚和竹叶黄酮共同处理后, 其凋亡率显著下降, 且 80 mg/L 竹叶黄酮的凋亡率下降最为明显, $P < 0.05$ (图 3).

2.4 竹叶黄酮可改善异氟醚引起的空间学习记忆功能损害

为了进一步研究竹叶黄酮对神经的保护作用, 先将大鼠用 1.4% 异氟醚处理 2 h 后, 再连续腹腔注射 25、50、100 mg/kg 竹叶黄酮. 水迷宫实验结果显示, 与空白对照组相比较, 1.4% 异氟醚处理组大鼠在训练第 2~5 d 的平均逃避潜伏期显著上升, $P < 0.05$, 而与单独 1.4% 异氟醚处理组大鼠相比较, 竹叶黄酮和异氟醚共同处理组的大鼠平均逃避潜伏期显著下降, $P < 0.05$ (图 4a). 与空白对照组相比较, 异氟醚处理组大鼠过台次数显著下降; 而与异氟醚组相比较, 异氟醚与竹叶黄酮共同处理组大鼠的过台次数显著上升, $P < 0.05$ (图 4b).

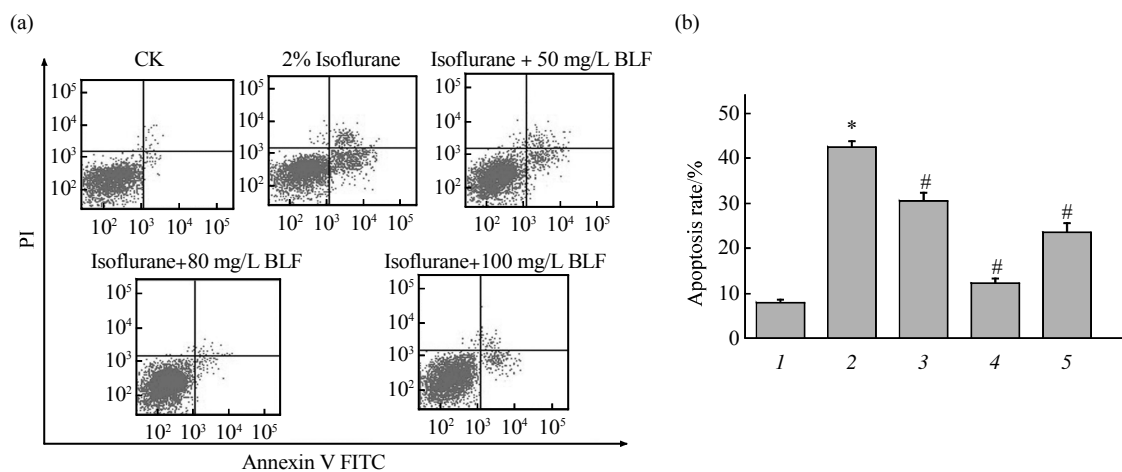


Fig. 3 Bamboo leaf flavonoids decreased the apoptosis of hippocampal neurons that induced by isoflurane

After hippocampal neurons was treated with 2% isoflurane, 2% isoflurane + 50 mg/L bamboo leaf flavonoids, 2% isoflurane + 80 mg/L bamboo leaf flavonoids, 2% isoflurane + 100 mg/L bamboo leaf flavonoids for 48 h, flow cytometry was used to measure the cell apoptosis respectively. * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs 2% isoflurane group. 1: CK; 2: 2% isoflurane; 3: 2% isoflurane+50 mg/L BLF; 4: 2% isoflurane+80 mg/L BLF; 5: 2% isoflurane+100 mg/L BLF.

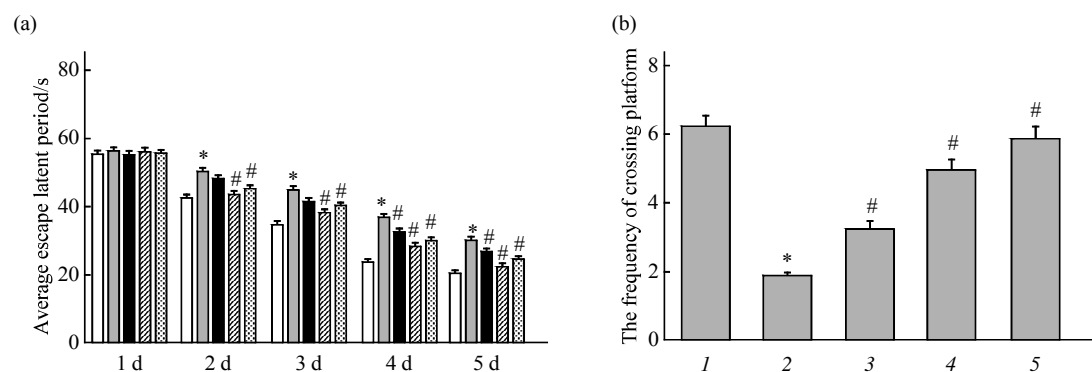


Fig. 4 Bamboo leaf flavonoids alleviates isoflurane-induced cognitive impairment in aged rats

After rats were inhaled with 1.4% isoflurane for 2 h, and injected intraperitoneally with 25, 50 and 100 mg/kg of bamboo leaf flavonoids for 5 consecutive days. The cognitive functions were examined by Morris water maze. (a) Average escape latent period. □: CK; ■: 1.4% isoflurane; ▨: Isoflurane+25 mg/kg BLF; ▩: Isoflurane+50 mg/kg BLF; ▪: Isoflurane+100 mg/kg BLF. (b) The frequency of crossing platform. * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs 1.4% isoflurane group. 1: CK; 2: 1.4% Isoflurane; 3: Isoflurane+25 mg/kg BLF; 4: Isoflurane+50 mg/kg BLF; 5: Isoflurane+100 mg/kg BLF.

2.5 竹叶黄酮抑制异氟醚引起的海马组织匀浆中 $A\beta_{1-42}$ 的产生

与空白对照组相比较, 异氟醚处理组大鼠海马组织匀浆中 $A\beta_{1-42}$ 含量显著上升; 与异氟醚组相比较, 竹叶黄酮和异氟醚共同处理组 $A\beta_{1-42}$ 含量显著

下降, $P < 0.05$ (图 5)。

2.6 竹叶黄酮可提高异氟醚处理后大鼠的抗炎能力

与空白对照组相比较, 1.4%异氟醚处理后, 海马组织中的 $TNF-\alpha$ 和 $INF-\gamma$ 含量显著上升; 与异氟醚组相比较, 竹叶黄酮和异氟醚共同处理组海

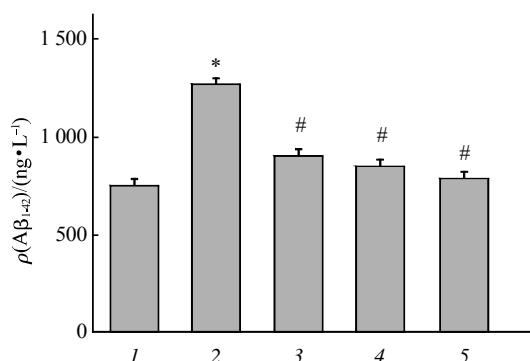


Fig. 5 Bamboo leaf flavonoids inhibited the production of Aβ that induced by 1.4% isoflurane

After Morris water maze conducted, the hippocampus were isolated for the determinations of Aβ₁₋₄₂ by ELISA. * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs 1.4% isoflurane group. 1: CK; 2: 1.4% Isoflurane; 3: Isoflurane+25 mg/kg BLF; 4: Isoflurane+50 mg/kg BLF; 5: Isoflurane+100 mg/kg BLF.

马组织中的 TNF-α 和 INF-γ 含量显著下降, $P < 0.05$ (图 6), 说明竹叶黄酮可抑制异氟醚所引起的 TNF-α 和 INF-γ 含量的增加。

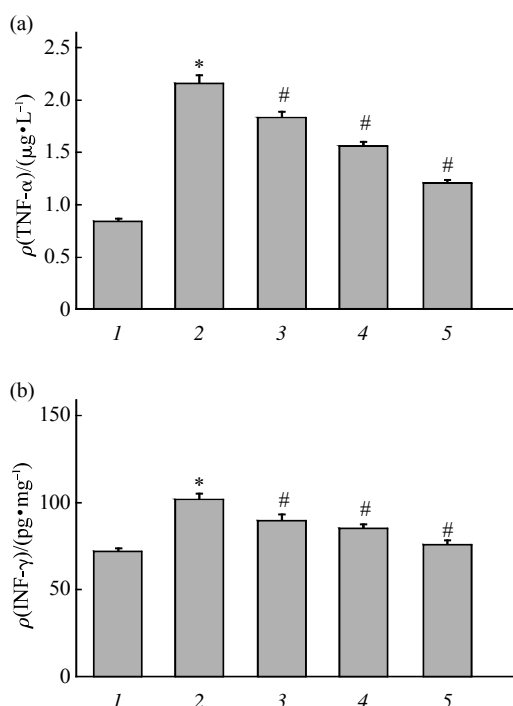


Fig. 6 Bamboo leaf flavonoids increased the anti-inflammatory ability of rats after inhaled with 1.4% isoflurane

After Morris water maze conducted, the hippocampus were isolated for the determinations of TNF-α and INF-γ by ELISA. (a) The concentration of TNF-α. (b) The concentration of INF-γ. * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs 1.4% isoflurane group. 1: CK; 2: 1.4% Isoflurane; 3: Isoflurane+25 mg/kg BLF; 4: Isoflurane+50 mg/kg BLF; 5: Isoflurane+100 mg/kg BLF.

3 讨 论

大量的动物实验证明, 大鼠暴露于吸入麻醉药物后, 神经细胞发生凋亡、神经出现广泛退行性变, 之后出现学习认知功能障碍。而越来越多的研究报道中药可以有效地提高认知功能。姜黄素可改善高浓度七氟醚所致的老年 SD 大鼠学习记忆力损害^[16]; 红景天苷可以改善阿尔茨海默病大鼠的认知功能障碍^[17]; 当归可减少 Aβ 诱导的大鼠记忆力损伤^[18]; 竹叶黄酮可通过抗自由基, 抑制炎症反应和减少细胞凋亡来保护大鼠心肌缺血、再灌注损伤^[19]。高扬等^[20]研究表明竹叶黄酮可抑制 UVB 导致的 HaCaT 细胞损伤并提高其细胞生成率; 高飞等^[15]研究表明竹叶黄酮通过上调 NGF 的表达刺激神经细胞突触的生长, 提示其可能具有潜在的神经保护作用。本文研究结果发现竹叶黄酮能显著抑制异氟醚所致的大鼠海马神经细胞的凋亡, 且水迷宫实验结果显示竹叶黄酮可显著降低大鼠逃避潜伏期及增加过台次数, 表明竹叶黄酮具有改善异氟醚所引起的海马神经细胞凋亡及认知功能损伤的作用。

Aβ 的生成、聚集和沉积是认知功能损害相关疾病的重要病理学基础。有研究表明 2% 异氟醚处理人胶质瘤细胞 6 h 后, 可显著促进 Aβ 的生成^[21]。也有研究表明黄酮类药物可通过抑制 Aβ 的生成改善认知功能障碍, 如川皮苷可显著抑制阿尔茨海默病模型小鼠大脑中 Aβ 的生成, 从而改善认知功能障碍^[22]。染料木黄酮可改善由 Aβ 诱导的突触功能障碍^[23]。银杏黄酮 EGb761 通过抑制大脑中 Aβ 的聚集缓解 AD 的发展^[24]。本文研究结果也显示 1.4% 异氟醚处理大鼠后, 海马匀浆中的 Aβ 含量显著增加, 但不同浓度竹叶黄酮处理后可显著抑制 Aβ 的生成, 表明竹叶黄酮改善异氟醚所致的认知功能障碍可能与抑制 Aβ 的生成有关。

研究报道认知功能障碍可能与中枢神经系统炎症反应有关, 如促炎因子的过度释放是异氟醚诱导老年大鼠认知损伤的一个重要机制。而 TNF-α 和 INF-γ 在炎症反应中发挥重要的作用, 它们可减少胰岛素降解酶的表达, 减弱小胶质细胞降解 Aβ 的能力^[25]。而竹叶黄酮具有提高免疫功能的作用, 如一定剂量的竹叶黄酮可通过促进小鼠脾脏细胞 INF-γ 的产生与分泌, 进一步激活 NK 细胞, 刺激 B 细胞分泌抗体, 从而增强小鼠的免疫调节能力^[26]。本文研究结果显示, 异氟醚处理后, 海马组织匀浆中的 TNF-α 和 INF-γ 的含量显著上升, 而竹叶黄

酮处理后则可显著降低二者的表达,提示竹叶黄酮可通过增强大鼠抗炎能力进而抑制异氟醚所致的神经毒性。

综上所述可知,竹叶黄酮可增强大鼠抗炎能力且抑制 A β 的产生,缓解异氟醚所致的神经毒性及认知功能障碍,为竹叶黄酮应用于神经保护方面提供了理论基础。

参 考 文 献

- [1] Shoaib O A, Grasso Li M P, Lahaye L A, *et al.* Incidence and risk factors for postoperative cognitive dysfunction in older adults undergoing major noncardiac surgery: a prospective study. *Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology*, 2015, **31**(1): 30–36
- [2] Arora S S, Gooch J L, García P S. Postoperative cognitive dysfunction, Alzheimer's disease, and anesthesia. *International Journal of Neuroscience*, 2014, **124**(4): 236–242
- [3] Lee J W, Kang H, Baek S M, *et al.* The relationship between postoperative cognitive dysfunction and the depth of sedation with propofol during spinal anesthesia in elderly patients. *Anesthesia and Pain Medicine*, 2015, **10**(3): 196–202
- [4] Qiao Y, Feng H, Zhao T, *et al.* Postoperative cognitive dysfunction after inhalational anesthesia in elderly patients undergoing major surgery: the influence of anesthetic technique, cerebral injury and systemic inflammation. *BMC Anesthesiology*, 2015, **15**(1): 1–7
- [5] Vlisides P, Xie Z. Anesthesia and Postoperative Cognitive Dysfunction. *J Anesth Perioper Med*, 2014, **1**(1): 60–62
- [6] Zhang B, Tian M, Zhen Y, *et al.* The effects of isoflurane and desflurane on cognitive function in humans. *Anesthesia and Analgesia*, 2012, **114**(2): 410–415
- [7] Yang C, Zhu B, Ding J, *et al.* Isoflurane anesthesia aggravates cognitive impairment in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Clin Exp Med*, 2014, **7**(4): 903–910
- [8] Hovens I B, Van Leeuwen B L, Nyakas C, *et al.* Postoperative cognitive dysfunction and microglial activation in associated brain regions in old rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 2015, **118**(1): 74–79
- [9] Barrientos R, Kitt M, Thompson V, *et al.* The interaction effects of surgery and morphine treatment on neuroinflammation and cognitive function in aged rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2015, **49**(5): e1–e50
- [10] Hovens I B, Schoemaker R G, Van Der Zee E A, *et al.* Postoperative cognitive dysfunction: involvement of neuroinflammation and neuronal functioning. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2014, **38**(5): 202–210
- [11] Fidalgo A R, Cibelli M, White J P, *et al.* Systemic inflammation enhances surgery-induced cognitive dysfunction in mice. *Neuroscience Letters*, 2011, **498**(1): 63–66
- [12] Li Y C, Xi C H, An Y F, *et al.* Perioperative inflammatory response and protein S-100 β concentrations-relationship with post-operative cognitive dysfunction in elderly patients. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 2012, **56**(5): 595–600
- [13] 史 洋, 刘 峰, 杨东花, 等. 淡竹叶药效物质基础研究进展. *中国现代中药*, 2014, **16**(7): 597–600
Shi Y, Liu F, Yang DH, *et al.* *Modern Chinese Medicine*, 2014, **16**(7): 597–600
- [14] 陈 焯. 淡竹叶化学成分与药理作用研究进展. *亚太传统医药*, 2014, **10**(13): 50–52
Chen Y. *Asia-Pacific Traditional Meicine*, 2014, **10**(13): 50–52
- [15] 高 飞, 周 瑜, 王向军, 等. 竹叶提取物抗肿瘤和神经保护作用研究. *中草药*, 2015, **46**(5): 710–715
Gao F, Zhou Y, Wang X J, *et al.* *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2015, **46**(5): 710–715
- [16] 左 蕾, 刘丹彦, 李琪英. 姜黄素对七氟醚吸入后老年大鼠认知功能的影响. *中国临床药理学与治疗学*, 2014, **19**(6): 638–643
Zuo L, Liu D Y, Li Q Y. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2014, **19**(6): 638–643
- [17] Gao J, He H, Jiang W, *et al.* Salidroside ameliorates cognitive impairment in a d-galactose-induced rat model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, 2015, **293**(20): 27–33
- [18] Duan M H, Wang L N, Jiang Y H, *et al.* Angelica sinensis reduced A β -induced memory impairment in rats. *Journal of Drug Targeting*, 2015: 1–8
- [19] 邵 莹, 吴启南, 周 婧, 等. 淡竹叶黄酮对大鼠心肌缺血 / 再灌注损伤的保护作用. *中国药理学通报*, 2013, **29**(2): 241–247
Shao Y, Wu Q N, Zhou J, *et al.* *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2013, **29**(2): 241–247
- [20] 高 扬, 易若琨, 宋家乐. 竹叶总黄酮对 UVB 诱导 HaCaT 细胞氧化损伤的保护作用. *南京中医药大学学报*, 2015, **31**(2): 165–169
Gao Y, Yi R K, Song J L. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*, 2015, **31**(2): 165–169
- [21] Xie Z, Dong Y, Maeda U, *et al.* The common inhalation anesthetic isoflurane induces apoptosis and increases amyloid β protein levels. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 2006, **104**(5): 988–994
- [22] Nakajima A, Aoyama Y, Shin E J, *et al.* Nobiletin, a citrus flavonoid, improves cognitive impairment and reduces soluble A β levels in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease (3XTg-AD). *Behavioural Brain Research*, 2015, **289**(16): 69–77
- [23] Xi Y D, Zhang D D, Ding J, *et al.* Genistein inhibits A β 25–35-induced synaptic toxicity and regulates CaMKII/CREB pathway in SH-SY5Y cells. *Cellular & Molecular Neurobiology*, 2015: 1–9
- [24] Liu X, Hao W, Qin Y, *et al.* Long-term treatment with Ginkgo biloba extract EGB 761 improves symptoms and pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2015, **46**(1): 121–131
- [25] Rojo L E, Fernández J A, Maccioni A A, *et al.* Neuroinflammation: implications for the pathogenesis and molecular diagnosis of Alzheimer's disease. *Archives of Medical Research*, 2008, **39**(1): 1–16
- [26] 唐浩国, 魏晓霞, 李 叶, 等. 竹叶黄酮对小鼠脾细胞免疫的分子机制研究. *食品科学*, 2007, **28**(9): 523–526
Tang H G, Wei X X, Li Y, *et al.* *Food Science*, 2007, **28**(9): 523–526

Bamboo Leaf Flavonoids Alleviates Isoflurane-induced Cognitive Impairment in Aged Rats

LIU Zhan^{1)*}, LIU Yan-Feng²⁾

¹⁾ Department of Anesthesia, Nanyang City Center Hospital, Nanyang 473000, China;

²⁾ Department of Anesthesia, The First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Nanyang 473000, China)

Abstract To examine the effect of bamboo leaf flavonoids on isoflurane-induced neuronal apoptosis and cognitive impairment in aged rats. The primary hippocampal neurons were isolated and cultured. After hippocampal neurons were treated with 2% isoflurane for 6 h, and treated with 50, 80 and 100 mg/L of bamboo leaf flavonoids, the cell proliferation was measured by MTT method and cell apoptosis was measured by flow cytometry. The rats were inhaled with 1.4% isoflurane for 2 h, and injected intraperitoneally with 25, 50 and 100 mg/kg of bamboo leaf flavonoids for 5 consecutive days. The cognitive functions were examined by Morris water maze. The hippocampus were isolated for the determinations of $A\beta_{1-42}$, $TNF-\alpha$ and $INF-\gamma$ by ELISA. Results showed that bamboo leaf flavonoids significantly increased the proliferation of hippocampal neurons and suppressed hippocampal neurons apoptosis compared with isoflurane treatment only. The result of Morris water maze showed that bamboo leaf flavonoids significantly decreased average escape latent period and increased the frequency of crossing platform. The results of ELISA showed that bamboo leaf flavonoids suppressed the expression of $A\beta_{1-42}$, $TNF-\alpha$ and $INF-\gamma$ in hippocampus. Our findings suggested that bamboo leaf flavonoids enhanced immunity of aged rats and suppressed the expression of $A\beta_{1-42}$, leading to the inhibition of isoflurane-induced neuronal apoptosis and cognitive impairment.

Key words bamboo leaf flavonoids, isoflurane, cell apoptosis, cognitive impairment

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0092

*Corresponding author.

Tel: 86-377-63200010, E-mail: huiqingguohn@163.com

Received: March 22, 2016 Accepted: May 31, 2016