

白芍总苷对 TNF- α 诱导 Caco-2 炎性细胞模型的作用机制

朱占荣 官 杰 吴艳敏 王 琪 罗晓庆 张 贺 王 慧

摘 要 **目的** 研究白芍总苷(total glucosides of paeony, TGP)对肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)诱导的人结肠上皮 Caco-2 炎性细胞自噬和凋亡水平的影响,并探究其保护机制。**方法** 将对数生长期的 Caco-2 细胞分为对照组、模型组和给药组。其中对照组细胞常规培养,模型组和给药组细胞 TNF- α 100ng/ml 刺激 48h 建立炎性细胞模型;给药组细胞使用不同浓度 TGP 培养,对照组和模型组细胞使用等量完全培养基培养;用噻唑蓝(MTT)法检测细胞增殖情况;利用酶联免疫吸附试验检测各组中白介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)和白介素 6(interleukin 6, IL-6)蛋白质水平表达变化;采用 Western blot 法检测程序性死亡受体 1(Beclin-1)、微管相关蛋白轻链 3B(LC3B)、Bcl-2 蛋白的表达。**结果** TGP 对 Caco-2 炎性细胞模型的增殖具有抑制作用,与正常组比较, TNF- α 诱导的 Caco-2 炎性细胞中 IL-1 β 、IL-6 的表达明显增高($P < 0.05$);与模型组比较, TGP 能够下调 IL-1 β 、IL-6 的表达水平, Beclin-1、LC3B 的表达水平降低, Bcl-2 表达水平升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** TGP 能够下调 IL-1 β 、IL-6 的表达水平,抑制 Beclin-1、LC3B 蛋白表达水平,上调抗凋亡基因 Bcl-2 表达, TGP 对 TNF- α 诱导 Caco-2 炎性细胞模型的治疗作用与抑制炎症及调节肠上皮细胞自噬有关。

关键词 白芍总苷 炎症性肠病 肿瘤坏死因子 α 细胞自噬

中图分类号 R285.5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2022.12.013

Effect of Total Glucosides of Paeony on TNF- α Mechanism of Inducing Caco-2 Inflammatory Cell Model. ZHU Zhanrong, GUAN Jie, WU Yanmin, et al. Department of Immunology, Qiqihar Medical University, Heilongjiang 161006, China

Abstract **Objective** To investigate the effect of total glucosides of paeony (TGP) on the autophagy and apoptosis levels of TNF- α induced human colonic epithelial Caco-2 inflammatory cells, and to explore its protective mechanism. **Methods** The Caco-2 cells in logarithmic growth phase were divided into control group, model group and administration group. Among them, the cells in the control group were routinely cultured, and the cells in the model group and the treatment group were cultured with TNF- α 100ng/ml to establish an inflammatory cell model; the cells in the treatment group were cultured with total glucosides of different concentrations of paeony, and the cells in the control group and the model group were cultured with the same amount of complete culture. The cell proliferation was detected by thiazolyl blue (MTT) method; the protein levels of interleukin 1 β (IL-1 β) and interleukin 6 (IL-6) in each group were detected by enzyme-linked immunosorbent assay; Western blot was used to detect the expression of Beclin-1, LC3B and Bcl-2 proteins. **Results** The expression level of autophagy in Caco-2 inflammatory cells was increased. Compared with the model group, total glucosides of paeony could down-regulate the expression levels of IL-1 β and IL-6, inhibit the protein expression levels of Beclin-1 and LC3B, and up-regulate the anti-apoptotic expression levels. The expression of apoptotic gene Bcl-2 was significantly different ($P < 0.05$). **Conclusion** TGP can down regulate IL-1 β , The expression level of IL-6 inhibits the expression level of beclin-1 and LC3B protein and up regulates the expression of anti apoptotic gene Bcl-2. This regulation depends on autophagy of intestinal epithelial cells.

Key words Total glucosides of paeony; Inflammatory bowel disease; Tumor necrosis factor- α ; Autophagy

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种累及直肠、回肠、结肠的由免疫系统介导的慢性复发性肠道炎症性疾病,包括克罗恩病(Crohn's dis-

ease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)^[1]。本病特征为黏膜组织损伤和肠道炎症,患者常出现体重减轻、腹痛、腹泻、便血^[2]。流行病学研究发现,近年来 IBD 发生率逐年上升,且呈现年轻化趋势^[3]。其发病机制尚未明确,大多与遗传、免疫、感染、肠道微生物等多种因素密切相关^[4]。本病病程长,易复发,给患者身心带来较大痛苦。目前西药治疗以糖皮质激素类、氨基水杨酸、免疫抑制剂类为主,其药物

基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(2017-KYYWF-0733)

作者单位:161006 齐齐哈尔医学院医学技术学院

通信作者:王慧,副教授,硕士生导师,电子信箱:huitsz8292@sina.

com

疗效不佳、不良反应较大、价格昂贵,而中医药在临床应用中发挥多途径、多靶点的药用特性,凸显其独特优势^[5]。研究发现,白芍总苷(total glucosides of paeony, TGP)可通过下调肠黏膜急性损伤患者的炎症细胞因子表达,参与细胞信号转导通路的调节,调节机体免疫功能^[6]。然而, TGP 在 IBD 中的作用机制尚不清楚。因此本研究采用 TNF- α 诱导 Caco-2 细胞制备炎性细胞模型,探究 TGP 对其保护机制,以期研究中药治疗 IBD 提供新思路,同时为 TGP 的药用价值提供理论依据。

材料与方法

1. 实验材料与试剂:人结肠细胞 Caco-2 由中国科学院细胞库(上海)提供;白芍总苷(H20055058)购自浙江宁波立华制药有限公司;TNF- α (300-01A)购自美国 Pepro Tech 公司;MEM 培养基(RNBJ5754)购自美国 Sigma 公司;胎牛血清(11011-8611)购自浙江天杭生物科技有限公司;青霉素-链霉素(SC118-01)、脱脂奶粉(SW128-02)、二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒(SW101-02)、胰蛋白酶(SC109-01)、ECL 超敏化学发光试剂盒(SW134-01)均购自赛文生物科技有限公司;MTT(2016106)购自合肥白鲨生物科技有限公司; β -actin (abs839931ss)、 β -actin 辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) (ABS20039ss)、辣根酶标记鼠抗兔 IgG (H+L) (ABS20040) 均购自上海爱必信生物科技有限公司;IL-6 ELISA 检测试剂盒(JL20896)、IL-1 β ELISA 检测试剂盒(JL18442)均购自江莱生物公司;程序性死亡受体 1(Beclin-1, D40C5)、微管相关蛋白轻链 3B(LC3B, #3868)、Bcl-2 (#4223) 抗体购自美国 CST 公司。

2. 细胞培养:Caco-2 细胞接种于含 20% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素双抗溶液的 MEM 培养基,置于 37℃、5% CO₂、100% 湿度培养箱中培养,细胞平均每两天换液 1 次。待细胞生长密度达到 70%~80% 时,用 1ml 胰酶消化 4min,用培养基终止消化,吹下细胞,收集。一般 3~5 天即可传代 1 次,细胞代数控制在 15~20 代之间。

3. MTT 法检测 TGP 对 TNF- α 诱导 Caco-2 炎性细胞模型增殖的抑制:取对数生长期的 Caco-2 细胞分别以 10000 个/孔接种于 96 板,每孔接种体积 100 μ l。设对照组、模型组和给药组,对照组给予常规培养液处理,模型组使用 100ng/ml TNF- α 损伤 Caco-2 细胞 48h 后,给药组依次加入不同浓度(25、

50、100、200、400 μ mol/ml)的白芍总苷培养。每组设 3 个复孔,外周一圈孔加 PBS 200 μ l。分 12h、24h、48h 3 个时间点收集 96 孔板进行 MTT 法检测细胞活力。操作过程为在每孔吸掉上清液 100 μ l 后加入 20 μ l 0.5% 的 MTT 溶液,继续培养 4h;吸去孔内培养液,每孔加入 150 μ l 二甲亚砜(DMSO),于微孔板振荡器上振荡 5~10min,待紫色结晶物甲瓚充分溶解,测定 490nm 波长处的吸光度(A)值,细胞活力抑制率(%)=(1-实验组 A 值/对照组 A 值) $\times$ 100%;计算白芍总苷对 Caco-2 细胞增殖的半数抑制浓度(IC₅₀),实验重复 3 次。

4. ELISA 法检测各组 IL-1 β 、IL-6 水平:按上述步骤种板,按步骤 3 种板与分组,其中 C 组加入 100 μ l 1% 青霉素-链霉素双抗溶液的 MEM 培养基培养,M 组和给药组用 100ng/ml TNF- α 损伤细胞 48h 后,给药组依次加入白芍总苷低、中、高剂量组(50、100、200 μ mol/ml)培养 48h 后,取上清入灭菌过的 EP 管中,然后将上清液 100 微升/孔,用 ELISA 试剂盒操作说明书步骤,每个样品设复孔,测量各组上清液中 IL-1 β 、IL-6 的蛋白分泌水平,实验重复 3 次。

5. Western blot 法检测各组中 Beclin-1、LC3B、Bcl-2 蛋白的表达:按步骤 3 种板与分组,收集各组细胞,提取总蛋白后,再用 BCA 定量试剂盒进行总蛋白定量。通过 10% SDS-PAGE 凝胶分离相同量(20 μ g)蛋白质,样品 20 μ l 上样,加入缓冲液电泳,然后转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。封闭后,将膜与一抗(抗 Beclin-1:1:1000 稀释、抗 LC3B:1:1000 稀释、抗 Bcl-2:1:4000 稀释、抗 β -actin:1:1000 稀释)抗体结合 4℃ 孵育过夜。TBST 洗涤膜后,加入过氧化物酶标记的二抗(1:20000 稀释),加 ECL 显色,使用 BIO-RAD 成像系统扫描和 Image J 图像分析系统分析条带。

6. 统计学方法:应用 GraphPad Prism7.0 统计学软件对数据进行统计分析,采用 *t* 检验或单因素方差分析进行两组或多组间比较分析。所有结果均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 不同浓度的 TGP 对 TNF- α 诱导 Caco-2 炎性细胞模型增殖的影响:MTT 结果显示,与给药组比较,模型组细胞活力抑制率高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。TGP 浓度为 25 μ mol/ml 和 400 μ mol/ml

时,与模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);当浓度 50 ~ 200 $\mu\text{mol/ml}$ 时,随着浓度的增加细胞呈依赖性降低,可知,TGP 浓度为 50 ~ 200 $\mu\text{mol/ml}$ 对受损的 Caco-2 细胞均有修复作用,其中以 200 $\mu\text{mol/ml}$ 作用最显著($P < 0.05$),测得 IC_{50} 为 51.17 $\mu\text{mol/ml}$;且 TNF- α 损伤 Caco-2 细胞作用 48h 的细胞活力抑制率约为 25%,故选用作用 48h 细胞作为造模条件,选取 TGP 50、100、200 $\mu\text{mol/ml}$ 作为样品处理浓度进行后续研究(图 1)。

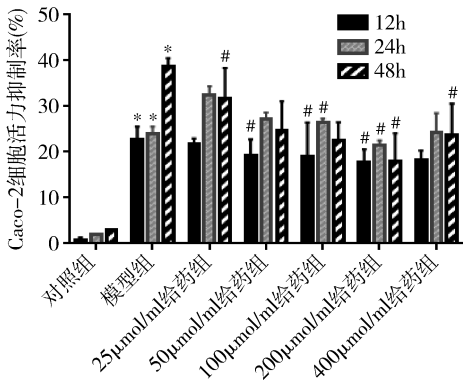


图 1 不同浓度 TGP 对 TNF- α 诱导 Caco-2 炎症细胞增殖的影响 ($n = 3$)

与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,* $P < 0.05$

2. ELISA 法检测各组 IL-1 β 、IL-6 水平:相对于对照组,模型组中 IL-6、IL-1 β 分泌水平均明显升高;与模型组比较,不同浓度的 TGP (50、100、200 $\mu\text{mol/ml}$) 剂量呈依赖性地抑制 IL-6、IL-1 β 的分泌水平,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。

表 1 各组细胞上清液中 IL-6 和 IL-1 β 含量比较 ($\mu\text{g/ml}$)

组别	IL-6	IL-1 β
对照组	49.950 $\pm$ 0.515	73.660 $\pm$ 3.201
模型组	222.600 $\pm$ 1.974 *	347.010 $\pm$ 6.223 *
50 $\mu\text{mol/ml}$ 给药组	138.100 $\pm$ 1.489 #	244.600 $\pm$ 6.510 #
100 $\mu\text{mol/ml}$ 给药组	90.450 $\pm$ 0.773 #	181.800 $\pm$ 4.072 #
200 $\mu\text{mol/ml}$ 给药组	54.130 $\pm$ 2.409 #	79.270 $\pm$ 2.011 #

与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,* $P < 0.05$

3. Western blot 法检测各组中 Beclin-1、LC3B、Bcl-2 蛋白的表达:与对照组比较,模型组中 Beclin-1、LC3B 程度明显升高($P < 0.05$),与模型组比较,TGP 低剂量组 (50 $\mu\text{mol/ml}$)、TGP 中剂量组 (100 $\mu\text{mol/ml}$)、TGP 高剂量组 (200 $\mu\text{mol/ml}$) 分别呈剂量依赖性地抑制 Beclin-1、LC3B 的蛋白的表达(图 2)。TGP 低、中、高组可以显著升高 Bcl-2 蛋白的表达(图 2)。且 TGP 高剂量组抑制效果最佳的作用优于中、低剂量组,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 2、图 3)。

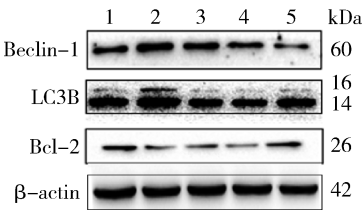


图 2 Western blot 法检测各组中 Beclin-1、LC3B、Bcl-2 蛋白的表达

1. 对照组;2. 模型组;3. TGP 低剂量组 (50 $\mu\text{mol/ml}$);4. TGP 中剂量组 (100 $\mu\text{mol/ml}$);5. TGP 高剂量组 (200 $\mu\text{mol/ml}$)

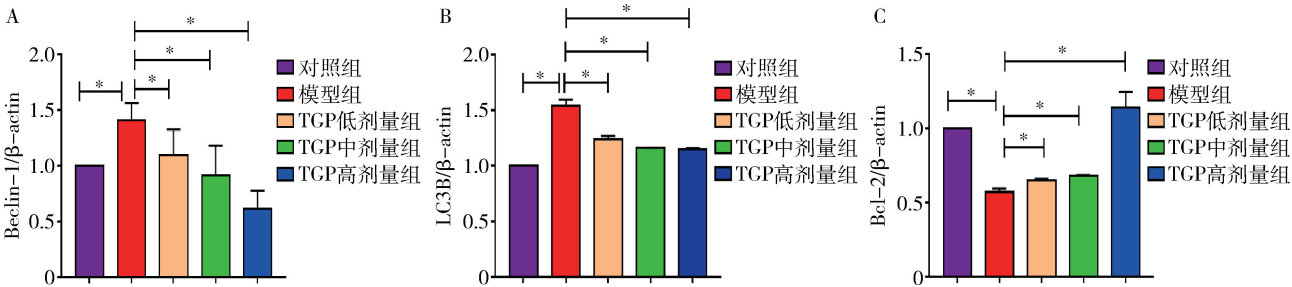


图 3 Western blot 法检测各组蛋白表达柱状图

A. Beclin-1;B. LC3B;C. Bcl-2。* $P < 0.05$

讨 论

鉴于 IBD 发病机制不明确,西医治疗多以调节肠道菌群、抗炎、免疫治疗为主,难以根治。中医学根据 IBD 临床表现常见腹痛、腹泻、黏液脓血便或里急后重等特点,将其归于“肠风”“脏毒”“休息痢”等范

畴^[7]。《景岳全书》中论述:“湿盛则濡泻,久泄皆属于湿”,其认为病机为湿聚成浊,浊瘀成毒,升降失司,致肠炎久治不愈^[8]。治以疏肝补脾、健脾化湿、化瘀通络^[9]。《神农本草经》言白芍:“主邪气腹痛,除血痹,破坚积,寒热疲,镇痛,利小便,益气”。归

肝、脾经,以养血敛阴,滋肝阴,缓急和中^[10]。TGP 是提取中药白芍的具有多途径抑制身体免疫反应的有效部位,现代药理学研究表明,其主要含有芍药苷、羟基芍药苷、芍药花苷等多种单萜苷类化合物^[11]。其有明显的抗炎、镇痛、免疫调节的作用^[12]。另有研究发现,TGP 在类风湿关节炎、系统性红斑狼疮等疾病模型中,TGP 通过下调 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等炎性细胞因子的活性表达和细胞外调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK) 通路,削减炎性细胞因子与免疫细胞相互作用,发挥抗炎作用,且有研究证实,使用 TGP 150 μ mol/L 可减轻肠道炎症,防止肠道屏障受损^[13, 14]。

本研究发现,TGP 能降低 Caco-2 炎性细胞模型上清液中 IL-1 β 、IL-6 的含量表达水平。炎症的恶性循环是 IBD 肠黏膜损伤的重要基础,炎症的激活可触发自噬体的形成,TNF- α 主要由巨噬细胞分泌,可促进炎性反应的发生^[15]。当机体出现炎性反应时,诱导机体的巨噬细胞分泌过多的 IL-6,而 IL-6 会促进 IL-1 β 的生成,IL-1 β 是一种单核-吞噬细胞分泌的多肽调节因子,启动机体免疫防御机制,在调节肠道炎症免疫反应中起着关键作用^[16]。本研究中使用 TNF- α 损伤 Caco-2 细胞 48h 后,细胞上清液中 IL-1 β 、IL-6 含量增加,说明诱导成为炎症肠道损伤细胞模型。TGP 给药治疗后,与模型组比较,IL-1 β 、IL-6 显著下调($P < 0.05$)。

自噬失调在 IBD 的发病机制中有重要影响。生理状态下,自噬对肠上皮细胞发挥保护作用是通过清除机体有害物质(老化及死亡的蛋白质和细胞器)而维持机体内稳态的途径来实现^[17]。当自噬异常和持续性炎症会促进 IBD 的发生、发展,例如可以通过调控 mTOR/Beclin-1 信号通路,防止过度活化的自噬激活炎症小体,破坏肠上皮细胞屏障^[18]。然而,炎症的加剧可使肠上皮细胞内自噬过度活化,诱发 IBD^[19]。有研究发现,通过抑制炎症体激活,调节自噬体且诱发细胞凋亡^[20]。可知,自噬可抑制炎症相关信号转导,而炎症能够激活自噬相关蛋白,进一步诱导细胞凋亡发生^[21, 22]。Beclin-1 和 LC3B 是自噬途径的重要基因,Beclin-1 被视为观察自噬起始标志物,是启动自噬的必要条件^[23]。LC3B 作为细胞自噬的标志蛋白,其含量与自噬小体数量呈正相关^[24]。Bcl-2 不仅作为一个抗凋亡蛋白,同时,也被认为是一种抗自噬蛋白,Bcl-2 通过结合 Beclin-1 发挥抑制自噬的作用,若破坏两者复合物则导致自噬

过度表达,促进细胞凋亡,引起细胞程序性死亡^[25, 26]。本研究结果显示,模型组 IL-1 β 、IL-6 含量增加的同时,Bcl-2 的表达降低,结合 Beclin-1 的表达,可见 Bcl-2 过表达抑制了 Beclin-1,阻断了自噬体的形成,导致自噬缺陷。TGP 则通过抑制 IL-1 β 、IL-6 分泌,上调抗凋亡基因 Bcl-2 表达,下调自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3B 的表达,发挥对自噬的抑制作用,维持机体内环境的稳定。

综上所述,通过体外实验初步验证了 TGP 治疗 TNF- α 诱导 Caco-2 炎性细胞模型的作用与抑制炎症及调节肠上皮细胞自噬有关。但由于本研究是初步结果,TGP 是否可以调控自噬相关通路,有待于进一步探究。这也为后续的研究工作指出了方向。

参考文献

- 1 Viola A, Fiorino G, Costantino G, *et al.* Epidemiology and clinical course of late onset inflammatory bowel disease [J]. *Minerva Gastroenterol*; Torino, 2021, 31(17): 339-345
- 2 Ng SC, Shi HY, Hamidi N, *et al.* Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies [J]. *Lancet*, 2017, 390(10114): 2769-2778
- 3 Senger PC, Zacharias P, Quaresma AB, *et al.* Inflammatory bowel disease epidemiology data from a prospective registry in Córdoba, Argentina: raising the bar for future studies in Latin America [J]. *Dig Liver Dis*, 2021, 53(9): 1212-1213
- 4 Mentella MC, Scaldaferri F, Pizzoferrato M, *et al.* Nutrition, IBD and gut microbiota: a review [J]. *Nutrients*, 2020, 12(4): 944
- 5 Feerrara G, Petrillo MG, Giani T, *et al.* Clinical use and molecular action of corticosteroids in the pediatric age [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(2): 444
- 6 汪娟, 王芳. 白芍总苷治疗自身免疫性疾病的研究进展 [J]. *医学综述*, 2021, 27(22): 4481-4485
- 7 甄建华, 黄光瑞. 溃疡性结肠炎中医病名、病因、病机的古今比较和回顾 [J]. *环球中医药*, 2019, 12(8): 1286-1289
- 8 张景岳. 景岳全书 [M]. 李继明, 编. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 881
- 9 林锦荣. 炎症性肠病中医证型与实验室指标相关性的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2018
- 10 祝之友. 神农本草经药物解读——从形味性效到临床 [J]. *中国中医药现代远程教育*, 2020, 18(13): 67-75
- 11 张腾腾, 居正, 姬雨思, 等. 白芍化学成分及分析方法研究进展 [J]. *广州化工*, 2020, 48(18): 20-21
- 12 Zhang L, Wei W. Anti-inflammatory and immunoregulatory effects of paeoniflorin and total glucosides of paeony [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 207: 107452
- 13 Jiang H, Li J, Wang L, *et al.* Total glucosides of paeony: a review of its phytochemistry, role in autoimmune diseases, and mechanisms of action [J]. *Ethnopharmacol*, 2020, 258: 112913
- 14 Wu XX, Huang XL, Chen RR, *et al.* Paeoniflorin prevents intestinal barrier disruption and inhibits lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in Caco-2 cell monolayers [J]. *Inflammation*, 2019, 42

(6): 2215 – 2225

- 15 Zhang L, Yu J, Wang C, *et al.* The effects of total glucosides of paeony (TGP) and paeoniflorin (Pae) on inflammatory – immune responses in rheumatoid arthritis (RA) [J]. *Funct Plant Biol*, 2019, 46(2): 107 – 117
- 16 Liu B, Meng X, Ma Y, *et al.* Clinical safety of total glucosides of paeony adjuvant therapy for rheumatoid arthritis treatment: a systematic review and Meta – analysis [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2021, 21(1): 102
- 17 Ravanani P, Srikumar IF, Talwar P. Autophagy: the spotlight for cellular stress responses [J]. *Life Sci*, 2017, 188: 53 – 67
- 18 Yang L, Liu C, Zhao W, *et al.* Impaired autophagy in intestinal epithelial cells alters gut microbiota and host immune responses [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2018, 84(18): 18
- 19 洪寅雯, 文科, 吴本升, 等. 基于 mTOR/Beclin1 通路探讨血竭散对克罗恩病大鼠结肠组织自噬和炎症小体的影响 [J]. *安徽中医药大学学报*, 2022, 41(1): 65 – 72
- 20 Larabi A, Barnich N, Nguyen HTT. New insights into the interplay between autophagy, gut microbiota and inflammatory responses in IBD [J]. *Autophagy*, 2020, 16(1): 38 – 51

- 21 Cosin – Roger J, Simmen S, Melhem H, *et al.* Hypoxia ameliorates intestinal inflammation through NLRP3/mTOR downregulation and autophagy activation [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 98
- 22 龚小梅, 李湛全, 姚香草, 等. 三氧化二砷对胃癌细胞凋亡与自噬的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(10): 1196 – 1200
- 23 Yang P, Li Z, TyeK D, *et al.* Effects of an orally supplemented probiotic on the autophagy protein LC3 and Beclin1 in placentas undergoing spontaneous delivery during normal pregnancy [J]. *BMC Preg – nancy Childbirth*, 2020, 20 (10): 229 – 235
- 24 Yang XQ, Yu SY, Yu L, *et al.* Effects of tacrolimus on autophagy protein LC3 in puromycin – damaged mouse podocytes [J]. *Int Med Res*, 2020, 48(12): 300060520971422
- 25 Xu HD, Qin ZH. Beclin 1, Bcl – 2 and Autophagy [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1206: 109 – 126
- 26 Fernández áF, Sebtí S, Wei Y, *et al.* Disruption of the beclin 1 – Bcl – 2 autophagy regulatory complex promotes longevity in mice [J]. *Nature*, 2018, 558(7708): 136 – 140

(收稿日期: 2022 – 02 – 10)

(修回日期: 2022 – 03 – 15)

(接第 168 页)

- 4 Sigaut S, Couffignal C, Esposito – Farèse M, *et al.* Melatonin for prevention of postoperative delirium after lower limb fracture surgery in elderly patients (DELIRLESS): study protocol for a multicentre randomised controlled trial [J]. *BMJ Open*, 2021, 11(12): e053908
- 5 Saka E, Abdullah T, Canbaz M, *et al.* Comparison of arterial blood pressure and cardiac index – based hemodynamic management on cognitive function in elderly patients undergoing spinal surgery: a randomized clinical trial [J]. *Minerva Anesthesiol*, 2021, 87(7): 757 – 765
- 6 Stankiewicz R, Grąt M. Direct, remote and combined ischemic conditioning in liver surgery [J]. *World J Hepatol*, 2021, 13(5): 533 – 542
- 7 Kumar A, Singh H, Shariff M. Remote ischemic preconditioning and its role in the prevention of new onset atrial fibrillation post – cardiac surgery. A Meta – analysis of randomized control trials [J]. *J Arrhythm*, 2019, 35(6): 789 – 794
- 8 Meybohm P, Bein B, Brosteanu O, *et al.* A multicenter trial of remote ischemic preconditioning for heart surgery [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(15): 1397 – 1407
- 9 Oh CS, Kim SH, Lee J, *et al.* Impact of remote ischaemic preconditioning on cerebral oxygenation during total knee arthroplasty [J]. *Int J Med Sci*, 2017, 14(2): 115 – 122
- 10 Oh CS, Sa M, Park HJ, *et al.* Effects of remote ischemic preconditioning on regional cerebral oxygen saturation in patients in the beach chair position during shoulder surgery: a double – blind randomized controlled trial [J]. *J Clin Anesth*, 2020, 61: 109661
- 11 Bennett SR, Abukhodair AW, Alqarni MS, *et al.* Outcomes in cardiac surgery based on preoperative, mean intraoperative and stratified cerebral oximetry values [J]. *Cureus*, 2021, 13(8): e17123
- 12 Kundumani – Sridharan V, Subramani J, Owens C, *et al.* Nrg1β released in remote ischemic preconditioning improves myocardial perfusion and decreases ischemia/reperfusion injury via ErbB2 – mediated

rescue of endothelial nitric oxide synthase and abrogation of Trx2 autophagy [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2021, 41(8): 2293 – 2314

- 13 Hummitzsch L, Zitta K, Fritze L, *et al.* Effects of remote ischemic preconditioning (RIPC) and chronic remote ischemic preconditioning (cRIPC) on levels of plasma cytokines, cell surface characteristics of monocytes and in – vitro angiogenesis: a pilot study [J]. *Basic Res Cardiol*, 2021, 116(1): 60
- 14 郭鹏, 郑跃英, 余建. 远端肢体缺血预处理对老年骨科患者术后认知功能障碍的影响 [J]. *浙江临床医学*, 2017, 19(3): 444 – 446
- 15 Yamamoto Y, Owada Y. Possible involvement of fatty acid binding proteins in psychiatric disorders [J]. *Anat Sci Int*, 2021, 96(3): 333 – 342
- 16 Liu T, Li Y, Yang B, *et al.* Suppression of neuronal cholesterol biosynthesis impairs brain functions through insulin – like growth factor I – Akt signaling [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(14): 3702 – 3716
- 17 Holmgaard F, Vedel AG, Rasmussen LS, *et al.* The association between postoperative cognitive dysfunction and cerebral oximetry during cardiac surgery: a secondary analysis of a randomised trial [J]. *Br J Anaesth*, 2019, 123(2): 196 – 205
- 18 Kumpaitiene B, Svagzdienė M, Drigotienė I, *et al.* Correlation among decreased regional cerebral oxygen saturation, blood levels of brain injury biomarkers, and cognitive disorder [J]. *J Int Med Res*, 2018, 46(9): 3621 – 3629
- 19 苏秀珠, 张燕, 王丽萍. 脑氧饱和度监测目标导向技术在老年患者围术期脑保护中的作用 [J]. *中国医药导报*, 2021, 18(7): 95 – 98, 112
- 20 Yu J, Chen K, Wu L, *et al.* Anesthetic propofol blunts remote preconditioning of trauma – induced cardioprotection via the TRPV1 receptor [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109308

(收稿日期: 2022 – 03 – 07)

(修回日期: 2022 – 03 – 13)