

红花黄色素对老年大鼠认知功能障碍的影响及机制

郑诗 张辉 梁飞

广东省第二人民医院 广东 广州 510220

摘要: **目的:** 探究红花黄色素对老年大鼠认知功能障碍的作用效果及机制, 并探讨红花黄色素剂量高低与作用效果之间关系, 为认知功能障碍的防治提供了新方向。**方法:** 我们选择25只15-16周SD大鼠, 所有大鼠结束适应性饲养后, 均予D-半乳糖皮下注射构建大鼠衰老模型, 随机分为5组(每组5只), 分别是对照组、模型组、低剂量组、高剂量组、高剂量+抑制剂组, 其中低剂量组、高剂量组、高剂量+抑制剂组分别由尾静脉注射1ml/kg、5ml/kg、5ml/kg的红花黄色素注射液, 而高剂量+抑制剂组进行红花黄色素注射后一并完成腹腔注射1.5mg/kg LY294002, 对照组、模型组分别注射5ml/kg生理盐水。除对照组外, 其他各组均进行七氟烷麻醉, 七氟烷浓度3.2%, 流量2L/min, 持续6小时。麻醉后进行水迷宫实验, 检测各组大鼠潜伏期、穿越平台次数, 采用ELISA检测大鼠血清TNF- α 、IL-10水平, HE染色大鼠脑组织, TUNEL染色检测海马区凋亡情况及计算凋亡率, 采用Western Blot检测海马区组织PI3K、AKT蛋白水平。**结果:** 水迷宫结果显示麻醉后各时间点模型组潜伏期均比对照组明显延长($P < 0.05$), 高剂量组潜伏期较模型组缩短($P < 0.05$), 而低剂量组在麻醉后第3-5天潜伏期与模型组相比稍缩短, 但差异无统计学意义($P > 0.05$), 高剂量+抑制剂组与高剂量组相比, 两组潜伏期未见明显差异($P > 0.05$); 穿越平台次数结果显示, 高剂量组和低剂量组的穿越平台次数较模型组增多($P < 0.05$), 高、低剂量两组穿越平台次数相比差异无统计学意义($P > 0.05$), 高剂量+抑制剂组与高剂量组穿越平台次数相比差异无统计学意义($P > 0.05$); ELISA结果显示高剂量组和低剂量组血清TNF- α 含量均低于模型组, IL-10均高于模型组($P < 0.05$); 低剂量组与高剂量组相比, 两组TNF- α 差异无统计学意义($P > 0.05$), 而高剂量组IL-10较低剂量组升高更明显($P < 0.05$); HE染色结果提示模型组脑组织结构紊乱, 炎症细胞浸润, 而低、高剂量组较模型组大鼠脑组织结构清晰, 炎症浸润较少; TUNEL染色结果显示低、高剂量组海马区神经元凋亡率较模型组减轻($P < 0.05$), 高剂量组与低剂量组相比, 凋亡率无显著差异($P > 0.05$); 脑海马组织Western blot结果提示高剂量组和低剂量组PI3K含量较模型组稍升高, 但差异无统计学意义($P > 0.05$), 而高剂量组、低剂量组AKT蛋白水平较明显模型组下降, 且低剂量组AKT含量下降更明显($P < 0.05$)。**结论:** 红花黄色素能有效改善老年大鼠麻醉后认知功能障碍, 抑制炎症, 抑制神经元凋亡, 具有潜在的神经保护功效, 为POCD的防治提供了新方向, 红花黄色素剂量高低与改善效果强弱并不完全一致, 红花黄色素干预剂量仍需要后续研究, 本研究结果尚不支持红花黄色素改善认知功能障碍的机制与PI3K/AKT通路有关。

关键词: 红花黄色素; 七氟烷; 认知功能障碍; 神经炎症; PI3K/AKT通路

如今有更多老年人为了挽救生命、提高生活质量而接受麻醉、手术治疗。尽管围术期麻醉手术和器官保护技术已取得重大进步, 但老年患者认知功能障碍仍有较高发生率, 据报道麻醉手术后认知功能障碍发生率为17%-43%^[1], 其主要表现为记忆、学习等认知能力下降^[2]。术后认知功能下降对高龄患者术后康复产生重大影响, 不仅延长住院时间, 增加医疗成本与死亡率, 而且严重影响患者出院后社会参与能力和日常生活能力^[3-4]。

临床研究发现高龄(> 65岁)是围术期认知功能障碍的独立危险因素之一^[2,5], 高龄患者在手术和麻醉后遭受更深远的有害认知影响, 另外, 机体慢性炎症状态如

糖尿病、代谢综合征以及多发性硬化等亦是认知功能障碍的重要危险因素^[6-8]。尽管认知功能障碍的发病机制尚不明确, 但是多项研究发现全身及神经炎症与术后认知功能障碍有关, 有学者提出了认知功能障碍炎症假说理论, 即炎症在中枢神经元活动中引起功能性破坏, 最终导致认知功能障碍, 此类假说得到诸多动物及临床研究的肯定^[9-15], 麻醉药物亦可引起神经炎症的出现或者加重^[16-17]。近年有研究支持PI3K-AKT信号传导在炎症中的核心作用, PI3K/Akt通路作为高度保守的细胞内信号转导途径之一, 响应细胞外信号, 对细胞代谢、增值、凋亡等过程有重要意义。有研究发现异常PI3K-AKT信号传导可能导致神经炎症的发生和持续存在^[18-20], 同时对该通路的调节可能成为调控神经炎症的一种可行手段^[21]。炎症

基金项目: 广东省中医药局科研项目(项目编号20212004)

假说也为POCD预防及治疗等研究提供了理论基础,近几年有少许研究尝试通过控制炎症来预防干预防术后认知障碍^[22-25]。

红花黄色素(SY)是从红花花瓣中提取的化合物,是红花的主要活性成分,是一种水溶性黄酮,其成分为羟基红花黄A(HSYA)、无水红花黄B(AHSYB)和其他小分子化学物质^[26]。目前研究发现红花黄色素具有多种药理活性,包括减轻炎症、抗氧化等^[27-29],现阶段关于红花黄色素研究多集中于治疗心脑血管疾病以及糖尿病等方面^[30,31],其与认知功能障碍之间的相关报道少见,且对红花黄色素剂量高低与药理作用效果的探讨较少。鉴于红花黄色素显著抗炎效果,故我们推测红花黄色素可能对老年大鼠认知功能障碍有改善效果,因此本研究目的是探究红花黄色素对老年大鼠认知障碍的作用,并探讨红花黄色素剂量高低与作用效果之间关系,及其作用机制是否与PI3K-AKT信号通路相关。

1 实验方法

1.1 动物饲养与处理

选取雄性15-16周龄SD大鼠25只(北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号SCXK(京)2019-0008),饲养于温度20-26°C,湿度40%-70%,12h光照/12h黑暗条件下。本实验通过江西中洪博元生物技术有限公司实验动物福利与伦理委员会伦理审批,编号2022050501。

所有大鼠先进行1周适应性饲养,之后进行衰老处理。所有组大鼠均予以D-半乳糖(厂家:源叶生物批号:N13GS167640)0.125g/kg/d予头颈部皮下注射,连续注射6周。所有大鼠衰老处理后,被随机分为5组:1)对照组2)模型组3)低剂量组4)高剂量组5)高剂量+抑制剂组。低剂量组、高剂量组、高剂量+抑制剂组进行红花黄色素(厂家:山西德元堂药业有限公司,国药准字Z20050582)预处理,低剂量组尾静脉注射1ml/kg红花黄色素,高剂量组尾静脉注射5ml/kg红花黄色素,高剂量+抑制剂组尾静脉注射5ml/kg红花黄色素,且一并完成1.5mg/kg LY294002腹腔注射(LY294002,是一种常用的PI3K抑制剂,厂家:MedChemExpress MCE,批号:114710),对照组、模型组则尾静脉注射5ml/kg生理盐水。注射完成1小时后,除对照组外,其他组均放入七氟烷麻醉机内,七氟烷浓度3.2%,流量2L/min,持续6小时,构建麻醉后认知障碍模型。

麻醉后第1-5天,进行水迷宫定位航行实验,第6天进行空间搜索实验。水迷宫结束后,取各组动物血清采用ELISA检测炎症因子TNF- α 、IL-10水平;取脑组织做HE染色检测组织形态病理变化;TUNEL染色检测脑组织海

马区神经元凋亡情况;Western blot检测海马组织PI3K、AKT蛋白水平。

1.2 水迷宫实验

麻醉后第1-5天进行水迷宫定位航行实验,在Morris水迷宫水池水面以下1cm处放置一个直径10cm的圆形平台。打开视频录制系统,设置定时采集时长为1min20s,大鼠台上停留时间为5s,每只大鼠随机选一个方向放入水中,记录大鼠入水时间和上台时间,如果60s内大鼠找到隐藏的平台,让大鼠在平台上待20s,再捞起来擦干水放回鼠笼中。如果60s内大鼠没有找到隐藏的平台,则需要引导大鼠游回平台,让大鼠在平台上待20s,再捞起来擦干水放入鼠笼中。每只大鼠每天游四次,每次从不同的方向放入水中,每游完一次让大鼠休息20分钟。60s内大鼠找到隐藏的平台,则大鼠的潜伏期为上台时间减去入水时间,超过60s找到平台,则大鼠的潜伏期为60s。视频录制结束后识别轨迹,计算指标。空间搜索实验:于隐匿台定位航行实验结束后次日去除平台,记录其120s内穿越原平台的次数,即为穿越平台次数。

Morris水迷宫老鼠的起点位置半随机化表

时间	训练实验1	训练实验2	训练时间3	训练实验4
第1天	S	E	WS	EN
第2天	WS	S	EN	E
第3天	EN	WS	E	S
第4天	E	EN	S	WS
第5天	S	E	WS	EN
第6天	SE			

1.3 ELISA检测

采用ELISA检测各组大鼠血清样本中炎症因子TNF- α 、IL-10的水平,ELISA试剂盒为白细胞介素10(IL-10)试剂盒(MM-0195R1,江苏酶免实业有限公司),肿瘤坏死因子 α (TNF- α)试剂盒(MM-0180R1,江苏酶免实业有限公司)。水迷宫实验结束后次日,采集各组大鼠全血,在室温放置2小时后1000 \times g离心20分钟,取血清。按照试剂盒说明书进行ELISA检测,用酶标仪在450nm处测定各孔吸光度(OD)值。

1.4 HE染色

脑石蜡切片经烤片、脱蜡、水化后,用苏木素染液染色3-5min,流水冲洗后,用1%盐酸酒精分化,反蓝液反蓝,伊红染色3-5min后,切片脱水,封片,在显微镜(BX43, Olympus)下观察。

1.5 TUNEL检测

脑组织石蜡切片经烤片、脱蜡、水化后,用Proteinase K进行抗原修复,用TUNEL检测液37°C避光

孵育2h, 复染DAPI后, 封片, 在荧光显微镜 (BX53, Olympus) 下观察。DAPI染出来的细胞核在紫外的激发下为蓝色, 凋亡染色阳性为相应荧光素标记的红光。在400倍光学显微镜下随机取海马区5个不重叠视野, 统计相应视野内神经元细胞数和凋亡阳性细胞数。细胞凋亡率=凋亡阳性细胞数/神经元总数。

1.6 Western blot 检测

采用Western blot检测海马组织PI3K、AKT蛋白的表达水平。内参一抗Mouse Anti-GAPDH (HC301, TransGen Biotech); 二抗: HRP conjugated Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (GB23301, Servicebio); 目的一抗: Rabbit Anti PI3K (20584-1-ap, Proteintech); 目的一抗: Mouse Anti AKT (bs-0115M, Bioss); 二抗: HRP conjugated Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (GB23303, Servicebio)。取大鼠海马组织, 加入RIPA裂解液 (C1053, 北京普利莱基因技术有限公司), 用组织研磨仪进行研磨, 直至研磨充分, 12000 r/min高速离心机4°C离心10min, 取上清液, 使用BCA蛋白定量试剂盒 (E-BC-K318-M, Elabscience) 对PI3K、AKT总蛋白进行定量。之后, 对蛋白样品进行加热变性 (100°C, 5min) 后, 进行十二烷基苯磺酸钠凝胶电泳 (SDS-PAGE) 1.5h, 后用300 mA恒流转膜1.5h。PVDF膜 (IPVH00010, Millipore) 用专用脱脂奶粉 (P1622, 北京普利莱基因技术有限公司) 封闭后, 一抗4°C孵育过夜, 次日PVDF膜室温孵育二抗2h, 用发光液浸湿PVDF膜, 置于超高灵敏度化学发光成像系统 (Chemi Doc™ XRS+, 伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司) 中进行显影。所使用的抗体及对应稀释倍数如下表所示:

抗体名称	稀释倍数
Mouse Anti-GAPDH	1 : 2000
Rabbit Anti PI3K	1 : 1000
Mouse Anti AKT	1 : 1000
HRP conjugated Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	1 : 2000
HRP conjugated Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	1 : 2000

2 统计学分析

以上所有实验均至少重复3次。所有结果均采用均值±标准差 ($X \pm SD$) 表示。采用SPSS19.0进行统计学分析, 多组之间采用ANOVA单因素方差分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。采用Graphpad9.0软件进行作图。

3 结果

3.1 水迷宫检测各组大鼠学习记忆能力

潜伏期越短、穿台次数越多提示大鼠学习记忆能力越好。如图1所示, 与对照组相比, 模型组在麻醉后第1

到5天潜伏期均延长 ($P < 0.05$); 高剂量组潜伏期在各时间点均较模型组缩短 ($P < 0.05$), 而低剂量组潜伏期在麻醉后第3-5天与模型组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 高剂量+抑制剂组与高剂量组潜伏期相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组大鼠穿越平台次数对比如图2所示, 模型组穿越平台次数显著少于对照组 ($P < 0.05$), 高剂量组和低剂量组的穿越平台次数较模型组增多 ($P < 0.05$), 高剂量组穿越平台次数比低剂量组略高, 但两者相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 高剂量+抑制剂组穿越平台次数与高剂量组相比, 两组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

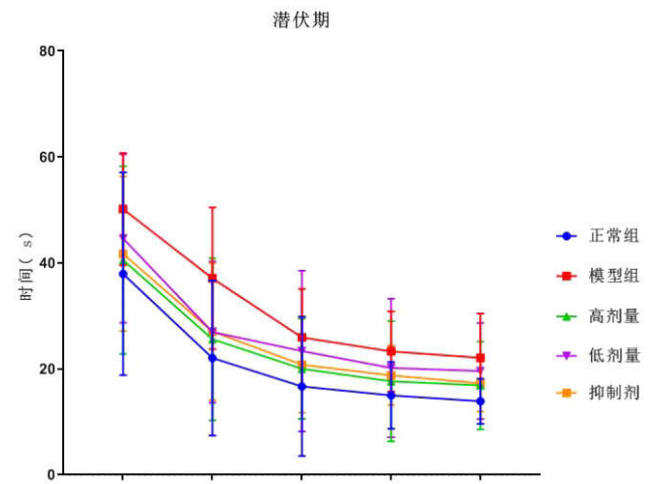


图1 麻醉后1-5天各组大鼠潜伏期对比

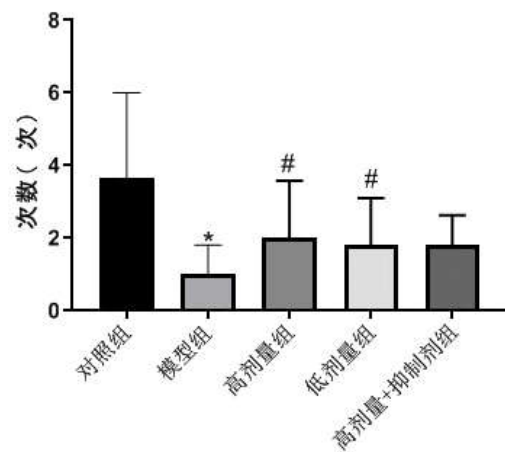


图2 麻醉后第6天各组大鼠穿越平台次数对比 (*与对照组对比 $P < 0.05$, #模型组相比 $P < 0.05$)

3.2 ELISA检测血清炎症因子TNF- α 、IL-10水平

ELISA检测结果如图3所示, 模型组TNF- α 水平较对照组升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。高剂量组和低剂量组TNF- α 水平较模型组下降 ($P < 0.05$), 其中,

低剂量组TNF- α 水平比高剂量组更低,但两者差异无统计学意义($P > 0.05$)。与高剂量组相比,高剂量+抑制剂组TNF- α 水平升高明显($P < 0.05$)。

与对照组相比,模型组IL-10下降明显,差异具有统

计学意义($P < 0.05$)。高剂量组和低剂量组IL-10均较模型组升高($P < 0.05$),其中高剂量组IL-10升高幅度更明显,但高剂量+抑制剂组IL-10水平与高剂量组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)

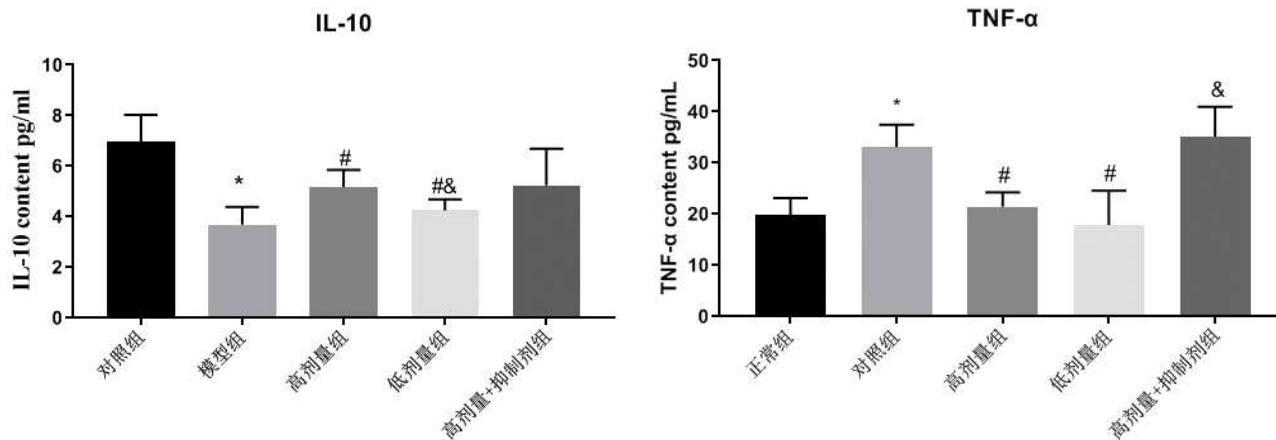


图3 ELISA检测各组血清炎症因子TNF- α 、IL-10水平

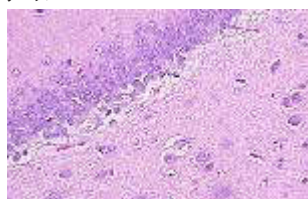
(*与对照组对比 $P < 0.05$, #与模型组相比 $P < 0.05$, &与高剂量组相比 $P < 0.05$)

3.3 HE染色检测脑组织形态

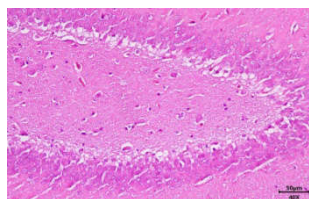
如图4所示,与对照组相比,模型组大鼠海马区、皮质区可见神经元细胞体积缩小、空泡变性及细胞核固缩深染现象,皮质区神经元细胞损伤明显;高剂量组、低剂量组经红花黄色素处理后大鼠脑组织海马区、皮质区

神经元细胞损伤程度减轻,高剂量组细胞损伤程度减轻更为明显;与高剂量组相比,高剂量+抑制剂组大鼠脑组织海马区、皮质区神经元细胞损伤程度加深,皮质区神经元细胞损伤更为明显。

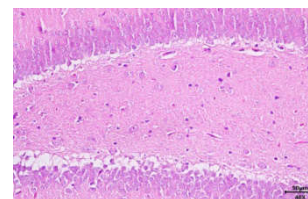
海马区



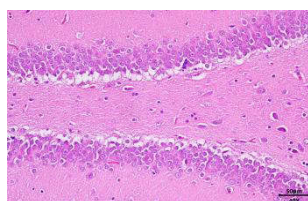
对照组



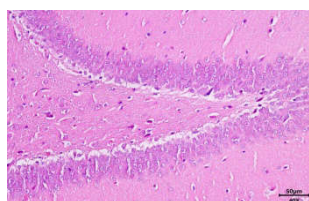
模型组



高剂量组

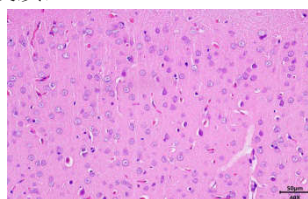


低剂量组

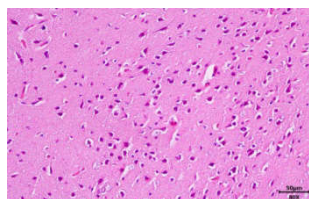


高剂量+抑制剂组

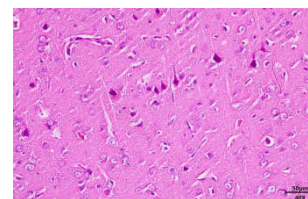
皮质区



对照组



模型组



高剂量组

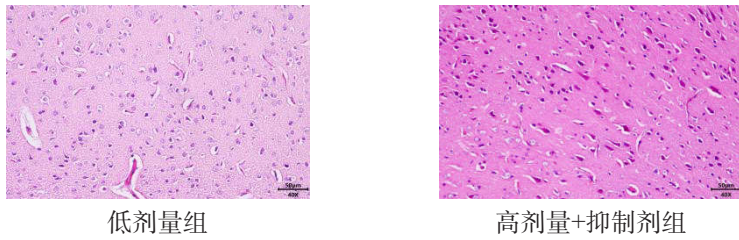
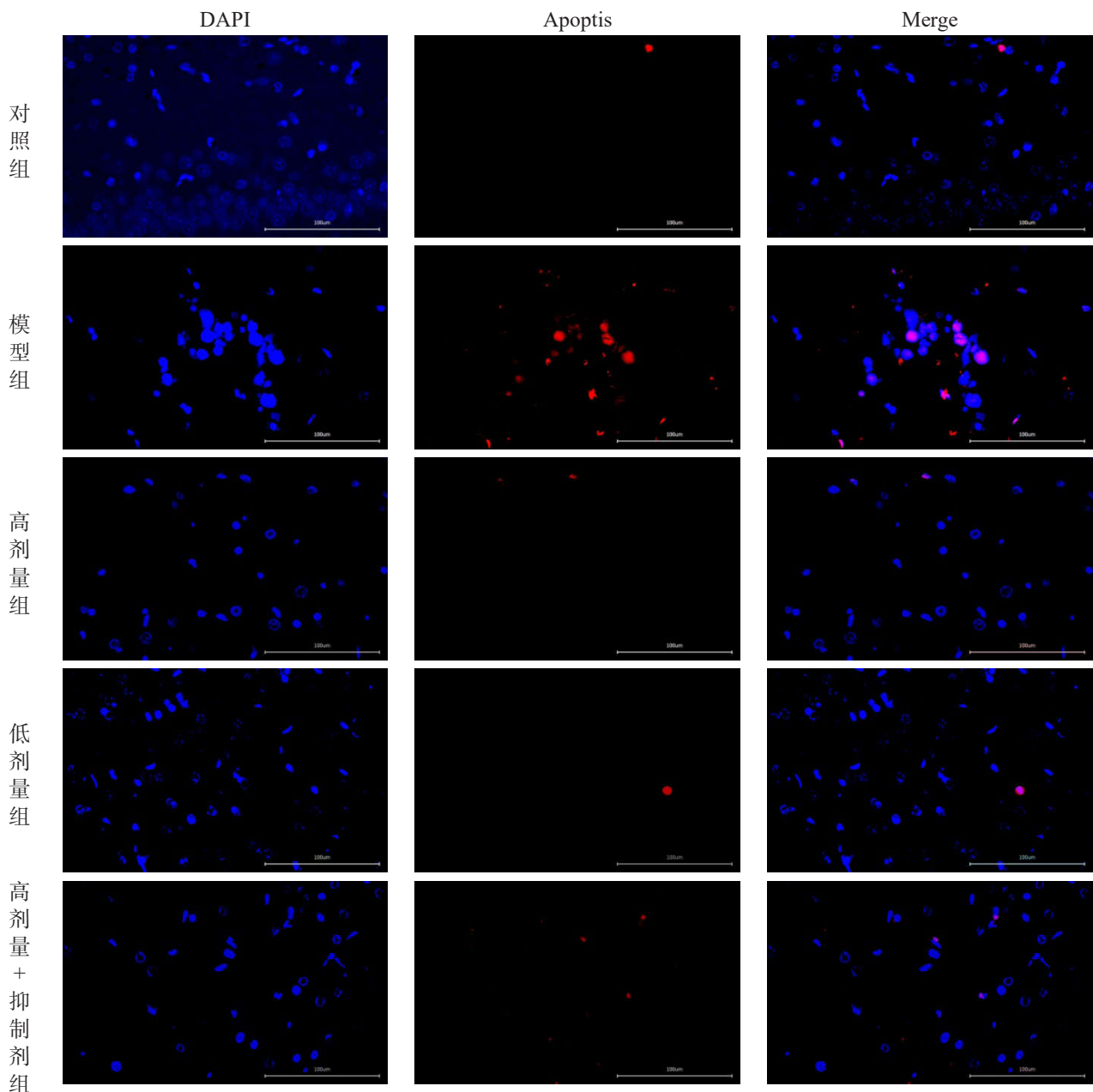


图4：各组大鼠脑海马区和皮质区组织HE染色结果

3.4 TUNEL染色检测海马区细胞凋亡情况

如图5显示，相较于对照组，模型组海马细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.05$)；经红花黄色素处理后，高剂量组、低剂量组凋亡率均低于模型组 ($P < 0.05$)，高、低

剂量组相比，凋亡率无显著差异 ($P > 0.05$)；与高剂量组比较，高剂量+抑制剂组海马区细胞凋亡率增加 ($P < 0.05$)。



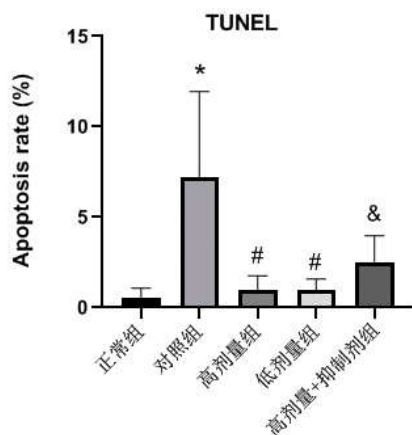


图5 TUNEL染色检测海马区细胞凋亡率

(*与对照组对比 $P < 0.05$, #与模型组相比 $P < 0.05$, &与高剂量组相比 $P < 0.05$)

3.5 Western blot 检测海马区组织PI3K、AKT蛋白水平

如图6所示, 模型组与对照组PI3K蛋白水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 相较于模型组, 高剂量组和低剂量组PI3K含量稍有升高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 相较于高剂量红花组, 高剂量红花+抑制组, 海马组织PI3K含量的升高 ($P < 0.05$)。模型组AKT蛋白水平较对照组升高 ($P < 0.05$), 高剂量组和低剂量组海马区组织AKT蛋白水平较模型组明显下降 ($P < 0.05$)。

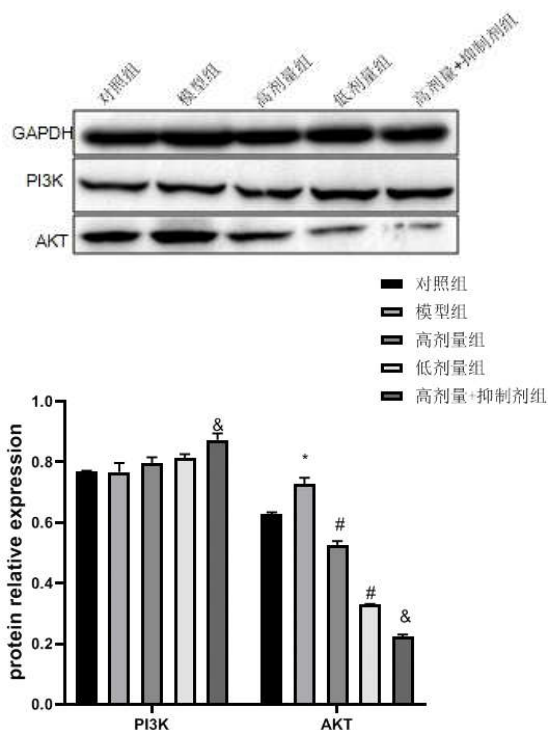


图6 Western blot检测海马区组织PI3K、AKT蛋白水平

(*与对照组对比 $P < 0.05$, #与模型组相比 $P < 0.05$, &与高剂量组相比 $P < 0.05$)

4 讨论

本研究主要使用15-16周龄大鼠, 经皮下注射D半乳糖方式制作衰老大鼠模型, 该衰老模型已在多项研究中验证与认可^[32-34]。我们对衰老大鼠进行长时间七氟烷麻醉暴露, 大鼠在麻醉后出现明显学习记忆能力下降。七氟烷作为临床上最常用的吸入麻醉剂之一, 在长时间或多次吸入的情况下增加老年患者增加POCD的风险^[35-36], 长时间七氟烷麻醉暴露加重了神经炎症, 并导致突触可塑性降低以及促进神经元凋亡, 这些均与POCD发生机制相关^[37-38]。在我们水迷宫结果中, 模型组在七氟烷麻醉后第1-5天潜伏期有明显延长且穿越平台次数明显下降, 模型组HE染色结果亦提示该组大鼠脑组织海马区、皮质区组织出现神经元细胞体积缩小、空泡变性及细胞核固缩深染等明显神经元损伤现象, 上述结果均支持本实验中建立的老年大鼠认知功能障碍模型是成功的。

根据水迷宫实验结果, 在术前单次接受5ml/kg红花黄色素注射液后, 相应组别大鼠学习记忆认知功能得到明显改善, 且我们发现高剂量红花黄色素的改善效果优于低剂量, 这与我们在预实验中行为学结果是一致的, 与此同时, 我们的研究结果均体现出红花黄色素具有减轻炎症作用, 这与既往相关研究结论一致^[39-41]。本实验进一步针对红花黄色素对炎症相关因子水平的影响进行结果分析, 在该结果中, 我们发现红花黄色素剂量高低对血清炎症因子水平的影响并不一致, 低剂量红花黄色素就可以对炎症因子TNF- α 产生明显抑制, 低剂量与高剂量红花黄色素在TNF- α 水平的抑制上未体现出明显差异, 而高剂量红花黄色素对IL-10水平的提升更具优势。在凋亡染色结果中, 我们发现高剂量组、低剂量红花黄色素均对神经元凋亡有明显改善作用, 且高、低剂量红花黄色素之间抗凋亡作用效果无明显差异。故本实验结果尚不支持红花黄色素剂量高低与认知障碍模型中的抗炎、抗凋亡效果强弱对应, 但可能由于本实验中每一组的动物数量较少, 可能导致结果偏倚, 所以红花黄色素干预的最佳剂量仍需要后续更多动物样本的研究。

PI3K/Akt级联在介导促炎症细胞因子的释放方面有重要作用^[42-43], 同时有研究认为红花黄色素抗凋亡作用与PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路有关^[44]。但是, 我们的研究结果提示, 在长时间七氟烷暴露的老年大鼠认知功能障碍模型中海马区PI3K含量无明显变化, 同时模型中海马区AKT含量有明显增加, 这与既往POCD动物模型研究中观察到的PI3K、AKT变化结果并不一致, 分析其可能的原因是认知障碍模型制作方式的差异导致了研究结果的不同^[45-48]。在我们研究结果中, 红花黄色素并未使大鼠海马

区PI3K水平发生明显变化,但出现AKT含量下降,这与既往红花黄色素和PI3K/AKT相关研究结果亦不一致^[49],原因可能是本研究中检测的是AKT总量,而既往研究多检测磷酸化P-AKT,观察P-AKT/AKT^[48-49],仅根据目前本研究结果证据尚不支持PI3K/Akt通路参与七氟烷暴露后老年大鼠认知功能障碍的形成机制,红花黄色素改善认知功能障碍机制与PI3K/AKT通路并无明显关联,但我们的结果看到红花黄色素处理后海马区AKT含量明显下降,其原因可能与其他AKT相关通路有关,需要进一步更大样本研究。

综上,红花黄色素能有效改善老年大鼠麻醉后认知功能障碍,抑制炎症,抑制神经元凋亡,具有潜在的神经保护功效,为POCD的防治提供了新方向,红花黄色素剂量高低与改善效果强弱并不完全一致,红花黄色素最佳干预剂量仍需要后续研究,本研究结果尚不支持红花黄色素改善认知功能下降的机制与PI3K/AKT通路有关。

参考文献

- [1] Evered L, Scott DA, Silbert B, et al. Postoperative cognitive dysfunction is independent of type of surgery and anesthetic. *Anesth Analg*(S0003-2999).2011 May;112(5):1179-85.
- [2] Monk TG, Weldon BC, Garvan CW, et al. Predictors of cognitive dysfunction after major noncardiac surgery. *Anesthesiology*(S0003-3022). 2008 Jan;108(1):18-30.
- [3] Steinmetz J, Christensen KB, Lund T, et al. Long-term consequences of postoperative cognitive dysfunction. *Anesthesiology*(S0003-3022). 2009 Mar;110(3):548-55.
- [4] Abildstrom H, Rasmussen LS, Rentowl P, et al. Cognitive dysfunction 1-2 years after non-cardiac surgery in the elderly. ISPOCD group. International Study of Post-Operative Cognitive Dysfunction. *Acta Anaesthesiol Scand*(S0001-5172). 2000 Nov;44(10):1246-51.
- [5] Moller JT, Cluitmans P, Rasmussen LS, et al. Long-term postoperative cognitive dysfunction in the elderly: ISPOCD1 study. *Lancet*(S0140-6736), 1998 Mar 21; 351(9106):857-61.
- [6] Hudetz JA, Iqbal Z, Gandhi SD, et al. Postoperative delirium and short-term cognitive dysfunction occur more frequently in patients undergoing valve surgery with or without coronary artery bypass graft surgery compared with coronary artery bypass graft surgery alone: results of a pilot study. *J Cardiothorac Vasc Anesth*(S 1053-0770). 2011 Oct;25(5):811-6.
- [7] Hudetz JA, Patterson KM, Iqbal Z, et al. Metabolic syndrome exacerbates short-term postoperative cognitive dysfunction in patients undergoing cardiac surgery: results of a pilot study. *J Cardiothorac Vasc Anesth*(S1053-0770). 2011 Apr;25(2):282-7.
- [8] Dallmeier D, Larson MG, Vasan RS, et al. Metabolic syndrome and inflammatory biomarkers: a community-based cross-sectional study at the Framingham Heart Study. *Diabetol Metabol Syndr*(S1758-5996). 2012 Jun 20;4(1):28.
- [9] Safavynia SA, Goldstein PA. The Role of Neuroinflammation in Postoperative Cognitive Dysfunction: Moving From Hypothesis to Treatment. *Front Psychiatry*(S 1664-0640). 2019 Jan 17;9:752.
- [10] Mahanna-Gabrielli E, Schenning KJ, Eriksson LI, et al. State of the clinical science of perioperative brain health: report from the American Society of Anesthesiologists Brain Health Initiative Summit 2018. *Br J Anaesth*(S0007-0912). 2019 Oct;123(4):464-478.
- [11] Terrando N, Monaco C, Ma D, et al. Tumor necrosis factor-alpha triggers a cytokine cascade yielding postoperative cognitive decline. *Proc Natl Acad Sci USA*(S 0027-8424). 2010 Nov 23;107(47):20518-22.
- [12] Fidalgo AR, Cibelli M, White JPM, et al. Systemic inflammation enhances surgery-induced cognitive dysfunction in mice. *Neurosci Lett*(S0304-3940). 2011 Jul 1;498(1):63-6.
- [13] Van Harten AE, Scheeren TWL, Absalom AR. A review of postoperative cognitive dysfunction and neuroinflammation associated with cardiac surgery and anaesthesia. *Anesthesiology*(S0003-3022). 2012 Mar;67(3):280-93.
- [14] Subramanian S, Terrando N. Neuroinflammation and Perioperative Neurocognitive Disorders. *Anesth Analg* (S0003-2999) . 2019 Apr; 128 (4) :781-788.
- [15] Saxena S, Lai IK, Li R, et al. Neuroinflammation is a putative target for prevention and treatment of perioperative neurocognitive disorders. *BRITISH MEDICAL BULLETIN*(S0007-1420). 2019;130:125-135.
- [16] Berger M, Nadler JW, Friedman A, et al. The effect of propofol versus isoflurane anesthesia on human cerebrospinal fluid markers of alzheimer's disease: results of a randomized trial. *J Alzheimers Dis*(S1387-2877). 2016 Apr 15;52(4):1299-310.
- [17] Hirsch J, Vacas S, Terrando N, et al. Perioperative

- cerebrospinal fluid and plasma inflammatory markers after orthopedic surgery. *J Neuroinflammation*(S1742-2094). 2016 Aug 30;13(1):211.
- [18] Cianciulli A, Porro C, Calvello R, et al. Microglia mediated neuroinflammation: focus on PI3K modulation. *Biomolecules*(S2218-273X). 2020 Jan 14;10(1):137.
- [19] Weichhart T, Saemann MD. The PI3K/Akt/mTOR pathway in innate immune cells: emerging therapeutic applications. *Ann Rheum Dis*(S0003-4967). 2008;67(Suppl 3):iii70-4.
- [20] Hawkins PT, Stephens LR. PI3K signalling in inflammation. *Biochim Biophys Acta* (S0006-3002). 2015 Jun;1851(6):882-97.
- [21] Chu E, Mychasiuk R, Hibbs ML, et al. Dysregulated phosphoinositide 3-kinase signaling in microglia: shaping chronic neuroinflammation. *J Neuroinflammation* (S1742-2094). 2021 Nov 27;18(1):276.
- [22] Glumac S, Kardum G, Sodic L, et al. Longitudinal assessment of preoperative dexamethasone administration on cognitive function after cardiac surgery: a 4-year follow-up of a randomized controlled trial. *BMC Anesthesiol*(S1471-2253). 2021 Apr 23;21(1):129.
- [23] Oberman K, Hovens I, de Haan J, et al. Acute preoperative ibuprofen improves cognition in a rat model for postoperative cognitive dysfunction. *J Neuroinflammation* (S1742-2094). 2021 Jul 8;18(1):156.
- [24] Wang Y, Machizawa MG, Lisle T, et al. Suppression of Neuroinflammation Attenuates Persistent Cognitive and Neurogenic Deficits in a Rat Model of Cardiopulmonary Bypass. *Front Cell Neurosci*(S1662-5102). 2022 Feb 24;16:780880.
- [25] Hu J, Feng X, Valdearcos M, et al. Interleukin-6 is both necessary and sufficient to produce perioperative neurocognitive disorder in mice. *Br J Anaesth*(S0007-0912). 2018 Mar;120(3):537-545.
- [26] Delshad E, Yousefi M, Sasannezhad P, et al. Medical uses of *Carthamus tinctorius* L. (Safflower): a comprehensive review from Traditional Medicine to Modern Medicine. *Electron Physician*(S2008-5842). 2018 Apr 25;10(4):6672-6681.
- [27] Lu QY, Ma JQ, Duan YY, et al. Carthamin Yellow Protects the Heart Against Ischemia/Reperfusion Injury With Reduced Reactive Oxygen Species Release and Inflammatory Response. *J Cardiovasc Pharmacol*(S0160-2446). 2019 Sep;74(3):228-234.
- [28] Kim JH, He MT, Kim MJ, et al. Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed attenuates memory impairment induced by scopolamine in mice via regulation of cholinergic dysfunction and oxidative stress. *Food Funct*(S2042-6496). 2019 Jun 19;10(6):3650-3659.
- [29] Yu SY, Lee YJ, Kim JD, et al. Phenolic composition, antioxidant activity and anti-adipogenic effect of hot water extract from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed. *Nutrients*(S2072-6643). 2013 Nov 28;5(12):4894-907.
- [30] Xuan J, Huang M, Lu Y, et al. Economic Evaluation of Safflower Yellow Injection for the Treatment of Patients with Stable Angina Pectoris in China: A Cost-Effectiveness Analysis. *J Altern Complement Med*(S1075-5535). 2018 Jun;24(6):564-569.
- [31] Jin X, Shi L, Chang F, et al. Efficacy and Safety of Safflower Yellow in Early Diabetic Nephropathy: A Meta-Analysis. *Evid Based Complement Alternat Med*(S1741-427X). 2019 Feb 14;2019:8065376.
- [32] Azman KF, Zakaria R. D-Galactose-induced accelerated aging model: an overview. *Biogerontology* (S1389-5729). 2019 Dec;20(6):763-782.
- [33] Cebe T, Atukeren P, Yanar K, et al. Oxidation scrutiny in persuaded aging and chronological aging at systemic redox homeostasis level. *Exp Gerontol*(S0531-5565). 2014 Sep;57:132-40.
- [34] Yanar K, Aydın S, Cakatay U, et al. Protein and DNA oxidation in different anatomic regions of rat brain in a mimetic ageing model. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*(S1742-7835). 2011 Dec;109(6):423-33.
- [35] Miller D, Lewis SR, Pritchard MW, et al. Intravenous versus inhalational maintenance of anaesthesia for postoperative cognitive outcomes in elderly people undergoing non-cardiac surgery. *Cochrane Database Syst Rev*(S1469-493X). 2018 Aug 21;8(8):CD012317.
- [36] Purdon PL, Pavone KJ, Akeju O, et al. The ageing brain: age-dependent changes in the electroencephalogram during propofol and sevoflurane general anaesthesia. *Br J Anaesth*(S0007-0912). 2015 Jul;115 Suppl 1(Suppl 1):i46-i57.
- [37] Zhang L, Zhang J, Yang L, et al. Isoflurane and sevoflurane increase interleukin-6 levels through the nuclear factor-kappa B pathway in neuroglioma cells. *Br J*

- Anaesth(S0007-0912). 2013 Jun;110 Suppl 1(Suppl 1):i82-91.
- [38] Haseneder R, Kratzer S, von Meyer L, et al. Isoflurane and sevoflurane dose-dependently impair hippocampal long-term potentiation. *Eur J Pharmacol* (S0014-2999). 2009 Nov 25;623(1-3):47-51.
- [39] Purdon PL, Pavone KJ, Akeju O, et al. The ageing brain: age-dependent changes in the electroencephalogram during propofol and sevoflurane general anaesthesia. *Br J Anaesth*(S0007-0912). 2015 Jul;115 Suppl 1(Suppl 1):i46-i57.
- [40] Wang YP, Guo Y, Wen PS, et al. Three Ingredients of Safflower Alleviate Acute Lung Injury and Inhibit NET Release Induced by Lipopolysaccharide. *Mediators Inflamm*(S0962-9351). 2020 Feb 29;2020:2720369.
- [41] Fu PK, Pan TL, Yang CY, et al. *Carthamus tinctorius* L. ameliorates brain injury followed by cerebral ischemia-reperfusion in rats by antioxidative and anti-inflammatory mechanisms. *Iran J Basic Med Sci*(S2008-3866). 2016 Dec;19(12):1368-1375.
- [42] Harston RK, McKillop JC, Moschella PC, et al. Rapamycin treatment augments both protein ubiquitination and Akt activation in pressure-overloaded rat myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*(S0363-6135). 2011 May;300(5) : H1696-706.
- [43] Yang J, Li S, Wang L, et al. Ginsenoside Rg3 Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury via MerTK-Dependent Activation of the PI3K/AKT/mTOR Pathway. *Front Pharmacol*(S1663-9812). 2018 Aug 2;9:850.
- [44] Chen L, Xiang Y, Kong L, et al. Hydroxysafflor yellow A protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by anti-apoptotic effect through PI3K/Akt/GSK3 β pathway in rat. *Neurochem Res*(S0364-3190). 2013 Nov;38(11) :2268-75.
- [45] Lv Z, Che L, Du Y, et al. Mechanism of Mongolian Medicine Eerdun Wurile in Improving Postoperative Cognitive Dysfunction Through Activation of the PI3K Signaling Pathway. *Front Neurosci*(S1662-453X). 2022 Jan 14;15:769759.
- [46] Du Y, Cui H, Xiao Y, et al. The mechanism of lipopolysaccharide administration-induced cognitive function impairment caused by glucose metabolism disorder in adult rats. *Saudi J Biol Sci*(S1319-562X). 2019 Sep;26(6):1268-1277.
- [47] Wang P, Cao J, Liu N, et al. Protective Effects of Edaravone in Adult Rats with Surgery and Lipopolysaccharide Administration-Induced Cognitive Function Impairment. *PLoS One*(S1932-6203). 2016 Apr 26;11(4):e0153708.
- [48] Wang N, Wang M. Dexmedetomidine suppresses sevoflurane anesthesia-induced neuroinflammation through activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway. *BMC Anesthesiol*(S1471-2253). 2019 Jul 27;19(1):134.
- [49] Ma Q, Ruan YY, Xu H, et al. Safflower yellow reduces lipid peroxidation, neuropathology, tau phosphorylation and ameliorates amyloid beta-induced impairment of learning and memory in rats. *Biomed Pharmacother*(S0753-3322). 2015 Dec;76:153-64.