

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.13.006

文章编号: 1005-8982(2017)13-0028-05

亚麻醉、镇静及麻醉剂量丙泊酚对高脂血症大鼠 空间记忆及海马组织的影响

李繁¹, 黎仕煊¹, 黄奕弟²

(1. 海南医学院第二附属医院 麻醉科, 海南 海口 571100; 2. 海南医学院第一附属医院
解剖教研室, 海南 海口 570102)

摘要: **目的** 探讨亚麻醉、镇静及麻醉剂量丙泊酚对高脂血症大鼠的空间记忆及海马组织的影响。**方法** 65 只健康成年雄性 SD 大鼠随机分为基础性喂养组(15 只)和高脂饲料喂养组(50 只), 喂养 6 周后随即抽取 10 只测定血脂。将复制模型成功的 40 只大鼠随机分为 4 组: A 组腹腔注射生理盐水 75 mg/kg; B、C、D 组分别腹腔注射亚麻醉(10 mg/kg)、镇静(30 mg/kg)及麻醉剂量(375 mg/kg)丙泊酚(浓度为 1%), 连续给药 5 d, 给药后 20 min 以及第 6~7 日均进行 Morris 水迷宫训练, 测定空间记忆能力; 给药后第 8 天, 断头取脑, 获得海马组织, 测定其中 Tau 蛋白磷酸化水平、Caspase-3 表达水平和 γ 氨基丁酸(GABA)水平。**结果** 随着给药和训练天数增加, 4 组大鼠的逃避潜伏期缩短 ($P < 0.05$); C 组和 D 组大鼠不同时间点的逃避潜伏期高于 A 组和 B 组 ($P < 0.05$), 且 D 组高于 C 组 ($P < 0.05$); 第 7 天空间搜索实验时, C 组和 D 组大鼠穿越平台次数低于 A 组和 B 组 ($P < 0.05$), 且 D 组低于 C 组 ($P < 0.05$); C 组和 D 组大鼠海马组织中 GABA 含量、阳性细胞平均光密度值高于 A 组和 B 组 ($P < 0.05$), 且 D 组高于 C 组 ($P < 0.05$)。**结论** 镇静和麻醉剂量的丙泊酚会降低高脂血症大鼠的空间记忆能力, 可能与海马组织中 GABA 的高水平和 Tau 蛋白过度磷酸化有关。

关键词: 丙泊酚; 高脂血症; 空间记忆; 海马组织

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Influence of subanesthesia, sedation and anesthesia doses of Propofol on spatial memory and hippocampal tissues in rats with hyperlipidemia

Fan Li¹, Shi-huan Li¹, Yi-di Huang²

(1. Department of Anesthesiology, the Second Affiliated Hospital, Hainan Medical University, Haikou, Hainan 571100, China; 2. Department of Anatomy, the First Affiliated Hospital, Hainan Medical University, Haikou, Hainan 570102, China)

Abstract: Objective To discuss the influence of subanesthesia, sedation and anesthesia doses of Propofol on learning and memory functions, hippocampal tissues in rats with hyperlipidemia. **Methods** Totally 65 healthy adult male SD rats were randomly divided into basic diet group (15 rats) and high-fat diet group (50 rats). After 6 weeks of feeding, 10 rats were used for measurement of blood lipids. The 40 rats of successful model were randomly divided into 4 groups. Group A had intraperitoneal injection of saline 75 mg/kg; groups B, C and D were anesthetized by intraperitoneal injection of subanesthetic (10 mg/kg), sedation (30 mg/kg) and anesthetic (375 mg/kg) doses of 1% Propofol for 5 consecutive days. Morris water maze training was carried out and spatial memory was measured 20 min and 6-7 days after drug administration. On the 8th day after the first administration, the hippocampal tissues were obtained to measure the level of Tau protein phosphorylation, caspase-3 expression level and γ -amino butyric acid (GABA) level. **Results** With the increase of the days of drug administration and training, the escape latency was significantly shortened in the 4 groups ($P < 0.05$). The escape latency in the groups C and D

收稿日期: 2016-12-20

[通信作者] 黎仕煊, E-mail: lsh1982924@163.com; Tel: 13876346001

at different time points was significantly longer than that in the groups A and B ($P < 0.05$), and the escape latency in the group D was significantly longer than that in the group C ($P < 0.05$). In the search space experiments on the 7th day, the platform-crossing times of the groups C and D were significantly fewer than those of the group A and B ($P < 0.05$), and the platform-crossing times of the group D were significantly fewer than those of the group C ($P < 0.05$); the GABA content of the hippocampal tissues and the average optical density of positive cells were significantly higher in the groups C and D than in the groups A and B ($P < 0.05$), and significantly higher in the group D than in the group C ($P < 0.05$). **Conclusions** Sedation and anesthesia doses of Propofol can reduce the spatial memory in hyperlipidemia rats, which may be associated with high levels of GABA in hippocampus and Tau protein hyperphosphorylation.

Keywords: Propofol; hyperlipidemia; spatial memory; hippocampal tissue

麻醉是减轻高脂血症患者手术疼痛重要手段^[1]。然而,30%~50%的患者麻醉苏醒后出现认知功能障碍(postoperative cognitive dysfunction,POCD),临床表现为学习记忆功能减退(13.6%)、执行能力下降(8.4%)以及两者皆有(2.9%)^[2],因此,研究麻醉药物的作用机制,阐明其对高脂血症患者空间记忆能力和海马组织的影响,对于高脂血症手术患者临床麻醉具有重要意义。丙泊酚^[3]是常用的麻醉药物,起效快、作用时间短,副作用少。镇静和麻醉剂量的丙泊酚均会损伤高脂血症大鼠空间学习记忆能力,但其机制研究报道较少^[4]。本研究分别给高脂血症大鼠腹腔注射亚麻醉、镇静和麻醉剂量的丙泊酚,观察其对高脂血症大鼠的空间记忆及海马组织的影响,以期对丙泊酚临床应用剂量选择提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及模型复制

65 只健康成年雄性 SD 大鼠(南京江宁青龙山动物繁殖厂提供),体重(208 ± 18.4)g。所有大鼠复制模型前适应性喂养 2 周,随后依据随机数字表法分为 2 组:基础性喂养组(15 只)和高脂饲料喂养组(50 只),前者喂养基础饲料,后者喂养高脂饲料,喂养 6 周。高脂饲料配方如下:基础饲料 78.3%,猪油 10%,蛋黄粉 5%,蔗糖 5%,胆固醇(上海如吉有限公司)1%,脱氧胆酸钠 0.5%,丙基硫氧嘧啶 0.2%。待喂养 6 周后,分别随机抽取 10 只大鼠,尾静脉采血,全自动生化仪(日本 Olympus 公司)测定血脂,以高脂饲料喂养组血清胆固醇量高于基础性喂养组($P < 0.05$)视为复制模型成功^[5]。测定结果表明,高脂饲料喂养组血清胆固醇量(4.72 ± 0.41)mmol/L 高于基础性喂养组(2.70 ± 0.24)mmol/L ($P < 0.05$),复制模型成功。

1.2 分组方法及给药方案

将剩余高脂饲料喂养组 40 只大鼠随机分为 4

组,每组 10 只:A 组为对照组,腹腔注射生理盐水 75 mg/kg;B 组为亚麻醉剂量组,腹腔注射 10 mg/kg 丙泊酚(1%,阿斯利康);C 组为镇静剂量组,腹腔注射 30 mg/kg 丙泊酚;D 组为麻醉剂量组,腹腔注射 75 mg/kg 丙泊酚。所有大鼠在 1~5 d 的 Morris 水迷宫(上海移数有限公司)训练前 20 min 注射,6~7 d 不注射。D 组大鼠翻正反射恢复后 20 min 开始训练。

1.3 观察指标

1.3.1 空间记忆能力测试 采用 Morris 水迷宫检测^[6],主要包括航行定位能力和空间搜索能力。1~5 d 进行定位航行实验,即从离平台最远的第一象限,将大鼠背对着平台置于水中,记录大鼠找到平台的时间,若超过 120 s,则记为 120 s;第 6 天进行定位航行附加实验,即将入水点改为平台毗邻的左侧象限,其余操作同定位航行实验,记录时间;第 7 天进行空间搜索实验,撤掉平台,记录大鼠在 120 s 内穿过平台的次数。

1.3.2 海马组织 在第 8 天时,大鼠心脏灌注,断头取脑,取出海马组织,制备成标本,部分采用尼氏染色,观察海马组织神经元和椎体细胞状况;同时,取剩余组织,采用免疫组织化学染色的方法测定海马神经元 Tau 蛋白磷酸化水平和 Caspase-3 表达水平,并测定其中 γ 氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)水平。GABA 测定方法为:取海马组织置于 5 ml 容量瓶中,加入 2 ml 水,涡旋,超声 25 min,加入 1 ml 磺基水杨酸(4%),加水定容,离心 5 000 r/min,5 min,取上清液,0.45 μ m 滤膜过滤,L-8800 型氨基酸自动分析仪测定(日本 Hitachi 有限公司)。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 进行数据分析,数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间计量资料比较及重复测定计量资料比较采用方差分析,在方差分析的基础上采用 SNK- q 检验进行两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同剂量丙泊酚对大鼠航行能力的影响

随着给药和训练天数增加,4 组大鼠的逃避潜伏期经方差分析,差异有统计学意义(见表 1);C 组和 D 组大鼠同一时间点的逃避潜伏期与 A 组和 B 组比较,差异有统计学意义(C 组和 A 组比较,C 组和 B 组比较,D 组和 A 组比较,D 组和 B 组比较,均 $P=0.000$),且 D 组大鼠同一时间点的逃避潜伏期与

表 1 不同剂量丙泊酚对大鼠航行能力的影响 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	F 值	P 值
A 组	78.3 ± 5.1	69.4 ± 7.1	45.1 ± 3.9	26.0 ± 2.8	20.9 ± 2.6	15.9 ± 1.9	377.821	0.000
B 组	79.1 ± 6.0	71.0 ± 6.2	45.9 ± 4.0	25.8 ± 3.2	23.1 ± 2.0	20.1 ± 2.9	350.558	0.000
C 组	91.6 ± 4.0	81.0 ± 4.3	65.9 ± 5.1	43.7 ± 7.1	33.8 ± 2.5	28.1 ± 3.2	325.107	0.000
D 组	103.5 ± 10.6	91.7 ± 6.7	83.1 ± 4.3	63.2 ± 10.7	54.3 ± 5.3	48.9 ± 5.0	83.922	0.000

2.3 海马组织尼氏染色结果比较

4 组大鼠 CA1 区海马锥体细胞层和颗粒细胞层均为带状分布,尼氏小体体积大,数量多,排列紧凑,无细胞缺失,颜色较深。见图 3。

2.4 海马组织中 Caspase-3 表达和 GABA 含量比较

C 组和 D 组大鼠海马组织中 GABA 含量与 A 组和 B 组比较,差异有统计学意义(C 组和 A 组比较, $q=8.744, P=0.000$;C 组和 B 组比较, $q=7.693, P=0.000$;D 组和 A 组比较, $q=14.411, P=0.000$;D 组和 B 组比较, $q=13.360, P=0.000$),D 组大鼠海马组织中 GABA 含量与 C 组比较,差异有统计学意义 ($q=5.667, P=0.000$)。见图 4。

2.5 海马组织中 Tau 磷酸化比较

C 组 (32.4 ± 3.8)和 D 组 (40.5 ± 2.4)大鼠海马 CA3 区阳性细胞平均光密度值与 A 组 (18.0 ± 2.3)和 B 组 (20.3 ± 2.1)比较,差异有统计学意义(C 组与 A 组比较, $q=16.665, P=0.000$;C 组与 B 组比较, $q=13.995, P=0.000$;D 组与 A 组比较, $q=26.024, P=0.000$;D 组与 B 组比较, $q=23.364, P=0.000$),且 D

C 组比较,差异有统计学意义(均 $P=0.000$)。见图 1。

2.2 不同剂量丙泊酚对大鼠空间搜索能力的影响

第 7 天空间搜索实验时,C 组和 D 组大鼠穿越平台次数与 A 组和 B 组比较,差异有统计学意义(C 组和 A 组比较, $q=9.730, P=0.000$;C 组和 B 组比较, $q=6.325, P=0.000$;D 组和 A 组比较, $q=17.028, P=0.000$;D 组和 B 组比较, $q=13.622, P=0.000$),D 组大鼠穿越平台次数与 C 组比较,差异有统计学意义 ($q=7.298, P=0.000$)。见图 2。

组大鼠平均光密度值与 C 组比较,差异有统计学意义 ($q=9.369, P=0.000$)。见图 5、6。

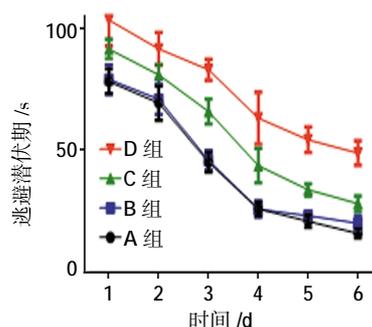


图 1 不同剂量丙泊酚对大鼠航行能力的影响

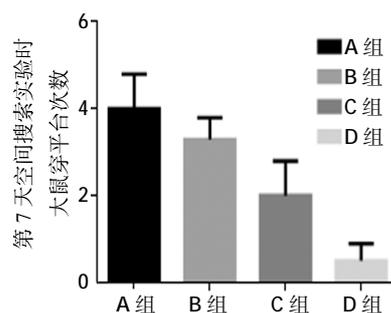


图 2 不同剂量丙泊酚对大鼠空间搜索能力的影响

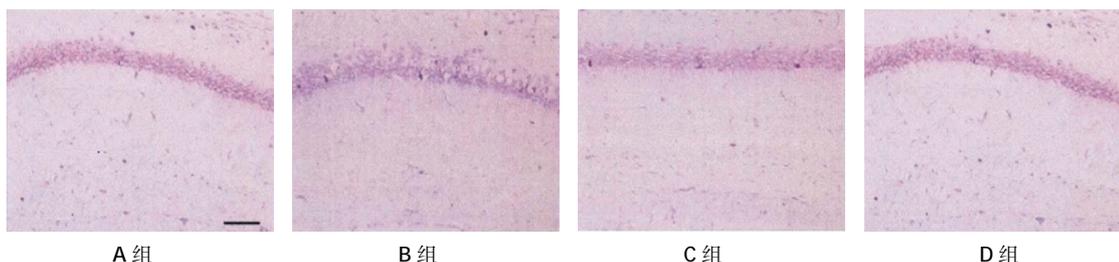


图 3 4 组大鼠海马组织尼氏染色结果 (100 μm)

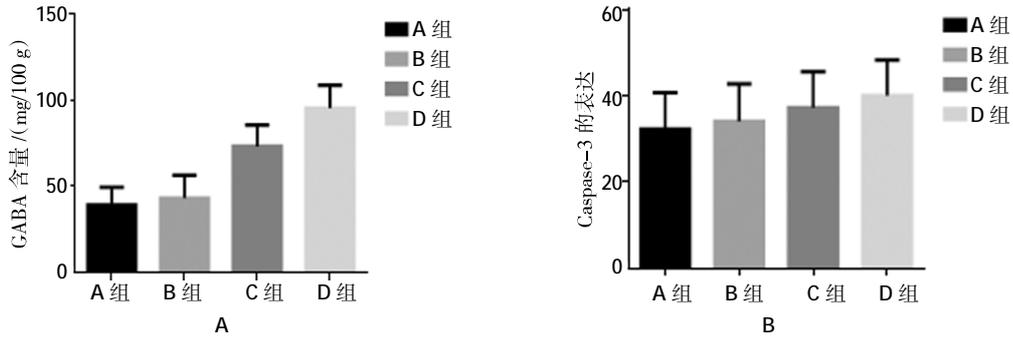


图 4 海马组织中 GABA 含量(A)和 Caspase-3 表达(B)

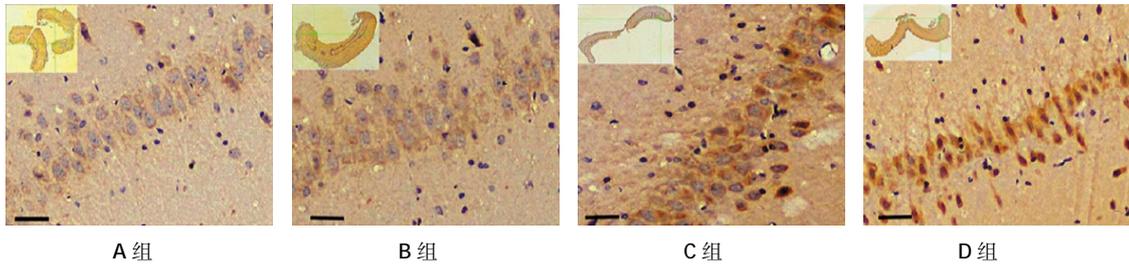


图 5 不同剂量丙泊酚对大鼠 Tau 磷酸化的影响 (× 300)

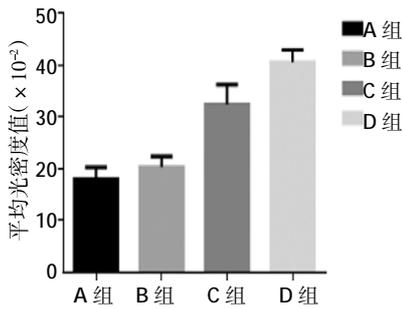


图 6 不同剂量丙泊酚对大鼠 Tau 磷酸化的影响

3 讨论

随着医疗水平的提高,外科手术的焦点已从降低死亡率转变为减少心脑血管系统的并发症发生率^[7]。研究表明^[8],麻醉和高血脂是引起术后大脑并发症的高危因素,患者多表现为谵妄、中风和认知功能障碍。丙泊酚是临床常用的麻醉药物之一,有研究表明^[9],丙泊酚麻醉患者术后常伴有不同程度的认知功能障碍,患者学习和记忆能力下降,可能与丙泊酚抑制海马乙酰胆碱的释放有关,但目前对于丙泊酚对认知功能影响的机制仍存争议。

海马是学习记忆的关键部位,而 Morris 水迷宫是学习和记忆研究的最佳模型,动物的逃避潜伏期与其空间信息获取能力呈正相关;在空间搜索实验时,穿越平台次数越多,记忆越强。本研究中,高脂血症大鼠丙泊酚给药后,1~5 d 进行定位航行实验时,

大鼠逃避潜伏期逐渐缩短,符合学习记忆图的趋势,但组间比较时,C 组和 D 组大鼠不同时间点的逃避潜伏期高于 A 组和 B 组,D 组大鼠不同时间点的逃避潜伏期高于 C 组,表明镇静和麻醉剂量的丙泊酚干扰了大鼠定位和寻找平台的能力,且随着剂量增加,这种干扰作用越强。在第 6 天时,C 组和 D 组大鼠不同时间点的逃避潜伏期高于 A 组和 B 组,D 组大鼠不同时间点的逃避潜伏期高于 C 组,表明停药 1 d 时,大鼠的空间学习记忆能力仍未恢复;第 7 天空间搜索实验时,C 组和 D 组大鼠穿越平台次数低于 A 组和 B 组,且 D 组低于 C 组,说明 C、D 组大鼠空间记忆能力下降,且 D 组下降更为严重。而在整个空间记忆实验时,A 组和 B 组的逃避潜伏期、穿越平台次数均无统计学差异,说明单次或多次的腹腔注射亚麻醉剂量的丙泊酚均不会影响高脂血症大鼠的学习记忆功能,与 VESELIS 等^[10]研究一致。

目前,丙泊酚对学习记忆功能影响及其机制研究报道均以海马研究最多。丙泊酚主要作用于突触,通过调节突触前膜递质释放和前后膜受体的功能起到麻醉作用。在麻醉过程中,丙泊酚可改变突触形态,从而抑制神经冲动传递,使得海马突触致密物变薄、活性区域减少,进而降低大鼠空间学习记忆能力^[11]。丙泊酚降低大鼠学习记忆能力可从 3 个方面分析:①中枢神经系统 Glu/GABA 是调控学习记忆的重要组分,其中 Glu 起正性调节作用,GABA 起负性调节作用,同时也是丙泊酚麻醉的作用点。对灵

长类动物研究显示^[12], GABA 的作用减弱或增强均会损伤记忆功能。本研究中, C 组和 D 组大鼠海马组织中 GABA 含量高于 A 组和 B 组, 且 D 组大鼠海马组织中 GABA 含量高于 C 组, 表明丙泊酚可通过升高 GABA 含量而影响大鼠认知功能, 并呈剂量依赖性。②研究表明^[13], 全身麻醉药物可能引起大鼠神经元凋亡或退行性改变, 引起神经后遗症, 如 DMITRIEV 等^[14]发现 60 mg/kg 的丙泊酚会引起 10 d 幼鼠脑神经细胞退行性改变。本研中, 4 组大鼠海马组织中表达 Caspase 的细胞数目无统计学差异, HE 染色显示神经细胞正常, 可能是由于本实验采用的成年大鼠所致。③老年斑和 Tau 蛋白过度磷酸化是阿尔茨海默病(AD)发病的关键步骤, 而 AD 患者主要表现为学习记忆能力下降, LUAN 等^[15]证实了老年斑和 Tau 蛋白过度磷酸化与麻醉术后认知功能障碍相关。Tau 蛋白过度磷酸化会导致微管崩解, 轴突变性, 导致神经递质的合成、运输释放以及摄取等受到影响, 导致神经细胞间物质运输障碍而引起神经退行性变。张亮等^[16]推测丙泊酚损伤大鼠学习记忆能力与老年斑和 Tau 蛋白过度磷酸化有关。本研究中, C 组和 D 组大鼠海马 CA3 区阳性细胞平均光密度值高于 A 组和 B 组, 且 D 组大鼠平均光密度值高于 C 组, 说明学习记忆能力与 Tau 蛋白过度磷酸化密切相关, 但这种相关性还有待于进一步研究。

总之, 单次或多次的腹腔注射亚麻醉剂量的丙泊酚均不会影响高脂血症大鼠的学习记忆功能, 而镇静和麻醉剂量的丙泊酚会降低高脂血症大鼠的学习记忆能力, 剂量越高, 损伤越为严重, 其机制可能与 GABA 的高水平及 Tau 蛋白过度磷酸化有关。

参 考 文 献:

- [1] 高少龙, 何绍明. 全身麻醉药在蛋白模型和离子通道的分子靶位及变构调节机制[J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2014, 35(1): 72-74.
- [2] 郝学超, 闵苏. 术后认知功能障碍神经炎症机制研究进展[J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2014, 35(1): 47-51.
- [3] KIM J, IN S, PARK Y, et al. Quantitative analysis of propofol-glucuronide in hair as a marker for propofol abuse[J]. Analytical and bioanalytical chemistry, 2013, 405(21): 6807-6814.
- [4] GAO J, PENG S, XIANG S, et al. Repeated exposure to propofol impairs spatial learning, inhibits LTP and reduces CaMKII α in young rats[J]. Neuroscience Letters, 2014, 560(26): 62-66.
- [5] 王琼, 乐薇, 覃鹏飞, 等. 三种高脂血症实验性大鼠模型的比较[J]. 中国康复, 2010, 25(5): 330-331.
- [6] 樊睿, 朱昭琼, 彭晶, 等. 乳异氟醚麻醉对大鼠海马淀粉样 β 蛋白表达及 Tau 蛋白磷酸化水平的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2013, 33(3): 302-305.
- [7] WANG Y, XU W, YANG X, et al. Recurrent Upper cervical chordomas after radiotherapy: Surgical outcomes and surgical approach selection based on complications [J]. Spine, 2013, 38(18): 1141-1148.
- [8] 倪旭青, 熊威威, 王华, 等. 依托咪酯和丙泊酚对新生大鼠认知功能及海马组织的影响[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2013, 22(1): 9-11.
- [9] ROBERT E H, DONG S, IOAN O, et al. Facilitation of memory encoding in primate hippocampus by a neuroprosthesis that promotes task-specific neural firing[J]. Journal of Neural Engineering, 2013, 10(6): 1-16.
- [10] VESELIS R A, REINSEL R A, FESHCHENKO V A. Information loss over time defines the memory defect of propofol: a comparative response with thiopental and dexmedetomidine [J]. Anesthesiology, 2004, 101(27): 831-841.
- [11] ZHANG J, ZHANG X, JIANG W, et al. Propofol impairs spatial memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal matrix metalloproteinase-9 levels in rat [J]. Neuroreport, 2013, 24(15): 831-836.
- [12] THANAPREEDAWAT P, KOBAYASHI H, INUI N, et al. GABA affects novel object recognition memory and working memory in rats[J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2013, 59(2): 152-157.
- [13] 杨静, 李萌萌. 全身麻醉药物导致发育大脑神经凋亡的可能机制[J]. 感染、炎症、修复, 2015, 28(1): 59-61.
- [14] DMITRIEV A, HAGGLUND C, CHEN S, et al. Enhanced Nanoplasmonic Optical Sensors with Reduced Substrate Effect [J]. Nano letters, 2008, 8(11): 3893-3898.
- [15] LUAN K, ROSALES J L, LEE K Y. et al. Viewpoint: Crosstalks between neurofibrillary tangles and amyloid plaque formation[J]. Ageing Research Reviews, 2013, 12(1): 174-181.
- [16] 张亮, 陈世骄, 陈伯成, 等. 丙泊酚对高脂血症大鼠空间学习记忆功能的影响及机制[J]. 广西医科大学学报, 2014, 31(2): 181-185.

(张蕾 编辑)