

· 基础研究 ·

七氟烷对成年大鼠认知功能影响的研究

李志山, 郑李娜*, 郭永清

(山西省人民医院麻醉科, 太原 030012)

【摘要】目的 探讨不同浓度(1%, 2%, 3%)七氟烷对成年大鼠的认知功能及血清、海马组织中神经元特异性烯醇化酶(NSE)的影响。**方法** 将40只成年雄性SD大鼠随机分为1%七氟烷组、2%七氟烷组、3%七氟烷组及对照组(吸入空气), 七氟烷吸入3h。处理后第1, 2, 3, 4, 5天进行Morris水迷宫的定位航行试验和第6天的空间探索试验。第6天测试完毕后取大鼠的血清和海马组织测定NSE的含量。**结果** 吸入不同浓度七氟烷组与对照组相同时间点比较, 逃避潜伏期和总路程差异无统计学意义($P > 0.05$)。同时, 不同浓度七氟烷组间比较, 逃避潜伏期和总路程差异也无统计学意义($P > 0.05$)。吸入七氟烷或空气后第6天撤台, 各组大鼠的目标象限停留时间百分比和穿越平台次数之间差异也无统计学意义($P > 0.05$)。吸入1%和3%七氟烷组大鼠血清中NSE水平低于对照组($P < 0.01$); 同时, 吸入2%和3%七氟烷组大鼠血清中NSE水平高于吸入1%七氟烷组($P < 0.01$, $P < 0.05$)。海马组织中的NSE含量各组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 单次吸入1%, 2%和3%的七氟烷, 短期不影响成年大鼠的空间学习记忆能力。同时, 吸入1%和3%七氟烷可以降低大鼠血清中NSE水平。

【关键词】 认知功能障碍; 七氟烷; Morris水迷宫; 磷酸丙酮酸水合酶

【中图分类号】 R749

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2013.00135

Effects of sevoflurane on cognitive dysfunction in adult rats

LI Zhi-Shan, ZHENG Li-Na*, GUO Yong-Qing

(Department of Anesthesiology, Shanxi Provincial People's Hospital, Taiyuan 030012, China)

【Abstract】 Objective To determine the effect of sevoflurane at different doses (1%, 2%, 3%) on cognitive function and contents of neuron specific enolase (NSE) in the serum and hippocampus in adult rats. **Methods** Forty male adult Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into the following three treatment groups and control. The rats from the three treatment groups were exposed to 1%, 2% and 3% sevoflurane for 3h, respectively, while those of control were exposed to air. The navigation tests in Morris water maze (MWM) were performed on day 1, 2, 3, 4 and 5 after the treatment, and the pilot tests in MWM were performed on day 6. Blood samples and hippocampal tissues were collected from the rats in each group after the pilot tests on day 6 after the measurement for the content of NSE by enzyme linked immunosorbent assay. **Results** No significant difference was found in the escape latency and path length between the sevoflurane groups and control ($P > 0.05$), and among sevoflurane groups of different doses ($P > 0.05$). There was no significant difference in the mean percentage of crossing platform quadrant and the frequency of crossing platform among the four groups ($P > 0.05$). The serum level of NSE was significantly lower in the 1% and 3% sevoflurane groups than in the control ($P < 0.01$), and it was obviously higher in the 2% and 3% sevoflurane groups than in the 1% sevoflurane group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). No significant difference was seen in the hippocampal content of NSE in the rats from the four groups ($P > 0.05$). **Conclusion** The single exposure of sevoflurane at different doses has no short-term impact on the learning and memory in adult rats. The serum NSE level is decreased after exposure to 1% and 3% sevoflurane.

【Key words】 cognitive dysfunction; sevoflurane; Morris water maze; neuron specific enolase

Corresponding author: ZHENG Li-Na, E-mail: baby123zheng@163.com

术后认知功能障碍 (postoperative cognitive dysfunction, POCD) 是指患者在术前没有精神异常的表现, 在围术期多种因素影响下, 出现脑功能紊

乱, 表现为焦虑、认知、行为、意志的改变及记忆受损等^[1]。研究表明, 早期POCD多与高龄、麻醉时间长、教育水平低、术后肺部并发症、患者二次手

术和术后感染等因素有关,全身麻醉药的过度作用被认为是引起POCD的主要诱因之一^[2]。七氟烷由于具有诱导、苏醒迅速,刺激性小等优点,在临床麻醉中被广泛使用。但七氟烷麻醉是否会影响患者的学习、记忆能力,仍存在争议。本研究拟通过Morris水迷宫(Morris water maze, MWM)实验及检测血清、海马组织中神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)的水平,来推测七氟烷是否影响成年大鼠的空间学习记忆能力。

1 材料与方法

1.1 药品和仪器

七氟烷(美国雅培制药有限公司,批号0527, 250ml/瓶),NSE测定试剂盒(上海蓝基生物科技有限公司),MWM及图像自动监测系统(中国医学科学院药物研究所)。

1.2 实验动物及分组

健康成年雄性Sprague-Dawley大鼠40只(体重350~400g,由山西医科大学动物室提供)随机分成4组,每组10只:(1)1%七氟烷组;(2)2%七氟烷组;(3)3%七氟烷组;(4)对照组(吸入空气),3个实验组分别采用1%,2%,3%的七氟烷麻醉3h,而对照组不做任何处理。

1.3 麻醉方法

麻醉箱为透明塑料材质,外形大小为55cm×45cm×40cm。麻醉气体由麻醉机(Datex-Ohmeda公司,芬兰)输出端输出,由箱子一侧距顶部5cm一小孔进入箱内,在箱子另一侧壁再留一小孔与麻醉机输出端连接和麻醉气体监测仪相连,持续监测七氟烷浓度。麻醉箱内部分为上下两层,下层铺有钠石灰吸收CO₂,以防止麻醉箱内CO₂蓄积。麻醉前1天,先将大鼠置于麻醉箱内,让其自由活动15min,以熟悉麻醉箱内的环境,防止麻醉初期出现惊恐不安。大鼠麻醉苏醒1h后,恢复饲养。

1.4 Morris水迷宫测试

水迷宫为一直径150cm、高50cm的圆形水池,水池内壁及底部均被漆为黑色,池内水深约25cm,水温保持在(22±2)℃,房间内光照恒定,无光线反射在水池内。池壁上以4个等距离点将水池分为4个象限,在目标象限(设为第二象限)中央处放一个直径为12cm、高23cm的圆形黑色站台,站台位于水面下约2cm。池壁内贴有不同形状及颜色的标记物。迷宫上方安置着连接显示系统的摄像机,同步

记录大鼠运动。采用MWM视频分析系统进行信息处理,该系统能动态记录大鼠在水迷宫中游泳的录像资料,设定分析参数,进行在线或离线数据分析。

(1)定位航行实验:每次将大鼠放入水中前,先将大鼠置于平台上适应约15s,随后将大鼠随机从不同象限的入水点面壁放进水池中,将电脑设计为大鼠登上平台3s后终止记录,该记录为寻找平台的潜伏期时间,本实验设计最长记录时间为60s,若大鼠在60s内仍然不能上台,则认为其逃避潜伏期为60s,并引导其登上平台适应15s,每次测试结束擦干后放入鼠笼,每只大鼠每天分别在4个象限各测试1次,一直持续5d。通过测量平台的潜伏期时间,评价大鼠的空间学习记忆能力;通过大鼠游泳的平均总路程来判断大鼠的活动能力。(2)空间探索实验:在实验的第6天,撤除站台,然后将各只大鼠随机从第一、四象限面壁放入池内,各测试1次,同步记录大鼠在60s内的游泳轨迹并对其进行分析。通过测量大鼠在目标象限活动时间的比率和穿越平台的次数,以评判大鼠的空间记忆能力。

1.5 血清及海马组织中NSE测定

在吸入七氟烷或空气后第6天,完成空间探索实验后,将每组存活大鼠,腹腔注射水合氯醛(2%,50mg/kg)麻醉,固定于清洁的操作台上,从尾静脉采集5ml血液置于离心管中,静置约5min后,用离心机3000×g,离心5min,分离血清,将血清分为两份置于-80℃冰箱保存。采用酶联免疫吸附试验测定血清中NSE浓度。取血后,断头,在冰皿中分离出海马,用生理盐水清洗干净,装入试管,-80℃冰箱保存。测试时,解冻后制作成10%的溶浆,离心取上清液,采用酶联免疫吸附试验测定NSE在海马组织中的浓度。

1.6 统计学处理

应用SPSS15.0统计软件进行统计学分析。实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。MWM实验数据采用重复测量资料的方差分析,其他数据采用单因素方差分析。检验水准取 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠认知功能测试结果

定位航行实验表明,在同一时间点,吸入不同浓度七氟烷的实验组与对照组相比,大鼠的平均逃避潜伏期和总路程差异均无统计学意义($P > 0.05$;图1);同时,不同浓度七氟烷组间比较,大鼠的平均逃避潜伏期和总路程差异也无统计学意义($P > 0.05$;图1)。吸入七氟烷或空气后第6天的空间探索实验结果表明,各组大鼠

的目标象限停留时间百分比和平均穿越平台次数差异也无统计学意义 ($P > 0.05$; 图2)。

2.2 大鼠血清及海马组织中NSE含量

1%七氟烷组和3%七氟烷组大鼠血清中NSE浓度低于对照组 ($P < 0.01$; 图3A); 同时, 2%七氟烷组和3%七氟烷组大鼠血清中NSE浓度高于1%七氟烷组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$; 图3A)。大鼠10%海马组织溶浆中NSE含量, 各组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$; 图3B)。

3 讨论

研究表明, POCD是手术和麻醉诱发的, 多种因素联合作用所致神经功能减退。因此了解术前、术中及术后可能存在的诱发因素, 尽量避免并及时处理, 对手术的顺利进行和术后康复, 减少POCD的发生具

有重要的意义。一些研究认为全身麻醉可以损害大鼠的空间记忆能力^[3], 但其机制仍然不十分清楚。

研究显示, 成年大鼠七氟烷的最低肺泡浓度 (minimum alveolar concentration, MAC) 为2.5%^[4], 而满足常用临床手术所需最低有效肺泡浓度为1.2~1.3MAC。方强等^[5]研究发现, 0.65MAC的七氟烷麻醉对大鼠短期学习记忆能力无明显的影响。因此本研究中, 我们选用了1%七氟烷、2%七氟烷、3%七氟烷3种吸入浓度进行研究比较。

MWM是一种研究与海马功能直接相关的空间学习记忆模型^[6,7], 逃避潜伏期直接反映了空间信息获取的学习能力, 空间探索实验反映了记忆储存及提取再现的能力。本研究中, 各组成年大鼠在定位航行试验中, 平均逃避潜伏期和总路程等指标差异均无统计学

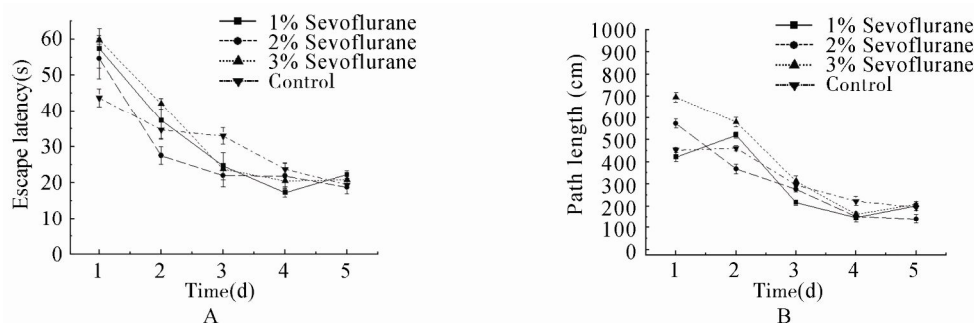


图1 定位航行实验中吸入不同浓度七氟烷大鼠的逃避潜伏期(A)和总路程(B)

Figure 1 Effects of different dosages of sevoflurane treatment on the escape latency (A) and path length (B) during the place navigation test in rats

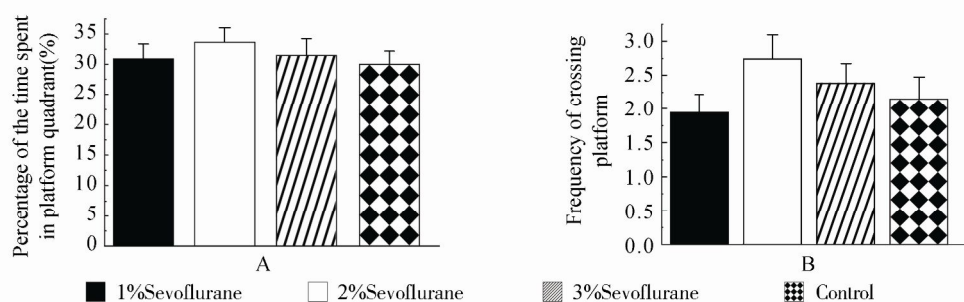


图2 空间探索实验中吸入不同浓度七氟烷大鼠的目标象限停留时间百分比(A)和平均穿越平台次数(B)

Figure 2 Effects of different dosages of sevoflurane treatment on the percentage of the time spent in the target quadrant (A) and crossing platform frequency (B) during the spatial probe test in rats

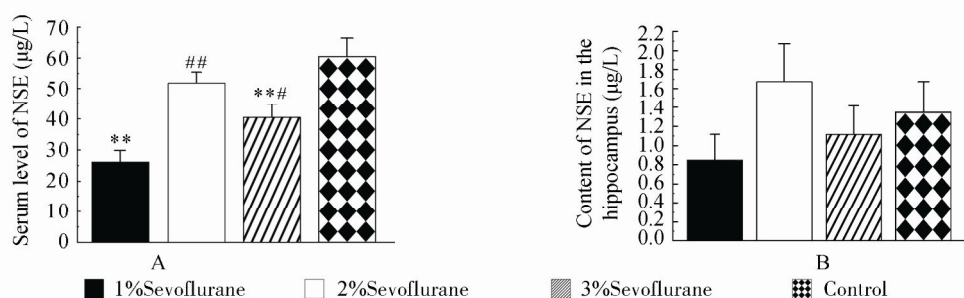


图3 吸入不同浓度七氟烷大鼠血清中NSE含量(A)和海马组织中NSE含量(B)

Figure 3 Effects of different dosages of sevoflurane treatment on the NSE in the serum (A) and NSE in the hippocampus (B) in rats
NSE: neuron specific enolase. Compared with control group, ** $P < 0.01$; Compared with 1% sevoflurane group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

意义,说明单次吸入1%七氟烷、2%七氟烷、3%七氟烷麻醉对成年大鼠空间学习能力没有明显影响。在空间探索实验中,各组大鼠目标象限停留时间百分比、穿越平台次数上差异均无统计学意义,说明七氟烷麻醉对大鼠空间记忆能力没有影响。但是余高明等[8]的研究发现,单次吸入3%七氟烷2h可导致成年大鼠麻醉后1d内自发活动减少,2个月内空间学习与记忆能力损伤。由于本实验只进行了单次吸入七氟烷3h后6d内的行为学的研究,其长期空间学习记忆能力是否有影响有待进一步研究。徐敏等^[9]研究发现,1MAC七氟烷麻醉结束后早期,麻醉组小鼠在水迷宫训练期第2~4天的潜伏期和游泳路程较对照组明显缩短,而在反映长期记忆能力的探索实验中,麻醉组小鼠在平台象限滞留时间和平台象限滞留时间百分比明显长于对照组,这说明七氟烷能增强学习和记忆能力。本研究中,大鼠的行为学结果差异无统计学意义,可能与单次吸入七氟烷且样本量小有关,我们会在后续的实验中,继续加大样本量和测试时间,来更加深入细致地研究七氟烷对大鼠的行为学影响。

海马是参与学习记忆的主要脑功能区,与认知功能有着密切的联系^[10-12]。正常情况下,血液中NSE含量很低,当中枢神经系统损伤时,NSE才从神经元中释放出来,通过血脑屏障进入血液和脑脊液,故检测血清NSE含量可反映神经元死亡的程度^[13,14]。本研究表明,吸入七氟烷不但没有引起NSE的升高,而且吸入1%、3%七氟烷可以减少血清中的NSE水平,其具体机制还需进一步的实验研究。虽然海马组织溶解中NSE水平差异无统计学意义,但海马组织中NSE水平和血清中的NSE趋势相似。

综上所述,单次吸入1%、2%和3%的七氟烷,短期内不影响成年大鼠的空间学习记忆能力。同时血清中NSE水平的降低,表明吸入1%和3%的七氟烷不会引起大鼠神经元细胞的损害。

致谢

特别感谢山西医科大学实验室张华屏老师在实验中给予的指导和帮助;还要感谢山西医科大学公共卫生学院提供实验室及动物实验中心的帮助。

【参考文献】

- [1] Saravay SM, Kaplowitz M, Kurek J, *et al.* How do delirium and dementia increase length of stay of elderly general medical inpatients[J]. *Psychosomatics*, 2004, 45(3): 235-242.
- [2] 蔡一榕, 薛张纲, 朱 彪. 患者术后认知功能障碍的危险因素分析[J]. *临床麻醉学杂志*, 2006, 22(8): 608-610.
- [3] 蒯建科, 姚立农, 于代华, 等. 异氟醚对新生大鼠认知功能的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2006, 26(8): 717-719.
- [4] Kashimoto S, Furuwa A, Nonaka A, *et al.* The minimum alveolar concentration of sevoflurane in rats[J]. *Eur J Anaesthesiol*, 1997, 14(4): 359-361.
- [5] 方 强, 张 焰, 李国君, 等. 不同浓度七氟烷对老年大鼠认知功能的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2009, 29(1): 44-46.
- [6] Maei HR, Zaslavsky K, Teixeira CM, *et al.* What is the most sensitive measure of water maze probe test performance[J]. *Front Integr Neurosci*, 2009, 3: 4.
- [7] Maei HR, Zaslavsky K, Wang AH, *et al.* Development and validation of a sensitive entropy-based measure for the water maze[J]. *Front Integr Neurosci*, 2009, 3: 33.
- [8] 余高明, 谢 红, 张力元, 等. 七氟烷对成年大鼠行为学的影响[J]. *江苏医药*, 2011, 37(14): 1637-1639.
- [9] 徐 敏, 陆志俊, 张富军. 七氟醚对小鼠空间学习和记忆能力的影响[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2011, 31(2): 182-186.
- [10] Hernandez-Rabaza V, Llorens-Martin M, Velazquez-Sanchez C, *et al.* Inhibition of adult hippocampal neurogenesis disrupts contextual learning but spares spatial working memory long-term conditional rule retention and spacial reversal[J]. *Neuroscience*, 2009, 159 (1): 59-68.
- [11] Ramis M, Sarubbo F, Sola J, *et al.* Cognitive improvement by acute growth hormone is mediated by NMDA and AMPA receptors and MEK pathway[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2013. [Epub ahead of print]
- [12] Zhang X, Herrmann U, Weyer SW, *et al.* Hippocampal Network Oscillations in APP/APLP2-Deficient Mice[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61198.
- [13] 王 琨, 李彦敏. NSE、S-100蛋白与脑损伤关系的研究[J]. *脑与神经疾病杂志*, 2009, 17(5): 396.
- [14] Jain S, Yoon SY, Leung L, *et al.* Cellular source-specific effects of apolipoprotein (apo) E4 on dendrite arborization and dendritic spine development[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59478.

(编辑: 周宇红)