文章编号:1000-5404(2009)23-2363-04

论著

异氟烷对老年大鼠海马胆碱乙酰转移酶的作用和空间学习记忆的影响

罗铁山,陶国才,易 斌,李 鹏,石胜驰 (第三军医大学西南医院麻醉科,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨异氟烷对老年大鼠海马胆碱乙酰转移酶(choline acetyltransferase,ChAT)表达的作用和空间学习记忆的影响。**方法** 20月龄老年雄性SD大鼠54只,随机分为3组($n=18$)。A组(对照组):吸入30%氧气的空氧混合气体6 h;B组(异氟烷单次吸入组):单次吸入1.2%异氟烷和30%氧气的空氧混合气体6 h;C组(异氟烷多次吸入组):吸入1.2%异氟烷和30%氧气的空氧混合气体2 h,1次/d,连续3 d。各组处理中随机抽取5只行血气分析,5只完成处理24 h后处死取脑分离海马,免疫组化法和RT-PCR法检测ChAT的表达,剩余行Morris水迷宫实验检测大鼠的空间学习记忆功能,持续6 d。**结果** 与A组比较,B、C组海马ChAT mRNA及蛋白表达下调($P<0.05$);2~5 d的逃避潜伏期延长($P<0.05$);学习记忆曲线后移,B、C组至第4天渐趋稳定,而A组第3天趋于稳定;停留原平台象限的时间和穿越原平台次数减少($P<0.05$);B、C组差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 异氟烷可引起老年大鼠短期空间学习记忆功能减退,其机制可能与海马ChAT表达下调有关。

关键词:异氟烷;胆碱乙酰转移酶;海马;空间学习记忆功能
中图法分类号:R338.26;R338.64;R971.2 **文献标识码**:A

Effects of isoflurane on hippocampal ChAT expression and spatial learning and memory in aged rats

LUO Tie-shan, TAO Guo-cai, YI Bin, LI Peng, SHI Sheng-chi (Department of Anesthesia, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effect of isoflurane on the expression of choline acetyltransferase (ChAT) in the hippocampus and spatial learning and memory function in aged rats. **Methods** A total of 54 20-month Sprague-Dawley male rats, were randomly divided into 3 groups with 18 rats each group. Group A (control group) received a breath of 30% oxygen and air mixed gas for 6 h; Group B (Single inhalation of isoflurane group) were anesthetized with 1.2% isoflurane, 30% oxygen and air mixed gas for 6 h; Group C (Repeated inhalation of isoflurane group) were anesthetized with 1.2% isoflurane, 30% oxygen and air mixed gas 2 h every day for 3 d. Five rats were randomly selected from each group for the arterial blood gas analysis in the course of treatment. Another five rats randomly selected from each group were killed and their hippocampus were immediately isolated for detection of ChAT expression by immunohistochemical assay and RT-PCR in 24 h after treatment. The spatial learning and memory function of 24 remained rates was assessed with Morris water-maze test form 1 d to 6 d after treatment. **Results** The expression levels of mRNA and protein of ChAT in the hippocampus was significantly lower in group B and group C than group A ($P<0.05$). At day 2, 3, 4 and 5 after treatment, the escape latency in group B and group C was observed significantly longer compared with that of group A ($P<0.05$). Learning and memory curve was shift right in group B and group C, and turned to be stable at the 4th day but at the 3rd day in group A. The results of Morris water-maze test showed that the frequency of crossing the original platform and the time consumption of staying the original platform quadrant was lower in group B and group C than those in group A ($P<0.05$). No significant differences was found between group B and group C ($P>0.05$). **Conclusion** Isoflurane reduces the short-term spatial learning and memory function in aged rats and this effects may be induced by the decrease of ChAT expression in the hippocampus.

Key words: isoflurane; choline acetyltransferase; hippocampus; spatial learning and memory function

术后认知功能障碍(postoperative cognitive dysfunction,POCD)在老年患者发病率高、危害性大,机制不明。既往的研究[1,2]认为,常用麻醉药可影响POCD的发生。近年来研究证实海马胆碱能神经元的损伤是

作者简介:罗铁山,男,湖南省新化县人,硕士研究生,主治医师,主要从事麻醉与术后认知功能障碍方面的研究。E-mail:mxjlts888@126.com
通信作者:陶国才,E-mail:tgctsc@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2009-06-08;修回日期:2009-07-21

认知功能受损害的形态学基础。但作为目前临床上应用最为广泛的吸入麻醉药异氟烷对 POCD 的影响研究较少，能否通过损伤海马胆碱能神经系统而引发 POCD 尚有待研究。因此本研究观察异氟烷对老年大鼠海马神经元胆碱乙酰转移酶（choline acetyltransferase，ChAT）表达及空间学习记忆的影响，旨在为 POCD 的防治提供可能的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及处理

健康 20 月老年 SD 大鼠 54 只，雄性，体质量 500～600 g（成都达硕动物有限公司，批号：0487381），随机分为 3 组（n = 18）。正常对照组（A 组）：在麻醉箱中吸入含有 30% 氧气的空氧混合气体 6 h；1.2% 异氟烷（美国雅培制药有限公司，批号 8670828，100 ml/瓶）单次吸入组（B 组）：吸入 1.2% 异氟烷 6 h；1.2% 异氟烷多次吸入组（C 组）：吸入 1.2% 异氟烷 2 h，1 次/d，连续 3 d。B、C 组吸入异氟烷过程中保持麻醉箱内氧浓度 30%。麻醉模型建立采用自制透明麻醉吸入箱实施，麻醉箱一侧孔接 Drager Fabius 型麻醉机（德国），一侧孔接 solar 8000M 型多功能监测仪（美国）监测流出气体中异氟烷浓度，麻醉中监测血氧饱和度和行血气分析，即各组随机抽取 5 只在 1、2、4、6 h 时间点取动脉血 ABL 700 血气分析仪（丹麦）进行血气分析，其后脱离实验。24 h 后各组分别随机抽取 5 只取脑分离海马进行免疫组化和 RT-PCR 实验，各组剩余 8 只进行 Morris 水迷宫实验。麻醉中维持体温正常、二氧化碳无蓄积。

1.2 学习和记忆的实验测试

隐蔽平台实验：实验前 1 d，大鼠自由游泳 2 min 以适应周围环境，各组处理 24 h 后，进行 Morris 水迷宫测试，参考黄忠仕等[3]的方法进行。实验历时 5 d，每天在同一时间点从不同象限将大鼠面向池壁放入水中，记录其在 120 s 内寻找到平台的时间（逃避潜伏期），取四个象限总的时间为当日学习成绩。探索试验：隐蔽平台试验后第 2 天撤除平台，将大鼠从距原平台最远象限投入水中，记录其 120 s 内在原平台象限游泳的时间及穿越原平台的次数。

1.3 海马神经元 ChAT 表达的检测

1.3.1 免疫组化染色 3 组在处理 24 h 后分别随机抽取 5 只大鼠，10% 水合氯醛腹腔麻醉成功后，取脑并分离一侧海马置于 10% 甲醛固定，常规石蜡切片，片厚 4 μm，脱腊至水，加入兔抗大鼠 ChAT 抗体（ABCM 公司产品，稀释比例为 1∶250），正常对照片以 PBS 代替一抗，滴加 PV-6001，DAB 显色。每个动物随机取 2 张切片，每张切片在 400 物镜下随机选取 3 个视野（即 3 幅测试图像），用 IMge Pro Plus 图像分析系统（Media Cybernetics Inc. 美国）测算其平均积分光密度（IOD）值作为 ChAT 的相对含量。

1.3.2 ChAT mRNA 表达检测 一侧大脑分离海马，Trizol 法分别提取组织细胞总 RNA，紫外分光光度法定量后，按照逆转录试剂盒说明，反转录条件：42 ℃ 10 min，30 ℃ 20 min，99 ℃ 5 min，4 ℃ 5 min。以引物设计软件 Primer Premier5.0 设计 ChAT 及内参 GAPDH 引物，ChAT 正向引物：5′-GCCCGAGACCTGTGCAAAGA-3′；反向引物：5′-CCACAGCTTCCGCAAACTCC - 3′，产物 247 bp。GAPDH 正向引物：5′-ACCCATCACCATCTTCCAGGAG-3′；反向引物：5′-GAA GGGGCGGAGATGATGAC-3′，产物 159 bp。ChAT 和内参 GAPDH PCR 反应条件：35 个循环（94 ℃ 5 min，94 ℃、63 ℃、72 ℃ 30 s，72 ℃ 10 min）。扩增完成后，取 10 μl PCR 产物琼脂糖凝胶进行电泳，Alpha Imager 图像分析仪（Alpha Innotech，美国）进行灰度扫描，结果以 ChAT/GAPDH 的比值作为 ChAT mRNA 的表达水平。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计学软件，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用单因素方差分析，组间两两比较采用 SNK 法。

2 结果

2.1 实验动物一般情况

各组大鼠间月龄、体质量和游泳速度差异无统计学意义（$P>0.05$），各组术中血氧饱和度和血气分析各项指标差异无统计学性意义（$P>0.05$）。

2.2 异氟烷对老年大鼠 Morris 水迷宫实验结果影响

其空间学习记忆成绩见表 1、2，与 A 组比较，B、C 组老年大鼠的记忆质量和记忆速度下降，2～5 d 逃避潜伏期长于 A 组（$P<0.05$）；学习记忆曲线后移，至 4 d 渐趋稳定，而 A 组 3 d 趋于稳定；停留原平台象限时间和穿越原平台次数均明显少于 A 组（$P<0.05$）；B、C 组比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。

表 1 异氟烷对老年大鼠逃避潜伏期的影响（t/s，n = 8，$\bar{x} \pm s$）

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
A	47.53 ± 7.31	22.87 ± 3.42	10.47 ± 2.96	10.06 ± 3.57	9.30 ± 2.83
B	51.06 ± 5.22	28.15 ± 4.45[a]	18.30 ± 2.91[b]	14.25 ± 3.23[a]	12.63 ± 2.87[a]
C	50.99 ± 5.45	28.10 ± 3.58[a]	18.99 ± 4.32[b]	14.04 ± 2.92[a]	12.77 ± 3.13[a]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 A 组比较

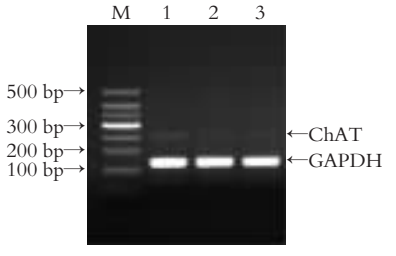
表 2 异氟烷对老年大鼠停留原平台象限时间和穿越原平台次数的影响（n = 8，$\bar{x} \pm s$）

组别	停留原平台象限时间（t/s）	穿越原平台次数（次）
A	49.84 ± 5.61	7.38 ± 2.67
B	44.55 ± 4.27[a]	4.13 ± 2.70[a]
C	44.24 ± 4.91[a]	4.25 ± 1.98[a]

a：$P<0.05$，与 A 组比较

2.3 异氟烷对老年大鼠海马神经元 ChAT 表达的影响

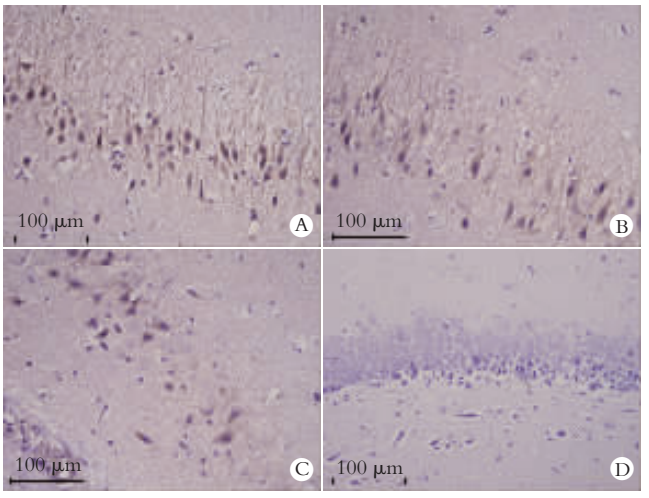
2.3.1 海马神经元 ChAT mRNA 表达 RT-PCR 结果显示，正常情况下，老年大鼠海马神经元 ChAT 基因表达水平为（30.86 ± 2.78）%，异氟烷麻醉后，ChAT 基因表达水平分别（27.46 ± 1.40）%、（27.36 ± 2.38）% 显著性降低（$P<0.05$），B、C 组之间无显著性差异（$P>0.05$，图 1）。



M：标准；1：正常对照组；2：异氟烷单次吸入组；3：异氟烷多次吸入组

图 1 异氟烷对老年大鼠海马神经元 ChAT mRNA 表达的影响

2.3.2　海马神经元 ChAT 蛋白表达　在正常情况下,老年大鼠海马神经元内可见细胞质呈棕黄色,分布均匀,细胞核不着色的 ChAT 阳性细胞。ChAT 蛋白表达水平为(40.14 ± 3.87)。异氟烷麻醉后,ChAT 蛋白表达水平 B 组(34.95 ± 2.43)、C 组(35.20 ± 2.10),较之麻醉前显著降低($P < 0.05$),B、C 组之间没有差异($P > 0.05$)。PBS 替代一抗的正常对照组未见任何阳性细胞(图 2)。



A:正常对照组;B:异氟烷单次吸入组;C:异氟烷多次吸入组;D:PBS 替代一抗的正常对照组

图 2　异氟烷对老年大鼠海马神经元 ChAT 蛋白表达的影响
(Polymer 二步法 ×400)

3　讨论

POCD 是指术前无精神障碍的患者,受多种因素的影响,在麻醉及手术后数天至数周出现认知能力减退、焦虑、记忆受损、语言理解能力和社会融合能力减退为临床特点的并发症,易发生于老年人。近年来尽管医疗技术水平的提高使围术期的死亡率和并发症大大降低,但 POCD 的发生率却居高不下,引起了临床上的广泛关注,然相关因素的确切影响及分子机制仍未知。既往的研究认为[4,5],常用麻醉药可影响 POCD 的发生,但对于吸入麻醉药异氟烷的研究较少。近年来研究证实海马胆碱能神经元的损伤是认知功能受损害的形态学基础。异氟烷作为临床应用最广泛的吸入麻醉药,是否影响 POCD 的发生,是否呈多点位性对海马胆碱能神经系统作用和损伤而引发 POCD,值得进一步研究。

POCD 临床诊断主要依靠神经心理学检查,其中以学习记忆测试最为敏感。在动物学习记忆研究中主要采用经典的 Morris 水迷宫实验[6],其中隐蔽平台实验中的逃避潜伏期反映了动物记忆的获得情况,即学习能力,探索实验测量动物的记忆保持能力。根据以往研究表明大鼠异氟醚 MAC 值约为 1.18[7],本实验结合预实验结果,选用 1.2% 异氟烷作为麻醉浓度,无体动和呼吸抑制。为排除术中通气不足影响,对大鼠进行血氧饱和度监测和血气分析,麻醉中无乏氧。既往的研究[8]认为 24 h 后已无麻醉药物残留于机体,所以本研究在麻醉 24 h 后进行行为学和生化指标检测。研究结果显示,各组大鼠随着训练的天数增加,逃避潜伏期缩短,说明逐渐产生空间学习记忆;与 A 组比较,B、C 组大鼠至第 4 天渐趋稳定,而 A 组第 3 天趋于稳定,提示麻醉后空间学习记忆的速度减慢。同时,B、C 组大鼠 2 ~ 5 d 逃避潜伏期延长($P < 0.05$),说明学习记忆质量减退。在探索实验中,与 A 组比较,B、C 组停留原平台象限的时间和穿越原平台的次数减少,说明麻醉后损伤了老年大鼠的记忆保持能力。既往的研究报道常用麻醉药氯胺酮、硫喷妥钠、丙泊酚可引起新生小鼠成年后认知能力减退[9],Bianchi 等[10]的研究发现异氟烷或氟烷能导致 12 月龄成年小鼠认知能力下降,本研究结果显示异氟烷能导致 20 月龄的老年大鼠空间学习记忆能力减退,与前述研究报道相符。

目前的研究认为,海马胆碱能神经元的损伤是认知功能受损害的形态学基础。乙酰胆碱(Ach)是迄今发现的与学习记忆关系最为密切的一种神经递质,ChAT 是生成乙酰胆碱的限速酶,在胆碱能神经元胞体内合成,活性中心有咪唑基和疏基,和乙酰辅酶 A 结合使咪唑基乙酰化,然后,胆碱与 ChAT 活性中心的阴离子部位结合,将乙酰基转移到胆碱上,从而生成 Ach,故 ChAT 与 Ach 分布几乎平行,常作为研究胆碱能神经元的标志或评估 Ach 含量的间接指标[11]。业已证实以进行性智能丧失为主要临床表现的 Alzheimer 病(AD)患者基底核内 ChAT 活性下降非常明显,而最显著的是海马和颞叶新皮质[12,13]。以往的研究发现,血管性痴呆(vascular dementia,VD)大鼠模型海马 C1 区 ChAT 免疫反应阳性神经元和纤维数量较对照组明显减少,与大鼠的学习记忆障碍程度成正相关[14]。Li 等[15]的研究表明,一种中药制剂复智散对自然老化大鼠的学习记忆功能有明显的改善作用,并呈量效关系,与其提高大鼠海马内 ChAT 活性及 Ach 有关。本研究结果显示,与对照组比较,老年大鼠多次吸入和单次吸入异氟烷后海马 ChAT 阳性神经元光密度值减少($P < 0.05$),ChAT 的转录水平降低($P < 0.05$),说明表达减少,并且这种表达减少与行为学测试的空间学习记忆减退大体一致,提示麻醉药异氟烷致老年大鼠空间学习记忆功能减退可能通过影响或损伤海马胆碱能神经元起作用。随年龄增加,中枢胆碱能神经元逐渐萎缩、退行性变且数量减少,致使与学习记忆有关的各种功能逐渐减退。结合本实验的研究结果可以初步推断,随老龄化中枢胆碱能神经系统逐渐

发生退行性变改变,异氟烷麻醉进一步加重了这种退行性改变,从而导致脑功能障碍,是老年人 POCD 发生的可能机制。

本研究在麻醉总时间一致的情况下,未发现单次吸入组与多次吸入组差别有统计学意义($P>0.05$),因此是否这种短时间间隔损伤效应等同于一次性损伤效应还需进一步研究;另外此实验仅证实了吸入约 1MAC 值 1.2% 异氟烷可影响老年大鼠的空间学习记忆功能,但不同吸入浓度的效应如何还需进一步研究。

综上所述,1.2% 异氟烷麻醉可引起老年大鼠短期空间学习记忆功能减退,其机制可能与下调海马神经元 ChAT 的表达有关。

参考文献:

[1] Satomoto M, Satoh Y, Terui K, *et al*. Neonatal exposure to sevoflurane induces abnormal social behaviors and deficits in fear conditioning in mice[J]. Anesthesiology, 2009, 110(3):628 - 637.

[2] Fesenko U A. Piracetam improves children's memory after general anaesthesia[J]. Anestezjol Intens Ter, 2009, 41(1):13 - 18.

[3] 黄忠仕,焦 杨,张士军,等. 龙眼参多糖对老年痴呆模型 SAMP8 小鼠学习记忆的改善作用[J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(21): 2086 - 2088.

[4] Kanbak M, Saricaoglu F, Akinci S B, *et al*. The effects of isoflurane, sevoflurane, and desflurane anesthesia on neurocognitive outcome after cardiac surgery: a pilot study[J]. Heart Surg Forum, 2007, 10(1): E36 - E41.

[5] Majewski-Tiedeken C R, Rabin C R, Siegel S J. Ketamine exposure in adult mice leads to increased cell death in C3H, DBA2 and FVB inbred mouse strains[J]. Drug Alcohol Depend, 2008, 92(1 - 3): 217 - 227.

[6] Pouzet B, Zhang W N, Feldon J, *et al*. Hippocampal lesioned rats are able to learn a spatial position using non-spatial strategies[J]. Behav Brain Res, 2002, 133(2): 279 - 291.

[7] Orliaguet G, Vivien B, Langeron O, *et al*. Minimum alveolar concentration of volatile anesthetics in rats during postnatal maturation[J]. Anesthesiology, 2001, 95(3):734 - 739.

[8] Komatsu H, Nogaya J, Anabuki D, *et al*. Memory facilitation by posttraining exposure to halothane, enflurane, and isoflurane in ddN mice [J]. Anesth Analg, 1993, 76(3):609 - 612.

[9] Fredriksson A, Ponten E, Gordh T, *et al*. Neonatal exposure to a combination of N-methyl-D-aspartate and gamma-aminobutyric acid type A receptor anesthetic agents potentiates apoptotic neurodegeneration and persistent behavioral deficits[J]. Anesthesiology, 2007, 107(3): 427 - 436.

[10] Bianchi S L, Tran T, Liu C, *et al*. Brain and behavior changes in 12-month-old Tg2576 and nontransgenic mice exposed to anesthetics[J]. Neurobiol Aging, 2008, 29(7):1002 - 1010.

[11] Lyness S A, Zarow C, Chui H C, *et al*. Neuron loss in key cholinergic and aminergic nuclei in Alzheimer's disease: a meta-analysis[J]. Neurobiol Aging, 2003, 24(1):1 - 23.

[12] Albeck D, Mesches M H, Juthberg S, *et al*. Exogenous NGF restores endogenous NGF distribution in the brain of the cognitively impaired aged rat[J]. Brain Res, 2003, 967(1 - 2):306 - 310.

[13] Nordberg A. Functional studies of cholinergic activity in normal and Alzheimer disease states by imaging technique[J]. Prog Brain Res, 2004, 145:301 - 310.

[14] 范文辉,李露斯,刘之荣. 血管性痴呆的动物模型、神经病理及其胆碱能机制[J]. 中国临床康复, 2002, 6(21):3172 - 3173.

[15] Li X L, Wang de S, Zhao B Q, *et al*. Effects of Chinese herbal medicine fuzhisan on aged rats[J]. Exp Gerontol, 2008, 43(9):853 - 858.

(编辑 汪勤俭)

(上接 2354 页)

包,动脉血气针,体外除颤起搏电极,IABP 仪及导管,微量泵,电刀,无影灯,显影纱布纱垫,各种手术缝合线。术前查血型,常规静脉通道,要留置 20 号以下粗套管针。②病情观察。术中严密观察记录患者生命体征,神志,血氧饱和度,心电图及影像变化。有条件最好监测有创动脉压,有创动脉压比袖带测压更能快速准确地反映病情变化。遵医嘱及时抽血给药,保证血标本即使送检,准确记录出入量,根据血压及出血量合理安排补液速度。③建立多条静脉通道。在出现病情变化后,应立即建立两条以上静脉通道并连接多个三通,每条通道最好由专人负责,以保证给药,输血,输液及抽血的及时有效进行。④特别注意。对于高龄老年患者,提醒医生最好选用较细较软的 5F 飘浮起搏电极,安装完毕留图像并记录参数。拔除起搏电极前,再次检测起搏器功能,在 X 线透视下拔除,严密观察生命体征变化。若拔除前,起搏欠佳或操作者手感有异常,应暂停操作,按急性心包填塞抢救及开胸手术准备。待各科人员、仪器设备、药品物品、配血、静脉通道均准备好后,再行拔除更为安全。

3 讨论

严重缓慢心律失常患者,为预防手术中心率下降、心跳骤停,在术前安置临时起搏器较为常见。但由于安置临时起搏器导致心肌穿孔、急性心包填塞,临床较为罕见。在抢救过程中迅速确诊急性心包填塞;及时心包穿刺抽吸心包积液;果断开胸修复心肌穿孔;快速建立多条静脉通道;术前药品物品准备充分;各科室人员及医护配合默契,使患者在最短的时间内得到有效救治是此次抢救成功的关键。

关键词: 临时起搏器; 急性心包填塞

中图法分类号: R473.5 **文献标识码**: B

参考文献:

[1] 莫怀忠,安裕文,姚 茵,等. 心脏双支传导阻滞患者围术期安置临时起搏器的必要性分析[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(16):1612 - 1614.

[2] 陈仙芳. 急性心包填塞的抢救与护理[J]. 现代中西医结合杂志, 2007,16(35):5375 - 5376.

(编辑 栾 嘉)