文章编号:1000-5404(2010)04-0357-04

论著

异氟烷对大鼠学习记忆功能及海马乙酰胆碱受体表达的影响

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

[摘要] **目的** 观察吸入1.2%异氟烷5 h后成年和老年大鼠学习记忆功能的变化及海马α_4型烟碱乙酰胆碱受体(alpha 4 nicotine acetylcholine receptor,α_4nAChR)表达改变。**方法** 健康成年和老年SD大鼠各50只,分为老年对照组(A0),水迷宫老年对照组(WA0),水迷宫老年异氟烷1(WA1)、3(WA3)、7 d组(WA7),成年对照组(B0),水迷宫成年对照组(WB0),水迷宫成年异氟烷1(WB1)、3(WB3)、7 d组(WB7),每组10只。WA1、WA3、WA7组和WB1、WB3、WB7组分别吸入1.2%异氟烷5 h后与WA0、WB0组水迷宫训练检测学习记忆功能,WA1和WB1组于第1天,WA3和WB3组于第3天,A0、WA0、WA7、B0、WB0和WB7组于第7天处死取海马,Western blot检测α_4nAChR表达,并观察海马免疫反应阳性细胞的分布。**结果** 水迷宫实验表明WA0、WB0组无明显差异,WA7(第3、4、5天)潜伏期与WA0(第3、4、5天)、WB0(第3、4、5天)及WB7组(第3、4、5天)相比明显延长($P<0.05$),WA3(第3天)潜伏期与WA0(第3天)、WB0(第3天)及WB7组(第3天)相比明显延长($P<0.05$)。WA0、WB0、A0及B0组α_4nAChR表达无差异,而WA1、WA3组α_4nAChR表达低于WA0、WB0、A0及B0组($P<0.05$);同时WA1组较WA0、WB0、A0及B0组α_4nAChR免疫反应阳性细胞数明显减少($P<0.05$)。**结论** 吸入1.2%异氟烷5 h后成年大鼠学习记忆功能无明显改变,而老年大鼠出现下降,可能与海马α_4nAChR表达下降有关。

[关键词] 异氟醚;麻醉药,吸入海马;受体,胆碱能;迷宫学习;记忆;大鼠
[中图法分类号] R338.26;R338.64;R971.2 **[文献标志码]** A

Effect of isoflurane on memory of rats and expression of acetylcholine receptor in hippocampus

Shi Shengchi, Luo Tieshan, Li Peng, Yi Bin, Tao Guocai (Department of Anesthesiology, Southwest Hospital, Third Military University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To observe the change in memory of aged rats and the expression of alpha 4 acetylcholine receptor in hippocampus 5 h after inhalation of 1.2% isoflurane. **Methods** Fifty healthy adult and 50 aged SD rats were randomly divided into aged normal control group (A0), aged water labyrinth normal control group (WA0), 1 day isoflurane aged water labyrinth group (WA1), 3-day isoflurane aged water labyrinth group (WA3), 7-day isoflurane aged water labyrinth group (WA7), adult normal control group (B0), adult water labyrinth normal control group (WB0), adult 1 day isoflurane water labyrinth group (WB1), 3-day isoflurane water labyrinth group (WB3), and 7-day isoflurane water labyrinth group (WB7), 10 rats in each group. Memory of rats in WA1, WA3, WA7 groups was detected 5 h after inhalation of 1.2% isoflurane while memory in rats of WB1, WB3 and WB7 groups was detected during the Morris water maze testing. The rats in A0, WA0, WA7, B0, WB0 and WB7 groups were killed on day 7 to detect the expression of α4 acetylcholine receptor by Westernblotting for observation of changes in distribution of positive immune reaction cells in hippocampus. **Results** Water maze test showed that there was no significant difference in expression of alpha 4 acetylcholine receptor between WA0 and WB0 groups. However, the expression level of alpha 4 acetylcholine receptor was significantly lower in latent period of WA1 than in latent period of WA0, WB0 and WB7 groups ($P<0.05$). A significant change was observed in latent period of WA3 compared with WA0, WB0 and WB7 groups ($P<0.05$). Western blot analysis showed that the expression level of alpha 4 acetylcholine receptor was not significantly different WA0, WB0, A0 and B0 groups ($P<0.05$). However, the expression of alpha 4 acetylcholine receptor was lower in WA1(2.18±0.12)and WA3(2.21±0.11)than in WA0, WB0, A0 and B0 groups. The number of immune positive cells was not significantly different in WA0, WB0, A0 and B0 groups

[通信作者] 陶国才,电话:(023)68754197, E-mail:13908393339@vip.163.com

but was significantly lower in WA1group than in WA0, WB0, A0 and B0 groups. **Conclusion** Inhalation of 1.2% isoflurane can decrease the memory of old rats, which may be related with the decreased expression of α4 acetylcholine receptor in hippocampus.

[Key words] isoflurane; anesthetics, inhalation; hippocampus; receptors, cholinergic; maze learning; memory; rats

Corresponding Author: Tao Guocai, Tel: 86-23-68754197, E-mail: 13908393339@vip.163.com

目前术后认知功能障碍是麻醉研究领域的重点和难点。既往研究发现异氟烷(Isoflurane)与老年人术后认知功能障碍有密切相关[1],但确切机制仍不太清楚。同时研究表明大脑中烟碱乙酰胆碱受体(nicotine acetylcholine receptor, nAChR)参与许多复杂的功能,特别是学习、记忆等认知功能[2]。本研究通过对照研究老年与成年大鼠吸入异氟烷前后大鼠学习记忆及海马的 α_4nAChR 表达量及形态的变化,旨在为术后认知功能障碍的机制研究提供一条思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康成年和老年 SD 雄性大鼠各 50 只,由成都达硕动物有限公司提供(产品批号:0487381。老年大鼠:22 月龄,500 ~ 600 g;成年大鼠:3 月龄,250 ~ 350 g)。各组动物分笼饲养,自由饮食及水,动物房自然采光,昼夜交替。实验动物分为:老年对照组(A0),水迷宫老年对照组(WA0),水迷宫老年异氟烷1(WA1)、3(WA3)、7 d 组(WA7),成年对照组(B0),水迷宫成年对照组(WB0),水迷宫成年异氟烷 1(WB1)、3(WB3)、7 d 组(WB7),每组 10 只。

1.2 药品和器材

异氟烷(美国雅培制药有限公司生产),Morris 水迷宫测试系统(中国医学科学院研制)。

1.3 大鼠吸入异氟烷模型的建立

将 WA1 组、WA3 组、WA7 组和 WB1 组、WB3 组、WB7 组大鼠放入自制麻醉箱[3](40 cm × 25 cm × 20 cm)中,调节好新鲜气体流量和挥发罐浓度,并监测异氟烷浓度,保持吸入异氟烷在 1.2% 并维持 5 h。在持续吸入 1.2% 异氟烷过程中监测氧饱和度及检测动脉血氧分压(吸入 1.2% 异氟烷 30、60、120、180、300 min)显示氧饱和度(在 97% ~ 100% 之间)与动脉血氧分压(在 80 ~ 105 mmHg 之间),与 WA0 组、WB0 组、A0 组及 B0 组无差异。

1.4 Morris 水迷宫行为训练和测试[4]

Morris 水迷宫仪器为直径 120 cm,高 50 cm 的圆形水池,在水池边缘上等距离设东、西、南、北 4 个标记点,将水池均等地分为 4 个象限。水池水深 30 cm,在第 1 象限正中距池壁 30 cm 放 1 圆形透明站台,水面高出站台表面 1.5 cm。水温控制在(22.0 ± 0.5) ℃。各组动物实验前分别放入水中 2 min 适应环境。实验在隔音的房间内进行,水池、光源、鼠笼、站台等实验室各物件的位置保持不变。每只大鼠每天训练 4 次,每次采用随机的入水点,每次实验以 120 s 为限,实验时将大鼠面朝池壁轻轻放入水中,同时计算机自动记录大鼠从入水点到达站台所需时间(潜伏期)作为学习和记忆成绩。大鼠找到并爬上站台后,让其停留 30 s;若大鼠入水后 120 s 内未能找到或爬上站台,则将其放置于站台上站立 30 s(记录为 120 s)。然后将大鼠从站台上取下休息至少 30 min ,再进行下一次训练。4 次平均值作为当天数据记录。

1.5 海马组织的 α_4nAChR 免疫组化检测

WA1 组、WA3 组、WA7 组、WB1 组、WB3 组和 WB7 组大鼠分别于 1、3、7 d,WA0 组、WB0 组、A0 组、B0 组也于第 7 天用 4% 多聚甲醛缓冲液灌注固定后断头取脑,进行石蜡包埋,在视交叉前端大脑和背侧海马处连续切片,切片厚 4 μm。先用柠檬酸盐抗原修复液(pH = 6.0),在高压锅内进行抗原热修复,进行免疫组织化学染色:一抗为兔抗多克隆抗体(1∶200),4 ℃ 孵育过夜;生物素标记的二抗(羊抗兔),室温孵育 10 min;滴加辣根酶室温孵育 20 min;DAB 显色,室温 5 min. 显微镜观察显色效果。染色结果判断标准采用 Fromowitz 阳性细胞半定量法[5](随机选择 5 个高倍视野):阳性细胞数 < 10% 为 0 分,10% ~25% 为 1 分,26% ~50% 为 2 分, 51% ~80% 为 3 分, >80% 为 4 分;细胞染色强度,阴性为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。

1.6 Westernblot 检测 α_4nAChR 蛋白表达变化

取出海马,研钵粉碎,加入 PMSF (每克组织 30 μl) ,冰上孵育 30 min;移入 EP 管,4 ℃离心(beckman 离心机),12 000 × g, 15 min ,取上清用紫外分光光度计进行蛋白定量, -70 ℃ 保存。取 20 μg 蛋白进行 15% 分离胶和 5% 浓缩胶 SDS-PAGE 电泳;随后将蛋白质电转印至 PVDF 膜,封闭 1 h;然后置入封闭液 1∶500 稀释的兔多克隆抗大鼠 α_4 型烟碱乙酰胆碱受体抗体 4 ℃ 过夜。取出 PVDF 膜,用含 0.05% Tween-20 TBS 洗膜 5 min × 3 次。重新将 PVDF 膜放入加入封闭液 1∶1 000 稀释的结合有 HRP 的二抗(羊抗兔) 。取出 PVDF 膜,用含 0.05% Tween-20 TBS 洗膜 5 min × 3 次,再用 TBS 洗膜 5 min。将膜置 DAB 显色液中显色,至有清晰条带显出时放入清水中终止反应,凝胶成像系统扫描存盘,AlphaImager 图像分析仪测定杂交带的光密度值,并进行条带的蛋白含量分析。

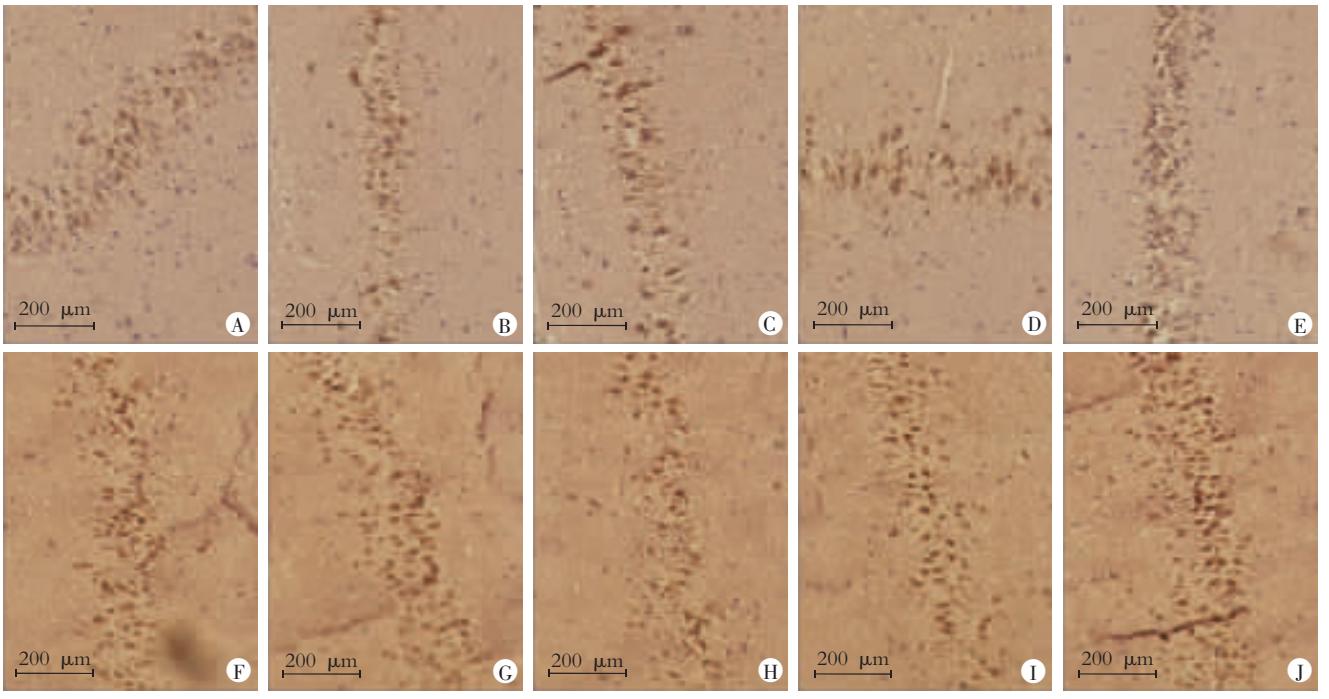
1.7 统计方法

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 水迷宫实验结果

WA0 组、WA1 组、WA3 组、WA7 组和 WB0 组、WB1 组、WB3



A:WA0 组; B:WA1 组; C:WA3 组; D:WA7 组; E:A0 组; F:WB0 组; G:WB1 组; H:WB3 组; I:WB7 组; J:B0 组

图 1　异氟烷处理后成年和老年 SD 大鼠海马 α_4nAChR 表达免疫组化观察　(Polymer 三步法)

组、WB7 组水迷宫训练潜伏期第 1 天无明显差别,WA7 组(第 3、4、5 天)潜伏期与 WA0 组(第 3、4、5 天)、WB0 组(第 3、4、5 天)及 WB7 组(第 3、4、5 天)相比时间明显增加,表明学习记忆功能下降($P<0.05$);WA3 组(第 3 天)潜伏期与 WA0 组(第 3 天)、WB0 组(第 3 天)及 WB7 组(第 3 天)相比显著延长($P<0.05$,表 1)。

表 1　异氟烷处理后成年和老年 SD 大鼠水迷宫实验潜伏期的变化
(s, $n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
WB7 组	53.3±10.0	41.5±9.3	21.8±4.5	13.4±2.3	9.3±1.2	9.6±1.1	8.2±1.0
WB3 组	54.0±10.1	40.7±9.0	22.5±4.0	—	—	—	—
WB1 组	53.4±10.8	—	—	—	—	—	—
WB0 组	53.4±10.1	37.3±9.4	19.2±4.1	12.4±2.5	8.8±1.4	8.4±1.0	8.3±1.1
WA7 组	54.6±10.2	45.7±9.8	39.0±8.3^{abc}	26.5±5.9^{abc}	15.6±3.5^{abc}	9.6±1.2	8.5±1.0
WA3 组	54.6±10.5	45.5±9.7	37.8±8.0^{abc}	—	—	—	—
WA1 组	55.0±10.6	—	—	—	—	—	—
WA0 组	53.5±10.1	41.7±9.0	25.5±4.5	14.3±2.3	9.8±1.3	9.4±1.2	8.2±1.1

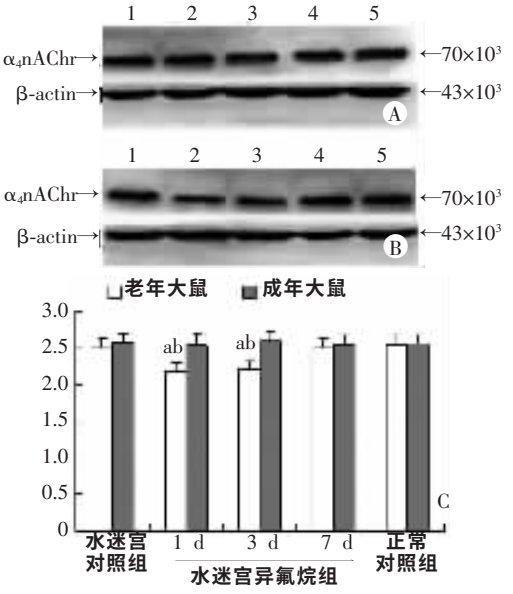
a:$P<0.05$,与 WA0 组比较; b:$P<0.05$, 与 WB0 组比较; c:$P<0.05$, 与 WB7 组比较

2.2　免疫组化实验结果

以 Fromowitz 半定量法检测异氟烷处理后成年和老年 SD 大鼠海马 α_4 nAChR 阳性表达细胞,结果显示:WA0 组、WB0 组、A0 组及 B0 组无明显差异,WA1 组(4.1±0.5)与 WA0 组(5.2±0.3)、WB0 组(5.3±0.4)、A0 组(5.2±0.4)及 B0 组(5.3±0.4)相比 α4nAChR 的阳性表达明显减少($P<0.05$,图 1)。

2.3　Western blot 结果

Western blot 结果显示,成年大鼠经异氟烷处理水迷宫实验后,海马 α_4nAChR 表达较对照组未见明显变化,而老年大鼠异氟烷处理水迷宫实验 1 d 和 3 d 海马 α_4 nAChR 表达出现明显下降,至第 7 天恢复,与对照组无明显变化,见图 2。



A: 成年大鼠异氟烷处理后海马 α_4nAChR 表达变化;B:老年大鼠异氟烷处理后海马 α_4nAChR 表达变化;C:半定量分析结果; a:$P<0.05$, 与 WA0 组、A0 组比较;b:$P<0.05$,与 WB0 组、B0 组比较

A:1:水迷宫成年对照组;2~4:水迷宫成年异氟烷处理 1,3,7 d 组;5:成年正常对照组;B:1:水迷宫成年对照组;2~4:水迷宫成年异氟烷处理 1,3,7 d 组;5:成年正常对照组

图 2　异氟烷处理后成年和老年 SD 大鼠海马 α_4nAChR 表达变化

3 讨论

术后认知功能障碍是术后常见的并发症,主要表现为幻视、幻听、情绪状态的改变和学习记忆功能的下降。术后认知功能障碍发病率较高,其影响因素众多,可能与年龄、手术应激及麻醉等有关,但其确切发病机制目前不清楚。异氟烷是全身麻醉的主要用药之一,有研究发现异氟烷与七氟烷都能导致谵妄[6],但全身麻醉与局部麻醉相比只与急性的早期认知功能障碍有关[7]。本研究发现水迷宫实验中吸入异氟烷后老年大鼠的空间学习记忆能力出现了下降,特别是在第3、4、5天的潜伏期与WA0组,WB0组和WB7组相比发生了显著性的改变。上述研究表明吸入1.2%异氟烷5h后老年大鼠学习记忆功能出现了减退。有学者研究认为吸入异氟烷后对学习记忆影响不大[3,8],可能与选择的实验动物种类、动物的年龄和观察方法和时间不同有关,在本研究中同样发现异氟烷成年大鼠的影响没有差异。

Rampil 等[9]发现吸入异氟烷后能对机体产生影响,使大脑中 mRNA 和蛋白表达水平发生改变,在暴露在1MAC(最低肺泡有效浓度,minimum alveolar concentration)1.2%的异氟烷5 h后,在海马有近1%的蛋白表达发生了变化[10]。本研究结果显示大鼠在吸入1.2%异氟烷5 h后,老年大鼠海马的 α_4 nAChR 表达量都出现了下降,其中以WA1组、WA3组最为明显且与WA0组,WB0组A0组及B0组有统计学差异,免疫组化 Fromowitz 阳性细胞记数也有相近的结果。这表明吸入1.2%异氟烷5 h对大鼠的 α_4 nAChR 产生了影响,其中老年大鼠的表达下降显著。$\alpha_4\beta_2$ nAChR 是整个中枢 nAChR 中的重要部分[11],在认知功能方面,nAChR 有着十分重要的作用,Pocivavsek[12]研究报道 $\alpha_4\beta_2$ nAChR 的减少导致大鼠空间记忆能力下降。在 MCI(mild cognitive impairment MCI 是指介于正常老化和痴呆之间的一种认知缺损状态,主要表现在记忆减退与年龄的不相称,但没有达到 AD 的标准)和 Alzheimer 病(AD)研究发现患者的脑内特定区域也发现的 $\alpha_4\beta_2$ nAChR 减少[13,14]。灌注 $\alpha_4\beta_2$nAChR 拮抗剂-二氢刺桐碱后发现大鼠空间记忆能力降低[12],而烟碱能够改善记忆能力[15]。以上说明 α_4 nAChR 的下降能导致学习记忆功能的下降。

综上所述,吸入异氟烷后老年大鼠学习记忆功能出现了降低,可能与异氟烷导致的海马 α_4nAChR 表达减少有关[16],它可能是老年术后认知功能障碍的发病机制之一。由于临床上评估认知功能的方法和标准各不相同且并不只限于学习记忆,患者以幻视和幻听为主要表现而本次实验主要检测空间学习记忆能力,所以探讨异氟烷与认知功能障碍的关系及其发病机制还需要进一步研究。

参考文献:

[1] Mandal P K, Schifilliti D, Mafrica F, *et al*. Inhaled anesthesia and cognitive performance[J]. Drugs Today (Barc), 2009, 45(1): 47-54.

[2] Sarter M, Parikh V, Howe W M. nAChR agonist-induced cognition enhancement: integration of cognitive and neuronal mechanisms[J]. Biochem Pharmacol, 2009, 78(7): 658-667.

[3] 王贤裕, 田玉科. 异氟烷对大鼠术后学习记忆的影响[J]. 华中医学杂志, 2005, 29(2): 82-83, 86.

[4] Nunez J. Morris water maze experiment[J]. J Vis Exp, 2008, 24(19): 897.

[5] Fromowitz F B, Viola M V, Chao S, *et al*. Ras p21 expression in the progression of breast cancer[J]. Hum Pathol, 1987, 18(12): 1268-1275.

[6] Meyer R R, Munster P, Werner C, *et al*. Isoflurane is associated with a similar incidence of emergence agitation/delirium as sevoflurane in young children--a randomized controlled study[J]. Paediatr Anaesth, 2007, 17(1): 56-60.

[7] Anwer H M, Swelem S E, el-Sheshai A, *et al*. Postoperative cognitive dysfunction in adult and elderly patients--general anesthesia vs subarachnoid or epidural analgesia[J]. Middle East J Anesthesiol, 2006, 18(6): 1123-1138.

[8] Rammes G, Starker L K, Haseneder R, *et al*. Isoflurane anaesthesia reversibly improves cognitive function and long-term potentiation (LTP) via an up-regulation in NMDA receptor 2B subunit expression [J]. Neuropharmacology, 2009, 56(3): 626-636.

[9] Rampil I J, Moller D H, Bell A H, *et al*. Isoflurane modulates genomic expression in rat amygdala[J]. Anesth Analg, 2006, 102(5): 1431-1438.

[10] Pan J Z, Xi J, Eckenhoff M F, *et al*. Inhaled anesthetics elicit region-specific changes in protein expression in mammalian brain[J]. Proteomics, 2008, 8(14): 2983-2992.

[11] Ogawa M, Tsukada H, Hatano K, *et al*. Central in vivo nicotinic acetylcholine receptor imaging agents for positron emission tomography (PET) and single photon emission computed tomography (SPECT) [J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(3): 337-340.

[12] Pocivavsek A, Icenogle L, Levin E D. Ventral hippocampal alpha7 and alpha4beta2 nicotinic receptor blockade and clozapine effects on memory in female rats[J]. Psychopharmacology (Berl), 2006, 188(4): 597-604.

[13] Sabri O, Kendziorra K, Wolf H, *et al*. Acetylcholine receptors in dementia and mild cognitive impairment[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2008, 35 Suppl 1: S30-S45.

[14] Albuquerque E X, Pereira E F, Alkondon M, *et al*. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function[J]. Physiol Rev, 2009, 89(1): 73-120.

[15] Miyata H. Role of smoking and nicotine in neuropsychiatric disorders: evidence for therapeutic role of nicotinic acetylcholine receptors[J]. Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi, 2008, 28(4): 149-158.

[16] 罗铁山, 陶国才, 易斌, 等. 异氟烷对老年海马胆碱乙酰转移酶的作用和空间学习记忆的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(23): 2363-2366.

(**收稿**:2009-09-30;**修回**:2009-11-30)

(编辑 栾 嘉)