

· 实验研究 ·

七氟醚对基底前脑区抑制性中间神经元电活动的影响

宋歌 张昊鹏 李慧明 李文 郝海智 董海龙

【摘要】 目的 观察七氟醚对基底前脑区抑制性中间神经元电活动的影响,为吸入全麻药物的作用机制提供实验依据。**方法** 2~3 周龄 C57BL/6 小鼠,切取脑片,运用全细胞膜片钳技术钳制基底前脑区神经元,灌流混合七氟醚的人工脑脊液,记录动作电位和抑制性突触后电流。**结果** 七氟醚可使基底前脑区抑制性中间神经元自发放电频率增加 ($P < 0.001$),增加去极化电流引起的动作电位频率 ($P < 0.05$),并且增加锥体神经元抑制性突触后电流频率 (sIPSC) ($P < 0.05$),而动作电位依赖的抑制性突触后电流 (mIPSC) 没有明显变化。**结论** 基底前脑区抑制性中间神经元参与了七氟醚的麻醉效应。

【关键词】 七氟醚;基底前脑区;中间神经元

Effect of sevoflurane on the electric activities of inhibitory interneurons in basal forebrain area SONG Ge, ZHANG Haopeng, LI Huiming, LI Wen, HAO Haizhi, DONG Hailong. Department of Anesthesiology and Perioperative Medicine, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Corresponding author: Dong Hailong, Email: hldong6@hotmail.com

【Abstract】 Objective To provide new experimental evidences associated with the mechanisms of inhaled anesthetics, the effects of sevoflurane on the electric activities of inhibitory interneurons in basal forebrain area (BF) were observed. **Methods** C57BL/6 mice, aged 2-3 weeks, were used and BF sections were cut for whole patch-clamp recording. Artificial cerebrospinal fluid containing sevoflurane was given and action potential, inhibitory postsynaptic potential were recorded. **Results** Sevoflurane could increase the frequency of firing rate of inhibitory interneurons in basal forebrain area ($P < 0.001$), which could increase the frequency of action potential caused by depolarization current ($P < 0.05$), and increase the frequency of spontaneous inhibitory postsynaptic currents of pyramidal neurons ($P < 0.05$), while AP-dependent miniature inhibitory postsynaptic currents were not significantly changed. **Conclusion** The basal forebrain inhibitory interneurons are involved in the anesthetic effect of sevoflurane.

【Key words】 Sevoflurane; Basal forebrain; Interneurons

全身麻醉问世至今已 170 余年,每年全世界都有数以千万计的患者接受全身麻醉,而至今其机制尚未阐明^[1]。有研究表明全身麻醉药物可以通过作用在脑内睡眠觉醒相关系统而发挥作用^[2]。基底前脑区 (basal forebrain area, BF) 在睡眠觉醒行为中扮演着重要的角色,该区域神经元类型多样,主要有胆碱能 (5%)、GABA 能 (35%)、谷氨酸能 (60%) 细胞。七氟醚是临床上常用的吸入性全身麻醉药物,以往研究表明氟烷、安氟醚和异氟醚均

可增加 GABA 能神经元 GABA 递质从神经末梢的释放^[3],表明 GABA 能神经元可能是吸入麻醉药的作用靶点之一,但全身麻醉药物对抑制性神经元放电活动的影响还少有研究。本研究采用膜片钳技术观察离体条件下七氟醚对基底前脑区抑制性中间神经元-GABA 能神经元电活动的作用,为基底前脑区参与麻醉觉醒的机制提供新证据。

材料与方法

基底前脑区脑片制备 选择雄性 C57BL/6 小鼠 (第四军医大学实验动物中心提供),2~3 周龄,断颈处死后取脑,迅速暴露颅骨、剥离硬脑膜后完整将全脑置于冰水混合的 NMDG 人工脑脊液中约 60 s 以降低脑部温度,缩短“热缺血”时间,随后将全

基金项目:陕西省创新团队(2013KCT-30);国家自然科学基金青年基金项目(81300952)

作者单位:710032 西安市,第四军医大学附属西京医院麻醉与围术期医学科

通信作者:董海龙,Email: hldong6@hotmail.com

脑取出,放入冷却的脑槽中,将脑组织快速沾干水分后用快速粘合剂固定在预冷的切片机置物盘上,灌入 NMDG 人工脑脊液开始进行切片操作,脑片厚度为 $400\ \mu\text{m}$,将切得的脑片使用吸管小心放入已经 36°C 温浴的低钙人工脑脊液中孵育 1 h 并持续通以 $95\%\ \text{O}_2 + 5\%\ \text{CO}_2$ 混合气体,孵育结束后将放置脑片的烧杯从水浴箱中取出,进行电生理记录,脑片持续通气。

试剂及溶液 七氟醚(批号:A020C518),人工脑脊液及电极内液配方试剂均来自 Sigma 公司。NMDG 人工脑脊液配制(mM): 130 NMDG-Cl, 24 NaHCO_3 , 3.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 1.0 CaCl_2 , 5.0 MgCl_2 , 10 Glucose, 调节 $\text{pH}=7.35$, 渗透压= $295\sim 305\ \text{mosmol}$ 。低钙人工脑脊液配制(mM): 130 NaCl, 24 NaHCO_3 , 3.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 0.5 CaCl_2 , 5.0 MgCl_2 , 10 Glucose, 调节 $\text{pH}=7.35$, 渗透压= $295\sim 305\ \text{mosmol}$ 。灌流液配置(mM): 135 NaCl, 21 NaHCO_3 , 3 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 0.6 CaCl_2 , 1.8 MgCl_2 , 15 D-glucose, 调节 $\text{pH}=7.35$, 渗透压= $295\sim 305\ \text{mosmol}$ 。记录抑制性突触后电流(sIPSC)时,灌流液中加入 CNQX ($10\ \mu\text{M}$) + AP5 ($50\ \mu\text{M}$),记录抑制性突触后电流频率(mIPSC)时灌流液中加入 CNQX ($10\ \mu\text{M}$) + AP5 ($50\ \mu\text{M}$) + TTX ($1\ \mu\text{M}$)。电极内液配制: Cs^+ 电极内液(mM): 100 Cs^+ -gluconate, 0.6 EGTA, 5 MgCl_2 , 8 NaCl, 2 ATPNa, 0.3 GTPNa, 40 HEPES, $\text{pH}=7.4$, 渗透压= $280\sim 300\ \text{mosmol}$ 。 K^+ 电极内液(mM): 130 K^+ -gluconate, 0.5 EGTA, 2 MgCl_2 , 5 NaCl, 2 ATPNa, 0.4 GTPNa, 10 HEPES, $\text{pH}=7.4$, 渗透压= $280\sim 300\ \text{mosmol}$ 。

七氟醚灌流液的制备 使用 $95\%\ \text{O}_2 + 5\%\ \text{CO}_2$ 混合气驱动七氟醚溶解于灌流液中,约半小时后达到气液相平衡。灌流采用密闭玻璃容器灌注且麻醉气体持续通入,以保持七氟醚在灌流液中含量的相对稳定。

统计分析 记录的信号经过膜片钳放大器 4 KHz 进行滤波,采样频率为 10 KHz,数据采集和记录使用 Axon laboratory 的 Clampex 10.0 软件,分析软件使用 Mini analysis 6.0.7 (sIPSCs/mIPSCs Events),检测结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,自发放电变化采用重复测量方差分析, $P < 0.001$ 为差异有统计学意义,其他同一细胞自身前后对照采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

基底前脑区抑制性中间神经元的判定 形态学方面,抑制性中间神经元的一般形态明显小于锥体神经元,多为圆形或橄榄形,并且细胞长轴一般与电极方向平行;电生理特性方面,抑制性中间神经元动作电位形状较其他神经元更为“尖耸”,并且伴有明显的“后超极 AHP ($> 10\ \text{mV}$) 和后除极 ADP ($> 0.25\ \text{mV/ms}$)”的同时没有“频率适应”现象(图 1)。

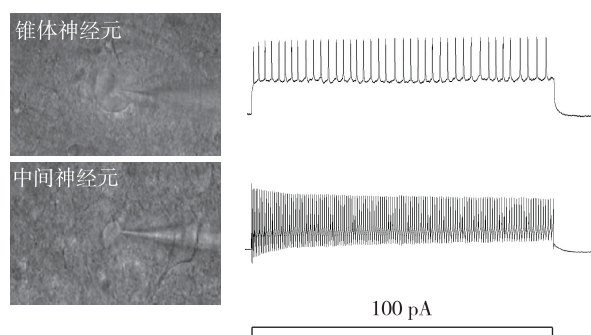
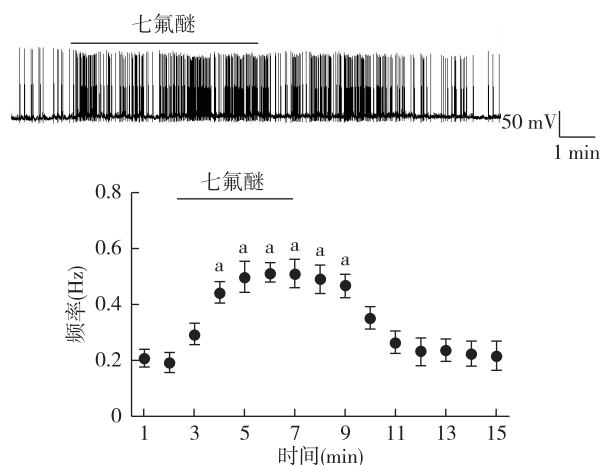


图 1 神经元类型判定

七氟醚对中间神经元自发放电的影响 电流钳模式下,采用 K^+ 电极内液,记录神经元自发放电,给药前动作电位频率为 $(0.20 \pm 0.04)\ \text{Hz}$,七氟醚处理后动作频率为 $(0.45 \pm 0.06)\ \text{Hz}$,前后对照表明:七氟醚可以使中间神经元自发放电频率明显增加($P < 0.001$)(图 2)。



注:与前 2 min 比较,* $P < 0.001$

图 2 七氟醚对中间神经元自发放电的影响 ($n=6$)

七氟醚对电流刺激下中间神经元电活动的影响 电流钳模式下,给予中间神经元 $80\ \text{pA}$ 恒定电流,给药前动作电位的数量为 27.1 ± 2.8 ,七氟醚处

理后动作电位的数量为 38.2 ± 0.9 , 前后对照表明: 七氟醚可以明显增加中间神经元去极化电流引起的动作电位频率 ($P < 0.05$) (图 3)。

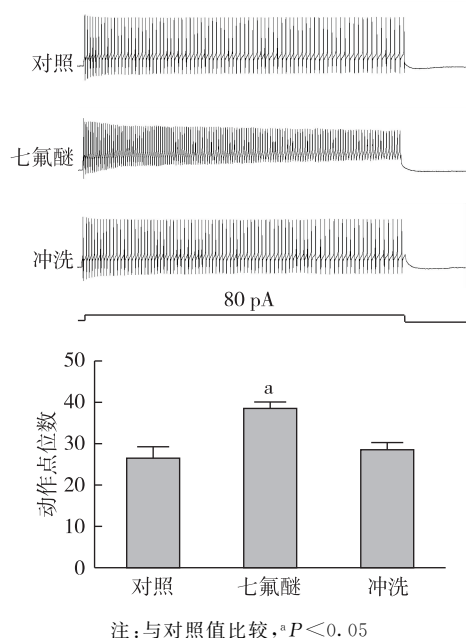


图 3 七氟醚对电流刺激下中间神经元电活动的影响 ($n=5$)

七氟醚对锥体神经元抑制性突触后电流的影响 电压钳模式下, 膜电位钳制在 $+30$ mV, 采用 Cs^+ 电极内液, 记录神经元 sIPSC, 给药前 sIPSC 频率为 (2.0 ± 0.2) Hz, 七氟醚处理后 sIPSC 频率为 (2.8 ± 0.4) Hz, 前后对照表明: 七氟醚可以增加锥体神经元抑制性突触后电流频率 ($P < 0.05$) (图 4)。

七氟醚对锥体神经元微小抑制性突触后电流的影响 电压钳模式下, 膜电位钳制在 $+30$ mV, 采用 Cs^+ 电极内液, 记录神经元 mIPSC, 给药前 mIPSC 频率为 (0.8 ± 0.5) Hz, 七氟醚处理后 mIPSC 频率为 (1.1 ± 0.4) Hz, 前后对照表明: 七氟醚对锥体神经元微小抑制性突触后电流频率无明显影响 (图 5)。

讨 论

睡眠和麻醉虽是两种不同的状态, 但又有很多相似之处, 例如脑电和行为特征^[4,5], 多数全身麻醉药物引起麻醉效应的脑电变化首先是出现纺锤波直至意识消失出现 δ 波, 与睡眠的过程基本相似。以往研究发现, 吸入麻醉药异氟醚可以直接兴奋促睡眠神经元, 而损毁这类神经元后动物会对麻醉剂

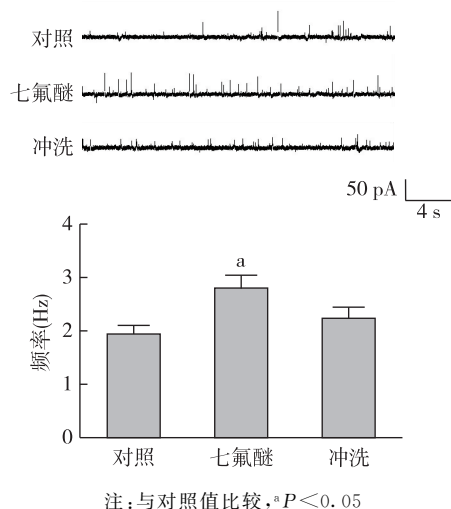


图 4 七氟醚对锥体神经元抑制性突触后电流的影响 ($n=6$)

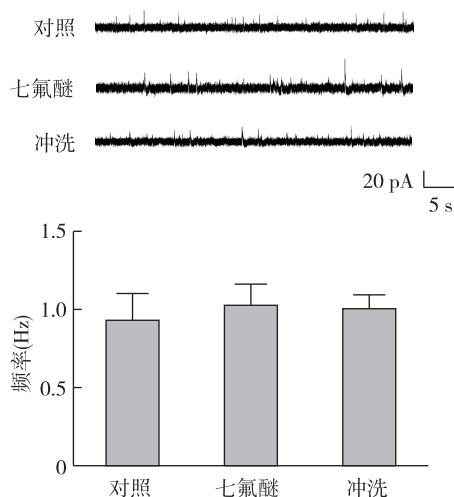


图 5 七氟醚对锥体神经元微小抑制性突触后电流的影响 ($n=6$)

产生耐药^[2]。本研究结果显示, 七氟醚同样可以兴奋基底前脑区抑制性中间神经元。

在大鼠海马中, 全身麻醉药物可阻断 CA1 区锥体细胞和齿状回颗粒神经元的放电活动, 可使 CA1 区神经元超级化, 这种超级化可能是直接作用于神经元细胞膜的结果^[6]。而氟醚、咪达唑仑和丙泊酚等全身麻醉药物可直接增强神经末梢的 GABA 释放, 并可增加 sIPSC 的频率^[7]。本实验中, 七氟醚处理后, 抑制性突触后电流频率增加, 但是动作电位依赖的 mIPSC 未有明显变化, 证明突触前抑制性递质释放增多是由动作电位介导的即 GABA 能中间神经元兴奋引起的, 间接说明突触前 GABA 能抑

制性神经元兴奋性增加。哺乳动物大脑中 GABA 能神经元是主要的释放抑制性神经递质的一类神经元,脑内广泛分布 GABA 能神经元,而哪些部位的 GABA 神经元对吸入麻醉药敏感,不同麻醉药物作用的核团是否有所不同目前尚不清楚。

基底前脑是调节睡眠觉醒行为重要的核团,以往研究结果显示:该区域内一部分 GABA 能神经元与动物的觉醒正相关;而又有一部分的 GABA 能神经元与 NREM 睡眠正相关^[8],这说明了 GABA 能神经元在其中发挥着不同的作用。在麻醉状态下,大部分神经元是处于被抑制的状态,本研究结果显示七氟醚可以使基底前脑区一部分抑制性中间神经元兴奋性增加 ($n=14/48$)。以往有研究发现,基底前脑区中间神经元主要分为两类,分别是神经元表面表达小清蛋白 (parvalbumin, PV) 和生长激素抑制素 (somatostatin, SOM)^[9]。光遗传学技术的运用证实激活小鼠基底前脑区 PV⁺ 神经元可引起小鼠觉醒量增多和 NREM 睡眠减少,而激活基底前脑 SOM⁺ 神经元则引起小鼠觉醒量减少和 NREM 睡眠增多^[10],提示:这两种神经元在睡眠觉醒的调控中发挥了不同的作用。而在麻醉状态下,很可能这两种神经元之间与其周围的胆碱能、谷氨酸能神经元相互作用,共同参与了麻醉效应产生的过程。本实验中同时记录到抑制性中间神经元在通入七氟醚后出现抑制性变化 ($n=25/48$),基底前脑区的 GABA 能中间神经元在麻醉状态下既有被兴奋也有被抑制的,据此推测,这种被兴奋的神经元很可能与促 NREM 睡眠神经元是同一类型,即 SOM⁺ GABA 能神经元,而被抑制的神经元可能是促觉醒类型,即 PV⁺ GABA 能神经元。由此可以推断,在麻醉状态下,除了基底前脑胆碱能及谷氨酸能神经元被抑制之外,基底前脑部分 GABA 能神经元兴奋释放 GABA,协同发挥麻醉效应。这些推论还需要进一步实验来证实。

综上所述,本实验通过运用膜片钳技术证实基底前脑区抑制性中间神经元参与了七氟醚引起的麻醉效应,为七氟醚麻醉机制的研究提供参考。

参 考 文 献

- [1] 罗竺欣, 张宇, 喻田. 全身麻醉药靶点研究的新进展. 临床麻醉学杂志, 2015, 31 (6): 619-620.
- [2] Moore JT, Chen J, Han B, et al. Direct activation of sleep-promoting VLPO neurons by volatile anesthetics contributes to anesthetic hypnosis. *Curr Biol*, 2012, 22 (21): 2008-2016.
- [3] Westphalen RI, Hemmings HC Jr. Volatile anesthetic effects on glutamate versus GABA release from isolated rat cortical nerve terminals: basal release. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 316 (1): 208-215.
- [4] Lydic R, Baghdoyan HA. Sleep, anesthesiology, and the neurobiology of arousal state control. *Anesthesiology*, 2005, 103 (6): 1268-1295.
- [5] Franks NP. General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nat Rev Neurosci*, 2008, 9 (5): 370-386.
- [6] Ishizeki J, Nishikawa K, Kubo K, et al. Amnestic concentrations of sevoflurane inhibit synaptic plasticity of hippocampal CA1 neurons through gamma-aminobutyric acid-mediated mechanisms. *Anesthesiology*, 2008, 108 (3): 447-456.
- [7] Banks MI, White JA, Pearce RA. Interactions between distinct GABA (A) circuits in hippocampus. *Neuron*, 2000, 25 (2): 449-457.
- [8] Hassani OK, Lee MG, Henny P, et al. Discharge profiles of identified GABAergic in comparison to cholinergic and putative glutamatergic basal forebrain neurons across the sleep-wake cycle. *J Neurosci*, 2009, 29 (38): 11828-11840.
- [9] Zaborszky L, Duque A. Local synaptic connections of basal forebrain neurons. *Behav Brain Res*, 2000, 115 (2): 143-158.
- [10] Xu M, Chung S, Zhang S, et al. Basal forebrain circuit for sleep-wake control. *Nat Neurosci*, 2015, 18 (11): 1641-1647.

(收稿日期:2016-12-02)