

· 实验研究 ·

异氟醚对老年大鼠认知功能及大脑颞叶 GABA 受体 1 和 NMDA 受体 2B 表达的影响

曹高亚 吴倍 邢珍 焦保良 李福龙 滕金亮 王新生

【摘要】 目的 观察吸入不同浓度异氟醚后老年大鼠空间记忆以及脑右侧颞叶 γ -氨基丁酸受体 1 (GABAR1) 和 N-甲基-D-天冬氨酸受体 2B (NMDAR2B) 表达的变化。**方法** 雄性 SD 老年大鼠 90 只, 9 月龄, 随机分为对照组 (C 组, $n=10$) 和实验组 ($n=80$)。C 组吸入室温空气, 实验组按照异氟醚浓度和吸入持续时间分为 S1 组 (1.5%-2 h)、S2 组 (2.5%-2 h)、S3 组 (1.5%-4 h) 和 S4 组 (2.5%-4 h)。各组均分为两组分别在麻醉后 1、7 d 进行 Morris 水迷宫实验, 采用 RT-PCR 技术和免疫荧光技术检测右侧脑颞叶 GABAR1 和 NMDAR2B 的 mRNA 表达和蛋白含量。**结果** 与对照组比较, 异氟醚吸入 1 d 后 S1、S2、S3、S4 组的空间记忆能力伴随着药物浓度升高和吸入持续时间延长出现持续下降, 颞叶中 GABAR1 的 mRNA 表达和蛋白含量明显升高, NMDAR2B 的 mRNA 表达和蛋白含量明显降低 ($P<0.01$)。异氟醚吸入 7 d 后, S1、S2、S3 组大鼠的空间记忆能力与对照组差异无统计学意义, S4 组明显低于对照组和其他三组 ($P<0.01$); S1、S2、S3 组 GABAR1 和 NMDAR2B 的 mRNA 表达和蛋白含量与对照组差异无统计学意义; 与对照组比较, S4 组 GABAR1 的 mRNA 表达和蛋白含量明显升高, NMDAR2B 的 mRNA 表达和蛋白含量明显降低 ($P<0.01$)。**结论** 持续吸入异氟醚对空间记忆能力的影响显著, 而且长时间高浓度的吸入方式造成的影响时间较长。这种影响与脑颞叶中 GABAR1 和 NMDAR2B 等神经递质受体的表达相关。

【关键词】 异氟醚; Morris 水迷宫; γ -氨基丁酸受体 1; N-甲基-D-天冬氨酸受体 2B; 颞叶

Expression of GABAR1 and NMDAR2B in aged rat cerebral temporal lobes after isoflurane inhalation

CAO Gaoya, WU Bei, XING Zhen, JIAO Baoliang, LI Fulong, TENG Jinliang, WANG Xinsheng. Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

Corresponding author: WANG Xinsheng, Email: wxinsheng1968@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of different concentration and inhalation duration time of isoflurane on cognitive performance and the expression of GABAR1 and NMDAR2B in aged SD rat cerebral temporal lobes. **Methods** Aged male SD rats (9 months) were randomly divided into control group ($n=10$) and test group ($n=80$). The control group received air at room temperature. Test groups were divided into four groups: group S1 (1.5%-2 h), group S2 (2.5%-2 h), group S3 (1.5%-4 h), group S4 (2.5%-4 h) according to isoflurane concentration and inhalation duration time. Every group was equally divided into two groups and Morris water maze test was performed day 1 and day 7 after isoflurane inhalation. Then the right temporal lobe was gathered and the mRNA transcription and protein expression of GABAR1 and NMDAR2B were detected by RT-PCR and Immunofluorescence technique. **Results** One day after isoflurane inhalation, accompanied with increased isoflurane concentration and inhalation duration, the spatial memory ability of every test group decreased continually, and the mRNA transcription and protein expression of GABAR1 increased and the mRNA transcription and protein expression of NMDAR2B decreased compared with control group ($P<0.01$). Seven days after isoflurane inhalation, the spatial memory ability of group S4 decreased, the mRNA transcription and protein expression of both GABAR1 increased, the mRNA transcription and protein expression of NMDAR2B decreased compared with control group and the other test groups ($P<0.01$). There was no significant difference between the control group and groups S1, S2, S3. **Conclusion** Continuous inhalation of isoflurane has great effects on spatial memory ability. And impaired spatial memory by isoflurane inhalation of high concentration with long duration is present in a long time. Thoses are related with the mRNA transcription and protein expressions of GABAR1 and NMDAR2B in cerebral temporal lobe.

基金项目: 河北北方学院自然科学研究计划项目 (120176)

作者单位: 075000 张家口市, 河北北方学院

通信作者: 王新生, Email: wxinsheng1968@sina.com

【Key words】 Isoflurane; Morris water maze; GABAR1; NMDAR2B; Temporal lobe

颞叶作为人脑的主要结构之一,具有重要的生理功能,其与记忆、联想、比较等高级神经活动有关。Wang 等^[1]研究表明前颞叶切除后的患者,术后记忆功能在短期内有降低。异氟醚作为一种临床常用吸入麻醉药,其与术后认知功能障碍 (postoperative cognitive dysfunction, POCD) 的关系一直是研究的热点。然而各种研究始终聚集在对海马区的影响上,而对颞叶的研究较少。本实验拟对吸入不同浓度异氟醚后大鼠的记忆能力的变化以及脑颞叶 γ -氨基丁酸受体 1 (GABAR1) 和 N-甲基-D-天冬氨酸受体 2B (NMDAR2B) 的表达进行观察,探讨脑颞叶在学习记忆中的作用以及异氟醚对其的影响。

材料与方法

实验材料 SPF 级雄性 SD 老年大鼠 (购自北京维通利华), 9 月龄, 温度 20~24℃, 湿度 50%~60%, 动物室饲养 2 周以适应实验室环境。异氟醚标准品 (HARVEY, 批号: HZB1208)。羊抗鼠 GABAR1 抗体 (Santa Cruz), Alexa Fluor488 标记驴抗羊 IgG 抗体 (Abcam); 兔抗鼠 NMDAR2B 抗体 (Abcam), FITC 标记羊抗兔 IgG 抗体 (Abcam); Trizol (Invitrogen), SuperReal PreMix Plus (SYBR Green), FastQuant RT Kit (TIANGEN)。

模型制备 参考徐智等^[2]的方法, 采用 D-半乳糖 0.125 g·kg⁻¹·d⁻¹ 腹腔注射, 连续注射 45 d 制备衰老大鼠模型。

动物分组 参照杨卫国等^[3]的方法, 使用中国科学院药物研究所研制的 Morris 水迷宫对衰老 SD 大鼠模型进行 Morris 水迷宫训练, 筛选因视力差影响记忆形成的大鼠。选取符合要求的 SD 衰老大鼠模型 90 只, 随机分为对照组 (C 组, $n=10$) 和实验组 ($n=80$)。实验组采用美国 MATRX 小动物麻醉机进行异氟醚麻醉, 对照组吸入同等时间的空气。实验组按照药物吸入方式分为: S1 组: 吸入 1.5% 异氟醚 2 h, S2 组: 吸入 2.5% 异氟醚 2 h, S3 组: 吸入 1.5% 异氟醚 4 h, S4 组: 吸入 2.5% 异氟醚 4 h, 每组 20 只。

观察指标 Morris 水迷宫对衰老 SD 大鼠模型进行 Morris 水迷宫训练, 定位航行实验测试大鼠登上平台的时间即逃避潜伏期, 空间探索实验记录大鼠在 90 s 内穿越原平台所在位置的次数。按照水迷宫测试时间, 观察每组药物吸入后 1 d 和药物吸入后 7 d 的定位航行实验及空间探索实验结果。

实验标本制备 水迷宫测试 2 h 后, 20% 乌拉坦腹腔麻醉, 各组随机选取 5 只进行生理盐水灌注, 冰上取右侧颞叶脑组织, 液氮冷冻, -80℃ 保存; 另 5 只进行 4% 多聚甲醛灌注固定, 采取右侧脑颞叶组织, 4% 多聚甲醛浸泡固定 24 h, 常规脱水、石蜡包埋、制片。

GABAR1 和 NMDAR2B mRNA 转录水平检测 -80℃ 取出各组右侧颞叶, 液氮研磨, Trizol 法提取组织总 RNA, 紫外吸收测定法检测 RNA 质量, 将达标的 RNA 按反转录试剂盒说明反转录为 cDNA, 最后进行 RT-PCR。引物设计和合成由 TAKARA 完成 (表 1)。采用 ABI7300 Real-Time 检测仪完成 Q-PCR, 反应体系参照 Yu 等^[4]方法。通过溶解曲线判定扩增产物特异性, 以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算 mRNA 的相对表达水平。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物

基因	引物序列 (5'-3')
β -actin	F GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA
	R GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG
GABAR1	F CTCTGACTATCTTTGGGCCTGGAC
	R TCCTCGTGAAGACAGTGGTGTG
NMDAR2B	F TGGCTATCCTGCAGCTGTTTG
	R TGGCTGCTCATCACCTCATTC

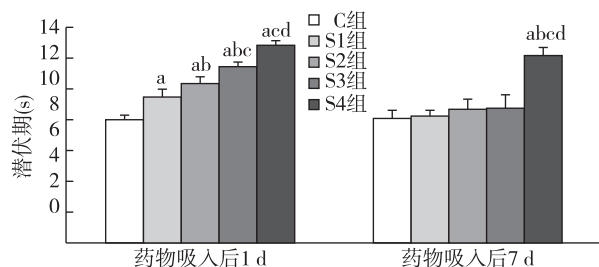
GABAR1 和 NMDAR2B 蛋白含量检测 脑组织切片的制备参考乔霖等^[5]的方法。荧光显微镜观察, 细胞核被染成蓝色, GABAR1 和 NMDAR2B 的阳性表达的细胞膜被染成绿色。IPP 6.0 图像分析系统, 采集相同区域的阳性细胞的荧光积分光密度值 (IOD) 作为定量表达结果。

统计分析 采用 SPSS 17.0 进行统计学分析。正态分布计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

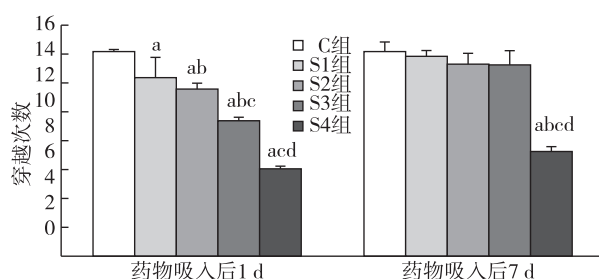
Morris 水迷宫实验 与对照组比较, 吸入异氟醚后 1 d S1、S2、S3、S4 组大鼠逃避潜伏期明显延长, 空间探索穿越次数明显减少 ($P<0.01$), 且 S1、S2、S3、S4 组呈现逐渐延长 ($P<0.01$)。药物吸入

后 7 d, S4 组大鼠定位航行潜伏期明显长于其他四组, 空间探索穿越次数明显少于其他四组 ($P < 0.01$) (图 1, 2)。



注: 与 C 组比较, $^a P < 0.01$; 与 S1 组比较, $^b P < 0.01$; 与 S2 组比较, $^c P < 0.01$; 与 S3 组比较, $^d P < 0.01$

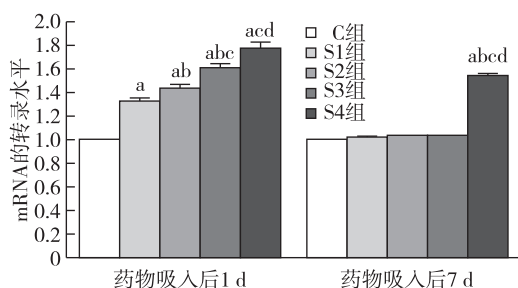
图 1 五组大鼠潜伏期的比较



注: 与 C 组比较, $^a P < 0.01$; 与 S1 组比较, $^b P < 0.01$; 与 S2 组比较, $^c P < 0.01$; 与 S3 组比较, $^d P < 0.01$

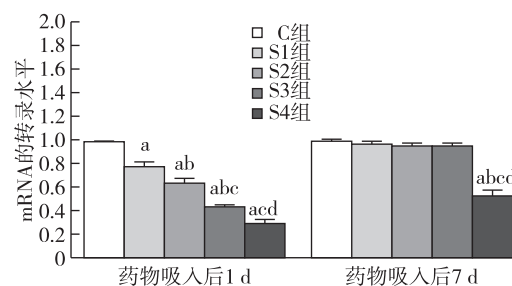
图 2 五组大鼠穿越次数的比较

GABAR1 mRNA 和 NMDAR2B mRNA 转录水平 与对照组比较, 药物吸入后 1 d S1、S2、S3、S4 组 GABAR1 mRNA 表达明显上调, NMDAR2B mRNA 明显下调 ($P < 0.01$); S1、S2、S3、S4 组 GABAR1 mRNA 表达呈现逐渐上调, NMDAR2B mRNA 表达逐渐下调 ($P < 0.01$)。药物吸入后 7 d, S4 组 GABAR1 mRNA 表达明显高于其他四组, NMDAR2B mRNA 表达明显低于其他四组 ($P < 0.01$) (图 3, 4)。



注: 与 C 组比较, $^a P < 0.01$; 与 S1 组比较, $^b P < 0.01$; 与 S2 组比较, $^c P < 0.01$; 与 S3 组比较, $^d P < 0.01$

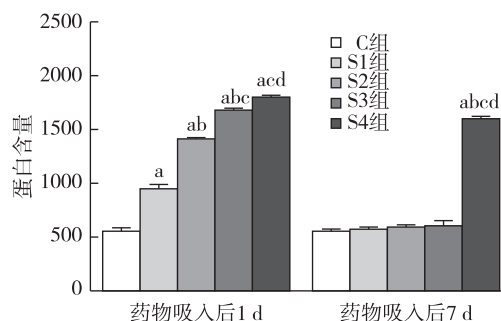
图 3 五组大鼠 GABAR1 mRNA 表达水平的比较



注: 与 C 组比较, $^a P < 0.01$; 与 S1 组比较, $^b P < 0.01$; 与 S2 组比较, $^c P < 0.01$; 与 S3 组比较, $^d P < 0.01$

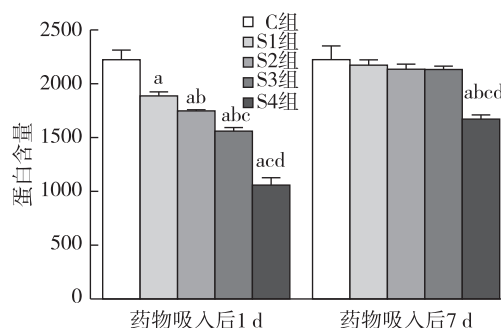
图 4 五组大鼠 NMDAR2B mRNA 表达水平的比较

GABAR1 和 NMDAR2B 蛋白含量 与对照组比较, 药物吸入后 1 d S1、S2、S3、S4 组 GABAR1 蛋白含量明显升高, NMDAR2B 蛋白含量明显降低 ($P < 0.01$); 且 S1、S2、S3、S4 组 GABAR1 蛋白含量逐渐升高, NMDAR2B 蛋白含量逐渐降低 ($P < 0.01$)。药物吸入后 7 d, S4 组 GABAR1 蛋白含量明显高于其他四组, NMDAR2B 蛋白含量明显低于其他四组 ($P < 0.01$) (图 5~7)。



注: 与 C 组比较, $^a P < 0.01$; 与 S1 组比较, $^b P < 0.01$; 与 S2 组比较, $^c P < 0.01$; 与 S3 组比较, $^d P < 0.01$

图 5 五组大鼠 GABAR1 蛋白含量的比较



注: 与 C 组比较, $^a P < 0.01$; 与 S1 组比较, $^b P < 0.01$; 与 S2 组比较, $^c P < 0.01$; 与 S3 组比较, $^d P < 0.01$

图 6 五组大鼠 NMDAR2B 蛋白含量的比较

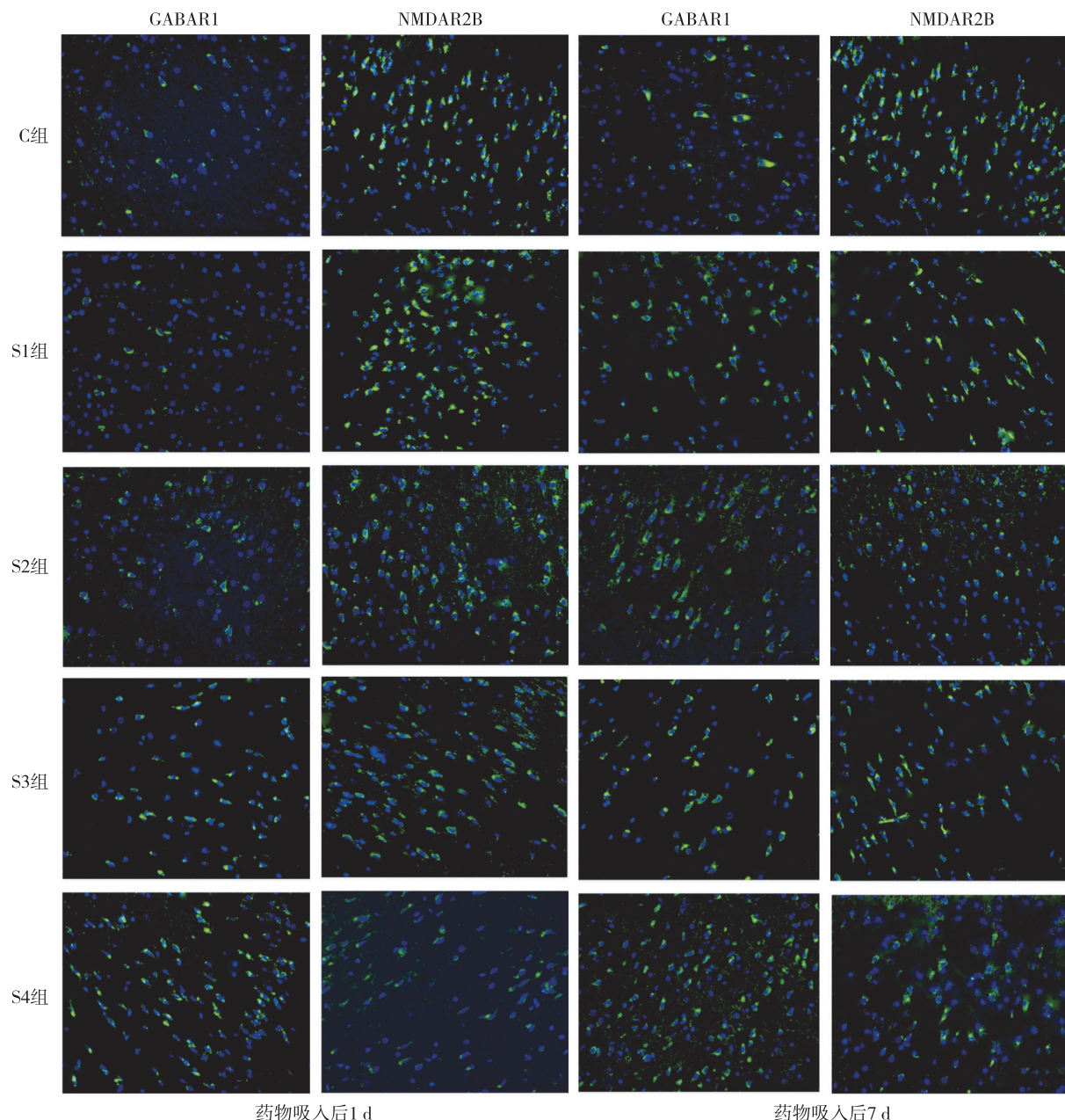


图7 五组大鼠免疫荧光染色显示 GABAR1 和 NMDAR2B 蛋白含量 ($\times 200$)

讨 论

谷氨酸作为神经中枢系统中最重要兴奋性递质之一,广泛分布在大脑皮质和海马中,其受体主要分为离子型受体和代谢型受体。其中 NMDA 受体作为离子型受体的一种,在中枢神经系统的记忆形成中参与了学习记忆、突触可塑性等形成的过程。NMDAR2B 作为 NMDA 的亚单位,其与中枢系统的发育及学习记忆密切相关,并且是突触长时程增强效应 (LTP) 必不可少的受体^[5]。GABA 受体是中枢抑制性受体,全麻药物在很大程度上是通

过 GABA 受体 (主要是 GABAR1 受体) 离子通道产生全麻作用。LTP 是记忆形成的神经生理学机制,已有研究显示,异氟醚可以通过抑制小鼠的海马区的 LTP 从而影响其突触功能导致记忆功能的损害^[6],并且有报道显示麻醉药物可以通过激活 GABAR1 受体来抑制海马区及颞叶 LTP 的形成,进而抑制大鼠的学习能力^[7~9]。关于吸入麻醉对认知功能的影响,一直存在很多不同的意见。早期有大量的研究显示吸入麻醉会引起认知损伤,如 Dong 等^[10]指出异氟醚能够通过减少 NMDAR2B 的表达从而影响认知功能,这与本实验部分结果相符,然

而近期的研究表明吸入麻醉也可能会引起认知功能的改善,这种改善与异氟醚的低浓度吸入相关^[11]。Morris 水迷宫往往被用来作为检测空间记忆能力的方法,可以评估啮齿类依赖海马的空间记忆能力。本实验结果提示:异氟醚的吸入对大鼠空间记忆能力有损害,并且伴随着药物浓度的增高和持续时间的延长,损伤进一步加重;药物作用持续时间比药物浓度对大鼠空间记忆能力的损伤影响更加显著。这种表现与大鼠颞叶中,GABAR1 和 NMDAR2B 的 mRNA 转录水平及蛋白表达是相一致的。

综上所述,异氟醚的持续吸入时间对空间记忆能力的影响比药物浓度的影响更加显著,这种影响在短期时间内尤其明显,而长时间高浓度的吸入方式影响的时间较长。这种影响与脑颞叶中 GABAR1 和 NMDAR2B 等神经递质受体的表达相关。这一结论有助于在临床应用异氟醚过程中提供辅助性建议,但是对于影响颞叶的神经递质受体表达的信号转导通路的变化,以及临床麻醉方式的把握上仍需要进一步的探索。

参 考 文 献

- [1] Wang SY, Sun ZH, Zhou WJ, et al. Short-term effects of postoperative cognition and gender differences in refractory temporal lobe epilepsy. *Epileptol Electroneurophysiol*, 2015, 24 (2): 69-74.
- [2] 徐智,吴国明,钱桂生,等. 大鼠衰老模型的初步建立. 第三军医大学学报, 2003, 25 (4): 312-315.
- [3] 杨卫国,廖淳杰,谢玉波. 新生大鼠丙泊酚麻醉对成年后海马特异性核蛋白表达的影响. *临床麻醉学杂志*, 2013, 29 (7): 689-69.
- [4] Yu X, Liu S, Li J, et al. MicroRNA-572 improves early post-operative cognitive dysfunction by down-regulating neural cell adhesion molecule 1. *PLoS One*, 2015, 10 (2): e0118511.
- [5] 乔霖,邢珍,赵薇,等. 丙泊酚对老年大鼠脑颞叶 GABAR1 和 NMDAR2B 表达的影响. *临床麻醉学杂志*, 2015, 31 (12): 1228-1231.
- [6] Yamakura T, Shimoji K. Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Prog Neurobiol*, 1999, 59 (3): 279-298.
- [7] Simon W, Hapfelmeier G, Kochs E, et al. Isoflurane blocks synaptic plasticity in the mouse hippocampus. *Anesthesiology*, 2001, 94 (6): 1058-1065.
- [8] Nagashima K, Zorumski CF, Izumi Y. Propofol inhibits long-term potentiation but not long-term depression in rat hippocampal slices. *Anesthesiology*, 2005, 103 (2): 318-326.
- [9] 田海涛,李海鹏,王志萍. 海马神经元 γ -氨基丁酸 a 受体在异氟醚导致新生大鼠认知功能障碍中的作用. *中华麻醉学杂志*, 2012, 32 (11): 1347-1349.
- [10] Dong Y, Wu X, Zhang G, et al. Isoflurane facilitates synaptic NMDA receptor endocytosis in mice primary neurons. *Curr Mol Med*, 2013, 13 (4): 488-498.
- [11] Liu J, Wang P, Zhang X, et al. Effects of different concentration and duration time of isoflurane on acute and long-term neurocognitive function of young adult C57BL/6 mouse. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7 (9): 5828-5836.

(收稿日期:2016-08-30)

· 消息 ·

《中国科技期刊引证报告(核心版)》2016 年版发布

2016 年 10 月 12 日,中国科学技术信息研究所在北京国际会议中心发布了 2016 年版《中国科技期刊引证报告(核心版)》。共有 1985 种期刊入选本年度中国科技核心期刊。本刊核心总被引频次 3236,核心影响因子 1.364,在外科学综合类期刊中分别排在第 3 和第 2 位,在所有核心期刊中分别排在第 157 和第 107 位。会上,同时公布了 2016 年度领跑者 5000—中国精品科技期刊顶尖论文(F5000)。据统计,2011~2015 年累积被引用次数达到其所在学科领域和发表年度基准线以上的论文有近 2 万篇。其中通过定量分析方式获得精品期刊顶尖论文提名的论文共有 2 225 篇。本刊有 20 篇论文入选。