

· 实验研究 ·

艾芬地尔预处理对七氟醚导致的幼年大鼠学习记忆和认知能力损伤的保护作用及机制

田海涛 田苹 张宝娟 王月兰 宋成伟 李海鸥

【摘要】 目的 观察 N-甲基-D-天冬氨酸亚型受体 (NR2B) 选择性拮抗剂艾芬地尔对七氟醚导致的幼年大鼠学习、记忆和认知能力损伤的保护作用及机制。**方法** SD 大鼠 28 只, 7 日龄, 体重 15~18 g, 采用随机数字表法, 将大鼠分为四组, 每组 7 只: 对照组 (C 组), 腹腔注射生理盐水 0.2 ml; 艾芬地尔组 (I 组), 腹腔注射 N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 亚型受体 NR2B 选择性拮抗剂艾芬地尔 5.0 mg/kg; 七氟醚组 (S 组), 吸入七氟醚前 2 h 腹腔注射生理盐水 0.2 ml, 持续吸入 2.0% 七氟醚 4 h; 艾芬地尔+七氟醚组 (IS 组), 对应时点腹腔注射艾芬地尔 5.0 mg/kg, 持续吸入 2.0% 七氟醚 4 h。给药后 3 周处死大鼠, 取其海马切片, 行电生理实验, 在 Schaffer 侧支上给予高频成串刺激 (100 Hz, 4 个脉冲), 待值群峰电位 (population spike, PS) 稳定后, 每隔 10 分钟检测单通道刺激后值群峰电位振幅 (population spike amplitude, PSA) 值和记录长时程增强 (long-term potentiation, LTP), 诱发成功情况。**结果** 与 C 组比较, 在单通道刺激后各时点 S 组 PSA 值明显减小, LTP 诱发成功率明显降低 ($P < 0.01$); 与 S 组比较, 在单通道刺激后各时点 IS 组 PSA 值明显增大, LTP 诱发成功率明显升高 ($P < 0.01$)。**结论** NR2B 受体参与七氟醚导致的新生大鼠认知功能障碍, 艾芬地尔 5.0 mg/kg 预处理有助于改善其神经毒性, 产生脑保护作用。

【关键词】 七氟醚; N-甲基-D-天冬氨酸亚型 2B 受体; 认知障碍; 长时程增强

Protective effects of pretreatment with ifenprodil on learning, memory and cognitive dysfunction induced by sevoflurane in neonatal rats TIAN Haitao, TIAN Ping, ZHANG Baojuan, WANG Yuelan, SONG Chengwei, LI Haiou. Department of Anesthesiology, The First Renmin Hospital of Jining, Jining 272100, China

Corresponding author: Li Haiou, Email: lihaiou2772@163.com

【Abstract】 Objective To evaluate the role and mechanism of ifenprodil, which is the selective antagonist of N-methyl-D-aspartic acid subtype receptor NR2B, in sevoflurane-induced cognitive dysfunction in neonatal rats. **Methods** Twenty-eight 7-day-old Sprague Dawley rats, weighing 15-18 g, were randomly divided into 4 groups ($n=7$ each): control group (group C), ifenprodil group (group I), sevoflurane group (group S) and ifenprodil+sevoflurane group (group IS). Normal saline 0.2 ml was injected intraperitoneally in group C. Specific NR2B receptor antagonist ifenprodil 5 mg/kg was injected intraperitoneally at the corresponding time points in group I. Normal saline 0.2 ml was injected intraperitoneally and 2.0% sevoflurane was inhaled for 4 h in group S. Ifenprodil 5 mg/kg was injected intraperitoneally 2 h before sevoflurane inhalation, and 2.0% sevoflurane was inhaled for 4 h in group IS. The rats were then sacrificed 3 weeks after administration, their brains were immediately removed and hippocampal slices were prepared for electrophysiological experiments. The value of population spike amplitude (PSA) and long-term potentiation (LTP) were measured every 10 minutes. Induced LTP was recorded. **Results** Compared with group C, the values of PSA and rates of induced LTP were significantly decreased in group S ($P < 0.01$). The values of PSA and rates of induced LTP were significantly increased in group IS than those in group S ($P < 0.01$). **Conclusion** NR2B receptor is involved in sevoflurane-induced cognitive dysfunction in the neonatal rats. Pretreatment with ifenprodil 5.0 mg/kg can improve the neurotoxicity and protect the brain.

【Key words】 Sevoflurane; NR2B; Cognitive dysfunction; Long-term potentiation

作者单位: 266021 青岛大学医学院麻醉学系 [田海涛, 现在济宁市第一人民医院麻醉科]; 济宁市第一人民医院麻醉科 (张宝娟、宋成伟、李海鸥); 济宁市任城区第一妇幼保健院产科 (田苹); 济南千佛山医院麻醉科 (王月兰)

通信作者: 李海鸥, Email: lihaiou2772@163.com

在啮齿类、猪和灵长类哺乳动物的胚胎和新生儿期单独或联合应用七氟醚可导致 6 岁以下, 特别是 3 岁内儿童学习、记忆和认知障碍^[1,2], 其作用机制尚未明确。既往研究显示, N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA)

受体在学习、记忆、认知等环节中起重要作用,而 NR2B 亚型在学习、记忆和认知方面不可或缺,被命名为聪明基因^[3],七氟醚对 NR2B 的抑制作用,可能是影响学习记忆能力的一种中枢机制。NR2B 受体的选择性拮抗剂艾芬地尔的神经保护作用已被多项研究证实^[4,5],而作为神经保护剂,艾芬地尔是否可以减轻麻醉药导致的小儿的神经系统损伤的探索,具有重要的临床意义,本研究拟评价海马神经元 NR2B 受体在七氟醚导致新生大鼠认知功能障碍中的作用,为明确其可能机制提供参考。

材料与方 法

实验分组 SD 大鼠 28 只,7 日龄,体重 15~18 g,由青岛大学动物中心提供。随机分为四组:对照组(C 组)、艾芬地尔组(I 组)、七氟醚组(S 组)、艾芬地尔+七氟醚组(IS 组),每组 7 只。

模型制备 C 组腹腔注射生理盐水 0.2 ml;I 组腹腔注射 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)亚型受体 NR2B 选择性拮抗剂艾芬地尔 5.0 mg/kg;S 组吸入七氟醚前 2 h 腹腔注射生理盐水 0.2 ml,将大鼠置于实验箱中,采用 HPM1205A 气体监测仪监测箱内七氟醚、O₂ 和 CO₂ 浓度,持续吸入 2.0%七氟醚 4 h,经进气孔向实验箱内通入 30%O₂-5%CO₂ 混合气体 4 h;IS 组腹腔注射艾芬地尔 5.0 mg/kg,持续吸入 2.0%七氟醚 4 h 和相应混合气体。

实验方法 给药后 3 周时七氟醚麻醉下断头取脑,小心剥离左侧海马,取中间 1/3,用振动切片机沿海马槽走向连续切成 300 μ m 薄片 6~8 片,将脑片移至孵育槽的人工脑脊液中并持续通入 95%O₂-5%CO₂ 的混合气体,放于 20℃室温半小时,随后放入 32℃水浴箱中孵育 90 min 后开始实验,采用静置-灌流两用界面式浴槽,用人工脑脊液(ACSF)以 2~3 ml/min 的速率持续灌流,浴槽温度保持在 32℃。ACSF 成分(mmol·L⁻¹):NaCl 124.0、KCl 3.6、NaH₂PO₄ 1.25、MgSO₄ 2.2、NaHCO₃ 26.0、CaCl₂ 2.2、葡萄糖 10.0,所用试剂均为分析纯,以双蒸水配制,通入 30%O₂-5%CO₂ 混合气体后 pH 值为 7.30~7.40。在 CX21 解剖显微镜下将刺激电极置于海马 Schaffer 侧支纤维,记录电极(玻璃微电极,电阻 4~5 M Ω 内充 NaCl 2 mol/L)置于 CA₁ 区锥体细胞层。由电子刺激器提供单通道脉冲刺激,经隔离器输送到刺激电极,输出信号经 MEE8301 微电极放大器倍 10 倍高增益放大器,放大后显示在 Vc10 双道记忆示波器上,同时通过 X-Y 记录仪记

录。当单通道刺激(波宽 0.2 ms,电流强度 26~70 mA)海马 Schaffer 侧支时,可在 CA₁ 区记录到群峰电位(PS)。

观察指标 选取波幅在 3 mV 以上海马脑片以保证脑片活性,以三次正常 PSA(群峰电位振幅)平均值作为基础值,用引起 PSA 最大反应 50%强度为实验刺激强度,在 Schaffer 侧支上给予高频串刺激(100 Hz,4 个脉冲),待 PS 稳定后,分别记录 10、20、30 和 40 min 单通道刺激后 PSA 值,每只大鼠记录优选 3 张海马脑片,故每组样本量为 21 个,取各组 PSA 平均值。成功诱发 LTP 海马脑片数占本组脑片总数的百分数(LTP 诱发成功的标准为 PS 增高幅度 $\geq$ 20%,维持时间 $\geq$ 30 min)。

统计分析 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组内比较采用重复测量数据方差分析,组间比较采用 q 检验;率的比较采用两样本率的 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

与 C 组比较,在单通道刺激后各时点 S 组 PSA 值明显减小,S 组 LTP 诱发成功率明显降低($P < 0.01$);I 组和 IS 组组间比较差异无统计学意义。与 S 组比较,在单通道刺激后各时点 IS 组 PSA 值明显增大,IS 组 LTP 诱发成功率明显升高($P < 0.01$)(表 1、2)。

表 1 四组大鼠海马脑片单通道刺激后不同时点 PSA 值的比较(mV, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	10 min	20 min	30 min	40 min
C 组	21	7.1 $\pm$ 0.8	8.3 $\pm$ 0.6	8.3 $\pm$ 0.5	8.2 $\pm$ 1.2
I 组	21	6.8 $\pm$ 0.8	8.0 $\pm$ 0.8	7.7 $\pm$ 0.3	7.5 $\pm$ 1.5
S 组	21	3.5 $\pm$ 1.0 ^a	2.5 $\pm$ 1.1 ^a	1.9 $\pm$ 1.0 ^a	1.7 $\pm$ 1.3 ^a
IS 组	21	6.9 $\pm$ 1.2 ^b	8.1 $\pm$ 1.5 ^b	7.7 $\pm$ 1.0 ^b	7.4 $\pm$ 1.6 ^b

注:与 C 组比较,^a $P < 0.01$;与 I 组比较,^b $P < 0.01$

表 2 四组大鼠 LTP 诱发成功率的比较

组别	样本量	诱发成功(例)	诱发成功率(%)
C 组	21	20	95
I 组	21	18	85
S 组	21	6	29 ^a
IS 组	21	19	90 ^b

注:与 C 组比较,^a $P < 0.01$;与 I 组比较,^b $P < 0.01$

讨 论

研究表明,7 日龄大鼠其中枢神经系统发育阶段约相当于人类出生后 0~6 个月脑发育时期^[6]。故本研究选择出生后 7 d 大鼠作为研究对象,并结合预实验结果选择艾芬地尔 5 mg/kg 和吸入 2%七氟醚 4 h。

海马是研究学习记忆的重要脑区,因为海马是大脑边缘系统的重要组成部分,参与外界信息向中枢传导的整合,在学习、记忆调节和认知中起着重要作用^[7],脑组织中神经递质和 NR2B 受体结合参与神经元树突的形成,对神经元的可塑性起关键作用^[8],NR2B 在海马 CA1 区的密度最高。新生 7 日龄大鼠长时间吸入七氟醚对海马 CA1 区的 NR2B 的抑制作用,在 28 周时可能产生学习、记忆和认知方面的影响^[9]。预处理是一个行之有效的实验和临床策略,温和的 NMDA 受体拮抗性预处理能增加大脑抑制性伤害的耐受性,是一个较为有效的临床脑保护手段^[10]。国内也有艾芬地尔通过对 NR2B 受体选择性拮抗作用改善异氟烷所致发育期海马神经元毒性,产生保护脑作用的相关报道^[5]。本研究选择艾芬地尔做预处理,观察其对七氟醚麻醉新生 SD 大鼠的影响,探索七氟醚可能的中枢神经毒性机制,为临床七氟醚麻醉脑保护提供基础理论依据。目前 LTP 反映突触水平上信息存储过程,是学习、记忆过程中神经元电生理活动的客观指标^[11]。本研究选择海马 CA1 区,记录 PSA 值和 LTP 诱发成功率。如 PSA 值增大和 LTP 诱发成功率增加,则 CA1 区突触传递功能增强,表明大鼠的学习、记忆和认知能力增强,反之亦然^[12]。本研究结果显示,与 C 组比较,S 组各时点 PSA 值明显减小、LTP 诱发成功率明显降低;与 S 组比较,IS 组各时点 PSA 值明显增大、LTP 诱发成功率明显升高,提示七氟醚对发育期大脑的学习、记忆、认知能力损伤和其抑制 NR2B 受体有关,而 5 mg/kg 的预处理可改善认知功能,这可能与艾芬地尔和 NR2B 受体结合,并使 NR2B 受体反应性增强有关^[13]。本研究依靠电生理指标,实验材料成本低廉,结果直接客观,但其技术难度大,实验环境因素要求高;在实验设计方面还需行为学和分子生物学相关指标加以补充,进而更具体更全面探索 NR2B 受体选择性拮抗剂预处理在七氟醚麻醉过程的神经保护作用机理,为临床提供真正有实用价值的可行方案。

综上所述,NR2B 受体参与了七氟醚导致的新

生大鼠认知功能障碍,艾芬地尔 5.0 mg/kg 预处理有助于改善其神经毒性,产生脑保护作用,而这一结果尚需进一步实验验证。

参 考 文 献

- [1] Zhang MQ, Ji MH, Zhao QS, et al. Neurobehavioural abnormalities induced by repeated exposure of neonatal rats to Solfurane can be aggravated by social isolation and enrichment deprivation initiated after exposure to the anaesthetic. *Br J Anaesth*, 2015, 115 (5): 752-760.
- [2] 孙文波, 张立民, 赵晓春, 等. 不同浓度七氟醚对大鼠原代皮质神经元的影响. *临床麻醉学杂志*, 2016, 32 (5): 480-483.
- [3] Tang Y, Ye M, Du Y, et al. EGFR signaling upregulates surface expression of the GluN2B-containing NMDA receptor and contributes to long-term potentiation in the hippocampus. *Neuroscience*, 2015, 304 (24): 109-121.
- [4] Bird CW, Barto D, Magcalas CM, et al. Ifenprodil infusion in agranular insular cortex alters social behavior and vocalizations in rats exposed to moderate levels of ethanol during prenatal development. *Behav Brain Res*, 2017, 320 (1): 1-11.
- [5] 陈欣, 王伟, 张建芳, 等. 艾芬地尔对异氟烷所致发育期海马神经元毒性的保护作用. *现代生物医学进展*, 2015, 15 (15): 2801-2805.
- [6] Seubert CN, Zhu W, Pavlinec C, et al. Developmental effects of neonatal isoflurane and sevoflurane exposure in rats. *Anesthesiology*, 2013, 119 (2): 358-364.
- [7] Dai S, Perouansky M, Pearce RA. Isoflurane enhances both fast and slow synaptic inhibition in the hippocampus at amnesic concentrations. *Anesthesiology*, 2012, 116 (4): 816-823.
- [8] Zhang XY, Ji F, Wang N, et al. Glycine induces bidirectional modifications in N-methyl-D-aspartate receptor-mediated synaptic responses in hippocampal CA1 neurons. *J Biol Chem*, 2014, 289 (45): 31200-31211.
- [9] 居玲莎, 王星, 罗丹, 等. 海马内 DNA 甲基转移酶在七氟醚所致新生大鼠远期认知功能损伤中的作用. *临床麻醉学杂志*, 2016, 32 (4): 372-375.
- [10] Celso Cstantino L, Tasca CI, Boeck CR, et al. The Role of NMDA receptors in the development of brain resistance through Pre-and PostConditioning. *Aging Dis*, 2014, 5 (6): 430-441.
- [11] Whitehead G, Jo J, Hogg EL, et al. Acute stress causes rapid synaptic insertion of Ca²⁺-permeable AMPA receptors to facilitate long-term potentiation in the hippocampus. *Brain*, 2013, 136 (12): 3753-3765.
- [12] 田海涛, 李海鸥, 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): 1348-1350.
- [13] 刘真真, 金延武, 冯颖, 等. 艾芬地尔预处理对七氟醚致幼年大鼠学习记忆能力损伤的保护作用及机制. *山东医药*, 2016, 56 (29): 28-30.

(收稿日期:2017-03-05)